

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Krebserkrankungen, allgemein**

Krebserkrankungen stellen heute, trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Ursachenforschung, der Tumordiagnostik, der Prävention und Therapie, immer noch die zweithäufigste Todesursache, nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems in Deutschland dar (zur Hausen, 1990). Bedingt durch die großen Differenzen zwischen den über hundert bekannten Tumorarten, ist es nicht möglich, Tumoren nach einem einheitlichen Schema zu behandeln. Die Tumorthherapie ist somit eine große Herausforderung für die onkologische Wissenschaft und Medizin. Mit Hilfe neuer Behandlungsstrategien wird versucht, nur die entarteten, anarchisch und autonom wachsenden Zellen des Tumors zu schädigen, um den Gesamtorganismus zu schonen und um eine bessere Dosis-Wirkungs-Effizienz zu erzielen.

Im ersten Abschnitt der Literaturübersicht wird der momentane Wissensstand in der Onkologie kurz beschrieben. Im zweiten Teil wird auf die aktuelle Situation bei der Nutzung von Arzneistoffträgern (drug carrier systems) eingegangen, wobei hier speziell die Ergebnisse, die mit partikulären Systemen erzielt wurden, genauer betrachtet werden sollen.

#### **2.1.1 Geschwulstdefinition**

Als Geschwulst bezeichnet man eine in der Regel umschriebene, strukturell und funktionell abnormale Wucherung körpereigener Zellen, die autonom verläuft und den Gesamtorganismus schädigt. Synonyme Bezeichnungen sind Blastom, Neoblastom, Gewächs, Neoplasie, Neoplasma, Neubildung und Tumor (Weiss u. Korbe, 1990).

In der Encyclopedia of Cancer von Joseph R. Bertino (1997) wird Krebs als eine "Mehrschritt-Genetik-Krankheit" bezeichnet, bei der es zu speziellen Veränderungen in der Funktion eines oder mehrere Gene kommt. Diese Genomänderung führt zu einer Unterbrechung der Zellwachstums- und Differenzierungskontrolle, mit dem Ergebnis einer unkontrollierten Zellproliferation und der Transformation in einen neoplastischen Zustand.

### **2.1.2 Genetische Grundlagen der Tumorentstehung**

Die Vorstellung, daß Tumorerkrankungen eine genetische Basis besitzen, vor allem bedingt durch epidemiologische, zytogenetische sowie Familienuntersuchungen lassen sich fast ein ganzes Jahrhundert zurückverfolgen (Wilkowski, 1990). Erstmals wurde 1914 durch den Würzburger Zoologen Theodor Boveri die Ansicht vertreten, daß Geschwülste durch somatische Mutationen des Zellgenoms entstehen (Stünzi u. Weiss, 1990). Seine Hypothese gründete sich auf die Beschreibung mitotischer Abnormitäten in Tumoren, die sowohl als Primär- als auch als Sekundärergebnis bei der Tumorentstehung aufgefaßt werden können (Knudson, 1995). Der erfolgreiche Nachweis, daß es sich bei Krebs um eine genetische Krankheit handelt, gelang erst in diesem Jahrzehnt (Scherneck u. Kölbl, 1998). Zwei wesentliche Kriterien unterscheidet die Krebserkrankung von anderen genetischen Krankheiten:

1. Die Ursache der Krebsentstehung sind in der Regel somatische Mutationen und keine Keimbahnmutationen (Scherneck u. Kölbl, 1998).
2. Die Ausbildung eines Tumors geht von einer Zelle aus und ist die Folge einer Ansammlung mehrerer, unabhängiger Mutationen (Vogelstein u. Kinzler, 1993). Diese Akkumulation der Mutationen erfolgt schrittweise, wobei jede Mutation der Zelle einen selektiven Vorteil verschafft und diese letztlich expandieren kann (Bodner, 1994).

Sog. Krebsgene, die für die Tumorentstehung verantwortlich sind, können mit Hilfe neuer methodisch-technischer sowie konzeptioneller Verfahren lokalisiert und isoliert werden. Dazu gehören mindestens drei verschiedene Kategorien von Genen:

1. Onkogene,
  2. Tumorsuppressorgene und
  3. Reparatur-Mutator-Gene
- (Levine, 1995).

### **2.1.3 Ursachen der Krebsentstehung**

Die Auslöser für die Tumorentstehung sind ganz unterschiedlicher Natur, obwohl die molekularen Mechanismen, die zu einer Zellentartung führen, auf gleichen oder ähnlichen Prozessen beruhen (Weinberg, 1984). Alle Faktoren, die eine Krebserkrankung auslösen können, werden als Kanzerogene bezeichnet. Zu diesen gehören z.B. chemische Agenzien (Lösungsmittel), Strahlungen (radioaktive Strahlung) und Viren (Retroviren, Papillomviren).

Auf **exogene** Faktoren gehen 70% der Krebserkrankungen des Menschen zurück, wobei die chemischen Risikofaktoren wahrscheinlich die bedeutsamste Gruppe darstellen (Doll u. Peto, 1981). Etwa 50 Chemikalien und deren Gemische werden von der WHO als eindeutig kanzerogen für den Menschen eingestuft (IARC, 1987).

Neben den exogenen Faktoren kann die Mutation der Protoonkogene oder der Tumorsuppressorgene auch auf **endogene** Ereignisse zurückgehen. Besonders reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies können direkt freigesetzt, als Reaktion auf chronische Entzündungen oder indirekt durch Lipidperoxidation und Bildung von Epoxiden und Ketonverbindungen, DNA-Schäden provozieren (Bartsch, 1996). Zu den endogenen Faktoren gehören auch die über die Keimbahn vermittelten Mutationen von Tumorsuppressorgenen, welche für erbliche Formen einzelner Krebsarten (z.B. Retinoblastom) verantwortlich sind. Die Zahl der Tumorerkrankungen, die eindeutig einen erblichen Hintergrund haben, ist jedoch sehr gering (Knudson, 1971).

#### **2.1.4 Tumoreigenschaften**

Die Zellen der malignen Tumoren unterscheiden sich durch spezifische Eigenschaften von gesunden Geweben, die von Tumorart zu Tumorart unterschiedlich stark ausgebildet sind. Typisch für alle Krebszellen sind nach Mutschler (1991):

1. anormal schnelles und unkoordiniertes Wachstum mit zum Teil fehlender Ausdifferenzierung der Zellen,
2. invasives und destruktives Wachstum, wobei umliegende Gewebegrenzen gleichermaßen mitzerstört werden,
3. maligne Zellen haben die Eigenschaft zu metastasieren, das heißt, sie sind aufgrund ihrer geringen interzellulären Haftung in der Lage, sich aus dem Verband zu lösen und zum Beispiel über die Blut- oder Lymphbahn in andere Organe zu streuen.

Weitere Merkmale sind :

- anormale Zellform (Nicolson, 1979),
- anormales Chromosomenbild (Sachs, 1986),
- aufgrund des hohen Nähr- und Sauerstoffumsatzes und durch das schnelle unkoordinierte Wachstum kommt es im Tumorgewebe zu einer starken Milchsäureansammlung und einem sauren pH-Wert (Weinberg, 1984),
- Ausbildung tumorspezifischer Antigene auf der Zelloberfläche, die dem Tumor charakteristische immunologische Eigenschaften vermitteln (Weinberg, 1984; Old, 1996),

- Fähigkeit der Tumorzellen durch Ausschüttung sogenannter Angiogenesefaktoren (z.B. VEGF) ihre Ernährung und damit auch das Wachstum der Zellen selbst zu steuern (Folkman u. Shing, 1992) und zu beschleunigen,
- die Aktinfasern des Zytoskeletts sind in malignen Zellen stark deformiert.

#### **2.1.4.1 Fähigkeit zur Angiogenese**

Von den hier aufgeführten Eigenschaften der Tumorzellen soll die Fähigkeit zur Angiogenese und das daraus entstehende Gefäßsystem näher betrachtet werden, da dies eine Reihe von Ansatzpunkten für neue Therapiemöglichkeiten bietet. Der Begriff der Angiogenese wurde 1935 zur Beschreibung der sich neu bildenden Gefäße in der Plazenta erstmals verwendet (Hertig, 1935). Die Proliferation von Gefäßendothelzellen ist für die Organentwicklung und Differenzierung während der Embryogenese von existentieller Bedeutung (Folkman u. Shing, 1992). Die Angiogenese ist ebenfalls beteiligt am expansiven Tumorwachstum, an rheumatoiden Arthritiden und an der Pathogenese verschiedener Retinopathien (Folkman u. Shing, 1992; Garner, 1994). Bei den proliferativen Retinopathien kommt es zu Blutungen, Koagulationen und einer erhöhten Permeabilität der Gefäße mit der Folge einer Retinaablösung (Garner, 1994). In der tumorassoziierten Neovaskulatur dagegen zeigt sich eine systemische Zirkulation, die den Tumorzellen ein schnelles Wachstum und die Fähigkeit zur Metastasierung ermöglicht (Folkman u. Shing, 1992). Die Ursache für die Bildung neuer Blutgefäße im Zusammenhang mit dem voranschreitenden Tumorwachstum wurde über 20 Jahre kontrovers diskutiert. Zum einen wurde vermutet, daß die proliferierenden Tumorzellen das Wachstum der neuen Blutkapillaren induzieren. Andere Wissenschaftler glaubten, daß die Neovaskularisation nur auf eine entzündliche Reaktion zurückzuführen ist. Und eine dritte Gruppe postulierte, daß diese Blutgefäße mit Tumorzellen ausgekleidet sind (Folkman u. Klagsburn, 1987). Experimente in den folgenden Jahren führten zu der Hypothese: "Solide Tumoren sind angiogeneseabhängig" (Folkman, 1971). Histologische Untersuchungen bestärkten die Idee, daß das Tumorwachstum eng mit dem Kapillarwachstum verbunden ist. Eine Reihe von potentiellen Regulatoren wurden gefunden:

- acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF),
- basic Fibroblast Growth Factor (bFGF),
- Transforming Growth Factor alpha (TGF $\alpha$ ),
- Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ),
- Hepatocyte Growth Factor (HGF),
- Tumornecrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ),

- Prostaglandin E (PGE<sub>2</sub>),
- Angiogenin,
- Interleukin-8 (IL-8),
- und weitere (Folkman u. Shing, 1992).

Alle diese Moleküle sind in der Lage die Angiogenese zu fördern, aber bis jetzt war es schwierig, eine Beziehung zwischen ihrer Aktivität und der Regulation des Gefäßwachstums im Tumor zu finden (Ferrara, 1996). Erst mit dem von Senger et al. (1983) beschriebenen Vascular Permeability Factor (VPF) konnte ein Faktor gefunden werden, der eindeutig mit der Angiogenese in Zusammenhang zu stehen schien (Senger et al., 1983). 1989 gelang es sowohl Ferrara und Henzel (1989) als auch Ploüet et al. (1989) unabhängig voneinander ein endothelzellspezifisches Mitogen zu reinigen und zu sequenzieren. Sie bezeichneten es als **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**. Spätere Untersuchungen konnten zeigen, das VPF und VEGF dieselben Moleküle verkörpern.

In weiteren Untersuchungen wurde bestätigt, daß VEGF eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von tumorassoziierten Gefäßen und bei intraokulären Erkrankungen besitzt (Kim, K. J. et al., 1993; Aiello, L. P. et al., 1994).

VEGF wurde in einer großen Anzahl von humanen und animalen Tumoren nachgewiesen (Hanaham u. Folkmann, 1996). Es konnte sowohl in *in vivo*- als auch in *in vitro*-Experimenten die Induktion der Angiogenese gezeigt werden (Leung et al., 1989; Plate et al., 1992). Durch die Ausschüttung von VEGF und dem damit verbundenen Gefäßwachstum kommt es zu tumorcharakteristischen Eigenschaften:

- schnelles Wachstum der Zellen durch massive Versorgung mit Nährstoffen (Kim et al., 1993),
- hohe Anzahl und Dichte von Mikrogefäßen (Toi et al., 1994),
- typische Tumorgefäßarchitektur (Pötgens et al., 1995),
- Entwicklung von Tumormetastasen (Takahatshi et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, daß es im Zusammenhang mit hypoxischen Situationen und Glukosedefiziten (*in vitro*) sowie einer hohen Nekroserate (*in vivo*) zu einer massiven VEGF-Ausschüttung kam (Shweiki et al., 1992; Plate et al., 1993). Erst 1995 wurde die Bedeutung des basis Fibroblast Growth Factor (bFGF) und des Endothelial Growth Factor (EGF) neben VEGF in der Tumorangiogenese näher untersucht (Zagzag, 1995). An Glioblastomzellkulturen kam es nach der Behandlung mit bFGF und EGF zu einer vermehrten VEGF-Synthese und -Freisetzung (Goldmann et al., 1993; Tsai et al., 1995).

