

**Die liposomale Targetierung der Aminopeptidase N an
angiogenetisch aktiven Endothelzellen als
möglicher neuer Therapieansatz**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Britta Jacke

geb. am 29.04.1974 in Halle / Saale

Gutachter /in:

1.Prof. Dr. G. Bendas

2.Prof. Dr. A. Langner

3.Prof. Dr. A. Fahr

Halle / Saale, 09.07.08

urn:nbn:de:gbv:3-000013970

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013970>]

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Theoretischer Teil	4
2.1.	Tumorerkrankungen und deren Therapie	4
2.2.	Angiogenese	5
2.2.1.	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung.....	5
2.2.2.	Mechanismen der Angiogenese bei Tumoren.....	6
2.2.3.	Antiangiogenese.....	9
2.2.4.	Endotheliales Targeting.....	12
2.3.	Liposomen als Arzneistoffcarrier	14
2.3.1.	Liposomen und ihr therapeutisches Potential.....	14
2.3.2.	Liposomen und ihre Wechselwirkungen mit Zellen.....	18
2.3.3.	Liposomen und ihr Potential als Krebstherapeutikum.....	20
2.3.4.	Liposomales endotheliales Targeting bei Tumorerkrankungen.....	25
2.4.	Aminopeptidase N	28
2.4.1.	Vorkommen, Struktur und Eigenschaften.....	28
2.4.2.	APN bei Metastasierung und Angiogenese.....	29
2.5.	Ziele meiner Arbeit	32
3.	Material und Methoden	37
3.1.	Verwendete Substanzen	37
3.2.	Darstellung des Lipidanker-Peptid-Konjugats	38
3.2.1.	Darstellung des Lipidankers N-Glut-PE (Ether).....	38
3.2.2.	Kopplung des Lipidankers N-Glut-PE (Ether) an das zyklische Peptid CNGRC.....	40
3.3.	Liposomen	43
3.3.1.	Herstellung der Liposomen.....	43
3.3.2.	Größenbestimmung.....	44
3.3.3.	Fluoreszenzmarkierung.....	45
3.3.4.	Liposomenstabilität.....	45
3.3.5.	Bestimmung des Peptidgehalts.....	46
3.3.6.	Bestimmung des Phospholipidgehalts.....	47
3.4.	Zellkultivierung	48
3.4.1.	Gewinnung humaner Nabelschnurendothelzellen.....	48
3.4.2.	Tumorzelllinien.....	49
3.5.	In vitro Bindungsstudien	50

3.5.1. Versuche mit mikroskopischer Auswertung.....	50
3.5.2. Versuche mit Auswertung am Fluoreszenz-Plattenreader.....	51
3.6. Internalisierungsstudien	52
3.6.1. Quantitative Untersuchungen	52
3.6.1.1. Modifizierte Dithionit-Methode	52
3.6.1.2. Verwendung des Enzyms PRONASE.....	53
3.6.2. Qualitative Internalisierungsuntersuchungen	54
3.6.2.1. Inhibierung aktiver Transportprozesse durch Kaliumentzug / hypotones Medium	54
3.6.2.2. Konfokale Mikroskopie / Endozytoseuntersuchung	54
3.7. In vitro Angiogenese Assay	55
3.7.1. Vorversuch MTT-Test	55
3.7.2. In vitro Sprouting Assay.....	56
3.8. PET-Untersuchungen.....	58
3.9. Untersuchungen an der CAM	59
3.10. In vivo Mausmodell	61
4. Ergebnisse und Diskussion.....	64
4.1. Darstellung APN-gerichteter Liposomen	64
4.1.1. Darstellung des Lipidanker-Peptid-Konjugats	66
4.1.2. Charakterisierung der mit CNGRC bzw. CARAC funktionalisierten Liposomen...	68
4.2. In vitro Targetierungsuntersuchungen mit den funktionalisierten Liposomen	72
4.2.1. Bindungsuntersuchung am Mikroskop.....	72
4.2.2. Quantifizierung und Optimierung der Bindung im Zellmodell.....	74
4.3. Internalisierungsuntersuchungen	82
4.3.1. Quantitative Internalisierungsstudien	83
4.3.2. Qualitative Internalisierungsstudien	92
4.4. Nutzung von Inhibitoren der Aminopeptidase N zur Einflussnahme auf die Gefäßneubildung im in vitro Angiogenese-Assay	97
4.5. Nutzung der Positronen-Emissions-Tomographie für Targeting- Untersuchungen	103
4.5.1. Herstellung und Charakterisierung der APN-gerichteten Liposomen entsprechend den Anforderung an die PET	105
4.5.2. Untersuchung des Liposomenverhaltens in tumortragenden Mäusen mittels PET..	108
4.6. In vivo nahe Untersuchungen am Modell der Chorionallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis	110

4.6.1. Der CAM-Assay als Grundlage für Targetinguntersuchungen mittels APN-funktionalisierter Liposomen.....	111
4.6.2. Untersuchung der funktionellen Beeinflussung der Angiogenese im CAM-Tumor-Modell	117
4.7. In vivo Targetinguntersuchungen mittels Tritium markierter Liposomen	120
5. Zusammenfassung.....	127
6. Literaturverzeichnis.....	130

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ab	Antikörper
ala	Alanin
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
APN	Aminopeptidase N / CD13
ARA	Ala-Arg-Ala
arg	Arginin
asn	Asparagin
Boc	t-Butyloxycarbonyl
BOP	(Benzotriazol-1-yloxyl)tris(dimethylamino) phosphoniumhexafluorophosphat
BSA	Bovine Serum Albumine
CAM	Chorionallantoismembran
CBQCA	3-(4-Carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyd
CD 13	Cluster of Differentiation 13 = APN
6-CF	6-Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterol
CARAC	Cys-Ala-Arg-Ala-Cys
CNGRC	Cys-Asn-Gly-Arg-Cys
cpm	counts per minute
cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DiO	3,3'-Diocetadecyloxycarbocyaninperchlorat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTA	Diphtherie Toxin A
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
ECGM	Endothel Cell Growth Medium
ECM	extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR-effect	Enhanced Permeability and Retention effect

ESI-MS	Elektrospray Ionisation – Massenspektrometrie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FGF	Fibroblast Growth Factor
¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluorodeoxyglucose
FKS	Fötales Kälberserum
Flt	FMS-like tyrosin kinase (Stammzellwachstumsfaktor)
gly	Glycin
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	Human Epidermal growth factor Receptor (Unterfamilie von EGFR)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IL-4	Interleukin 4
IFN7	Interferon 7
LDL	Low Density Lipoprotein
LSM	Laser Scanning Microscope
LUV	Large Unilamellar Vesicle
MDR	Multi Drug Resistance
MLV	Multilamellar Vesicle
MMP	Matrix Metalloproteinase
mPEG-PE	Methoxypolyethylenglycol-phosphatidylethanolamin
MTD	Maximum Tolerated Dosis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NBD-PE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2- 1,3benzoxadiazol-4-yl)
NGR	Asn-Gly-Arg
N-Glut-PE	N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-L-arginine- methylamid
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RES	Retikulo Endotheliales System
SL	Stammlösung
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SUV	Small Unilamellar Vesicle

Texas-Red-DHPE	1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, triethylammonium salt
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TFA	trifluor acetic acid
TRIS	2-Amino-(hydroxymethyl)-aminoethan
Trt	Trityl-(Schutzgruppe)
Triton-X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tyr	Tyrosin
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phospatidylethanolamin
PEG	Polyetylenglycol
PET	Positronen Emissions Tomographie
PCS	Photon Correlation Spektroskopie
PRONASE	Mixtur von Proteinasen isoliert aus <i>Streptomyces griseus</i>
RGD	Arg-Gly-Asp
ROI	Region of Interest
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

Die Palette von Wirkstoffen zur Behandlung von Tumorerkrankungen ist im Jahr 2005 um eine entscheidende Innovation bereichert worden. So wurde mit dem Wirkstoff Avastin® erstmals ein Hemmstoff der Angiogenese, d.h. der Neubildung von Blutgefäßen in soliden Tumoren, zugelassen. Dieses neue Therapieprinzip zur Bekämpfung solider Tumoren eröffnete Patienten weitere Hoffnung auf ein längeres Überleben. Mittlerweile ist dieser Wirkstoff nicht nur zur first-line Therapie von metastasierenden Kolon- und Rektumkarzinomen zugelassen, sondern es folgte die Zulassung zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms sowie im September 2007 die Zulassung zur Therapie des metastasierten, rezidivierenden Bronchialkarzinoms [1]. Für diese Innovation wurden in den letzten Jahren auch zahlreiche Preise und Auszeichnungen vergeben [2]. Diese Entwicklung zeigt den großen Bedarf an neuartigen, wirksamen Arzneimitteln zur Krebsbehandlung, da Tumorerkrankungen mittlerweile die zweithäufigste Todesursache in Deutschland darstellen. Die klassische pharmakotherapeutische Behandlung von Tumoren basiert bisher auf Zytostatika. Diese Behandlung bedingt oftmals hohe Dosen für eine ausreichende Wirksamkeit und damit verbunden eine Reihe von erheblichen Nebenwirkungen bei mäßigem Heilungserfolg. Ursache dafür ist das unspezifische Schädigen aller sich teilenden Zellen durch Chemotherapeutika bzw. das mangelnde Ansprechen dieser Pharmaka aufgrund sich ausbildender Resistenzen der Tumorzellen.

Teilweise können diese Probleme durch sog. Drug Delivery Systeme überwunden werden. Mit solchen Carriern soll ein direkter Transport des Arzneistoffs an den Ort des Krankheitsgeschehens, verbunden mit einer Reduktion von Effekten an gesunden Zellen des Organismus erreicht werden. Als Wirkstoff - Transportvehikel der Drug-Delivery-Systeme haben sich seit den 70-er Jahren Liposomen etabliert. Diese eignen sich aufgrund ihrer universellen Beladbarkeit mit sowohl lipophilen als auch hydrophilen Wirkstoffen. Ihre Zielspezifität erhalten sie durch Bindung unterschiedlichster Liganden, z.B. von Antikörpern oder Peptiden auf ihren Oberflächen [3].

Die Tumorentstehung ist ein vielschichtiger und zum Teil lang andauernder Prozess. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass der Primärtumor sein Umfeld in besonderer Weise verändern muss, um überleben zu können. Neben verschiedenen Mechanismen zum Unterlaufen einer Immunantwort gehört die Fähigkeit, sich durch neu aussprossende Blutgefäße zu versorgen [4]. Zu diesem Zweck produzieren Tumorzellen Wachstumsfaktoren, die das Gefäßwachstum

aus bestehenden Gefäßen des Organismus stimulieren. Durch diese sog. Angiogenese ist es dem Tumor erst möglich, eine Größe von mehr als wenigen Millimetern zu überschreiten. Beim gesunden Erwachsenen ist dagegen Angiogenese ein eher seltenes Phänomen. Neben zyklusbedingten Veränderungen im Endometrium und Ovar kommt es nur im Rahmen der Wundheilung zur Angiogenese. Damit stellt die Hemmung der Tumorzell-induzierten Angiogenese einen attraktiven und selektiven Angriffspunkt für eine Tumorthherapie dar. Von Vorteil ist dabei ein zu erwartender Amplifizierungseffekt, da mit der Störung der Gefäßbildung der gesamte Tumor in seinem Wachstum erreicht und gestört wird. Ein weiterer entscheidender Vorteil der Hemmung der Angiogenese gegenüber konventioneller Chemotherapie ist, dass Endothelzellen genetisch stabiler und meist nicht maligne transformiert sind und damit keine Resistenzentwicklungen zu erwarten sind. Die proliferierenden Endothelzellen unterscheiden sich dabei von den normalen Endothelzellen in ihrer Stoffwechselaktivität und in der Exprimierung spezieller Oberflächenepitope, die als Rezeptoren für bestimmte Wachstumsfaktoren oder Signalmoleküle (z.B. VEGF, Matrixmetalloproteinasen) dienen. Durch Nutzung dieser Epitope als Targets für die Tumorthherapie eröffnet sich die Möglichkeit des kausalen Angriffs auf endothelialer Ebene. Arzneistoffe können so zielgerichtet zum Ort der Angiogenese transportiert werden.

Bei der Zielstruktur für unsere Untersuchungen lag unser Hauptaugenmerk auf der Amino-peptidase N (APN), von welcher bekannt ist, dass sie auf angiogenetisch aktivem Endothel der Tumorgefäße überexprimiert wird. Außerdem wird APN eine maßgebliche Rolle bei der Tumorangiogenese, -proliferation und -migration zugeschrieben. Obwohl APN auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird, ist für das Targeting von großer Bedeutung, dass nur endotheliale APN, nicht aber monozytäre oder epitheliale APN die NGR- Peptidsequenz (Asparagin-Glycin-Arginin) bindet. Die Amino-peptidase N stellt somit ein Target zum selektiven Erreichen des angiogenetisch aktiven Endothels dar. Ein weiterer Vorteil liegt in der Expression von APN auf der luminalen Seite von Gefäßendothelien, wodurch systemisch verabreichte Arzneistoffe oder Liposomen direkt ihr Zielmolekül erreichen können.

Daraus ergeben sich zwei verschiedene therapeutische Ansatzpunkte. Einerseits könnte man über eine gezielte Beeinflussung der APN Einfluss auf die Angiogenese nehmen, andererseits ist bei der Nutzung als Target ein zielgerichteter Transport von angiogenetisch hemmenden oder zytostatisch wirksamen Arzneimitteln denkbar.

Als Transportvehikel für einen APN-gerichteten Arzneistofftransport bieten sich dabei mit NGR-Peptid funktionalisierte Liposomen an.

Generelles Ziel dieser Arbeit ist somit die liposomale Targetierung von angiogenetisch aktiven Endothelzellen über APN unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen, um perspektivisch hemmend in die Gefäßneubildung und das Tumorwachstum einzugreifen.

Ein Teilziel bestand in der Herstellung und Charakterisierung von APN gerichteten Liposomen als Drug Targeting Vehikel und Testung ihrer Bindungs- und Aufnahmefähigkeit *in vitro* an isolierten humanen Endothelzellen bzw. Krebszellen. Aufbauend darauf soll die Eignung der APN zur Beeinflussung der Angiogenese im Zellmodell bzw. an der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis getestet werden. Der dritte Teil dieser Arbeit bestand in der Übertragung der gewonnenen *in vitro* Erkenntnisse auf die Targetierung des Tumorendothels im Tiermodell.

Die Nutzung des vaskulären Epitops APN als Targetstruktur zur Anreicherung von Arzneistoffvehikeln am Tumorendothel ist eine weitere innovative Perspektive zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen.

2. Theoretischer Teil

2.1. Tumorerkrankungen und deren Therapie

Krebs stellt derzeit nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache dar. Die Zahl der Neuerkrankungen allein in Deutschland wird vom Robert-Koch-Institut für das Jahr 2002 mit 218.000 Männern und 206.000 Frauen erhoben. Etwa 200.000 Menschen jährlich sterben in Deutschland an den Folgen der Erkrankung und etwa 5 Millionen Menschen leben mit Krebs in Deutschland. Die häufigste Krebsart ist bei Frauen Brustkrebs und bei Männern Prostatakrebs [5].

Obwohl sich in den vergangenen Jahrzehnten das Wissen über die molekulare Entstehung der Tumorerkrankungen enorm erhöht hat, ist der Einfluss auf die Therapie bislang gering. Die drei klassischen Säulen der Tumorthherapie stellen Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie dar. Die Chirurgie stellt fast immer, wenn möglich die erste Wahl der Behandlung dar. Die Qualität dieses hochselektiven Eingriffs entscheidet über Prognose des Patienten, ist aber limitiert bei zu fortgeschrittenem Tumorstatus und bei Metastasen. Bei der Strahlentherapie versucht man mit Röntgen- oder Gammastrahlung die Tumorzellen abzutöten. Chirurgie und Strahlentherapie sind meist nur im Frühstadium bei soliden Tumoren erfolgreich. Wenn sich Metastasen gebildet haben, ist meist eine Chemotherapie unumgänglich, aber nur in 20 % bis 25 % der Fälle wirksam [6]. Die klassische Chemotherapie wirkt bevorzugt auf proliferierende Zellen zytostatisch, wodurch sie neben einer Wirkung an den sich teilenden Tumorzellen auch alle anderen regenerativen Gewebe beeinflusst, was dann zu starken Nebenwirkungen führt. Langzeitnebenwirkungen in Form von Leukämie, Myelodysplasie oder Sekundärtumor können durch Chemotherapien auftreten, da Zytostatika selbst meist teratogen, mutagen und kanzerogen wirken. In den letzten Jahren wurden die Standardmethoden weiter verbessert, gerade Nebenwirkungen können besser gelindert werden, aber ein wirklich wirksames Bekämpfen dieser Volkskrankheit gelingt nicht.

Es gibt deshalb die zunehmende Suche nach Alternativen, neuen Strategien und individualisierten Therapien, wobei v.a. neue diagnostische Methoden zur Anwendung kommen. So werden bei verschiedenen Krebsarten der Rezeptorstatus oder andere tumorbiologische Parameter ermittelt und danach die weitere Therapie bestimmt. Beispielsweise erfolgt beim Mammakarzinom die Therapie mit Aromatasehemmern nur bei

Östrogenrezeptor(ER)-positiven Tumorzellen. Eine Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) ist nur bei Mammakarzinomen mit einem Übermaß an HER/2neu-Rezeptoren (humaner epidermaler Wachstumsfaktor) auf der Zellmembran Erfolg versprechend [7]. Ebenso ist eine Therapie mit dem Kinaseinhibitor Erlotinib (Tarceva[®]) nur angezeigt bei HER-1 (EGFR-1) exprimierenden Tumorarten, wie das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom, für das Tarceva[®] im Jahr 2005 seine Zulassung erhielt [8].

Bei 60 % - 80 % der Kolorektalkarzinome exprimieren die Tumorzellen EGF-Rezeptoren (epidermal growth factor), der Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) bindet spezifisch daran und kann Wachstum unterbinden [9].

Ein weiterer verwendeter individueller Antikörper ist Rituximab (MabThera[®]) bei Behandlung des niedrig malignen Non Hodgkin-Lymphom. Der Antikörper bindet an das CD20-Antigen der B-Zellen, welche bei dieser Erkrankung fast alle von der Entartung betroffen sind. Durch diese Bindung wird das körpereigene Immunsystem aktiviert und es kommt zur Eliminierung der B-Zellen [10].

Ebenso wirkt Alemtuzumab (MabCampath[®]) als Antikörper bei chronisch lymphatischer Leukämie gegen CD52 auf Leukozyten. Nach dem Andocken löst sich der Antigen-Antikörper-Komplex auf, und die entartete Blutzelle geht zu Grunde [11].

Dies sind alles Beispiele für eine erfolgreiche Suche nach selektiveren Wegen zur Tumorbekämpfung, um die Erkrankung individuell an der Ausbreitung zu hindern. Nachteilig ist, dass eine Anwendung dieser Antikörper immer nur für bestimmte Tumorspezies wirksam ist, und für jede Weiterentwicklung neue spezifische biochemische Marker der jeweiligen Tumorart gefunden werden müssen.

Eine weitere Idee war schon früh, die Versorgung des Tumors zu kappen, nachdem man bereits 1971 erkannt hatte, dass Tumoren ohne Blutzufuhr über Gefäße nicht wachsen können [12]. Die Bekämpfung des Tumors über die Beeinflussung seiner Gefäße (Beeinflussung der Angiogenese) stellt damit eine aussichtsreiche therapeutische Strategie dar.

2.2. Angiogenese

2.2.1. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung

Das Wachstum neuer Blutgefäße findet physiologischerweise am meisten in der Embryonalentwicklung statt. Dabei entwickelt sich aus Endothelzell - Vorläuferzellen, den

Angioblasten, das primäre Gefäßgeflecht (Vasculogenese), welches dann differenziert und durch Sprouting und Bildung von Verästelungen aus existierenden Kapillaren neu entsteht (Angiogenese). Im gesunden Erwachsenen gehören die Endothelzellen neben Nervenzellen zu den langlebigsten Zellarten. Physiologische Angiogeneseprozesse spielen nur bei der Wundheilung und bei Frauen während der Menstruation zum Aufbau des Endometrium eine Rolle. Durch entsprechende pro- und antiangiogene Faktoren werden diese Prozesse gesteuert, um dann wieder in eine ausgeglichene Balance zurückzufinden.

Eine zentrale Rolle nimmt die Angiogenese bei einer Reihe von pathologischen Prozessen ein, z.B. bei ophtalmologischen Krankheiten, wie der altersbedingten „feuchten“ Makuladegeneration. In der Makula bewirkt die Sekretion angiogener Faktoren eine Bildung von neuen Blutgefäßen in der Netzhaut, welche letztendlich zur akuten Sehschwäche bis zur Erblindung führen [13]. Ebenso wird der Einfluss der Angiogenese bei Entzündungskrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis diskutiert [14,15]. Eine Schlüsselrolle nimmt die Angiogenese beim Wachstum und der Metastasierung von soliden Tumoren und einigen Leukämieformen ein.

Bereits 1971 entdeckte Folkman (Kinderchirurg aus Boston) das Prinzip der Angiogenese [12]. Er beobachtete einen Wachstumsstillstand und ein Ausbleiben der Gefäßbildung von Tumorzellen, die in isolierte Organe implantiert wurden. Ein Tumorstillstand ist also nur durch Einsprossung von Kapillaren und damit Versorgung möglich. Tumoren mit eigener Gefäßversorgung wachsen schneller und aggressiver [16]. Außerdem korreliert die Angiogenese mit der Prognose von Patienten, nachgewiesen z. B. beim Mammakarzinom [17,18] oder kolorektalen Karzinom [19].

Seitdem hat sich das Wissen über die Rolle der Angiogenese drastisch erhöht, ihre essenzielle Rolle bei Tumorstillstand und –metastasierung wurde durch zahlreiche Arbeiten von Forschergruppen bestätigt und ihre Grundlagen erforscht.

2.2.2. Mechanismen der Angiogenese bei Tumoren

Die Erkenntnis, dass Tumorstillstand nur mit Angiogenese möglich ist, wurde von Forschern schnell als möglicher Ansatz zur Unterdrückung des Tumorstillstands erkannt. Angriffspunkte zur Inhibierung ergaben sich aus dem komplexen Prozess der Angiogenese, der mittlerweile in weiten Teilen bekannt ist.

Maligne, entartete Zellen können oft jahrelang scheinbar schlafend im Gewebe vorliegen (Tumor dormancy). Sie ernähren sich dabei von Nährstoffen, die von benachbarten Blutgefäßen durch das Gewebe diffundieren. Durch den Einfluss von Onkogenen erfolgt dann die überschießende Expression proangiogener Faktoren oder die Reduktion endogener Angiogenese-Inhibitoren. Daraufhin wird das Angiogeneseprogramm gestartet, was als ersten Schritt eine Aktivierung der Endothelzellen zur Folge hat. Die Umwandlung vom „schlafenden Zellverband“ in einen aktivierten, wachsenden Zellverband wurde von Folkman als „Angiogenic switch“ bezeichnet [Abb.2-1]. Die Theorie geht davon aus, dass unter ruhenden Umständen eine feine Balance zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese besteht (angiogenic balance). Veränderungen in diesem Gleichgewicht aktivieren den Schalter, d.h. entweder durch Abnahme der Inhibitoren (z.B. Interferon, Angiostatin) oder durch Zunahme der Aktivatoren (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor und Basic Fibroblast Growth Factor) wird die Angiogenese auf „EIN“ umgestellt und damit erfolgt eine Induktion des angiogenetischen Prozesses [20].

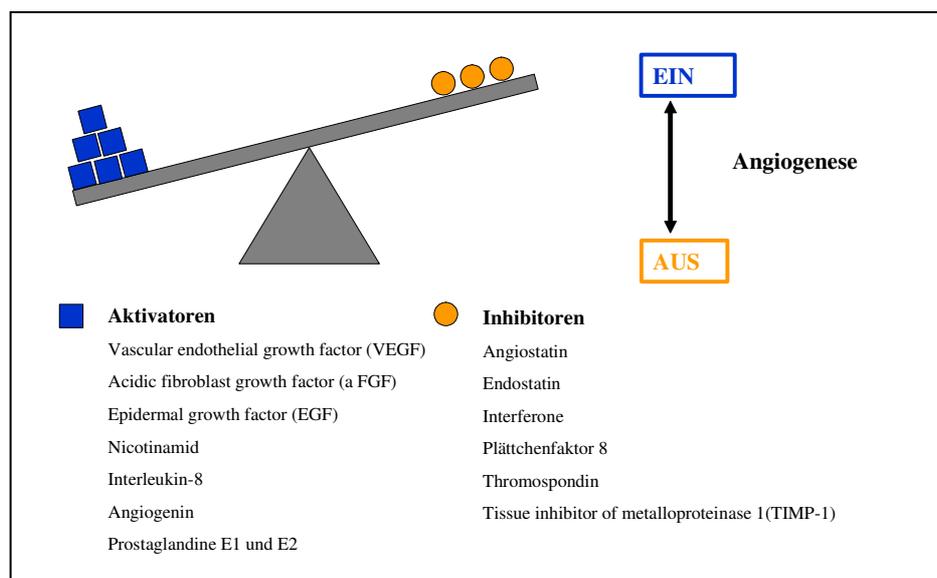
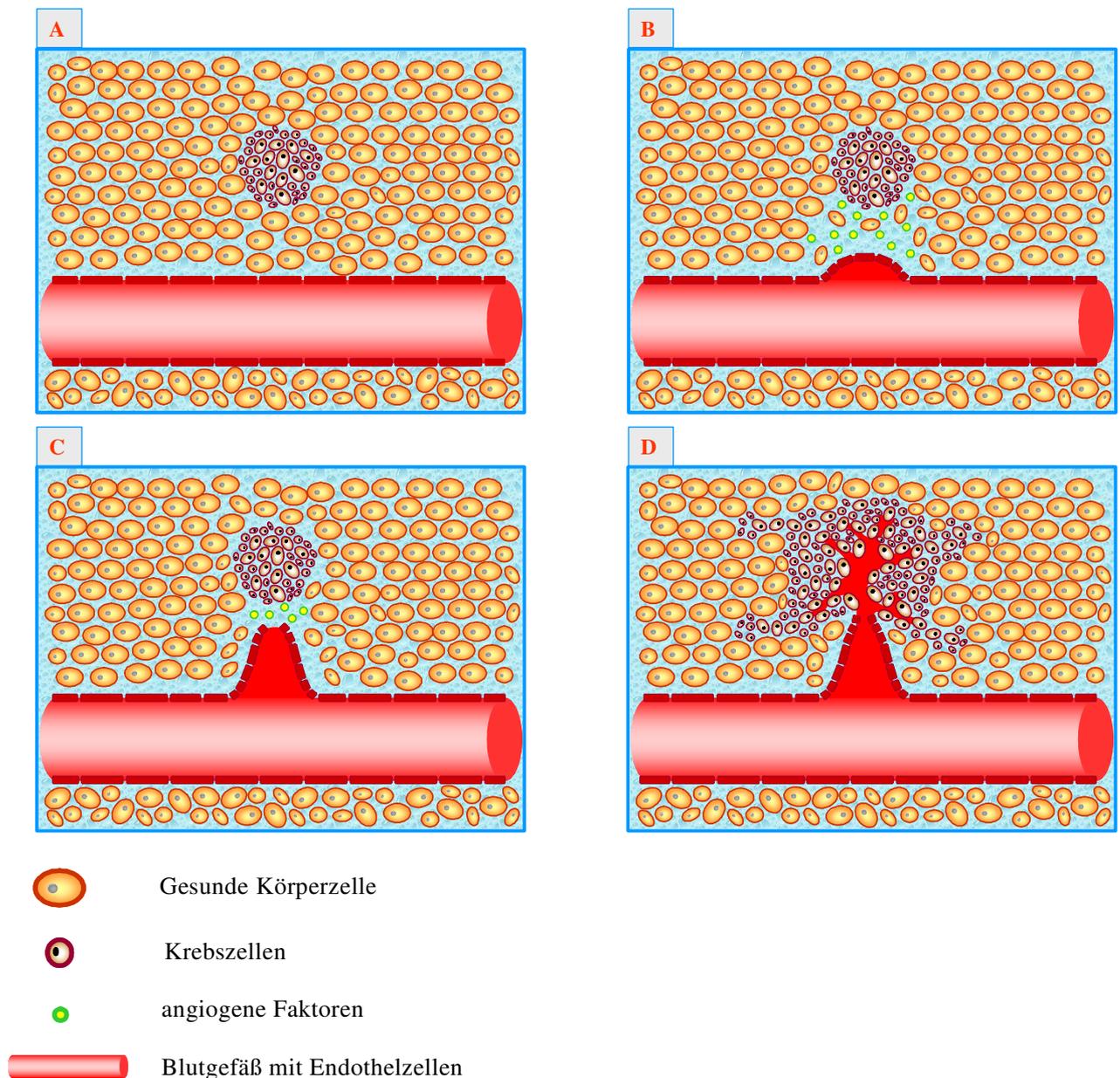


Abb.2-1: „Angiogenic switch“ [20]

Eine Kaskade von Prozessen, ausgelöst durch lokale Hypoxie schließt sich an. Eine Schlüsselrolle hat dabei VEGF, welches von vielen Tumoren direkt sezerniert werden kann. Dies führt zu Aktivierung der Endothelzellen, da diese VEGF Rezeptoren an der Oberfläche tragen. Die so aktivierten Endothelzellen verändern sich, was sich im ersten Schritt durch eine Aufweitung und erhöhte Durchlässigkeit bemerkbar macht. Das ermöglicht die Extravasation

von proteolytischen Enzymen, dazu gehören z.B. Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2). Die Basalmembran des Ursprungsgefäßes wird abgebaut und eine provisorische extrazelluläre Matrix (ECM) erzeugt, entlang dieser die Endothelzellen migrieren und schließlich auch in Richtung Stimulus proliferieren. Unter dem Einfluss selbst exprimierter Adhäsionsmoleküle, z.B. Integrine (v.a. $\alpha_v\beta_3$ u. $\alpha_v\beta_5$) binden sie dann extrazelluläre Matrixproteine, wie Vitronectin. Schließlich formieren sich die Endothelzellen zu einem neuen Lumen und fusionieren mit einem durchbluteten Gefäß. Anschließend werden Perizyten rekrutiert, die dann ein umgebendes Stützgewebe formen. Das Ergebnis ist ein dreidimensionales, funktionierendes Gefäßnetz, welches die Tumorversorgung ermöglicht [21,22].



- A** schematische Darstellung eines Tumorzellaggregats, umgeben von extrazellulärer Matrix (ECM), „schlafender Zellverband“
- B** Stimulation der Angiogenese durch tumorinduzierte Signalproteine, wie z.B. VEGF
- C** Migration und Proliferation der Endothelzellen aus bestehenden Gefäßen in Richtung Stimulus (Tumor)
- D** Etablierung eines funktionellen Gefäßsystems, Versorgung des Tumors und damit ist das Wachstum ermöglicht

Abb. 2-2: Kaskade der Tumorangio-genese

2.2.3. Antiangiogenese

Das erlangte Wissen über die molekularen Hintergründe, Rezeptoren und Signalkaskaden bzw. die Erkenntnisse, dass Angiogenese kaum beim gesunden Erwachsenen vorkommt, aber ein Tumor die Gefäßneubildung zum Wachstum braucht, eröffnete den Weg zu einem neuen Therapieansatz. Prinzip dessen ist es, die Neubildung der Gefäße zu verhindern und den Tumor damit gleichsam auszuhungern. Der Angriff an den Endothelzellen des Tumor-versorgenden Gefäßsystems hat entscheidende Vorteile gegenüber der herkömmlichen Beeinflussung der Tumorzellen selbst mit zytostatischen Stoffen. Die Tumorzellen sind maligne transformiert, genetisch instabil und eignen sich dadurch sehr schnell Resistenzen an. Beispielhaft dafür sind MDR-Proteine, welche die Krebszelle dazu befähigen, die Zytostatika wieder auszuschleusen [24]. Dies führt zur massiven Erhöhung der Therapiedosen bis zur MTD (maximum tolerated doses) und damit auch zu erheblichen Nebenwirkungen. Aufgrund fehlender Zielspezifität gelangen ca. 5-10% der Dosis in normale Körperzellen [25].

Im Gegensatz dazu gelten Endothelzellen als genetisch sehr stabil und zeigen auch nach wiederholter Arzneistoffapplikation keine Tendenz zur Resistenzbildung [26]. Des Weiteren herrscht im Tumor ein hoher interstitieller Druck, der das Blut- und Lymphsystem zusammendrückt und damit ein Eindringen der Zytostatika vom Blutgefäß in das Tumorgewebe erschwert [27]. Außerdem ist das Gefäßsystem des Tumors strukturell und funktionell anomal, die Gefäße sind undicht und haben ein willkürliches und ungeordnetes Verbindungsmuster, was eine räumliche und temporäre Heterogenität des Blutflusses und damit schlechtes Erreichen des Tumors mit Zytostatika zur Folge hat [28,42].

Endothelzellen dagegen sind für alle applizierten Stoffe direkt aus der Blutbahn ohne nochmaliges Überwinden von Barrieren leicht erreichbar. Zudem kann man mit einer

Potenzierung der Wirkung rechnen, da ganze Tumorzellverbände von einzelnen Gefäßen abhängen und somit beeinflusst werden können [29,30].

Der Prozess der Angiogenese bietet eine Reihe von Möglichkeiten, therapeutisch im Sinne einer antiangiogenetisch wirksamen Therapie einzugreifen. Das Prinzip besteht darin, einzelne oder mehrere Kaskadeschritte zu blockieren. Prinzipiell kann die Gefäßneubildung an jeder Stelle des Gefäßaufbaus gestört werden. Daher werden derzeit eine Fülle von Stoffen auf antiangiogene Eigenschaften untersucht. Das amerikanische National Cancer Institut (NCI) veröffentlicht auf seiner Homepage den aktuellen Stand der Forschungen auf diesem Gebiet. Derzeit befinden sich ca. 50 verschiedene Substanzen in klinischen Prüfungen. Sie unterscheiden sich hinsichtlich folgender Wirkmechanismen und Ansatzpunkte:

1. Stoffe, die den Matrixabbau inhibieren (z.B. Metalloproteinaseinhibitoren, Suramin)
2. Stoffe, die die Proliferation der Endothelzellen direkt inhibieren (z.B. Thalidomid)
3. Inhibitoren proangiogenetischer Faktoren (z.B. Anti-VEGF Antikörper)
4. Integrinantagonisten
5. Stoffe mit unspezifischem Wirkungsmechanismus

Zugelassen wurde beispielsweise im November 2003 der Tyrosinkinaseinhibitor Glivec[®] (Imatinib) [31]. Im Januar 2008 folgte Tasigna[®] (Nilotinib), ein Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation bei Resistenzentwicklung gegen Glivec[®] [32]. Das Wirkprinzip eines Tyrosinkinaseinhibitors beruht auf der Verhinderung der intrazellulären Phosphorylierung bestimmter Proteine, welche bei der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF eine wichtige Rolle spielen. Mit Tarceva[®], Sutent[®] und Sprycel[®], zugelassen im Jahr 2005 bzw. 2006 stehen weitere Tyrosinkinaseinhibitoren für verschiedene onkologische Erkrankungen zur Verfügung. Die verschiedenen Inhibitoren zeigen ein breites Spektrum bezüglich Spezifität und Affinität zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen. (z.B. VEGF 1-3, PDGF, Kit.). Dadurch werden nicht nur Signalwege der Angiogenese, sondern oft auch solche blockiert, die für die generelle Proliferation der Tumorzellen verantwortlich sind [33-35].

Mit Nexavar[®] (Sorafenib) steht neben Sutent[®] seit Juli 2006 ein weiterer Multikinaseinhibitor zur Behandlung vom fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom und Leberzellkarzinom zur Verfügung. Sorafenib blockiert sowohl die Raf-Kinase (zentrale Schaltstelle für die Zellteilung) als auch die Tyrosinkinasen des VEGF-Rezeptors der Blutgefäße sowie weitere

Tyrosinkinasen und wirkt deshalb auch antiproliferativ und Angiogenese hemmend gleichzeitig [36].

Die bisher erfolgreichste Substanz in der reinen Angiogenesehemmung zur Tumorbekämpfung ist Bevacizumab (Avastin[®]), welches im Januar 2005 die EU-Zulassung zur first-line-Behandlung von Patienten mit metastasiertem Kolon-oder Rektumkarzinom erhielt. Als monoklonaler Antikörper von VEGF fängt Bevacizumab VEGF im Blutstrom ab und komplexiert diesen Wachstumsfaktor. Dies hat zur Folge, dass VEGF nicht an seinen Rezeptor binden kann, wodurch die Stimulation der Angiogenese verhindert wird. Zu einer direkten Interaktion zwischen Bevacizumab und der Tumorzelle oder der Endothelzelle kommt es nicht. Die durchgeführte große Zulassungsstudie an Patienten mit kolorektalem Karzinom erbrachte, dass bei Kombination von 5-Fluouracil / Folinsäure mit Bevacizumab eine Überlebensverlängerung von fünf Monaten im Vergleich zur normalen Chemotherapie erreicht wurde. Ebenso wurde die Zeit, in der die Krankheit nicht fortgeschritten ist, um vier Monate und damit wesentlich verlängert. Die Nebenwirkungen, v.a. Bluthochdruck waren insgesamt gut beherrschbar. Bevacizumab galt als Durchbruch in der Tumorthapie, da erstmals der Beweis erbracht wurde, dass Antiangiogenese ein wirksames Antitumorprinzip ist. Im Jahr 2007 wurde die Zulassung von Bevacizumab erweitert: In Kombination mit Paclitaxel wird es zur first-line-Behandlung von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom angewendet. Avastin wird weiterhin zusätzlich zu einer platinhaltigen Chemotherapie zur first-line-Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem, metastasiertem oder rezidivierendem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom angewendet [37].

Auch in der Augenheilkunde stellt die Inhibition des Wachstumsfaktors VEGF eine neue Ära der Therapie durch Antiangiogenese dar. Angewendet wird es bei der Altersbedingten Makuladegeneration (AMD), eine Augenerkrankung von der allein in Deutschland 4,5 Mio. Menschen betroffen sind [38]. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese zeigen bei der „feuchten“ AMD eine sekundäre Gefäßneubildung aus der Aderhaut, welche über die Bildung von neovaskulären Membranen zu Makulaödem und Hämorrhagien und damit zur akuten Sehschwäche bis zur Erblindung führt. Basierend auf der Erkenntnis, dass auch für diese Form der neovaskulären AMD der Wachstumsfaktor VEGF eine wichtige pathogenetische Rolle spielt [39], liegen derzeit zwei Zulassungen von VEGF-Inhibitoren für diese Erkrankung vor. 2004 wurde der Wirkstoff Pegabtanib (Macugen[®]) zugelassen, ein Aptamer, welches spezifisch an die Isoform VEGF₁₆₅ bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Rezeptor inhibiert. Im Januar 2007 wurde mit Ranibizumab (Lucentis[®]) ein

Antikörperfragment (Fab-Fragment von Bevacizumab mit zusätzlichen Punktmutationen) gegen VEGF-A zugelassen, dass den Sehverlust bei AMD nicht nur aufhalten, sondern auch rückgängig machen kann (MARINA-Studie 2006 [40] und ANCHOR-Studie 2006 [41]). Nachteil ist die aufwändige, lebenslange (intravitreale Injektion einmal im Monat) und teure (1500€/ Monat) Therapie. Bevacizumab (Avastin[®]), wie beschrieben ein Antikörper von VEGF, aus dem das Fab Fragment Ranibizumab (Lucentis[®]) hervorgegangen ist, wird im Off label-use für die gleiche Indikation als kostengünstigere Alternative verwendet.

Aus den aktuellen Zulassungen und den damit zugrunde liegenden Studienerkenntnissen reicht eine Angiogenesehemmung allein nicht aus, um das Tumorwachstum zu stoppen. Sie können aber zusätzlich zu etablierten Therapieschemen eingesetzt werden und führen so zur Verbesserung der Lebensqualität bzw. –erwartung der Erkrankten. Weiterhin zeigten Jain et al. [42] dazu mit ihren Studien, dass die Gabe von Angiogeneseinhibitoren die unausgeglichene Balance zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren wieder verbessert und dadurch eine Normalisierung des ungeordneten Blutgefäßsystems erfolgt. Als Folge dessen normalisiert sich der Blutfluss und Zytostatika können besser zum Tumor transportiert werden und die Wirksamkeit verbessert sich.

Kritisch zu bewerten sind die extrem hohen Kosten und langen Therapiezeiten, die massive (ethische) Diskussionen über die Umsetzbarkeit medizinischen Fortschritts im kostenbewussten Gesundheitssystem Deutschlands auslösen.

2.2.4. Endotheliales Targeting

Neben der beschriebenen Möglichkeit, inhibitorisch in die Angiogenesekaskade einzugreifen, besteht eine andere Option in der Nutzung des Tumorendothels als Target, um zytotoxische bzw. antiangiogenetische Stoffe mittels geeigneter Carrier Systeme gezielt zum Tumor zu transportieren. Ziel ist es dabei, durch Targetierung die Effizienz der Arzneistoffe zu erhöhen bzw. deren systemische Toxizität zu vermindern. Die gute Erreichbarkeit des Endothels im Vergleich zu den Tumorzellen selbst, sowie die Schädigung der Endothelzellen oder Hemmung deren Funktion bieten entscheidende Vorteile, um den Tumor an seiner empfindlichsten Stelle, der Versorgung zu schädigen. Eine der wichtigsten Voraussetzungen zur Verfolgung ist die Selektivität des zellulären Targets, um nicht auch gesundes Endothel mit zu schädigen. Theoretisch würde sich jedes Molekül eignen, welches nur vom Tumorendothel exprimiert wird, aber nicht im restlichen Körper vorkommt.

Die ersten molekularen Targets auf Tumorendothelien wurden im Zuge der Aufklärung des Tumorangiogeneseprozesses gefunden, beispielhaft dafür sind die α_v -Integrine [43,44] oder der VEGF-VEGFR-Komplex [45]. Die Nutzung dieser ausgewählten Targets erfolgte auf vielfältige Weise. So wurden beispielsweise erfolgreiche Studien zur targetierten Gentherapie für eine Inhibierung der endothelialen Zellfunktion bzw. der Produktion von antiangiogenetischen Proteinen durchgeführt [46].

Eine weitere Methode ist die Nutzung von (Tumor)endothelialen Targets zur Auslösung eines Verschlusses des Gefäßes, um so über die Unterbrechung des Blutflusses ein Abschneiden des Tumors von der Versorgung zu erreichen. So wurde von Dienst et al. 2005 an drei verschiedenen Xenograft-Tumor-Mausmodellen gezeigt, dass die Targetierung eines Fusionsproteins (lösliche Form von tissue factor Tf) gegen den am Tumorendothel hochexprimierten VCAM-Rezeptor selektiv zu einer intravasalen Okklusion und im weiteren Verlauf zur Tumorstillstandsbildung bis zur Tumornekrose führte [47]. Vergleichende Studien mit dem Fusionsprotein Tf und unterschiedlicher Targetierung wurden von Hu und Kollegen durchgeführt, was tatsächlich zu einer unterschiedlichen Lokalisierung der Thrombose innerhalb des Gefäßsystems führte [48].

Eine andere zukunftsweisende Strategie ist die Zerstörung des tumorversorgenden Gefäßsystems durch Targetierung von zytotoxischen Agenzien. Die Kopplung von Doxorubicin oder auch des proapoptotischen Peptides KLAKLAK mit dem RGD-Peptid, welches eine Bindungsspezifität für im Tumorendothel hochexprimierte $\alpha_v\beta_3$ -Integrine hat, zeigte *in vivo* starke Antitumoreffekte [49,50]. Borsi et al. nutzten eine ED-B genannte Domäne des Fibronectinrezeptors, welche nur während der Migration der Endothelzellen auf der extrazellulären Matrix von soliden Tumoren zu finden ist. Durch Kopplung von einem Antikörper gegen ED-B mit TNF- α , welches ein pleiotropes tumorwirksames Zytokin ist, konnte im Tumormausmodell eine Anreicherung von TNF- α im Tumor und ein Rückgang des Tumorstillstandsbildung beobachtet werden [51]. Olson und Kollegen nutzen den VEGF-Rezeptor als Target, indem sie rekombinantes VEGF an eine Form von Diphtherietoxin gekoppelt haben. Dieses VEGF-Toxin-Konjugat zeigte sich als selektiv toxisch bei Endothelzellen und hemmte die Neovaskularisierung im CAM-Assay (Chorionallantoismembran). Des Weiteren zeigte sich mit diesem Konjugat im Mausversuch eine Hemmung des Tumorstillstandsbildung, verbunden mit hämorrhagischer Nekrose [52].

Durch die direkte Targetierung des Endothels und der damit verbundenen Umgehung der Heterogenität und genetischen Instabilität der Tumorzellen zeigten sich mit den

angewendeten einfachen Arzneistoff-Ligand-Assoziaten Vorteile zur herkömmlichen Krebstherapie. Effizienter erscheint jedoch die Nutzung von Arzneistoffcarriern, z.B. Liposomen, bei denen durch Beladung eines einzelnen Vehikels mit einer Vielzahl von Wirkstoffmolekülen eine erhebliche Erhöhung des Ligand-Arzneistoff-Verhältnisses erwirkt wird und außerdem eine vielfältige Steuerung der pharmakokinetischen Eigenschaften möglich ist.

2.3. Liposomen als Arzneistoffcarrier

2.3.1. Liposomen und ihr therapeutisches Potential

Der vorangegangene Abschnitt zeigte die Bedeutung eines aktiven Targetings von Endothelzellen, daher liegt es nahe die Targeteigenschaften der angiogenetisch aktiven Endothelzellen mittels eines geeigneten Drug Carrier Systems auszunutzen. Dahinter verbirgt sich die Idee, den Arzneistoff gezielt zum angiogenetischen Gefäß zu transportieren, ohne die gleichzeitige Kontaktierung gesunder Zellen oder Gewebe. Die Eigenschaften des beförderten Stoffes treten dabei in den Hintergrund, während die Eigenschaften des Transportvehikels nun in den Vordergrund treten. Der Carrier sollte deshalb untoxisch, pharmakologisch inaktiv, metabolisierbar und aus der Zirkulation ausscheidbar sein, wenn die Transportfunktion erfüllt ist [53]. Hierfür erscheinen Liposomen besonders geeignet.

Liposomen sind Vesikel, bei denen eine hydrophile Innenphase von Lipiddoppelschichten (Bilayer) umgeben ist. Sie formen sich spontan bei Dispersion von Phospholipiden in wässrigem Medium. Ihr Aufbau ermöglicht deshalb den Einschluss von sowohl wässrigen Stoffen in der Innenphase, als auch von lipophilen Stoffen in der Lipidmembran. Abgesehen von ihrer chemischen Zusammensetzung, welche die Eigenschaften Membranfluidität, Ladungsverteilung bzw. Permeabilität beeinflussen, werden Liposomen nach ihrer Größe unterschieden. Man unterscheidet kleine (SUV, ca. 25 nm) und große (LUV, 50-200 nm) einschichtige (unilamellare) Vesikel und mehrschichtige (multilamellare) Vesikel (bis zu mehreren μm , MLV), die Dicke einer Membran beträgt ca. 4 nm.

Da Liposomen prinzipiell aus natürlichen Biomolekülen bestehen (Phospholipide, Cholesterol), sind sie nach *in vivo* Applikation bioabbaubar und nicht toxisch, obgleich bei der Applikation von Ei- bzw. Sojaphosphatidylcholin-Liposomen geringe Veränderungen der

Granulozyten-, Monozyten- und Lymphozytenkonzentrationen im Blut beobachtet wurden [54].

Obwohl Liposomen aus natürlichen Bestandteilen aufgebaut sind, stellen sie nach *in vivo* Applikation einen Fremdkörper für den Organismus dar. Schon nach kurzer Zeit werden die Liposomen vom Retikoendothelialen System (RES) erkannt (v.a. Makrophagen der Leber und Milz) und eliminiert, was zu sehr kurzen Zirkulationshalbwertszeiten von wenigen Minuten führt. Dies verhindert eine ausreichende Akkumulation am Wirkort [55]. Der Grund für die effiziente Aufnahme der Liposomen vom RES liegt in der Opsonisierung der Liposomen durch Plasmaproteine. Man hat erkannt, dass nach parenteraler Applikation die Liposomenoberfläche zunächst mit Plasmaproteinen interagiert. Besonders zu nennen sind hier bestimmte Lipoproteine (v.a. HDL), die durch Anlagerung und Lipidaustausch die Liposomenmembran destabilisieren und das Ausströmen (Leakage) von eingeschlossenem Material verursachen [56]. Zum anderen führen eben sog. Opsonine, z.B. Immunoglobuline (IgG, IgM), Komplementproteine oder Fibronectin zur Markierung der Liposomen und damit zur anschließenden effizienten Aufnahme durch Makrophagen. Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass die Stabilität von Liposomen im Plasma abhängig von Größe, Lamellarität, Lipidzusammensetzung und Temperatur ist. Es werden z.B. Cholesterolanteile von 30-50% für die Stabilität als positiv erachtet, da das Auftreten von Phasenübergängen vermindert und dadurch das Leakage drastisch vermindert wird. Die Zugabe von Cholesterol wandelt die Membran generell in eine geordnete fluide Phase über weite Temperaturbereiche und bedingt eine Stabilisierung der Membran [57]. Zur Herstellung serumstabiler Liposomen sollten reine, rigide und gesättigte Lipide verwendet werden [58]. Lipidverunreinigungen, z.B. Lysophospholipide, ungesättigte Fettsäuren und ungleiche Kettenlängen führen zur Schwächung der Bilayer und damit zu verstärkter Destabilisierung und Opsonisierung [59].

Um die Akkumulation von liposomalen Arzneistoffen am Wirkort zu erhöhen, entstand schon in den 70er Jahren die Idee der targetierten Liposomen. Durch die kovalente Bindung von Antikörpern (Immunoliposomen) und Peptiden kann die Oberfläche der Liposomen mit Bindungsstrukturen funktionalisiert werden und ermöglicht so die gezielte Anreicherung der Vesikel zum Wirkort. Der erste erfolgreiche Versuch mit Antikörper-funktionalisierten Liposomen wurde 1975 von Gregoriadis und Neerunjun veröffentlicht [60]. Danach gab es eine Reihe von Versuchen, die die Akkumulation von Immunoliposomen *in vitro* eindrucksvoll bestätigten. [61-63]. Trotz der gezeigten spezifischen Anreicherung der

Liposomen im Zellsystem *in vitro* endeten *in vivo* der Großteil der Immunoliposomen in der Leber und Milz, begründet durch die unzureichende Interaktionszeit zwischen Zielzelle und targetiertem Liposom, was einen therapeutischen Nutzen im Organismus stark einschränkte. Die o.g. Optimierung der Liposomeneigenschaften (Größe, Zugabe von Cholesterol, rigide Membranen) und die Entwicklung von Immunoliposomen führten insgesamt nicht zu therapeutisch nutzbaren Halbwertszeiten. Eine der ersten Maßnahmen zur Erhöhung der Verweildauer im Blut war deshalb eine Vorsättigung des RES mit leeren Liposomen bzw. Dextransulfat [64,65]. Jedoch erst die Einführung von Lipid-gekoppelten Polyethylenglycolketten (PEG) mit einem Molekulargewicht von ca. 1900 Da in Konzentrationen von 5 - 10 mol% führten zu einem relevanten Anstieg der Halbwertszeiten. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten Anfang der 90er Jahre den protektiven Effekt der PEG-Lipide, welche die Erkennung der Liposomen durch Opsonine abschwächen und nachfolgend eine Verlangsamung der Elimination aus dem Blut bewirken [66,67]. Diese pegylierten Liposomen, die in der Literatur auch unter dem Namen long-circulating bzw. sterically stabilized zu finden sind, ließ sich die Fa. Liposome Technology (heute Fa. Alza) unter dem Namen Stealth[®]-Liposomen patentieren. Deren Verhalten wurde nun im Detail in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten untersucht [68,69]. So zeigt sich der protektive Effekt in Abhängigkeit von der Molmasse und der molaren Konzentration des PEGs, wobei optimale Effekte bei einer Konzentration von 5 mol% erreicht wurden [70-72]. Ab einer bestimmten Konzentration findet man eine parallele Ausrichtung der PEG-Ketten an der Oberfläche der Liposomen (Bürstenmodell) [73], wodurch mit PEG 2000 eine sterische Schutzhülle von ca. 5 nm entsteht. [74, 75]. Dadurch vermindert sich die Bindung durch Opsonine und anschließende phagozytotische Aufnahme, aber auch die nicht Opsonin vermittelte Aufnahme durch Makrophagen der Leber (Kupfferzellen) [76]. Lang-zirkulierende Liposomen zeigen dosisunabhängig Eliminationskinetiken erster Ordnung und eine erhöhte Bioverfügbarkeit [68]. Die Entdeckung des Stealth[®] Effektes bewirkte zahlreiche Forschungen *in vitro* und *in vivo*, so stellte man fest, dass sich vor allem PEG-ylierte Liposomen bevorzugt in gut durchbluteten Geweben anreichern bzw. durch das aufgelockerte Endothel von Tumoren invadieren und so zu einer passiven Akkumulation im Tumor führen. Für dieses Phänomen wurde Mitte der 80er Jahre von einer Arbeitsgruppe um Matsumura und Maeda der Begriff „enhanced permeability and retention effect“ (EPR)-Effekt geprägt [79,80]. Diese Erkenntnisse hielten auch Einzug in die klinische Praxis. Nähere Ausführungen dazu in Kapitel 2.5.

