

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Polysulfatierte Dendrone als Transportvehikel für Enzyme in der Tumorthherapie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Iris Najjar

aus Le Chesnay, Frankreich

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	7
Abstract	9
1. Einleitung	10
1.1. Tumore.....	10
1.1.1. Definition und Epidemiologie	10
1.1.2. Entstehung von Tumoren	10
1.1.3. Tumorthérapien und ihre Limitierungen	11
1.2. Targeted Drug Delivery Systeme	13
1.2.1. Übersicht der Transportsysteme	13
1.2.2. Effiziente Targeted Drug Delivery Systeme: Voraussetzungen.....	14
1.3. Das MacroDel als Targeted Drug Delivery System für Enzyme in der Tumorthérapie.....	17
1.3.1. Das MacroDel: ein Dendron.....	17
1.3.2. Das dendritische Polyglycerolsulfat: ein polydisperses Makromolekül	17
1.3.3. Synthese und Aufbau des MacroDels.....	18
1.3.4. Pharmakokinetische- und dynamische Eigenschaften des MacroDels	20
1.3.5. Das MacroDel als Targeted Drug Delivery System für Enzyme	20
1.4. Ziel der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Materialien	25
2.1.1. Übersicht der Geräte.....	25
2.1.2. Übersicht der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3. Übersicht der Zellkulturmaterialien	27
2.1.4. Übersicht der Zelllinien.....	27
2.2. Übersicht der untersuchten pharmakologischen Substanzen.....	29
2.3. Methoden	31
2.3.1. Allgemeine Zellkultur	31
2.3.2. Quantifizierung der Aufnahme des MacroDels und seiner Konjugate mittels Durchflusszytometrie <i>in vitro</i>	32
2.3.3. Untersuchung der Aufnahme und Elimination des MacroDels <i>in vitro</i>	32
2.3.4. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDels und seiner Konjugate mittels Fluoreszenzmikroskopie <i>in vitro</i>	33
2.3.5. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates durch OATP1B1.....	34
2.3.6. Untersuchung der Zytotoxizität des MacroDels und seiner Konjugate mittels MTT.....	34
2.3.7. Nachweis der Kopplung der MacroDel-Konjugate mittels nativer Gelelektrophorese.....	36
2.3.8. Untersuchung der Enzymaktivität nach Konjugation am MacroDel	38

2.3.9. Untersuchung des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates <i>in vivo</i>	39
2.3.10. Statistische Analyse.....	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels mittels Durchflusszytometrie <i>in vitro</i>	41
3.1.1. Aufnahmescreening	41
3.1.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Aufnahme des MacroDels.....	44
3.1.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Aufnahme des MacroDels	45
3.1.4. Analyse der Aufnahme und Elimination des MacroDels über die Zeit.....	46
3.2. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDels mittels Fluoreszenzmikroskopie <i>in vitro</i>	47
3.3. Untersuchung des MacroDels auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	51
3.3.1. Zytotoxizitätsscreening.....	51
3.3.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Zytotoxizität	52
3.3.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Zytotoxizität.....	53
3.4. Untersuchung des MacroDels <i>in vivo</i>	56
3.5. Untersuchung der MacroDel-RNase Konjugate	59
3.5.1. Nachweis der Konjugation von RNase und RNaseI an das MacroDel	59
3.5.2. Untersuchung der MacroDel-RNase Konjugate auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	62
3.6. Untersuchung der MacroDel-Dornase Konjugate	64
3.6.1. Nachweis der Konjugation der Dornase an das MacroDel	64
3.6.2. Untersuchung der Enzymaktivität der Dornase nach Konjugation	65
3.6.3. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-Dornase Konjugates mittels Durchflusszytometrie <i>in vitro</i>	66
3.6.4. Untersuchung der MacroDel-Dornase Konjugate auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	67
3.7. Untersuchung des MacroDel-ASNase Konjugates.....	70
3.7.1. Untersuchung der Enzymaktivität der ASNase nach Konjugation	70
3.7.2. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Durchflusszytometrie <i>in vitro</i>	71
3.7.3. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Fluoreszenzmikroskopie <i>in vitro</i>	72
3.7.4. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates durch OATP1B1.....	74
3.7.5. Untersuchung des MacroDel-ASNase Konjugates <i>in vivo</i>	75
4. Diskussion	77
4.1. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels mittels Durchflusszytometrie <i>in vitro</i>	77
4.1.1. Aufnahmescreening	77
4.1.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Aufnahme des MacroDels.....	78
4.1.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Aufnahme des MacroDels	79
4.1.4. Analyse der Aufnahme und Elimination des MacroDels über die Zeit.....	80
4.2. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDels mittels Fluoreszenzmikroskopie <i>in vitro</i>	81

4.3. Untersuchung des MacroDels auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	82
4.3.1. Zytotoxizitätsscreening.....	82
4.3.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Zytotoxizität	83
4.3.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Zytotoxizität.....	84
4.4. Untersuchung des MacroDels <i>in vivo</i>	84
4.5. Das MacroDel-RNase Konjugat	87
4.5.1. Nachweis der Konjugation von RNase und RNaseI an das MacroDel	87
4.5.2. Untersuchung der MacroDel-RNase Konjugate auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	87
4.6. Das MacroDel-Dornase Konjugat	88
4.6.1. Nachweis der Konjugation der Dornase an das MacroDel	89
4.6.2. Untersuchung der Enzymaktivität der Dornase nach Konjugation	89
4.6.3. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-Dornase Konjugates mittels Durchflussszytometrie <i>in vitro</i>	90
4.6.4. Untersuchung der MacroDel-Dornase Konjugate auf Zytotoxizität <i>in vitro</i>	91
4.7. Das MacroDel-ASNase Konjugat.....	92
4.7.1. Untersuchung der Enzymaktivität der ASNase nach Konjugation	93
4.7.2. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Durchflussszytometrie <i>in vitro</i>	94
4.7.3. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Fluoreszenzmikroskopie <i>in vitro</i>	95
4.7.4. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates durch OATP1B1.....	95
4.7.5. Untersuchung des MacroDel-ASNase Konjugates <i>in vivo</i>	95
4.8. Fazit: Eignet sich das MacroDel als TDDS für Enzyme?	96
5. Literaturverzeichnis.....	98
Lebenslauf.....	105
Eidesstattliche Versicherung	107
Danksagung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

ASNase: Asparaginase

ASNS: Asparaginsynthetase

bzw.: beziehungsweise

Ca: Karzinom (english: carcinoma)

CD30: Cluster of differentiation 30

DNA: Desoxyribonukleinsäure

DNase: Desoxyribonuklease

D(n)S: Dendronsulfat mit n Sulfatgruppen (monodispers)

DMEM: Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium

dPGS: Dendritisches Polyglycerolsulfat (polydispers)

et al.: Et Alii

FCS: Fetal Calf Serum

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorter

ggf.: gegebenenfalls

hu: human

huTR: Human Targeted RNase

IC₅₀: Inhibition Concentration 50

ICC: Indocarbocyanin

IgG: Immunglobulin G

M: Molare Masse

MacroDel: Macromolecular Delivery (Dendronsulfat)

Mal: Maleimid

MEME: Minimum Essential Medium Eagle

MTT: 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazoliumbromid

n.a. : Nicht bekannt

n. i.: Nicht inhibierend

NF-kappa-B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

NHS: N-Hydroxysuccinimid

Nr.: Nummer

NTCP: Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide

OATP: Organic Anion Transporting Protein

OD: Optische Dichte
PBS: Phosphate Buffered Solution (Phosphatpufferlösung)
PEG: Polyethylenglycol
PFA: Paraformaldehyd
P/S: Penicillin-Streptomycin
RNA: Ribonukleinsäure
RNase: Ribonuklease
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
ScFvFc: Single chain variable fragment, crystallizable Fragment
SDS: Natriumdodecylsulfat
SPDP: N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio) Propionat
Tab.: Tabelle
TCA: Trichloressigsäure
TDDS: Targeted Drug Delivery System
T/E: Trypsin-EDTA
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a. unter anderem
s.: Siehe
SDS: Natriumdodecylsulfat

Zusammenfassung

Einleitung: Klassische Chemotherapeutika sind aufgrund ihrer oft unzureichenden Selektivität durch eine hohe systemische Toxizität gekennzeichnet. Durch einen gezielten Transport könnten die systemischen Nebenwirkungen gesenkt und der therapeutische Effekt verbessert werden. Dendritische Polymere können als effiziente Targeted Drug Delivery Systeme (TDDS) verwendet werden. Das MacroDel (Macromolecular Delivery), ein synthetisches, polysulfatiertes, monodisperses Polyglycerol, soll in der vorliegenden Arbeit als Transportmolekül für Enzyme untersucht werden. Enzymatisch aktive Substanzen werden aufgrund der fehlenden Möglichkeit sie gezielt an ihren Wirkort zu transportieren, selten als Zytostatika eingesetzt. Sie besitzen jedoch ein hohes zytotoxisches Potential. Am Beispiel von RNase, DNase und Asparaginase soll untersucht werden, ob sich das MacroDel als Transportvehikel für Enzyme in der Tumorthherapie eignet.

Methoden: Die Enzyme wurden an das MacroDel konjugiert. Der Kopplungserfolg wurde über eine native Gelelektrophorese geprüft und die enzymatische Aktivität nach Konjugation mittels Photometrie gemessen. Die Aufnahme und Verteilung des MacroDels und der MacroDel-Enzym Konjugate wurde *in vitro* auf sämtliche Tumorzelllinien über Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurden das MacroDel und die MacroDel-Enzym Konjugate an einen ICC-Farbstoff konjugiert. *In vivo* erfolgte die Analyse auf Nude-Fox1^{nu} Mäusen, denen das humane Kolonkarzinom HT29 und ein gastropankreatischer Tumor implantiert wurde. Die Zytotoxizität wurde *in vitro* mittels MTT-Tests analysiert. Der Nachweis der transportervermittelten Aufnahme des MacroDels und der MacroDel-Enzym Konjugate erfolgte durch die Inhibierung von OATP1B1 mit Rifamycin.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass die Konjugierung der Enzyme an das MacroDel ohne wesentlichen Aktivitätsverlust möglich ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das MacroDel und die MacroDel-Enzym Konjugate von allen getesteten Tumorzelllinien *in vitro* zytoplasmatisch aufgenommen werden und *in vivo* im Tumor akkumulieren. Ihre Aufnahme konnte durch einen OATP-Transporter Inhibitor gehemmt werden. Zudem konnten das MacroDel und die MacroDel-Enzym Konjugate *in vitro* auf einigen Tumorzelllinien zytotoxische Effekte hervorrufen.

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das MacroDel gezielt Enzyme ins Tumorgewebe transportieren kann. Weiterhin werden das MacroDel

und die MacroDel-Enzym Konjugate wahrscheinlich über Transporter direkt ins Zytoplasma von Tumorzellen aufgenommen. Das MacroDel stellt somit eine vielversprechende Wirkstoffgruppe dar, die als Targeted Drug Delivery System für Enzyme in der Tumorthherapie weiter untersucht werden sollte. Das MacroDel könnte aufgrund seiner direkten zytoplasmatischen Aufnahme, das Targeting vieler neuer intrazellulärer Strukturen ermöglichen.

Abstract

Introduction: Conventional chemotherapeutic drugs are mostly associated with high systemic cytotoxicity because of their low selectivity. Selectivity can be increased by the use of targeted drug delivery systems which lead to lower side effects and better therapeutic outcomes. Dendritic polymers have shown to be promising targeted drug delivery systems (TDDS) in cancer. In this thesis, the MacroDel (Macromolecular Delivery), a synthetic polysulfated Dendron made of glycerol monomers, is evaluated regarding its ability to act as a TDDS for enzymes. Several enzymes have high cytotoxic potential. However, the inability to transport them to their cytoplasmic target has been the major reason why enzymes have rarely been used in chemotherapies. By using the example of RNase, DNase and Asparaginase, this thesis analyses the potential of MacroDels as targeted drug delivery systems for enzymes in cancer treatment.

Methods: The conjugation of the enzymes to the MacroDel was controlled through native gelelectrophoresis and the enzyme activity after conjugation through photometry. The MacroDel and the MacroDel-enzyme conjugates were conjugated to ICC-dyes. The *in vitro* uptake and distribution were then analysed on all cancer cell lines using flow cytometry and fluorescence microscopy. The *in vivo* analysis was performed on Nude-Fox1^{nu} mice transplanted with the human coloncarcinoma HT29 and a gastropancreatic tumor. Cytotoxicity of the MacroDel and its enzyme-conjugates were examined *in vitro* using MTT-assays. The uptake of the MacroDel and its conjugates were analysed by inhibiting OATP1B1 with Rifamycin.

Results: It could be shown that the conjugation of enzymes to the MacroDel is possible without losing enzymatic activity. Furthermore, it could be demonstrated that all cancer cell lines take up the MacroDel and the MacroDel-enzyme conjugates *in vitro* and accumulate *in vivo* in cancer tissues. Their uptake is downregulated by the Inhibition of OATP-Transporters. Additionally the MacroDel and the MacroDel-enzyme conjugates show a cytotoxic effect on several cancer cell lines *in vitro*.

Conclusion: For the first time, it could be shown that MacroDels are able to target enzymes to cancer tissues. Furthermore, it could be demonstrated that MacroDels and the MacroDel-enzyme conjugates are directly uptaken into the cytoplasm of cancer cells by transporters. Consequently, MacroDels represent a promising TDDS for enzymes in cancer that should be further investigated. Also the MacroDel would enable the targeting of a multitude of new cytoplasmatic structures that were inaccessible before.

1. Einleitung

1.1. Tumore

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Tumore sind komplexe, heterogene und sich dynamisch entwickelnde Gewebe, die aus körpereigenen Zellen entstehen. Sie gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit und stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar [1]. Die Anzahl an Neuerkrankungen steigt aufgrund des Alterns der Bevölkerung und der besseren Überlebensaussichten jährlich an [2] und stellt eine weltweite gesundheitsökonomische Herausforderung dar, die geschätzte 1,16 Trillionen USD an Kosten pro Jahr verursacht [3]. Es ist also von höchster Bedeutung effiziente, skalierbare und kostengünstige Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, die dieser Herausforderung gewachsen sind.

1.1.2. Die Entstehung von Tumoren

Es gibt über 100 verschiedene Tumortypen und innerhalb eines selben Tumors können unterschiedliche Subtypen vorhanden sein [4]. Trotz dieser Heterogenität konnten Hanahan et al. sechs Kernmerkmale identifizieren, die bei allen malignen Tumoren vorhanden sind und die für die Entwicklung zur malignen Zelle Voraussetzung sind. Die Merkmale werden in einem mehrstufigen Prozess erworben, welcher mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Reihenfolge stattfinden kann. Zu den sechs Hauptmerkmalen gehören die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, die Evasion vor dem programmierten Zelltod, die unbegrenzte Zellteilungsmöglichkeit, die Fähigkeit zur Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung [4]. Diese Hauptmerkmale werden überwiegend über Mutationen erlangt. Jedes Merkmal kann jedoch durch verschiedene Mutationen, die in unterschiedliche Signalwege eingreifen, entstehen. Ermöglicht wird dies, durch die genomische Instabilität von Tumorzellen: Sie reagieren sensibler auf Mutagene und besitzen keine voll funktionsfähigen DNA-Reparaturmechanismen mehr [5].

Tumore bestehen jedoch nicht nur aus tumorösen Zellen. Sie besitzen die Fähigkeiten, normale Zellen zu rekrutieren und führen somit zur Ausbildung eines tumorösen Mikromilieus, welches ihr Wachstum mitfördert [5]. Zu den rekrutierten Zellen gehören u.a. Endothelzellen [6], Tumor-assoziierte Fibroblasten [7] und Stammzellen [8, 9]. Weiterhin ist das entzündliche Milieu im prä-tumorösen und tumorösen Geweben von herausragender Bedeutung: Es fördert über verschiedene Mechanismen das Tumorwachstum (zusammengefasst [5]).

Die Komplexität der tumorösen Zellverbände, ihre Heterogenität sowie ihre dynamische Entwicklung, stellen eine Herausforderung für die Entwicklung effizienter Therapeutika dar.

1.1.3. Tumorthérapien und ihre Limitierungen

Die Therapie maligner Erkrankungen besteht aus drei Hauptsäulen: die chirurgische, die radiologische und die Chemotherapie. Die Auswahl der Therapie richtet sich nach der Tumorart, dem Differenzierungsgrad und der Ausbreitung. Je nach Allgemeinzustand des Patienten, wird dann entschieden ob in kurativer oder in palliativer Absicht therapiert wird. Dabei können alle drei Therapiemöglichkeiten kombiniert werden. Eine neue Gruppe an Tumorthérapeutika stellen die gezielten Tumorthérapeutika (Targeted Cancer Therapeutics) dar, die zu den unkonventionellen Chemotherapeutika gezählt werden.

- Die chirurgische Therapie

Die chirurgische Therapie ist Bestandteil der meisten kurativen Therapien von soliden Tumoren. Über einen chirurgischen Eingriff wird die Tumormasse vollständig im Gesunden reseziert ggf. unter Mitnahme der regionalen Lymphknoten [10]. Sie kann in palliativen Situationen ebenfalls zur Symptomlinderung eingesetzt werden [10]. Nachteil chirurgischer Therapien ist ihre Invasivität, die abhängig von dem durchgeführten Eingriff mit einem hohen perioperativen Risiko einhergehen kann. Dementsprechend können nur Patienten in mäßigem bis gutem Allgemeinzustand operiert und ggf. geheilt werden. Weiterhin kann die chirurgische Therapie, bei unresezierbaren Tumoranteilen oder Metastasen, nicht zur Heilung führen.

- Die Radiotherapie

Die Radiotherapie erfolgt über lokale Applikation ionisierender Strahlen, die zu einer Zellzerstörung und Proliferationshemmung führen [11]. Diese Therapieform wird in kurativer Absicht häufig mit einer chirurgischen oder pharmakologischen Therapie kombiniert, kann aber auch prophylaktisch und palliativ eingesetzt werden [11]. Nach der Radiotherapie entwickeln viele Patienten eine akute Strahlenreaktion, die u.a. durch Übelkeit, Erbrechen und je nach bestrahlter Region z.B. durch Schleimhautentzündungen, Panzytopenien und Strahlenpneumonitiden gekennzeichnet ist [12]. Weiterhin können Patienten im Verlauf chronische Strahlenreaktionen entwickeln, die mit irreversiblen Gewebsfibrosierungen im Bestrahlungsbereich einhergehen und zum Auftreten von Zweitmalignomen führen können [12]. Außerdem sind viele Tumore strahlenresistent, so dass weitere Therapieansätze verfolgt werden müssen.

- Die Chemotherapie

Ein Chemotherapeutikum, auch Zytostatikum genannt, ist ein Sammelbegriff für eine zunehmend heterogene Gruppe an Pharmaka, die über unterschiedliche Mechanismen die Zellproliferation hemmen. Sie werden in beinahe jedem Therapieregime eingesetzt [13]. Beispiele dafür sind Alkylanzien wie Cisplatin, die durch Alkylierung der DNA zu DNA-Strangbrüchen führen, oder Mitosehemmstoffe wie Vincristin, die durch Zerstörung des Spindelapparates, die Zellteilung hemmen [14]. Die konventionellen Zytostatika sind nur bedingt selektiv. Sie hemmen die Zellteilung, so dass jedes proliferierende Gewebe gleichermaßen geschädigt wird [13]. Daraus leiten sich die vielzähligen Nebenwirkungen ab: Schädigung der Magen- und Darmschleimhaut, Knochenmarksuppression, Haarausfall, Schädigung der Gonaden mit Infertilität. Weiterhin haben die einzelnen Zytostatika spezifische, teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen, die bei der Verabreichung beachtet werden müssen [13].

Aufgrund der Toxizität der konventionellen Zytostatika und der nur bedingten Wirksamkeit, entwickelte sich im Verlauf eine neue Klasse an Zytostatika: die gezielten Tumortherapeutika.

- Die gezielten Tumortherapeutika

Gezielte Tumortherapeutika sind Therapeutika, die im Gegensatz zu den konventionellen Zytostatika, tumorspezifische Angriffspunkte anvisieren. Durch Hemmung eines spezifischen Moleküls, welches im Wachstum und in der Proliferation der Tumorzelle beteiligt ist, wird die Progression gehemmt [15]. Man unterscheidet drei Arten von gezielten Tumortherapeutika: Monoklonale Antikörper, Small Molecule Inhibitors und Immunotoxine [15]. Hauptunterschied zwischen den monoklonalen Antikörpern und den Small Molecules Inhibitors sind ihre Zielmoleküle. Während die Small Molecules Inhibitors intrazelluläre Moleküle anvisieren, können monoklonale Antikörper, aufgrund ihres hohen Molekulargewichts, nicht in die Zelle penetrieren und sind auf zelloberflächliche oder extrazelluläre Moleküle beschränkt [16]. Immunotoxine, eine neue Generation an gezielten Tumortherapeutika, sind Fusionsproteine bestehend aus einem modifiziertem Antikörper oder Wachstumsfaktor und einem Toxin [15]. Mit der Entwicklung gezielter Tumortherapien konnten teilweise revolutionäre Erfolge erreicht werden. Ein bedeutender Erfolg wurde mit der Entwicklung des Small Molecule Inhibitors Imatinib erreicht. Imatinib hemmt spezifisch eine intrazelluläre überaktive Tyrosinkinase, das BCR-ABL Protein, welches durch Chromosomentranslokation entsteht und bei dem größten Teil der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie vorhanden ist [17].

Der Einsatz von gezielten Tumortherapien ist zum Teil durch das schnelle Auftreten von Resistenzen limitiert. Sie entstehen durch Mutationen im Zielmolekül, welches dadurch nicht mehr gebunden werden kann, oder durch Aktivierung alternativer Signalwege, die zu weiterem Wachstum führen [18]. Ein weiterer Nachteil ist, dass Patienten vorab auf das Zielmolekül getestet werden müssen und allein positive Patienten von der Therapie profitieren. Tumore sind heterogene Gewebe, so dass gelegentlich nur Anteile des Tumors das Zielmolekül exprimieren und keine komplette Remission erreicht werden kann [16]. Gezielte Tumortherapeutika sind allgemein verträglicher als die konventionellen Chemotherapeutika, können jedoch auch zu einer Reihe von Nebenwirkungen führen. Unter anderem können monoklonale Antikörper vermehrt allergische Reaktionen auslösen, während Small Molecules Inhibitors häufig andere Signalwege beeinflussen und zu Medikamenteninteraktionen führen [19].

Die gezielten Tumortherapeutika konnten bis jetzt, aufgrund der oben genannten Limitierungen, nur bei einzelnen Tumoren die konventionellen Chemotherapeutika ablösen. Die konventionelle Chemotherapie bzw. die Kombination mit weiteren Verfahren ist weiterhin Hauptpfeiler der Tumortherapie. Ihre bedingte Wirksamkeit beruht vorwiegend auf der verabreichten Dosis, die aufgrund der systemischen Toxizität nicht gesteigert werden kann [20]. Durch einen gezielten Transport könnte lokal die Konzentration gesteigert und die systemischen Nebenwirkungen gesenkt werden. Es ist also von herausragender Bedeutung effiziente „Targeted Drug Delivery Systeme“ zu entwickeln.

1.2. Targeted Drug Delivery Systeme

1.2.1. Übersicht der Transportsysteme

Targeted Drug Delivery Systeme (TDDS) können als Systeme definiert werden, die die Akkumulation einer pharmakologischen Substanz an ihrem Zielorgan selektiv ermöglichen, unabhängig von dem Ort und der Art der Administration [21]. Dazu gehören einerseits die biologisch inspirierten Transportsysteme, die hauptsächlich aus Bakterien, Viren oder Eukaryonten entwickelt werden, und andererseits die nicht biologischen Transportsysteme, die sich weiter in anorganische und organische Transportsysteme unterteilen lassen [22]. Die biologischen und anorganischen Transportsysteme sollen in dieser Arbeit nicht behandelt werden, sind aber in Übersichtsarbeiten ausführlich dargestellt [23]. Organische Transportsysteme gehören zu den häufigsten im klinischen Alltag angewandten Transportsysteme. Hauptvertretergruppen sind die lipidhaltigen Transportsysteme, vorwiegend Liposome und Lipidnanopartikel, und die polymeren Transportsysteme [24].

- Lipidhaltige Transportsysteme

Liposome werden als Transportvehikel für Zytostatika wie Doxorubicin in der Tumorthherapie [25], aber auch in der Infektiologie eingesetzt [26]. Neuere Ansätze untersuchen die Möglichkeit über Liposome Immunmodulatoren [27] oder genetische Therapeutika [28] zu transportieren. Liposome bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und kapseln somit den Wirkstoff ein [29]. Lipidnanopartikel sind neuere Moleküle, die unter anderem entwickelt wurden um Therapeutika zu transportieren, die nicht in Liposome geladen werden konnten [30]. Ihr Einsatz als Transportsystem wird derzeit noch erforscht.

- Polymere Transportsysteme

Polymer aus dem griechischen poly „viel“ und méros „Teil“ abgeleitet, ist eine Bezeichnung für chemische Stoffe, die aus einer Vielzahl von gleichen Struktureinheiten bestehen. Man unterscheidet je nach Form und Zusammensetzung Nanohydrogele, Mizellen, Polyplexe und Polymer-Konjugate [31-34]. Sie besitzen unterschiedliche Eigenschaften und werden dementsprechend zum Transport unterschiedlicher Substanzen eingesetzt. So bestehen polymere Hydrogele aus hydrophilen Stoffeinheiten, die es ermöglichen innerhalb ihrer drei dimensional Struktur, große Mengen an hydrophilen Therapeutika zu speichern [31]. Polymere Mizellen hingegen sind amphipatische Moleküle mit einem lipophilen Kern, so dass diese Transportform sich besonders für lipophile Therapeutika eignet [21] [35]. Polyplexe sind meist polyelektrische Komplexe bestehend aus einem Polycation und einem anionischen Oligonucleotid oder Plasmid [32]. Innerhalb dieser Struktur können sowohl DNA Bestandteile als auch Tumorthérapeutika transportiert werden [32]. Polymer-Konjugate besitzen eine charakteristische tripartide Struktur bestehend aus einem Polymer, einem Linker und der pharmakologischen Substanz [36], die über den Linker kovalent am Polymer gebunden ist. Das Polymer kann linear oder dendritisch sein [32] und aus unterschiedlichen Untereinheiten bestehen [37]. Lineare Polymere besitzen den Nachteil, ein bis maximal zwei Substanzen binden zu können [36]. Dendritische Polymere hingegen können mit einer Vielzahl von Substanzen konjugiert werden und bieten somit die einzigartige Möglichkeit gleichzeitig diagnostische Substanzen, Therapeutika und Liganden zu binden [36].

1.2.2. Effiziente Targeted Drug Delivery Systeme: Voraussetzungen

Trotz der Vielfalt an Transportern, die bereits existieren, spiegelt die unzureichende Selektivität der meisten Chemotherapeutika die Schwierigkeit wider effiziente TDDS zu entwickeln. Um ein solches entwickeln zu können, ist ein Verständnis über die Barrieren, die ein TDDS überwinden muss, von großer Bedeutung. In den folgenden Abschnitten werden die Hürden, die ein TDDS

überwinden muss, nacheinander vorgestellt. Dabei wird allein auf intravenös verabreichte Substanzen eingegangen.

- Der systemische Kreislauf

Nach intravenöser Verabreichung müssen TDDS mit ihrem Kargo im Blut für einen längeren Zeitraum zirkulieren [38]. Dies ist die Voraussetzung für die Verteilung der Substanz im Körper und der darauffolgenden Anreicherung im Zielgewebe. Ein TDDS sollte also die Bioverfügbarkeit der Substanz steigern [38]. Dafür muss die Einheit aus TDDS und Kargo löslich sein [38]. Es muss die Substanz vor frühzeitigem Abbau durch zirkulierende Proteasen schützen und eine Elimination durch die Niere und Leber verzögern [38]. Weiterhin sollte ein TDDS die Wirkstoffverträglichkeit durch Verbergung potentiell antigener und immunogener Domänen erhöhen [38]. Das TDDS selber sollte ebenfalls keine Immunreaktion, Hämolyse oder Gerinnungsaktivierung im Blut hervorrufen [39].

- Die Extravasation und Akkumulation

Über den systemischen Kreislauf gelangt das TDDS mit seinem Kargo zum Zielgewebe, wo es die nächste Hürde überwinden muss: die Extravasation aus dem Blutgefäß ins Interstitium [40]. Tumorgefäße besitzen besondere Eigenschaften: Sie sind vermehrt durchlässig und können bis zu 780nm große Lücken aufweisen, so dass TDDS mit ihrem Kargo meist über die Lücken ins Gewebe diffundieren können [41]. Dabei konnte nur die Akkumulation von 15kDa bis 70kDa große Makromoleküle nachgewiesen werden [42]. Diese wird von dem gestörten Lymphabfluss, der in vielen Tumoren herrscht, unterstützt [43]. Diese Besonderheiten werden häufig unter dem Begriff „Enhanced Permeability and Retention Effect“ (EPR) oder „Passive Targeting“ zusammengefasst [43]. Das Ausmaß, in welchem der EPR-Effekt stattfindet ist eng von dem Vaskularisierungsgrad und dem jeweiligen Tumorendothel abhängig [15]. Beide Faktoren sind jedoch sehr variabel und können je nach Lokalisation [44] und Tumorart [45] variieren. Weiterhin ist die Akkumulation auch von der Plasmahalbwertszeit sowie der Konzentration des TDDS und seines Kargos im Blut abhängig [15].

- Das Targeting innerhalb des Zielgewebes

Nach Überwindung der Endothelbarriere muss das TDDS mit seinem Kargo innerhalb des Gewebes zu seiner Zielstruktur gelangen. Die Voraussetzung dafür ist die Möglichkeit frei im Interstitium zu diffundieren [40]. Diese ist in Tumoren häufig eingeschränkt, aufgrund von sehr hohen interstitiellen Drücken [46], so dass die TDDS und ihre Kargos selten tiefe Tumorschichten erreichen [47]. Gelingt es dem TDDS mit seinem Kargo die Zielstruktur zu erreichen, muss es am

Ziel seine Wirkung entfalten können. Dies kann entweder durch Ligand-Rezeptor Interaktionen mit der Zielstruktur oder durch die getriggerte Freisetzung des Kargos erfolgen [40]. Das Targeting über Ligand-Rezeptor Interaktionen, auch als aktives Targeting bezeichnet, erfolgt durch Interaktion mit tumorspezifischen Strukturen [40]. Das Endothel, die subendotheliale Matrix sowie die Tumorzelloberfläche exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren und Proteinen, wie die Folsäure oder LDL-Rezeptoren, die unter normalen Bedingungen nicht oder nur in geringem Maße exprimiert werden und als Zielstruktur genutzt werden [15, 48]. Die extern getriggerte Freisetzung des Kargos kann gezielt durch lokale Milieuveränderungen, wie z.B. pH Veränderungen, oder physikalische Einflüsse erreicht werden [40]. Dabei kann es sich z.B. um lokal applizierte magnetische Felder oder Ultraschallwellen handeln [15].

- Der intrazelluläre Transport

Bestimmte Therapeutika haben intrazelluläre Strukturen als Ziel, so dass die TDDS einer weiteren Barriere ausgesetzt sind: die Zellmembran. Moleküle gelangen je nach Größe und Eigenschaften über unterschiedliche Mechanismen in den intrazellulären Raum. Lipophile, unpolare Moleküle können über Diffusion die Membran durchqueren, während geladene Moleküle, wie Aminosäuren oder Ionen, einen aktiven Transport benötigen [49]. Dieser kann grundsätzlich auf zwei Weisen erfolgen. Entweder das TDDS und das Kargo werden über Endocytose aufgenommen oder sie gelangen direkt ins Zytoplasma. Während der Endocytose schnüren sich durch Invagination Vesikel von der Zellmembran ab und gelangen in Form von Endosomen nach intrazellulär [22, 50]. Sie fusionieren im Verlauf mit den Lysosomen, wo ihr Inhalt degradiert wird, wenn es nicht frühzeitig zum Austritt kommt [51]. Nanometergroße Transportsysteme werden überwiegend über Endocytose aufgenommen [50, 52, 53]. Der direkte Transport ins Zytoplasma kann über invasive Methoden wie die Elektroporation, Mikroinjektion oder Sonoporation erfolgen, die vorübergehend zu einer Membranpermeabilisierung führen und nicht selten Zellschäden verursachen [54]. Die nicht invasive Methode erfolgt durch bestimmte TDDS, denen es über ihre besonderen Eigenschaften möglich ist, durch membranöse Transporter, Translokation oder Fusion mit der Zellmembran, direkt ins Zytoplasma aufgenommen zu werden [55].

- Die Biokompatibilität

Ein TDDS muss also in der Lage sein, die aufgeführten Barrieren zu überwinden, um gezielt und effizient sein Kargo ans Ziel zu bringen. Zusätzlich dazu muss es, um klinisch angewandt zu werden, biokompatibel sein: Es sollte abbaubar sein oder renal oder hepatisch eliminiert werden können. Weiterhin sollte es idealerweise keine Nebenwirkungen hervorrufen [38].

1.3. Das MacroDel als Targeted Drug Delivery System für Enzyme in der Tumorthherapie

1.3.1. Das MacroDel: Ein Dendron

In der vorliegenden Arbeit wird ein Transportsystem untersucht, welches aus makromolekularen, dendritischen Polymeren besteht („Macromolecular Delivery“, MacroDel). Es setzt sich aus Glycerolmolekülen zusammen und wird durch Sulfatgruppen funktionalisiert. Verzweigte Polymere können unterschiedlich aufgebaut sein und z.B. dendrimere, linear-dendritische, dendrigraft und hochverzweigte (hyperbranched) Strukturen aufweisen (s. Abb. 1)[36].

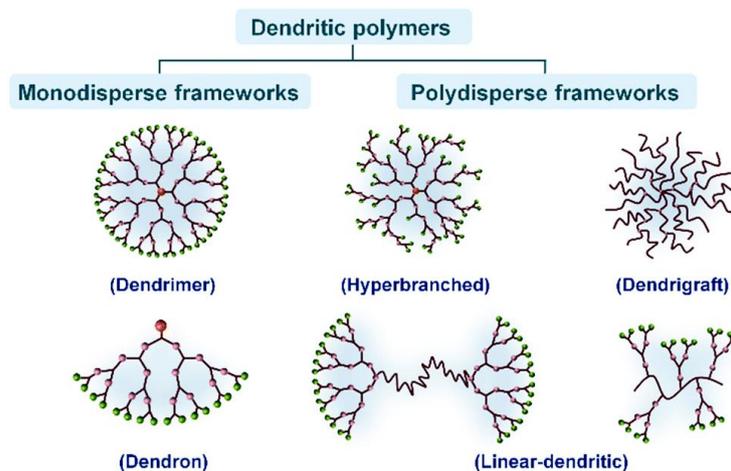


Abb. 1: Schematische Darstellung der dendritischen Polymere. Abbildung aus [56].

Dendritische Polymere lassen sich in monodispers und polydispers unterteilen. Darunter versteht man die Molmassenverteilung eines Polymers. Während bei polydispersen Polymeren die Polymerisationsgrade und dementsprechend ihre molaren Massen variieren, besitzen monodisperse Polymere einen definierten Polymerisationsgrad und eine definierte molare Masse [36]. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte MacroDel ist als Dendron monodispers und besitzt dementsprechend einen definierten Polymerisationsgrad und eine definierte molare Masse [36].

1.3.2. Das dendritische Polyglycerolsulfat: ein polydisperses Makromolekül

Die schon intensiv beforschten dendritischen Polyglycerolsulfate (dPGS) gehören zu der Gruppe der hochverzweigten Polymere. Das dendritische Gerüst besteht wie das MacroDel aus Glycerol-Monomeren und die terminalen Endgruppen sind ebenfalls mit Sulfatgruppen besetzt, wodurch ein stark anionisches Makromolekül entsteht [57]. Die dPGS wurden ursprünglich aufgrund ihrer gerinnungshemmenden Wirkung als Alternative zu Heparin für die Prävention und Therapie thromboembolischer Ereignisse untersucht [58]. Im Verlauf konnten komplementinhibierende und

antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden [59]. Es konnte gezeigt werden, dass das dPGS an unterschiedliche Zytokine, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren wie Nf-KappaB bindet [60]. In diesem Zusammenhang wurde das dPGS als Therapeutikum und als Transporter für Farbstoffe in der Bildgebung inflammatorischer Erkrankungen untersucht [61]. Weiterhin konnte die Akkumulation und Aufnahme von dPGS und dPGS-Zytostatika Konjugate in Tumorgewebe *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [62]. Im Mausmodell führte das dPGS zu einer signifikanten Abnahme der Tumormasse ohne unerwünschte Nebenwirkungen hervorzurufen [60]. Aufgrund der spezifischen Akkumulation und Aufnahme in Tumorzellen bei gleichzeitig guter Verträglichkeit wurde das dPGS vielfach als erfolgsversprechendes TDDS in der Tumorthherapie beschrieben. Das dPGS ist als Vertreter der hochverzweigten Polymere jedoch nicht monodispers [63]. Die Entwicklung der MacroDels spiegelt den Versuch wider, die positiven Eigenschaften des dPGS als TDDS mit den positiven Eigenschaften eines MacroDels zu kombinieren. Die Monodispersität der MacroDels ermöglicht eine bessere Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften, welche für die spätere Entwicklung als Medikament essentiell ist.