Für bFGF wurde weiterhin ein synergistischer Effekt mit VEGF bei der Induktion der Angiogenese *in vitro* gezeigt (Pepper et al., 1992) und *in vivo* (Asahara et al., 1995).

Die Hauptursachen für die Expression von VEGF ist die Sauerstoffspannung im Tumorgewebe. In hypoxischen Gebieten kommt es zu einer massiven VEGF-Expression, diese Gebiete befinden sich besonders im Bereich der Tumornekroseränder (Weidner et al., 1992; Smith-McCune et al., 1994).

Für VEGF sind zwei Rezeptoren identifiziert worden (Shibuya et al., 1990; de Vries et al., 1992; Millauer et al., 1993). Zu diesen VEGF-Rezeptortyrosinkinasen gehören der Flt-1- (fetal liver tyrosinkinase-1) und der KDR- (kinase domain region) Rezeptor. Ihr Zusammenwirken mit VEGF ist für eine normale Entwicklung der embryonalen Gefäße notwendig. Die Rezeptorexpression ist ausschließlich auf endotheliale Zellen begrenzt (Risau, 1996; Strawn et al., 1996). Wie bei VEGF kommt es in hypoxischen Zuständen zu einem Anstieg der Rezeptorexpression. Versuche an Ratten konnten zeigen, daß ein künstlich erzeugter Sauerstoffmangel zu einer Aktivierung von KDR und Flt-1 in der Lunge führt (Tuder et al., 1995). Plate et al. (1992) fanden bei ihren Untersuchungen an gesunden Gehirnen keine Flt-1-Expression, aber in der Gegenwart eines Glioblastoms konnte der Rezeptor an den Gefäßendothelien des Tumors detektiert werden. Als Ursache für die Tumorangiogenese wird ein parakriner Mechanismus vermutet, mit VEGF als potentieller Angiogenesefaktor (Plate et al., 1992).

Brown und Giaccia (1998) faßten die Besonderheiten des tumorassoziierten Gefäßsystems zusammen. Die Tumorgefäße bestehen aus zwei Typen, einmal aus den bereits vorhandenen Gefäßen im gesunden nichtentarteten Gewebe, in die der Tumor durch sein infiltratives Wachstum eingedrungen ist, und, bedingt durch die VEGF-Ausschüttung der Tumorzellen, aus neugebildeten Gefäßen. Beide Gefäßarten entwickeln im Bereich des Tumors strukturelle und physiologische Abnormitäten, die zu typischen Charakteristika (Endrich et al., 1979) der Tumorgefäße werden:

- irregulärer Blutfluß,
- arteriovenöse Shunts,
- der Gefäßverlauf ist stark gewunden und geschlängelt,
- viele blindendende Gefäßausläufer,
- die neugebildeten Gefäße zeigen eine nur mangelhaft ausgestattete Muskulatur und häufig eine fehlende Innervation,

- die Gefäße sind nicht durchgängig mit einer Basalmembran ausgestattet,
- das Endothel kleidet nur unvollständig die Gefäßwände aus, es kommt zu einer starken Fenestration.

Die Folge dieser speziellen Anordnung sind irregulärer Blutfluß, hypoxische Regionen und eine hohe Permeabilität (Shah-Yukich u. Nelson, 1988; Dewhirst et al., 1989).

## **2.2 Krebserkrankungen, speziell**

Der steigende Anteil der Krebsfälle an den Todesursachen des Menschen in den Industrienationen kann zum einen mit der höheren Lebenserwartung des Menschen erklärt werden. Proportional zum Alter nimmt die Wahrscheinlichkeit, daß es zu Mutationen oder zu fehlenden Reparaturen des mutierten Genabschnittes kommt, zu. Viele Tumoren besitzen eine lange Latenzzeit, d. h., mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an Krebs zu erkranken (Cairns, 1975).

Die wichtigsten Formen der Krebsbekämpfung sind trotz des großen Wissenszuwachses auf der molekularen Ebene (Tumorentstehung) immer noch die klassischen Behandlungsmethoden:

- **operative Tumorentfernung,**
- **Bestrahlung** (lokal, systemisch, von außen, von innen ),
- **Chemotherapie** (Zytostatikaeinsatz),
- **Hormontherapie** (bei hormonabhängigen Tumoren).

Die besten Ergebnisse werden meist mit einer Kombination aus mehreren Therapiemöglichkeiten erzielt.

Die momentane Situation der Erkrankungshäufigkeiten und die derzeit angewendeten Therapiekonzepte sowie sog. innovative Ansätze sollen anhand der in der Arbeit verwendeten Tumoren näher erläutert werden.

### **2.2.1 Hirntumore**

Maligne Tumoren des Zentralen Nervensystems verursachen 2% aller Todesfälle durch maligne Tumoren bei Erwachsenen und ca. 20% der tumorbedingten Sterbefälle im Kinder- und Jugendalter. Die jährliche Inzidenzrate (Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr) schwankt zwischen zwei in Japan und zehn in Indien. Glioblastome treten häufig im Alter von 55-73 Jahren auf, wobei in letzter Zeit zunehmend jüngere Patienten erkranken

(Bogdahn u. Jachimczak, 1996). Die Überlebensrate der an Gehirntumor erkrankten Patienten ist von der Art der betroffenen Zellen und vom Grad der Entartung abhängig. So unterteilt man astrozytäre Gliome, die mit 40% die größte Gruppe der ZNS-Neoplasien (Kleihues et al., 1995) einnimmt, in vier Grade (World Health Organisation (WHO)-Klassifikation, 1996) (Bogdahn u. Jachimczak, 1996).

Tab.1 : Klassifikation primärer Hirntumoren - "Gliome" nach der WHO-Klassifikation

Grad	Bezeichnung	Patientenalter (Jahre)	Lokalisation	Histopathologie	Überlebenszeit (Jahre)
<b>I</b>	pilozytisches Astrozytom	8-18	Hirnstamm, III. Ventrikel, Thalamus	geringe Zelldichte bipolare, pilozytische Zellen Rosenthal-Fasern	n.a. selten Progression zu anaplastischen Formen
<b>II</b>	niedrig malignes Astrozytom	30-40	meist in den Hemisphären	mäßige Zelldichte, fibrilläre oder gemistozytische Astrozyten, einige Mitosen nukleäre Atypie	3-5
<b>III</b>	anaplastisches Astrozytom	40-60	überall	große Zelldichte, massive Zell- u. Kernpolymorphismen, zahlreiche Mitosen	2
<b>IV</b>	Glioblastoma multiforme	45-65	überall	hohe Zelldichte, atypische Mitosen, ausgedehnte Nekrose, erhebliche Gefäßneubildung	1 nur 10% überleben 2 Jahre

n.a.:nicht angegeben

Bei anderen Tumoren des ZNS liegen die 5-Jahres-Überlebensraten wesentlich höher:

- Medulloblastom : 41%,
- Oligodendrogliom : 47%,
- Ependymom : 59% (Giles et al., 1993).

Neben den eigentlichen Tumoren des Zentralnervensystems stellen metastasierende Tumorerkrankungen ein besonderes Problem dar. Bei etwa 50%, der an Krebs leidenden Patienten kommt es im Verlaufe des Krankheitsgeschehens auch zur Metastasenbildung im ZNS (Culver et al., 1997).

### 2.2.1.1 Therapieformen der Glioblastome

Primärbestandteil der Gehirntumorthherapie ist die radikale, aber schonende neurochirurgische Resektion des Tumors mit anschließender histologischer Beurteilung (Fransen u. De Tribolet, 1993). Die intraoperative Kontrolle über die Vollständigkeit der Resektion kann mit Hilfe sonographischer Methoden (Becker et al., 1994) und anderer bildgebender Verfahren (MRT, CT) überprüft werden. Standardmäßig sollte in den ersten 24 Stunden post operationem eine Radiotherapie erfolgen (Bleehem u. Ford, 1993). Die in letzter Zeit häufig eingesetzte adjuvante Chemotherapie hat eine weitere Verbesserung der Behandlungsergebnisse gebracht. Obwohl eine Verlängerung der Überlebenszeit beobachtet werden kann, wird nur ein sehr geringer Teil der Patienten mit Hilfe der Kombination aller drei Therapieformen geheilt (Culver et al., 1997).

Besondere Probleme bei der Bekämpfung sind:

1. **sehr hohe Strahlenresistenz** (wahrscheinlich P53-Mutation, den Zellen fehlt die Fähigkeit nach der Schädigung apoptotisch zu sterben),
2. **Probleme bei chemotherapeutischer Intervention:**
  - Überexpression der Multi-Drug-Resistenzgene (Black, 1991),
  - hoher intrazellulärer Glutathionspiegel (Ali-Osman et al., 1991),
3. **stärkste Angiogenese** aller Malignome, die neugebildete Gefäßarchitektur führt zu vielen hypoxischen Arealen im Tumor. Gray et al. (1953) konnten nachweisen, daß Sauerstoffmangel zu einer erhöhten Strahlenresistenz führt,
4. **Invasivität der malignen Gliome**, die Metastasierungsrate liegt bei nur 1%, aber maligne Gehirntumoren sind hoch invasiv und können das benachbarte Gehirnparenchym bereits sehr früh infiltrieren (Pilkington, 1994),
5. Besonderheit der **Blut-Hirn-** und **Blut-Tumor-Schranke**, (obwohl Dickmann et al. (1989) von einem "blood brain barrier breakdown" im Zusammenhang mit dem Auftreten von Gehirntumoren sprechen. Es lassen sich z.B. mit Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln Glioblastome III. und IV. Grades darstellen. Ursache dafür ist eine stark permeable Tumorgefäßarchitektur).

Neue sog. innovative Therapieansätze, die aufgrund der Besonderheiten des Gehirntumors verfolgt werden, sind:

1. Tumorzellvaccinekonzept (ex-vivo-Transfektion von Tumorzellen, Expansion, Bestrahlung und Re-inokulation) (Sobol et al., 1995; Sampson et al., 1995),

2. Modifikation des Tumorzellkonzepts durch Ko-inokulation von Zytokin-transfizierten, autologen Fibroblasten mit letal bestrahlten Tumorzellen (Glick et al., 1995),
3. Wiederherstellung des Wildtyp-Tumorsuppressor-Gens bzw. Inaktivierung der Onkogene (Sobol u. Scanlon, 1995)
4. Suizidgentherapie, ein weitverbreiteter Ansatz, der das Prinzip nutzt, daß Gene mittels Viren oder Liposomen (Zhu, 1997) in die Tumorzellen geschleust werden, die durch Pro-Drug-aktivierende Enzyme kodiert sind,
5. Induktion der Apoptose (Roth et al., 1995),
6. Hemmung der Tumorneovaskularisierung,
  - Inhibition der Expression von z. B. bFGF (Stan et al., 1995),
  - Modulation des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems (Millauer et al., 1994; Ke et al., 1995).

### **2.2.2 Mammakarzinome**

Brustkrebs stellt bei der Frau die bei weitem häufigste Krebstodesursache (BRD/USA: 22% an der Gesamt mortalität) dar. Doch bei rechtzeitiger Tumorerkennung und adäquater Therapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 64-69% (Becker u. Wahrendorf, 1991). Das Brustkrebsrisiko wird u. a. von der Reproduktionsvorgeschichte beeinflusst. Zu den gesicherten Risikofaktoren gehören eine frühe Menarche und eine späte Menopause (Harris et al., 1992). Kinderlosigkeit und erstmalige Schwangerschaft nach dem dreißigsten Lebensjahr erhöhen das Risiko um das Zweifache.

#### **2.2.2.1 Therapieformen der Mammakarzinome**

Die Therapie des Mammakarzinoms setzt sich aus der operativen, der radiotherapeutischen und der systemischen (Chemo- bzw. Hormon-) Therapie zusammen. Je nach Malignität und Stadium der Erkrankung sowie nach dem Zustand des Patienten wird ein unterschiedliches Behandlungsschema eingesetzt, das von der Einzel- bis zur Kombinationstherapie reicht. Dabei ist die chirurgische Entfernung nach Diagnosesicherung die Therapie der ersten Wahl. Die globale Heilungsrate konnte in den letzten Jahren nur minimal verbessert werden, wobei aber die Lebensqualität der Patienten deutlich gestiegen ist (Bastert u. Costa, 1996).