Obwohl PEG der Goldstandard für die sterische Abschirmung von Liposomen bleibt, gab es zahlreiche Versuche, andere Polymere zu finden. So wurden in jüngster Zeit Liposomen beschrieben, die mit Poly[N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid], Poly-N-vinylpyrrolidon, bioabbaubaren Polymer-Lipid-Konjugaten oder Polyvinylalkoholen [81-83] hergestellt wurden. Mit diesen Präparationen wurden zum Teil ähnliche Ergebnisse wie mit PEG erhalten, keines dieser Stoffe hatte jedoch einen maßgeblichen Durchbruch bei einer therapeutischen Anwendung.

Mit den Erfolgen der enormen Zirkulationszeitverlängerung rückte ein wirkliches liposomales Drug Targeting wieder in den Vordergrund. Durch Kombination von sterischer Abschirmung und Kopplung geeigneter Zielstrukturen, z. B. Antikörpern und Peptiden war der Weg geebnet für ein Carrier System mit genügend langer Zirkulationszeit bei gleichzeitiger Bindungsspezifität. Auf der anderen Seite kann natürlich die sterische Stabilisierung Probleme bei der Wechselwirkung der gebundenen Strukturen mit dem Target ergeben. Die Abschirmung der Vesikeloberfläche durch PEG-Moleküle erschwert die Annäherung des gebundenen Liganden z.B. Antikörpers an sein Antigen. Trotzdem beweisen zahlreiche Untersuchungen, dass bei Einhaltung einer Balance zwischen sterischer Stabilisierung und ausreichender Antikörperkopplung ein zufrieden stellender Kompromiss zwischen Zirkulationszeit und Targetierung erreicht werden kann [84,85]. Weitere Versuche zeigten, dass die PEG-Kettenlänge entscheidenden Einfluss auf die Targetbindungsfähigkeit der Liposomen hat. Generell wird PEG 2000 als bester Kompromiss zwischen ausreichender Stabilisierung sowie Plasmaverweilzeiten [86] und akzeptablen Targetierungsergebnissen angesehen.

Zur Herstellung von targetierten Liposomen müssen Antikörper, Proteine oder andere Moleküle an die Liposomenoberfläche gebunden werden. Generell kann man dabei drei Hauptreaktionen unterscheiden, welche effizient und selektiv sind und zu kovalenten Bindungen zwischen Lipidanker und zu koppelnden Stoff führen: Die Reaktion zwischen einer aktivierten Carbonylgruppe und einer Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung; die Reaktion zwischen Pyridylthiol und einem Thiol unter Ausbildung einer Disulfidbrücke; die Reaktion zwischen einem Maleiminderivat und einem Thiol unter Ausbildung einer Thioetherbindung. Es gibt eine weitere nicht kovalente Methode, basierend auf der Biotin-Avidin-Technik, die zur Ausbildung einer starken Bindung führt.

Prinzipiell können innerhalb der sterisch stabilisierten targetierten Liposomen zwei Typen hinsichtlich der Lage des gebundenen Moleküls unterschieden werden. Beim Typ I werden

die Liganden mittels Lipidanker direkt an die Liposomenoberfläche gebunden, wohingegen beim Typ II die Liganden am distalen Ende von in die Liposomenmembran inkorporierten PEG-Ketten lokalisiert sind.

Grundsätzlich kann die Ligandkonjugation nach Vesikelpräparation, d.h. an präformierte Liposomen erfolgen oder vor Vesikelpräparation durch Zugabe von lipidierten Liganden zur restlichen Lipidmischung. Die nachträgliche Kopplung hat den Nachteil, dass die Liposomenpopulation nach einer meist Mehrschritt-Synthese vom ungebundenen Ligandanteil und anderen Reaktionspartnern gereinigt werden muss. Dies erfolgt meist durch Gelchromatographie, was z.T. zeitaufwändig ist bzw. nicht immer zu gleichmäßig reproduzierbaren Vesikelpopulationen führt. Vorteil dieser Methode ist die gleichmäßige Anordnung der Liganden an der Liposomenaußenseite.

Die Methode mit lipidierten Liganden bietet den Vorteil des schnellen und vollständigen Einbaus während der Vesikelherstellung, dafür orientieren sich die Liganden sowohl zur Vesikeloberfläche, als auch ins Vesikelinnere, was eine Reduzierung der Targetierungspotenz zur Folge haben kann. In den meisten Versuchen wird die Methode an präformierten Liposomen angewendet, wobei es sich nach Art des Liganden bzw. des Versuchsablaufs richten wird, welche Methode zu favorisieren ist.

2.3.2. Liposomen und ihre Wechselwirkungen mit Zellen

Ein erfolgreiches liposomales Targeting stellt zwar eine Grundlage einer möglichen therapeutischen Strategie dar, zeigt aber allein noch keine Effekte. Zu diesem Zweck müssen die Liposomen ihren verkapselten Wirkstoff am Wirkort gezielt freigegeben oder der liposomale Wirkstoff muss frei oder auch liposomal verkapselt von der Zielzelle aufgenommen werden, um intrazellulär seine Wirkung zu entfalten.

Das Prinzip der Wirkstofffreisetzung an der Zielzelle basiert auf der Destabilisierung der Liposomenmembran nach Bindung an ein multivalentes Target. Grundlage der Destabilisierung ist eine Zusammensetzung der Liposomenmembran aus Lipiden, welche allein keine Liposomen bilden. Wird dieses Lipid, wie z. B. DOPE jedoch durch kleine Mengen an lipidierten Antikörpern oder Peptiden ergänzt, bilden sich Liposomen mit ausreichender Stabilität für die Zirkulation. Durch Bindung an die Zielzelle kommt es dann aber zur lateralen Wanderung der Liganden und Anreicherung an der Bindungskontaktstelle und damit zur Destabilisierung der Liposomenmembran und zur Freigabe des Wirkstoffs [87].

Je nach Target bzw. therapeutischem Ansatzpunkt kann auch eine Internalisierung der Liposomen in die Zellen angestrebt werden. Gerade bei der Anwendung von mit zytotoxischen Agenzien beladenen targetierten Liposomen zeigte sich, dass bei stärkerer Internalisierung auch deutlich höhere zytotoxische Effekte erreicht wurden [88].

Die zellulären Aufnahmeprozesse können grundsätzlich in passive Prozesse (Fusion) und aktive energieabhängige Prozesse unterteilt werden, wobei letztere im Mittelpunkt der Aufnahmemechanismen durch Liposomen stehen. Dazu zählen Prozesse wie Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose.

Zur Phagozytose sind nur bestimmte im Dienst der Körperabwehr stehende Zellen des RES, insbesondere Makrophagen befähigt. Meist ist eine Aufnahme der Liposomen durch das RES nicht gewünscht, kann aber nur durch schon genannte bestimmte Maßnahmen verringert werden. In speziellen Fällen, z.B. bei der Nutzung der Liposomen als Drug Carrier für Erkrankungen des RES, wie Leishmaniasis dient es dem therapeutischen Ziel [89]. Voraussetzung für die phagozytotische Aufnahme ist die Bindung der Vesikel an die Oberfläche der Fresszellen. Dafür stehen mehrere spezialisierte Rezeptoren zur Verfügung, z.B. der Fc-Rezeptor zur Bindung von Antikörpern und Rezeptoren für Opsonine. Nach Haftung kommt es zur Invagination (Einstülpung) der Zellmembran mit Ausbildung einer digestiven Tasche. Die Tasche löst sich dann von der Oberfläche ab und bildet einen Membran-umgrenzten Hohlraum, der das Vesikel beinhaltet (Phagosom). Daraufhin kommt es zur Entleerung von primären Lysosomen in das Phagosom mit Ausbildung eines sog. Phagolysosoms, in welchem der Inhalt weiter enzymatisch verdaut wird.

Als spezifischer Prozess ist die rezeptorvermittelte Endozytose bekannt. Dabei kann es nur zur Aufnahme kommen, wenn die Liposomen an spezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche binden. Physiologisch existieren eine Reihe von endozytotischen Rezeptoren für verschiedene Plasmabestandteile, wie z. B. Lipoproteine (LDL), Hormone, Proteine (Transferrin), aber auch für eine Vielzahl von anderen Oberflächenrezeptoren wurde eine endozytotische Aktivität aufgeklärt. Nach der Bindung der Liposomen an Rezeptoren beginnt die Endozytose in den Clathrin coated pits der Plasmamembran. Dabei handelt es sich um Einstülpungen der Membran, die mit Clathrin besetzt sind. An der Außenseite dieser Ausstülpungen befinden sich die Rezeptoren in angereicherter Form. Die Liposomen binden und werden als Rezeptor-Makromolekül-Komplexe in Clathrin umhüllte Vesikel eingestülpt und gelangen so in die Zelle. Innerhalb weniger Minuten streifen sie ihre Clathrinhülle ab und verschmelzen mit den frühen Endosomen. Der Innenraum der frühen Endosomen ist schwach

sauer mit einem pH-Wert von ca. 6, da ATP getriebene Protonenpumpen den Einstrom von H^+ -Ionen aus dem Zytosol bewirken. Durch den sauren pH-Wert erleben die meisten Rezeptoren eine Konformationsänderung und es kommt zu einer Abdissoziation des Liganden. Die freien Rezeptoren kehren dann zur ursprünglichen Membrandomäne zurück, oder sie werden zu einer neuen Domäne transportiert (Transzytose).

Nach 5 bis 15 Minuten erfolgt der Transport der frühen Endosomen in das Zellzentrum zu den späten Endosomen, deren pH Wert 5 - 5,5 beträgt. Durch Fusion der späten Endosomen mit enzymgefüllten Golgivesikeln entstehen letztlich die Lysosomen (pH 3,5 - 4), die eigentlichen Verdauungskompartimente. In ihnen findet die kontrollierte intrazelluläre Verdauung der Makromoleküle mittels 40 verschiedener Arten hydrolysierender Enzyme (Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, Phosphatasen) statt. Da bei einem lysosomalen pH Wert von 3,5 eine schnelle hydrolytische Zersetzung von vielen Wirkstoffen wahrscheinlich ist, sollten Wirkstoffe schon aus den Endosomen freigesetzt werden. Dies kann beispielsweise durch pH-sensitive Liposomen geschehen. Diese bestehen ähnlich wie targetsensitive Liposomen aus DOPE und einem stabilisierenden sauren Amphiphil, z.B. Cholesterylhemisuccinat. Während im Neutralen das Amphiphil stärker dissoziiert und damit stärker hydrolysiert vorliegt, wird beim Absinken des pH-Werts das saure Amphiphil zunehmend protoniert, verliert damit seine Ladung und damit wird die Hydratation zurückgedrängt. Infolgedessen wird die Kopfgruppe kleiner und das Amphiphil verliert seine stabilisierende Wirkung, die Liposomen zerfallen [90].

Man kann feststellen, dass Liposomen ein großes therapeutisches Potential als Drug Delivery Systeme haben. Durch Steuerung der Eigenschaften (Größe, Zusammensetzung, Ladung, Targetierung) kann das Schicksal eines Liposoms im Organismus gezielt beeinflusst werden. Dies soll im Zuge dieser Arbeit zur gezielten Anreicherung von targetierten Liposomen an angiogenetischem Endothel in Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen in der Krebstherapie genutzt werden.

2.3.3. Liposomen und ihr Potential als Krebstherapeutikum

Die geringe therapeutische Breite und die fehlende Zielspezifität für maligne Zellen der herkömmlichen Zytostatika sind für den Patienten mit einer Reihe von Nebenwirkungen verbunden, wie Nausea, Emesis, Alopezie, Infertilität, Mucositis, Anämie, Leukopenie,

Thrombopenie. Dazu kommen stoffspezifische Nebenwirkungen, wie z.B. die ausgeprägte Kardiotoxizität bei Doxorubicin.

Die Verwendung von Liposomen bietet mehrere Möglichkeiten, die Toxizität der herkömmlichen Zytostatika zu verringern. Zum einen kann durch den liposomalen Einschluss dem Arzneistoff der Zutritt zu gesundem Gewebe verhindert werden, um andererseits eine möglichst gezielte Anreicherung des liposomalen Wirkstoffs am Tumor zu erreichen.

Wie bereits beschrieben, kann auch für das Tumortargeting bei Liposomen zwischen aktiven und passiven Prozessen unterschieden werden.

Unter passivem Targeting versteht man, dass sich Liposomen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften bevorzugt im Tumorgewebe anreichern können. Hierbei macht man sich zunutze, dass sich diese Gewebe durch verschiedene Parameter von gesundem unterscheiden. So sind Gefäße, die der Tumor selbst zur Aufrechterhaltung seiner Versorgung sprossen lässt, häufig durch große interzelluläre Spalten zwischen den Endothelzellen und fehlende Basalmembran gekennzeichnet [91, 92]. Liposomen definierter Größe können durch diese Spalten treten, jedoch nicht oder weniger durch das vergleichsweise dicht geschlossene Endothel normaler Blutgefäße, auch EPR-Effekt genannt. Verschiedene mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Lücken zwischen den Endothelzellen 50-100 nm betragen, andere Untersuchungen belegen, dass je nach Art und Wachstumsstatus des Tumors die Spalten sogar 380 bis 700 nm groß sein können [93]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Liposomengröße von ca. 100 nm optimal für eine Tumoraufnahme und auch für eine längere Retention im Tumor sind [94]. Diese Erkenntnisse und die Entwicklungen einer ausreichenden Verlängerung der Zirkulationszeit führten zu einer Reihe von therapeutisch genutzten liposomal verkapselten Zytostatika. Das am meisten genutzte Präparat ist dabei Caelyx[®], welches Doxorubicin-Hydrochlorid in einer PEG-ylierten, liposomalen Formulierung enthält. Es wird zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs bei erhöhtem kardialen Risiko, bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom und bei AIDS-assoziiertem Kaposi-Sarkom verwendet. Dieses Präparat hat den Vorteil gegenüber freiem Doxorubicin, dass die kardiotoxische Wirkung entschieden gemindert wird. Zum einen werden durch die langsamere Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen hohe Plasmaspiegel-Spitzen von Doxorubicin vermieden. Auf der anderen Seite können die Liposomen aufgrund ihrer Größe (100 nm) zwar ins Tumorgewebe extravasieren, nicht oder weniger jedoch durch das intakte Endothel der Herzmuskelzellen [95]. Ein weiteres liposomales Doxorubicin-Präparat ist Myocet[®], welches weniger angewendet wird, da die Liposomen vor der

Verabreichung an den Patienten erst noch mit Doxorubicin vom Apotheker beladen werden müssen und außerdem keine PEG-ylisierung zur Verlängerung der Verweildauer im Blut haben. Bei DaunoXome[®], einem liposomalem Daunorubicinpräparat wird die Halbwertszeit durch die geringe Teilchengröße von ca. 50 nm und durch einen relativ hohen Cholesterolanteil (50 mol%) erreicht. Zwei weitere Präparate mit liposomal verkapselter all-trans-Retinoinsäure bzw. liposomal verkapseltem Vincristin befinden sich in einem fortgeschrittenen Stadium klinischer Prüfungen. Einen Überblick über liposomale Präparate zur Tumortherapie, die derzeit zugelassen sind bzw. sich im Stadium der klinischen Prüfung befinden sind auch in Tab.2-1 zusammengestellt.

Hersteller	Wirkstoff	Produkt	Indikation	Status
Gilead	Daunorubicin	DaunoXome [®]	first-line f. Kaposi-Sarkom Akute myeloische Leukämie Blasen-, Kolorektal-Karzinom	in EU zugelassen
Zeneus Pharma Limited	Doxorubicin	Myocet [®]	first-line Behandlung v. metastasierendem Brustkrebs	in EU zugelassen
Essex (Schering-Plough)	Doxorubicin (pegyliert)	Caelyx [®]	Monoth. bei metast. Mammakarzinom fortgeschr. Ovarialkarzinom AIDS-Kaposi-Sarkom	in EU zugelassen
Aronex Pharm.	all-trans-Retinoinsäure (ATRA)	Altragen [®]	akute myeloische Leukämie, Lymphome, Prostatakrebs	Ende Phase II
Inex	Vincristin-Sulfat	Marqibo [®]	Pankreas-, Kolorektal-Karzinom Non-Hodgkin-Lymphom	Ende Phase II
AronexPharm.	Platinverbindungen	Platar	pleurales Mesotheliom Renalzellkarzinom	Phase II
Vical	DNA-Kompl. für MHC I - Antigen	Allovectin-7	metast. Melanom	Phase II
OSI Pharm	Lurtotecan	OSI-211	kleinzelliges Lungenkarzinom	Phase II
Antigenics-Inc	Platinverbindungen	Aroplatin	Kolorektal-Karzinom	Phase II

Tab.2-1: Liposomale Zytostatika, zugelassen oder in klinischer Prüfung (Präparate in klinischer Prüfung nicht vollständig)

Die derzeit am Markt befindlichen liposomalen Zytostatika können relativ erfolgreich das Nebenwirkungsprofil der Arzneistoffe herabsetzen, sie reichern sich in den meisten Fällen auch im Vergleich zum reinen Zytostatikum bevorzugt im Tumorgewebe an. Dies ist aber alles auf passive Vorgänge zurückzuführen, verursacht durch die morphologischen Besonderheiten des Tumorendothels. Probleme, wie hoher interstitieller Druck bzw. schlecht durchblutete Bereiche im Tumor, erschweren auch den liposomalen Arzneistoffen die Extravasation aus den Blutgefäßen ins Gewebe bzw. die Verteilung darin. Dies erklärt auch die relativ geringe Anzahl bisher zugelassener liposomaler Arzneistoffe. Eine weitere Erklärung, dass lediglich zwei verschiedene Zytostatika (Daunorubicin, Doxorubicin) aus der gleichen Substanzklasse (Anthracycline) liposomal zu Anwendung kommen, könnte in der Herstellungstechnologie begründet liegen. Beide Wirkstoffe können über sog. „active loading“ hocheffizient in die Liposomen bis zu einer Mikropräzipitation eingeschlossen werden, was natürlich Vorteile zu anderen Zytostatika hat und Nachteile, wie höherer Zulassungsaufwand und Preis der Liposomen aufwiegt [96].

Alternativ zum passiven Targeting wird seit längerer Zeit versucht, liposomale Zytostatika aktiv durch Bindung von Antikörpern, Peptiden oder anderen Liganden an die Liposomenoberfläche zu targetieren. Hierbei gibt es bereits vielfältige erfolgreiche Ansätze. So zeigten Park et al. 2001 [97] mit Immunoliposomen, die gegen das von einigen Tumoren überexprimierte Antigen Her-2 (z.B. Mammakarzinom) gerichtet waren eine bevorzugte Anreicherung der targetierten Liposomen *in vitro*. Nach Einschluss von Doxorubicin in die gleichen Liposomen zeigten diese an fünf verschiedenen Her-2 überexprimierenden Xenograft-Tumor-Tiermodellen eine deutliche Regression des Tumors. Dabei ergab sich eine klare Überlegenheit gegenüber den besten z.Zt. zugelassenen nicht-targetierten Liposomen und auch gegenüber dem Antikörper (Trastuzumab), allein oder in Kombination mit Chemotherapie. Im Jahr 2007 vorgenommene ähnliche Untersuchungen mit Anti-Her-2 funktionalisierten Liposomen, welche mit dem Zytostatikum Paclitaxel (Taxol®) beladen waren, ergaben sich ebenfalls Vorteile für die Immunoliposomen hinsichtlich der Zytotoxizität in Xenograft-Tumormodellen von Mäusen im Vergleich zu reinem Taxol® [98]. Immunoliposomen, welche den Antitumorstoff Fenretinid enthielten und mit einem Antikörper gegen das in vielen Tumoren hochexprimierte Gangliosid GD-2 targetiert waren, induzierten Apoptose in Neuroblastoma (NB)- und Melanomzelllinien und zeigten auch *in vivo* antimetastatische Aktivität in einem NB-Modell [99].

Ein interessanter therapeutischer Ansatz wurde von Mastrobattista et al. 2002 beschrieben, die eine Diphtherietoxin-Kette A (DTA) mit dem pH-abhängigen fusogenen Peptid dINF-7 in sterisch stabilisierte Immunliposomen integrierten, welche mit Antikörpern targetiert waren, die spezifisch an Ovarkarzinomzellen (OVCAR-3) binden [100]. Sie zeigten, dass DTA nach Freigabe ins Zytosol durch pH-abhängige Destabilisation der endosomalen Membran, vermittelt durch dINF-7, zellselektiv zytotoxischer wirkte im Vergleich zu untargetierten Liposomen.

Durch Targetierung von internalisierenden Rezeptoren, wie z.B. dem Folat- oder Transferrinrezeptor ist es möglich, liposomal eingeschlossene Arzneistoffe ins Cytosol abzugeben. So zeigte Folatrezeptor targetiertes liposomales Doxorubicin und auch Daunorubicin eine erhöhte Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* [101, 102]. Ein anderer therapeutischer Ansatz wurde von Lu et al. 2002 beschrieben, sie benutzten den Folatrezeptor zum Markieren der Krebszellen mit Haptenen und es konnte so über Opsonisierung mit anti-Hapten-Antikörpern eine Immunsystem gesteuerte Zytotoxizität erreicht werden [103].

Ein weiterer in den letzten Jahren umfangreich genutzter Rezeptor ist der Transferrin-Rezeptor, der von vielen Tumoren überexprimiert wird und physiologischerweise zum endozytotischen Transport von Eisen in die Zelle dient [104]. So konnte auch hier in verschiedenen *in vitro* Studien gezeigt werden, dass sich Zytostatika, wie Cisplatin oder Doxorubicin selektiv und durch rezeptorgesteuerte Aufnahme vermehrt in Tumorzellen anreichern. Auch im Tierversuch am Tumor-Mausmodell zeigten sich durch Targetierung und erhöhte Aufnahme lebensverlängernde Effekte [105,106]. Des Weiteren gibt es viel versprechende Versuche mit Immunliposomen zur systemischen p53 Supressortherapie unter Nutzung der endozytotischen Eigenschaften von Transferrin [107].

Die Suche nach weiteren Liganden für ein liposomales Targeting fokussiert auf Rezeptoren, die spezifisch von Krebszellen überexprimiert werden. Lee et al. nutzten 2002 Chondroitinsulfat auf Tumorzellen als Target für Cisplatin beladene Liposomen und erreichten damit eine Reduzierung des Tumorwachstums und Reduktion von Metastasen *in vivo* [108]. Der Rezeptor des „vasoactive intestinal peptide“ (VIP) wurde 2003 von Dagar et al. als Target genutzt, um mit VIP gekoppelte, radioaktiv markierte Liposomen zu Brustkrebszellen in Ratten zu transportieren. Die Ergebnisse zeigten auch hier, dass die Targetierung deutlich zum Vorteil bei der Akkumulation der Liposomen am Tumorgewebe führte [109]. Mit dem Hyaluronrezeptor (CD44) konnte an drei verschiedenen Tumormodellen *in vivo* gezeigt werden, dass entsprechend targetierte mit Mitomycin befüllte

Liposomen bei Tumorprogression und -belastung mit Metastasen und Überleben deutliche Vorteile gegenüber den nicht targetierten Liposomen bzw. dem freien Arzneistoff besitzen [110]. Von Mamot et al. konnte 2005 an mit drei verschiedenen Zytostatika (Doxorubicin, Epirubicin, Vinorelbin) beladenen Liposomen ein signifikant erhöhter Antitumor-Effekt gezeigt werden, wenn diese Liposomen mit einem anti-EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Antikörper funktionalisiert wurden [111].

Die Zerstörung von Tumorzellen durch targetierte mit Zytostatika beladene Liposomen ist ein viel versprechender Ansatz und im Tierversuch oftmals wirksamer als der reine Arzneistoff oder die untargetierten Liposomen. Eines der Hauptprobleme, die Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen das Zytostatikum, z.B. durch aktives Wiederausschleusen aus den Zellen, bleibt weiterhin vorhanden. Im Gegensatz dazu würde ein endothelspezifisches Targeting aufgrund der genetischen Stabilität von Endothelzellen eine Resistenzentwicklung vermeiden und damit zur Effektivierung von Chemotherapeutika beitragen. Das zunehmende Wissen um die molekularen Zusammenhänge der tumorinduzierten Angiogenese hat das Tumorendothel auch für ein liposomales Targeting in das Interesse der Forschung gerückt.

2.3.4. Liposomales endotheliales Targeting bei Tumorerkrankungen

Die Neubildung von Gefäßen stellt eine essenzielle Voraussetzung für das Tumorwachstum dar und bietet neben der direkten Blockade der Angiogenese-Signalkaskade herausragende Eigenschaften als Target. Durch die Erkenntnis, dass die Angiogenese mit der Expressierung spezifischer Oberflächenrezeptoren verbunden ist, die im normalen Endothel wenig oder gar nicht vorhanden sind, bietet sich die Möglichkeit diese für ein aktives Targeting zu nutzen. Das endotheliale Targeting eröffnet deshalb vielfältige Möglichkeiten zum Anreichern von Arzneistoffen, Radiopharmaka oder Genen [112-114]. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass ein Vehikel, welches sich einmal im Blutstrom befindet, direkten Zugang zu seinen Zielzellen hat. Die Nutzung der Liposomen als untoxisches Transportvehikel mit der Möglichkeit der Beeinflussung der Zirkulationskinetik und der möglichen Kopplung von spezifischen Strukturen (Peptide, Antikörper) an die Lipidoberfläche ergänzt die Vorteile des Endotheltargetings. Die Nutzung von internalisierenden Liganden eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, dass der liposomal eingeschlossene Arzneistoff über Aufnahme und endosomale/lysosomale Freigabe ins Cytosol abgegeben wird. Dadurch haben Liposomen einen entscheidenden Vorteil gegenüber reinen z.B. Antikörper-Arzneistoff-Konjugaten

[115]. Durch Nutzung tumorspezifischer endothelialer Epitope kann ein solcher Therapieansatz gleichermaßen für verschiedene Tumoren genutzt werden, d.h. man umgeht die Heterogenität der Marker auf Tumorgeweben [116]. Untersuchungen von Oku et al. 2002 berichten von einem therapeutischen Targeting mittels Liposomen, an welche ein Pentapeptid gekoppelt wurde, das spezifisch angiogenetisches Endothel bindet. Das dabei bindende Epitop auf der Endotheloberfläche ist nicht bekannt. Dabei zeigte sich mit diesen Liposomen, die zusätzlich das Chemotherapeutikum Adriamycin verkapselt hatten, ein reduziertes Wachstum des Tumors in tumortragenden Mäusen im Vergleich zum freien Arzneistoff und zu unbeladenen Liposomen [117]. Analoge Ergebnisse zeigten sich bei Verwendung der gleichen Peptid-gekoppelten Liposomen mit einem anderen Zytostatikum bzw. bei Nutzung dieser Liposomen in der PEG-ylierten Form [118,119]. Dies bedeutet, dass die liposomale Verkapselung in Kombination mit der Kopplung eines endothelspezifischen Liganden die Effektivität der Zytostatika erhöhen konnte. Dabei zeigten sich die Vorteile weniger in der Anreicherung im Tumor, sondern mehr als Folge einer spezifischen Anreicherung des Wirkstoffs und dessen erhöhter toxischer Wirkung auf dem angiogenetischen Endothel und damit indirekt in einer Tumorsuppression.

Neuere Untersuchungen zeigten die Nutzung bekannter Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Volkel et al. mit Endoglin-Antikörpern gekoppelten Liposomen. Dabei zeigte sich *in vitro* bei Verkapselung von Doxorubicin ein Vorteil gegenüber dem freien Stoff bzw. den ungekoppelten Liposomen [120]. Verschiedene Studien aus 2003, 2004 und 2007 bewiesen den Nutzen der Oberflächenmoleküle Type I-Matrixmetalloproteinase und $\alpha_v\beta_3$ -Integrine als Target, welche beide eine essenzielle Rolle bei der Angiogenese spielen. Bei Targetierung dieser mit entsprechenden Peptiden gekoppelten Liposomen konnte auch hier *in vitro* eine vermehrte Akkumulation an Endothelzellen und *in vivo* bei Verkapselung von Zytostatika ein Vorteil zu Gunsten der spezifischen Liposomen festgestellt werden [121-123].

Die Beispiele verdeutlichen, dass die Verwendung von Liposomen zur Targetierung des Endothels eine aussichtsreiche Strategie zum erfolgreichen Bekämpfen von Tumorerkrankungen darstellt.

Die Erkenntnis, dass das Endothel von Tumoren hochspezialisiert ist, führt zur ständigen Suche nach neuen Oberflächenmolekülen, die möglichst nur auf angiogenetisch aktivem Gefäßen exprimiert werden. Zur Untersuchung möglicher Peptid-Peptid-Interaktionen wird dabei zunehmend die Phage-Display-Methode verwendet. Dabei wird ein Peptid oder Protein in Fusion mit einem Hüllprotein eines Bakteriophagen exprimiert. Das fusionierte Peptid wird

auf der Oberfläche des Bakteriophagen präsentiert, während die DNA, welche für das Protein kodiert, im Inneren des Phagen verbleibt. Dies erlaubt die rasche Identifizierung von Peptidliganden für eine Vielzahl von Zielmolekülen (Antikörper, Enzyme, Rezeptoren) durch einen Biopanning genannten *in vitro* oder *in vivo* (Maus) Selektionsprozess. In den letzten Jahren wurde so eine Reihe von Epitopen auf Endothelzellen einschließlich möglicher Liganden gefunden, die theoretisch als potentielle Targetstrukturen dienen können [124, Tab. 2-2]. Bei der Bindung an das Tumorendothel kristallisierten sich besonders zwei verschiedene Peptidsequenzen heraus. Auf der einen Seite zeigte sich die Frequenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), welche an bestimmte Integrine bindet und auf der anderen Seite die Peptidsequenz NGR (Asparagin-Glycin-Arginin), welche an Aminopeptidase N (CD 13) binden soll [124, 125]. Während die Erkenntnisse zum RGD-spezifischen Binden bereits seit mehreren Jahren auch auf dem Liposomenfeld intensiv verfolgt werden [126-128], wurde die Spezifität der NGR-Bindung an APN und dessen mögliches Potential als Targetstruktur für Arzneistoffe erstmals im Jahr 2000 beschrieben [129]. Da eine liposomale Targetierung von APN mittels NGR-Peptiden zu Beginn unserer Arbeit nicht beschrieben war, wurde dieses Vorhaben als Ziel der vorliegenden Arbeit bestimmt. Als Grundlage dafür soll im nächsten Kapitel auf die Rolle von APN im Körper und ihre Vorteile bei der Nutzung als Targetstruktur eingegangen werden.

Target	Referenz
CD 34	Schlingemann et al., 1990
VEGF-VEGFR-Komplex	Brown et al., 1990
Selektine	Nguyen et al., 1993
α v-Intergrine	Brooks et al., 1994
Tie-2	Sato et al., 1995
MMP-2/ MMP-9	Koivunen et al., 1999
CD 13/ Aminopeptidase N	Pasqualini et al., 2000
Endostatin Rezeptor	Karumanchi et al., 2001
Anexin A1	Oh et al., 2004

Tab.2-2: Auswahl möglicher Epitope für ein endotheliales Drug Targeting [130]

2.4. Aminopeptidase N

2.4.1. Vorkommen, Struktur und Eigenschaften

Die Aminopeptidase N (APN / CD13), auch Alanyl-Aminopeptidase genannt, ist ein zinkabhängiges Metalloenzym mit ubiquitärem Vorkommen und vielfältigen Funktionen. In der Niere und im Darm steht sie im Dienste der Aminosäuren-Resorption, im Zentralnervensystem wirkt es im Neuropeptid-Stoffwechsel. Als Aminopeptidase spaltet APN bevorzugt neutrale Aminosäuren vom nicht substituierten Aminoterminus von Oligopeptiden, Amiden oder Arylamiden [131].

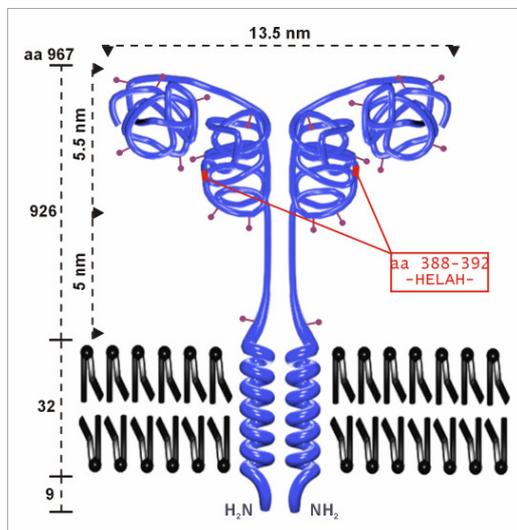


Abb.2-3: mögliche APN-Struktur [132]

Humane APN ist ein Homodimer aus zwei 150 kDa großen, nicht-kovalent assoziierten Untereinheiten. Die Aminopeptidase N ist ein Membranprotein, bestehend aus 967 Aminosäuren, und sie wird in verschiedene Domänen eingeteilt. Sie besitzt einen zyttoplasmatischen Schwanz (8 Aminosäuren), an den sich eine aus 24 Aminosäuren bestehende hydrophobe, Membran-durchspannende Region anschließt. Den größten Teil nimmt die extrazelluläre hydrophile Domäne ein (935 AS), die aus einer Stielregion, einer katalytischen Region (Bindung des Zinkatoms) und einer wahrscheinlich an der Ligandenbindung beteiligten Region besteht.

Eine Expression von APN findet man in der Bürstensaummembran der Niere und der Dünndarmschleimhaut, wo sie im Dienst der Aminosäurenresorption steht. Ebenfalls tragen

viele Zellarten, wie Fibroblasten, Endothelzellen, synaptische Neuronenmembranen im ZNS und Epithelzellen APN an der Oberfläche.

In der Hämatopoese ist die APN-Expression charakteristisch für bestimmte Entwicklungsstufen von Leukozyten, deshalb wird APN seit Jahren zur Leukämie- und Lymphomtypisierung verwendet [133]. APN wird auf Stammzellen während der gesamten Reifung von Granulozyten und Monozyten, auf frühen lymphatischen Vorläuferzellen und zum Teil auf Zellen einer lymphatischen Leukämie exprimiert. Neben der membrangebundenen APN existiert eine lösliche Form, die in extrazellulären Flüssigkeiten, wie Serum, Synovia, Galle, Urin und Samenflüssigkeit zu finden ist. Diese lösliche Form entsteht durch Proteolyse aufgrund der Sensitivität der stielartigen Region gegenüber Proteinasen. In der Synovia entzündeter Gelenke von Patienten mit Rheumatoidarthritis wird vermehrt lösliche APN nachgewiesen [134], außerdem gilt lösliche APN seit Jahren als nützlicher Marker zur Erkennung einer akuten Schädigung der Nierentubuli [135].

Die APN Expression wird wie die Expression anderer Membranpeptidasen sowohl in der Embryonalentwicklung reguliert als auch durch Wachstums- und Differenzierungsvorgänge beeinflusst. Zytokine können Membranpeptidasen regulieren, gezeigt u.a. für IL-4, welches APN in Monozyten und Endothelzellen heraufreguliert [136].

APN wird durch mikrobielle Produkte gehemmt, am bekanntesten sind Bestatin (Ubenimex[®]), Amastatin und Probestin.

2.4.2. APN bei Metastasierung und Angiogenese

Für APN gibt es mehrere Untersuchungen, die eine Rolle bei der Tumormigration und -proliferation zeigen. So ist der Abbau der extrazellulären Matrix eine entscheidende Voraussetzung zur Tumorzellmetastasierung und Angiogenese. Es konnte von mehreren Arbeitsgruppen bewiesen werden, dass das Auswandern von APN-positiven Tumorzellen durch die ECM aktiver erfolgt, als bei APN-negativen. Zusätzlich zeigte man, dass durch Hemmung der APN diese Invasion der Tumorzellen durch die ECM gehemmt werden konnte. Man vermutet deshalb, dass APN eine indirekte Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix spielt [137-139]. Die Untersuchungen von Saiki et al. zeigen, dass APN an der Typ IV Kollagenolysis (Protein in der Basalmembran der ECM) beteiligt ist und damit das Einwandern von Tumorzellen in die ECM und somit die Metastasierung ermöglicht [140,141]. In Fortsetzung dieser Erkenntnisse gibt es Untersuchungen, die einen signifikanten

Zusammenhang zwischen APN-Expression auf Tumorgewebe und schlechter Überlebensprognose z.B. beim Dickdarmkrebs aufstellen [138]. Lösliche APN in verschiedenen Körperflüssigkeiten korreliert mit der Tumorlast [142].

Des Weiteren wurde eine Funktion von APN als ein für die Tumorangiogenese maßgebliches Molekül beschrieben. So weisen Pasqualini et al. [129] im Tumor-Mausmodell eine hohe Expression auf den Gefäßen von verschiedenen Tumoren nach, während im Gefäßsystem der anderen Gewebe dagegen kein APN nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Hypoxie und andere angiogene Faktoren, wie bFGF, VEGF, TNFalpha die Expression von APN erhöht werden kann. [143]. Dies konnte sowohl durch histochemische Färbungen als auch durch Nachweis erhöhter mRNA, Proteinmengen und Promoteraktivität nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich durch Inhibierung der APN durch Antikörper eine verminderte Fähigkeit von HUVEC zur Bildung von kapillären Netzwerken auf Matrigel [143], dabei diskutiert man eher eine Inhibition der Migration und nicht der Proliferation. Dies stützt die beschriebene These, dass APN am Abbau der ECM beteiligt ist. Im Hypoxie-induzierten Retina-Angiogenese-Modell sowie im CAM-Assay wurde die Gefäßbildung durch Anwendung von APN-Inhibitoren (z.B. Bestatin) gestoppt. *In vivo* Versuche an Xenograft-Tumoren in Mäusen mit inhibierenden Antikörpern bzw. Bestatin zeigten eine Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrolle. Da bei diesen Versuchen Tumoren mit APN-negativen Geweben benutzt wurden, muss dieser Effekt auf die APN-Expression in den Gefäßen zurückzuführen sein. [129].

Durch *in vivo* Phage-Display Untersuchungen in tumortragenden Mäusen wurden die Peptidsequenzen NGR bzw. zyklisches CNGRC gefunden, die selektiv an das Endothel von Tumoren bindet [124]. An den Gefäßen der anderen Organe (z.B. Herz, Brust, Niere) zeigte sich keine Anreicherung von CNGRC [125]. Als Rezeptor für die Bindung von CNGRC wurde von Pasqualini Aminopeptidase N postuliert, da *in vitro* und *in vivo* CNGRC im Vergleich zu anderen Peptiden bevorzugt an APN positive Endothezellen bindet und diese Bindung zusätzlich durch APN-Antikörper inhibiert werden konnte. Histochemische Färbungen zeigen, dass die Anlagerung der CNGRC-Phagen an den gleichen Stellen im Gefäß erfolgt, wo auch APN nachgewiesen werden konnte [129]. Curnis et al. konnten zeigen, dass die anti-Tumoraktivität von TNFalpha durch Kopplung von CNGRC zunimmt und durch gleichzeitige Gabe von freiem CNGRC und APN-Antikörpern wieder aufgehoben wurde [144]. Diese Indizien stützen die These, dass APN ein Rezeptor für NGR bzw. das zyklische CNGRC ist.

Obwohl es an vielen Stellen des Organismus eine Expression von APN gibt (Epithelzellen, Nierenzellen, Darm u.a.) belegen Untersuchungen von Curnis als Ergebnis umfangreicher immunohistochemischer und Biodistributionsstudien mit TNF-NGR-Konjugaten, dass NGR an diese *in vitro* nicht bindet und sich auch *in vivo* nicht in APN-reichen Organen akkumuliert. Darüber hinaus zeigen kompetitive Bindungsexperimente, dass NGR bevorzugt an Tumor assoziierte Blutgefäße, nicht aber an Epithelzellen oder myeloische Zellen bindet [145]. Dies spricht für die Expression einer speziellen Isoform des APN-Rezeptors auf proliferierenden Endothelzellen. Einer absoluten Selektivität widerspricht Curnis aber, denn es zeigten sich auch geringe Anreicherungen in Fibroblasten und Mastozyten von Tumoren bzw. auch an Brustkrebs- und Prostatakrebszellen [145]. Die Aussage der Bindung von NGR an APN positive Tumorzellen wird sehr kontrovers diskutiert. Es gibt einige Arbeiten, die nach Kopplung von CNGRC z.B. an Prodrugs [146] oder Vektoren [147] eine Effizienzerhöhung im Zellmodell an APN-positiven Tumorzellen erfahren. Dagegen gibt es histochemische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die keine Bindung des reinen CNGRC-Peptides an APN-positive Tumorzellen beschreiben können [148]. Ergänzend konnte gerade bei APN-negativen Tumoren *in vivo* eine Wachstumsreduktion beispielsweise mit TNF-NGR-Konjugaten gezeigt werden, was maßgeblich auf die Targetierung der APN in den tumornahen Gefäßen zurückzuführen ist [149].

Durch Kopplung von NGR an verschiedene zytotoxische Substanzen wurde in verschiedenen Studien eine gezielte Targetierung des Tumorendothels forciert und dadurch verstärkte antitumorale Wirkung gezeigt. So konnten schon 1998 von Arap et al. mit NGR-Doxorubicin-Konjugaten *in vivo* am Mausmodell eine Größenreduktion der Tumoren, Reduktion der Metastasen und Erhöhung der Überlebensrate gezeigt werden [125]. Ein Jahr später koppelten Ellerby et al. CNGRC an das proapoptotische Peptid (KLAKLAK)₂ und zeigten eine selektive Toxizität an Endothelzellen *in vitro* und tumorwirksame Aktivität *in vivo* [150]. Van Hensbergen erreichte durch Kopplung von CNGRC an Doxorubicin mit hydrolysierbarem Anker *in vitro* eine vermehrte Freigabe von Doxorubicin in das Zytoplasma von HUVEC, was aber *in vivo* bei Eierstockkrebs-Xenograft-Tumoren in Mäusen ohne Einfluss auf die Tumorlast blieb [151]. Das Zytokin TNF-alpha besitzt verändernden Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion und könnte somit die Effizienz von Chemotherapeutika erhöhen. Dieses Zytokin kann in freier Form aufgrund zytotoxischer Effekte nur lokal angewendet werden. Die Kopplung mit CNGRC und anschließende systemische Gabe in Mäuse bewirkte einen gezielten Transport zu tumornahen Gefäßen, verringerte die Toxizität

und erhöhte zusätzlich die Effizienz von Doxorubicin bei gleichzeitiger Gabe um das 8-10 fache. Ähnliche synergistische Effekte wurden mit Melphalan erreicht [152].

Einen interessanten Ansatz hatten Liu et al. mit der Inkorporierung von NGR in virusähnliche Vektoren, mit denen sie eine erhöhte Anreicherung an zwei verschiedenen Endothelzelllinien zeigten und somit einen neuen Ansatz zur Gentherapie an tumorassoziierten Gefäßen beschrieben [153]. Eine weitere *in vitro* Studie zeigte die erfolgreiche Lyse von Endothelzellen nach Targetierung mit einem vasoaktiven NGR-Galaktose-Konjugat [154]. Eine Studie aus 2005 zeigte durch Kopplung von CNGRC an Endostatin (endogener Angiogeneseinhibitor) nicht nur die vermehrte Anreicherung des Konjugats an HUVEC, sondern auch dessen erhöhten antiangiogenetischen und apoptotischen Effekt *in vitro*. Gleichzeitig durchgeführte *in vivo* Experimente mit tumortragenden Mäusen zeigten eine deutliche Überlegenheit des CNGRC-Konjugats bei der Reduktion der Tumorgröße. Diese Ergebnisse beweisen, dass die antiangiogenen Eigenschaften von Endostatin durch die Modifikation mit CNGRC gesteigert werden konnten, wie auch histochemische Untersuchungen der Tumorgefäßdichte und -länge bestätigen [155]. Die beschriebenen Versuche verdeutlichen, dass die Nutzung von NGR zum zielgerichteten Transport von Stoffen an das tumorassoziierte Endothel meist sehr Erfolg versprechende Ansätze bei der Tumorthherapie darstellen, die sich in Effektivierung herkömmlicher Zytostatika bzw. Verminderung der Toxizität dieser manifestieren.

Das Tumorendothel stellt insgesamt ein sehr attraktives Zielgewebe zur Anreicherung von Arzneistoffen dar. Die Feststellung, dass nur vom angiogenetisch aktiven Endothel eine Isoform des APN-Rezeptors exprimiert wird, die bevorzugt durch das Peptidmotiv NGR/CNGRC gebunden wird, macht es zu einem bevorzugten Ziel für Drug-Carrier-Systeme, wie z.B. Liposomen.

2.5. Ziele meiner Arbeit

Aufgrund der zentralen und lebenswichtigen Rolle des Gefäßsystems bei der Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und lebensnotwendigen Nährstoffen, stellt es einen idealen Angriffspunkt zur Antitumorthherapie dar. Das Tumorendothel exprimiert im Prozess der Angiogenese eine Reihe von Rezeptoren, wobei uns APN als Zielstruktur als besonders geeignet erschien, da die membranäre Expressionsform einer speziellen Isoform dieser Peptidase auf angiogenetisch aktivem Endothel erfolgt. Durch die Zielspezifität des Peptides

NGR/CNGRC für tumorendotheliale APN umgeht man zum einen die Heterogenität der verschiedenen Tumorgewebe und kann gleichzeitig gezielt Arzneistoffe mittels Drug Carrier Systeme zum Wirkort transportieren.

Als Wirkstofftransportvehikel haben sich Liposomen bewährt, die durch Funktionalisierung mit Liganden ihre besondere Zielspezifität erhalten und deren pharmakokinetische Eigenschaften besonders für spätere therapeutische Anwendungen modifiziert werden können.

Das Gesamtziel der Arbeit bestand in der Entwicklung und Charakterisierung von APN-gerichteten Liposomen mit der Fähigkeit zur Akkumulation an angiogenetisch aktivem Endothel. Andererseits sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob mittels APN-Inhibitoren eine Verminderung der Angiogenese erreicht werden kann, um perspektivisch liposomal verkapselte APN-Inhibitoren für eine gezielte antiangiogenetische Therapie am Endothel nutzen zu können.

In einem ersten Schritt sollte dabei die Peptidsequenz CNGRC an einen Lipidanker gekoppelt werden, um diesen Lipid-CNGRC-Komplex dann gezielt in Liposomenmembranen inkorporieren zu können. Bei der Herstellung sollen dabei verschiedene bekannte Kriterien der Serum- bzw. sterischen Stabilität Berücksichtigung finden.

Innerhalb einer zweiten Etappe sollten die daraus resultierenden APN-gerichteten Liposomen unter *in vitro* Bedingungen hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an APN exprimierenden Endothelzellen bzw. Krebszellen untersucht werden. Da eine alleinige Akkumulation von Liposomen am angiogenetisch aktiven Endothel noch kein Garant für einen therapeutischen Effekt des transportierten Arzneistoffs darstellt, sollten ergänzend Untersuchungen über Art und Ausmaß von Internalisierungsvorgängen der Liposomen an den Endothelzellen stattfinden.

Da für APN eine entscheidende Rolle bei der Tumormigration und –proliferation postuliert wird, sollte eine Inhibierung der APN eine neuartige Möglichkeit der kausalen Beeinflussung des Tumorwachstums darstellen. Im zweiten Schritt sollte *in vitro* bzw. in einem *in vivo* nahen System (CAM) überprüft werden, inwieweit sich eine Targetierung von APN und anschließende Beeinflussung durch APN-Inhibitoren zur Hemmung der Angiogenese nutzen lässt.

Da der Prozess der Angiogenese sehr komplex und multifaktoriell ist, sollten die bis dahin gewonnenen Ergebnisse aus den reinen Zellversuchen auf *in vivo* Tiermodelle mit Tumoren

übertragen werden. Dabei sollte in erster Linie überprüft werden, ob ein Targeting der angiogenetisch aktiven Endothelzellen mit APN-gerichteten Liposomen und damit eine Akkumulation im Tumor möglich ist. Durch Modifizierung der Liposomen und damit der Möglichkeit der Freigabe von verkapselten Arzneistoffen direkt an oder gezielt in der Zielzelle eröffnen sich neuartige Möglichkeiten der Beeinflussung des Tumorwachstums auf vaskulärer Ebene.

Anmerkungen zu dieser Arbeit

Die experimentellen Studien zu dieser Arbeit begannen im Oktober 2002. Zu diesem Zeitpunkt gab es mehrere Untersuchungen, die eine Rolle der APN in der Tumormigration und –proliferation zeigten. Ergänzt wurden diese Erkenntnisse durch die Feststellung, dass es molekulare Unterschiede zwischen der (tumor)endothelialen APN und der in Monozyten oder Epithelzellen exprimierten APN gibt und Peptide mit dem NGR/CNGRC-Motiv selektiv an die Isoform der endothelialen APN binden. Es gab Hinweise, dass Zytostatika durch Targetierung mit NGR eine Wirkungsverbesserung hatten. Seit diesem Zeitpunkt gab es zunehmende Forschungsaktivitäten, die sich mit der Wirkung von zytotoxischen Stoffen beschäftigten, die mit NGR gekoppelt waren und damit eine Tumor- bzw. Tumorendothelspezifität haben sollen. Dabei lag der Fokus vor allem in der Beobachtung der Effekte auf Tumorgröße bzw. Überlebenszeit *in vivo*.

Zu Beginn unserer Studien war die Nutzung von APN für ein liposomales APN Targeting ein völlig neuer Ansatz, der mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen übernommen wurde. Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Studie mit einer ähnlichen Zielstellung des liposomalen APN Targeting veröffentlicht [156,157]. Im Vordergrund dieser Arbeit stand jedoch vor allem die Erforschung der Wirkungsverbesserung von Doxorubicin bei Tumoren in liposomaler Verkapselung durch NGR-Kopplung. Im Fokus unserer Arbeiten stand im ersten Schritt ein reines Liposomentargeting von APN ohne überschneidende Effekte durch im Liposomen inkorporierte Arzneistoffe. Es sollte in erster Linie aufgeklärt werden, ob eine Bindung an APN-exprimierende Endothelzellen erfolgt. Eine Verfolgung des Schicksals der Liposomen nach erfolgter Bindung sollte weitere mechanistische Erkenntnisse über eine mögliche Internalisierungsfunktion des APN-Rezeptors bringen. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, die für ihre liposomalen Targetierungsversuche APN transfizierte Tumorzellen benutzen, kamen bei uns humane APN positive Endothelzellen zum Einsatz, da gerade Bindungs- und Internalisierungsvorgänge zwischen Endothelzelle und Tumorzelle stark variieren [158,159]. Dabei wurde bewusst auf eine liposomale Verkapselung eines Arzneistoffes verzichtet, da die Aufklärung des Verhaltens des Vehikels an der Zielzelle im Vordergrund stand. Damit grenzen wir uns deutlich von den anderen Arbeiten ab, die zytotoxische Effekte des inkorporierten Arzneistoffs an der Zielzelle auswerten.

Unabhängig von den Targetierungsuntersuchungen mit Liposomen bestand ein zweites Ziel in der *in vitro* Überprüfung, inwieweit sich eine Beeinflussung von APN zur Hemmung der Angiogenese nutzen lässt.

Diese Ergebnisse erst sollten die Grundlage für weiterführende *in vivo* Versuche an tumortragenden Mäusen darstellen, um deren Ergebnisse auch mechanistisch interpretieren zu können. Auch bei diesen Versuchen wurde im ersten Schritt auf eine Inkorporierung von Arzneistoffen verzichtet, um Überschneidungen von Targetingeffekten und Effekten des Arzneistoffs zu vermeiden.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Substanzen

Lipide:

SPC	Lipoid AG, Ludwigshafen
Cholesterol	Serva, Heidelberg
mPEG-PE 2000	Avanti-Polar Lipids, USA
1,2-O,O-Dihexadecyl-Glycero-3-phosphoethanolamin	Avanti-Polar Lipids, USA

Fluoreszenzfarbstoffe:

NBD-PE	Avanti Polar Lipids, USA
DiO	Sigma Aldrich GmbH
Texas-Red-PE	Molecular Probes, Leiden, NL
6-CF	Acros Organics, Geel, Belgien

Die Reagenzien Glutarsäureanhydrid, Pyridin, Chloroform, Methanol, Natriumdithionit, Natriumhydroxid, Triethylamin, DMF, Essigsäure und DMSO stammten von Sigma-Aldrich GmbH. Das Detergenz Triton X-100 stammte von Serva Deutschland und wurde in den Konzentrationen 1% (m/m) und 0,2% (m/m) angewendet.

Die Lösungen der Puffer (PBS, HEPES, TRIS) wurden nach Standardprotokollen hergestellt und waren von analytischer Reinheit. Das zur Serumstabilitätsbestimmung benutzte humane Serum wurde von c.c pro Germany bezogen. Die Enzyme Pronase (Protease aus *Streptomyces griseus*), α -Chymotrypsin stammen von Sigma. Der Aminopeptidasenhemmstoff Bestatin stammt ebenfalls von Sigma, der anti-CD13 Antikörper WM15 von Chemicon Europe.