1.3.3. Synthese und Aufbau des MacroDels

- Aufbau

Das MacroDel ist ein polysulfatiertes monodisperses Makromolekül, das je nach Verzweigungs- und Sulfatierungsgrad ein Molekulargewicht von 2671M bis 9088M aufweisen kann. In dieser Arbeit wurden MacroDels der 2. bis 4. Generation (Verzweigungsgrad) mit jeweils 12, 24 und 48 Sulfatgruppen untersucht. Der Kern besteht aus einem Pentaerythrytol, aus welchem drei verzweigte Äste und eine funktionelle Gruppe, dem sogenannten „focal point“, ausgeht [64]. Die Äste bestehen aus 1,3 Glycerol-Monomeren und die funktionelle Gruppe aus einer Hydroxylgruppe, die im Verlauf für die Konjugation weiter verwendet werden kann [64]. Die terminalen Endgruppen der Verzweigungen sind mit Sulfatgruppen besetzt, wodurch ein stark anionisches Makromolekül entsteht [64].

- Synthese

Die Synthese des polysulfatierten MacroDels läuft in drei Schritten ab: (1) Die Synthese des MacroDels, (2) die Sulfatierung der terminalen Endgruppen und (3) ggf. die Konjugation.

(1) Synthese. Die Synthese erfolgt vom Kern ausgehend nach peripher nach der sogenannten divergenten Methode. Ausgehend von Trimethylpropane (TMP) werden in einem ersten Schritt die Hydroxylgruppen des TMP allyliert ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{R}$), während im zweiten Schritt die

Doppelbindungen der Allyl-Gruppen hydroxiliert werden. Daraus entsteht ein MacroDel der 1. Generation mit sechs Hydroxylgruppen. Dieser zweischrittige Prozess kann wiederholt werden, um MacroDels höherer Generationen zu generieren.

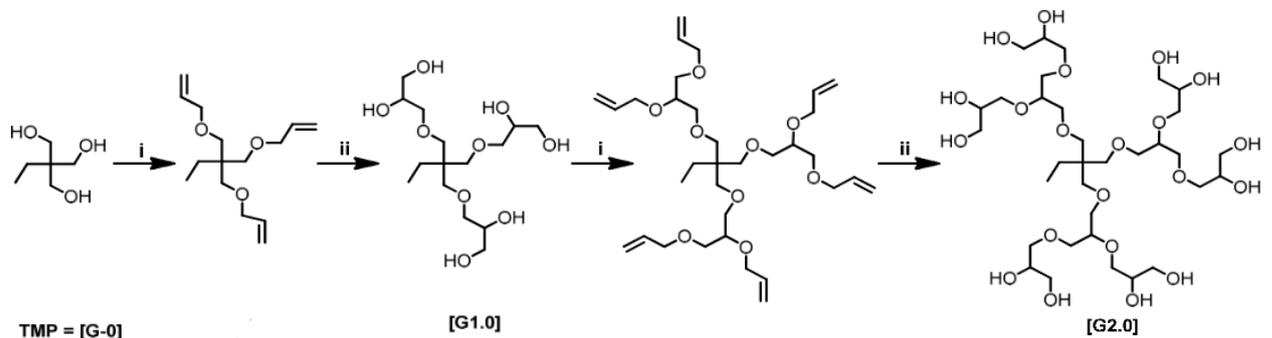


Abb. 2: Graphische Darstellung der Syntheseschritte des MacroDels, Abbildung aus [65].
 TMP: Trimethylpropane; [Gx]: Generation x; i: erster Syntheseschritt; ii: zweiter Syntheseschritt.

(2) Sulfatierung. Die terminalen Hydroxylgruppen des MacroDels werden durch Zugabe von SO₃/Pyridin Komplexen und weiteren Zwischenschritten durch Sulfatgruppen ersetzt. Der Sulfatierungsgrad der eingesetzten MacroDels ist nahezu 100%.

(3) Konjugation. Die Konjugation erfolgt über die Hydroxylgruppe des „focal points“. Es wurde erst ein Spacer eingeführt, der die Interaktionen zwischen dem Dendron und der pharmakologischen Substanz verhindern sollte. Die Spacer wurden über eine Ether Verbindung (R1-O-R2) an den „focal point“ des MacroDels gebunden. An den Spacer wurde entweder direkt über ein NHS-Ester oder über einen Linker, dem SPDP oder dem Maleimid, die pharmakologische Substanz gebunden [64]. Das SPDP ist ein spaltbarer Linker, während das Maleimid nicht gespalten werden kann.

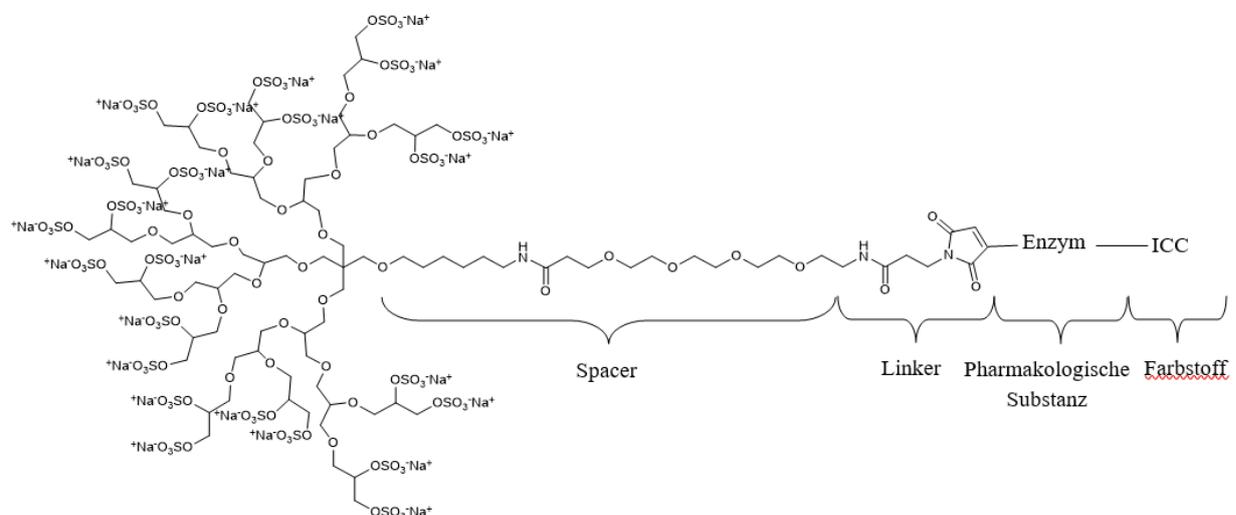


Abb. 3: Schematische Darstellung eines D24S-MacroDels. Spacer: Hexylamid-PEG4; Linker: Maleimid; Pharmakologische Substanz: Enzym; Farbstoff: ICC.

1.3.4. Pharmakokinetische- und dynamische Eigenschaften des MacroDels

Über die pharmakologischen Eigenschaften des MacroDels ist noch wenig bekannt. Aus Untersuchungen mit dem strukturähnlichen, polydispersen dPGS, lassen sich möglicherweise einige Eigenschaften übertragen. Das dPGS reichert sich überwiegend im Tumor- und Entzündungsgewebe an [66-68] und führte systemisch zu keiner Toxizität [60, 62, 69, 70]. Eine ähnliche Verteilung und Verträglichkeit des MacroDels ist zu erwarten und soll in dieser Arbeit untersucht werden. Im Gegensatz zu den meisten Nanotransportern [50] konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass das dPGS auch über andere Transportmechanismen als die Endozytose im Zytoplasma aufgenommen wird [57]. Dies konnte in Voruntersuchungen ebenfalls für das MacroDel nachgewiesen werden und soll in dieser Arbeit geprüft werden [64]. Dafür kommen spezifische Organische Anionen Transporter (OATP) in Frage. OATP1B1 und OATP1B3 sind Teil der OATP-Familie [71, 72]. Sie werden spezifisch in der Leber exprimiert [73] und werden in vielen Tumoren überexprimiert [74-79]. Typische Substrate für OATP1B1 und OATP1B3 sind Hormone, Gallensäuren, sulfatierte Substrate aber auch pharmakologische Substanzen wie Statine, Antibiotika und Zytostatika [71, 72, 80]. NTCP-Transporter werden in Hepatozyten exprimiert und nehmen überwiegend Gallensäuren aus dem Blutkreislauf auf. Sie können ebenfalls Hormone, pharmakologische Substanzen und sulfatierte Substrate aufnehmen [81].

1.3.5. Das MacroDel als Targeted Drug Delivery System für Enzyme

Tumore sind hochproliferative Gewebe, die auf eine hohe Stoffwechselaktivität angewiesen sind, um ihren metabolischen Bedarf zu decken. Folglich spielen Enzyme in der Progression von Tumoren eine zentrale Rolle. Die Behandlung von Tumoren mit Enzymen, die den Stoffwechsel inhibieren, konnte in unterschiedlichen Tumoren die Progression hemmen und das Überleben verlängern [82-84]. Der Einsatz von Enzymen in der Tumorthherapie wird jedoch durch ein topographisches Problem limitiert [84]. Die meisten Enzyme müssen ins Zytoplasma gelangen, um ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten [84]. Im Gegensatz zu den meisten Pharmaka, können Enzyme nicht über membranöse Transporter oder Diffusion die Zellmembran passieren, außer sie besitzen spezifische Translokationsdomänen, wie z.B. viele Bakterienproteine [85]. Einige Ansätze untersuchten die Möglichkeit über Fusionsproteine Enzyme intrazellulär zu transportieren [86]. Fusionsproteine binden über Antikörperfragmente an zellspezifische Rezeptoren und werden

über Endozytose internalisiert, so dass es bei fehlenden Evasionsstrategien zur Degradation der Enzyme im Lysosom kommt [87]. Die Konjugation an ein TDDS wie das MacroDel, das Enzyme oder andere Substanzen direkt in den zytoplasmatischen Raum liefern könnte, stellt eine attraktive und vielversprechende Perspektive für die Entwicklung neuer Tumorthérapien dar. In dieser Arbeit soll am Beispiel der Ribonuklease (RNase), Desoxyribonuklease (DNase) und Asparaginase (ASNase) untersucht werden, ob sich das MacroDel als TDDS für Enzyme eignet. In folgenden Abschnitten werden die Enzyme vorgestellt.

- Ribonuklease

Die RNase ist ein Enzym, welches den Abbau von RNA katalysiert und somit die Proteinbiosynthese reguliert [49]. Das zytotoxische Potential, welches durch Hemmung der Proteinbiosynthese entsteht, wurde schon vielfach beschrieben [88, 89]. Die RNase Ranpirnase (aus dem Leopardsfrosch *Rana Pipiens*) konnte bereits in klinischen Studien gute antitumoröse Effekte erzielen [90]. Das Fusionsprotein huTR, bestehend aus einer humanen pankreatischen RNase und einem murinen Anti-CD30 Antikörperfragment (ScFvFc), zeigte ebenfalls *in vitro* einen zytotoxischen Effekt auf CD30 positive T-Zelllymphome [86]. Die Internalisierung erfolgt in beiden Fällen über Endozytose [86, 91]. Die Konjugation der RNasen an das MacroDel würde einen intrazellulären Transport direkt ins Zytoplasma ermöglichen. In dieser Arbeit wurde das MacroDel mit dem huTR konjugiert, da es als humane RNase, ein geringeres allergenes Potential besitzt und somit eine bessere Verträglichkeit verspricht.

- Desoxyribonuklease

DNasen sind Enzyme, die über Hydrolyse DNA spalten [49]. Sie können durch den Abbau von DNA die Apoptose in Zellen induzieren. Sie scheinen eine wichtige Rolle in der Progression und Metastasierung von Tumoren zu spielen. So konnte in über 60 humane Tumore eine verminderte DNase Aktivität nachgewiesen werden [92]. Die Behandlung mit DNase I führte zur Hemmung der Proliferation und Metastasierung [93, 94]. Die Wirkung der DNasen scheint auf den Abbau extrazellulärer DNA zu beruhen, die von Tumorzellen sezerniert wird, um die Synthese der Faktoren zu stimulieren, die für das Wachstum, die Adhäsion und Metastasierung notwendig sind (zusammengefasst [95]). Um einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen auszuüben, müssten die DNasen intrazellulär transportiert werden. Dort können die DNasen während der Zellteilung ihre Wirkung entfalten [49]. In dieser Arbeit wurde die rekombinante Form der DNase I (Dornase) mit dem MacroDel konjugiert. Die Dornase wird hauptsächlich im Pankreas synthetisiert [96]. Sie wird zur Viskositätsreduzierung in der Therapie der zystischen Fibrose

inhalativ verabreicht und ist gut verträglich [97]. Aufgrund der bereits nachgewiesenen guten Verträglichkeit der Dornase wurde diese für die Konjugation ausgewählt.

- Asparaginase

Die ASNase katalysiert die Umwandlung von Asparagin zu Asparaginsäure unter Abspaltung von Ammonium [98]. Asparagin ist eine nicht essentielle Aminosäure und wird aus Glutamin über die Asparaginsynthetase (ASNS) de novo synthetisiert [98]. Neuere Erkenntnisse suggerieren, dass Asparagin von Zellen als Aminosäureaustauscher für essentielle Aminosäuren genutzt wird [98]. Asparagin nimmt somit eine koordinierende Funktion in der Protein- und Nukleotidbiosynthese ein [98]. Das Asparagin stellt somit ein sehr interessantes Target in der Tumorthherapie dar. Die ASNase wird bereits erfolgreich in der Behandlung verschiedener Leukämien und Lymphome eingesetzt und führt zu einer Senkung des Asparaginspiegels im Blut [83]. Lymphozyten sind auf die Zufuhr von Asparagin aus dem Blut angewiesen, so dass es zur einer Hemmung der Proteinbiosynthese und somit der Proliferation kommt. In soliden Tumoren konnten bis jetzt jedoch keine antitumorösen Effekte erzielt werden [99]. Womöglich hängt es mit der ASNS zusammen, die in den meisten soliden Tumoren exprimiert wird [100]. Die Konjugation der ASNase an das MacroDel könnte möglicherweise eine Wirkung auf solide Tumore hervorrufen.

1.4. Ziel der Arbeit

Tumorerkrankungen gewinnen durch das Altern der Bevölkerung zunehmend an Bedeutung. Die verfügbaren medikamentösen Therapien führen selten zur Heilung und sind aufgrund der mangelnden Spezifität mit einer hohen systemischen Toxizität verbunden. Die Toxizität kann über den Einsatz von TTDS vermindert werden, da das Therapeutikum direkt an den Wirkort transportiert wird. Das dPGS, die polydisperse Variante des MacroDels, erfüllt *in vitro* und *in vivo* die Grundvoraussetzungen eines TTDS [60]. Es konnte mit Zytostatika konjugiert werden und die Aufnahme von dPGS-Zytostatika Konjugate konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden [60, 62]. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich das strukturähnliche MacroDel ebenfalls als TTDS eignet. Es soll am Beispiel von Enzymen untersucht werden, ob das MacroDel in der Lage ist, große und komplexe Proteine ins Zytoplasma zu transportieren, ohne dabei ihre Funktion zu beeinträchtigen. Weiterhin sollen die MacroDel–Enzym Konjugate auf ihre Wirkung als potentiell Zytostatikum evaluiert werden.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Aspekte analysiert werden:

1. Die Aufnahme und das intrazelluläre Verteilungsmuster des MacroDels soll *in vitro* evaluiert werden. Dabei soll der Einfluss des Sulfatierungsgrades, der Spacer und Linker untersucht werden.
2. Das MacroDel soll bezüglich seiner Zytotoxizität unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sulfatierungsgrade, Spacer und Linker *in vitro* analysiert werden.
3. Ausgewählte MacroDels sollen mit der RNase, Dornase und ASNase konjugiert werden. Anschließend soll die Aktivität der konjugierten Enzyme geprüft werden.
4. Die Aufnahme und Verteilung der MacroDel-Konjugate soll *in vitro* untersucht werden.
5. Die Aufnahme des MacroDels und der MacroDel-Konjugate über OATP-Transporter soll nachgewiesen werden.
6. Die MacroDel-Konjugate sollen bezüglich ihrer Zytotoxizität *in vitro* getestet werden.
7. Die Verteilung und Verträglichkeit des MacroDels und eines ausgewählten MacroDel-Konjugates soll im Mausmodell untersucht werden.

Dazu werden folgende Methoden eingesetzt:

- Der Nachweis der *in vitro* Aufnahme des MacroDels und seiner Konjugate soll über Durchflusszytometrie erfolgen.

- Die Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters des MacroDels und seiner Konjugate wird *in vitro* und *in vivo* mittels Epifluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie durchgeführt.
- Die Untersuchung des MacroDels und seiner Konjugate auf Zytotoxizität erfolgt über MTT-Assays.
- Die Konjugation der Enzyme an das MacroDel soll über native Gelelektrophorese geprüft werden.
- Die Aktivität der konjugierten Enzyme soll mittels photometrischer Tests nachgewiesen werden.
- Die OATP-vermittelte Aufnahme soll über einen Ryfamycin-Inhibierungsversuch mit anschließender Durchflusszytometrie bewiesen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Übersicht der Geräte

Beschreibung	Bezeichnung	Hersteller
Akkupipettierhilfe	Accupipex	Karl Hecht GmbH
Durchflusszytometer	FACSCalibur Optics	BD Biosciences
ELISA-Reader	Anthos HT11	Anthos Mikrosysteme GmbH
Feinanalysewaage	AW 22-4	Sartorius®
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLB/DMR mit HBO 50	Leica Microsystems GmbH
Fluoreszenzmikroskopkamera	Moticam 2500	Motic®
Fluoreszenzreader	Lambda Fluoro 320 microplate reader	MWG Biotech AG
Gelelektrophorese-Kämme 10 Wells 1,5mm	165-3365	Biorad
Gelelektrophoresekammer	Criterion	BioRad
Geltrocknungsgerät	Gel Dryer Model 583	BioRad
Glasplatten (7,3cmx10,1cm)	20-30-114	Biostep GmbH
Inkubator	Labotec Incubator C200	Lacotec Labortechnik
Karussell-Gewebeeinbettautomat	Citadel 1000	Shandon
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop	LSM 5 Exciter Vario Two	Carl Zeiss, MicroImaging
Lichtmikroskop	Leitz HMLUX3	Leitz, Wetzlar
Multistep-Pipette	Ripette®	Ritter GmbH
Paraffinausgießstation	Histocentre2	Shandon
Paraffinmikrotom	Paraffinmikrotom RM2125	Leica Microsystems GmbH
pH-Meter	pH-Meter MP220	Mettler-Toledo GmbH
Pipetten	Eppendorf Research; 0,1-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf AG
Sicherheitswerkbank	SterilGARD III Advance	The Baker Company
Spectrophotometer	Beckmann DU 530	Beckmann Instruments GmbH
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
Vakuumpumpe	HydroTech Vacuum Pump	BioRad
Vortexer	Press-to-mix 34524	Snijders analysers
Wasserbad	Wasserbad, Typ1038	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Zellzählsystem	Casy® CellCounting und Analyse System Modell TTC	Schärfe System GmbH
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

2.1.2. Übersicht der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Bezugsquelle
(3-Aminopropyl)triethoxysilan	CAS:919-30-2	Sigma Aldrich
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium- bromid (MTT)	CT01-5	Merck Millipore
4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	6335.1	Carl Roth
Dako Fluorescent Mounting Medium	S3023	Dako

Deckgläser (d=12mm)	CB00120RA1	Gerhard Menzel GmbH
Deckgläser (24x50mm)	1870.2	Carl Roth
Alcianblau 8GS (C.I. 74240)	3082.1	Carl Roth
Ammoniumperoxiddisulfat	9592.3	Carl Roth
Bromphenolblau	A512.1	Carl Roth
Casy Cups Messgefäße	05651794001	Schärfe System GmbH
Cellophane	1650963	BioRad
DEPC treated water DNase/RNase free	DWT-106E	Bioline GmbH
Eosin-G-Lösung 0,5%, wässrig	X883.1	Carl Roth
Ethanol ≥ 70% vergällt	T913.3	Carl Roth
Ethanol ≥ 96% vergällt	T171.4	Carl Roth
Ethanol ≥99,8% vergällt	K928.4	Carl Roth
Ethidiumbromid 1%	2218.1	Carl Roth
FACSClean	340345	BD Biosciences
FACSFlow™	342003	BD Biosciences
FACSRinse	340346	BD Biosciences
Glasplatten (Spacer Plates 75mm)	165-3310	BioRad
Glasplatten (7,3cmx10,1cm)	20-30-114	Biostep GmbH
Glycerin ≥ 99,5%	3783.1	Carl Roth
Glycin ≥ 99%	3790.2	Carl Roth
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	T865.1	Carl Roth
Isopropanol, 2-Propanol	9866.1	Carl Roth
Mango-Taq	BIO-21083	Bioline GmbH
Methanol	CP43.2	Carl Roth
MgCl ₂ 50mM	MG-204F	Bioline GmbH
Milchpulver	1145.2	Carl Roth
Natriumchlorid	9265.1	Carl Roth
Neo-Clear® Xylol-Ersatz	1.098.435.000	Merck KGaA
NTP Set	BIO-39052	Bioline GmbH
Objektträger Superfrost Plus®	H867.1	Carl Roth
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
pBR328-Marker (pBR328/Hinf I/BgI I)	X902.1	Carl Roth
Phosphorsäure ≥85%	9079.1	Carl Roth
Quali-PCR-Tubes	G001-AF	G.Kisker GbR
RNase-Free DNase Set (50)	79254	Qiagen
RNase Inhibitor Ribosafe	BIO-65027	Bioline GmbH
RNeasy Minutenti Kit (50)	74104	Qiagen
5x Reaction Buffer	NHMR-107I	Bioline GmbH
Roti-Blue 5x-Konzentrat	A152.2	Carl Roth
Roti-Mark BIOCOLAR	2806.2	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	3029.2	Carl Roth
Salzsäure, c=1 mol/l; Maßlösung	K025.1	Carl Roth
Sucrose	S0389-500G	Sigma Aldrich
TAE-Puffer (50x)	CL86.1	Carl Roth
TEMED	2367.3	Carl Roth
Tetro cDNA Synthesis Kit	BIO-65042	Bioline GmbH
Zellkultur Multiwell-Platten, 24 wells, steril	92024	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkultur Multiwell-Platten, 48 wells, steril	677 180	Greiner Bio-One
Zellkultur Multiwell-Platten, 96 wells, steril	92696	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss, 75cm ² , steril	CE49.1	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen 15ml	N459.1	Carl Roth
Zentrifugenröhrchen 50ml	N463.1	Carl Roth

Tab.2: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquelle.

Andere Verbrauchsmaterialien oder Chemikalien wurden bei Carl Roth Karlsruhe bzw. A. Hartenstein Würzburg bestellt.

2.1.3. Übersicht der Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Bezugsquelle
Accutase	L11-007	PAA Laboratories GmbH
Casy® Ton Lösung für Casy® CellCounting und Analyse System	43001	Schärfe System GmbH
Deionized Phosphate Buffered Saline (DPBS)	P04-36500	PanBiotech GmbH
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	P04-04500	PanBiotech GmbH
Einfrierbehälter Nalgene® Cryo Freezing Container	5100-0001	Nalgene® Labware by ThermoScientific
Fetale Bovine Serum	3302-P102305	PanBiotech GmbH
L-Glutamin, 200mM	P04-80100	PanBiotech GmbH
McCoy's 5A modified medium w 22g/l NaOHCO ₃	F1015	Biochrom AG, Berlin
Minimum Essential Medium Eagle (MEME)	P04-21050	PanBiotech GmbH
Penicillin/Streptomycin; 10.000 I.E. Penicillin/ml; 10mg Streptomycin/ml	P06-07100	PanBiotech GmbH
Phorbol-12-Myristate-13-Acetat	524400	Calbiochem-Merck4Biosciences
Roswell Park Memorial Institute 1640- Medium (RPMI)	P04-17500	PanBiotech GmbH
Steril water for cell culture	P04-991500	PanBiotech GmbH
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat 0,25%/0,02%, w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	P10-020100	PanBiotech GmbH

Tab.3: Übersicht der verwendeten Zellkulturmaterialien und deren Bezugsquelle.

2.1.4. Übersicht der Zelllinien

Zelle	Herkunft	Medium	Bezugsquelle
A2780	Hu/OvarCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Kratz, Klinik f. Tumorbiologie; Freiburg i.Brsg.
A431	Hu/Epidermoides Gewebe	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Dervedde, Charité Berlin-CBF, Zentralinst. für Laboratoriumsmed. und Pathobiochemie
A549	Hu/LungenCa/Alveolar Typ II	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	DSMZ, Braunschweig
BRL3A	Buffalo Ratte/Leber	Ham's F12	DSMZ, Braunschweig
BxPC3	Hu/Pankreas AdenoCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
DLD-1	Hu/Kolorektales AdenoCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
HCT116	Hu/Kolon AdenoCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	ATCC, Nr.: CCL-247
HeLa	Hu/ZervixCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	DSMZ, Braunschweig, Nr.: ACC57

HepG2	Hu/LeberCa	Eagle's (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
HL60	hu/Akute promyeloische Leukämie	Iscove's (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	ATCC, Nr.: CCL-240TM
HMC-1	Hu/Mastzelleukämie	Basal Iscove (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	Charité Berlin-CCM Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
HS746T	Hu/MagenCa Metastase	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	Roche Deutschland Holding GmbH
HT29	Hu/Kolon AdenoCa	McCoy's (+10%FCS, +1%P/S)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik f. Hepatologie und Gastrologie
HUH7	Hu/LeberCa	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	OUCI, JRCB, Nr.: JCRB0403
Jurkat	Hu/Akute T-Zell Leukämie	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	ATCC, Nr.: TIB-152
LOVO	Hu/KolorektalesCa Metastase	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	ATCC, Nr.: CCL-229
MCF-7	Hu/MammaCa	RPMI +Insul, 10%FCS	AG Kratz, Klinik für Tumorbiologie, Freiburg i.Brsg.
MiaPaCa-2	Hu/PancreasCa	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
MOLT4	Hu/Akute lymphoblastische Leukämie	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	ATCC, Nr.: CRL-1582
Panc1	Hu/Duktales PankreasCa	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	ATCC, Nr.: CRL-1469
QG56	Hu/LungenCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
QGP-1	Hu/Pankreas	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
SKBR3	Hu/Mamma AdenoCa	McCoy's (+10%FCS, +1%P/S)	ATCC, Nr.: HTB-30
SKHEP1	Hu/Leber AdenoCa	DMEM (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
SKOV3	Hu/Ovar AdenoCa	McCoy's (+10%FCS, +1%P/S)	AG Lindl, Helmholtzzentrum, München
SW480	Hu/Kolorektales AdenoCa	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
SW948	Hu/Kolorektales AdenoCa	MEME (+10%FCS, +5ml Glutamin 200mM, +10µg/ml Insulin)	AG Grötzinger, Charité Berlin-CVK Klinik für Hepatologie und Gastrologie
U937	Hu/Histiozytisches Lymphom, Monozyt	RPMI (+10%FCS, +1%P/S, +5ml Glutamin 200mM)	AG Dervedde, Charité Berlin- CBF, Zentralinst. für Laboratoriumsmed. und Pathobiochemie

Tab.4: Übersicht der verwendeten Zelllinien, deren Medium und Herkunft

2.2. Übersicht der untersuchten pharmakologischen Substanzen

Die MacroDels und dPGS wurden von der Firma Mivenion GmbH synthetisiert und bereitgestellt. Die Konjugation der Enzyme an das MacroDel erfolgte ebenfalls durch Mivenion GmbH. Die Dornase (Pulmozyme 2500E/2,5ml; Roche GmbH) und ASNase (Medac Diagnostika) wurden käuflich erworben. Die Immunoenzyme ScFvFcRnase und ScFvFcRnaseI wurden von Dr. Schirman, aus der Universität Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Die Substanzen wurden bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

	Bezeichnung	Abkürzung	Chemische Kurzbeschreibung, Spacer und Linker	[SO ₄ ²⁻]	Bel.	M
MacroDel						
[1]	D24S-hexylamin	D24S	Spacer aus Hexylamin	24	-	≈ 4240
[2]	D48S-hexylamin	D48S	Spacer aus Hexylamin	48	-	≈ 8467
[3]	D24S-hexylamid-PEG4-mal	D24S-PEG4	Spacer aus Hexylamin und PEG4; Linker aus Maleimid	24	-	≈ 4638
[4]	D48S-hexylamid-PEG4-mal	D48S-PEG4	Spacer aus Hexylamin und PEG4; Linker aus Maleimid	48	-	≈ 8865
[5]	D24S-hexylamid-PEG8-SPDP	D24S-PEG8	Spacer aus Hexylamin und PEG8; Linker aus SPDP	24	-	≈ 4861
[6]	D48S-hexylamid-PEG8-SPDP	D48S-PEG8	Spacer aus Hexylamin und PEG8; Linker aus SPDP	48	-	≈ 9088
[7]	D24S-hexylamid-cyclooctinyl-PEG4	D24S-cycPEG4	Spacer aus Hexylamin, Cylcooctinyl und PEG4	24	-	≈ 4416
[8]	D24S-decylamid-PEG4	D24S-decyPEG4	Spacer aus Decylamin und PEG4	24	-	≈ 8865
MacroDel-ICC Konjugate						
[9]	D12S-hexylamid-ICC	D12S-ICC	Spacer aus Hexylamin; Konjugation von ICC über NHS	12	n. a.	≈ 2671
[10]	D24S-hexylamid-ICC	D24S-ICC	MacroDel [1] mit ICC; Konjugation von ICC über Iminothiolan/Maleimid	24	0,23 0,32	≈ 5130
[11]	D48S-hexylamid-ICC	D48S-ICC	MacroDel [2] mit ICC; Konjugation von ICC über NHS	48	0,43	≈ 9115
[12]	D24S-hexylamid-PEG4-mal-ICC	D24S-PEG4-ICC	MacroDel [3] mit ICC; Konjugation von ICC über NHS	24	0,55	≈ 5136
[13]	D24S-hexylamid-PEG8-SPDP-ICC	D24S-PEG8-ICC	MacroDel [5] mit ICC; Konjugation von ICC über NHS	24	-	≈ 5359
[14]	D24S-decylamid-ICC	D24S-decyl-ICC	Spacer aus Decylamin; Konjugation von ICC über NHS	24	0,15	≈ 4945
[15]	D24OH-ICC	D24OH-ICC	Spacer aus Hexylamin; Konjugation von ICC über NHS; Terminale Endgruppen aus 24 Hydroxylgruppen	0	1,0	≈ 2440
[16]	D24OH-hexylamid-PEG4-ICC	D24OH-PEG4-ICC	Spacer aus Hexylamin und PEG4; Konjugation von ICC über NHS; Terminale Endgruppen aus 24 Hydroxylgruppen	0	0,32	≈ 2687
dPGS-ICC Konjugat						

[17]	dPGSamid-ICC	dPGS-ICC	Konjugation von ICC an dPGSamin über NHS; Terminale Endgruppen zu 80% sulfatiert	n. a.	-	≈ 13000
MacroDel-RNase Konjugate						
[18]	RNase	RNase	ScFvFc-RNase, Immunoenzym, Klon: 4EA	n. a.	-	≈ 110000
[19]	D24S-hexylamid-PEG4-mal-RnaseScFvFc	D24S-RNase	MacroDel [3] mit RNase; Konjugation von RNase über Maleimid	24	-	≈ 114740
[20]	RNase I	RNaseI	ScFvFc-RNase, Immunoenzym	n. a.	-	≈ 55000
[21]	D24S-hexylamid-PEG4-mal-RNaseIScFvFc	D24S-RNaseI	MacroDel [3] mit RNaseI; Konjugation von RNaseI über Maleimid	24	-	≈ 59638
MacroDel-DNase Konjugate						
[22]	DNase I	Dornase	Rekombinante DNase I	n. a.	-	≈ 29254
[23]	D24S-hexylamid-PEG4-mal-Dornase	D24S-PEG4-Dornase	MacroDel [3] mit Dornase; Konjugation von Dornase über Maleimid	24	-	≈ 39800
[24]	D24S-hexylamid-PEG8-SPDP-Dornase	D24S-PEG8-Dornase	MacroDel [5] mit Dornase; Konjugation von Dornase über SPDP	24	-	≈ 34200
[25]	D48S-hexylamid-PEG8-SPDP-Dornase	D48S-PEG8-Dornase	MacroDel [6] mit Dornase; Konjugation von Dornase über SPDP	48	-	≈ 38400
[26]	D24S-hexylamid-cyclooctinylPEG4-Dornase	D24S-cycPEG4-Dornase	MacroDel [7] mit Dornase; Konjugation von Dornase über NHS	24	-	≈ 39700
[27]	D48S-hexylamid-PEG8-SPDP-Dornase-ICC	D48S-Dornase-ICC	MacroDel-Dornase Konjugat [25] mit ICC; Konjugation über NHS	48	0,16	≈ 46700
MacroDel-Asparaginase Konjugate						
[28]	Asparaginase	ASNase	Asparaginase	-	-	≈ 32000
[29]	D24S-PEG4-ASNase	D24S-ASNase	MacroDel [3] mit ASNase; Konjugation von ASNase über Maleimid	24	-	≈ 36638
[30]	ASNase-ICC		Asparaginase mit ICC; Konjugation über NHS?	-	0,72	≈ 32649
[31]	D24S-PEG4-ASNase-ICC	D24S-ASNase-ICC	MacroDel-ASNase Konjugat [29] mit ICC; Konjugation über NHS	24	0,42	≈ 37287

Tab. 5: Übersicht der verwendeten pharmakologischen Substanzen mit Angabe des chemischen Aufbaus, der Sulfatgruppenanzahl, des Molekulargewichts und der Beladung mit ICC.

Bel.: Beladungsgrad mit ICC; D: MacroDel; [SO₄²⁻]: Sulfatgruppenanzahl der terminalen Endgruppen; M: Molekulargewicht in Dalton; PEG: Polyethylenglycol; SPDP: Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat; ICC: Indocarbocyanin; NHS: N-Hydroxysuccinimid; Mal: Maleimid; dPGS: Dendritisches Polyglycerolsulfat.

2.3. Methoden

2.3.1. Allgemeine Zellkultur

- Adhärente Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden in 75cm²-Kulturflaschen kultiviert und bei 37°C, 5% CO₂-Luftgemisch und vollständiger Befeuchtung im Brutschrank aufgehoben. Die angewendeten Medien und ihre Zusammensetzung sind je nach Tumorzelllinie unterschiedlich und sind der Tab. 3 und Tab. 4 zu entnehmen. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen geteilt: Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gespült, Trypsin/EDTA zum Ablösen hinzugefügt und 5 bis 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 10ml Medium wurde die enzymatische Reaktion beendet und die Zellsuspension nach mehrfacher Resuspension in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1150rpm für 7 Minuten wurde das Zellpellet im Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde über CASY bestimmt und je nach Teilungsrate in neue Kulturflaschen mit 20ml Medium überführt. Der Arbeitsvorgang wurde mithilfe der Werkbank SterilgardR III Advance steril durchgeführt.

- Suspensionszellen

Je nach Teilungsempfehlung wurde von der Kulturflasche eine bestimmte Menge an zellhaltigem Medium entnommen und verworfen. Diese Menge wurde mit frischem, zellfreiem Medium ersetzt, so dass eine Verdünnung bzw. Teilung erzielt wurde.

- Einfrieren und Auftauen

Die Zellen wurden, folgend dem oben beschriebenen Vorgang, von den Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in einem Einfrierbehälter mit vorgekühltem Einfriermedium (10% DMSO/FCS-Lösung) gelockert. Die Einfrierbehälter wurden bei 4°C eine Stunde lang gelagert, anschließend für einige Stunden bei -20°C und über Nacht bei -80°C aufgehoben. Am nächsten Tag wurden die Kryobehälter in flüssigen Stickstoff überführt. Im Durchschnitt wurden 2-3x10⁶ Zellen in 3ml Einfriermedium pro Röhrchen eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gelegt und anschließend in ein vorgewärmtes Medium überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in PBS zum Waschen gelockert und wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen ausgesät.

2.3.2. Quantifizierung der Aufnahme des MacroDels und seiner Konjugate mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

Für die quantitative Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und seiner Konjugate wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt. Hierfür wurden das MacroDel und seine Konjugate mit ICC konjugiert. Die Zellen wurden auf 48-Well-Platten ausgesät und 24h lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Substanzen wurden auf $1 \times 10^{-6} \text{M}$ verdünnt und ihre Fluoreszenz wurde auf „Absorption“ eingestellt. Die erhaltenen Verdünnungen wiesen nach Einstellung ungefähr die gleiche Fluoreszenz auf. Die Substanzen wurden anschließend auf die 48-Well-Platten aufgetragen und erneut für 24h inkubiert. Daraufhin wurden die Überstände entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Rundbogenröhrchen überführt. Die Suspensionzellen wurden nicht gewaschen, sondern sofort überführt. Anschließend wurden die Zellen im Rundbogenröhrchen mit PBS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in FACS-Puffer (PBS+5% FCS) aufgenommen. Die Proben wurden bei konstanten Einstellungen mit dem FACS Calibur-Durchflusszytometer im FL2 Kanal bei 550nm gemessen. Es wurden jeweils 10000 Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte über Cell Quest Pro. Zur Auswertung der FACS-Messungen wurde die Geo Mean Fluoreszenz verwendet, da die Fluoreszenzverteilung innerhalb der Zelllinien nicht homogen verteilt war.

