



Herstellung und Charakterisierung E-Selektin-gerichteter Immunliposomen zur Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Pharmazeutin Annett Krause
geb. am 07.03.1973 in Wermsdorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. Alfred Fahr, Marburg
2. Prof. Dr. Peter Nuhn, Halle/S.
3. PD Dr. Ullrich Rothe, Halle/S.

Halle (Saale), 06.09.2000

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung	9
Kapitel 2	Theoretischer Teil	11
2.1	Liposomen und ihr therapeutisches Potential	11
2.2	Liposomen in biologischen Systemen.....	19
2.3	Entzündung und antiinflammatorische Therapie	24
2.4	Das Gefäßendothel	32
2.5	Ziel der Arbeit	36
Kapitel 3	Material und Methoden	37
3.1	Verwendete Substanzen	37
3.1.1	Darstellung des Lipidankers NGPE	37
3.1.2	Darstellung des Lipidankers PDP-PE	38
3.1.3	Darstellung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE	38
3.2	Proteinquantifizierung.....	42
3.3	Phosphatquantifizierung [122].....	44
3.4	Dünnschichtchromatographie	44
3.5	Liposomenpräparation, -markierung und -größenbestimmung.....	45
3.6	Liposomenstabilität.....	46
3.7	Antikörperkopplungsmethoden.....	47
3.8	Zellversuche, allgemein (u.a. Nabelschnurpräparation)	48
3.9	In vitro Targetierungsuntersuchungen an Zellen	50
3.9.1	Verwendung von CHO-E-Zellen	50
3.9.2	Verwendung von HUVEC	52
3.10	Untersuchungen zur Internalisierung von Liposomen	53
3.10.1	Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Pyranins	53
3.10.2	Endozytoseuntersuchungen mit Pyranosomen.....	53
3.10.3	Internalisierungsuntersuchungen unter Verwendung der Dithionitmethode	54
3.10.3.1	Vorversuch zur NBD-Fluoreszenzlöschung	54
3.10.3.2	Hauptversuch mit HUVEC und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung.....	55
3.10.4	Internalisierungsuntersuchungen mittels Fluoreszenzdoppelmarkierung der Liposomen.....	55
3.10.5	Internalisierungsuntersuchungen mittels klassischem Fusionsnachweis	55
3.10.6	Internalisierungsuntersuchungen unter Verwendung des Enzyms Pronase.....	56
3.11	Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM).....	56
3.12	Durchflußapparat	57
Kapitel 4	Ergebnisse und Diskussion	58
4.1	Herstellung und Charakterisierung selektingerichteter Immunoliposomen.....	58
4.1.1	Vergleich etablierter Methoden zur Herstellung von Immunoliposomen.....	58
4.1.2	Entwicklung einer neuen Kopplungsmethode	61
4.1.2.1	Darstellung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE	63
4.1.2.2	Charakterisierung der neuen Kopplungsmethode	64
4.2	In vitro Targetierungsuntersuchungen mit den Immunoliposomen.....	73
4.2.1	Targetierung unter statischen Bedingungen.....	73
4.2.2	Targetierung unter dynamischen Bedingungen	78
4.3	Internalisierungs-Untersuchung	80
4.3.1	Endozytoseuntersuchungen mit Pyranosomen.....	80
4.3.1.1	Verwendung von CHO-E-Zellen	83
4.3.1.2	Verwendung von Makrophagen.....	84
4.3.1.3	Verwendung von Keratinozyten	86
4.3.1.4	Verwendung von HUVEC mit Pyranosomen	87

4.3.1.5 Verwendung von HUVEC mit unspezifischen Immunoliposomen	89
4.3.1.6 Verwendung von HUVEC und spezifischen Immunoliposomen	90
4.3.1.7 Zusammenfassung	91
4.3.2 Weitere Internalisierungsuntersuchungen	93
4.3.2.1 Dithionit-Methode	93
4.3.2.2 Mikroskopie im konfokalen Modus	96
4.3.2.3 Fluoreszenzdoppelmarkierung	99
4.3.2.4 Fusions-Nachweis	101
4.3.2.5 Pronase-Methode	103
4.3.2.6 Zusammenfassung des Abschnittes	106
Kapitel 5 Zusammenfassung	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Fluoreszenzfarbstoff HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure, Pyranin)	23
Abb. 2: Darstellung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE in 3 Reaktionsschritten.....	39
Abb. 3: ESI-MS-Spektrum: N-(3,5-Dichlor-2,4,5-triaz-2-yl)-Dipalmitoylphosphatidylethanol-amin	42
Abb. 4: HUVEC, 2 Tage nach Isolierung.....	50
Abb. 5: Durchflußapparatur mit 2 Durchflußkammern	57
Abb. 6: Vergleich konventioneller Kopplungsmethoden	60
Abb. 7: Zellbindung unter statischen Bedingungen.....	61
Abb. 8: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute von der PEG Konzentration.....	62
Abb. 9: Der Lipidanker Cyanur-PEG-PE (<i>N</i> -[5-Chlor-3-(ω -(3,5-Dichlor-2,4,6 tria-2-yl-oxy)-Poly(ethylenglykol) ethylamino)-2,4,6-triaz-2-yl]-DPPE).....	63
Abb. 10: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute vom Reaktions-pH-Wert	65
Abb. 11: Einschluß-Stabilität der Liposomen über 14 Tagen (vor bzw. nach Antikörperkopplung)	66
Abb. 12: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute von der inkorperierten Cyanur-PEG-PE/mPEG-PE 2000 Menge.....	67
Abb. 13: Erreichbare Kopplungsausbeuten bei Anwendung verschiedener Kopplungsmethoden (Gesamt-PEG-PE-Konzentration: 5mol%/PL).....	68
Abb. 14: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme einer Dispersion von Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen (Darstellung im Höhenmodus, Ausschnitt 10x10 μ m, Die Farbskala kennzeichnet Höhenunterschiede von 0 bis 100nm).....	70
Abb. 15: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme entlang eines einzelnen Cyanur-PEG-PE-Immunoliposoms (Darstellung im Amplitudenmodus).....	71
Abb. 16: dreidimensionale Darstellung eines Details der oberen Randzone des einzelnen Cyanur-PEG-PE-Immunoliposoms von Abb. 15 (Kantenlänge des quadratischen Ausschnittes: 250nm, Höhe des Balkens: 40 μ m, trimere Struktur eines IgG-Moleküls).....	71
Abb. 17: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme eines einzelnen konventionellen (NGPE)-Immunoliposoms (Darstellung im Amplitudenmodus).....	72
Abb. 18: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme des einzelnen konventionellen (NGPE)-Immunoliposoms aus Abb. 17 (Darstellung im Amplitudenmodus, großemäßige Detektion der Oberflächenstrukturen)	73
Abb. 19: Zellbindungsausbeute in Abhängigkeit von der liposomalen mPEG-PE2000/Cyanur-PEG-PE Konzentration (Vergleich einer Kopplungsmethode für sterisch stabilisierte Immunoliposomen von Typ I und II)	74
Abb. 20: FACs-Ergebnisse (Die dargestellten Werte sind die Ergebnisse eines Einzelexperimentes (a) und repräsentativ für drei analoge Experimente).....	77
Abb. 21: Bindungsverhalten von Immunoliposomen an HUVEC [(A)-(C): spezifisch funktionalisierte Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen an stimulierten (nach 0,5,18h) und (D): unstimulierte (nach 18h) HUVEC (dichte Monolayer !) unter simulierten Scherflußbedingungen in einer Durchflußapparatur]	79
Abb. 22: Fluoreszenzanregungsspektren von Pyraninlösungen (λ_{em} =512nm).....	81
Abb. 23 : Fluoreszenzanregungsspektren von Pyranosomen (λ_{em} =512nm).....	82
Abb. 24: Abhängigkeit der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm vom pH-Wert.....	83
Abb. 25: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (CHO-E-Zellen, Pyranosomen).....	84

Abb. 27: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (Makrophagen, PG bzw. PA-haltige Pyranosomen)	85
Abb. 28: Fluoreszenzanregungsspektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (Makrophagen, PG-haltige Pyranosomen)	86
Abb. 29: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (Keratinocyten, Pyranosomen).....	87
Abb. 30: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (HUVEC, Pyranosomen).....	88
Abb. 31: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (HUVEC, unspezifische Immunoliposomen)....	89
Abb. 32: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (HUVEC, spezifische Immunoliposomen).....	90
Abb. 33: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm (A) bzw. 460/415 nm (B) während der Inkubationszeiten (verschiedene Zellarten/Liposomentypen).....	91
Abb. 34: Dithionit-vermittelte Reduktion einer Aryl-Nitroverbindung zur Aryl-Aminoverbindung	93
Abb. 35: Abfall der NBD-Ausgangsfluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit nach Dithionitzugabe (verschiedene molare NBD-PE: Dithionit-Ausgangsverhältnisse).94	
Abb. 36: HUVEC: A,a nach 90 minütiger Inkubation mit NBD(„outside only“) markierten Liposomen, B,b nach zusätzlicher Dithionitbehandlung	96
Abb. 37: HUVEC mit virtuellen Schnittebenen (schematische Darstellung).....	97
Abb. 38: Virtuelle Schnitte einer HUVEC (nach 90 minütiger Inkubation mit NBD(„outside only“) markierten Liposomen und zusätzlicher Dithionitbehandlung)	98
Abb. 38: HUVEC nach 90 minütiger Inkubation mit doppelt-(Rhod+FITC) markierten Liposomen	100
Abb. 40: HUVEC nach 90 minütiger Inkubation mit Calcein beladenen Liposomen bei 4°C bzw. 37°C	102
Abb. 40: Anzahl zellassoziierter bzw. internalisierter Liposomen pro Zelle für stimulierte und unstimulierte HUVEC	103
Abb. 41: Vergleich von Internalisierungsraten unterschiedlicher Zellarten	105

Abkürzungen

AFM	Atomic Force Microscopy
CHEMS	Cholesteryl Hemisuccinat
CHO-(Zellen)	Chinese Hamster Ovarial-(Zellen)
Chol	Cholesterol
cLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
COX-2	Cyclooxygenase 2
Cyanur-PEG-PE	N-[5-Chlor-3-(ω -(3,5 Dichlor-2,4,6 triaz-2-yl-oxy-)-Poly(ethylenglykol)-ethylamino)-2,4,6 triazol] Dipalmitoyl-phosphatidylethanolamin
DiO	3,3' Dioctadecyloxacarboxyaninperchlorat
DOPE	1,2 Dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DPPE	1,2 Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DSPC	1,2 Distearoyl-sn-glycero-phosphocholin
DTT	DL-Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EGF	Epidermal growth factor
ESL-1	E-Selectin-Ligand-1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IL-1	Interleukin-1
LFA-1	Lymphocyte Function associated Antigen-1
LUV	Large unilamellar vesicle
MadCAM	Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule
Mes	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MLV	Multilamellare Vesikel
MPB-PE	N-(4'-(4'-Maleimidophenyl)butyryl)-phosphatidylethanolamin
MPS	Mononukleares Phagozytäres System
mPEG-PE	Methoxypolyethylenglykol- phosphatidylethanolamin
NBD-PE	1,2 Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl)
NF κ B	Nuclear factor kappa B
N-Glut-PE	N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
NSAP	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphatpuffer
PDP-PE	N-(3'-(Pyridyldithio)-propionyl)-phosphatidylethanolamin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PEG	Polyethylenglykol
PL	Phospholipid
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RES	Retikuloendotheliales System
SATA	Succinimidye-S-acetylthioacetat
SAMSA	S-Acetylmercaptosuccinylanlydrid
SCR	short consensus repeats

sLe ^x	Sialyl Lewis ^x
SMPB	N-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SUV	Small unilamellar vesicle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Kapitel 1 Einleitung

Die Palette von Wirkstoffen zur Anwendung im Rahmen einer antiinflammatorischen Therapie ist in den letzten Jahre um echte Innovationen bereichert worden [1,2]. So wurden unter anderem zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis der Dehydroorotatdehydrogenase-Hemmstoff Leflunomid, der selektive COX2-Hemmer Rofecoxib und der chimäre Antikörper Infliximab zur Neutralisierung des Tumornekrosefaktors eingeführt.

Diese Entwicklung spiegelt den großen Bedarf an wirksamen Pharmaka zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie bspw. die rheumatoide Arthritis oder das Asthma bronchiale wieder, welche aufgrund ihrer weiten Verbreitung und dem langfristigen Therapiebedarf auch einen erheblichen Kostenfaktor sowie für die Betroffenen eine starke Einschränkung der Lebensqualität darstellen.

Der chronische Verlauf der Erkrankungen bedingt, daß die Patienten über längere Zeiträume z.T. intensiv medikamentös behandelt werden müssen, wodurch die Gefahr schwerwiegender systemischer Nebenwirkungen steigt. In diesem Zusammenhang sei vor allem auf den in vielen Fällen unumgänglichen Einsatz potenter Glucocorticoide mit ihrem bekannten Nebenwirkungsprofil erinnert.

Somit wird deutlich, daß neben Krebserkrankungen auch chronische Entzündungskrankheiten potentielle Anwendungsgebiete für sog. zielgerichteter Drug Delivery Systeme sind, mit denen ein direktes Heranbringen der Wirkstoffe an den Ort des Krankheitsgeschehens, verbunden mit einer parallelen Reduktion von Effekten an gesunden Zellen des Organismus erreicht werden soll.

Als Wirkstoff-Transportvehikel der Drug Delivery Systeme haben sich seit den 70er Jahren die von Bangham entdeckten Liposomen etabliert [3]. Ihre Zielspezifität erhalten sie durch die Bindung unterschiedlichster Liganden auf ihren Oberflächen. Als besonders aussichtsreiche Variante wurden dabei die in den 80er Jahren entwickelten sog. Immunoliposomen, d.h. Liposomen, die durch Kopplung spezifischer Antikörper ihre Zielspezifität erhalten, erkannt. Neben der Auswahl geeigneter Liganden mit hoher Affinität und Spezifität profitiert die Effizienz eines Drug Delivery Systems in entscheidendem Maß von der Wahl geeigneter Zielstrukturen.

Das Verständnis der Prozesse eines chronischen Entzündungsgeschehens hat sich mit der Entdeckung und Charakterisierung verschiedenster involvierter Entzündungsrezeptoren und -mediatoren entscheidend verbessert. Einen wichtigen Meilenstein in dieser Entwicklung stellt bspw. auch die Identifizierung der Adhäsionsrezeptor-Familie der Selektine dar [4]. Sie vermitteln den initialen Kontakt von Leukozyten mit dem Gefäßendothel im Entzündungsgebiet, der den Ausgangspunkt für eine komplexe Leukozytenadhäsion- und Migrationskaskade dieser Zellen darstellt. Aufgrund ihrer initialen und zentralen Stellung im Rahmen des Entzündungsgeschehens stellen die vaskulären Selektine ideale Zielstrukturen für eine gerichtete Anreicherung antiinflammatorischer Wirkstoffe im entzündeten Gewebe dar. Sie werden ausschließlich unter Entzündungsbedingungen und unmittelbar am Ort des Geschehens exprimiert. Ein besonderer Vorteil der Selektine liegt außerdem in ihrer Expression auf der luminalen Seite von Gefäßendothelien, wodurch ein zentrales Problem der systemischen Liposomenanwendung, die Notwendigkeit einer Extravasation zur Erreichung der Zielstrukturen, nicht besteht.

Als Transportvehikel für einen selektingerichteten Arzneistofftransport bieten sich dabei mit Anti-Selektin-Antikörpern funktionalisierte Immunoliposomen an.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Herstellung und Charakterisierung von E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen, der Testung ihrer in vitro-Bindungsfähigkeit an verschiedene E-Selektin-exprimierenden Zellarten sowie des Nachweises ihrer Internalisierung durch vaskuläre Endothelzellen.

Die Nutzung vaskulärer Selektine als Targetstrukturen zur Anreicherung von Arzneistoffvehikeln im entzündeten Gewebe könnte völlig neuartige Perspektiven bzw. Ansatzpunkte einer antiinflammatorischen Therapie eröffnen.

Kapitel 2 Theoretischer Teil

2.1 Liposomen und ihr therapeutisches Potential

Probleme einer systemischen Applikation, Fragen der Liposomenfunktionalisierung, Herstellung von Immunoliposomen, Erfolge und Aussichten

Verschiedene medizinische und pharmazeutische Herausforderungen treiben die Entwicklung von sog. zielgerichteten Drug Delivery Systemen voran [5]. Hinter diesem Begriff verbirgt sich die Idee der direkten „Lieferung“ eines Arzneistoffes an den gewünschten Zielort (Zellen, Gewebe, Organ) ohne die gleichzeitige Kontaktierung anderer gesunder Zellen als häufige Ursache unerwünschter Nebenwirkungen. Der Begriff des „Drug Targetings“ bezeichnet den zielgerichteten Arzneistofftransport zum Ort des Krankheitsgeschehens, wobei laut eigener Interpretation das „Targeting“ hauptsächlich den Transportprozess zum Zielort beschreibt, während mit „Delivery“ Transport-/ Internalisierungs- und Freisetzungsschritt erfaßt werden (z.B. zytoplasmatisches Delivery).

Negative systemische Nebeneffekte eines Wirkstoffes treten gehäuft bei einer Langzeitanwendung (chronische Erkrankungen) und Einsatz hoher Dosen (z.B. Hochdosis-Chemotherapie bei Krebserkrankungen) auf, weshalb vor allem die Therapie derartiger Erkrankungen vom Einsatz sog. zielgerichteter Drug Delivery Systeme profitieren könnte. Bereits 1906 erkannte Paul Ehrlich mit seinem „Prinzip der magischen Kugeln“ das Potential eines zielgerichteten Wirkstofftransportes [6], welcher neben einer Minimierung der Effekte für das umliegende Gewebe auch eine Steigerung der therapeutischen Effizienz der Arzneistoffes durch seine Konzentration am Wirkort bedingt.

Von Forssen et al. [5] wurden folgende Kriterien für ein optimales systemisches Drug Delivery System formuliert. Es garantiert einen exklusiven Arzneistofftransport zum Wirkort, bei seiner Anwendung treten minimale toxische Effekte für den restlichen Organismus auf, das System ist pharmakologisch inaktiv und untoxisch, sollte metabolisierbar und aus der Zirkulation entfernt sein, wenn die Transportfunktion erfüllt ist.

Eine Verwendung der in den 60er Jahren von Bangham entdeckten Liposomen als Transportvehikel im Rahmen eines Drug Delivery Systems wurde bereits in den 70er Jahren u.a. von Gregoriadis und Papahadjopoulos vorgeschlagen [7,8]. Liposomen sind Vesikel aus konzentrisch angeordneten Lipiddoppelschichten (Bilayer), welche sowohl hydrophile Stoffe in der wässrigen Innenphase bzw. den Bilayerzwischenräumen als auch lipophile Stoffe innerhalb der Bilayer transportieren können und in ihrer Morphologie von kleinen (SUV) und großen (LUV) einschichtigen Vesikeln (unilamellar) bis zu einem Mehrschichtenaufbau (multilamellar, MLV) variieren. Sie entstehen durch Selbstassoziation von Amphiphilen (i.d.R. Phospholipiden) im wässrigen Milieu. Die Liposomen zeichnen sich für ihre Anwendung als in vivo-Transportvesikel unter anderem durch eine große Variabilität der physikalischen Eigenschaften (z.B. Lipidzusammensetzung und Membranfluidität, Größe, Oberflächenladung) aus. Die Tatsache, daß die Hauptkomponenten der Liposomen mit Phospholipiden und Cholesterol natürliche Bestandteile der Säugetierzellmembranen sind, bedingt eine normale Metabolisierung, geringe Toxizität sowie Immunogenität und gute Biokompatibilität im Rahmen einer systemischen Applikation. Der Einbau spezieller Lipidderivate ermöglicht die Verlängerung von Zirkulationshalbwertszeiten, eine geeignete Partikelgrößen unter bestimmten Umständen eine erhöhte Extravasation. Dem Arzneistoff bietet die liposomale Verpackung Separation und Stabilisierung, seine Verteilung im

Organismus ist durch den Einschluß unabhängig von seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Bei der Anwendung von Liposomen als Arzneistoffvehikel ist zwischen einem indirekten (passiven) oder direktem (aktiven) Targeting zu differenzieren. Die Hauptvariante des passiven Targetings ergibt sich bereits aus der Natur der Liposomen als körperfremde Strukturen und der daraus resultierenden Anreicherung in Zellen des MPS (mononukleares phagozytäres Systems). Ausgenutzt wird diese biologische Tendenz bspw. zur Anreicherung von Anti-Leishmaniose-Wirkstoffen in Zellen des MPS bei einer besonders schwerwiegenden Infektion mit Befall von Leber und Milz [9] sowie zur Aktivierung von Makrophagen in der Antitumorthherapie [10]. Ein passives Targeting ist desweiteren durch das permeable Gefäßsystem einiger solider Tumore (Lücken zwischen den Endothelzellen, fehlende Basalmembran, fehlendes umgebendes Muskelgewebe) sowie das Kapillarbett der Lunge möglich [11,12]. Ein direktes Targeting setzt die Funktionalisierung der Liposomen mit spezifischen Liganden voraus, welche über eine Bindung an Oberflächenstrukturen auf den Zielzellen eine Anreicherung der Liposomen am Wirkort ermöglichen. In der Vergangenheit wurde schon eine Vielzahl von Liganden erprobt und unter anderm Kohlenhydratstrukturen (z.B. Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharid), Peptide (z.B. RGD, Transferrin), Hormone, Lektine und Immunglobuline an Liposomen gekoppelt. Die aussichtsreichste Strategie stellt dabei die Verwendung von Antikörpern dar. Diese zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität, hohe Affinität zur entsprechenden Zielstruktur und Biokompatibilität aus, desweiteren durch ihre extreme Varianz (hinsichtlich des Zielantigens) bei gleichbleibender, gut untersuchter chemischer Struktur, wodurch wiederum die Anwendung einheitlicher, optimierter Kopplungsmethoden ermöglicht wird. Die resultierenden sog. Immunoliposomen werden seit Beginn der 70er Jahre intensiv erforscht. Der erste (veröffentlichte) erfolgreiche Versuchs eines Antikörper-vermittelten Targetings wurden 1975 von Gregoriadis und Neerunjun durchgeführt [13]. In der Zwischenzeit gibt es eine Vielzahl erfolgreicher in vivo und in vitro-Anwendungen von Immunoliposomen an verschiedensten Zellsystemen [14-18], vorrangig auf dem Gebiet der Krebstherapie. Auch mit einfachen Wirkstoff-Antikörper-Konjugaten wurde bereits versucht, die positiven Targetierungseigenschaften der Antikörper ausnutzen, doch bieten Immunoliposomen ihnen gegenüber weitere Vorteile. So zeigen sie ein bedeutend höheres (bis zu 400 fach) und damit günstigeres Wirkstoff/Antikörper-Verhältnis und erlauben durch die laterale Diffusionsbeweglichkeit der oberflächengebundener Liganden eine optimale Ausrichtung dieser zum Antigen sowie eine multivalente Bindung.

Für den Erfolg eines Antikörper-vermittelten Drug Targeting ist es wichtig, Oberflächendeterminanten auf den Zielzellen zu finden, welche sich qualitativ oder zumindest quantitativ vom umgebenden Gewebe unterscheiden, in ausreichendem Maße und idealerweise nur unter pathologischen Bedingungen exprimiert werden, wie z.B. Histone (nekrotisches Gewebe) [19], Adhäsionsmoleküle (Entzündungsgebiete) [20] oder Strukturen zu identifizieren, welche nur durch morphologische Abnormalitäten im Krankheitsgebiet erreichbar werden, wie z.B. das Fibronectin auf der Basalmembran in Tumorgefäßen oder das Myosin im ischämischen Herzgewebe [21].

Trotz aller günstiger Eigenschaften für ihren Einsatz als Arzneistoffvehikel ist die systemische Applikation von Liposomen allgemein und von Immunoliposomen im besonderen mit einer Reihe von Problemen behaftet.

Ein erstes wichtiges Kriterium stellt die Serumstabilität dar. Es gibt eine Vielzahl von Interaktions-Möglichkeiten zwischen Liposomen und Blutkomponenten (z.B. Immunglobulinen, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren, C-reaktives Protein), welche Einfluß die Liposomenintegrität haben [24,25]. Einen bekannten Einfluß auf die Liposomenstabilität stellt auch die Interaktion mit Serumlipoproteinen dar, da Phospholipide bspw. durch HDL extrahiert werden können, was zum Ausfluß (leakage) von eingeschlossenen Material durch die gestörte Membran führen kann [22]. Die

Lipidkomponenten von Immunliposomen sind im Prinzip den gleichen Attacken durch Serumkomponenten ausgesetzt, jedoch erhöht die Anwesenheit von Antikörper, welche in der Lage sind Komplementfaktoren selber zu binden, zusätzlich die Anfälligkeit der Liposomen gegenüber einer komplementinduzierten Lyse [23]. Das Probleme der erhöhten Antigenität der Immunliposomen wird an späterer Stelle noch ausführlich beschrieben. Das Ausmaß der Interaktionen zwischen Liposomen und Serumkomponenten zeigt eine starke Abhängigkeit von verschiedenen Vesikelparametern, z.B. von Größe, Lipidzusammensetzung und Lipidreinheit. Der Einbau von 30-50 mol% Cholesterol in die Liposomenmembran bedingt eine erhöhte Lipidpackungsdichte, verringert dadurch die potentiellen Interaktionen mit Serumproteinen und erhöht somit die Serumstabilität [26]. LUV behalten ihren Inhalt in Gegenwart von Serum länger als SUV, deren geringerer Krümmungsradius wiederum Einfluß auf die Bilayerpackung zeigt und dadurch die Anfälligkeit der kleineren Liposomen gegenüber einer seruminduzierten Bilayerstörung erhöht [27]. Desweiteren sollten zur Herstellung serumstabiler Liposomen hochgradig reine, rigide und gesättigte Lipide verwendet werden [25,28]. Lipidverunreinigungen (Lysophospholipide und andere Lipid-Hydrolyseprodukte), ungesättigte Fettsäuren und ungleiche Kettenlängen können die Bilayer schwächen und bei einer Präsentation auf der Vesikeloberfläche zu einer verstärkter Destabilisierung und Opsonisierung führen.

Die Kompartimentsbeschränkung, d.h. die Tatsache, daß die Verteilung von Liposomen auf das physiologische Kompartiment, in welche sie appliziert wurden, beschränkt ist, stellt ein weiteres Problem bei der systemischen Anwendung von Liposomen dar. Die vaskulären Endothelzellen und die Basalmembran wirken als physiologische Barrieren, die einer ungehinderten Vesikelextravasation entgegenstehen. Die Unfähigkeit der Liposomen, die Zirkulation zu verlassen, stellt somit ein Haupthindernis für ihren Einsatz zu extravasalen Targets dar, wobei jedoch unter bestimmten pathologischen Bedingungen (erhöhte Endothelpermeabilität in Tumorgewebe und unter Entzündungsbedingungen) und organspezifisch (Leber: diskontinuierliche, sinusoidale Kapillartyp, Endothel ohne Basalmembran) Ausnahmen möglich sind. Als besonders vorteilhaft kann also eine Targetstruktur bezeichnet werden, wenn sie ohne ein Verlassen der Zirkulation erreichbar ist. So bieten sich z.B. Rezeptoren auf der luminalen Seite vaskulärer Endothelzellen an.

Stark limitierend auf den Effekt einer systemischen Liposomenanwendung wirkt sich auch die Tatsache aus, daß Liposomen nach ihrer Applikation schnell von Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES, v.a. Makrophagen von Leber/Milz) als körperfremd erkannt und eliminiert werden und damit nur sehr geringe Zirkulationshalbwertszeiten erreichen können. Aufgrund der kurzen Zirkulationshalbwertszeiten ist das Erreichen ausreichend hoher Wirkstoffspiegel am Zielort über längere Zeiten nicht möglich. Eine effektive systemische Liposomenanwendung setzt also die Blockade des RES voraus. Erreicht wurde dies zunächst durch eine Prädosierung mit Dextransulfat oder unfunktionalisierten Liposomen zur Sättigung der Makrophagen und damit der Erschöpfung ihrer Aufnahmekapazitäten [29,30]. Neue Strategien der Zirkulationszeitverlängerung wurden zu Beginn der 90er Jahre entwickelt. 1987 entdeckten Allen et al. die zirkulationsverlängernde Wirkung des Gangliosides GM₁ und sahen diese als Effekt der voluminösen und flexiblen Kopfgruppe des GM₁ an. 1990 nutzen Blume und Cevc für den gleichen Effekt erstmal Phospholipide mit Polyethylenglykol-(PEG) Kopfgruppen [32]. Damit konnten zum einen deutlich längere Zirkulationshalbwertszeiten erreicht werden und zum anderen waren die PEG-Lipide auch aufgrund ihrer Biokompatibilität dem Gangliosid GM₁ gegenüber von Vorteil. Die resultierenden, langzirkulierenden Liposomen wurden als Stealth-Liposomen bezeichnet. Der protektive Effekt der PEG-Lipide (Stealth-Effekt) zeigt eine Abhängigkeit von deren Kettenlänge und ihrer molaren Konzentration, wobei maximale Effekte der Zirkulationszeitverlängerung mit Molmassen von 2000-5000 bei Konzentrationen von 5mol% /Gesamtlipid erreicht werden konnten [33-35]. Bei einer entsprechend hohen Konzentration findet eine parallele Ausrichtung der gestreckten PEG-Ketten statt (Bürsten-Modell [36]),

wodurch um das Liposom eine sterische Schutzhülle mit einer Schichtdicke von 4-5 nm (PEG2000) entsteht [37,38]. Die sterische Stabilisierung der Liposomen bewirkt zum einen eine Reduktion der adsorptiven Bindung opsonisierender Proteine auf der Liposomenoberfläche, zum anderen auch eine Inhibierung der nicht Opsonin-vermittelten Aufnahme durch Makrophagen der Leber (Kupfferzellen) [39].

Immunoliposomen werden in den meisten Fällen durch Bindung spezieisfremder Antikörper gebildet, wobei heute der überwiegend Anteil monoklonaler Antikörper aus der Maus stammt. Makrophagen erkennen mit Hilfe ihrer Fc-Rezeptoren spezieisfremde Antikörpermoleküle an ihrem Fc-Teil und eliminieren diese schnell mittels Phagozytose. Leserman und Aragnol versuchten eine Hemmung der Fc-vermittelten Eliminierung von Immunoliposomen mit der Applikation von monoklonalen Antikörpern gegen den Fc-Rezeptor der Makrophagen [29]. Immunoliposomen zeigen aufgrund ihrer erhöhten Antigenität im Vergleich mit unkonjugierten Liposomen prinzipiell verkürzte Zirkulationshalbwertszeiten, auch bei sterischer Stabilisierung [40-42]. Dabei besteht zwischen liposomal gebundener Antikörpermenge und erreichter Zirkulationshalbwertszeit eine umgekehrte Proportionalität. Ein Beispiel von Allen et al. zeigt, in welchem Maße die Menge an sterisch stabilisierten Immunoliposomen im Blut nach 24 Stunden mit Zunahme der Antikörperdichte absinkt. So sind von Vergleichsliposomen ohne Antikörper nach 24 h noch 25% der applizierten Menge, von Immunoliposomen mit einer Antikörperdichte von $20\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ noch 20%, bei $74\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ nur noch 10% und bei $140\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ keine Liposomen mehr nachweisbar [43]. Prinzipiell bewirken Antikörpermengen über $70\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ eine rapide Eliminierung der betreffenden Immunoliposomen aus der Zirkulation, wohingegen mit Kopplungsmengen von $20\text{-}40\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ bei guter Targeterkennungsfähigkeit der Liposomen Zirkulationshalbwertszeiten von mehreren Stunden erreicht werden können. Angestrebt werden sollten liposomale Kopplungsmengen um $30\mu\text{g}/\mu\text{mol}$.

Innerhalb der sterisch stabilisierten Immunoliposomen können hinsichtlich der Antikörperposition zwei unterschiedliche Typen unterschieden werden. Beim Typ I sind die Antikörpermoleküle direkt auf der Liposomenoberfläche gebunden, wohingegen sie beim Typ II in exponierter Stelle am Ende der PEG-Ketten lokalisiert sind. Typ I ist vor allem durch eine starke Abhängigkeit der Kopplungsmengen von der PEG-Lipidkonzentration aufgrund der sterischen Interferenzen durch die PEG-Ketten während der Kopplungsreaktion gekennzeichnet. Dieses Problem konnte mit Hilfe des Typ II gelöst werden, zusätzlich wurde durch die Kopplung der Antikörper an den PEG-Terminus eine erhöhte Antikörpererkennbarkeit und -flexibilität und damit eine verbesserte Zell-Bindungsfähigkeit erreicht [44,45]. Gleichzeitig sind jedoch auch die Fc-Regionen der gebundenen Antikörper besser zugänglich, wodurch Immunoliposomen vom Typ II einer schnelleren Leber-Elimination unterliegen als vom Typ I [42]. Werden die Antikörper nach der Kopplungsmethode von Chua [46] über eine Hydrazonbindung an die Liposomenoberfläche gebunden, so ist im Gegensatz zu allen anderen Techniken eine Orientierung der Antikörper mit dem Fc-Teil zur Vesikeloberfläche garantiert und die Fc-Exposition abgeschwächt. Eine echte Lösung des Antigenitäts-Problemes bringt die Anwendung dieser Methode, die an späterer Stelle noch detailliert beschrieben wird, jedoch nicht.

Erfolgversprechender sind demgegenüber die Optimierungsansätze auf Seiten der Antikörper. Während in den Anfängen der Immunoliposomen noch mit Antikörpergemischen gearbeitet wurde, haben sich seit Mitte der 90er Jahre monoklonale Antikörper durchgesetzt, die heute mit Hilfe von Hybridomzellklonen (Milzzelle aus immun. Maus + Myelomzelle) in ausreichendem Umfang produziert werden können. Obwohl durch die Anwendung dieser homogenen und monospezifischen Antikörper eine Reduktion ihrer benötigten Menge möglich ist, werden sie aufgrund ihres Fc-Teils schnell von Makrophagen als fremd erkannt. Bei einer wiederholten Anwendung wird der Organismus desweiteren zur Bildung von Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) angeregt [47]. Eine weitere Verbesserung wurde durch die Verwendung von Fab-Fragmenten, d.h. der isolierten Antikörper-Erkennungsdomänen der

IgG-Moleküle versucht und erreicht [48,15]. Nachteilig kann sich jedoch die Notwendigkeit eines zusätzlichen Präparationsschrittes auswirken, der einen Verlust an Antikörper und unter Umständen auch dessen Aktivität bedingt. Mit Hilfe der Gentechnologie ist es auch gelungen, verträglichere intakte Antikörpermoleküle zu entwickeln [49]. Bei sog. chimären Antikörpern handelt es sich um modifizierte monoklonale Antikörper, bei denen die Antigenerkennungs (Fab)-Domänen aus der Maus mit einer humanen Effektor (Fc)-Domäne vermischt sind. Bei humanisierten monoklonalen Antikörpern ist nicht nur der Fc-Teil humanen Ursprungs, sondern zusätzlich ein Teil der Fab-Domäne [50,51]. Nur diejenigen Teile der Fab-Domäne, welche zur Antigenerkennung zwingend notwendig sind, stammen noch von der Maus. Heute existieren humanisierte Antikörper schon für eine breite Palette von Oberflächenstrukturen. Inwieweit ihr Einsatz dem der spezie fremden Antikörper überlegen ist, muß noch durch ausstehende vergleichende in vivo-Untersuchungen geklärt werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Antigenität den Einsatz von Immunoliposomen ohne Zweifel limitiert, aber durch den Einsatz humanisierter Formen von Antikörpern scheint dieses Problem lösbar. Die systemische Anwendung von Liposomen war und ist also mit einer Reihe von Problemen behaftet, was Huang 1989 sicher auch zu folgender Feststellung bewegte: „It is now clear that liposomes will not be the universal magic bullets as was earlier thought“ [52]. Es läßt sich jedoch auch feststellen, daß in der Zwischenzeit für eine große Anzahl von Problemen bereits Lösungen gefunden werden konnten, so z.B. eine RES-Blockade durch Stealth-Liposomen und eine Antigenitätsreduktion durch humanisierte Antikörper.

Für den Nutzen von Liposomen spricht auch eine große Anzahl erfolgreicher in vitro und in vivo-Untersuchungen. Daß beispielweise das Ziel der Reduktion von Nebenwirkungen durch den Einsatz von Liposomen erreicht werden kann, zeigen folgende Beispiele. So konnte die dosislimitierende Cardiotoxizität von Adriamycin durch eine liposomale Verkapselung des Wirkstoffes abgeschwächt, damit die maximal tolerierbare Dosis und letztendlich der therapeutische Index deutlich gesteigert werden [53]. Auch für das sehr toxische Amphotericin B wurde durch den selektiven Transport zu den Pilzzellen bei einer systemischen Infektion eine Steigerung des therapeutischen Index erreicht [54]. Eine effektive Anreicherung an Brustkrebszellen gelang Kirpotin et al. mit spezifischen Immunoliposomen gegen das Krebsoberflächenantigen HER-2 [55]. In einer sehr erfolgreichen in vivo-Untersuchung an der Maus zeigte Ahmad et al., daß mit Hilfe des Einsatzes von Immunoliposomen ein spezifischer Transport von Doxorubicin an Lungenkrebszellen möglich ist, wodurch eine deutliche Eindämmung des Tumorwachstums und eine Verlängerung der Überlebenszeit der Tiere erreicht werden konnte [18].

Die meisten Untersuchungen wurden auf dem Gebiet der Krebsbekämpfung durchgeführt, da Zytostatika aufgrund ihrer Toxizität, hohen effektiven Dosen und extremen Nebenwirkungen derzeit das größte Potential für ein Drug Targeting bieten. Als ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von Immunoliposomen bietet sich die antiinflammatorische Therapie und dabei vor allem die Behandlung chronischer Entzündungskrankheiten, wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale sowie chronische Darmerkrankungen, an. Eine erfolgreiche Akkumulation an und Internalisierung durch bronchiale Epithelzellen wurde z.B. von Mastrobattista et al. gezeigt. Er verwendete Immunoliposomen mit spezifischen Antikörpern gegen das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) [56]. Nicht nur der zielgerichtete Transport von antiinflammatorischen Wirkstoffen sondern bspw. auch von Antisense-Oligonukleotiden, welche am Entzündungsort die Down-Regulation der Adhäsionsmolekül-Expression und damit eine Stagnation des Entzündungsgeschehens bewirken könnten, erscheint damit realisierbar.

Die Idee der hydrophoben Verankerung hydrophiler Proteinstrukturen in der Lipidmatrix als effektiver Weg der Liposomenfunktionalisierung wurde erstmals Mitte der 70er Jahre geäußert. Daraufhin begannen zum Ende der 70er Jahre viele Arbeitsgruppen mit

umfangreichen Untersuchungen zur liposomalen Ligandenimmobilisierung. Diese Untersuchungen fanden ca. 1990 ihren Abschluß und seitdem steht für die Herstellung von Immunoliposomen ein breite Palette von Antikörper-Konjugationsmöglichkeiten zur Verfügung.

Idealerweise sollten sie einfach, mit wenigen Reaktionsschritten sowie ohne großen präparativen Aufwand und Verlust an Antikörpern durchführbar sein. Während der Konjugation darf die Fähigkeit der Antikörper zur Antigenerkennung sowie die strukturelle Integrität der Liposomen nicht beeinträchtigt werden. Ohne die Notwendigkeit von Derivatisierungen am Protein sollten effektive Antikörperdichten erreichbar sein.

Prinzipiell ist eine Antikörperkonjugation vor, d.h. an mizellar angebotene Lipidderivate, oder nach der Liposomenpräparation, d.h. an präformierte Vesikel möglich. Der Einbau lipidierter Liganden während der Vesikelbildung (Dialyse) bedingt eine beidseitige Orientierung der Liganden zur Vesikeloberfläche und ins Vesikelinnere, während mit der nachträglichen Kopplung die effektivere Anordnung auf der Liposomenoberfläche garantiert wird. Aufgrund dieses Vorteils und der größeren Praktikabilität der letzteren Variante sollen im folgenden nur Konjugationsmethoden an präformierte Liposomen vorgestellt werden. Innerhalb der Kopplungstechniken ist eine weitere Einteilung in Methoden unter Ausbildung einer kovalenten oder nichtkovalenten Antikörperbindung zu unterscheiden. Zu den nichtkovalenten Methoden zählen die adsorptive Bindung, die Biotin-Avidin-Methode sowie die sog. „Sandwich“ Methode. Bei letzterer wird das Protein A liposomal gebunden, die entsprechenden Zielzellen mit Antikörpern vorbehandelt und über die Wechselwirkung Protein A-IgG die Liposomen-Zell-Bindung realisiert [57].

Eine weitere Verbreitung haben jedoch die kovalenten Kopplungstechniken erfahren. Sie beruhen u.a. auf der Verwendung bifunktioneller Kopplungsreagenzien (z.B. Glutaraldehyd), Thioladditionen, Halogensubstitutionen, Thiol-Disulfid-Austauschen, Ausbildungen von Carbonsäureamidbindungen, Diazotierungskopplungen, Hydrazonkopplungen sowie Kopplungen über Ester- und Ether-Bindungen. Aufgrund der sehr großen Auswahl an Methoden sollen im folgenden nur die am häufigsten verwendeten näher vorgestellt werden. Bei der Avidin-Biotin-Methode fungiert Avidin mit seinen 4 hochaffinen Bindungsstellen (lat. avidus = gierig) als Brücke zwischen biotinyliertem Antikörper und biotinyliertem Lipidderivat [58,59]. Trotz der Tatsache, daß der entstehende Komplex auf einer nichtkovalenten Bindung beruht, ist die Bindung sehr stark (Dissoziationskonstante ca. 10^{-15} M). Diese oft verwendete Methode birgt nicht die Gefahr einer Proteinschädigung in sich, ist einfach und unkompliziert durchführbar. Als problematisch könnte sich jedoch die Möglichkeit erweisen, daß aufgrund der liposomalen Adjuvanswirkung mit der Induktion einer Immunantwort gegen das Glykoprotein Avidin gerechnet werden muß. Zum anderen wird die Anwendbarkeit der Methode durch die Notwendigkeit biotinylierter Antikörper limitiert.

Eine große Bedeutung unter den kovalenten Konjugationstechniken haben die thioreaktiven Methoden erlangt, so bspw. die Thioladdition an Maleimidogruppen unter Bildung einer irreversiblen Thioetherbindung oder der Thiol-Disulfid-Austausch unter Bildung einer reversiblen Disulfidbindung [60]. Für erstere Methode wird der Lipidanker MPB-PE [N-(4'-(4''-Maleimidophenyl)-butyryl)-phosphatidylethanolamin], ein Produkt der Derivatisierung des Phospholipids mit dem Reagens SMPB [Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat], verwendet [61]. An die Maleimidogruppe des Lipidankers erfolgt die Bindung eines thiolysierten Proteins. Die essentielle Thiolgruppe des Proteins entsteht entweder durch Reduktion von endogenen Disulfidbindungen (z.B. mit Dithiothreitol) oder durch eine Derivatisierung des Proteins mit verschiedenen möglichen Thiolysierungs-Reagenzien (SPDP, SAMSA, SATA). Für die zweite Variante unter Bildung der Disulfidbindung wird der Lipidanker PDP-PE [N-(3'-(Pyridyldithio)-propionyl)-phosphatidylethanolamin], ein Produkt der Derivatisierung des Phospholipids mit dem Reagens SPDP [N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat], verwendet [60]. Die weniger stabile aromatische Pyridylthiolgruppe

(-S-Pyr-) wird anschließend aus der ursprünglichen Disulfidbindung des PDP-PE durch die Thiolgruppe des Proteins verdrängt und es kommt zur Ausbildung einer neuen Disulfidbrücke zwischen Lipidanker und Protein. Die Thiolgruppe des Proteins kann wiederum durch Reduktion von endogenen Disulfidbindungen oder durch eine Derivatisierung mit Thiolysierungs-Reagenzien erzeugt werden. Die gebildete Disulfidbindung ist jedoch reversibel und kann leicht in Gegenwart von Thiolen, z.B. Glutathion, gespalten werden. Gute Kombinationen beider Methoden stellen die beiden häufig verwendeten Varianten der Kopplung von MPB-Antikörpern an PDP-PE-Liposomen bzw. PDP-Antikörper an MPB-Liposomen mit resultierenden irreversiblen Thioetherbindungen dar [62]. Alle thioreaktiven Konjugationsmethoden zeichnen sich durch eine hohe Kopplungseffizienz aus. Nachteilig sind jedoch die zahlreichen Reinigungsschritte und die Derivatisierung sowohl von Lipid- als auch Protein-Komponente zu bewerten.

Die von Chua et al. [46] entwickelte Methode beruht auf Ausbildung einer Hydrazonbildung zwischen den durch milde Oxidation (Periodat) von Kohlenhydratstrukturen am Fc-Teil der Immunglobuline erzeugten Aldehydgruppen am Antikörper und hydrazidgruppenhaltigen Ankerlipiden. Der Vorteil der Methode liegt in der orientierten Bindung der Antikörpermoleküle an die Vesikeloberfläche, da die essentiellen Kohlenhydratgruppen hauptsächlich am Fc-Teil der IgG vorhanden sind. Diese Orientierung bedingt im Rahmen einer systemischen Anwendung die Reduktion der Fc-Exposition und damit der Fc-vermittelten Aufnahme durch Makrophagen der Leber/ Milz. Der Vorteil der verringerten Fc-vermittelten Aufnahme wird jedoch z. T. durch eine verstärkte Aufnahme über den sog. Scavenger-Rezeptor der Makrophagen kompensiert [42]. Es wird angenommen, daß die Interaktion der oxidativ geschädigten Antikörper mit dem Scavenger-Rezeptor in Analogie zu oxidiertem LDL erfolgt [63]. Unterschiedliche Antikörper zeigen gegenüber der oxidativen Behandlung unterschiedliche Empfindlichkeiten, jedoch sind prinzipiell Affinitätsverluste des Antikörper bei Verwendung dieser Kopplungsmethode möglich. Die Antikörperkopplung unter Ausbildung von Carbonsäureamidbindungen stellt eine weitere sehr vorteilhafte Methode dar. Ohne die Notwendigkeit einer Antikörperderivatisierung werden hohe Kopplungsausbeuten erreicht. Die Carboxylgruppe des Lipidankers NGPE (N-Glutarylphosphatidylethanolamin) wird dabei mit einem Carbodiimid (z.B. EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) im sauren Milieu (pH 3,5) unter Ausbildung eines reaktiven O-Acyl-Intermediates aktiviert und anschließend mit dem aminogruppentragenden Antikörper bei einem pH von 8,4 umgesetzt [64]. Ein Nachteil der alleinigen Aktivierung mit EDC soll lt. Bogdanov et al. [65] in den Nebenreaktionen des aktivierten Carbonylderivates liegen. Zum einen ist die Hydrolyse des Derivates zu den Ausgangsstoffen, zum anderen eine Isomerisierung unter Bildung des nicht aktiven N-Acylharnstoffderivates möglich. Der Zusatz von N-Hydroxysulfosuccinimid während der Kopplung führt zur Bildung des hydrolysestabilen und nicht isomeriefähigen N-Hydroxysulfosuccinimid-Ester, woraus eine verbesserte Umsetzung mit dem Antikörper resultieren kann. Eine weitere Modifizierung hat die Kopplungsvariante unter Verwendung von NGPE durch Ezpeleta et al. erfahren [66], wobei die Veränderung gegenüber [64] hauptsächlich in der Wahl eines neutralen Reaktionsmilieus und veränderten Reaktionszeiten besteht. Als Begründung für die Wahl des neutralen pH-Wertes wurde eine schnelle Abnahme der Aktivität des Carbodiimids im sauren Milieu unter Bildung des Harnstoffderivates angegeben.

Prinzipiell sind alle Antikörper-Kopplungstechniken für konventionelle Immunliposomen auf sterisch stabilisierte Immunliposomen übertragbar. Die Kopplungsausbeuten sind jedoch beim Typ I der langzirkulierenden Immunliposomen durch die sterische Barriere um die Liposomenoberfläche in Abhängigkeit von der Konzentration des PEG-Lipides deutlich reduziert. Die Lösung dieses Problems wurde unter anderem durch den nachträglichen Einbau von PEG-Lipiden in, bzw. die nachträgliche Konjugation von thioreaktiven PEG-Derivaten an präformierten, bereits mit Antikörpern funktionalisierten Immunliposomen versucht [67,68]. Eine wesentlich größere Akzeptanz erbrachte jedoch die Einführung des Typs II der sterisch

stabilisierten Immunoliposomen. Die Antikörperkopplung erfolgt in diesem Fall an die terminalen Enden der PEG-Ketten, welche mit den von den Kopplungsmethoden für konventionelle Immunoliposomen bekannten reaktiven Gruppen derivatisiert wurden. In der Vergangenheit wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Vielzahl solcher bifunktionaler PEG-Derivate synthetisiert, so daß heute PEG-Lipide mit terminaler Aminogruppe, Carboxylgruppe [44], Hydrazidgruppe [45] sowie terminaler MBP bzw. PDP-Gruppe [43,69] eingesetzt werden.