Die Peptide CNGRC, CARAC (genaue Formel im Abschnitt 3.2) und das Peptid als Referenz zur Gehaltsbestimmung wurden durch Herrn Dr. Jahreis vom Max-Planck-Institut für Enzymologie und Proteinfaltung Halle, AG Peptidchemie synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Die in der Synthese erhaltenen Chromatogramme wurden mit folgenden Sprühreagenzien detektiert:

Bromthymolblau-Sprühreagenz zur Detektion von Substanzen mit lipophilen Gruppen:

200 mg Bromthymolblau (Sigma-Aldrich GmbH) wurden in wenigen ml Ethanol gelöst. Dazu wurden 400 mg Kaliumhydroxid gegeben und alles in 1 l destilliertem Wasser aufgelöst

Molybdän-Sprühreagenz zur Detektion d. Phospholipide, sowie aller Phosphorsäurediester und -triester:

Lösung 1: 312 g konzentrierte Schwefelsäure wurden mit Wasser auf 250 ml verdünnt. Anschließend wurden 10 g Molybdäntrioxid zugegeben und das Gemisch bis zum vollständigen Auflösen der Substanz gekocht.

Lösung 2: 125 ml der Lösung 1 wurden mit 450 mg Molybdänpulver versetzt und 15 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurde vom Bodensatz dekantiert und filtriert.

Je 5 ml Lösung 1 und Lösung 2 wurden gemischt und mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnt und dann als Spray eingesetzt.

Die Chromatogramme wurden gemäß nachfolgender Sprühreihenfolge detektiert. Zuerst erfolgte die Behandlung mit Bromthymolblau-Spray. Nach einem Trocknungsvorgang erfolgte die Behandlung mit Molybdänspray. Die Phospholid-haltigen Verbindungen wurden dann als dunkelblaue Flecken sichtbar.

Ninhydrin-Sprühreagenz zur Detektion primärer Amine:

500 mg Ninhydrin werden in 90 ml Aceton gelöst und vor Gebrauch 10 ml Essigsäure zugesetzt.

3.2. Darstellung des Lipidanker-Peptid-Konjugats

3.2.1. Darstellung des Lipidankers N-Glut-PE (Ether)

Die Synthese erfolgte analog der üblicherweise in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Vorschrift zur Erzeugung des Phospholipidankers N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin durch Veränderung des Lipid-Ausgangsstoffes [161]:

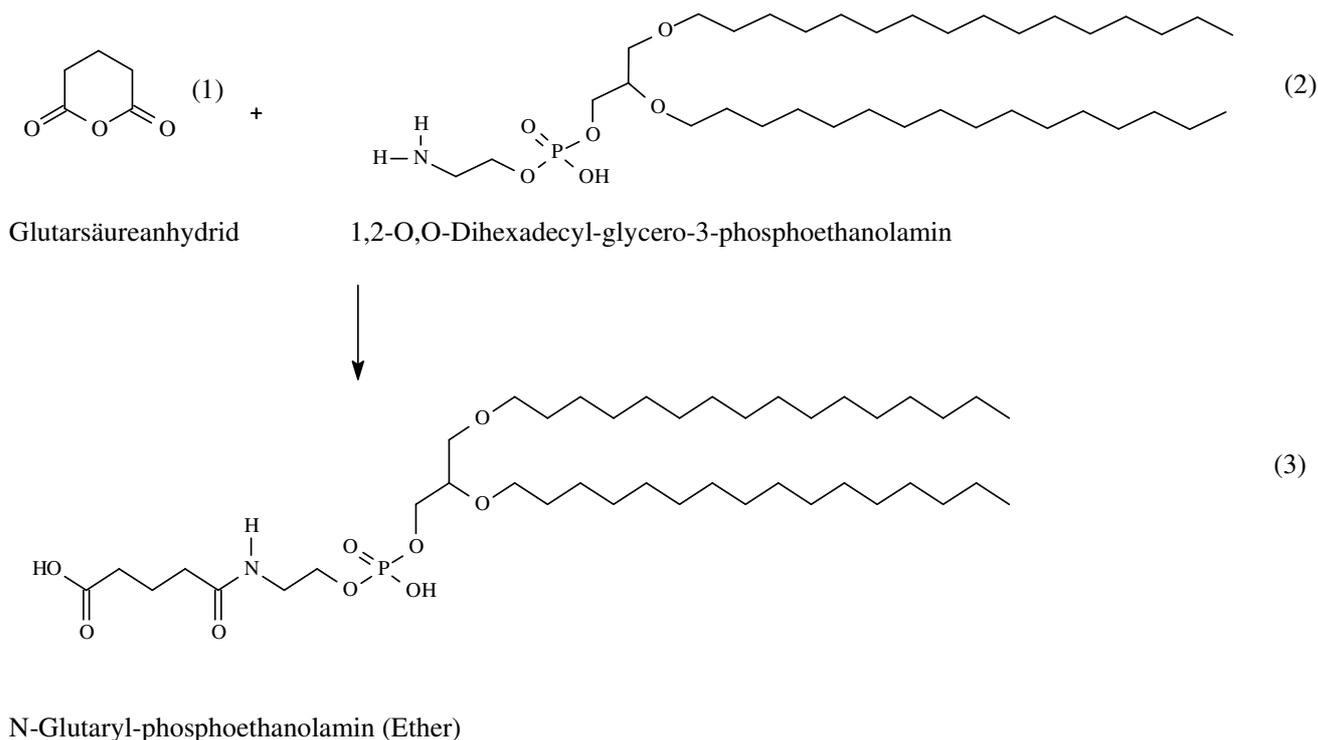


Abb.3-1: Reaktionspartner zur Darstellung des Lipidankers

Durch Verwendung von 1,2-O,O-Dihexadecyl-glycero-3-phosphoethanolamin (2) als Ausgangsstoff wurde ein Lipidanker erzeugt, der nicht als Glycerolfettsäureester vorliegt, sondern bei dem die Alkylketten in 1,2-Position des Glycerolgrundkörpers über eine Etherbindung angeknüpft sind.

1,2-O,O-Dihexadecyl-glycero-3-phosphoethanolamin (500 mg, 0,754 mmol) wurde in abs. Chloroform (ca. 10 ml) gelöst und mit 10-fachem Überschuss Glutarsäureanhydrid (860 mg, 7,54 mmol) in Gegenwart von abs. Pyridin (ca. 120 μ l) versetzt. Die Reaktion verlief unter Rühren bei Raumtemperatur über 2 Tage. Der Grad der Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5). Als Detektionsmittel wurden Bromthymolblau- und Molybdänsprühreagenz nacheinander angewendet. Die Abtrennung des Produktes erfolgte säulenchromatographisch (Kieselgel 16, Merck, 1 m Länge, 2,5 cm Durchmesser) über Gradientenelution. Dabei diente Chloroform als Elutionsmittel, dem steigende Anteile Methanol zugemischt wurden, wobei das Produkt bei einem Anteil von 7 % (V/V) eluiert werden konnte. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und 24 Stunden unter Vakuum über P_2O_5

getrocknet. Danach wurde die Identität mittels ESI-MS bestimmt und eine Stammlösung der Konzentration 5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ in Chloroform hergestellt und bei -20°C gelagert.

-ESI-MS: $(\text{C}_{42}\text{H}_{84}\text{NO}_9\text{P}, 778\text{g}/\text{mol}^{-1})$, M-H

-DC (LM: Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)), Rf 0,68

3.2.2. Kopplung des Lipidankers N-Glut-PE (Ether) an das zyklische Peptid CNGRC

Als Ausgangsstoffe wurden zum einen der in Kapitel 2.1 beschriebene Phospholipidanker (3) und zum anderen das zyklische Peptid CNGRC (Cys-Asn-Gly-Arg-Cys) bzw. CARAC (Cys-Ala-Arg-Ala-Cys) verwendet, welche freundlicherweise von Dr. Jahreis am Max-Planck-Institut synthetisiert wurden:

•spezifisches Peptid (CNGRC):

Boc-Cys-Asn(Trt)-Gly-Arg(Pbf)-Cys-Gly-Gly-NH-CH₂-CH₂-NH₂ /S-S

•unspezifisches Peptid (CARAC):

Boc-Cys-Ala-Arg(Pbf)-Ala-Cys-Gly-Gly-NH-CH₂-CH₂-NH₂ /S-S

Die funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums der Peptide sind mit den entsprechenden, kursiv gekennzeichneten Schutzgruppen versehen. Die Cysteine sind jeweils über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und an der Aminogruppe des einen Cysteins ist ein Spacer gekoppelt (blau markiert). Beide Peptide liegen als TFA (Trifluoressigsäure)-Salze vor.

Darstellung am Beispiel der Kopplung von CNGRC-Peptid mit dem Phospholipidanker:

Dazu sollte eine Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Lipidankers und der freien Aminogruppe am Spacer des Peptides geknüpft werden.

Im ersten Schritt erfolgte deshalb eine Aktivierung der Carboxylgruppe des Phospholipidankers mittels BOP (Sigma-Aldrich). Dies ermöglicht die Aktivierung unter milden Bedingungen, welches besonders für Säure/Basen-labile Schutzgruppen (Boc, Trt) geeignet ist. Dabei findet die Umsetzung der Carbonsäure zum Phosphonium-Zwischenprodukt (A) statt, welches sich unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen innerhalb von ca. 15 Minuten zum Benzotriazolyl-Zwischenprodukt (B) umsetzt. Die

Aminogruppe des Peptids ist ausreichend nukleophil, um mit beiden Zwischenprodukten zum Amid zu reagieren [161].

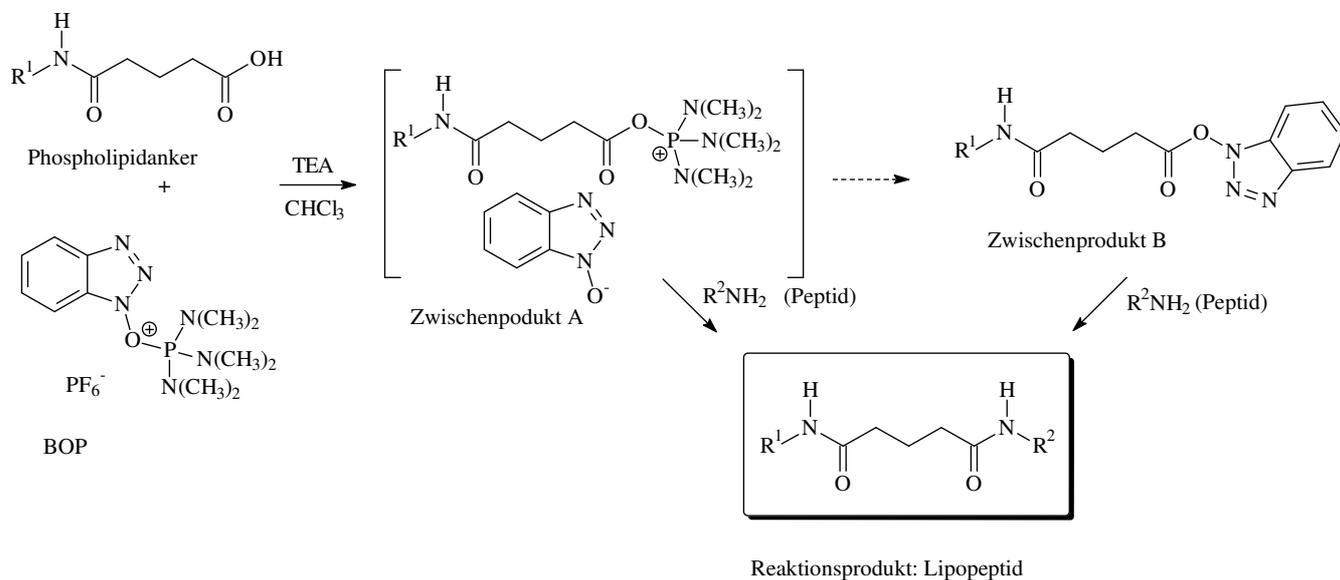


Abb.3-2: Schematische Darstellung der Aktivierung der Carbonsäure des Lipidankers und Reaktion mit der Aminogruppe des Peptids

4 ml der N-Glut-PE-Chloroform-Stammlösung (20 μmol) wurden mit der ca. 1,1-fachen Menge BOP (10 mg, 22 μmol) und mit Triethylamin (24 μmol) als Hilfsbase versetzt. Parallel dazu erfolgte das Lösen von 20 mg CNGRC-Peptid (14,05 μmol) in 1 ml DMF und Zugabe einer äquimolaren Menge Triethylamin, um das Peptid aus seinem TFA-Salz freizusetzen. Beide Lösungen wurden vereinigt und unter Rückfluss 48 Stunden bei ca. 40°C gerührt. Die Umsetzung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Als Laufmittel diente das Gemisch Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5), die Detektion erfolgte mit Bromthymolblau- und Molybdänsprühereagenz. Der Rf-Wert des detektierten Reaktionsproduktes lag über dem des Ausgangsphospholipids, was auf die verminderte Polarität durch das Anknüpfen des geschützten Peptides zurückzuführen ist. Die Identität des geschützten Reaktionsproduktes wurde durch Massenspektrometrie im Reaktionsgemisch bestätigt.

Die Aufarbeitung bzw. Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte über das Chromatotron (Modell 8924, Harrison Research). Mit diesem Gerät ist eine präparative, zentrifugal

beschleunigte, radiale Dünnschichtchromatographie möglich, welche auf einem kreisförmigen Rotor (Glasscheibe) mit einer dünnen Schicht Sorbent (Kieselgel) durchgeführt wird. Die zu trennende Probe und das Lösungsmittel werden in der Mitte der rotierenden Scheibe aufgegeben und die getrennten Fraktionen verlassen den Rand der Scheibe und werden zusammen mit dem Lösungsmittel aufgefangen. Die Chromatotron-Scheibe wurde mit einer Schichtdicke von 1 mm mit Kieselgel 60 PF₂₅₄ (gipshaltig) ausgegossen und 5 Stunden bei 100°C getrocknet. Die Elution erfolgte mit Chloroform und zunehmenden Gradienten Methanol. Bei einer Mischung von ca. 12 % Methanol wurde das Reaktionsprodukt eluiert. Die Detektion wurde mit Bromthymolblau-/Molybdänsprühreagenz durchgeführt, die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Identität des DC-reinen Reaktionsprodukts (mit Schutzgruppen) konnte mittels der ESI-Massenspektrometrie bestätigt werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen, welche von Dr. Jahreis am Max-Planck-Institut durchgeführt wurde.

Als letzter Schritt wurde das Gemisch aus entschütztem Lipopeptid (als TFA-Salz vorliegend) und den freien Schutzgruppen mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt. Als Laufmittel verwendeten wir Chloroform/Methanol/Ammoniak (65/35/3). Zur Neutralisation der im Reaktionsgemisch enthaltenen Trifluoressigsäure wurde Ammoniak zur Aufarbeitung verwendet. Eine Detektion konnte hierbei mit Ninhydrin erfolgen, da durch das Abspalten der Schutzgruppen freie Aminogruppen zur Detektion zur Verfügung standen. Nach der Isolierung der entsprechenden Bereiche und anschließender Extraktion mittels Chloroform/Methanol (50/50) wurde das Lösungsmittel eingeeengt, und es konnte das Lipopeptid als dünnschichtchromatographisch rein detektiert werden (Ninhydrin, Bromthymolblau/Molybdän). Eine Identitätsbestimmung erfolgte über ESI-MS. Nach dem Einengen zur Trockne und anschließender Trocknung unter Vakuum über P₂O₅ wurde eine Stammlösung in Chloroform/Methanol (8/2) mit einer Konzentration von 5 µmol/ml hergestellt und bei -20°C gelagert.

Die Darstellung des unspezifischen CARAC-Lipopeptides erfolgte analog der oben beschriebenen Verfahrensweise.

-DC (LM: Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)), R_f = 0,74

-ESI-MS (CNGRC-Lipopeptid): (C₆₆H₁₂₅N₁₄O₁₆PS₂, 1466 g/mol⁻¹), M-2

-ESI-MS (CARAC-Lipopeptid): (C₆₆H₁₂₆N₁₃O₁₅PS₂, 1437 g/mol⁻¹), M+3

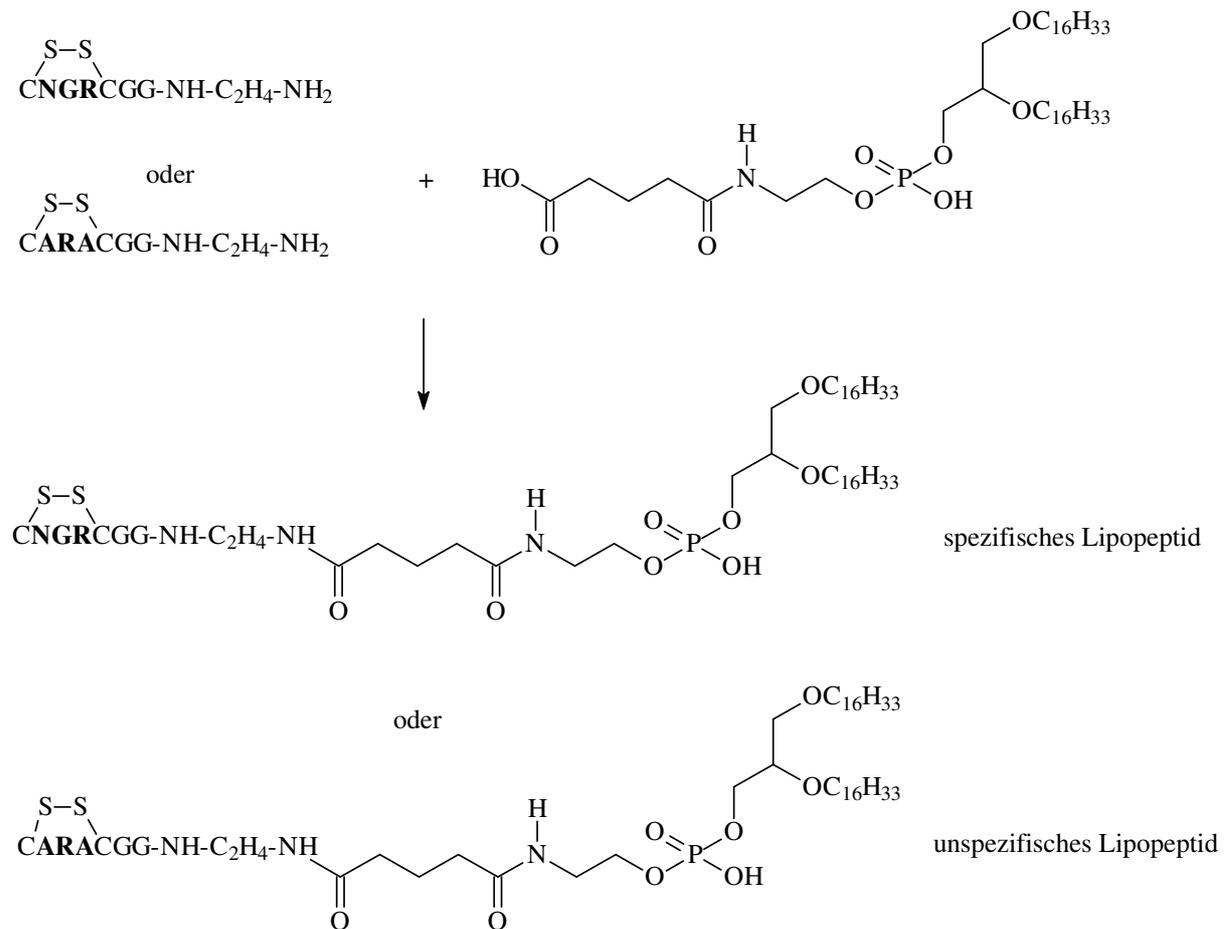


Abb.3-3: Schematische Darstellung der Kopplung von CNGRC- bzw. CARAC-Peptid mit dem Lipidanker zum Lipopeptid

3.3. Liposomen

3.3.1. Herstellung der Liposomen

Die Liposomenpräparationen wurden routinemäßig mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 $\mu\text{mol/ml}$ hergestellt, wobei das molare Verhältnis SPC/Chol/PEG-PE/Lipopeptid/Farbstoff entsprechend den Anforderungen des jeweiligen Versuches variierte. Bei der Herstellung der Stealth-Liposomen erfolgte der unterschiedliche Einsatz von PEG-PE 2000 auf Kosten des SPC Anteils.

Bei der oft in der Arbeit verwendeten Einheit mol% wird immer vom prozentualen Anteil an der molaren Menge des Gesamtlipids ausgegangen.

Als Herstellungsmethode kamen die Hydratationsmethode und die Detergenzdialysemethode zum Einsatz, wobei beide zur erfolgreichen Erzeugung von Liposomenpopulationen führten. Da die Hydratationsmethode insgesamt effektiver war und zu reproduzierbareren Ergebnissen führte, wurden alle *in vitro* und *in vivo* Versuche mit per Hydratationsmethode hergestellten Liposomen durchgeführt und auch nur diese Methode hier beschrieben.

Zur Herstellung der Liposomen wurden die entsprechend berechneten Mengen der Chloroform-Stammlösungen der Lipide bzw. Lipopeptide (CNGRC-Lipopeptid bzw. CARAC-Lipopeptid) in einem 10 ml Rundkolben vereinigt und das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer bei 35°C abgezogen. Danach wurde der so entstandene Lipidfilm im Exsikkator über P₂O₅ zusätzlich für 2 Stunden getrocknet. Durch Zugabe der wässrigen Dispersionsmittel, die dem späteren Verwendungszweck angepasst waren, wurde der Lipidfilm hydratisiert. Dies wurde zusätzlich gefördert durch zugegebene Glasperlen und manuelles Schütteln in einem 60°C heißen Wasserbad. Anschließend wurden die Dispersionen einer 16-stündigen maschinellen Schüttelprozedur unterworfen (100 Bewegungen pro Minute, Schüttler MLW Thys2). Die daraus resultierenden großen multilamellaren Liposomen wurden anschließend in Eppendorfgefäße überführt und einer 10-minütigen Behandlung im Ultraschallbad (Roth, Transsonic 460/H) unter Eiswasserkühlung ausgesetzt. Diese Behandlung wurde nach jeweils 5-minütiger Pause weitere fünfmal wiederholt. Die so erhaltenen kleinen Vesikel wurden aufgereinigt und dann der Größenbestimmung überführt.

Die Aufreinigung von nicht eingebauten Lipidbestandteilen, Lipopeptiden oder nicht eingeschlossenen Farbstoffmolekülen erfolgte gelchromatographisch mit Sepharose 4B. Dazu wurde die bereits vorgequollene Sepharose ca. 8 cm hoch in Säulen gegossen (Kunststoff, 10cm x 1cm), anschließend mit Hydratationsmedium gewaschen und das Totvolumen mit Dextranblau (Sigma) bestimmt. Die Probe wurde tropfenweise auf das obere Gelbett gebracht und erst nach vollständigem Einlaufen mit Hydratationsmedium (meist PBS) eluiert. Die liposomalen Fraktionen wurden visuell aufgrund ihrer Trübung bzw. Färbung erkannt und in Eppendorfgefäßen aufgefangen.

3.3.2. Größenbestimmung

Die Größenbestimmung der Liposomen erfolgte mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) mit dem Malvern HPPS-ET. Jeweils 2 ml des steril filtrierte Hydratationsmediums

wurden in einer Meßküvette mit je 25 µl der Liposomensuspension vereinigt und dann bei 25°C vermessen. Es erfolgte für jede Probe eine dreifache Messung mit je 10 Einzelmessungen. Neben dem durchschnittlichen Teilchendurchmesser wurde der Polydispersitätsindex (PI) ermittelt, der als Maß für die Teilchengrößenverteilung gilt. Für die Versuche wurden nur Liposomen verwendet, deren PI unter 0,2 lag.

3.3.3. Fluoreszenzmarkierung

Der Einbau der lipophilen Fluoreszenzfarbstoffe DiO, NBD-PE und Texas-Red erfolgte durch direkte Zugabe der Chloroform-Farbstoffstammlösungen zu den Lipidkomponenten. Dabei wurden NBD-PE in einer Konzentration von 2 mol%, Texas-Red in einer Konzentration von 1,5 mol% und DiO mit einer Konzentration von 0,5 mol% bezogen auf das Gesamtlipid eingesetzt. Der Einschluss der Lösungen des hydrophilen Farbstoffs 6-CF (0,1 M) erfolgte durch Zugabe des in Wasser gelösten 6-CF zur Hydratisierung des trockenen Lipidfilms. Die Entfernung des nicht eingeschlossenen Farbstoffs erfolgte säulenchromatographisch wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

3.3.4. Liposomenstabilität

Zuerst erfolgte eine Präparation der Liposomen wie in Kapitel 3.3.1-3.3.3 mit Einschluss einer 0,1 M 6-CF-Lösung. Zur Bestimmung der Einschussrate wurden 10 µl der Liposomen in 10 ml PBS verdünnt und die Fluoreszenz anschließend am Fluostar (Ex. 487 / Em. 520nm) vermessen. Dabei liefert nur der außerhalb der Vesikeldispersion befindliche 6-CF Anteil ein Signal (c_{START}), da die 0,1 molare 6-CF-Lösung innerhalb der Vesikel einem self-quenching-Effekt unterliegt. Um die eingeschlossene Fluoreszenzmenge zu erfassen wurden 10 µl Liposomen in 10 ml 1 % Triton-X-100 aufgenommen (Lyse der Vesikel) und analog vermessen (c_{LYSE}). Über eine Kalibriergerade wurden die jeweiligen Konzentrationen bestimmt und aus der Differenz konnte per Gleichung 1 die prozentuale Einschusskapazität bestimmt werden.

$$\% \text{ Einschuss} = (c_{\text{LYSE}} - c_{\text{START}}) / f \cdot c_{6\text{-CF}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 1}$$

f = Verdünnungsfaktor der Vesikelmenge im Messpuffer

Nach Berechnung des liposomal eingeschlossenen Gesamtvolumens und Division durch den Gesamtlipidgehalt der Liposomenpräparation erhält man zur besseren Vergleichbarkeit den Einschlusswert in Volumen Farbstofflösung je mol Lipid. Eine wiederholte Bestimmung der 6-CF-Einschlussmenge und Vergleich mit dem Einschluss zum Herstellungstag über einen bestimmten Zeitraum gibt Auskunft über die Lagerungsstabilität der Liposomen.

3.3.5. Bestimmung des Peptidgehalts

Die Ermittlung der Menge des in die Liposomenmembran inkorporierten Peptides erfolgte mit dem Reagenz CBQCA (3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyd) der Firma Molecular Probes. Das Reagenz reagiert mit den primären Aminogruppen (R-NH₂) der Peptide auch in Anwesenheit von Triton und den mizellar vorliegenden Lipiden hoch sensibel zu einem fluoreszierenden Isoindol-Derivat [162,163]. In Abb. 3-4 ist das Reaktionsschema mit den Reaktionspartnern dargestellt.

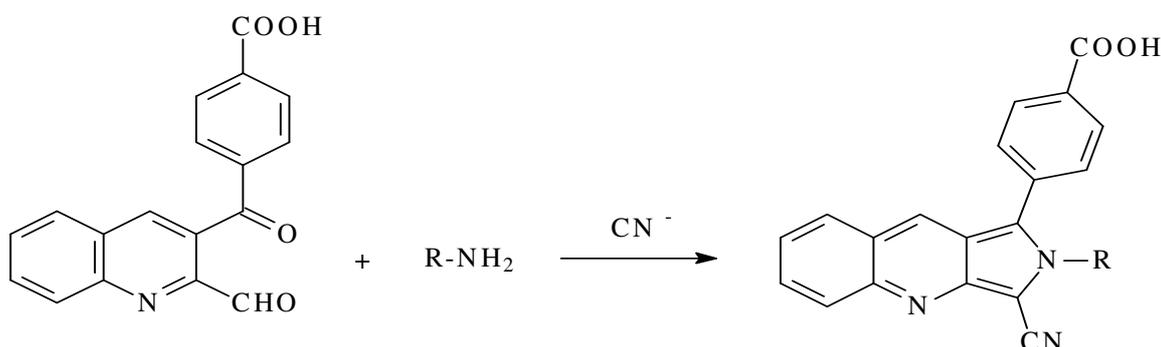


Abb. 3-4: Reaktion des Reagenz CBQCA mit primärer Aminogruppe der Peptide

Die gesamte Bestimmung erfolgte durch direkte Zugabe der Reagenzien in schwarze 96-Well-Platten und Vermessung im Plattenreader.

Als Standard wurde ein strukturanaloges kurzes Peptid genutzt (Ala-Ala-Tyr-Arg-Ala-Ala-Gly-OH, synthetisiert von Dr. Jahreis, MPI), welches eine möglichst genaue Korrelation der ermittelten Mengen erlaubte.

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurde der Standard von 50 ng bis 10 µg verdünnt und dann analog der Liposomenproben behandelt.

Als Proben wurden 80 µl der CNGRC und CARAC-haltigen Liposomensuspension in die Wells gebracht, anschließend mit 20 µl 1 % Triton zur Lyse versetzt und mit dem

maschinellen Schüttler (Memmert, 75 Bewegungen pro Minute) 20 Minuten vermischt. Als Leerwert wurden 80 µl einer peptidfreien Liposomenpräparation benutzt. Anschließend wurden alle Proben bis auf 180 µl mit Boratpuffer pH 9,3 aufgefüllt. Danach wurde unter dem Abzug 5 µl Kaliumcyanidlösung und 20 µl der CBQCA-Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde mit einem Deckel verschlossen, zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie umwickelt und unter Schütteln für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz der Proben (Ex. 485 / Em. 520 nm) im Plattenreader (Fluostar Galaxy, BMG Technologies GmbH; Offenburg Deutschland) gemessen. Die Probenmesswerte wurden durch die peptidfreien Liposomenleerwerte korrigiert und anschließend die Konzentration mittels der Kalibriergeraden bestimmt.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Boratpuffer: 3,8g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ in 80 ml Aqua dest. lösen, evtl. pH-Wert auf 9,3 einstellen und dann mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

1% Triton: 1% Lösung (m/m) in Boratpuffer

KCN-Lösung: 20 mM Lösung in Aqua dest.

CBQCA: 40 mM Lösung in DMSO, Aufbewahrung bei -20°C , vor Verwendung Auftauen und auf 5 mM als Arbeitslösung mit Boratpuffer verdünnen und sofort verwenden

3.3.6. Bestimmung des Phospholipidgehalts

Die Bestimmung des Phospholipidgehalts erfolgte mittels des Bartlett-Assays [164]. Dafür wurde das in den Phospholipiden enthaltene Phosphat (Phosphorsäureester) mittels Perchlorsäure in anorganisches Phosphat umgewandelt. Der Nachweis des Phosphats beruht auf der Bildung von Phosphormolybdänblau. Bei Molybdänblau handelt es sich um tiefblaue Lösungen von Mischoxiden des vier- und sechswertigen Molybdäns.

Die Kalibrierkurve wurde aus einer Phosphatstandardlösung im Bereich von 2 bis 65 nmol erstellt, deren Einzelproben in verschließbare Mikroreagenzgläser überführt wurden. Parallel wurden mehrere Proben der zu bestimmenden Liposomenpräparation ebenso vorbereitet. Jede Probe wurde nun mit 200 µl 70 % Perchlorsäure versetzt und für 30 Minuten in einem Heizblock auf 180°C bis 190°C erhitzt. Es folgte das Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur und die anschließende Zugabe von 2 ml Molybdatreagenz zu jeder Probe.

Nach der Zugabe von 250 µl 10 % Ascorbinsäure und sorgfältigem Mischen wurden die Proben für 10 Minuten in siedendes Wasser gestellt. Nach dem Abkühlen konnte die Absorption am Spektrophotometer (Shimadzu, $\lambda_{\text{ex}} = 812 \text{ nm}$) bestimmt werden. Jede Einzelprobe wurde dreifach hergestellt und dreifach vermessen.

Molybdat Reagenz: 2,2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 14,3 ml konz. Schwefelsäure ad 1 l dest.

H_2O

10 % (m/m) Ascorbinsäure (Imopharm GmbH, Viernheim)

70 % Perchlorsäure (Merck)

Phosphat-Standard-Lösung: 0,65 mmol/l (Sigma)

3.4. Zellkultivierung

3.4.1. Gewinnung humaner Nabelschnurendothelzellen

Die verwendeten Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden postnatal (max. 24 Stunden) aus frischen Nabelschnüren präpariert. Der Bezug des biologischen Materials erfolgte von der Entbindungsstation des Universitätsklinikums der MLU Halle. Aufbewahrung und Transport bis zur Präparation im Zelllabor erfolgte in einem speziellen Transportpuffer. Dieser Puffer (100ml) setzte sich aus 5 ml Transportpufferkonzentrat und 1 ml (10.0000 U/ml) Penicillin / Streptomycin (c.c. pro GmbH, Neustadt, Deutschland) und 94 ml autoklaviertem Wasser zusammen. Das Pufferkonzentrat bestand aus 82 g Natriumchlorid, 3 g Kaliumchlorid, 19,8 g D-Glucose und 2,38 g HEPES in 500 ml autoklaviertem Wasser (MilliQ). Die gesamte Lösung wurde steril filtriert.

Die isolierten Zellen wurden in Medium folgender Zusammensetzung kultiviert: 500 ml Medium M199 mit Earles Salzen (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), welchem 5 ml essenzielle Aminosäuren-Mischung (c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland), 5 ml Penicillin / Streptomycin-Lösung (10000 E/ml, c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland), 5 ml Pyruvatlösung (c.c.pro GmbH), 5 ml HEPES (10mM, pH 7,2, c.c pro GmbH) und 100 ml FKS (c.c. pro GmbH) zugesetzt wurden.

Die Präparation der Nabelschnüre erfolgte unter einer Lamina-Air-Flow-Box (Uni-Flow UV1200). Die verwendeten, sterilen Lösungen wurden vor Beginn im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Zu Beginn wurde die Schnur äußerlich mit 70 % Ethanol gereinigt und anschließend auf Verletzungen und Punktionen untersucht und evtl. der entsprechende Teil entfernt. Die

Enden wurden jeweils um 1 cm gekürzt und verworfen. Nach Identifizierung der Vene erfolgte deren Katheterisierung an beiden Enden mit einer Knopfkanüle, welche mit Nahtmaterial (Braun, Melsungen, Deutschland) fest fixiert wurde. Die Schnur wurde jetzt dreimal mit 50 ml isotonischer Kochsalzlösung (Braun) gespült und etwaige Thromben durch leichte Massage gelöst. Danach schloss sich ein weiterer Spülschritt mit 50 ml PBS an und abschließend wurde die Schnur mit Luft zweimal durchspült. Die Enden der Knopfkanülen wurden nach diesen Reinigungsschritten abgeflammt und ein Ende mit einem Kombi-Stopper (Heiland, Hamburg, Deutschland) verschlossen. Eine 0,1 % Chymotrypsinlösung (in PBS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde anschließend durch einen Sterilfilter (Rotilabo Spritzenfilter, Roth, 0,22 µm) langsam bis zur prallen Füllung der Vene in die Nabelschnur eingefüllt und dann verschlossen. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C / 5% CO₂ an. Danach wurde die Schnur geschwenkt und vorsichtig massiert, um die Ablöseprozesse der Zellen noch zu verstärken. Der Inhalt der Vene wurde anschließend in ein 50 ml Falconröhrchen abgelassen. Die Vene wurde noch zweimal mit 15 ml FKS-haltigem Medium durchspült und ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Die vereinigten Lösungen wurden anschließend zentrifugiert (7 Minuten, 1400 RPM, Hettich Universal 30F) und das entstandene HUVEC-Zellpellet nach Aufnahme mit frischem Medium in Zellkulturflaschen (5 ml, Roth) pipettiert. Nach 3 Stunden konnte ein Anheften der Endothelzellen am Kulturflaschenboden festgestellt werden. Deshalb erfolgte jetzt ein erster Mediumwechsel, mit dem z.B. auch nicht adhärente Erythrozyten entfernt wurden. Weitere Mediumwechsel erfolgten nach 24 Stunden, dann aller 2 Tage. 3 bis 5 Tage nach der Präparation konnte ein konfluentes Wachstum festgestellt werden. Für die späteren Zellversuche wurden nur Zellen der Passage 2 verwendet.

3.4.2. Tumorzelllinien

Im Rahmen von vergleichenden *in vitro* Zellexperimenten kamen zusätzlich zu den HUVEC zwei Tumorzelllinien zum Einsatz.

HT-29/CACO-2

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 und die humane Lungenkarzinomzelllinie A-549 wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. habil. D. Riemann (MLU Halle, Immunologie)

zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien sind adhärent, wobei HT-29 kein APN an ihrer Oberfläche exprimiert. A-549 dagegen exprimiert APN an der Oberfläche.

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (Roth GmbH) bei HT-29 mit Medium RPMI 1640 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % FKS und bei A-549 mit Medium DMEM mit 10 % FKS im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ bis zum konfluenten Wachstum nach 3-5 Tagen.

3.5. In vitro Bindungsstudien

Für diese Versuche wurden Liposomen mit einem konstanten Gesamtlipidgehalt von 10 µmol/ml, wobei SPC/Chol in einem Verhältnis von 7/3 (molar) standen. Je nach Anforderung des Versuchs wurden die Liposomen mit unterschiedlichen Anteilen CNGRC- bzw. CARAC-Lipopeptid ausgestattet. Weitere Anteile an Farbstoffen und PEG-PE 2000 senkten den Anteil von SPC. Der lipophile Fluoreszenzmarker DiO wurde in einer Konzentration von 0,5 mol% eingesetzt. Die Herstellung erfolgte gemäß den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.6. Die Versuche wurden mit HUVEC der 2. Passage durchgeführt. Sämtliche Bindungsuntersuchungen erfolgten bei 4°C, um aktive Aufnahmeprozesse zu unterbinden.

3.5.1. Versuche mit mikroskopischer Auswertung

Nach konfluentem Wachstum wurden die HUVEC mittels Trypsinbehandlung (0,25 % Trypsin-EDTA, Sigma) geerntet und jeweils 50.000 in eine Kammer von Kammerobjektträgern (Lab Tek IITM, Nunc, Wiesbaden) gebracht. Diese wurden mit 400 µl Medium pro Kammer und zur Aktivierung der APN-Expression mit IL-4 (2 ng/ml, Dr. Riemann, MLU Halle, Immunologie) für 48 Stunden im Brutschrank belassen. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt, mit PBS gespült. Anschließend wurden die Liposomen für 30 Minuten bei 4°C mit den Zellen in Kontakt gebracht. Danach wurden die nicht zellgebundenen Liposomen durch mehrmaliges Spülen entfernt. Es folgte eine Fixierung der Zellen mit 2 % Paraformaldehyd pro Kammer bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Nach dreimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Eindeckelung mit einer Mowiol/Propylgallat-Schutzlösung, welche über Nacht trocknete.

Mowiol-Mounting-Medium

5 g Mowiol 488 (Polyvinylalkohol, Kremer Pigmente, Aichstetten) mit 20 ml PBS über Nacht rühren. Anschließend 10 ml Glycerol zusetzen und nochmals über Nacht rühren. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 15000 RPM für 1 Stunde und der Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt.

Anti-Fading

0,625 g n-Propylgallat wurden mit 12,5 ml PBS und 12,5 ml Glycerol über Nacht gerührt und anschließend bei 4°C aufbewahrt

Die gebrauchsfertige Schutzlösung bestand aus zwei Teilen Mowiol und einem Teil Anti-Fading.

Die Aufnahmen der Bilder erfolgten am Laser Scanning Mikroskop bei Ex. 485 / Em. 520 (LSM Leica TCS SP2). Bei der Bedienung des Mikroskops half freundlicherweise Herr Dr. M. Höpfner.

Alternativ wurde die Fluoreszenz mittels des Fluoreszenzmikroskops Leica DM IRB untersucht. Aufnahmen erfolgten mit der angeschlossenen Kamera (Diagnostic Instruments Inc., USA). Mit der Software Meta Vue 5.0 (Visitron System, Puckheim) wurden die Photonencounts in ausgewählten Messarealen ermittelt.

3.5.2. Versuche mit Auswertung am Fluoreszenz-Plattenreader

Nach konfluentem Wachstum wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung (0,25 % Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet und anschließend auf schwarze 96-Well-Platten verteilt. Pro Well wurden 12.000 Zellen ausgesät und mit Medium und IL-4 (2 ng/ml) für 48 Stunden im Brutschrank belassen. Danach wurde das Medium abgezogen und die Liposomen in 200 µl Medium mit den Zellen für 30 Minuten in Kontakt gebracht. Die Liposomeninkubation erfolgte zur Ausschaltung von Internalisierungsvorgängen bei 4°C (keine Endozytose). Anschließend erfolgte die Entfernung der nicht zellgebundenen Liposomen durch vorsichtiges (!) zweimaliges Spülen. Abschließend wurden die Zellen mit 200 µl PBS überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern und dann am Plattenreader

(Fluostar Galaxy, BMG Technologies GmbH, Offenburg) die Fluoreszenz (Ex. 485 nm / Em 520 nm) vermessen. Als Blindwerte dienten Wells mit Zellen ohne Liposomenbehandlung. Jede Versuchsanordnung wurde mindestens als 8-fach Messung durchgeführt.

3.6. Internalisierungsstudien

Für alle Internalisierungsversuche wurden Liposomen der Zusammensetzung SPC/Cholesterol/PEG-PE 2000 im Verhältnis 6,8/3/0,2 (molar) verwendet. Entsprechend der zu untersuchenden Parameter wurden die Liposomen zusätzlich mit unterschiedlichen Anteilen Lipopeptid (CARAC und CNGRC) präpariert. Die Gesamtlipidkonzentration betrug immer 10 µmol/ml. Die Herstellung erfolgte wie in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.6 beschrieben.

3.6.1. Quantitative Untersuchungen

3.6.1.1. Modifizierte Dithionit-Methode

Die ursprüngliche Methode zur Quantifizierung der Liposomeninternalisierung [165] beruht auf der Verwendung asymmetrisch gelabelter Liposomen. Da sich diese Labeltechnik in der praktischen Umsetzung meist als problematisch herausgestellt hat, wurde die Methode mit symmetrisch gekoppelten Farbstoffmolekülen modifiziert. Im Kapitel 4.3.1 wird näher auf die Funktionsweise der Methode eingegangen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit 2 mol% NBD-PE.

Vorversuch Fluoreszenzlöschung

Basierend auf den theoretischen Grundlagen der modifizierten Methode, sollte gezeigt werden, dass der Farbstoff NBD-PE bei der verwendeten Lipidzusammensetzung gleichmäßig zwischen Innen- und Außenlayer verteilt ist.

Dazu wurden 20 µl der Liposomensuspension mit 80 µl PBS in schwarze 96-Well-Platten gegeben. Anschließend wurden 80 µl einer 1,5 M Dithionitlösung (1 M Tris, pH 10) hinzugegeben und die Fluoreszenzlöschung durch Messungen im Abstand von 30 Sekunden am Plattenreader über 9 Minuten verfolgt.

Anwendung als Zellinternalisierungsassay:

Für diese quantitativen Aufnahmeversuche kamen HUVEC der 2. Passage zum Einsatz. Sie wurden nach konfluentem Wachstum aus der Kulturflasche geerntet und jeweils 12.000 je Well in schwarze 96-Well-Platten überführt. Zum Anheften und Ausbreiten auf dem

Plattenboden verblieben sie für 48 Stunden im Brutschrank. Zur zusätzlichen APN-Stimulation wurden die Zellen in dieser Zeit mit IL-4 (2 ng/ml bei 200 µl Medium je Well) inkubiert. Mediumwechsel erfolgte alle 24 Stunden. Danach wurden 20 µl Liposomensuspension in 200 µl Medium für 30 Minuten auf den Zellen belassen. Im Anschluss daran wurden die nicht gebundenen Liposomen entfernt und zweimal mit Medium gespült und es schloss sich eine weitere Inkubationszeit mit 200 µl Medium je Well von 1,5 Stunden an. Je nach Anforderung des einzelnen Versuchs wurden die Inkubationsschritte bei 4°C oder bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Als Blindwerte wurden Wells, die nur Zellen enthielten (ohne Liposomenbehandlung) betrachtet. Im Anschluss an die 1,5-stündige Inkubation erfolgte die sofortige Ermittlung der jeweiligen Fluoreszenz pro Well am Plattenreader. Diese Messung stellt die Erfassung der Gesamtfluoreszenz, d.h. des gebundenen und des internalisierten Anteils dar. Hieran schloss sich die Zugabe von 80 µl der Dithionitlösung je Well und 30 Sekunden später eine weitere Fluoreszenzmessung an. Die dabei gemessene Fluoreszenzminderung zum Wert der ersten Messung stellt 50 % des Fluoreszenzwertes des gebundenen Anteils der Liposomen dar, da die restlichen 50 % der NBD Moleküle im Inneren der gebundenen Vesikel fluoreszieren und nicht durch Dithionit erreicht wurden. Durch Verdoppelung des 50 % Wertes und abziehen vom Gesamtmesswert (1. Messung) erhält man den Wert für den internalisierten Anteil der Liposomen.

3.6.1.2. Verwendung des Enzyms PRONASE

Für diesen quantitativen Aufnahmeversuch wurden Liposomen verwendet, welche mit 0,5 mol% DiO fluoreszenzmarkiert waren. Die HUVEC der 2. Passage wurden nach konfluentem Wachstum aus der Kulturflasche durch Ablösung mit Trypsin (Trypsin-EDTA, 0,25 %, Sigma) geerntet und jeweils 60.000 in ein Well einer hellen 24-Well-Platte (cellstar[®], Greiner, Frickenhausen) überführt. Die Platten wurden für 48 Stunden im Brutschrank belassen unter gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit IL-4 (2 ng/ml Medium). Danach wurde das Medium entfernt und zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Anschließend wurden 70 µl Liposomensuspension in 500 µl Medium je Well für 1 Stunde bei 4°C bzw. 37°C mit den Zellen inkubiert. Hieran schlossen sich zwei Spülschritte zur Entfernung nicht zellassoziierter Liposomen an und die Zellen wurden mit 500 µl Medium überschichtet und nochmals 1,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Well 500 µl einer 0,1 % PRONASE-Lösung (gekühlt bei 4°C) gegeben. Nach ca. 2 Minuten wurden die

abgelösten Zellen in Eppendorf-Gefäße überführt, die 500 µl einer 30 % Sucrose-Lösung enthielten. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5804R) bei 10.000g wurde der Überstand abgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt. Jeweils 200 µl wurden in schwarze 96-Well-Platten überführt und die Fluoreszenz am Plattenreader (Ex. 485 nm/ Em. 520 nm, Fluostar Galaxy) vermessen (A-Messung = gebundener Anteil). Das im Eppendorfgefäß verbliebene Zellpellet wurde durch Zugabe einer 0,2 % Triton-X-100-Lösung und intensivem Vortexen zerstört und anschließend das Lysat für 10 Minuten bei 10.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 200 µl analog der A-Messung vermessen (I-Messung = internalisierter Anteil). Als Blindwert diente ein mitgeführter, analog behandelter, blanker Zellansatz.

3.6.2. Qualitative Internalisierungsuntersuchungen

3.6.2.1. Inhibierung aktiver Transportprozesse durch Kaliumentzug / hypotonen Medium

Prinzipiell wurde für diese Untersuchung die o.g. Dithionit – Methode angewandt, d.h. die Liposomen wurden mit 2 mol% NBD-PE markiert und anschließend in beschriebener Weise behandelt und vermessen. Vorher erfolgte aber eine spezielle Behandlung der Zellen zur Herabregulierung der intrazellulären Kaliumkonzentration in folgender Weise:

Die HUVEC werden mittels Trypsin aus den Kulturflaschen geerntet und jeweils 12.000 pro Well in schwarze 96-Well-Platten eingesetzt und für 48 Stunden unter IL-4-Stimulation im Brutschrank belassen. Danach wurden die Zellen dreimal mit Puffer A (50 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4) gespült und anschließend in hypotonem Medium (M199 mit Aqua dest. 1:1) 5 Minuten inkubiert. Darauf folgte eine weitere Inkubation über 10 Minuten in Puffer A. Parallel dazu wurde als Blindprobe ein Ansatz mitgeführt, welcher mit PBS bzw. normalem Medium inkubiert wurde.

3.6.2.2. Konfokale Mikroskopie / Endozytoseuntersuchung

Für diesen Versuch wurden 0,5 mol% DiO markierte Liposomen bekannter Lipidzusammensetzung benutzt, funktionalisiert mit CNGRC-Peptid (10 µg/µmol Lipid). Die verwendeten HUVEC der 2. Passage wurden geerntet und für 48 Stunden in Kammerobjektträgern (Lab Tek IITM, Nunc, Wiesbaden) kultiviert und mit IL-4 (2 ng/ml Medium) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 70 µl Liposomensuspension in

330 μ l Medium mit den Zellen für 1,5 Stunden bei 37°C. Nach dieser Zeit wurden die Liposomen entfernt und die Zellen für 5 Minuten mit einem Zitronensäurepuffer (40 mM Zitronensäure, 120 mM Natriumchlorid, pH 3) inkubiert, was zur Ablösung der oberflächlich gebundenen Liposomen führt, danach wurde nochmals mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit 2 % Paraformaldehydlösung fixiert, anschließend mit Mowiol überschichtet und nach Trocknung am Mikroskop beobachtet.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fa. Leica, Wetzlar), ausgestattet mit einem 100 x 1,4 HCX PlanApo Ölimersionsobjektiv und TCS SP2-Software aufgenommen. Die Fluoreszenz der internalisierten DiO (Ex. 485nm / Em. 520 nm) markierten Liposomen wurde durch einen Argon-Laser angeregt. Mittels der Software wurden optische „visuelle“ Schnitte durch die Zelle erzeugt, wobei jedes Bild einer Ebene mit einer Schichtdicke von 0,93 μ m in z-Richtung entspricht.

3.7. In vitro Angiogenese Assay

3.7.1. Vorversuch MTT-Test

Dieser Test ermöglicht die Einschätzung von Lebensfähigkeit und Vitalität einer Zellkultur. Mit Hilfe des Tests bestimmt man die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen, unabhängig davon, ob sie momentan DNA synthetisieren oder nicht. Nach Zugabe von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich) zur Zellkultur entsteht aus dieser schwach gelben Lösung nach Aufbrechen des Tetrazoliumrings durch die mitochondrialen Dehydrogenasen das in Alkohol lösliche, dunkelblaue Formazan, welches photometrisch erfasst werden kann.

Die Zytotoxizität *in vitro* von Bestatin bei den verschiedenen Konzentrationen sollte so erfasst werden.

Dazu wurden jeweils 10.000 HUVEC der 2. Passage für vier verschiedene Konzentrationen von Bestatin und nur Medium als Leerwert in helle 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen) gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von Bestatin (Sigma) mit der Endkonzentration 50 mM, 100 mM, 250 mM und 500 mM bei einem Well-Gesamtvolumen von 200 μ l. Diese Inkubation der Zellen mit Bestatin dauerte 72 Stunden, wobei nach 36 Stunden ein Medium / Bestatin - Wechsel erfolgte. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgezogen und alle Zellen mit 100 μ l Medium überschichtet. Ein Well ohne Zellen

(nur Medium) wurde parallel als Substanzleerwert mitgeführt. Danach wurde je Well 10 μ l MTT hinzu pipettiert und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Zugabe von Puffer, welcher SDS und DMSO enthielt, führte zur Lyse der Zelle und zur Lösung der blauen Formazankristalle. Die Intensität der Farbstofflösung wurde photometrisch vermessen ($\lambda=570$ nm, Plattenreader Fluostar Galaxy). Durch Abzug des Substanzleerwertes von allen Messwerten und Ermittlung des 100 %-Wertes aus den Bestatin unbehandelten Proben erfolgte die Auswertung.

verwendete Lösungen:

Bestatin-Stammlösung: $3 \cdot 10^{-3}$ M

MTT-Lösung: 500 mg in 100 ml PBS gelöst, aliquotiert aufbewahrt bei -20°C , vor Gebrauch aufgetaut auf 37°C

MTT-Puffer: 10 g SDS, 20 ml Essigsäure und 80 ml DMSO gemischt

3.7.2. In vitro Sprouting Assay

Die Durchführung dieses Assays erfolgte in Anlehnung an die von Korff und Augustin beschriebene Methode [166].

Bei der praktischen Durchführung dieser Methode wurde ich freundlicherweise von Frau S. Kahrstedt, MLU Halle, Uniklinik f. Herz-und Thoraxchirurgie, AG Molekulare Gerentologie, unterstützt.