2.3.3. Untersuchung der Aufnahme und Elimination des MacroDels *in vitro*

Um die pharmakokinetischen Eigenschaften des MacroDels besser zu charakterisieren, sollte nach Aufnahme des MacroDels in die Zelllinien die Elimination mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Der Versuchsablauf folgte dem in Paragraph 2.3.2. beschriebenen Vorgang. Das MacroDel D24S-ICC wurde in einer Konzentration von $1 \times 10^{-6} \text{M}$ auf HUH7 aufgetragen. Die Fluoreszenz wurde anschließend nach 0,5h, 1h, 3h, 4h, 6h, 24h und 36h gemessen. Nach 36h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und somit das MacroDel entfernt. Anschließend wurde die Fluoreszenz nach 0h, 0,5h, 1h, 3h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h und 120h gemessen. Die Messung und Auswertung wurde gemäß Abschnitt 2.3.2. durchgeführt.

2.3.4. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDels und seiner Konjugate mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vitro*

- Aussaat der Zellen auf Deckgläser

Um die Aufnahme und die Verteilung zu untersuchen, wurden auf 24-Well-Platten Deckgläser eingelegt, die Zellen in einer Konzentration von $1-2 \times 10^5$ Zellen pro Well in 500 μ l zellspezifischem Medium (vgl. Tab. 3) ausgesät und 24h lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Substanzen wurden auf 1×10^{-6} M verdünnt und ihre Fluoreszenz wurde auf „Absorption“ eingestellt. Die Substanzen wurden anschließend auf die 24-Well-Platten aufgetragen und erneut 24h lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Jeweils ein Deckglas pro Zelllinie wurde als Kontrolle mit Medium belassen. Nach zweimaligem Auswaschen mit PBS wurden die Zellen 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd auf Eis fixiert. Die Zellen wurden danach dreimal mit PBS ausgewaschen und mit Anti-Phalloidin-Antikörper in einer 1:300 Verdünnung 45 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die DAPI-färbung in einer Verdünnung von 1:2000 10 Minuten lang bei Raumtemperatur. Die Deckgläser wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckelt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

- Epifluoreszenzmikroskopie

Wie oben beschrieben erfolgte die Aussaat von A2780, DLD-1, MiaPaCa-2, QGP-1, QG56, LOVO, Helas, HepG2, A549, HS746T, SKOV3 und BxPC3 in 500 μ l zellspezifischem Medium. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 1×10^{-6} M aufgetragen. Die Analyse und Aufnahme der Bilder erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 40-Facher Vergrößerung und konstanten Einstellungen bezüglich der Fluoreszenz. Zur Auswertung wurde das Programm Motic Image 2.0 (Firma Motic) benutzt.

- Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie beleuchtet im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie nur eine schmale Schicht des Präparates, so dass dadurch ein hoher Kontrast entsteht und Fluoreszenzüberlagerungen minimiert werden[101]. Die Zellen wurden mittels Konfokalmikroskopie untersucht, um die Verteilung der Substanzen zu analysieren. Hierfür wurde das Konfokalmikroskop auf die Zellkerne fokussiert, so dass nur diese Schicht auf Fluoreszenz untersucht wurde. Wie oben beschrieben erfolgte die Aussaat von MiaPaca-2, HCT116, QG56, HUH7, HepG2, BRL3-A, A431,

MCF-7, A2780, QGP-1, SkHep1 und SW480 in 500µl zellspezifischem Medium. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^{-6} \text{M}$ aufgetragen. Die Analyse und Aufnahme der Bilder erfolgte am Konfokalmikroskop bei 40-Facher Vergrößerung und konstanten Einstellungen bezüglich der Fluoreszenz.

2.3.5. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates durch OATP1B1

Um die Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates nachzuweisen, wurde der OATP1B1 Transporter mittels Rifamycin inhibiert. Rifamycin gilt als selektiver Inhibitor für den OATP1B1 Transporter [102]. Die Inhibition erfolgte auf HUH7 Zellen und wurde über Durchflusszytometrie gemessen. Der Versuchsablauf folgte dem in Paragraph 2.3.2. beschriebenen Vorgang. Nach 24h Inkubation im Brutschrank wurde jeweils Medium und Rifamycin (10µM und 50µM) auf HUH7 aufgetragen und 6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Substanzen ASNase-ICC, D24-ASNase-ICC und D24S-ICC auf HUH7 in einer Konzentration von $1 \times 10^{-6} \text{M}$ aufgetragen und 24h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Messung und Auswertung wurde gemäß Abschnitt 2.3.2. durchgeführt.

2.3.6. Untersuchung der Zytotoxizität des MacroDels und seiner Konjugate mittels MTT

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Test, der auf der enzymatischen Aktivität von Zellen beruht. Der gelbe, wasserlösliche Farbstoff MTT wird durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums und der mitochondrialen Membran in blau-violettes Formazan umgesetzt [103]. Die Zellen, die stoffwechselaktiv sind, färben sich demnach blauviolett an, wogegen sich Zellen ohne Stoffwechsel nicht anfärben. Quantifiziert wird die Färbung über die photometrische Messung der Absorption. Je höher die Absorptionswerte, desto höher auch die metabolische Aktivität der Zellen [103]. Diese korreliert unter konstanten Kulturbedingungen mit der Viabilität von Zellen [104]. Dennoch kann die metabolische Aktivität ebenfalls durch Aktivierung/Hemmung des Stoffwechsels oder durch Veränderung der Proliferationsrate ohne Viabilitätsverlust beeinflusst werden [105]. Anhand der Absorptionswerte wurde der IC_{50} -Wert der einzelnen Substanzen errechnet. Der IC_{50} -Wert gibt an, bei welcher Konzentration eine Verminderung der Viabilität von 50% erreicht wurde [106].

- Durchführung des MTT-Tests

Das MacroDel und die MacroDel-Konjugate sollten auf unterschiedliche Zelllinien aufgetragen werden, um durch die Bestimmung der Stoffwechselaktivität Rückschlüsse auf die Viabilität und Zytotoxizität der Substanzen zu ziehen. Hierfür wurden jeweils 50µl Zell- und Mediumgemisch auf 96-Well-Platten ausgesät. Die Zusammensetzung des Mediums ist in der Tab. 3 und Tab. 4 für jede Zelllinie abzulesen. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50µl der Substanzen in verschiedenen Konzentrationen auf die Wells aufgetragen. Alle wurden in 4-Facher Bestimmung angelegt mit einer Kontrollreihe (Medium) pro Substanz. Nach dem Auftragen der Substanzen wurden die Platten 72h lang im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Nach 72h wurden 10µl MTT Reagenz (5mg/ml; bei 4°C lichtgeschützt gelagert) in jedes Well pipettiert und 4h lang im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden 50µl aus jedem Well entnommen und 150µl Stopplösung (0,04 NHCl/2-Propanol) in die Wells hinzugefügt. Anschließend wurde im Spectrophotometer die Absorption der Platten bei einer Wellenlänge von 570-620nm gemessen.

- Zytotoxizitätsscreening

Um festzustellen, welche Zelllinien auf das MacroDel und die MacroDel-Konjugate reagieren, wurden zuerst Screenings mit maximal drei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Das Screening der MacroDels wurde mit D24S-PEG4 und D48S-PEG4 in den Konzentrationen 1000nM und 5000nM durchgeführt. Das MacroDel-Dornase Screening erfolgte mit D48S-PEG8-Dornase in den Konzentrationen 1nM, 10nM und 100nM, das MacroDel-RNaseI Screening in den Konzentrationen 100nM und 300nM und das MacroDel-RNase Screening in den Konzentrationen 1nM, 10nM und 100nM. Mit dem MacroDel-ASNase Konjugat wurde kein Screening durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Absorption der Kontrollen (Zellen mit Medium ohne Testsubstanz) mit einer Viabilität von 100% gleichgesetzt. Die Absorption der Zellen, die mit den Substanzen inkubiert wurden, wurden ins Verhältnis zu ihren Kontrollen gesetzt und prozentual angegeben. Die Ergebnisse wurden in IC₅₀-Intervalle angegeben, da aufgrund der begrenzten Anzahl an Testbedingungen keine genaue Ermittlung des IC₅₀-Werts möglich war.

- Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und des IC₅₀-Wertes

Für die genaue Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurde der MTT-Test in fünf bis zehn Konzentrationen mit einer Auswahl von Substanzen wiederholt. Die Berechnung der Viabilität der Testsubstanzen erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$\text{Viabilität}_{\text{Testsubstanz}}[\%] = \frac{\text{Mittelwert } OD_{570-620}(\text{Testkonzentration}) - \text{Mittelwert } OD_{570-620}(\text{Hintergrund})}{\text{Mittelwert } OD_{570-620}(\text{Kontrolle}) - \text{Mittelwert } OD_{570-620}(\text{Hintergrund})} \times 100$$

Die Absorption des Hintergrundes wurde für die einzelnen Medien gemessen und betrug 0,012 für RPMI und 0,005 für DMEM. Dabei gilt als Hintergrund die Absorption der Zellen mit Medium und Lösungsmittel. Die graphische Darstellung und die Errechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, USA) über das 5PL nicht-lineare Regressionsmodell, das für Dosis-Wirkungs-Beziehungen häufig eingesetzt wird [107].

- Einfluss des Sulfatierungsgrades, der Spacer und Linker auf die Zytotoxizität

Der MTT-Test wurde ebenfalls verwendet, um den Einfluss unterschiedlicher Sulfatierungsgrade, Spacer und Linker auf die Zytotoxizität der Substanzen zu analysieren. Hierfür wurden die unterschiedlichen MacroDels auf gleiche Zelllinien in fünf bis sieben Konzentrationen aufgetragen und die IC₅₀-Werte nach der oben genannten Methode ermittelt und verglichen.

2.3.7. Nachweis der Kopplung der MacroDel-Konjugate mittels nativer Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese wird standardmäßig zur Untersuchung von Proteinen bis zu 500kDa eingesetzt, da sie im Vergleich zu anderen Gelen ein höheres Auflösungsvermögen besitzt. Bei der nativen Gelelektrophorese werden die natürliche Konformität und die physiologische Funktion der Proteine beibehalten. Die Proteine werden nach ihren Nettoladungseigenschaften aufgetrennt, während bei der SDS-Gelelektrophorese die Proteine alleine durch ihr Molekulargewicht aufgetrennt werden [108]. Der Acrylamid-/Bisacrylamidgehalt des Gels bestimmt die Porengröße und somit, in welchem Bereich die Proteine aufgetrennt werden. Je höher die Konzentration, desto vernetzter liegt das Gel vor. In unseren Versuchen benutzten wir 8%, 10% und 12% Gele.

- Puffer und Gelvorbereitung

Als Erstes wurden die verschiedenen Puffer hergestellt. Der Gelpuffer bestand aus einer 3M Tris-Base-Lösung, die auf einen pH von 8,45 eingestellt wurde. Der Probenpuffer bestand aus Tris-Puffer (pH 6,8) und der Elektrophoresepuffer aus Tris-Base (0,25M) und Glycerin (1,92M). Für die Zusammensetzung des Acrylamid-/Bisacrylamid-Gels folgten wir den üblichen Herstellungsprotokollen [108].

- Durchführung

Nach dem Aufbau der Apparatur und dem Herstellen des Trenn- und Sammelgels wurden 20µl der vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert. Dabei enthielten 20µl Probe jeweils 10µg Substanz. Die erste Tasche wurde mit 10µl Marker versehen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer (1:10 verdünnt) aufgefüllt und das Gel lief etwa drei Stunden lang bei einer Spannung von 120V.

- Aufbereitung und Färbung der Gele

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele anschließend mit Alcianblau und Coomassie gefärbt. Alcianblau ist ein kationischer Farbstoff, der in saurem Milieu fast ausschließlich an polysulfatierte Moleküle bindet [109]. In Voruntersuchungen konnten wir feststellen, dass es die polysulfatierten MacroDels gut darstellen kann. Coomassieblau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und somit die Visualisierung von Proteinen ermöglicht [110].

Für die Alcianblau-Färbung wurde das Gel 5 Minuten lang in eine 0,5M HCL-Lösung überführt, dann 45 Minuten lang in Färbelösung eingelegt. Die Färbelösung bestand aus 0,5g Alcianblau in 100ml HCL (0,5M). Das Gel wurde anschließend mit HCL (0,5M) dreimal je 5 Minuten lang gewaschen und das dritte Mal über Nacht eingelegt. Über den ganzen Zeitraum wurde das Gel geschwenkt.

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel 60 Minuten lang in eine Fixierlösung bestehend aus 79ml H₂O, 1ml Phosphorsäure (≥85%) und 20ml Methanol (≥99,8%) eingelegt. Über Nacht wurde das Gel in Färbelösung eingelegt. Die Färbelösung bestand aus 60ml H₂O, 20ml Methanol (≥99,8%) und 20ml RotiBlue 5-Fach-Konzentrat. Am Folgetag wurde das Gel mit Waschpuffer bestehend aus 25ml Methanol (≥99,8%) und 75ml H₂O 5 Minuten lang inkubiert. Auch hier wurde das Gel über den ganzen Färbevorgang geschwenkt.

- Trocknen der Gele

Die Gele wurden 15 Minuten lang in eine Trockenlösung bestehend aus 70ml H₂O, 20ml Ethanol ($\geq 99,8\%$) und 10ml Glycerin eingelegt. Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier gelegt, mit Cellophan-Folie bedeckt und in einem Trockengerät bei 80°C 50 Minuten lang getrocknet.

2.3.8. Untersuchung der Enzymaktivität nach Konjugation am MacroDel

- Untersuchung der Enzymaktivität der MacroDel-Dornase Konjugate

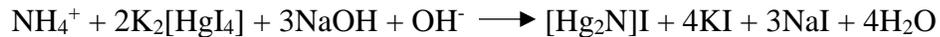
Die Aktivität der DNase kann kolorimetrisch durch die Umsetzung eines DNA-Methyl-Green-Substrats [111] oder durch eine spectrophotometrische Analyse erstmals etabliert durch Kunitz [112] nachgewiesen werden. In unseren Versuchen bevorzugten wir die Methode nach Kunitz. Diese basiert auf der Beobachtung, dass die Absorption der DNA bei Depolymerisation ansteigt.

Die hochpolymerisierte DNA (Worthington biochemical corporation) wurde in einer 6,25mM Magnesium-Sulfat-Lösung gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde Acetatpuffer hinzugefügt (1,0M, pH 5) und mit destilliertem Wasser verdünnt. Die genauen Angaben sind dem Hersteller Manual zu entnehmen [113]. Die Kontroll-DNasen wurden mit destilliertem Wasser auf 20-60U/ml verdünnt. Für die Berechnung der U/ml der MacroDel-Dornase Konjugate wurden die Herstellerangaben der Dornase verwendet (Pulmozyme 2500E/ml). Das Spectrophotometer wurde auf dsDNA Faktor 50 eingestellt und mit destilliertem Wasser erfolgte die Leerwertmessung. Als Erstes wurde 1ml DNA-Substrat in die 70 μ l-Küvetten pipettiert und anschließend gemessen. Dann wurde 0,2ml einer Kontroll- oder Konjugatprobe hinzugefügt und die Absorption minütlich gemessen. Die Ergebnisse wurden graphisch mittels Excel dargestellt. Der Aktivitätsvergleich zwischen der Dornase und den Konjugaten erfolgte durch Errechnung der Absorptionsveränderung in den ersten 10 Minuten.

- Untersuchung der Enzymaktivität der MacroDel-ASNase Konjugate

Die Asparaginase (ASNase) katalysiert die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Aspartat unter Bildung von Ammoniumionen (NH₄⁺). Ammoniumionen können über die Nessler Reaktion nachgewiesen werden, so dass Ammonium als Maß für die Asparaginase Aktivität eingesetzt werden kann. Das Ammoniumion reagiert mit dem Nessler-Reagenz, dem Kaliumtetraiodomercurat(II), zu einem

rotbraunen Farbkomplex, dem $[\text{Hg}_2\text{N}]\text{I}$, das nach folgender Formel photometrisch quantifiziert werden kann:



Die Enzymaktivität des MacroDel-ASNase Konjugates sollte nach Aufnahme in die Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Zellen in 25cm²-Flaschen kultiviert und 24h lang mit Medium, ASNase-ICC und D24S-ASNase-ICC inkubiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall lysiert und mit 300g zentrifugiert, wodurch die Zellkerne zugrunde gehen. Das erhaltene Pellet beinhaltete die Zellkerninhalte. Der Überstand wurde ein zweites Mal mit 100.000g zentrifugiert, wodurch selbst Zellorganellen zugrunde gehen. Das zweite Pellet enthielt somit Bestandteile der Zellorganellen und der Überstand zytoplasmatische Bestandteile. In Eppendorfröhrchen wurden 400µl von dem Substrat Asparagin 10 Minuten lang bei 37°C mit 50µl der jeweiligen Lösung (Zellkern-, Zellorganellen- oder Zytoplasma-Lösung) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50µl TCA gestoppt und bei 13000rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurden jeweils 100µl auf eine 96-Well-Platte überführt und 20µl Nessler Reagenz hinzugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsmessung mittels Plate-Reader bei 490nm.

2.3.9. Untersuchung des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates *in vivo*

Das MacroDel und das MacroDel-ASNase Konjugat wurden im Mausmodell auf ihre Aufnahme und Verteilung untersucht. Es wurden Nude-Fox1^{nu} Mäuse, auch athymische Mäuse genannt, verwendet. Diese entwickeln aufgrund einer Deletion im Fox1-Gen keinen Thymus, so dass es zu einer fehlenden Ausreifung der T-Lymphozyten kommt [114]. Dadurch ist das adaptive Immunsystem stark beeinträchtigt und Xenografttransplantation können durchgeführt werden, ohne dass es zu Abstoßungsreaktionen kommt [114]. Diese Versuche sollten als Vorversuche dienen, so dass insgesamt nur neun Mäuse behandelt wurden. Die Versuche, sowie die Bereitstellung der Organe, erfolgte durch die AG-Grötzinger der Charité Universitätsmedizin Berlin. Der Tierversuch wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt (Nummer: G0080/14). In einem ersten Versuch wurden sechs athymischen Mäusen das Kolonkarzinom HT29 und ein gastropankreatischer Tumor implantiert. Drei von ihnen wurden mit 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC intravenös beimpft, die drei weiteren erhielten 30 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal. Im zweiten Versuch wurden drei athymischen Mäusen das Kolonkarzinom HT29 implantiert und mit

10mg/kg Körpergewicht D24S-ASNase-ICC beimpft (intraperitoneal). Die athymischen Mäuse wurden nach 24h getötet und ihre Organe zur Entwässerung in aufsteigende Alkoholreihen gelegt. Daraufhin folgte die Paraffineinbettung, die mithilfe des Histocentre-Einbettautomats durchgeführt wurde. Es wurden 4µm dünne Paraffinschnitte hergestellt und auf Superfrost Ultrafrost fixiert. Nach Trocknung der Paraffinschnitte bei 37°C über Nacht wurden diese über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend erfolgte die DAPI-Färbung. Die Gewebsschnitte wurden 10 Minuten lang mit Dapi-Lösung inkubiert (2,5µg/ml), dreimal mit PBS gewaschen, mit Dako Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop bei 460nm ausgewertet. Die Aufnahmen erfolgten bei konstanten Einstellungen mit dem Programm Motic Image 2.0 (Firma Motic).

2.3.10. Statistische Analyse

Die Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel ausgewertet. Die Signifikanzen wurden entweder nach dem studentischen, ungepaarten T-Test oder durch Vergleich der Konfidenzintervalle ermittelt. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt. Als signifikant galt ein Ergebnis mit einem p-Wert von $p \leq 0,05$, als sehr signifikant ein p-Wert von $p \leq 0,01$ und hochsignifikant ein p-Wert von $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

Das MacroDel soll als Targeted Drug Delivery System für Enzyme in der Tumorthherapie eingesetzt werden, so dass als Erstes seine Aufnahme durch Tumorzellen überprüft wurde. Hierfür wurden die unterschiedlichen MacroDels mit einem ICC-Farbstoff konjugiert (durch Mivenion GmbH).

3.1.1. Aufnahmescreening

- Aufnahme des MacroDels D24S-ICC im Vergleich zum D24OH-ICC

Das MacroDel sollte bezüglich seiner Aufnahme im Vergleich zu einem nicht sulfatierten MacroDel getestet werden. Hierfür wurde im folgenden Experiment das MacroDel D24S-ICC und D24OH-ICC auf fünfzehn unterschiedliche Tumorzelllinien getestet. Die Fluoreszenz wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

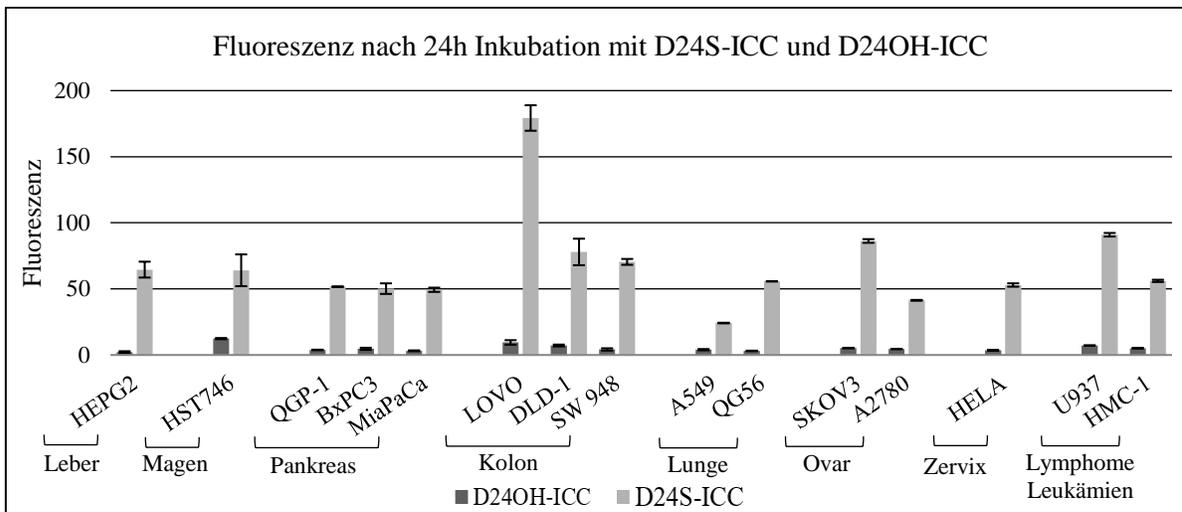


Abb. 4: Vermehrte Fluoreszenzintensität aller Tumorzelllinien nach 24h Inkubation mit D24S-ICC im Vergleich zu D24OH-ICC.

Geo Mean Fluoreszenz von fünfzehn Tumorzelllinien nach 24h Inkubation mit D24S-ICC und D24OH-ICC. Dargestellt ist die Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen ± 1 Standardabweichung.

Alle Tumorzelllinien wiesen nach Inkubation mit D24S-ICC im Vergleich zu D24OH-ICC eine verstärkte Fluoreszenz auf. Weiterhin fällt auf, dass die Aufnahme des MacroDels durch die Tumorzelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Nach Inkubation mit D24S-ICC hatte A549 mit 24 und LOVO mit 179 die niedrigste respektiv höchste Fluoreszenz. Die Fluoreszenz der mit D24OH-ICC inkubierten Zellen war bei allen Tumorzelllinien sehr gering und variierte zwischen den

Tumorzelllinien nur wenig. Nach Inkubation mit D24OH-ICC zeigte HS746T mit 12,38 die höchste und HepG2 mit 2,12 die niedrigste Fluoreszenz.

Beispielhaft wurde die Fluoreszenz von SW480 in folgenden Diagrammen genauer dargestellt.

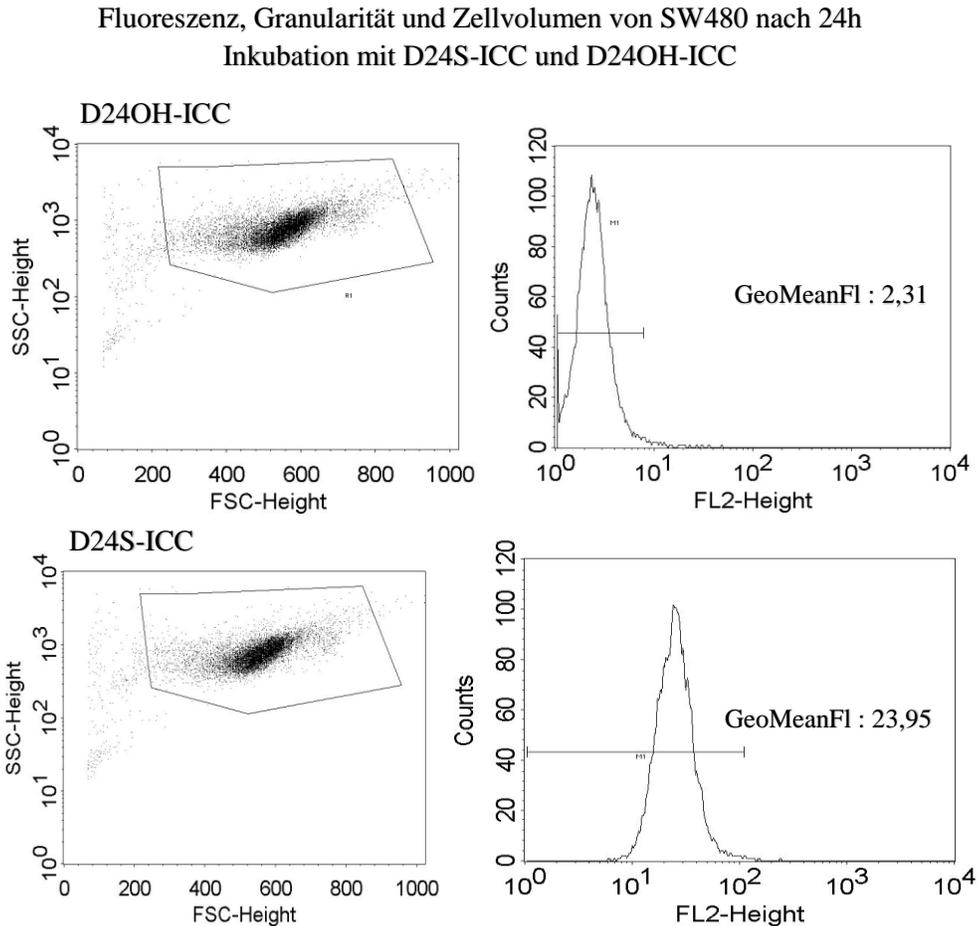


Abb. 5: Vermehrte Fluoreszenzintensität der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 nach 24h Inkubation mit D24S-ICC im Vergleich zu D24OH-ICC. Die Zellgranularität und das Zellvolumen von SW480 zeigt nach Inkubation von D24S-ICC im Vergleich zu D24OH-ICC keinen Unterschied.

Repräsentative Darstellung der Fluoreszenzintensität von SW480 nach 24h Inkubation mit D24S-ICC und D24OH-ICC. Dargestellt ist die SSC-Height (Maß für die Zellgranularität) im Verhältnis zur FSC-Height (Maß für das Zellvolumen) und die Geo Mean Fluoreszenz im Verhältnis zur Zellzahl. SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; FL2: Fluoreszenzintensität Kanal 2; M1: ausgewählte Zellpopulation; GeoMeanFl: Geo Mean Fluoreszenz.

SW480 zeigte nach Inkubation mit D24S-ICC im Vergleich zu D24OH-ICC eine verstärkte Fluoreszenz (GeoMeanFl: 23,95 versus GeoMeanFl: 2,31). Die Zellgranularität und das Zellvolumen zeigten jedoch keinen Unterschied.

- Aufnahme des MacroDels D24S-PEG4-ICC durch unterschiedliche Zelllinien

Im zweiten Screening sollte untersucht werden, ob das MacroDel von Tumorzelllinien unterschiedlich stark aufgenommen wird. Das erste Screening ergab bereits Hinweise dafür, so dass es mit einem weiteren MacroDel, dem D24S-PEG4-ICC, bestätigt werden sollte. Die vier PEG-Gruppen fungieren dabei als Spacer zwischen Dendron und Linker, was bei Konjugation von Enzymen positive Auswirkungen auf die Funktionalität haben könnte. Insgesamt wurden vierzehn Tumorzelllinien, eine Zelllinie aus epidermoiden Gewebe (A431) und eine Zelllinie aus immortalisierten Rattenhepatozyten mit D24S-PEG4-ICC inkubiert. Die letzte Zelllinie wurde hinzugenommen, da das MacroDel in späteren Versuchen ebenfalls *in vivo* getestet werden sollte. Es wurde keine Negativkontrolle (D24OH-ICC) angelegt, da es im ersten Screeningversuch zu keiner oder nur sehr geringen Aufnahme der Kontrolle kam. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

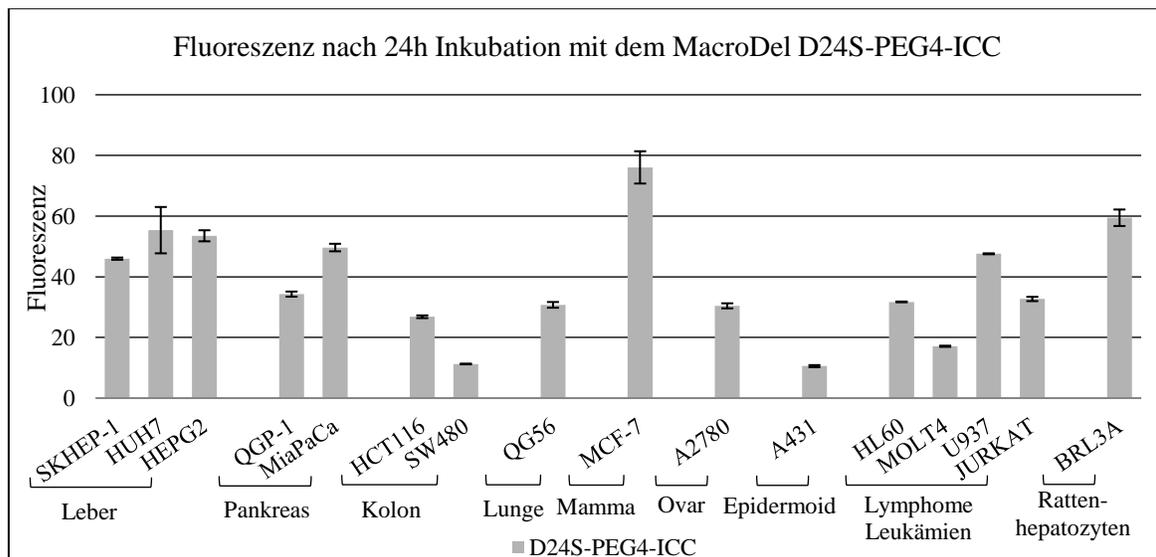


Abb. 6: Nach 24h Inkubation mit D24S-PEG4-ICC kommt es in den Zellen zu einer unterschiedlich starken Fluoreszenzzunahme.

Geo Mean Fluoreszenz von vierzehn Tumorzelllinien, einer epidermoiden Zelllinie und einer immortalisierten Rattenhepatozytenzelllinie nach 24h Inkubation mit D24S-PEG4-ICC. Dargestellt ist die Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung.

Bei allen Zelllinien kam es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenz der Zelllinien untereinander zeigte deutliche Unterschiede und reichte von 11,2 bei SW480 bis 76,1 bei MCF-7. Die Epidermoidzelllinie zeigte die geringste Fluoreszenz mit 10,5. Die immortalisierten Rattenhepatozyten wiesen eine Fluoreszenz von 59,5 auf.

Der Versuch wurde ein zweites Mal mit jeweils einer Messung durchgeführt und konnte die oben aufgeführten Ergebnisse bestätigen.

3.1.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Aufnahme des MacroDels

Im folgenden Experiment sollte analysiert werden, ob eine Erhöhung der Sulfatgruppenanzahl die Aufnahme des MacroDels verstärkt. Hierfür wurden D12S-ICC, D24S-ICC und D48S-ICC mit jeweils 12, 24 und 48 Sulfatgruppen auf die Kolonkarzinomzelllinie HT29 getestet. HT29 wurde in den Screeningversuchen nicht getestet, zeigte jedoch in Vorversuchen eine Zunahme der Fluoreszenz nach Inkubation mit D24S-ICC. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

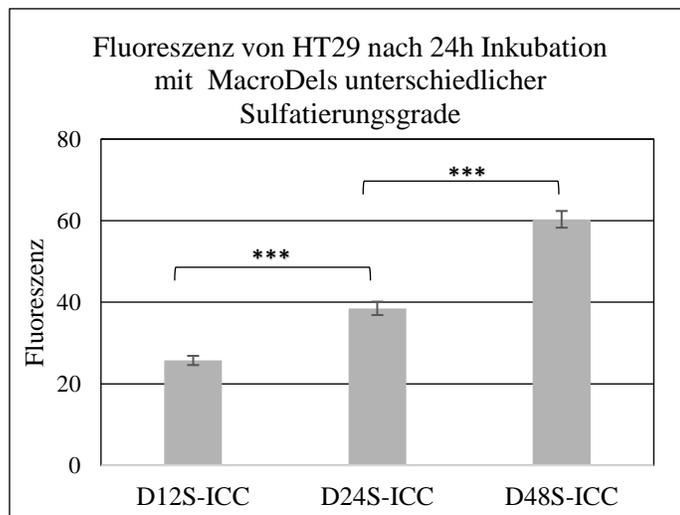


Abb. 7: Die Fluoreszenzintensität von HT29 steigt bei höherer Sulfatgruppenanzahl an. Geo Mean Fluoreszenz von HT29 nach 24h Inkubation mit D12S-ICC, D24S-ICC, D48S-ICC. Dargestellt ist die Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung. ***Signifikanz $p < 0,001$.

Die Erhöhung der Sulfatgruppenanzahl von 12 auf 24 und von 24 auf 48 führte zu einer signifikanten ($p < 0,001$) Verstärkung der Fluoreszenz auf HT29.

Der Versuch wurde mit D24S-ICC und D48S-ICC wiederholt. Es wurden, zusätzlich zu HT29, A549 und MCF-7 mit den Substanzen inkubiert. A549 wurde in den Screeningversuchen nicht getestet, zeigte jedoch in Vorversuchen eine Fluoreszenzzunahme nach Inkubation mit D24S-ICC. Die Geo Mean Fluoreszenz von HT29, A549 und MCF-7 war nach Inkubation mit D48S-ICC signifikant höher ($p < 0,05$) als nach Inkubation mit D24S-ICC. Der Versuch wurde auf HT29 dreimal, auf A549 zweimal und auf MCF-7 einmal unabhängig voneinander mit jeweils drei Messungen durchgeführt und konnte die Ergebnisse bestätigen.

3.1.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Aufnahme des MacroDels

Das MacroDel soll in dieser Arbeit als TTDS für Enzyme angewendet werden, so dass eine Konjugation des Enzyms an das MacroDel erfolgen muss. Um eine Interaktion zwischen den stark negativ geladenen MacroDels und den Enzymen zu vermindern, wurden Spacer zwischen dem MacroDel und den Enzymen eingebaut. Die Enzyme wurden entweder direkt über ein NHS-Ester oder über einen Linker an die Spacer konjugiert. Dabei wurden spaltbare (SPDP) und unspaltbare (Maleimid) Linker eingesetzt.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Spacer und Linker die Aufnahme des MacroDels beeinflussen. Hierfür wurden A549 und QGP-1 mit D24S-ICC, D24S-decyl-ICC, D24S-PEG4-ICC und D24OH-ICC (Kontrolle) inkubiert. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen MacroDels ist der Tab. 5 zu entnehmen. Die Fluoreszenz wurde nach 3h und 24h mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

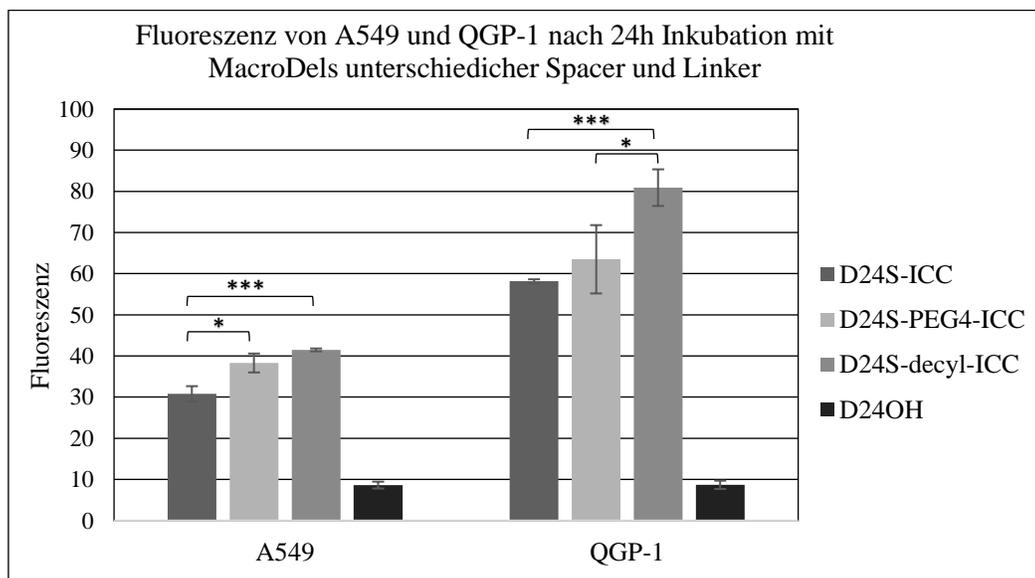


Abb. 8: A549 und QGP-1 zeigen die stärkste Fluoreszenz nach 24h Inkubation mit D24S-decyl-ICC und die geringste Fluoreszenz nach Inkubation mit D24S-ICC.