Die alleinige Anreicherung von Liposomen am Wirkort ist zwar eine wichtige Voraussetzung aber kein Garant für einen therapeutischen Effekt des transportierten Wirkstoffs. Der angereicherte Wirkstoff muß danach für die Zielzelle auch verfügbar sein. Das ist prinzipiell über folgende drei „Hauptwege“ realisierbar. Als erstes kann das Liposom im Rahmen eines aktiven Internalisierungsprozesses in die Zelle gelangen und intrazellulär entleert werden. Die zweite Möglichkeit besteht in einer Fusion von Liposomen- und Zellmembran mit Ausstrom des Vesikelinhaltes ins Zytoplasma. Desweiteren ist eine extrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes mit anschließendem Transport (Diffusion, rezeptorvermittelt) in freier Form in die Zielzelle möglich. Die Notwendigkeit einer Aufnahme des transportierten Wirkstoffs in die Zelle soll mit folgendem Beispielen aus der Chemotherapie unterstrichen werden. In einer Studie mit Methotrexat beladenen Immunoliposomen und unter Verwendung von T- und B-Lymphozyten als Targetzellen zeigte sich, daß das liposomale Methotrexat für die T-Zellen bedeutend zytotoxischer wirkte als für B-Zellen. Die Ursache dieser Beobachtung war allein die Tatsache, daß beide Zellarten bei gleicher Sensitivität für freies MTX und vergleichbarer Expression des targetierten Oberflächenantigens drastische Unterschiede in ihrem Internalisierungsverhalten zeigten. Während für die T-Zellen eine extensive Internalisierung der Immunoliposomen nachgewiesen werden konnte, zeigten die B-Zellen nur ganz geringe Internalisierungsraten [70]. Erhöhte Internalisierungsraten erhöhen den Effekt von zytotoxischen Liposomen. Auch bei anderen Anwendungen von Liposomen ist der Nachweis einer effektiven Aufnahme durch die Zielzellen essentiell. Die einzelnen Wege der „Verfügbarmachung“ des transportierten Wirkstoffs für die Zielzelle können durch verschiedene Maßnahmen beeinflußt bzw. gefördert werden. So ist bspw. eine Vesikelfusion durch Einbau von fusogenen Stoffen bzw. von Fusionsproteinen und die Internalisierung durch direkte Targetierung zu Endozytoserezeptoren (z.B. Folat-, LDL-, Transferrin-, Scavenger-Rezeptor), Auswahl geeigneter Liposomenparameter (z.B. Größe, Lipidzusammensetzung, Oberflächenladung) sowie durch Ausnutzung morphologischer Veränderungen unter pathologischen Bedingungen (z.B. erhöhte Endozytoserraten von Endothelzellen unter Entzündungsbedingungen) forcierbar. In manchen Fällen, z.B. bei einer fehlenden Internalisierungsaktivität der Zielzellen, bietet sich die Anwendung von Liposomen mit sog. Controlled-Release-Mechanismen an. Dabei handelt es sich um Liposomen, die so beschaffen sind, daß es durch Umwelteinflüsse am Zielort zu einer kontrollierten Freisetzung des Vesikelinhaltes kommt. Die wichtigsten Vertreter sind pH-, Temperatur- und Target-sensitive Liposomen.

Aus diesem Grund müssen die verschiedenen Möglichkeiten geprüft werden, wie Liposomen nach erfolgter Targetierung mit den Zielzellen allgemein und spezifisch interagieren können. Die verschiedenen Interaktions-Varianten Zelle-Liposom werden im folgenden Kapitel vorgestellt und dabei Möglichkeiten der direkten Einflußnahme auf die einzelnen Varianten aufgeführt.

Zusammenfassend zu diesem Kapitel „Liposomen und ihr therapeutisches Potential“ kann festgehalten werden, daß die Effizienz einer systemische Anwendung von Liposomen /Immunoliposomen im Rahmen eines zielgerichteten Drug Delivery Systems von verschiedensten Faktoren abhängt. Ausschlaggebend sind dabei die Targetierungsstrategie,

die Antigen-Oberflächendichte und das Internalisierungsvermögen der Zielzellen, physikalische Eigenschaften der verwendeten Liposomen sowie Fragen der Vesikelstabilität und der Zirkulationszeitverlängerung [5]. Mögliche weitere Ansatzpunkte in Richtung einer weiteren Optimierung von Drug Delivery Systemen könnten u.a. die Selektion weiterer geeigneter Targets, die Auswahl von neuen Liganden mit hoher Affinität und Selektivität sowie geringer Antigenität, die Entwicklung weiterer Konjugationsmethoden mit korrekter Präsentation und Orientierung der Antikörper sowie innovative Techniken zur Arzneistofffreisetzung am Zielort darstellen. Jede Neuentwicklung sollte dabei jedoch in Hinblick auf Praktikabilität und kommerzielle Realisierbarkeit und damit die Möglichkeit einer breiten therapeutischen Anwendung überprüft werden.

2.2 Liposomen in biologischen Systemen

Die verschiedenen Wechselwirkungsmöglichkeiten Liposom/Zelle nach erfolgter Targetierung, Möglichkeiten ihrer Identifizierung bzw. Differenzierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Wechselwirkung eines Liposoms mit einer Zelle und somit verschiedene „Schicksale“, die ein Liposom und damit auch sein transportierter Inhalt nach erfolgter Targetierung erfahren kann.

In diesem Kapitel sollen die einzelnen Interaktionsmöglichkeiten Liposom-Zelle sowie Methoden zu ihrem Nachweis bzw. ihrer Differenzierung vorgestellt werden. Desweiteren soll der Einfluß von physikalischen Eigenschaften der Liposomen (z.B. Größe, Lipidzusammensetzung, Oberflächenfunktionalisierung) auf die Zell-Liposom-Wechselwirkungen aufgeführt werden.

Dies erfolgt vor allem in Hinblick auf den letzten Teil der Arbeit, der sich mit der Internalisierung der Liposomen nach ihrer Anreicherung an den Zielzellen und damit am Wirkort befaßt.

Bei den einzelnen Interaktionsmöglichkeiten wird unterschieden zwischen der Adsorption von Vesikeln auf der Zelloberfläche, der Fusion von Liposomen mit der Zellmembran sowie der endozytotischen Aufnahme von Vesikeln [5].

Bei der Adsorption handelt es sich um einen passiven Prozeß, der zum einen durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Liposom- und Zelloberfläche, zum anderen rezeptorvermittelt ausgelöst werden kann. Die Adsorption ist in vielen Fällen Ausgangspunkt für eine Vielzahl weiterer Prozesse, es kann jedoch auch bei einer kompletten Trennung zwischen Liposomeninhalt bzw. -lipidkomponenten und der Zelle bei einer Adsorption stabiler, intakter Vesikel bleiben. Nicht alle zellassoziierten Liposomen müssen zwangsläufig auch internalisiert werden, aber eine Internalisierung kann nur als Resultat einer vorhergegangenen Adsorption stattfinden. Welche Faktoren/ Mechanismen dann letztendlich ausschlaggebend dafür sind, ob ein Vesikel aufgenommen wird oder nicht, ist noch nicht vollständig geklärt. Verbleibt das Vesikel nach seiner adsorptiven Bindung zunächst intakt auf der Zelloberfläche, so ist ein Intermembrantransfer zwischen den beiden Phospholipidbilayern möglich. Dieser Lipidaustausch (v.a. PE,PC) kann zu einer Störung der Membranintegrität und damit auch zu einem Ausfluß der Vesikel führen [71]. Eine ähnliche Interaktion ist auch im Plasma zwischen Liposomenbilayer und Lipoproteinen möglich, woraus eine Aufteilung der Vesikellipidkomponenten auf die einzelnen Lipoproteine resultiert (v.a. HDL, siehe Kap. 2.1).

Desweiteren kann nach einer Adsorption eine sog. Kontaktfreisetzung stattfinden. Sie ist die Folge einer durch den Zell-Liposomenkontakt bedingten Permeabilitätserhöhung der Vesikelmembran. Der Liposomeninhalt wird extrazellulär freigesetzt und kann anschließend in die Zelle gelangen. Dieser Weg ist vor allem für nicht endozytotisch aktive Zellen von Bedeutung und stellt für sie eine Möglichkeit zur Aufnahme liposomal transportierter Stoffe,

ohne zwingend erforderliche Internalisierung des gesamten Vesikels, dar. Auf dem Prinzip der Kontaktfreisetzung beruht die Idee der sog. „Target-sensitiven“ Immunliposomen [72-74]. Ihre Hauptlipidkomponente stellt DOPE dar, welches allein nicht in der Lage ist, intakte Vesikel zu bilden. Erst durch den Zusatz eines „Stabilisators“ entstehen intakte Liposomen. Zur Stabilisation geeignet sind u.a. Antikörper-Lipidkonjugate. Erfolgt nun die Bindung des konjugierten Antikörpers an das entsprechende Oberflächenantigen der Zelle, so resultiert ein spontaner Zerfall der Liposomen unter Freisetzung des eingeschlossenen Inhaltes. Die effektive Ausnutzung einer Kontaktfreisetzung zur Anreicherung eines liposomal verkapselten Wirkstoffes an einem bestimmten Zielgewebe setzt zum einen voraus, daß die Bindung des Liposoms an der Zielzelle dauerhaft ist. Zum anderen müssen die Flußbedingungen im umgebenden Medium passen, d. h. möglichst wenig Turbulenzen, so daß der freigesetzte Wirkstoff auch Zeit für eine Diffusion ins Gewebe hat und nicht sofort weggespült wird. Als vorteilhaft erweist sich in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß in Blutgefäßen die Strömungsgeschwindigkeit ausgehend von der Gefäßmitte zur Gefäßwand hin stetig abfällt.

Die Adsorption stellt auch für die Membranfusion von Liposomen mit der Zellmembran eine essentielle Voraussetzung dar. Im Verlauf des Fusionsprozesse erfolgt eine Inkorporation der liposomalen Lipide in die Plasmamembran der Zelle und eine Freisetzung des liposomalen Inhaltes direkt ins Zytoplasma. Bei multilamellaren Vesikeln kann auch nur die äußere Bilayer betroffen sein und es gelangen intakte kleinere Liposomen ins Zytoplasma. Fusionsprozesse können durch den Einbau fusogener Stoffe (z.B. Lysolecithin, Detergenzien) in die Liposomenmembran induziert werden. Eine effektive verbreitete Methode nutzt Sendai-Virus-Fusionsproteine [75]. Unter in vivo-Bedingungen stellt die Fusion neben der Phagozytose eine sehr effektive Internalisierungsmöglichkeit dar, mit deren Hilfe große Menge liposomalen Materials in die Zelle aufgenommen werden können. Im Hinblick auf ein effektives Drug Delivery System ist zu beachten, daß bei einem Fusionmechanismus die aufgenommene Wirkstoffmenge proportional zur zellgebundenen Lipidmenge ist, während für den Fall der Endozytose eine Sättigungsgrenze besteht.

Die Endozytose ist ein aktiver Prozeß, in deren Verlauf sich lokalisierte Abschnitte der Zellmembran nach innen einstülpen, sich abschnüren und endozytotische Vesikel bilden. Die Größe der gebildeten Vesikel bildet die Grundlage der Einteilung der Endozytose in zwei Haupttypen: Pinozytose und Phagozytose. Endozytose kann entweder konstitutiv ablaufen oder als Antwort auf einen extrazellulären Reiz [76].

Im Rahmen der Phagozytose erfolgt die Aufnahme größerer Partikel, z.B. Mikroorganismen oder Teile überalterter Zellen. Die Größe der aufnehmenden Vesikel kann > 250nm betragen und variiert mit dem aufzunehmenden Material. Die Phagozytose ist die Aufgabe spezialisierter, phagozytierender Zellen („Freßzellen“). Die Hauptfunktionen dieser Zellen bestehen im Infektionsschutz (Mikroorganismen) und in der Beseitigung geschädigter oder überalterter Zellen (z.B. Erythrozyten) im Körper. Nach Aufnahme von Material verschmelzen die gebildeten Phagosomen mit Lysosomen und der Abbau beginnt. Voraussetzung für eine phagozytotische Aufnahme ist stets die Bindung der Partikel auf der Oberfläche der Freßzellen. Dafür steht ein Spektrum spezialisierter Rezeptoren zur Verfügung. Am bekanntesten ist der Fc-Rezeptor zur Anbindung von Antikörpern, es existieren jedoch auch Rezeptoren zur Erkennung des Komplementsystem sowie von Kohlenhydratstrukturen auf Mikroorganismen. Die Phagozytose verläuft also nicht konstitutiv, sondern bedarf aktivierter Rezeptoren, die die Reaktion durch Weiterleitung eines Signals ins Zellinnere auslösen.

Im Gegensatz dazu erfolgt im Rahmen der Pinozytose eine ständige, konstitutive Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Stoffen. Praktisch alle Eukaryontenzellen sind dazu befähigt. Die Größe pinozytotischer (endozytotischer) Vesikel liegt unter 150-200nm. Die endozytotische Aufnahme beginnt in spezialisierten Bereichen der Zellmembran. Dabei handelt es sich um Einstülpungen der Plasmamembran, die auf ihrer dem Zytoplasma zugewandten Innenseite mit einem dichtgepackten Material (das Protein Clathrin als

Hauptbestandteil) ausgekleidet sind. Die sog. clathrin-coated pits belegen ca. 2% der Membrangesamtfläche und sind sehr kurzlebig. Es vergeht nach ihrer Bildung ungefähr eine Minute, in der sie sich unter Bildung von sog. clathrin-coated vesicles einstülpen und abschnüren. Innerhalb weniger Sekunden streifen die Vesikel ihre Clathrinhülle ab und verschmelzen mit frühen Endosomen. Der spezielle Aufbau der Clathrinhülle ist die treibende Kraft zur Einstülpung. Im Verlauf der Membraneinstülpungen kommt es relativ unspezifisch zum Einschluß / zur Aufnahme von Flüssigkeiten und darin gelösten Stoffen in die Zelle. Dieser Vorgang wird als Flüssigphasen-Endozytose bezeichnet. Eine weitere unspezifische Form ist die adsorptive Endozytose, in dessen Verlauf sich das aufzunehmende Material auf der Grundlage elektrostatischer Kräfte in den clathrin-coated pits anreichert.

Dem gegenüber steht die spezifische Form der Pinozytose, die rezeptorvermittelte Endozytose. Damit ist eine Selektierung spezifischer Makromoleküle aus dem extrazellulären Medium durch Bindung an komplementäre Zelloberflächen-Rezeptoren möglich. Infolge der Bindung kommt es zu einer Anreicherung der Makromoleküle in den clathrin-coated Pits und sie gelangen konzentriert als Rezeptor-Ligand-Komplex über die clathrin-coated Vesicles in das Zellinnere. Beachtlicherweise kann die Plasmamembran eines clathrin-coated Pits bis zu 1000 verschiedenen Rezeptoren unterschiedlichen Typs Platz bieten.

Die clathrin-coated vesicles verschmelzen nach ihrer „Häutung“ mit den dicht unter der Plasmamembran lokalisierten frühen Endosomen. Der pH-Wert im Innenraum des Endosomenkompartiments beträgt ~ 6 , denn in der Endosomenmembran befinden sich ATP-getriebene H^+ -Pumpen, die einen H^+ -Einstrom aus dem Zytosol bewirken. Das saure Milieu führt in den meisten Fällen zu einer Konformationsänderung der Rezeptorproteine und damit zu einer Abdissoziation der Liganden. Freie Rezeptoren kehren in Transportvesikeln entweder zur ursprünglichen Membrandomäne zurück (Recycling) oder sie werden zu einer neuen Domäne transportiert (Transzytose). Nach 5-15 min erfolgt der Transport der frühen Endosomen mit den dissoziierten Liganden und anderen nichtmembrangebundenen Inhaltsstoffen in das Zellzentrum. Vermittelt wird dieser Transport zu den späten Endosomen von großen endosomalen Carriervesikeln, die auch als multivesikuläre Körper bezeichnet werden. Es ist bislang noch nicht geklärt, ob es sich bei diesen Carriervesikeln um reifende Endosomen oder separate, zwischengeschaltete Transportkompartimente handelt. Die Bewegung verläuft entlang von Mikrotubuli und ist damit durch Mikrotubuli depolymerisierende Substanzen hemmbar. Durch Fusion der späten Endosomen mit enzymgefüllten Golgi-Vesikeln entstehen letztendlich die Lysosomen, die eigentlichen Verdauungskompartimente. In ihrem Inneren herrscht ein pH $\sim 5,5$. In manchen Fällen werden Rezeptor und Ligand auch gemeinsam, ohne vorherige Dissoziation, in den Lysosomen abgebaut. Das führt zu einer Rezeptor-Down-Regulation. Polare Epithelzellen, zu denen die Gefäßendothelzellen zählen, besitzen sowohl ein apikales als auch ein basolaterales frühes Endosomenkompartiment, beide münden in ein gemeinsames spätes Kompartiment. Endozytotische Vorgänge sind demzufolge an beiden Polen einer Endothelzelle möglich.

Die morphologischen Gegebenheiten endozytotisch aktiver Zellen, vor allem das Innenvolumen der aufnehmenden Membranvesikel, beschränken natürlich streng die Größe endozytierbarer Partikel. Dieser Punkt erklärt die Notwendigkeit der Einhaltung ganz konkreter Liposomenparameter, sobald eine Internalisierung über endozytotische Mechanismen angestrebt wird. Neben der Vesikelgröße spielen auch die Lipidzusammensetzung, Ladungsverhältnisse sowie die Funktionalisierung von Liposomen mit spezifischen Liganden für Endozytoserezeptoren eine entscheidende Rolle. Der Einfluß einzelner Parameter speziell auf die Endozytose durch Endothelzellen wird im Kapitel 2.4 näher beschrieben werden.

An dieser Stelle sollen nun verschiedene Methoden zum Nachweis bzw. zur Differenzierung zwischen den einzelnen Wechselwirkungsmöglichkeiten Liposom / Zellen ohne Anspruch auf Vollständigkeit vorgestellt werden. Eine Auswahl dieser Methoden wurde im Rahmen der experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit verwendet.

Zur Differenzierung zwischen einer einfachen adsorptiven Bindung eines Liposoms und einem Lipidaustausch zwischen Liposomen- und Zellmembran bietet sich die Verwendung radioaktiv markierter Lipide an [71]. Zur Minimierung des häufigen Problems eines spontanen Wechsels von Phospholipiden zwischen den Membranen ohne intensiveren bzw. längeren Kontakt, verwendet man hauptsächlich Cholesterolalkylether. Diese zeigen keinen spontanen Austausch und sind zudem nicht metabolisierbar.

Von größerer Bedeutung wird in vielen Fällen die Frage sein, ob ein Liposom von einer Zelle internalisiert wird oder nur oberflächlich gebunden vorliegt. Die prinzipielle Trennung beider Zellosoziationszustände gelingt auf mikroskopischem Wege bspw. mit Hilfe der Dithionitmethode (siehe auch Kap. 4.3.2.1). Sie beruht auf der Tatsache, daß Natriumdithionit stark fluoreszierende NBD-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4yl-) lipide zu nichtfluoreszierenden ABD-(7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4yl-) lipiden reduzieren kann [77,78]. Verwendet man nun Liposomen, die ausschließlich in ihrer äußeren Monolayer Farbstoffmoleküle tragen, so wird die Fluoreszenz oberflächlich gebundener Liposomen nach Dithionitbehandlung gelöscht, wogegen die Farbstoffmoleküle internalisierter Liposomen aufgrund der Unfähigkeit des geladenen Dithionions zur Permeation durch Membranbilayern einer Reduktion entgehen. Eine weitere Möglichkeit bietet die sog. „Acid-Wash“-Methode. Oberflächlich gebundene Liposomen, die in ihrem Inneren einen wasserlöslichen Fluoreszenzmarker (z.B. Calcein) enthalten, erfahren durch die kurzfristige Behandlung mit einem sauren Puffer (pH~3) eine Membranschädigung und geben den eingeschlossenen Farbstoff frei. Internalisierte Liposomen bleiben von der Behandlung unberührt und sind im Fluoreszenzmikroskop aufgrund des eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar [56]. Die beiden genannten Methoden erlauben mit einer anschließenden fluorimetrischen Auswertung auch eine quantitative Bestimmung internalisierter Lipidmengen. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenztechnik ist die Aufspaltung einer Zelle in mehrere virtuelle Zellebenen möglich (siehe auch Kap. 4.3.2.2). Der Nachweis von fluoreszierendem liposomalen Material in den mittleren (inneren) Zellebenen liefert einen weiteren Beweis für eine Internalisierung. Ein direkter Weg zur Untersuchung einer Liposomeninternalisierung ist die optische Verfolgung der Liposomen mittels Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten. Dafür eignen sich Ferritin [80,81], Meerrettich-Peroxidase [82,83] oder kolloidales Gold [84]. Eingeschlossene Metallatome, z.B. Cr^{3+} erlauben in ähnlicher Weise eine Verfolgung des Liposomenschicksals mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie in Verbindung mit der Röntgenmikroanalyse.

Eine Internalisierung von Liposomen kann ebenfalls über den durch eine eingeschlossene Substanz ausgelösten Effekt (z.B. Zytotoxizität) nachgewiesen werden, unter der Voraussetzung einer intrazellulären Freisetzung und eines intrazellulären Angriffspunktes der Substanz. Zur quantitativen Bestimmung internalisierter Lipidmengen bzw. zur Trennung einer zellosoziierten Lipidmenge in internalisierten und gebundenen Anteil eignet sich die Verwendung der Enzyms Pronase [79]. Mit dessen Hilfe ist die Ablösung gebundener, markierter Liposomen von der Zelloberfläche und anschließend ihre quantitative Bestimmung möglich. In der verbleibenden Zellfraktion wird nach deren Homogenisierung der internalisierte Anteil bestimmt (siehe auch Kap. 4.3.2.5). Eine weitere mögliche Methode ist die Messung des Abbaus liposomal verkapselter metabolisierbarer Marker. Als lipophiler Marker kommt dabei z.B. an den Methylgruppen des Cholinanteils markiertes Sphingomyelin in Frage. Im Verlauf der Metabolisierung des Sphingomyelins erfolgt eine Übertragung der Cholinkopfgruppe auf PC. Eine quantitative Bestimmung des markierten PC-Anteils gibt Auskunft über den Internalisierungsgrad der Liposomen [85]. Als hydrophile Marker eignen sich vor allem Proteine, die innerhalb des Lysosomenkompartimentes der Zelle einen Abbau zu den Aminosäuren erfahren. Die Internalisierung eines Liposoms über einen endozytotischen Mechanismus läßt sich auch unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure, Pyranin) quantifizieren. Aufgrund der Tatsache, daß diese Methode im Rahmen der Arbeit intensiv genutzt wurde, soll der Farbstoff an dieser

Stelle etwas ausführlicher vorgestellt werden. Pyranin ist ein pH-Indikator, welcher bei niedrigen pH-Werten praktisch farblos ist. Steigt jedoch der pH-Wert, so ändert sich die Farbe zu einem fluoreszierenden Gelb-Grün. Abb. 1 zeigt die Formel des Pyranins. Die Hydroxygruppe ist für die pH-abhängige Farbänderung allein verantwortlich. Die Sulfonsäuregruppen haben daran keinen Beitrag, da sie innerhalb des untersuchten pH-Bereiches stets vollständig deprotoniert vorliegen. Sie sind jedoch für andere entscheidende Eigenschaften des Farbstoffes verantwortlich. Die Sulfonsäurereste sind hydrophil und erhöhen somit die Wasserlöslichkeit des aromatischen Ringsystems. Indem sie deprotoniert vorliegen, verleihen sie dem Molekül eine negative Ladung, so daß eine Diffusion durch eine Bilayermembran praktisch nicht stattfindet. Bei einer Endozytoseuntersuchung unter Verwendung des Pyranins wird nun die pH-Verschiebung von pH 7,4 (extrazelluläres Medium) zu pH 5,5 (Lysosomenkompartiment), welcher der Farbstoff auf dem endozytotischen Weg ausgesetzt ist, ausgenutzt. Der zum pH-Ausgleich führende Protonentransfer durch die Liposomenmembran erfolgt innerhalb von Sekunden. Für eine quantitative Internalisierungsbestimmung werden die pH-abhängigen Änderungen im Fluoreszenzanregungsspektren des Farbstoffes beobachtet und die Fluoreszenzintensitätsunterschiede bei bestimmten Anregungswellenlängen ausgewertet. Eine genaue Beschreibung der Methode anhand des Fluoreszenzanregungsspektrum erfolgt in Kapitel 4.3.

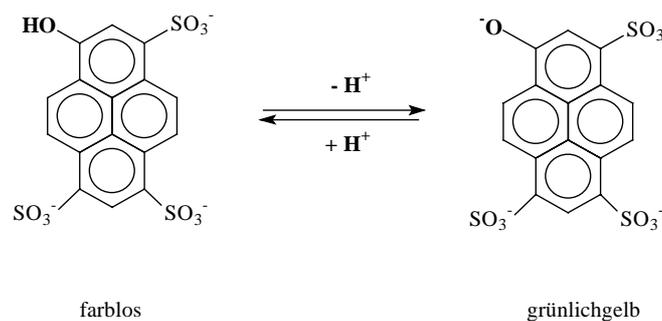


Abb. 1: Der Fluoreszenzfarbstoff HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure, Pyranin)

Da es sich bei der Endozytose um eine aktive Leistung der lebenden Zelle handelt, zeigt sie eine Temperaturabhängigkeit. Bei 37°C verläuft sie optimal, während bei 4°C keine endozytotische Aktivitäten nachweisbar sind. Diese Abhängigkeit ermöglicht eine Differenzierung von den passiven Vorgängen der Adsorption und der Fusion. Der separate Nachweis von parallel zu einer Endozytose ablaufenden Zell-Liposomen-Wechselwirkung gelingt auch durch eine gezielte Hemmung der Endozytose mit Inhibitoren. Dazu gehört bpsw. Cytochalasin B, welches eine Hemmung der Endozytose über eine Depolymerisation des Aktins bewirkt [86,87]. Weitere metabolische Inhibitoren sind Natriumazid und Desoxyglucose. Über eine Hemmung der Fusion von Endosomen mit Lysosomen inhibieren Ammoniumchlorid und Chlorochin die Endozytose [88]. Der Nachweis einer endozytotischen Aufnahme über einen ganz bestimmten Rezeptor gelingt mit der Verwendung spezieller Blockierungssubstanzen für die einzelnen Rezeptortypen, z.B. Polyinosinsäure für Scavenger-Rezeptoren [89], hitzeaggregiertes IgG für Fc-IgG-Rezeptoren und Methylmannose für Mannoserezeptoren [90].

Unter in vivo-Bedingungen stellt die Fusion neben der Phagozytose eine sehr effektive Internalisierungsmöglichkeit dar. Der klassische Fusionsnachweis verwendet die Farbstoffe 6-Carboxyfluorescein oder Calcein. Dabei nutzt man die Tatsache, daß diese wasserlöslichen Farbstoffe bei hohen Konzentrationen (>100mM) einem Selfquenching-Effekt unterliegen. Adsorbierte Liposomen, in deren Innenraum die Farbstoffe stark konzentriert vorliegen, fluoreszieren nicht. Erfolgt jedoch eine Fusion von Vesikel- und Zellmembran, tritt der

Farbstoff aus und erfährt im Zytosol eine massive Verdünnung mit dem optischen Ergebnis einer diffusen Fluoreszenz über den gesamten Zellkörper. Werden die Liposomen dagegen über einen endozytotischen Mechanismus aufgenommen, so zeigt sich eine punktuelle Fluoreszenz der Kompartimente des lysosomalen Systems.

Während eine Membranfusion in den meisten Fällen mit einer Zerstörung der Liposomen verbunden ist, ist es bei einer endozytotischen Aufnahme durchaus möglich, daß intakte Vesikel im Zytosol vorliegen. Eine Unterscheidung zwischen intakten und degradierten Liposomen innerhalb der Zelle wird mit Hilfe einer Doppelmarkierung der Liposomen möglich. Eine Variante nutzt die radioaktive Doppelmarkierung mit ^{22}Na und $^{51}\text{Cr}/\text{EDTA}$. Solange die Liposomen intakt vorliegen, bleibt das Verhältnis beider Marker konstant, bei einer Degradierung der Vesikel wird jedoch freigesetztes Natrium von den meisten Zellen über die Na^+/K^+ -Pumpe ausgeschieden, wohingegen Chrom innerhalb der Zelle verbleibt. Ein Absinken des Verhältnisses von $^{22}\text{Na}/^{51}\text{Cr}/\text{EDTA}$ zeigt eine Zerstörung der Vesikel innerhalb der Zelle an. Eine weitere Variante nutzt die Doppelmarkierung mit zwei Fluorophoren. Ein wasserlöslicher Farbstoff (z.B. FITC-Dextran) ist im Innenraum der Vesikel und ein zweiter lipophiler Marker in der Membran (Rhodamin-PE) lokalisiert. Eine Kolo-kalisation beider Farbstoffe in einem bestimmten Zellbereich weist auf das Vorhandensein intakter Liposomen hin.

Wie bereits erwähnt, ist die Akkumulation von Liposomen am Wirkort zwar eine wichtige Voraussetzung aber kein Garant für einen therapeutischen Effekt des transportierten Wirkstoffs, so daß die Klärung des weiteren „Schicksals“ der Liposomen nach Erreichen des Wirkortes eine zentrale Frage bei jeder Anwendung von Liposomen ist.

In welcher Art und Weise die im Rahmen dieser Arbeit präparierten Immunliposomen mit ihren entsprechenden Zielzellen interagieren, wird Gegenstand des Kapitels 4.3 sein. Eine detailliertere Erläuterung der dabei verwendeten Methoden zur Identifizierung bzw. Differenzierung zwischen den einzelnen Interaktionsmöglichkeiten Zelle-Liposom erfolgt in den entsprechenden Abschnitten dieses Kapitels.

2.3 Entzündung und antiinflammatorische Therapie

Pathophysiologie der Entzündung mit besonderer Berücksichtigung der Leukozyten-Adhäsionskaskade, Innovationen und Perspektiven der antiinflammatorischen Therapie

Der chronische Verlauf von Erkrankungen bedingt die Tatsache, daß diese über längere Zeiträume z.T. intensiv medikamentös behandelt werden müssen, wodurch die Gefahr schwerwiegender systemischer Nebenwirkungen steigt. Die Therapie chronischer Erkrankungen würde deshalb, in gleicher Art und Weise wie die Krebsbekämpfung vom Einsatz sog. Drug Delivery Systeme mit dem Ziel eines gerichteten Transports von Wirkstoffen an die Zielzellen mit reduzierter Beeinflussung gesunder Zellen profitieren.

Als potentielle Anwendungsgebiete treten dabei vor allem die chronischen Entzündungskrankheiten hervor, wie z.B. die rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und das Asthma bronchiale. Diese Erkrankungen haben einen hohen und ständig wachsenden Verbreitungsgrad unter der Bevölkerung (z.B. rheumatoide Arthritis: 2-3 Prozent der Bevölkerung) und bedingen eine z.T. extreme Einschränkung der Lebensqualität für den Betroffenen. Die Suche nach Ansatzpunkten für eine innovative antiinflammatorische Therapie eröffnet somit ein sehr sinnvolles und lohnenswertes Forschungsgebiet.

Die Grundlage dafür bildet die Identifizierung der verschiedenen pathologischen Vorgänge während einer Entzündungsreaktion, um daraus spezifische Beeinflussungsstrategien entwickeln zu können.

Im folgenden Abschnitt soll die Entzündungsreaktion allgemein, mit ihr verbundene charakteristische zelluläre Ereignisse, beteiligte Mediatorsysteme und Rezeptoren behandelt werden. Vor diesem Hintergrund werden verschiedene aktuelle Strategien der antiinflammatorischen Therapie genannt und ein völlig neuartiger, sehr hoffnungsvoller Ansatzpunkt vorgestellt.

Eine Entzündung ist eine örtliche, in einer bestimmten Reihenfolge ablaufende Reaktion des Gefäßbindegewebes als Antwort auf schädliche Noxen unterschiedlichster Art (chemisch/physikalisch, Infektion). Die entzündliche Reaktion ist durch 5 Hauptsymptome gekennzeichnet: Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Übererwärmung (Calor), Schmerz (Dolor) und eine gestörte Funktion (Functio laesia).

Hervorgerufen durch eine Zellschädigung erfolgt zu Beginn einer Entzündungsreaktion die Freisetzung von Mediatorstoffen. Mediatoren sind Substanzen, die aus Zellen oder Zellverbänden freigesetzt werden und unmittelbar auf benachbarte Zellen einwirken. In der ersten Phase der Reaktion, der sog. Exsudationsphase tritt durch Gefäßdilataion und damit verbundener Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes eine Störung der Durchblutung der terminalen Strombahn auf. Infolge einer erhöhten Endothelpermeabilität findet ein massiver Austritt von Blutplasma in den extrazellulären Raum statt. Die regionale Kreislaufstörung ist für die beiden Symptome Rötung und Übererwärmung verantwortlich, wogegen die Schwellung Folge des Plasmaaustrittes ist. Die Schwellung ihrerseits bedingt Störungen in der Funktion der betroffenen Region. Als Folge der Erregung von Schmerzrezeptoren durch die Mediatorstoffe tritt das Symptom Schmerz auf. In der zweiten Phase der Entzündungsreaktion, der sog. Emigrations- und Proliferationsphase erfolgt eine Emigration von Blutzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten) in den extrazellulären Raum sowie eine Vermehrung von Histiozyten und Fibroblasten. Im betroffenen Gewebe vermitteln die eingewanderten Blutzellen nachfolgend die zelluläre Immunabwehr.

In Bezug auf den zeitlichen Ablauf ist zwischen akuter und chronischer Entzündung zu unterscheiden. Bei den akuten Entzündungen verläuft die Reaktion sehr stark und ihr Ablauf ist zeitlich begrenzt. Chronische Entzündungen können sich aus akuten Reaktionen entwickeln, wenn die Abwehrmechanismen des Organismus die anfängliche Schädigung nicht beseitigen konnten bzw. die Schädigung anhält. Eine primär chronische Entzündung entwickelt sich dagegen von Anfang an sehr langsam und zeigt einen langandauernden Verlauf. An akuten Entzündungen sind hauptsächlich Granulozyten beteiligt, während das zelluläre Infiltrat im Rahmen einer chronischen Reaktion vor allem aus Makrophagen und Lymphozyten besteht.

Der Schwerpunkt dieses Abschnittes soll auf der Vorstellung der Rezeptorfamilie der Selektine und ihrer, durch Initiierung der Leukozytenadhäsionskaskade zu Beginn der zweiten Phase der Entzündungsreaktion, zentralen Stellung innerhalb des Entzündungsgeschehens liegen. Die Beschreibung der Entzündungsfrühphase erfolgt aus diesem Grund nur stark verkürzt, wohingegen die Vorgänge der sog. Emigrations- und Proliferationsphase detaillierter behandelt werden.

Die Frühphase einer entzündlichen Reaktion wird durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus den Mastzellen eingeleitet. Der Hauptmediator der Mastzellen ist Histamin. Durch Bindung an seine H_1 -Rezeptoren bewirkt es eine Relaxation der glatten Muskelzellen in den Gefäßen, hauptsächlich betroffen sind präkapilläre Arteriolen. Der Vasodilatation zeitlich etwas nachgeordnet, kommt es durch Kontraktion der Endothelzellen zur Lücken-(gaps) Bildung zwischen ihnen und damit zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität. Ort des Plasmaaustrittes sind hauptsächlich die postkapillären Venolen. Von den Mastzellen werden weiterhin verschiedene Proteine (u.a. chemotaktischer Faktor für Neutrophile), Peptide (u.a. chemotaktischer Faktor für Eosinophile) und Enzyme (u.a. Proteasen zur Aktivierung des Kininsystems) freigesetzt. Die Wirkungen der Kinine

(Bradykinin, Kallidin, Methionylkallidin), die ebenfalls zu den Entzündungsmediatoren der Frühphase gehören, sind für alle 3 Vertreter etwa gleichartig und umfassen neben einer Dilatation präkapillärer Arteriolen und einer Permeabilitätssteigerung kleiner Gefäße auch eine chemotaktische Wirkung auf Granulozyten sowie die Schmerzproduktion. Bradykinin bewirkt desweiteren durch die Aktivierung von Phospholipasen die Bildung des Mediatorsystems der Spätphase, die Eicosanoide. Zu den Eicosanoiden, den Oxidationsprodukten der Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure) gehören die Prostaglandine, Prostacyclin, die Leukotriene sowie die Thromboxane. Das Wirkspektrum dieser Substanzen ist breitgefächert und entspricht z. T. auch dem der Mediatoren der Frühphase. Allerdings werden sie im Unterschied zu diesen oft erst im späteren Entzündungsverlauf freigesetzt.

Durch Freisetzung sog. chemotaktischer Substanzen im geschädigten Gewebe akkumulieren im weiteren Verlauf des Entzündungsgeschehens zunächst neutrophile Granulozyten, später Monozyten und Lymphozyten innerhalb der Venolen und Kapillaren des entzündeten Bereiches. Damit beginnt die sog. Infiltrationsphase. Die akkumulierten Entzündungszellen adhären zunächst am Endothel und wandern anschließend unter partieller Auflösung der Basalmembran in den entzündeten Gewebebezirk ein, wo sie die zelluläre Immunabwehr (v.a. Phagozytose) vermitteln.

Mit Ausnahme von PAF (Plättchen aktivierender Faktor) handelt es sich bei den chemotaktisch aktiven Stoffen meist um Proteine oder Fettsäureoxidationsprodukte (Eicosanoide). Sie werden von Bakterien, Mastzellen, Phagozyten (z.B. PAF, Peptide Fettsäureprodukte), basophilen Granulozyten, Lymphozyten (Lymphokine) freigesetzt oder entstehen u.a. bei der Komplementaktivierung, Kininfreisetzung bzw. sind direkte Produkte der Zell- und Gewebeschädigung (Proteolyseprodukte, Collagenspaltprodukte). Die Akkumulation von Entzündungszellen im betroffenen Gebiet ist somit durch eine breite Palette unterschiedlicher Substanzen abgesichert.

Weitere wichtige Entzündungsmediatoren stammen aus der Substanzfamilie der Zytokine. Dabei handelt es sich um regulatorisch wirkende Proteine und Glykoproteine, die von mehreren Zelltypen (Lymphozyten: Lymphokine, Monozyten/Makrophagen: Monokine) gebildet werden können und über membranständige Rezeptoren agieren. Zu ihnen gehören die Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und koloniestimulierende Faktoren.

Unter den Interleukinen spielt vor allem Interleukin-1 (IL-1) im Rahmen des Entzündungsgeschehens eine entscheidende Rolle. Hauptproduzenten sind alle Makrophagen nach Stimulation, aber auch für Endothelzellen wurde die Synthese von IL-1 nachgewiesen. Die Wirkungen von IL-1 sind vielfältig und können zusammenfassend als Verstärkereffekte auf immunologische und entzündliche Reaktionen charakterisiert werden.

Innerhalb der Tumornekrosefaktoren unterscheidet man die beiden verschiedenen Substanzen $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TNF}\beta$. Die Tumornekrosefaktoren besitzen zahlreiche biologische Funktionen, u.a. induzieren sie *in vitro* und *in vivo* das Absterben von Tumorzellen bzw. -geweben (Namensgebung), weiterhin spielen sie eine zentrale Rolle bei Immunreaktionen. Ihre Sekretion wird durch IL-1 stimuliert. Tumornekrosefaktoren können an zwei verschiedene Rezeptoren binden, diese liegen sowohl als monomere Moleküle an der Zelloberfläche (alle Körperzellen außer Erythrozyten) als auch in löslicher Form vor und binden sowohl $\text{TNF}\alpha$ als auch $\text{TNF}\beta$. Die physiologischen Wirkungen von TNF werden durch Bindung an die membranständigen Rezeptoren ausgelöst. Die löslichen Rezeptorproteine fangen freie TNF ab und wirken damit modulierend auf die TNF-Funktion. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden TNF zu einem sehr frühen Zeitpunkt gebildet und stehen am Anfang einer ganzen Kaskade von Zytokinen.

Eine komplexe Rolle innerhalb des Entzündungsgeschehens, vor allem des chronischen Entzündungsgeschehens spielt der Transkriptionsfaktor NF-kappa-B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$). Transkriptionsfaktoren regulieren die Synthese von Boten-RNA (m-RNA), indem sie das Ablesen der DNA im Zellkern beeinflussen. In einer unstimulierten Zelle befindet sich $\text{NF-}\kappa\text{B}$

in gebundener Form im Zytoplasma, durch Bindung an inhibitorischen Proteine (I-kappa-B α/β) wird sein Eindringen in den Zellkern verhindert. Kommt es jedoch zu einer Stimulation der Zelle bspw. durch Zytokine, Viren oder oxidativen Streß, wird der Faktor aus seiner gebundenen Form freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo er an spezifische Gensequenzen bindet und die Bildung verschiedener Proteine, die an inflammatorischen und immunologischen Prozessen beteiligt sind, induziert. Beispielsweise fördert NF- κ B die Biosynthese mehrerer Gene, die für die Bildung von Zell-Adhäsionsrezeptoren (u.a. E-/P-Selektin, siehe unten) sowie von proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , Interleukine, koloniestimulierende Faktoren), inflammatorischen Enzymen (COX-2, 5-LOX) und Rezeptoren (IL-Rez., T-Zell-Rez.) verantwortlich sind [102].

Nachfolgend sollen die zellulären Veränderungen im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion vorgestellt werden, denn eine Entzündung schließt immer die Aktivierung und Mobilisierung verschiedener Zellen des Immunsystems sowie deren Infiltration ins betroffene Gewebe ein. Der Prozeß der Extravasation von Leukozyten findet hauptsächlich in kleinen venösen Gefäßen (postkapilläre Venolen) statt, wird von einer Vielzahl sog. Zelladhäsionsmoleküle (CAM's) vermittelt und setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen. Nach einem initialen Kontakt fließender Leukozyten mit dem Endothel, dem sog. Tethering, findet ein Zellrollen entlang des Endothels statt. Aus der Rollbewegung heraus entwickelt sich eine feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel, welche wiederum die Voraussetzung für die abschließende Emigration der Zellen ins Gewebe durch die Endothelbarriere hindurch bildet.

Die vermittelten Adhäsionsrezeptoren werden entweder von den beteiligten Endothelzellen oder den Entzündungszellen exprimiert. Sie gehören zu den Rezeptorfamilien der Integrine (z.B.LFA-1, MAC-1), Selektine (E-, P-, L-Selektin) und der Immunglobulinsuperfamilie (z.B.PECAM-1, MadCAM-1).

Die initialen Prozesse der sog. Leukozytenadhäsionskaskade, das Tethering und das Rollen, werden durch die Rezeptorfamilie der Selektine vermittelt, auf deren Wirken die nachfolgenden Adhäsionsrezeptoren aufbauen. Die Familie der Selektine umfaßt drei verwandte Vertreter: P-Selektin, welches von Plättchen und Endothelzellen gebildet und gespeichert wird, L-Selektin mit konstitutiver Lokalisation auf den Mikrovilli von Leukozyten und E-Selektin, zu dessen Synthese Endothelzellen befähigt sind.

Die Entzündungsmediatoren Histamin und Thrombin bewirken in einer frühen Phase der Entzündung neben der bereits erwähnten lokalen Veränderung des Blutflusses auch die Freisetzung von P-Selektin. Dieses liegt in speziellen Speicherorganellen der Zellen (Weibel-Palade-Körper der Endothelzellen, α -Granula der Thrombozyten) in funktionsfähiger Form vor und gelangt innerhalb von 10 min an die Zelloberfläche. Somit vermittelt das P-Selektin den Frühkontakt mit den Leukozyten. Als korrespondierender P-Selektin-Ligand auf den Leukozyten fungiert PSGL-1 (P-selektin glycoprotein ligand-1). P-Selektin wird zusätzlich nach Zellaktivierung bspw. mit Zytokinen durch Aktivierung der Transkription neu synthetisiert. Ebenfalls als Antwort auf eine Zytokinaktivierung (v.a. IL-1, TNF- α) erfolgt zeitlich versetzt die Expression des E-Selektins. Dieser Selektinverteiler muß stets neu synthetisiert werden, seine Konzentration auf der Endotheloberfläche erreicht dadurch erst nach ca. 4-8 Stunden ein Maximum und geht anschließend innerhalb von 24 Stunden auf das Ausgangsniveau zurück. E-Selektin wird durch die Liganden ESL-1 (E-selectin ligand-1) und PSGL-1 auf den Leukozyten erkannt. Die Expression der Gene für E- und P-Selektin wird durch den bereits an früherer Stelle vorgestellten Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert.

Von der Leukozytenseite her wirkt das L-Selektin, welches konstitutiv auf fast allen Leukozytensubtypen vorkommt und auf den Mikrovilli der Zellen lokalisiert ist. Diese exponierte Lage erleichtert den Kontakt zu verschiedenen Endothelliganden (GlyCAM-1=Glycosylation-depend cell adhesion molecule-1, CD 34 und MadCAM-1=Mucosal

addressin cell adhesion molecule-1). L-Selektin wird innerhalb weniger Minuten nach der Leukozytenaktivierung von der Zelloberfläche proteolytisch wieder abgespalten. Der zugrundeliegende Mechanismus bzw. die auslösende Ursache für dieses Phänomen sind noch nicht bekannt, es wird jedoch von einer Adhäsion-modulierenden Funktion ausgegangen [50]. Durch die genannten Wechselwirkungen der einzelnen Selektinrezeptoren mit ihren Liganden erfahren die Leukozyten aus dem Blutfluß (Geschwindigkeit ca. 2mm/s) eine rollende Verlangsamung auf ca. 0,02mm/s entlang des Endothels. Die Selektine greifen also bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in die Chemotaxis der Leukozyten ein.

Auf diesen verlangsamten und dabei lokal konzentrierten Blutzellen kommt es nun im weiteren Verlauf des Entzündungsgeschehens zu einer Aktivierung von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Integrine, u.a. LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen-1, CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18). Für diese Aktivierung der Leukozyten sind endotheliale Mediatoren bspw. PAF und verschiedene Zytokine verantwortlich. Durch das Binden dieser Mediatoren an ihre Rezeptoren auf den Leukozyten erfahren die Leukozytenintegrine eine Konformationsänderung, die ihnen wiederum die Wechselwirkung mit ihren endothelialen Rezeptoren ermöglicht. Als Rezeptoren der Integrine auf der Endothelseite fungieren endotheliale Strukturen der Immunglobulinsuperfamilie, u.a. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). Diese werden ebenfalls als Antwort auf eine Zytokinstimulation ca. 12-24 Stunden bzw. 6-10 Stunden nach Ausbruch der Entzündungsreaktion auf den Endothelzellen des betroffenen Gefäßabschnittes exprimiert. Durch die Bindung der aktivierten Integrine an ihre endothelialen Rezeptoren wird eine feste Adhäsion der zuvor abgebremsten, rollenden Leukozyten am Endothel vermittelt. Die Entzündungszellen flachen sich daraufhin ab und können aufgrund ihrer Fähigkeit zum extremen Gestaltswandel zwischen den Endothelzell-junctions in die extrazelluläre Matrix eindringen. Die Hauptaufgabe der eingewanderten Entzündungszellen besteht in der Phagozytose, sie sind jedoch im Rahmen ihrer Abwehrfunktion auch zur Abgabe proteolytischer Enzyme, reaktiver Sauerstoffspezies und weiterer Zytokine befähigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die beschriebene Adhäsionskaskade der Leukozyten das Resultat des Zusammenwirkens einer Vielzahl verschiedener Rezeptoren darstellt, an deren Ausgangspunkt die Familie der Selektine steht. L- und P-Selektin vermitteln aufgrund ihrer schnellen Verfügbarkeit die Frühphase des initialen Zellrollens, während E-Selektin zeitverzögert, durch die erforderliche Neusynthese, eine Überleitung des Rollens in eine festere Adhäsion als Voraussetzung für die Einwanderung ins betroffene Gewebe bewirkt.

Bei den Selektinen handelt es sich um langgestreckte membrangebundene Glykoproteine. Der Name „Selektin“ leitet sich von „Lektin“, einer Sammelbezeichnung für zuckerbindende Proteine ab. Da zur Bindungsbildung Calcium notwendig ist, werden die Selektine den C-Typ-Lektinen zugeordnet. Alle drei Selektine besitzen eine homologe Struktur und bestehen aus 5 Domänen. Am N-Terminus befindet sich die Lektindomäne als eigentliche Kohlenhydraterkennungsregion. Im Anschluß daran folgt eine dem Epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Domäne (EGF), welche die Ligandenerkennung und -bindung durch Konformationsänderung des Rezeptors unterstützt. Die extrazelluläre Ausdehnung wird durch eine, bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl von „short consensus repeats“ geprägt. Es folgt eine transmembranäre Domäne und die Selektine enden C-terminal in einem, der Rezeptorverankerung dienenden, zytoplasmatischen Schwanz.

Die Liganden der Selektine sind mucinähnliche Strukturen, d.h. lang gestreckte Glykoproteine, an deren Serin- oder Threonin-reichem Proteingrundgerüst viele Kohlenhydrat-Seitenketten als die eigentlichen Bindungsepitope glykosidisch gebunden sind. Bei den Kohlenhydrat-Epitope handelt es sich um N-Acetylglucosamin-basierende Oligosaccharide in spezieller Verknüpfung mit Fucose und einer terminalen Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure). Eine herausragende Bedeutung als Bindungsepitop besitzt das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x (sLe^x, Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc-O-R) aus

Sialinsäure, Galaktose, Fucose und Glucosamin. Alle Selektine binden sLe^x nur mit sehr geringer Affinität (ca. 1mM), es wurden jedoch bisher keine besser bindende Kohlenhydrate identifiziert. Die gefundene hohe Bindungsstärke der Selektine zu den natürlichen Mucinliganden (ca. 100nM) kann strukturell heute noch nicht erklärt werden. Das Tetrasaccharid sLe^x dient als Standardligand für Struktur-Wirkungsbeziehungen zur Aufklärung der Bindungseigenschaften dieser Familie von Adhäsionsrezeptoren.