Neue Therapieansätze:

1. Hochdosischemotherapie mit gekoppelter Knochenmarktransplantation (Antman, 1996),
2. lokale Hyperthermie (42,5°C und mehr) mit Ultraschall und Mikrowelle, erzeugt eine tumorizide und strahlensensibilisierende Wirkung (Dewey et al., 1977; Hahn, 1982),

3. Zytokineinsatz stimuliert die Produktion von Granulozyten und Monozyten im Knochenmark, wird mit gutem Erfolg nach Polychemotherapie eingesetzt (Bitran, 1990; Bonadonna u. Gianni, 1990),
4. Immunotherapie, Immunotoxine gekoppelt an tumorzellspezifische Antikörper (Old, 1996).

Zusammenfassend muß aber gesagt werden, daß die neuen Therapiestrategien bislang enttäuschend verlaufend sind, obwohl die *in vitro* gewonnenen Daten und die tierexperimentellen Resultate sehr vielversprechend waren. Es konnte bis heute keine entscheidende Verbesserung in der Patientenbehandlung gegenüber den klassischen Behandlungsmethoden erzielt werden (Bastert u. Costa, 1996).

### 2.2.3 Maligne Melanome

Melanome besitzen die höchste jährliche Inzidenzsteigerungsrate aller Malignome. Nach Berechnungen soll im Jahr 2000 jedes 90. Individuum der Bevölkerung ein malignes Melanom entwickeln.

Melanominzidenz (Neuerkrankungen / 100000 Einwohner / Jahr) in verschiedenen Regionen:

- Queensland (Australien) ca. 30-40,
- Südstaaten (USA) ca. 20-30,
- Nordstaaten (USA) ca. 5-10,
- BRD ca. 10,
- Italien ca. 5.

Die Hauptursache für die Melanomentstehung ist ultraviolette Strahlung. Personen mit "heller Komplexion" (helle Haut- und Augenfarbe, rotblonde Haare, Sommersprossen) gehören zur Risikogruppe, sowie Personen mit hoher Nävusanzahl (>20) und Träger potentieller Melanomvorläufer (Kaufmann et al.,1996).

Die 8-Jahr-Überlebensraten liegen je nach klinischen Stadium, bei 100%, wenn nur ein intraepidermaler Tumor ohne Metastasenbildung vorliegt und sinkt unter 5% im letzten klinischen Stadium (III) wenn es zur Bildung von Fernmetastasen kommt.

### 2.2.3.1 Therapieformen der malignen Melanome

Die Therapie der Wahl besteht in einer frühzeitigen operativen Entfernung des Melanoms. Weitere häufig eingesetzte konventionelle Therapiestrategien zur Melanombekämpfung sind:

- Bestrahlung (vorzugsweise bei Gehirnmetastasen),
- Chemotherapie:
  - Monotherapie,
  - regionale Chemotherapie,
  - Kombinationschemotherapie,
  - Chemoimmunotherapie,
- Hormontherapie (Einsatz des Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen, in Kombination mit der Chemotherapie, besonders bei weiblichen Patienten).

Neue Therapieversuche:

1. Hochdosischemotherapie mit kombinierter Knochenmarkstransplantation,
2. Unterbrechung der Melaninbiosynthese mittels Levodopa,
3. Einsatz monoklonaler Antikörper gegen melanomassoziierte Antigene (Ganglioside GD2, GD3),
4. Versuch der Blockade der Adhäsionsrezeptormolekülausschüttung (Integrinrezeptormolekül VLA2) (Kaufmann et al., 1996).

Prävention:

Aufgrund der einfachen blickdiagnostischen Zugänglichkeit, der meist langsamen Wachstumsdynamik der meisten Melanomtypen, der sehr guten Therapierbarkeit initialer Melanome und der fast aussichtslosen Prognose fortgeschrittener Melanome, bietet diese Tumorart sehr gute Voraussetzungen für Präventionsprogramme in besonders gefährdeten Regionen. So wird seit 1963 in Australien, dem Land mit der höchsten Inzidenzrate für Melanome, ein spezielles Vorsorgeprogramm, das "Queensland Melanoma Project" mit großem Erfolg praktiziert (Kaufmann et al., 1996).

### 2.3 Neue Behandlungsstrategien auf der Grundlage der Drug-Targeting-Prinzipien

Da die klassischen Behandlungsformen nur bei wenigen Tumorerkrankungen zu den gewünschten Ergebnissen führen, wird vermehrt nach neuen Behandlungsmöglichkeiten geforscht, die eine bessere Therapierbarkeit von Tumoren und deren Metastasen erlauben.

Eine Strategie besteht in dem Versuch, durch Modifikation der Körperverteilung eines Arzneistoffs, die Anreicherung im Zielgewebe (z.B. Tumor) zu erhöhen und gleichzeitig eine Verteilung im übrigen Gewebe zu reduzieren (Drug Targeting). Paul Ehrlich (1906) postulierte den Begriff der "Magic Bullet" für Arzneistoffträger mit deren Hilfe Arzneistoffe erkrankte Gewebe oder auch Krankheitserreger gezielt erreichen können, unter minimalen Nebenwirkungen für den Gesamtorganismus (Drug Targeting). Da diese Anforderungen nur von sehr wenigen Substanzen erfüllt werden, muß man sich Mechanismen bedienen, die diese Ansprüche erfüllen. So forderte Gregoriadis (1977) wirksame, gewebeunspezifische Arzneistoffe an gewebespezifische, aber unwirksame Trägersysteme zu koppeln. Poste et al. (1984) und Davis und Illum (1986) unterteilen den Begriff des Drug Targeting in:

- **passives Targeting:** Die Verteilung erfolgt aufgrund unveränderter Arzneistoff- oder Arzneistoffträgereigenschaften. Grundlage sind die vorhandenen physikochemischen Eigenschaften.
- **aktives Targeting:** Es besteht aus allen Mechanismen, die zu einer gezielten Steuerung der Arzneistoffe oder Arzneistoffträger führen, d. h., daß das natürliche Verteilungsmuster zugunsten bestimmter Organe, Gewebe oder Zellen verändert wird.

Das aktive Targeting wird nach Widder et al. (1979) und Kreuter (1985) nach dem Zielort differenziert in:

- *Targeting I. Ordnung:* Anreicherung im Kapillarnetz des Zielgewebes (z.B. Lunge),
- *Targeting II. Ordnung:* Ansammlung in den Zellen des Zielgewebes (z.B. Pneumozyten),
- *Targeting III. Ordnung:* Akkumulation in bestimmten Organellen der Zielzellen (z.B. Zellkern).

Um den Arzneistoff oder das Therapiegene an den gewünschten Ort zu bringen, werden verschiedene Strategien verfolgt:

### 2.3.1 Lokoregionäre Therapie

Bei dieser Art der Therapie wird ein Arzneistoff so nah wie möglich an den gewünschten Ort herangebracht, mit dem Ziel, die regionale Konzentration des Wirkstoffs, bei gleichzeitiger Verringerung der systemischen Toxizität zu verbessern. Eine weite Anwendung findet z. B. die direkte Applikation von Zytostatika in das Gefäßsystem von Tumoren. Man erzielt ein Targeting I. Ordnung. In Anlehnung an De Dycker (1992) können folgende Formen unterschieden werden:

- **intravaskuläre Applikation:**
  - **arterielle Infusion:** entspricht einer systemischen Therapie mit primärem Durchfluß des zu behandelnden Organs,
  - **arterielle Infusion mit Filtration:** wie oben, mit nachfolgender Filtration des Blutes von überschüssigem Arzneistoff,
  - **isolierte Perfusion:** Das betroffene Organ wird vom übrigen Kreislauf isoliert und maschinell mit Blut und Zytostatika perfundiert (Müller u. Aigner, 1992).
  - **Chemoembolisation:** Abbaubare Mikropartikel werden kombiniert mit Zytostatika oder z.B. liposomal verkapselten Genkonstrukten (Berndt, 1998) in die Blutgefäße des Zielorgans injiziert. Es kommt zur Blutstromverlangsamung und zur temporären Stase des Blutes, dadurch erhöht sich die Verweildauer des Therapeutikums im Zielgewebe.
- **intrakavitäre Applikation:** Arzneistoffe werden z.B. intraperitoneal, intraperikardial oder intravesikulär verabreicht, so daß wenig Wirkstoff in den Körperkreislauf übertreten kann.

### 2.3.2 Kopplung an Antikörper

Tumorzellen bilden auf ihrer Oberfläche spezifische Antigene aus und besitzen damit immunologische Eigenschaften (Weinberg, 1984). Es ist technisch möglich, zu den Antigenen passende Antikörper herzustellen und diese an Arzneistoffe zu koppeln (Sezaki u. Hashida, 1984). Da die entwickelten Antikörper hochspezifisch sind, können sie nur an Tumorzellen binden. Der Nachteil ist, Tumorzellen stammen zwar von einer einzigen Zelle ab (Vogelstein u. Kinzler, 1993), sind aber polyklonal, dadurch kommt es nur zum Untergang der antigentragenden Tumorzellen und damit zu einer Selektion der Tumorzellen (Malter u. Süss, 1989).

### **2.3.3 Einsatz kolloidaler Partikel als Trägersysteme für Arzneistoffe**

Unter Kolloiden versteht man in feinsten Verteilung vorliegende Stoffe mit einem Teilchendurchmesser von 1nm bis 1µm (Berschneider, 1991). Durch den Einsatz kolloidaler Systeme als Arzneistoffträger kommt es zu einer Veränderung der ursprünglichen Körperverteilung des Wirkstoffes und es besteht die Möglichkeit, durch Kopplung der Substanzen an geeignete Trägersysteme, diese zielgerichtet vor Ort zu bringen (Drug Targeting). Zu diesen kolloidalen Systemen gehören:

1. Nanopartikel,
2. Mikropartikel,
3. Nano- und Mikroemulsionen,
4. Liposomen,
5. Niosomen,
6. Pharmakosomen,
7. Tensid-Konjugate.

Es sollen im Rahmen dieser Arbeit nur die Nanopartikel näher besprochen werden, Hinweise zu den mitaufgeführten kolloidalen Systemen sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen.

#### **2.3.3.1 Nanopartikel**

Nanopartikel sind feste, kolloidale Partikel von einer Größe zwischen 10-1000nm, in welchen Arzneistoffe, Enzyme oder anderes biologisches Material in gelöster, eingeschlossener und/oder eingekapselter Form enthalten sind und/oder in welchen diese Stoffe adsorptiv oder chemisch gebunden sind (Kreuter, 1981). Andere Autoren definieren Nano- und Mikropartikel gemeinsam, als feste Teilchen im Nanometer- bzw. Mikrometerbereich, die aus Aggregaten von synthetischen oder natürlichen Makromolekülen bestehen (Oppenheim, 1981; Kreuter, 1983; Müller u. Herborn, 1990). Diese meist mehr oder weniger kugelförmigen Polymermoleküle stellen keine glatte, kompakte Masse dar, sondern weisen eine poröse, schwammartige Struktur und eine entsprechend große Oberfläche auf (Beck, 1993).

Nanopartikel haben sich als vielversprechende Arzneistoffträger erwiesen. Besonders bedingt durch ihre geringe Partikelgröße (< 1µm), bietet dieses System eine Reihe von Vorteilen für den Einsatz in der Medizin, der Landwirtschaft, der Veterinärmedizin und der Industrie (Marty, 1977). Neben der Größe, welche besonders für die *in vivo*-Applikation viele Vorteile bietet (der Durchmesser der kleinsten Blutkapillaren im lebenden Organismus beträgt 4µm (Thews et al.,1989)), sind Beladungsrate, Freisetzungskinetik und Stabilität der kolloidalen Trägersysteme entscheidende Auswahlkriterien für das jeweilige Anwendungsgebiet.

### **2.3.3.1.1 Partikelarten und deren Herstellung**

Die hier aufgeführten Polymere stellen die am besten untersuchten und am häufigsten verwendeten Nanopartikelausgangsstoffe dar. Nanopartikel können je nach Ausgangsstoff (natürlich, synthetisch) auf verschiedene Art und Weise hergestellt werden, folgende prinzipielle Methoden werden angewendet:

#### **a) Herstellung aus natürlichen Makromolekülen**

Nach Kreuter (1983a) lassen sich natürliche Makromoleküle durch Desolvation, Denaturierung und/oder Quervernetzung zu Nanopartikeln verarbeiten.

- **Desolvatisierung:**

Durch pH-Wert-, Ladungsänderungen oder durch Zugabe von spezifischen Reagenzien lassen sich natürliche Polymere desolvatisieren. Dabei kommt es zum Aussalzungseffekt, d. h. Präzipitation der Makromoleküle oder Bildung von Koazervaten.