Dargestellt ist die Geo Mean Fluoreszenz von A549 und QGP-1 nach 24h Inkubation mit D24S-ICC, D24S-decyl-ICC, D24S-PEG4-ICC und D24OH-ICC. Mittelwert von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung. *Signifikanz $p < 0,05$, ***Signifikanz $p < 0,001$.

Die Fluoreszenz von A549 und QGP-1 nach 24h Inkubation mit D24S-decyl-ICC war im Vergleich zu D24S-ICC signifikant stärker ausgeprägt. Im Vergleich zu D24S-PEG4-ICC war der Unterschied nur auf QGP-1 signifikant. Das D24S-ICC führte bei A549 und QGP-1 zur geringsten Fluoreszenz,

wobei der Fluoreszenzunterschied zu D24S-PEG4-ICC alleine auf A549 signifikant ausfiel. Nach drei Stunden Inkubation kam es nur zu geringfügigen Unterschieden in der Fluoreszenz zwischen den unterschiedlichen Spacern und Linkern. Auf A549 führte das D24S-ICC mit 9,72 zur geringsten und das D24S-PEG4-ICC mit 12,5 zur höchsten Fluoreszenz. Auf QGP-1 führte das D24S-ICC mit 14,16 zur geringsten und das D24S-decyl-ICC mit 17,77 zur höchsten Fluoreszenz. Die Kontrolle D24OH-ICC wurde von A549 und QGP-1 in sehr geringem Maße aufgenommen und führte nach 24h zu einer Fluoreszenz von jeweils 8,63 und 8,69.

Längere Spacer scheinen also die Aufnahme des MacroDels zu verbessern.

3.1.4. Analyse der Aufnahme und Elimination des MacroDels über die Zeit

Intrazelluläre TTDS müssen die pharmakologische Substanz intrazellulär abgeben oder als Einheit intrazellulär verbleiben können, damit die pharmakologische Substanz ihre Wirkung entfalten kann. Um die pharmakokinetischen Eigenschaften des MacroDels besser zu charakterisieren, wurde die Fluoreszenzintensität von HUH7 nach Inkubation mit D24S-ICC über die Zeit gemessen. Nach 36h Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und das MacroDel entfernt. Die Fluoreszenz wurde weiterhin bis zu 120h nach der erfolgten Entfernung gemessen. Es wurde keine Negativkontrolle angelegt, da im Screeningversuch die mit D24OH-ICC inkubierten Zelllinien nur sehr geringe Fluoreszenzen zeigten. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

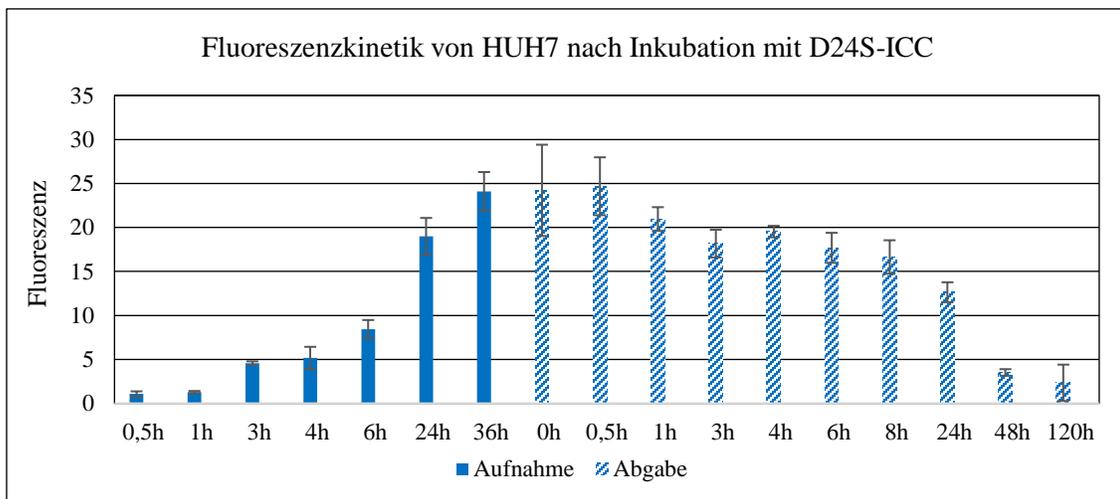


Abb. 9: Die Fluoreszenz von HUH7 steigt bei zunehmender Inkubationszeit mit D24S-ICC stetig an und nimmt nach Entfernung progressiv ab.

Dargestellt ist die Geo Mean Fluoreszenz von HUH7 über die Zeit nach Inkubation mit D24S-ICC und nach Entfernung von D24S-ICC. Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung.

Die Fluoreszenz von HUH7 stieg bei zunehmender Inkubationszeit stetig an, ohne ein Plateau zu erreichen. Nach 36h Inkubation erreichte HUH7 eine Geo Mean Fluoreszenz von 24. Nach Entfernung von D24S-ICC nahm die Fluoreszenz progressiv ab und erreichte nach 24h ihre Halbwertszeit. 120h nach Entfernung des D24S-ICC war eine geringe Fluoreszenz noch nachweisbar. Diese war im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz immer noch höher ($\text{GeoMeanFl}_{\text{Aufnahme}}(0,5\text{h})= 1,04$; $\text{GeoMeanFl}_{\text{Abgabe}}(120\text{h})= 2,34$).

Der Versuch wurde ein zweites Mal mit drei Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit den oben genannten überein.

3.2. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDels mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vitro*

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass es nach Inkubation mit dem MacroDel zu einem Anstieg der Fluoreszenz von Tumorzellen kommt. Um die intrazelluläre Aufnahme des MacroDels nachzuweisen, ist jedoch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse notwendig. Die Durchflusszytometrie kann nicht unterscheiden, ob die fluoreszierenden Substanzen an der Zelloberfläche haften oder sich intrazellulär befinden. Weiterhin sollte über die Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre Verteilung des MacroDels analysiert werden.

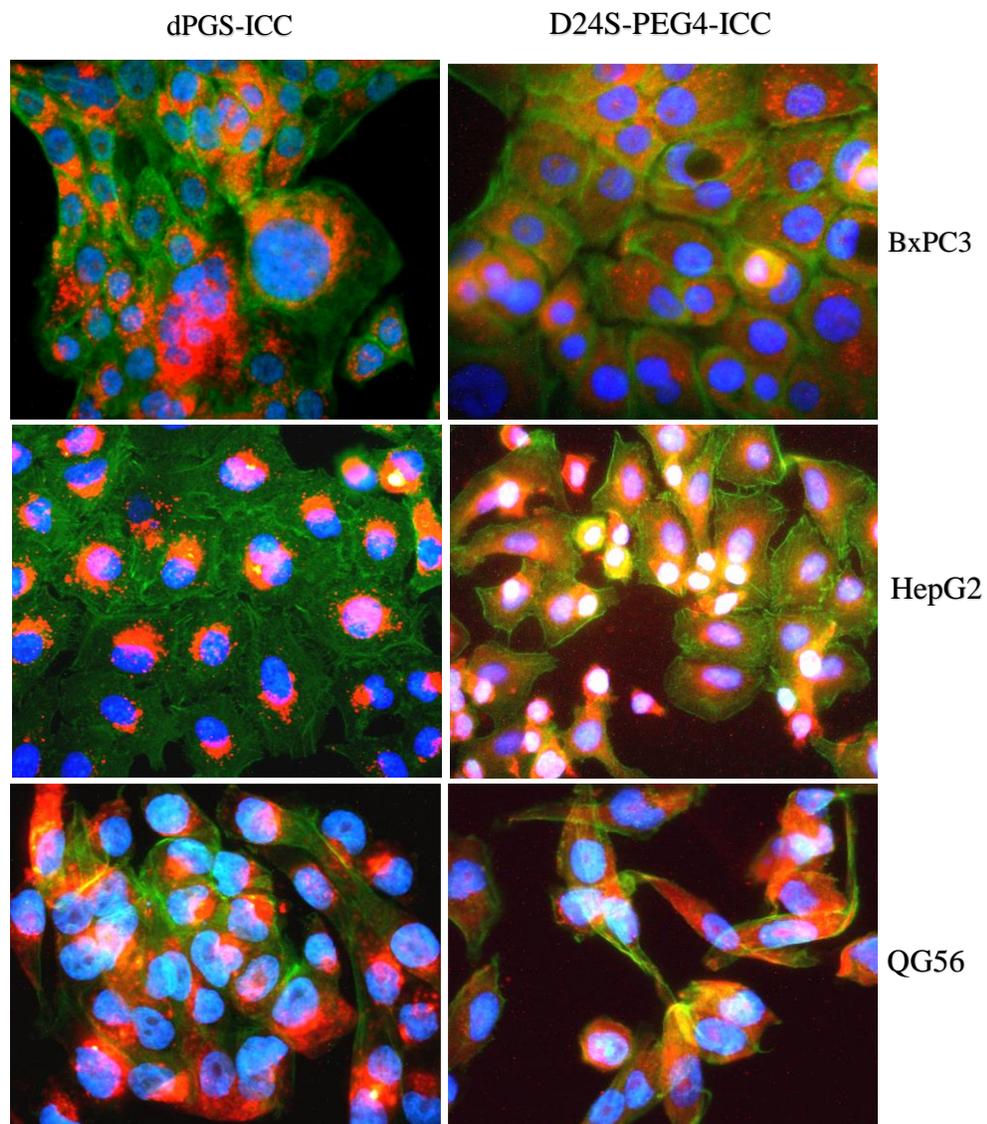
- Aufnahme und Verteilung des MacroDels D24S-PEG4-ICC im Vergleich zum D24OH-PEG4-ICC

Das MacroDel sollte bezüglich seiner Aufnahme im Vergleich zu einem nicht sulfatierten MacroDel getestet werden. Das MacroDel D24S-PEG4-ICC und das D24OH-PEG4-ICC wurden auf zwölf unterschiedliche Tumorzelllinien aus Leber (HepG2, SkHep1), Pankreas (BXPC3, MiaPaCa, QGP-1), Kolon (DLD-1, LOVO), Lunge (QG56, A549), Ovar (A2780) und Zervix (SKOV3, Hela) 24h lang inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. Auf allen Tumorzelllinien konnte die intrazelluläre Aufnahme von D24S-PEG4-ICC nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Bei der Inkubation mit D24OH-PEG4-ICC kam es bei keiner Tumorzelllinie zu einer nachweisbaren Aufnahme (Ergebnisse nicht aufgeführt).

- Aufnahme und Verteilung des MacroDels D24S-PEG4-ICC im Vergleich zum dPGS-ICC

Nachdem die intrazelluläre Aufnahme von D24S-PEG4-ICC nachgewiesen werden konnte, sollte das Verteilungsmuster analysiert werden und mit dem Verteilungsmuster der Vorläufersubstanz, dem dPGS, verglichen werden. Im folgenden Versuch wurde das MacroDel D24S-PEG4-ICC und das dPGS-ICC auf sieben Tumorzelllinien stammend aus dem Ovar (A2780, SKOV3), der Lunge (A549, QG56), dem Pankreas (BxPC3, QGP-1) und der Leber (HepG2) getestet. Die Fluoreszenz wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert.

Beispielhaft wurden Aufnahmen von BxPC3, HepG2, QG56 und A549 dargestellt.



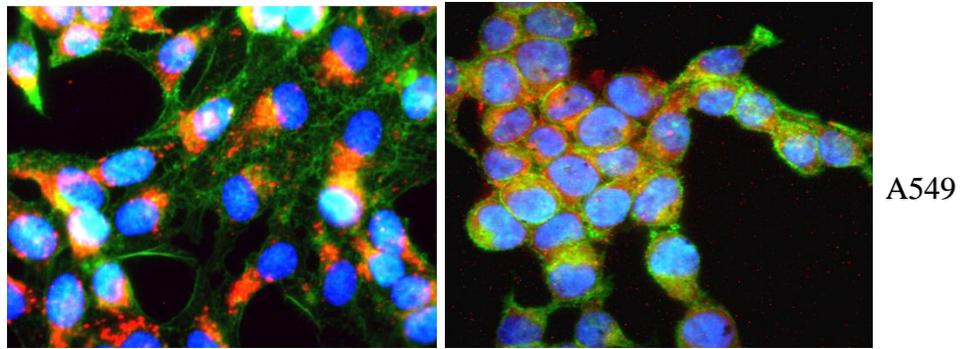


Abb. 10: Das D24S-PEG4-ICC verteilt sich homogen während das dPGS-ICC überwiegend vesikulär vorliegt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von BxPC3, HepG2, A549 und QG56 nach 24h Inkubation mit D24S-PEG4-ICC und dPGS-ICC am Epifluoreszenzmikroskop. 40x Objektiv. Kernfärbung mit Dapi (blau); Aktinfärbung mit Phalloidin (grün); ICC (rot).

Das D24S-PEG4-ICC verteilte sich überwiegend homogen. Das dPGS-ICC hingegen lag überwiegend gruppiert in Form von Vesikeln vor. Bei BxPC3 und A549 war dieser Unterschied besonders ausgeprägt. Bei HepG2 und QG56 waren nach Inkubation mit D24S-PEG4-ICC zusätzlich zur homogenen Verteilung gruppierte Signalverstärkungen in Form vesikulärer Ansammlungen zu finden. A2780, QGP-1 und SKOV3 zeigten ähnliche Verteilungsmuster.

- Intrazelluläre Verteilung des MacroDels D24S-PEG4-ICC

In der Epifluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass das D24S-PEG4-ICC aufgenommen wird und überwiegend homogen mit einzelnen vesikulären Ansammlungen verteilt vorliegt. Es sollte nun die Konfokalmikroskopie eingesetzt werden, um die Ergebnisse zu bestätigen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das MacroDel sich im Zytoplasma und/oder im Zellkern anreichert. Hierfür wurde das D24S-PEG4-ICC 24h lang mit vierzehn Zelllinien stammend aus Leber (HUH7, HepG2, SkHep1), Pankreas (MiaPaca-2, QGP-1), Kolon (HCT116, SW480), Lunge (QG56), Mamma (MCF-7), Ovar (A278), Lymphomen und Leukämien (HL60, MOLT4, U937), epidermoiden Gewebe (A431) und immortalisierten Rattenhepatozyten inkubiert und mit einem Konfokalmikroskop ausgewertet.

Es wurden beispielhaft Aufnahmen von HUH7, MiaPaCa-2 und A2780 jeweils einmal mit und einmal ohne Phalloidinfärbung (grün) dargestellt.

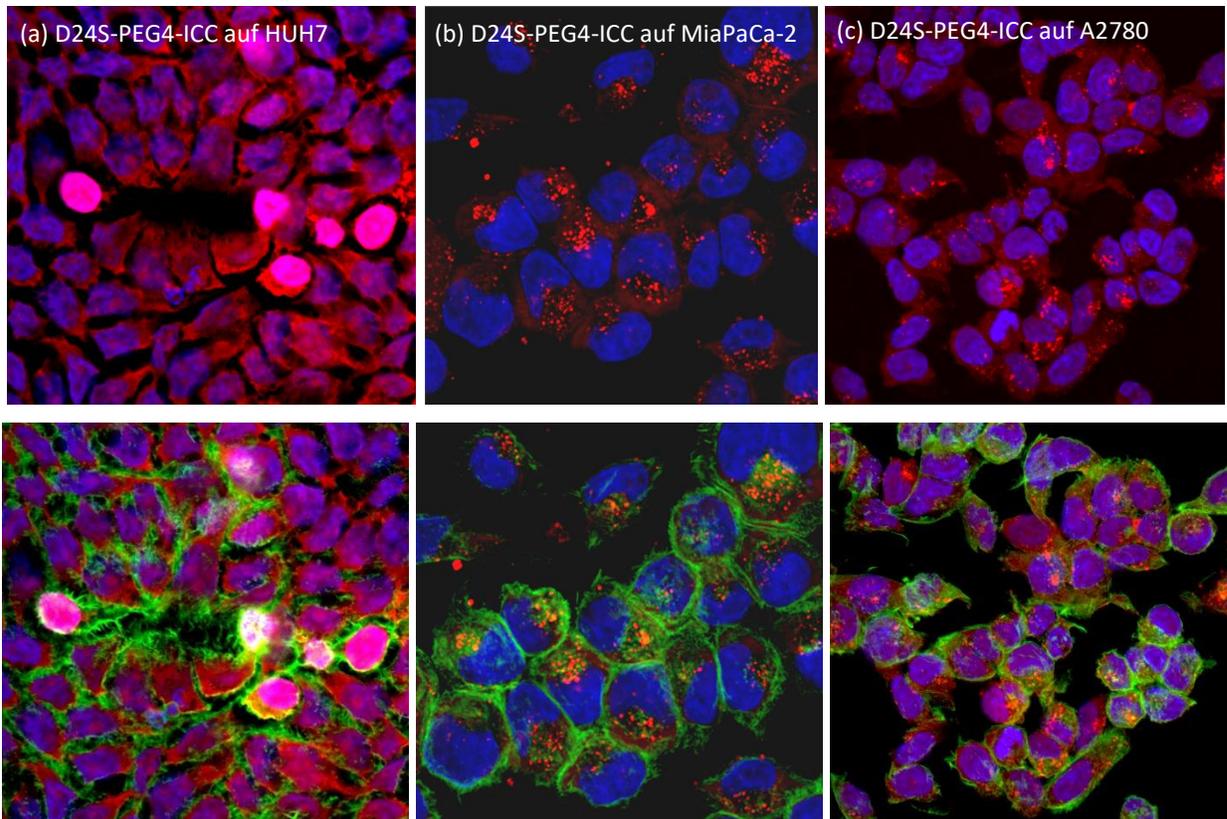


Abb. 11: Das D24S-PEG4-ICC liegt je nach Tumorzelllinie in unterschiedlichem Maße zytoplasmatisch und intranukleär vor. Das D24S-PEG4-ICC verteilt sich bei HUH7 und A2780 gleichermaßen zytoplasmatisch und intranukleär, bei MiaPaCa-2 überwiegend zytoplasmatisch.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von HUH7, A2780 und MiaPaCa-2 nach 24h Inkubation mit D24S-PEG4-ICC am Konfokalmikroskop. 40x Objektiv. Kernfärbung mit Dapi (blau); Aktinfärbung mit Phalloidin (grün); ICC (rot).

Das D24S-PEG4-ICC wurde je nach Zelllinie in unterschiedlichem Maße zytoplasmatisch und intranukleär aufgenommen. Es lag bei HUH7 und A2780 gleichermaßen zytoplasmatisch und intranukleär vor und bei MiaPaCa-2 überwiegend zytoplasmatisch. Bei MiaPaCa-2 und A2780 fiel weiterhin die starke vesikuläre Ansammlung von D24S-PEG4-ICC auf. Bis auf HepG2 zeigten die restlichen Tumorzelllinien eine zytoplasmatische und intranukleäre Verteilung von D24S-PEG4-ICC. Bei HepG2 kam es überwiegend zu einer zytoplasmatischen Verteilung ohne Nachweis im Zellkern. In den immortalisierten Rattenhepatozyten kam es sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu einer Ansammlung von D24S-PEG4-ICC.

Die Konfokalmikroskopie konnte also die zytoplasmatische Aufnahme von D24S-PEG4-ICC bestätigen und ergab Hinweise für eine intranukleäre Anreicherung.

3.3. Untersuchung des MacroDels auf Zytotoxizität *in vitro*

In den vorherigen Versuchen konnte die intrazelluläre Aufnahme des MacroDels durch Zelllinien *in vitro* nachgewiesen werden. Es sollte zunächst die Wirkung des MacroDels ohne Konjugation mit Wirkmolekülen auf Zellen analysiert werden. Es wurde die MTT Methode eingesetzt.

3.3.1. Zytotoxizitätsscreening

Es sollte zuerst ein Screening durchgeführt werden, um möglichst viele unterschiedliche Tumorzelllinien auf die MacroDels zu testen. Hierfür wurde das D24S-PEG4 und das D48S-PEG4 auf fünfzehn Tumorzelllinien und der immortalisierten Rattenhepatozytenzelllinie getestet.

		IC ₅₀ -Intervall [nM]	
		D24S-PEG4	D48S-PEG4
Leber	HepG2	>5000	1000-5000
	HUH7	>5000	>5000
	SkHep1	<1000	<1000
	MiaPaCa-2	>5000	5000
	QGP-1	1000-5000	<1000
	HCT116	<1000	<1000
	HT29	>5000	-
	LOVO	n. i.	-
	SW480	>5000	1000-5000
Lunge	QG56	n. i.	n. i.
Mamma	MCF-7	>5000	5000
	SKBR3	n. i.	-
Ovar	A2780	<1000	<1000
Vulva	A431	n. i.	>5000
Lymphom	Jurkat	>5000	>5000
Immortalisierte Rattenhepatozyten	BRL-3A	>5000	<1000

Tab. 6: Die Wirkung von D24S-PEG4 und D48S-PEG4 unterscheidet sich je nach Zelllinie. Darstellung von IC₅₀-Intervallen nach 72h Inkubation mit D24S-PEG4 und D48S-PEG4 auf unterschiedliche Zelllinien. Als nicht inhibiert (n. i.) wurden die Zelllinien markiert, die bei 5000nM eine Viabilitätsminderung von ≤10% im Vergleich zur Mediumreihe zeigten. Benutzt wurde der Mittelwert von vier Messungen.

Bei einigen Tumorzelllinien bewirkte eine Inkubation mit dem MacroDel allein zytotoxische Wirkungen. SkHep1 und A2780 reagierten stark auf das D24S-PEG4 und das D48S-PEG4 (IC₅₀-Wert <1000nM). Das D24S-PEG4 zeigte weiterhin einen starken Effekt auf HCT116, das D48S-PEG4 auf HCT116, BRL-3A und QGP-1 (IC₅₀-Wert <1000nM). Das D24S-PEG4 führte auf QGP-1, das D48S-PEG4 auf SW480 und HepG2 zu einem geringeren Effekt (1000nM ≤ IC₅₀-Wert ≤ 5000nM).

Keinen Effekt zeigte das D24S-PEG4 auf LOVO, QG56, SKBR3 und A431, das D48S-PEG4 auf QG56.

Die Versuche wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Das Screening mit D24S-PEG4 wurde zweimal wiederholt und konnte die Ergebnisse bestätigen.

3.3.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Zytotoxizität

In den durchflusszytometrischen Analysen konnte auf ausgewählten Zelllinien nachgewiesen werden, dass es zu einer verstärkten Aufnahme von D48 MacroDels im Vergleich zu D24 MacroDels kommt. Es sollte untersucht werden, ob D48 MacroDels ebenfalls im Vergleich zu D24 MacroDels einen stärkeren zytotoxischen Effekt hervorrufen. Hierfür wurde die Wirkung von D24S mit D48S und D24S-PEG8 mit D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 verglichen. Je niedriger der IC_{50} -Wert, desto höher die zytotoxische Wirkung. A2780 und SkHep1 wurden für weitere Versuche ausgewählt, da sie im Screeningversuch am stärksten auf die MacroDels reagierten.

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von D24S, D48S, D24S-PEG8 und D48S-PEG8 wurde am Beispiel von A2780 graphisch dargestellt.

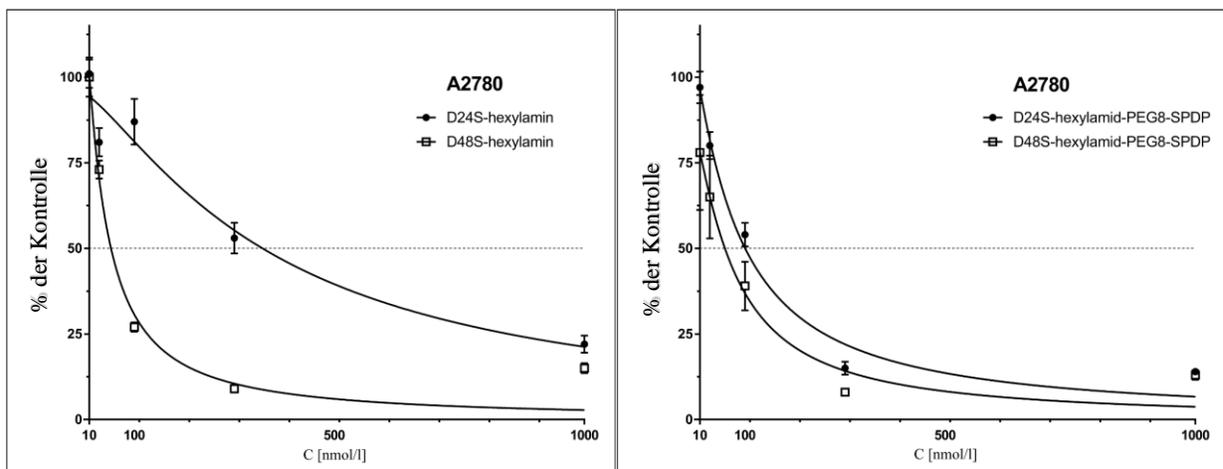


Abb. 12: Die Konjugate D48S-PEG8 und D48S wiesen jeweils im Vergleich zu D24S-PEG8 und D24S auf A2780 einen geringeren IC_{50} -Wert auf.

Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von D24S (D24S-hexylamin), D48S (D48S-hexylamin), D24S-PEG8 (D24S-hexylamid-PEG8-SPDP) und D48S-PEG8 (D48S-hexylamid-PEG8-SPDP) nach 72h Inkubation auf A2780. Mittelwert von vier Messungen mit ± 1 Standardabweichung.

Die errechneten IC_{50} -Werte von D24S, D48S, D24S-PEG8 und D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 wurden in folgender Tabelle zusammengefasst.

Zelllinie	Substanz	IC ₅₀ -Wert [nM]	95% C.I. [nM]	R ²
A2780	D24S	385,7	284,4-503	0,93
	D48S	39,1	11,66-58,63	0,97
	D24S-PEG8	93,4	56,9-125,5	0,97
	D48S-PEG8	81,8	10,1-138,3	0,88
SKHep1	D24S	1143	904,3-1945	0,68
	D48S	53,58	26,7-108,6	0,96
	D24S-PEG8	67,7	41,3-88,2	0,94
	D48S-PEG8	62,3	17,2-89,3	0,92

Tab. 7: Das D48S führt im Vergleich zu D24S auf A2780 und SkHep1 zu einem signifikant geringeren IC₅₀-Wert. Das D48S-PEG8 führt im Vergleich zu D24S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 zu keiner signifikanten Verminderung des IC₅₀-Wertes.

Darstellung von IC₅₀-Werten nach 72h Inkubation von D24S, D48S, D24S-PEG8 und D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1. Angabe des Konfidenzintervalls (95% C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes (R²). Dargestellt ist der Mittelwert von vier Messungen.

Die IC₅₀-Werte von D48S waren im Vergleich zu den IC₅₀-Werten von D24S auf A2780 und SkHep1 signifikant vermindert (Intervallvergleich), was für eine höhere zytotoxische Wirkung der D48 MacroDels spricht. Die IC₅₀-Werte von D48S-PEG8 waren im Vergleich zu den IC₅₀-Werten von D24S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 vermindert. Der Unterschied war nicht signifikant (Intervallvergleich).

Der Vergleich zwischen D24S und D48S wurde dreimal auf SkHep1 und zweimal auf A2780 unabhängig voneinander mit jeweils vier Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten die gleiche Tendenz. Der Versuch mit D24S-PEG8 und D48S-PEG8 wurde auf SkHep1 ein zweites Mal durchgeführt. Dabei ergab sich eine signifikante Verminderung des IC₅₀-Wertes nach Inkubation von D48S-PEG8 im Vergleich zu D24S-PEG8.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Erhöhung der Sulfatgruppenanzahl zu einem höheren zytotoxischen Effekt führen.

3.3.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Zytotoxizität

In den durchflusszytometrischen Analysen konnte an ausgewählten Zelllinien gezeigt werden, dass unterschiedliche Spacer und Linker die Aufnahme des MacroDels beeinflussen. Es sollte nun untersucht werden, ob die unterschiedlichen Linker ebenfalls einen Einfluss auf die Zytotoxizität des MacroDels haben.

Es wurden D24S, D24S-decPEG4, D24S-PEG4, D24S-PEG8 und D48S, D48S-PEG4 und D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 verglichen. Die genaue Zusammensetzung der Spacer und Linker kann in der Tab. 5 nachgeschlagen werden.

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der MacroDels wurden am Beispiel von A2780 graphisch dargestellt.

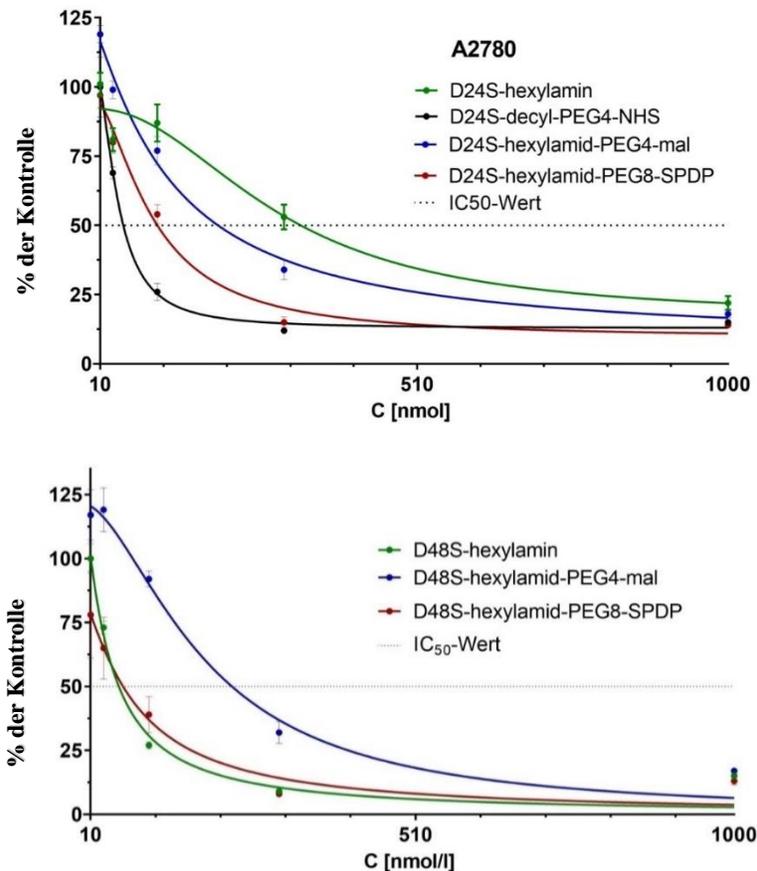


Abb. 13: Die Spacer und Linker führen auf A2780 zu einer unterschiedlich starken Viabilitätsminderung. Von den D24 MacroDels besitzt das D24S-decPEG4 den geringsten, das D24S den höchsten IC₅₀-Wert. Von den D48 MacroDels besitzen das D48S und das D48S-PEG8 den geringsten IC₅₀-Wert.

Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von D24S (D24S-hexylamin), D24S-decPEG4 (D24S-decyl-PEG4-NHS), D24S-PEG4 (D24S-hexylamid-PEG4-mal), D24S-PEG8 (D24S-hexylamid-PEG8-SPDP) und D48S (D48S-hexylamin), D48S-PEG4 (D48S-hexylamid-PEG4-mal), D48S-PEG8 (D48S-hexylamid-PEG8-SPDP) nach 72h Inkubation auf A2780 und SkHep1. Mittelwert von vier Messungen \pm 1 Standardabweichung.

Die errechneten IC₅₀-Werte der ausgewählten MacroDels wurden in folgender Tabelle zusammengefasst.

		Substanz	IC ₅₀ -Wert [nM]	95% C.I. [nM]	R ²	
A2780	D24-MacroDel	D24S	386	284-503	0,93	
		D 24S-decPEG4	21.4	2.2e ⁻⁵ -48,9	0.96	
		D 24S-PEG4	132	94,1-168	0.98	
		D24S-PEG8	93,4	56.9-125.5	0,97	
D48-MacroDel	D48-MacroDel	D48S	39.1	12-59	0.97	
		D 48S-PEG4	184.9	154-221	0.87	
		D48S-PEG8	81.79	11-139	0.88	
SkHep1	D24-MacroDel	D24S	676	410-1093	0.82	
		D24S-decPEG4	59,6	15,2-95,8	0,93	
		D24S-PEG4	389,4	328-460	0,97	
		D24S-PEG8	211	100-114	0,97	
	D48-MacroDel	D48-MacroDel	D48S	99,5	92,3-142	0,92
			D48S-PEG4	385,3	304-492	0,93
			D48S-PEG8	126	95,0-154	0,97

Tab. 8: Die unterschiedlichen Spacer und Linker führen auf A2780 und SkHep1 zu unterschiedlich starken Viabilitätsminderungen.

Darstellung der IC₅₀-Werte nach 72h Inkubation von D24S, D24S-decPEG4, D24S-PEG4, D24S-PEG8, D48S, D48S-PEG4 und D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1. Angabe des Konfidenzintervalls (95% C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes (R²). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von vier Messungen.

Die unterschiedlichen Spacer und Linker der MacroDels führten auf A2780 und SkHep1 zu unterschiedlich starken Viabilitätsminderungen. Das D24S-decPEG4 hatte im Vergleich zu den anderen D24-MacroDels auf A2780 und SkHep1 den geringsten IC₅₀-Wert. Dieser Unterschied war signifikant (Intervallvergleich). Das D24S-PEG8 gefolgt vom D24S-PEG4 wirkten nach dem D24S-decPEG4 am stärksten. Der IC₅₀-Wert vom D24S-PEG8 im Vergleich zu D24S-PEG4 war jedoch nur auf SkHep1 signifikant vermindert. Die geringste Wirkung zeigte das D24S, wobei dieser Unterschied im Vergleich zu D24S-PEG4 nur auf A2780 signifikant war. Im Gegensatz zu den D24-MacroDels, führte bei den D48-MacroDels das D48S, gefolgt vom D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 zum geringsten IC₅₀-Wert. Der Unterschied im IC₅₀-Wert zwischen D48S und D48S-PEG8 war jedoch nicht signifikant. Das D48S-PEG4 wies den höchsten IC₅₀-Wert auf und war signifikant höher als der IC₅₀-Wert von D48S und D48S-PEG8. Es führten also unterschiedliche Spacer und Linker bei den D24- und D48-MacroDels zu dem stärksten zytotoxischen Effekt.

Der Versuch wurde auf SkHep1 zweimal unabhängig voneinander mit jeweils vier Stichproben durchgeführt und konnte die oben genannten Ergebnisse bestätigen. Auf A2780 wurde der Versuch einmal mit vier Stichproben durchgeführt.

3.4. Untersuchung des MacroDels in vivo

Das MacroDel wurde von allen getesteten Zelllinien *in vitro* aufgenommen. Es sollte nun untersucht werden, wie sich das MacroDel *in vivo* verhält. Dafür wurden drei athymischen Mäusen mit einem humanen Kolonkarzinom (HT29) und einem gastropankreatischen Tumor 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC subkutan verabreicht. Sie wurden nach 24h getötet und Gewebsschnitte wurden aus den Organen und Tumoren angefertigt.

- Aufnahme des MacroDels D24S-ICC im nicht Tumorgewebe der Maus

Es wurden Gewebsschnitte aus Leber, Niere, Herz, Lymphknoten, Lunge, Darm, Rückenmark und Gehirn angefertigt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht.