Die HUVEC der 2. Passage wurden aus den Kulturflaschen geerntet und gezählt. Danach wurde eine definierte Anzahl von HUVEC in einer Mischung aus 80 % Endothelzellwachstumsmedium und 20 % Methylcellulose-Stammlösung resuspendiert (jeweils 400 Zellen pro 100 μ l). Jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension wurde in nicht adhärente 96-Well Zellkulturplatten mit U-förmigem Boden (Greiner, Frickenhausen) eingebracht. Während der Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank kam es zur Bildung der Sphäroide (Zellagglomerate). Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide mittels einer Pipette geerntet und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Jeweils 50 Sphäroide wurden dann 5 Minuten bei 1000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die gewonnenen Sphäroide wurden dann in das Kollagen eingebettet. Dazu wurde als erstes über die gewonnenen Sphäroide 2,5 ml Medium, bestehend aus 20 % FKS und ca. 80 % Methylcellulose-SL gegeben. In einem zweiten Gefäß wurden 0,5 ml 10x Medium M199 und 2,5 ml Kollagenlösung auf Eis gemischt. Diesem Gemisch wurde vorsichtig ca. 0,5 ml kalte 0,2 M

Natriumhydroxidlösung tröpfchenweise zugegeben, um den pH Wert auf 7,4 einzustellen (Farbumschlag des Phenolrots im Medium von gelb nach erdbeerrot). Die neutralisierte Kollagenlösung wurde mit der Sphäroidsuspension gemischt, dann wurde sofort die Bestatinlösung bzw. die Antikörperlösung in den unten genannten Konzentrationen hinzugegeben. Die Mischung wurde in eine vorgewärmte 24-Well-Zellkulturplatte gleichmäßig in vier der acht inneren Wells verteilt (1 ml je Loch), wobei die äußeren Löcher der Zellkulturplatte mit PBS gefüllt waren. Nach einer Stunde im Brutschrank und Polymerisation des Kollagens zu einem festen Gel wurden 100 µl Medium M199 mit 25 ng/ml VEGF auf jedes Well gegeben. Nach 18 bzw. 72 Stunden Inkubation wurden die Gele für 1 Stunde mit 1 ml 10 % Paraformaldehydlösung pro Gel abgestoppt. Anschließend wurden die Gele unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 200M, 10-fache Vergrößerung) mit der Software Metamorph Version 6.1r6 (Universal Imaging Corp.) untersucht und die Länge und Anzahl der Sprouts untersucht. Dabei wurde die kumulative Länge der Kapillarsprosse (CSL-cumulative sprout length) von 10 ausgewählten repräsentativen Sphäroiden je Ansatz ermittelt und dargestellt.

verwendete Reagenzien:

Endothelzellwachstumsmedium: ECGM, Promocell, Heidelberg

Methylcellulose-Stammlösung: 6 g Methylcellulose (Sigma-Aldrich) mit 250 ml auf 60°C vorgewärmtes Basalmedium (Promocell) für 20 Minuten mischen, dann weitere 250 ml Basalmedium hinzufügen und dann 1-2 Stunden bei 4°C rühren, anschließend Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 5000g, nur klaren Überstand verwenden.

Für die Bildung der Sphäroide 20 % Methylcellulose-SL mit 80 % ECGM mischen.

Kollagenlösung: aus Rattenschwänzen präpariert durch S. Kahrstedt (MLU Halle)

FKS, Medium M199 10x Sigma-Aldrich

VEGF R & D

Bestatin: Sigma-Aldrich, 5 mg in 1 ml milliQ Wasser (Braun) gelöst, im Assay in den Endkonzentrationen 100 µM, 250 µM, 500 µM benutzt

WM-15 Antikörper: mouse anti-human CD 13 monoclonal antibody, Chemicon Europe, Ausgangskonzentration 0,5 mg/0,5 ml, im Assay in den Endkonzentrationen 10 µg/ml, 20 µg/ml und 50 µg/ml verwendet

3.8. PET-Untersuchungen

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Rossendorf, Abteilung Radiopharmazeutische Biologie, Herrn Dr. Bergmann, durchgeführt. Dies bezieht sich insbesondere auf die *in vivo* Untersuchungen und die Bedienung des PET-Tomographen.

Die Liposomen für diese Versuche hatten analog die Zusammensetzung SPC / Cholesterol / PEG-PE im Verhältnis 13,6 µmol / 6 µmol / 0,4 µmol je Milliliter, sie enthielten je µmol Gesamtlipid 10 µg CNGRC- bzw. CARAC-Peptid. Die Lipidfilme (jeweils 2,5 µmol Gesamtlipid) wurden durch Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei 40°C (Büchi) in Schliffreagenzgläsern (Roth, Karlsruhe) gezogen. Danach wurden diese Lipidfilme zusätzlich für 24 Stunden über Phosphorpentoxid unter Vakuum getrocknet. Die Reagenzgläser wurden dann in einem speziellen Stativ angebracht, welches das gleichzeitige Eintauchen in ein Ultraschallbad von vier Reagenzgläsern nebeneinander ermöglicht. Jetzt erfolgte die Zugabe des Hydratationsmittels (250 µl) je nach Verwendungszweck, wie nachfolgend angegeben.

Vorversuche: Für die Untersuchung der Einschlusskapazität und der Serumstabilität wurden die Liposomen mit 250 µl einer 100 mM 6-CF-Lösung für 30 Minuten unter Eiskühlung im Ultraschallbad (Roth, Transsonic 460/H) hydratisiert. Anschließend wurde nicht eingeschlossene Farbstofflösung mittels einer G50-Säule durch Größenausschlusschromatographie entfernt. Die Bestimmung der Einschlusskapazität erfolgte analog der unter Punkt 3.3.4 beschriebenen Methode. Zur Bestimmung der Stabilität in Serum, wurden jeweils 5 µl Liposomen in 250 µl humanem Vollserum (c.c. pro Germany) bei 37°C in schwarzen 96-Well-Platten inkubiert und die Freigabe durch mehrmalige Messungen der Fluoreszenz (Fluostar Plattenreader) über einen Zeitraum von 300 Minuten verfolgt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte analog Punkt 3.3.4. Liposomenstabilität.

in vivo Versuche: Die Hydratisierung erfolgte im Radioaktivlabor des Forschungszentrums Rossendorf unter den Auflagen des Arbeits- und Strahlenschutzes. Das Radiopharmakon ^{18}F -FDG wurde uns in Aqua dest. zur Verfügung gestellt. 900 μl der wässrigen ^{18}F -FDG-Lösung wurde mit 100 μl 10-fach konzentrierter PBS versetzt und davon sofort jeweils 250 μl in die Reagenzgläser auf die Lipidfilme gegeben und anschließend 30 Minuten im Ultraschallbad unter Eiskühlung hydratisiert. Die Abtrennung von nicht eingeschlossener ^{18}F -FDG-Lösung erfolgte über eine Sephadex G50-Säule. Sofort im Anschluss erfolgte die Injektion in die Versuchsmäuse mit Liposomen (CNGRC und CARAC-funktionalisierte) und reinem ^{18}F -FDG per Schwanzvene. Die Lipiddosis je Maus betrug dabei ca. 3 μmol und die eingeschlossene Radioaktivität in den Vesikeln bzw. auch des freien ^{18}F -FDG betrug ca. 0,3 MBq. Die uns vom Forschungszentrum Rossendorf zur Verfügung gestellten athymischen Nacktmäuse trugen an der rechten hinteren Flanke einen Tumor, der durch subkutane Impfung mit HT-29 humanen Kolonkarzinomzellen erzeugt wurde.

Die Emissionsmessung wurde im Anschluss an die Injektionen sofort gestartet und erfolgte über einen Zeitraum von 240 Minuten mittels PET-Kamera (Concorde microPET P4). Die gemessene Strahlungsaktivität wurde ermittelt und umgewandelt in Bq je cm^3 Gewebe nach Korrektur der Werte durch Strahlungsabschwächung (Zerfall) und Transmissionsmessung. Die Zeit-Aktivitäts-Kurven wurden erstellt von bestimmten Organen (Milz, Herz usw.) (ROI-Region of interest).

3.9. Untersuchungen an der CAM

Verwendete Liposomen

In den Vorversuchen zur Bestimmung der optimalen Lipidparameter kamen Vesikel der Zusammensetzung SPC:Cholesterol im molaren Verhältnis von 7:3 zum Einsatz, von denen ein Teil zusätzlich mit 5 mol% PEG-PE auf Kosten des SPC-Anteils ausgestattet waren. Die Gesamtlipidkonzentration betrug 10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. Die Vesikel waren markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiO in einer Konzentration von 1 mol%.

Bei den Targetingversuchen mittels Injektion in die CAM wurden Liposomen mit einer Gesamtlipidkonzentration von 5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ eingesetzt. Die Markierung erfolgte mittels des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs Texas-Red-DHPE mit 1,5 mol%. Die Funktionalisierung der Liposomen erfolgte analog der *in vitro* Bindungsstudien mit CNGRC- und CARAC-

Lipopeptiden in einer Konzentration von 10 µg Peptid je µmol Lipid. Die Herstellung und Behandlung der Liposomen erfolgte wie im Kapitel 3.3 beschrieben.

Arbeiten an der CAM / Injektion in das Gefäßsystem der CAM

Die Durchführung der Arbeiten an den befruchteten Hühnereiern, Präparation der CAM und Injektionen in die CAM wurde in Kooperation mit der AG Dr. Rothe (MLU Halle, Medizin, Physiologische Chemie) mit Hilfe von Frau Dr. S. Rode durchgeführt. Es erfolgt deshalb nur eine kurze Beschreibung der Methode.

Die genutzten befruchteten Eier stammten von einem Biobauernhof aus Freilandhaltung. Die Bebrütung der Eier erfolgte in einem Inkubator (Heraeus, 37,5°C, 78% Luftfeuchte). Nach 3 Tagen wurden die Eier geöffnet. Dazu wurde das stumpfe Ende des Eis mittels eines Dentalbohrers mit eingespannter Diamantscheibe aufgeschnitten und die Eihaut entfernt und damit die CAM freigelegt. Die Eier wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Frischhaltefolie verschlossen und weiter inkubiert. Zur Generierung des Tumors auf der CAM wurden RD-Zellen, eine embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie, verwendet. Dabei wurden die RD-Zellen in Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel kultiviert und dann als stabiles Zellkonglomerat auf die ca. 7 Tage alte CAM übertragen. Nach ca. 4-6 Tagen hatten sich solide Tumoren unter entsprechender Angiogeneseinduktion gebildet. Die Injektionen der Liposomen erfolgten in die venösen Gefäße der 11-18 Tage alten CAM. Zur Injektion wurden geschliffene Glaskapillaren verwendet, die mittels einer Insulinspritze mit der Liposomensuspension befüllt wurden (20 µl). Die Injektion selbst erfolgte unter dem Mikroskop (Leica MZ III) mit Hilfe des Eppendorf Mikromanipulators 5170 mit Mikroinjektor 5242, in den die befüllte Glaskapillare eingespannt war. Der Injektionsdruck wurde mit einer Stickstoff-Gasdruckflasche zur Verfügung gestellt. Der Vorgang der Injektion und die Zirkulation der Liposomen wurden am Fluoreszenzmikroskop (Leica MZ III) verfolgt und über die Digitalkamera (Nikon CoolPix 4500) oder die schwarz / weiß Kamera (pixelfly pco.imaging) dokumentiert. Teilweise wurde die CAM nach 24 Stunden Zirkulationszeit der Liposomen mit Paraformaldehyd fixiert, herauspräpariert und auf einem Objektträger in Mowiol-Mounting Medium (siehe 3.5.1) eingebettet und am Laser Scanning Mikroskop (Leica TCS SP2) die Fluoreszenz der Liposomen in der CAM untersucht (Texas Red: Ex.583nm / Em.601 nm).

funktionelle Beeinflussung der Gefäßbildung

Für diesen Teilversuch wurden die RD-Tumoren auf der CAM mit Bestatinlösungen der Konzentrationen 6 mM, 120 μ M, 12 μ M behandelt. Dazu wurde der Tumor mit 10 μ l der jeweiligen Bestatinlösung penetriert. Der Tumor und die Veränderungen der umliegenden tumoralen Gefäße wurden über 6 Tage visuell durch Auswertung der aufgenommenen Bilder (Nikon CoolPix) untersucht. Als Vergleich wurden Tumoren auf der CAM mit 10 μ l PBS behandelt.

3.10. In vivo Mausmodell

Liposomen

Analog zu den Bindungsstudien *in vitro* wurden die Liposomen in der Gesamtkonzentration von 10 μ mol/ml bestehend aus SPC, Cholesterol und PEG-PE 2000 im Verhältnis 6,8:3:0,2 (molar) hergestellt. Die spezifisch funktionalisierten Liposomen enthielten 10 μ g CNGRC-Peptid je μ mol Lipid. Als Kontrollliposomen dienten Vesikel, die unspezifisches CARAC-Peptid enthielten (10 μ g/ μ mol Lipid) bzw. Liposomen, die nur aus der Grundlipidmischung bestanden. Die Herstellung und Behandlung erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Zur Verfolgung des Blutspiegelverlaufs und der Organverteilung in den *in vivo* Versuchen trugen die Liposomen den radioaktiven Marker $1\alpha 2\alpha$ - 3 H-Cholesteryloleat (Amersham, Buckinghamshire, UK) in der Konzentration von ca. 0,25 μ Ci/ μ mol Lipid. Dieser Marker wurde im Herstellungsvorgang der Liposomen zu den anderen Lipidbestandteilen gegeben (durchgeführt im Isotopenlabor d. Instituts f. Physiologische Chemie der Medizin, Halle).

Versuchstiere / Injektion / Organentnahme / Blutproben

Alle Arbeiten mit den Mäusen, insbesondere die Injektionen und die Blut- und Organentnahmen wurden durch die Firma EPO (Experimentelle Pharmakologie Onkologie) in Berlin-Buch durchgeführt.

Für die Weiterverarbeitung der Proben nutzten wir das Isotopenlabor des Max-Dellbrück-Zentrums in Berlin-Buch. Unterstützt wurden wir dabei freundlicherweise von Herrn Dr. R. Zeisig.

Für den Versuch kamen 6-8 Wochen alte weibliche Nacktmäuse (NMRI:nu/nu) zum Einsatz. Humane Mammakarzinom MT-3 Zellen wurden den Nacktmäusen subkutan transplantiert (1×10^7 Zellen pro Tier). Nach 13 Tagen (Tumor tastbar) wurden jeweils 200 μ l (2 μ mol Lipid) Liposomensuspension pro Maus per Schwanzvene injiziert. Dabei wurden jeweils

Gruppen von sechs Mäusen mit spezifischen CNGRC-Liposomen, unspezifischen CARAC-Liposomen und unfunktionalisierten Liposomen gespritzt. Drei der Mäuse je Gruppe wurden nach 4 Stunden und die anderen 3 Mäuse nach 24 Stunden getötet (Nackenzug) und nachfolgende Organe entnommen: Leber, Milz, Lunge, Niere und Tumor. Die Entnahme von Blutproben (25 µl) erfolgte nach Narkotisierung aus dem retroorbitalen Augenplexus zu den Zeitpunkten 5 min, 30 min, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h.

Radioaktivitätsmessung

Die ^3H -Messungen erfolgten im Wallac 1410 Liquid Scintillation Counter. Als Scintillator wurde Ultima Gold (Perkin Elmer) verwendet. Die Messeffektivität wurde durch Vermessung eines Aliquots ^3H Stammlösung im Scintillator (1 ml) bestimmt. Bei der Messung von ^3H in biologischen Proben tritt eine Minderung der Wiederfindungsrate durch Löscheffekte auf. Diese Löscheffekte können makroskopische (Trübung) oder substanzspezifische Ursachen haben und für jede Probe (Leber, Niere...) individuell variieren. Wir haben deshalb eine Bestimmung der Messeffektivität in der jeweiligen Probe durchgeführt. Dazu wurde zum jeweiligen Organ einer unbehandelten Maus in der Solubilisierungsflüssigkeit ein Aliquot ^3H -Stammlösung zugesetzt und durch Messung und anschließenden Vergleich mit dem Wert der reinen Stammlösung die Wiederfindung berechnet (Effektivität in %).

Zur Überprüfung der injizierten Dosis je Maus (100 % - Wert cpm) wurden 50 µl Liposomensuspension im Scintillator (1 ml) vermessen und auf die eingesetzte Menge Lipid (2 µmol je Maus) hochgerechnet (cpm/µmol)

Organaufbereitung

Die zu untersuchenden Organe wurden nach der Entnahme mittels Gewebelöser Solvable (Perkin Elmer) so behandelt, dass man klare Lösungen erhält. Dazu wurden Leber, Milz, Niere, Lunge und Tumor mit 1 ml Solvable versetzt und bei 60°C 15 Stunden inkubiert. Die Proben von blutreichen Organen (Milz, Leber) wurden zur Entfärbung mit Wasserstoffperoxidlösung versetzt. Die Proben wurden anschließend gevortext. Anschließend wurden Aliquote von 200 µl entnommen und in 2 ml Scintillator Ultima Gold überführt, wieder gründlich gemischt und anschließend vermessen. Das Gesamtvolumen der Organlysate bzw. das Gewicht der entnommenen Aliquote wurde durch Wägung vor und nach Abnahme der Messaliquote bestimmt.

Die Aktivität des Gesamtorgans berechnete sich nach folgender Formel:

$$cpm \text{ pro Organ}^{1)} = \left(\frac{\text{Zählrate}[cpm]}{\text{Effektivität}[\%]} \right) \times 100 \times \left(\frac{\text{Gesamtmasse Probe}[g]}{\text{Masse Aliquot}[g]} \right)$$

¹⁾ Bei der Leber erfolgte eine weitere Umrechnung auf das gesamte Organ, da die Probe nur ein Teilstück der Leber darstellte.

Unter Berücksichtigung des 100 % Wertes (cpm) jeder Liposomenpopulation konnte die Lipid (Liposomen)-Wiederfindung je Organ bzw. je Gramm Organ ermittelt werden.

Die Blutproben (25 µl) wurden parallel wie die Organe mit 1 ml Solvable behandelt und davon 200 µl in 2 ml Ultima Gold überführt. Bei der Umrechnung der Aliquotradioaktivität auf die Gesamtradioaktivität im Blut wurde von der Durchschnittsmaus von 25,5 g ausgegangen und entsprechend der tatsächlichen Masse der Maus per Faktor nach oben oder unten korrigiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Darstellung APN-gerichteter Liposomen

Das Endothel der während der Tumorangiogenese neu gebildeten Gefäße erfährt charakteristische, phänotypische Veränderung im Vergleich zu gesunden Gefäßen. So ist das angiogenetisch aktive Endothel durch die Expressierung spezifischer Oberflächenrezeptoren geprägt. Beispielsweise wird eine spezielle Isoform der Aminopeptidase N (APN) exprimiert, die eine Bindungsselektivität für Peptide mit einem NGR (Asparagin-Glycin-Arginin)-Motiv aufweist. Damit bietet die vaskuläre APN des angiogenetischen Gefäßes hervorragende Voraussetzungen für die Nutzung als Targetstruktur, um auf diesem Wege Arzneistoffvehikel zum Tumorgefäß zu bringen. Ein weiterer Vorteil des Targetings der vaskulären APN besteht darin, dass einmal applizierte Vehikel die Blutbahn nicht mehr verlassen müssen und direkt für die Targeterkennung und -bindung zur Verfügung stehen. Auf dieser Grundlage könnten sich, zusammen mit der Tatsache, dass Angiogenese im gesunden Körper kaum vorkommt, neue Ansätze für eine antiangiogenetische Tumorthherapie eröffnen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden APN-gerichtete Liposomen als Drug Delivery Systeme vorgeschlagen und in ihrem Potential untersucht. Dazu sollen durch Kopplung von Peptiden mit der Peptidsequenz NGR funktionalisierte Liposomen hergestellt und deren Targetierungseigenschaften untersucht und optimiert werden.

Die Erstellung und Optimierung dieses APN-gerichteten Drug Delivery Systems erfolgte in mehreren Arbeitsabschnitten, die im Folgenden nacheinander vorgestellt werden. Dabei wird auch auf einzelne Vor- bzw. Zwischenversuche eingegangen, die zwar letztendlich ohne direkten Einfluss auf die Endergebnisse waren, aber wichtige Erkenntnisse für die Weiterführung der Versuche lieferten.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte die Kopplung des NGR-enthaltenden Peptides mit einem Lipidanker für eine Inserierung in die Liposomenmembran. Dazu musste eine geeignete Methode gefunden werden, die sowohl den Ansprüchen der Peptidchemie, als auch der Lipidchemie gerecht wird. An die Darstellung der Liposomen schloss sich die Erprobung ihrer *in vitro* Targetbindungsfähigkeit unter Verwendung humaner Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und Krebszellen an. Die im Anschluss durchgeführten Internalisierungsexperimente sollten Aufschluss über Menge und Art der Aufnahme bringen, um Rückschlüsse auf mögliche therapeutische Ansätze ziehen zu können. Eine Fortführung

der Versuche im *in vivo* nahen Modell der Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis und in tumortragenden Mäusen sollte Aufschluss über das Verhalten der Liposomen im komplexen Organismus geben.

Zur Herstellung der APN-gerichteten Liposomen sollten diese mit dem NGR-Liganden gekoppelt werden. Wir haben uns dabei für die Verwendung des zyklischen Peptides CNGRC (Cystein-Asparagin-Glycin-Arginin-Cystein) entschieden, obwohl aus Phage Display Untersuchungen bekannt ist, dass sowohl die lineare Form als auch die zyklische Form mit zwei flankierenden Cysteinen zur Bindung der endothelialen APN in der Lage ist [125]. Bei weiteren *in vivo* Untersuchungen stellte man jedoch fest, dass das Ausmaß der Bindung des linearen Peptides GNGRG (Glycin-Asparagin-Glycin-Arginin-Glycin) unter dem des zyklischen CNGRC (Cystein-Asparagin-Glycin-Arginin-Glycin) lag. Anschließende Konformationsuntersuchungen erklärten, dass die Disulfidbrücke des zyklischen Peptides das Molekül wahrscheinlich in seiner für die APN-Bindung notwendigen Konformation stabilisiert. Die lineare Form kann aufgrund ihrer höheren Beweglichkeit mehrere Konformationszustände einnehmen und erreicht damit seltener die Konformation, welche vom APN-Rezeptor erkannt wird. Zusätzlich passt die lineare Form aufgrund ihrer Beweglichkeit besser in die Bindungstaschen von anderen Proteasen und Peptidasen und kann so schneller abgebaut werden [167]. Eine endgültige Erklärung für das Bindungsverhalten gibt es aufgrund der fehlenden genauen Strukturaufklärung der Isoform der APN auf angiogenetisch aktivem Endothel nicht.

Bei der Funktionalisierung der Liposomen mit den CNGRC-Liganden konnte nicht ohne Einschränkungen auf die bisherigen Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe mit der Kopplung von Antikörpern an Vesikel zurückgegriffen werden. Diese basierten auf der Reaktion des Ankerlipids im präformierten Liposom mit einer beliebigen Aminogruppe des Antikörpers, was zu einer zufälligen Orientierung des Liganden auf der Liposomenoberfläche führt. Dies ist bei den ca. 140 kDa großen Antikörpermolekülen ausreichend, um diese oft genug mit der entsprechenden Bindungsdomäne an der Liposomenoberfläche zu präsentieren. Bei dem in unserem Fall benutzten CNGRC-Peptid mit einer molaren Masse von ca. 700 g/mol (mit Spacer, siehe Material u. Methoden) sollte die aus den drei Aminosäuren NGR bestehende, bindende Region auf keinen Fall zur Kopplung an das Liposom verwendet werden. Wir haben uns deshalb vor der Liposomenherstellung für eine separate und gezielte Kopplung des

Lipidankers an die endständige Aminogruppe des Peptidspacers unter Schutz der funktionellen Gruppen der anderen Aminosäuren entschieden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurde dieser Phospholipidanker-Peptid-Komplex gezielt während der Herstellung der Liposomen in die Membran eingebaut, um so dem Peptid eine optimale Ausrichtung zu geben. Vorteil dieser Methode ist, dass kein Kopplungslipid in die Liposomen eingebaut werden muss bzw. die Liposomen keiner Kopplungsreaktion unterzogen werden müssen.

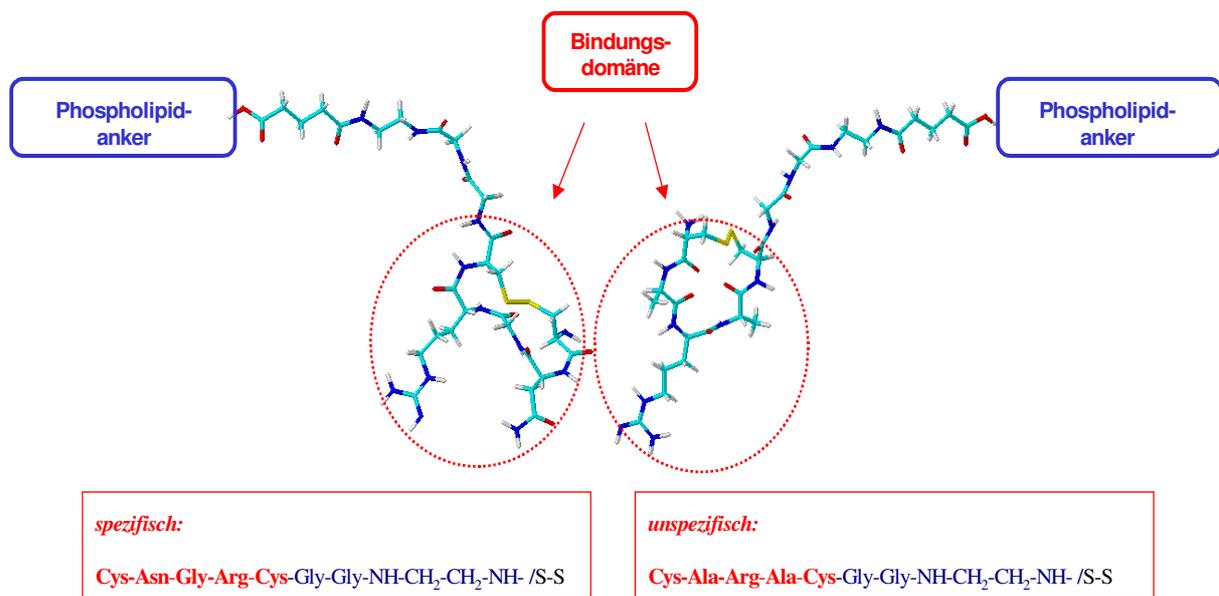
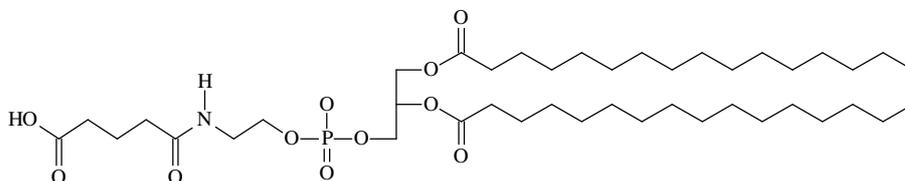


Abb.4-1: Schematische Darstellung des Lipidanker-Peptid-Konjugats (Lipopeptid)

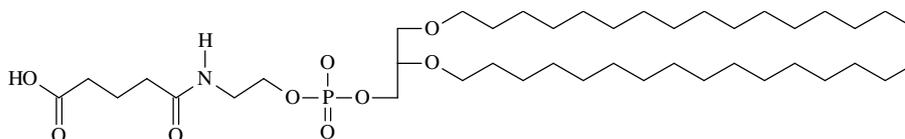
4.1.1. Darstellung des Lipidanker-Peptid-Konjugats

Als Ankerlipid zum Koppeln des Peptides sollte der von Weissig [160] entwickelte Lipidanker N-Glut-PE verwendet werden. Dieser erwies sich in unserer Arbeitsgruppe als praktikabler und preiswert zu synthetisierender Phospholipidanker. Er ist mit zahlreichen Lipidkompositionen kombinierbar und wird deshalb auch in vielfältigen anderen Liposomenarbeiten zum Koppeln verschiedener Liganden, u.a. von Proteinen und Kohlenhydraten verwendet [168-170]. Eine Minderung der Verluste durch Hydrolyse der Fettsäureester in 1,2 - Position des Glycerolgrundkörpers während der Abspaltung der Schutzgruppen des Peptides im Säuren sollte durch Austausch des Ausgangsstoffs erreicht werden. Mit der Verwendung von 1,2-O,O-Dihexadecyl-glycero-phosphoethanolamin als

Ausgangsstoff wurde ein Ether und damit ein wesentlich Hydrolyse unempfindlicherer Lipidanker synthetisiert (siehe Kapitel 3.2.1.).



N-Glut-PE (Ester nach Weissig) [160]



N-Glut-PE (Ether)

Abb.4-2: Strukturformeln der verschiedenen Phospholipidanker

Zur Aktivierung der Carbonsäure wurde das Reagenz BOP (Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorosphat) favorisiert, da es als mildes und zuverlässiges Reagenz in der Peptidchemie zur Bildung von Amidbindungen bei Verwendung von Säure/Basen-labilen Schutzgruppen bei guten Ausbeuten gilt [171].

Im ersten Schritt, bei dem nach Aktivierung der Carbonsäurefunktion von N-Glut-PE und Umsetzung des Peptides eine Detektion und anschließende Trennung des geschützten Produktes durch präparative HPLC (RP8-Säule, Methanol/Acetonitril-Gradient) erfolgen sollte, konnte in keiner der eluierten Fraktionen das Lipid-Peptid-Konjugat nachgewiesen werden. Wir vermuteten eine mangelnde Löslichkeit im Elutionsmittel und ein Verbleiben des Reaktionsproduktes auf der Säule, da das Lipid-Peptid-Konjugat im Reaktionsgemisch vor Aufgeben auf die HPLC noch massenspektrometrisch nachweisbar war, danach in allen Fraktionen aber nicht mehr.

Da mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden der Peptidchemie eine Auftrennung des Reaktionsgemisches nicht möglich war, entschieden wir uns für die Trennung mittels Chromatotron. Diese präparative, radial beschleunigte Dünnschichtchromatographie ermöglichte uns die Aufreinigung der äußerst geringen Mengen des Lipid-Peptid-Konjugats, was nach dem beschriebenen anschließenden Auftrennungsschritt durch präparative

Dünnschichtchromatographie nach Abspaltung der Schutzgruppen zu akzeptablen Ausbeuten führte (ca. 35 %).

4.1.2. Charakterisierung der mit CNGRC bzw. CARAC funktionalisierten Liposomen

Nach Darstellung und Analytik des Lipidanker-Peptid-Konjugats (Lipopeptid) sollte dieses in die Liposomenmembranen zur Herstellung funktionalisierter Liposomen eingebaut werden. Dazu wurden zur Lipidgrundmischung SPC/Cholesterol (7/3 molar) 5 mol% des N-Glut-PE-CNGRC- bzw. des entsprechenden Referenzlipopeptides (N-Glut-PE-CARAC) zugesetzt.

Das Lipidanker-Peptid-Konjugat zeigt gegenüber dem reinen Ankerlipid eine zur Hydrophilie verschobene Amphiphilie, daher musste dessen prinzipielle Membraninserierbarkeit mit den Methoden zur Liposomenherstellung in Einklang gebracht werden. Die Präparation erfolgte durch zwei verschiedene Standardmethoden, der Detergenzdialysemethode bzw. der Hydratationsmethode mit anschließender Ultraschallbehandlung bzw. Extrusion durch Membranfilter. Da die Darstellung mit beiden Methoden erfolgreich war, wurde für weitere Untersuchungen die Hydratationsmethode favorisiert, da diese wesentlich schneller, einfacher und reproduzierbarer durchzuführen ist.

Als erstes Qualitätskriterium wurde der Einfluss des Lipopeptides auf die resultierende Vesikelgröße untersucht. Es konnte für Liposomen bis zum untersuchten Anteil von 10 mol% Lipopeptid keine maßgebliche Änderung der Vesikelgröße beobachtet werden.

Da nicht automatisch von einem vollständigen Einbau des Konjugates in die Liposomenmembran ausgegangen werden konnte, musste insbesondere die reproduzierbare Darstellung von Vesikelpopulationen mit einem definierten Gehalt des Peptides nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde von uns deshalb der quantitative Nachweis von CNGRC und CARAC im Liposom verfolgt. Durch die geringe Größe des Peptids (ca. 700 g/mol) und damit einer geringen Anzahl funktioneller Gruppen wurde der Nachweis wesentlich erschwert. Mehrere klassische Nachweismethoden, die sich beispielsweise auf die Detektion von aromatischen Gruppen (z.B. einfache Adsorptionsmessung, Bradford-Assay) beziehen, konnten ausgeschlossen werden. Hinzu kam, dass die Methode auch in Anwesenheit von Detergenzien (zum Zerstören der liposomalen Strukturen) sensitiv genug zum Nachweis der geringen Mengen und der geringen Anzahl von Aminosäuren im Molekül sein sollte. Sowohl der sonst in unserer Arbeitsgruppe benutzte Peterson-Lowry-Assay [172], als auch der Versuch des Nachweises der Sulfidgruppen mit Orthophtalaldehyd [173] im Molekül unter

vorheriger Reduktion der Disulfidbrücke zeigten sich als nicht geeignet aufgrund mangelnder Empfindlichkeit.

Der Nachweis gelang uns schließlich mit dem Reagenz CBQCA (Molecular Probes[®]), welches auch in Anwesenheit von Detergenzien und Lipiden mit primären Aminen hochsensibel zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat reagiert. Der im Protokoll von Molecular Probes[®] vorgeschlagene Standard BSA zur Ermittlung der genauen Mengen musste von uns ersetzt werden, da BSA mit einer Masse von 66 kDa und einer Vielzahl funktioneller Gruppen als Vergleich für unser aus sieben Aminosäuren bestehendes Peptid inakzeptabel war. Wir entschieden uns für ein adäquates Peptid (ebenfalls nur sieben Aminosäuren), welches uns freundlicherweise vom Max-Planck-Institut (AG Jahreis) zur Verfügung gestellt wurde.

Als Ergebnis zeigt sich, dass mit steigendem molaren Anteil des Lipidanker-CNGRC-Konjugats auch die nachweisbare Peptidmenge am Liposom linear ansteigt, d. h. es kommt zu einem gleichmäßigen Einbau des CNGRC-Peptides in die Liposomenmembran.

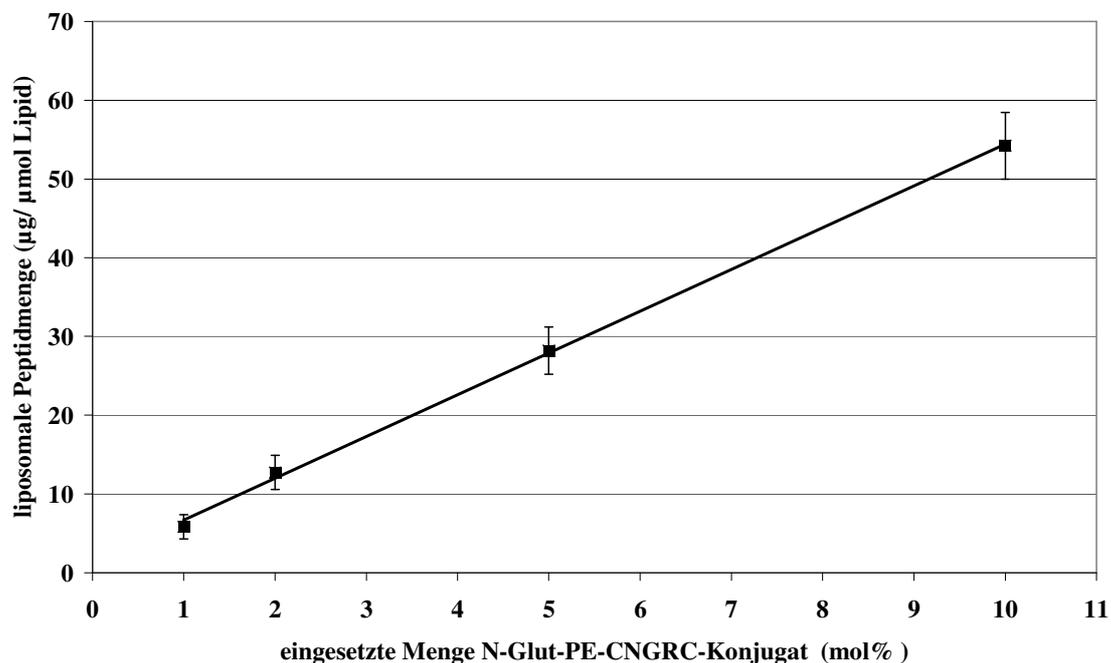


Abb.4-3: Eingebaute Menge CNGRC-Peptid je μmol Lipid in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Lipopeptid

Rechnet man die erhaltenen Werte auf Anzahl der CNGRC-Peptidmoleküle pro Liposom um, erlaubt dies ein Vergleich mit den herkömmlichen Antikörperkopplungsmethoden an N-Glut-PE.

	Peptid	Antikörper *
nachgewiesene Peptid- bzw. Antikörpermenge je μmol Lipid	10 μg	90 μg [174]
↓	↓	↓
Anzahl d. Moleküle pro Liposom in der Außenmonolayer	1123	97

*gekoppelt an N-Glut-PE enthaltende präformierte Liposomen [174]

Abb.4-4: Vergleich der Anzahl von Peptid- bzw. Antikörpermolekülen pro Liposom (100 nm Durchmesser)

Berechnungsgrundlage:

mittlerer Flächenbedarf eines Lipids: $0,4 \text{ nm}^2$ [3], Gesamtoberfläche der Liposomen in $1 \mu\text{mol} = 1,68 \cdot 10^{17} \text{ nm}^2$, Anzahl der Liposomen je μmol Lipid = $2,95 \cdot 10^{12}$, Gesamtoberfläche eines Liposoms = 56863 nm^2 (Innenoberfläche = 25447 nm^2 , Außenoberfläche = 31416 nm^2 , $8,58 \cdot 10^{12}$ Peptide/ μmol Lipid, $4,1 \cdot 10^{14}$ Antikörper/ μmol Lipid)

Dabei fällt auf, dass selbst bei der Menge von 10 μg Peptid je μmol Lipid eine mehr als 10-fach höhere Anzahl von Liganden an einem Liposom vorhanden ist, als Antikörpermoleküle bei Immunliposomen. Dieses Resultat kann natürlich nicht als Überlegenheit der Herstellungsmethode gewertet werden, sondern ist der geringen molaren Masse des Peptids geschuldet, erscheint aber in Hinblick auf die folgenden Targetierungsexperimente als vorteilhaft.

Hinzu kommt ebenfalls, dass bei Inkorporierung von PEG-PE die Kopplungsausbeute von Antikörpern an präformierte N-Glut-PE-haltige Liposomen massiv absinkt (z.B. bei einem Anteil von 5 mol% PEG-PE auf 19 %) [174]. Bei der hier von uns angewendeten Technik mit fertigen N-Glut-PE-CNGRC Lipopeptiden kommt es zu keiner Beeinträchtigung des Peptideinbaus durch PEG-PE (nicht gezeigt), was für eine spätere *in vivo* Anwendung sehr vorteilhaft ist.

Um zu überprüfen, inwieweit die reproduzierbar eingebauten Mengen an Lipidanker-Peptid-Konjugat einen Einfluss auf die Membranpermeabilität und damit die Liposomenstabilität bewirken, wurden Einschlussexperimente durchgeführt. Die Stabilität von Liposomen mit 5 mol% Lipopeptid wurde mit Hilfe wiederholter Bestimmungen der von den Vesikeln

eingeschlossenen Fluoreszenzmarkerlösung überprüft. Sind die zu prüfenden Vesikel instabil und permeabel für die eingeschlossene Farbstofflösung, zeigt sich dies in einem Abfall der Einschlussmenge.

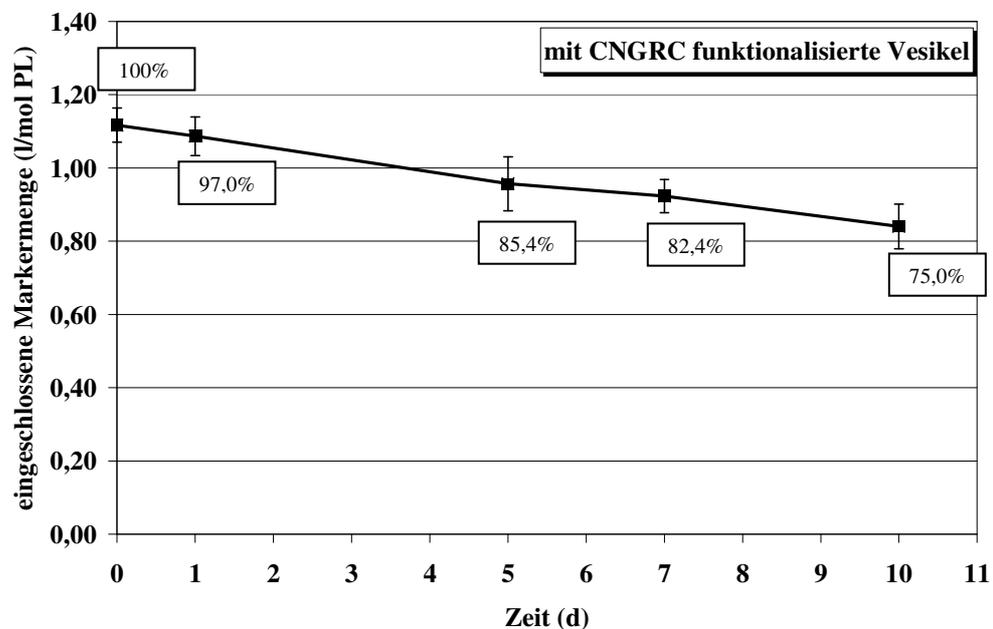
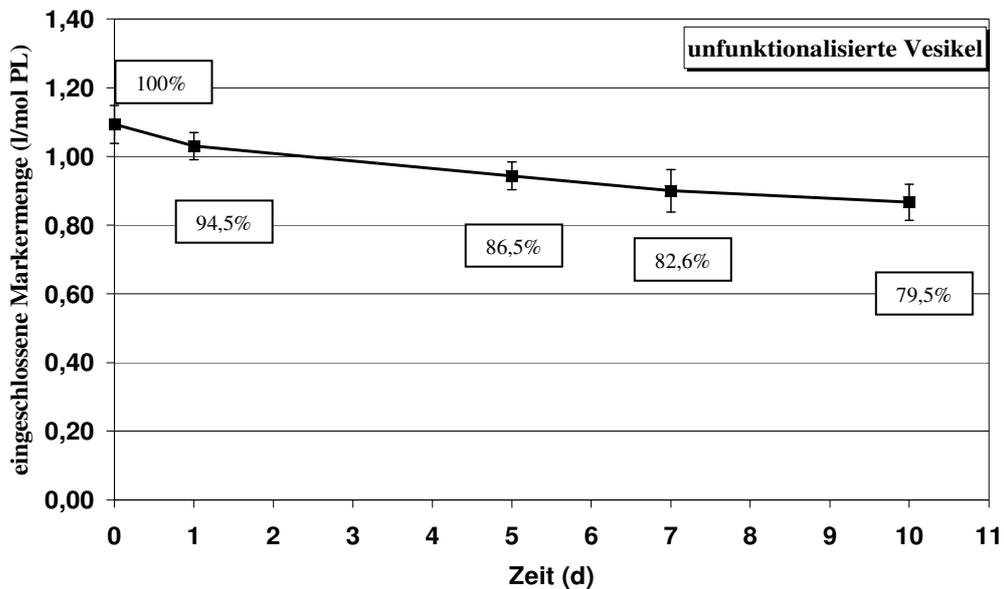


Abb.4-5: Einschluss-Stabilität der Liposomen in PBS über 10 Tage (mit bzw. ohne Funktionalisierung durch das Peptid CNGRC)

Abb.4-5 zeigt die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung für die Vesikel, welche nur mit dem Ankerlipid N-Glut-PE präpariert wurden („unkontrollierte“) und für die Liposomen, welche mit dem Lipidanker-CNGRC-Konjugat („kontrollierte“) präpariert wurden. Beide Präparationen zeigen einen kontinuierlichen, geringfügigen Abfall der Einschlussmenge über den Beobachtungszeitraum. Eine Reduktion der Einschlussmenge im Zeitraum von 10 Tagen von ca. 20 % ist akzeptabel und mit anderen Lipidzusammensetzungen vergleichbar [165,174]. Auch bei einer Erhöhung des CNGRC-Lipopeptid-Anteils auf 10 mol% oder dem Einbau des Referenzpeptids CARAC zeigten sich die gleichen Verläufe der Stabilität (Daten nicht gezeigt). Es konnte bewiesen werden, dass es durch den Einbau des Peptides CNGRC bzw. des Referenzpeptids CARAC nicht zu einer Einbuße in der Stabilität der Vesikel kommt und damit die Voraussetzung für weiterführende *in vitro* Versuche gegeben ist.

4.2. In vitro Targetierungsuntersuchungen mit den funktionalisierten Liposomen

4.2.1. Bindungsuntersuchung am Mikroskop

Die im Kapitel 4.1 umfassend charakterisierten Peptid-gekoppelten Liposomen besitzen somit alle Voraussetzungen für eine Targetierung der APN auf angiogenetisch aktiven Endothelzellen. Für dieses therapeutische Ziel werden im Folgenden verschiedene *in vitro* Bindungsstudien vorgestellt, die eine spezifische Akkumulation der funktionalisierten Liposomen an aktivierte Endothelzellen zeigen.

Zu diesem Zweck wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren (HUVEC) verwendet, die nach Isolation und Kultivierung in der zweiten Passage genutzt wurden. Um eine klare Abgrenzung der Bindungs- von Internalisierungsvorgängen zu erreichen, wurden sämtliche Targetierungsversuche bei 4°C durchgeführt, um energieabhängige Vorgänge, wie z.B. die Aufnahme in die Zelle zu unterbinden [175]. Die Bindungsuntersuchungen erfolgten stets an einer Monoschicht der Zellen auf einem geeigneten Träger, was auch am stärksten den physiologischen Gegebenheiten im Blutgefäß entspricht. Zur Simulation der Überexpression von APN auf Endothelzellen während der Tumorangiogenese wurden die Zellen zusätzlich mit IL-4 stimuliert. Dieses Zytokin bewirkt eine Steigerung der APN-Expression auf Endothelzellen um mehr als das Doppelte [136]. Der Nachweis der hohen Expression von APN auf HUVEC erfolgte zusätzlich über FACS-Untersuchungen mittels APN-Antikörper durch die AG Dr. Riemann (MLU Halle, Medizin, Daten nicht gezeigt) [148].

Durchgeführte Vorversuche (AG Dr. Riemann) am Laser Scanning Mikroskop mit dem Fluoreszenz-assoziierten Peptid CNGRC und CD 13 Antikörpern beweisen, dass dieses im Vergleich zum unspezifischen CARAC an den humanen Endothelzellen bindet (Abb.4-6). Dies legt die Grundlage für die weiteren Targetierungsuntersuchungen der CNGRC-funktionalisierten Liposomen.

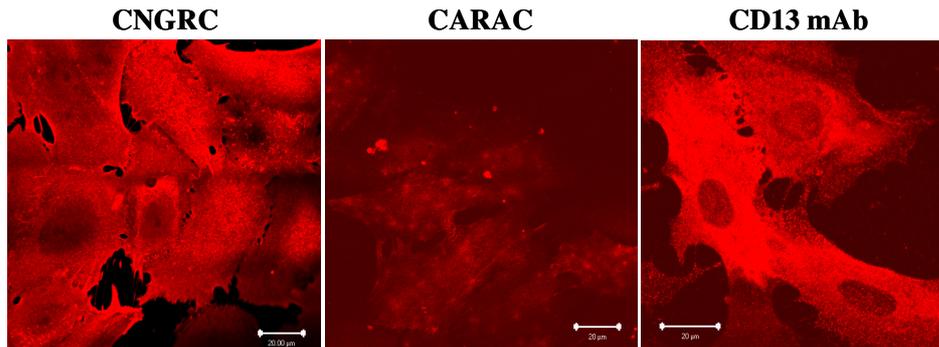


Abb.4-6: Bindung von den Peptiden CNGRC, CARAC und des spezifischen CD 13-Antikörpers an HUVEC

Die präparierten funktionalisierten Liposomen wurden in den ersten Zellversuchen mit ausschließlich mikroskopischer Auswertung hinsichtlich ihrer Targetbindungsfähigkeit überprüft. Für die ersten Bindungsversuche wurden die Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiO markiert und 5 μg bzw. 10 μg CNGRC-Peptid je μmol Lipid in die Membran inkorporiert. Die Zellen wurden als Monolayer auf Kammerobjektträgern kultiviert. Nach Inkubation mit den Vesikeln für 30 Minuten bei 4°C und anschließenden Spülschritten wurden die Zellpräparate ausgewertet. Aufgrund der Markierung der Liposomen konnte deren Bindung an der Zelloberfläche mikroskopisch durch Vergleich mit den Blindliposomen (ohne Funktionalisierung) am Laser Scanning Mikroskop (LSM) beobachtet werden.

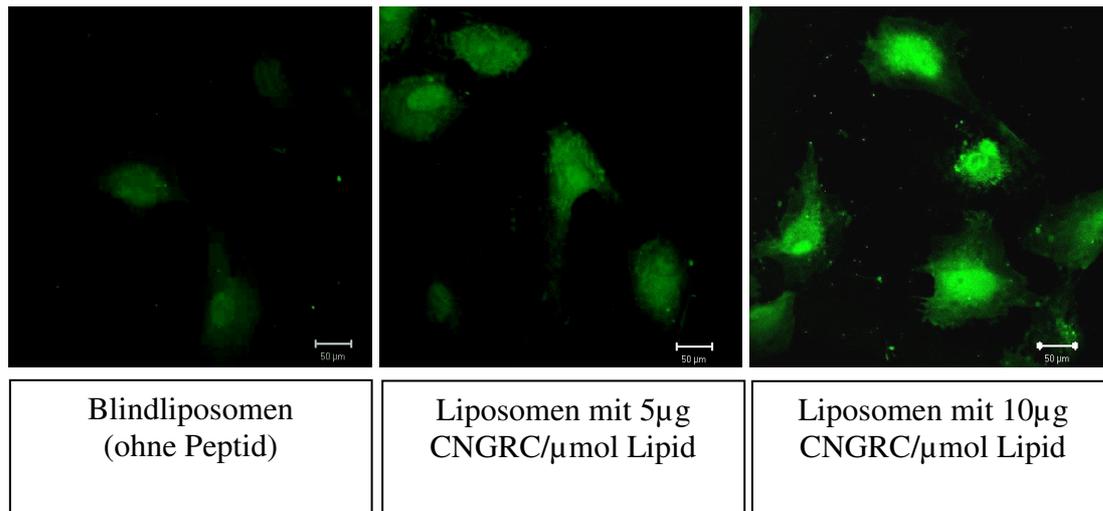


Abb.4-7: LSM-Aufnahmen der Akkumulation von Blindliposomen und CNGRC-Liposomen mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen an immobilisierten HUVEC

Als Ergebnis sieht man, dass es eine vermehrte Anreicherung der mit CNGRC-funktionalisierten Liposomen im Vergleich zu den Blindliposomen gibt, sichtbar in erhöhter Fluoreszenz als Funktion der Anzahl assoziierter Liposomen. Zusätzlich ist eine leichte Steigerung der Bindung bei erhöhter Ligandmenge ersichtlich. Das Versuchsergebnis wurde jedoch durch die Beobachtung relativiert, dass auch die unfunktionalisierten Liposomen eine deutliche Zellbindungstendenz aufwiesen, die wir auf unspezifische Membranwechselwirkungen zurückführten. Prinzipiell diente dies als orientierendes Experiment, welches einen prinzipiellen Vorteil der spezifisch mit CNGRC funktionalisierten Liposomen bei der Bindung an stimulierte humane Endothelzellen zeigt. Für weitere Versuche soll das Ausmaß dieser Bindung quantifiziert werden, um Einflussparameter der Targetierung zu erfassen und zu optimieren.

4.2.2. Quantifizierung und Optimierung der Bindung im Zellmodell

Bei den weiteren Versuchen entschieden wir uns für eine Erfassung der liposomalen Zellbindung mittels Fluoreszenz-Plattenreader. Diese Auswertungsvariante erschien uns aufgrund der großen Anzahl parallel erfassbarer Einzelproben als optimal und ermöglicht eine Quantifizierung der Bindungsausbeuten und somit eine genaue Verfolgung der Optimierung bei Veränderung einzelner Parameter. Dabei werden die Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiO markiert und nach Inkubation mit den Zellen wird die Fluoreszenz

als Maß für die Bindung quantifiziert. Die verwendeten HUVEC werden als lockere, nicht zu dichte Monoschicht kultiviert, da wir festgestellt haben, dass es bei einem verlangsamten Wachstum bis zur Konfluenz zu einer rückläufigen Expression von APN kommt (in Zusammenarbeit mit AG Dr. Riemann, Ergebnisse nicht gezeigt). Dieses Ziel wurde durch Einbringen von 12.000 Zellen je Well, einer Kultivierung und gleichzeitiger Stimulation mit IL-4 über 48 h erreicht und für alle Plattenreaderexperimente gleichermaßen angewendet.

Im ersten Versuch wurde der Frage nachgegangen, ob eine gesteigerte Menge Liposomen, mit der die konstante Anzahl an Zellen je Well inkubiert wird, auch zu einer Zunahme der zellassoziierten Liposomen führt.