Eine Dysregulation der Selektine wurde bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen beobachtet. Beispielsweise konnte im Rahmen der myokardialen Ischämie eine verstärkte P-Selektin-Expression gezeigt werden. Diese Beobachtung stand im Zusammenhang mit einer pathologischen akuten Entzündung [103]. Im Rahmen der rheumatoiden Arthritis, der häufigsten chronisch entzündlichen Systemerkrankung des Bindegewebes, konnte eine starke Anreicherung von E-Selektin im rheumatoiden Gewebe und damit eine aktive Rolle dieses Rezeptors in der Pathogenese dieser Erkrankung nachgewiesen werden [104]. Weiterhin spielen die Selektine bei der Atherosklerose [105], die als entzündlich fibrotische Antwort auf die Akkumulation von cholesterolhaltigen Lipoproteinen in der Gefäßwand anzusehen ist, eine wichtige Rolle sowie bei diabetischen Gefäßschäden (Angiopathie) [106]. Desweiteren vermitteln die Selektine die Bindung verschiedener metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel mit resultierender Gewebeinvasion [107]. Im Rahmen diagnostischer Untersuchungen wird die verstärkte Selektinpräsenz in Entzündungsgebieten des Körpers zu deren Identifizierung genutzt (Einsatz radioaktiv markierter anti-Selektin-Antikörper) [99].

Die nachgewiesene Beteiligung der Selektine an der Entstehung verschiedener entzündlicher Erkrankungen sowie ihre zentrale Stellung innerhalb des Entzündungsgeschehens läßt die gezielte Beeinflussung der Selektine als hoffnungsvollen Ansatzpunkt für eine neuartige antiinflammatorische Therapie erscheinen. Dieser Gedanke findet auch in einer zur Zeit sehr regen Forschungsaktivität auf dem Gebiet der Selektine seine Bestätigung.

Prinzipiell ergeben sich mehrere Möglichkeiten für einen antiinflammatorischen Ansatz an den Selektinen. Zum einen ist eine direkte Inhibierung der Selektine durch Anti-Selektin-Antikörper oder kompetitive Selektininhibitoren möglich. Die Suche nach selektininhibierenden Wirkstoffen wird geprägt durch die Reduktion oder Modifizierung der Leitstruktur sLe^x. Durch Abwandlung des Tetrasaccharids konnten bereits einige Substanzen mit ähnlicher, vereinzelt sogar erhöhter Bindungsaffinität zu den Selektinen erhalten werden [108-110]. Eine zweite Strategie auf der Suche nach effektiven Selektininhibitoren orientiert sich an der sog. Multivalenzhypothese, die von einem Zusammenwirken mehrerer Einzelverbindungen mit dem Ziel der Bindungsverstärkung ausgeht [111]. Davon ausgehend erfolgte die Synthese verschiedenen oligo- und polymerer Verbindungen, in denen die einzelnen sLe^x Moleküle bzw. ihre Derivate über Trägermoleküle in engem räumlichen Kontakt stehen [112]. Die Inhibierung der Selektine mit spezifischen Antikörpern wurde u.a. von Elanham et al. versucht, und dabei beobachtet, daß Anti-E-Selektin-Antikörper erfolgreich die Akkumulation von Neutrophilen in hypersensitiverter Primatenhaut inhibieren [113]. Die Blockade der Selektine eröffnet die Möglichkeit eines sehr frühzeitigen und damit effektiven Eingreifens in die Chemotaxis von Entzündungszellen, die Ausbreitung einer beginnenden Entzündungsreaktion wird bereits in kurzem zeitlichem Abstand zu ihrer Initiierung nachhaltig gestoppt.

Ein besonderer Vorteil der vaskulären E- und P-Selektine ist aufgrund ihrer Expression auf den Endothelzellen auch ihre direkte räumliche Bindung an den Entzündungsort. Desweiteren werden beide Adhäsionsrezeptoren ausschließlich unter Entzündungsbedingungen exprimiert, sie zeigen unter normalen physiologischen Verhältnissen keine Grundlevel auf den Endothelzellen wie verschiedene andere Adhäsionsrezeptoren, bspw. ICAM-1 und VCAM-1.

Somit bieten sich die vaskulären Selektinen auch als attraktive Targetstrukturen zur gezielten Anreicherung von Liposomen im Entzündungsgebiet an.

Der Einsatz selektingerichteter Liposomen würde eine Kombination der positiven Transporteigenschaften der Liposomen mit den exzellenten Targeteigenschaften der vaskulären Selektine bedeuten. Antiinflammatorische Wirkstoffe können gezielt an das entzündete Gewebe transportiert werden. Zur Umsetzung dieser Idee wurden von Stahn et al. bereits erfolgreich sLe^x-funktionalisierte Liposomen verwendet [114]. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch die Funktionalisierung der Liposomen mit spezifischen Anti-Selektin-Antikörpern, womit eine Ausnutzung der im Kapitel 2.1 aufgeführten positiven Eigenschaften von Immunliposomen möglich wäre. Als besonders erfolgsversprechend gestaltet sich dieser Ansatzpunkt des liposomalen Targeting zu vaskulären Selektinen auch aufgrund der Tatsache, daß die Liposomen zur Erreichung ihrer molekularen Ziele das Gefäßsystem nicht verlassen müssen. Durch seine längere Aktivität im Gegensatz zum P-Selektin erscheint das E-Selektin als am besten geeignete Zielstruktur für ein antiinflammatorisches Drug Targeting. Mit den spezifisch zum Entzündungsgebiet transportierten Liposomen ist sowohl eine Anreicherung antiinflammatorischer Wirkstoffe am Ort des Krankheitsgeschehens möglich, desweiteren ist auch ein Belieferung der betroffenen Endothelzellen mit sog. Antisense-Oligonukleotiden zur nachfolgenden Down-Regulation der Expression weiterer Adhäsionsmoleküle am Entzündungsort denkbar. Beide Einsatzvarianten der selektingerichteten Immunliposomen könnten einer antiinflammatorischen Therapie entscheidende neue Impulse liefern.

Insgesamt gesehen zeigen sich derzeit auf der antiinflammatorischen Strecke viele neue Ansätze, während in der Vergangenheit für eine antiinflammatorische Therapie hauptsächlich die Substanzklassen der sog. Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAP) und die Glucocorticoide zur Verfügung standen. Die Entwicklung neuer Strategien wurde vor allem durch die detaillierte Untersuchung verschiedener proinflammatorischer Rezeptor-, Enzym- und Mediatorsysteme möglich. Vor diesem Hintergrund konnten auch für die klassischen Antiphlogistika z.T. neue Wirkmechanismen aufgedeckt werden.

Die Nichtsteroidalen Antiphlogistika wirken hauptsächlich über einen Eingriff in die Prostaglandinsynthese. Sie hemmen das Enzym Cyclooxygenase (COX), wodurch der Syntheseweg einer ganzen Reihe wichtiger Entzündungsmediatoren unterbrochen wird. Weiterhin gibt es für die einzelnen Vertreter dieser recht umfangreichen Wirkstoffklasse noch gewisse substanztypische Wirkungen. Der populärste Vertreter der NSAP, die Acetylsalicylsäure (ASS), inhibiert neben einer Hemmung der COX durch Acetylierung freier Aminogruppen in der Nähe des aktiven Zentrums die NFκB-Aktivierung, indem sie das Einwandern des Transkriptionsfaktors in den Zellkern verhindert oder den Abbau des Inhibitors (inhibitorische Proteine) blockiert.

Für den relativ neuen Wirkstoff Aceclofenac postuliert man eine Hemmung des Interleukins IL-1β und der Adhäsionsmoleküle. Dadurch wird die Leukozytenadhäsion am Endothel des entzündeten Gefäßes sowie die darauf aufbauende Leukozyteninfiltration unterdrückt.

Der molekulare Wirkmechanismus der Glucocorticoide bei Entzündungen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheinen auch Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Indem sie die Synthese von PAF, IL-1 und IL-2 sowie weiterer Mediatorstoffe reduzieren, wirken die Glucocorticoide auch als Hemmstoffe der Chemotaxis. Da die entzündungshemmende Wirkung der Corticoide relativ langsam eintritt, müssen Patienten mit chronischen Entzündungen oft über einen langen Zeitraum mit ausreichend hohen Wirkstoffdosen behandelt werden. Negativer Effekt dieser Dauertherapie sind die zahlreichen bekannten Nebenwirkungen (Symptome des Cushing-Syndroms, Osteoporosegefahr, diabetogene Wirkung, erhöhte Infektanfälligkeit, Atrophien von Muskulatur, Haut, Fettgewebe u.v.a.), die mit steigender Dosis zunehmen. Einen weiteren Ansatzpunkt für eine antiinflammatorische Therapie liefern die Leukotriene. Antileukotriene finden vorrangig im

Rahmen der Asthmabehandlung Verwendung. Eine Hemmung Leukotrien-abhängiger Wirkungen gelingt zum einen durch Blockade des für die Bildung verantwortlichen Enzyms 5-Lipoxygenase, z.B. durch Zileuton, zum anderen durch Blockade spezifischer an Arachidonsäure bindender Membranproteine bspw. durch BAY1005 [115]. Als Leukotrien-Rezeptor-Antagonist fungiert die Substanz Montelukast.

Zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, der häufigsten chronisch entzündlichen Systemerkrankung des Bindegewebes, stehen u.a. sog. Basisantirheumatika mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur Verfügung. Methotrexat bspw. reduziert die Proliferation von Lymphozyten sowie die Bildung von Rheumafaktoren (Anti-IgG-Antikörper), vermindert desweiteren die Zytokinsynthese und führt auch dadurch zu einer verringerten Lymphozyteninfiltration im Entzündungsgebiet. Die verwendeten Goldpräparate hemmen die Bildung endothelialer Adhäsionsmoleküle. In einer Studie von 1991 wurde z.B. eine verminderte synoviale Expression von E-Selektin (syn. ELAM-1) nach Applikation von Goldpräparaten nachgewiesen [116].

T-Lymphozyten spielen im Rahmen des chronischen Entzündungsgeschehens der rheumatoiden Arthritis eine entscheidende Rolle. Sie decken ihren Bedarf an Pyrimidinbasen im Gegensatz zu anderen Zellen vorwiegend durch Eigensynthese. Aktivierte Leukozyten haben gegenüber ruhenden einen 7-8 fach erhöhten Pyrimidinnucleotid-Bedarf. Der neuartige Wirkstoff Leflunomid hemmt die Dihydroorotatdehydrogenase, das Schlüsselenzym der De-novo-Pyrimidin-Biosynthese [2]. Zusätzlich bewirkt Leflunomid eine Blockade der TNF-abhängigen Aktivierung und Genexpression von NFκB. In der Folge wird dadurch wiederum die NFκB-abhängige Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen verhindert.

Das proinflammatorische Zytokin TNFα steht an der Spitze einer Kaskade von Zytokinen, die letztendlich zur Entzündung und Gewebeerstörung führen. Seine Hemmung stellt also eine sehr sinnvolle Strategie zur kausalen Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen dar. Das Einsatzgebiet TNFα hemmender Substanzen ist wiederum die Rheumatherapie. Erhöhte Konzentrationen von TNFα in Synovialgewebe bzw. -flüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis korrelieren eindeutig mit der Schwere und der entzündlichen Aktivität der Krankheit. Zur Neutralisierung des Tumornekrosefaktors stehen verschiedene monoklonale Antikörper zur Verfügung. Bei Infliximab handelt es sich um einen „chimären“ Antikörper. Die Kombination von Infliximab mit Methotrexat zeigt einen synergistischen Effekt. Das Basisantirheumatikum supprimiert wahrscheinlich die Produktion von humanen Antikörpern gegen das Mausprotein. Der „humanisierte“ TNFα-Antikörper CDP 571 (Celltech) enthält noch weniger Mausproteinanteile und seit kurzem steht Literaturangaben zufolge auch ein mausproteinfreier, gänzlich humaner Antikörper zur Verfügung [118]. Etanercept ist ein TNFα-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein, d.h. ein rekombinanter löslicher TNFα-Rezeptor, der im Blut zirkuliert und TNFα abfängt. Da der Rezeptor allein nur eine HWZ von 30 s besitzt, erfolgte eine gentechnische Kopplung an die Fc-Domäne von humanem IgG mit dem Resultat einer akzeptablen HWZ [119].

Auch die gezielte Beeinflussung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 durch Applikation eines rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten erwies sich Literaturangaben zufolge in ersten klinischen Studien (chron. Polyarthritis) als vielversprechend [118].

Vor diesem Hintergrund einer breiten Palette innovativer antiinflammatorischer Wirkstoffe erscheint die Entwicklung eines selektingerichteten liposomalen Drug Delivery Systems als äußerst lohnenswert. Die Wirkstoffe würden aufgrund der sowohl räumlichen als auch zeitlichen direkten Bindung der Selektine an das Entzündungsgeschehen spezifisch zum Ort des Geschehens transportiert. Eine Anreicherung antiinflammatorischer Wirkstoffe direkt im Entzündungsgebiet bedingt zum einen hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen und zum

anderen eine entscheidende Reduktion unerwünschter, systemischer Nebenwirkungen. Die Vorteile in Hinblick auf bspw. eine Glucocorticoid-Dauertherapie liegen auf der Hand.

Zusammengefaßt werden kann, daß die Ausnutzung vaskulärer Selektive als Targetstrukturen für Immunliposomen völlig neuartige Ansatzpunkte für eine antiinflammatorische Therapie eröffnet. Aufgrund der Tatsache, daß im Rahmen dieser Strategie das Gefäßendothel als Zielgewebe genutzt werden würde, erfolgt im nachfolgenden Abschnitt eine kurze Charakterisierung dieser Gewebeart.

2.4 Das Gefäßendothel

Charakterisierung des Endothels als Zielgewebe für ein selektiverichtetes Drug Targeting

Als Endothel bezeichnet man das einschichtige Oberflächenplatteneithel, welches die Blut- und Lymphgefäße und die Herzinnenräume auskleidet. Charakteristisch für alle Oberflächenepithelien ist eine Basallamina (Teil einer Basalmembran), die eine Abgrenzung zwischen Epithel und darunterliegendem Bindegewebe bildet.

Endothelzellen sind polarisiert. Die luminale (apikale) Front steht in ständigem Kontakt zu den zirkulierenden Blutzellen und dem Plasma. Die abluminale (basolaterale) Seite wird durch die bereits erwähnte Basalmembran, die von den Zellen selbst produziert wird, vom umgebenden Gewebe abgegrenzt. Bemerkenswert ist die starke Reduzierung des Endothelgewebes auf nur eine Zellschicht. Die Endothelzellen sind untereinander durch Verbindungskomplexe, sog. junctional complexes, verbunden. Dabei unterscheidet man zwischen communicating (gap) junctions (maculae communicantes) und dicht schließenden occluding (tight) junctions (zonulae occludentes), welche den interzellulären Raum abdichten. Das junctions-Muster variiert von Gefäß zu Gefäß.

Das Endothel stellt einen geschlossenen Zellverband ohne Blutversorgung dar. Seine Ernährung erfolgt ausschließlich von anderen Geweben durch Diffusion. Die Aufgabe des Endothels besteht in einer Barrierefunktion, die einen kontrollierten Transport verschiedener Stoffe zwischen Plasma und Interstitialflüssigkeit ermöglicht. Für die Transportfunktionen in (Endozytose) und durch (Transzytose) den Zellkörper steht der Endothelzelle ein typisches Set an Zellorganellen zur Verfügung: Caveolen (= Plasmalemmvesikel), transendotheliale Kanäle, Fenestrae und die interzellulären Verbindungskomplexe (junctions), desweiteren der Apparat für die rezeptorvermittelte Endozytose, bestehend aus clathrin-coated pits, coated vesicles, Endosomen, multivesikulären Körpern und Lysosomen [145].

Das Gefäßendothel besitzt die Fähigkeit zum Transport von zirkulierenden bioaktiven Stoffen (Peptide, Amine, Hormone; Carriermoleküle wie Lipoproteine, Albumin, Transferrin u.a.) ins umgebende Gewebe. Verschiedene Stoffe werden auch ausschließlich für metabolische Bedürfnisse in die Zelle transportiert. Die Aufnahme der Plasmakomponenten erfolgt entweder über spezifische (rezeptorvermittelt) oder unspezifische Mechanismen. Auf der Endotheloberfläche ist ein weitgefächertes Spektrum unterschiedlichster Rezeptoren vorhanden, z.B. Vasomedin-Rezeptoren für eine Anzahl vasoaktiver Substanzen (Histamin, Serotonin, Bradykinin, Leukotriene), Rezeptoren für Metalloproteine (Transferrin, Ceruplasmin), Rezeptoren für Lipoproteine, Insulinrezeptoren und spezifische Bindungsstellen für Albumin. Die Bindung der einzelnen Substanzen an die spezifischen Rezeptoren führt zur Auslösung verschiedenster biologischer Effekte. Aus dem Andocken des Histamins an seinen Rezeptor, vorrangig H₂-Rezeptoren an Venolen, resultiert bspw. eine drastische Erhöhung der Endothelpermeabilität für Makromoleküle durch eine Zytoskelettkontraktion und Öffnung interzellulärer junctions [91].

Die Rezeptorausstattung variiert wiederum von Gefäß zu Gefäß. Charakteristisch für das Endothel von Lebersinusoidalzellen sind desweiteren bspw. Mannoserezeptoren sowie sog. Scavenger-Rezeptoren zur Endozytose polyanionischer Makromoleküle (z.B. acetylierte/oxidativ modifizierte LDL, modifiziertes Albumin) [92,89]. Verschiedene Venenendothelzellen besitzen Fc-IgG-Rezeptoren (nachgewiesen mit HUVEC) [90].

Der endotheliale Transport von Molekülen wird durch verschiedene Faktorengruppen bestimmt. Das sind u.a. die physikalisch-chemischen Eigenschaften der permeierenden Moleküle (Größe, Ladung, chemische Struktur, Konzentration, sterische Verhältnisse), die Oberflächeneigenschaften und der metabolische Zustand der Endothelzelle sowie der Zustand von Endothelbasalmembran, extrazellulärer Matrix und Interstitialflüssigkeit.

Es kann zwischen verschiedenen Aufnahmemechanismen unterschieden werden. Zunächst ist eine grobe Einteilung in spezifisch und unspezifisch ablaufende Prozesse möglich. Zu den unspezifischen Mechanismen zählen Flüssigphasendozytose und Flüssigphasentranszytose sowie die adsorptive Endozytose bzw. Transzytose. Rezeptorvermittelte Endozytose und rezeptorvermittelte Transzytose stellen die spezifischen Möglichkeiten dar. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt die Transzytose (95% des Gesamttransportes) über die Endozytose (5%).

Unter den pathologischen Bedingungen einer Entzündung (siehe auch Kap. 2.3) dominiert eine morphologische Veränderungen des Endothels, seine Permeabilität steigt drastisch an. Der Anstieg der Gefäßendothelpermeabilität führt zu einem massiven Ausfluß von Flüssigkeit und Makromolekülen in den interstitiellen Raum und damit zur Ödembildung. Diese Veränderung wird hauptsächlich durch Mediatoren wie Histamin, Bradykinin, Serotonin und Substanz P ausgelöst, die eine rasche Bildung von Lücken (gaps) zwischen den Endothelzellen bewirken. Diese Lücken sind das Resultat einer Kontraktion benachbarter Zellen unter Mitwirkung von Actin- und Myosinfilamenten, die mit den Zell-Zell-Verbindungen (junctions) eng assoziiert sind [93]. Auch Calciumionen scheinen im Rahmen der gaps-Formation eine wichtige Rolle zu spielen, und für andere Entzündungsmediatoren, bspw. TNF α wurde gezeigt, daß sie eine Erhöhung der Endothelpermeabilität über einen G-Protein (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein) gekoppelten Prozeß vermitteln [94]. Desweiteren wurde in verschiedenen Studien für einzelne Subtypen von Endothelzellen ein Anstieg der Endozytose-/Transzytoseaktivität im Rahmen des Entzündungsgeschehens nachgewiesen. So konnte z.B. von einer japanischen Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß das Ausmaß der Transzytose von Lipidmikrosphären (200nm) durch eine HUVEC-Monolayer nach Interleukin-1 β -Stimulation um das 3,7 fache erhöht wurde [95]. Parallel führte eine italienische Arbeitsgruppe eine Untersuchung zum Endozytoseverhalten von Hirn-Mikrogefäßendothelzellen im Vergleich mit HUVEC durch und für beide Zellarten konnte nach Lipopolysaccharidbehandlung (entzündungsauslösend) ein Anstieg der endozytotischen Aufnahme von Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen werden [96]. Auch im Rahmen einer Studie mit Leber-Sinusoidalendothelzellen zur Abhängigkeit der Scavenger- und Mannoserezeptor vermittelten Endozytose von entzündungsfördernden Stoffen wurde eine Erhöhung des Ausmaßes beider Endozytostypen für verschiedenen Makromoleküle nach Behandlung mit Entzündungsmediatoren wie Lipopolysaccharide, TNF α , IL-1 β und PGE $_2$ gefunden [92].

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem in Hinblick auf das Gesamtziel eines liposomalen E-Selektin gerichteten Drug Delivery Systems die Frage nach der allgemeinen Kapazität von Gefäßendothelzellen zur endozytotischen Internalisierung von Liposomen interessant, bzw. inwieweit sich die morphologischen und strukturellen Veränderungen, welche das Endothel im Rahmen einer Entzündungsreaktion erfährt, auf das Internalisierungsverhalten auswirken. Die Akkumulation von Liposomen in entzündeten Geweben aufgrund einer erhöhten Endothelpermeabilität wurde bereits mehrfach nachgewiesen [97-99].

Ein Wissensdefizit besteht jedoch noch in Hinblick auf die endozytotische Aufnahme von Liposomen durch Endothelzellen. Bei den meisten veröffentlichten Untersuchungen wurden lediglich markierte Makromoleküle verwendet. Die wenigen vorhandenen Untersuchungen beschäftigten sich mit rezeptorvermittelten Endozytosevorgängen, was eine Kenntnis des Rezeptormusters auf dem jeweiligen Endothelsubtyp sowie eine entsprechende Modifizierung der Liposomen voraussetzt. In einer holländischen Studie konnte eine massive Aufnahme von 100nm großen Liposomen, funktionalisiert mit anionischem Albumin, durch Lebersinusoidalendothelzellen gezeigt werden, die Endozytose erfolgte über den sog. Scavenger- Rezeptor [89]. Eine weitere humane Endothelzellelinie (E.A.hy 926) zeigte in einer anderen Untersuchung eine starke endozytotische Aufnahmebereitschaft für Liposomen (200nm), welche mit unterschiedlich modifizierten Dextranderivaten funktionalisiert waren [100]. Im Rahmen einer sehr interessanten Studie, die unter simulierten Entzündungsbedingungen durchgeführt wurde, wurde bewiesen, daß IFN α -aktivierte humane Bronchialepithelzellen (ICAM-1-Expression, Adhäsionsmolekül) in der Lage sind, ca. 60% der an ihnen angereicherten anti-ICAM-1-Immunoliposomen einer Größe von 200-250nm zu internalisieren [56].

Es existieren also erste positive Hinweise auf eine prinzipielle Befähigung von Endothelzellen zur Aufnahme von Liposomen, es fehlen u.a. jedoch noch Aussagen zur unspezifischen, nicht rezeptorvermittelten Internalisierung von Liposomen, sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen. Insgesamt gesehen wäre die Kapazität von Endothelzellen eine essentielle Voraussetzung für das Funktionieren eines Drug Delivery-Systems mit dem Endothel als Zielgewebe. Eine alleinige Anreicherung von wirkstoffbeladenen Vesikeln am Endothel garantiert noch keinen therapeutischen Effekt. Würde es im Rahmen einer Entzündungsreaktion zusätzlich zu einer Erhöhung der Endozytoseleistung der betrachteten Zellen kommen, so wäre das in diesen Zusammenhang optimal, denn damit würde das Endothel zum einen die für eine spezifische Anreicherung der Liposomen im Zielgewebe notwendigen Rezeptoren (E-Selektin) exprimieren und zum anderen durch seine morphologischen und funktionellen Veränderungen eine Aufnahme der angereicherten Liposomen begünstigen.

Zum Abschluß dieser Betrachtungen soll noch auf zwei, für die Internalisierung besonders bedeutungsvolle Vesikelparameter eingegangen werden, ihre Größe und Lipidzusammensetzung. Die Morphologie der Endothel bedingt die Tatsache, daß sich die Vesikelgröße innerhalb bestimmter Grenzen bewegen muß. Von einer holländischen Arbeitsgruppe [89] wurde ein Abfall der Endozytoserate mit steigendem Vesikeldurchmesser gefunden, mit 50nm großen Liposomen konnte ein Ergebnis von 2,8nmol internalisiertes Lipid/ 10^6 Zellen erreicht werden, mit 100nm großen Liposomen wurden 1,9nmol erreicht und bei der Verwendung einer Vesikelgröße von 200nm bzw. 400nm reduzierte sich das Ergebnis auf 1,0nmol internalisiertes Lipid/ 10^6 Zellen. Eine Liposomengröße von 50-100nm erscheint in Hinblick auf eine angestrebte Internalisierung der Vesikel als ein guter Richtwert. Bei einer Verwendung von Immunoliposomen ergibt sich natürlich durch die Kopplung von Antikörpermolekülen auf die Vesikeloberfläche eine zusätzliche geringfügige Vergrößerung (Dimension eines IgG-Moleküles \sim 10-15nm). Auch sind in Hinblick auf eine in vivo Verwendung der Immunoliposomen mit der Größe verbundene Fragen einer ausreichenden Einschluß- und damit Transportkapazität sowie Serumstabilität zu klären. Die Suche nach einer optimalen Vesikelgröße wird jedoch hauptsächlich von den gegebenen Größendimensionen der Zielzelle und ihrer Internalisierungswege bestimmt werden.

Ein anderer entscheidender Parameter in Bezug auf die Internalisierung ist die Lipidzusammensetzung der Vesikel. Sie sollte in großer Übereinstimmung mit der Zellmembran der Zielzellen gewählt werden. Für den speziellen Fall der Endothelzellen wurde dafür eine Lipidzusammensetzung von PC/PE/Chol (70/10/20 mol%) als optimal bestimmt [100,101].

Das Endothel stellt insgesamt gesehen ein sehr attraktives Zielgewebe zur Anreicherung von Liposomen dar. Es ist zur Expressierung einer breiten Palette von Rezeptoren und damit molekularer Zielstrukturen mit teilweise hoher endozytotischer Aktivität befähigt. Zum anderen müssen Liposomen zur Bindung an ihre molekularen Ziele auf der Endotheloberfläche das Gefäßsystem nicht verlassen. Durch die Fähigkeit zur Expressierung bestimmter Adhäsionsmoleküle ausschließlich unter Entzündungsbedingungen erscheint das Endothel auch in Hinblick auf ein antiinflammatorisches Drug Targeting als sehr attraktives Zielgewebe. Aufgrund ihrer Lokalisation auf der Endotheloberfläche ausschließlich im Rahmen einer Entzündungsreaktion und damit dem Fehlen eines Grundlevels ihrer Expression unter normalen physiologischen Bedingungen bieten sich die vaskulären E- und P-Selektine als Zielstrukturen für die Akkumulation von Liposomen mit antiinflammatorischen Wirkstoffen an. Ein Targeting zu den endothelialen Selektinen bedeutet einen direkten Transport der Wirkstoffe zum Ort des Krankheitsgeschehens ohne die Kontaktierung gesunden Gewebes.

2.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund ihrer initialen und zentralen Rolle innerhalb des Entzündungsgeschehens stellen die vaskulären Selektine ideale Zielstrukturen für eine gezielte Anreicherung antiinflammatorischer Wirkstoffe direkt im Entzündungsgebiet dar. Als Wirkstoff-Transportvehikel haben sich Liposomen bewährt, die durch Funktionalisierung mit verschiedenen Liganden ihre besondere Zielspezifität erhalten. Als besonderes hoffnungsvolle Variante haben sich dabei mit Antikörpern funktionalisierte Liposomen, sog. Immunoliposomen, bewährt.

Das Gesamtziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Charakterisierung selektingerichteter Immunoliposomen mit der Fähigkeit zur Akkumulation am Gefäßendothel unter Entzündungsbedingungen.

In einer ersten Etappe sollte dabei, beginnend mit einem umfangreichen Vergleich etablierter Herstellungsmethoden für Immunoliposomen und dessen Auswertung, die Herstellung derartiger Immunoliposomen erfolgen. Dabei sollten verschiedene bekannte Kriterien der Serum- bzw. sterischen Stabilität der Vesikel Berücksichtigung finden und anti-E-Selektin-Antikörper zur Funktionalisierung der Liposomen verwendet werden.

Innerhalb einer zweiten Etappe sollten die resultierenden Immunoliposomen unter in vitro-Bedingungen hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an verschiedenen E-Selektin exprimierenden Zellarten getestet werden. Dabei sollten verschiedene Auswertungsmöglichkeiten zur Anwendung kommen.

Als Voraussetzung dafür müssten Voruntersuchungen zur Stimulierbarkeit bzw. zum Ausmaß der E-Selektin-Expression der verwendeten Endothelzellen und damit zur gezielten Stimulierbarkeit von Entzündungsbedingungen erfolgen. Aufgrund der Tatsache, daß selektingerichtete Immunoliposomen im Rahmen einer späteren systemischen Anwendung aus dem Blutstrom heraus an die Endotheloberfläche binden müssen, sollte das Targetbindungsvermögen der Liposomen sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter simulierten Flußbedingungen getestet werden, wobei für die Targetierungsexperimente unter dynamischen Flußbedingungen eine spezielle Durchflußapparatur zum Einsatz kommen sollte.

Die alleinige Akkumulation von Immunoliposomen am Ort des Krankheitsgeschehens ist noch kein Garant für einen therapeutischen Effekt des transportierten Wirkstoffes, weshalb die Targetierungsexperimente in einer dritten Etappe durch Untersuchungen zum Internalisierungsverhalten von Gefäßendothelzellen gegenüber den präparierten Immunoliposomen ergänzt werden sollten.

Kapitel 3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Substanzen

Für die Liposomenpräparation fanden die Lipide SPC (Lucas Meyer, Hamburg, Deutschland) Cholesterol, DPPE, DPPG, DOPA (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland), Biotin-PE, PEG-PE2000 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) Verwendung. Die Ankerlipide N-Glut-PE, und PDP-PE wurden entsprechend den Literaturvorgaben selbst synthetisiert.

Als Fluoreszenzfarbstoffe kamen zum Einsatz NBD-PE, Lissamine[®]Rhodamin-PE, DiO (Avanti Polar Lipids) sowie Calcein, 6-Carboxyfluorescein (Fluka, Deutschland) und HPTS, FITC-Dextran (Sigma Chemie).

Die Reagenzien SMPB, SPDP, EDC, Avidin, DTT, Glutarsäureanhydrid, MES, HEPES, MOPS, Natriumdithionit, Bromthymolblau, Natriumhydroxid, Pyridin, Triethylamin, N,N-Diisopropylamin, 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazin) sowie die Enzyme Pronase (=Protease aus *Streptomyces griseus*), Trypsin, α -Chymotrypsin, stammen von Sigma Chemie, NHS von Aldrich.

Die Proteine Albumin, biotinyliertes Albumin, Biotin und unspezifisches humanes IgG wurden ebenfalls von Sigma Chemie erworben, der spezifische monoklonale Antikörper Anti-human E-Selektin (mAB-BBA26) von der Firma RD-Systems.

Die Lösungen der Puffer PBS, PBS mit Magnesium und Calcium, HEPES, MES und MOPS (alle Sigma) wurden nach Standardprotokollen hergestellt und waren von analytischer Reinheit.

Das Detergenz Triton X-100 (Oktylphenylpolyethylenglykolether, Serva, Deutschland) fand in den Konzentrationen 1% (m/m) und 0,2% (m/m) Anwendung.

Eine 0,1M Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes 6-Carboxyfluorescein wurde in folgenden Schritten hergestellt. 0,36g 6-CF wurden in 10 ml Wasser aufgelöst und der Mischung unter Magnetrührung 1-2 Plättchen gemörserte NaOH-Plättchen (Fluka) zugegeben, bis eine vollständige Lösung der Substanz auftrat. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

3.1.1 Darstellung des Lipidankers NGPE

DPPE (250mg, 0,36mmol) wurden in trockenem Chloroform (25ml) gelöst und mit Glutarsäureanhydrid (412mg, 3,6mmol) in Gegenwart von trockenem Pyridin (60 μ l) versetzt. Die Reaktion verlief unter Rühren über 2 Tage und bei Raumtemperatur. Danach wurde der Grad der Umsetzung mittels Dünnschichtchromatografie überprüft. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Chloroform/ Methanol/ Ammoniak (65/35/3). Die Abtrennung des Produktes N-Glutarylphosphatidylethanolmin vom übrigen Reaktionsansatz erfolgte säulenchromatografisch (Kieselgel 16, Merck), als Elutionsmittel diente eine Mischung aus Chloroform/ Methanol/ Ammoniak (65/35/3). Die produktenthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde das Produkt über P₂O₅ im Vakuum getrocknet. Nach Abschluß der präparativen Darstellung des Lipidankers wurde eine Stammlösung der Konzentration 5 μ mol/ml hergestellt und bei -20°C gelagert. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei der beschriebenen Vorgehensweise um eine

optimierte und etablierte Methode [64] handelt, wurde auf eine weitergehende Analytik verzichtet.

3.1.2 Darstellung des Lipidankers PDP-PE

DPPE (14mg, 20 μ mol) wurden in 2ml trockenem Chloroform gelöst. Daran schloß sich die Zugabe von zunächst 3mg Triethylamin (30 μ mol) sowie anschließend 9mg SPDP (30 μ mol) an. Die Reaktionsmischung wurde unter Stickstoff 1-2 Stunden gerührt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde dünnschichtchromatografisch unter Verwendung von Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) als Elutionsmittel kontrolliert. Bei einem unvollständigem Ablauf der Reaktion wurde zusätzlich 1mg Triethylamin (10 μ mol) zugesetzt. Nachdem dünnschichtchromatografisch kein freies DPPE mehr nachweisbar war, wurde die Reaktionsmischung am Rotatonsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Besonderer Wert mußte dabei auch auf die vollständige Entfernung des noch vorhandenen Triethylamins gelegt werden (Hydrolyse von Esterbindungen). Es schloß sich eine Reinigung des entstandenen Lipidderivats PDP-PE mittels präparativer Dünnschichtchromatografie (Kieselgel 60-Platte, Schichtdicke 20mm, Merck) an. Als Eluent wurde eine Mischung aus Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) verwendet. Nach Detektion der Produktzone wurde die entsprechende Kieselgelschicht abgetragen und das Produkt mit Chloroform herausgelöst. Nach der Trocknung des Produktes wurde eine Stammlösung hergestellt und bei -20°C gelagert wird. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei der beschriebenen Vorgehensweise um eine optimierte und etablierte Methode [60] handelt, wurde auf eine weitergehende Analytik verzichtet.

3.1.3 Darstellung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE

Die Darstellung des endgruppenfunktionalisierten PEG-Lipid-Derivates erfolgte in drei Schritten (Abb. 2).

Im ersten Schritt bildete sich Cyanurchlorid-DPPE (Verbindung I.: N-(3,5-Dichlor-2,4,5-triaz-2-yl)-DPPE) als Voraussetzung für die nachfolgende Verbindung zwischen DPPE und dem PEG-Derivat über die Cyanurchloridbrücke, woraus PEG-Cyanurchlorid-DPPE (Verbindung II.: N-[5-Chlor-3-(ω -Hydroxy-Poly (ethylenglykol)-ethylamino)-2,4,6-triaz-2-yl]-DPPE) resultiert. Anschließend wurde das freie Hydroxyende des PEG-Spacers mit einem terminalen Cyanurchloridmolekül funktionalisiert. Dieses dient nach Einbau des fertigen Anker-moleküls Cyanur-PEG-DPPE (Verbindung III.: N-[5-Chlor-3-(ω -(3,5 Dichlor-2,4,6 triaz-2-yl-oxy-)-Poly (ethylenglykol)-ethylamino)-2,4,6 triazyl]-DPPE) in eine Liposomenbilayer zur Kopplung eines Proteins über eine nukleophile Substitutionsreaktion.

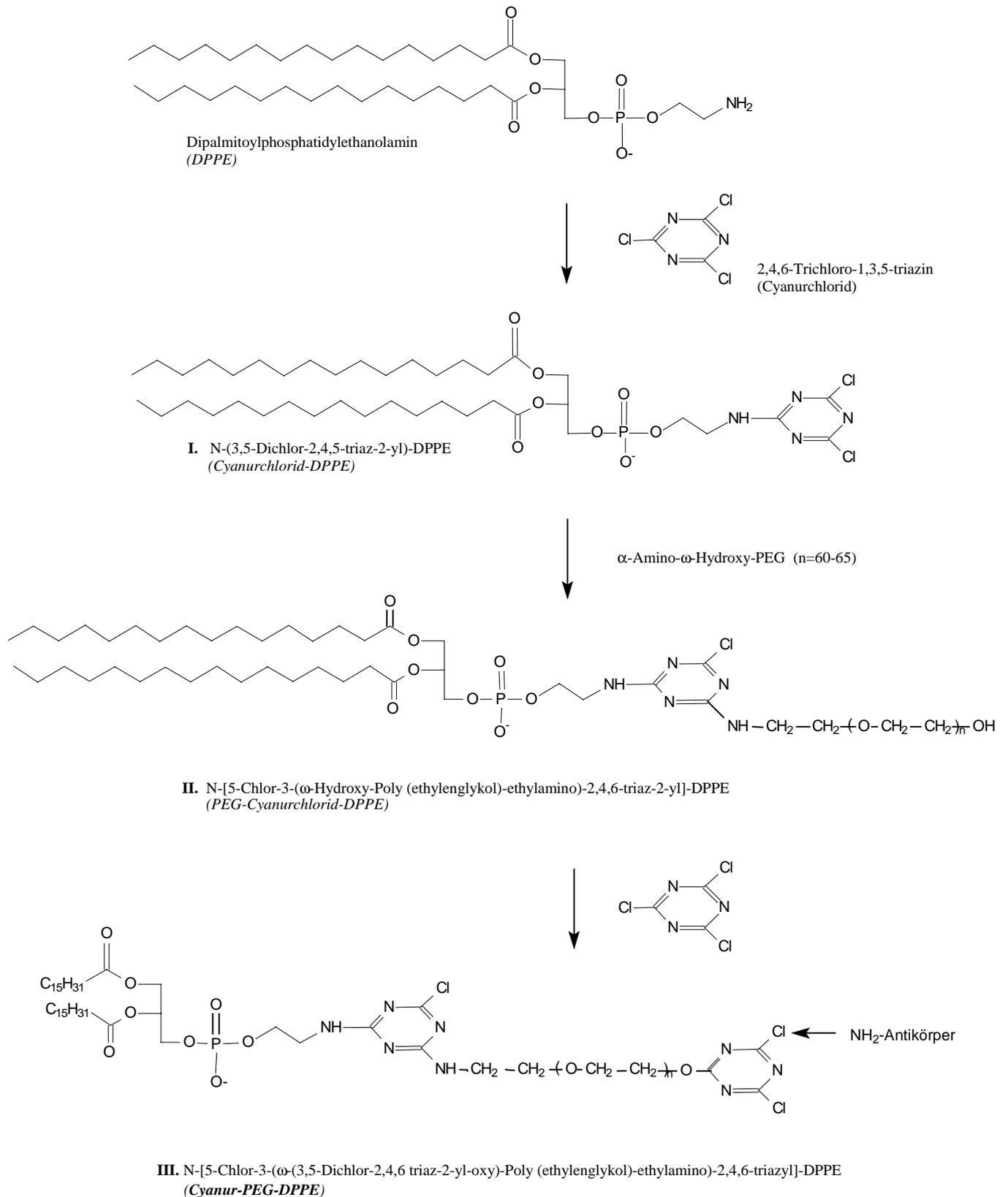


Abb. 2: Darstellung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE in 3 Reaktionsschritten

Darstellung von N-(3,5-Dichlor-2,4,5-triaz-2-yl)-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin

DPPE (200mg; 0,289mmol, Sigma) wurde in trockenem Chloroform gelöst und anschließend Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin, 160mg; 0,867mmol, Sigma) und N,N-Diisopropylethylamin (37,2mg; 0,289mmol, Sigma) im molaren Verhältnis 1:3:1 (DPPE:Cyanurchlorid:Amin) zugesetzt. Der Reaktionsansatz verblieb für 72 h unter Rühren bei Raumtemperatur. Danach wurde der Grad der Umsetzung dünnschichtchromatografisch überprüft. Als Laufmittel diente das Gemisch Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5). Nach Entwicklung des Chromatogramms erfolgte die Detektion mit Bromthymolblau-Sprühreagenz (Detektion von Substanzen mit ausgeprägt lipophilen Strukturelementen) und Molybdänspray (Detektion von Phospholipiden sowie allen Di- und Triestern der Phosphorsäure). Die Chromatogramme wurden zuerst mit Bromthymolblau-Sprühreagenz besprüht, getrocknet und abschließend mit Molybdänspray übersprüht. Die Verbindungen erscheinen als dunkelblaue Flecke. Der Rf-Wert der 1. Produktes (ca. 0,7) liegt höher als der des DPPE (ca. 0,55). Grund dafür ist der an die PE-Aminogruppe gekoppelte aromatische Ring des Cyanurchlorides, welcher dem Produkt eine geringere Polarität verleiht (Aminogruppe maskiert). Die Abtrennung des DPPE-Cyanurchlorides vom übrigen Reaktionsansatz erfolgte säulenchromatografisch (Kieselgel 16, Merck, 10g Kieselgel für 100mg Produkt) mit dem Eluent Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5). Die produktenthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde das Produkt über P₂O₅ unter Vakuum getrocknet. Die Reaktion verlief quantitativ (DC-Kontrolle). Die Identität des Produktes konnte mittels der ESI-MS (Elektronenspray-Massenspektroskopie, negative mode) bestätigt werden (Abb. 3). Mit Hilfe der Elementaranalyse wurde über die Bestimmung des prozentualen Chlor- bzw. Stickstoffgehaltes der Beweis der Reinheit des Produktes Cyanurchlorid-DPPE erbracht.

- ESI-MS: (C₄₀O₈N₄C₁₂P₁H₇₂, M= 838g·mol⁻¹) m/z 839,9
- DC (LM:Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)); Rf=0,7
- Elementaranalyse N (ber.:6,68 %, gef.:6,54 %)
Cl (ber.:8,45 %, gef.:8,42 %)

Darstellung von N-[5-Chlor-3-(ω-Hydroxy-Poly(ethylenglykol)-ethylamino)-2,4,6-triaz-2-yl]-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin

Zur Anknüpfung der PEG-Kette an den DPPE-Baustein wurde das Cyanurchlorid-DPPE (80mg; 0,095mmol) in trockenem Chloroform gelöst und anschließend das bifunktionale PEG-Derivat α-Amino-ω-Hydroxy-PEG (257mg; 0,0855mmol, Fluka) sowie N,N-Diisopropylethylamin (12,3mg; 0,095mmol) im molaren Verhältnis 1:0,9:1 (DPPE-Cyanurchlorid:PEG:Amin) zugegeben. Die Reaktion lief unter Rühren und bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 72 h ab. Nach Ablauf dieser Reaktionszeit erfolgte eine dünnschichtchromatografische Überprüfung des Grades der Umsetzung. Bei diesem zweiten Zwischenprodukt wird das Laufverhalten hauptsächlich von der PEG-Kette beeinflusst, der Fleck im Chromatogramm zeigt keine so einheitliche Geometrie wie der des ersten Produktes, der Rf-Wert (ca. 0,65) liegt unter dem des Vorgängerproduktes. Verursacht wird dies durch den Polaritätszuwachs durch die Polyethylenglykoleinheiten und die terminale Hydroxylgruppe (Aminoalkoholstruktur). Das Produkt wurde wiederum säulenchromatografisch gereinigt (Eluent: Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)) und anschließend über P₂O₅ unter Vakuum getrocknet. Aufgrund der Tatsache, daß das α-Amino-ω-Hydroxy-PEG keine einheitliche Molmasse aufweist, gestaltete sich die Analytik des Produktes ab diesem Reaktionsschritt schwierig. Eine ESI-MS-Analyse war nicht möglich,

die H^1 -NMR erbrachte aufgrund der Dominanz der Protonen der PEG-Kette im Gegensatz zu anderen Molekülteilen kein verwertbares Ergebnis. Die Identität des Produktes wurde mit Hilfe der Elementaranalyse bestimmt. Zunächst erfolgte eine Berechnung der durchschnittlichen Molmasse des PEG (α -Amino-Gruppe) aus dem mit Hilfe der Elementaranalyse bestimmten durchschnittlichem Stickstoffgehalt. Davon ausgehend konnte anschließend der Chlor- und Stickstoffgehalt des PEG-Cyanurchlorid-DPPE berechnet und durch die Ergebnisse der Elementaranalyse bestätigt werden. Das zweite Produkt wurde DC-rein weiterverarbeitet.

- DC (LM:Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)); Rf=0,65
- Elementaranalyse N (ber.:1,9 %, gef.: 2,03 %)
Cl (ber.:0,96 %, gef.:1,09 %)

Darstellung N-[5-Chlor-3-(ω -(3,5 Dichlor-2,4,6 triaz-2-yl-oxy)-)Poly(ethylenglykol)-ethylamino)-2,4,6 triazol]-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin

Zur Anknüpfung des terminalen Cyanurchlorides an die PEG-Kette des Lipidankers wurde das zweite Zwischenprodukt PEG-Cyanurchlorid-DPPE (200mg; 0,052mmol) wiederum in trockenem Chloroform gelöst und mit Cyanurchlorid (29mg; 0,16mmol) und N,N-Diisopropylethylamin (6,7mg; 0,052mmol) im molaren Verhältnis 1:3:1 (PEG-Cyanurchlorid-DPPE:Cyanurchlorid:Amin) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur 72 h gerührt. Nach der Überprüfung des Grades der Umsetzung mittels Dünnschichtchromatografie erfolgte wiederum eine säulenchromatografische Reinigung des Produktes (Eluent: Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)). Aufgrund des dominierenden Ketteneinflusses zeigt sich nur eine ganz geringfügige Veränderung im chromatografischen Laufverhalten gegenüber dem Vorläuferprodukt, der Rf-Wert (ca. 0,6) verringert sich geringfügig. Die Identität des Endproduktes Cyanur-PEG-DPPE wurde wie für das zweite Zwischenprodukt aufgrund der Heterogenität der Molmasse des PEG-Spacers mit Hilfe der Elementaranalyse nachgewiesen. Danach erfolgte die Herstellung einer Stammlösung bekannter Konzentration in trockenem Chloroform, die bei -20°C gelagert wird. Die Gesamtausbeute betrug ca. 25 %.

- DC (LM:Chloroform/Methanol/Wasser (65/35/0,5)); Rf=0,6
- Elementaranalyse N (ber.:2,9 %, gef.:2,72 %)
Cl (ber.:2,78 %, gef.:2,60 %)

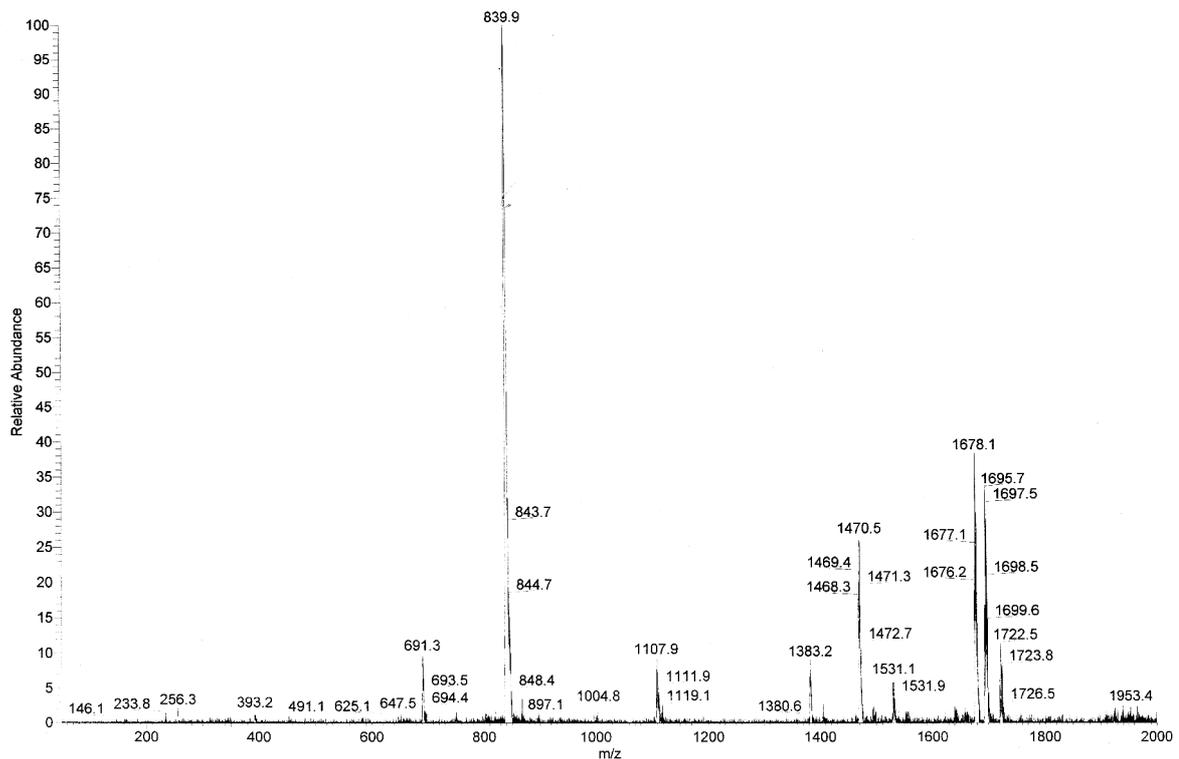


Abb. 3: ESI-MS-Spektrum: N-(3,5-Dichlor-2,4,5-triaz-2-yl)-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin

3.2 Proteinquantifizierung

Mit Hilfe des Peterson-Lowry-Assays ist die direkte Bestimmung einer lipidgebundenen Proteinmenge möglich. Dazu muß die Bestimmung generell in Gegenwart von Detergenz (Natriumdeoxycholat) erfolgen, die liposomale Lipidkonzentration der zu vermessenden Probe kleiner als 1mM sein und der gemessene Wert durch Bestimmung von Lipidleerwerten korrigiert werden.