*(Gelatine, Albumin, Casein, Cellulose-Derivate; Marty, 1977)*

- **Denaturierung:**

Bei der Herstellung z. B. von Albuminmikropartikeln kommt es durch Erwärmung auf Temperaturen von 100 oder 150°C zur Denaturierung. Das Albumin ist dabei fein in einer W/O-Emulsion verteilt. Der große Nachteil der Methode ist, daß nur hitzestabile Arzneistoffe inkorporiert werden können.

*(Albumin; Zolle et al., 1970)*

- **Chemische Quervernetzung:**

Die chemische Quervernetzung von z.B. Stärkepartikeln mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd (zur Stabilisierung) stellen eine weitere Möglichkeit zur Nanopartikelherstellung dar.

*(Stärke; Kost et al., 1991)*

#### **b) Herstellung aus synthetische Ausgangsstoffen**

Die Präparation von Nanopartikeln mit Hilfe der Polymerisationsreaktion wird meist nur für synthetische Polymere verwendet.

- Fällungspolymerisation:

Ist das Polymer bei einer Polymerisation des reinen Monomers, nicht in seinem Monomer löslich, dann fällt es schon während der Polymerisation aus (Blockfällungsreaktion).

Findet die Polymerisation in einem indifferenten Lösungsmittel statt, in dem zwar das Monomer, nicht aber das Polymer löslich ist, so fällt es während der Reaktion aus (Lösungsfällungspolymerisation).

- Emulsionspolymerisation:

Die Polymerisation einer Emulsion mit sehr feinen Monomertröpfchen erfolgt nach Zusatz eines Initiators, der nach seiner Wasserlöslichkeit unterschieden werden kann.

*(Polyalkylcyanoacrylat; Couvreur et al., 1979)*

- Anionische Polymerisation:

Polymere, wie Polyisobutylcyanoyacrylat können nur durch die Anwesenheit von Substanzen mit freien Elektronenpaaren (z.B. schwache Basen) katalysiert werden. Die entstehende Partikelgröße ist von der Reaktionsgeschwindigkeit abhängig: je schneller die Reaktion (z.B. viel Base) desto größer werden die Partikel.

*(Polyisobutylcyanoyacrylat; Rollot et al., 1986)*

- Solvent Evaporation:

Bei der so bezeichneten Methode kommt es während der Polymerisation zur Verdampfung des eingesetzten Lösungsmittels. Das Monomer ist in dem Lösungsmittel gelöst.

*(Polyester; Le Ray et al., 1991)*

- Emulgatorfreie Polymerisation:

Diese Art der Reaktion kann mit zwei Methoden initiiert werden: mit  $\gamma$ -Bestrahlung (Kreuter u. Speiser, 1976) und mit Kaliumperoxidsulfat unter gleichzeitiger Erwärmung auf 65° oder 85°C (Berg, 1979). Die Initiation mit  $\gamma$ -Strahlen wurde entwickelt um Polymethylmethacrylat-Nanopartikel als Impfstoffadjuvanz in der Gegenwart von Virusantigenen herzustellen, ohne daß es zu einer Schädigung des Antigens kommt (Kreuter u. Zehnder, 1978). Die Polymerisation ist sowohl in Wasser als auch in Phosphatpuffer möglich (Bentele et al., 1983). Die verwendete Strahlendosis muß dabei 2,2krad/min betragen (Kreuter u. Speiser, 1976). *(Polymethylmethacrylat; Kreuter u. Speiser, 1976)*

### 2.3.3.1.2 Charakterisierung nanopartikulärer Systeme

Eine ausführliche *in vitro*- Charakterisierung potentieller kolloidaler Trägesysteme ist nötig, um entscheiden zu können, ob ein *in vivo*-Einsatz möglich und sinnvoll ist. Für Nanopartikel lassen sich folgende physikochemische Eigenschaften beschreiben (Tröster, 1990):

- Partikelgröße: (Partikelgrößenverteilung, Partikelmorphologie, Aggregationsverhalten),
- Oberflächenladung,
- Oberflächenhydrophobizität,
- Elektrophoretische Beweglichkeit,
- Porösität,
- Spezifische Oberfläche,
- Dichte,
- Kristallinität,
- Kontaktwinkel,
- Molekulargewicht,
- Hydratationsverhalten.

Für die Körperverteilung hat neben der Partikelgröße besonders die Oberfläche der Arzneistoffträgersysteme, die unter anderem für die Hydrophobizität (Crommelin u. Schreier, 1994), die Ladung und das Maß der Proteinadsorption verantwortlich ist, eine enorme Bedeutung.

Neben der **Größe** und **Ladung** der Partikel sollen im folgenden besonders das **Proteinadsorptionsverhalten**, die **Toxizität** und die **Degradation** der Trägersysteme besprochen werden, da diese Eigenschaften für die *in vivo*-Anwendung bedeutsam sind.

#### 2.3.3.1.2.1 Partikelgröße

Die Partikelgröße ist nicht nur für intravenös zu verabreichende Formulierungen ein entscheidender Faktor. So hat es sich z.B. bei der s.c. Injektion gezeigt: um so kleiner der Partikeldurchmesser, desto geringer sind die möglichen Gewebereaktionen. Die Größe der Nanopartikel hängt zum einen vom Ausgangsstoff und zum anderen von den verwendeten Herstellungsbedingungen ab. So konnten Storm et al. (1995) in einem Übersichtsartikel die Größen verschiedener Nanopartikel gegenüberstellen.

Tab. 2: Tabellarische Auflistung von Nanopartikeln unterschiedlicher Ausgangssubstanzen mit verschiedenen Durchmesser

Nanopartikel	mittlerer Teilchendurchmesser [nm]	Autor
• Polystyrol	60 800 1000	Blunk et al., 1993 O'Mullane et al., 1990 Harper et al., 1991
• Poly (methylmethacrylat)	130	Leu et al., 1984 Tröster et al., 1990
• Poly (butyl 2-methacrylat)	130	Douglas et al., 1986
• Poly ( $\beta$ -malic-acid-co- benzyl-malonat)	< 200	Stolnik et al., 1994
• Poly (lactid acid)	90 250	Müller u. Wallis, 1993
• Poly (lactid-acid-co-glycolic-acid)	140	Gref et al., 1994

Durch den Einsatz des anionischen Polymerisationsverfahrens (verschiedene pH-Werte {5-9} des Mediums) können z. B. Partikel mit unterschiedlichen Durchmessern hergestellt werden. Es kommt durch eine pH-Wert-Erhöhung zu einer Zunahme des mittleren Teilchendurchmessers, dabei ist der Zusammenhang zwischen pH-Wert und Durchmesser nicht linear:

- Poly(methylidene-malonate)-Nanopartikel-Durchmesser von 250-350nm (Lescure, 1991),
- Poly(diethyl-methylidene-malonate)-Nanopartikel-Durchmesser von 140-250 nm (De Keyser et al., 1991).

Der kleinste Kapillardurchmesser im lebenden Organismus beträgt 4 $\mu$ m (Thews et al., 1989), so daß größere Partikel hauptsächlich in der Lunge aus dem Blutstrom gefiltert und angereichert werden (Illum et al., 1982; Kreuter, 1985). Je größer die Partikel, desto größer ist die Gefahr einer lebensbedrohlichen Lungenembolie.

Hohe Lungenkonzentrationen (20-60%, der gesamtapplizierten Dosis) kleiner Partikel (<4 $\mu$ m) können nach Kreuter (1983) aber auch auf Partikelaggregationen zurückzuführen sein. Aus diesem Grund ist es wichtig, das Aggregationsverhalten der Partikel genau zu untersuchen. Alle Nanopartikelpräparationen haben m. o. w. die Tendenz, sich aus energetischen Gründen (Verkleinerung der Oberfläche) zusammenzulagern (auszuflocken, zu aggregieren) (Stricker, 1987; Storm et al., 1995). In ihren Untersuchungen über das Aggregationsverhalten von PMMA-Partikeln konnten Tröster (1990) und Borchard (1993) aber keinen Zusammenhang zwischen primär vorliegender Aggregatgröße und Lungenkonzentration finden. Gleichzeitig durchgeführte Größenmessungen nach Inkubation im Plasma ergaben für alle Präparationen eine Verringerung des Aggregatdurchmessers.

Die Autoren vermuteten eine - durch die Plasmaproteinadsorption bedingte - gleichsinnige Aufladung der Nanopartikel.

Partikel mit einem Durchmesser kleiner als  $4\mu\text{m}$  werden gewöhnlich durch die phagozytierenden Zellen des RES, besonders in der Leber (60-90%) und der Milz (3-10%) aufgenommen (Kreuter, 1983). Maaßen et al. (1993) unterteilen die Aufnahme der Partikel je nach Größe in Phagozytose (alle Größen) und Pinozytose ( $<150\text{nm}$ ). Während große Partikel nur von phagozytosefähigen Zellen (Makrophagentypen, neutrophile Granulozyten) aufgenommen werden können, sind zur Pinozytose alle Zellen befähigt (Maaßen et al., 1993). Diese durch die Partikelgröße mögliche, differenzierte Aufnahme ist für das Drug Targeting von Bedeutung. Die Partikelaufnahme ist eine Funktion der Partikelgröße, d. h. die Endozytoseintensität steigt mit dem Partikeldurchmesser. Dieses Phänomen konnte sowohl *in vitro* (Rudt, 1992; Lück, 1997) als auch *in vivo* beobachtet werden (Karino et al., 1987). Zu unterscheiden ist zwischen Anzahl und Masse, da mit einer Größenzunahme, gleichzeitig auch die Partikelmasse ansteigt und damit die Menge der aufgenommenen Partikel sinkt (Johnson et al., 1986).

#### **2.3.3.1.2.2 Oberflächenladung**

Die Partikelladung wird über die Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit ermittelt und üblicherweise als Zeta-Potential (mV) angegeben (Maaßen et al., 1993). Das Zeta-Potential ist ein Maß für die Stabilität von Systemen, die dispergierte Partikel enthalten, in dem es den Grad der Abstoßung zwischen benachbarten, ähnlich geladenen Partikeln angibt. Unterschreitet das Zeta-Potential eines partikulären Systems einen kritischen Wert so kommt es zu Ausflockungen und Aggregationen.

Auch die Ladung der Partikel spielt bei der Endozytose eine Rolle. Nach der DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) müßten negativ geladene Partikel langsamer als positiv geladene aufgenommen werden, da es zu elektrostatischen Abstoßungen mit der negativ geladenen Zellmembran kommt. Tatsächlich ist es aber so, daß *in vitro* der Phagozytoseindex ein Minimum bei einem Zeta-Potential um Null erreicht (Kissel u. Roser, 1991). In *in vivo*-Studien wurde schon früh (1966) ein Anstieg der Clearance von kolloidalen Partikeln im Blut mit zunehmender Ladung - unabhängig von der Art (negativ oder positiv) - gefunden (Wilkins u. Myers, 1966). Das Zeta-Potential ist *in vitro* abhängig von der Elektrolytkonzentration des umgebenden Milieus (Müller, 1996) und *in vivo* zusätzlich von den adsorbierenden Plasmaproteinen.

### 2.3.3.1.2.3 Toxizität und Degradation nanopartikulärer Systeme

Bei der Testung neuer Arzneizubereitungen und Substanzen, die am Menschen eingesetzt werden sollen, ist eine ausführliche Untersuchung auf toxische Nebenwirkungen durchzuführen. Dabei muß neben der akuten Toxizität und der Toxizität der Abbauprodukte, eine toxische Wirkung, die durch das Material und die Eigenschaften als partikuläres System bedingt sind, mit berücksichtigt werden. Dieses gilt ganz besonders, wenn die Partikel intravenös eingesetzt werden sollen. Die durch die Größe der Partikel bedingten Probleme, wie Verlegung der Lungenkapillaren sind unter Punkt 2.3.3.1.2.1 bereits besprochen worden. Im Rahmen histologischer Untersuchungen an Geweben (Goldring et al., 1983) und an *in vitro*-Zellkulturen (Papatheofanis u. Barmada, 1991; Müller et al., 1996) wurde die Art und Weise der Alterationen durch Nanopartikel determiniert. Besonders im Zusammenhang mit s.c. injizierten Partikeln konnten - abhängig von der Partikelgröße - entzündliche Reaktionen beobachtet werden. Neben entzündlichen Reaktionen konnten einige Autoren (Kanke et al., 1980; Gipps et al., 1988) vereinzelt über die Entstehung von Degenerationsreaktionen und Granulomen an Injektionsstellen berichten. Papatheofanis und Barmada (1991) untersuchten die Ausbildung einer Synovia-ähnlichen Membran beim Einsatz von PMMA als Knochenzement in der Orthopädie. Diese Membran bestand überwiegend aus Entzündungszellen und ist als Reaktion des Körpers auf die Polymerpartikel zu verstehen. Angaben über akute Toxizitäten nanopartikulärer Systeme sind bis heute nur in geringem Umfang vorhanden. Zu den am häufigsten untersuchten Systemen gehören die Cyanoacrylat-Nanopartikel. Kante et al. (1982) fanden für Poly(butylcyanoacrylat) einen LD50-Wert von 230mg/kg KG und für Poly(isobutylcyanoacrylat) einen Wert von 196ng/kg KG bei Mäusen. Da die meisten Nanopartikel selber nur gering toxisch sind, sondern erst ihre Abbauprodukte, unterteilte Kreuter (1983-d) nanopartikuläre Systeme nach ihrer Abbaugeschwindigkeit in:

1. schnelle : z.B. Gelatine,
2. mittelschnelle : z.B. kurzkettige Polycyanoacrylate,
3. langsame : z.B. langkettige Polyalkylcyanoacrylate,
4. sehr langsame : z.B. Poly (methylemethacrylat).