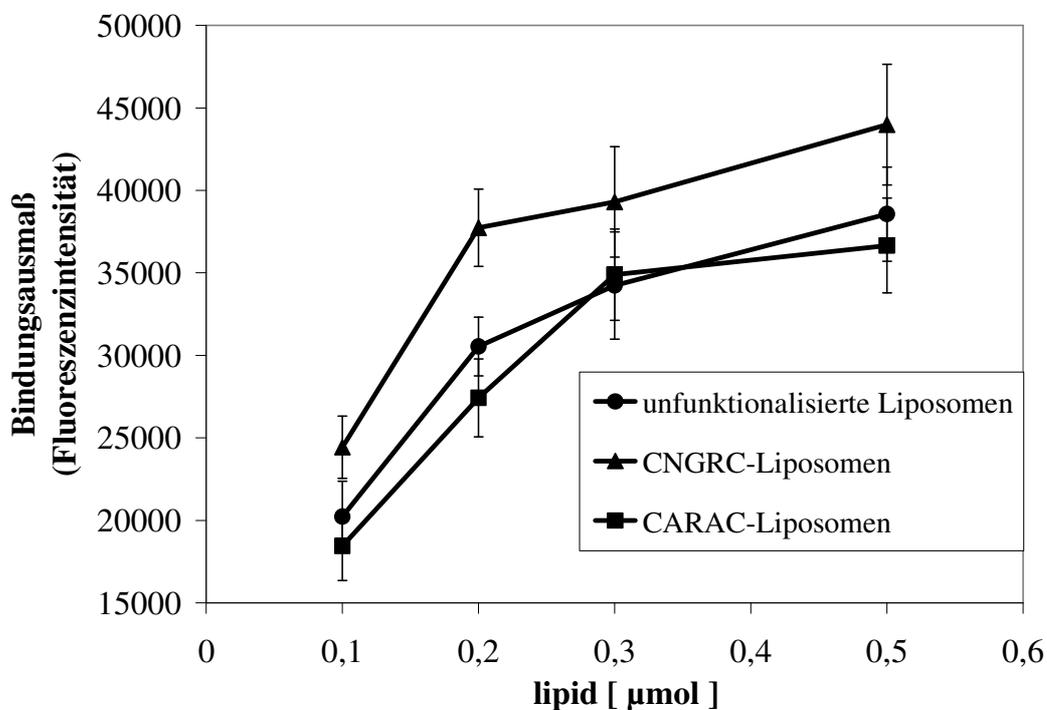


Abb.4-8: Abhängigkeit des Bindungsausmaßes von der Menge zugesetzter Liposomen

Aus Abbildung 4-8 ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzwerte als Merkmal der Bindungsstärke mit zunehmender Liposomenmenge nur geringfügig zunehmen. Eine kontinuierliche Steigerung der molaren Menge an Liposomen bewirkt keine lineare Steigerung der Bindung. So bewirkt eine Erhöhung der Liposomenmenge um den Faktor 5 lediglich eine Steigerung der Bindung der spezifischen Liposomen um den Faktor 2.

Ab einer Konzentration von ca. 0,2 µmol steigt jedoch der Anteil unspezifisch gebundener Liposomen an den Gesamtbindungsereignissen stärker an als der Anteil der spezifischen

Liposomen. Erklärbar ist dies sicher mit der begrenzten Anzahl von Oberflächenrezeptoren, die ab einem gewissen Besetzungsgrad nur noch geringfügigere Steigerungen der spezifisch funktionalisierten Liposomen zulassen, während der Anteil durch unspezifische Membranwechselwirkungen hervorgerufene Anteil zunimmt. Deshalb wurden für weitere Versuche die Menge von 0,2 μmol Lipid pro Well verwendet, weil dies in unserem Testsystem das beste Verhältnis bezüglich spezifischer und unspezifischer Zellassoziation zeigte.

Das große Ausmaß unspezifischer Membranwechselwirkungen bei der Anwendung konventioneller Liposomen verdeutlicht bereits unter *in vitro* Bedingungen die Notwendigkeit einer sterischen Stabilisierung der Liposomen. Außerdem ist diese im Hinblick auf eine effektive *in vivo* Anwendung zur Verlängerung der Zirkulationszeit essenziell. Liposomen werden nach systemischer Applikation sehr schnell durch die Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) eliminiert und weisen aus diesem Grund nur kurze Zirkulationshalbwertszeiten auf. Durch den Einbau von Phospholipiden mit Polyethylenglykol-Kopfgruppen (PEG-PE) in die Membran der Liposomen und damit Aufbau einer sterischen Barriere kann man eine signifikante Erhöhung der Zirkulationszeiten erreichen. Dieser bereits im Kapitel 2.3.1 beschriebene protektive sog. Stealth[®]-Effekt von PEG ergibt sich aus einer Reduktion der Absorption opsonierender Proteine bzw. aus der Inhibierung der nicht-opsoninabhängigen Aufnahme der Liposomen durch Kupffer-Zellen (Makrophagen) der Leber. Aus *in vivo* Untersuchungen ist bekannt, dass für eine optimale Zirkulationszeitverlängerung Mengen von 4 - 5 mol% PEG-PE 2000 notwendig sind [70,71]. Das Einbringen von PEG-PE 2000 zur sterischen Stabilisierung der Liposomen lässt zusätzlich ein Zurückdrängen der unspezifischen Interaktionen zwischen Zelloberfläche und Liposom erwarten, deshalb wurden von uns die Zellbindungsausbeuten bei unterschiedlichen Abstufungen des liposomal inkorporierten PEG-PE 2000 Anteils beobachtet.

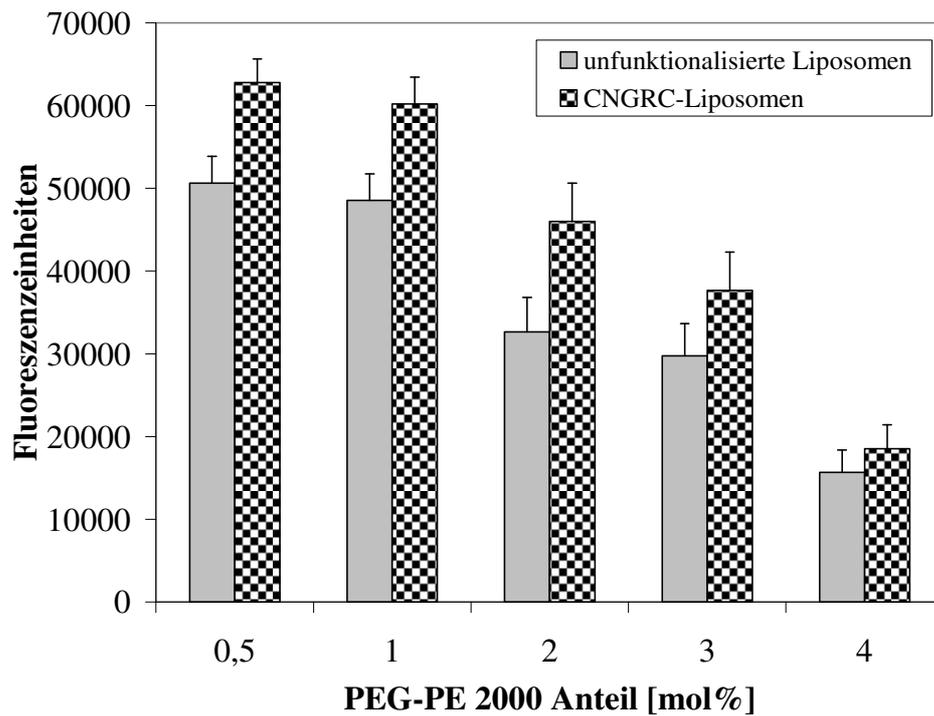


Abb.4-9: Bindungsausmaß der Liposomen an aktivierte HUVEC bei steigenden Anteilen PEG-PE 2000

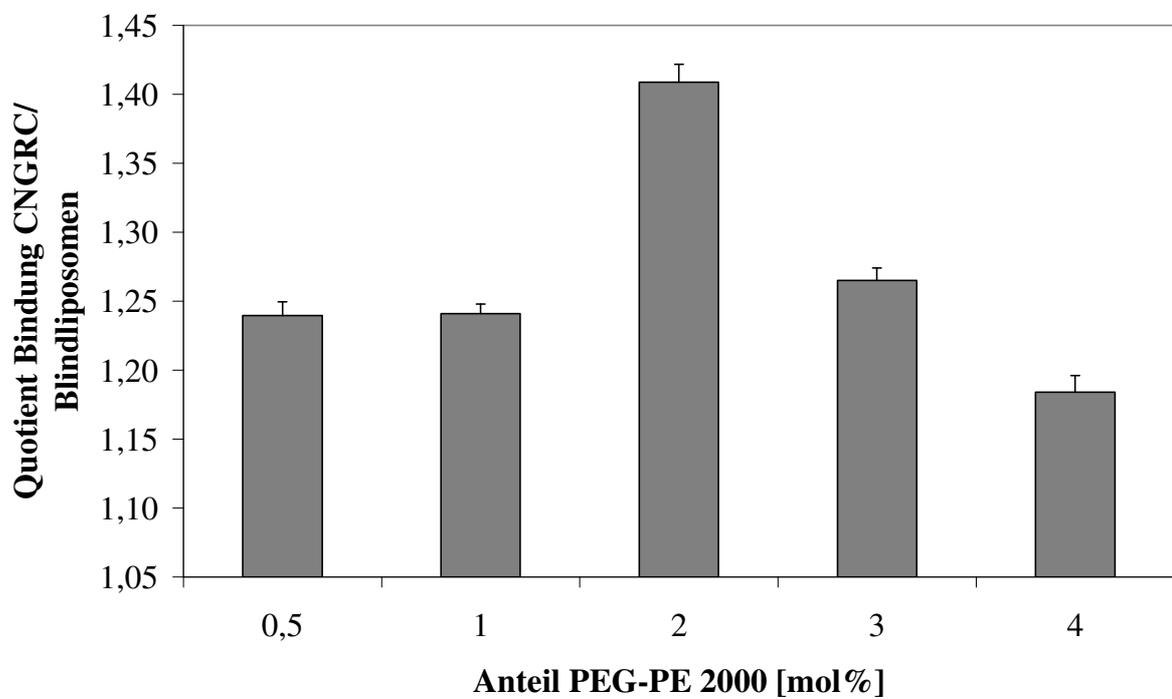


Abb.4-10: Verhältnis spezifische / unspezifische Bindung bei unterschiedlichen Anteilen PEG-PE der Liposomen

Dabei fällt auf, dass mit zunehmender Menge an inkorporiertem PEG-PE das Bindungsausmaß sowohl bei den funktionalisierten als auch bei den Blindliposomen abnimmt. Durch Bestimmung des Verhältnisses von spezifischem zu unspezifischem Bindungsausmaß wird deutlich, dass bis zu einem Anteil von 2 mol% der Bindungsabfall der CNGRC-Liposomen in großem Maße auf die Unterdrückung der unspezifischen Membranwechselwirkungen zurückzuführen ist. Die Reduktion der Bindung bei Liposomen mit mehr als 2 mol% PEG-PE ist dann sicher Ausdruck der Behinderung der Peptiderkennbarkeit durch die PEG-Ketten. Bei einem Anteil von 2 mol% PEG-PE unter den gegebenen Bedingungen erreichten wir die am stärksten ausgeglichene Balance zwischen den unspezifischen Wechselwirkungen der Liposomen mit der Zelloberfläche auf der einen Seite und der Bindung trotz sterischer Abschirmung der Peptidmoleküle auf der anderen Seite. Wir entschieden uns deshalb, bei weiteren Bindungsuntersuchungen mit einem PEG-Anteil von 2 mol% zu arbeiten. Inwieweit dies in geplanten *in vivo* Versuchen für eine ausreichende Zirkulationszeit ausreicht, muss dann im konkreten Fall überprüft werden.

Bei den bisher vorgenommenen Optimierungsschritten arbeiteten wir mit einem konstanten Anteil von 5 µg CNGRC je µmol Lipid. Im dritten Schritt sollte nun überprüft werden, inwieweit eine Steigerung der Ligandmenge zu einer zusätzlichen Steigerung des Bindungsausmaßes an aktivierten humanen Endothelzellen führt. Aus Untersuchungen mit Immunoliposomen ist bekannt, dass keine Proportionalität zwischen gebundener Antikörpermenge und Targetbindungsfähigkeit besteht. In verschiedenen Untersuchungen stellte man fest, dass auch drastische Erhöhungen der Antikörpermenge nur geringe Steigerungen der zellassozierten Liposomenmenge ergaben [176]. Unsere Untersuchungen mit gekoppeltem CNGRC-Peptid bestätigen diese Tendenz. So konnte bei einer Erhöhung der inkorporierten Menge CNGRC um das 12-fache lediglich eine Steigerung des Bindungswertes um das 1,4-fache erreicht werden. Aus Abb. 4-11 wird ersichtlich, dass bis zu einem Wert von 10 µg/µmol Lipid noch deutliche Steigerungen des Bindungsausmaßes erreicht werden können, während mit höheren Peptidmengen ein Plateauzustand erreicht wird. Erklärbar ist dies wahrscheinlich mit der begrenzten Anzahl von Oberflächenrezeptoren, die ab einer bestimmten angebotenen Peptidmenge abgesättigt sind, und es damit zu keiner Steigerung der spezifischen Bindung mehr kommen kann. Diese Sättigung wird auch schon bei relativ geringen Mengen Peptid erreicht, da selbst in den Bereichen von 2,5 µg - 10 µg Peptid je µmol Lipid eine große Anzahl von Peptidmolekülen pro Liposom zur Bindung zur

Verfügung steht (siehe Kapitel 4.1). Für weiterführende Versuche wurden 10 μg Peptid je μmol Lipid in die Liposomenmembran eingebaut, da die ab dieser Menge erreichbaren Steigerungen des Bindungswertes gering im Vergleich zur eingesetzten Menge Peptid sind.

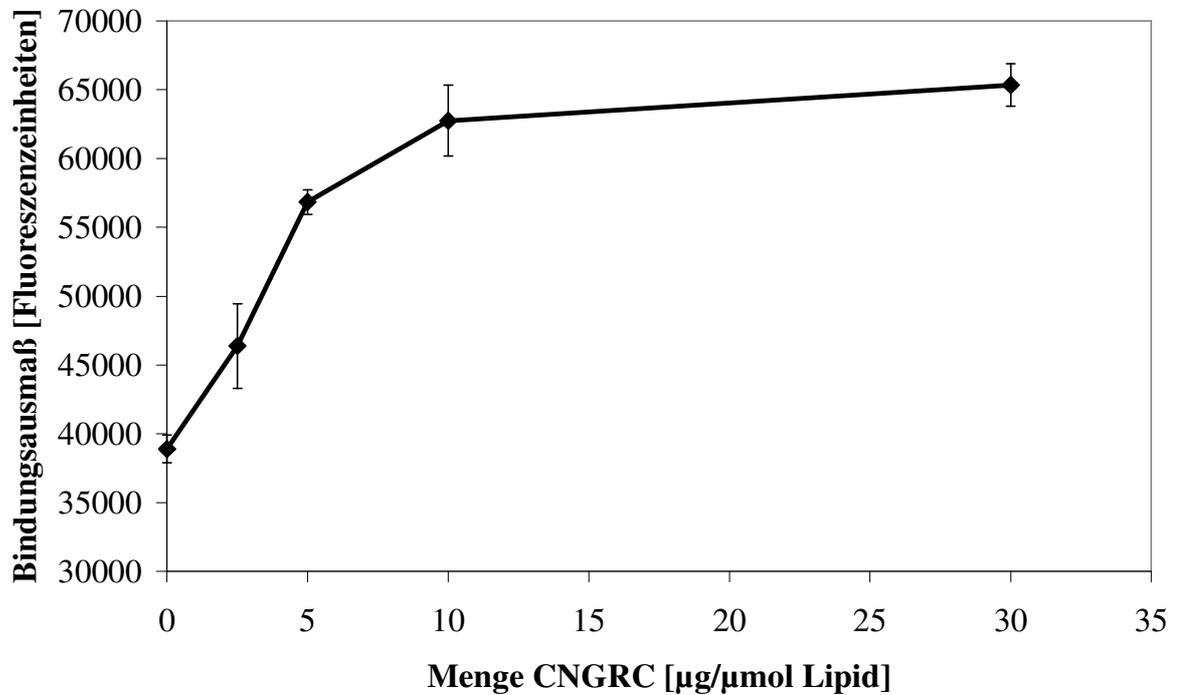


Abb.4-11: Abhängigkeit der Liposomenbindung an aktivierte HUVEC von der Menge liposomal inkorporiertem CNGRC-Liganden

Durch Variation der Parameter Lipidmenge pro Zellzahl, inkorporierte PEG-PE-Konzentration und eingebaute Menge an CNGRC-Peptid konnte in unserem *in vitro* Testsystem eine deutliche Steigerung des Bindungsausmaßes an stimulierten HUVEC erreicht werden.

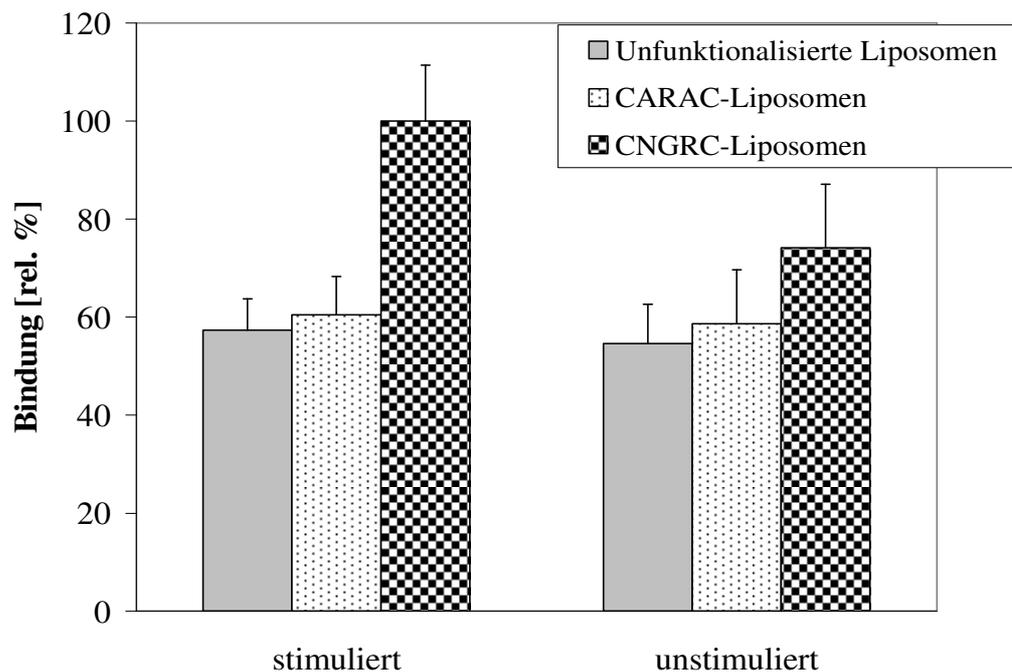


Abb.4-12: Relatives Bindungsausmaß der optimierten Vesikel an stimulierten (IL-4) und unstimulierten HUVEC bei 4°C, Bindung d. CNGRC-Liposomen an stimulierte Zellen (als 100% gesetzt)

Zusammenfassend zeigt Abb. 4-12 deutlich den Bindungsvorteil bei spezifischer Funktionalisierung mit CNGRC-Peptid gegenüber unfunktionalisierten bzw. unspezifisch funktionalisierten (CARAC) Vergleichs-Vesikeln. Zusätzlich ist die Spezifität der Bindung dargestellt, indem das Bindungsausmaß der gleichen Liposomen an unstimulierten Endothelzellen bestimmt wurde. Man sieht ein deutliches Absinken des Bindungsvorteils der spezifischen Liposomen, was in der durch fehlende IL-4 Stimulation gesunkenen APN-Expression begründet ist. Dies zeigt, dass die Bindung von CNGRC-funktionalisierten Liposomen von der APN-Expression der Zielzelle abhängig ist.

Zusätzliche Ergebnisse lieferten mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder nach Inkubation von fluoreszenzmarkierten Vesikeln mit adhären HUVEC in Kammerobjektträgern bei 4°C. Dabei wurde die Menge zellassoziierter Liposomen durch Messung der abgegebenen Photonencounts in jeweils festgelegten Messarealen ermittelt. Dadurch war ein gezieltes Festlegen der auszumessenden Bereiche möglich, wodurch Bereiche ohne Zellen (durch Ablösung während Spülvorgängen) bzw. fluorimetrisch stark überhöhte Bereiche nicht einbezogen wurden.

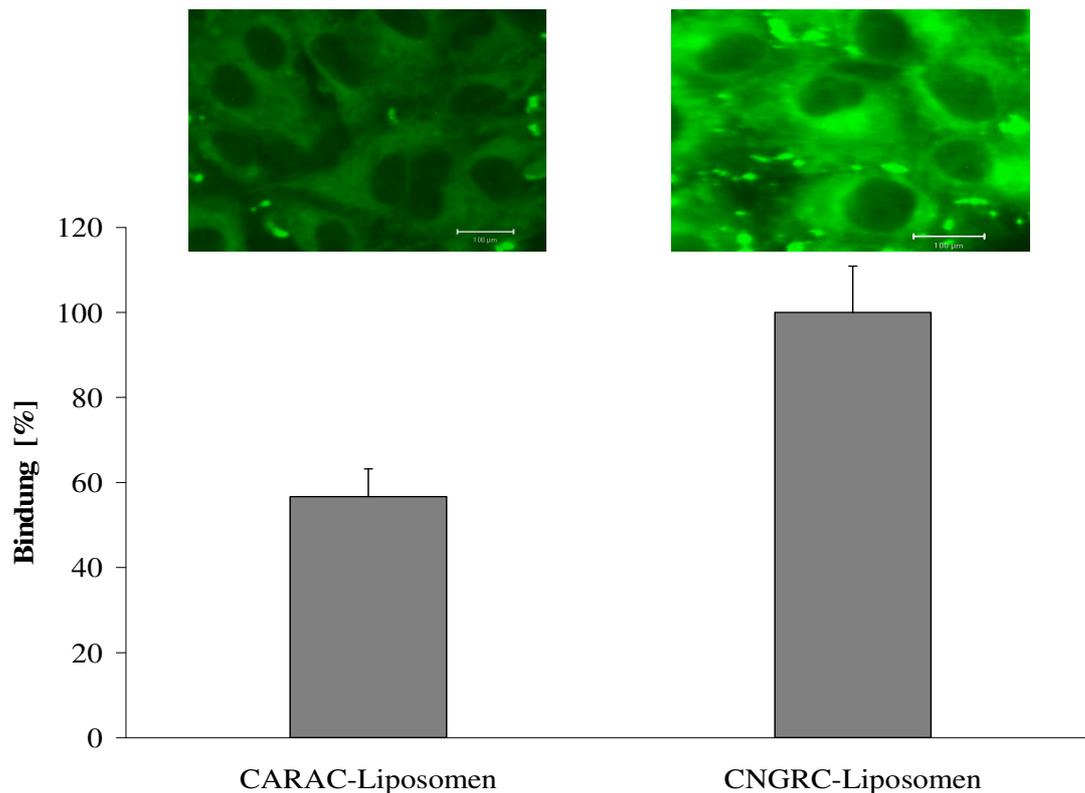


Abb.4-13: Bindungsausmaß durch Messung der Photonencounts in Messarealen

Dieser Versuch diente hauptsächlich der Ergänzung der Charakterisierung des Bindungsverhaltens der spezifischen CNGRC-Liposomen, weshalb die Anzahl der untersuchten Präparationen stark reduziert war.

Die spezifisch funktionalisierten Vesikel zeigten auch hier einen deutlichen Bindungsvorteil gegenüber den unspezifisch funktionalisierten. Der Vorteil der Funktionalisierung bewegt sich im gleichen Größenbereich, wie bei den Messungen im Plattenreader (ca. 1,8-fach).

Als entscheidender Vorteil der hier beschriebenen Targetierung der endothelialen APN durch NGR-Peptid wurde postuliert, dass andere Formen von APN an anderen Zellpopulationen keine Bindungsfähigkeit aufweisen sollten. Um dies auch unter *in vitro* Bedingungen zu überprüfen, wurden Bindungsexperimente mit adhärennten APN-exprimierenden Tumorzellen (verglichen mit APN-negativen) analog der Plattenreader-Experimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die CNGRC-funktionalisierten Liposomen weder an APN-negative noch an APN-positive Tumorzellen binden, lediglich unspezifische Zellassoziation auf dem Level der Blindliposomen bzw. unspezifisch funktionalisierten Liposomen war zu beobachten. Diese

Ergebnisse decken sich mit denen aus der AG Dr. Riemann, welche die Bindung von reinem CNGRC-Peptid an verschiedene Tumorzelllinien untersuchten [148].

Sie bestätigten damit die Erkenntnis, dass sich mit dem Peptid CNGRC funktionalisierte Liposomen unter *in vitro* Bedingungen nur an humanen APN-exprimierenden Endothelzellen anreichern lassen und gegenüber unfunktionalisierten oder unspezifisch funktionalisierten Liposomen einen Bindungsvorteil besitzen.

Die Bindungsspezifität von CNGRC für endotheliale APN stellt somit die Grundlage für ein spezifisches endotheliales Drug-Targeting mittels CNGRC-funktionalisierten Liposomen dar.

Die hier vorgestellten Zellbindungsstudien haben unter dem Gesichtspunkt einer späteren therapeutischen Anwendung im Organismus nur eingeschränkte Aussagekraft, da sie unter idealisierten Bedingungen durchgeführt wurden. Zum einen erlauben die statischen Bedingungen den Liposomen in Ruhe über eine bestimmte Zeit mit den Zellen in Kontakt zu treten. Zum anderen entspricht unser Zellmodell zwar *in vivo* nahen Bedingungen (humane Endothelzellen mit stimulierter APN-Expression), kann aber nicht das durch komplexe Vorgänge der Angiogenese entstandene Gefäßgeflecht vollständig simulieren. Trotzdem haben sich die Zellsysteme als geeignet erwiesen, um die Eigenschaften der funktionalisierten Vesikel zu optimieren und zu quantifizieren, deshalb wurde es von uns auch für ergänzende Internalisierungsuntersuchungen genutzt.

4.3. Internalisierungsuntersuchungen

Die Akkumulation der funktionalisierten Liposomen am Endothel ist eine wichtige Voraussetzung, aber noch kein Garant für einen therapeutischen Effekt. Je nach verfolgter Strategie kann ein Freisetzen des Wirkstoffs nach Bindung an der Zelloberfläche angestrebt werden (targetspezifische Freigabe) oder eine Freigabe des Wirkstoffs im Inneren der Zelle. Unter dem Aspekt, dass angiogenetisch aktive Endothel als Target zum gezielten Transport von zytotoxischen Agenzien zur Zerstörung des tumorversorgenden Gefäßsystems zu nutzen, können Erkenntnisse über die Aufnahme der Wirkstoff beladenen Vesikel entscheidend sein. Deshalb standen die Ermittlung der Aufnahmeprozesse durch die verwendeten Endothelzellen sowie die quantitative Analyse dieses Vorgangs im Mittelpunkt der folgenden Arbeiten.

Prinzipiell können Liposomen und Zielzelle auf verschiedene Arten miteinander in Wechselwirkung treten. Zum einen können Vesikel z.B. durch unspezifische

Membraneffekte, wie Fusion oder Lipidaustausch mit Zellen interagieren. Zum anderen können Liposomen durch rezeptorvermittelte, endozytotische Aufnahmeprozesse, eine oftmals angestrebte Art der Wechselwirkung, aktiv in die Zielzellen aufgenommen werden. So ist bekannt, dass für die Aufnahme von LDL und Eisen in Körperzellen stark internalisierende Rezeptoren zur Verfügung stehen. Über die Aufnahmemechanismen und -mengen von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) ist insgesamt relativ wenig bekannt, obgleich in unserer Arbeitsgruppe die Aufnahmeuntersuchung von selektingerichteten Immunliposomen in HUVEC im Fokus stand. Dabei stellte man fest, dass diese zwar vermehrt endozytotisch aufgenommen werden, aber quantitativ kaum Aufnahmevorteile gegenüber unfunktionalisierten bzw. unspezifischen Liposomen zeigten. Der Grund dafür liegt in der Fähigkeit der HUVEC, auch unspezifisch assoziierte Liposomen aufzunehmen [158].

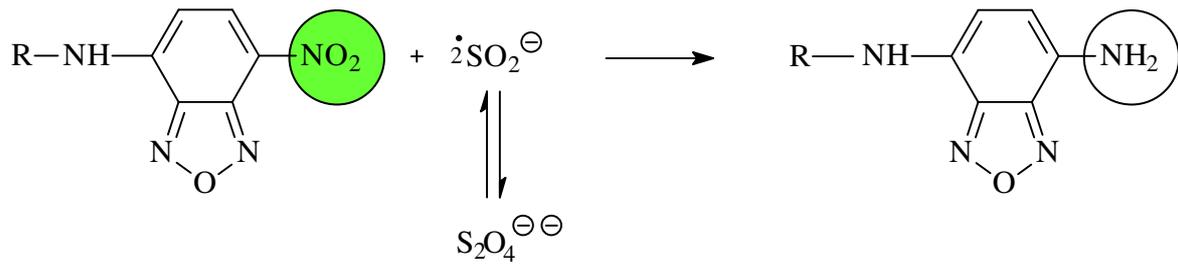
In unseren Untersuchungen sollte deshalb untersucht werden, ob über APN assoziierte Liposomen einen Aufnahmevorteil zeigen bzw. ob eine rezeptorvermittelte Aufnahme vorliegt.

4.3.1. Quantitative Internalisierungsstudien

Im Rahmen der Untersuchung des Internalisierungsverhaltens CNGRC-funktionalisierter Liposomen wurden zwei verschiedene Methoden benutzt, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden sollen.

Dithionit-Methode:

Diese Methode ermöglicht eine differenzierte Quantifizierung zwischen oberflächlich assoziierten und internalisierten Liposomen. Basis ist die Markierung der Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE, welcher problemlos in die Liposomenmembran eingebaut werden kann. Natriumdithionit reagiert mit dem stark fluoreszierenden NBD-PE unter Bildung von nicht fluoreszierendem ABD-PE. Die zugrunde liegende chemische Reaktion ist in Abb. 4-14 dargestellt.



ABD (7-**Amin**obenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-R

NBD (7-**Nitro**obenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-R

R = 1,2 Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin (PE)

Abb.4-14: Chemische Grundlage der Dithionit-Methode

Die elektronenziehende Nitrogruppe beim NBD fördert die Delokalisation von π -Elektronen im konjugierten Ringsystem, was die starke Fluoreszenz bedingt. Bei der Reaktion mit Dithionit kommt es zur Reduktion der Nitrogruppe zur elektronenliefernden Aminogruppe, was zu einem Fluoreszenzverlust führt. In wässriger Lösung liegt das Dithionit-Ion ($S_2O_4^{2-}$) im Gleichgewicht mit dem Radikal $\cdot SO_2^-$ vor [177]. Da sowohl Dithionit-Ion als auch das Radikal eine Ladung tragen, können sie nicht oder nur sehr langsam durch die Bilayer der Liposomen bzw. durch die Zellmembranen permeieren. Eine Unterscheidung zwischen zellinternalisierten und an der Zelloberfläche gebundenen Liposomen erfolgte folgendermaßen:

Bisher wurden für diesen Assay asymmetrisch gelabelte Liposomen verwendet, bei welchen das Fluorophor NBD-PE nur in die äußere Monolayer integriert wurde. Nach Bindung und Internalisierung eines Teils dieser Liposomen an der Zielzelle und anschließender Dithionitbehandlung sollte der leicht zugängliche Farbstoff an der Außenseite der Liposomen der oberflächlich gebundenen Vesikel reduziert werden (Fluoreszenzverlust), während sich die Liposomen im Inneren der Zellen der Dithionit Reduktion entziehen, dabei weiter fluoreszieren und somit quantitativ erfasst werden können. Nachteil der unsymmetrischen Markierung ist, dass es durch den ständig stattfindenden intermembranären Lipidaustausch auch bei den asymmetrisch gelabelten Liposomen zu einem Verschieben von Farbstoffmolekülen in die innere Monolayer kommt. Dieser Flip-Flop-Mechanismus steigt mit zunehmender Temperatur an, so dass gerade bei Inkubationstemperaturen im

physiologischen Bereich ein Auftreten dieses Phänomens zu beobachten war und oft nur 70 % - 80 % des NBD-PE an der Außenmonolayer der Liposomen blieben. Die restlichen 20 % - 30 % in die Innenmonolayer des Liposoms gewanderten NBD-Moleküle entzogen sich so der Ermittlung, da sie vom Dithionit-Reagenz nicht erreicht wurden.

Wir haben uns deshalb für eine symmetrische, d.h. für einen ganz normalen Einbau des NBD-Lipids in die Liposomenmembran entschieden. Des Weiteren haben wir überprüft, ob sich der Farbstoff gleichmäßig zwischen Innen- und Außenmonolayer verteilt, indem die Abnahme der Fluoreszenz nach Dithionitzugabe zeitlich verfolgt wurde.

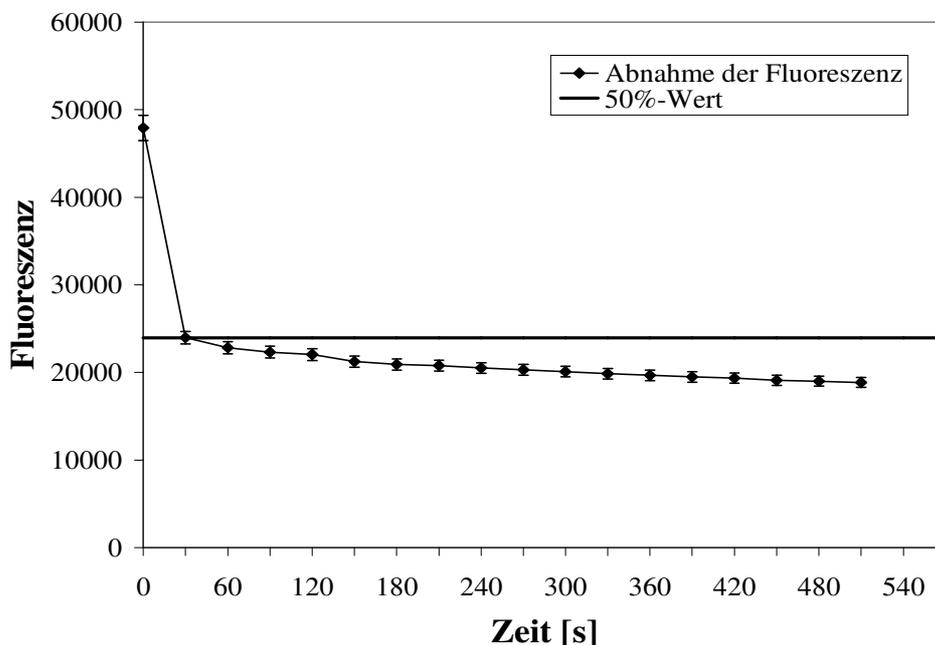


Abb.4-15: Absinken der Fluoreszenz symmetrisch NBD-gelabelter Liposomen nach Dithionitzugabe

Wie Abb. 4-15 zeigt, erfolgt innerhalb 30 - 60 Sekunden nach Dithionitzugabe eine schnelle Abnahme der Fluoreszenz auf 50 % ihres Ausgangswertes, erst dann ein sehr langsames weiteres Abfallen. Wir schlussfolgern daraus, dass mittels Dithionitzugabe eine schnelle Reduktion der an der Außenmonolayer befindlichen NBD-Moleküle möglich ist. Zerstört man die Vesikel mit Detergenz, kommt es zum Absinken der Fluoreszenz auf den Nullwert. Überträgt man diese Erkenntnis auf den Dithionit-Assay, kann man davon ausgehen, dass nach Inkubation der Liposomen mit den Zellen und anschließender Dithionitzugabe mit dem Absinken der Fluoreszenz genau 50 % des Fluoreszenzwertes der oberflächlich an den Zellen

gebundenen Liposomen erfasst werden, da das Dithionit weder die Fluoreszenz im Inneren der gebundenen Liposomen erreicht, noch durch die Zellmembran zu den internalisierten Vesikeln permeieren kann. Durch Verdoppelung dieses 50 % - Wertes der Fluoreszenzdifferenz zwischen der Messung vor und nach der Dithionitzugabe ermöglicht dies ein Ermitteln des internalisierten bzw. daraus auch des gebundenen Anteils der Liposomen. So lieferte diese modifizierte Dithionit-Methode sichere Werte ohne aufwändige unsymmetrische Markierung (Ethanolinjektionsmethode) und eliminiert damit eine potentielle Fehlerquelle. Zwar lässt sich bei den beidseitig gelabelten Liposomen ebenfalls ein Flop-Flop Mechanismus nicht ausschließen, der zum Austausch von gelöschten und noch fluoreszenten Markermolekülen führen kann, durch die symmetrische Verteilung in Innen- und Außenmonolayer sind aber sterische Effekte als Triebkraft des Lipidaustausches stark zurückgedrängt. Des Weiteren erfolgten die Zugabe von Dithionit und die anschließende Messung in einem eng gesteckten Zeitfenster (ca. 60 Sekunden). In Abb. 4-16 ist die Messmethode schematisch dargestellt.

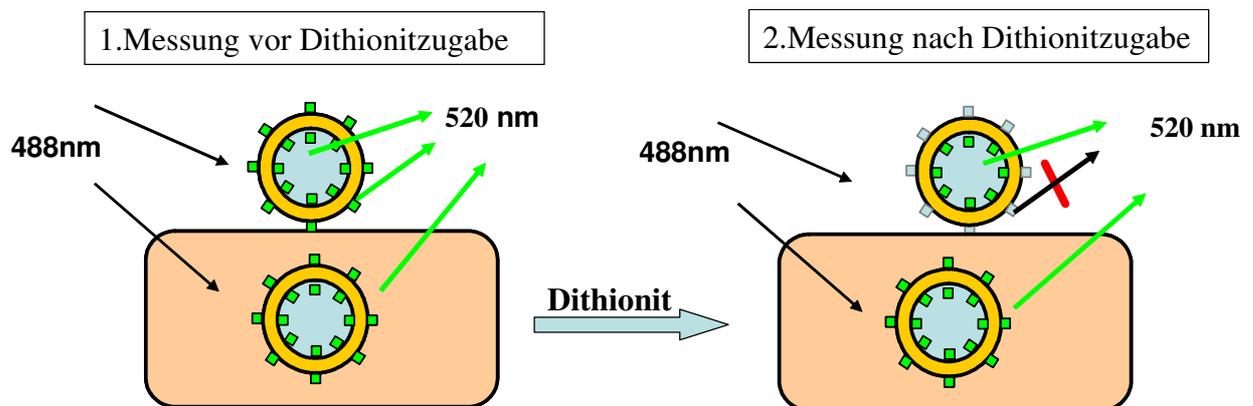


Abb.4-16: Unterscheidung zwischen gebundenen und internalisierten Liposomen durch modifizierte Dithionittechnik

Für die Internalisierungsuntersuchungen wurden ebenfalls 12.000 Zellen je Well in 96-Well-Platten eingebracht und analog der Bindungsstudien über 48 Stunden mit IL-4 inkubiert. Die Lipidzusammensetzung und Peptidmenge der Internalisierungsexperimente erfolgte gemäß den optimierten Ergebnissen aus den *in vitro* Bindungsstudien. Als erstes wurden die Zellen 30 Minuten mit den unterschiedlich funktionalisierten Liposomen zur Bindung bei 4°C (nur Erfassung passiver Vorgänge) inkubiert, bevor nach Abspülen der ungebundenen Liposomen

die Inkubation bei 37°C zur Internalisierung im Brutschrank für 1,5 Stunden erfolgte. Nach diesem Zeitraum wurde das erste Mal vermessen und so gebundener und internalisierter Anteil gemeinsam erfasst. Nach Dithionitzugabe erfolgte sehr schnell die zweite Messung, aus welcher nach o.g. Methode der internalisierte Anteil ermittelt werden konnte. Zusätzlich wurden der erste Inkubationsschritt zur Erfassung der Bindung auch bei einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt, um einen Vergleich der Bindungs- und Internalisierungsereignisse bei unterschiedlichen Temperaturen zu erhalten.

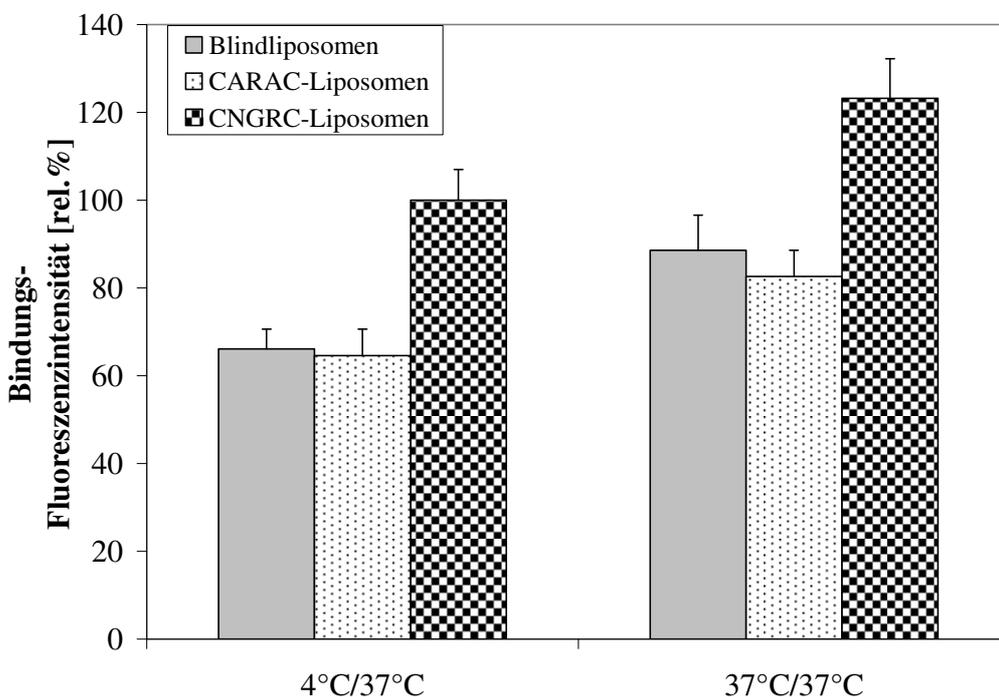


Abb.4-17: Bindungswerte der Liposomen mit Dithionit-Methode bei unterschiedlichen Kombinationen von Bindungstemperatur / Internalisierungstemperatur, 4°C / 37°C- Wert der spezifischen Liposomen als 100 % gesetzt

Wenn man die Ergebnisse der erhaltenen Bindungswerte mit denen aus den Bindungsstudien (Kapitel 4.2.) vergleicht, so erhält man auch mit dieser Methode Werte im gleichen Größenbereich. Zudem fällt auf, dass bei Erhöhung der Inkubationstemperatur zur Bindung auf physiologische Temperaturen die Bindungsereignisse zunehmen, jedoch im gleichen Verhältnis untereinander wie bei 4°C. Es kommt also insgesamt zu mehr Bindungen von Liposomen, der Bindungsvorteil der spezifischen Vesikel erhöht sich jedoch nicht.

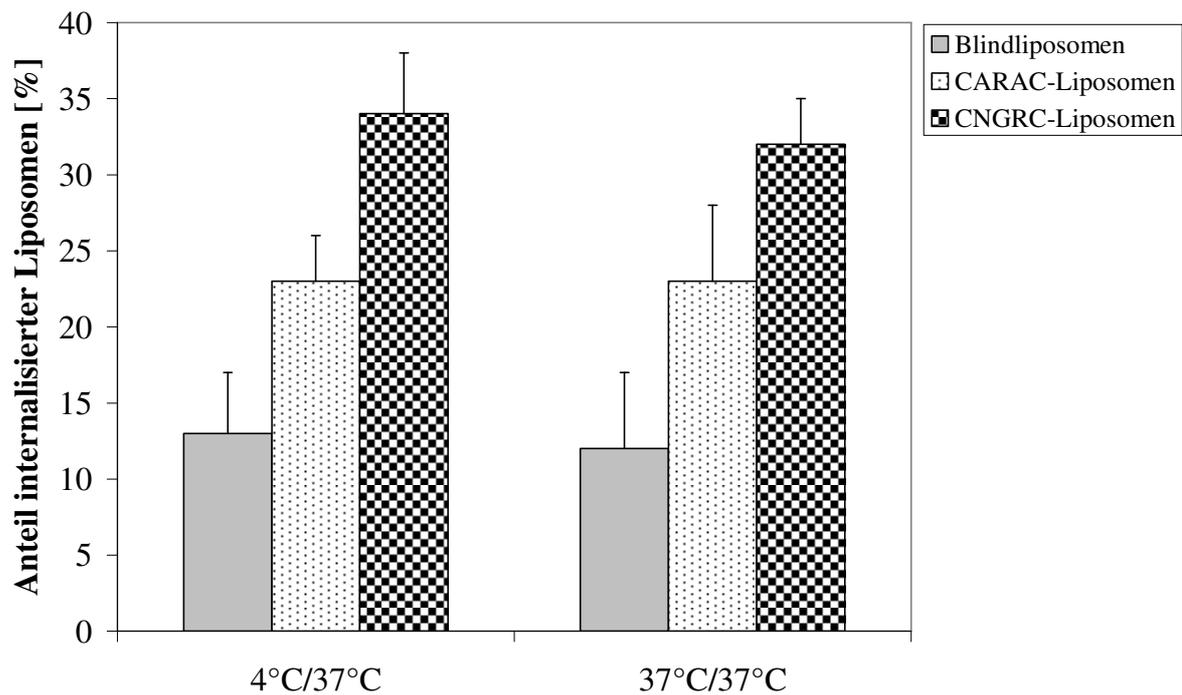


Abb.4-18: Prozentualer Anteil aufgenommener Liposomen vom jeweiligen Bindungswert bei verschiedener Kombination Bindungstemperatur / Internalisierungstemperatur

Betrachtet man den jeweiligen aufgenommenen Anteil in Abb. 4-18 so sieht man deutlich einen Internalisierungsvorteil der spezifisch funktionalisierten Liposomen gegenüber den unspezifisch funktionalisierten Liposomen. Die unspezifisch funktionalisierten Liposomen wurden dagegen besser internalisiert als blanke Liposomen. Es wird also deutlich, dass die Art der Funktionalisierung zu quantitativen Unterschieden bei der Aufnahme führt. Dies spricht vor allem für eine aktive Beteiligung des APN-Rezeptors an der Internalisierung. Die Variation der Bindungstemperatur führt zu keiner nennenswerten Veränderung des prozentualen Anteils aufgenommener Liposomen vom jeweils gebundenen Anteil gemäß ihrer Funktionalisierung, obgleich die absolut aufgenommene Menge natürlich mit erhöhter Temperatur ansteigt.

Zur Bestätigung und Vervollständigung dieser Ergebnisse wurden weitere quantitative Internalisierungsuntersuchungen mit einer ergänzenden Methode, der PRONASE-Methode durchgeführt. Diese Methode basiert zwar auch auf Messung der Fluoreszenz von Liposomen, die Differenzierung zwischen zellassoziertem und internalisiertem Anteil erfolgt jedoch anders.

PRONASE-Methode

Diese Methode erfolgt unter Verwendung des Enzyms PRONASE (Protease aus *Streptomyces griseus*), mit dessen Hilfe eine vollständige Abtrennung gebundener Liposomen von der Zelloberfläche und damit eine Separation zwischen gebundenem und aufgenommenem Liposomenanteil möglich ist. Dies erfolgt durch Fluoreszenzmessung nach Zentrifugation des abgetrennten Anteils der gebundenen Liposomen. Die internalisierten Liposomen innerhalb der Zellen können nach Detergenzbehandlung und Zentrifugation im Überstand quantifiziert werden. Als Marker kam bei diesen Untersuchungen DiO zum Einsatz, welches im Vergleich zum NBD mit einer höheren molekularen Fluoreszenzausbeute sensitiver ist. Als Targetzellen wurden wiederum mit IL-4 aktivierte HUVEC verwendet, welche in helle 24-Well-Platten eingebracht wurden, da die Durchführung in 96-Well-Platten keine quantitativ auswertbaren Ergebnisse brachte. Der Grundversuch bestand in einer einstündigen Inkubation der Liposomen bei 4°C, um nur Bindungsereignisse zu erfassen und einem Spülschritt, um nach dieser Zeit den ungebundenen Anteil zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37°C im Brutschrank, um die Internalisierung des gebundenen Anteils zu erfassen. Zusätzlich wurde eine Variation der Temperaturen vorgenommen, um deren Einfluss auf Bindung und anschließende Aufnahme zu verfolgen. Da wir aus den Dithionit-Versuchen eine aktive Rolle des APN Rezeptors beim Aufnahmeprozess vermuteten, wurde zusätzlich mit zwei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen der Liposomen gearbeitet.

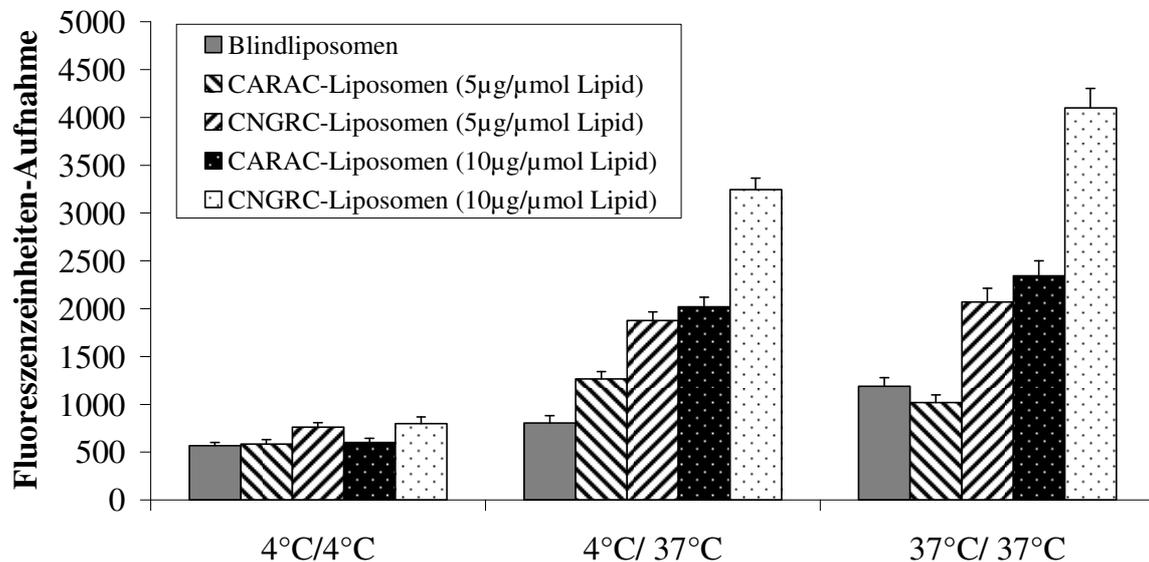


Abb.4-19: Fluoreszenzwerte der Liposomenaufnahme in HUVEC mit der PRONASE-Methode bei unterschiedlichen Verhältnissen Bindungstemperatur / Internalisierungstemperatur und bei verschiedenen Peptidkonzentrationen

Bei der rein mengenmäßigen Betrachtung der Aufnahme fällt auf, dass es jeweils einen Vorteil der spezifisch funktionalisierten Liposomen gab. Lediglich bei einer Internalisierungstemperatur von 4°C gibt es kaum Unterschiede, und die Menge der Aufnahme aller Liposomenfraktionen senkt sich auf das Niveau der Blindliposomen. Mit der Zunahme der Temperatur und der Möglichkeit der Zelle zu aktiven Aufnahmeprozessen steigen die Aufnahmewerte der unspezifisch und spezifisch funktionalisierten Liposomen an. Da es bei einer Temperatur von 37°C nachgewiesen zu erhöhten Bindungswerten kommt, lässt sich die nochmalige Steigerung der absoluten internalisierten Menge bei dieser Versuchsanordnung auf diesen Vorteil zurückführen. Es wird weiterhin deutlich, dass mit einer Erhöhung der Peptidmenge eine Steigerung der aktiven energieabhängigen Aufnahmeprozesse möglich ist. Bei Betrachtung der Abb. 4-20, in welcher der Anteil der aufgenommenen Liposomenmenge vom jeweils gebundenen Teil sichtbar ist, wird dies zusätzlich verdeutlicht.