Demgegenüber kann mit Hilfe des BCA-Assays nur eine indirekte Bestimmung der lipidgebundenen Proteinmenge durchgeführt werden. Das bedeutet, aufgrund des störenden Einflusses des Phospholipidanteils auf eine Proteinbestimmung muß auf die quantitative Erfassung des ungebundenen Proteinanteils ausgewichen wird. Durch Subtraktion dieser störungsfrei erfaßbaren Proteinmenge von der initial eingesetzten Menge erhält man die lipidgebundene Proteinmenge. Diese Variante setzt eine quantitative Abtrennung des freien Proteins von den Proteoliposomen voraus.

Beide Methoden sind Modifizierungen der Biuretreaktion.

Peterson-Lowry-Assay [120]

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde die Biuretmethode mit der Folin-Reaktion gekoppelt. Bei der letzteren wird Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure durch

das im Protein enthaltene Tyrosin reduziert. Der Mechanismus dieser Farbreaktion, an der auch die anderen Aminosäuren beteiligt sind, ist noch unklar.

Lösung A: 4,0g NaOH, 20,0g Na₂CO₃, 0,2g Natriumtartrat, 10,0g Natriumdodecylsulfat/ 1000ml H₂O

Lösung B: 0,5 g CuSO₄·5H₂O/ 100ml H₂O

Lösung C: Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagens (Sigma)

Lösung D: 49 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B

BSA-Standard-Lösung: 400µg Protein/ ml Lösung (Sigma)

0,3% Natriumdeoxycholat-Lösung

70% Trichloressigsäure

Vorbereitend wurde aus der BSA-Standard-Lösung eine Verdünnungsreihe (1-14 µg Protein) zum späteren Erstellen einer Eichkurve hergestellt, wobei die Einzelproben in Eppendorf-Reaktionsgefäße (V=2ml) überführt wurden. Ebenfalls in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden mehrere Proben der zu prüfenden Liposomenpräparation (mit zu den Eichkurvenwerten adäquaten theoretischen Proteingehalten) vorbereitet. Die Einzelproben wurden anschließend mit Wasser zu 1000µl aufgefüllt, mit 50µl der 0,3%igen Natriumdeoxycholat-Lösung versetzt, sorgfältig gemischt (vortexen) und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl 70%iger Trichloressigsäure zu jeder Probe. Nach einem sorgfältigen Mischen (vortexen) wurden die Proben mit 10 000xg zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abdekantiert und zu dem entstandenen Pellet 1ml der Lösung D gegeben. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend eine Zugabe von 50µl Lösung C zu jeder Probe. Nach einem sorgfältigen Mischen (vortexen) wurden die Proben für 30 Minuten unter Lichtausschluß gelagert. Abschließend erfolgte eine Vermessung der Proben an einem Spektrophotometer (Shimadzu, λ_{ex}= 750nm). Jede Einzelprobe wurde dreifach hergestellt und vermessen.

Bicinchoninsäure(BCA)-Assay [121]

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verknüpfung der Biuretreaktion mit einer Indikatorreaktion. BCA bildet selektiv mit den aus der Biuretreaktion resultierenden Cu⁺ Ionen einen Farbkomplex.

Lösung A: 8,87g Bicinchoninsäure (Sigma), 17,1g Na₂CO₃, 9,5g NaHCO₃, 1,6g Na-tartrat, 5,9g NaOH/ 1000ml H₂O, pH 11,5, eingestellt mit konz. NaOH-Lösung

Lösung B: 4g CuSO₄·5H₂O/100ml H₂O

BCA-Reagenzlösung (BCA-RL): 50 Teile Lösung A+ 1Teil Lösung B

Die BCA-Reagenzlösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch frisch hergestellt. Zur Erstellung von Eichkurven wurden Verdünnungsreihen des jeweiligen Proteins vorbereitet. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Lösung mußte im Bereich 5-250µg/ml liegen. In einer Meßküvette wurden 100µl der zu Proteinlösung mit 2ml vorgelegter BCA-Reagenzlösung sorgfältig vermischt und die Probe bei einer Temperatur von 60 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach einer anschließenden 30 minütigen Abkühlungsphase auf Raumtemperatur wurden die Proben am Spektrophotometern (Shimadzu, λ_{ex}= 562nm) jeweils gegen eine Blindprobe, die sich aus 100µl des jeweiligen Puffers und 2ml BCA-Reagenzlösung zusammensetzte, vermessen. Jede Einzelprobe wurde dreifach hergestellt und vermessen.

Die der Proteinbestimmung vorausgehende Abtrennung des ungebundenen Proteinanteils von den Proteoliposomen erfolgte gelchromatografisch. Es wurden Sepharose CL-4B-Säulen (d=10mm, l=100mm) verwendet. Als Eluenten dienten verschiedene Pufferlösungen. Die vereinigten, in ihrer Gesamtheit den ungebundenen Proteinanteil enthaltenden Fraktionen wurden anschließend mittels Druckfiltration unter Verwendung einer Amicon-Zelle (V=5ml) mit integrierter Dialysemembran aufkonzentriert.

3.3 Phosphatquantifizierung [122]

Molybdat-Reagenz: 2,2g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 14,3ml konz. H_2SO_4 / 1000ml H_2O

10% Ascorbinsäure-Lösung

70% Perchlorsäure (Merck)

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

Vorbereitend wurde aus der Phosphat-Standard-Lösung eine Verdünnungsreihe (0-50 nmol Phosphat) zum späteren Erstellen einer Eichkurve hergestellt, wobei die Einzelproben in verschließbare Mikroreagenzgläser überführt wurden. Parallel wurden mehrere Proben der zu prüfenden Liposomenpräparation (mit zu den Eichkurvenwerten adäquaten theoretischen Phosphatgehalten) vorbereitet. Jede Einzelprobe wurde zunächst mit 0,2ml der 70%igen Perchlorsäure versetzt und für 30 Minuten auf 180-190°C erwärmt. Es folgte eine 15 minütige Abkühlphase auf Raumtemperatur und danach eine Zugabe von 2ml Molybdat-Reagenz zu jeder Probe. Nach dem Versetzen mit 0,25ml 10%iger Ascorbinsäure-Lösung und sorgfältigem Vortexen der Mischung wurden die Proben für 10 Minuten in kochendes Wasser gegeben. Nachdem die Proben unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt wurden, erfolgte die Vermessung am Spektrophotometer (Shimadzu, $\lambda_{\text{ex}} = 812\text{nm}$). Jede Einzelprobe wurde dreifach hergestellt und vermessen.

3.4 Dünnschichtchromatographie

Für die DC-Prüfungen wurden Alufolien der Firma Merck, Deutschland (Kieselgel 60; Schichtdicke 0,2mm) verwendet. Eine kleine Probe der zu prüfenden Substanz wurde nach dem Lösen in einem geeigneten Lösungsmittel mit Hilfe einer Glaskapillare punktförmig aufgetragen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte unter den Bedingungen der Kammersättigung. Die Laufstrecke betrug jeweils ca. 10 cm. Die R_f-Werte wurden bei Raumtemperatur und unter einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50% bestimmt. Die verwendeten Laufmittelsysteme sind jeweils im Rahmen der Synthesevorschriften für die einzelnen Verbindungen aufgeführt. Als Detektionsmittel kamen Bromthymolblau-Sprühreagenz (Detektion von Substanzen mit ausgeprägt lipophilen Strukturelementen) und Molybdänspray zur Phosphatdetektion (spezifischer Nachweis von Phospholipiden sowie allen Di- und Triestern der Phosphorsäure) zum Einsatz.

Bromthymolblau-Sprühreagenz:

200 mg Bromthymolblau, in wenigen Millilitern Ethanol gelöst, werden zusammen mit 400 mg Kaliumhydroxid in 1Liter Wasser gelöst.

Molybdänspray:

Lösung 1: 312 g konzentrierte Schwefelsäure werden auf 250 ml verdünnt. Anschließend werden 10g Molybdäntrioxid (MoO_3) zugegeben und das Gemisch bis zur vollständigen Auflösung der Substanz gekocht.

Lösung 2: 125 ml der Lösung 1 werden mit 450 mg Molybdänpulver versetzt, 15 min gekocht und nach dem Abkühlen filtriert.

Spray: Je 5ml der *Lösungen 1* und *2* werden gemischt und mit 10 ml Wasser verdünnt.

3.5 Liposomenpräparation, -markierung und -größenbestimmung

Die Liposomenpräparationen wurden routinemäßig mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 oder 15 $\mu\text{mol/ml}$ hergestellt, wobei das molare Verhältnis SPC/ Chol/ Lipidanker/ Farbstoff entsprechend den Erfordernissen des jeweiligen Versuches variierte. Zur Herstellung von Stealth-Liposomen erfolgte ein Zusatz unterschiedlicher Mengen PEG-PE 2000 auf Kosten des SPC-Anteils. Als Lipidanker kamen Biotin-PE (0,1mol%), PDP-PE oder MPB-PE (5mol%), NGPE (5mol%) oder Cyanur-PEG-PE (0,5-7,5mol%) zum Einsatz.

Zur Herstellung der Liposomen wurden zunächst die berechneten Mengen der chloroformischen Stammlösungen der einzelnen Lipidkomponenten in einem 10 ml Rundkolben vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Kolben mit dem gebildeten Lipidfilm wurde anschließend für mindestens zwei Stunden im Exsikkator nachgetrocknet. Danach erfolgte die Hydratisierung des Film durch Zugabe des entsprechenden Dispersionsmittel, das je nach späterem Verwendungszweck der Liposomen variierte. Die Liposomenbildung wurde durch die Zugabe von Glaskügelchen und manuelle Schüttelbewegungen (mindestens 10 min) des Glaskolben in einem 60 °C heißem Wasserbad unterstützt. Dem manuellen Schütteln schloß sich eine 16 stündige maschinelle Schüttelbehandlung bei 100 Bewegungen/min an. Die resultierenden großen multilamellaren Vesikel wurden mittels sechsmaliger Extrusion (Extruder: Lipex Biomembrane, Vancouver, Kanada) durch eine Polycarbonatmembran (Nucleopore, Costar, Bodenheim, Deutschland) in ihrer Größe verändert. Während für die Zellbindungsuntersuchungen Liposomen mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 175nm (200nm-Porenmembran) verwendet wurden, kamen bei den Internalisierungsexperimenten Liposomen zum Einsatz, die eine durchschnittlichen Partikelgröße von 75nm (50nm-Porenmembran) aufwiesen. Zur Herstellung dieser sehr kleinen Liposomen mußte nacheinander mit verschiedenen Polycarbonatmembranen in absteigender Porengröße (200nm, 100nm, 50nm) gearbeitet werden. Der Polydispersitätsindex lag jeweils unter 0,1. Die verschiedenen Modifikationen der Basislipidzusammensetzung der Liposomen (SPC/Chol) hatten keinen Einfluß auf die Liposomengrößen.

Zur Größenbestimmung der hergestellten Liposomen diente ein Malvern Autosizer IIc (Malvern, Großbritannien). Jeweils 2 ml des entsprechenden steril filtrierten Puffers (Filter: Satorius, 0,22 μm) wurden in einer Meßküvette vorgelegt und 25 μl der jeweiligen Liposomendispersion zugegeben. Danach wurde die dynamische Lichtstreuung durch Erfassen der Intensitätsverteilung in zwei Zyklen (Photonen-Korrelations-Spektroskopie) gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Liposomen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Farb-Markierungen verwendet.

Der Einbau der lipophilen Fluoreszenzfarbstoffe NBD-PE und RHOD-PE sowie DiO erfolgte in der Art und Weise, das die entsprechende Menge der chloroformischen Farbstoff-Stammlösung direkt in die Mischung aus den einzelnen Lipidkomponenten gegeben wurde. NBD-PE und RHOD-PE wurden in einer Konzentration von 2mol% (Auswertung am

Durchflußzytometer und Mikroplatten-Fluorimeter) bzw. 3mol% (mikroskopische Auswertung) verwendet, DiO in einer Konzentration von 0,4mol% Gesamtlipid.

Der Einschluß der Lösungen der hydrophilen Farbstoffe Pyranin (60µmM), Calcein (100mM), 6-Carboxyfluorescein (100mM) und FITC-Dextran (M 19000, 10µM) erfolgte während der Hydratisierung des trockenen Lipidfilms zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf der Liposomenpräparation. Die Abtrennung nichteingeschlossenen Farbstoffes erfolgte säulenchromatografisch unter Verwendung einer Sephadex-G75-Säule (l=15 cm, d=1cm, Pharmacia Fine Chemicals, Deutschland) und dem entsprechenden Puffer als Eluent.

Zur Präparation der sog. „outside only“ labeled Liposomen (Fluoreszenzfarbstoff ausschließlich in äußerer Monolayer lokalisiert) wurde zunächst die entsprechende Menge der NBD-PE-Stammlösung in einem 5 ml Rundkolben am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und der Lipidfilm anschließend in einem Ethanolvolumen aufgenommen, welches max. 1% des Gesamtvolumens der zu markierenden Liposomensuspension entsprach. Mittels Mikroliterspritze wurde diese konzentrierte ethanolische Farbstofflösung anschließend in die vorpräparierte, unmarkierte Liposomendispersion gespritzt. Zur Minimierung eines Farbstoff-Transfers von der Außen- zur Innenmonolayer wurden die Liposomen jeweils nur wenige Stunden vor Versuchsbeginn präpariert und kühl aufbewahrt.

3.6 Liposomenstabilität

Zuerst erfolgte die Präparation der Liposomen analog Kapitel 3.5, mit dem Unterschied, daß zum Hydratisieren des Lipidfilms anstelle diverser Pufferlösungen eine 0,1M 6-CF-Lösung verwendet wurde. Zur Entfernung von nicht eingeschlossener 6-CF-Lösung erfolgte eine Dialyse durch Nephrophan-R-Membranen (Filmfabrik Wolfen) über 5 Stunden gegen PBS pH7,4 als Dialysierflüssigkeit. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 250ml/h und die Dialysekammer wurde während des Dialysierens konstant horizontal bewegt. Zur Bestimmung der Einschlußrate wurden 10µl der dialysierten Vesikeldispersion mit 10ml PBS pH7,4 verdünnt und die Fluoreszenzintensität am Fluorimeter F-4500 Hitachi gemessen ($\lambda_{\text{ex}}=490\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520\text{ nm}$, quantitative Auswertung über Bezugsgerade zwischen $1 \cdot 10^{-7}\text{ mol/l}$ und $1 \cdot 10^{-6}\text{ mol/l}$ 6-CF in PBS pH7,4). Dabei erzeugte lediglich der nicht eingeschlossene und nicht durch Dialyse abgetrennte Farbstoff ein geringes Fluoreszenzsignal. Anschließend wurden die Vesikel mit 1%iger Triton X-100-Lösung lysiert und damit der eingeschlossene Marker, welcher vorher bei einer Konzentration von 0,1M einem selfquenching-Effekt unterlag, freigesetzt und verdünnt. Aus der Differenz der 6-CF-Konzentrationen der lysierten und der dialysierten Vesikel errechnete sich die liposomal eingeschlossene Markermenge (% Einschluß des zum Hydratisieren initial eingesetzten Markervolumens, z.B. 1ml) nach folgender Formel:

$$\% \text{ Einschluß} = (c_{\text{lysiert}} - c_{\text{dialysiert}} / f \cdot c_{6\text{-CF}}) \cdot 100 \%$$

f=Verdünnungsfaktor der Liposomendispersion

Nach Berechnung des liposomal eingeschlossenen Gesamtvolumens und Division dieses Wertes durch den Lipidgehalt der Liposomenpräparation erhält man die Angabe Volumen Farbstofflösung/ mol Lipid.

Eine wiederholte Bestimmung der 6-CF-Einschlußmenge über einen Zeitraum von 14 Tagen gibt Auskunft über die Stabilität der gelagerten Liposomen.

3.7 Antikörperkopplungsmethoden

Für alle Kopplungsmethoden, unabhängig vom jeweils verwendeten Lipidanker, wurde ein initiales molares Verhältnis Lipid/ Protein von 1000:1 gewählt. Dieses Verhältnis wurde von Hansen et al. optimiert [62]. Als preiswerte Poteinkomponenten wurden für die Versuche zur Erfassung einer lipidgebundenen Proteinmenge ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) in Abhängigkeit von der jeweiligen Kopplungsvariante entweder humanes IgG (I-2511, Sigma) oder Albumin (biotinyliert, Sigma) verwendet.

Cyanur-PEG-PE als Lipidanker:

Die Ausgangsliposomen für diese Kopplungsvariante wurden in 0,15 M NaCl-Lösung hergestellt. Die benötigte Menge des Antikörpers wurde in Boratpuffer pH 8,8 (0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, Reachim, Deutschland) gelöst und die resultierende, konzentrierte Proteinlösung zur Liposomensuspension gegeben. Es schloß sich eine Inkubation über 16 Stunden bei Raumtemperatur und unter Schütteln an. Im Anschluß daran wurden ungebundene Antikörper durch einen gelchromatografischen Reinigungsschritt (Sephacrose CL-4B, l=100mm, d=10mm, Pharmacia Fine Chemicals) unter Verwendung von PBS pH 7,4 als Eluent entfernt.

NGPE als Lipidanker:

Von dieser Kopplungsmethode existieren mehrere verschiedene Varianten, wobei die beiden verwendeten hauptsächlich in der Wahl der pH-Verhältnisse differieren.

Bei Anwendung der Variante im neutralen Milieu wurde PBS pH 7,4 zur Herstellung der Ausgangsliposomen verwendet. Die Aktivierung des liposomalen NGPE erfolgte durch Zugabe von EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid), wobei für 0,1 μmol NGPE eine Menge von 1,2mg EDC (0,8 μmol) benötigt wurden. Es schloß sich eine Inkubation von 6 Stunden bei Raumtemperatur an, wonach der EDC-Überschuß mittels Gelchromatografie (Sephadex G50, l=100mm, d=10mm, Pharmacia Fine Chemicals) abgetrennt wurde. Im Anschluß daran erfolgte die Zugabe des Antikörpers in Form einer konzentrierten PBS-Lösung und eine zweite Inkubationphase über 12 Stunden, wiederum bei Raumtemperatur und unter konstantem Schütteln [66].

Bei Anwendung der Variante im sauren Milieu wurde eine 0,15M NaCl-Lösung zur Herstellung der Ausgangsliposomen verwendet. Die Aktivierung des liposomalen NGPE erfolgte nach dem Einstellen der Liposomendispersion auf einen pH-Wert von 3,5 durch Zugabe von EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid), wobei diesmal für 0,1 μmol NGPE eine Menge von 0,75mg EDC benötigt wurden. Es schloß sich eine kurze Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur an und anschließend erfolgte die Zugabe des Antikörpers in Form einer konzentrierten Lösung in Boratpuffer pH 8,8 (0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) und eine zweite Inkubationphase über 12 Stunden, wiederum bei Raumtemperatur und unter konstantem Schütteln [64].

Ungebundene Antikörper wurden bei beiden Varianten wiederum gelchromatografisch (Sephacrose CL-4B) unter Verwendung von PBS pH 7,4 als Eluent abgetrennt.

Biotinyliertes PE als Lipidanker:

Liposomen mit inkorporiertem biotinyliertem PE wurden in HEPES pH7,4 (25mM) hergestellt. Diese Liposomendispersion wurde schrittweise, in kleinen Teilmenge von 50 μl zu einer Avidin-Lösung (in HEPES) gegeben bis zu einem molaren Endverhältnis von biotinyliertem DOPE/Avidin von 1:1. Nach jeder Zugabe einer Teilmenge erfolgte ein intensives Vortexen der Reaktionsmischung. Im Anschluß an eine Inkubationsphase von 30

Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe des biotinylierten Proteins in Form einer konzentrierten HEPES-Lösung. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die gelchromatografische Abtrennung des ungebundenen biotinylierten Proteins mittels einer Sepharose CL-4B-Säule und HEPES als Elutionsmittel.

PDP-PE als Lipidanker:

Die Ausgangsliposomen für diese Kopplungsvariante wurden in einem Puffer pH 6,7 (25mM HEPES, 25mM MES, 140mM NaCl) hergestellt. Zur Reduktion der Disulfidbindungen des liposomalen PDP-PE wurden 3,1mg DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma) zu 1ml Liposomendispersion gegeben, woraus eine DTT-Endkonzentration von 20mM resultierte. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Abtrennung des überschüssigen DTT mittels Ultrazentrifugation (2h, 200 000xg, 20°C). Die Liposomen wurden in Puffer pH 6,7 resuspendiert und anschließend ihre Größe am Malvern Autosizer IIc kontrolliert.

Parallel zur Liposomenpräparation erfolgte die Derivatisierung des Proteins. Dafür wurden das Protein, gelöst in HEPES, und SMPB (Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat, Sigma), gelöst in DMF, in einem molaren Verhältnis SMPB/Protein von 20:1 bei Raumtemperatur für eine Dauer von 90 Minuten umgesetzt. Die Abtrennung des ungebundenen SMPB erfolgte durch Trennung des Reaktionsgemisches auf einer Sephadex G50-Säule unter Verwendung des Puffers pH 6,7 als Eluent. Nach der Reinigung erfolgte eine Quantifizierung des derivatisierten Protein.

Im Anschluß daran wurden das MPB-Protein und die PDP-PE funktionalisierten Liposomen im Standard-Verhältnis Lipid/ Protein von 1000:1 vereinigt. Nach einer Inkubationsphase von 16 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte wiederum eine säulenchromatografische Abtrennung (Sepharose CL-4B, HEPES) von ungebundenem Protein.

3.8 Zellversuche, allgemein (u.a. Nabelschnurpräparation)

Im Rahmen der gesamten Zelluntersuchungen dieser Arbeit kamen 4 verschiedene Zellarten zur Anwendung: CHO-E-Zellen (Maus-E-Selektin-transfizierte China-Hamster-Ovarialzellen), die Makrophagen-Zelllinie J774, Keratinozyten und HUVEC (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen).

CHO-E-Zellen:

Die verwendeten CHO-E-Zellen wurden von PD Dr. Rothe (Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle) bereitgestellt. Ihre Kultivierung erfolgte im Medium MEM- α (Life Technologie, Kat.-No. 11900, Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum (c.c. pro GmbH, Neustadt, Deutschland), 2mM L-Glutamin (Sigma) und 100 nM Penicillin/ Streptomycin-Mischung 1% (c.c.pro GmbH). In eine Kulturflaschen (5 ml, Roth) wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ CHO-E-Zellen ausgesät. Die Inkubation fand bei 37 °C in 5 % CO₂ (Brutschrank WTB Binder) statt, bis zu einem konfluenten Wachstum der Zellen nach 3-4 Tagen.

Die Anwesenheit von E-Selektin auf der Zelloberfläche der CHO-E-Zellen, auch nach mehrfacher Passage der Zellen, wurde in vorangegangenen Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkierten E-Selektin-Antikörpern von der Arbeitsgruppe PD Dr. Rothe überprüft (unveröffentlicht).

Makrophagen-Zelllinie J774:

Die verwendete Maus-Makrophagen-Zelllinie (J774.1A, Passage 8, American Type Culture Collection, ATCC) wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Schröder (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle) überlassen. In Medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco BRL) wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ in Gewebekulturschalen (d=150mm, Roth) kultiviert bis zu zum Auftreten eines konfluenten Zellwachstum nach 3-4 Tagen.

Keratinocyten:

Die verwendeten Keratinocyten (HaCat, Passage 27) waren eine freundliche Gabe von Prof. Wohlrab (Universitätshautklinik der Martin-Luther-Universität Halle). Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte im Medium Keratinocyte- SFM (Gibco-BRL, Kat.-No. 17005-034) bei 37 °C in 5% CO₂ bis zu einem konfluenten Wachstum der Zellen 4-5 Tage nach Aussaat.

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen:

Die verwendeten HUVEC wurden aus frischen Nabelschnüren (max. 24 h postnatal) isoliert. Der Transportpuffer zum Transfer der Schnüre aus der Klinik ins Zelllabor setzte sich aus 12,5ml Konzentrat, 2,5ml Penicillin/Streptomycin-Mischung 1% (c.c.pro GmbH) und 235ml autoklaviertem Wasser (Milli-Q) zusammen. Das Pufferkonzentrat bestand aus 82g Natriumchlorid, 3g Kaliumchlorid, 19,8g D-Glucose, 2,38g HEPES, gelöst in 500ml autoklaviertem Wasser. Kultiviert wurden die isolierten Zellen in einem Medium folgender Zusammensetzung: 500ml Medium M199 mit Earl's Salzen (Gibco BRL, Kat.-No. 31150-022), dem 5ml Penicillin/ Streptomycinlösung 1% (c.c. pro GmbH), 5ml essentielle Aminosäuren-Mischung 1% (c.c.pro GmbH), 5ml 1%iger Pyruvatlösung, 5ml HEPES (10mM, pH7,4), 2,5ml Schutzfaktor (Biotect Protection Medium, Kat.-No. L3010, Biochrom KG Berlin) und 100ml (entspr. 20%) FKS (fötales Kälberserum, c.c.pro GmbH) zupipettiert wurden.

Die Präparation der Nabelschnüre erfolgte nach folgendem Protokoll.

Alle Arbeiten erfolgten unter den sterilen Bedingungen einer Laminar-Flow-Box (Uni Flow UV1200). Es wurden ausschließlich sterile Lösungen verwendet, die vor Präparationsbeginn im Brutschrank auf 37 °C erwärmt wurden. Der erste Arbeitsschritt bestand in der äußerlichen Reinigung der Schnur mit 70% Ethanol, danach wurde sie gründlich auf Verletzungen bzw. Klemmenabdrücke untersucht. Von jedem Ende der Schnur wurde ca. 1cm abgetrennt. Nach dem Identifizieren der Vene erfolgte deren Katheterisierung mit einer Knopfkanüle, welche fest fixiert werden mußte. Die Schnur wurde anschließend dreimal mit 50ml physiologischer Kochsalzlösung gespült und etwaige Thromben durch leichtes Massieren gelöst. Es schloß sich ein einmaliges Spülen mit 50 ml PBS-Puffer + Mg/Ca. Abschließend wurde noch einmal mit Luft durchgespült. Die Enden der Schnur wurden nach diesen Reinigungsschritten abgeflammt und ein Ende verstöpselt. Langsam erfolgte daraufhin das Einspritzen von 15ml einer 0,15%igen Chymotrypsinlösung (Sigma) bis zur prallen Füllung der Vene. Es schloß sich eine 30 minütige Inkubation der Schnur im Brutschrank bei 37 °C an. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Schnur vorsichtig geschwenkt und leicht massiert, wodurch das Ablösen der Endothelschicht unterstützt werden sollte. Nachdem die Kanülenverschlüsse entfernt worden waren, konnte der Inhalt der Schnur in ein 50ml Falconröhrchen auslaufen. Zweimal wurde mit je 15ml Medium nachgespült und die Spüllösung mit der Trypsinlösung vereinigt. Die vereinigten Lösungen wurden anschließend zentrifugiert (7min, 1400xg, Hettich Universal 30F) und das entstandene HUVEC-Zellpelett nach Aufnahme mit frischem Medium in Kulturflaschen (5ml, Roth) überführt. Die Kulturflaschen wurden vor der Zellzugabe mit Gelatinelösung imprägniert und 5ml Medium pro Fläche befüllt. Nach 3

Stunden konnte ein Anheften der Endothelzellen am Boden der Kulturflasche beobachtet werden, so daß nach dieser Zeit ein erster Mediumwechsel durchgeführt wurde. Nach 2-4 Tagen zeigten die Zellen ein konfluentes Wachstum und konnten in die erste Passage überführt werden. Für die Zellversuche wurden Zellen der zweiten und dritten Passage verwendet. Aus einer Nabelschnurpräparation konnten $2\text{-}4\cdot 10^6$ Zellen gewonnen werden. Eine mikroskopische Ansicht (Axiovert 100 TV, Zeiss, Deutschland) von HUVEC, aufgenommen 2 Tage nach ihrer Isolierung, zeigt Abb. 4.

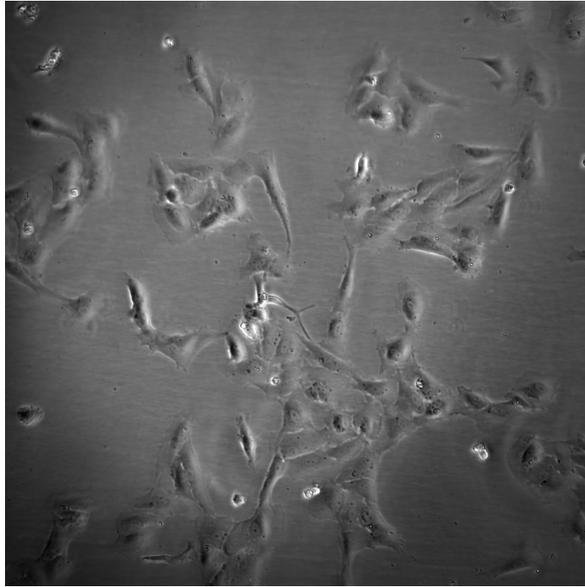


Abb. 4: HUVEC, 2 Tage nach Isolierung

3.9 In vitro Targetierungsuntersuchungen an Zellen

3.9.1 Verwendung von CHO-E-Zellen

Die Bindungsuntersuchungen mit CHO-E-Zellen wurden in Form eines doppelten (zusammengesetzten) Antikörpertests durchgeführt. Die verwendeten Zellen exprimieren konstitutiv Maus-E-Selektin. Anti-(Maus)-E-Selektin-Antikörper (Ratten IgG, im folgenden: primärer Antikörper, α mE-Sel 10E9) standen der Arbeitsgruppe jedoch nur in sehr beschränktem Rahmen zur Verfügung (freundliche Gabe von Prof. Vestweber, Universität Münster). Aus diesem Grund wurden die Zellen jeweils mit diesem primären Antikörper, der aus der Ratte stammt, vorinkubiert. Die Liposomen, deren Bindungsfähigkeit im Rahmen der Untersuchungen überprüft werden sollte, wurden mit Anti-Ratten-IgG (im folgenden: sekundärer Antikörper, Sigma) funktionalisiert.

Versuche mit Auswertung am Mikroplatten-Fluorimeter (well-plate-reader):

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die CHO-E-Zellen mittels Trypsinbehandlung (0,25% Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet und anschließend auf 96-well-Platten (schwarz, Labsystem, Deutschland) verteilt. Pro well wurden 30 000 Zellen ausgesät, die sich innerhalb von 3h am well-Boden (Gelatineimprägnierung) fest anhefteten und eine stabile Zellmonolayer ausbildeten. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit primärem Antikörper für 150min bei 37°C inkubiert. Zur Reduktion unspezifischer Bindungsereignisse erfolgte anschließend die Inkubation mit Blockierungsflüssigkeit (0,01M

PBS, 0,5% Albumin, 0,5% Gelatine) für 15 min bei 37 °C. Im Anschluß daran konnten die Liposomen der verschiedenen Präparationen zu den Zellen gegeben werden. Die Liposomeninkubation erfolgte zur Ausschaltung von Internalisierungsverlusten stets bei 4°C (keine Endozytose) und für eine Dauer von 90min. Das gewählte Lipid / Zell-Verhältnis betrug $1\mu\text{mol Lipid} / 1\cdot 10^6$ Zellen. Abschließend wurden nicht zellgebundene Liposomen entfernt und die Ansätze am Mikroplatten-Fluorimeter (Fluoroscan Ascent, Labsystems) vermessen. Als Blindwerte wurden wells mit blanken Zellen vermessen, die identisch behandelt, jedoch nicht mit Liposomen inkubiert wurden. Das mehrfache Spülen der Zellen nach den einzelnen Inkubationsschritten mußte in einer äußerst vorsichtigen (!) Art und Weise erfolgen, um die Gefahr einer Ablösung einzelner Zellen vom well-Boden zu minimieren. Für die Auswertung mit Hilfe des Mikroplatten Fluorimeter (Fluoroscan Ascent, Labsystems) erwies sich eine Fluoreszenzmarkierung der Liposomen mit 2 mol% NBD-PE als optimal.

Versuche mit Auswertung am Durchflußzytometer:

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die CHO-E-Zellen mittels Trypsinbehandlung (0,25% Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet und anschließend auf Gewebekulturschälchen (d=35 mm, 2ml, Roth, Gelatineimprägnierung) verteilt. Pro Kulturschale wurden ca. $1\cdot 10^6$ Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel mit primärem Antikörper für 150min bei 37°C inkubiert. Zur Reduktion unspezifischer Bindungsereignisse erfolgte anschließend die Inkubation mit Blockierungsflüssigkeit (0,01M PBS, 0,5% Albumin, 0,5% Gelatine) für 15min bei 37°C. Im Anschluß daran konnten die Liposomen der verschiedenen Präparationen zu den Zellen gegeben werden. Die Liposomeninkubation erfolgte zur Ausschaltung von Internalisierungsverlusten stets bei 4°C (keine Endozytose) und für eine Dauer von 90min. Das gewählte Lipid- / Zellverhältnis betrug $1\mu\text{mol Lipid} / 1\cdot 10^6$ Zellen. Abschließend wurden nicht zellgebundene Liposomen entfernt und die Zellen abgelöst. Zur Vermeidung des Abtrennens gebundener Liposomen von den Zelloberflächen erfolgte die Ablösung der Zellen von den Böden der Kulturschalen nicht durch die herkömmliche Trypsinbehandlung, sondern mechanisch (schaben). Anschließend erfolgte die Vermessung der Zellproben am Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson, San Diego, USA, Anregungsquelle: luftgekühlter Argonlaser 488 nm). Für die Messungen wurden Zellsuspensionen mit Konzentration von ca. $1\cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet, die Liposomen waren mit 3 mol% NBD-PE fluoreszenzmarkiert. Die Messungen am Gerät wurden von Herrn Dipl. Phys. Klapperstück (Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten der Martin-Luther-Universität Halle) durchgeführt. Als Auswertungsgrundlage diente die Größe der mittleren Fluoreszenzintensität.

Versuche mit mikroskopischer Auswertung (unter statischen Bedingungen):

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die CHO-E-Zellen mittels Trypsinbehandlung (0,25% Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet und auf runde, 0,5 mm dicke Gläschen (d=18 mm, A=2,4 cm²) verteilt. Für eine optimale Bewachung der Glasfläche (Gelatineimprägnierung) mit einer dichten Zellmonolayer wurden ca. 200 000 Zellen benötigt. Die Zellen wurden anschließend über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen. Nach einer Beurteilung des Zellwachstums am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper zugegeben und es schloß sich eine Inkubation für 150min bei 37°C an. Zur Reduktion unspezifischer Bindungsereignisse erfolgte anschließend eine Inkubation mit Blockierungsflüssigkeit (0,01M PBS, 0,5% Albumin, 0,5% Gelatine) für 15min bei 37°C. Im Anschluß an diese Vorarbeiten wurden die Liposomen verschiedener Präparationen für 90min bei 4°C mit den Zellen in Kontakt gebracht. Anschließend wurden nicht zellgebundene Liposomen durch mehrmaliges Spülen entfernt und das Bindungsverhalten der Liposomen mikroskopisch beurteilt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem konfokalen

Laser-Scanning-Mikroskop in Kombination mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (LSM 410 invert). Bei der Bedienung des Mikroskopes half Herr Dipl. Pharm. Jan Vogel. Für alle mikroskopischen Auswertungen erwies sich eine Fluoreszenzmarkierung der Liposomen mit 3 mol% NBD-PE (Laser 488nm) als optimal.

3.9.2 Verwendung von HUVEC

Bei der Verwendung von HUVEC als Testzellen erfolgte eine Funktionalisierung der Liposomen mit anti-(Human)-E-Selektin-Antikörpern (BBA 26, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Aufgrund der nicht konstitutiven Expressierung des E-Selektins mußten die HUVEC vor jedem Versuch einer Stimulation mit rekombinantem humanen Interleukin-1 β (aus *E. coli*, Boehringer Mannheim, Deutschland, hIL-1 β) unterzogen werden.

Die Anwesenheit von E-Selektin auf der Zelloberfläche der HUVEC wurde in vorangegangenen Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkierten E-Selektin-Antikörpern (Anti-Human-E-Selektin-Antikörper, FITC-markiert, R&D Systems) von der Arbeitsgruppe PD Dr. Rothe überprüft. Eine akzeptable E-Selektin-Dichte auf den Zellen kann max. bis zur 4. Zellpassage garantiert werden, danach kommt es zu einem rapiden Abfall der exprimierten E-Selektinmenge (z.B. P5 ~22% von P3), unabhängig von der verwendeten hIL-1 β -Menge (unveröffentlicht).

Versuche mit Auswertung am Durchflußzytometer:

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die HUVEC mittels Trypsinbehandlung (0,25% Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet, auf Gewebekulturschälchen (d=35 mm, 2ml, Roth, Gelatineimprägnierung) verteilt und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen. 3 Stunden vor Zugabe der Liposomen wurden am nächsten Tag zu jeder Kulturschale (ca. 1·10⁶ Zellen) je 16 ng hIL-1 β / 2ml Medium zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium gewechselt und die Zellen mehrmals gespült. Im Anschluß daran konnten die Liposomen der verschiedenen Präparationen zu den Zellen gegeben werden. Die Liposomeninkubation erfolgte zur Ausschaltung von Internalisierungsverlusten stets bei 4°C (keine Endozytose) und für eine Dauer von 90 min. Das gewählte Lipid- / Zellverhältnis betrug 1 μ mol Lipid/1·10⁶ Zellen. Abschließend wurden nicht zellgebundene Liposomen durch mehrmaliges Spülen entfernt und die Zellen abgelöst. Zur Vermeidung des Abtrennens gebundener Liposomen von den Zelloberflächen erfolgte die Ablösung der Zellen von den Böden der Kulturschalen nicht durch die herkömmliche Trypsinbehandlung, sondern mechanisch (schaben). Anschließend wurde die Vermessung der Zellproben am Durchflußzytometer unter analogen Bedingungen wie unter Kapitel 3.9.1 beschrieben durchgeführt.

Versuche mit mikroskopischer Auswertung (dynamisch, unter simulierten Flußbedingungen):

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die HUVEC mittels Trypsinbehandlung (0,25 % Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet und auf runde, ca. 0,5 mm dicke Gläschen (d=18 mm, A=2,4 cm²) verteilt. Für eine optimale Bewachsung der Glasfläche (Gelatineimprägnierung) mit einer dichten Zellmonolayer wurden ca. 500 000 Zellen benötigt. Die zellbeladenen Gläschen wurden für mindestens 3 Stunden im Brutschrank belassen. Nach dieser Zeit hafteten die Zellen fest auf der Glasoberfläche und die Gläschen konnten, in die in Kapitel 3.12 beschriebene Doppeldurchflußkammer eingebaut werden. Es wurden jeweils parallel ein Gläschen mit stimulierten und ein Gläschen mit unstimulierten

Zellen eingebaut. Jeder Teilversuch wurde doppelt durchgeführt, in der Art und Weise, daß ein Wechsel der stimulierten (Hauptversuch) und unstimulierten (Kontrolle) Zellen zwischen den Positionen I und II innerhalb der Kammer (siehe Abb. 5) stattfand. Die Kammer wurde anschließend auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert und an eine Walzenpumpe (Isnatec, 12 Druckrollen) angeschlossen, so daß ein kontinuierlicher Mediumfluß (2,4ml/min) aus und in ein Mediumreservoir sowie durch die Kammer gewährleistet war. Anschließend erfolgte eine Zugabe von Liposomen der entsprechenden Präparation (jeweils mit 3mol% NBD-PE fluoreszenzmarkiert) in das Mediumreservoir. Vor jeder mikroskopischen Beobachtung der Zellen wurde die Kammer auf dem Mikroskopisch (auf 37°C temperiert) fixiert und das Medium/Liposomen-Reservoir kurzzeitig von der Kammer abgeklemmt. Die Kammer wurde für ca. 5 Minuten mit frischem, liposomenfreiem Medium durchspült, bis im Fluß keine freien Liposomen mehr beobachtbar waren. Nach Abschluß der mikroskopischen Aufnahmen (jeweils nach 0, 0,5, 5 Stunden) wurde die Kammer wieder mit dem Medium/Liposomen-Reservoir verbunden und bis zum Abschluß des Versuches nach 18 Stunden der kontinuierliche Mediumfluß aufrechterhalten.

3.10 Untersuchungen zur Internalisierung von Liposomen

3.10.1 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Pyranins

Zur Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens des Farbstoffes Pyranin (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure, HPTS) erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzanregungsspektren von Pyraninlösungen mit variierenden pH-Werten sowie von Pyranosomen (Pyraninlösung enthaltene Liposomen) in unterschiedlichen Pufferlösungen.

Zur Herstellung des sog. Pyraninpuffers wurden 2,423 g TRIS, 2,362 g Succinat und 4,186 g MOPS in Wasser zu 500 ml gelöst. Der pH-Wert dieser Mischung betrug 5,1.

Vermessung der Pyraninlösungen:

Zunächst wurde eine 60µM Pyranin-Stammlösung (M 524,4) in Pyraninpuffer hergestellt. Davon ausgehend erfolgte die Herstellung von jeweils 100ml Pyraninlösung der gewünschten pH-Werte 5,5; 6,5; 7,4; 8,5. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte unter Magnetührung mit Natriumhydroxid. Anschließend wurden die einzelnen Lösungen am Fluorimeter (Hitachi Fluoroscan) vermessen, wobei Fluoreszenzanregungsspektren bei konstanter Emissionswellenlänge $\lambda_{em}=512nm$ und Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}=200-500nm$ aufgenommen wurden.

Vermessung der Pyranosomen:

Bei der Vermessung der Pyranosomen wurde reiner Pyraninpuffer mit Natriumhydroxid auf die gewünschten pH-Werte 5,5; 6,5; 7,4; 8,5 eingestellt. Vor der Vermessung am Fluorimeter erfolgte die Zugabe von 30µl einer Dispersion von Pyranosomen in PBS (10µM) zu 2 ml des jeweiligen Puffers in der Küvette. Die Aufnahme der Spektren fand unter analogen Bedingungen statt.

3.10.2 Endozytoseuntersuchungen mit Pyranosomen

Für diese Endozytoseuntersuchungen wurden Liposomen aus den Lipidkomponenten SPC/CHOL/NGPE genutzt. Die Liposomen wurden in einer Konzentration von 10µmol/ml Gesamtlipid hergestellt und enthielten eine 35mM Pyraninlösung (Pyranosomen). Je nach

Versuchsziel wurden die Pyranosomen entweder unfunktionalisiert verwendet oder dem Versuch ging eine Antikörperkopplungsprozedur analog Kapitel 3.7 voraus. Die Pyranosomen wurden stets frisch hergestellt. Für die Fälle der Nutzung von CHO-E-Zellen, J774 und Keratinozyten wurden die Zellen unbehandelt verwendet, im Falle der Arbeit mit HUVEC ging der Liposomeninkubation bei bestimmten Teilversuchen eine Stimulation der Endothelzellen mit hIL-1 β (siehe Kapitel 3.9.2) voraus.

Vorbereitend wurden die Zellen einen Tag vor dem eigentlichen Versuch aus den Kulturflaschen auf Kulturschalen verteilt, die Zellanzahl pro Schale betrug jeweils ca. $1 \cdot 10^6$. Am nächsten Tag wurden die Pyranosomen zu den einzelnen Zellansätzen gegeben, wobei alle Einzelansätze zur gleichen Startzeit mit Pyranosomen bestückt wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei den Temperaturen 4°C oder 37°C. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe jeweiliger Versuchsaufbau im Ergebnisteil) wurden die einzelnen Zellansätze gestaffelt weiterbearbeitet, indem die nichtzellassoziierten Pyranosomen durch mehrmaliges Spülen der Zellen entfernt und die Zellen aus den Kulturschalen abgelöst wurden (mechanisch, u.U. in Kombination mit einer milden Trypsinbehandlung). Aufgrund des nicht kalkulierbaren Verlustes von Zellen bei der Zentrifugation und erneuten Resuspendierung des Zellpellets wurde bei diesen Zellversuchen in Hinblick auf eine möglichst große und gleichartige Anzahl von Zellen im Meßansatz direkt die aus den Kulturschalen entnommenen Medium/Trypsin/FKS-Zell-Suspensionen vermessen. Als Konsequenz daraus wurde als Blindwert der Messungen stets eine pyranosomenfreie Medium/Trypsin/FKS-Zell-Suspensionen mitgeführt. Die Fluoreszenzmessungen fanden an einem Fluorimeter Hitachi Fluoroscanner statt, es wurden Fluoreszenzanregungsspektren von $\lambda_{\text{ex}} = 400\text{-}480\text{nm}$ und mit $\lambda_{\text{em}} = 512\text{nm}$ aufgenommen. Aus den Einzelspektren wurden im Anschluß die charakteristischen Fluoreszenzintensitäten der Anregungswellenlängen 405nm, 460nm und 415nm entnommen.

Die Wahl der Inkubationszeiten und vor allem die Anzahl der Meßzeitpunkte richtete sich nach der jeweils verwendeten Zellart. So konnte bspw. bei der Nutzung der makrophagenähnlichen Zelllinie J774 sowie der CHO-E-Zellen, zweier äußerst robuster und optimal vermehrbare Zellarten, eine größere Anzahl von Einzelmessungen durchgeführt werden, während Keratinozyten und HUVEC nur in limitiertem Umfang zur Verfügung standen (Zellanzahl pro Einzelansatz ca. $1 \cdot 10^6$). Die Versuche unter Verwendung von J774 und Keratinozyten wurden doppelt, die Messungen mit CHO-E und HUVEC dreifach durchgeführt.

3.10.3 Internalisierungsuntersuchungen unter Verwendung der Dithionitmethode

3.10.3.1 Vorversuch zur NBD-Fluoreszenzlöschung

Die für diesen Versuch verwendeten Liposomen wurden nach der in Kapitel 3.5 beschriebenen Ethanolinjektionsmethode hergestellt, d.h. sie enthielten den Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE ausschließlich in ihrer Außenmonolayer („outside only“ labeled vesicles). Zu Beginn des Vorversuches wurden die Liposomen in einer Messküvette in 2ml PBS pH 7,4 suspendiert und die Fluoreszenzemissionsintensität der Liposomensuspension als Ausgangswert der Messung bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 470nm, die Emissionswellenlänge 540nm. Anschließend wurden variierende Mengen einer Dithionit-Stammlösung in 1,0M Tris pH10,0 in die Küvette zugegeben, so daß das NBD-PE : $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ -Verhältnis 1:50 000 / 1: 100 000 bzw. 1: 200 000 betrug. Die stetig abfallende Fluoreszenzemissionsintensität wurde 30,60,90,120,150,180,300s und max. 600s nach Dithionitzugabe vermessen.

3.10.3.2 Hauptversuch mit HUVEC und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die HUVEC mittels Trypsinbehandlung (0,25 % Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet und auf runde, ca. 0,5 mm dicke Gläschen ($d=18$ mm, $A=2,4$ cm²) verteilt. Für eine optimale Bewachung der Glasfläche (Gelatineimprägnierung) mit einer dichten Zellmonolayer wurden ca. 500 000 Zellen benötigt. Die zellbeladenen Gläschen wurden für mindestens 3 Stunden im Brutschrank belassen. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe der Liposomen auf die zellbewachsenen Gläschen mit einem resultierendem Verhältnis von $1\mu\text{mol Lipid} / 1 \cdot 10^6$ Zellen. Es schloß sich eine Inkubationszeit von 90min bei einer Temperatur von 37°C an, nach der alle nicht zellassoziierten Liposomen durch mehrmaliges Spülen von den Zellen entfernt wurden. Danach erfolgte eine erste fluoreszenzmikroskopische Beobachtung (konventioneller Modus) der Zellen (Bild vor Dithionitbehandlung, Laser 488 nm). Darauf folgend wurde für 3 Minuten eine 20mM Dithionitlösung auf die Zellen gebracht sowie anschließend durch mehrmaliges Spülen entfernt. Im Anschluß erfolgte eine zweite fluoreszenzmikroskopische Beobachtung (konventioneller Modus) der Zellen (Bild nach Dithionitbehandlung). Im Anschluß daran erfolgte nach Auswahl eines geeigneten Einzel-Zellobjektes dessen mikroskopische Aufnahme im konfokalen Modus des Fluoreszenzmikroskops.

3.10.4 Internalisierungsuntersuchungen mittels Fluoreszenzdoppelmarkierung der Liposomen

Für diesen Versuch wurden Liposomen verwendet, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, im Vesikelinnenraum befand sich wasserlösliches FITC-Dextran, während Rhodamin-PE in die lipophile Membran integriert war (siehe Kapitel 3.5).

Die Übertragung der HUVEC auf die Mikroskopie-Gläschen erfolgte in Analogie zu der unter Kapitel 3.10.3.2 beschriebenen Vorgehensweise. Die Liposomen wurden für 90 min bei 37°C in Kontakt mit den Zellen belassen, wobei ein Verhältnis von $1\mu\text{mol Lipid} / 1 \cdot 10^6$ Zellen gewählt wurde. Nach dem Entfernen nichtzellassoziierter Liposomen durch mehrfaches Spülen, wurden die Zellen für 3 Minuten mit einem sauren Puffer pH 3,0 (3,6g CH₃COOH, 7,02g NaCl, 0,7g KCl, 0,64g CaCl₂, 0,326g KH₂PO₄, 0,288g MgSO₄, 4,96g NaHCO₃, 2,66g Glucose/ l) behandelt und danach wiederum sorgfältig gespült. Im direkten Anschluß daran erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Proben (FITC-Dextran: Laser 488nm, Rhod-PE: 543nm Laser).

3.10.5 Internalisierungsuntersuchungen mittels klassischem Fusionsnachweis

Für diesen Versuch wurden mit einer 100mM Calceinlösung beladene Liposomen verwendet. Die Übertragung der HUVEC auf die Mikroskopie-Gläschen erfolgte in Analogie zu der unter Kapitel 3.10.3.2 beschriebenen Vorgehensweise. Nach ihrer Zugabe wurden die Liposomen für 90min in Kontakt mit den Zellen belassen, wobei ein Verhältnis von $1\mu\text{mol Lipid} / 1 \cdot 10^6$ Zellen gewählt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37°C oder 4°C. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zur Entfernung nichtzellassoziierter Liposomen bzw. extrazellulär

ausgeflossenen Farbstoffes mehrfach gespült und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Laser 488nm).