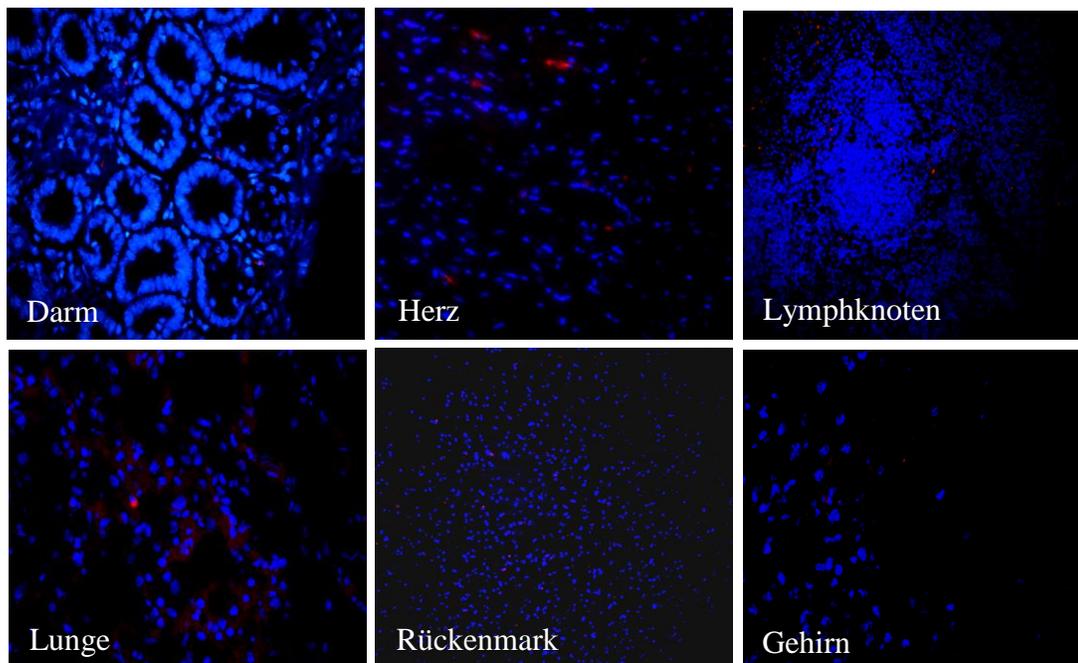


Abb. 14: Keine nachweisbare Aufnahme von D24S-ICC in Darm, Lymphknoten, Rückenmark und Gehirn und geringe Signalverstärkung in Herz und Lunge 24h nach Injektion.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Gewebsschnitten aus Darm, Herz, Lymphknoten, Rückenmark, Lunge und Gehirn einer athymischen Maus 24h nach subkutaner Injektion von 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC. Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop, 40x Objektiv. Kernfärbung mit Dapi (blau); ICC (rot).

Im Darm, Rückenmark, Gehirn und in den Lymphknoten der athymischen Maus kam es 24h nach Injektion von 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC zu keiner nachweislichen Aufnahme. Die Herz- und Lungengewebschnitte zeigten minimale Fluoreszenzsignale, wahrscheinlich aufgrund einer sehr geringen D24S-ICC Anreicherung.

Im Gegensatz dazu war in den epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Leber und der Niere eine starke Fluoreszenz zu erkennen.

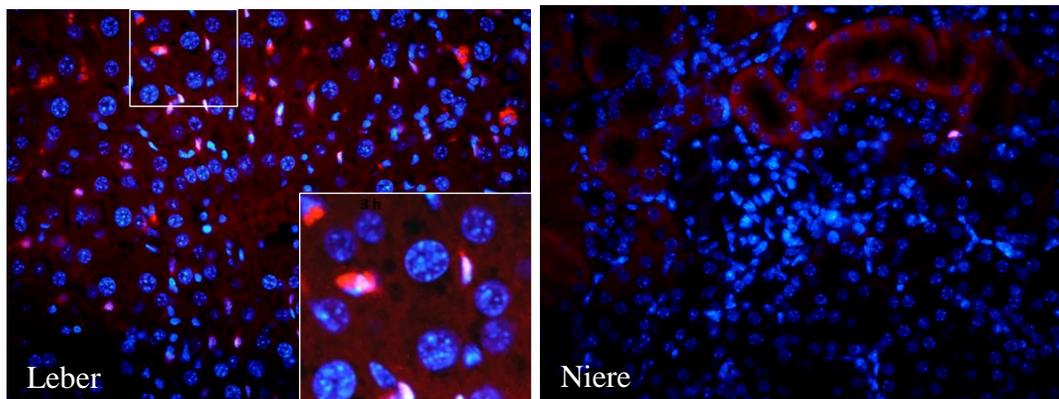


Abb. 15: Nachweisbare Aufnahme von D24S-ICC in Leber und Niere 24h nach Injektion. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Gewebsschnitten der Niere und der Leber einer athymischen Maus 24h nach subkutaner Injektion von 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC. Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop, 40x Objektiv. Aufnahmevergrößerung der Leber. Kernfärbung mit Dapi (blau); ICC (rot).

24h nach subkutaner Injektion von D24S-ICC war in der Leber und Niere der athymischen Maus das D24S-ICC nachzuweisen. In der Niere kam es besonders in den Tubuli zu einer Signalverstärkung. Es handelt sich am wahrscheinlichsten um die proximalen Tubuli, da umliegend zellreiche Verbände zu erkennen sind, die den Glomeruli entsprechen. In den Glomeruli waren keine Fluoreszenzsignale nachzuweisen. Das D24S-ICC verteilte sich in der Leber inhomogen und wies eine besonders hohe Signalintensität in kleineren nicht hepatozytären Zellen auf. Es handelt sich wahrscheinlich um Ito- und/oder Kupferzellen.

Der Versuch erfolgte auf insgesamt drei athymischen Mäusen. Die Gewebsschnitte der zwei weiteren Mäuse wiesen ähnliche Verteilungsmuster auf.

Der gleiche Versuch wurde mit einer höheren Dosis wiederholt. Es wurden drei weiteren athymischen Mäusen 30mg/kg Körpergewicht D24S-ICC intraperitoneal verabreicht. Trotz der sehr hohen Konzentration kam es ebenfalls nur in der Leber und Niere zu einer nachweislichen D24S-ICC Aufnahme, jedoch bei stärkerer Signalintensität.

- Aufnahme des MacroDels D24S-ICC im Tumorgewebe der Maus

24h nach Injektion von 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC wurden die athymischen Mäuse getötet und Gewebsschnitte vom humanen Kolonkarzinom (HT29) und vom gastropankreatischen Tumor hergestellt.

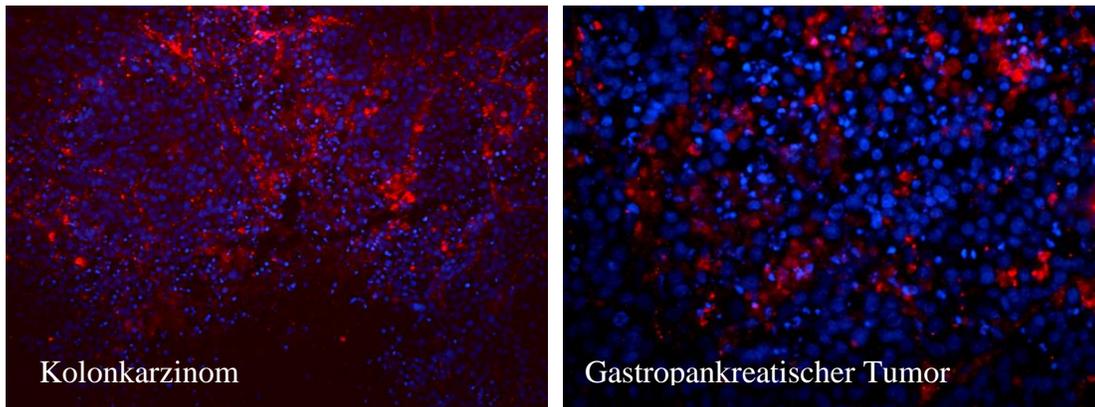


Abb. 16: Nachweisbare Aufnahme des D24S-ICC im humanen Kolonkarzinom und im gastropankreatischen Tumor der athymischen Maus 24h nach Injektion von D24S-ICC.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Gewebsschnitten des humanen Kolonkarzinoms HT29 und des gastropankreatischen Tumors einer athymischen Maus 24h nach subkutaner Injektion von 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC. Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop, 40x Objektiv. Kernfärbung mit Dapi (blau); ICC (rot).

24h nach subkutaner Injektion von 2mg/kg Körpergewicht D24S-ICC war das D24S-ICC im humanen Kolonkarzinom und im gastropankreatischen Tumor der athymischen Maus nachzuweisen. Das D24S-ICC akkumulierte in beiden Fällen vermehrt im Randbereich der Tumore (Bilder nicht aufgeführt).

Der Versuch erfolgte auf drei athymischen Mäusen. Die Gewebsschnitte der zwei weiteren Mäuse wiesen ähnliche Verteilungsmuster auf.

- Verträglichkeit des MacroDels

Nach Injektion von 2mg bzw. 30mg/kg Körpergewicht D24S-PEG4-ICC in den athymischen Mäusen wurden die Mäuse über 24h beobachtet. Während den 24h kam es bei keiner athymischen Maus zu einer Unverträglichkeitsreaktion oder zu Verhaltensauffälligkeiten. Weiterhin blieb in diesem Zeitraum das Gewicht konstant.

3.5. Untersuchung der MacroDel-RNase Konjugate

Das MacroDel konnte von allen Tumorzelllinien *in vitro* aufgenommen werden und reichert sich *in vivo* ebenfalls im Tumorgewebe an. Es soll am Beispiel des Immunoenzym ScFvFcRNase und ScFvFcRNaseI untersucht werden, ob sich das MacroDel als TTDS in der Tumorthherapie für Enzyme eignet. Weiterhin zeigte das MacroDel auf einigen Tumorzelllinien *in vitro* einen zytotoxischen Effekt, so dass ebenfalls untersucht werden sollte, ob die Konjugation mit der ScFvFcRNase und ScFvFcRNaseI zu einer Wirkverstärkung führt.

3.5.1. Nachweis der Konjugation von RNase und RNaseI an das MacroDel

Die Immunoenzyme RNaseI (ScFvFcRNaseI) und RNase (ScFvFcRNase) wurden mit dem MacroDel D24S-PEG4 über den unspaltbaren Linker Maleimid konjugiert (durch Mivenion GmbH). Die Immunoenzyme wurden in zwei unterschiedlichen Klonen hergestellt und unterscheiden sich strukturell und in ihrem Molekulargewicht. Die Konjugation sollte mittels nativer Gelelektrophorese geprüft werden. Die native Gelelektrophorese eignet sich besonders gut für die anionischen MacroDels, da die Substanzen nach Ladung aufgetrennt werden [108]. Die Konjugation erfolgte mit dem MacroDel im Überschuss, um einen möglichst hohen Kopplungserfolg zu erreichen. Nach Synthese des D24S-RNaseI Konjugates wurde über eine NP-HPLC (Normal Phase High Performance Liquid Chromatography) versucht, das überschüssige MacroDel aus der Lösung zu entfernen. Dabei wurde die Mischung über eine Säule mit polarer stationärer Phase nach Polarität aufgetrennt. Sehr polare Substanzen, wie das stark anionische MacroDel, verbleiben länger in der Säule, während das weniger polare Konjugat schneller die Säule passiert. Die aufgefangene Lösung wurde mit den Fraktionen 1 bis 8 gekennzeichnet. Auf den Gelen wurde die Fraktion 4 bis 8 des D24S-RNaseI Konjugates, das Konjugat D24S-RNase, die RNaseI, die RNase und ein Marker aufgetragen.

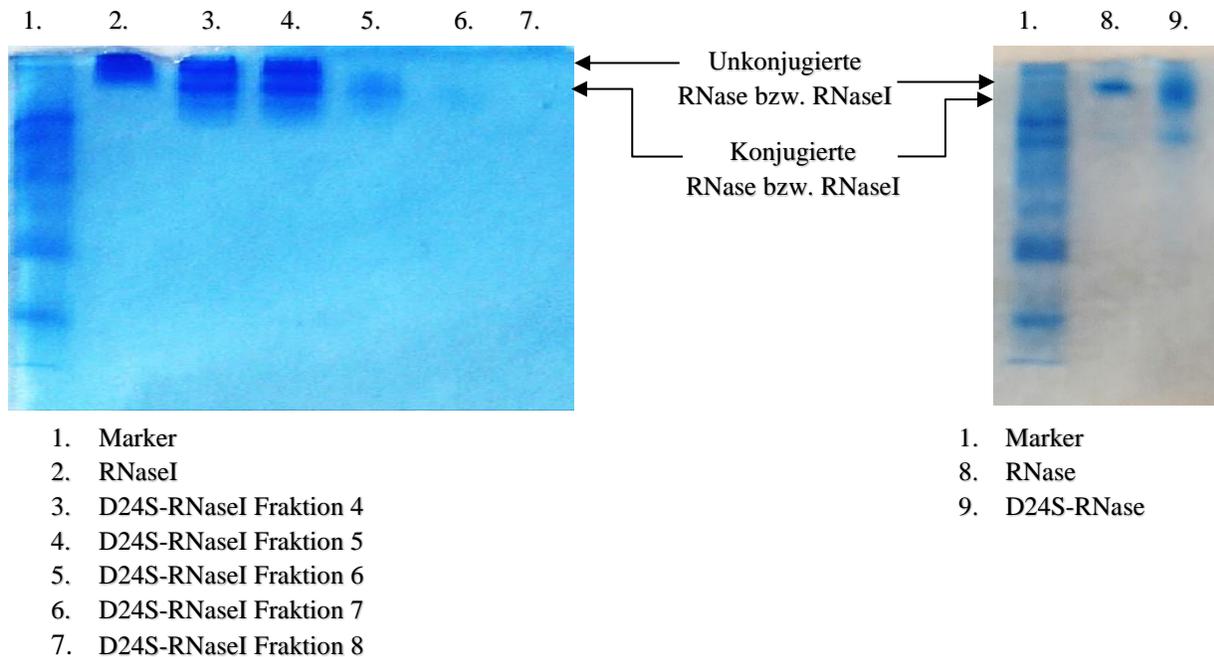


Abb. 17: Das MacroDel liegt bei den Konjugaten D24S-RNaseI Fraktion 4-6 und D24S-RNase gekoppelt vor. Bei der Fraktion 4-5 des D24S-RNaseI Konjugates und bei dem Konjugat D24S-RNase ist zusätzlich die RNase bzw. die RNaseI ungekoppelt nachweisbar. Die Fraktion 7 und 8 des D24S-RNaseI Konjugates weisen keine Banden auf.

Dargestellt ist die Aufnahme einer nativen Gelelektrophorese mit Coomassie Färbung. Aufgetragen wurden D24S-RNaseI Fraktion 4-8, RNaseI, D24S-RNase, RNase und ein Marker.

Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, wodurch sich hauptsächlich Proteine anfärben lassen. Die ungekoppelten Enzyme sind in Reihe 2 und 8 mit einer Bande im Gel deutlich erkennbar. Auf gleicher Höhe ist bei der Fraktion 4-5 des D24S-RNaseI Konjugates und bei dem D24S-RNase Konjugat eine Bande zu sehen, die dem ungekoppelten Anteil der RNaseI bzw. RNase entspricht. Die zweite Bande entspricht der konjugierten RNaseI bzw. RNase und ist im Gel schneller gelaufen. Diese ist bei der Fraktion 6 des D24S-RNaseI Konjugates nur schwach ausgeprägt, bei der Fraktion 7 und 8 ist keine Bande nachweisbar. Das Konjugat D24S-RNase weist eine dritte Bande auf, die schneller gelaufen ist als der gekoppelte Anteil. Es könnte sich um RNasen handeln, die mehr als ein MacroDel gebunden haben.

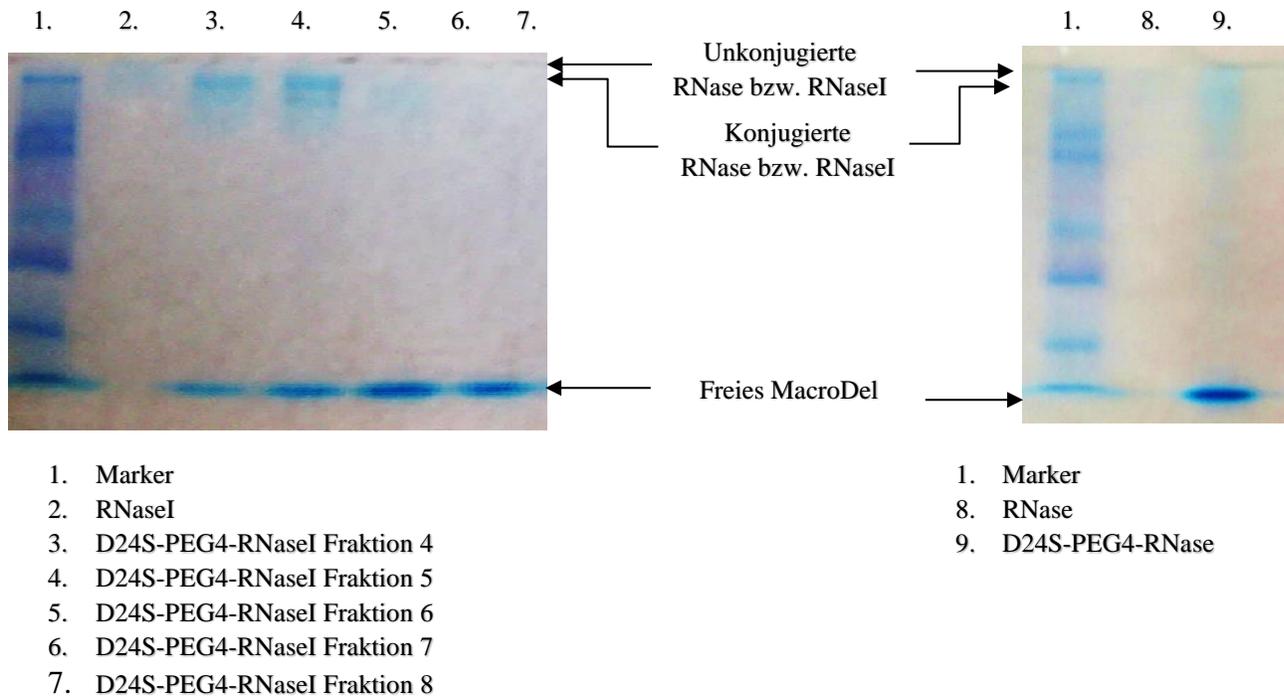


Abb. 18: Die MacroDels liegen bei dem Konjugat D24S-RNaseI Fraktion 4-6 und D24S-RNase gekoppelt vor. Die Fraktion 7 und 8 des D24S-PEG4-RNaseI Konjugates weisen keine Banden auf. Bei allen Konjugaten ist zusätzlich das freie MacroDel nachweisbar.

Dargestellt ist die Aufnahme einer nativen Gelelektrophorese mit Alcianblau Färbung. Aufgetragen wurde D24S-RNaseI Fraktion 4-8, RNaseI, D24S-RNase, RNase und ein Marker.

Ein zweites Gel wurde mit Alcianblau gefärbt, wodurch sich in nativen Gelelektrophoresen Sulfatgruppen anfärben lassen [109]. Die Färbung konnte das Ergebnis aus der Coomassie-Färbung bestätigen. Die ungekoppelten Enzyme sind in Reihe 2 und 8 kaum zu erkennen. Die Fraktion 4-6 des Konjugates D24S-RNaseI und das Konjugat D24S-RNase weisen eine Bande im Gel auf, die dem gekoppelten Anteil der RNaseI bzw. RNase entspricht. Bei der Fraktion 5 des D24S-PEG4-RNaseI ist diese nur schwach ausgeprägt, bei der Fraktion 7-8 ist diese gar nicht vorhanden. Die Lauffront ist bei beiden MacroDel-RNase Konjugaten stark gefärbt. Es handelt sich um das freie MacroDel, welches im Überschuss vorliegt. Bei dem D24S-RNaseI Konjugat ist die Färbung der Lauffront umso stärker, je höher die Fraktion. Dies ist auf die NP-HPLC zurückzuführen, wo stärker geladene Substanzen die Säule langsamer passieren und somit später aufgefangen werden.

3.5.2. Untersuchung der MacroDel-RNase Konjugate auf Zytotoxizität *in vitro*

Nachdem die Kopplung der RNase und RNaseI an das MacroDel D24S-PEG4 nachgewiesen werden konnte, sollte die Wirkung dieser Konjugate auf Tumorzellen *in vitro* untersucht werden und mit der Wirkung des unkonjugierten D24S-PEG4 verglichen werden.

- Zytotoxizitätsscreening der MacroDel-Konjugate D24S-RNase und D24S-RNaseI

Es sollte zuerst ein Screening durchgeführt werden, um möglichst viele unterschiedliche Tumorzelllinien auf die Konjugate zu testen. Die Konjugate D24S-RNaseI und D24S-RNase sowie ihre Kontrollen RNaseI und RNase wurden auf unterschiedliche Tumorzelllinien und die immortalisierte Rattenhepatozytenzelllinie getestet. Die Messung erfolgte mittels MTT.

		IC ₅₀ -Intervall [nM]	
		D24S-RNaseI	D24S-RNase
Leber	HUH7	>300	n. i.
	SKHep1	>300	10-100
Pankreas	MiaPaCa	n. i.	n. i.
	QGP-1	>300	>100
	Panc-1	-	n. i.
Kolon	HT29	-	n. i.
	LOVO	n. i.	n. i.
	SW480	>300	>100
Lunge	QG56	n. i.	n. i.
Mamma	MCF-7	n. i.	>100
	SKBR3	>300	n. i.
Ovar	A2780	>300	10-100
Vulva	A431	n. i.	-
Lymphome und Leukämien	Jurkat	n. i.	-
	MOLT4	n. i.	-
	U937	n. i.	n. i.
Immortalisierte Rattenhepatozyten	BRL-3A	>300	-

Tab. 9: Die Wirkung von D24S-RNaseI und D24S-RNase unterscheidet sich je nach Zelllinie. Allein bei A2780 und SkHep1 wird nach Inkubation mit D24S-RNase der IC₅₀ Wert erreicht.

Darstellung von IC₅₀-Intervallen nach 72h Inkubation mit D24S-RNaseI und D24S-RNase auf unterschiedliche Zelllinien. D24S-RNaseI wurde in den Konzentrationen 300 und 100nM, D24S-RNase in den Konzentrationen 100, 10 und 1nM aufgetragen. Als nicht inhibiert (n. i.) wurden die Zelllinien markiert, die bei der höchsten Konzentration (300nM bzw. 100 nM) eine Viabilitätsminderung von ≤10% im Vergleich zur Mediumreihe zeigten. Dargestellt ist der Mittelwert von vier Messungen.

Die Zelllinien reagierten unterschiedlich stark auf die Konjugate D24S-RNaseI und D24S-RNase. Das D24S-RNaseI Konjugat erreichte bei einer Konzentration von 300nM bei keiner Zelllinie seinen IC₅₀-Wert, während das D24S-RNase Konjugat auf A2780 und SkHep1 einen IC₅₀-Wert zwischen 10 und

100nM aufwies. Auf den weiteren Zelllinien erreichte das D24S-RNase Konjugat bei einer Konzentrationen von 100nM ebenfalls nicht den IC₅₀-Wert. Nach Inkubation mit RNaseI und RNase kam es bei keiner Zelllinie zu einer Veränderung der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Mediumkontrolle (nicht aufgeführt).

- IC₅₀-Wert des MacroDel-Konjugates D24S-RNase im Vergleich zum MacroDel

Im Screeningversuch zeigte sich, dass die Tumorzelllinien A2780 und SkHep1 sensibel auf das D24S-RNase Konjugat reagierten. Es sollte nun der IC₅₀-Wert von D24S-RNase auf A2780 und SkHep1 ermittelt werden und mit dem IC₅₀-Wert des unkonjugierten MacroDels verglichen werden. Die Untersuchung erfolgte mittels MTT.

Zelllinie	Substanz	IC ₅₀ -Wert [nM]	95% C.I. [nM]	R ²
A2780	D24S-RNase	52,79	40.29-69.9	0.88
	D24S-PEG4	132	94,1-168	0.98
SKHep1	D24S-RNase	191.1	146.1-260.6	0.86
	D24S-PEG4	389,4	328-460	0,97

Tab. 10: Der IC₅₀-Wert von dem Konjugat D24S-RNase ist im Vergleich zum unkonjugierten D24S-PEG4 bei A2780 und SkHep1 signifikant geringer. Das D24S-RNase Konjugat weist eine signifikant stärkere Wirkung auf A2780 im Vergleich zu SkHep1 auf.

Darstellung von IC₅₀-Werten nach 72h Inkubation mit D24S-RNase und D24S-PEG4 auf A2780 und SkHep1. Die Inkubation mit D24S-PEG4 auf A2780 und SkHep1 erfolgte in einem separaten Versuch. Angabe des Konfidenzintervalls (95% C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes (R²). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von vier Messungen.

Der IC₅₀-Wert lag nach 72h Inkubation mit D24S-RNase auf A2780 bei 52,79nM und auf SkHep1 bei 191,1nM. D24S-RNase wies somit signifikant geringere IC₅₀-Werte im Vergleich zum unkonjugierten D24S-PEG4 auf (Intervallvergleich). Die Inkubation mit RNase führte weder bei A2780 noch bei SkHep1 zu einer signifikanten Veränderung der metabolischen Aktivität (nicht aufgeführt). Die Konjugation der RNase mit dem D24S-PEG4 MacroDel führte also zu einer Wirkverstärkung, wobei die Wirkung wahrscheinlich auf das überschüssige Dendron zurückzuführen ist.

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte des D24S-RNase Konjugates und des unkonjugierten D24S-PEG4 MacroDels erfolgte in unabhängigen Versuchen.

3.6. Untersuchung der MacroDel-Dornase Konjugate

Die MacroDel-RNase Konjugate zeigten nur auf wenigen Tumorzelllinien eine zytotoxische Wirkung. Es sollte anhand eines weiteren Enzyms, der Dornase, untersucht werden, ob die Konjugation des MacroDels mit der Dornase eine bessere Wirkung hervorruft und ob das MacroDel sich für die Dornase als TTDS eignet.

3.6.1. Nachweis der Konjugation der Dornase an das MacroDel

Die Dornase wurde mit D24 und D48 MacroDels über verschiedene Spacer und Linker konjugiert (durch Mivenion GmbH). Die genaue Zusammensetzung der Konjugate kann in der Tab. 5 nachgeschlagen werden. Die Konjugation sollte mittels nativer Gelelektrophorese geprüft werden. Es wurden folgende Konjugate auf zwei Gele aufgetragen: D24S-PEG4-Dornase1, D24S-PEG4-Dornase2, D24S-cycPEG4-Dornase, D24S-PEG8-Dornase, D48S-PEG8-Dornase, Dornase, Marker. Bei dem D24S-PEG4-Dornase1 und D24S-PEG4-Dornase2 Konjugat, handelt es sich strukturell um dieselben Konjugate, die jedoch in zwei unabhängigen Versuchen konjugiert wurden. Ein Gel wurde mit Coomassieblau (Färbung von Proteinen), das andere mit Alcianblau (Färbung von Sulfatgruppen) gefärbt.

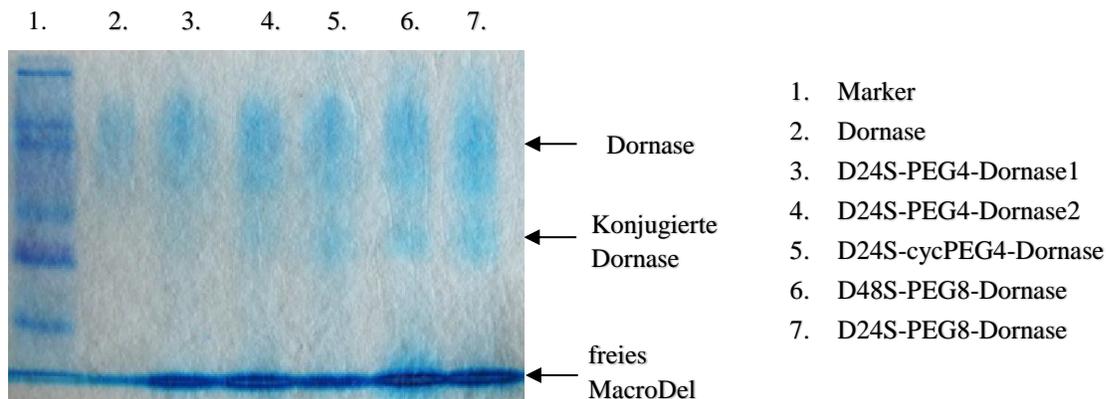


Abb. 19: Die Konjugation der Dornase an das MacroDel ist bei allen Konjugaten nachweisbar. Die Dornase und das MacroDel sind ebenfalls bei allen Konjugaten im Überschuss nachweisbar.

Dargestellt ist die Aufnahme einer nativen Gelelektrophorese mit Alcianblau-Färbung. Aufgetragen wurden die Substanzen Dornase, D24S-PEG4-Dornase1, D24S-PEG4-Dornase2, D24S-cycPEG4-Dornase, D48S-PEG8-Dornase, D24S-PEG8-Dornase und ein Marker.

Die MacroDels lagen bei allen Konjugaten mit der Dornase konjugiert vor. Bei der D24S-cycPEG4-Dornase, D24S-PEG8-Dornase und D48S-PEG8-Dornase war die Bande am stärksten ausgeprägt.

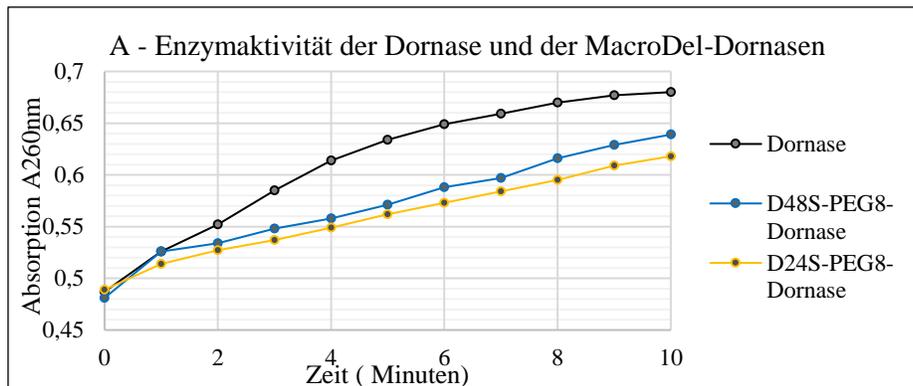
Weiterhin war die freie Dornase sowie das freie MacroDel bei allen Konjugaten zusätzlich nachzuweisen. Sie lagen im Überschuss vor. Besonders die Bande der MacroDels war stark ausgeprägt.

Das zweite, mit Coomassieblau gefärbte Gel konnte die Konjugation der MacroDels mit der Dornase bestätigen (Ergebnis nicht aufgeführt). Die Bande war bei allen Konjugaten schwach ausgeprägt, bei D48S-PEG8-Dornase noch am stärksten. Die Dornase war bei allen Konjugaten im Überschuss nachzuweisen, das MacroDel ließ sich in dieser Färbung nicht darstellen.

Der Versuch stellt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

3.6.2. Untersuchung der Enzymaktivität der Dornase nach Konjugation

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Dornase erfolgreich an das MacroDel gekoppelt werden kann. Es sollte nun untersucht werden, ob die Enzymaktivität der Dornase nach Konjugation mit dem MacroDel noch erhalten ist. Hierfür wurde eine spektrophotometrische Analyse durchgeführt und die Aktivität von D24S-PEG4-Dornase1, D24S-PEG4-Dornase2, D24S-cycPEG4-Dornase, D24S-PEG8-Dornase und D48S-PEG8-Dornase mit der ungekoppelten Dornase verglichen.



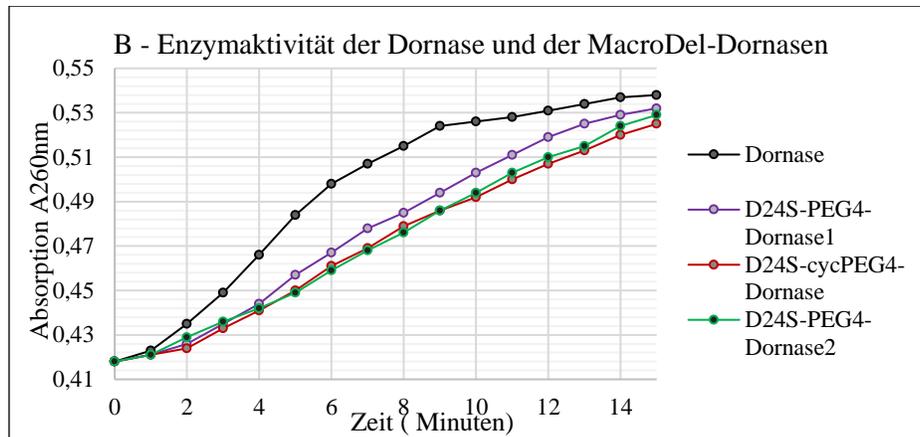


Abb. 20: Die Enzymaktivität ist nach Konjugation bei allen MacroDel-Dornase Konjugaten erhalten geblieben. Die Enzymaktivitäten der MacroDel-Dornase Konjugate waren im Vergleich zu der Dornase vermindert. Dargestellt ist die Absorptionsveränderung (bei 260nm) über die Zeit nach Inkubation von hochpolymerisierter DNA mit der Dornase, der D24S-PEG8-Dornase und der D48S-PEG8-Dornase in Abb. A und der Dornase, der D24S-PEG-Dornase1 und 2 und der D24S-cycPEG4-Dornase in Abb. B.

Alle Macrodel-Dornase Konjugate wiesen nach Konjugation noch Enzymaktivität auf. Diese betrug für alle Konjugate 70-80% der Aktivität der ungekoppelten Dornase. In der Abbildung B erreichte die Dornase nach ungefähr 10 Minuten ein Plateau, so dass nach 14 Minuten, die MacroDel-Dornase Konjugate die gleichen Absorptionswerte wie die Dornase erreichten. Dies hängt jedoch sehr wahrscheinlich mit einem Substratmangel zusammen, so dass man davon ausgehen kann, dass bei überschüssig vorhandener DNA die Absorption der Dornase weiter annähernd linear gestiegen wäre.

3.6.3. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-Dornase Konjugates mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

Nach Konjugation des MacroDels mit der Dornase, sollte untersucht werden, ob die MacroDel-Dornase Konjugate von Tumorzellen aufgenommen werden. Es sollte am Beispiel des MacroDels D48S-PEG8 und seines Konjugates D48S-PEG8-Dornase erfolgen, da in der nativen Gelelektrophorese dieses Konjugat den höchsten gekoppelten Anteil aufwies. Der Fluoreszenzfarbstoff ICC wurde an den enzymatischen Anteil des Konjugates gekoppelt (durch Mivenion GmbH). Die Aufnahme wurde auf SkHep1, A2780 und QG56 untersucht. Die Negativkontrolle, Dornase-ICC, konnte aufgrund eines Synthesefehlers nicht eingesetzt werden.

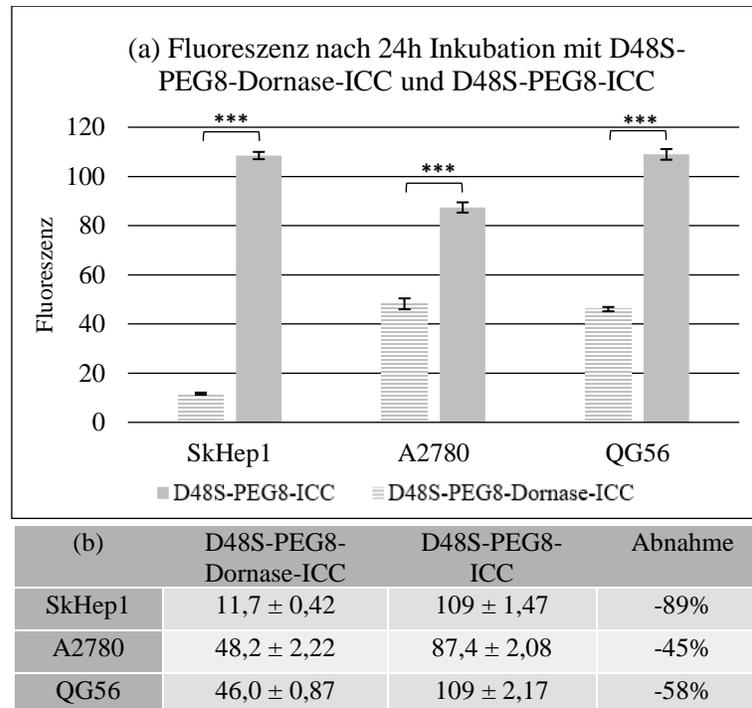


Abb. 21: (a) Die Fluoreszenz ist nach Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase-ICC und D48S-PEG8-ICC auf SkHep1, QG56 und A2780 nachzuweisen. Die Fluoreszenzintensität von SkHep1, A2780 und QG56 ist nach Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase-ICC signifikant geringer als nach Inkubation mit D48S-PEG8-ICC. Darstellung der Geo Mean Fluoreszenz von SkHep1, A2780 und QG56 nach 24h Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase-ICC und D48S-PEG8-ICC. Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung. ***Signifikanz $p < 0,001$.

(b) Tab. 11: Übersicht der Geo Mean Fluoreszenz von SkHep1, A2780 und QG56 nach 24h Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase-ICC und D48S-PEG8-ICC. Angabe der Abnahme der Fluoreszenz in % bezogen auf die Fluoreszenz der mit D48S-PEG8-ICC inkubierten Tumorzellen (100%). Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung.

Nach 24h Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase-ICC kam es auf A2780, SkHep1 und QG56 zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Diese war jedoch im Vergleich zu D48S-PEG8-ICC signifikant geringer. Die Verringerung war bei SkHep1 mit einer Abnahme um 89% am stärksten ausgeprägt. Die Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase-ICC führte respektiv bei A2780 und QG56 im Vergleich zu D48S-PEG8-ICC zu einer Abnahme um 45% und 58%.