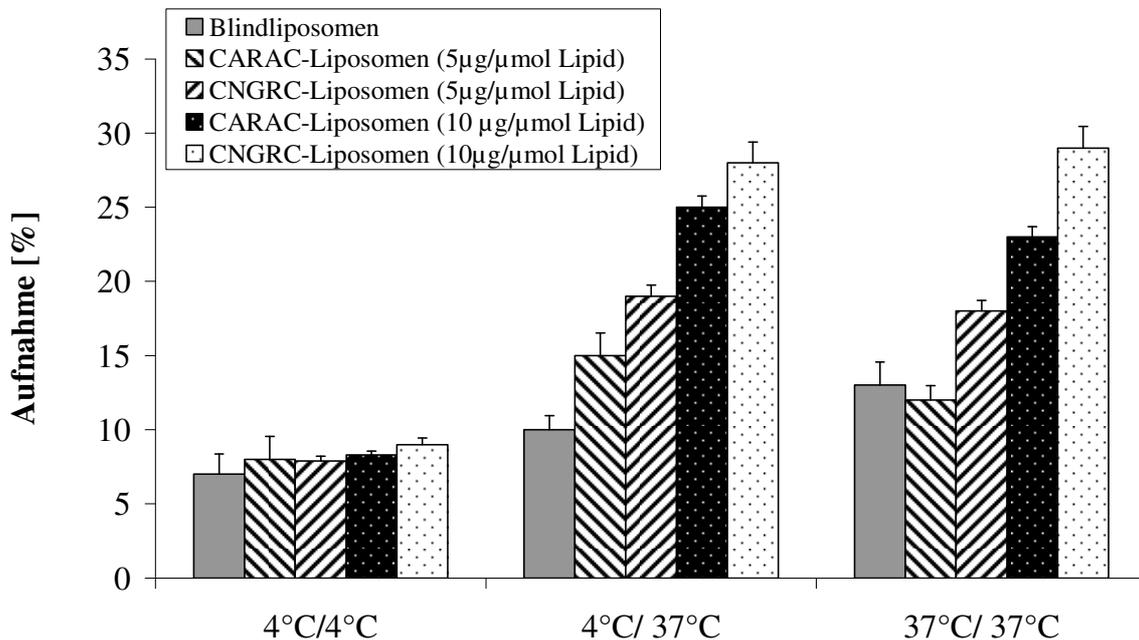


Abb.4-20: Prozentualer Anteil der internalisierten Liposomen vom jeweils gebundenen Teil

Fasst man die Ergebnisse beider quantitativen Methoden zusammen, kann man postulieren, dass die Aufnahmeprozesse der funktionalisierten Vesikel aktive energieabhängige Prozesse sind, da sie bei 4°C und damit Unterdrückung der energieabhängigen Vorgänge auf ein unspezifisches Niveau absinken. Der Bindungsschritt ist nachweislich essenziell für die anschließende Aufnahme. Bei Erhöhung des Bindungsanteils, wie gezeigt durch Inkubation bei 37°C, konnten auch absolut höhere Mengen an Liposomen aufgenommen werden. Die anteilige prozentuale Rate am Bindungsteil blieb jedoch konstant.

Weiterhin konnten die Ergebnisse beider Methoden zeigen, dass die Funktionalisierung von Liposomen zu einem Aufnahmevorteil führt, welcher abhängig von der Art und Menge des Liganden ist. Die erhöhten Aufnahmeraten der unspezifisch funktionalisierten Liposomen (CARAC) gegenüber blanken Vesikeln bei ungefähr gleichen Bindungsraten weisen auf eine unterschiedliche Art der Zellassoziation hin, die letztendlich zu unterschiedlichen Aufnahmemengen führt. So könnte eine festere Bindung über andere Epitope auf der Endotheloberfläche ein Erklärungsansatz sein, wie von anderen Arbeitsgruppen beim Targeting von Immunoliposomen an Krebszellen gezeigt [178]. Die spezifisch über den APN-Rezeptor assoziierten CNGRC-Liposomen zeigen mit ca. 30 % die höchsten Aufnahmeraten, was für eine aktive Rolle des APN-Rezeptors bei der Aufnahme spricht. Eine quantitative

Beurteilung der Internalisierungsleistung spezifisch funktionalisierter Liposomen mit Literaturdaten anderer Arbeitsgruppen gestaltet sich meist schwierig, da oft stark variierende Versuchsparameter vorliegen (Ligand, Zellen, Liposomengröße, Inkubationszeiten usw.). So zeigen z.B. bronchiale Epithelzellen [159] oder makrophagenähnliche Zellen [179] höhere Aufnahmeraten. Verglichen mit anderen Arbeiten an Endothelzellen [165,180] stellt die hier erreichte Rate von ca. 30 % einen durchaus vergleichbaren Wert dar. Die Erkenntnisse über eine mögliche aktive Internalisierungsfunktion von APN decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen. Ellerby et al. konnten beweisen, dass fluoreszenzmarkiertes CNGRC bevorzugt in APN-exprimierende Zellen endothelialen Ursprungs aufgenommen werden [50]. Ähnliche Erkenntnisse haben Arap et al. mit CNGRC markierten Phagen, welche bei *in vivo* Mausversuchen mit APN-negativen Tumoren nach 24 Stunden in den Tumoren nachgewiesen werden können, im Gegensatz zum Kontrollphagen [49]. Sie schließen daraus, dass nach Bindung der CNGRC-Phagen an das Tumorendothel eine Aufnahme bis ins Tumorgewebe erfolgt ist. Eine mögliche Rolle von APN als endozytotischer Internalisierungsrezeptor wird diskutiert, aber nähere mechanistische Untersuchungen dazu fehlen.

Eine nähere Untersuchung, ob die spezifischen CNGRC-Liposomen endozytotisch aufgenommen werden, soll Gegenstand des nächsten Abschnitts ein.

4.3.2. Qualitative Internalisierungsstudien

Die zellulären Aufnahmemechanismen können grundsätzlich in zwei große Bereiche eingeteilt werden. Einerseits ist es der Zelle möglich durch passive Prozesse (Fusion) Stoffe in die Zelle aufzunehmen, andererseits können Stoffe durch aktive energieabhängige Prozesse eingeschleust werden (Pinozytose, Endozytose). Da Fusion und Pinozytose eine untergeordnete Rolle spielen [165,181], sollte bei unseren Betrachtungen die Frage geklärt werden, ob APN eine aktive Beteiligung in Form der rezeptorvermittelten Endozytose am Aufnahmeprozess hat. Mehrere Studien zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass die Targetierung von internalisierenden Rezeptoren mit Liposomen zu einer beträchtlichen Erhöhung der therapeutischen Aktivität führt [182,183].

Einen differenzierten Einfluss auf rezeptorvermittelte Internalisierungsvorgänge erhält man durch intrazellulären Kaliumentzug. Dadurch kommt es zu einem Ablösen der Clathrinstruktureinheiten auf der Innenseite der Zellmembran. Normalerweise kommt es durch Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor zu dessen Anreicherung in Clathrin-

reichen Arealen („Clathrin coated pits“) und einer anschließenden Clathrin-abhängigen Einschnürung in „Clathrin coated pits vesicles“ und damit zur Aufnahme. Ein Kaliumentzug verhindert die Bildung der „Clathrin-coated pits vesicles“ und damit die rezeptorvermittelte Aufnahme [184-186]. Zusätzliche Inkubation der Zellen mit hypotonem Medium verstärkt die Effekte des Kaliumentzugs. Eine genaue Wirkungsweise der Hemmung ist nicht bekannt. Diskutiert wird eine abnorme Polymerisation des Clathrins in Form von leeren Gebilden, wodurch die Menge an freiem Clathrin zur Bildung endozytotischer Einstülpungen (pits) stark dezimiert ist [184].

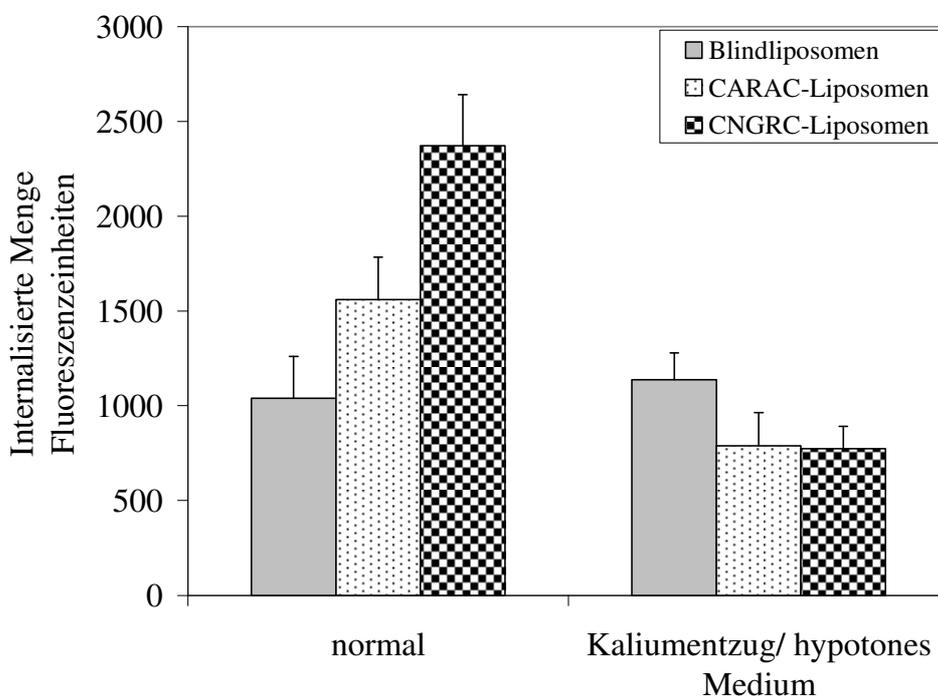


Abb.4-21: Vergleich der aufgenommenen Liposomenmenge mit und ohne Inhibitoren

Bei Anwendung dieser Methode für die Klärung der Rolle von APN als internalisierenden Rezeptor auf HUVEC wurde deutlich, dass der Aufnahmevorteil der CNGRC-funktionalisierten Liposomen gegenüber den unspezifisch funktionalisierten (CARAC) bzw. blanken Liposomen verloren geht. Ein Absinken der Aufnahme sogar unter das Niveau der Blindliposomen macht deutlich, dass die CNGRC-Liposomen über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden. Gleichzeitig ist auch ein Absinken der Internalisierung der unspezifisch funktionalisierten CARAC-Liposomen zu beobachten, was ebenfalls auf eine teilweise rezeptorvermittelte Aufnahme hinweist. Denkbar ist dabei eine Beteiligung von

LDL-Rezeptoren, deren Existenz auf Endothelzellen nachgewiesen ist [187]. CNGRC-funktionalisierte Liposomen zeigen eine Ligandmengen-abhängige Steigerung der Aufnahme, welche das Ausmaß der unspezifischen Liposomen deutlich übersteigt und durch Kaliumentzug zurückzudrängen ist. Eine spezifische APN-Rezeptor-vermittelte Aufnahme kann deshalb postuliert werden.

Zusätzlich sollte im Rahmen dieses Teilversuchs eine fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der CNGRC-Liposomen erfolgen, um die gewonnenen Erkenntnisse optisch deutlich zu machen. Dazu benutzten wir das Laser-Scanning-Mikroskop, mit dessen Technik es möglich ist, dass emittierte Fluoreszenzlicht aus den Ebenen ober- und unterhalb der fokussierten Ebene auszublenden. Durch eine spezielle Blende (pin-hole) ist es möglich, nur die fokussierte Ebene isoliert darzustellen. So kann man durch Darstellung der verschiedenen schmalen Ebenen durch das Präparat in sog. z-Richtung den Eindruck optischer (virtueller) Schnitte erzeugen. Nachfolgend können die einzelnen Schichten übereinander gelegt werden, um das gesamte Objekt darzustellen. Die Größe des „pin hole“ bestimmt die Dicke der z-Schicht, wobei diese zusätzlich von der Fluoreszenzstärke des Präparates abhängt.

Für diesen Versuch wurden die HUVEC in Kammerobjektträgern kultiviert, anschließend mit DiO-markierten CNGRC-Liposomen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit saurem Puffer („Acid wash“) und damit Zerstörung und Ablösung der oberflächlich gebundenen Vesikel wurden die Zellen fixiert und anschließend am Laser Scanning Mikroskop, wie beschrieben, in verschiedene Ebenen geschnitten, ausgehend von der auf dem Glasträger haftenden Zellunterseite bis zur Zelloberfläche. Die schematische Darstellung in Abb.4-22 soll dies verdeutlichen.

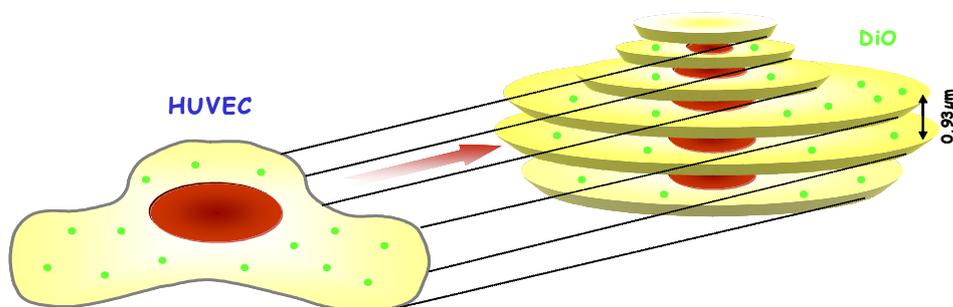


Abb.4-22: HUVEC in virtuellen Schnittebenen

Nach Bestimmung der Gesamthöhe der Zelle (ca. 8 μm) wurden „Schnitte“ jeweils im Abstand von 0,93 μm ausgeführt, wodurch ein Blick ins Zellinnere möglich war. Die einzelnen „Schnitte“ wurden nebeneinander dargestellt, wodurch ein räumlicher Eindruck entstand.

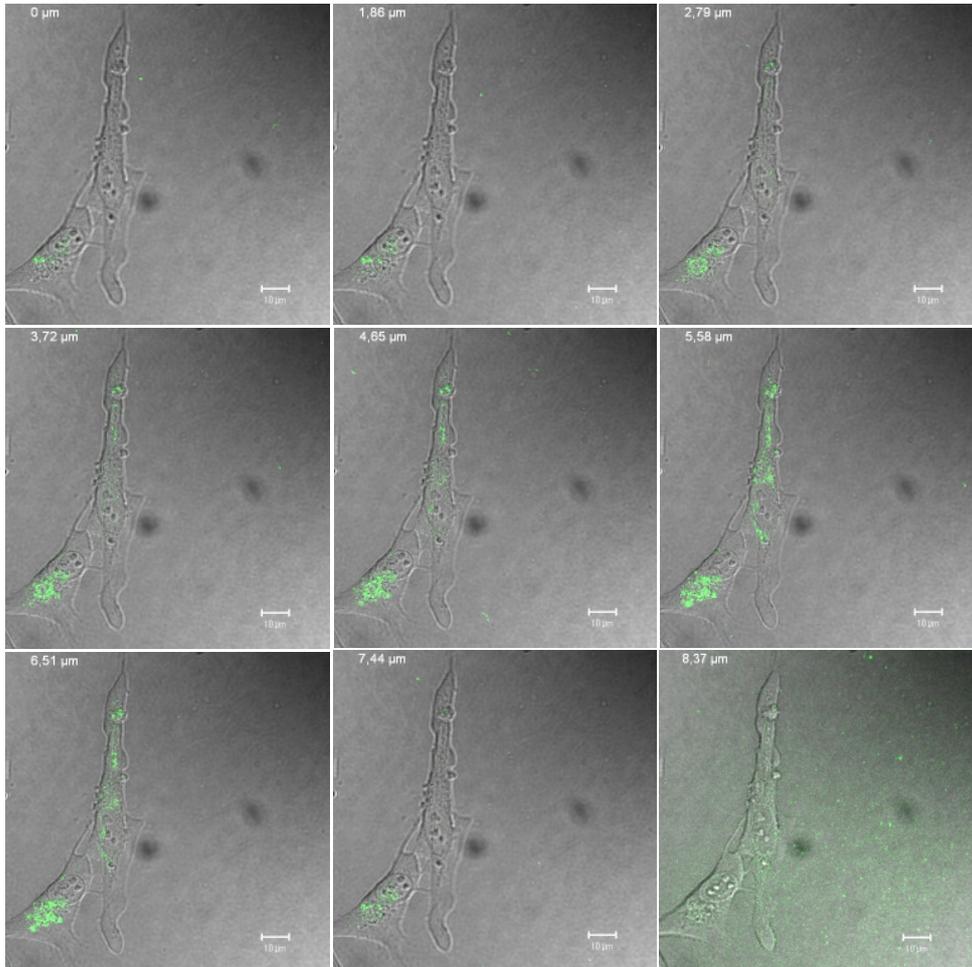


Abb.4-23: Virtuelle Schnitte durch HUVEC mittels konfokaler LSM nach Internalisierung von CNGRC-Liposomen und anschließender zusätzlicher „Acid wash“ Behandlung der Zelloberfläche

In den mittleren Zellabschnitten zeigen sich deutlich punktförmige Bereiche, die auf Liposomen-gefüllte Kompartimente der Endosomen oder Lysosomen hinweisen. Man sieht eine Separation der aufgenommenen Vesikel innerhalb festgelegter Bereiche. Des Weiteren zeigt der klar abgegrenzte Kern eine Lokalisation der Liposomen im Zellinneren. Die

mikroskopische Untersuchung der Aufnahme untermauert die These der aktiven endozytotischen Aufnahme von spezifisch funktionalisierten APN-gerichteten Liposomen.

Fasst man die Internalisierungsversuche zusammen, zeigt sich, dass nach einer erfolgreichen Targetierung der APN-gerichtete Liposomen *in vitro* diese bevorzugt von den Endothelzellen aufgenommen werden. Unter dem Aspekt einer antiangiogenetischen Therapie und der Möglichkeit der hohen Beladung eines einzelnen Liposoms mit einer Vielzahl von Arzneistoffmolekülen könnte sich der durchschnittliche gezeigte Aufnahmevorteil von 5% - 10% gegenüber unspezifisch funktionalisierten enorm potenzieren. Eine Nutzung des Targets APN zum gezielten Transport von liposomal verkapselten zytostatischen Arzneistoffen und deren Aufnahme ins Zellinnere würde dadurch eine enorme Erhöhung der therapeutischen Effizienz erfahren. So ist z.B in Liposomen mit einer Größe von 100 nm eine Verkapselung von ca. 30.000 Molekülen des Zytostatikums Doxorubicin möglich, legt man ein Lipid/ Doxorubicin-Verhältnis von 3/1 zugrunde [3]. Die Erkenntnisse der *in vitro* Internalisierungsversuche legen damit eine optimale Grundlage für ein liposomales Drug Delivery System in angiogenetisch aktiven Endothelzellen und könnten damit über die Zerstörung dieser tumorversorgenden Gefäße eine Reduktion des Tumorwachstums erwirken. Ponzoni et al. zeigten eine erfolgreiche Reduktion der Tumorlast im Neuroblastom-Mausmodell mit APN-gerichteten Doxorubicin beladenen Liposomen, wobei es aber keine Erklärungsversuche zur Art der Aufnahme nach der Bindung gibt [156].

Neben dem Therapieansatz der Angiogenesehemmung durch Schädigung des Tumorendothels mittels toxischer Substanzen stellte sich uns die Frage, ob eine Hemmung der Aktivität der APN durch bekannte Inhibitoren eine Reduktion der Angiogenese bewirken kann. Durch Modifizierung der Liposomen könnten APN-Inhibitoren gezielt am Endothel freigesetzt werden, ob auch eine intrazelluläre Lokalisation der Inhibitoren eine hemmende Wirkung hat, wurde bisher nicht geklärt.

Im nächsten Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, ob die Vorteile des aktiven Targetings von spezifisch funktionalisierten CNGRC-Liposomen mit einer Inhibition der APN kombiniert werden kann und damit neue Perspektiven einer liposomalen antiangiogenetischen Therapie gezeigt werden können.

4.4. Nutzung von Inhibitoren der Aminopeptidase N zur Einflussnahme auf die Gefäßneubildung im *in vitro* Angiogenese-Assay

Im Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit eine hemmende Wirkung auf die APN auch direkt auf den Prozess der Angiogenese wirkt.

Die Erkenntnis, dass eine spezielle Isoform der Aminopeptidase N nur von angiogenetisch aktivem Endothel, nicht aber von normalem Endothel exprimiert wird, legt eine aktive Rolle der APN im Tumorangio-genese-prozess nahe [145,129]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser APN in Endothelzellen durch angiogene Wachstumsfaktoren induziert wird, welche bei den meisten Tumorerkrankungen exprimiert werden und sich funktionell während der Angiogenese ergänzen. Außerdem wurde eine Beteiligung von APN am Abbau der extrazellulären Matrix und damit der Metastasierung bewiesen [137,140].

Baghwat et al. konnten mit Hilfe von APN-Inhibitoren, wie Bestatin, Amastatin sowie hemmenden Antikörpern einen Einfluss auf die Angiogenese *in vitro* in Form der verminderten Bildung von kapillären Netzwerken von HUVEC auf Matrigel zeigen [143]. Pasqualini et al. demonstrierten ebenfalls den antiangiogenen Einfluss von APN-Inhibitoren im Hypoxie induzierten Retina-Modell der Maus bzw. im Chorionallantoismembran (CAM)-Assay des bebrüteten Hühnereis [129]. Diese Ergebnisse ergänzen die schon seit längerem bestehenden Erkenntnisse, dass APN-Inhibitoren das Tumorwachstum verzögern. Am meisten untersucht ist in diesem Zusammenhang der Inhibitor Bestatin.

Bestatin ist ein Dipeptid, welches vor 25 Jahren von Umezawa im Kulturmedium von *Streptomyces olivoreticuli* gefunden wurde. Bestatin hemmt effektiv die Aktivität von Aminopeptidasen, wobei APN das Hauptziel darstellt. Andere Peptidasen, welche ebenfalls durch Bestatin gehemmt werden, sind Aminopeptidase B und Cystinyl-Aminopeptidase [188]. In diesem Zusammenhang berichten mehrere Arbeiten *in vivo* an tumortragenden Mäusen und Ratten über den Anti-Tumor-Effekt von Bestatin. Dabei zeigten sich sowohl bei der Therapie mit Bestatin allein, als auch in Kombination mit klassischen Zytostatika positive Effekte. [189-191.] Diese Ergebnisse sind Grundlage der bestehenden Zulassung von Bestatin unter dem Namen Ubenimex[®] als Arzneimittel in Japan und Tschechien für die Behandlung zur Lebensverlängerung bei akuter nichtlymphatischer Leukämie in Kombination mit anderen Chemotherapeutika [192].

In den vergangenen Jahren wird der Effekt von Bestatin auf die Angiogenese *in vitro* widersprüchlich diskutiert. Van Hensbergen et al. konnten 2003 zwar die Hemmung tubulärer Strukturen von HUVEC auf Matrigel zeigen, der gleiche Versuch durchgeführt in einer

Fibrinmatrix weist aber auf eine proangiogene Wirkung durch Bestatin in Form einer verstärkten Bildung kapillärer Strukturen hin [193]. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [194] aus dem Jahr 2004, die in zwei verschiedenen Angiogenese-Modellen *in vivo* und *in vitro* die hemmende Wirkung von Bestatin auf die tumorinduzierte Gefäßneubildung zeigen.

Im bisherigen Fokus unserer Arbeit stand die Nutzung von APN als Targetstruktur für Liposomen. Für eine funktionelle Beeinflussung der APN, beispielsweise mittels eingeschlossener Inhibitoren, sollte der Angiogenese-hemmende Effekt zuerst isoliert, unabhängig von Liposomen in einem geeigneten *in vitro*-Angiogenesemodell untersucht werden. Dies erschien insbesondere in Hinblick auf die heterogenen Erkenntnisse zur Angiogenesebeeinflussung durch APN-Blockierung in der Literatur notwendig.

Für die Aufklärung des Einflusses von APN-Inhibitoren auf die Angiogenese wurde von uns ein etabliertes *in vitro*-Angiogenese Assay verwendet [166]. Dieses basiert auf dem Einbringen von HUVEC-Sphäroiden (über 24 Stunden kultivierte Zellagglomerate, aus ca. 400 Zellen bestehend) in eine Kollagenmatrix. Während einzeln in solche Matrices eingebrachte Endothelzellen zur massiven Apoptose neigen, stabilisiert diese vorherige spheroidale Aggregation die Endothelzellen und führt nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF), wie auf Abb. 4-24 zu sehen, zur radialen Bildung von kapillären Sprouts [195].

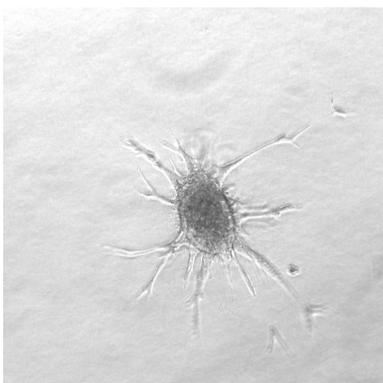
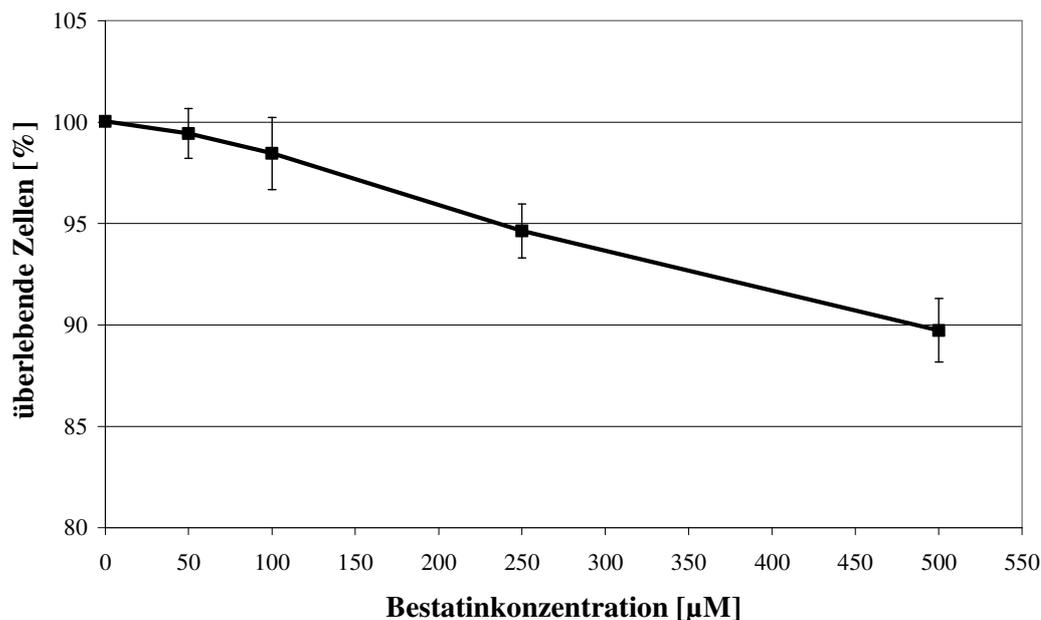


Abb.4-24: Beispiel eines HUVEC-Sphäroids mit gebildeten Sprouts mit deutlich sichtbaren kapillären Strukturen

Durch gleichzeitiges Einbringen von Testsubstanzen in die Kollagenmatrix kann deren Einfluss auf die Länge und die Anzahl dieser Sprouts ausgewertet werden. Im Gegensatz zu vielfach verwendeten anderen Angiogenese-Assays, die auf der zweidimensionalen Bildung von netzartigen Strukturen auf entsprechenden Matrices basieren (z.B. Matrigel), ermöglicht dieser Assay ein dreidimensionales Wachstum der kapillären Strukturen aus den Endothelzellen in die Kollagenmatrix. Damit wird die Angiogenese bei Einwanderung der Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix *in vivo* optimal simuliert. Der Assay bietet standardisierte Bedingungen und damit reproduzierbare Ergebnisse. Die Kultivierung, d.h. die Sproutingvorgänge sind über mehrere Tage nachvollziehbar, bevor sie mit Paraformaldehyd abgestoppt werden können. Die Zellen für einen Versuch stammten jeweils von derselben Nabelschnur, um individuelle biologische Unterschiede bezüglich Wachstum und Sproutingvermögen auszuschließen.

Um auch seitens der Inhibition bestmögliche Standardisierung zu ermöglichen, wurde Bestatin als bekannter und arzneilich zugelassener APN-Inhibitor im Testsystem verwendet. Zum weiteren Vergleich und Beurteilung der Ergebnisse setzten wir zusätzlich einen spezifischen APN-inhibierenden Antikörper (WM-15) ein.

Um zytotoxische Effekte der Inhibitoren selbst auszuschließen, führten wir als Vorversuch den etablierten MTT-Viabilitätstest durch. Die Durchführung erfolgte mit den gleichen Konzentrationen der Testsubstanzen und über den gleichen Zeitraum wie im Angiogenese-Assay.



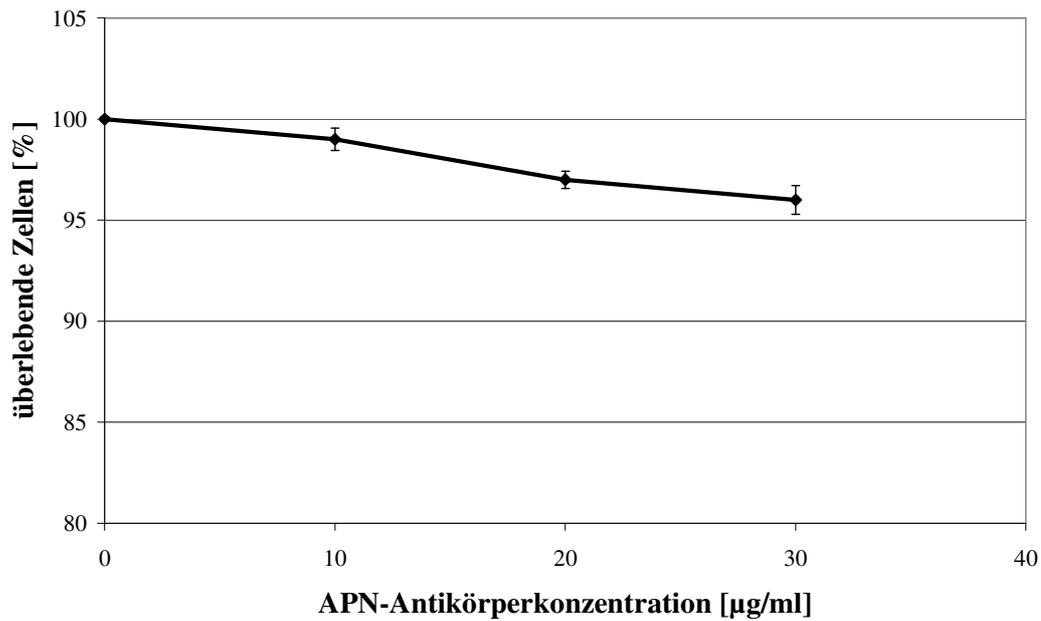


Abb.4-25: Überlebensraten der HUVEC 72 Stunden nach Zugabe der Inhibitoren

Die Auswertung des MTT-Tests (Abb.4-25) zeigt selbst bei hohen Dosen der genannten Substanzen nur eine geringe Toxizität, so dass im Angiogeneseassay eine mögliche Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Sproutbildung nicht auf generelle zytotoxische Effekte zurückzuführen und somit klar auf die Angiogeneseaktivität zu fokussieren ist.

Die Beurteilung der Bildung von Sprouts durch Ermittlung der Anzahl und Länge mittels spezieller Software wurde 18 Stunden und 72 Stunden nach Einsetzen der Sphäroide und gleichzeitiger Zugabe des Inhibitors in die Kollagenmatrix durchgeführt.

Die Anzahl der Sprouts wurde weder von Bestatin noch vom Antikörper im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst (nicht dargestellt). Die nachfolgende Auswertung der Sproutlängen erfolgte durch Ermittlung der durchschnittlichen kumulativen Sproutlänge (CSL-cumulative sprout length [166]) eines Sphäroids, wobei mindestens 10 repräsentative Sphäroide je Ansatz ausgewertet wurden.

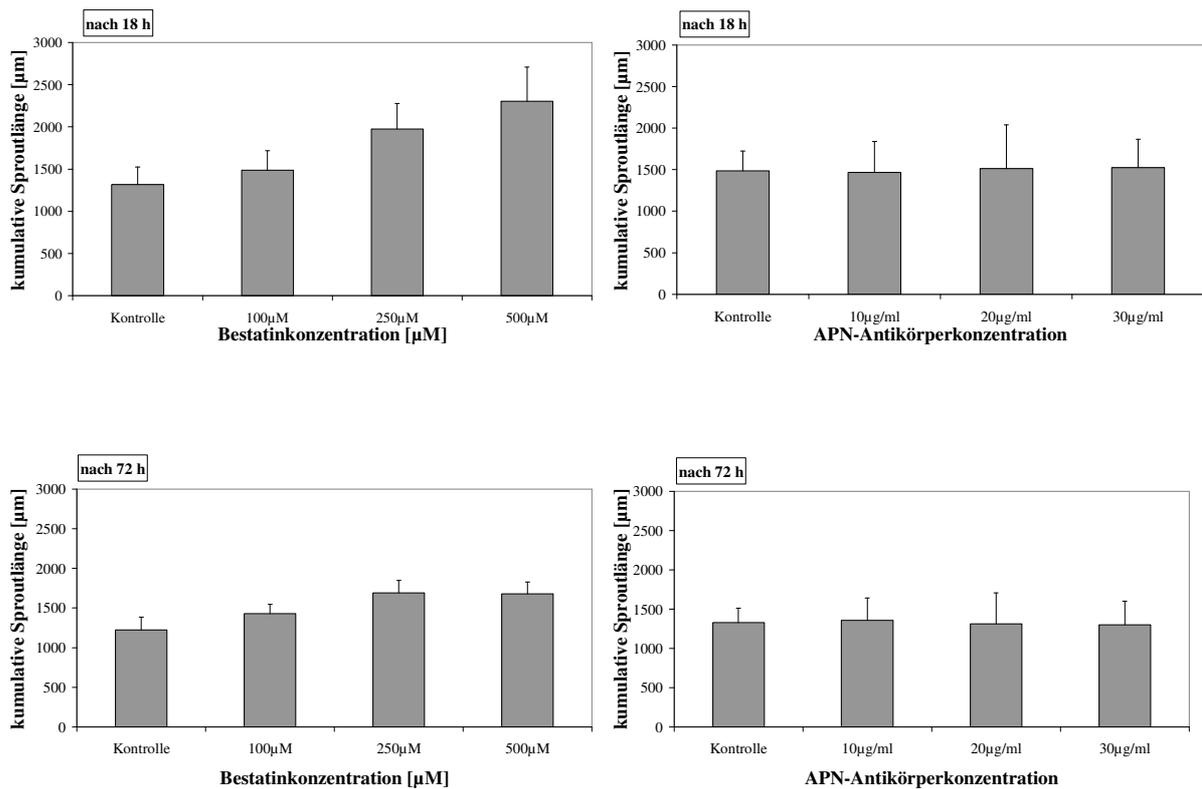


Abb.4-26 Einfluss von Bestatin und WM-15 auf die Bildung von kapillären Strukturen im *in vitro* Angiogenese Assay

Der erwartete antiangiogenetische Effekt durch die Inhibitoren der Aminopeptidase N wurde zu keinem untersuchten Zeitpunkt sichtbar. Mit dem spezifischen inhibierenden Antikörper waren überhaupt keine Einflüsse auf das Sproutingvermögen der HUVEC zu verzeichnen. Bei der Anwendung von Bestatin zeigte sich sogar ein proangiogenetischer Effekt im Zeitraum von 18 Stunden nach Zugabe. Nach 72 Stunden war selbst dieser Effekt nicht mehr messbar, was auf eine Zersetzung im Medium und damit Unwirksamkeit von Bestatin im Testsystem zurückzuführen sein könnte.

Für die Beurteilung des angiogenetischen Effekts wurden deshalb die 18 Stunden-Werte herangezogen. Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen der ausbleibenden Hemmung mittels des spezifischen Antikörpers kann man schlussfolgern, dass ein Effekt von Bestatin wahrscheinlich nicht auf die Hemmung der APN zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe van Hensbergen, die ebenfalls die proangiogenetische Wirkung von Bestatin, aber in einer Fibrin-Matrix feststellte. Der dabei ermittelte Einfluss war zwar auch schon bei niedrigeren Bestatin-Konzentrationen intensiver,

aber auch hier blieb der Effekt des APN-Antikörpers WM15 im unbedeutenden Bereich [193].

Damit erhärtet sich das heterogene Bild, welches in der Literatur zum Einfluss von Bestatin auf die Angiogenese *in vitro* gezeichnet ist. Man gewinnt den Eindruck, dass die Effekte von Bestatin stark von der benutzten Matrix-Umgebung der Zellen abhängig sind, somit unterschiedliche Assays schwer zu vergleichen sind. Es kann weiterhin vermutet werden, dass Bestatin durch seine hemmende Wirkung auch auf andere Aminopeptidasen, Einfluss auf die Interaktion zwischen HUVEC und strukturellen Proteinen der Matrix hat. Dies würde die völlig gegensätzlichen Ergebnisse bei Anwendung von Bestatin z.B. im *in vitro* Matrigel-Assay erklären. In diesem Assay wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Bestatin die Bildung netzartiger Strukturen von HUVEC auf Matrigel hemmt [143,193]. Allerdings ist die Anwendung von Matrigel als Angiogenese-Assay selbst umstritten. Es wurde vermutet, dass die Ausbildung netzartiger Strukturen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren die spezielle morphologische Differenzierung von Endothelzellen aufgrund der Interaktion zwischen Rezeptoren auf der Matrix und des entsprechenden Gegenspielers auf der Endothelzelle darstellt. Untersuchungen zeigen aber, dass auch Nicht-Endothelzellen, wie Osteoblasten oder Epithelzellen zur Bildung von tubulären Strukturen auf Matrigel, wie bei Endothelzellen in der Lage sind [196,197]. Andere Arbeitsgruppen halten dagegen Matrigel sehr wohl geeignet, um bestimmte Schritte der Angiogenesekaskade zu beobachten, welche so *in vivo* nicht differenzierbar bzw. quantifizierbar sind [198]. Insgesamt zeigt sich ein sehr inhomogenes Bild in der Bewertung der einzelnen *in vitro* Angiogenese-Modelle zum einen und folglich in den Ergebnissen daraus auf der anderen Seite. Da auch verschiedene Methoden der Auswertung durch Auszählung bestimmter Parameter (Länge, kumulative Länge, Anzahl, etc.) der gebildeten Strukturen angewendet werden, gestaltet sich selbst die Bewertung der Erkenntnisse innerhalb eines Assays mitunter sehr differenziert.

Für die Diskussion um den antiangiogenen Einfluss von Bestatin als unspezifischer APN-Inhibitor bedeutet dies, dass *in vitro* Angiogenese Modelle keine sicheren Erkenntnisse liefern. Der Prozess der Angiogenese ist sehr komplex, so dass mit einem *in vitro* Modell unter Verwendung einzelner Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) immer nur ein Bruchteil der Einflussfaktoren abgebildet werden kann, nicht aber der gesamte komplizierte Prozess.

In dem von uns verwendeten Assay wurde aber zumindest mit Kollagen ein Matrixprotein verwendet, welches vermehrt in den Zellzwischenräumen angiogenetisch aktiver

Endothelzellen *in vivo* nachgewiesen wurde [166]. Die Ergebnisse zeigen aber keine Effekte von Bestatin und des APN-inhibierenden Antikörpers auf die Länge bzw. Anzahl gebildeter kapillärer Strukturen aus den Endothelzellen in die Matrix.

Durch die negativen Ergebnisse der Angiogenese-Hemmung durch Bestatin wurde zumindest auf *in vitro* Ebene auf eine Kombination mit dem liposomalen Targeting verzichtet. An einem späteren Punkt der Arbeit wird auf die Angiogenese-Hemmung im Zusammenhang mit dem liposomalen Targeting unter *in vivo*-nahen Bedingungen (CAM-Assay) erneut eingegangen. Weiterführende Untersuchungen über die Rolle der Aminopeptidasen und ihrer Inhibitoren sind notwendig, um das Potential von Bestatin als antiangiogenetischen Wirkstoff bzw. als Antitumorwirkstoff zu verstehen. Eine sichere Erforschung des Einflusses von Inhibitoren bestimmter Aminopeptidasen scheint *in vivo* Erfolg versprechender zu sein, da so die Bewertung in Modellen erfolgen könnte, welche die Komplexität des Angiogeneseprozesses möglichst nah abbilden.

4.5. Nutzung der Positronen-Emissions-Tomographie für Targeting-Untersuchungen

Die *in vitro* Versuche am Zellmodell zeigten einen deutlichen Bindungsvorteil der APN-gerichteten CNGRC-funktionalisierten Liposomen an humanen Endothelzellen gegenüber unfunktionalisierten Liposomen und beweisen damit die prinzipielle Plausibilität der APN-Targetierung. Prinzipiell haben *in vitro* Zellversuche immer einen sehr modellhaften Charakter, der es auf der einen Seite ermöglicht, Optimierungen ohne störende Nebeneffekte zu erfassen und differenziert bewerten zu können. Auf der anderen Seite werden den Liposomen in dem statischen Bindungssystem unphysiologisch günstige Bedingungen, insbesondere zum zeitlichen Verlauf der Wechselwirkung mit den Zellen geboten. Auch können die verwendeten Nabelschnurzellen-Schichten nicht ohne kritische Betrachtung als Angiogenese-resultierende Gefäßmodelle angesehen werden, da sie nicht nach Stimulation durch einen Tumor entstanden sind. Da Zellmodelle immer nur einen Bruchteil des komplexen Angiogeneseprozesses abbilden können, sollten die Targetingexperimente für weiterführende Untersuchungen auf *in vivo* Modelle ausgeweitet werden. Wir entschieden uns dabei für das Modell athymischer Mäuse mit humanen Tumoren.

Dabei werden humane Krebszellen in die Mäuse subkutan injiziert, die dort zu Tumoren heranwachsen und so beobachtet werden können. Die Thymusfunktionsstörung dieser Mäuse

bewirkt, dass die Abstoßung des humanen Gewebes verhindert wird. In diese Tumor-Maus-Modelle sollten nun APN-gerichtete Liposomen eingebracht werden und deren Anreicherung im Tumorendothel bzw. Tumor verfolgt werden. Ziel war es, im komplexen Organismus zu überprüfen, ob eine Targetierung der APN am Tumorendothel des wachsenden Tumors möglich ist.

Zur Verfolgung der Anreicherung der Liposomen in der Maus wurde von uns die Methode der **Positronen-Emissions-Tomographie (PET)** gewählt. Diese nicht invasive nuklearmedizinische Methode wird seit ca. 15 Jahren erfolgreich eingesetzt. Dabei werden winzige Mengen eines radioaktiven Tracers (Positronenstrahler) verabreicht und deren unterschiedliche Verteilung mittels PET-Kamera im Körper sichtbar gemacht. Positronenstrahler haben im Gegensatz zu anderen radioaktiven Tracern eine besondere Eigenschaft, die man sich bei der PET zunutze macht und zu deren Registrierung und räumlicher Zuordnung benutzt. Die primär emittierten Positronen anihilieren nach einer ihrer kinetischen Energie entsprechenden Reichweite mit einem Elektron im Gewebe. Positron und Elektron bilden zuerst das äußerst kurzlebige Positronium und wandeln dann ihre Masseenergien um in zwei mit einem Winkel von 180° auseinander fliegenden Photonen einer genau definierten Energie von 511 keV. Die räumliche Zuordnung dieser sog. Vernichtungsstrahlung erfolgt mit Hilfe eines Scannerrings, in dem das Tier liegt. Die gleichzeitige Detektion der beiden Energieteilchen über eine PET-Kamera erlaubt es, die Linie zu bestimmen, auf welcher der Zerfall stattgefunden hat. Aus der Überlagerung sehr vieler dieser Linien errechnet dann ein an die Kamera angeschlossener Computer ein komplexes Bild der Verteilung des Tracers im Körper. Vor der eigentlichen Emissionsmessung wird eine Transmissionsmessung des Versuchstieres mit einer 511 keV-Photonen emittierenden Radioaktivitätsquelle durchgeführt. Durch Vergleich mit einer Transmissionsmessung ohne Tier (Leermessung) wird die Absorption dieser Photonen im Tier bestimmt und zur Schwächungskorrektur der Emissionsmessung und damit Bestimmung der eigentlichen Aktivität im Versuchstier benutzt. Positronenstrahler, wie sie bei der PET zum Einsatz kommen, haben extrem kurze Halbwertszeiten. Diese liegen zwischen wenigen Minuten bis zu zwei Stunden. Dies hat seinen Grund in der eigentlichen Verwendung der PET zur Diagnostik und damit Anreicherung der Tracer im lebenden menschlichen Organismus.

4.5.1. Herstellung und Charakterisierung der APN-gerichteten Liposomen entsprechend den Anforderung an die PET

Als radioaktiven Tracer wählten wir 2-[¹⁸F]Fluor-Deoxyglucose (¹⁸F-FDG). In diesem Glucosemolekül wurde eine OH-Gruppe durch ein radioaktives Fluor ersetzt (Abb.4-27).

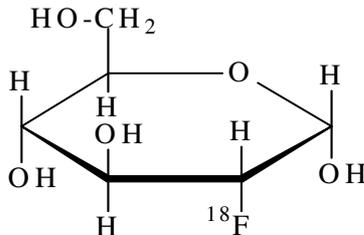


Abb.4-27: Formel der 2-[¹⁸F]Fluor-Deoxyglucose (¹⁸F-FDG)

¹⁸F-FDG hat von den verfügbaren Tracern den Vorteil einer relativ langen Halbwertszeit von 110 Minuten und ermöglicht damit eine Detektion der Aktivität über einen angemessenen Zeitraum (im Vergleich dazu ¹¹C mit 21 Minuten oder ¹³N mit 10 Minuten). Des Weiteren wird ¹⁸F-FDG bei der PET in der Tumordiagnostik aufgrund seiner Eigenschaft zur Anreicherung im Tumor verwendet, so dass reines, nicht-liposomales ¹⁸F-FDG als Positivprobe verwendet werden konnte.

Um die Methode PET für liposomale Targetinguntersuchungen nutzbar zu machen, musste der radioaktive Tracer ¹⁸F-FDG in die Liposomen eingeschlossen werden. Dabei standen wir vor der Aufgabe, den Einschluss des Tracers und die anschließende Entfernung des überschüssigen, nicht eingeschlossenen Anteils aufgrund der Limitierung durch die Halbwertszeit in extrem kurzer Zeit durchzuführen. Des Weiteren musste die Herstellung unter den besonderen Sicherheitsvorkehrungen bei der Arbeit mit radioaktivem Material stattfinden, d.h. sämtliche Vorgänge mussten hinter Bleiwänden und ohne direkten Kontakt bei den einzelnen Herstellungsschritten erfolgen. Die Filmmethode der *in vitro* Versuche mit anschließendem langen Schütteln und manueller Extrusion kam dabei nicht in Frage.

Daher wurden die benötigten Lipidfilme aus ihren Chloroform-Stammlösungen unter Vakuum in speziellen Reagenzgläsern gebildet. Dies war von Vorteil für die geringe Menge Flüssigkeit zur Hydratation von 250 µl (spätere max. Injektionsmenge pro Maus). Ein anschließendes Einspannen von vier Reagenzgläsern in ein Stativ und gleichzeitiges Eintauchen in ein Ultraschallbad ermöglichten es, die Lipidfilme gleichzeitig zu hydratisieren, abzulösen und die Größe der Liposomen zu beeinflussen. Damit konnte die Herstellungszeit

für Hydratisierung, Bildung und Verkleinerung der Liposomen auf ca. 30 Minuten verkürzt werden.

Vor dem eigentlichen Versuch und der Hydratisierung mit radioaktivem FDG musste überprüft werden, ob die so hergestellten Liposomen den Anforderungen an Größe, Einschluss und Stabilität im *in vivo* Versuch genügen.

Im ersten Schritt erfolgte die Bestimmung des eingeschlossenen Anteils der Hydratationsflüssigkeit und der Größe, um Rückschlüsse auf die Menge eingeschlossener Radioaktivität und damit die Durchführbarkeit der PET-Messung zu ziehen. Für diese Vorversuche wurden die Liposomen mit einer hochkonzentrierten Fluoreszenzfarbstofflösung (100 mM 6-CF) hydratisiert, wobei nicht eingeschlossene Farbstofflösung (self-quenching) durch eine Sephadex G-50-Säule abgetrennt wurde. Durch anschließende vergleichende Messungen der Liposomen in Puffer und nach Zerstörung dieser mit Triton (Verdünnung und Entquenching) konnte der eingeschlossene Anteil bestimmt werden. Die Lipidzusammensetzung wurde analog der optimierten Zellversuche gewählt. Repräsentativ für alle Bestimmungen wurden die Werte der CNGRC-funktionalisierten Liposomen dargestellt (CARAC-Liposomen analog).

Lipidkonzentration	Einschluss	Größe
10 $\mu\text{mol/ml}$	0,35% \pm 0,07 0,35 l/mol \pm 0,07	121 nm \pm 13
20 $\mu\text{mol/ml}$	1,14% \pm 0,14 0,57 l/mol \pm 0,07	136 nm \pm 11

Abb.4-28: Einschlussvermögen und Größe der Liposomen bei schneller Herstellungsweise

Dabei fällt auf, dass die Einschlüsse durch das sehr schnelle Herstellungsverfahren deutlich unter denen der sonst von uns genutzten langsamen Hydratationsmethode (kontinuierliches Schütteln über mehrere Stunden) liegen (vgl. ca. 1,1 l/mol bei 10 $\mu\text{mol/ml}$). So sind die Bildung und damit auch der effektive Einschluss bei Liposomen nicht nur von Parametern wie Phospholipidstruktur, Ladung, Temperatur usw. abhängig, sondern auch von der Art und Menge der zugeführten kinetischen Energie [199,200]. Die schnelle Hydratisierung des Lipidfilms unter gleichzeitiger Ultraschallbehandlung führt definitiv zu niedrigeren

Einschlussquoten. Für die spätere Anwendung bei der PET sollten diese Einschlussquoten aber dennoch ausreichend sein, da der zeitliche Vorteil gegenüber allen anderen Verfahren sehr hoch ist und damit eine schnelle und sichere Herstellung der Liposomen mit dem kurzlebigen radioaktiven Marker ^{18}F -FDG möglich ist.

Inwieweit diese Liposomen in Serum stabil sind und damit ausreichend lange als intakte Vesikel *in vivo* zirkulieren können, zeigten uns Freigabeuntersuchungen des eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs über mehrere Stunden in humanem Serum.

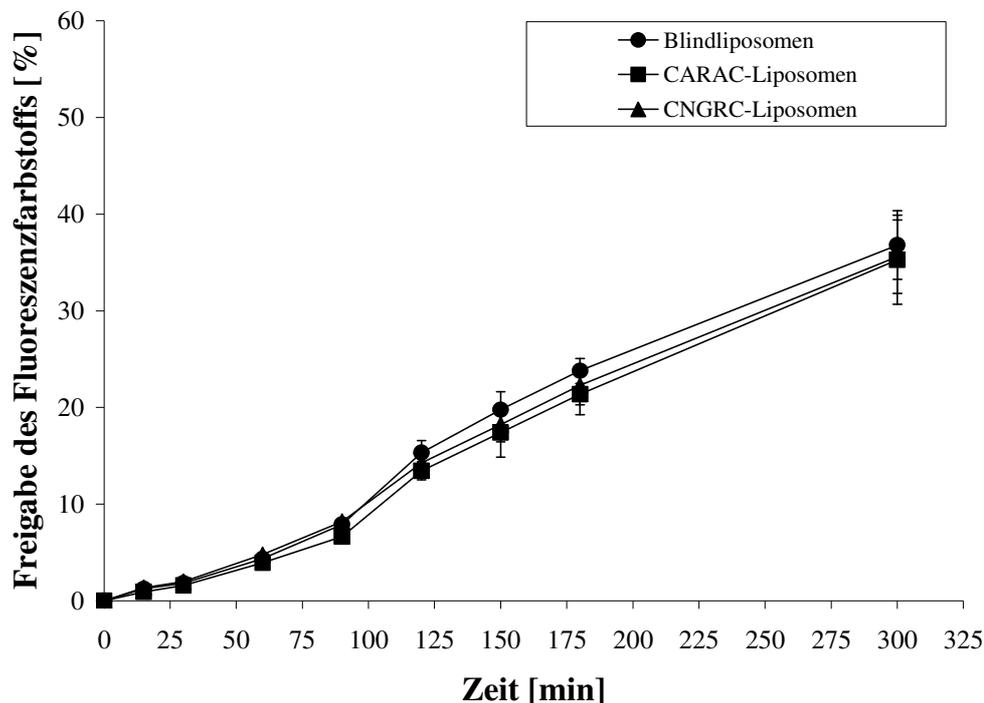


Abb.4-29: Stabilität der Liposomen in humanem Vollserum

Prinzipiell gibt es eine Vielzahl von Interaktionen, die zwischen den Liposomen und den Serumbestandteilen (z.B. Globuline, Gerinnungsfaktoren, Stoffwechselprodukte) möglich sind [201,202]. Die größte Bedeutung haben hier die Serumlipoproteine, da Phospholipide z.B. durch HDL extrahiert werden können, was zum Leakage von eingeschlossenem Material durch die gestörte Membran führen kann.

In unserem Versuch zeigt sich, dass alle drei Vesikelpopulationen eine Leakage-Tendenz haben. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten über das Ausmaß ist meist nur schwer möglich, da die Lipidzusammensetzungen und -konzentrationen variieren. Des Weiteren werden die Untersuchungen oft in verdünnten Serumlösungen durchgeführt, deren Relevanz für spätere *in*

in vivo Versuche unklar ist. Es fällt auf, dass alle drei Vesikelpopulationen ungefähr das gleiche Freigabeverhalten in Serum haben. Verantwortlich dafür ist sicherlich die Grundlipidmischung mit 2 mol% PEG-PE, die alle drei Populationen gleichermaßen gegen die Wechselwirkungen mit Lipoproteinen abschirmt. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass PEG-Ketten an der Liposomenoberfläche nicht nur Vorteile in Bezug auf die Zirkulationszeiten *in vivo* haben, sondern auch verbesserte Serumstabilitäten bringen [203]. Im von uns angestrebten Beobachtungszeitfenster von 240 Minuten bei PET zeigte sich eine durchschnittliche Freisetzungsrates von ca. 25 %, die uns, auch verglichen mit anderen Arbeiten, als durchaus akzeptabel für den *in vivo* Versuch erschien. Außerdem sollte das gleiche Freisetzungsverhalten der einzelnen Vesikelpopulationen für spätere Vergleiche von Vorteil sein.