3.10.6 Internalisierungsuntersuchungen unter Verwendung des Enzyms Pronase

Für diesen Versuch wurden 0,4mol% DiO fluoreszenzmarkierte Liposomen verwendet. Nach einem konfluenten Wachstum wurden die HUVEC mittels Trypsinbehandlung (0,25 % Trypsin-EDTA, Sigma) aus den Kulturflaschen geerntet, auf Gewebekulturschälchen (d=35mm, 2ml, Roth, Gelatineimprägnierung) verteilt und für mindestens 3 Stunden im Brutschrank belassen. Die Hälfte der Einzelzellansätze wurden anschließend einem Stimulationsprozeß unterzogen (3h, 37°C, 16 ng hIL-1 β / 2ml Medium/ 1·10⁶ Zellen). Nach ihrer Zugabe verblieben die Liposomen für 90min bei 37°C in Kontakt mit den Zellen, wobei ein Verhältnis von 0,5 μ mol Lipid / 1·10⁶ Zellen gewählt wurde. Nach dieser Inkubationszeit folgte durch mehrmaliges Spülen der Zellen eine Abtrennung nichtzellassoziierter Liposomen. Anschließend wurden zu jeder Kulturschale 0,8ml einer 0,1%igen Pronaselösung gegeben. Nach ca. 1 Minute hatten sich alle Zellen vom Kulturschalenboden abgelöst und wurden mit der Pronaselösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, das 0,8ml einer 30%igen Saccharoselösung enthielt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation mit 100 000xg wurde der Überstand abgenommen, in eine Meßküvette überführt und am Fluorimeter vermessen (DiO: λ_{ex} =484 nm, λ_{em} =501 nm). Das im Eppendorf-Reaktionsgefäß verbliebene Zellpelett wurde durch Zugabe einer 0,2%igen Triton X100-Lösung und intensivem Vortexen zerstört und anschließend das Lysat für 10 Minuten mit 100 000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in eine Meßküvette überführt und am Fluorimeter vermessen. Als Blindwert der Messung diente ein mitgeführter, analog behandelter blanker Zellansatz.

3.11 Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM)

Für die Raster-Kraft-mikroskopischen Messungen (AFM, atomic force microscopy) wurde ein NanoscopeTM IIIa Gerät (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) im TappingmodeTM benutzt. Die Arbeiten am Mikroskop sowie die Aufarbeitung des Bildmaterials wurden freundlicherweise von Dr. U. Bakowsky (Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle) durchgeführt. Die Darstellung der Oberflächenaufnahmen erfolgte entweder im Amplituden- oder Höhenmodus. Die zu untersuchenden Liposomen waren auf einem gereinigten Silikonträger lokalisiert, die hydratisierten Proben befanden sich entweder unter Milli Q[®]-Wasser oder dem entsprechenden Puffer.

3.12 Durchflußapparat

Für die dynamischen Targetierungs-Untersuchungen wurde eine Durchflußapparat aus Polyacrylat (Fertigung in Auftragsarbeit) verwendet. Abb. 5 zeigt die Apparatur mit doppelter Durchflußkammer.

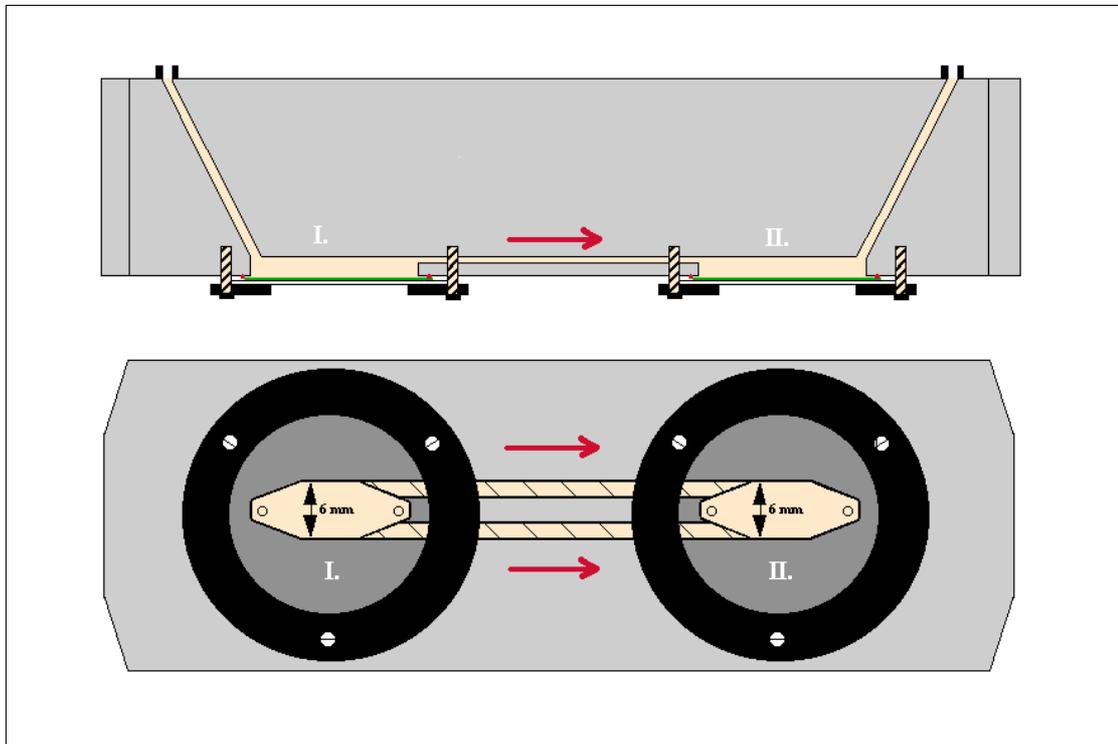


Abb. 5: Durchflußapparat mit 2 Durchflußkammern

Die Durchflußkammern sind an der Unterseite der Gesamtapparatur lokalisiert und weisen folgende Maße auf: Länge=11mm, Breite=6mm, Höhe=4,5mm). Die inneren Randbereiche der Kammern wurden abgerundet, um Inhomogenitäten der Strömung zu vermeiden. Der Zu- bzw. Ausstrom von Medium wird über zwei Bohrungen ermöglicht, welche von der Oberseite der Apparatur in die Kammerräume führen. Diese Bohrungen münden außerhalb der Apparatur in Schlauchansätzen, welche den Anschluß von Schlauchverbindungen mit einem Innendurchmesser von 1mm an die Apparatur ermöglichen. An der Unterseite der Durchflußapparat wird jede Kammer von einem rundem Glasplättchen ($d=18\text{mm}$) verschlossen, welches während des Versuches auf der Kammer-zugewandten Seite mit einer Zellmonolayer bewachsen ist und auf einer, in die Kammer eingelassenen Gummidichtung ($d=15\text{mm}$) aufliegt. Fest fixiert wird jedes Glasplättchen abschließend durch einen flachen Metallring, der von drei Schrauben gehalten wird. Im zuführenden Schlauch wurde unmittelbar vor Eintritt in die Apparatur eine Blasenfalle ($V=2\text{ml}$) zwischengeschaltet. Zur Erzeugung eines kontinuierlichen Medium-Kreislaufes ($2,4\text{ml}/\text{min}$) wurden die Schlauchverbindungen an eine Walzenpumpe (Isnatec, 12 Rollen) angeschlossen und mit einem Mediumreservoir verbunden. Um eine konstante Temperatur des durchströmenden Mediums von 37°C zu garantieren, wurden bei Langzeitversuchen (bis max.18 Stunden) sowohl die Apparatur als auch das Mediumreservoir auf einer Wärmeplatte fixiert. Zur mikroskopischen Beobachtung der Zellen konnte die Kammer aufgrund ihrer äußeren Gestalt fest im beheizbaren Objektisch fixiert werden.

Kapitel 4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung und Charakterisierung selektingerichteter Immunoliposomen

Im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung erfährt das Endothelgewebe des betroffenen Gefäßes eine charakteristische phenotypische Veränderungen in einen aktivierten Zustand. Der lokale Prozeß der Endothelaktivierung ist u.a. durch die Expressierung verschiedener Zell-Ädhäsions-Moleküle (CAM) gekennzeichnet. Diese stellen aufgrund der direkten zeitlichen und räumlichen Bindung ihrer Expression an das Entzündungsgeschehen ideale Zielstrukturen für liposomale Drug Delivery Systeme dar, die im Gesamtkonzept einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie ihren Einsatz finden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das E-Selektin als Zielstruktur favorisiert. Als Transportvesikel sollten, aufgrund der in Kapitel 2.1 vorgestellten besonderen Eigenschaften von Immunoliposomen, mit Anti-(Human)-E-Selektin-Antikörpern funktionalisierte Liposomen zur Anwendung kommen.

Die Erstellung und Optimierung dieses E-Selektin-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 dennoch wichtige Erkenntnisse lieferten und die Planung entscheidender Experimente beeinflussten.

Die Arbeiten begannen mit der Selektion einer geeigneten Methode zur Darstellung der Immunoliposomen aus der großen Anzahl veröffentlichter Kopplungsprozeduren. Zusätzlich wurde eine weitere Kopplungsmethode entwickelt. An die Darstellung der Immunoliposomen schloß sich die Erprobung ihrer in vitro Target-Erkennungs- und Bindungsfähigkeit unter Verwendung verschiedener Zellarten und Nachweismethoden an. Die im Anschluß an die positiv verlaufenden Targetierungsuntersuchungen durchgeführten Experimente zur Internalisierung der angereicherten Liposomen werden im letzten Teil der Arbeit vorgestellt.

4.1.1 Vergleich etablierter Methoden zur Herstellung von Immunoliposomen

Es gibt eine Vielzahl veröffentlichter Methoden zur Kopplung von Antikörpern auf die Oberfläche von Liposomen. Im theoretischen Teil der Arbeit wurde eine Auswahl dieser vorgestellt und bewertet (siehe Kapitel 2.1). Für den folgenden Methodenvergleich wurde unter anderem die Biotin-Avidin-Methode ausgewählt [146,147]. Sie ist aufgrund der großen Anzahl kommerziell verfügbarer biotinylierter Proteine eine häufig verwendete Möglichkeit und birgt aufgrund des nichtkovalenten Charakters der geschlossenen Bindung nicht die Gefahr von Proteindenaturierungen während der Kopplungsprozedur. Aus der großen Palette der thioreaktiven Methoden wurde die Variante unter Verwendung des Lipidankers PDP-PE ausgewählt, welcher nach Erzeugung einer reaktiven Sulfhydryl (-SH) Gruppe mit dem entsprechenden MPB-Antikörper unter Bildung einer kovalenten Thioetherbindung reagiert. Die thioreaktiven Kopplungsmethoden sind die am häufigsten verwendeten und in Bezug auf die erreichbaren Protein-Kopplungsausbeuten effektivsten Methoden [60-62]. Die Kopplungstechniken unter Bildung einer Carbonsäureamidbindung zwischen liposomaler und Proteinkomponente zeichnen sich ebenfalls durch hohe Kopplungsausbeuten aus und sind wie

die thioreaktiven Methoden universell einsetzbar. Von großem Vorteil ist dabei, daß die Antikörper keine spezifischen Derivatisierungen benötigen [64-66]. Als Ankerlipid wurde dafür N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin ausgewählt und in zwei Kopplungsvarianten mit hauptsächlichlicher Unterscheidung in den pH-Verhältnissen während der Reaktion verwendet. Die kovalente Kopplung von partiell (Fc-Teil) oxidierten Antikörpern an hydrazidgruppenhaltige Lipidderivate unter Ausbildung einer Hydrazonbindung gehört ebenfalls in die Reihe der häufig verwendeten Kopplungstechniken [46]. Während alle anderen Techniken zu einer zufälligen Orientierung (random orientation) des Antikörpermoleküls auf der Liposomenoberfläche führen, erfolgt die Bindung des Antikörpers in diesem Fall ausschließlich über dessen Fc-Teil, aufgrund der dort lokalisierten Kohlenhydratgruppen. Diese Orientierung bedingt bei einer systemischen Applikation eine Reduktion der unerwünschten Fc-Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Immunoliposomen durch Makrophagen der Leber/Milz (MPS). Darin liegt der Vorteil dieser Methode. Hinsichtlich der erreichbaren Protein-Kopplungsausbeuten ist sie ineffektiver als andere Methoden. Im Rahmen unseres Vergleiches wurde sie nicht berücksichtigt, weil sie aufgrund des notwendigen Oxidationsschrittes ein hohes Schädigungspotential der Antikörper aufweist, was sich auch in einer eingeschränkten Targetbindungsfähigkeit der resultierenden Immunoliposomen äußern kann [42,148]. Zum anderen wird der positive Effekt einer Reduktion der Fc-vermittelten Makropagenaufnahme dieser Immunoliposomen teilweise durch eine verstärkte Scavenger-Rezeptor-vermittelte Makrophagenaufnahme kompensiert [42,63]. Unterschiedliche Antikörper zeigen jedoch unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber der oxidativen Behandlung. In Hinblick auf die enormen Preise der spezifischen Antikörper wollten wir die Risiken dieser Kopplungstechnik aber nicht eingehen.

Abb. 6 zeigt einen Vergleich der einzelnen Methoden hinsichtlich der erreichbaren Protein-Kopplungsmengen in $\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol PL}$. Frühere Vergleiche aus der Literatur leiden in ihrer Aussagekraft oft aufgrund der Tatsache, daß die verschiedenen Liposomenpräparationen in ihrer Lipidankermenge differieren. Wir wählten für alle Varianten eine Lipidankerkonzentration von 5mol%/ Gesamtlipid (Ausnahme: 0,1 mol% Biotin-PE). Einen entscheidenden Einflußparameter auf die Kopplungsausbeute stellt auch das initiale molare Verhältnis Antikörper:Gesamtlipid dar. Von Hansen et al. [62] wurde für verschiedene Methoden als optimal das Verhältnis 1:1000 gefunden. Eine weitere Erhöhung des Verhältnisses führte nicht zu einem signifikanten Anstieg der Kopplungsausbeute. Obwohl auch bemerkt werden muß, daß unterschiedliche Kopplungsmethoden unterschiedliche Abhängigkeiten ihrer Kopplungsergebnisse von diesem Verhältnis zeigen, arbeiteten wir bei unserem Vergleich stets mit einem initialen molaren Verhältnis Antikörper:Gesamtlipid von 1:1000. Daraus resultiert ein initiales molares Verhältnis Antikörper:Ankerlipid von 1:50. Als Proteinkomponente wurde humanes IgG verwendet, die Lipidzusammensetzung der Liposomen war SPC:Chol:Lipidanker (6,95:3:0,05). Es handelte sich also um konventionelle Immunoliposomen ohne sterische Stabilisierung, bei keiner Liposomenpräparation wurde eine Veränderung der Vesikelgröße oder Vesikelstabilität beobachtet.

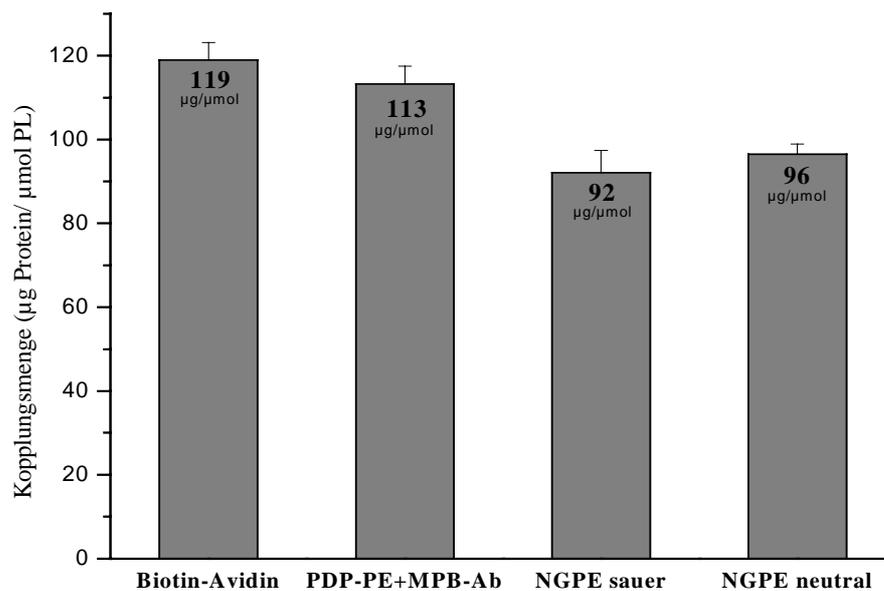


Abb. 6: Vergleich konventioneller Kopplungsmethoden

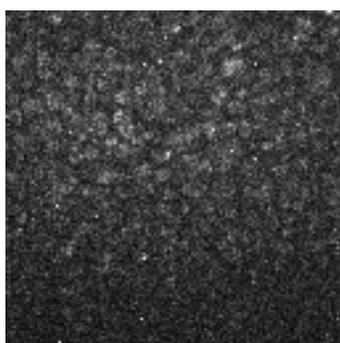
Aus Abb. 6 geht hervor, daß mit allen verwendeten Methoden ähnlich hohe Protein-Kopplungsmengen erreicht wurden. Der maximale Unterschied zwischen 2 Methoden (Biotin/Avidin, $119\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ - NGPE sauer, $92\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) von $27\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol PL}$ würde theoretisch für 100nm große Liposomen einen Unterschied von ca. 10 Antikörpermolekülen/Liposom bedeuten (Berechnungsgrundlagen: mittlerer Flächenbedarf einer Lipids = $0,561\text{nm}^2$ (SPC:Chol/7:3/mol:mol), ca. $4 \cdot 10^{12}$ Antikörper/ $\mu\text{g Protein}$, ca. $9,4 \cdot 10^{12}$ Lipos./ $\mu\text{mol PL}$). Diese Differenz ist in diesen hohen Bereichen gebundener Proteinmengen ohne entscheidende Bedeutung. Zudem muß in Hinblick auf eine in vivo Anwendung der Immunoliposomen bedacht werden, daß eine sehr hohe Antikörpermenge wiederum zu einer Verkürzung der Zirkulationszeit aufgrund einer gesteigerten Makrophagenaufnahme führt [42,43, siehe auch Kap. 2.1]. Eine ausreichende Targetbindungsfähigkeit der Immunoliposomen kann desweiteren schon mit bedeutend geringeren liposomal gebundenen Antikörpermengen gewährleistet werden. Eine Proportionalität zwischen gebundener Antikörpermenge und Targetbindungsfähigkeit der Immunoliposomen scheint nicht zu bestehen, denn in verschiedenen Untersuchung mit konventionellen Immunoliposomen ohne PEG-Beteiligung [42,43] konnten mit drastischen Erhöhung der liposomalen Antikörpermenge nur geringfügige Steigerungen der zellassoziierter Lipidmenge erreicht werden (z.B. Steigerung der gekoppelten Antikörpermenge von 36 auf $160\mu\text{g}/\mu\text{mol PL}$ führte zu Anstieg der gebundenen PL-Menge/mg Zellprotein um ca. 22% [43]). Kopplungsmengen zwischen $30\text{-}50\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol PL}$ scheinen einen akzeptablen Kompromiß darzustellen.

Aufgrund der Fähigkeit aller Methoden vergleichbar gute Protein-Kopplungsergebnisse zu ermöglichen, muß die Auswahl einer Methode durch deren Praktikabilität bestimmt werden. In dieser Hinsicht favorisierten wir die Kopplungsmethode über eine Carbonsäureamidbindung mit Verwendung von NGPE als Ankerlipid. Obwohl sich die nichtkovalente Biotin-Avidin-Methode als eine einfache und unproblematische Technik mit guter Kopplungsausbeute erwiesen hat, besteht ihr entscheidender Nachteil in der eingeschränkten Verfügbarkeit der biotinylierter Derivate des zu koppelnden Proteins sowie des Zusatzbedarf des Crosslinkers Avidin. Gegen die Auswahl der thioreaktiven Methoden

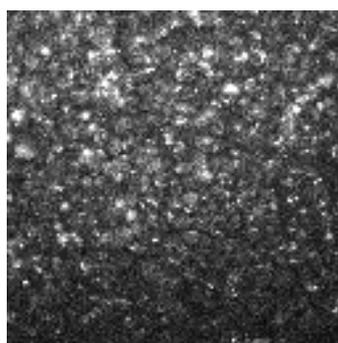
sprach deren hoher präparativer Aufwand sowie die möglichen Verluste bei der Proteinreinigung. Unter den einzelnen Varianten der NGPE-Methode entschieden wir uns für die Kopplung unter neutralen pH-Verhältnissen. Als Begründung für die Notwendigkeit der Ausführung der Kopplung im neutralen Milieu wird eine schnelle Abnahme der EDC-Aktivität bei sauren pH-Werten angegeben [66]. Aufgrund der marginalen Unterschiede in den Kopplungsausbeuten beider Varianten scheint dieser Aspekt jedoch nur von geringfügiger Bedeutung zu sein. Obwohl wir keinerlei Anzeichen für eine pH-Wert verbundene Schädigung des Antikörpers (Lösung in Boratpuffer pH8,4) beobachtet haben (gleichartige Targetbindungsfähigkeit der resultierenden Immunoliposomen beider Varianten), entschieden wir uns für die neutrale Variante als unsere Hauptmethode zur Herstellung konventioneller Immunoliposomen. Die Methoden der Kopplung über eine Carbonsäureamidbindung zeichnen sich vor allem durch ihre einfache, unproblematische Durchführung ohne die Notwendigkeit einer Antikörperderivatisierung aus.

4.1.2 Entwicklung einer neuen Kopplungsmethode

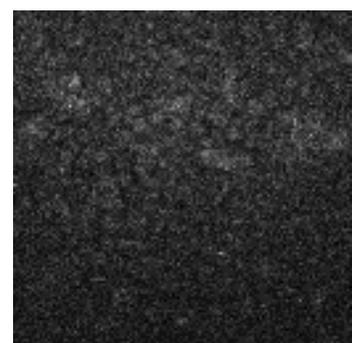
Die präparierten Immunoliposomen wurden anschließend in ersten Zellversuchen unter statischen Bedingungen (siehe Kapitel 3.9.1) und mit ausschließlich mikroskopischer Auswertung hinsichtlich ihrer Targetbindungsfähigkeit überprüft. Dabei kamen CHO-Zellen mit konstitutiver E-Selektin-Expression zum Einsatz, die sich durch eine sehr gute Kultivierbarkeit auszeichnen und uns in ausreichendem Umfang zur Verfügung standen. Den spezifisch funktionalisierten Immunoliposomen standen als Referenz unspezifisch funktionalisierte Immunoliposomen (unspez. humanes IgG) und unfunktionalisierte Liposomen identischer Lipidzusammensetzung gegenüber, desweiteren kamen unveränderte CHO-Zellen ohne E-Selektin-Expression zum Einsatz. Die Zellen, positioniert als Monolayer auf einem dünnen Glasplättchen, wurden mit Immunoliposomen für 90 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend nichtzellassoziierte Liposomen durch mehrmaliges Spülen entfernt und die Zell-Präparate ausgewertet. Aufgrund der Markierung der Liposomen (3mol%NBD-PE) konnte deren Bindung an der Zelloberfläche fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden (Abb.7).



(A) Liposomen, unfunktionalisiert



(B) Immunoliposomen, spezifisch



(C) Immunoliposomen, unspezifisch

Abb. 7: Zellbindung unter statischen Bedingungen

In den Versuchen konnten für die spezifisch funktionalisierten Immunoliposomen eindeutig höhere Zellbindungsraten nachgewiesen werden als für die unspezifisch funktionalisierten. Das Versuchsergebnis wurde jedoch deutlich durch die Beobachtung relativiert, daß auch die unfunktionalisierten „blanken“ Liposomen eine sehr hohe Zell-Bindungstendenz aufwiesen, die wir auf unspezifische Membranwechselwirkungen zurückführten.

Das große Ausmaß unspezifischer Membranwechselwirkungen bei Anwendung konventioneller Immunliposomen verdeutlicht bereits unter *in vitro* Bedingungen die Notwendigkeit einer sterischen Stabilisierung der Liposomen. Zum anderen ist diese auch in Hinblick auf eine effektive *in vivo*-Anwendung der Immunliposomen essentiell. Während konventionelle Liposomen allgemein und Immunliposomen in besonderem Maße nach systemischer Applikation sehr schnell durch Zellen des MPS eliminiert werden und aus diesem Grund nur minimale Zirkulationshalbwertszeiten aufweisen, kann durch Aufbau einer sterischen Barriere um die Liposomen eine signifikante Erhöhung der Zirkulationshalbwertszeit erreicht werden. Der bereits in Kapitel 2.1 beschriebene protektive (Stealth)-Effekt der Liposomen ergibt sich zum einen aus einer Reduktion der Adsorption opsonisierender Proteine an die Liposomenoberfläche und zum anderen aus der Inhibierung der nicht-opsoninabhängigen Aufnahme der Liposomen durch Kupffer-Zellen (Makrophagen) der Leber [39]. Der Aufbau einer „hydrophilen Barriere“ um die Liposomen wird durch den Einbau von Phospholipiden mit Polyethylenglykol-Kopfgruppen (PEG-Lipide) erreicht. Zur Herstellung sterisch stabilisierter Immunliposomen vom Typ I, der durch die direkte Bindung der Antikörper auf die Liposomenoberfläche charakterisiert ist, wird die Lipidzusammensetzung von Liposomen durch PEG-Lipide erweitert und etablierte Kopplungsmethoden für konventionelle Immunliposomen genutzt. Während der Einbau der PEG-Lipide auf der einen Seite die essentielle sterische Stabilisierung der Liposomen bedingt, wirkt die sterische Barriere auf der anderen Seite einer Bindung der Antikörper auf der Vesikeloberfläche entgegen. Der Einfluß der liposomalen PEG-PE-Konzentration auf das Kopplungsausmaß wird in Abb. 8 deutlich.

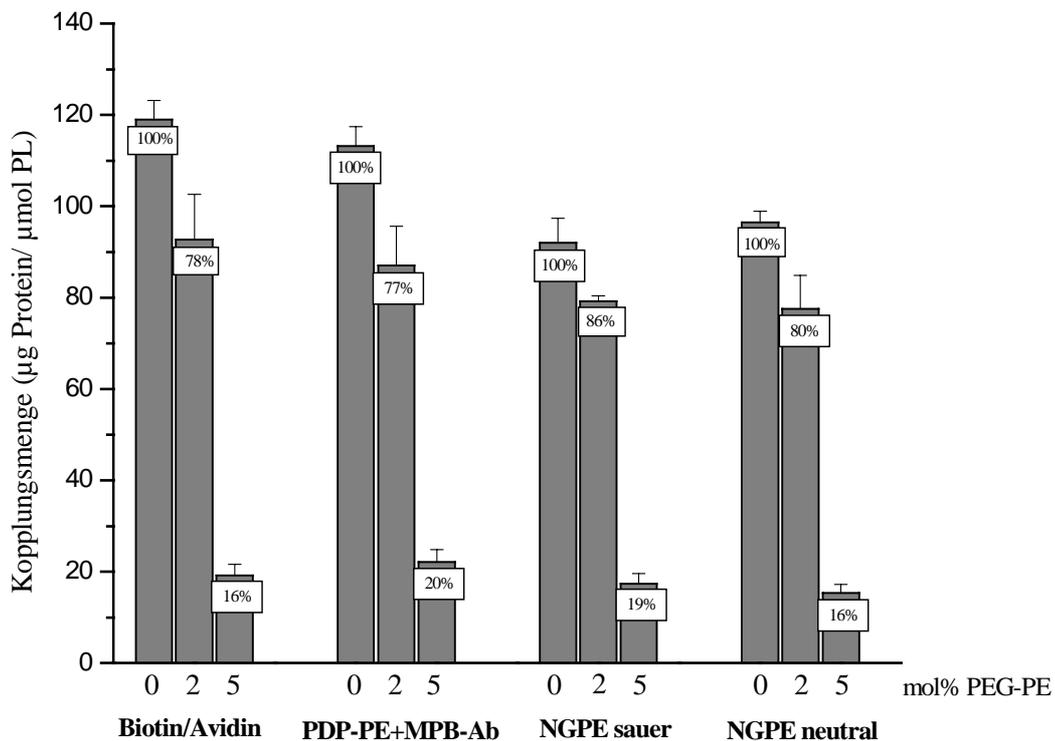


Abb. 8: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute von der PEG Konzentration

Eine Reduktion des unspezifischen Kontaktes unfunktionalisierter Liposomen mit der Zelloberfläche gelang uns mit liposomalen mPEG-PE 2000-Konzentrationen von 2mol%/ PL. Aus *in vivo* Untersuchungen ist bekannt, daß für eine effektive Zirkulationszeitverlängerung

mPEG-PE 2000-Konzentrationen von 5mol%/PL notwendig sind [127-129]. Aus diesem Grund wurden diese beiden mPEG-PE 2000-Konzentrationen für den in Abb. 8 dargestellten Vergleich genutzt. Es wird deutlich, daß die Anwesenheit von mPEG-PE tatsächlich zu einer drastischen Reduktion des Kopplungserfolges führt. Das Ausmaß der Reduktion der gebundenen Antikörpermenge ist bei allen Kopplungstechniken mit ca. –20% bei Anwesenheit von 2mol% PEG-PE 2000/PL und ca. –80% bei Anwesenheit von 5mol% PEG-PE 2000/PL annähernd gleich. Diese enorme Abhängigkeit der erreichbaren Antikörper-Kopplungsmengen von der anwesenden PEG-Lipid-Konzentration, deren Reduktion wiederum eine Einbuße der in vivo Zirkulationshalbwertszeit bedeuten würde, führt zu einer starken Einschränkung der Effektivität dieses Typs sterisch stabilisierter Immunoliposomen. Während der Stabilisierungseffekt optimal erreicht werden kann, leidet der Targetierungseffekt der gebundenen Antikörper. Kopplungsmengen von ca. 20µg Protein/µmol PL sind für eine gute Target-Erkennungsfähigkeit bei Anwendung konventioneller Immunoliposomen durchaus ausreichend, in Bezug auf die sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ I muß jedoch zusätzlich die eingeschränkte Antikörperzugänglichkeit auf der Liposomenoberfläche durch die benachbarten PEG-Ketten bedacht werden.

Eine mögliche Lösung dieses Problems bietet der Einsatz der sog. sterisch stabilisierten Liposomen des Typs II.

4.1.2.1 Darstellung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE

Die Weiterentwicklung der sterisch stabilisierten, langzirkulierenden Immunoliposomen vom Typ 1 mit Antikörperkopplung direkt auf der Liposomenoberfläche zu sog. Typ II Immunoliposomen mit exponierter Stellung der Antikörper am distalen Ende des PEG-Spacer-Molekülteils brachte entscheidende Vorteile mit sich. In welcher Art und Weise sich die besondere Position der Antikörper positiv auf Parameter wie bspw. die Antikörperkopplungsausbeute, die Antikörpererkennbarkeit und das Targetbindungsvermögen auswirken können, wurde bereits im theoretischen Teil in Kapitel 2.1 der Arbeit behandelt. Die meisten der bereits vorhandenen heterobifunktionalen PEG-Derivate mit der Möglichkeit einer endständigen Antikörperankopplung sind jedoch Resultate aufwendiger Syntheseprozesse [43-45,130,131] und kommerziell nicht beziehbar. Unser Ziel war es, ein Ankerlipid zu entwickeln, dessen Darstellung zum einen unkompliziert durchführbar ist und das zum anderen den Ausgangspunkt zu einer möglichst schnellen, einfachen und schonenden Kopplungsprozedur ohne die Notwendigkeit einer Antikörperderivatisierung darstellt.

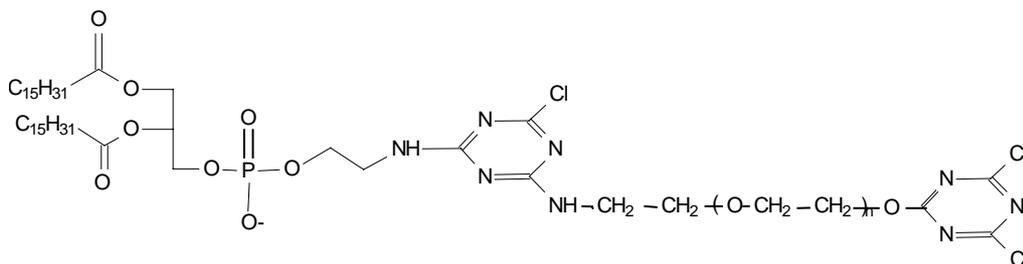


Abb. 9: Der Lipidanker Cyanur-PEG-PE (*N*-[5-Chlor-3-(ω -(3,5-Dichlor-2,4,6-triaz-2-yl)-oxy)-Poly(ethylenglykol) ethylamino)-2,4,6-triaz-2-yl]-DPPE)

Als Verbindungsglied zwischen Phospholipidgrundkörper und PEG-Kette diente Cyanurchlorid, zusätzlich kam das trifunktionelle Reagens zur Endgruppenfunktionalisierung der PEG-Kette zum Einsatz. Cyanurchlorid wurde in den letzten Jahrzehnten vor allem intensiv zur Protein- oder DNA-Kopplung an Hydroxygruppen-tragende Polymere, in den

meisten Fällen Polyethylenglykol, genutzt [124,125]. Im Prinzip ist Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin) ein trifunktionelles Reagens, jedoch mit starker Reaktivitätsabstufung. Während die ersten beiden Chlorsubstituenten durch Reaktion mit Nukleophilen unter relativ milden Bedingungen substituierbar sind, ist die Reaktivität des dritten Chlorsubstituenten stark abgeschwächt, seine Substitution würde extreme, für Proteinstrukturen untolerierbare Bedingungen, verlangen. Die Reaktivität des Triazins gegenüber nukleophilen Substanzen nimmt mit zunehmendem Substitutionsgrad stark ab.

Das freie Cyanurchlorid gilt zwar als eine die Atemwege reizende Substanz [123], jedoch haben umfangreiche Zellkompatibilitätsuntersuchungen von Wyszynska et al. [123] bewiesen, daß Cyanurchlorid keine akute oder chronische Toxizität oder Genotoxizität sowie keine mutagenen Effekte aufweist. Diese Erkenntnisse zur Biokompatibilität des Cyanurchlorides waren eine wichtige Voraussetzung für unsere Nutzung des Reagens. Desweiteren kann Cyanurchlorid in der gebundenen Form des Lipidankers als physiologisch sicher angesehen werden, da seine Reaktivität zusätzlich pH-kontrolliert ist (siehe auch Kap. 4.1.2.2). Unter physiologischen pH-Verhältnissen (pH7,4) zeigt sich das Reagens annähernd unreaktiv. Unter milden, von Proteinen (z.B. IgG) tolerierbaren, basischen Bedingungen (Optimum pH 8,8) findet man hingegen eine ausreichende Reaktivität. Die dargestellten Fakten sprechen für eine Nutzung des Cyanurchlorides zur Darstellung eines PEG-Lipidankers, der für die Kopplung von Antikörpermolekülen an langzirkulierende Immunoliposomen vom Typ II genutzt werden kann.

Im ersten Schritt der Darstellung erfolgte die Anknüpfung des Cyanurchlorides an die Aminogruppe des Dipalmitoylphosphatidylethanolamins als Voraussetzung für die Verbindung des Phospholipidgrundgerüsts mit der Polyethylenglykol-Kette. Im zweiten Schritt kam das hetero(bi)funktionelle PEG-Derivat α -Amino- ω -Hydroxy-Polyethylenglykol zum Einsatz, welches durch seine abgestufte Reaktivität der beiden Endgruppen die Bildung dimerer Produkte minimiert. Zusätzlich wurde dieses Derivat im molaren Unterschuß eingesetzt. Aufgrund der höheren Reaktivität (höhere Nukleophilie) der Aminogruppe resultierte aus dem zweiten Schritt ein PEG-DPPE-Derivat mit terminaler, freier Hydroxygruppe. Diese reagierte im letzten Schritt wiederum mit freiem Cyanurchlorid unter Bildung eines endgruppenfunktionalisierten PEG-Lipidankers, der die Möglichkeit einer terminalen Proteinbindung bietet.

Die Analytik des Endproduktes erbrachte im Rahmen der Elementaranalyse für die beiden Elemente Chlor und Stickstoff eine geringfügige Abweichung von den theoretischen Werten. Erklärbar ist dies mit einer nicht hundertprozentigen Endgruppenfunktionalisierung der PEG-Ketten des Ankerlipides. Einige wenige Lipidmoleküle des Endproduktgemisches tragen auch nach dem letzten Darstellungsschritt und säulenchromatografischer Isolierung des Endproduktes eine terminale Hydroxygruppe. Aufgrund der Tatsache, daß diese Abweichung auf die später Anwendung des Ankerlipids keinen negativen Einfluß hat, wurde sie als vernachlässigbar eingestuft. Die Moleküle ohne terminalen Cyanurchloridrest tragen aufgrund ihrer Unfähigkeit zur Proteinbindung lediglich zur sterischen Stabilisierung des betreffenden Liposoms bei.

4.1.2.2 Charakterisierung der neuen Kopplungsmethode

Nach Darstellung und Analytik des neuen Lipidankers begannen wir mit dessen Charakterisierung.

So zeigte sich in Untersuchungen zur Kopplungsfähigkeit des Cyanur-PEG-PE eine starke Abhängigkeit des Kopplungsausmaßes vom pH-Wert während der Kopplungsprozedur (Abb. 10).

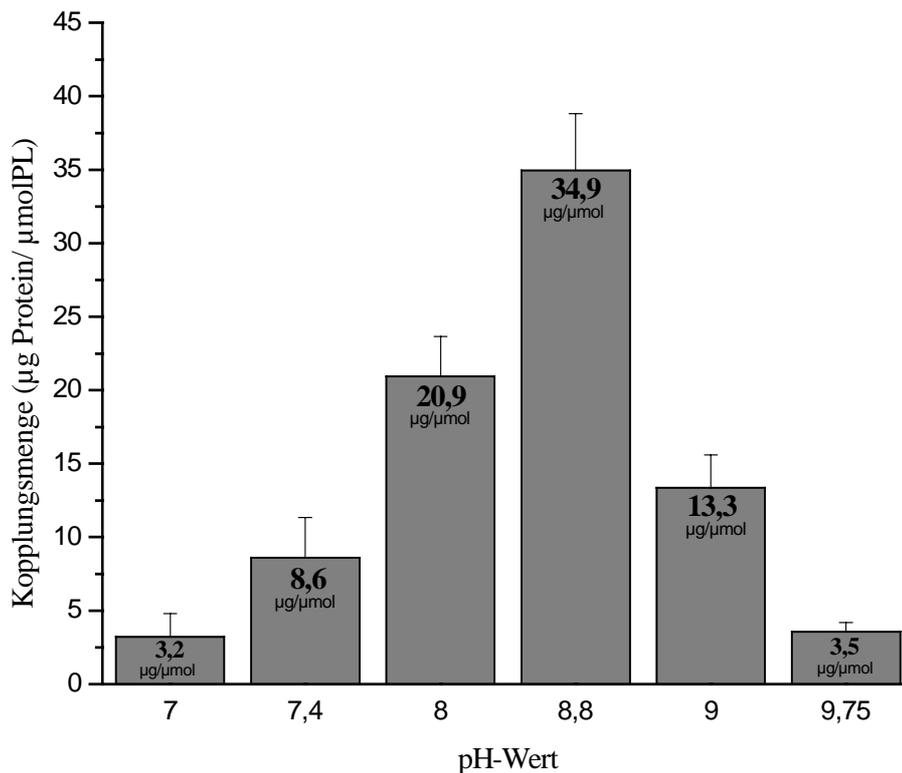


Abb. 10: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute vom Reaktions-pH-Wert

Zur Findung eines pH-Optimums für die Kopplung verwendeten wir Liposomen mit 7,5 mol% Cyanur-PEG-PE/ PL und führten die Reaktion wiederholt unter ansteigendem pH-Wert im Bereich pH7,0-9,75 durch. Während im neutralen Bereich die Reaktion nur in vernachlässigbarem Umfang abläuft, ist mit steigender Alkalisierung des verwendeten Mediums eine deutliche Steigerung der Reaktionsumsatzes zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 8,8 ist die Nucleophilie der Protein-Aminogruppen sehr hoch und damit optimal für einen Angriff am Triazinring des Cyanurchlorides, die Kopplungsreaktion verläuft bei diesem pH-Wert am intensivsten. Der relativ hohe pH-Wert 8,8 läßt sich sicher auch damit erklären, daß die Reaktivität des Triazins gegenüber nucleophilen Substanzen mit steigendem Substitutionsgrad abnimmt und es sich bei dieser Umsetzung bereits um den zweiten Substitutionsschritt am terminalen Cyanurchlorid handelt. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes während der Umsetzung führt wiederum zu einem drastischen Abfall des Kopplungsausmaßes. Als Ursache dafür sehen wir zum einen die Konkurrenzreaktion durch OH⁻-Ionen an, d.h. ab einem bestimmten pH-Wert ist der Austausch des Chloridsubstituenten durch eine OH-Gruppe gegenüber dem Austausch durch eine Protein-Aminogruppe bevorzugt, zum anderen ist im sehr stark alkalischen Milieu auch eine hydrolytische Ringöffnung des Cyanurchlorides möglich.

Die relative Reaktionsträgheit des PEG-Derivates bei den pH-Werten 7,0-7,4 ist auch ein Zeichen für die Unbedenklichkeit der Anwendung des Cyanur-PEG-PE unter physiologischen Bedingungen (pH7,4), unerwünschte Nebenreaktionen durch eine Substitution des dritten Chlorsubstituenten sind im neutralen Milieu nicht zu erwarten. Da der pH-Wert 8,8 für die Immunglobuline tolerierbar war, wurde er für alle weiteren Kopplungen an Cyanur-PEG-PE-

enthaltene Liposomen routinemäßig genutzt. Das initiale molare Verhältnis Antikörper: Gesamtlipid von 1:1000 wurde beibehalten.

In weiterführenden Untersuchungen wurde der Einfluß des Cyanur-PEG-PE-Einbaus in Liposomen der Basislipidzusammensetzung SPC:Chol (7/3) in Hinblick auf die Vesikelstabilität überprüft. Es konnte für Liposomen mit bis zu 10 mol% Cyanur-PEG-PE/PL keine Änderungen der Vesikelgröße beobachtet werden. Die Stabilität von Liposomen mit 7,5 mol% Cyanur-PEG-PE über 14 Tagen wurde mit Hilfe wiederholter Bestimmungen der von den Vesikeln eingeschlossenen Menge einer Fluoreszenzmarkerlösung überprüft. Sind die zu prüfenden Vesikel instabil und für die eingeschlossene Farbstofflösung permeabel, so zeigt sich dies in einem Abfall der Einschlußmenge (l/mol PL).

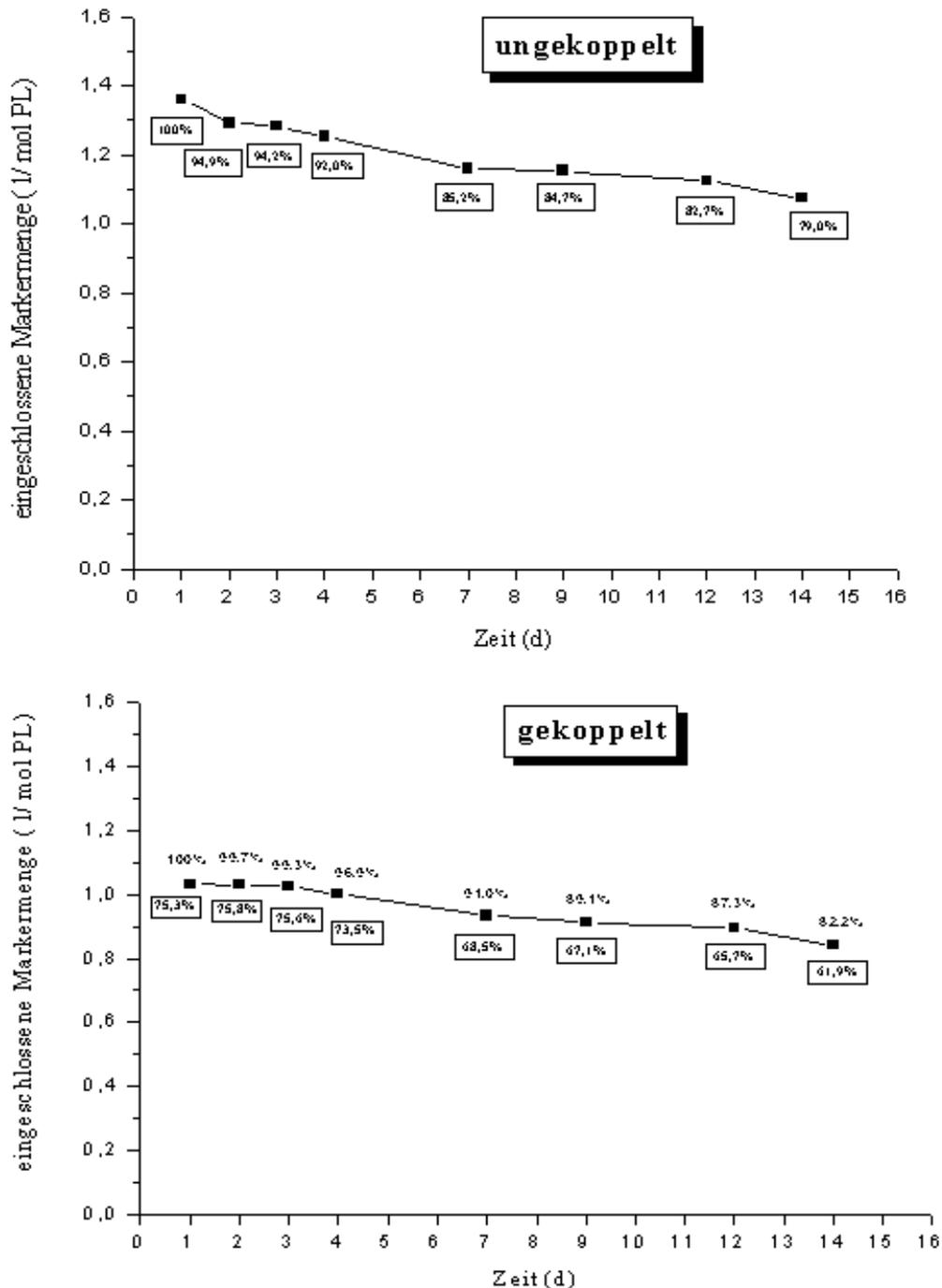


Abb. 11: Einschluß-Stabilität der Liposomen über 14 Tagen (vor bzw. nach Antikörperkopplung)

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung für unfunktionalisierte Liposomen („ungekoppelt“) und für Liposomen derselben Präparation nach erfolgter Antikörperkopplung („gekoppelt“). Die ungekoppelten Liposomen zeigen einen kontinuierlichen, geringfügigen Abfall der Einschlußmenge über den Beobachtungszeitraum. Ein Reduktion der Einschlußmenge von ca. 20% nach dieser Zeit ist akzeptabel und auch von anderen etablierten Lipidzusammensetzungen bekannt [126]. Während die Vesikel im Verlauf der Kopplungsprozedur eine kurzfristige Stabilitätseinbuße erfahren (-ca.25% der Ausgangs-Einschlußmenge), scheint die Anwesenheit der gebundenen Antikörpermoleküle auf der Liposomenoberfläche keinen negativen Einfluß auf die Vesikelstabilität zu besitzen. In Analogie zu den ungekoppelten Liposomen sinkt die Einschlußmenge innerhalb von 14 Tagen um ca. 20%.

Die enorme Abhängigkeit der Antikörper-Kopplungsmengen von der anwesenden PEG-Lipid-Konzentration stellte einen der Hauptnachteile der sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ I dar (siehe Abb. 12). Bei Anwendung der Immunoliposomen mit Cyanur-PEG-PE als Lipidanker, welcher eine endständige Bindung des Antikörpers an der PEG 2000-Kette ermöglicht, sollte dieses Problem nicht auftreten.

Es wurden Liposomen mit ansteigender molarer Konzentration an Cyanur-PEG-PE (0,5-7,5 mol%) präpariert und deren Kopplungsausbeuten ermittelt. Im Vergleich dazu wurden Vesikel analysiert, bei denen das Cyanur-PEG-PE mit mPEG-PE 2000 auf 5mol% Gesamt-PEG-Derivat ergänzt wurde.