3.6.4. Untersuchung der MacroDel-Dornase Konjugate auf Zytotoxizität *in vitro*

Es konnte nachgewiesen werden, dass die MacroDel-Dornase Konjugate von Tumorzellen *in vitro* aufgenommen werden. Es sollte nun die Zytotoxizität der MacroDel-Dornase Konjugate auf

unterschiedliche Tumorzelllinien analysiert werden und mit den unkonjugierten MacroDels verglichen werden.

- Zytotoxizitätsscreening des MacroDel-Konjugates D48S-PEG8-Dornase

Es sollte zuerst ein Screening durchgeführt werden, um möglichst viele unterschiedliche Tumorzelllinien auf die Konjugate zu testen. Das Konjugat D48S-PEG8-Dornase und die Dornase wurden auf zwanzig unterschiedliche Tumorzelllinien aus Leber (SkHep1, HUH7), Magen (HS746T), Kolon (SW948, HT29, LOVO, SW480, DLD-1), Pankreas (Panc1, MiaPaCa-2, QGP-1, BxPC3), Lunge (QG56), Mamma (SKBR3, MCF-7), Ovar (SKOV3, A2780), Zervix (Hela), Leukämien und Lymphomen (HL60, U937) getestet. Es wurde das Konjugat D48S-PEG8-Dornase ausgewählt, weil es in der Gelelektrophorese den größten konjugierten Anteil an MacroDel aufwies und seine Aufnahme durch ausgewählte Tumorzellen nachgewiesen werden konnte. Die Messung erfolgte mittels eines MTT-Tests.

IC ₅₀ Intervalle				
<1 nM	10-100 nM	>100 nM	n.i.	
	SkHep1	HUH7	HS746T	LOVO
	A2780	SW948	DLD-1	Panc1
		HT29	MiaPaCa	BxPC3
		SW480	QG56	SKBR3
		QGP-1	MCF-7	SKOV3
			Hela	HL60
			U937	

Tab. 12: Das D48S-PEG8-Dornase Konjugat führt bei A2780 und SkHep1 zur stärksten Verminderung der metabolischen Aktivität mit einem IC₅₀-Wert zwischen 10-100nM. Die metabolische Aktivität vermindert sich in geringerem Maße bei HUH7, SW948, HT29, SW480 und QGP-1. Bei den übrigen Tumorzelllinien kommt es bei 100nm zu keiner Verminderung der metabolischen Aktivität.

Die aufgelisteten Tumorzellen sind nach IC₅₀-Wert in drei Intervalle und eine nicht inhibierende Spalte getrennt. Nicht inhibierend (n. i.) wurde als eine Verminderung von ≤10% der metabolischen Aktivität bezogen auf die Mediumreihe definiert. Die Ergebnisse wurden nach 72h Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase in vier unabhängigen Versuchen erzielt. Die Werte wurden aus dem Mittelwert von vier Messungen erlangt.

Die meisten Tumorzellen zeigten nach Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase keine Verminderung der metabolischen Aktivität. A2780 und SkHep1 reagierten am stärksten und wiesen zwischen 10-100nM eine Verminderung der metabolischen Aktivität um über 50% auf. Bei HUH7, SW948, HT29, SW480 und QGP-1 verminderte sich die metabolische Aktivität bei 100nm um 50% bis 10%. Die unkonjugierte Dornase führte auf keiner Tumorzelllinie zu einer Verminderung der metabolischen Aktivität (Ergebnisse nicht aufgeführt).

- IC₅₀-Wert des MacroDel-Konjugates D48S-PEG8-Dornase im Vergleich zum MacroDel

Im Screeningversuch zeigte das Konjugat D48S-PEG8-Dornase den größten Effekt auf A2780 und SkHep1. Es sollte der IC₅₀-Wert von D48S-PEG8-Dornase auf A2780 und SkHep1 ermittelt werden und mit dem IC₅₀-Wert des unkonjugierten MacroDels verglichen werden. Die Untersuchung erfolgte mittels MTT.

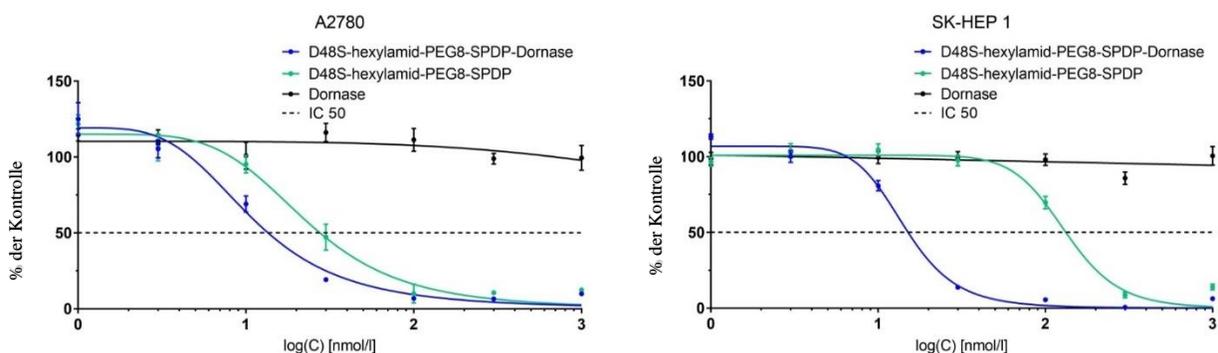


Abb. 22: Das Konjugat D48S-PEG8-Dornase erreicht auf A2780 und SkHep1 im Vergleich zu dem unkonjugierten MacroDel D48S-PEG8 bei geringerer Konzentration den IC₅₀ -Wert. Die Dornase führt bei A2780 und SkHep1 zu keiner Viabilitätsminderung.

Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von D48S-PEG8-Dornase (D48S-hexylamid-PEG8-SPDP-Dornase), D48S-PEG8 (D48S-hexylamid-PEG8-SPDP) und Dornase auf A2780 und SkHep1. Mittelwert von vier Messungen mit ± 1 Standardabweichung.

Zelllinie	Substanz	IC ₅₀ -Wert [nM]	95% C.I. [nM]	R ²
A2780	D48S-PEG8-Dornase	10,28	7,793-12,57	0,98
	D48S-PEG8	22,96	17,58-28,47	0,97
SkHep1	D48S-PEG8-Dornase	14,9	13,63-16,35	0,94
	D48S-PEG8	133,3	118,9-150,9	0,97

Tab. 13: Der IC₅₀-Wert von dem Konjugat D48S-PEG8-Dornase ist im Vergleich zum unkonjugierten D48S-PEG8 bei A2780 und SkHep1 signifikant geringer.

Darstellung von IC₅₀-Werten nach 72h Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase und D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1. Angabe des Konfidenzintervalls (95% C. I.) und des Bestimmtheitsmaßes (R²). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von vier Messungen.

Der IC₅₀-Wert lag nach 72h Inkubation mit D48S-PEG8-Dornase auf A2780 bei 10,28nM und auf SkHep1 bei 14,9nM und war signifikant geringer als nach Inkubation mit D48S-PEG8 (Intervallvergleich). Die Inkubation mit Dornase führte weder auf A2780 noch auf SkHep1 zu einer signifikanten Veränderung der metabolischen Aktivität (Ergebnisse nicht aufgeführt).

Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt mit jeweils vier Stichproben. Der zweite Versuch konnte die oben aufgeführten Ergebnisse bestätigen.

3.7. Untersuchung des MacroDel-ASNase Konjugates

Nachdem das MacroDel als TDDS für die RNase und die Dornase untersucht wurde, sollte das MacroDel mit der ASNase (Asparaginase) konjugiert werden. Die L-ASNase wird bereits in der Therapie von Leukämien und Lymphomen erfolgreich eingesetzt. Durch die Konjugation der ASNase an das MacroDel könnte das therapeutische Spektrum der ASNase auf weitere Tumorzelllinien erweitert werden.

3.7.1. Untersuchung der Enzymaktivität der ASNase nach Konjugation

Die Asparaginase wurde an das MacroDel D24S-PEG4 konjugiert (durch Mivenion GmbH). Die Kopplung konnte erfolgreich mittels nativer Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Dabei war das MacroDel D24S-PEG4 im Überschuss nachweisbar.

Nach Konjugation der ASNase an das MacroDel sollte die Aktivität der gekoppelten ASNase geprüft werden. Die Aktivitätsmessung sollte jedoch erst nach Aufnahme des Konjugates durch die Zellen erfolgen. Hierfür wurde MCF7 24h mit jeweils Medium, ASNase-ICC und D24S-ASNase-ICC inkubiert. Die Enzymaktivität sollte im Zellkern, im Zytoplasma und in den Zellorganellen über die Nessler Reaktion photometrisch untersucht werden.

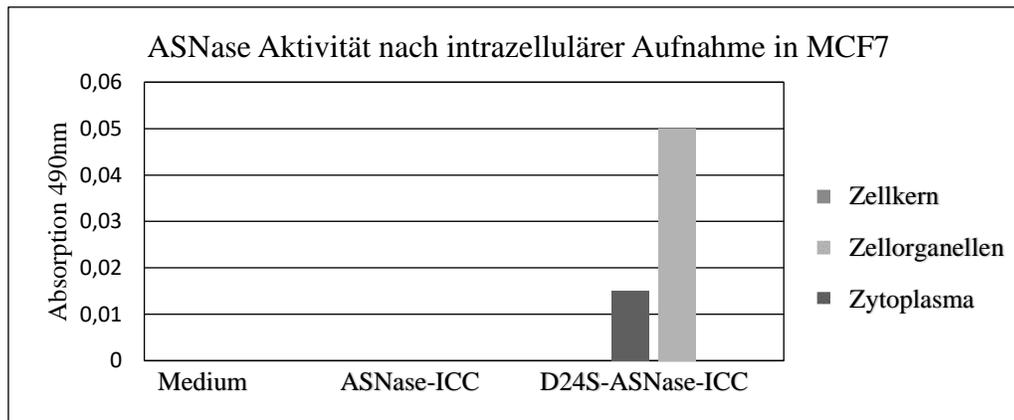


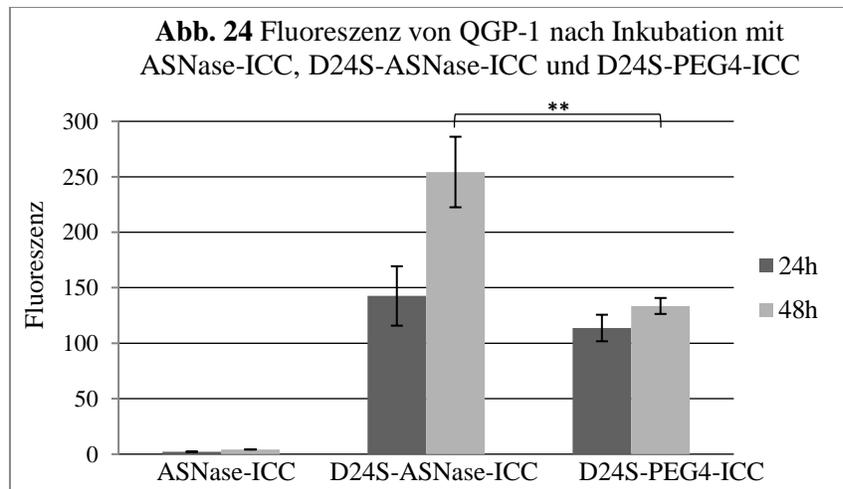
Abb. 23: Die Aktivität der D24S-ASNase-ICC ist sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellorganellen nachweisbar. Die ASNase-ICC Aktivität ist in keinem der Kompartimente nachweisbar. Darstellung der Absorptionswerte (490nm) von MCF7 nach 24h Inkubation mit Medium, ASNase-ICC und D24S-ASNase-ICC.

Die Aktivität des D24S-ASNase-ICC Konjugates konnte im Zytoplasma und in den Zellorganellen nachgewiesen werden. Im Zytoplasma konnte etwa 20% der Gesamtaktivität nachgewiesen werden.

Die mit ASNase-ICC und Medium inkubierten Zellen zeigten in keinem Zellkompartiment eine Absorptionsveränderung und enzymatische Aktivität.

3.7.2. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

Die konjugierte ASNase zeigte nach Konjugation und Aufnahme in die Zellen weiterhin Enzymaktivität, so dass als nächstes untersucht werden sollte, ob das D24S-ASNase Konjugat von Tumorzellen aufgenommen wird. Hierfür wurde die D24S-ASNase am enzymatischen Teil mit ICC konjugiert und auf QGP-1 und A2780 untersucht. Weiterhin wurden die Kontrollen ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach 24h Inkubation. Die Ergebnisse wurden in der Tab. 14 zusammengefasst und die Fluoreszenzintensität von QGP-1 wurde beispielhaft dargestellt.



Tab. 14	ASNase-ICC	D24S-ASNase-ICC	D24S-PEG4-ICC
A2780	4,32 ± 0,21	41,16 ± 3,14	31,06 ± 1,16
QGP-1	2,15 ± 0,20	142,6 ± 26,79	114 ± 11,96

Abb. 24: Die Fluoreszenzintensität von QGP-1 ist nach 24h und 48h Inkubation mit D24S-ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC erhöht. Dabei führt das D24S-ASNase-ICC zu einer stärkeren Fluoreszenzzunahme. Die Inkubation mit ASNase-ICC führt zu einer sehr geringen Fluoreszenz.

Darstellung der Geo Mean Fluoreszenz von QGP-1 nach 24h und 48h Inkubation mit ASNase-ICC, D24S-ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC. Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen ± 1 Standardabweichung. **Signifikanz $p < 0,01$.

Tab. 14: Die Fluoreszenzintensität von A2780 und QGP-1 ist nach 24h Inkubation mit D24S-ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC erhöht. Die Inkubation mit ASNase-ICC führt auf A2780 und QGP-1 zu einer sehr geringen Fluoreszenz.

Übersicht der Geo Mean Fluoreszenz von A2780 und QGP-1 nach 24h Inkubation mit ASNase-ICC, D24S-ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC. Geo Mean Fluoreszenz von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung.

Bei A2780 und QGP-1 kam es nach 24h und 48h Inkubation mit D24S-ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Die Inkubation mit ASNase-ICC führte bei keiner Zelllinie zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz. Die Konjugation der ASNase-ICC an das MacroDel erhöht also die Aufnahme. Auf A2780 und QGP-1 war die Fluoreszenz nach Inkubation mit D24S-ASNase-ICC höher als nach Inkubation mit D24S-PEG4-ICC. Dieser Unterschied war jedoch nur auf QGP-1 und nach 48h signifikant.

Das MacroDel-ASNase Konjugat wird also von den Tumorzelllinien aufgenommen.

3.7.3. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vitro*

Die Durchflusszytometrie erlaubt noch keinen sicheren Nachweis für die intrazelluläre Aufnahme von Substanzen, so dass als nächstes die ASNase-ICC, das MacroDel D24S-PEG4-ICC und das Konjugat D24S-ASNase-ICC auf A2780, HepG2 und QGP-1 mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht wurden. Weiterhin sollte ihre intrazelluläre Verteilung analysiert werden, um somit Rückschlüsse über mögliche Aufnahmemechanismen zu ziehen. In Abbildung 25 sind repräsentative, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A2780, QGP-1 und HepG2 dargestellt.

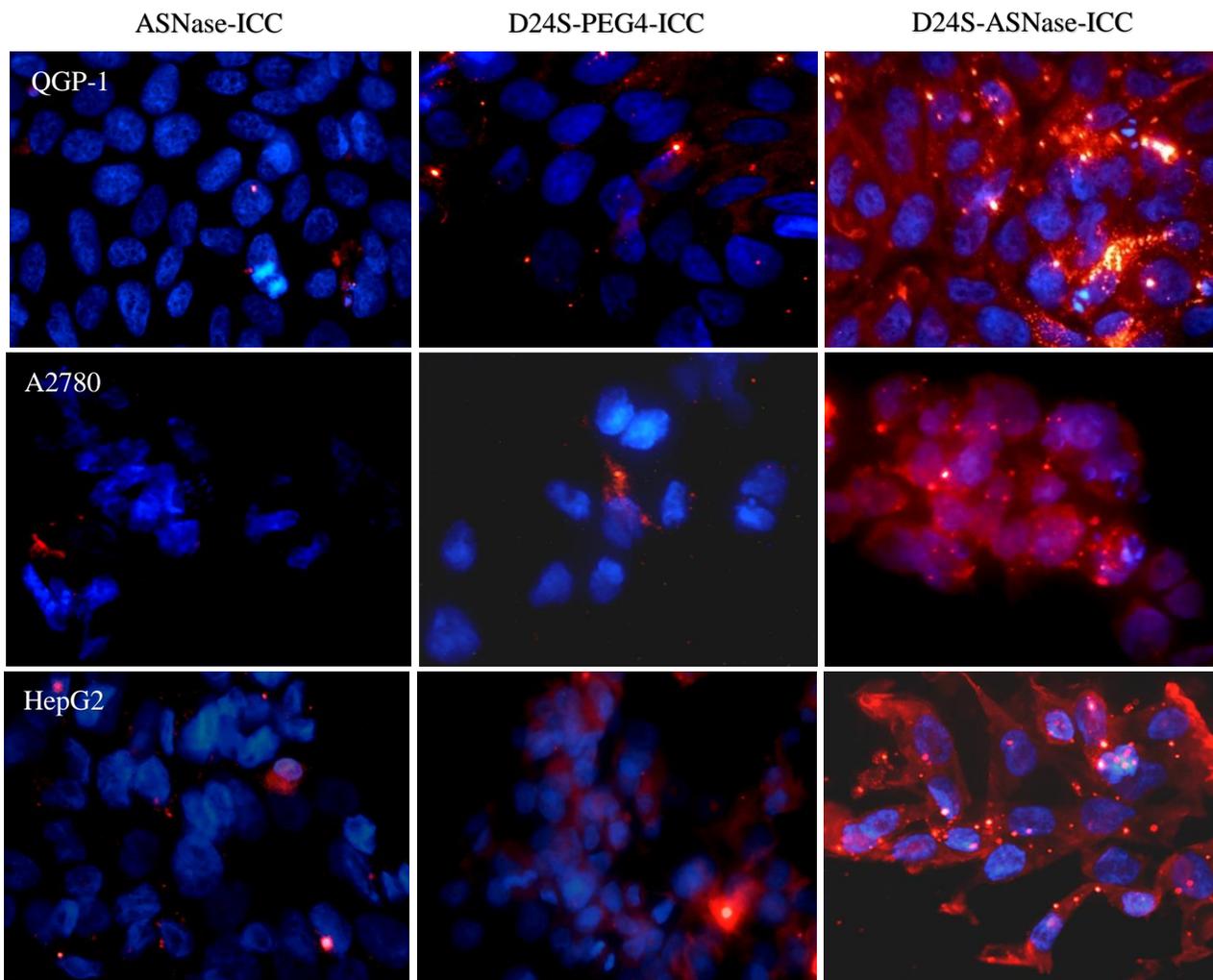


Abb. 25: Nachweisbare Aufnahme von dem MacroDel D24S-PEG4-ICC und dem Konjugat D24S-ASNase-ICC durch QGP-1, A2780 und SkHep1 nach 24h Inkubation. Die ASNase-ICC konnte nur vereinzelt in den Zellen nachgewiesen werden.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von QGP-1, A2780 und HepG2 nach 24h Inkubation mit ASNase-ICC, D24S-PEG4-ICC und D24S-ASNase-ICC am Epifluoreszenzmikroskop, 40x Objektiv. Kernfärbung mit Dapi (blau); ICC (rot).

In der Epifluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine vermehrte Fluoreszenz auf QGP-1, A2780 und HepG2 nach Inkubation mit D24S-ASNase-ICC und D24S-PEG4-ICC. Zusätzlich zu der homogenen Signalverstärkung waren bei D24S-ASNase-ICC einzelne vesikuläre Signalverstärkungen nachweisbar. Das D24S-PEG4-ICC führte auf allen Zelllinien zu einer geringeren Signalverstärkung als sein Konjugat. Die ASNase-ICC konnte nur minimal nachgewiesen werden.

3.7.4. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates durch OATP1B1

Die intrazelluläre Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates konnte über die Epifluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Es sollte nun untersucht werden, ob das MacroDel-ASNase Konjugat transportervermittelt aufgenommen wird. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass das MacroDel möglicherweise über OATP1B1, OATP1B3 und NTCP Transporter in das Zytoplasma transportiert wird. Diese Annahme sollte geprüft werden. Dafür wurde QGP-1 mit dem MacroDel D24S-decyl-ICC, dem Konjugat D24S-ASNase-ICC und der ASNase-ICC unter Zugabe unterschiedlicher Rifamycin Konzentrationen inkubiert. Rifamycin gilt als selektiver Inhibitor des OATP1B1 Transporters [102]. Eine Verminderung der Fluoreszenz nach Zugabe von Rifamycin würde für einen OATP1B1 vermittelten Transport sprechen. Es wurde das MacroDel D24S-decyl-ICC ausgewählt, weil es am stärksten von Tumorzellen aufgenommen wurde (Abb. 8). Nach 3h Inkubation wurde die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

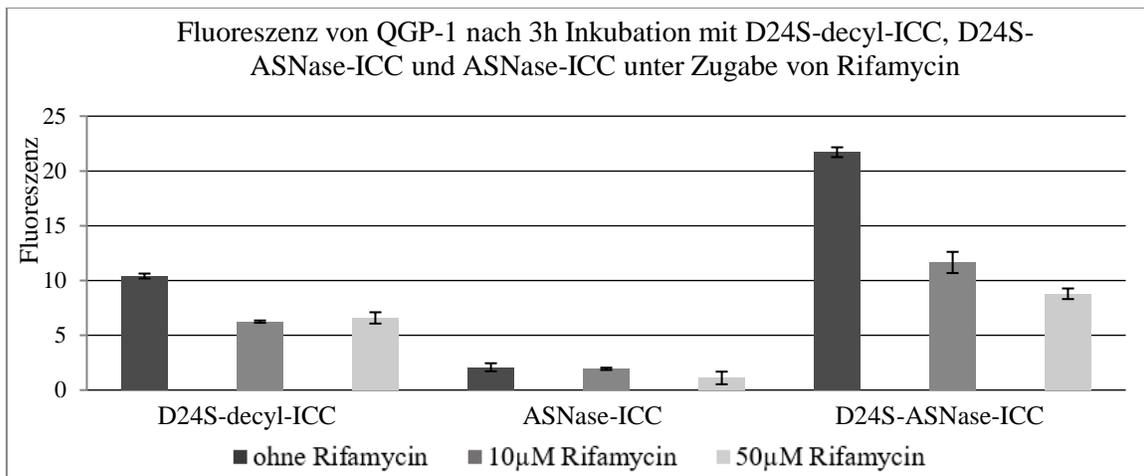


Abb. 26: Die Fluoreszenzintensität von QGP-1 ist nach Zugabe von 10µM und 50 µM Rifamycin bei D24S-decyl-ICC und D24S-ASNase-ICC vermindert.

Darstellung der Geo Mean Fluoreszenz von QGP-1 nach 3h Inkubation mit jeweils D24S-decyl-ICC, D24S-ASNase-ICC und ASNase-ICC unter Zugabe von 10µM und 50µM Rifamycin. Mittelwert von drei Messungen \pm 1 Standardabweichung.

Die Zugabe von Rifamycin führte bei dem MacroDel D24S-decyl-ICC und dem Konjugat D24S-ASNase-ICC zu einer Verminderung der Fluoreszenz. Die Fluoreszenz lag bei D24S-decyl-ICC und D24S-ASNase-ICC bei jeweils 10,41 und 21,71 und nach Zugabe von 10 µM Rifamycin sank sie um fast die Hälfte (jeweils 6,25 bzw. 11,65). Die Erhöhung der Rifamycinkonzentration auf 50µM führte

alleine bei D24S-ASNase-ICC zu einem weiteren Absinken der Fluoreszenz auf 8,79, während die Fluoreszenz von D24S-decyl-ICC bei 6,59 stagnierte. Wie in den vorherigen durchflusszytometrischen Untersuchungen beobachtet (Abb. 21), kam es zu einer stärkeren Aufnahme des D24S-ASNase-ICC Konjugates im Vergleich zum MacroDel D24S-decyl-ICC. Die ASNase-ICC führte auf QGP-1 zu einer sehr geringen Fluoreszenz von 2,08 und zeigte nach Zugabe von 50µM Rifamycin eine Fluoreszenz von 1,11.

Die Inhibierung des OATP1B1 Transporters durch Rifamycin führte zu einer Verringerung der MacroDel und MacroDel-ASNase Aufnahme. Folglich konnte zumindest ein Teil des MacroDels und des MacroDels-ASNase Konjugates über den OATP1B1 Transporter aufgenommen werden.

3.7.5. Untersuchung des MacroDel-ASNase Konjugates *in vivo*

Das MacroDel-ASNase Konjugat wurde von allen getesteten Tumorzelllinien *in vitro* aufgenommen, so dass untersucht werden sollte, wie sich die Aufnahme und Verteilung des MacroDel-ASNase Konjugates *in vivo* verhält und ob sie sich von dem MacroDel unterscheiden. Es wurden drei athymische Mäuse 10mg/kg Körpergewicht D24S-ASNase-ICC injiziert und nach 24h getötet. Danach wurden Gewebsschnitte aus Leber, Niere und dem humanen Kolonkarzinom HT29 angefertigt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Leber und Niere.

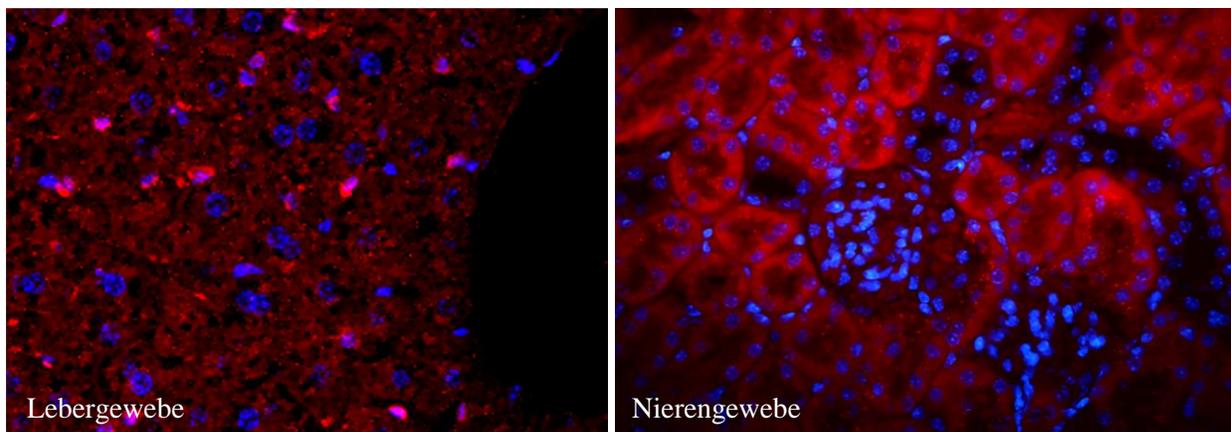


Abb. 27: Nachweisbare Aufnahme von D24S-ASNase-ICC in Leber und Niere 24h nach Injektion. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Gewebsschnitte der Niere und Leber einer athymischen Maus 24h nach subkutaner Injektion von 10mg/kg Körpergewicht D24S-ASNase-ICC am Epifluoreszenzmikroskop, 40x Objektiv. Kernfärbung mit Dapi (blau); ICC (rot). 24h nach subkutaner Injektion von D24S-ASNase-ICC kam es in der Leber und Niere der athymischen Maus zu einer Akkumulation des D24S-ASNase-ICC Konjugates. In der Niere kam es

besonders in den Tubuli zu einer Signalverstärkung. Es handelte sich am wahrscheinlichsten um die proximalen Tubuli, da umliegend zellreiche Verbände zu erkennen waren, die den Glomeruli entsprachen, in denen es ebenfalls zu einer geringen Signalverstärkung kam. Das D24S-ASNase-ICC konnte somit in den Glomeruli und Tubuli nachgewiesen werden. Das D24S-ASNase-ICC verteilte sich in der Leber inhomogen und wies zusätzlich zur flächenhaften Fluoreszenz vereinzelt sehr hohe Signalintensitäten in kleineren Zellen auf. Es handelte sich wahrscheinlich um Ito- und/oder Kupferzellen. Keine oder nur geringe Fluoreszenzsignale wurden in Geweben aus Lymphknoten, Herz, Lunge und Darm nachgewiesen (Abbildungen nicht aufgeführt).

Anschließend wurden aus dem Xenografttumor, dem humanen Kolonkarzinom (HT29), Gewebsschnitte angefertigt. Um die Verteilung des D24S-ASNase Konjugates innerhalb des Tumors zu untersuchen, wurde jeweils die Fluoreszenzintensität der äußeren Tumorschicht mit der inneren verglichen.

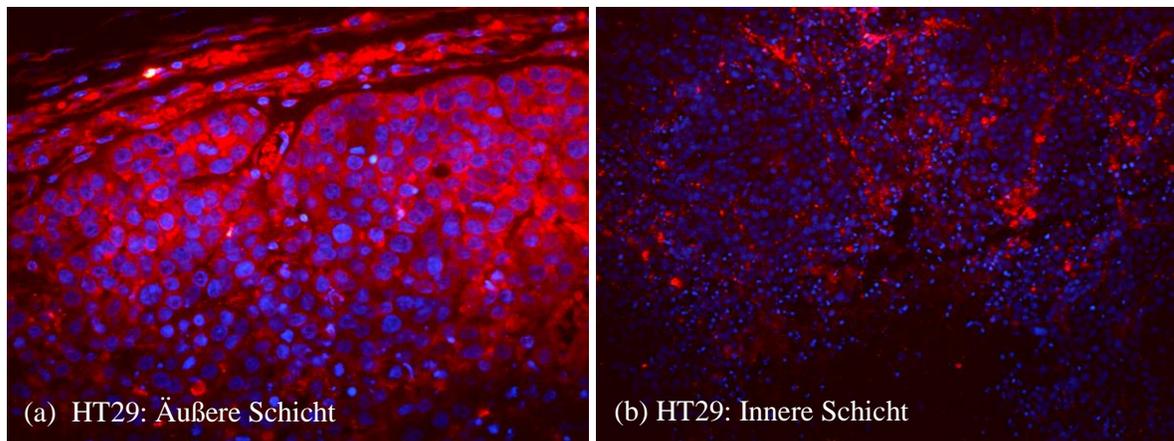


Abb. 28: Nachweisbare Aufnahme von D24S-ASNase-ICC im humanen Kolonkarzinom HT29 der athymischen Maus 24h nach Injektion. Die Fluoreszenz ist in der äußeren Schicht im Vergleich zur inneren Schicht stärker ausgeprägt.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Gewebsschnitten des humanen Kolonkarzinoms HT29 einer athymischen Maus 24h nach subkutaner Injektion von 10mg/kg Körpergewicht D24S-ASNase-ICC am Epifluoreszenzmikroskop. Kernfärbung mit Dapi (blau); ICC (rot). (a) 40x Objektiv (b) 25x Objektiv.

Das D24S-ASNase-ICC Konjugat konnte sowohl im Inneren als auch im Äußeren des Tumors nachgewiesen werden, wobei es im äußeren Bereich zu einer deutlich stärkeren Akkumulation kam. Im inneren Bereich kam es zu einer inhomogenen Verteilung des D24S-ASNase-ICC Konjugates. Hier waren sowohl Bereiche mit sehr starker Akkumulation und Bereiche mit einem kaum nachweisbaren Signal zu finden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob polysulfatierte, dendritische Makromoleküle („Macromolecular Delivery“, MacroDel) ins Zytoplasma aufgenommen werden und ob diese Makromoleküle chemisch gekoppelte Wirkmolekülen mit hohem Molekulargewicht in die Zelle schleusen können ohne Verlust der Funktionalität.

4.1. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

Es konnte mittels verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass die MacroDels gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff ICC durch Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* aufgenommen werden. Dabei sind jedoch folgende Einschränkungen zu beachten:

- Untersuchung ICC markierter MacroDels: Einschränkungen

Die Aufnahme der mit ICC konjugierten MacroDels wurde in dieser Arbeit mit der Aufnahme der unkonjugierten MacroDels gleichgesetzt. Die Konjugation kann jedoch zu einer Konformationsänderung des MacroDels führen und dessen Aufnahme beeinflussen. Des Weiteren konnte bei der Auswertung ein Quenching Effekt, eine Signalauslöschung durch Aggregation der ICC-Farbstoffe, nicht ausgeschlossen werden. Die mit ICC-konjugierten MacroDels wurden außerdem auf Absorption und nicht auf Fluoreszenz eingestellt, so dass der Vergleich zwischen den unterschiedlichen MacroDels vorsichtig zu interpretieren ist. Aufgrund dieser Limitierungen sollten die MacroDels in weiterführenden Versuchen auf ICC eingestellt oder mit ICC-unabhängigen Methoden untersucht werden.

4.1.1. Aufnahmescreening

- Aufnahme des MacroDels D24S-ICC im Vergleich zum D24OH-ICC

Die Aufnahme des MacroDels wurde zunächst mittels Durchflusszytometrie untersucht. Im Screeningversuch auf fünfzehn Tumorzelllinien aus Leber, Magen, Pankreas, Kolon, Lunge, Ovar, Zervix, Lymphomen und Leukämien wurde eine verstärkte Fluoreszenz nach Inkubation mit dem MacroDel D24S-ICC festgestellt (Abb. 4). Im Gegenteil dazu kam es nach Inkubation mit der Kontrolle, dem unsulfatierten MacroDel D24OH-ICC bei keiner Tumorzelllinie zu einer starken Zunahme der Fluoreszenz (Abb. 4). Die Aufnahme des MacroDels ist somit von der Sulfatierung abhängig. Der Zusammenhang zwischen Aufnahme und Sulfatierung konnte mit dem polydispersen,

polysulfatierten dPGS im Vergleich zum unsulfatierten dPG ebenfalls nachgewiesen werden [60]. Dies unterstützt die Annahme, dass die polysulfatierten MacroDels überwiegend über die Transporter OATP1B1 und OATP1B3 aufgenommen werden [64], da diese eine starke Affinität zu anionischen und sulfatierten Substraten wie dem Östronsulfat oder DHEAS (Dehydroepiandrosteronsulfat), zwei Hormonvorstufen, besitzen [73].

- Aufnahme des MacroDels D24S-PEG4-ICC durch unterschiedliche Zelllinien

In einem zweiten Screeningversuch wurde untersucht, ob das MacroDel durch die oben genannten Tumorzelllinien, einer epidermoiden Zelllinie und einer immortalisierten Rattenhepatozytenzelllinie unterschiedlich stark aufgenommen wird. Es wurde festgestellt, dass das MacroDel D24S-PEG4-ICC von allen Zelllinien aufgenommen wird, aber in unterschiedlichem Maße (Abb. 6). OATP1B1, OATP1B3 und NTCP Transporter werden (jeweils mindestens einer) auf allen hier eingesetzten Zelllinien exprimiert (aus Voruntersuchungen bekannt). Dies konnte mehrfach von weiteren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [73, 75, 76, 79]. Die ungleiche Aufnahme des MacroDels könnte auf ein unterschiedliches Expressionsmuster von OATP1B1, OATP1B3 und NTCP an der Zellmembran zurückzuführen sein. Zusätzlich konnten bei den OATP1B1 und OATP1B3 Transportern unterschiedliche Polymorphismen nachgewiesen werden, die die Affinität und Aufnahmekinetik des MacroDels beeinflussen könnten [115]. Es könnten ebenfalls weitere Aufnahmemechanismen, wie die Endozytose oder eine Aufnahme durch andere Transporter, mitbeteiligt und je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Zellen exprimieren zudem spezifische Transporter, sogenannte Efflux-Transporter, die für den Abtransport von Substanzen aus der Zelle verantwortlich sind [116]. Die unterschiedliche Expression und Aktivität von Efflux Transportern könnte auch die Akkumulation des MacroDels beeinflussen.

Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass die Effizienz des MacroDels als TDDS möglicherweise von der Zelllinie und ihrem Expressionsmuster abhängig ist.

4.1.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Aufnahme des MacroDels

Um den Einfluss der Sulfatierung genauer zu analysieren wurde die Aufnahme von D12S-ICC, D24S-ICC und D48S-ICC mit jeweils 12, 24 und 48 Sulfatgruppen durch die Kolonkarzinomlinie HT29 verglichen. Die Aufnahme war bei den stärker sulfatierten MacroDels signifikant höher (Abb. 7). Eine höhere Sulfatgruppenanzahl scheint demnach die Aufnahme des MacroDels zu steigern. Dieser

Zusammenhang lässt sich durch eine Affinitätssteigerung des Substrates zu den OATP-Transportern erklären. So führte z.B. die Sulfatierung von Steroiden zu einer vermehrten Aufnahme durch OATP-Transporter im Vergleich zu ihren unsulfatierten Homologen [117]. Daher lässt sich auch die sehr starke Affinität von dem sulfatierten Östronsulfat oder DHEAS zu den OATP1B1 und OATP1B3 Rezeptoren erklären, die in kinetischen Untersuchungen häufig als Modellsubstanz eingesetzt werden [118].