4.5.2. Untersuchung des Liposomenverhaltens in tumortragenden Mäusen mittels PET

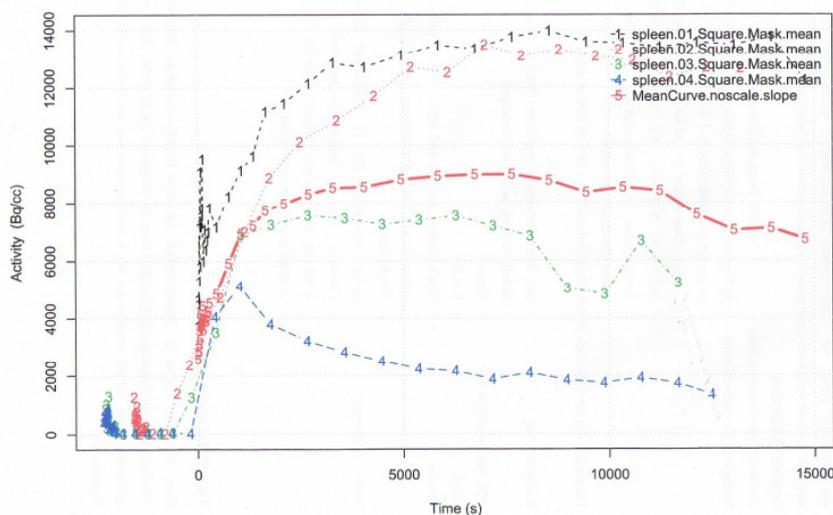
Entsprechend den Vorversuchen wurden die Lipidfilme in der Konzentration von 20 $\mu\text{mol/ml}$ zur Herstellung der Liposomen in Reagenzgläsern aufgebracht. Die Hydratation und anschließende Ablösung des Lipidfilms erfolgte dann im Radioaktivlabor des Kernforschungszentrums Rossendorf mittels PBS, in welchem das frisch erzeugte radioaktive FDG vorlag. Nach der Ultraschallbehandlung erfolgte die Abtrennung des nicht eingeschlossenen radioaktiven Materials mittels einer G-50-Säule mit automatischem Probensammler. Über den angeschlossenen Radioaktivdetektor konnten die liposomalen FDG-enthaltenden Fraktionen ermittelt werden und anschließend sofort den narkotisierten Mäusen über die Schwanzvene appliziert und damit die Messung begonnen werden. Durch Messung der Aktivität vor und nach der Säulentrennung konnte der eingeschlossene Anteil ermittelt werden. Mittels Abnahme eines winzigen Aliquots wurden nach dem Abklingen der Aktivität im normalen Labor die Größe der Vesikel bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte lagen im gleichen Größenbereich wie in den Vorversuchen und bestätigten damit deren Aussagekraft (Abb.4-30).

Lipidkonzentration	Einschluss	Größe
20 $\mu\text{mol/ml}$	0,98% \pm 0,13	151 nm \pm 19
	0,49 l/mol \pm 0,06	

Abb.4-30: Einschluss und Größe der *in vivo* genutzten CNGRC-Liposomen

Zur Injektion kamen 200 µl Liposomendispersion mit einem Lipidgehalt von ca. 3 µmol, welche eine Aktivität von ca. 0,3 MBq beinhalteten. Die Emissionsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 240 Minuten mittels PET-Kamera. Die gemessene Aktivität wurde durch Kalibrierung nach Korrektur der Strahlungsabschwächung durch Zerfall ($t_{1/2}$) und Transmissionsmessung in Bq je cm³ Organ umgerechnet und als Zeit-Aktivitätskurven zur Verfügung gestellt.

Dabei zeigte sich in allen drei durchgeführten Versuchen keine messbare Anreicherung von Liposomen (CNGRC u. CARAC) im Tumor. Die Ursache für dieses Ergebnis als Folge mangelnder Zirkulation intakter Liposomen konnte eigentlich ausgeschlossen werden, da eine kontinuierliche Anreicherung der liposomalen ¹⁸F-FDG-Fractionen in der Milz im Gegensatz zu einer wesentlich geringeren des freien ¹⁸F-FDG sichtbar war. Die Milz hat im Körper die Funktion des Abbaus korpuskulärer Bestandteile im Blut (z.B. geschädigter Blutzellen) und gilt damit als Indiz für eine Aufnahme intakter Vesikel aus dem Blut. Eine massive Zerstörung der Liposomen *in vivo* hätte sich in einer dem unverkapselt applizierten ¹⁸F-FDG ähnlichen Aufnahmeraten durch die Milz gezeigt.



1,2-CNGRC-Liposomen
3-CARAC-Liposomen
4-reines ¹⁸F-FDG
5-Mittelwert

Abb.4-31: Aktivitäts-Zeit-Kurve in der Milz der Mäuse nach Applikation von CNGRC-Liposomen, CARAC-Liposomen und reinem ¹⁸F-FDG

Die fehlende Tumortargetierung eröffnet verschiedene Fragen zur möglichen Interpretation. Betrachtet man die Bindung der Liposomen an APN der Endothelzellen als prinzipiell

möglich, ergeben sich aus experimentell technischer Sicht zwei kritische Punkte. Einerseits könnte das Ausmaß der Anreicherung zu gering sein, so dass es unter der erfolgten Beladung der Liposomen mit ^{18}F -FDG nicht mehr messbar ist. Ein weiterer Aspekt könnte ein zu kurzer Messzeitraum sein, wenn sich die Akkumulation am Tumorendothel erst nach längerer Zeit darstellen lässt. Prinzipiell aber sollte ein vaskuläres Targeting schnell und innerhalb von 4 Stunden verlaufen, genaue Erkenntnisse in Bezug auf die Kinetik der Anreicherung von NGR an seinen Rezeptor *in vivo* gibt es aber nicht. Vergleicht man die Kinetik anderer Studien zu endothelialen Targetierung von Liposomen, fallen sehr unterschiedliche Messzeiträume auf. Obwohl prinzipiell eine schnelle Akkumulation der Liposomen an den leicht zugänglichen Targets anzunehmen ist, sind Detektionsdaten von bis zu 24 Stunden [156,174] in der Literatur beschrieben.

In unseren weiteren Untersuchungen sollte deshalb die Beobachtung des Targetings in einem längeren Zeitraum erfolgen. Dabei kam die Methode PET nicht in Frage, da diese in ihrer maximalen Versuchszeit durch die geringen Halbwertszeiten der Tracer und durch die Verarbeitung und Speicherung der extrem hohen Datenmengen auf ca. 4 Stunden limitiert ist.

4.6. In vivo nahe Untersuchungen am Modell der Chorionallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis

Für die weiteren Untersuchungen entschieden wir uns für das Modell der Chorionallantoismembran (CAM), welches ein anerkanntes Testsystem zur Untersuchung der Angiogenese darstellt. Dieses in der Literatur auch als HET-CAM-Test (Hen's Egg Test-Chorionallantois Membrane) bezeichnete Testsystem ist eine einfache, vergleichsweise schnell durchführbare, im Gegensatz zu Tierversuchen kostengünstige und sehr empfindliche Methode zur Untersuchung der Angiogenese [204]. Bei der CAM handelt es sich eine extraembryonale Membran bebrüteter Hühnereier, die dem Hühnerembryo in erster Linie als Gasaustauschfläche bzw. dem Kalziumtransport von der Schale in den Embryo dient. Die Membran entwickelt sich am 4. bis 5. Entwicklungstag des Embryos bis zum 11. Entwicklungstag, danach reifen die Gefäße aus. Daher wird das CAM-Modell intensiv zur Untersuchung von Vaskularisierungsprozessen bzw. deren Hemmung herangezogen.

In unserem Fall haben wir das Modell durch Aufbringen eines dreidimensionalen Krebszellkonglomerats an Tag 7 als Tumormodell erweitert. Dazu benutzten wir embryonale Rhabdomyosarkomzellen (RD), die in Matrigel generiert wurden und nach Aufbringen auf die

CAM innerhalb von 4 bis 6 Tagen zu soliden Tumoren heranwuchsen. Diese zeichnen sich durch gute Vaskularisierung aus. Nach Anwachsen auf der CAM beobachtet man eine schnelle Gefäßreaktion in Form von strahlenförmig auf den Tumor zulaufenden Gefäßen zu dessen Versorgung (Abb.4-32). Es wird somit eine tumorinduzierte Angiogenese erzeugt, deren neu gebildete Gefäße uns als Modell zur Targetierung der Liposomen und zur weiteren funktionellen Untersuchung der Angiogenese zur Verfügung standen.

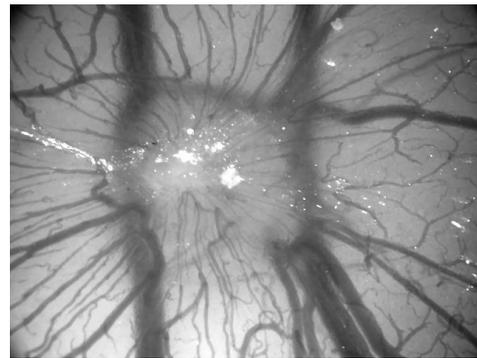


Abb.4-32: auf der CAM angewachsener Tumor, man sieht deutlich die strahlenförmig auf den Tumor zulaufenden Gefäße bzw. dessen Vaskularisierung

Lokalisationsuntersuchungen von Pasqualini mit anti-APN-Antikörpern belegen die Exprimierung der APN auch im Huhn, da eine Kreuzreaktivität eines anti-APN-Antikörpers der Maus auch gegen Huhn-APN nachgewiesen werden konnte. Vorausgegangene Versuche an der Maus bewiesen, dass Antikörper und NGR-Peptid an der gleichen Stelle binden [129].

4.6.1. Der CAM-Assay als Grundlage für Targetinguntersuchungen mittels APN-funktionalisierter Liposomen

Da durch die Bindungsuntersuchungen mittels PET innerhalb des möglichen Zeitfensters von 4 Stunden eine spezifischen Anreicherung der APN-gerichteten Liposomen im Tumor nicht nachweisbar war, suchten wir nach einer Möglichkeit, die Tumor-Anreicherung der Liposomen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Die Untersuchung von Ponzoni et al. gab uns Hinweise, dass eine spezifische Anreicherung von APN-Liposomen erst nach 12 Stunden oder 24 Stunden möglich ist, wobei dies eigentlich dem postulierten Prinzip eines vaskulären Targetings widerspricht [156]. Der CAM Assay mit seinen beschriebenen Vorteilen zur Beobachtung der Angiogenese sollte deshalb als *in vivo* nahes Testsystem für weitere Untersuchungen dienen. Aufbauend auf Erfahrungen in der AG Rothe (MLU, FB

Physiologische Chemie) war es möglich, Liposomen mittels geschliffener Glaskapillaren und einem Mikroinjektor-System in das Blutgefäßsystem der CAM zu injizieren. Auf dieser Grundlage sollten die APN-gerichteten Liposomen in die Gefäße der CAM injiziert werden und die Anreicherung in angiogenetisch aktiven, tumornahen Bereichen untersucht werden. Alle Vorgänge konnten über das angeschlossene Mikroskop und die Digitalkamera verfolgt und ausgewertet werden.

Es gibt bisher kaum veröffentlichte Arbeiten zur Injektion von Liposomen in das Gefäßsystem der CAM. Lediglich eine Arbeit zu Blutstromgeschwindigkeitsmessungen mittels Liposomen in der CAM [205] und eine Promotionsarbeit an der MLU Halle, in der Mikropartikel zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen injiziert wurden, sind hierzu bekannt [206]. Weitere zwei Arbeiten existieren, die sich aber mit der lokalen Reaktion der CAM nach Aufbringen von bestimmten wirkstoffhaltigen Liposomen (z.B. Polividon-Jod) beschäftigen [207,208].

Da es keine geeigneten Anhaltspunkte über Injektionen in die CAM gab, sollten im ersten Schritt folgende Punkte ermittelt werden:

- geeignete Menge Lipid zur Injektion
- optimale Gesamtmenge (Volumen) an Liposomen
- geeignete Lipidzusammensetzung

Diese Parameter sollten so eingestellt werden, dass die injizierte Liposomen keine Beeinträchtigung des Gefäßsystems oder auch der Überlebensfähigkeit der Embryonen darstellt.

In den Vorversuchen kamen zuerst nicht targetierte Liposomen zum Einsatz, um die reinen Zirkulationseigenschaften ohne Nebeneffekte des Liganden beobachten zu können.

Das injizierte Volumen wurde in erster Linie durch die Füllmenge (20 μ l) der zur Injektion benutzten Kapillare bestimmt, von Mehrfachinjektionen wollten wir wegen der erneuten Verletzung des Gefäßsystems absehen. Im ersten Schritt wurden deshalb Liposomen der gleichen Zusammensetzung wie in den *in vitro* Zellversuchen aus SPC/Cholesterol eingesetzt. Ein Teil der Vesikel wurde zusätzlich mit 5 mol% PEG-PE auf Kosten des SPC Anteils hergestellt, um vermutete unspezifische Interaktionen zwischen Endothelzellen und Liposomen zurückzudrängen und die Zirkulationszeit zu erhöhen. Die Gesamtlipidmenge betrug 10 μ mol/ml. Die Vesikel waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiO in der Lipidmembran zur Detektion markiert.

Als Ergebnis konnte ein deutlicher Unterschied im Zirkulationsverhalten von Liposomen mit und ohne PEG-Anteil festgestellt werden. Die nicht PEG-ylierten Liposomen hatten eine maximale Zirkulationszeit von 3-4 Stunden, danach kam es ausgehend von der Peripherie zum Stillstand und zur Agglutination des Blutgefäßsystems in der CAM, während bei den mit PEG-ylierten Liposomen behandelten CAM auch noch nach 5 Stunden ein Blutfluss in den meisten Gefäßen zu beobachten war. 24 Stunden nach der Injektion war dann auch hier der gesamte Blutfluss aufgrund der Agglutinationen zum Stillstand gekommen und dadurch der Embryo abgestorben. Diese Beobachtungen waren durch Aufnahme von Fließsequenzen über eine an das Mikroskop angeschlossene digitale Videokamera möglich, sind im statischen Bild aber nicht abbildbar.

Da für unsere Targetierungsuntersuchungen aber ein Beobachtungszeitfenster von mindestens 24 Stunden von Interesse war, haben wir uns für eine deutliche Reduktion der Lipidmenge auf ca. 5 $\mu\text{mol/ml}$ entschieden. Die CAM, die mit PEG-ylierten Liposomen dieser Konzentration injiziert wurden, zeigte daraufhin einen unbeeinträchtigten Blutfluss mit einem vitalen Embryo über den erwünschten Zeitraum von mind. 24 Stunden. In einem weiteren Schritt wurde der PEG-Anteil auf 2 mol% reduziert, da mit diesem Anteil in den Zellversuchen die optimalen Bindungsergebnisse erzielt wurden. Da auch diese Veränderung das Blutgefäßsystem der CAM und den Embryo nicht beeinträchtigte, wurde für alle weiteren Versuche folgende Zusammensetzung als optimal erachtet: SPC / Cholesterol / PEG-PE (3,4 / 1,8 / 0,1 μmol) mit einer Injektionsdosis von 20 μl .

Zur weiteren Untersuchung der spezifischen Targetierung der angiogenetischen Gefäße auf der CAM sollten die Liposomen analog zu den *in vitro* Zellversuchen mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff DiO markiert werden, um fluoreszenzmikroskopisch das Ausmaß der Anreicherung am Gefäß auswerten zu können.

Nach 24 Stunden sollte dann die CAM aus dem Ei präpariert, in ein konservierendes Medium eingebettet und am Laser Scanning Mikroskop oder normalen Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Dabei stellten wir schon nach Präparation der Blindprobe (keine Injektion von Liposomen) und anschließender Beobachtung fest, dass es in dem zur Anregung des Farbstoffs DiO notwendigen Wellenlängenbereich von 485 nm zu einer starken grünen Autofluoreszenz der Gefäße selbst kam.



Abb.4-33: beobachtete Autofluoreszenz einer unbehandelten (keine Liposomeninjektion) CAM, LSM (links) bzw. mit Fluoreszenzmikroskop Vergr. 8x (rechts)

Da eine solch hohe Autofluoreszenz der CAM-Gefäße eine Detektion von targetierten Liposomen und damit einen Vergleich erschwert, erschien uns die Markierung der Liposomen mit grün fluoreszierenden Farbstoff als ungeeignet. Worauf diese Autofluoreszenz zurückzuführen ist, konnte an dieser Stelle nicht erschöpfend geklärt werden. Bekannt ist, dass Kollagen, NADH, Porphyrine oder Tryptophan Autofluoreszenzen hervorrufen können. In unserem Fall vermuteten wir eine Autofluoreszenz aufgrund von Häm, dem eisenhaltigen Farbstoff der roten Blutkörperchen, welches strukturell ein Porphyrin darstellt. Aufgrund der Autofluoreszenz entschieden wir uns in den nächsten Versuchen für eine Markierung der Liposomen mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Texas Red, da bei Anregung im Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs von 583 nm die Autofluoreszenz stark zurückgedrängt werden konnte (siehe Abb.4-34).

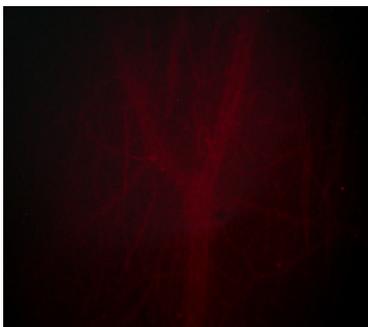
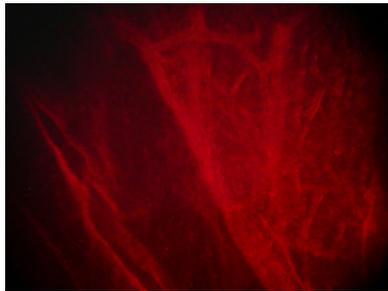


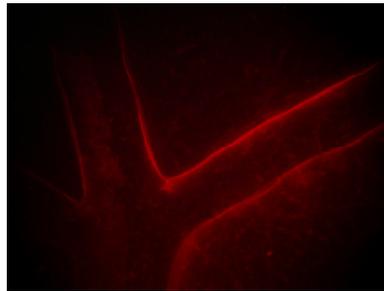
Abb.4-34: CAM, unbehandelte Blindprobe (keine Liposomeninjektion), Mikroskop Leica MZ FLIII, Kamera Nikon Coolpix 4500, Vergr. 8,0

Durch die Markierung der Liposomen mit Texas Red stand uns nun ein System zur Verfügung, um die Anreicherung der spezifischen und unspezifischen Liposomen ohne

überschneidende Autofluoreszenz der Gefäße selbst zu verfolgen. Zur weiteren Untersuchung der spezifischen Targetierung des angiogenetischen Endothels in der CAM wurden die Liposomen analog zu den Konzentrationen der Zellversuche mit unspezifischem CARAC-Liganden oder spezifischem CNGRC-Liganden präpariert. Von den Liposomenfraktionen wurden jeweils 20 µl injiziert. Die Auswertung 24 Stunden nach der Injektion am Fluoreszenzmikroskop gab Hinweise auf eine spezifische Bindung der CNGRC-Liposomen am Endothel der CAM.



CAM, CARAC-Liposomen



CAM, CNGRC-Liposomen

Abb.4-35: Akkumulation von APN-gerichteten Liposomen in der Gefäßwand der CAM nach 24 Stunden, Mikroskop Leica MZ FLIII, Kamera Nikon Coolpix 4500, Vergr. 8,0

An den Gefäßen der CAM, denen spezifische APN-gerichteten CNGRC-Liposomen injiziert wurden, zeigte sich eine deutlich schärfere Abgrenzung der Fluoreszenz in den endothelialen Schichten des Gefäßes, als bei der CAM, in die unspezifische CARAC-Liposomen injiziert wurden. Hier scheint sich die Fluoreszenz diffuser über das gesamte Gefäß zu verteilen, wobei im gesamten Ausmaß der Fluoreszenz mit der verwendeten Kamera kein deutlicher Unterschied darstellbar wurde. Es kann dabei nicht völlig geklärt werden, worauf die unspezifische Anreicherung der CARAC-Liposomen an den Gefäßwänden zurückzuführen ist. Da wir auch keine klaren Erkenntnisse haben, inwieweit die APN in dem sich entwickelnden Gefäßsystem der CAM gleichmäßig oder verstärkt durch die erhöhte Vaskularisierung in Tumornähe exprimiert wird, gingen wir deshalb dazu über, in weiteren Versuchen die Gefäße direkt am Tumor zu beobachten.

Für die Aufnahmen nutzten wir eine Hochleistungs-s/w-Kamera (pixelfly von ico.imaging), die auch für die Fließsequenzen in den Gefäßen benutzt wurde, weil mit dieser wesentlich empfindlicher Lichtveränderungen darstellbar sind, als mit der normalen digitalen Kamera.

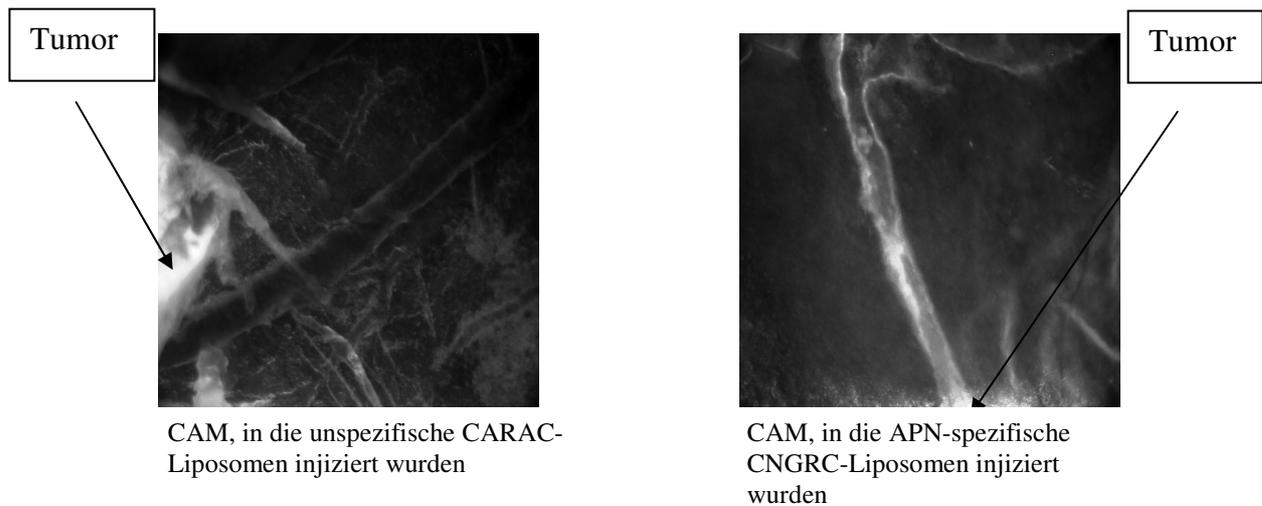


Abb.4-36: Akkumulation der Liposomen in den Gefäßen der CAM in Tumornähe, Mikroskop Leica MZ FLIII, Kamera Pixelfly, Vergr.8,0

Die Fotos zeigen eine erkennbar stärkere Anreicherung von CNGRC-Liposomen am Endothel in unmittelbarer Tumornähe in Form einer intensiveren Fluoreszenz am Gefäß. Durch die ansonsten analogen experimentellen Parameter muss dieser Unterschied auf die spezifische Erkennung der CNGRC-Liposomen zurückzuführen sein. Wir haben daraus geschlossen, dass es auch in einem *in vivo*-nahen System unter Blutflussbedingungen möglich ist, CNGRC-funktionalisierte Liposomen zielgerichtet am APN-exprimierenden, angiogenetisch aktiven Endothel anzureichern. Dieses Ergebnis bestätigt damit unsere *in vitro* Untersuchungen und erstmals unsere These unter *in vivo* nahen Bedingungen, APN als Zielstruktur zum zielgerichteten Transport von in Liposomen eingeschlossenen Arzneistoffen zu tumorversorgenden Gefäßen nutzen zu können.

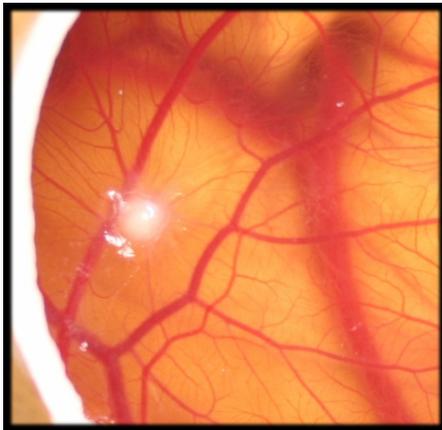
Prinzipiell aber muss das CAM-Assay zur weiteren Beurteilung des Verhaltens von injizierten Liposomen als eher kritisch angesehen werden. Aus unseren Vorversuchen ist bekannt, dass die CAM bezüglich der Injektionsmenge enge Rahmenbedingungen vorgibt, um die Lebensfähigkeit des bebrüteten Eies und damit die Beobachtungszeit zu ermöglichen.

Ein Injizieren von Liposomen ist nach unserer Beobachtung deshalb nur in einem relativ stark begrenzten Konzentrationsfenster des Lipids möglich, was eine optimale Nutzung als Modell zur Untersuchung von Liposomen und deren Variation in Lipidzusammensetzung oder -menge limitiert. Die hohe unspezifische Bindung der Liposomen oder auch die relativ eingeschränkte Detektion aufgrund der Autofluoreszenz von CAM-Gefäßen sind ebenfalls als kritisch anzusehen.

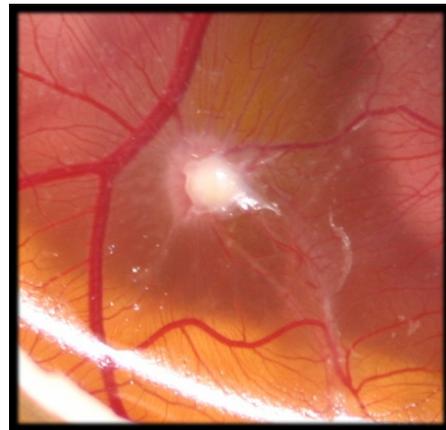
4.6.2. Untersuchung der funktionellen Beeinflussung der Angiogenese im CAM-Tumor-Modell

Die widersprüchlichen Ergebnisse der Beeinflussung der Angiogenese im *in vitro* Modell durch den APN-Inhibitor Bestatin (siehe Kapitel 4.4) sollten nun in dem *in vivo* nahen System überprüft und ergänzt werden. Im Gegensatz zum Zellmodell *in vitro*, welches auf Grundlage von präparierten Endothelzellen in einer künstlichen Matrix basiert, stellen die durch den implantierten Tumor erzeugten Gefäße am lebenden Organismus eine realere Plattform zur Beobachtung einer Gefäßreaktion dar. Erfahrungen der AG Rothe (MLU, Physiologische Chemie) mit dem zugelassenen Angiogeneseinhibitor Avastin[®] zeigten, dass es mit dem zur Verfügung stehenden Modell möglich ist, eine Inhibition der tumorversorgenden Gefäße darzustellen [209]

Für unsere Untersuchungen wurde der Wirkstoff Bestatin in drei verschiedenen Konzentrationen jeweils auf den Tumor der CAM aufgebracht und damit der Tumor selbst und die umliegenden einwachsenden Gefäße penetriert. Anschließend erfolgte eine optische Auswertung der Gefäßreaktion über 6 Tage im Vergleich zu einem PBS behandelten CAM-Tumor. Dargestellt sind die Ergebnisse der höchsten Bestatinkonzentration (6 mM), welche repräsentativ für die Ergebnisse aller drei verwendeten Bestatinkonzentrationen sind.



Bestatin, direkt nach Auftragung



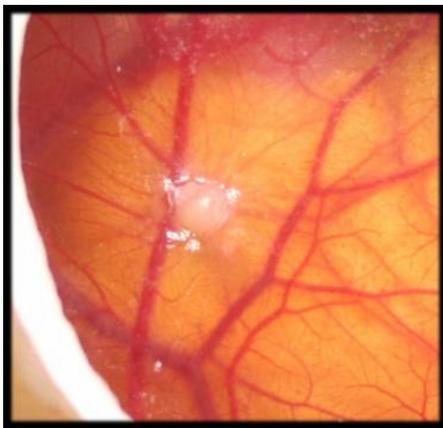
PBS, direkt nach Auftragung



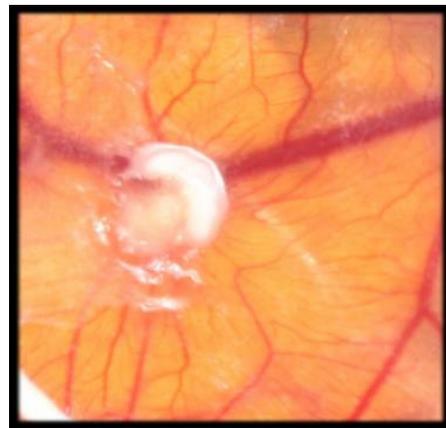
Bestatin, nach 1 Tag



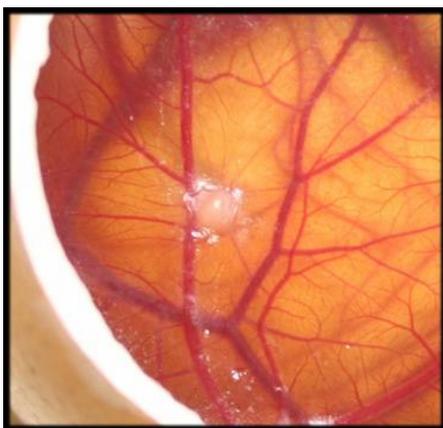
PBS, nach 1 Tag



Bestatin, nach 2 tagen



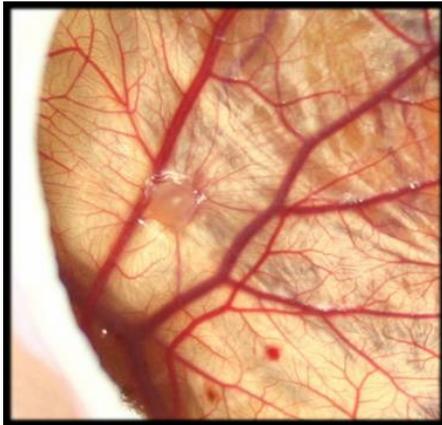
PBS, nach 2 Tagen



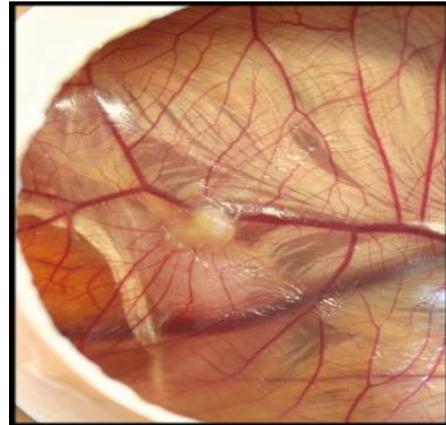
Bestatin, nach 3 Tagen



PBS, nach 3 Tagen



Bestatin, nach 6 Tagen



PBS, nach 6 Tagen

Abb.4-37: Vergleich der tumornahen CAM Gefäße nach Behandlung mit Bestatin und vergleichend mit PBS-Behandlung

Es zeigte sich an allen beobachteten Tagen und mit allen drei verwendeten Konzentrationen keine Reaktion der tumorversorgenden Gefäße auf Bestatin. Dabei ist die Beurteilung der Gefäße nicht immer einfach, da auch mit zunehmendem Beobachtungstag leichte biologische Veränderungen der CAM zu verzeichnen sind, welche durch Vergleich mit der PBS behandelten CAM relativiert werden mussten. Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu bereits beschriebenen positiven Einflüssen von Bestatin auf die Hemmung der Angiogenese an der CAM der Arbeitsgruppe von Pasqualini [129]. Eine mögliche Erklärung für diese Gegensätze besteht in der unterschiedlichen Induktion der beobachteten Gefäße. Während die von Pasqualini beobachteten Gefäße durch Stimulation nach Auftragen eines exogenen Wachstumsfaktors (bFGF) induziert wurden, sind die von uns beobachteten Gefäße das Ergebnis einer komplexen tumorinduzierten Reaktion. Damit kommt unser CAM-Modell den natürlichen Gegebenheiten der Angiogenese bei Krebserkrankungen wesentlich näher. Aus den damit erhaltenen Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass eine Inhibition der APN durch Bestatin ohne Einfluss auf Angiogeneseprozesse bleibt. Gestützt wird diese Hypothese durch neuere Untersuchungen einer japanischen Forschergruppe, die nach *in vitro* Studien postuliert, dass eine alleinige Inhibierung der enzymatischen Aktivität von APN (wie durch WM-15-Ab oder Bestatin) nicht ausreicht, um die multiplen Schritte der angiogenetischen Morphogenese zu unterbrechen [210]. Die vorliegende Zulassung von Bestatin (Ubenimex[®]) in der Krebstherapie aufgrund von *in vivo* Studien, die eine Wachstumshemmung von Tumoren zeigen, scheinen nach unseren Erkenntnissen ihre

Ursache nicht in einer Wirkung von Bestatin auf die Amino-peptidasen zu haben. Es gibt aber Forschungsansätze, die eine immunmodulatorische Funktion von Bestatin oder auch eine direkte Beeinflussung von APN-positiven Krebszellen [211,212] diskutieren

Des Weiteren ist zu bemerken, dass die extraembryonale Membran des Huhns auch nur ein Modell im Vergleich zu den komplexen Vorgängen bei der Tumorangiogenese im menschlichen Körper darstellt und damit massive Unterschiede zu den physiologischen Verhältnissen im Menschen bzw. Säugetier existieren.

Trotzdem stellt das CAM-Tumor-Modell ein wichtiges Instrument zur Beobachtung von angiogenetischen Vorgängen dar. Mit diesem ist es gelungen zu zeigen, dass in Übereinstimmung mit den *in vitro* Versuchen sich die APN zur Targetierung mit funktionalisierten Liposomen eignet. Eine funktionelle Nutzung der APN durch ihre Hemmung mittels etablierter Inhibitoren konnte bisher nicht beobachtet werden.

Unter diesen Voraussetzungen zeigte sich das Potential APN-gerichteter Liposomen als Arzneistoffvehikel zum zielgerichteten Transport von Arzneistoffen in das angiogenetisch aktive Gefäßsystem. Weitere bestätigende Untersuchungen im Säugetierorganismus stehen aus.

Die Angiogenesehemmung mittels inhibitorischer Beeinflussung der APN war aus dem CAM-Tumor-Assay nicht ableitbar und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

4.7. In vivo Targetinguntersuchungen mittels Tritium markierter Liposomen

Die vorausgegangenen Targetingversuche am *in vitro* Endothelzellmodell bzw. am *in vivo* nahen Tumormodell im lebenden Hühnerei zeigten eine Anreicherung von CNGRC-Liposomen am tumornahen Endothel. Auf der anderen Seite stellen sie Modelle dar, die nur einen begrenzten Teil des vielschichtigen Angiogeneseprozesses abbilden. Vor dem Hintergrund einer angestrebten therapeutischen Anwendung im Organismus sollte deshalb auch eine Anreicherung am Tumor *in vivo* erreicht werden. Erste *in vivo* Mausversuche mit CNGRC-Liposomen in tumortragenden Mäusen und Detektion durch PET konnten dabei keinen Beweis liefern. Nachteil dieses Versuches war aber das begrenzte Zeitfenster von 4 Stunden, da es Hinweise gibt, dass eine längere Zirkulationszeit zur Anreicherung am Tumor notwendig ist [156].

Deshalb erfolgte im nächsten Schritt ein *in vivo* Versuch mit tumortragenden Mäusen, bei dem es möglich war, die Anreicherung von radioaktiv markierten Liposomen in den verschiedenen Organen der Maus nach verschiedenen Zirkulationszeiten der Liposomen von bis zu 24 Stunden zu bestimmen. Dazu wurden die Liposomen mit einem Tritium markierten Cholesterol-Label versehen. Tritium ist instabil und zerfällt mit einer Halbwertszeit von 12,32 Jahren durch Emission eines Elektrons. Die dabei abgesendete Beta-Strahlung ist nicht intensiv, durchdringt kein Glas, was eine einfache und sehr sichere Handhabung erlaubt. Die Bestimmung der Intensität der Radioaktivität durch Szintillationsmessung stellt eine empfindliche, praktikable und reproduzierbare Methode dar [213,214]. Um sicher zu stellen, dass die Liposomen nicht innerhalb kürzester Zeit durch das retikuloendotheliale System eliminiert werden, wurde die Lipidzusammensetzung analog der *in vitro* Versuche gewählt. Der damit enthaltene Cholesterolanteil von 30 mol% bedingt eine hohe Packungsdichte der Liposomenmembran, vermindert die Wechselwirkungen mit Lipoproteinen (v.a HDL) und soll die Serumstabilität erhöhen [57, 215]. Des Weiteren sollten die enthaltenen 2 mol% PEG-PE zu ausreichend langen Zirkulationszeiten führen [216]. Da im Allgemeinen kleinere Liposomen (<150 nm) im Vergleich zu größeren erhöhte Bluthalbwertszeiten aufweisen [217], wurden im Experiment Vesikel mit einem Durchmesser unter 150 nm verwendet. Um sicher zu gehen, dass die verwendeten Liposomenpopulationen nach systemischer Applikation auch über einen längeren Zeitraum stabil bleiben, erfolgte ein Vorversuch zur Serumstabilität. Dazu wurden die Liposomen mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und über 24 Stunden bei 37°C in Vollserum inkubiert und die Abgabe des Farbstoffs als Maß für die Durchlässigkeit und damit Stabilität der Vesikelmembran ausgewertet.

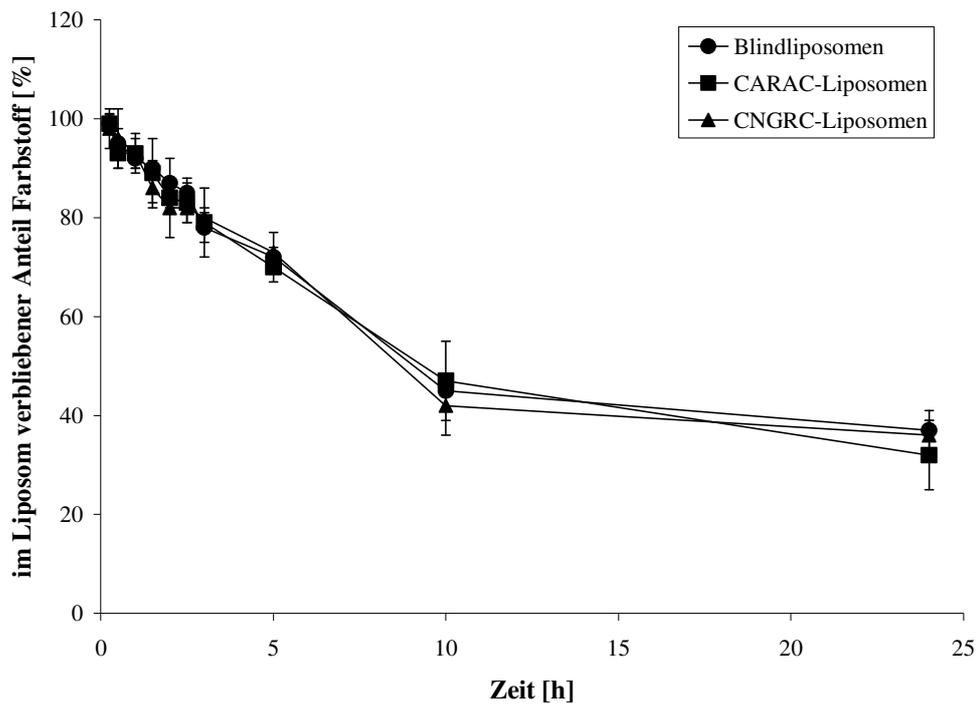


Abb.4-38: Stabilitätsuntersuchung der *in vivo* verwendeten Vesikelpopulationen in humanem Vollserum über 24 Stunden bei 37°C

Das Diagramm 4-38 zeigt, wie erwartet, eine stetige, aber langsame Abnahme der Stabilität der Liposomen, so dass selbst nach 24 Stunden noch ca. 35 % der Liposomen intakt waren. Eine Abschirmung der Liposomen gegen Serumproteine für die Dauer der Zirkulationszeit ist in vertretbarer Menge gelungen.

Zur Entwicklung der Tumoren wurde die Brustkrebszelllinie MT-3 verwendet, welche selbst keine APN exprimiert (getestet mittels Durchflusszytometrie durch Dr. Riemann, MLU Halle, nicht gezeigt). 13 Tage nach Inokulation der Krebszellen und der Entwicklung von fühlbaren Tumoren erfolgte die intravenöse Injektion von CNGRC-Liposomen, CARAC-Liposomen und unfunktionalisierten Liposomen in die Schwanzvene der Maus. Die Verweildauer der Liposomen im Blut wurde überprüft, indem zu verschiedenen Zeitpunkten retrobulbär Blut entnommen und die Radioaktivität bestimmt wurde. Die Bluteliminationskurven in Abb. 4-39 zeigen einen grundsätzlich gleichen Verlauf für alle drei Liposomenpopulationen. Dies belegt, dass die Blutelimination durch die im Liposom inkorporierten Peptide nicht beeinflusst wird, also ein schwaches immunogenes Potential aufweist.

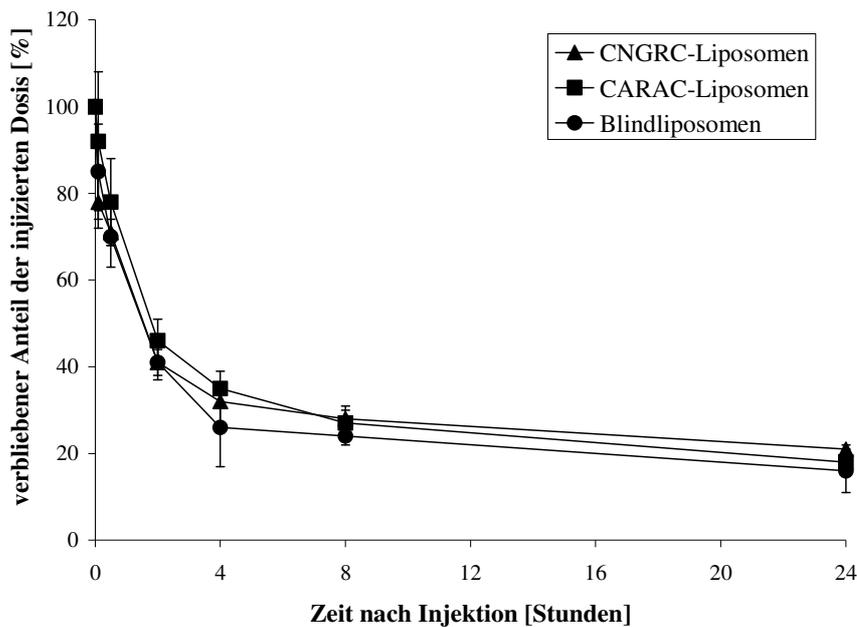


Abb.4-39: Bluteliminationskurve der einzelnen Liposomenfraktionen über 24 Stunden

Nach 4 Stunden wurden die ersten Gruppen der Versuchstiere getötet und die Verteilung der Liposomen in Leber, Milz, Niere, Lunge und Tumor mittels Szintillationsmessung ermittelt. Dabei zeigte sich nach vier Stunden, wie auch schon im vorangegangenen Versuch mit Detektion durch PET eine starke Anreicherung der Liposomen in der Milz. Dieser Fakt erscheint logisch vor dem Hintergrund, dass dieses Organ eine hohe Makrophagenaktivität besitzt. Im Tumor konnte eine bevorzugte Anreicherung von CNGRC-funktionalisierten Liposomen im Vergleich zu den unspezifisch funktionalisierten Liposomen bzw. den Blindliposomen nach vier Stunden nicht ermittelt werden.

24 Stunden nach Injektion mit den Liposomen wurde die zweite Gruppe der Mäuse getötet und die o.g. Organe entnommen. Es zeigte sich hier eine deutlich höhere Anreicherung des radioaktiven Labels im Tumor bei den Mäusen, denen die CNGRC-Liposomen injiziert wurden.

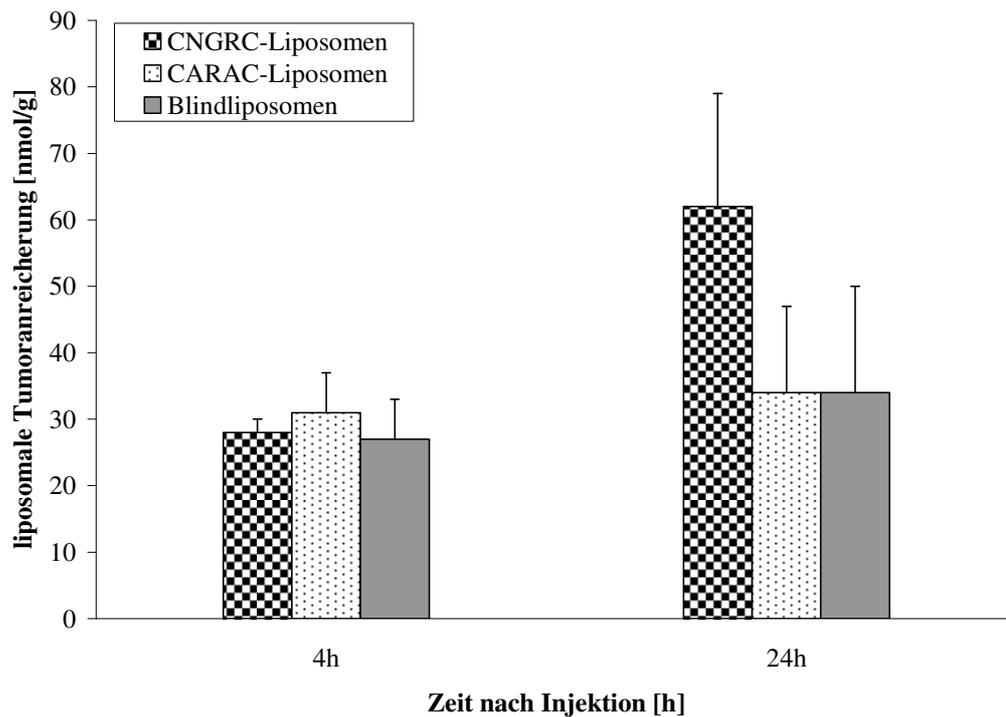


Abb.4-40: Anreicherung der einzelnen Vesikelpopulationen im Tumor 4 und 24 Stunden nach Injektion

Der Anteil der CNGRC-Liposomen im Tumor je Gramm Gewebe war 1,8 fach höher, als der Anteil von CARAC-Liposomen bzw. der Blindliposomen im Tumor. Dies zeigt, dass es prinzipiell möglich ist durch gezielte Funktionalisierung der Liposomen mit CNGRC eine relativ erhöhte Anreicherung am Tumor zu erreichen. Tumorakkumulation aufgrund passiver Extravasation durch den EPR-Effektes ohne Beteiligung einer Bindung von CNGRC an APN findet mit Sicherheit statt, wird aber relativiert durch Abgleich mit der Akkumulation von unspezifisch mit CARAC funktionalisierten bzw. unfunktionalisierten Liposomen. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation über das Tumorendothel erfolgt ist, da eine direkte Bindung von den Liposomen an das Tumorgewebe durch dessen fehlende APN Expression relativ sicher ausgeschlossen werden kann.

Obwohl eine vermehrte Anreicherung der spezifischen Liposomen erst nach 24 Stunden nicht den idealen theoretischen Vorstellungen eines vaskulären Targeting entspricht, kann auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ponzoni et al. [156] davon ausgegangen werden, dass die Vorteile der spezifischen CNGRC Liposomen am Endothel auf ein vaskuläres Targeting zurückzuführen sind.

Die Verteilung der Liposomen in den anderen entnommenen Organen wird in der Abb. 4-40 gezeigt.

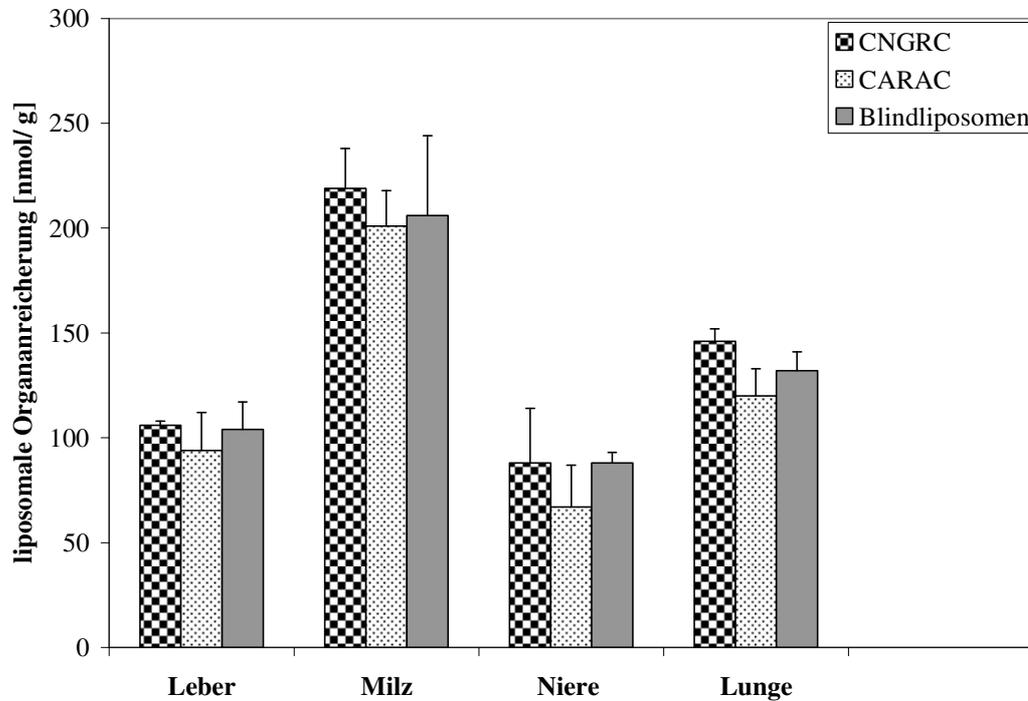


Abb.4-41: Verteilung der ^3H -markierten Liposomen nach 24 Stunden in den einzelnen Organen

Dabei fällt auf, dass ein Großteil der Liposomen von der Milz aufgenommen wird, wobei kein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Liposomenpopulationen festgestellt werden konnte. Andere Arbeitsgruppen, wie z.B. Schiffelers et al. [121] stellten bei Peptid (RGD)-funktionalisierten Liposomen auch hohe Aufnahmen in die Milz fest, dabei aber verstärkt durch die zielgerichteten Liposomen. Erklärt wurde dieser Effekt durch Integrinexpression auf den Monozyten der Milz [218]. Auch Pastorino et al. stellten eine verstärkte Aufnahme in die Milz der mit linearem NGR funktionalisierten Liposomen fest [156]. Die Milz hat neben ihren Filtereigenschaften wichtige Aufgaben als Organ des Immunsystems und produziert bis zu 30 % der Makrophagen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Immunogenität der von uns präparierten zielgerichteten CNGRC-haltigen Liposomen gegenüber anderen Liposomen relativ gering ist. Unterstützt wird diese These von einer Untersuchung über die Immunogenität von zyklischem CNGRC bzw. linearem GNGRG in Mäusen und Hasen [219]. Diese hat gezeigt, dass NGR in beiden Formen, sowohl in zyklischer als auch in linearer eine

geringe Immunogenität haben. Begründet wurde dies mit der strukturellen Ähnlichkeit von CNGRC und GNGRG mit einem Teilstück („Loop“) von Fibronectin, welches ubiquitär im Körper vorkommt. Weitere deutliche Aufnahmen der Liposomen erfolgten in die Leber, die Niere und die Lunge.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es uns gelungen ist, auch *in vivo* nachzuweisen, dass zielgerichtete CNGRC-Liposomen sich bevorzugt im Tumor anreichern. Dabei gehen wir davon aus, dass diese Akkumulation über Bindung der Liposomen am angiogenetisch aktiven Endothel des Tumors vermittelt wurde, da die Tumorzellen selbst APN negativ sind. Auffällig sind die relativ identischen Bluteliminationskurven und die ähnliche Anreicherung in der Milz, was für ein geringes immunogenes Potential spricht. Allerdings kann dies aufgrund der geringen Versuchsanzahl und der Einmalapplikation nicht endgültig postuliert werden. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass PEG-haltige Immunoliposomen nach Mehrfachapplikation ein zunehmend erhöhtes immunogenes Potential zeigen und dann nur noch geringe Zirkulationszeiten aufweisen [220]. Dennoch geben unsere Untersuchungen den Beweis der bestehenden Möglichkeit, angiogenetisch aktives Endothel mittels funktionalisierter Liposomen zu erreichen. Weitere Untersuchungen mit wirkstoffhaltigen Liposomen müssten erfolgen, um zu zeigen, dass das Prinzip der Targetierung des angiogenetisch aktiven Endothels schließlich auch zur Reduktion des Tumorwachstums und zur Verlängerung der Überlebenszeit führt.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Eignung von vaskulärer Aminopeptidase N als Zielstruktur zur Anreicherung von Liposomen am tumornahen Gefäßendothel. Dieses Prinzip sollte perspektivisch als Strategie zum Erreichen der neu gebildeten tumorversorgenden Blutgefäße genutzt werden und damit im Erfolgsfall durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen eine Eindämmung des Tumorwachstums zu erreichen. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit angiogenetische Vorgänge durch Inhibierung der Aminopeptidase N selbst beeinflusst werden können.