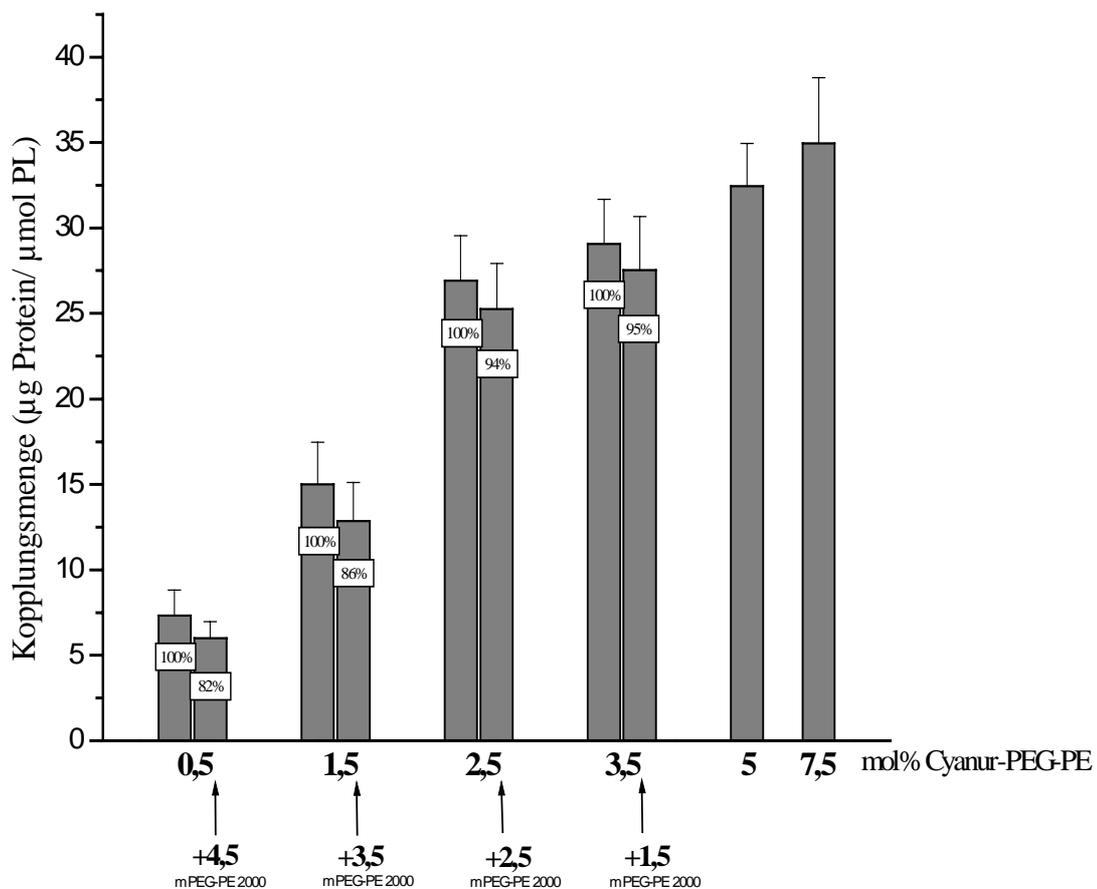


Abb. 12: Abhängigkeit der Kopplungsausbeute von der inkorporierten Cyanur-PEG-PE/mPEG-PE 2000 Menge

Wie aus Abb. 12 hervorgeht, wird das Antikörper-Bindungsmaß im Falle der Cyanur-PEG-PE-Liposomen nur unbedeutend von der Anwesenheit zusätzlicher Mengen mPEG-PE beeinflusst. Die maximale Differenz des Bindungsmaßes zwischen Liposomen mit und ohne mPEG-PE beträgt 18% und ist bei der Liposomenpräparation mit geringster Cyanur-PEG-PE-Konzentration zu finden (0,5 mol% Cyanur-PEG-PE + 4,5 mol% mPEG-PE 2000). Der Vorteil dieser sterisch stabilisierten Immunoliposomen gegenüber den sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ I (Abb. 13) hinsichtlich der erreichbaren Antikörper-Kopplungsmenge bei gleichartiger sterischer Stabilisierung wurde deutlich. Aus Abb. 13 geht weiterhin hervor, daß bis zu einer Cyanur-PEG-PE-Konzentration von 2,5mol% das Bindungsmaß deutlich zunimmt, eine weitere Erhöhung der Lipidanker-Konzentration darüber hinaus bewirkt nur noch geringfügige Steigerungen der Kopplungsausbeute.

Abb. 13 stellt einen abschließenden Vergleich zwischen den bereits charakterisierten, etablierten Methoden zur Herstellung sterisch stabilisierter Immunoliposomen vom Typ I und der neu entwickelten Methode unter Nutzung des Lipidankers Cyanur-PEG-PE dar. Es wurden jeweils Liposomen mit einer Gesamt-PEG-Konzentration von 5mol%/PL verwendet.

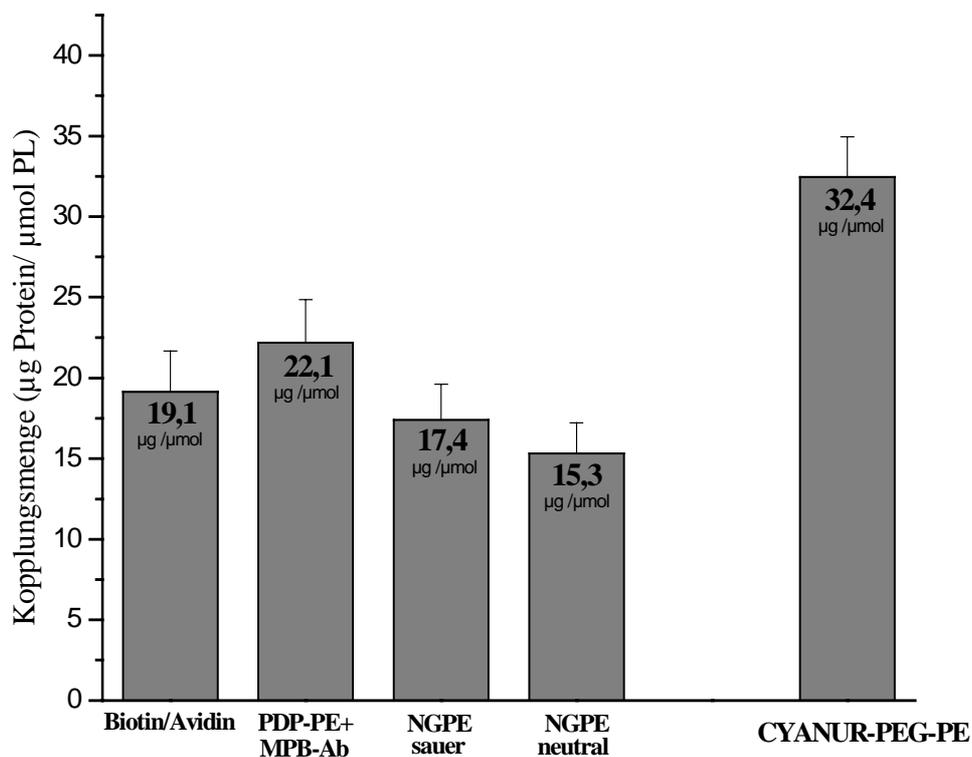


Abb. 13: Erreichbare Kopplungsausbeuten bei Anwendung verschiedener Kopplungsmethoden (Gesamt-PEG-PE-Konzentration: 5mol%/PL)

Der Vergleich zeigt, daß die mit der neuen Methode erreichbaren Kopplungsausbeuten über denen der etablierten Methoden liegt. Dieses Resultat kann in diesem Fall nicht als Überlegenheit der Kopplungstechnik, sondern lediglich des Typs der sterisch stabilisierten Liposomen gewertet werden. Im Vergleich mit den Kopplungsausbeuten konventioneller Liposomen bzw. anderer Kopplungstechniken unter Verwendung von PEG-Derivaten zur terminalen Antikörperkopplung liegen das erreichte Bindungsmaß eher im mittleren bis

unteren Bereich. In Hinblick auf die bereits erwähnte Überlegenheit von Kopplungsmengen um 30-50 μ g Protein/ μ mol PL gegenüber höheren Werten in Hinblick auf eine in vivo-Effektivität der Liposomen (siehe Kap. 2.1) relativiert sich die Bedeutung des erreichten Bindungsausmaßes wieder. Abschließend soll die neu entwickelte Kopplungsmethode charakterisiert werden als eine Technik, die unkompliziert durchführbar ist, keine Aktivierungs- bzw. Derivatisierungsschritte enthält, in ihrer Anwendbarkeit nicht von einer aufwendigen und komplizierten Synthese des Ankerlipids limitiert wird und bezüglich der Kopplungseffizienz mit etablierten Methoden vergleichbar ist.

Neben der verbesserten Antikörper-Kopplungsausbeute liegt der zweite große Vorteil der sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ II gegenüber dem älteren Typ I in einer erhöhten Targetbindungsfähigkeit. Erklärt wird dies mit der exponierten Lage der Antikörpermoleküle am terminalen Ende der PEG-Ketten sowie einer gewissen Flexibilität der Antikörper aufgrund der PEG-Kettenbeweglichkeit. Bisher konnten nur Resultate einer verbesserten Erkennbarkeit und Flexibilität der Antikörper in Form erhöhter zellassoziierter Lipidmengen registriert werden. Das soll in späteren Zell-Bindungsuntersuchungen auch mit unseren neu entwickelten Immunoliposomen versucht werden.

Desweiteren wollten wir jedoch auch versuchen, die unterschiedliche Lokalisation der Antikörper in Bezug zur Liposomenoberfläche bei beiden Typen sterisch stabilisierter Immunoliposomen zum ersten Mal optisch zu erfassen.

Dazu wurde das Verfahren der Raster-Kraft-Mikroskopie (atomic force microscopy, AFM) genutzt, welches zur Charakterisierung von Oberflächentopographien mit lateraler Auflösung von wenigen Nanometern bis zu ca. 100 μ m und vertikaler Auflösung von weniger als 1 nm eingesetzt wird. Eine Darstellung von Immunglobulinmolekülen (5-10nm) auf der Oberfläche von ca. 200nm großen Liposomen sollte damit möglich sein. Die Raster-Kraft-Mikroskopie ist eine sehr materialschonende Methode der Oberflächenanalytik, sie bedarf keiner besonderen Probenpräparation und stellt lediglich Anforderungen an die Oberflächenrauigkeit und -rigidität der Probe. Von fluiden Liposomen sind bisher keine topografischen Abbildungen bekannt. Die Oberflächenabtastung der Probe erfolgt mit Hilfe einer feinen SONDENSPIZTE, welche rasterförmig über die Probenoberfläche geführt wird. Diese, an einem als Hebelarm dienenden Federbalken (Cantilever) lokalisierte Spitze, besitzt in der Regel eine Länge von ca. 10 μ m und einen Krümmungsradius von ca. 10-20nm. Über die Durchbiegung des Federbalkens kann eine definierte Kraft zwischen SONDENSPIZTE und Probe bestimmt werden. Die zur Konstanthaltung der wirkenden Kraft notwendige vertikale Bewegung eines eingebauten Piezoelementes wird in ein Topographiebild der untersuchten Oberfläche umgerechnet. Die Vermessung unserer Liposomenproben erfolgte im sog. Tappingmode. Hierbei wird der Federbalken in gewissem Abstand von der Probenoberfläche in eine definierte Schwingung nahe der Resonanzfrequenz versetzt und auf die sich durch den Einfluß der Oberfläche ergebende Dämpfung der Schwingung geregelt [150]. Die Darstellung der Oberflächenaufnahmen erfolgt entweder im Amplituden- oder Höhenmodus.

Abb. 14 zeigt eine relativ homogene Population von Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen. Der Durchmesser der abgebildeten Liposomen beträgt ca. 200 nm, womit eine Übereinstimmung mit den Daten der dynamischen Lichtstreuung herrscht.

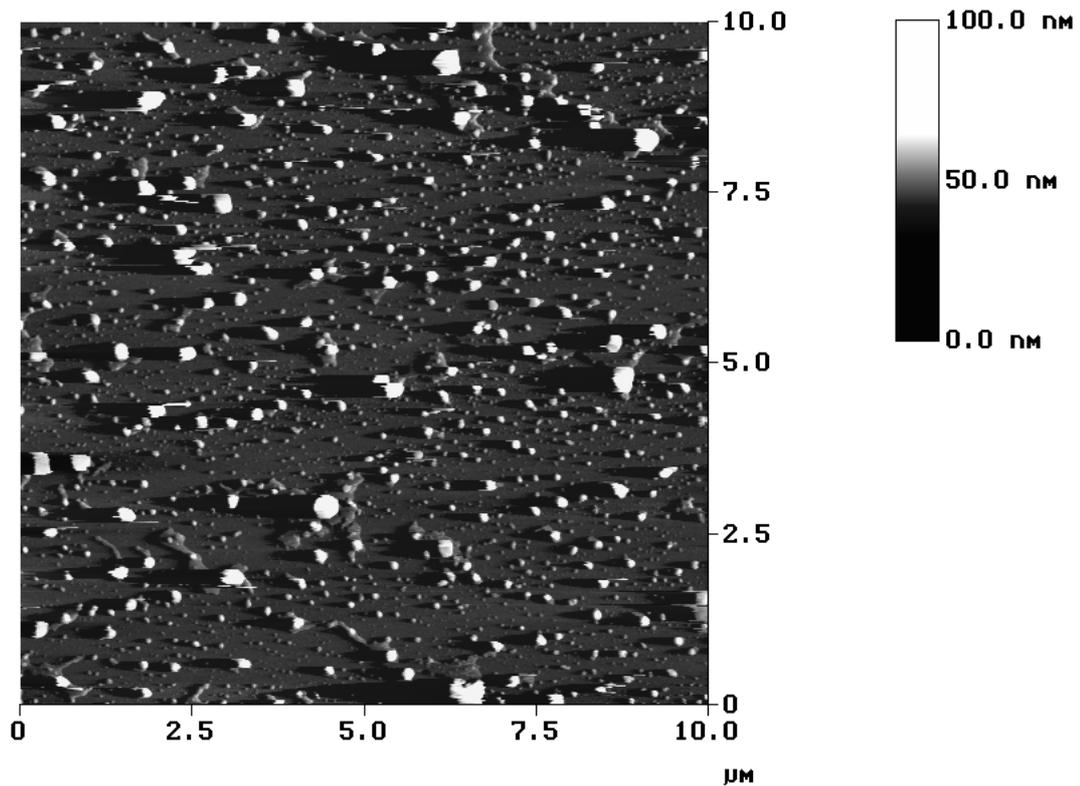


Abb. 14: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme einer Dispersion von Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen (Darstellung im Höhenmodus, Ausschnitt 10x10µm, Die Skala kennzeichnet Höhenunterschiede von 0 bis 100nm.)

Abb. 15 zeigt die starke Fokussierung auf ein einzelnes Liposom der Dispersion aus Abb. 14. Die Proteinquantifizierung für die dargestellte Liposomendispersion erbrachte einen Wert von ca. 30µg IgG/µmol PL. Daraus lässt sich eine mittlere Anzahl von ca. 86 Antikörpermolekülen pro Liposom (200nm) berechnen. (Berechnungsgrundlagen: mittlerer Flächenbedarf eines Lipids = 0,561nm² (SPC:Chol/ 7:3/mol:mol), ca. 4·10¹² Antikörper/ µg Protein, ca. 1,4·10¹² Lipos./µmol PL). Entlang des Oberflächenscans zeigten sich jedoch keine detektierbaren Oberflächenstrukturen in der Dimension von Antikörpern (ca.10nm).

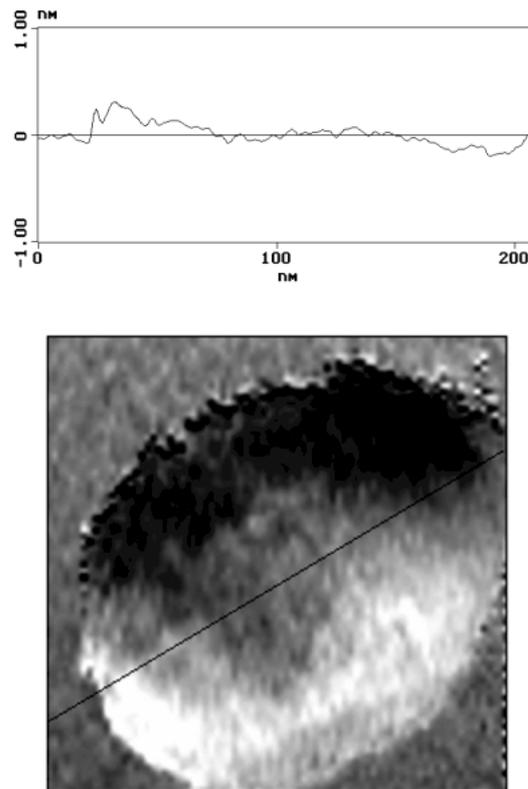


Abb. 15: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme entlang eines einzelnen Cyanur-PEG-PE-Immunoliposoms (Darstellung im Amplitudenmodus)

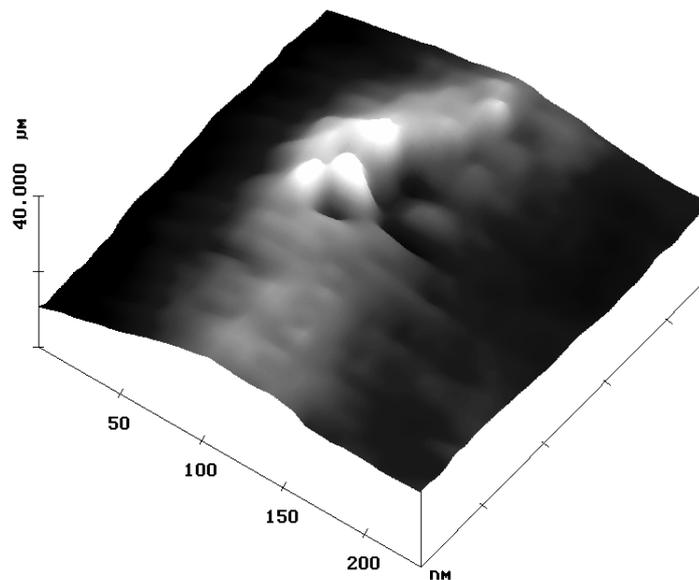


Abb. 16: dreidimensionale Darstellung eines Details der oberen Randzone des einzelnen Cyanur-PEG-PE-Immunoliposoms von Abb. 15 (Kantenlänge des quadratischen Ausschnittes: 250nm, Höhe des Balkens: 40µm, trimere Struktur eines IgG-Moleküls)

Nur bei direkter Fokussierung auf den oberen Randbereich des Liposoms wurden Oberflächenstrukturen sichtbar, deren weitere Vergrößerung das Bild in Abb. 16 ergab. Die sichtbare trimere Struktur, zusammengesetzt aus Kugeln mit einem Durchmesser von jeweils ca. 6-8nm, repräsentiert ein einzelnes IgG-Molekül. Diese Abbildung steht in sehr guter Übereinstimmung mit AFM-Aufnahmen von Fritz et al. [117].

Abb. 16 beweist nun in Ergänzung zur Proteinquantifizierung die Anwesenheit von IgG-Molekülen auf den Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen, welche sich jedoch auf der Vesikeloberfläche einer Detektion entziehen (Abb. 15).

Um zu überprüfen, ob diese Detektions-„Lücke“ ein allgemeines Problem der AFM-Technik ist oder tatsächlich in der Struktur der Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen begründet liegt, wurde eine parallele Untersuchung konventioneller Immunoliposomen (NGPE-Kopplung, neutral, ca. 90µg Protein/µmol PL) durchgeführt. Abb. 17 zeigt deren Ergebnis.

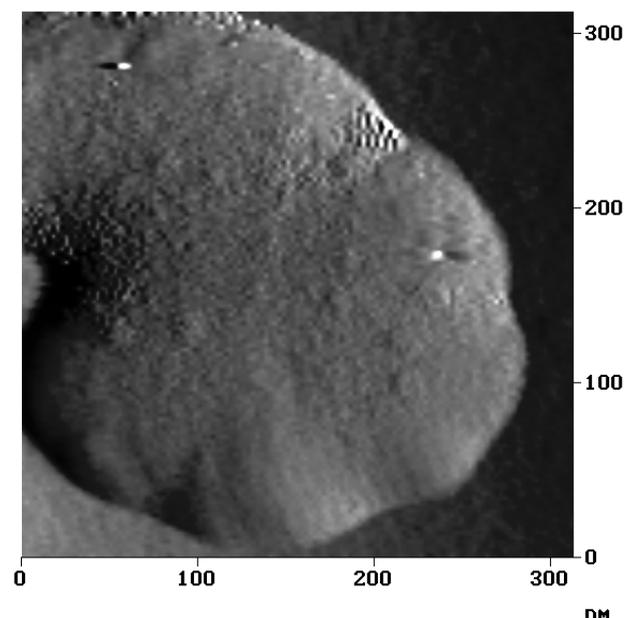


Abb. 17: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme eines einzelnen konventionellen (NGPE)-Immunoliposoms (Darstellung im Amplitudenmodus)

Der gesamte Vesikelkörper weist eine gleichmäßige Strukturierung auf, deren größenmäßige Auflösung im Oberflächenscan (Abb. 18) Einzelstrukturen der Dimension von Antikörpermolekülen (5-10nm) sichtbar macht. Die Antikörper zeigen eine sehr homogene Verteilung über die gesamte Liposomenoberfläche (Abb. 17).

Die Abb. 16 und 17 beweisen die prinzipielle Detektionsmöglichkeit von Antikörpermolekülen auf Liposomenoberflächen mit Hilfe der Raster-Kraft-Mikroskopie. Auch wenn die Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen nur ca. ein Drittel der Antikörperdichte der NGPE-Immunoliposomen aufweisen, müssten bei gleichen topologischen Gegebenheiten trimere Strukturen von IgG-Moleküle detektierbar sein. Als mögliche Ursache für die fehlende Detektierbarkeit der nachweislich vorhandenen Antikörper an den Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen kommt die veränderte Antikörperposition in Bezug zur Liposomenoberfläche in Frage. Die Raster-Kraft-Mikroskopie-Technik verlangt aufgrund des rasterförmigen Abtastens der Probenoberfläche von dieser eine gewisse Rigidität. Auf den

NGPE-Immunoliposomen sind die Antikörper direkt auf der Vesikeloberfläche lokalisiert und verstärkt durch die Möglichkeit einer Mehrfachbindung durch benachbarte Lipidanker relativ unbeweglich fixiert. Diese „Unbeweglichkeit“ erleichtert natürlich eine Raster-Kraft-mikroskopische Detektion. Im Gegensatz dazu befinden sich die Antikörper der Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen am distalen Ende lipidverankerter frei beweglicher PEG-Ketten und damit in ca. 4-5nm Entfernung von der Vesikeloberfläche. Diese gewonnene Flexibilität der Antikörper kann der Grund für ihre fehlende Detektierbarkeit sein, denn sie ermöglicht ihnen theoretisch ein „Ausweichen“ vor der Sondenspitze während des Abtastens der Liposomenoberfläche.

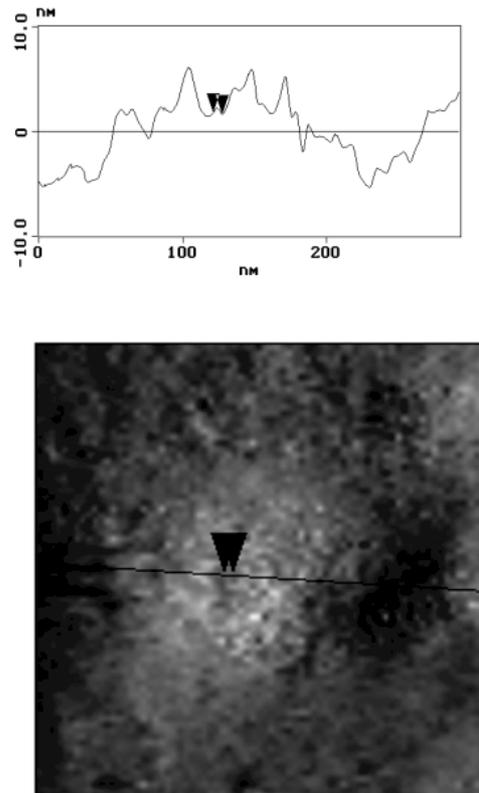


Abb. 18: Raster-Kraft-mikroskopische Aufnahme des einzelnen konventionellen (NGPE)-Immunoliposoms aus Abb. 17 (Darstellung im Amplitudenmodus, größenmäßige Detektion der Oberflächenstrukturen)

Der Einfluß der besonderen Position der Antikörpermoleküle und ihrer dadurch bedingten erhöhten Flexibilität auf die Targetbindungsfähigkeit der resultierenden sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ II wurde in nachfolgenden Zellbindungsstudien untersucht.

4.2 In vitro Targetierungsuntersuchungen mit den Immunoliposomen

4.2.1 Targetierung unter statischen Bedingungen

Für eine umfassende, vergleichende Charakterisierung der Targetbindungsfähigkeit von Immunoliposomen verschiedener Präparationen und Typen der sterischen Stabilisierung

wurden zunächst wiederum CHO-E-Zellen mit konstitutiver E-Selektin-Expression verwendet. Die quantitative Erfassung der Zell-Bindungsausbeuten erfolgte an einem Mikroplatten-Fluorimeter (well-plate-reader). Diese Auswertungsvariante erschien uns aufgrund der großen Anzahl parallel erfassbarer Einzelproben pro Ansatz für diese Problemstellung als optimal. Die Zellen wurden dafür in 96-well-Platten in Form einer Zellmonolayer eingebracht, zunächst mit primärem Antikörper (α mE-Sel 10E9) behandelt und im Anschluß daran mit den zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Immunoliposomen (funktionalisiert mit Anti-Ratten IgG als sekundärem Antikörper) inkubiert. Nach Entfernung nichtzellassoziierter Vesikel erfolgte die fluorimetrische Vermessung der Proben.

Abb. 19 zeigt den Vergleich der Targetbindung zwischen den unterschiedlichen Immunoliposomenpräparationen. Verglichen in Hinblick auf eine unter identischen Bedingungen erreichbare Zell-Bindungsausbeute wurden zum einen konventionelle Immunoliposomen (NGPE-Kopplung) mit sterisch stabilisierten vom Typ I (NGPE-Kopplung) und Typ II (Cyanur-PEG-PE-Kopplung). Zusätzlich wurden innerhalb der beiden sterisch stabilisierten Haupttypen Präparationen mit Abstufungen der liposomal inkorporierten PEG 2000-Mengen betrachtet. Zur Aufnahme von Blindwerten kamen unfunktionalisierte, „blanke“ Liposomen mit und ohne PEG-Einbau sowie konventionelle und sterisch stabilisierte Immunoliposomen mit unspezifischen Antikörpern (human IgG) zum Einsatz.

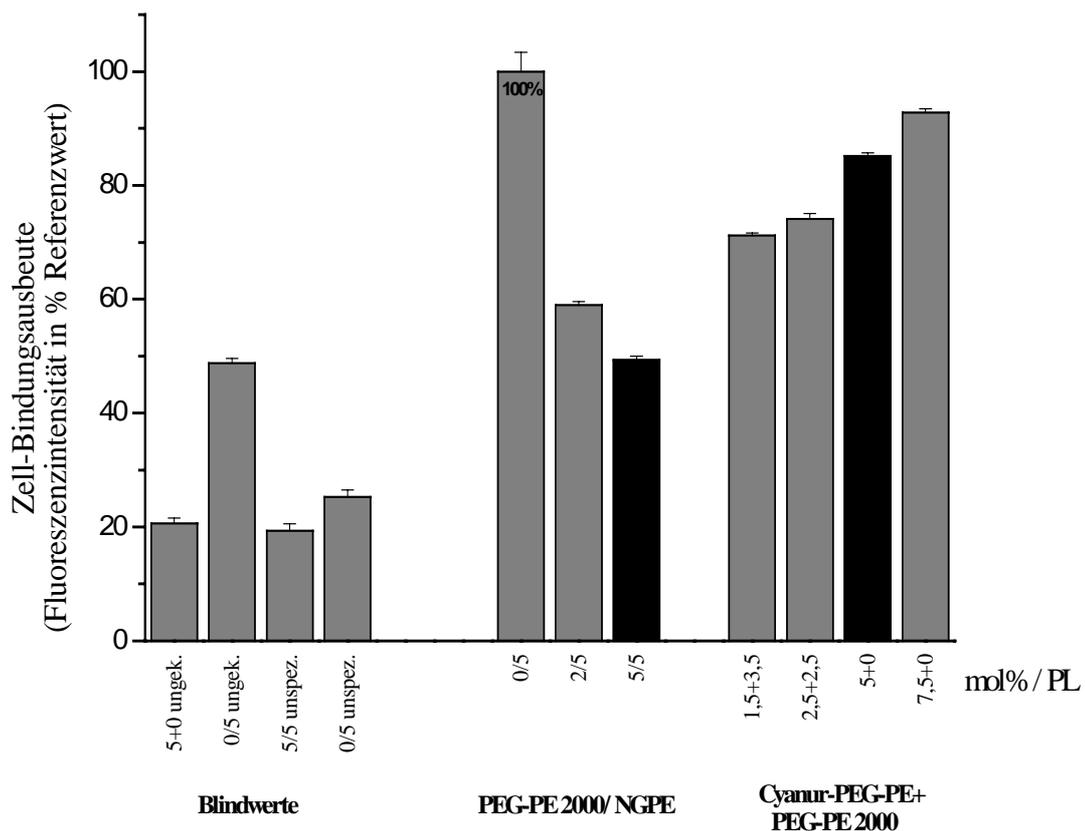


Abb. 19: Zellbindungsausbeute in Abhängigkeit von der liposomalen mPEG-PE2000/Cyanur-PEG-PE Konzentration (Vergleich einer Kopplungsmethode für sterisch stabilisierte Immunoliposomen von Typ I und II)

Die konventionellen Immunoliposomen (0/5) zeigten die höchste Zellbindungsausbeute. Ihr Fluoreszenzwert wurde als 100% gesetzt.

Einen vergleichsweise hohen Wert lieferten die unfunktionalisierten PEG-freien Liposomen (Blindwert). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung starker unspezifischer Membran-Wechselwirkungen in den unter Kapitel 4.1.2 beschriebenen Zell-Bindungsuntersuchungen mit mikroskopischer Auswertung. Das hohe Bindungsausmaß der konventionellen Immunoliposomen resultiert demzufolge aus dem Zusammenwirken unspezifischer Membran-Interaktionen mit unbehinderten, spezifischen Antikörper-E-Selektin-Wechselwirkungen. Dennoch ist das Ergebnis ein Beweis für die Möglichkeit einer spezifischen, E-Selektin-vermittelten Anreicherung von Immunoliposomen an Endothelzellen.

In der Reihe der sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ I nimmt in Analogie zur liposomal gebundenen Antikörpermenge die Bindungsausbeute mit steigender inkorporierter PEG-Menge ab. Die Differenzen zwischen den einzelnen Liposomenpräparationen sind jedoch unbedeutend in Hinblick auf Kopplungs- bzw. Bindungsausmaß. So verursacht ein fast vierfacher Abfall der Kopplungsausbeute von Liposomen mit 2 mol% PEG-PE zu Liposomen mit 5 mol % PEG-PE nur eine geringfügige Differenz (ca. -10%) im Bindungsausmaß. So ist davon auszugehen, daß der starke Abfall des Bindungsausmaßes durch Einbau von 2mol% PEG-PE zu einem großen Teil auch aus einer Unterdrückung der unspezifischen Membran-Wechselwirkungen resultiert. Eine Reduktion der Kopplungsmenge wirkt sich weniger gravierend aus (siehe auch geringe Differenz im Bindungsausmaß zwischen 2 und 5mol% PEG-PE). Die Reduktion des Bindungsausmaßes zwischen Liposomen mit 2 bzw. 5mol% PEG-PE ist dann jedoch auch wieder Ausdruck einer Behinderung der Antikörper-Erkennbarkeit durch benachbarte PEG-Ketten sowie in untergeordnetem Maße einer verringerten Menge lipidgebundener Antikörper.

Eine Favorisierung des Typs II der sterisch stabilisierten Immunoliposomen gegenüber Typ I ergibt sich auch aus einem direkten Vergleich des Bindungsausmaßes von NGPE-Immunoliposomen mit 5mol% PEG-PE und Immunoliposomen mit 5mol% Cyanur-PEG-PE. Das Bindungsausmaß der Typ I-Immunoliposomen fällt bei Einbau der nachgewiesenen notwendigen Konzentration von 5mol% PEG auf den Wert der unfunktionalisierten Liposomen (Blindwert) zurück, das heißt der Effekt der sterischen Stabilität wird nur unter Akzeptanz eines fast vollständigen Verlust des spezifischen Antikörper-Targetierungseffektes erreicht. Im Vergleich mit unspezifisch funktionalisierten Liposomen gleicher Lipidzusammensetzung zeigen die spezifisch funktionalisierten Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen (5mol%) wiederum ein 2,5 fache Erhöhung der Zell-Bindungsrate.

Alle Präparationen mit Cyanur-PEG-PE enthielten mindestens 5mol% PEG-Derivat, so daß unspezifische Membranprozesse unberücksichtigt bleiben dürften. Schon die Liposomen mit der geringsten inkorporierten PEG-Anker-Konzentration von 1,5mol% zeigen eine höhere Zell-Bindungsausbeute als die vergleichbar sterisch stabilisierten NGPE-Liposomen (5/5). Dieses Resultat ist Ausdruck der durch ihre exponierte Stellung verbesserten Zugänglichkeit der Antikörper und gleichzeitig ein indirekter Beweis für ihre mit Hilfe der Raster-Kraft-Mikroskopie nachgewiesene Flexibilität. Ein weitere Erhöhung der Zell-Bindungsausbeuten mit steigenden Cyanur-PEG-PE-Konzentrationen basiert wiederum auf einem Anstieg der lipidgebundenen Antikörper-Mengen. Im Vergleich zu den entsprechenden unfunktionalisierten Liposomen (Blindwert 5+0 ungekoppelt) ermöglicht die Anwendung der spezifisch funktionalisierten Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen einen ca. 4 fachen Anstieg der zellassoziierten Lipidmenge.

Zusammengefaßt werden kann, daß E-Selektin-vermittelt eine spezifische Anreicherung von Immunoliposomen an Endothelzellen möglich ist. Sowohl konventionelle als auch sterisch stabilisierte Immunoliposomen vom Typ I und II zeigen bei spezifischer Funktionalisierung einen Bindungsvorteil gegenüber unfunktionalisierten bzw unspezifisch funktionalisierten Vergleichs-Vesikeln. Die sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ II mit PEG-terminal gekoppelten Antikörpern zeigen die besten Targetierungseigenschaften. Dieses

Resultat korreliert mit anderen veröffentlichten Ergebnissen bei der Verwendung von Immunoliposomen mit PEG-terminaler Antikörper-Kopplung [43,132].

Für einen umfassenden Vergleich einer großen Anzahl verschiedener Liposomenpräparationen war unserer Meinung nach die Nutzung von CHO-E-Zellen geeignet und gerechtfertigt. Diese Zellart konnte problemlos in großen Zellzahlen verwendet werden.

Die Verwendung humaner Endothelzellen mit induzierbarer E-Selektin-Expression würde jedoch die in vitro Untersuchungen näher an die physiologischen Bedingungen rücken. Aus diesem Grund wurden die bereits vorgestellten Zell-Targetierungsuntersuchungen durch Versuche unter Verwendung von Endothelzellen aus der Vene humaner Nabelschnüre (HUVEC) ergänzt. Diese Zellen zeigen nach ihrer Isolation aus frischen Nabelschnüren bis zur 4. Passage die Fähigkeit zur IL-1 β induzierten E-Selektin-Expression. Die Anwesenheit von E-Selektin auf den HUVEC nach erfolgter Stimulation wurde in Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkierten E-Selektin-Antikörpern von der Arbeitsgruppe PD Dr. Rothe untersucht sowie für die Stimulation eine optimale Inkubationszeit und IL-1 β -Menge bestimmt (nicht gezeigt).

Neben einem Wechsel der Zellart wurde auch auf eine Vermessung der Zellproben mittels Durchflußzytometrie übergegangen. Das bedeutet nicht nur die Betrachtung eines begrenzten Abschnittes der Zellmonolayer eines wells sondern die Vermessung einer Vielzahl von Einzelzellen. Desweiteren wurde von dem zusammengesetzten Antikörpertest (E-Selektin-primärer Antikörper-sekundärer Antikörper) abgegangen und die Immunoliposomen direkt mit anti-(human)-E-Selektin-IgG (BBA26) funktionalisiert.

Abb. 20 zeigt die Auswertung der Zell-Bindungsstudien unter Verwendung von HUVEC. Der Versuch sollte hauptsächlich eine Ergänzung der Charakterisierung des Bindungsverhaltens der Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen darstellen, weshalb die Anzahl der untersuchten Präparationen stark reduziert wurde.

Die spezifisch funktionalisierten Immunoliposomen zeigen einen deutlichen Bindungsvorteil. Das Zell-Bindungsmaß ist gegenüber unfunktionalisierten und unspezifisch funktionalisierten Immunoliposomen mindestens 5 fach erhöht. Die Spezifität der Anreicherung der Immunoliposomen an den E-Selektin-exprimierenden Endothelzellen wird vor allem durch den Unterschied der Bindungsausbeute an stimulierten und unstimulierten HUVEC deutlich. Unstimulierte HUVEC sind nicht in der Lage, anti-(human)-E-Selektin-IgG-funktionalisierte Immunoliposomen zu binden.

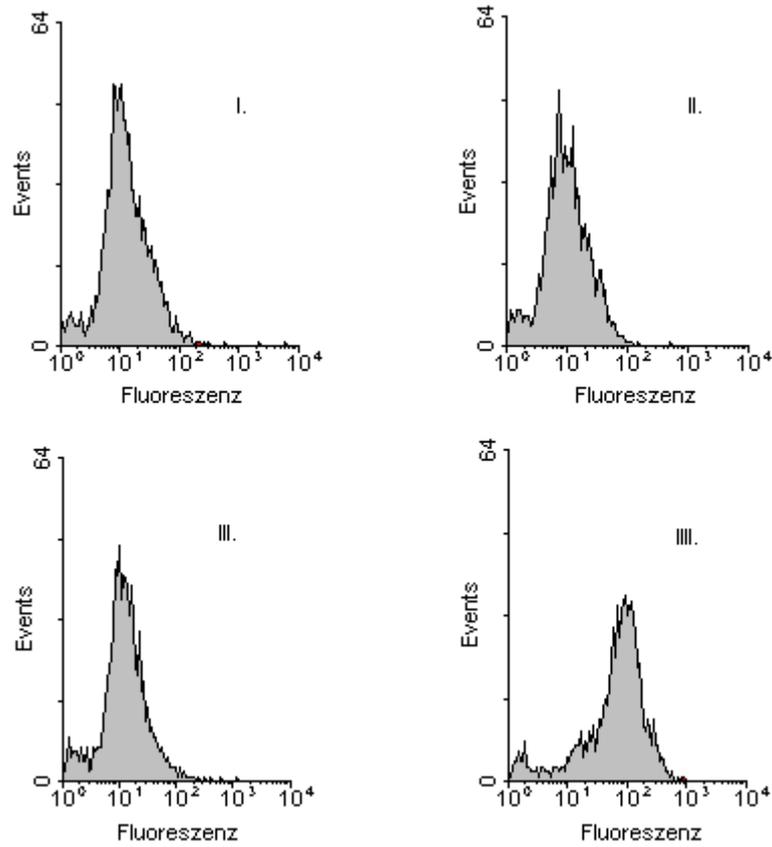


Abb. 20 (a)

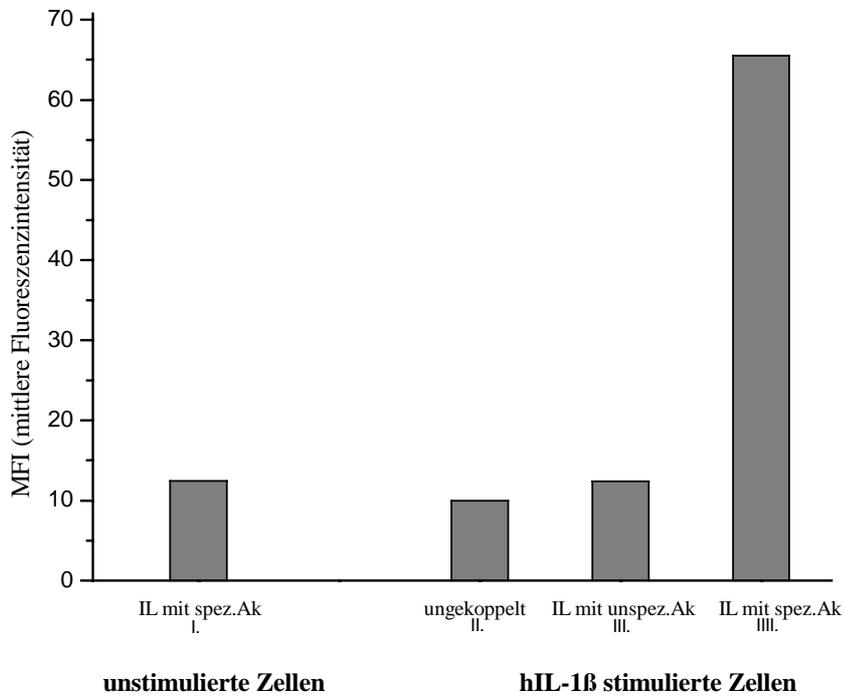


Abb. 20: FACs-Ergebnisse (Die dargestellten Werte sind die Ergebnisse eines Einzelexperimentes (a) und repräsentativ für drei analoge Experimente)

Die Ergebnisse von Zell-Bindungsstudien unter statischen Bedingungen sind jedoch nur von eingeschränkter Aussagekraft. Es handelt sich um sehr idealisierte Bedingungen, wenn Liposomen über längere Zeiträume in Ruhe in direktem Kontakt mit den Zielzellen belassen werden und im Anschluß daran die Anzahl gebundener Liposomen analysiert wird. So sind zum Teil auch extrem hohe veröffentlichte Unterschiede (bis zu 275 fach) zwischen dem Bindungsausmaß von Hauptversuch und entsprechenden Referenzvesikeln nur von begrenzter Relevanz und untereinander nicht unmittelbar vergleichbar [133].

4.2.2 Targetierung unter dynamischen Bedingungen

Im Falle einer systemischen Applikation der E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen müßten diese aus dem strömenden Blut heraus an das E-Selektin des Gefäßendothels binden. Um unsere in vitro-Untersuchungen realistischer zu gestalten und den physiologischen Gegebenheiten in postkapillären Venolen besser anzupassen, wurden die Targetierungsversuche unter den simulierten Scherflußbedingungen des Blutstroms wiederholt. Dafür wurden mit einer HUVEC-Monolayer bewachsene Glasplättchen in die unter Kapitel 3.12 beschriebene Durchflußapparatur eingebaut und die beiden Durchflußkammern mit liposomenhaltigem Medium durchspült. Aufgrund der gegebenen Kammergeometrie mußte zur Erreichung eines Schergrades von 200s^{-1} innerhalb der Kammern ein Fluß von $2,4\text{ml/min}$ angelegt werden (Schergrad in postvenösen Kapillaren: $100\text{-}600\text{s}^{-1}$). Die parallele Beobachtung zweier Zellschichten ermöglichte den direkten Vergleich des Verhaltens einer Liposomenpräparation an stimulierten und unstimulierten Zellen und damit eine Aussage zur Spezifität der Liposomenbindung. Die Liposomen waren für diese dynamischen Targetierungsuntersuchungen fluoreszenzmarkiert (3mol% NBD-PE) und ihr Bindungsverhalten somit am LSM beobachtbar.

Konventionelle Immunoliposomen werden nach systemischer Applikation sehr schnell durch Zellen des MPS eliminiert und weisen aus diesem Grund nur minimale Zirkulationshalbwertszeiten auf, weshalb bei unseren Langzeit-Targetierungsstudien hauptsächlich sterisch stabilisierte und damit langzirkulierende Immunoliposomen berücksichtigt wurden. Eine verlängerte Zirkulationszeit ermöglicht den wiederholten Kontakt zwischen Liposom und Targetzellen und erhöht somit die Chance einer Bindung. Die für die Immunoliposomen-Bindung essentielle E-Selektin-Expression auf den HUVEC's zeigt 5-6 Stunden nach Beginn der IL-1 β -Stimulation ein Maximum, fällt bis 10 Stunden nach Stimulation auf ein Drittel des 6h-Wertes ab und geht danach kontinuierlich innerhalb eines Zeitraumes von 25 Stunden auf den Ausgangswert zurück [133]. Wir analysierten das Bindungsverhalten der Immunoliposomen über einen Zeitraum von 18 Stunden. In einem Vorversuch mußte zunächst die notwendige „Robustheit“ der HUVEC für diese Versuchsdauer und den Versuchsaufbau abgeklärt werden. Trotz nicht idealer CO₂-Konzentrationen für die Zellen waren die HUVEC am Versuchsende noch intakt und adhärent. Zum Ausschließen der Gefahr einer Ergebnis-Beeinflussung durch Inhomogenitäten der Strömung wurde jeder Versuch doppelt durchgeführt, in der Art und Weise, daß ein Wechsel der stimulierten (Hauptversuch) und unstimulierten Zellen (Kontrolle) zwischen den Positionen I und II der Apparatur stattfand.

Untersucht wurde das Bindungsverhalten von NGPE-Immunoliposomen mit 5mol% mPEG-PE (Typ I), Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen mit 5mol% PEG-Anker-Konzentration (Typ II) sowie die entsprechenden Referenzliposomen ohne Antikörper-Funktionalisierung bzw. mit unspezifischem IgG. Gegenüber den Referenzliposomen zeigten beide Arten der sterisch stabilisierten Immunoliposomen eine deutlich erhöhte Zell-Bindungstendenz an stimulierten HUVEC. Das Bindungsausmaß an unstimulierten HUVEC war in allen Fällen

vernachlässigbar. Diese Resultate sind ein Beweis für die Spezifität der E-Selektin-vermittelten Bindung der Immunoliposomen. Der Vergleich der spezifisch funktionalisierten Varianten beider Typen zeigte hinsichtlich der Zellbindungsfähigkeit wiederum eine Überlegenheit der Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen. Die exponierte Stellung der Antikörper am PEG-Terminus und ihre dadurch gewonnene Flexibilität erleichtern den vorbeiströmenden Immunoliposomen die E-Selektin-Erkennung und -bindung auf der Endotheloberfläche.

Die Targetierungsversuche unter simulierten Flußbedingungen bewiesen auch noch einmal die Notwendigkeit der Verwendung langzirkulierender Immunoliposomen für eine effektive in vivo-Anwendung. So benötigt eine akzeptable Akkumulation von Liposomen an den Endothelzellen Zeiträume, in denen konventionelle Immunoliposomen bereits vollständig aus der Zirkulation eliminiert sind. Nur mit langzirkulierenden Immunoliposomen sind am Endothel hohe Arzneistoffkonzentrationen über längere Zeiträume garantierbar. Abb. 21 zeigt das Bindungsverhalten von spezifisch funktionalisierten Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen an stimulierten und unstimulierten HUVEC über einen therapierelevanten Zeitraum von 18 Stunden.

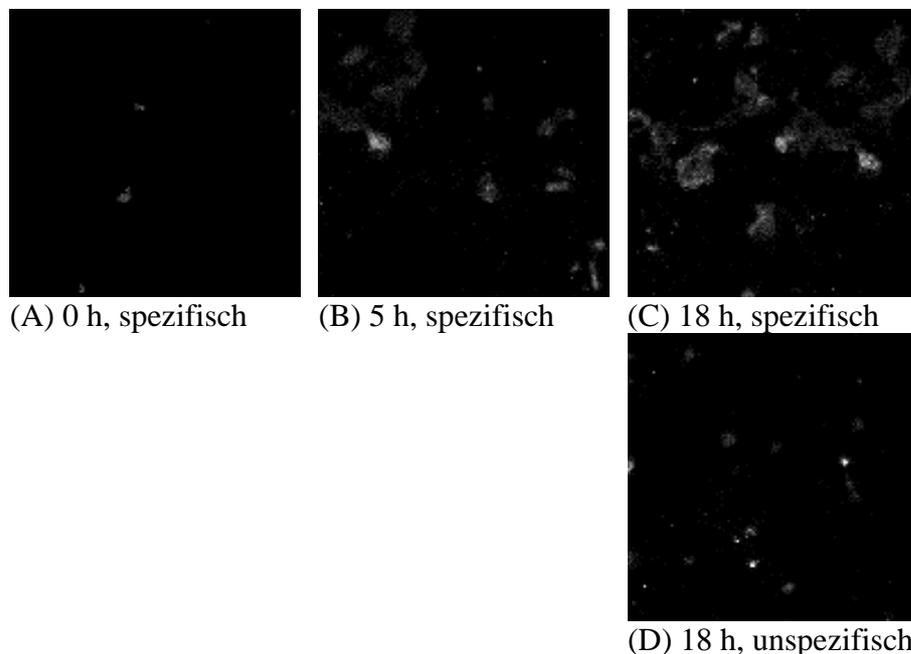


Abb. 21: Bindungsverhalten von Immunoliposomen an HUVEC [(A)-(C): spezifisch funktionalisierte Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen an stimulierten (nach 0,5,18h) und (D): unstimulierte (nach 18h) HUVEC (dichte Monolayer !) unter simulierten Scherflußbedingungen in einer Durchflußapparatur]

Erst ab einer Versuchsdauer von 5 Stunden konnte eine detektierbare Anreicherung von Liposomen beobachtet werden. Ist die E-Selektin-vermittelte Bindung zwischen Liposom und Zelle einmal erfolgt, bleibt sie auch unter den bestehenden Strömungsbedingungen beständig und ermöglicht so nachfolgende Prozesse der Vesikelinternalisierung.

Die verschiedenen Targetierungsuntersuchungen unter statischen und dynamischen Bedingungen erbrachten den Beweis, daß endotheliales E-Selektin eine geeignete Targetstruktur für die Antikörper-vermittelte Anreicherung von Immunoliposomen darstellt. Das beobachtete hohe Bindungsausmaß konventioneller Immunoliposomen ist das Resultat spezifischer Antikörper-Selektin-Interaktionen in Verbindung mit ausgeprägten unspezifischen Membran-Wechselwirkungen. In allen Modellsystemen zeigten die sterisch stabilisierten Immunoliposomen vom Typ II mit Verwendung des neu entwickelten Lipidankers Cyanur-PEG-PE einen deutlichen Vorteil bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit an

E-Selektin-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu sterisch stabilisierten Immunliposomen vom Typ I (NGPE-Kopplung). Aufgrund der Fähigkeit der betrachteten Immunliposomen auch unter simulierten Blutflußbedingungen an endotheliales E-Selektin zu binden und sich damit am Gefäßendothel anzureichern, erscheint die Idee eines liposomalen E-Selektin-gerichteten Drug Delivery Systems zur Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie als durchaus realisierbar.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wird das weitere „Schicksal“ der Immunliposomen am Endothel untersucht.