Der Abbau von Polyalkylcyanoacrylat-Partikeln ist am ausführlichsten untersucht (Couvreur et al., 1982; Lherm et al., 1992). Man unterscheidet zwischen einem chemischen und enzymatischen Weg. Die Abbaugeschwindigkeit, sowie die Toxizität hängen von der Länge der Alkylseitenketten ab. Kurze Seitenketten führen zu einer schnellen Biodegradation (Lherm et al., 1992) und erklären damit, da die toxischen Abbauprodukte schneller entstehen, die höhere Toxizität kurzkettiger Nanopartikel. Es kommt je nach Abbauweg zur Entstehung

von Formaldehyd (chemischer Weg) oder nach Spaltung durch Esterasen zur Alkoholbildung (enzymatischer Weg). Da unter physiologischen Bedingungen der Abbau der Polyalkylcyanoacrylat-Partikel hauptsächlich auf enzymatischem Weg abläuft (Lenaerts et al., 1984), sehen viele Autoren (Couvreur et al., 1984; Lenaerts et al., 1984) in der Entstehung - der daher nur sehr geringen Formaldehydmengen - kein toxikologisches Problem.

PMMA galt lange, wie Polystyrol, als nicht abbaubar. Erst Kreuter et al. (1979) konnten mit <sup>14</sup>C-markierten Partikel über einen Untersuchungszeitraum von 300 Tagen einen PMMA-Abbau nachweisen, dessen Mechanismus aber im einzelnen noch nicht geklärt ist.

Die meisten Studien zu toxikologischen Fragestellungen der Abbauprodukte wurden *in vitro* durchgeführt. So konnten Müller et al. (1996) für Poly-Milchsäure-Partikel eine zehnfach höhere und für Poly (butylcyanoacrylat)-Nanopartikel eine einhundertfach höhere Toxizität gegenüber Polystyrol-Partikeln finden. Die geringe Toxizität für Polystyrol- und für Polyhydroxybutyrat-Partikel ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Partikelarten entweder gar nicht oder nur sehr langsam abgebaut werden ( Maaßen et al., 1993).

Nach Maaßen et al. (1993) sind die toxischen Effekte von Nanopartikeln auf eine Reihe von Faktoren zurückzuführen, wie z. B. die:

- Freisetzung der Abbauprodukte,
- Stimulation von Zellen und nachfolgende Freisetzung von Entzündungsmediatoren,
- Membranadhäsionen.

Die *in vitro* gefundenen Zytotoxizitäten sind dramatisch höher als nach *in vivo*-Verabreichung. Dies läßt sich, ausgehend davon, daß die Abbauprodukte teilweise oder vollkommen für den toxischen Effekt verantwortlich sind, damit erklären, daß die Produkte (wie z. B.: Alkohol und Formaldehyd) *in vivo* ständig vom Ort der Degradation entfernt werden. Aufgrund der Elimination kommt es zu einer kürzeren Zell- und Gewebekontaktzeit als *in vitro*. Diese Vermutungen über den Mechanismus der Zytotoxizität führen zu der Schlußfolgerung, daß die in *in vitro*-Tests gefundenen Ergebnisse nur bedingt eine Aussage über die *in vivo*-Toxizität erlauben (Maaßen et al., 1993).

#### **2.3.3.1.2.4 Proteinadsorptionsvermögen**

Werden partikuläre Arzneistoffträger ins Blutgefäßsystem appliziert, so kommt es unmittelbar zu Interaktionen mit den Proteinen des Plasmas.

Die Ursachen für die Adsorption der Proteine auf die Partikeloberfläche ist, bedingt durch die spezifische Struktur, besonders der globulären Proteine, nicht mit einer allgemeinen Theorie zu beschreiben (Norde, 1986). Neben der Molekülgröße, der Oberflächenladung und der chemischen Zusammensetzung der Proteine spielen besonders hydrophobe Wechselwirkungen eine gewichtige Rolle (Blunk, 1994). Die Dehydratation hydrophober Bereiche wird durch den daraus resultierenden Entropiegewinn hervorgerufen und fördert somit die spontane Adsorption (Norde, 1986). Norde et al. (1986) kommen nach ihren Untersuchungen zu dem Schluß, das ein Entropiegewinn als Triebfeder für die Proteinadsorption angesehen werden muß.

Die insgesamt adsorbierte Plasmaproteinmenge und die qualitative Zusammensetzung der Proteine hängt von den physikochemischen Eigenschaften der Partikel, wie Größe, Oberflächenhydrophobizität und Ladung ab (Armstrong et al., 1997) und ist entscheidend für das *in vivo*-Verhalten der Partikel (Buckton, 1995). Der Prozeß der Adsorption wird als “**Opsonisierung**” bezeichnet (Armstrong et al., 1997) und ist notwendig für die Erkennung und Elimination körperfremden Materials aus dem Blutgefäßsystem. Die adsorbierten Plasmakomponenten scheinen eine Schlüsselrolle für den weiteren Verbleib der Partikel zu spielen (Müller, 1991; Borchard u. Kreuter, 1993, 1996). Proteine, welche die Phagozytose fördern, werden als **Opsonine** und Proteine, die die im Blutstrom zirkulierenden Partikel vor der Phagozytose durch die Zellen des RES schützen, werden als **Dysopsonine** bezeichnet (Armstrong et al., 1997). Es ist die Aufgabe des RES partikuläre Systeme aus dem Blutkreislauf zu eliminieren (Juliano, 1988). Zu den Proteinen, die die Erkennung und die anschließende Phagozytose des körperfremden Materials fördern, gehören:

- die Komponenten des Komplementsystems (Labarre et al., 1993),
- IgG (Mehta et al., 1984) und
- Fibronectin (Hsu u. Juliano, 1982; Gudewicz et al., 1980), diese werden auch als unspezifische Opsonine bezeichnet.

Für weitere Plasmakomponenten wurden Rezeptoren auf den Zellen des RES beschrieben, wie:

- Fibrinogen (Shermann u. Lee, 1977),
- Transferrin (Andreesen et al., 1984; Vogel et al., 1987) und
- $\alpha$ -2- Makroglobulin (van Leuven et al., 1986).

Insgesamt ist das Wissen über existierende Rezeptoren noch lückenhaft, wird aber aktiv erforscht. Proteine wie z. B. IgA besitzen einen dysopsonisierenden Effekt auf partikuläre Strukturen (van Oss, 1978; Patel, 1992).

Kreuter und Borchard (1993) diskutierten einen ähnlichen Effekt für Albumin. Müller und Heinemann (1989) vertraten die Auffassung, daß es durch eine gezielte präventielle Adsorption möglich ist, die Aufnahme der Partikel in bestimmte Zellen und Gewebe zu vermitteln. Moghimi und Patel (1988, 1996) gelang es, für Liposomen variierender Lipidzusammensetzung unterschiedliche Opsonine zu finden, die aber nicht näher identifiziert werden konnten. Liposomen mit niedrigem Cholesterolgehalt wurden präventiell von den Kupfferschen Sternzellen, und cholesterolreiche Liposomen hauptsächlich von den phagozytierenden Zellen der Milz aufgenommen. Die mögliche Relevanz der Apolipoproteine für Arzneistoffträger wurde durch den Einsatz endogener Lipoproteine von Van Berkel (1993) verdeutlicht: ihm gelang durch Modifikationen (z. B. Acetylierung oder Laktolysation von LDL und HDL) eine spezifische Aufnahme in unterschiedliche Leberzelltypen, wie Kupfferschen Sternzellen, Parenchym- und Endothelzellen. Über Jahre wurde das differentielle Adsorptionsvermögen *einzelner Proteine* auf unterschiedlichen partikulären Systemen (Zusammensetzung, Größe, Oberflächeneigenschaften) untersucht. Der Einfluß folgender Proteine auf das Verhalten von Nanopartikeln wurde *in vitro* und *in vivo* ermittelt.

Tab.3: Der Einfluß folgender *einzelner Proteine* auf das Verhalten von Nanopartikeln wurde untersucht

<b>Protein</b>	<b><i>in vitro</i> / <i>in vivo</i></b>	<b>Autor</b>
• Rattenserumalbumin	<i>in vivo</i>	Leu et al., 1984
• humanes Serumalbumin • bovines Serumalbumin • IgG • Fibrinogen	<i>in vitro</i>	Absolom et al., 1987
• humanes Serumalbumin	<i>in vivo</i>	Bazile et al., 1992
• Rattenserumalbumin • Rattenkomplement	<i>in vivo</i>	Borchard, 1993
• IgG • IgE • Fibronectin • Transferrin • Complement C3 • Fibrinogen	<i>in vitro</i>	Norman et al., 1993
• APO E • humanes Albumin	<i>in vitro</i>	Leroux et al., 1995
• humanes Serumalbumin	<i>in vitro</i>	Armstrong et al., 1997

Armstrong (1997) faßt in seiner Arbeit zusammen, daß die Untersuchungen an einzelnen Proteinen kein optimales Modell sind, um die Interaktionen der Blutbestandteile mit den applizierten partikulären Systemen zu bestimmen. Das Plasma besteht sowohl aus Opsoninen, Dysopsoninen und “nicht aktiven Proteinen”, die nach Kontakt mit der Partikeloberfläche untereinander in Wechselwirkungen treten und in ihrer Gesamtheit für das *in vivo*-Verhalten des partikulären Systems verantwortlich sind. Um alle im Plasma und Serum enthaltenden Proteine mit berücksichtigen zu können, etablierte Blunk (1994) die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese für partikuläre Trägersysteme. Die hochauflösende zweidimensionale Polyacrylamid- Gelelektrophorese, welche auf einer von O’Farrell (1975) beschriebenen Methode basiert, ist das einzige Verfahren, das eine Auftrennung von mehreren tausend Proteinen erlaubt (Jungblut, 1995). Die Proteine werden dabei nach zwei von einander unabhängigen Parametern, dem isoelektrischen Punkt (pI) und dem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt (Blunk, 1994). Blunk (1994) konnte zwar unterschiedliche Proteinadsorptionsmuster für einfache und oberflächenmodifizierte Partikel finden, ein genereller Zusammenhang zu den physikochemischen Partikeleigenschaften konnte aber nur für einzelne Proteine gefunden werden. Die gewonnenen Daten auf das *in vivo*-Verhalten der applizierten Systeme zu beziehen, gestaltet sich äußerst kompliziert, da nicht - wie häufig vermutet - die totale Proteinmenge entscheidend ist (Blunk et al., 1993). Entscheidend für die Körperverteilung kolloidaler Systeme sind (Blunk et al., 1993):

1. hohe Konzentrationen einzelner Proteine,
2. minimale Mengen von sog. Hauptproteinen,
3. Art und Weise der Konformationsänderung der adsorbierten Proteine aufgrund ihrer chemischen Oberflächeneigenschaften,
4. gegenseitige Beeinflussung der adsorbierten Proteine (z.B. Verdrängung von Nachbarproteine).

Um zu zeigen, daß die einfache Anwesenheit eines Proteins auf der Partikeloberfläche (unverändert oder beschichtet) kein eindeutiger Beweis für eine spezifische Körperverteilung ist, sollen folgende Untersuchungen verschiedener Autoren angeführt werden.

Auf mit Polyethylenglycol beschichteten Polymilchsäure-Partikeln, die nur eine geringe Anreicherung in der Leber zeigten, konnten Leroux et al. (1994) kein Apolipoprotein E und AIV im Verhältnis zu unbeschichteten Partikeln detektieren. Für beide Apolipoproteine sind Rezeptoren in der Leber beschrieben (Weinberg u. Patton, 1990; Mokuno et al., 1991). Apo E ist weiterhin in den Phagozytoseprozeß von Fremdmaterial in Makrophagen involviert (Innerarity et al., 1986; Bates et al., 1987).