Eine Targetierung von vaskulärer APN bietet sich aufgrund deren Überexprimierung auf dem Tumorendothel an und hat Vorteile gegenüber der traditionellen Tumorthherapie aufgrund der leichten Erreichbarkeit und der direkt versorgenden Funktion der Blutgefäße für den Tumor.

Im ersten Abschnitt der Arbeit stand die Präparation zielgerichteter Liposomen durch Funktionalisierung mit dem Peptid CNGRC, welches eine Bindungsaffinität zu APN hat. Dabei koppelten wir das CNGRC-Peptid separat an seinen Lipidanker. Diese präformierten Lipopeptide konnten dann ohne weitere Aktivierungsschritte bei der Herstellung mit den restlichen liposomalen Bestandteilen gemischt werden. Dies bietet den Vorteil, im Vergleich zur Kopplung von Liganden an bestehende Liposomen, dass der Einbau in die Liposomen definiert und schnell erfolgen kann, keine zusätzlichen Kopplungslipide und Aktivierungsreagenzien benutzt werden müssen, die evtl. die Eigenschaften der anderen Lipide verändern. Ein besonderer Vorteil besteht darin, dass die funktionellen Gruppen des CNGRC Peptides nicht durch unspezifische Bindungsvorgänge blockiert werden. Ein gleichmäßiger Einbau konnte durch Nachweis des CNGRC-Peptides am Liposom gezeigt werden.

Anschließend wurde die spezifische Anreicherung der Liposomen *in vitro* an aktivierte Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) untersucht. Die spezifisch mit CNGRC funktionalisierten Liposomen zeigten dabei unter verschiedenen Versuchsbedingungen ein deutlich höheres Bindungsausmaß als die unspezifischen bzw. unfunktionalisierten Liposomen. Da eine Aufnahme in das Zellinnere vor dem Aspekt einer antiangiogenen Therapie mittels zytotoxischer Agenzien erst zum therapeutischen Erfolg führt, stand im nächsten Schritt die Untersuchung der Internalisierung der Liposomen im Vordergrund. Dabei zeigten die spezifisch über APN gebundenen CNGRC-Liposomen das höchste Internalisierungsvermögen, bei dem die nachfolgend durchgeführten qualitativen

Untersuchungen auf eine rezeptorvermittelte endozytische Aufnahme in das Endothelzellinnere hinweisen.

Neben dem perspektivischen Therapieansatz der Angiogenesehemmung durch zytotoxische Substanzen, sind wir der Frage nachgegangen, ob eine Hemmung der APN durch den Inhibitor Bestatin eine Angiogenesehemmung zur Folge hat. In dem dafür von uns genutzten etablierten *in vitro* Kollagen-Matrix-Modell konnte kein hemmender Einfluss von Bestatin auf die Neubildung von Gefäßen in Form verminderter Bildung von kapillären Strukturen festgestellt werden. Dies bestätigte die aus der Literatur bekannten inhomogenen Ergebnisse von *in vitro* Angiogenesemodellen zum Einfluss von Bestatin auf angiogenetische Vorgänge. Aufgrund der Grenzen, die *in vitro* Modelle bei der Untersuchung von komplexen Angiogenesevorgängen haben, wurden alle weiteren Versuche auf *in vivo* bzw. *in vivo* nahe Modelle ausgeweitet.

Bei ersten *in vivo* Targetinguntersuchungen an tumortragenden Mäusen und der Detektion mittels PET konnte keine bevorzugte Anreicherung der spezifisch funktionalisierten CNGRC-Liposomen festgestellt werden. Da eine Ausweitung der Versuchsparameter, z.B. eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums nicht möglich war, gingen wir zu anderen Methoden über.

Weitere *in vivo* nahe Versuche führten wir mittels des dynamischen Modells der Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnereis durch, welches zusätzlich mit einem Krebszellkonglomerat generiert wurde und so eine empfindliche und vergleichsweise preiswerte Methode zur Untersuchung der Tumorangiogenese darstellt. Durch Injektion von funktionalisierten und unfunktionalisierten Liposomen in das Blutgefäßsystem der Chorionallantoismembran bestätigten diese Untersuchungen zum ersten Mal unter *in vivo* nahen Blutflussbedingungen, dass spezifisch funktionalisierte CNGRC-Liposomen stärker am tumornahen Endothel akkumulieren als die Referenzliposomen. Dies legt den Grundstein zur perspektivischen gezielten Angiogenesehemmung mit Zytostatika beladenen Liposomen. Weitergehende Untersuchungen zur Beeinflussung der Angiogenese durch Inhibierung der APN mit dem Hemmstoff Bestatin zeigten auch in diesem *in vivo* nahen Modell, wie schon *in vitro*, keinerlei Einfluss auf die tumorinduzierten Gefäße. Deshalb wurde der Aspekt einer Angiogenesehemmung durch funktionelle Beeinflussung der APN jetzt nicht weiter verfolgt.

Im letzten Abschnitt konnte ein zusätzlicher *in vivo* Versuch die positiven Targetierungsergebnisse aus dem Hühnerei-Modell vor dem Hintergrund einer späteren therapeutischen Anwendung im komplexen menschlichen Organismus bestätigen. Die

spezifisch mit dem CNGRC-Liganden funktionalisierten Liposomen zeigten einen Vorteil bei der Anreicherung am Tumor nach 24 Stunden im Versuch mit tumortragenden Nacktmäusen. Die Liposomen zeigen ausreichend lange Blutzirkulationszeiten und eine geringe Immunogenität. Weitergehende *in vivo* Versuche mit Zytostatika beladenen Liposomen sind notwendig, um festzustellen, ob die erfolgreiche Targetierung auch zu einer Tumorregression bzw. zu einem Überlebensvorteil führen kann.

Prinzipiell zeigt unsere Arbeit, dass die Idee, mit CNGRC-Peptiden funktionalisierte Liposomen zum APN überexprimierenden Tumorendothel zu transportieren, umsetzbar ist. Verschiedenste Methoden wurden dafür verwendet und ihre Eignung zur Untersuchung der Tumorangiogenese unterschiedlich bewertet. Damit ist die Voraussetzung zur gezielten Beeinflussung der tumorversorgenden Gefäße unter Umgehung der oft limitierenden Parameter in der klassischen Tumortherapie geschaffen. Diese Erkenntnisse stellen natürlich keinen Endpunkt dar. Denkbare Verbesserungen sind eine Optimierung der Bindungseigenschaften, so z.B. durch Variation des Abstandes von CNGRC von der Liposomenoberfläche (Spacer). Eine effektive Verkapselung von zytostatischen Wirkstoffen und Beurteilung der Freigabe an den angiogenetisch aktiven Zielzellen evtl. auch durch targetsensitive oder pH-sensitive Lipidzusammensetzung sind Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen. *In vivo* Versuche zum Einfluss dieser Liposomen auf das Tumorstadium sowie Beurteilung der Pharmakokinetik nach Mehrfachapplikation sollten folgen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Fachinformation Avastin®, Stand August 2007
- [2] Pharmazeutische Zeitung 39 (2005)
- [3] Lasic,D.D.: Liposomes: From Physics to applications. Elsevier Science Publishers (1993)
- [4] Folkman,J.: Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*9 (1990),171-174
- [5] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem RKI: Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends. 5 (2006)
- [6] Wolf,J.:Krebserkrankungen:wenig Hoffnung für Tumorpatienten. *Deutsche Apotheker Zeitung* 16 (2000),64-66
- [7] Fachinformation Herceptin® 150mg, Stand April 2007
- [8] Fachinformation Tarceva® Filmtabletten, Stand Juli 2007
- [9] Fachinformation Erbitux®, Stand Februar 2007
- [10] Fachinformation Mab Thera®, Stand September 2007
- [11] Fachinformation MabCampath®, Stand Juli 2006
- [12] Folkman,J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.* 285 (1971),1182-1186
- [13] Finger,R.P., Fleckenstein, M., Scholl,H.P.N., Holz,F.G.: Pathophysiologie und Therapie der AMD. *Pharmazie in unserer Zeit* 36 (2007),424-430
- [14] Auerbach,W., Auerbach,R.: Angiogenesis inhibition:a review. *Pharmacol Ther.* 63 (1994),265-311
- [15] Folkman,J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* 1 (1995),27-31
- [16] Folkman,J.: What ist the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 23(1987),261-363
- [17] Kato,T., Kameoka,S., Kimura,T., Nishikawa,T., Kasajima,T.: Angiogenesis and blood vessel invasion as prognostic indicators for node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 65 (2001), 203-215
- [18] Weidner,N., Semple,J.P., Welch,W.R., Folman,J.: Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 324 (1991),1-8

- [19] Bossi,P., Viale,G., Lee,A.K., Alfano,R., Coggi,G., Bosari,S.: Angiogenesis in colorectal tumors:microvessel quantitation and adenomas and carcinomas with clinicopathological correlation. *Cancer Res.* 55 (1995),5049-53
- [20] Hanahan,D., Folkman,J.: Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 (1996),353-64
- [21] Mohan,C., Thomas,K.: *Angiogenesis:Role in Tumor Growth and Metastasis.* EMD Biosciences,Inc.
- [22] Papetti,M., Herman,I.M.: Mechanism of normal and tumor derived angiogenesis. *Am.J.Physiol.Cell* (2002),C947-C970
- [23] Ferrara,N., Hillan,K.J., Gerber,H.P., Novotny,W.: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews* 3 (2004),391-400
- [24] Bradley,G., Juranka,P.F., Ling,V.: Mechanism of multidrug resistance. *Biochim.Biophys.Acta* (1988),87-128
- [25] Bosslet,K., Straub,R., Blumrich,M., Czech,J., Gerken,M., Sperker,B., Kroemer,H.K., Gesson,J.P., Koch,M., Monneret,C.: Elucidation of mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res.*58 (1998),1195-1201
- [26] Boehm,T., Folkman,J., Browder,T., O`Reilly,M.S.: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390 (1997),404-407
- [27] Jain,R.K.: Transport of molecules in the tumor interstitium:a review. *Cancer Res.*47 (1987),3039-3051
- [28] Folli,S., Pelegin,A., Chalandon,Y., Yao,X., Buchegger,F., Lienard,D., Lejeune,F., Mach,J.P.: Tumor-necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability. *Int.J.Cancer* 53 (1993),829-836
- [29] Burrows,F.J., Thorpe,P.E.: Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin.Cancer Res.* 10 (2004),415-427
- [30] Denekamp,J.: Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br.J.Radiol.*66 (1993),181-196
- [31] Fachinformation Glivec Filmtabletten, Stand April 2007
- [32] Fachinformation Tasigna®, Stand November 2007
- [33] Fachinformation Sprycel® Filmtabletten, Stand August 2007

- [34] Fachinformation Sutent® 12,5/25/50mg Hartkapseln, Stand Januar 2007
- [35] Fachinformation Tarceva® Filmtabletten, Stand Juli 2007
- [36] Wilhelm,S., Carter,C., Lynch,M., et al.: Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat.Rev.Drug Discov.*5 (2006),835-844
- [37] Fachinformation Avastin®, Stand Dezember 2007
- [38] Klein,R., Klein,B.E., Tomany,S.C., Meuer,S.M., Huang,G.H.: Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy:The Beaver Dam eye study. *Ophthalmol.*109 (2002),1767-1779
- [39] Ambati,J., Ambati,B.K., Yoo,S.H., Ianchulev,S., Adamis,A.P.: Age-related macula degeneration:etiology, pathogenesis and therapeutical strategies. *Surv.Ophthalmol.*48 (2003),257-293
- [40] Rosenfeld,P.J., et al.: Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration (MARINA-Study Group). *N.Engl.J.Med.*355 (2006),1419-1431
- [41] Brown,D.M., et al.: Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration (ANCHOR-Study Group). *N.Engl.J.Med.*355 (2006),1432-1444
- [42] Jain,R.K.: Normalization of tumor vasculature:an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307 (2005),58-62
- [43] Brooks,P.C., Montgomery,A.M., Rosenfeld,M., Reisfeld,R.A., Hu,T., Klier,G., Cheresh,D.A.: Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79 (1994),1157-1167
- [44] Brooks,P.C., Clark,R.A., Cheresh,D.A.: Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264 (1994),569-571
- [45] Brown,L.F., Berse,B., Jackman,R.W., Tognazzi,K., Manseau,E.J., Senger,D.R., Dvorak,H.F.: Expression of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.*53 (1993),4727-4735
- [46] Wickham,T.J., Haskard,D., Segal,D., Kovesdi,I.: Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunol.Immunother.*45 (1997),149-151
- [47] Dienst,A., Grunow,A., Unruh,M., Rabausch,B., Nör,J.E., Fries,J.W., Gottstein,C.: Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1-targeted recombinant fusion proteins. *J Natl Cancer Inst.*97 (2005),733-743

- [48] Hu,P., Sharifi,J., Bai,T., Khawli,L.A., Epstein,A.L.: Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis. *Cancer Res.*63 (2003),5046-5053
- [49] Arap,W., Pasqualini,R., Ruoslahti,E.: Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279 (1998),377-380
- [50] Ellerby,H.M., Arap,W., Ellerby,L.M., Kain,R., Andrusiak,R., del Rio,G., Krajewski,S., Lombardo,C.R., Rao,R., Ruoslahti,E., Bredesen,D.E., Pasqualini,R.: Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Med.*5 (1999),1032-1038
- [51] Borsi,L., Balza,E., Carnemolla,B., Sassi,F., Castellani,P., Berndt,A., Kosmehl,H., Biro,A., Siri,A., Orecchia,P., Grassi,J., Neri,D., Zardi,L.: Selective targeted delivery of TNF α to tumor blood vessels. *Blood* 102 (2003),4384-4392
- [52] Olson,T.A., Mohanraj,D., Roy,S., Ramakrishnan,S.: Targeting tumor vasculature:Inhibition of tumor growth by vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int.J.Cancer* 73 (1997),865-870
- [53] Willis,E., Forssen,E.: Ligand targeted liposomes. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 29 (1998),249-271
- [54] Jovic,G., Bugarski,D., Kataranovski,M., Stojanovic,N., Petakov,M., Mojovic,L., Bugarski,B.: The *in vivo* effect of liposomes on hematopoiesis. *Drug Dev. Ind.Pharm.*25 (1999),517-521
- [55] Senior,J.H.: Fate and behaviour of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors. *Crit.Ther.Drug Carrier Syst.*3 (1987),123-193
- [56] Scherphof,G., Roerdink,F., Waite,M., Parks,J.: Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interactions with high density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 542 (1978),296-303
- [57] Kirby,C., Clarke,J., Gregoriadis,G.: Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*. *Biochem.J.*186 (1980),591-597
- [58] Senior,J., Gregoriadis,G.: Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipids and cholesterol components. *Life Sci.*30 (1982),2123-2136

- [59] Huang,K.J., Luke,K:F:S:, Baumier,P.L.: Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes:a kinetic study. Proc.Natl.Acad.Sci.77 (1980),4030-4034
- [60] Gregordiadis,G., Neerunjun,T.: Homing of liposomes to target cells. Biochem.Biophys.Res.Commun.65 (1975),537-544
- [61] Lesermann,L.D., Barbet,J., Kourilski,F., Weinstein,J.N.: Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. Nature 288 (1980),602-604
- [62] Heat,T.D., Fraley,R.T., Papahadjopoulos,D.: Antibody targeting of liposomes: cell specificity obtained by conjugation of F(ab)₂ to vesicle surface. Science 210 (1980),8015-8018
- [63] Matthey,K.K., Heath,T.D., Badger,C.C., Bernstein,I.D., Papahadjopoulos,D.: Antibody directed liposomes: comparison of various ligands for association, endocytosis and drug delivery. Cancer Res.46 (1986),4904-4910
- [64] Abra,R.M., Hunt,C.A.:Liposome Distribution *in vivo*: Dose and vehicle size effects. Biochim.Biophys.Acta 666 (1981),493-501
- [65] Patel,K.P., Li,M.P., Baldeschweiler,J.D.: Suppression of liver uptake of liposomes by dextran-sulfate 500. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80 (1983),6518-6522
- [66] Klibanov,A.L., Maruyama,K., Torchillin,V.P., Huang,L.: Amphipatic polyethylenglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. FEBS Lett.268 (1990),235-237
- [67] Blume,G., Cevc,G.: Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo*. Biochim.Biophys.Acta 1146 (1993),157-168
- [68] Allen,T.M., Hansen,C.: Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. Biochim.Biophys.Acta 1068(1991),133-141
- [69] Torchillin,V.P., Omelyanenko,V.G., Papisov,M.I., Bogdanov,A.A.jr., Trubetskoy,V.S., Herron,J.N., Gentry,C.A.: Poly(ethylenglycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer coated liposome longevity. Biochim.Biophys.Acta 1195 (1994),11-20
- [70] Maruyama,K., Yuda,T., Okamoto,A., Ishikura,C., Kojima,S., Iwatsura,M.: Effect of molecular weight in amphipatic poly(ethyleneglycol) on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. Chem.Pharm.Bull.39 (1991),1620-1622

- [71] Allen,T.M., Hansen,C., Martin,F., Redemann,C., Yang-Young,A.: Liposomes containing synthetic derivates of poly(ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*. *Biochim.Biophys.Acta* 1066 (1991),29-36
- [72] Klibanov,A.L., Maruyama,K., Beckerleg,A.M., Torchillin,V.P., Huang,L.: Activity of amphipatic poly(ethyleneglycol) 5000 ti prolong the circulation time of liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 1062 (1991),142-148
- [73] Kenworthy,A.K., Simon,S.A., McIntosh,T.J.: Structure and phase bahaviour of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly(ethyleneglycol). *Biophys.J.* 68 (1995),1921-1936
- [74] Needham,D., McIntosh,T.J., Lasic,D.D.: Repulsive interactions and mechanical stability of polymer grafted lipid membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 1108 (1992),40-48
- [75] Woodle,M.C., Newman,M.S., Cohen,J.A.: Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J.Drug Targeting* 2 (1994),397-403
- [76] Dijkstra,J., van Galen,W.J.M., Scherphof,G.L.: Uptake and processing of liposomal phospholipids ba Kupffer cells *in vitro*. *Eur.J.Biochem.*148 (1985),391-397
- [77] Wu,N.Z., Da,D., Rudoll,T.L., Needham,D., Whorton,A.R., Dewhirst,M.W.: Increased microvascular permeability contibutes to preferential accumulation of Stealth liposomes in tumot tissue. *Cancer Res.*53 (1993),3765-3770
- [78] Vaage,J., Donovan,D., Wipff,E., Abra,R., Colbern,G., Uster,P., Working,P.: Therapy of xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposomes. *Int.J.Cancer* 80 (1999),134-137
- [79] Maeda,H., Wu,J., Matsuma,Y., Hori,K.: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J.Control.Release* 65 (2000),271-284
- [80] Maeda,H., Sawa,T., Konno,T.: Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANC. *J.Control.Release* 74 (2001),47-61
- [81] Woodle,M.C.: Controlling liposome blood clearance by surface grafted polymers. *Adv.Drug Deliv.Rev.*32 (1998),139-152

- [82] Metselaar, J.M., Bruin, P., de Boer, L.W., de Vringer, T., Snel, C., Oussoren, C., Wauben, M.H., Crommelin, D.J., Storm, G., Hennik, W.E.: A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long circulating liposomes with effective drug-targeting capacity. *Bioconjug.Chem.* 14 (2003), 1156-1164
- [83] Torchillin, V.P., Levchenko, T.S., Whiteman, K.R., Yaroslavov, A.A., Tsatsakis, A.M., Rizos, A.K., Michailova, E.V., Shtilman, M.I.: Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials* 22 (2001), 3035-3044
- [84] Klibanov, A.L., Maruyama, K., Beckerleg, A.M., Torchillin, V.P., Huang, L.: Activity of amphipatic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavourable for immunoliposome binding to target. *Biochim.Biophys.Acta* 1062 (1991), 142-148
- [85] Harasym, T.O., Tardi, P., Longman, S.A., Ansell, S.M., Bally, M.B., Cullis, P.R., Choi, L.S.: Poly(ethylene glycol)-modified phospholipids prevent aggregation during covalent conjugation of proteins to liposome. *Bioconjug.Chem.* 6 (1995), 187-194
- [86] Mori, A., Klibanov, A.L., Torchillin, V.P., Huang, L.: Influence of the steric barrier activity of amphipatic poly(ethylene glycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and the target binding of immunoliposomes *in vivo*. *FEBS Lett.* 284 (1991), 263-266
- [87] Pinnaduwa, P., Huang, L.: Stable target-sensitive immunoliposomes. *Biochemistry* 31 (1992), 2850-2855
- [88] Machy, P., Barbet, J., Leserman, L.D.: Differential endocytosis of T and B lymphocyte surface molecules evaluated with antibody-bearing fluorescent liposomes containing methotrexate. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79 (1982), 4148-4152
- [89] New, R.R., Chance, M.L., Thomas, S.C., Peters, W.: Antileishmanial activity of antimoiols entrapped in liposomes. *Nature* 272 (1978), 55-56
- [90] Collins, D., Litzinger, D.C., Huang, L.: Structural and functional comparison of pH-sensitive liposomes composed of phosphadidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim.Biophys.Acta* 1025 (1990), 234-242

- [91] Baban,D.F., Seymour,L.W.: Control of tumour vascular permeability. *Adv.drug deliv.Rev.*34 (1998),109-119
- [92] Petrak, K., Goddard,P.: Transport of macromolecules across the capillary walls. *Drug Deliv.Rev.*3 (1989),191-214
- [93] Hobbs,S.K., Monsky,W.L., Yuan,F., Roberts,W.G., Griffith,L., Torchillin,V.P., Jain,R.K.: Regulation of transport pathways in tumor vessels :role of tumor type and microenvironment. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95 (1998),4607-4612
- [94] Nagayasu,A., Uchiyama,K., Kiwada,H.: The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv.Drug Deliv.Rev.*40 (1999),75-87
- [95] Fachinformatio Caelyx® 2mg/ml, Stand Mai 2007
- [96] Mayer,L.D., Tai,L.C., Bally,M.B., Mitilenes,G.N., Ginsberg,R.S., Cullis,P.R.: Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochim.Biophys.Acta* 1025 (1990),143-151
- [97] Park,J.W., Kirpotin,D.B., Hong,K., Shalaby,R., Shao,Y., Nielsen,U.B., Marks,J.D., Papahadjopoulos,D., Benz,C.C.: Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J.Control.Release* 74 (2001),95-113
- [98] Yang,T., Choi,M.K., Cui,F.D., Lee,S.J., Chung,S.J., Shim,C.K., Kim,D.D.: Antitumor effect of Paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells. *Pharm.Res.*24 (2007),2402-2411
- [99] Raffaghello,L., Pagnan,G., Pastorino,F., Cosimo,E., Brignole,C., Marimpietri,D., Bogenmann,E., Ponzoni,M., Montaldo,P.G.: Immunoliposomal fenretinide: a novel antitumoral drug for human neuroblastoma. *Cancer Lett.*197 (2003),151-155
- [100] Mastrobattista,E., Crommelin,D.J., Wilschut,J., Storm,G.: Targeted liposomes for delivery of protein based drugs into cytoplasm of tumor cells. *J.Liposome Res.*12 (2002),57-65
- [101] Pan,X.Q., Wang,H., Lee,R.J.: Antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal doxorubicin in a KB oral carcinoma murine xenograft model. *Pharm.Res.*20 (2003),417-422
- [102] Ni,S., Stephenson,S.M., Lee,R.J.: Folate receptor targeted delivery of liposomal Daunorubicin into tumor cells. *Anticancer Res.*22 (2002),2131-2135

- [103] Lu, Y., Low, P.S.: Folate targeting of haptens to cancer cell surfaces mediates immunotherapy of syngeneic murine tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 51 (2002), 153-162
- [104] Hatakeyama, H., Akita, H., Maruyama, K., Sahara, T., Harashima, H.: Factors governing the *in vivo* tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes *in vivo*. *Int. J. Pharm.* 281 (2004), 25-33
- [105] Eavarone, D.A., Yu, X., Bellamkonda, R.V.: Targeted drug delivery to C6 glioma by transferrin-coupled liposomes. *J. Biomed. Mater. Res.* (2000), 10-4
- [106] Iinuma, H., Maruyama, K., Okinaga, K., Sasaki, K., Sekine, T., Ishida, O., Ogiwara, N., Johkura, K., Yonemura, Y.: Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int. J. Cancer* 99 (2002), 130-137
- [107] Xu, L., Huang, C.C., Huang, W., Tang, W.H., Rait, A., Yin, Y.Z., Cruz, I., Xiang, L.M., Pirollo, K.F., Chang, E.H.: Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002), 337-346
- [108] Lee, C.M., Tanaka, T., Murai, T., Kondo, M., Kimura, J., Su, W., Kitagawa, T., Ito, T., Matsuda, H., Miyasaka, M.: Novel chondroitin sulphate-binding cationic liposomes loaded with cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells *in vivo*. *Cancer Res.* 62 (2002), 4282-4288
- [109] Dagar, S., Krishnadas, A., Rubinstein, I., Blend, M.J., Onyuksel, H.: VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: *in vivo* studies. *J. Control. Release* 91 (2003), 123-133
- [110] Peer, D., Margalit, R.: Loading Mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increase its antitumor activity in three mice tumor models. *Int. J. Cancer* 108 (2004), 780-789
- [111] Mamot, C., Drummond, D.C., Noble, C.O., Kallab, V., Guo, Z., Hong, K., Kirpotin, D.B., Park, J.W.: Epidermal growth factor receptor targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs *in vivo*. *Cancer Res.* 65 (2005), 11631-11638
- [112] Curnis, F., Sacchi, A., Corti, A.: Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J. Clin. Invest.* 110 (2002), 433-435

- [113] Skipins,D.A., Cheresch,D.A., Kazemi,M.R., Nevin,L.M., Bednarski,M.D., Li,K.C.: Detection of tumor angiogenesis *in vitro* by alphavbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat.Med.* 4 (1998),623-626
- [114] Hood,J.D., Bednarski,M., Frausto, R., Guccione,S., Reisfeld,R.A., Xiang,R., Cheresch,D.A.: Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296 (2002),2404-2407
- [115] Allen,T.M.: Ligand targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat.Rev.Cancer* 2 (2002),750-763
- [116] Ruoslahti,E., Rajotte,D.: An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu.Rev.Immunol.*18 (2000),813-827
- [117] Oku,N., Asai,T., Watanabe,K., Kuromi,K., Nagatsuka,M., Kurohane,K., Kikkawa,H., Ogino,K., Tanaka,M., Ishikawa,D., Tsukada,H., Momose,M., Nakayama,J., Taki,T.: Anti-neovascular therapy using novel peptides homing angiogenic vessels. *Oncogene* 21 (2002),2662-2669
- [118] Asai,T., Shimizu,K., Kondo,M., Kuromi,K., Watanabe,K., Ogino,K., Taki,T., Shuto,S., Matsuda,A., Oku,N.: Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels. *FEBS Letters* 520 (2002),167-170
- [119] Maeda,N., Takeuchi,Y., Takada,M., Sadzuka,Y., Namba,Y., Oku,N.: Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J.Control.Release* 100 (2004),41-52
- [120] Volkel,T., Holig,P., Merdan,T., Muller,R., Kontermann,R.E.: Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105). *Biochim.Biophys.Acta* 1663 (2004),158-166
- [121] Schiffelers,R.M., Koning,G.A., ten Hagen,T.L., Fens,M.H., Schraa,A.J., Janssen,A.P., Kok,R.J., Molema,G., Storm,G.: Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J.Control.Release* 91 (2003),115-122
- [122] Kondo,M., Asai,T., Katanasaka,Y., Sadzuka,Y., Tsukada,H., Ogino,K., Taki,T., Baba,K., Oku,N.: Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Int.J.Cancer* 108 (2004),301-306
- [123] Hatakeyama,H., Akita,H., Ishida,E., Hashimoto,K., Aoki,T., Yasuda,J., Obata,K., Kikuchi,H., Ishida,T., Kiwada,H., Harashima,H.: Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody modified PEG liposomes. *Int.J.Pharm.*342 (2007),194-200

- [124] Landon,L., Deutscher, S.L.: Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display. *J.Cell.Biochem.*90 (2003),509-517
- [125] Arap,W., Pasqualini,R., Ruoslahti,E.: Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279 (1998),377-380
- [126] Xiong,X.B., Huang,Y., Lu,W.L., Zhang,H., Nagai,T., Zhang,Q.: Intacellular delivery of doxorubicin with RGD-modified sterically stabilized liposomes for an improved antitumor efficacy:*in vitro* and *in vivo*. *J.Pharm.Sci.*94 (2005), 1782-1793
- [127] Dubey,P.K., Mishra,V., Jain,S., Mahor,S., Vyas,S.P.: Lipoosomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. *J.Drug Target.*12 (2004),257-264
- [128] Hölig,P., Bach,M., Völkel,T., Nahde,T., Hoffmann,S., Müller,R., Kontermann,R.E.: Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells. *Protein Eng.Des.Sel.*17 (2004),433-441
- [129] Pasqualini,R., Koivunen,E., Kain,R., Lahdenranta,J., Sakamoto,M., Stryhn,A., Ashmun,R.A., Shapiro,L.H., Arap,W., Ruoslahti,E.: Aminopeptidase N is a receptor for tumor homing Peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60 (2000),722-727
- [130] Molema, G.: Design of vascular endothelium specific drug targeting strategies for the treatment of cancer. *Acta Biochim.Pol.*52 (2005),301-310
- [131] Riemann,D., Kehlen,A., Langner,J.: CD13-not just a marker in leukemia typing. *Immunol.Today* 20 (1999),83-88
- [132] Riemann,U.D.: Arbeiten zum Vorkommen und zur Regulation von Aminopeptidase N/CD 13 mit besonderer Berücksichtigung ihres Vorkommens auf Lymphozyten. Habilitationsschrift 2002, Med.Fakultät d.MLU Halle
- [133] Drexler,H.G.: Classification of acute myeloid leukemias-a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia* 1 (1987),697-705
- [134] Riemann,D., Schwachula,A., Hentschel,M., Langner,J.: Demonstration of CD13/Aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiology* 187 (1993),24-35
- [135] Flynn,F.V.: Assessment of renal function: selected developments. *Clin.Biochem.*23 (1990),49-54

- [136] vanHal,P.T.W., Hopstaken-Broos,J.P.M., Prins,A., Favalaro,E.J., Huijbens,R.J.F., Hilvering,C., Figdor,C.G., Hoogsteden,H.C.: Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4: Stimulation of human monocytes, macrophages and endothelial cells by IL-4 increases Aminopeptidase N activity
- [137] Fuji,H., Nakajima,M., Saiki,I., Yoneda,J., Azuma,I., Tsuruo,T.: Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidas N/CD13. *Clin.Exp.Metastasis* 13 (1995),337-344
- [138] Hashida,H., Takabayashi,A., Kanai,M., Adachi,M., Kondo,K., Kohno,N., Yamaoka,Y., Miyake,M.: Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 122 (2002),376-386
- [139] Menrad,A., Speicher,D., Wacker,J., Herlyn,M.: Biochemical and functional characterization of Aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.*53 (1993),1450-1455
- [140] Saiki,I., Fujii,H., Yoneda,J., Abe,F., Nakajima,M., Tsuruo,T., Azuma,I.: Role of aminopeptidas N (CD 13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int.J.Cancer* 54 (1993),137-143
- [141] Nakajima,M., Chop,A.M.: Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. *Semin.Cancer Biol.*2 (1991),115-127
- [142] van Hensbergen, Y., Broxterman,H.J., Hanemaaijer,R., Jorna,A.S., vanLent, N.A., Verheul,H.M.W., Pinedo,H.M., Hoekman,K.: Soluble aminopeptidas N/CD13 in malignant and non malignant effusions and intratumoral fluid. *Clin.Cancer Res.*8 (2002),3747-3753
- [143] Bhagwat,S.V., Lahdenranta,J., Giordano,R., Arap.W., Pasqualini,R., Shapiro,L.H.: CD 13/APN is activated by angiogenic signals and essential for capillary tube formation. *Blood* 97 (2001),652-659
- [144] Curnis,F., Sacchi,A., Borgna,L., Magni,F., Gasparri,A., Corti,A.: Enhancement of tumor necrosis factor α antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nature Biotech.*18 (2000),1185-1190
- [145] Curnis,F., Arrigoni,G., Sacchi,A., Fischetti,L., Arap,W., Pasqualini,R., Corti,A.: Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD 13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.*62 (2002),867-874

- [146] Zhang,Z., Hatta,H., Tanabe,K., Nishimoto,S.: A new class of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine prodrugs conjugated with a tumor homing cyclic peptide CNGRC by ester linkers: synthesis, reactivity, and tumor-cell-selective cytotoxicity. *Pharm.Res.*22 (2005),381-389
- [147] Moffatt,S., Wiehle,S., Cristiano,R.J.: Tumor-specific gene delivery mediated by a novel peptide-polyethylenimine-DNA polyplex targeting Aminopeptidase N/CD13. *Human Gene Ther.*16 (2005),57-67
- [148] Yi,F.: Investigation of the binding of the CNGRC peptide to aminopeptidas N/CD13. Master Thesis, MLU Halle Wittenberg
- [149] Ruoslahti,E.: Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Cancer Biology* 10 (2000),435-442
- [150] Ellerby,M.H., Arap,W., Ellerby,L.M., Kain,R., Andrusiak,R., delRio,G., Krajewski,S., Lombardo,K.C., Rao,R., Ruoslahti,E., Bredesen,D.E., Pasqualini,R.: Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Medicine* 5 (1999),1032-1038
- [151] van Hensbergen,Y., Broxterman,H.J., Elderkamp,Y., Lankelma,J., Beers,J.C.C., Heijn,M., Boven,E., Hoekman,K., Pinedo,H.M.: A doxorubicin CNGRC-peptide conjugate with prodrug properties. *Biochem.Pharmacol.*63 (2002),897-908
- [152] Curnis,F., Sacchi,A., Corti,A.: Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J.Clin.Invest.* 110 (2002),475-482
- [153] Liu,L., Liu,L., Anderson,W.F., Beart,R.W., Gordon,E.M., Hall,F.L.: Incorporation of tumor vasculature targeting motifs into moloney murine leukaemia virus env escort proteins enhances retrovirus binding and transduction of human endothelial cells. *J. Virology* 74 (2000),5320-5328
- [154] Holle,L., Song,W., Hicks,L., Holle,E., Holmes,L., Wei,Y., Li,J., Wagner,T., Yu,X.: *In vitro* targeted killing of human endothelial cells by conicubation of human serum and NGR peptide conjugated human albumin protein bearing α (1-3) galactose epitopes. *Oncology Reports* 11 (2004),613-616
- [155] Yokoyama,Y., Ramakrishnan,S.: Addition of an aminopeptidase N-binding sequence to human endostatin improves inhibition of ovarian carcinoma growth. *Cancer* 104 (2005),321-331

- [156] Pastorino,F., Brignole,C., Marimpietri,D., Cilli,M., Gambini,C., Ribatti,D., Longhi,R., Allen,T.M., Corti,A., Ponzoni,M.: Vascular damage and angiogenic effects of tumor vessel targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res.* 63 (2003),7400-7409
- [157] Pastorino,F., Brignole,C., Di Paolo,D., Nico,B., Pezzolo,A., Marimpietri,D., Pagnan,G., Piccardi,F., Cilli,M., Longhi,R., Ribatti,D., Corti,A., Allen,T.M., Ponzoni,M.: Targeted liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vascular-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. *Cancer Res.* 66 (2006),10073-10082
- [158] Kessner,S.: Die Untersuchung des immunoliposomalen Targetings von Endothelzellen als Grundlage für eine neuartige antiinflammatorische Therapie. (2004), MLU Halle-Wittenberg
- [159] Mastrobattista,E., Storm,G., van Bloois,L, Reszka,R., Bloemen,P.G., Crommelin,D.J., Henricks,P.A.: Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1419 (1999),353-363
- [160] Weissig,V.: Methoden zur Darstellung funktionalisierter Liposomen mit Adjuvaneffekt. Habilitation (1991), MLU Halle-Wittenberg
- [161] Kim,M.H., Patel,D.V.: „BOP“ as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Letters* 35 (1994),5603-5606
- [162] You,W.W., Haugland,R.P., Ryan,D.K., Haugland,R.P.: 3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution. *Anal.Biochem.*244 (1997),277-282
- [163] Liu,J.P., Hsieh,Y.Z., Wiesler,D., Novotny,M.: Design of 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxyaldehyde as a reagent for ultrasensitive determination of primary amines by capillary electrophoresis using laser fluorescence detection. *Anal.Chem.*63 (1991),408-412
- [164] Bartlett,G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J.Biol.Chem.*234 (1959),466-468
- [165] Kessner,S., Krause,A., Rothe,U., Bendas,G.: Investigation of the cellular uptake of E-Selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1514 (2001),177-190

- [166] Korff,T., Augustin,H.G.: Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J.Cell Sci.*112 (1999),3249-3258
- [167] Colombo,G., Curnis,F., De Mori,G.M.S., Gasparri,A., Longoni,C., Sacchi,A., Longhi,R., Corti,A.: Structura-activity relationships of linear and cyclic peptides containing the NGR tumot homing motif. *J.Biolog.Chem.*277 (2002),47891-47897
- [168] Holmberg,E., Maruyama,K., Litzinger,D.C., Wright,S., Davis,M., Kabalka,G.W., Kennel,S.J., Huang,L.: Highly efficient immunoliposomes prepared with a method which is compatible with various lipid compositions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*165 (1989),1272-1278
- [169] Zhang,N., Ping,Q.N., Huang,G.H.: Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int.J.Pharm.*294 (2005),247-259
- [170] Nag,A., Ghosh,P.C.: Assessment of targeting potential of galactosylated and mannosylated sterically stabilized liposomes to differential cell types of mouse liver. *J.Drug Target.*6 (1999),427-438
- [171] Coste,J., Campagne,J.M.: A propos de l'esterification des acides carboxyliques par le BOP ou le PyBOP. *Tetrahedron Letters* 36b (1995),4253-4256
- [172] Peterson,G.L.: A simplification of the protein assay method of lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Chemistry* 83 (1977),346-356
- [173] Zellmer,S., Lasch,J., Rothe,U.: Quantitative determination of thiolipids in organic solution, in membranes, and on HPTLC plates. *J.Lipid Res.*38 (1997),2374-2379
- [174] Krause,Annett: Herstellung und Charakterisierung E-selektin-gerichteter Immunoliposomen zur Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie. Dissertationsschrift 2000, MLU Halle-Wittenberg
- [175] Huang,A., Kennel,S.J., Huang,L.: Interactions of immunoliposomes with target cells. *J.Biol.Chem.*258 (1983),14034-14040
- [176] Allen,T.M., Brandeis,E., Hansen,C.B., Kao,G.Y., Zalipsky,S.: A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1237 (1995),99-108
- [177] Wasmuth,C.R., Edwards,C., Hutcherson,R.: Participation of SO_2^- radical ion in the reduction of p-nitrophenol by sodium dithionit. *J.Phys.Chem.*68 (1964),423-425

- [178] Kirpotin,D.B., Park,J.W., Hong,K., Shao,Y., Colbern,G., Zheng,W., Meyer,O., Benz,C.C., Papahadjopoulos,D.: Targeting of sterically stabilized liposomes to cancer overexpressing HER/2neu proto oncogene. Medical applications of liposomes, Elsevier Amsterdam (1998),325-345
- [179] Ishiwata,H., Sato,S.B., Kobayashi,S., Oku,M.: Polyethyleneglycol derivative of cholesterol reduces binding step of liposome uptake by murine macrophage like cell line J774 and human cell line Hep G2. Chem.Pharm.Bull.46 (1998),1907-1913
- [180] Defazio,G., Ribatti,D., Nico,B., Ricchinti,F.: Endocytosis of horshradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: an ultrastructural and morphometric study. Brain Research Bulletin 43 (1997),467-472
- [181] Lee,K.D., Nir,S., Papahadjopoulos,D.: Quantitative analysis of liposome-cell interactions *in vitro*: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes. Biochemistry 32 (1993),889-899
- [182] Park,J.W., Benz,C.C., Martin,F.J.: Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. Semin.Oncol.31 (2004),196-205
- [183] Sapro,P., Allen,T.M.: Internalizing antibodies are nessessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. Cancer Res.62 (2002),7190-7194
- [184] Cupers,P., Veithen,A., Kiss,A., Budhuin, Courtoy,P.J.: Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis inrat fetal fibroblasts. J.Cell Biol.127 (1994),725-735
- [185] Larkin,J.M., Donzell,W.C., Anderson,G.W.: Potassium-depended assembly of coated pits: new coated pits form as planar clathrin lathices. J.Cell Biol.103 (1986),2619-2627
- [186] Colin,M., Maurice,M., Trugnan,G., Brahim.Horn,M.C.: Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells. Gene Ther.7 (2000),139-152
- [187] Schmidt-Erfurth,U., Hasan,T., Schomacker,K., Flotte,T., Birngruber,R.: *In vivo* uptake of liposomal bezoporphyrin derivative and photothrombosis in experimental corneals neovascularization. Laser Surg.Med.17 (1995),178-188

- [188] Scornik,O.A., Botbol,V.: Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr.Drug Metab.*2 (2001),67-85
- [189] Abe,F., Shibuya,K., Uchida,M., Takahashi,K., Horinishi,H., Matsuda,A., Ishizuka,M., Takeuchi,T., Umezawa,H.: Effect of Bestatin on syngeneic tumors in mice. *Gann.* 75 (1984),89-94
- [190] Ichinose,Y., Genka,K., Koike,T., Kato,H., Watanabe,Y., Mori,T., Iioka,S., Sakuma,A., Ohta,M.: Randomized double-blind placebo-controlled trial of Bestatin in patients with resected stage I squamous-cell lung carcinoma. *J.Nat.Cancer Inst.*95 (2003),605-610
- [191] Abe,F., Shibuya,K., Ashizawa,J., Takahashi,K., Horinishi,H., Matsuda,A., Ishizuka,M., Tekeuchi,T., Umezawa,H.: Enhancement of antitumor effect of cytotoxic agents by Bestatin. *J.Antibiot.*38 (1985),411-414
- [192] Fachinformation Bestatin Cap., Nippon Kayaku Co.Ltd.
- [193] van Hensbergen, Broxterman,H.J., Peters,E., Rana,S., Elderkamp,Y.W., van Hinsbergh,V.W.M., Koolwijk,P.: Aminopeptidase inhibitor bestatin stimulates microvascular endothelial cell invasion in a fibrin matrix. *Thromb.Haemost.*90 (2003),921-929
- [194] Aozuka,Y., Koizumi,K., Saitoh,Y., Ueda,Y., Sakurai,H., Saiki,I.: Anti-tumor angiogenesis effect of aminopeptidase inhibitor bestatin against B16-BL6 melanoma cells orthotopically implanted into syngeneic mice. *Cancer Letters* 216 (2004),35-42
- [195] Korff,T., Augustin,H.G.: Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J.Cell Biol.*143 (1998),1341-1352
- [196] Vernon,R.B., Angello,J.C., Iruela-Arispe,M.L., Lane,T.F., Sage,E.H.: Reorganization of basement membrane matrices by cellular networks *in vitro*. *Labor.Invest.*66 (1992),536-547
- [197] Kennedy,A., Frank,R.N., Sotolongo,L.B., Das,A., Zhang,N.L.: Proliferative response and macromolecular synthesis by ocular cells cultured on extracellular matrix materials. *Curr.Eye Res.*9 (1990),307-322
- [198] Passaniti,A.: Extracellular matrix-cell interactions :matrigel and complex cellular pattern formation. *Correspondence. Labor.Invest.*67 (1992),804-808
- [199] Lasic,D.D.: The mechanism of vesicle formation.Review. *Biochem.J.*256 (1988),1-11

- [200] Lasic,D.D.: On the thermodynamic stability of liposomes. *J.Colloid Interface Sci.*140 (1990),302-304
- [201] Bonte,F., Hsu,M.J., Papp,A., Wu,K., Regen,S.L., Juliano,R.L.: Interactions of polymerizable phosphatidylcholine vesicles with blood components:relevance to biocompatibility. *Biochim.Biophys.Acta* 900 (1987),1-9
- [202] Bonte,F., Juliano,R.L.: Interactions of liposomes with serum lipoproteins. *Chem.Phys.Lip.*40 (1986),359-372
- [203] Ng,K., Zhao,L., Liu,Y., Mahapatro,M.: The effects of polyethyleneglycol (PEG)-derived lipid on the activity of target-sensitive immunoliposome. *Int.J.Pharm.*193 (2000),157-166
- [204] Ribatti,D., Vacca,A., Roncali,L., Dammacco,F.: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on anti-angiogenesis. *Curr.Pharm.Biotechnol.*1 (2000),73-82
- [205] Vennemann,P., Kiger,K.T., Lindken,R., Groenendijk,B.C., Steklenburg,-de Vos,S., Ten Hagen,T.L., Ursem,N.T., Poelmann,R.E., Westerweel,J., Hierck,B.P.: *In vivo* micro particle image velocimetry measurements of blood-plasma in the embryonic avian heart. *J.Biomech.*39 (2006),1191-1200
- [206] Schüller,M.: Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens-Das Chorioallantoismembran (CAM)-Modell, Dissertation, Med.Fakultät (2005)
- [207] Samkoe,K.S., Cramb,D.T.: Application of an ex ovo chicken chorioallantoic membrane model for two photon excitation photodynamic therapy of age-related macular degeneration. *J.Biomed.Opt.*8 (2003),410-417
- [208] Wutzler,P., Sauerbrei,A., Hartl,A., Reimer,K.. Comparative testing of liposomal and aqueous formulations of povidone-iodine for their angiourritative potential at the chorioallantoic membrane of ex ovo cultivated chick embryos. *Dermatology* 207 (2003),43-47
- [209] Rode,S., Rothe,U., Kuhnt,T., Scharf,R., Hänsgen,G.: Auswirkungen einer Kombination von Bestrahlung und antiangiogener Behandlung auf normale und tumorinduzierte Gefäße am Modell der Chorionallantoismembran (CAM), Poster 12.Jahreskongress der Dt. Gesellschaft für Radioonkologie,Dresden, Mai 2006
- [210] Fukasawa,K., Fujii,H., Saitoh,Y., Koizumi,K., Aozuka,Y., Sekine,K., Yamada,M., Saiki,I., Nishikawa,K.: Aminopeptidase N (APN/CD13) is

- selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Letters* 243 (2006),135-143
- [211] Peng,H.J., Tsai,L.C., Su,S.N., Chang,Z.N., Shen,H.D., Chao,P.L., Kuo,S.W., Tsao,I.Y., Hung,M.W.: Comparison of different adjuvants of protein and DNA for the prophylaxis of IgE antibody formation. *Vaccine* 22 (2004),755-761
- [212] Sekine,K., Fujii,H., Abe,F.: Induction of apoptosis by Bestatin (ubenimex) in human cell lines. *Leukemia* 13 (2003),729-734
- [213] Moreira,J.N., Hansen,C.B., Gaspar,R., Allen,T.M.: A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human cell lung cancer. *Biochim.Biophys.Acta* 1514 (2001),303-317
- [214] Gabizon,A., Horowitz,A.T., Goren,D., Tzemach,D., Shmeeda,H., Zalipsky,S.: *In vivo* fate of foalte-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor bearing mice. *Clin.Cancer Res.*9 (2003),6551-6559
- [215] Tall,A.R., Tabas,I., Williams,K.J.: Lipoprotein-liposome interactions. *Methods Enzymol.*128 (1986),637-656
- [216] Steenpaß,T.: PEGylierte Sterole zur Funktionalisierung liposomaler Oberflächen. Dissertation (2004), Lehrstuhl f.Pharm. Technologie u. Biopharm., Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- [217] Ishida,T., Harashima,H., Kiwada,H.: Liposome clearance. *Bioscience Rep.* 22 (2002),197-224
- [218] Singh,B., Rawlings,N., Kaur,A.: Expression of integrin alpha v beta 3 in pig, dog and cattle. *Histol.Histopathol.*16 (2001),1037-1041
- [219] Di Matteo,P., Curnis,F., Longhi,R., Colombo,G., Sacchi,A., Crippa,L., Protti,M.P., Ponzoni,M., Toma,S., Corti,A.: Immunogenic and structural properties of the Asn-Gly-Arg (NGR) tumor neovasculature-homing motif. *Mol.Immunol.*43 (2006),1509-1518
- [220] Bendas,G., Rothe,U., Scherphof,G.L., Kamps,J.A.A.M.: The influence of repeated injections on pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 1609 (2003),63-70

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit und die Überlassung des interessanten Themas. Ich danke für seine ständige Bereitschaft zu Diskussionen und Gesprächen, das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die Vermittlung der Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen und seine kooperative und geduldige Betreuung, auch über die große Entfernung. Nicht zuletzt danke ich für seine verständnisvolle und positive Persönlichkeit.

Bei Herrn Prof. Langner bedanke ich mich für die Möglichkeit der Fortsetzung der Arbeit in den Laboren der Pharmazie unter seiner Betreuung nach dem Wechsel von Herrn Prof. Bendas nach Bonn. Prof. Langner und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Möglichkeit der unkomplizierten Nutzung diverser Laborgeräte und das zeitweilige „Asyl“ meiner Zellen im Brutschrank. Besonders Frau Munk möchte ich für Ihre freundliche Hilfe bei organisatorischen Belangen danken. Der AG Prof. Dobner danke ich für nützliche Ratschläge in „synthetischen“ Fragestellungen

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. U. Rothe für die Möglichkeit der Nutzung der Fluoreszenzmikroskope und der Labore seiner Arbeitsgruppe zur Präparierung der Nabelschnüre und zur Zellkultivierung. Bei Herrn Dr. Höpfner möchte ich mich in diesem Zusammenhang für die Hilfe bei der Bedienung des LSM bedanken. Frau Dr. S. Rode gilt mein Dank für die freundliche Zusammenarbeit am CAM Modell.

Frau PD Dr. Riemann danke ich für anregende und kritische Gespräche, die Durchführung bestimmter Vorversuche und das zur Verfügung stellen von Zelllinien und Reagenzien.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Jahreis vom Max-Planck-Institut für die Synthese der Peptide und manchen fachlichen Rat bedanken. Herrn PD Dr. Simm (Klinik für Herz und Thoraxchirurgie) und insbesondere seiner Mitarbeiterin Frau Simone Kahrstedt danke ich für die Unterstützung und Hilfe beim in vitro Angiogenese Modell.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Zeisig (MDC Berlin) für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre am MDC und für die Ermöglichung der Durchführung der Organaufbereitungen und der Messungen im Radioaktivlabor bedanken. Der Firma EPO danke ich in diesem Zusammenhang für die Durchführung der in vivo Versuche.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch ganz besonders bei Herrn Dr. Schmidt für seine freundschaftliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und organisatorischen Belangen bedanken. Danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den „Arbeitsgruppenersatz“ durch das gemeinsame Nutzen der Laborräume.

Ein extra Dankeschön geht an meinen Ehemann Christoph Jacke für seine liebevolle und geduldige Unterstützung meiner Person und Arbeit.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Britta Jacke, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Bildungseinrichtung bzw. Prüfungsbehörde zur Begutachtung vorgelegt. Des Weiteren versichere ich, dass ich mich bisher nicht um den Erwerb des Doktorgrades beworben habe.

Halle / Saale, April 2008

Britta Jacke

Lebenslauf

Name: Britta Jacke, geb. Hartung
Geburtsdatum: 29.04.1974
Geburtsort: Halle / Saale
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

1980-1990 Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Halle
1991-1992 Besuch des Gymnasiums in Halle, Erwerb des Abiturs

Berufsausbildung

08/1992-09/95 Ausbildung zur Bankkauffrau und Berufspraxis bei der Deutschen Bank AG Halle
10/1995-09/1999 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/1997 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/1999 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1999-03/2000 Praktikum am Institut für Pharmazeutische Chemie im Fachbereich Pharmazie der MLU Halle
04/2000-11/2000 Praktikum in der „Birkenapotheke“ in Köln
11/2000 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Approbation als Apothekerin
12/2000-06/2001 wiss. Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie
07/2001-09/2002 Elternzeit
10/2002-01/2006 Anfertigung der Dissertation als Promotionsstudentin am Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg, gefördert durch die Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
02/2006-12/2006 Elternzeit
seit 01/2007 Apothekerin in der „Apotheke am Händelhaus“ in Halle