4.3 Internalisierungs-Untersuchung

Die Akkumulation der Immunliposomen am Endothel ist eine wichtige Voraussetzung, jedoch noch kein Garant für einen therapeutischen Effekt des liposomal-transportierten Wirkstoffs. Deshalb wurden nach den Targetierungsexperimenten Untersuchungen zum Internalisierungsverhalten von Gefäßendothelzellen, in diesem Fall humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC), gegenüber den präparierten Immunliposomen durchgeführt. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

Die Internalisierung von Liposomen durch Zellen ist kein zu generalisierendes Problem, sondern von der jeweiligen Zellart, u.U. dem physiologischen Zustand der Zellen sowie verschiedenen Parametern der verwendeten Liposomen abhängig. Liposomen können von Zellen auf endozytotischem Weg (rezeptorvermittelt oder unspezifisch) sowie durch Fusion internalisiert werden. Für den Nachweis einer bzw. für die Differenzierung zwischen verschiedenen Liposomen-Zell-Assoziationszuständen (z.B. Fusion, endozytotische Aufnahme, adsorptive Bindung) stehen eine Reihe von Techniken zur Verfügung, welche im theoretischen Teil (Kap. 2.2) bereits vorgestellt und im Rahmen der eigenen Untersuchungen angewendet wurden.

4.3.1 Endozytoseuntersuchungen mit Pyranosomen

Für HUVEC ist in Hinsicht auf das Internalisierungsvermögen für Liposomen sehr wenig bekannt.

In einer Arbeit von 1997 nutzte die Arbeitsgruppe Spragg [133] den auch in Kapitel 2.2 vorgestellten Farbstoff HPTS (Pyranin) für Untersuchungen zum Nachweis der endozytotischen Liposomeninternalisierung durch Nabelschnurendothelzellen (HUVEC). Die Aufnahme von Liposomen über einen endozytotischen Mechanismus wurde dabei fluoreszenzmikroskopisch untersucht und konnte nur für spezifisch funktionalisierte Immunliposomen durch stimulierte (IL-1 β), E-Selektin exprimierende Endothelzellen nachgewiesen werden. Für unspezifische Immunliposomen, unfunktionalisierte Liposomen und bei Verwendung unstimulierter Zellen wurde keine endozytotische Internalisierung beobachtet.

Um einerseits einen Eindruck vom Ausmaß des Internalisierungsvermögens von Endothelzellen zu erhalten und um andererseits den ebenfalls aus der Literatur [100,143] entnommenen positiven Hinweisen zur prinzipiellen, auch unspezifischen endozytotischen Liposomenaufnahme durch Endothelzellen nachzugehen, kam der Farbstoff Pyranin im Rahmen einer fluorimetrischen Bestimmungsmethode zum Einsatz. Anwendungsbeispiele aus der Literatur findet man für die verwendete Methode innerhalb von Studien zur Charakterisierung des ausgeprägten Endozytose- / Phagozytoseverhaltens von Makrophagen bzw. makrophagenähnlichen Zellen [134-136].

Besonderer Wert wurde im Verlauf dieser Untersuchungen auf den Vergleich mit Zellarten bekannten Internalisierungsverhaltens und die parallele Betrachtung von stimulierten (IL-1 β) und unstimulierten Endothelzellen gelegt.

Vor Beginn der eigentlichen Zellversuche erfolgte eine fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung des Farbstoffes .

Liposomen streuen das Licht in Abhängigkeit von der Wellenlänge und je nach Lipidzusammensetzung auch in Abhängigkeit vom pH-Wert [90]. Im Rahmen absorptionsspektroskopischer Messungen der pH-abhängigen Farbänderung des Pyranins zeigten die Absorptionsspektren deutlich, daß die optischen Eigenschaften des Farbstoffes in der wässrigen Innenphase der Liposomen durch die optischen Eigenschaften der Liposomen überlagert werden. Pyranin- und Pyranosomenspektren weisen unterschiedliche Verläufe auf [90].

Bei einer fluorimetrischen Messung ist der Einfluß der Lichtstreuung vernachlässigbar (siehe auch Diagramm). Die Auswertung von Fluoreszenzemissions- und anregungsspektren des Pyranins ergibt dabei folgendes Bild.

Regt man den Farbstoff mit Licht definierter Wellenlänge an (465nm), so wird hauptsächlich Licht der Wellenlänge 512nm in pH-abhängiger Intensität emittiert. Diese Intensitätsunterschiede sind jedoch nur schwer quantifizierbar, so daß die Auswertung von Fluoreszenzemissionsspektren nicht sehr aussichtsreich ist.

Vorteilhafter gestaltet sich die Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren. Dabei wird die Wellenlänge der anregenden Strahlung kontinuierlich verändert und die resultierende Fluoreszenzintensität bei konstanter Emissionswellenlänge aufgezeichnet. In Hinblick auf das Fluoreszenzemissionsspektrum wählt man als Emissionswellenlänge 512nm. Die gravierendsten pH-bedingten Unterschiede im Verlauf der Anregungsspektren findet man im Wellenlängenbereich 400-480nm.

Die Auswertung von Fluoreszenzanregungsspektren des in Liposomen eingeschlossenen Pyranins bietet sich also zur Beobachtung der endozytotischen Aufnahme dieser an, da die Liposomen im Verlauf der Endozytose zelluläre Kompartimente mit variierendem pH-Milieu passieren.

Zur Überprüfung der in der Literatur gefundenen Angaben zum optischen Verhalten des Pyranins erfolgte zunächst eine Aufnahme der Fluoreszenzanregungsspektren von Pyraninlösungen mit variierenden pH-Werten. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde der Wellenlängenbereich von 200-500nm (UV/VIS) abgedeckt. Für Pyraninlösungen der pH-Werte 5,5; 6,5;7,4 und 8,5 ergaben sich bei konstanter Emissionswellenlänge von 512nm folgende Spektrenverläufe.

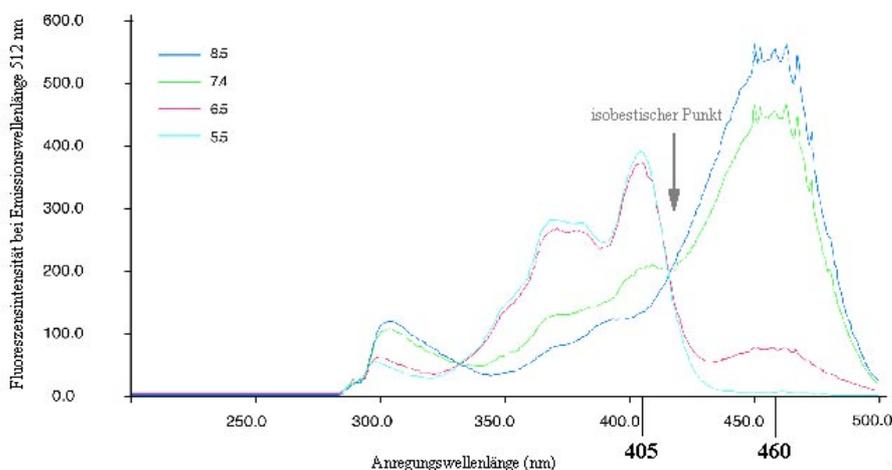


Abb. 22: Fluoreszenzanregungsspektren von Pyraninlösungen ($\lambda_{em}=512nm$)

Die Spektrenverläufe zeigen für das Pyranin 2 Hauptanregungsmaxima. Für niedrige pH-Werte liegt das Maximum bei 405nm, für den neutralen/basischen pH-Bereich bei 460nm. Von Bedeutung ist, daß die Fluoreszenzintensität im sauren Bereich bei einer Anregungswellenlänge von 460nm (= Maximum für neutralen/basischen Bereich) praktisch gegen 0 geht. So ergibt sich bei dieser Wellenlänge ein sehr großer Intensitätsunterschied beispielsweise zwischen den physiologisch sehr interessanten pH-Werten 5,5 (Kompartimente des endosomalen Systems) und pH 7,4 (Zytosol und zellumgebendes Medium). Demgegenüber lassen sich die pH-abhängigen Intensitätsunterschiede bei 405nm-Anregung wesentlich schlechter detektieren, da bei dieser Wellenlänge im Spektrenverlauf aller pH-Werte ein Maximum zu finden ist. Das saure Signal wird demzufolge stets partiell vom neutralen/basischen Signal überlagert. Der Schnittpunkt aller Spektren unabhängig vom jeweiligen pH-Wert bei 415nm markiert einen sog. isobestischen Punkt. Die Fluoreszenzemissionsintensität des Pyranins ist bei einer Anregung mit Licht dieser Wellenlänge ausschließlich von der vorliegenden Farbstoffkonzentration abhängig, der pH-Wert ist ohne Einfluß.

In einem zweiten Versuch erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzanregungsspektren von Pyranosomen in Pufferlösungen mit variierenden pH-Werten. Der zur pH-Angleichung führende Protonentransfer zwischen umgebender Pufferlösung und der vom Liposom eingeschlossenen Farbstofflösung durch die Membran erfolgt innerhalb von Sekunden.

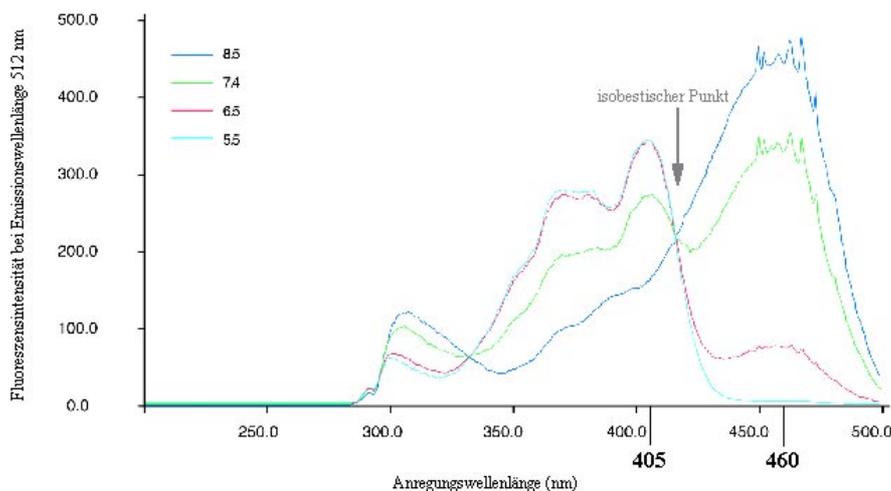


Abb. 23 : Fluoreszenzanregungsspektren von Pyranosomen ($\lambda_{em}=512nm$)

Durch die Spektrenauswertung wurde bestätigt, daß die Lichtstreuung durch Liposomen bei einer fluorimetrischen Messung nur von untergeordneter Bedeutung ist. Wir erhielten Pyranosomen-Spektren in großer Übereinstimmung mit den Spektren der Pyraninlösungen. Die Fluoreszenzintensität war in geringem Umfang durch den liposomalen Einschluß des Farbstoffes abgeschwächt.

Die endozytotische Aufnahme eines Pyranosoms durch eine Zelle, in deren Verlauf es einem pH-Wechsel von pH 7,4 (Medium, Zytosol) zu pH 5,5 (Endosomen) ausgesetzt ist, wäre zum einen durch eine abfallende Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 460nm und gleichzeitig durch einen Intensitätszuwachs bei einer Anregungswellenlänge von 405nm meßbar.

Da die Fluoreszenzintensität am isobestischen Punkt ausschließlich konzentrationsabhängig ist, kann sie im Zellversuch als Maß für die Gesamtmenge zellassoziierter Farbstoffs,

unabhängig von seiner Lokalisation auf dem endozytotischen Weg, dienen. Dies ist wichtig für die Vergleichbarkeit verschiedener Zellansätze einer Versuchsreihe, bei denen eine absolut identische Zellzahl nie garantiert werden kann. Ist die Zellanzahl nicht völlig identisch, so schwankt auch die Gesamtzahl zellassoziierter Pyranosomen.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde im Rahmen der Auswertung der Zellversuche für jeden vermessenen Ansatz die Fluoreszenzintensität am sauren Maximum (Anregungswellenlänge 405nm) und die Intensität am neutralen Maximum (Anregungswellenlänge 460nm) zur Intensität am isosbestischen Punkt (Anregungswellenlänge 415nm) ins Verhältnis gesetzt. Findet eine endozytotische Aufnahme der Pyranosomen, verbunden mit einer Anreicherung im sauren Milieu des Endosomeninhaltes statt, muß das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm mit der Zeit ansteigen, während das Verhältnis für die Anregungswellenlängen 460nm/415nm abfallen muß.

Die Grafik in Abb. 24 soll für die zuvor vorgestellten Spektren aus Abb. 23 die Änderung der genannten Fluoreszenzintensitätsverhältnisse in Abhängigkeit vom pH-Wert darstellen.

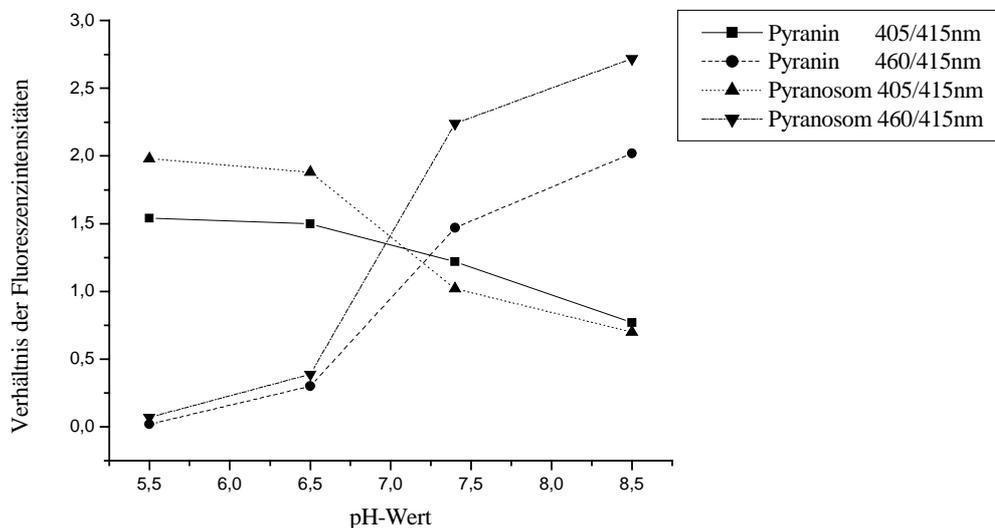


Abb. 24: Abhängigkeit der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm vom pH-Wert

4.3.1.1 Verwendung von CHO-E-Zellen

Die eigentlichen Zellversuche zur Internalisierung wurden mit CHO-E-Zellen begonnen. Diese bereits im Kapitel 4.1.2 vorgestellte Zellart lag im Gegensatz zu den jeweils frisch isolierten HUVEC in großem Umfang vor und konnte deshalb für Vorversuche genutzt werden. Zunächst wurde als Leerwert ein reiner Zellansatz unter den für die späteren Endozytosemessungen geplanten Bedingungen vermessen.

Es ist bekannt, daß Zellen bei einer Temperatur von 4°C keinerlei endozytotische Aktivität zeigen. Es dürfte also weder ein Anstieg des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm noch ein Abfall des Intensitätsverhältnisses der Anregungswellenlängen 460nm/415nm auftreten. Wie in Abb. 25: sichtbar, wurde diese theoretische Überlegung experimentell bestätigt, beide Graphen verlaufen annähernd parallel zur Zeitachse.

Der gleiche Versuch wurde bei 37°C wiederholt (Abb. 25:) und folgende Beobachtungen gemacht: Das Verhältnis 405/415nm steigt im zeitlichen Verlauf an, während das Verhältnis 460/415nm abfällt.

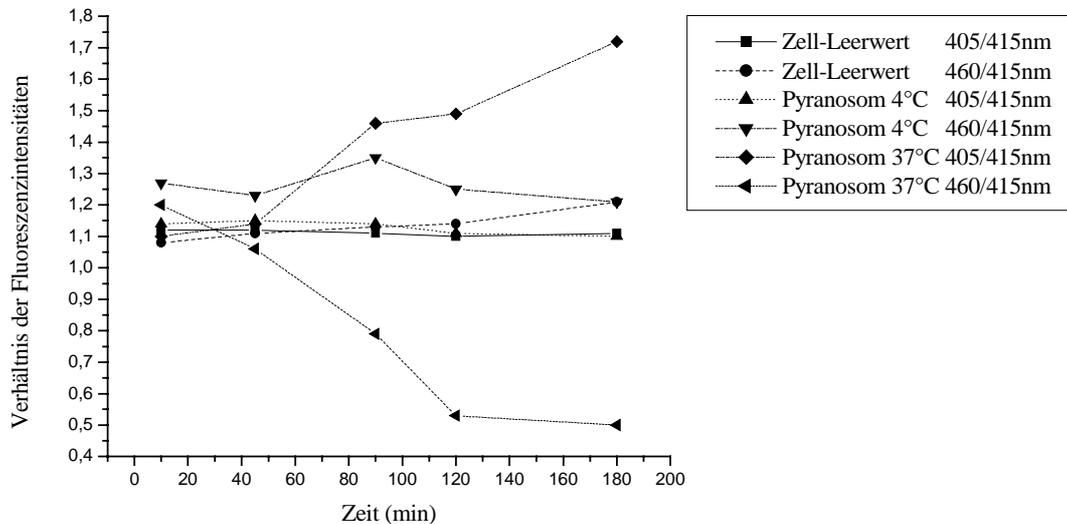


Abb. 25: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (CHO-E-Zellen, Pyranosomen)

Diese Beobachtung läßt auf eine endozytische Aufnahme der Pyranosomen durch die CHO-E-Zellen schließen. Deutliche Unterschiede bestehen sowohl zum Zell-Leerwert als auch zu den bei einer Temperatur von 4°C gefundenen Ergebnissen. Aufgrund des Fehlens spezifischer Rezeptor-Ligandenpaare zwischen den CHO-E-Zellen und den verwendeten Pyranosomen, können diese Ergebnisse als Nachweis einer unspezifischen endozytischen Aktivität der CHO-E Zellen gewertet werden. Unter den Bedingungen der 4°C-Inkubation liegt der Wert des Intensitätsverhältnisses 460/415nm deutlich über dem Zelleerwert, während der Wert des Verhältnisses 405/415nm nur ganz gering vom Leerwert abweicht. Erklärbar ist dies mit einer von uns oft beobachteten unspezifischen Adsorption von Pyranosomen an der Zellmembran der CHO-E-Zellen. Alle nachfolgenden Versuche wurden bei 37°C durchgeführt.

4.3.1.2 Verwendung von Makrophagen

Makrophagen sind spezialisierte Zellen der körpereigenen Abwehr mit hoher Endozytose-/Phagozytoseaktivität.

Die folgenden Versuche mit der makrophagenähnlichen Zelllinie J 774 sollten als Positivkontrolle innerhalb der Endozytoseuntersuchungen dienen. Aus der Literatur [136] ist bekannt, daß J 774 -Zellen eine besonders ausgeprägte Affinität zu Liposomen mit negativ geladenen Phospholipidkomponenten besitzen. Die Affinität zu neutralen Lipiden ist demgegenüber schwach. Eine Erläuterung dieses Phänomens soll an dieser Stelle nicht erfolgen. Die Verwendung speziell modifizierter Liposomen für die makrophagenähnliche Zelllinie verbietet natürlich den direkten Vergleich mit den späteren HUVEC-Zellversuchen hinsichtlich des absoluten Endozytoseausmaßes. Das war jedoch auch nicht das Ziel. Vielmehr sollte ermittelt werden, in welchen Größenbereichen sich die Änderungen der

Fluoreszenzintensitätsverhältnisse 405/415nm bzw. 460/415nm für sehr hohe Internalisierungsraten bewegen.

Als negativ geladene Phospholipidkomponenten wurden in die Pyranosomen entweder Phosphatidylglycerol (SPC/Chol/PD:1/1/1) oder Phosphatidsäure (SPC/Chol/PA:1/1/1) eingebaut.

Die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse 405/415nm bzw. 460/415nm erfolgt in Abb. 26

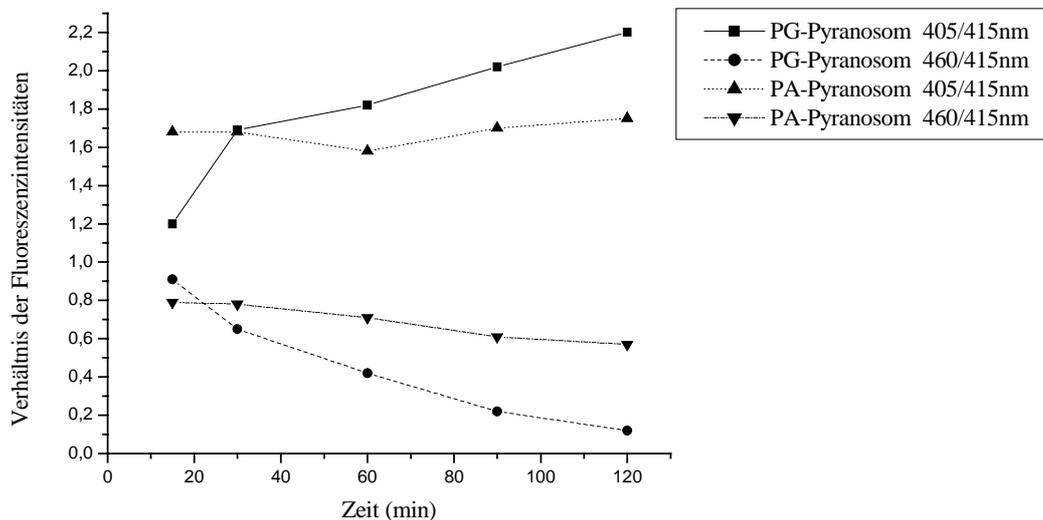


Abb. 26: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (Makrophagen, PG bzw. PA-haltige Pyranosomen)

Für beide Pyranosomenarten erfolgte im beobachteten Versuchszeitraum eine endozytische Aufnahme durch J774. Diese Schlußfolgerung ergibt sich zum einen aus dem Anstieg des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm und zum anderen aus einem Abfall der Intensitätsverhältnisse für die Anregungswellenlängen 460nm/415nm. Die J774 scheinen für die mit Phosphatidylglycerol (PG) modifizierten Pyranosomen eine bedeutend höhere Affinität aufzuweisen als für mit Phosphatidsäure (PA) modifizierte.

Innerhalb von 120min stieg das Verhältnis 405/415nm für die PG-Pyranosomen um einen Betrag von 1, das Verhältnis 460/415nm fiel um den Betrag 0,79; für die PA-Pyranosomen stieg das Verhältnis 405/415nm um den Betrag 0,07, das Verhältnis 460/415nm fiel um den Betrag 0,22. In einem verlängerten Beobachtungszeitraum wären sicher noch höhere Endozytoseraten nachweisbar gewesen, für weitere Messungen standen jedoch nicht ausreichend Zellen zur Verfügung.

Die Veränderungen der optischen Eigenschaften des Pyranins während der endozytischen Aufnahme durch die Makrophagen lassen sich auch gut durch eine gemeinsame Darstellung der nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erhaltenen Spektren demonstrieren.

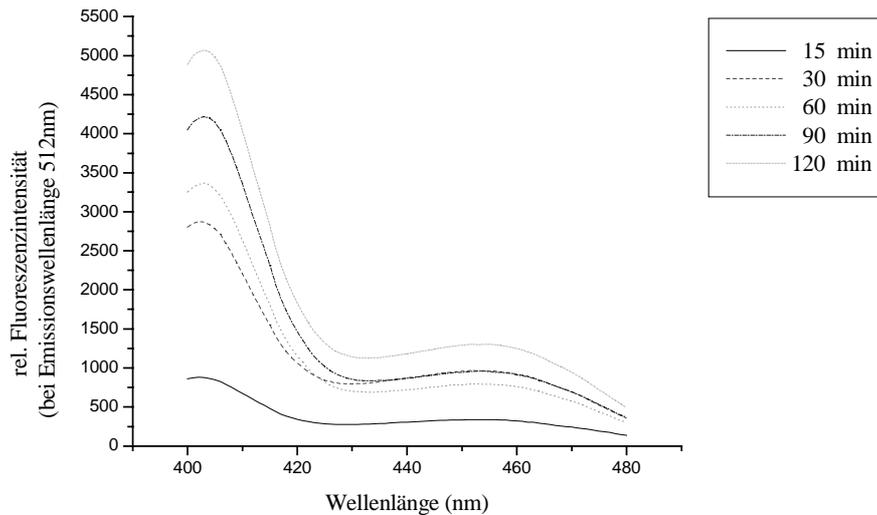


Abb. 27: Fluoreszenzanregungsspektren nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (Makrophagen, PG-haltige Pyranosomen)

In Abb. 26 wird vor allem der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 405nm mit zunehmender Versuchsdauer sichtbar. Der Abfall der Fluoreszenzintensität bei 460nm wird bei dieser Darstellung nicht so deutlich. Das ist durch die Schwankungen in der Zellzahl und damit in der Gesamtmenge assoziierter Farbstoffs bedingt, die zu unterschiedlichen Lagen der Spektren hinsichtlich der y-Achse (Fluoreszenzintensität) führen.

Werden die einzelnen Spektren jedoch parallel zur Zeitachse zu einem gemeinsamen isosbestischen Punkt (Mittelwert aller Einzelspektren) verschoben, wird sowohl der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 405nm als auch der Abfall der Fluoreszenzintensität bei 460nm mit zunehmender Versuchsdauer sichtbar (Abb. 27). Pyranosomen gelangen zunehmend aus dem neutralen Gebiet des umgebenden Mediums/ Zytosols in die sauren Kompartimente des lysosomalen Systems.

4.3.1.3 Verwendung von Keratinozyten

Keratinozyten sind als nichtendozytierende Zellen bekannt. Sie wurden im Gegensatz zu den Makrophagen als Negativkontrolle innerhalb der Endozytoseuntersuchungen genutzt.

Die Auswertung der Fluoreszenzanregungsspektren, die unter identischen Bedingungen wie die vorhergehenden Versuche aufgenommen wurden, ergab folgendes Bild.

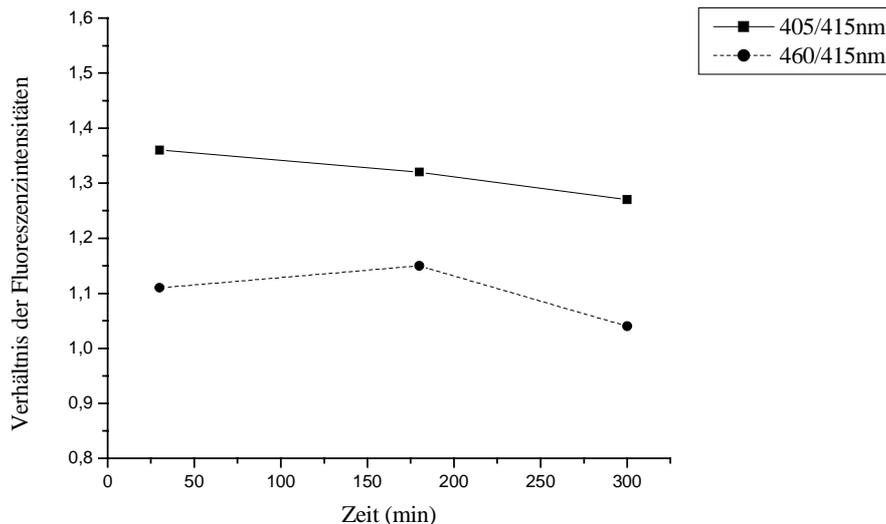


Abb. 28: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (Keratinocyten, Pyranosomen)

Sowohl der Graph für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm als auch der Graph für das Verhältnis 460nm/415nm verlaufen während des ausreichend lang gewählten Beobachtungszeitraumes annähernd parallel zur Zeitachse. Der geringfügige Abfall der 460/415nm Kurve nach 180min ist sicher nicht auf eine endozytotische Aktivität zurückzuführen, denn er tritt in gleichem Ausmaß auch bei der 405/415nm Kurve auf.

Mit der gewählten Pyraninmethode konnte wie erwartet für Keratinocyten keine endozytotische Aktivität nachgewiesen werden.

Ein Fehlen dieser Zellfunktion läßt sich somit anhand eines annähernd parallelen Verlaufes der Graphen für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm bzw. 460nm/415nm zur Zeitachse erkennen.

4.3.1.4 Verwendung von HUVEC mit Pyranosomen

Für die folgenden Untersuchungen wurden die eigentlichen Zielzellen, HUVEC, verwendet. Im Mittelpunkt dieses Teilversuches stand der direkte Vergleich von IL-1 β stimulierten mit unstimulierten Zellen. Der Hintergrund dafür ist die Frage, ob eine Interleukin-Stimulation und damit eine simulierte Entzündung der Endothelzellen zu einer Erhöhung ihrer endozytotischen Aktivität führt und die vaskulären Selektine u.U. eine Funktion als Endozytoserezeptoren besitzen.

Begonnen wurde mit der Verwendung unfunktionalisierter Pyranosomen, d.h. die unspezifische Endozytoseaktivität der Endothelzellen stand im Mittelpunkt.

Die Auswertung der Fluoreszenzanregungsspektren des Pyranosomen für stimulierte und unstimulierte Zellen ergab folgendes Bild.

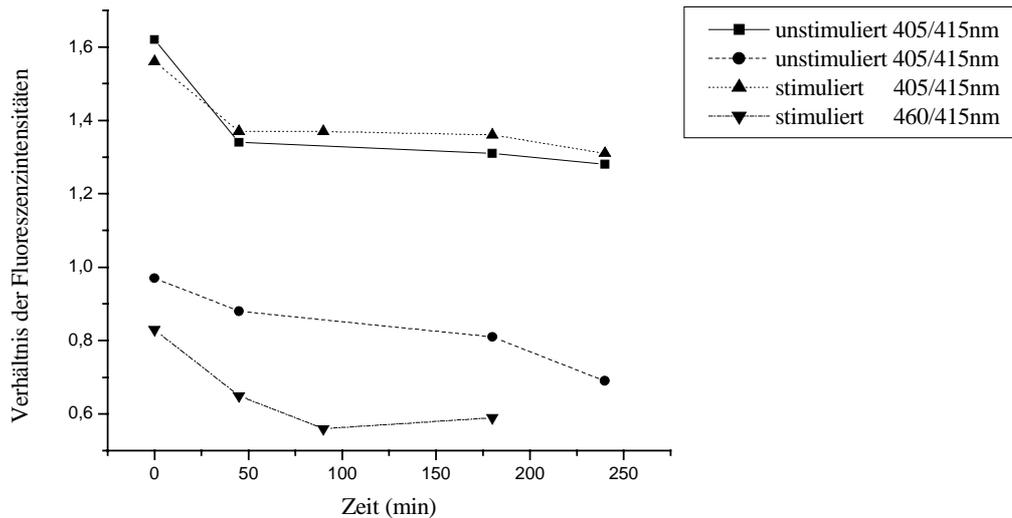


Abb. 29: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (HUVEC, Pyranosomen)

Für beide Zellansätze liegt ein ähnlicher Kurvenverlauf vor.

Der Graph für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm verläuft sowohl für die stimulierten als auch für die unstimulierten Zellen nach einem kurzen Abfall bis zum 45min-Meßwert annähernd parallel zur Zeitachse. Dieser Verlauf läßt nicht auf eine Ansäuerung der eingeschlossenen Pyraninlösung durch einen Eintritt der Pyranosomen ins saure Lysosomenmilieu schließen.

Entweder erfolgt durch die Endothelzellen keinerlei Aufnahme von unfunctionalisierten Pyranosomen über einen endozytotischen Mechanismus oder das Ausmaß ist zu gering für eine Erfassung mit Hilfe der verwendeten Methode. Der Beobachtungszeitraum von 4h kann Literaturangaben [133] zufolge als ausreichend eingeschätzt werden.

Der Graph für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 460nm/415nm fällt sowohl für stimulierte als auch für unstimulierte Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum ab. Prinzipiell ist zwar ein endozytotischer Prozeß durch eine Abnahme dieses Verhältnisses gekennzeichnet, vor allem aber in Hinblick auf den 405nm/415nm-Kurvenverlaufes kann der Abfall der 460/415nm Kurve nicht eindeutig als ein Abtransport von Liposomen aus dem pH-neutralen Gebiet von Medium/Zytosol im Rahmen eines endozytotischen Prozesses interpretiert werden.

Eine mögliche Erklärung des Kurvenabfalls wäre eine nichtendozytotische Aufnahme der Pyranosomen in die Zelle, d.h. unter Aussparung des sauren Endosomenkompartiments (u.a. Fusion?). Die Pyranosomen könnten dabei schon innerhalb des Zytosols eine Degradierung erfahren, wodurch es zum Ausfluß und einer Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs käme.

Diese Überlegungen würden die gemachten Beobachtungen zwar erklären helfen, können aber an dieser Stelle nicht bewiesen werden.

4.3.1.5 Verwendung von HUVEC mit unspezifischen Immunoliposomen

Im folgenden Teilversuch wurde die Aufnahme von Immunoliposomen durch Endothelzellen untersucht.

HUVEC verfügen Literaturangaben [90] zufolge über IgG-Fc-Rezeptoren. Das heißt eine endozytische Aufnahme von Immunoliposomen ist zum einen über diesen Rezeptortyp denkbar, unabhängig von der konkreten Spezifität des Antikörpers. Zum anderen können die HUVEC durch IL-1 β Stimulation zur Expression des E-Selektins angeregt werden, womit für unsere anti-E-Selektin-Antikörper funktionalisierten Immunoliposomen ein zusätzlicher spezifischer Rezeptor zur Verfügung steht. Inwieweit das E-Selektin, welches selbst von der exprimierenden Endothelzelle endozytiert wird, als direkter Endozytoserezeptor wirkt, ist bislang ungeklärt. Allerdings wären in Hinblick auf das Gesamtkonzept des selektinvermittelten Drug Delivery Systems über den Selektinrezeptor vermittelte Internalisierungsprozesse von großer Bedeutung.

Im ersten Abschnitt kamen unspezifisch funktionalisierte Immunoliposomen zum Einsatz. Bei Verwendung stimulierter Endothelzellen, deren jeweiliges Internalisierungsverhalten nach Kontakt mit spezifischen oder unspezifischen Immunoliposomen besonders interessant war, zeigte sich folgendes Bild.

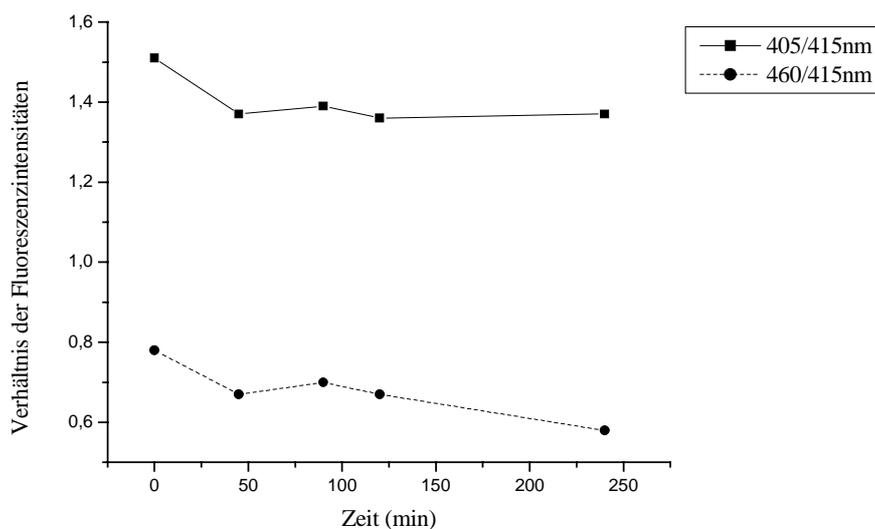


Abb. 30: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (HUVEC, unspezifische Immunoliposomen)

Der Graph für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm zeigt während des gewählten Beobachtungszeitraumes einen annähernd parallelen Verlauf zur Zeitachse.

Dieser Verlauf läßt nicht auf eine Ansäuerung der eingeschlossenen Pyraninlösung durch einen Eintritt der Pyranosomen ins saure Lysosomenmilieu schließen. Entweder erfolgt durch die Endothelzellen keinerlei Aufnahme von unspezifischen Immunoliposomen über einen endozytischen Mechanismus oder das Ausmaß ist zu gering für eine Erfassung mit Hilfe der verwendeten Methode.

Der Graph für das Verhältnis 460nm/415nm zeigt während des gewählten Beobachtungszeitraumes einen geringfügigen Abfall.

Damit ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei dem Versuch aus Kapitel 4.3.1.5. Eine endozytotische Aufnahme der unspezifischen Immunoliposomen konnte nicht nachgewiesen werden, es gibt keine Anzeichen auf eine Ansäuerung der eingeschlossenen Farbstofflösung als Folge einer Anreicherung im Lysosomenkompartiment. Vor allem aufgrund des 405nm/415nm-Kurvenverlaufes kann auch der Abfall der 460/415nm Kurve nicht eindeutig als ein Abtransport von Liposomen aus dem pH-neutralen Gebiet von Medium/Zytosol im Rahmen eines endozytotischen Prozesses interpretiert werden. An dieser Stelle soll wiederum auf den Erklärungsversuch aus Kapitel 4.3.1.5 verwiesen werden.

4.3.1.6 Verwendung von HUVEC und spezifischen Immunoliposomen

Für spezifisch funktionalisierte Immunoliposomen ergab sich folgendes Bild.

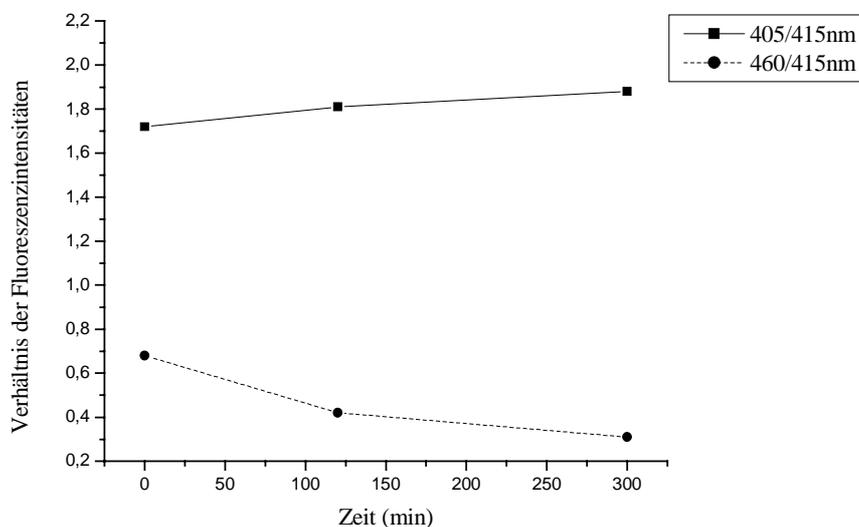
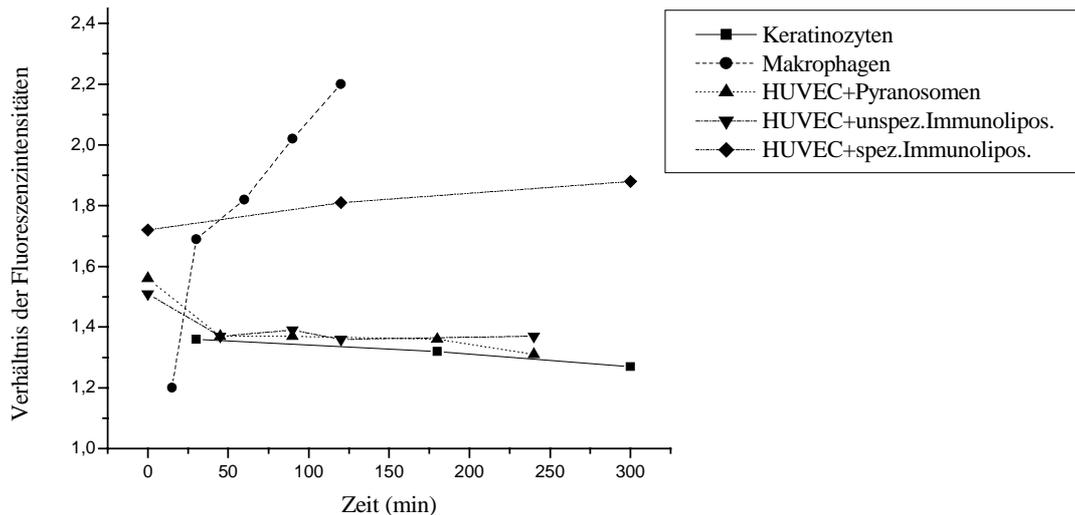


Abb. 31: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm bzw. 460/415 nm während der Inkubationszeiten (HUVEC, spezifische Immunoliposomen)

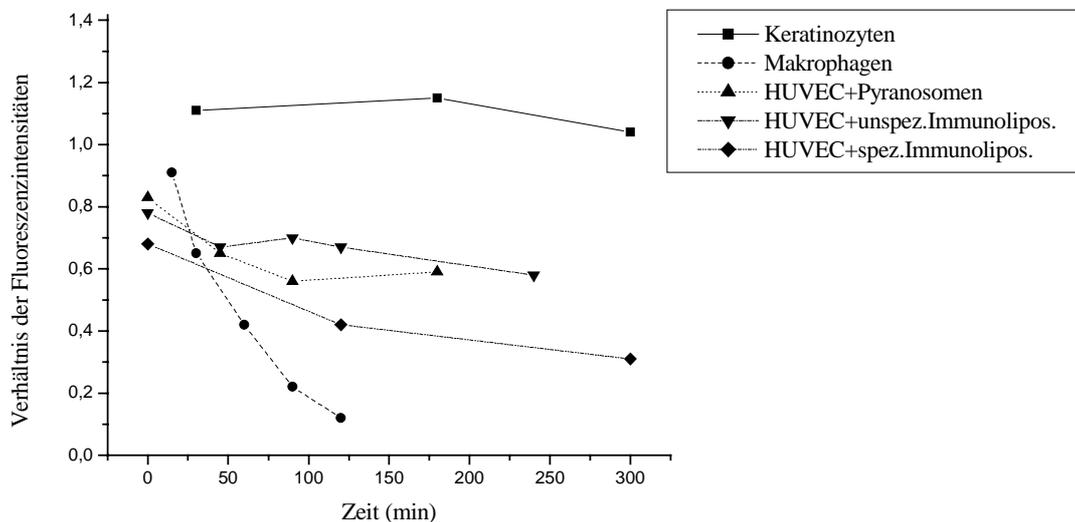
Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Anregungswellenlängen von 405nm/415nm steigt mit der Zeit an, während das Verhältnis für die Anregungswellenlängen 460nm/415 nm gleichzeitig abfällt. Wenn auch die Beträge des Abfalls/Anstieges der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse gering sind, so kann doch durch das gleichzeitige (!) Auftreten beider spezieller Kurvenverläufe ein endozytotische Liposomenaufnahme angenommen werden. Der Abfall der Fluoreszenzintensität bei Anregungswellenlänge 460nm ist in diesem Fall durch den 405/415nm Kurvenverlauf tatsächlich mit einem Lokalisationswechsel der Pyranosmen aus dem neutralen Kompartiment (Zytosol/Medium) ins saure Lysosomenkompartiment erklärbar.

4.3.1.7 Zusammenfassung

In diesem Teilabschnitt der Arbeit sollte das endozytotische Aufnahmeverhalten von HUVEC mit Hilfe einer fluorimetrischen Bestimmungsmethode unter Nutzung des pH-sensitiven Farbstoffs Pyranin charakterisiert werden. Als Positivkontrolle diente die Untersuchung der makrophagenähnlichen Zelllinie J774, als Negativkontrolle wurden Keratinozyten vermessen. Die gemeinsame Darstellung der Graphen aller Teilversuche für die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse 405nm/415nm und 460nm/415nm, der Übersichtlichkeit wegen im Falle der HUVEC nur für stimulierte Zellen, ergab Abb. 32



(A)



(B)

Abb. 32: Änderung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten 405/415 nm (A) bzw. 460/415 nm (B) während der Inkubationszeiten (verschiedene Zellarten/Liposomentypen)

Eine endozytotische Aufnahme konnte für HUVEC auch nur für den speziellen Fall spezifisch funktionalisierter Immunoliposomen durch stimulierte, E-Selektin exprimierende Endothelzellen nachgewiesen werden.

Das Ausmaß der endozytotischen Internalisierung auch bei Vorliegen eines spezifischen Rezeptors ist gering. Es wird außerdem deutlich, daß die Endothelzelle für eine endozytotische Aufnahme längere Zeit benötigt als eine spezialisierte Phagozytosezelle (Makrophagen). Jedoch ist eine direkte Funktion der vaskulären Selektine als Endozytoserezeptoren aufgrund dieser Ergebnisse denkbar. Dieser Aspekt bedarf jedoch noch einer weiteren eingehenden Klärung und kann an dieser Stelle lediglich vermutet werden.

Hinsichtlich der verwendeten Pyraninmethode ist nochmals zu betonen, daß eine Internalisierung über einen endozytotischen Mechanismus nur durch einen gleichzeitigen Anstieg bzw. Abfall der Graphen für die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse 405nm/415nm und 460nm/415nm nachgewiesen werden kann. Der alleinige Abfall des Graphen für das Fluoreszenzintensitätsverhältnis 460nm/415nm kann nicht eindeutig als ein Abtransport von Pyranosomen aus dem neutralen Milieu in die Lysosomen interpretiert werden. Das heißt, für unspezifische Immunoliposomen, unfunktionalisierte Liposomen und bei Verwendung unstimulierter Zellen wurde eine endozytotische Internalisierung nicht nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen die am Anfang aufgeführten Ergebnisse der Arbeitsgruppe Spragg [133].

Nach diesen Erfahrungen muß die verwendete fluorimetrische Bestimmungsmethode insgesamt kritisch betrachtet werden. Die Messung eines solch spezifischen Parameters wie die pH-Änderung (einer geringen eingeschlossenen Farbstoffmenge) um 2 Einheiten durch Anreicherung in einem Zellorganell ist sicher nur für Zellen mit überdurchschnittlicher Endozytoseleistung geeignet. In detektierbarem Ausmaß können eventuell noch intensivere spezifische Endozytosevorgänge anderer Zellarten, die zusätzlich durch eine vorausgegangene Akkumulation von Liposomen an der Zellmembran begünstigt werden, nachgewiesen werden. Unspezifische Endozytosevorgänge geringen Umfanges werden sich jedoch wahrscheinlich diesem Nachweis entziehen. An dieser Stelle soll noch ergänzt werden, daß selbst für Makrophagen bei Angebot von Liposomen mit ausschließlich neutraler Lipidzusammensetzung (ohne erhöhte Affinität) eine endozytotische Aufnahme mit dieser Methode nicht nachzuweisen war.

Während der Messungen wurde auch deutlich, daß die Methode relativ hohe Zellzahlen verlangt. HUVEC-Zellen standen im Rahmen unserer laborpraktischen Möglichkeiten nur begrenzt zur Verfügung, so daß wir zur Gewährleistung ausreichender Zellzahlen die Anzahl der einzelnen Meßpunkte pro Versuchsreihe verringerten. Eine erhöhte Anzahl von Meßpunkten hätte bei einzelnen Versuchsreihen sicher zu ausgeglicheneren Kurvenverläufen geführt, am Gesamtergebnis hätte sich aber nichts geändert.

Aufgrund dieser Überlegung sollen an dieser Stelle die Ergebnisse für unspezifische Immunoliposomen, unfunktionalisierte Liposomen und bei Verwendung unstimulierter Zellen nicht als völliges Fehlen unspezifischer endozytotischer Aktivität gewertet werden. Unter Umständen ist auch in diesen Fällen eine endozytotische Aktivität geringen Umfanges vorhanden, die sich jedoch der gewählten Nachweismethode entzieht. Die Pyraninmethode ist bei einer hohen Spezifität für eine alleinige Aussagefähigkeit zu unempfindlich.

Aufgabe des nächsten Arbeitsabschnittes sollte es sein, weitere Untersuchung zum Nachweis bzw. endgültigen Ausschluß einer unspezifischen Endozytose bzw. nichtendozytotischer Mechanismen durchzuführen.

4.3.2 Weitere Internalisierungsuntersuchungen

Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchungen zum Internalisierungsverhalten von HUVEC wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Sie werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

4.3.2.1 Dithionit-Methode

Begonnen wurden mit der sog. „Dithionit-Methode“, in deren Rahmen die Beobachtung ausschließlich internalisierter Vesikel durch eine Reduktion des Fluoreszenzfarbstoffes der oberflächlich gebundenen Liposomen möglich ist.

Natriumdithionit reagiert mit stark fluoreszierenden NBD-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) Lipiden unter Bildung von nichtfluoreszierenden ABD-(7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) Lipiden.

Die Grundlage dafür ist die in Abb. 33 dargestellte Reduktion der Aryl-Nitroverbindung zur korrespondierenden Aminoverbindung.