Der nach alleiniger Beschichtung von Polystyrol-Partikeln mit Albumin beschriebene phagozytoseprotektive Effekt, konnte nach der Zugabe von Serum aufgehoben werden (Maaßen et al., 1993). Um so interessanter ist, daß Bucke et al. (1997) auf mit PEG- und Poloxamer 407- beschichteten Liposomen eine Konzentration von über 80% Albumin fanden, auf gelatinebeschichteten und unbeschichteten dagegen nur 55-60%. Die Aufnahme in die Leber betrug 2 Stunden nach der Applikation für unbeschichtete 33%, für PEG- und Poloxamer 407- beschichtete 22% und 35%. Nur für die mit Gelatine modifizierte Liposomen konnte ein Wert von 55% in der Leber gefunden werden.

Blunk (1994) und Allemann et al. (1997) untersuchten mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese die Adsorptionskinetik von bestimmten Blutplasmaproteinen auf Partikeln. Dabei konnten Allemann et al. (1997) die Konzentrationsänderungen folgender Proteine auf Polymilchsäure-Nanopartikeln über die Zeit beobachten. Während Immunglobulin G während der Zeit von einer Stunde relativ konstant blieb, konnte für Albumin eine kontinuierlicher Abnahme über die Zeit beobachtet werden. Der prozentuale Anteil von APO E und Komplementbestandteilen C3\* und C3 $\beta$  stieg während der Analysezeit ständig. Diese Ergebnisse beschreiben die permanente Dynamik der Plasmaproteine auf der Partikeloberfläche und stützen die These, daß nicht nur die Proteinmenge, sondern vielmehr die Konformationsänderungen und die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Proteinen für das *in vivo*-Verhalten ausschlaggebend sind.

### 2.3.3.2 Körperverteilung

Nanopartikel interagieren nach ihrer Applikation ins Blutgefäßsystem sofort mit den Plasmaproteinen und werden meist sehr schnell, innerhalb von Minuten durch das RES aus dem Kreislaufsystem entfernt. Die besonders ausgeprägte Aufnahme in Leber (70-90%) und Milz (5-20%) (Kreuter, 1983) wird durch die starke Durchblutung dieser Organe, bedingt durch fenestrierte Gefäßwände und die hohe Anzahl von Zellen des RES, hervorgerufen (O'Mullane et al., 1987). Die Phagozytose der Arzneistoffträger durch die Zellen des RES steht einerseits in engem Zusammenhang mit den Oberflächeneigenschaften der Partikel (Müller, 1991) und wird andererseits durch die Oponisation beeinflusst (Juliano, 1988). Die effiziente Aufnahme intravenös applizierter Partikel durch die Zellen des RES kann für ein **passives Drug Targeting** ausgenutzt werden, z.B. für die Behandlung von :

- Leishmaniasen (Paul et al, 1998),
- Tuberkulose,

- Lepra und
- Leptospirose (Fidler u. Hart, 1982; Couvreur et al., 1991).

Diese Erreger besiedeln bestimmte Zelltypen des RES, wie z. B. *Leishmania major* die Kupffer-Zellen der Leber und sind somit für antiparasitariahaltigen Nanopartikel gut zu erreichen (Paul et al, 1998).

Einem gezielten **aktiven Drug Targeting** in andere Zellen und Gewebe oder eine ungehindert lange Blutzirkulation stehen die RES-Aufnahme in Leber und Milz jedoch als großes Hindernis im Wege (Dunn et al., 1997), so daß es zahlreiche Versuche gibt das RES zu umgehen:

#### **2.3.3.2.1 Suppression des RES**

So konnten Suppressionen mit Polystyrol-Partikeln (Illum et al., 1986), Dextransulfat (Patel et al., 1983) und MLV-Liposomen (Fichtner et al., 1992) nachgewiesen werden. Die verabreichten Dosen waren dabei so hoch, daß die phagozytierenden Zellen des RES regelrecht überflutet wurden und zu keiner weiteren Aufnahme fremden Materials mehr in der Lage waren. Die Blockade des Abwehrsystems führte zu einer Umverteilung der Partikel im Organismus mit z.B. einem signifikanten Anstieg der Lungenkonzentration (Illum et al., 1986) oder einer Verlängerung der Blutzirkulationszeit um das dreifache (Fichtner et al., 1992) gegenüber der nicht vorbehandelten Kontrolle. Schon nach einer einmaligen Unterdrückung des RES benötigten Mäuse 2 Tage (Fichtner et al., 1992) und Ratten drei Tage (Souhami u. Bradfield, 1974), um eine vollständige Phagozytoseaktivität des Abwehrsystems wieder herzustellen. Das Prinzip der RES-Suppression ist für therapeutische Zwecke nicht anwendbar, da eine Unterdrückung des Abwehrsystems seine Funktionen erheblich beeinträchtigen würde.

#### **2.3.3.2.2 Magnetische Steuerung von Partikeln**

Die Inkorporation magnetische Eisenpartikel ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) mit einem Durchmesser von 10-20 nm in Albumin (Widder et al., 1980) oder Poly(isobutylcyanoacrylat) (Ibrahim et al., 1983) ermöglichten die Herstellung magnetisch steuerbarer Arzneistoffträger. Trotz aussichtsreicher Tierstudien am Yoshida-Sarkom (Widder et al., 1983) bleibt die Anwendung auf Regionen beschränkt, die ein Anlegen des magnetischen Feldes ermöglichen. Die Lokalisation des Zielortes am Schwanz oder an den unteren Extremitäten der Maus ist sehr gut praktikabel und mit einem relativ schmalen Magnetfeld möglich. An größeren Säugetieren und dem

Menschen ergeben sich Schwierigkeiten, das Magnetfeld auf bestimmte Bereiche im Inneren des Körpers zu lenken, zumal die maximale Stärke des Feldes an den Polen und demzufolge eine Fokussierung der eisenhaltigen Partikel auf eine Region im Körperinneren nur schwer erreichbar ist.

#### **2.3.3.2.3 Steuerung durch den Einsatz monoklonaler Antikörper**

Die Möglichkeiten der Bindung monoklonaler Antikörper an Nanopartikel, die *in vitro* spezifisch zu Tumor-Targetzellen gelangen, riefen großes Interesse hervor (Illum et al., 1983; Couvreur u. Aubry, 1983). Die Ergebnisse konnten *in vivo* nicht reproduziert werden (Illum et al., 1984), da es wahrscheinlich durch Interaktionen der Nanopartikel mit Plasmaproteinen zu einer Verschiebung und/oder Entfernung der Antikörper kam, so daß es statt dessen zu einer Akkumulation in der Leber und der Milz kam. Ein weiteres Problem stellt die meist unzureichende Antikörpermenge, die auf der Nanopartikeloberfläche bindet, dar.

#### **2.3.3.3 Modifikation der Oberflächeneigenschaften durch Polymere (Tenside)**

Eine weitere Möglichkeit, die phagozytierenden Zellen des RES zu umgehen, besteht in dem Versuch, die bestehenden Oberflächeneigenschaften von Nanopartikeln mit Hilfe von hydrophilen, nichtionischen Polymeren zu verändern, um so die Stabilität *in vivo* zu erhöhen. Die Polymere müssen dabei inert, gut löslich, kompatibel mit dem Lösungsmittel und vollständig in Wasser polarisierbar sein (Storm et al., 1995). Verschiedene natürliche und synthetische Polymere sind in der Lage, sich durch Adsorption, hydrophobe Insertion, elektrostatische oder durch kovalente Bindung an die Partikeloberfläche zu binden. Die Verankerung der Polymere auf der Oberfläche kolloidaler Partikel kann zu einer sterischen Stabilisierung (Illum et al., 1987; Davis u. Illum, 1988) der Partikel und damit zu einer relativen "Unsichtbarkeit" der beschichteten Partikel gegenüber den Zellen des RES führen. Die Ursache dafür besteht in einer verminderten und differenzierteren Proteinadsorption mit dem Ergebnis einer Reduktion der Makrophagenaufnahme in Leber und Milz und einer verlängerten Blutzirkulationszeit (Jeon et al., 1991; Moghimi u. Davis, 1994). Die Beschichtung (coating) der Partikel erfolgte hauptsächlich mit amphiphatischen Block-Copolymeren (Tenside), wie den Vertretern der Poloxamer- und Poloxaminserie. Poloxamere bestehen aus zwei Polyethylenoxid-Polymerketten (**PEO**), die an die Enden eines zentralliegenden Polypropylenoxidpolymers (**PPO**) gebunden sind. Poloxamin dagegen besteht aus vier PEO-Ketten, die an PPO befestigt sind, wobei diese vier Kettenkombinationen über Ethylendiamin mit einander sind verbunden.

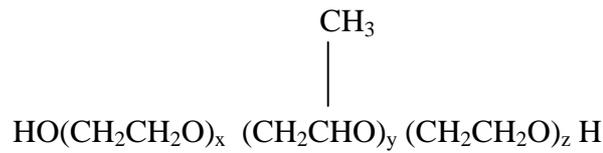


Abb. 1: Allgemeine Strukturformel der Poloxamere

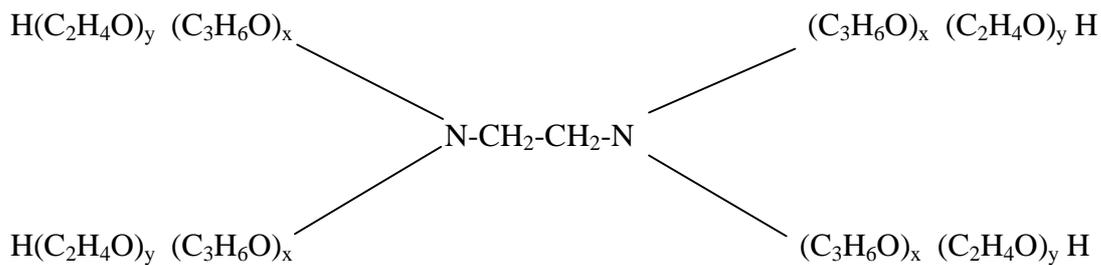


Abb. 2: Allgemeine Strukturformel der Poloxamine

Die Art der Befestigung der Tenside auf der Partikeloberfläche erfolgt hauptsächlich durch physikalische Adsorption (van der Waals-Adsorption) (Stricker, 1987). Die Polymere der Poloxamer- und der Poloxaminserie besitzen ein **A-B-A** Blockstruktur. Die Adsorption dieser Polymere erfolgt über die zentralgelegene hydrophobe **B**-Bestandteile (Polypropylenoxid oder Polyoxipropylenethyldiamin), während die hydrophilen **A**-Bestandteile (Polyethylenoxid) in das umgebene Milieu ragen. Die letztendlich treibende Kraft der Adsorption ist der Entropiegewinn der Wassermoleküle, bei der Dehydratation der hydrophoben **B**-Bestandteile der Tenside (Wesemeyer, 1994).

Neben den amphiphatischen Block-Co-Polymeren kommen auch Homopolymere, wie Polyethylenglycol (PEG) und Polysorbate zum Einsatz. Diese Tenside besitzen nicht die oben beschriebene Blockstruktur, sondern bestehen nur aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil.

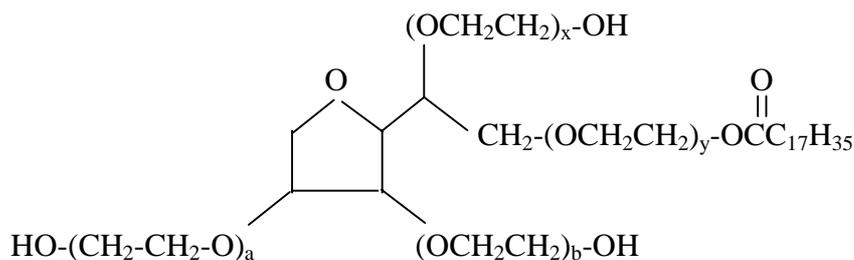


Abb. 3: Allgemeine Strukturformel der Polysorbate

Die Verankerung von PEG auf der Oberfläche von Polystyrolpartikeln erfolgt z.B durch kovalente Bindung.