Überdies konnte für andere dendritische Polyglycerole nachgewiesen werden, dass ein höheres Molekulargewicht zu einer stärkeren intrazellulären Akkumulation führt [119]. Das MacroDel D48S ist ein MacroDel der 3. Generation mit einem größeren dendritischen Gerüst und einem fast doppelt so hohen Molekulargewicht wie das MacroDel 2. Generation D24S (M_{D48S} : 8467Da; M_{D24S} : 4240Da). Das höhere Molekulargewicht der D48 MacroDels könnte also zu der stärkeren Akkumulation beigetragen und möglicherweise auch zur endozytotischen Aufnahme geführt haben.

4.1.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Aufnahme des MacroDels

In der vorliegenden Arbeit sollten Enzyme an das MacroDel gekoppelt werden ohne Beeinflussung der enzymatischen Aktivität. Längere Spacer zwischen Enzym und Dendron könnten eventuell günstig für den Erhalt der Enzymaktivität sein. Um den Einfluss der unterschiedlichen Spacer und Linker auf die Aufnahme des MacroDels zu untersuchen, wurde die Aufnahme von D24S-ICC, D24S-decyl-ICC und D24S-PEG4-ICC durch A549 und QGP-1 mit jeweils hexylamin ($C_6H_{15}N$), decylamin ($C_{10}H_{23}N$) und hexylamid-PEG4 ($C_6H_{15}N-[C_2H_4O]_4$) als Spacer verglichen. Das MacroDel D24S-decyl-ICC führte zur stärksten Fluoreszenzzunahme, während das MacroDel D24S-ICC durch A549 und QGP-1 am geringsten aufgenommen wurde (Abb. 8). Die Länge der Kohlenstoffkette scheint daher die Aufnahme des MacroDels zu beeinflussen. Das D24S-decyl-ICC besitzt eine längere Kohlenstoffkette, wodurch das MacroDel an Lipophilität gewinnt. Das Ergebnis stimmt mit der Erkenntnis von Kalgren et al überein, die zeigte, dass je größer die negative Ladung und unpolare Fläche eines Moleküls ist, desto stärker die Inhibierung und somit die Affinität der Substanz zu OATP1B1 und OATP1B3 [120]. Der Unterschied war jedoch vor allem bei A549 sehr gering ausgeprägt, so dass der Einfluss auf die Aufnahme wahrscheinlich vernachlässigt werden kann. Um eine definitive Aussage über den Einfluss der Spacer und Linker treffen zu können, müssten einerseits

die unterschiedlichen MacroDels auf Fluoreszenz eingestellt und andererseits weitere Tumorzelllinien untersucht werden.

4.1.4. Analyse der Aufnahme und Elimination des MacroDels über die Zeit

Ein hoher zytotoxischer Effekt ist auch davon abhängig, wie lange eine Substanz in der Zelle verbleibt. Ein hoher Efflux kann z.B. die Wirksamkeit verringern. Um die pharmakokinetischen Eigenschaften des MacroDels zu untersuchen, wurde die Aufnahme und Elimination des MacroDels D24S-ICC auf HUH7 über die Zeit gemessen. Über 36h nahm die Fluoreszenz stetig zu ohne ein Plateau zu erreichen (Abb. 9). Nach Mediumwechsel nahm die Fluoreszenz kontinuierlich ab und erreichte nach ungefähr 24h seine Halbwertszeit (Abb. 9). Dies entspricht ungefähr der Verdopplungszeit von HUH7 ($t=20h$) [121]. Da das MacroDel keine zytotoxische Wirkung und keine Hemmung der Zellproliferation auf HUH7 hervorruft (Tab. 6), kann die Fluoreszenzabnahme durch die Zellteilung und die Verteilung des D24S-ICC auf die Tochterzellen zurückzuführen sein. Es könnten jedoch auch aktive Efflux-Transporter oder intrazelluläre Abbaumechanismen ursächlich gewesen sein. Der Multidrugresistant Protein 2 Transporter (MRP-2) könnte an der Elimination beteiligt gewesen sein, da dieser auf HUH7-Zellen exprimiert wird [122] und nachweislich sulfatierte Konjugate aus Zellen transportiert [123]. Weitere Untersuchungen, wie z.B. ein MRP-2 Inhibierungsversuch, müssten durchgeführt werden, um die Eliminationsmechanismen besser aufzuklären. Nach 120h war eine geringe Fluoreszenz noch nachweisbar (Abb.9). Diese lange intrazelluläre Verweildauer könnte ebenfalls durch eine Interaktion der anionischen polysulfatierten MacroDels mit intrazellulären Strukturen wie Proteinen zu erklären sein. Nachweislich kann das dPGS an den Transkriptionsfaktor Nf-KappaB binden [57]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit wäre eine Bindung des MacroDels an Nf-KappaB oder andere Transkriptionsfaktoren ebenfalls denkbar und würde somit den Efflux-Transport der MacroDels verhindern.

Diese Erkenntnisse deuten einerseits darauf hin, dass das MacroDel als TDDS lange intrazellulär verweilt und somit die Wirkentfaltung bzw. Freisetzung des Kargos begünstigt, andererseits könnte die nach 120h noch nachweisbare Fluoreszenz auf eine fehlende oder zu langsame Elimination des MacroDels deuten. Weitere Untersuchungen sind dementsprechend notwendig um die Aufnahme- und Eliminationskinetik des MacroDels genauer zu charakterisieren.

4.2. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDels mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vitro*

- Aufnahme und Verteilung des MacroDels D24S-PEG4-ICC im Vergleich zum D24OH-PEG4-ICC

Da die Durchflusszytometrie keinen endgültigen Nachweis für die intrazelluläre Aufnahme von Substanzen bietet, wurde die Aufnahme des MacroDels mittels Epifluoreszenzmikroskopie geprüft. Seine intrazelluläre Aufnahme konnte in allen dreizehn getesteten Tumorzelllinien aus Leber, Pankreas, Kolon, Lunge, Ovar und Zervix nachgewiesen werden, während das unsulfatierte D24OH-PEG4-ICC von keiner Zelllinie aufgenommen wurde. Dies stimmt mit den vorherigen durchflusszytometrischen Untersuchungen des MacroDels überein.

- Aufnahme und Verteilung des MacroDels D24S-PEG4-ICC und des dPGS-ICC

Anschließend wurde das intrazelluläre Verteilungsmuster des MacroDels D24S-PEG4-ICC mit dem polydispersen dPGS-ICC auf Tumorzelllinien aus Leber, Pankreas, Lunge und Ovar mittels Epifluoreszenzmikroskopie verglichen. Das MacroDel wies eine überwiegend homogene Verteilung auf, was mit einer transportervermittelten Aufnahme des MacroDels direkt ins Zytoplasma vereinbar ist (Abb.10). Vereinzelt konnten ebenfalls vesikuläre Signale nachgewiesen werden (Abb.10). Dieses Ergebnis konnte in der Konfokalmikroskopie bestätigt werden (Abb. 11). Das dPGS hingegen lag überwiegend gruppiert in Form von Vesikeln vor (Abb. 10). Dies könnte für eine partiell endozytotische Aufnahme des dPGS-ICC sprechen. Ab 20kDa werden Substanzen überwiegend endozytotisch aufgenommen [64], so dass eine extrazelluläre Aggregation der dPGS-ICC Konjugate (Molekulargewicht zwischen 2-20kDa) diesen Prozess getriggert haben könnte. Das dPGS-ICC wird im Vergleich zum D24S-PEG4-ICC stärker von Tumorzellen aufgenommen (aus Voruntersuchungen bekannt), so dass die vesikuläre Anreicherung ebenfalls auf die stärkere intrazelluläre Akkumulation und ggf. Aggregation zurückzuführen ist. Weiterhin könnten die vesikulären Signale des MacroDel-ICC und dPGS-ICC durch die Aufnahme und den Abbau in Autophagosomen entstanden sein. Zytoplasmatische Strukturen und Moleküle werden im Zellstoffwechsel von solchen Zellorganellen aufgenommen und abgebaut [124]. Spezifische Doppelmarkierungen könnten darüber Aufschluss geben.

4.3. Untersuchung des MacroDels auf Zytotoxizität *in vitro*

- Untersuchung der Zytotoxizität über den MTT-Test

Das MacroDel reichte sich in allen getesteten Tumorzelllinien an, so dass als nächstes seine Wirkung untersucht wurde. Hierfür wurde der MTT-Test eingesetzt. Dieser gehört zu den am häufigsten eingesetzten Assays zur primären Evaluation von Chemotherapeutika und Antitumor Medikamenten, da er einfach und kostengünstig durchzuführen ist [125]. Der MTT-Test gibt primär die metabolische Aktivität von Zellen wieder. Unter konstanten metabolischen Bedingungen korreliert diese mit der Viabilität von Zellen [104]. Die metabolische Aktivität kann jedoch von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden und somit zu Über- oder Unterschätzungen führen [105]. Eine Verminderung der metabolischen Aktivität im MTT-Test kann durch Inhibierung des Stoffwechsels, durch Apoptose der Zellen oder durch Proliferationshemmung erklärt werden. In dieser Arbeit wird aus Gründen der Übersichtlichkeit und der fehlenden Differenzierungsmöglichkeit zwischen den Mechanismen der Begriff Zytotoxizität verwendet.

Weiterhin kam es bei den MTT-Testungen häufig zu einer großen Interexperiment-Variabilität. Diese wird ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [126] und kann auf instabile zelluläre Sensibilitäten, Variationen im Zellzyklus oder photochemische Artefakte zurückzuführen sein [105, 127]. Es sollte deswegen im Verlauf die Zytotoxizität der Substanzen mittels Metabolismus unabhängiger Assays evaluiert werden [104].

4.3.1. Zytotoxizitätsscreening

Aufgrund der hohen Anzahl an Tumorzelllinien und MacroDel-Varianten wurde das Zytotoxizitätsscreening mit einer Auswahl von zwei MacroDels, dem D24S-PEG4 und dem D48S-PEG4, durchgeführt. Die Kontrolle wurde von keiner Tumorzelle aufgenommen und zeigte in Vorversuchen keine zytotoxische Wirkung, so dass im Screeningversuch auf sie verzichtet wurde. Die zwei MacroDels führten auf den meisten getesteten Zelllinien zu keiner oder einer nur geringen zytotoxischen Wirkung (Tab. 6). Zu einer ausgeprägten Zytotoxizität kam es auf SkHep1, A2780, QGP-1 und HCT116 (Tab. 6). Das stärker sulfatierte MacroDel D48S-PEG4 führte ebenfalls auf SW480, HepG2, U937, MOLT4 und der immortalisierten Rattenhepatozytenzelllinie zur Reduktion der metabolischen Aktivität (Tab. 6). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den

durchflusszytometrischen Untersuchungen fällt interessanterweise auf, dass die zytotoxische Wirkung des MacroDels nicht mit der aufgenommenen Menge korreliert. Dieser Sensitivitätsunterschied könnte mit einer unterschiedlichen Expression und/oder Abhängigkeit zu bestimmten Transkriptionsfaktoren zusammenhängen, an die das MacroDel möglicherweise bindet. Es konnte nachgewiesen werden, dass das dPGS an Nf-KappaB und Aktiviertes Protein-1 (AP-1) binden kann und die TGF- β Expression vermindert [57, 59, 60]. Nf-KappaB und AP-1 sind Transkriptionsfaktoren, die in der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen beteiligt und bei vielen humanen Tumoren dysreguliert sind [128-130]. TGF- β spielt in der Tumorentstehung und Progression eine zentrale Rolle [131]. Durch die strukturelle Ähnlichkeit des MacroDels zum dPGS könnte eine Bindung des MacroDels an diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls in Frage kommen. Die genauen Mechanismen der Zytotoxizitätsinduktion müssten jedoch in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

TDDS haben als Hauptfunktion ihr Kargo an den Wirkort zu transportieren (s. 1.2.2.). Das MacroDel führt jedoch zusätzlich auf einige Tumorzelllinien zu einem zytotoxischen Effekt. Das MacroDel könnte also ebenfalls als Zytostatikum untersucht werden. Diese Eigenschaft könnte genutzt werden, um die Wirkung der transportierten Substanz zu verstärken. In den folgenden Versuchen wurde aus diesem Grund die Zytotoxizität des MacroDels genauer untersucht.

4.3.2. Einfluss der Sulfatgruppenanzahl auf die Zytotoxizität

Stärker sulfatierte MacroDels werden vermehrt von Tumorzellen aufgenommen und im Screeningversuch zeigte das MacroDel D48S-PEG4 im Vergleich zum D24S-PEG4 auf fünf weiteren Zelllinien (HepG2, SW480, MOLT4, U937, immortalisierte Rattenhepatozyten) einen zytotoxischen Effekt, so dass der Einfluss der Sulfatierung auf die Zytotoxizität genauer analysiert wurde. Hierfür wurde die Zytotoxizität von D24S mit D48S und D24S-PEG8 mit D48S-PEG8 auf A2780 und SkHep1 verglichen. Die IC₅₀-Werte der D48-MacroDels waren auf A2780 und SkHep1 geringer im Vergleich zu den D24-MacroDels (Abb.12). Dieser Unterschied war zwischen D24S und D48S signifikant und über eine zehner Potenz unterschiedlich während der Unterschied zwischen D24S- und D48S-PEG8 nicht signifikant war und sich nur um einige nM unterschied (Tab. 7). Der Einfluss der Sulfatierung auf die Zytotoxizität bleibt also unklar. Bei den D24S und D48S MacroDels könnte der Unterschied auf eine stärkere intrazelluläre Aufnahme zurückzuführen sein, die in vorherigen

Versuchen nachgewiesen werden konnte (Abb.7). Weiterhin könnte die stärkere negative Ladung die Affinität zu intrazellulären Strukturen wie z.B. dem Nf-KappaB steigern. Bei 24S- und D48S-PEG8 könnte der geringer ausgeprägte Unterschied möglicherweise auf den Einfluss des Spacers zurückzuführen sein.

4.3.3. Einfluss der Spacer und Linker auf die Zytotoxizität

Vor Konjugation wurden die MacroDels mit Spacer ausgestattet, um eine Interaktion der anionischen MacroDels mit den Enzymen zu verhindern. Die Spacer führten zu geringfügigen, wenn auch signifikanten, Unterschieden in der Aufnahme des MacroDels, so dass nun ihr Einfluss auf die Zytotoxizität untersucht werden sollte. Auf A2780 und SkHep1 wirkte das D24S-decPEG4 am stärksten zytotoxisch, gefolgt von D24S-PEG4, D24S-PEG8 und zuletzt D24S (signifikanter Unterschied im Intervallvergleich) (Abb.13; Tab. 8). Diese Ergebnisse stimmen mit der durchflusszytometrischen Analyse überein, wo das D24S-decyl-ICC am stärksten aufgenommen wurde und das D24S-ICC am geringsten (Abb. 8). Die Untersuchung wurde jedoch auf A549 und QGP-1 durchgeführt und müsste auf A2780 und SkHep1 wiederholt werden. Bei den D48 MacroDels führte das MacroDel D48S zum stärksten zytotoxischen Effekt gefolgt von D48S-PEG8 und zuletzt D48S-PEG4 (signifikanter Unterschied im Intervallvergleich)(Tab. 8). Auf den D24 und D48 MacroDels führten nicht die gleichen Spacer und Linker zu dem größten zytotoxischen Effekt, so dass wahrscheinlich weitere Faktoren die Zytotoxizität beeinflussen. Auf dem dPGS führten unterschiedliche Spacer und Linker zu keinen signifikanten Wirkunterschieden [57].

4.4. Untersuchung des MacroDels *in vivo*

- Verteilung des MacroDels im nicht Tumorgewebe der Maus

Nachdem die *in vitro* Aufnahme des MacroDels durch Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, wurde seine Aufnahme und Verteilung im Mausmodell untersucht. Hierfür wurde athymischen Mäusen das Kolonkarzinom HT29 und ein gastropankreatischer Tumor implantiert und 2mg bzw. 30mg/kg Körpergewicht MacroDel-ICC verabreicht. In der Epifluoreszenzmikroskopie zeigten die Gewebsschnitte des Darms, der Lymphknoten, der Lunge, des Rückenmarks, des Gehirns und des Herzens in beiden Konzentrationen keine bzw. eine nur geringe Akkumulation des MacroDel-ICC (Abb. 14). In der Leber kam es flächenhaft zu einer leichten Akkumulation des D24S-ICC (Abb. 15).

Es ist anzunehmen, dass das D24S-ICC über die in den Hepatozyten exprimierten Transporter OATP1B1, OATP1B3 und NTCP aufgenommen wurde [73]. Weiterhin waren vereinzelt sternförmige Akkumulationen nachzuweisen. Es handelte sich am ehesten um Kupferzellen oder Ito-Zellen, die über Phagozytose das D24S-ICC möglicherweise aufnehmen können. Morphologisch sind Kupferzellen und Ito-Zellen schwer voneinander zu unterscheiden. In der Niere kam es zu einer Akkumulation des D24S-ICC in den proximalen Anteilen der Tubuli (Abb. 15). In den Glomeruli konnte kein D24S-ICC nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass das D24S-ICC nicht glomerulär filtriert wird. Zu den Aufnahmemechanismen in der Niere ist wenig bekannt, ein möglicher Transport über die basolateralen exprimierten OATP4C1 Transporter [132] wäre denkbar. Diese sind für den Transport vieler anionischer Substanzen verantwortlich [132]. Apikal wird in den Tubuluszellen der Multidrugresistance Protein 2 (MRP 2) Transporter exprimiert [132], der überwiegend sulfatierte Substrate transportiert [123]. So wäre eine Ausscheidung des MacroDels über einen aktiven Transport in den proximalen Tubuluszellen der Niere denkbar. Die athymischen Mäuse, die mit 30mg/kg Körpergewicht beimpft wurden, zeigten eine stärkere Akkumulation des D24S-ICC bei gleichem Verteilungsmuster in Leber und Niere. Diese Ergebnisse sind mit den Verteilungsmustern der polydispersen dPGS-ICC vereinbar [68, 133].

Anzumerken ist, dass die Akkumulation des MacroDels in der Leber und Niere hepato- und nephrotoxische Nebenwirkungen hervorrufen könnte. Da das MacroDel überwiegend in den Tubuluszellen nachzuweisen war, ist vor allem von Tubuluschäden auszugehen, die jedoch meist reversibel sind [134]. Außerdem konnte beim radioaktiv markierten dPGS nach drei Wochen eine Akkumulation in der Leber und Niere noch nachgewiesen werden, dies bei nur langsamer renaler Elimination [133]. Dies ist für die Anwendung als TDDS und/oder Therapeutikum problematisch. Um eine solche Langzeitakkumulation des MacroDels auszuschließen, sollten in weiterführenden Versuchen die Mäuse über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Des Weiteren wird das MacroDel wahrscheinlich aktiv über Transporter (OATP1B1, OATP1B3, NTCP und möglicherweise OATP1C4) aufgenommen, die bei der Aufnahme von vielen Therapeutika beteiligt sind [135] [136]. Dies könnte zu Medikamenteninteraktionen führen, die ebenfalls zu beachten sind.

- Aufnahme des MacroDels D24S-ICC im Tumorgewebe der Maus

Bei allen Mäusen konnte im humanen Kolonkarzinom und im gastropankreatischen Tumor das MacroDel D24S-ICC nachgewiesen werden (Abb. 16). Dieses Ergebnis ist mit den Ergebnissen der polydispersen dPGS-ICC [60] vereinbar. Die spezifische Akkumulation im Tumorgewebe kann durch ein Zusammenspiel aus passivem Targeting (EPR-Effekt) und der spezifischen Aufnahme durch OATP1B1, OATP1B3 und/oder NTCP Transporter erreicht worden sein. Der EPR-Effekt kann jedoch in *in vivo* Modellen unterschiedlich ausgeprägt sein und sich von den menschlichen Tumoren stark unterscheiden, so dass Rückschlüsse in Bezug auf die Akkumulation im Menschen mit Vorsicht zu interpretieren sind [137]. Weiterhin konnte die Expression von OATP1B1, OATP1B3 und/oder NTCP Transporter zwar im Kolonkarzinom und im gastropankreatischen Tumor in den meisten Fällen nachgewiesen werden [75], sollte jedoch auf diese Tumorstämme spezifisch getestet werden.

Weiterhin erfolgte die Akkumulation des MacroDels D24S-ICC vermehrt im äußeren Bereich des Tumors (Abb. nicht aufgeführt). Dies könnte für eine aktive Aufnahme durch Transporter sprechen, da viele Zellen innerhalb des Tumors nekrotisch oder stoffwechsel inaktiv sind. Es könnte jedoch ebenfalls mit der Heterogenität der Gefäßversorgung und dem hohen interstitiellen Druck, der innerhalb von Tumoren herrscht, zusammenhängen [138]. Die schlechte Vaskularisierung und mangelnde Erreichbarkeit von Tumoranteilen für Transporter und Chemotherapeutika wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen beschrieben (zusammengefasst [138]). Die Abhängigkeit von der Gefäßversorgung für die Akkumulation des MacroDel-ICC könnte die Wirkung *in vivo* beschränken.

- Verträglichkeit des D24S-ICC im Mausmodell

Es wurden insgesamt sechs Mäuse mit D24S-ICC behandelt und nach 24h getötet. Es konnte nach Gabe des D24S-ICC keine akute Unverträglichkeitsreaktion bei den Mäusen beobachtet werden. Nach 24h kam es ebenfalls zu keinen Gewichtsschwankungen, so dass auf eine gute Verträglichkeit des D24S-ICC in den ersten 24h geschlossen werden kann.

Für alle *in vivo* durchgeführten Versuche gilt, dass die Anzahl an getesteten Mäusen sehr gering war und die Ergebnisse nur als Vorexperiment für weiterführende Untersuchungen dienen sollten.

4.5. Das MacroDel-RNase Konjugat

Das MacroDel konnte in allen Tumorzelllinien *in vitro* nachgewiesen werden und akkumulierte *in vivo* im Tumorgewebe. Es sollte nun als Targeted Drug Delivery System (TDDS) für RNasen getestet werden, da RNasen nachweislich zytotoxische Effekte auslösen können [88, 89]. Durch die Konjugation von RNasen an MacroDels, welche eine direkte Aufnahme ins Zytoplasma ermöglichen, könnte die Wirkung von RNasen deutlich verbessert werden. Es wurden Immunoenzyme, ScFvFc-RNase (RNase) und ScFvFc-RNaseI (RNaseI) eingesetzt, da sie eine gute Stabilität im Serum aufweisen [86].

4.5.1. Nachweis der Konjugation der RNase und RNaseI an das MacroDel

Die Immunoenzyme RNaseI und RNase wurden mit dem MacroDel D24S-PEG4 über den unspaltbaren Linker Maleimid konjugiert. Das D24S-RNaseI Konjugat wurde im Anschluss über eine NP-HPLC in Fraktion 1-8 aufgetrennt. In einer nativen Gelelektrophorese wurde der Kopplungserfolg geprüft. Die Fraktion 4-8 des D24S-RNaseI Konjugates und das D24S-RNase Konjugat mit ihren jeweiligen Kontrollen wurden auf die Gele aufgetragen. In beiden Fällen kam es zu einer erfolgreichen Kopplung, die sowohl in der Coomassie als auch in der Alcianblau Färbung nachzuweisen war (Abb. 17, 18). Von dem D24S-RNaseI Konjugat zeigte die Fraktion 4 den größten gekoppelten Anteil bei gleichzeitig geringsten Überschuss an freiem MacroDel, so dass diese Fraktion für weitere Versuche ausgesucht wurde. Bei dem D24S-RNase Konjugat war die Kopplung nachzuweisen, doch der Anteil an freiem MacroDel war höher als der konjugierte Anteil. Es zeigte sich also, dass die Kopplung des MacroDels an die RNasen erfolgreich war, aber nur in geringem Maße stattfand. Da das MacroDel als TDDS für Therapeutika eingesetzt werden soll, ist es wichtig die Kopplungseffizienz zu steigern oder effiziente Reinigungsmethoden zu entwickeln um reine Substanzgemische zu erhalten, die einheitliche pharmakokinetische und dynamische Charakteristika besitzen.

4.5.2. Untersuchung der MacroDel-RNase Konjugate auf Zytotoxizität *in vitro*

- Zytotoxizitätsscreening

Um möglichst viele Zelllinien auf die MacroDel-RNase Konjugate zu testen, wurden diese in drei bzw. zwei Konzentrationen getestet. Das D24S-RNase Konjugat zeigte allein auf A2780 und SkHep1 einen zytotoxischen Effekt, während das D24S-RNaseI Konjugat (Fraktion 4) auf keiner Zelllinie eine

relevante zytotoxische Wirkung zeigte (Tab. 9). Dabei war die maximal eingesetzte Konzentration bei dem D24S-RNaseI Konjugat höher ($C=300\text{nM}$) als bei dem D24S-RNase Konjugat ($C=100\text{nM}$). Der zytotoxische Effekt wurde sehr wahrscheinlich durch das MacroDel D24S-PEG4 hervorgerufen, welches nachweislich besonders auf A2780 und SkHep1 zytotoxisch wirkt (Tab.6) und in der D24S-RNase Lösung im Überschuss vorhanden ist. Das MacroDel D24S-PEG4 wurde aus der D24S-RNaseI Lösung über die NP-HPLC entfernt, wodurch sich der fehlende Effekt erklären ließe. Weiterhin wurde das MacroDel über den unspaltbaren Linker Maleimid an den freien enzymatischen Anteil des Immunoenzym gebunden, so dass davon auszugehen ist, dass die zwischen MacroDel und Antikörperfragment eingerahmte RNase nicht mehr funktionstüchtig war.

- Dosis-Wirkungs-Beziehung

Als nächstes wurde der IC_{50} -Wert von dem D24S-RNase Konjugat auf A2780 und SkHep1 ermittelt und mit dem IC_{50} -Wert des MacroDels verglichen. Auf A2780 und SkHep1 war der IC_{50} -Wert des Konjugates signifikant geringer im Vergleich zum MacroDel (Tab. 10). Die Konjugation mit dem Immunoenzym könnte zu einer Wirkverstärkung geführt haben, was jedoch, aufgrund des im vorherigen Abschnitt bereits erwähnten Arguments, unwahrscheinlich ist. Wahrscheinlicher ist der Unterschied durch die eingesetzten Konzentrationen zu erklären, die sich auf das Immunoenzym beziehen und nicht auf das während der Synthese im Überschuss eingesetzte MacroDel.

Aufgrund des mäßigen Kopplungserfolges und der fehlenden Wirksamkeit der konjugierten RNase, wurden die Versuche nicht weitergeführt. Um eine Wirksamkeit zu erreichen, müsste einerseits die Kopplungseffizienz gesteigert werden und andererseits das Immunoenzym ScFvFc-RNase über einen spaltbaren Linker oder über den ScFvFc Anteil konjugiert werden, so dass die aktive Domäne der RNase nicht beeinträchtigt wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, eine reine RNase ohne gebundenen ScFvFc Anteil einzusetzen.

4.6. Das MacroDel-Dornase Konjugat

Aufgrund der fehlenden Wirksamkeit des MacroDel-RNase Konjugates, sollte das MacroDel als TDDS für DNasen untersucht werden. DNasen besitzen ebenfalls ein hohes zytotoxisches Potential [95, 139]. Die Konjugation der DNase an das MacroDel könnte durch den direkten Transport ins Zytoplasma die Wirkung der DNase deutlich verbessern. Es wurde die rekombinante Form der DNase

I (Dornase) eingesetzt, die in der Therapie der cystischen Fibrose eingesetzt und gut vertragen wird [140].

4.6.1. Nachweis der Konjugation der Dornase an das MacroDel

Es wurden unterschiedliche Konjugate durch Mivenion hergestellt, die alle über native Gelelektrophorese auf ihren Kopplungserfolg getestet werden sollten. In der Alcianblau und in der Coomassie Färbung, konnte bei allen Konjugaten die Kopplung nachgewiesen werden (Abb. 19). Den größten Anteil an gekoppeltem MacroDel wiesen die D24S- und D48S-PEG8-Dornase Konjugate auf, die über den spaltbaren Linker SPDP an das MacroDel gekoppelt wurden. Die weiteren Konjugate wurden über den unspaltbaren Linker Maleimid oder direkt an das MacroDel gebunden. Der bessere Kopplungserfolg könnte also auf den SPDP Linker zurückzuführen sein. Weiterhin war, wie auch bei den MacroDel-RNase Konjugaten, die freie Dornase und das MacroDel im Überschuss noch nachweisbar. Dies hängt mit der Synthesemethode zusammen, wo das MacroDel im Überschuss hinzugefügt wurde, um einen möglichst hohen Kopplungserfolg zu erreichen.

Wie bereits bei den MacroDel-RNase Konjugaten angedeutet, müsste die Kopplungseffizienz verbessert oder effizientere Reinigungsmethoden gefunden werden, um pure Substanzgemische zu erhalten.

4.6.2. Untersuchung der Enzymaktivität der Dornase nach Konjugation

Die Konjugation von Enzymen an das MacroDel kann zu Konformationsänderungen führen, die die Wirkung des Enzyms beeinflussen können. Die Aktivität der MacroDel-Dornase Konjugate wurde im Vergleich zur ungekoppelten Dornase in einer spektrophotometrischen Analyse untersucht. Bei allen Konjugaten konnte eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, die um 20-30% geringer ausfiel als die unkonjugierte Dornase (Abb. 20). Dies weist darauf hin, dass die Konjugation die Enzymkinetik vermindert, eine ausreichende Aktivität aber noch vorhanden ist. Es ist jedoch zu beachten, dass in den Konjugat-Lösungen noch unkonjugierte Dornasen nachgewiesen werden konnten (Abb. 19), so dass die Aktivität möglicherweise teilweise auf diese zurückzuführen ist. Der Versuch sollte nach Aufreinigung der MacroDel-Dornase Konjugate erneut durchgeführt werden.

Weiterhin muss die konjugierte Dornase, um erfolgreich als Therapeutikum eingesetzt werden zu können, ihre Funktion während des Transportprozesses im Blut bis ins Zytoplasma der Tumorzelle erhalten können. Für die Stabilität des MacroDel-Dornase Konjugates im Blut spricht die Feststellung, dass im Blut Serum DNasen zirkulieren und extrazelluläre DNA abbauen [141]. Die Serum DNase I zeigte weiterhin experimentell die gleichen Eigenschaften, wie die humane pankreatische DNase I (Dornase) [142], so dass eine gute Stabilität der Dornase und des MacroDel-Dornase Konjugates im Blut wahrscheinlich ist. Dennoch sollte in weiteren Versuchen die Stabilität des MacroDel-Dornase Konjugates im Blut untersucht werden.

Für die weiteren Versuche wurde das D48S-PEG8-Dornase Konjugat ausgewählt, da es den höchsten Kopplungserfolg zeigte und noch eine gute Aktivität aufwies.

4.6.3. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-Dornase Konjugates mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

Es sollte nun untersucht werden, ob die Konjugation der Dornase an das MacroDel die Aufnahme beeinflusst. Hierfür wurde das Konjugat D48S-PEG8-Dornase-ICC und seine Kontrolle D48S-PEG8-ICC auf A2780, SkHep1 und QG56 untersucht. Bei allen Zelllinien kam es zu einer Aufnahme des MacroDel-Dornase Konjugates (Abb. 21, Tab. 11). Dies stimmt mit der Aufnahme von dPGS Konjugaten, wie dem dPGS-Paclitaxel Konjugat, überein [62]. Die Konjugation führte jedoch zu einer starken Verminderung der Aufnahme im Vergleich zum unkonjugiertem MacroDel. Dieser Unterschied lässt sich teilweise durch die geringere Konzentration an MacroDel-Konjugat erklären, da bei der Berechnung der Inkubationskonzentrationen von den Ausgangskonzentrationen der Dornase, welche eine 100% Kopplungseffizienz impliziert, ausgegangen wurde. Weiterhin könnte die veränderte Größe und Polarität des Konjugates die Aufnahmekinetik beeinflusst haben. Obwohl für hochverzweigte Polyglycerolsulfate gezeigt werden konnte, dass größere Moleküle bis zu 870kDa besser im Zytoplasma akkumulieren [119], bildet im Falle des MacroDel-Dornase Konjugates die Hauptmasse das Enzym aus. Folglich könnte dies die Affinität zu den OATP1B1, OATP1B3 und/oder NTCP Transportern verringert haben.

Um den Einfluss besser untersuchen zu können, müssten einerseits die Ausgangskonzentrationen angeglichen werden und andererseits die Substanzen auf Fluoreszenz eingestellt werden. Weiterhin ermöglicht die Durchflusszytometrie keinen sicheren Nachweis für die intrazelluläre Aufnahme der

MacroDel-Dornase Konjugate, so dass in weiterführenden Versuchen eine Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden müsste.

4.6.4. Untersuchung der MacroDel-Dornase Konjugate auf Zytotoxizität *in vitro*

- Zytotoxizitätsscreening

Das D48S-PEG8-Dornase Konjugat und die Dornase wurden auf Tumorzelllinien aus Leber, Magen, Kolon, Pankreas, Lunge, Mamma, Ovar, Zervix, Leukämien und Lymphomen auf Zytotoxizität untersucht. Auf den meisten Zelllinien kam es zu keinem zytotoxischen Effekt, bei den Tumorzelllinien aus dem Kolon (SW948, HT29, SW480), der Leber (HUH7) und dem Pankreas kam es zu einer geringfügigen Wirkung (Tab. 12). Die größte Wirkung zeigte sich auf A2780 und SkHep1 (Tab. 12). Dies stimmt mit den Zytotoxizitätsuntersuchungen der unkonjugierten MacroDels und des D24S-RNase Konjugates überein (Tab. 6, 9), die ebenfalls auf A2780 und SkHep1 stark zytotoxisch wirkten. Die Dornase wurde über den spaltbaren Linker SPDP an das MacroDel konjugiert, der bei einem pH von 7 eine Halbwertszeit von einigen Stunden besitzt (Thermo Fischer). Da die Substanzen für 72h inkubiert wurden, ist es schwierig zu unterscheiden, ob die zytotoxische Wirkung auf das MacroDel, das zudem noch im Überschuss vorlag, die Dornase oder eine Kombination beider zurückzuführen ist. Die fehlende Wirkung auf andere Tumorzelllinien lässt sich womöglich durch den geringen Anteil an konjugierter Dornase erklären, die dadurch nur wenig intrazellulär akkumulieren und wirken konnte. Die Dornase Kontrolle führte bei keiner Zelllinie zu einem zytotoxischen Effekt. Dies widerspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Alcazar, die eine Inhibierung der Zellproliferation durch DNase I nachweisen konnte [94]. Über die zugrunde liegenden Zytotoxizitätsmechanismen oder Aufnahmemechanismen der DNase I ging die Arbeitsgruppe nicht ein. In der Literatur konnten keine weiteren Hinweise für eine *in vitro* zytotoxische Wirkung der DNase I gefunden werden.

- Dosis-Wirkungsbeziehung

Da das MacroDel-Dornase Konjugat besonders gut auf A2780 und SkHep1 wirkte, wurde die IC₅₀-Wert Messung auf diese Zelllinien durchgeführt. Das MacroDel Konjugat D48S-PEG8-Dornase zeigte auf A2780 und SkHep1 einen signifikant geringeren IC₅₀-Wert als das MacroDel D48S-PEG8 (Abb. 22, Tab. 13). Es könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass die Konjugation des MacroDels mit der Dornase zu einer Wirkverstärkung führt. Da in dem Konjugatgemisch das MacroDel noch im

Überschuss vorlag und die Dornase über einen spaltbaren Linker an das MacroDel konjugiert wurde, kann die Wirkverstärkung nicht sicher auf die Aktivität der Dornase zurückgeführt werden. Um dies nachzuweisen, müssten in weiterführenden Experimenten die DNA-Produkte der Dornase gemessen werden. Dies würde ebenfalls den Nachweis erbringen, dass das MacroDel-Dornase Konjugat während des intrazellulären Transports ihre Wirkung beibehält.

Weiterhin ist zu beachten, dass die Dornase erst bei Zellteilung ihre Wirkung entfalten kann, da sich alleine während der Mitose die Zellkernmembran auflöst. Dementsprechend ist die Wirkung wahrscheinlich von der Zellteilungsrate abhängig. *In vitro* ergaben sich Hinweise für eine intranukleäre Akkumulation des MacroDel D24S-PEG4-ICC (Abb. 11). Bis 40kDa können Moleküle und Proteine passiv durch Kernporen passieren [143], so dass ein intranukleärer Transport des MacroDel-Dornase Konjugates möglich wäre und in weiteren Untersuchungen analysiert werden könnte. Ein intranukleärer Transport der Dornase könnte ihre Wirkung unabhängig von der Teilungsrate verstärken.

Im Verlauf sollte das MacroDel-Dornase Konjugat *in vivo* auf Verteilung und Aufnahme getestet werden. Der Einsatz des MacroDel-Dornase Konjugates *in vivo* könnte jedoch durch das Vorhandensein von extrazellulärer DNA limitiert werden. Im Serum und in tumorösen Zellverbänden konnten hohe Mengen an extrazellulärer DNA nachgewiesen werden [144], so dass es möglicherweise vor Erreichen der Zielzelle zur Bindung der Dornase an extrazelluläre DNA kommen könnte.