Die ersten Untersuchungen über das *in vivo*-Verhalten von beschichteten Partikeln (Polystyrol; Durchmesser, D:130nm) wurden mit Poloxamer 188 und 388 (Illum u. Davis, 1983, 1984) durchgeführt. Für beide Nanopartikel-Tensid-Präparationen konnte eine Reduktion der Leberaufnahme (20-40%) und eine Verlängerung der Blutzirkulationszeit gegenüber den unbeschichteten Partikeln gefunden werden. Dieser Effekt konnte für Poloxamer 188 nur für eine kurze Zeitperiode beschrieben werden, danach kam es zu einer, wie für die unbeschichteten Partikel typischen Körperverteilung. Der Effekt der verminderten Leberaufnahme blieb dagegen für Poloxamer 388 auch noch nach 8 Tagen bestehen. Als Ursache für das unterschiedliche Verhalten wurde eine leichtere Verdrängung von Poloxamer 188 von der Partikeloberfläche durch die Plasmaproteine angenommen (Douglas et al., 1986). Lee et al. (1989a) berichteten über ähnliche Ergebnisse mit Poloxamer 188 beschichteten PMMA-Partikeln (D:130nm). Die in Studien von Tröster et al. (1990, 1992) ebenfalls beschriebenen Verlängerungen der Blutzirkulationszeit, bei gleichzeitiger Reduktion der Leberaufnahme führten zu höheren Anreicherungen in anderen Organen, wie Milz, Lunge, Herz und Gehirn. Interessanterweise konnten die mit Poloxamer 388 auf Polystyrolpartikeln erzielten Ergebnisse nicht mit - ebenfalls 130nm großen - Polybutylcyanoacrylatpartikeln wiederholt werden (Douglas et al., 1986). Die Autoren vermuteten unterschiedliche Adsorptionsenergien pro Polymerkette und Differenzen in der Konformation des Tensids auf verschiedenen Oberflächen. Während mit Poloxamer 407 überzogene Polystyrol-Partikel eine teilchengrößenabhängige Körperverteilung in der Ratte zeigten, konnten diese Ergebnisse im Kaninchen nicht bestätigt werden. Für Poloxamin 908, einem mit 4 Polyethylenoxid (PEO) ausgestattetem Polymer konnte dagegen kein Unterschied im *in vivo*-Verhalten (Ratte) mit verschieden großen Partikeln gezeigt werden (Moghimi et al., 1991).

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, daß neben tierartlichen Differenzen (Kaninchen-Ratte), besonders die Dichte und die Konformation des **PEO**-Segments auf der Partikeloberfläche für die unterschiedlich starken Interaktionen mit Plasmaproteinen verantwortlich sind (Storm et al., 1995).

### 2.3.3.3.1 Prinzipien der Proteinadsorptionsreduktion durch PEO

Die für PEO nachgewiesene niedrige Proteinadsorption, deren Gründe noch nicht vollständig geklärt sind, führte dazu, daß diese Polymere gemeinsam mit PEG zu den meistuntersuchten, oberflächenmodifizierenden Polymeren gehören. Eine Komponente ist die extrem niedrige Grenzflächenenergie der PEO/Wasser Grenzfläche. Daraus ergibt sich für die Proteine keine treibende Kraft für die Adsorption. PEO ist bei Raumtemperatur mit Wasser mischbar, da die PEO-Segmente die Lücken der tetraedrischen Wasserstruktur ausfüllen und diese dadurch nur minimal stören. Diese Eigenschaft führt zu einem flüssigkeitsähnlichen Zustand der Oberfläche, der den PEO-Ketten eine hohe Mobilität verleiht und damit die Adsorptionsmöglichkeit für Proteine minimiert (Lee et al., 1989). Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die **sterische Stabilisierung**, die zwei Gründe hat. Zum einen kommt es durch ein sich näherndes Protein zu einer Einengung des zur Verfügung stehenden Raumes und damit zu einer Reduktion der Anzahl der möglichen Konformationen der PEO-Ketten. Der daraus resultierende Entropieverlust führt zu einer abstoßenden Kraft. Zum anderen existiert die Theorie des "excluded volume". Durch die Eigenschaft von PEO, in die tetraedrische Wasserstruktur einzudringen, kommt es zur Wasserbindung über die Etherbindungen, daraus resultiert eine hohe Entropie. Ab einem bestimmten Molekulargewicht kommt es zur Faltung der PEO-Ketten aus sich selbst und damit zu einem lockeren Einschluß der Wassermoleküle. Durch diese Hydrathülle entsteht ein "zugangloser Raum" (excluded volume). Um die Wassermoleküle wieder zu lösen, z. B. durch ein sich der Partikeloberfläche annäherndes Protein, ist Energie nötig (Lee et al, 1989; Gombotz et al., 1992). Blunk (1994) konnte nachweisen, daß auf beschichteten und unbeschichteten PS-Partikeln einheitlicher Größe die gleichen Proteine, aber in unterschiedlichen Konzentrationen adsorbieren. Diese Ergebnisse konnten die Hypothese, daß Plasmaproteine auf der Partikeloberfläche und weniger auf den sie umgeben Schutzpolymeren (z.B. Poloxamer) adsorbieren, bestärken.

Die im Zusammenhang mit der Adsorption von Polymeren auf die Oberfläche kolloidaler Trägersysteme entstehende neue Situation, wie Zunahme der Hydrophilie und Ausbildung einer je nach verwendetem Polymer unterschiedlichen Schichtdicke, konnten nur in einigen Fällen die Erwartungen hinsichtlich der Proteinadsorptionsmenge bestätigen. Blunk (1994) verglich die Schichtdicken der Überzüge und die Hydrophobie von mit verschiedenen Poloxameren (184, 188, 235, 237, 238, 407) und mit Poloxamin 908 inkubierten PS-Partikeln (D: 200nm), mit der gesamtadsorbierten Proteinmenge. Lediglich für die Partikel mit der stärksten Schichtdicke (Poloxamer 407: 7,4nm; Poloxamin 908: 8,6nm) konnten Korrelationen zur adsorbierten Proteinmenge (geringste Proteinmenge) gefunden werden.

Ähnliches trifft auf die Hydrophobie zu. Nur die beiden hydrophilsten Partikelpräparationen (Poloxamer 407, Poloxamin 908) konnten die Erwartungen der niedrigsten Proteinmenge bestätigen.

### **2.3.3.3.2 Toxizität der eingesetzten Tenside**

Die Toxizität oberflächenaktiver Polymere (Tenside) ist aufgrund ihres häufigen Einsatzes in der kosmetischen und pharmakologischen Produktion von enormer Bedeutung. Bedingt durch die hämolytischen Eigenschaften der Tenside ist bei der parenteralen Applikation besondere Vorsicht zu wahren.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die toxikologische Situation der verwendeten Tenside gegeben werden.

- **Poloxamer:**

Die Vertreter dieser Tensid-Reihe gelten als wenig toxisch, üben kaum Hautreizungen aus und werden wegen ihrer guten Verträglichkeit häufig in der kosmetische Industrie eingesetzt (Fiedler, 1989). Meist liegen nur orale LD50-Werte vor, welche fast ausschließlich über 2g/kg KG liegen. Genaue Daten zur Toxizität nach intravenöser Applikation liegen für Poloxamer 188 vor. So wurden bei einer Dosis von 0,1g/kg KG keine toxischen Symptome beim Hund festgestellt. Die LD50-Werte lagen bei der Maus nach i.p. Applikation bei 5-10g/kg KG und bei der Ratte bei 3,95g/kg KG.

- **Poloxamin:**

Poloxamine werden wie die Poloxamere auch in den Bereich niedriger Toxizität eingeordnet. Die Toxizität dieser Substanz nimmt mit steigendem Molekulargewicht ab (Tröster, 1990). Die orale LD50 liegt beim Kaninchen bei 15g/kg KG.

- **Polysorbat:**

Varma et al. (1985) untersuchten die Toxizität von Polysorbat 80 nach i.p. und p.o. Verabreichung und fanden nur sehr geringe Toxizitäten (LD50-Werte für Mäuse: 7,5ml/kg KG und für Ratten: 6,3ml/kg KG nach i. p. Applikation). In hohen Dosen wurden milde bis mäßige Depressionen des Nerverzentrums mit Abnahme der lokomotorischen Aktivität und der rektalen Temperatur gefunden. In *in vitro*-Studien konnte weiterhin eine negative inotrope Wirkung gezeigt werden. Erst ab einer Konzentration von 2,5ml/kg KG kommt es zu einer gesteigerten Diurese bei der Rate. Nach Meinung der Autoren kann Polysorbat 80 als sicherer

Hilfsstoff bis zu einer Dosis von 1ml/kg KG bei neuropsychopharmakologischen Untersuchungen verwendet werden.

Bis heute existieren keine Tenside, die uneingeschränkt zur parenteralen Applikation eingesetzt werden können (Reinhart u. Bauer, 1995).

## **2.3.4 Einsatzmöglichkeiten einfacher und oberflächenmodifizierter Nanopartikel**

### **2.3.4.1 Drug Targeting zum Tumor**

Intravenös applizierte kolloidale Partikel scheinen aufgrund ihrer nachgewiesenen Tendenz zur Akkumulation in einer Reihe von Tumoren (Grislain et al., 1983; Gipps et al., 1986; Beck et al., 1993; Reszka et al., 1997) für die Krebstherapie als Arzneistoffträger geeignet zu sein. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist eine hohe Adhäsionsneigung der Partikel an den Tumorgefäßen, ähnliches konnte auch für Entzündungsherde beobachtet werden. Die genauen Ursachen für dieses Verhalten sind noch nicht aufgeklärt, es wird aber u. a. die erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße mit dafür verantwortlich gemacht (Illum et al., 1989; Kreuter, 1994a). Alternativ oder zusätzlich dazu wird für viele Tumorarten eine erhöhte Endozytoseaktivität (gegenüber Endothelzellen gesunder Gewebe), der - die Tumorgefäße auskleidenden Endothelzellen - beschrieben. Als eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die beschriebenen Anreicherungstendenz der Partikel in Tumoren, aber auch in der Leber und im Knochenmark, ist die hohe Anzahl an Endothellücken in einer Größe von ca. 100nm. Aufgrund dieser Besonderheit sowie der nur fragmentär vorhandenen Basalmembran werden die Gefäße auch als diskontinuierlicher Kapillartyp bezeichnet (Thews et al., 1989). Alle aufgeführten tumorspezifischen Besonderheiten können zu einer erhöhten Anreicherung, der an Nanopartikel gebundenen Zytostatika führen.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Versuchen unternommen, Antitumorsubstanzen an Arzneistoffträger zu binden (adsorptiv oder inkorporativ). Ziel der Experimente war es, eine Verlängerung der Blutzirkulationszeit, bei gleichzeitig kontrollierter Wirkstofffreigabe und verminderter Toxizität für den Gesamtorganismus zu erreichen.

Neben dem großen Einsatz liposomal verkapselter Zytostatika in der experimentellen Onkologie waren Sugibayashi et al. (1979) die ersten, die Tierversuche mit einem an Nanopartikel (Albumin) adsorbierten Zytostatikum durchführten. Dabei konnte die Wirkeffizienz von nanopartikulär gebundenem 5-Fluorouracil signifikant zur freien Substanz gesteigert werden. Dabei kam es aber gleichzeitig zu einem Anstieg der Toxizität.

Erst durch den Einsatz anderer Nanopartikelformulierungen (z.B. Poly-[hexylcyanoacrylat]) (Brasseur et al., 1980) konnte der toxische Effekt auf das Maß der freien Substanz gesenkt werden, ohne daß es zu einer Abnahme der therapeutischen Effizienz kam. Ähnliche Ergebnisse erzielten Kreuter und Hartmann (1983b) mit an Poly-(butylcyanoacrylat)-Partikeln gebundenem 5-Fluorouracil. Die antitumorale Wirkung war signifikant erhöht, gleichzeitig stiegen bei den Versuchstieren aber auch die toxischen Nebenwirkungen, wie Leukopenie, starke Körpergewichtsreduktion und es kam zu Todesfällen. Durch den Einsatz von Albumin als Trägersubstanz (Morimoto et al., 1980) konnten die toxischen Nebeneffekte von 5-Fluorouracil verringert werden. Nach einer einmaligen intraperitonealen Applikation konnte mit dieser Arzneistoff-Träger-Kombination eine Verlängerung der Lebenszeit um 20% und nach dreimaliger Verabreichung ein Anstieg der Überlebenszeit um 50% gegenüber der freien Substanz erzielt werden. Als Tumormodell wurde ein sog. "Aszites-Tumor" (freie Tumorzellen in der Bauchhöhle) verwendet.