4.7. Das MacroDel-ASNase Konjugat

Während durch den Einsatz von DNase und RNase auf der Transkriptions- und Translationsebene der Tumorzellen Wirkungen erzielt werden können, kann die Asparaginase (ASNase) den Proteinstoffwechsel beeinflussen. Die Asparaginase katalysiert die Deaminierung der nicht essentiellen Aminosäure Asparagin zu Aspartatsäure und Ammonium [83]. Asparagin spielt eine wichtige Rolle im Wachstum und in der Progression von Tumoren. Bis jetzt konnte die Asparaginase erfolgreich in der Therapie von Lymphomen und Leukämien eingesetzt werden [83]. Durch Konjugation der Asparaginase an das MacroDel könnte das Wirkspektrum auf solide Tumoren erweitert werden. In Vorexperimenten (nicht aufgeführt) konnten nur geringe zytotoxische Effekte nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies auf die Expression von Asparaginsynthetase in soliden Tumoren, die die Bildung von Asparagin aus Glutamin katalysiert, zurückzuführen [100].

4.7.1. Untersuchung der Enzymaktivität der ASNase nach Konjugation

Die Konjugation der ASNase an das MacroDel D24S-PEG4 über den unspaltbaren Linker Maleimid erfolgte durch Mivenion. Die Konjugation konnte mittels nativer Gelelektrophorese erfolgreich nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Dabei war das freie MacroDel im Überschuss noch nachweisbar, was bei der Interpretation der weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden muss.

Nach erfolgreicher Konjugation wurde geprüft, ob die Aktivität der ASNase nach Konjugation und nach Aufnahme in die Zelle noch vorhanden war. Der Nachweis erfolgte mittels Nessler's Reaktion. Die Aktivität der D24S-ASNase-ICC konnte im Zytoplasma und in den Zellorganellen nach Konjugation und intrazellulärer Aufnahme nachgewiesen werden (Abb. 23). 20% der Aktivität konnte im Zytoplasma nachgewiesen werden, was eine deutliche Wirksamkeit auf zellbiochemische Prozesse ermöglichen würde. Die zytoplasmatisch nachweisbare Aktivität spricht ebenfalls für eine direkte Aufnahme des Konjugates über Transporter. Mutmaßlich wird das MacroDel-ASNase Konjugat durch die selben Transporter (OATP1B1, OATP1B3, NTCP) wie das MacroDel aufgenommen. Eine weitere Möglichkeit wäre ebenfalls die Aufnahme über Endozytose mit anschließender Evasion ins Zytoplasma. Die nachweisbare Aktivität in den Zellorganellen, zu denen auch Endosomen und Lysosomen gezählt werden, spricht ebenfalls für eine partielle endozytotische Aufnahme des Konjugates. Dementsprechend wird das 24S-ASNase-ICC wahrscheinlich sowohl transportervermittelt als auch über Endozytose aufgenommen. Die mit ASNase-ICC inkubierten Zellen, wiesen keine Enzymaktivität auf, was vermeintlich auf die fehlende Aufnahme zurückzuführen ist.

4.7.2. Untersuchung der Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Durchflusszytometrie *in vitro*

In der Durchflusszytometrie konnte auf allen getesteten Zelllinien, QGP-1, HepG2 und A2780, die Aufnahme des MacroDels D24S-PEG4-ICC und des Konjugates D24S-ASNase-ICC nachgewiesen werden (Abb. 24, Tab. 14). Die ASNase-ICC wurde von den Zellen nur in sehr geringen Mengen aufgenommen, möglicherweise über Endozytose. Erstaunlicherweise kam es bei QGP-1 und A2780 zu einer stärkeren Aufnahme des D24S-ASNase Konjugates im Vergleich zum MacroDel. Dies stimmt mit den MacroDel-Dornase Untersuchungen nicht überein, wo die Konjugation des MacroDels

an die Dornase zu einer Verminderung der Aufnahme führte (Abb. 21, Tab. 11). Möglicherweise wird das MacroDel-ASNase Konjugat über weitere zusätzliche Wege in die Zelle aufgenommen, wie zum Beispiel über Endocytose oder andere Transporter. Die stärkere Fluoreszenz könnte ebenfalls durch eine Aggregation des MacroDel-ASNase Konjugate an der Zellmembran durch Bindung von membranösen Proteinen oder elektrostatischen Wechselwirkungen entstanden sein. Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch die Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

4.7.3. Untersuchung der Aufnahme und Verteilung des MacroDel-ASNase Konjugates mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vitro*

Um die intrazelluläre Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates nachzuweisen, wurden A2780, HepG2 und QGP-1 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In allen Zelllinien konnte die Aufnahme von D24S-PEG4-ICC, D24S-ASNase-ICC und vereinzelt ASNase-ICC nachgewiesen werden (Abb. 25). Übereinstimmend mit der durchflusszytometrischen Untersuchung, kam es zu einer stärkeren Aufnahme des MacroDel-ASNase Konjugates im Vergleich zum MacroDel. Das MacroDel wies eine überwiegend homogene Verteilung auf, was mit vorherigen Ergebnissen (Abb. 10) übereinstimmt und mit einer transportervermittelten Aufnahme des MacroDels vereinbar ist. Das MacroDel-ASNase Konjugat wies zusätzlich zu der homogenen Verteilung vereinzelte vesikuläre Signalverstärkungen auf, die auf eine endozytotische Aufnahme oder eine Aggregation der Konjugate deuten könnten. Das MacroDel-ASNase Konjugat scheint also über unterschiedliche Transportmechanismen in die Zelle zu kommen. Dies würde mit den Ergebnissen der Enzymaktivitätsmessung und der Durchflusszytometrie übereinstimmen (§4.7.1., §4.7.2.). Eine endozytotische Aufnahme würde jedoch, aufgrund der nachfolgenden lysosomalen Degradation, zu einem Wirkverlust des Enzyms führen. Um diesen Wirkverlust zu verhindern, könnte über einen Endozytosehemmer, wie Genistein [145], die Endozytose gehemmt und der Anteil der transportervermittelten Aufnahme gesteigert werden. Weiterhin könnten die vesikulären Signale durch Autophagie der zytoplasmatischen MacroDel-ASNase Konjugate entstanden sein. Über Autophagie können zytoplasmatische Bestandteile aufgenommen und abgebaut werden [146]. In Tumorzellen konnten verstärkte Autophagieprozesse nachgewiesen werden, welche auch therapeutisch genutzt werden können [146].

4.7.4. Untersuchung der Aufnahme des MacroDels und des MacroDel-ASNase Konjugates durch OATP1B1

Das MacroDel wird möglicherweise über OATP bzw. NTCP Transporter in Tumorzellen aufgenommen. Diese Annahme sollte einerseits geprüft und andererseits für das MacroDel-ASNase Konjugat untersucht werden. Es sollte getestet werden, ob die Konjugation mit der ASNase den Aufnahmemechanismus verändert, da sich u.a. in der Fluoreszenzmikroskopie Hinweise für endozytotische Aufnahmemechanismen zeigten und das Konjugat ein deutlich höheres Molekulargewicht besitzt (M_{D24S} : 4638 Da; $M_{D24S-ASNase}$: 36638 Da). Hierfür wurde Rifamycin als selektiver Inhibitor für OATP1B1 eingesetzt [145]. Bereits durch Zugabe von 10 μ M Rifamycin kam es zu einer Abnahme der Aufnahme um fast 50% von D24S-decyl-ICC und D24S-ASNase-ICC (Abb. 26). Dies weist deutlich darauf hin, dass das MacroDel und das MacroDel-ASNase Konjugat zumindest teilweise über OATP1B1 aufgenommen werden. Die unter Rifamycin trotzdem aufgenommenen MacroDels und MacroDel-ASNasen könnten durch eine inkomplette Hemmung der OATP1B1 Transporter oder über alternative Aufnahmewege wie OATP1B3, NTCP-Transporter oder Endozytose zurückzuführen sein.

4.7.5. Untersuchung des MacroDel-ASNase Konjugates *in vivo*

In weiteren Versuchen sollte untersucht werden wie sich das MacroDel-ASNase Konjugat nach Applikation *in vivo* verhält und ob es sich ähnlich dem MacroDel verteilt. Hierfür wurde 10mg/kg Körpergewicht D24S-ASNase-ICC drei athymischen Mäusen mit einem humanen Kolonkarzinom (HT29) injiziert und untersucht. In der Epifluoreszenzmikroskopie konnte das D24S-ASNase-ICC Konjugat in Leber und Niere nachgewiesen werden (Abb. 27). In der Leber zeigte sich die Verteilung ähnlich dem MacroDel: flächenhaft homogen mit vereinzelt vesikulären Ansammlungen in eckigen Zellen, am ehesten die Kupferzellen oder Ito-Zellen. Auch hier ist die Aufnahme über die OATP1B1 und OATP1B3 Transporter, die in Hepatozyten exprimiert werden [73], die wahrscheinliche Ursache für die Akkumulation [102]. Die Kupferzellen sind zur Endozytose befähigt und könnten über diesen Mechanismus das D24S-ASNase-ICC aufgenommen haben. Die ASNase wies in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie lebertoxische Eigenschaften auf [147]. Die Akkumulation des MacroDel-ASNase Konjugates in der Leber könnte diese Toxizität, aufgrund der OATP und NTCP getriggerten Aufnahme, verschärfen. In der Niere konnte das D24S-ASNase-ICC Konjugat,

vergleichbar mit dem MacroDel, in den Tubuli nachgewiesen werden. Die möglichen Aufnahmemechanismen wurden im Abschnitt 4.4. ausführlich diskutiert. Im Gegensatz zum MacroDel, konnte das D24S-ASNase-ICC Konjugat auch schwach in den Glomeruli nachgewiesen werden. Die Mechanismen, die zu einer glomerulären Akkumulation führten, müssten weiter untersucht werden. Sie könnten auf eine glomeruläre Filtration des MacroDel-ASNase Konjugates deuten. Bis jetzt ist jedoch über die Elimination des MacroDels und der ASNase wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass die ASNase über das Retikuloendotheliale System eliminiert wird [148, 149], während das MacroDel möglicherweise in der Niere tubulär sezerniert wird (s. 4.4.). Die glomeruläre Akkumulation könnte eine nephrotoxische Wirkung des MacroDel-ASNase Konjugates bewirken.

Im Kolonkarzinom konnte in der inneren und äußeren Schicht des Tumors das MacroDel-ASNase Konjugat nachgewiesen werden, wobei es im äußeren Bereich zu einer deutlich stärkeren Akkumulation kam (Abb. 28). Mögliche Gründe für die heterogene Verteilung wurden bereits ausführlich erörtert und können im Abschnitt 4.4. nachgeschlagen werden. Die mangelnde Erreichbarkeit innerer Tumorschichten könnte die Wirkung des MacroDel-ASNase Konjugates *in vivo* beschränken.

4.8. Fazit: Eignet sich das MacroDel als Targeted Drug Delivery System für Enzyme?

Viele Hinweise deuten darauf hin, dass das MacroDel funktionelle Eigenschaften besitzt, um als erfolgreiches TDDS eingesetzt werden zu können. Durch die anionischen Ladungen ist das MacroDel gut löslich und kann im Blut zirkulieren. Es zeigte *in vitro* und *in vivo* eine lange Halbwertszeit, was für die Akkumulation des TDDS mit seinem Kargo am Zielort essentiell ist [38]. Die starke Sulfatierung des MacroDels ermöglicht seine spezifische Aufnahme möglicherweise durch Transporter (OATP1B1, OATP1B3, NTCP), die nachweislich nur auf Tumorzellen und Hepatozyten exprimiert werden [73-79]. Die spezifische Akkumulation des MacroDels konnte *in vivo* im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Das MacroDel wird direkt ins Zytoplasma aufgenommen, was von den wenigsten TDDS erreicht wird [50]. Dadurch werden viele intrazelluläre Targets erstmals erreichbar. Das MacroDel konnte ebenfalls intranukleär nachgewiesen werden, so dass es möglicherweise auch als TDDS für intranukleäre Targets dienen könnte. Weiterhin führte das MacroDel selbst auf einigen Tumorzelllinien zu einem zytotoxischen Effekt. Diese Eigenschaft

könnte als „Enhancer“ genutzt werden, um die Wirkung des transportierten Tumorthapeutikums zu verstärken. Außerdem war das MacroDel in den *in vivo* Versuchen gut verträglich.

Das MacroDel zeigte sich als TDDS für Enzyme ebenfalls erfolgsversprechend. Die Enzyme konnten an das MacroDel konjugiert werden und wiesen nach Konjugation noch Aktivität auf. *In vitro* und *in vivo* konnte die Akkumulation der MacroDel-Enzym Konjugate im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Aufnahme der MacroDel-Enzym Konjugate erfolgt ebenfalls über Transporter direkt ins Zytoplasma. Das MacroDel konnte also seine Transporterfunktion als TDDS für Enzyme erfüllen. Die Effizienz könnte jedoch durch einen höheren Kopplungserfolg verbessert werden. Dadurch würden die Konjugate womöglich auf mehr Tumorzelllinien einen zytotoxischen Effekt hervorrufen. Die meisten Untersuchungen erfolgten alleine mit dem MacroDel-ASNase Konjugat, so dass im Verlauf die weiteren Konjugate untersucht werden müssten.

In vivo kam es erwartungsgemäß auch zu einer Akkumulation des MacroDels und seiner Konjugate in der Leber. Die hepatische Akkumulation könnte für weitere therapeutische Zwecke genutzt werden. Die Möglichkeit Enzyme in das Zytoplasma von Hepatozyten zu transportieren, stellt eine neue Perspektive für die Therapie hereditärer Stoffwechselerkrankungen dar. Bis jetzt konnten mittels Enzymersatztherapien nur lysosomale Speichererkrankungen behandelt werden [150], da für den Ersatz zytoplasmatischer Enzyme bislang effiziente Transporter fehlten.

Das MacroDel erfüllt somit die Grundvoraussetzungen eines TDDS und sollte als TDDS für Enzyme in der Tumorthapie und in der Therapie hepatischer Stoffwechselerkrankungen weiter untersucht werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Krebsregisterdaten. *Krebs* *gesamt*. 2012; Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html.
2. RKI, *Epidemiologie von Krebserkrankungen*, in *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland*, R.K. Institut, Editor. 2016.
3. Report, W.C., *World Cancer Report 2014*, W.C. Stewart BW, Editor. 2014, International Agency for Research on Cancer: Lyon.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Patenaude, A., J. Parker, and A. Karsan, *Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 217-23.
7. Giaccia, A.J. and E. Schipani, *Role of carcinoma-associated fibroblasts and hypoxia in tumor progression*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **345**: p. 31-45.
8. Bergfeld, S.A. and Y.A. DeClerck, *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 249-61.
9. Fang, S. and P. Salven, *Stem cells in tumor angiogenesis*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 290-5.
10. Siewert, J.R. and U. Fink, *Prinzipien der onkologischen Chirurgie*, in *Kompendium Internistische Onkologie: Teil 1: Grundlagen · Richtlinien · Antineoplastische Substanzen · Toxizitäten · Prophylaktische und supportive Therapie · Adressen*, H.-J. Schmoll, K. Höffken, and K. Possinger, Editors. 1996, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 281-297.
11. BN, K., *Strahlentherapie*, in *Onkologische Therapie: Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren ; mit diagnostischen hinweisen*, H.D.B.e. al., Editor. 2004, Schattauer: Stuttgart. p. 141-149.
12. *5.6 Nebenwirkungen*, in *Radiologie*, M. Reiser, F.-P. Kuhn, and J. Debus, Editors. 2011, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
13. Bönisch, H., K.H. Graefe, and W.K. Lutz, *Maligne Tumoren*, in *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. 2016, Thieme. p. 654-684.
14. Shewach, D.S. and R.D. Kuchta, *Introduction to Cancer Chemotherapeutics*. Chemical reviews, 2009. **109**(7): p. 2859-2861.
15. Vasir, J.K. and V. Labhasetwar, *Targeted drug delivery in cancer therapy*. Technol Cancer Res Treat, 2005. **4**(4): p. 363-74.
16. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(1): p. 3-20.
17. Druker, B.J., *Imatinib mesylate in the treatment of chronic myeloid leukaemia*. Expert Opin Pharmacother, 2003. **4**(6): p. 963-71.
18. Izar, B., J. Rotow, J. Gainor, J. Clark, and B. Chabner, *Pharmacokinetics, Clinical Indications, and Resistance Mechanisms in Molecular Targeted Therapies in Cancer*. Pharmacological Reviews, 2013. **65**(4): p. 1351.
19. Widakowich, C., G. de Castro, Jr., E. de Azambuja, P. Dinh, and A. Awada, *Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers*. Oncologist, 2007. **12**(12): p. 1443-55.
20. Jang, S.H., M.G. Wientjes, D. Lu, and J.L. Au, *Drug delivery and transport to solid tumors*. Pharm Res, 2003. **20**(9): p. 1337-50.
21. Torchilin, V.P., *Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives*. Pharm Res, 2007. **24**(1): p. 1-16.
22. Stewart, M.P., A. Lorenz, J. Dahlman, and G. Sahay, *Challenges in carrier-mediated intracellular delivery: moving beyond endosomal barriers*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2016. **8**(3): p. 465-78.
23. Yoo, J.-W., D.J. Irvine, D.E. Discher, and S. Mitragotri, *Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(7): p. 521-535.

24. Gu, Z., A. Biswas, M. Zhao, and Y. Tang, *Tailoring nanocarriers for intracellular protein delivery*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(7): p. 3638-55.
25. Abraham, S.A., D.N. Waterhouse, L.D. Mayer, P.R. Cullis, T.D. Madden, and M.B. Bally, *The liposomal formulation of doxorubicin*. Methods Enzymol, 2005. **391**: p. 71-97.
26. *Liposomes in Biomedical Applications*, ed. P.N. Shek. 1995: harwood academic publishers.
27. de Jong, S., G. Chikh, L. Sekirov, S. Raney, S. Semple, S. Klimuk, N. Yuan, M. Hope, P. Cullis, and Y. Tam, *Encapsulation in liposomal nanoparticles enhances the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG ODN*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(8): p. 1251-64.
28. Zimmermann, T.S., A.C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M.N. Fedoruk, J. Harborth, J.A. Heyes, L.B. Jeffs, M. John, A.D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L.V. Nechev, L.R. Palmer, T. Racie, I. Rohl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A.J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, and I. MacLachlan, *RNAi-mediated gene silencing in non-human primates*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 111-4.
29. Akbarzadeh, A., R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, and K. Nejati-Koshki, *Liposome: classification, preparation, and applications*. Nanoscale Res Lett, 2013. **8**(1): p. 102.
30. Martins, S., B. Sarmiento, D.C. Ferreira, and E.B. Souto, *Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles*. Int J Nanomedicine, 2007. **2**(4): p. 595-607.
31. Peppas, N.A., P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. **50**(1): p. 27-46.
32. Duncan, R., *The dawning era of polymer therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 347-60.
33. Parker, A., *Self-assembling Complexes for Gene Delivery: Kabanov AV, Felgner PL, Seymour LW, eds. (£70.00.) Wiley, 1998. ISBN 0471 97269*. Molecular Pathology, 2002. **55**(3): p. 207-208.
34. Veronese, F.M. and J.M. Harris, *Introduction and overview of peptide and protein pegylation*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(4): p. 453-6.
35. Oerlemans, C., W. Bult, M. Bos, G. Storm, J.F. Nijsen, and W.E. Hennink, *Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release*. Pharm Res, 2010. **27**(12): p. 2569-89.
36. 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.
37. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, ed. E. Mathiowitz. 1999.
38. Svenson, S., *Carrier-Based Drug Delivery*, in *Carrier-Based Drug Delivery*. 2004, American Chemical Society. p. 2-23.
39. 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.
40. Bae, Y.H. and K. Park, *Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility*. Journal of Controlled Release, 2011. **153**(3): p. 198-205.
41. Hobbs, S.K., W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, and R.K. Jain, *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4607-12.
42. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
43. Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-84.
44. Jain, R.K., N. Safabakhsh, A. Sckell, Y. Chen, P. Jiang, L. Benjamin, F. Yuan, and E. Keshet, *Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10820-5.

45. Yuan, F., H.A. Salehi, Y. Boucher, U.S. Vasthare, R.F. Tuma, and R.K. Jain, *Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows*. *Cancer Res*, 1994. **54**(17): p. 4564-8.
46. Milosevic, M., A. Fyles, D. Hedley, and R. Hill, *The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure*. *Semin Radiat Oncol*, 2004. **14**(3): p. 249-58.
47. 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.
48. Folkman, J., *Addressing tumor blood vessels*. *Nat Biotechnol*, 1997. **15**(6): p. 510.
49. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell*. 2002.
50. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. *J Control Release*, 2010. **145**(3): p. 182-95.
51. Heller, A., G. Brockhoff, and A. Goepferich, *Targeting drugs to mitochondria*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012. **82**(1): p. 1-18.
52. Akinc, A. and G. Battaglia, *Exploiting endocytosis for nanomedicines*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(11): p. a016980.
53. Hillaireau, H. and P. Couvreur, *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(17): p. 2873-96.
54. Stewart, M.P., A. Sharei, X. Ding, G. Sahay, R. Langer, and K.F. Jensen, *In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery*. *Nature*, 2016. **538**(7624): p. 183-192.
55. Jhaveri, A. and V. Torchilin, *Intracellular delivery of nanocarriers and targeting to subcellular organelles*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016. **13**(1): p. 49-70.
56. Soleyman, R. and M. Adeli, *Impact of dendritic polymers on nanomaterials*. *Polymer Chemistry*, 2015. **6**(1): p. 10-24.
57. TÜRK, H., U. ZÜGEL, G. Bernhard, J. Dervede, S. Enders, R. Haag, R. Tauber, B.A. Von, and H. Weinhart, *Dendritic polyglycerol sulfates and sulfonates and their use for inflammatory diseases*. 2009, Google Patents.
58. Turk, 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.
59. 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.
60. Würfel, P., *Dendritische Polyglycerolsulfate in der Tumorchemotherapie*. 2015, Charité-Universitätsmedizin Berlin.
61. Laube, A., *Hochsulfatierte Makromoleküle in Diagnostik und Therapie der rheumatoiden Arthritis*. 2016, Charité-Universitätsmedizin Berlin. p. 101.
62. 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.
63. Calderon, M., M.A. Quadir, S.K. Sharma, and R. Haag, *Dendritic polyglycerols for biomedical applications*. *Adv Mater*, 2010. **22**(2): p. 190-218.
64. Licha, K., M. Schirner, P. Welker, R. Haag, M. Weinhart, and F. Paulus, *Polyanionic multivalent macromolecules for intracellular targeting of proliferation and protein synthesis*. 2011, Google Patents.
65. Haag, R., A. Sunder, and J.-F. Stumbé, *An Approach to Glycerol Dendrimers and Pseudo-Dendritic Polyglycerols*. *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(12): p. 2954-2955.
66. 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.

67. 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.
68. Groger, D., F. Paulus, K. Licha, P. Welker, M. Weinhart, C. Holzhausen, L. Mundhenk, A.D. Gruber, U. Abram, and R. Haag, *Synthesis and biological evaluation of radio and dye labeled amino functionalized dendritic polyglycerol sulfates as multivalent anti-inflammatory compounds*. Bioconjug Chem, 2013. **24**(9): p. 1507-14.
69. 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.
70. Sousa-Herves, A., D. Groger, M. Calderon, E. Fernandez-Megia, and R. Haag, *Anionic Dendritic Polymers for Biomedical Applications*, in *Dendrimers in Biomedical Applications*. 2013, The Royal Society of Chemistry. p. 56-72.
71. Hagenbuch, B. and B. Stieger, *THE SLCO (FORMER SLC21) SUPERFAMILY OF TRANSPORTERS*. Molecular aspects of medicine, 2013. **34**(2-3): p. 396-412.
72. Hagenbuch, B. and C. Gui, *Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 778-801.
73. Buxhofer-Ausch, V., L. Secky, K. Wlcek, M. Svoboda, V. Kounnis, E. Briasoulis, A.G. Tzakos, W. Jaeger, and T. Thalhammer, *Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy*. J Drug Deliv, 2013. **2013**: p. 863539.
74. 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.
75. Lockhart, A.C., E. Harris, B.J. Lafleur, N.B. Merchant, M.K. Washington, M.B. Resnick, T.J. Yeatman, and W. Lee, *Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome*. Clin Exp Gastroenterol, 2008. **1**: p. 1-7.
76. Maeda, T., M. Irokawa, H. Arakawa, E. Kuraoka, T. Nozawa, R. Tateoka, Y. Itoh, T. Nakanishi, and I. Tamai, *Uptake transporter organic anion transporting polypeptide 1B3 contributes to the growth of estrogen-dependent breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **122**(4): p. 180-5.
77. Hamada, A., T. Sissung, D.K. Price, R. Danesi, C.H. Chau, N. Sharifi, D. Venzon, K. Maeda, K. Nagao, A. Sparreboom, H. Mitsuya, W.L. Dahut, and W.D. Figg, *Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3312-8.
78. Pressler, H., T.M. Sissung, D. Venzon, D.K. Price, and W.D. Figg, *Expression of OATP Family Members in Hormone-Related Cancers: Potential Markers of Progression*. PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. e20372.
79. Kounnis, V., E. Ioachim, M. Svoboda, A. Tzakos, I. Sainis, T. Thalhammer, G. Steiner, and E. Briasoulis, *Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B3, 1B1, and 1A2 in human pancreatic cancer reveals a new class of potential therapeutic targets*. Onco Targets Ther, 2011. **4**: p. 27-32.
80. Obaidat, A., M. Roth, and B. Hagenbuch, *The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. **52**: p. 135-51.
81. Stieger, B., *The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation*. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): p. 205-59.
82. Novak, J.F. and F. Trnka, *Proenzyme therapy of cancer*. Anticancer Res, 2005. **25**(2a): p. 1157-77.
83. Avramis, V.I. and P.N. Tiwari, *Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia*. International Journal of Nanomedicine, 2006. **1**(3): p. 241-254.
84. Leland, P.A. and R.T. Raines, *Cancer chemotherapy — ribonucleases to the rescue*. Chemistry & biology, 2001. **8**(5): p. 405-413.

85. Montecucco, C., E. Papini, and G. Schiavo, *Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism*. FEBS Lett, 1994. **346**(1): p. 92-8.
86. Menzel, C., T. Schirrmann, Z. Konthur, T. Jostock, and S. Dubel, *Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3830-7.
87. Bareford, L.M. and P.W. Swaan, *Endocytic mechanisms for targeted drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(8): p. 748-58.
88. Tafech, A., T. Bassett, D. Sparanese, and C.H. Lee, *Destroying RNA as a therapeutic approach*. Curr Med Chem, 2006. **13**(8): p. 863-81.
89. Ardelt, W., B. Ardelt, and Z. Darzynkiewicz, *Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 181-9.
90. Beck, A.K., H.I. Pass, M. Carbone, and H. Yang, *Ranpirnase as a potential antitumor ribonuclease treatment for mesothelioma and other malignancies*. Future Oncol, 2008. **4**(3): p. 341-9.
91. Haigis, M.C. and R.T. Raines, *Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 313-24.
92. Daoust, R. and H. Amano, *Ribonuclease and deoxyribonuclease activities in experimental and human tumors by the histochemical substrate film method*. Cancer Res, 1963. **23**: p. 131-4.
93. De Lamirande, G., *Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice*. Nature, 1961. **192**: p. 52-4.
94. Alcazar-Leyva, S., E. Ceron, F. Masso, L.F. Montano, P. Gorocica, and N. Alvarado-Vasquez, *Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation*. Med Sci Monit, 2009. **15**(2): p. Cr51-55.
95. Hawes, M.C., F. Wen, and E. Elquza, *Extracellular DNA: A Bridge to Cancer*. Cancer Res, 2015. **75**(20): p. 4260-4.
96. Kishi, K., T. Yasuda, and H. Takeshita, *DNase I: structure, function, and use in medicine and forensic science*. Leg Med (Tokyo), 2001. **3**(2): p. 69-83.
97. Yang, C., M. Chilvers, M. Montgomery, and S.J. Nolan, *Dornase alfa for cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **4**: p. Cd001127.
98. Krall, A.S., S. Xu, T.G. Graeber, D. Braas, and H.R. Christofk, *Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11457.
99. Tallal, L., C. Tan, H. Oettgen, N. Wollner, M. McCarthy, L. Helson, J. Burchenal, D. Karnofsky, and M.L. Murphy, *E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children*. Cancer, 1970. **25**(2): p. 306-20.
100. *The Human Protein Atlas*.
101. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, ed. J.B. Pawley. 2006, New York: Springer.
102. Roth, M., A. Obaidat, and B. Hagenbuch, *OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies*. British Journal of Pharmacology, 2012. **165**(5): p. 1260-1287.
103. 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.
104. Riss, T.L., R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, and L. Minor, *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
105. Stepanenko, A.A. and V.V. Dmitrenko, *Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability*. Gene, 2015. **574**(2): p. 193-203.
106. Hacker, M., W.S. Messer II, and K.A. Bachmann, *Pharmacology: principles and practice*. 2009: Academic Press.
107. Gottschalk, P.G. and J.R. Dunn, *The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic*. Anal Biochem, 2005. **343**(1): p. 54-65.
108. Arndt, C., S. Koristka, H. Bartsch, and M. Bachmann, *Native polyacrylamide gels*. Methods Mol Biol, 2012. **869**: p. 49-53.
109. Lev, R. and S.S. Spicer, *SPECIFIC STAINING OF SULPHATE GROUPS WITH ALCIAN BLUE AT LOW PH*. J Histochem Cytochem, 1964. **12**: p. 309.

110. Merrill, C.R., *Gel-staining techniques*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 477-88.
111. Sinicropi, D., D.L. Baker, W.S. Prince, K. Shiffer, and S. Shak, *Colorimetric Determination of DNase I Activity with a DNA-Methyl Green Substrate*. Analytical Biochemistry, 1994. **222**(2): p. 351-358.
112. Kunitz, M., *Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity*. J Gen Physiol, 1950. **33**(4): p. 349-62.
113. Worthington, K.W.V., *Deoxyribonuclease I Assay*, in *Worthington Enzyme Manual*. 2011.
114. Szadvari, I., O. Krizanova, and P. Babula, *Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment*. Physiol Res, 2016. **65**(Supplementum 4): p. S441-s453.
115. Clarke, J.D. and N.J. Cherrington, *Genetics or environment in drug transport: the case of organic anion transporting polypeptides and adverse drug reactions*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(3): p. 349-60.
116. Borges-Walmsley, M.I., K.S. McKeegan, and A.R. Walmsley, *Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs*. Biochemical Journal, 2003. **376**(Pt 2): p. 313-338.
117. Kanai, N., R. Lu, Y. Bao, A.W. Wolkoff, M. Vore, and V.L. Schuster, *Estradiol 17 beta-D-glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 2): p. F326-31.
118. Izumi, S., Y. Nozaki, T. Komori, K. Maeda, O. Takenaka, K. Kusano, T. Yoshimura, H. Kusuhara, and Y. Sugiyama, *Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17beta-glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein*. Drug Metab Dispos, 2013. **41**(10): p. 1859-66.
119. 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.
120. Karlgren, M., A. Vildhede, U. Norinder, J.R. Wisniewski, E. Kimoto, Y. Lai, U. Haglund, and P. Artursson, *Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions*. J Med Chem, 2012. **55**(10): p. 4740-63.
121. Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato, *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
122. Jouan, E., M. Le Vee, C. Denizot, Y. Parmentier, and O. Fardel, *Drug Transporter Expression and Activity in Human Hepatoma HuH-7 Cells*. Pharmaceutics, 2016. **9**(1).
123. Zhou, S.F., L.L. Wang, Y.M. Di, C.C. Xue, W. Duan, C.G. Li, and Y. Li, *Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development*. Curr Med Chem, 2008. **15**(20): p. 1981-2039.
124. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
125. McCauley, J., A. Zivanovic, and D. Skropeta, *Bioassays for anticancer activities*. Methods Mol Biol, 2013. **1055**: p. 191-205.
126. 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.
127. Heuser, M., M. Kopun, W. Rittgen, and C. Granzow, *Cytotoxicity determination without photochemical artifacts*. Cancer Lett, 2005. **223**(1): p. 57-66.
128. Baud, V. and M. Karin, *Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(1): p. 33-40.
129. Vesely, P.W., P.B. Staber, G. Hoefler, and L. Kenner, *Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins*. Mutat Res, 2009. **682**(1): p. 7-12.
130. Lopez-Bergami, P., E. Lau, and Z.e. Ronai, *Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer*. Nature reviews. Cancer, 2010. **10**(1): p. 65-76.
131. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
132. Ivanyuk, A., F. Livio, J. Biollaz, and T. Buclin, *Renal Drug Transporters and Drug Interactions*. Clin Pharmacokinet, 2017.
133. Pant, K., D. Groger, R. Bergmann, J. Pietzsch, J. Steinbach, B. Graham, L. Spiccia, F. Berthon, B. Czarny, L. Devel, V. Dive, H. Stephan, and R. Haag, *Synthesis and biodistribution studies of (3)H-*

- and (64)Cu-labeled dendritic polyglycerol and dendritic polyglycerol sulfate. *Bioconjug Chem*, 2015. **26**(5): p. 906-18.
134. Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of Acute Kidney Injury*. *Comprehensive Physiology*, 2012. **2**(2): p. 1303-1353.
 135. Kovacsics, D., I. Patik, and C. Ozvegy-Laczka, *The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017. **13**(4): p. 409-424.
 136. Yin, J. and J. Wang, *Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions*. *Acta Pharm Sin B*, 2016. **6**(5): p. 363-373.
 137. Duncan, R., Y.-N. Sat-Klopsch, A.M. Burger, M.C. Bibby, H.H. Fiebig, and E.A. Sausville, *Validation of tumour models for use in anticancer nanomedicine evaluation: the EPR effect and cathepsin B-mediated drug release rate*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2013. **72**(2): p. 417-427.
 138. Sriraman, S.K., B. Aryasomayajula, and V.P. Torchilin, *Barriers to drug delivery in solid tumors*. *Tissue Barriers*, 2014. **2**: p. e29528.
 139. Mely-Goubert, B., S. Matzku, and D. Bellgrau, *DNase I inhibitions in tumors of different metastasizing capacities: a possible index of invasiveness*. *Cancer Biochem Biophys*, 1983. **7**(1): p. 39-44.
 140. Wagener, J.S. and O. Kupfer, *Dornase alfa (Pulmozyme)*. *Curr Opin Pulm Med*, 2012. **18**(6): p. 609-14.
 141. Tamkovich, S.N., A.V. Cherepanova, E.V. Kolesnikova, E.Y. Rykova, D.V. Pyshnyi, V.V. Vlassov, and P.P. Laktionov, *Circulating DNA and DNase activity in human blood*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1075**: p. 191-6.
 142. Love, J.D. and R.R. Hewitt, *The relationship between human serum and human pancreatic DNase I*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(24): p. 12588-94.
 143. Keminer, O. and R. Peters, *Permeability of single nuclear pores*. *Biophys J*, 1999. **77**(1): p. 217-28.
 144. Leon, S.A., B. Shapiro, D.M. Sklaroff, and M.J. Yaros, *Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy*. *Cancer Research*, 1977. **37**(3): p. 646-650.
 145. Vercauteren, D., R.E. Vandenbroucke, A.T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S.C. De Smedt, N.N. Sanders, and K. Braeckmans, *The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls*. *Molecular Therapy*, 2010. **18**(3): p. 561-569.
 146. Hu, L., K. Jiang, C. Ding, and S. Meng, *Targeting Autophagy for Oncolytic Immunotherapy*. *Biomedicines*, 2017. **5**(1).
 147. Hijjiya, N. and I.M. van der Sluis, *Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia & Lymphoma*, 2016. **57**(4): p. 748-757.
 148. Brueck, M., D. Koerholz, W. Nuernberger, H. Juergens, U. Goebel, and V. Wahn, *Elimination of l-asparaginase in children treated for acute lymphoblastic leukemia*. *Dev Pharmacol Ther*, 1989. **12**(4): p. 200-4.
 149. Pinheiro, J.P. and J. Boos, *The best way to use asparaginase in childhood acute lymphatic leukaemia-still to be defined?* *Br J Haematol*, 2004. **125**(2): p. 117-27.
 150. Ohashi, T., *Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases*. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2012. **10 Suppl 1**: p. 26-34.

Lebenslauf I

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

Lebenslauf II

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

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Iris Najjar, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Polysulfatierte Dendron als Transportvehikel für Enzyme in der Tumorthherapie“ 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.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich PD Dr. Pia Welker sehr für ihre langjährige Betreuung danken. Die zahlreichen Diskussionen über den Inhalt dieser Arbeit und ihre wertvollen Ratschläge halfen mir bis zum Ende diese Arbeit sorgfältig fertig zu stellen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Serowka und Frau Dipl.-Biol. Dorothea Mangoldt für ihre Geduld und ihre Bereitschaft mich in die unterschiedlichen Labortechniken einzuführen bedanken. Ich möchte mich auch für die stetige Unterstützung, die sie mir bei den Versuchsdurchführungen entgegen brachten und für die außergewöhnlich nette und familiäre Atmosphäre im Labor, bedanken.

Ein Dank geht ebenfalls an Frau Cassandra Steinkraus, die bei der Durchführung der ASNase Versuche beitrug.

Letztendlich möchte ich meiner ganzen Familie für die wertvolle Unterstützung, die sie mir im Laufe meines Medizinstudiums und meiner Promotionsarbeit entgegen brachten, danken. Ein besonderer Dank geht an meine Mutter, Frau Dr. Angela Sametz, die diese Arbeit korrigierte.