Besonders interessant sind die Ergebnisse aus Untersuchungen, die mit dem Zytostatikum Doxorubicin, einem der Hauptmedikamente in der Onkologie, erfolgten. Der dosislimitierende Faktor für diese Substanz ist, neben den anderen zytostatikatypischen Nebenwirkungen, die besonders hohe akute und chronische Herztoxizität. Durch Bindung der Substanz an Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikel konnte der Einfluß auf das Herz durch eine verhinderte Akkumulation von Doxorubicin gesenkt werden (Couvreur et al., 1982). In den Herzen der untersuchten Tiere konnte lediglich Doxorubicin in der Gruppe, welche die freie Substanz erhielten, nachgewiesen werden. Die antitumorale Wirkung war bei der L1210 Leukämie, nicht aber beim S130 Myelom signifikant gegenüber der freien Substanz erhöht. Bedingt durch die drastische Toxizitätsminderung der Nanopartikel-Cytostatika-Kombination war der therapeutische Index aber für beide Tumorarten signifikant erhöht. Nach weiteren Tierversuchen (Chiannikulchai et al., 1989, 1990; Couvreur et. al., 1990) wurde 1992 mit Doxorubicin beladenen Poly-(isohexylcyanoacrylat)-Partikeln eine erste klinische am Menschen durchgeführt (Kattan et al., 1992). In der Phase I der klinischen Prüfung wurde die Arzneistoff-Träger-Kombination auf ihre Verträglichkeit hin an 21 gesunden Menschen überprüft. Nach einer Gesamtinjektionszeit von einer Stunde trat nur bei einem Patienten eine geringe allergische Reaktion auf. Zu Fieber und Erbrechen kam es bei 9 Probanden unmittelbar nach der Infusion und bei sieben weiteren innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Applikation. Bei 85,7% der Probanden wurde keine kardiale Toxizität beobachtet. Die empfohlene Doxorubicindosis wurde auf  $75\text{mg}/\text{m}^2$  festgelegt.

In einer Reihe von *in vitro*-Studien (Astier et al., 1988; Spenlehauer et al., 1988; Egea et al., 1994) wurde die Beladungsrate und die Freisetzungskinetik aus den Nanopartikeln, sowie die Wirkung auf Tumorzellen in der Zellkultur (Astier et. al., 1988) untersucht. Cisplatin war die am häufigsten verwendete Substanz.

Reszka et al. (1997) konnten in ihren Untersuchungen zur antitumoralen Wirkung von freiem, liposomal verkapseltem und an Nanopartikel gebundenem Mitoxantron ganz erstaunliche Ergebnisse erzielen. Während 78% der Substanz in den Liposomen (negativ geladene SUV's) inkorporiert werden konnte, waren es nur 10% des eingesetzten Mitoxantrons, das durch Adsorption an die Nanopartikel gebunden wurde, der freie Anteil des Arzneimittels wurde mitappliziert. Mit den Liposomen konnten die höchsten Serumkonzentrationen erzielt werden, die Antitumoreffizienz unterschied sich aber nicht vom freien Mitoxantron. Dagegen führten sowohl einfache als auch mit Poloxamin 1508 beschichtete Poly-(butylcyanoacrylat)-Nanopartikel, als Träger für Mitoxantron, zu den höchsten Arzneistoffkonzentrationen im Tumorgewebe und der stärksten Reduktion des Tumolvolumens (signifikant gegen freies und liposomal verkapseltes Mitoxantron). Interessant ist die hohe Anreicherung der Substanz im Tumor trotz einer schnellen Elimination der Nanopartikel aus dem Blut. Die Ergebnisse wurden an soliden Tumoren (B16-Melanom) erzielt. In Studien an einem Aszites-Tumormodell (P 388-Leukämiemodell) (Beck et al., 1993) kam es mit demselben Wirkstoff- und Arzneiträgersystemen zu einer Umkehrung in der Wirksamkeit. Die Nanopartikelformulierungen zeigten keinen Vorteil gegenüber der freien Substanz, lediglich die liposomale Zubereitung konnte die mittlere Überlebenszeit steigern, wobei es zu einer relativ hohen Anzahl von Langzeitüberlebenden (5 von 16 Tieren) kam (Beck et al., 1993).

Durch den Einsatz kolloidaler Träger für Zytostatika konnte in den meisten Fällen (Tiermodelle) eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit und eine Stagnation des Tumorstadiums erzielt werden, wobei es aber lediglich bei einem Tumormodell nach magnetischer Steuerung zur Totalremission (Widder et al., 1983) kam.

Tab.4: Übersicht der an tumortragenden Tieren durchgeführten Behandlungsversuche mit nanopartikulär gebundenen Zytostatika

Partikel	Tumorart	Applikations-art	Zytostatikum	antitumorale Wirkung gegenüber der freien Substanz	Toxizität gegenüber der freien Substanz	Autor
Albumin	• Ehrlich-Ascites-Tumor	i.p.	5-Fluorouracil	↑	k.a.	Sugibayashi et al.1979
Poly(methylcyanoacrylat) Poly(hexyl cyanoacrylat) Poly(isobutylcyanoacrylat)	• Karzinom S200	i.v.	Dactinomycin	↑ ↑ ↑	↑ ↓ ↓	Brasseur et al., 1980
Albumin	• Ehrlich-Ascites-Tumor	i.p.	5-Fluorouracil	↑	k.a.	Morimoto et al., 1980
Gelatine	• P388-Leukämie	i.p.	Mitomycin C	#	k.a.	Yoshioka et al., 1981
magnetische Albuminpartikel	• Yoshida-Sarcom	i.a.	Doxorubicin	77% totale Remission	k.a.	Widder et al.,1983
Poly(butyl cyanoacrylat)	• Crocker Sarkom (S180)	i.v.	5-Fluorouracil	↑	↑	Kreuter et al.,1983b
Albumin	• B16-Melanom	i.v.	5-Fluorouracil	↓	↑	Oppenheim et al.,1984
Poly(isobutyl cyanoacrylat)	• S130 Myelom • L1210 Leukämie	i.v.	Doxorubicin	↓ ↑	k.a. k.a.	Couvreur et al.,1986
Poly(isohexyl butylcyanoacrylat)	• Lebermetastasen desM5076	i.v.	Doxorubicin	↑	k.a.	Chiannikulchai et al., 1989
Poly(isohexyl butylcyanoacrylat)	• tumorfreie Menschen	i.v.	Doxorubicin	k.a.	↓	Kattan et al.,1992
Poly(isohexyl butylcyanoacrylat)	• P388-Leukämie	i.p.	Doxorubicin			Cuvier et al.,1992
Poly(butyl cyanoacrylat) Poly(butyl cyanoacrylat) +Poloxamer 1508	• P388-Leukämie	i.p.	Mitoxantron	#	#	Beck,1993
Polyvinylpyrrolidone-Partikel	• B16F10-Melanom	i.v.	Paclitaxel	↑	↓	Sharma et al.,1996
Poly(butyl cyanoacrylat) Poly(butyl cyanoacrylat) +Poloxamer 1508	• B16-Melanom	i.v.	Mitoxantron	↑	#	Reszka et al.,1997

↑/↓: erhöht / erniedrigt,

#: kein Unterschied zur Kontrolle,

k.a. : keine Angaben

#### 2.3.4.2 Drug Targeting ins Gehirn

Das Gehirn ist, bedingt durch die besondere Situation der Blut-Hirn-Schranke, für Arzneistoffe nur begrenzt erreichbar. Der Aufbau der Blut-Hirn-Schranke soll hier nicht im einzelnen näher besprochen werden. Die Blut-Hirn-Schranke kann unter gesunden Bedingungen vom Blut her nur von lipophilen Pharmaka mit niedrigem Molekulargewicht (MG <500) überwunden werden (Pardridge, 1996). Weiterhin existieren für eine Reihe von Substanzen, wie z.B. Aminosäuren und Glukose, aktive Transportmechanismen. Da eine Erhöhung der Lipophilie von Pharmaka nicht nur zu einer gesteigerten Anreicherung der Substanzen im Gehirn, sondern zu einem verstärkten Transport durch alle lipophilen Barrieren im Organismus führen würde, wurde schon früh der Einsatz partikulärer Systeme, wie Liposomen und Nanopartikel, als Arzneistoffträger für zerebrale Erkrankungen diskutiert (Kabanov et al., 1989).

In den Studien von Tröster et al. (1990) wurden verschiedene Tenside hinsichtlich der Möglichkeit, die Aufnahme von PMMA-Nanopartikeln in das RES zu umgehen und die Körperverteilung zu verändern, untersucht. Dabei zeigten Polysorbat 80-beschichtete PMMA-Partikel 30 Minuten nach der intravenösen Applikation mit 11,71µg/g Organ die höchste Anreicherung im Gehirn im Vergleich zu allen anderen Präparationen. In den Serumkonzentrationen unterschieden sich diese Nanopartikelzubereitungen nur unwesentlich von den unbeschichteten Kontrollen.

In *in vitro* Untersuchungen konnte Borchard (1993) für Polysorbat 80 überzogene PMMA-Partikel die höchsten Aufnahmen in bovine Gehirndothelzellen im Vergleich zu anderen Tensid-PMMA-Präparationen zeigen. An Mäusen konnte nachgewiesen werden, daß mit Polysorbat 80 modifizierten Nanopartikeln aus Poly (butylcyanoacrylat) Arzneistoffe ins Gehirn transportiert werden können (Alyautdin et al., 1995; Kreuter et al., 1995; Schröder u. Sabel, 1996, Alyautdin et al., 1997). Als Arzneistoff verwendeten Alyautdin et al. (1995) ein Leu-Enkephalin-Analogon und Opioid-Rezeptor-Agonisten Dalargin mit zentral analgetischer Wirkung. Diese Substanz ist nach intravenöser Verabreichung nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, so daß selbst hohe Dosen von 20mg/kg KM zu keinem Effekt führten (Kalenikova et al., 1988). Mit Hilfe Polysorbat 80 modifizierter PBCA-Partikeln als Träger für Dalargin konnte ein dosisabhängiger analgetischer Effekt ("tail flick test") nachgewiesen werden. Keine Analgesie wurde mit den einzelnen Komponenten (PBCA-Nanopartikel, Polysorbat 80, Dalargin) oder Gemischen aus zwei oder allen Komponenten erzielt. Diese Ergebnisse konnten von Schröder und Sabel (1996) mit dem "hot plate test"

bestätigt werden. In weiteren Studien konnten andere, nicht-Blut-Hirn-Schranken-gängige Arzneistoffe (Tubocurarin und Loperamid) mit demselben Trägersystem ins Gehirn transportiert werden (Kreuter et al., 1995; Alyautdin et al., 1997). Kreuter et al. (1995) vermuteten eine endozytotische Aufnahme in bzw. einen transzytotische Transport der Partikel durch die Endothelzellen der Hirnkapillaren. Lück (1997) konnte mit Hilfe der zweidimensionalen-Gelelektrophorese auf der Oberfläche, von mit Polymeren der Polysorbit-Reihe überzogenen PBCA-Partikeln eine präventielle Adsorption (13,9-29,7% der gesamt adsorbierten Proteinmenge) von APO E finden. Für dieses Apolipoprotein wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Rezeptoren im Gehirn und an der Blut-Hirn-Schranke beschrieben (Zheng et al., 1994; Tooyama et al., 1995; Zlokovic et al., 1996). Lück (1997) schlußfolgerte daraus eine Beteiligung von APO E am erhöhten Transport der Partikel durch die Blut-Hirn-Schranke. Kreuter und Alyautdin (1998) versuchten dies *in vivo* mit APO E-präadsorbierten und mit Dalargin-beladenen PBCA-Partikeln nachzuweisen. Er konnte 15 Minuten nach der Applikation einen analgetischen Effekt (44% des max. möglichen Effekts) bei der Maus ("tail flick test") erzielen. Dies wurde von den Autoren als ein starkes Indiz für die Beteiligung von APO E am erhöhten Transport der Partikel durch die Blut-Hirn-Schranke gewertet. Ein eindeutiger Beweis eines APO E-Rezeptor-vermittelten Transportes der PBCA-Partikel muß allerdings noch erbracht werden.

#### **2.3.4.3 Weitere Einsatzgebiete**

Der Einsatz nanopartikulärer Trägersysteme in weiteren Gebieten, wie

- der Bekämpfung von:
  - Infektionskrankheiten (Leishmaniose (Paul et al., 1998))
  - entzündlichen Erkrankungen (Arthritis (Illum et al., 1989))
  - AIDS (Schäfer et al., 1992)
- der Einsatz als
  - Carrier z.B. für:
    - Enzyme (L-Asparaginase gegen akute Lymphoblastische Leukämie (Gaspar et al., 1997))
  - Impfstoffadjuvanz (Kreuter u. Liehl, 1981)
  - Gastroprotektivum (Ammoury et al., 1991)
  - Depotform bei Augenerkrankungen (Glaukomtherapie (Zimmer et al., 1994))

werden untersucht, sollen aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher besprochen werden.