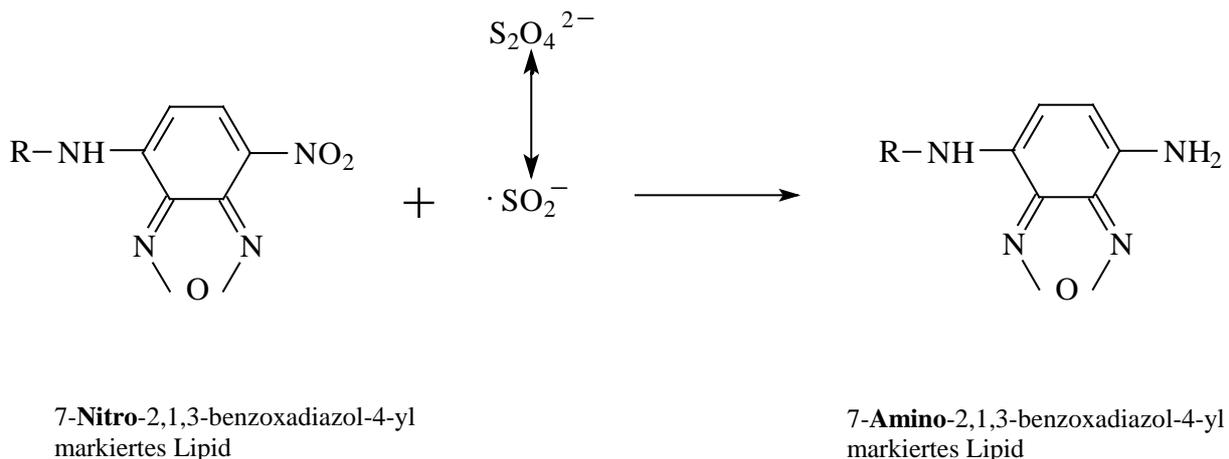


Abb. 33: Dithionit-vermittelte Reduktion einer Aryl-Nitroverbindung zur Aryl-Aminoverbindung

Die elektronenziehende Nitrogruppe fördert die Delokalisation von π -Elektronen im konjugierten Ringsystem, eine Reduktion zur elektronenliefernden Aminogruppe führt zum Fluoreszenzverlust. Die Reaktion erfolgt ohne Nebenreaktionen oder Ringöffnungen [77]. In wässriger Lösung liegt das Dithionit-Ion (S₂O₄²⁻) im Gleichgewicht mit dem SO₂⁻-Radikal vor. Das Radikal ist ein Reaktionszwischenprodukt während der Reduktion [78]. Da sowohl Ion als auch Radikal eine Ladung tragen, können sie nicht durch Lipidbilayer und damit Membranen permeieren.

Der vorgestellte Mechanismus wird vor allem im Rahmen von Untersuchung zur asymmetrischen Transbilayer-Verteilung von Phospholipiden in der Plasmamembran verschiedener Zellarten genutzt. So ist z.B. bei humanen Erythrozyten über die Membranphospholipidasymmetrie eine Aussage zum physiologischen Zustand der Zellen möglich [137].

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen zellinternalisierten und auf Zelloberflächen gebundenen Liposomen ist nun folgendermaßen möglich. Mit Hilfe der Ethanolinjektionsmethode (Kap. 3.5) gelingt die Darstellung einer besonderen Art unsymmetrisch markierter Liposomen. Derartige Vesikel („outside only“ labeled vesicles) enthalten lediglich in ihrer Außenmonolayer fluoreszierende NBD-Lipide. Diese sind aufgrund ihrer Position für gelöstes Dithionit leicht zugänglich, während in der Innenmonolayer verankerte Farbstoffmoleküle unerreichbar wären. In gleichem Maße wie die Membranbilayer der Liposomen stellt auch die Plasmamembran der zu untersuchenden Zellen eine Barriere für gelöstes Dithionit dar.

Nach Inkubation von Zellen mit unsymmetrisch markierten Liposomen und nachfolgender Dithionitbehandlung werden die oberflächlich gebundenen Liposomen ihre Fluoreszenzeigenschaften verlieren, während sich die Farbstoffmoleküle in der Außenmonolayer internalisierter Liposomen einer Dithionit-Reduktion entziehen und damit fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können.

In einer Studie von McIntyre und Sleight [77] wurde die Zytotoxizität von Dithionit für den Konzentrationsbereich von 0-100mM ausgeschlossen, sie verwendeten das Reduktionsmittel routinemäßig in einem 100 000 fachen molaren Überschuß gegenüber dem NBD-Farbstoff.

In allen gefundenen Literaturangaben zu dieser Problematik wurden Vesikel mit max.1mol% NBD-Lipid / Gesamtlipid verwendet. Aus eigenen Untersuchungen war jedoch bekannt, daß sich für eine fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von zellassozierten Liposomen eine 3mol%ige Markierung als sehr günstig erweist. Aufgrund dieser Diskrepanz wurde zunächst eine Voruntersuchungen zur Fluoreszenzlöschung der nachfolgend verwendeten Liposomen durchgeführt. Dithionit kam dabei in 50000, 100000 und 200000 fachem molaren Überschuß gegenüber dem in die Liposomen eingearbeiteten NBD-Lipid zum Einsatz. Die Stammlösung des Dithionit besitzt einen pH-Wert von 10, da Dithionit bei sauren pH-Werten eine spontane Zerstörung erfährt. In der folgenden Graphik (Abb. 34:) ist die Fluoreszenz der Liposomen (in Prozent der Ausgangsfluoreszenz) in Abhängigkeit von der Zeit nach Dithionitzugabe dargestellt.

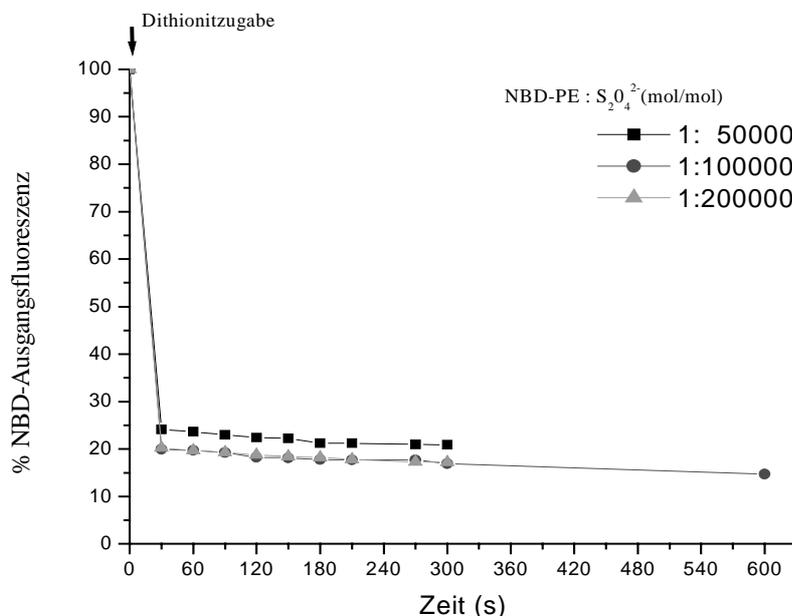


Abb. 34: Abfall der NBD-Ausgangsfluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit nach Dithionitzugabe (verschiedene molare NBD-PE: Dithionit-Ausgangsverhältnisse)

Ein radikaler Abfall der Fluoreszenz innerhalb von 30s nach Zugabe des Reduktionsmittels auf einen Wert von ca. 20% Ausgangsfluoreszenz ist beobachtbar, der in eine sehr, sehr langsamen Abfallphase übergeht. Diese Zweiteilung läßt sich aufgrund von Literaturangaben folgendermaßen erklären [77]. In der ersten, schnellen Reduktionsphase werden tatsächlich alle Farbstoffmoleküle der Außenmonolayer erfaßt, während die zweite, langsame Reduktionsphase als Folge einer sehr langsamen Passage von Dithionitionen durch die Membran und Reduktion von Farbstoffmolekülen der Innenmonolayer auftritt. Theoretisch sollten sich bei den verwendeten „only outside“ markierten Liposomen die fluoreszierenden Moleküle ausschließlich in der Außenmonolayer aufhalten. Bei der sehr hohen Farbstoffkonzentration von 3mol%/ Gesamtlipid ist jedoch ein Lipidaustausch zwischen den beiden Monolayern (Flip-Flop-Mechanismus) wahrscheinlich. Um diesen Effekt in jedem Fall gering zu halten, wurden stets am gleichen Tage präparierte Liposomen verwendet und diese stets kühl gelagert. Aus Abb. 34 geht weiterhin hervor, daß für unsere gewählten Bedingungen eine Steigerung des molaren Verhältnisses NBD-PE:Dithionit über 1:100000 hinaus zu keinem weiteren Fluoreszenzabfall führt, der Permeationschritt ist dadurch nicht beeinflussbar. Bei den geplanten Zellversuchen wurde nach Abschätzung der zu erwartenden zellassozierten Lipidmenge zur Sicherheit ein Verhältnis von ungefähr 1:200000 gewählt. Das war möglich, da sich in diesem Fall eine Dithionitkonzentration von 20mM ergab und eine Zytotoxizität des Dithionits bis 100mM auszuschließen ist.

Im folgenden sollen die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse vorgestellt werden.

Auf dünnen Glasplättchen ausgebreitete HUVECs wurden mit NBD-markierten Liposomen (3mol%/Gesamtlipid, nur Außenmonolayer) 90min lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Entfernen nichtzellassoziierter Liposomen durch sorgfältiges Spülen wurden die Zellen für 3min bei 4°C mit einer 20mM Dithionitlösung behandelt, danach auch diese durch Spülen entfernt und eine mikroskopische Betrachtung durchgeführt. Abb. 35 zeigt die Ergebnisse. Die oberen Teilbilder (A,a) zeigen die Zellen vor Dithionitbehandlung. Es ist eine diffuse Fluoreszenzverteilung über den gesamten Zellkörper sichtbar, gleichzeitig zeichnen sich abgegrenzte, stark fluoreszierende Bereiche ab. Die diffuse Fluoreszenz über den gesamten Zellkörper kann zum einen durch adsorbierte Liposomen mit gleichmäßiger Verteilung über die gesamte Zelloberfläche hervorgerufen werden, zum anderen von fusionierten Liposomen stammen, deren Membranen in der Plasmamembran der Endothelzelle aufgehen. Zwischen internalisierten und adsorbierten Liposomen kann also nur schwer unterschieden werden. Allerdings gilt das Auftreten der genannten abgegrenzten Fluoreszenzbereiche als Zeichen für eine endozytotische Aufnahme der Liposomen. Es handelt sich dabei um mit fluoreszierendem Liposomenmaterial gefüllte Vakuolen im Zellinneren, die zum endozytotischen bzw. lysosomalen System gehören. Ausschließlich adsorbierte Liposomen wären als stark fluoreszierender Ring um die Zellen sichtbar [56,79]. Die unteren Teilbilder (B,b) der Abb. 35 zeigen eine Zelle nach Dithionitbehandlung. Durch Zugabe des Reduktionsmittels wurde sowohl die Fluoreszenz oberflächlich adsorbierter Liposomen als auch die von Farbstoffmolekülen, welche nach Fusionsprozessen in der äußeren Monolayer der Zellmembran lokalisiert waren, gelöscht. Die verbleibende Restfluoreszenz kann ausschließlich intrazellulär lokalisiertem Liposomenmaterial zugeordnet werden. Es findet eine endozytotische Aufnahme von unfunktionalisierten Liposomen durch Endothelzellen aus Nabelschnurvenen statt.

Dieses Ergebnis wird durch den nachfolgenden Versuch mit dem gleichen Zellpräparaten zusätzlich verdeutlicht.

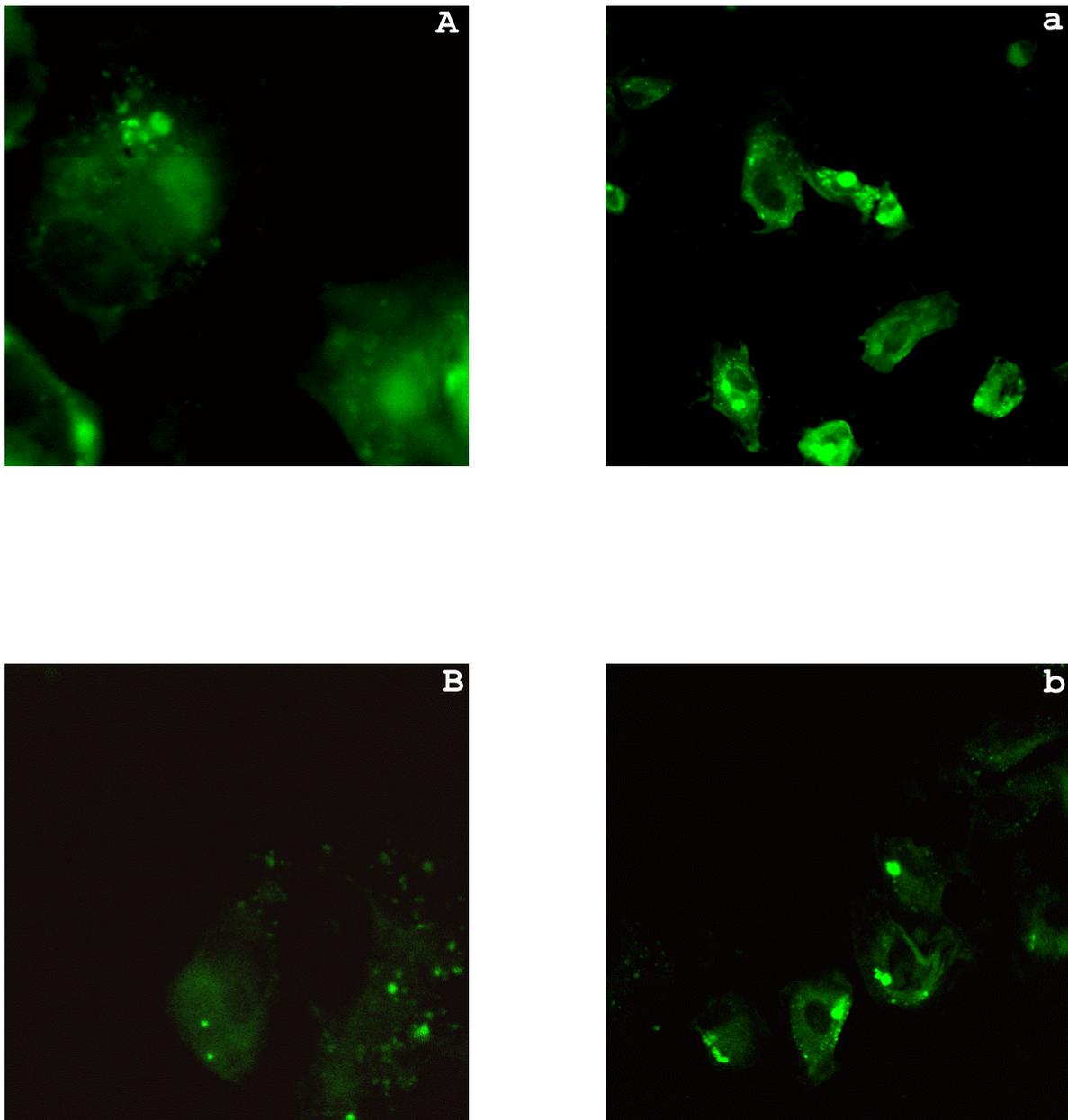


Abb. 35: HUVEC: A,a nach 90 minütiger Inkubation mit NBD(„outside only“) markierten Liposomen, B,b nach zusätzlicher Dithionitbehandlung

4.3.2.2 Mikroskopie im konfokalen Modus

Im Rahmen dieses Teilversuches erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung einer ausgewählten Zelle im konfokalen Modus.

Mit Hilfe der Laser-Scanning-Technik ist es möglich, daß das emittierte Fluoreszenzlicht aus den Ebenen ober- und unterhalb der fokussierten Ebene ausgeblendet werden kann. Der Begriff „konfokal“ beschreibt die Möglichkeit, nur die fokussierte Ebene isoliert darzustellen. Ermöglicht wird dies durch die Wirkung einer Blende (pin-hole). Die Darstellung von definierten schmalen Ebenen in z-Richtung erbringt den Eindruck optischer (virtueller) Schnitte des Präparates. Über den Computer ist es nachfolgend mit Hilfe verschiedener Algorithmen möglich, die einzelnen z-Schichten eines Präparates übereinanderzulagern und so das Gesamtpräparat in seiner Summe darzustellen. Jeder Punkt des Objektes erhält damit

eine Koordinate im dreidimensionalen Raum. Die Größe des pin-hole reguliert die „Dicke“ der z-Schicht, abhängig ist sie jedoch von der Fluoreszenzstärke des Präparates. Je fluoreszenzintensiver ein Objekt ist, je schmaler kann die z-Schicht sein.

Mit Hilfe des konfokalen Modus des Fluoreszenzmikroskopes wurde nun eine einzelne Zelle nach erfolgter Dithionitbehandlung optisch in verschiedene Ebenen „geschnitten“, ausgehend von der auf dem Glasplättchen haftenden Zelloberseite bis zur Zelloberfläche. Die schematische Darstellung in Abb. 36 soll dies verdeutlichen.

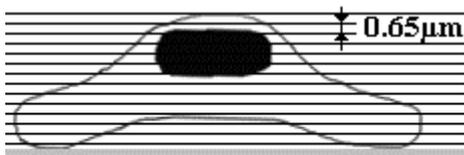


Abb. 36: HUVEC mit virtuellen Schnittebenen (schematische Darstellung)

Nach der Bestimmung der Gesamthöhe der Zelle wurden 15 „Schnitte“ jeweils im Abstand von $0,65\mu\text{m}$ ausgeführt. In Abb. 37 werden diese einzeln dargestellt, wodurch ein Blick in das Zellinnere möglich wird.

Die fluoreszierenden Vakuolen zeigen sich deutlich in den mittleren Zellschnitten, d.h. sie sind im Zellinneren lokalisiert. Zellober- und unterseite sind praktisch fluoreszenzfrei, die Farbstoffmoleküle adsorbierter Liposomen wurden zu nichtfluoreszierenden Derivaten reduziert.

Neben den deutlich abgegrenzten fluoreszierenden Bereichen ist auch nach Dithionitbehandlung eine diffuse Fluoreszenz auf verschiedenen Teilen der Zellkörper sichtbar. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß Farbstoffmoleküle nach Vesikelfusionen mit der Plasmamembran durch Lipidaustausch in tieferliegende Membranmonolayer eingebaut wurden, wo sie dithionitunzugänglich sind, oder die Fluoreszenz stammt von Bruchstücken abgebauter Vesikel im Zytosol.

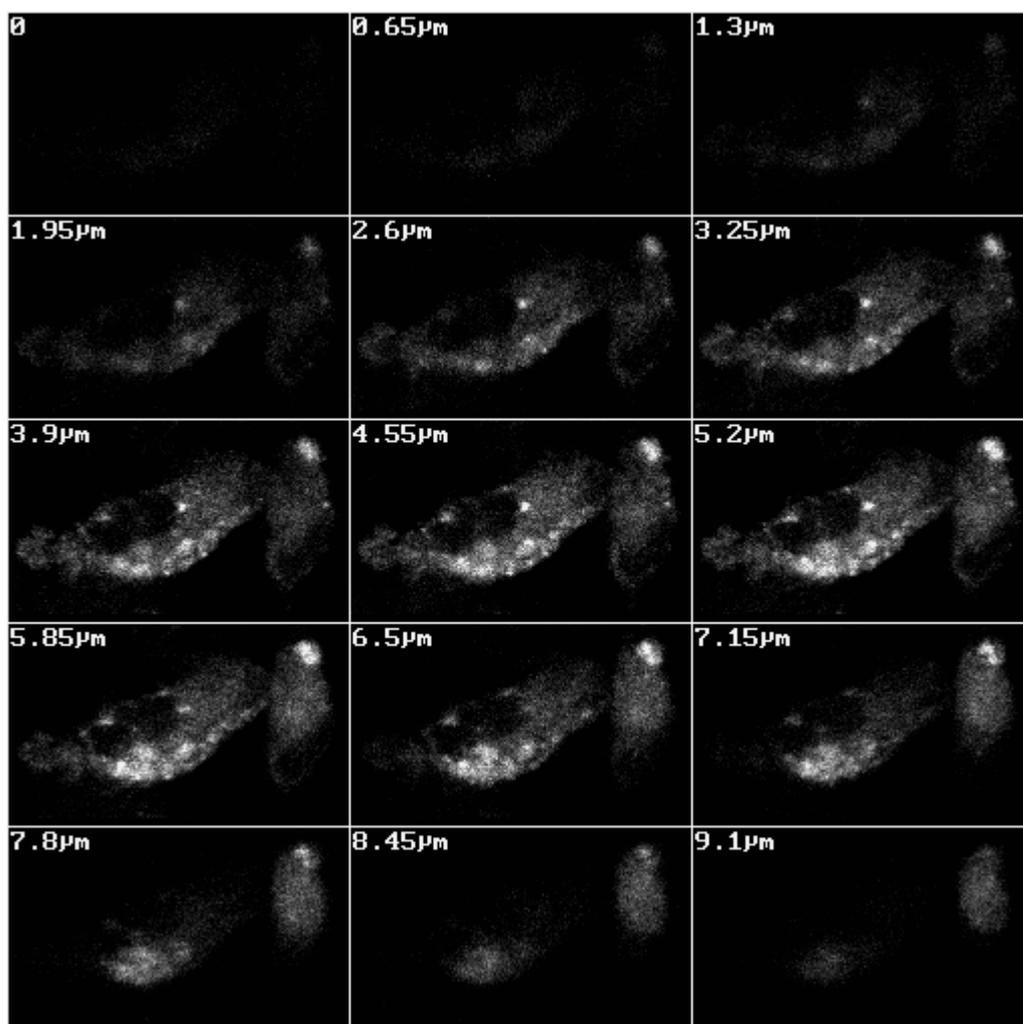
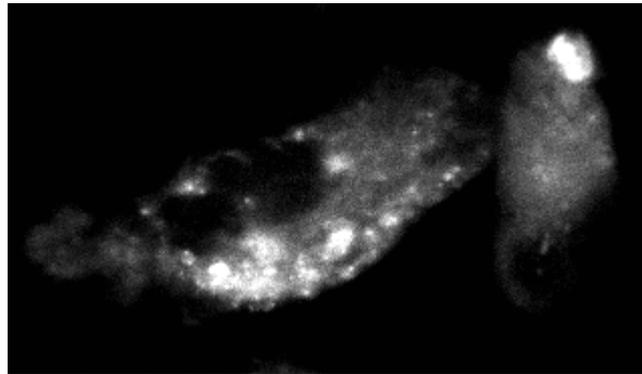


Abb. 37: Virtuelle Schnitte einer HUVEC (nach 90 minütiger Inkubation mit NBD („outside only“) markierten Liposomen und zusätzlicher Dithionitbehandlung)

4.3.2.3 Fluoreszenzdoppelmarkierung

Eine weitere mikroskopische Methode zum Endozytosenachweis setzt die Doppelmarkierung der Liposomen mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen voraus. Wasserlösliches FITC-Dextran wurde dafür in den hydrophilen Vesikellinnenraum eingeschlossen, während Rhodamin-PE die lipophile Membran markiert.

Auf dünnen Glasplättchen haftende HUVECs wurden 90min bei 37°C mit doppelt markierten Liposomen inkubiert. Nach dem Entfernen nichtzellassoziierter Liposomen durch sorgfältiges Spülen wurden die Zellen für 10 min mit einem sauren Puffer pH3 behandelt. Danach folgte die Auswertung der Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Einsatz unterschiedlicher Anregungswellenlängen. Das linke obere Teilbild (Rhod) der Abb. 38 zeigt eine ausgewählte Zelle bei einer Anregungswellenlänge von 543nm, dabei wird die Rhodaminfluoreszenz (rot) der Vesikelmembran sichtbar. Im rechten oberen Teilbild (FITC) wurde mit einer Anregungswellenlänge von 488nm gearbeitet, die Fluoreszenz stammt in diesem Fall vom FITC-Dextran (grün). Im unteren Teilbild (Rhod+FITC) sind beide Fluoreszenzen überlagert (resultierend: gelb). Eine Kolokalisation beider Fluoreszenzen (rot und grün) im gleichen Zellbereich beweist die Internalisation intakter Vesikel [138]. Dies ist in Abb. 38 an verschiedenen Stellen zu beobachten. Die vorrangige Anreicherung der Farbstoffe in abgegrenzten Vakuolen, welche verstreut über den gesamten Zellkörper auftreten, spricht zusätzlich für das Stattfinden einer endozytotischen Aufnahme intakter Vesikel. Ausschließlich adsorbierte Liposomen wären, wie bereits an anderer Stelle erwähnt, als stark fluoreszierender Ring um die Zellen sichtbar [56,79]. Es soll jedoch an dieser Stelle bemerkt werden, daß ein Ausschluß der Beteiligung adsorbierter Liposomen an der sichtbaren Gesamtfluoreszenz für den Fall des Rhodamins nicht möglich ist. Im Fall des FITC-Dextrans kann durch die sog. „Acid wash“- Methode eine durch adsorbierte Liposomen verursachte Teilfluoreszenz ausgeschlossen werden. Durch die Behandlung der Zellen mit dem sauren Puffer kommt es zu einem Ausfluß des wässrigen Vesikelinhaltes an der Zelloberfläche [56]. Das Auftreten diffuser FITC-Fluoreszenz verteilt über den Zellkörper bietet einen Anhaltspunkt für das zusätzliche Auftreten von Fusionsprozessen an der Zellmembran mit resultierendem Ausfluß des Vesikelinhaltes ins Zytosol. Diesem Befund soll im nächsten Abschnitt mit einem Fusionsnachweis nachgegangen werden.

Nach den vorangehend vorgestellten Ergebnissen läßt sich an dieser Stelle vermerken, daß die verwendeten Endothelzellen zu einer endozytotischen Internalisierung von zumindest teilweise intakten Liposomen befähigt sind, das zusätzliche Stattfinden von Fusionsprozessen an der Zellmembran mit Ausfluß des Vesikelinhaltes in das Zytosol wird angenommen. Im vorgestellten Versuch wurde die intrazelluläre Lokalisation der beiden Fluoreszenzfarbstoffe nur nach einem bestimmten Inkubationszeitraum betrachtet. Für das Verständnis des zeitlichen Ablaufes einer endozytotischen Vesikelaufnahme mit anschließendem lysosomalen Abbau (räumliche Trennung der Farbstoffe ?) wäre die Beobachtung der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sicher auch sehr interessant.

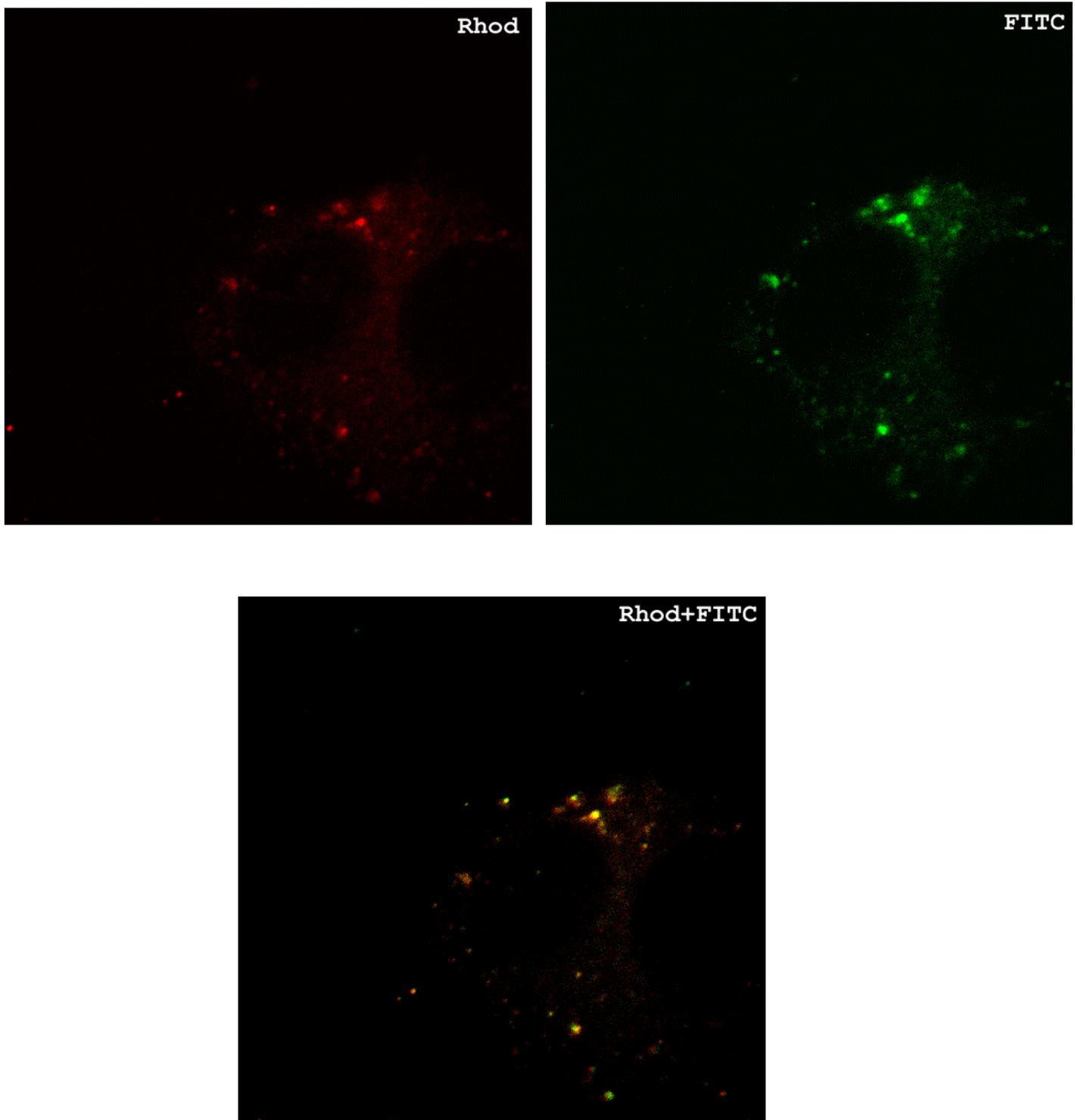


Abb. 38: HUVEC nach 90 minütiger Inkubation mit doppelt-(Rhod+FITC) markierten Liposomen

4.3.2.4 Fusions-Nachweis

Die klassische Methode zum Fusionsnachweis verwendet die Farbstoffe 6-Carboxyfluorescein oder Calcein [88]. Dabei nutzt man die Tatsache, daß hohe Konzentrationen (ab 0,1mM) der wasserlöslichen Farbstoffe keine Fluoreszenz zeigen. Sie unterliegen dabei einem sog. self-quenching-Effekt, d.h. einer Fluoreszenzlöschung durch Selbstassoziation. Eine Verdünnung der Lösungen führt zu einem konsequenten Anstieg der Fluoreszenz. Calcein besitzt aufgrund seiner stärkeren Ladung eine noch geringere Neigung zum Durchdringen von lipophilen Membranen als Carboxyfluorescein.

Im Verlauf einer Fusion von Liposomen mit der Zellplasmamembran erfolgt ein Ausfluß des Vesikelinhaltes ins Zytosol, was mit einer massiven Verdünnung des Farbstoffes unter die self-quenching-Konzentration einhergeht. Die Zellen zeigen eine starke diffuse Fluoreszenz, die sich über den gesamten Zellkörper erstreckt, unterbrochen von einem dunklen Gebiet in der Zellkernregion. Im Vergleich dazu liefern endozytisch internalisierte Liposomen punktförmige Fluoreszenzbereiche im Zellkörper, beschränkt auf die lysosomalen oder endozytotischen Vakuolen, in denen der Farbstoff als Folge einer enzymatischen Zerstörung der Vesikel freigesetzt und verdünnt wird. Adsorbierte Liposomen fluoreszieren nicht, außer als Konsequens einer massiven intravesikulären Konzentrationsverminderung durch extrazellulären Ausfluß. In diesem Fall erscheinen die Zellen nach dem Spülen matt fluoreszierend mit breitem strahlendem Rand [56,88].

Endozytose ist eine aktive, metabolische Leistung der lebenden Zelle. Die Fusion ist im Gegensatz dazu ein passiver Prozeß ohne direkte Mitwirkung der Zelle. Eine Unterscheidung zwischen beiden Prozessen gelingt deshalb durch Ausnutzung des Temperatureffektes auf beide Prozesse. Während bei 37°C beide Prozesse ablaufen, ist die Endozytose bei 4°C vollständig gehemmt.

Mit Hilfe des nachfolgend vorgestellten Versuches konnte nachgewiesen werden, daß im Verlauf der Interaktionen unfunktionalisierter Liposomen mit HUVEC sowohl endozytotische Prozesse als auch Fusionsmechanismen zusammenwirken. Dazu wurden adhärenzte HUVEC für 90 min mit calceinbeladenen Liposomen bei 4°C und parallel bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen zur Entfernung nichtzellassoziierter Liposomen bzw. extrazellulär ausgeflossenen Farbstoffes gründlich gespült und einer fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zugeführt. Es sei an dieser Stelle nochmals bemerkt, daß extrazellulär freigesetztes Calcein aufgrund seiner Ladung nicht in der Lage ist, selbständig die Zellmembran zu überwinden.

Abb. 39 zeigt die erhaltenen Bilder.

Bei 4°C (oberes Teilbild) zeigt sich eine über den gesamten Zellkörper erstreckende starke Fluoreszenz, die als deutliches Zeichen einer Fusion gewertet wurde. Wären die Liposomen ausschließlich adsorptiv auf der Zelloberfläche gebunden, wäre die resultierende Fluoreszenz geringer und ein strahlender Ring um die Zelle sichtbar. Eine Mitbeteiligung adsorbierter Liposomen an der Gesamtfluoreszenz kann an dieser Stelle natürlich nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden. Das nach einer 37°C-Inkubation erhaltene Bild (unteres Teilbild) zeigt neben der massiven diffusen Fluoreszenz zusätzlich abgegrenzte stark fluoreszierende Bereiche. Diese wurden als mit Liposomenmaterial gefüllte endozytotische oder lysosomale Kompartimente interpretiert.

Wie bereits am Beginn des Kapitel vorausgeschickt, konnte mit Hilfe dieser klassischen Fusionsnachweismethode gezeigt werden, daß an der Internalisierung unfunktionalisierter Liposomen durch Nabelschnurendothelzellen sowohl Endozytose- als auch Fusionsmechanismen beteiligt sind.

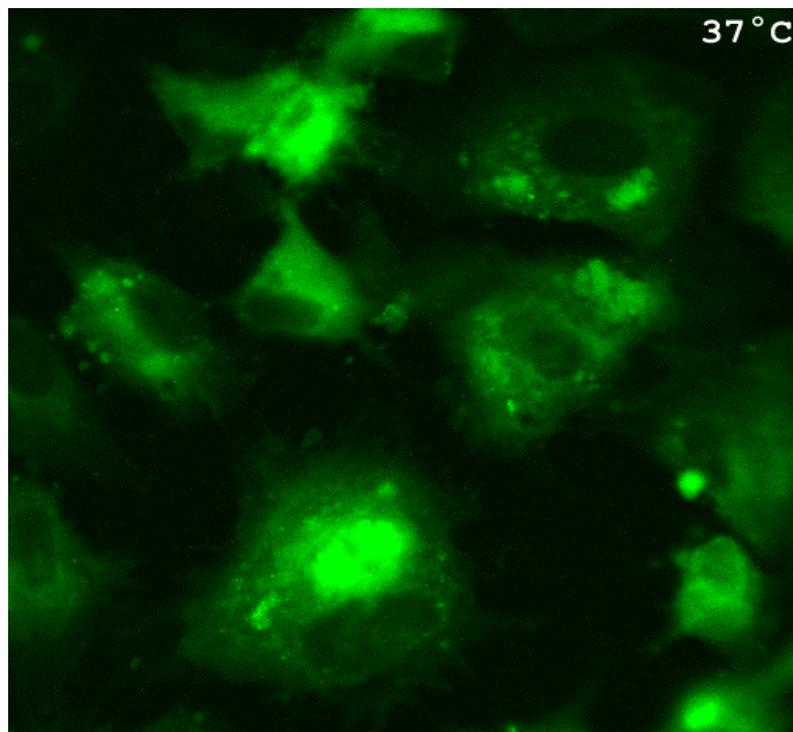
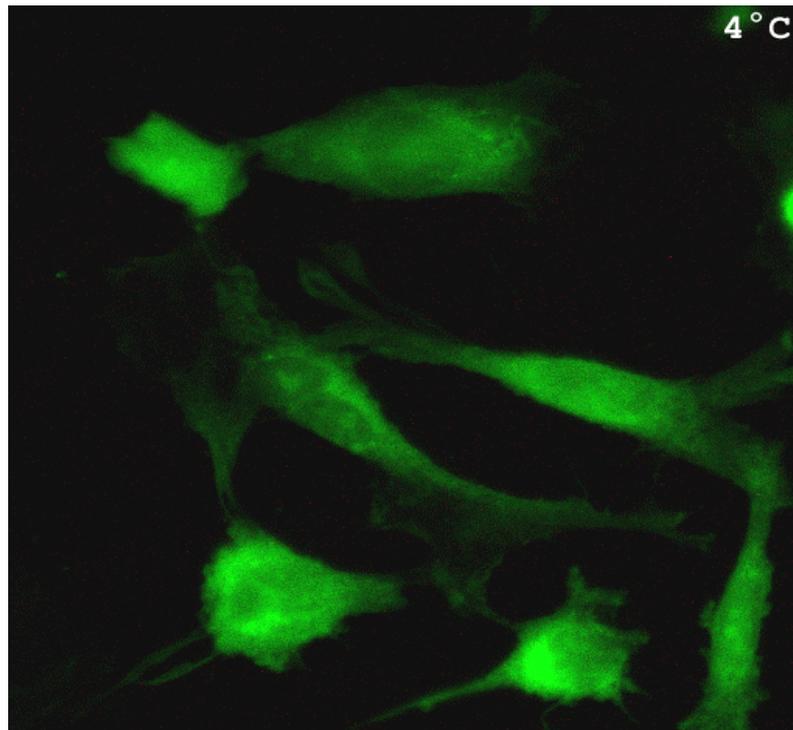


Abb. 39: HUVEC nach 90 minütiger Inkubation mit Calcein beladenen Liposomen bei 4°C bzw. 37°C

4.3.2.5 Pronase-Methode

Nach den verschiedenen mikroskopischen Internalisierungsuntersuchungen wurde im folgenden die Aufnahme von Liposomen durch HUVEC quantitativ (Fluorimetrie) bestimmt, d.h. als internalisierte Lipidmenge pro Zelle. Dies erfolgte unter Verwendung des Enzyms Pronase (=Protease aus *Streptomyces griseus*). Mit dessen Hilfe ist eine vollständige Abtrennung gebundener Liposomen von der Zelloberfläche möglich und damit eine Separation zwischen gebundenen und internalisierten Vesikeln. Die Mengen der unterschiedlich zellassoziierten Liposomenteilmenen wurden folgendermaßen bestimmt. Nach 90 minütiger Inkubation der HUVEC (Lipidkonzentration 500 μ M) mit Liposomen bei 37°C folgte zunächst durch mehrfaches Spülen eine Abtrennung nichtzellassoziierter Vesikel. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pronaselösung (0,1%) behandelt und die erhaltene Zellsuspension zentrifugiert. Der Überstand dieses ersten Zentrifugationsschrittes enthielt die oberflächlich gebundenen Liposomen. Das verbliebene Zellpelett wurde mit einer Lösung des Detergenz Triton X-100 zerstört und homogenisiert. Im Überstand des darauf folgenden zweiten Zentrifugationsschrittes wurde der internalisierte Lipidanteil quantitativ bestimmt. Im Rahmen dieser Bestimmungen kam der Fluoreszenzfarbstoff DiO (3,3'-Di-octadecyloxacarbocyaninperchlorat) zur Liposomenmarkierung (0,4mol%) zum Einsatz. Im Vergleich zu den in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig verwendeten Farbstoffen NBD ($\epsilon = 21 \cdot 10^{-3}$) und Rhodamin ($\epsilon = 88 \cdot 10^{-3}$) zeigt DiO ($\epsilon = 154 \cdot 10^{-3}$) eine deutlich höhere Fluoreszenzausbeute und deshalb ist seine Anwendung für die Bestimmung solch kleiner Lipidmengen sehr vorteilhaft.

Die zahlenmäßigen Ergebnisse des Versuches sind in Abb. 40 dargestellt.

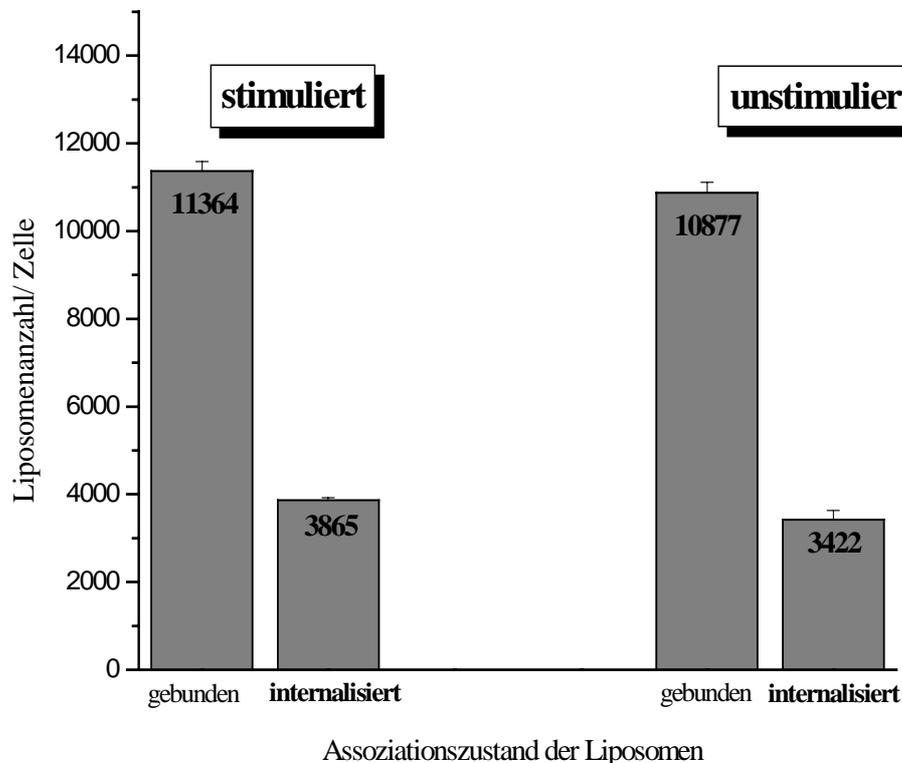


Abb. 40: Anzahl zellassoziierter bzw. internalisierter Liposomen pro Zelle für stimulierte und unstimulierte HUVEC

Zum einen ist eine Aussage über die internalisierte bzw. gebundene Lipidmenge pro Zelle möglich, zum anderen eine Aussage über den Einfluß einer induzierten Entzündung der Endothelzellen (Interleukinstimulation) auf ihre Endozytoseleistung.

Im stimulierten Zustand wurden durchschnittlich pro Zelle ca. 3865 Liposomen aufgenommen, das entspricht 25% der gesamtzellassoziierten Lipidmenge. Im unstimulierten Zustand waren es mit durchschnittlich ca. 3422 Liposomen pro Zelle 11% weniger im Vergleich zu den stimulierten Zellen. Es ist also ein geringfügiger Anstieg der Internalisierungsrate bei den stimulierten Zellen zu beobachten. Die Menge gebundener Liposomen stieg nur um 4%, was aufgrund des Fehlens eines spezifischen Ligand-Rezeptorpaars auch nach Stimulation bei Verwendung unfunktionalisierter Liposomen nicht anders zu erwarten gewesen wäre. Der geringfügige Anstieg der Bindungsrate ist u. U. auf etwas veränderte Oberflächeneigenschaften der Zellen nach der Stimulation zurückzuführen.

Die parallele Untersuchung IL-1 β stimulierter und unstimulierter Zellen sollte hauptsächlich die Frage klären, ob eine induzierte Entzündung mit ihren resultierenden physiologischen/pathologischen Veränderungen der Endothelzelle zu einer Änderung im unspezifischen Internalisierungsverhalten ganz speziell für Liposomen führt. In der Literatur findet man zahlreiche Studien, die unter Entzündungsbedingungen eine drastische Erhöhung der Endothelpermeabilität für diverse Makromoleküle sowie auch eindeutig für Liposomen nachweisen konnten [99,139]. Dies führt passiv zu einer Akkumulation von Liposomen im subendothelialen Gewebe und paßt ausgezeichnet in das angestrebte Konzept eines Drug Delivery Systems mit dem Gefäßendothel als Zielgewebe. Zur direkten Internalisierung von Liposomen durch Gefäßendothelzellen ist jedoch relativ wenig bekannt. Allerdings geht aus verschiedenen Literaturquellen hervor, daß die endozytotische Aufnahme diverser Moleküle durch Endothelzellen unter Entzündungsbedingungen verändert ist. So wurde z.B. durch Martinez et al. [92] ein Anstieg der endozytotischen Aufnahme von Serumalbumin und Mannan durch Lebersinusoidalendothelzellen um bis zu 50% nach Zugabe verschiedener Entzündungsmediatoren (LPS, TNF α , IL-1 β , PGE $_2$) nachgewiesen. Die Aufnahme erfolgte über „Scavenger“- und Mannose-Rezeptoren, Teile des gut ausgebildeten rezeptorvermittelten Endozytoseapparates der Lebersinusoidalzellen. Vor allem die Mediatoren der Frühphase (IL-1 β , TNF α) zeigten einen steigernden Effekt, wohingegen Mediatoren der Entzündungsspätphase (IL-6, INF γ) interessanterweise wirkungslos waren. Defazio et al. fanden eine gesteigerte endozytotische Aufnahme (Fluidphasenendozytose) von Meerrettich-Peroxidase durch verschiedene Endothelzellen (Hirnmikrogefäße, Nabelschnurvenen) [140]. Aus einer Untersuchung von Takahashi et al. geht hervor, daß die Transzytose von Lipidmikrosphären durch HUVEC nach Interleukin-1 β -Behandlung erhöht ist [141].

In das Gesamtbild dieser Ergebnisse paßt sich die gefundene geringfügige Steigerung der unspezifischen Internalisierung der Liposomen relativ gut ein, wobei natürlich die unterschiedlichen Zelltypen beachtet werden müssen. Die Geringfügigkeit der Aufnahmesteigerung liegt mit Sicherheit zum Teil in der beachtlichen Größe der Liposomen im Vergleich mit Molekülen begründet.

An dieser Stelle kann also zusammengefaßt werden, daß eine Stimulation von HUVEC mit dem Entzündungsmediator IL-1 β zu einem geringfügigen Internalisierungsanstieg für unfunktionalisierte, ca. 50nm große Liposomen führt.

Durch Verwendung spezieller Endozytosehemmstoffe (z.B. Cytochalasin B) könnte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden, in welchem Ausmaß endozytotische Mechanismen beteiligt sind, im vorgestellten Versuch gehen auch fusionierte Liposomen in die internalisierte Lipidmenge ein. Weiterhin wäre eine Identifizierung beteiligter Rezeptortypen von Interesse.

Aus Abb. 40 ist eine konkrete internalisierte Liposomenzahl pro Zelle entnehmbar, eine Beurteilung der damit verbundenen Internalisierungsleistung der Gefäßendothelzelle ist jedoch nur im Vergleich mit bekannten Angaben möglich. Ein direkter Vergleich mit den von anderen Arbeitsgruppen in ähnlich gestalteten Studien gefundenen Aufnahmeleistungen gestaltete sich nach abgeschlossenem Versuch ziemlich schwierig. Das Vorliegen stark differierender Versuchsparameter, Verwendung unterschiedlicher Zelltypen, Liposomengrößen und -zusammensetzungen erlaubte nur einen grob orientierenden Vergleich. Die gefundenen Werte wurden zum einen mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit J774-Zellen (makrophagenähnliche Zelllinie) und zum anderen mit Ergebnissen aus einer Untersuchung zum Internalisierungsvermögen von Bronchialepithelzellen für spezifisch gereicherte Immunliposomen verglichen.

In

Abb. 41 sind die wichtigsten Versuchsparameter und Ergebnisse zusammengefaßt.

Näherungsweise Berechnung der Liposomenanzahl/ μmol Phospholipid bei gegebener Vesikelgröße und Lipidzusammensetzung:
Gewählte Voraussetzungen:
♦ Größe 1 Bilayer ~ 5nm
♦ Unilamellarität
♦ Mittlerer Flächenbedarf eines Lipids auf Bilayeroberfläche (Lipidgemisch SPC: Chol/7:3) = 0,561 nm ² [24]
ergibt für:
50nm Liposomen → $2,6 \cdot 10^{13}$ Liposomen/μmol PL
200nm Liposomen → $1,4 \cdot 10^{12}$ Liposomen/μmol PL

wichtige Versuchsparameter /Ergebnisse	Mastrobattista et al. [15]	Ishiwata et al. [16]	Eigene Ergebnisse	
Zelltyp	BEAS-2B (humane Bronchialepithelzellen)	J 774 makrophagenähnlich	HUVEC (humane Nabelschnurendothelzellen)	
Vesikelgröße	200nm	200nm	50nm	
Lipidzusammensetzung	PHEPC:EPG:Chol:MPB-PE/38,5:4:16:0,06	EPC:Chol/ 75:25	SPC:Chol/70:30	
Lamellarität	1,5	1,5	1	
Vesikelanzahl/ μmol PL	$1,1 \cdot 10^{12}$	$9 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^{13}$	
Liposomentyp	Immunliposom (anti-ICAM-1-Antikörper)	Unfunktionalisiert	Unfunktionalisiert	
Inkubationsbedingungen	(1h Vorinkubation 4°C) 1h 37°C	2h 37°C	1,5h 37°C	
Lipidangebot	500 μM	100μM	500 μM	
			Stimuliert	Unstimuliert
nmol Lipid/ Zelle (internalisiert)	$6 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
% internalisiert/ gesamtassoziiert	nicht vergleichbar	31%	25%	24%

Abb. 41: Vergleich von Internalisierungsraten unterschiedlicher Zellarten

Bei einer Angabe der Aufnahmemenge in Liposom/Zelle anstatt nmol Lipid/ Zelle ergäbe sich aufgrund der unterschiedlichen Liposomengrößen und Lamellaritäten theoretisch eine andere Abstufung der Ergebnisse, diese wäre jedoch unrealistisch. Die höchste Internalisierungsrate zeigen im Vergleich die stimulierten Bronchialepithelzellen für die Immunliposomen. Dies ergibt sich aus dem Vorhandensein eines spezifischen Ligand-Rezeptorpaars (Antikörper-ICAM-1), wodurch eine massive dauerhafte Anreicherung der Vesikel auf der Zelloberfläche ermöglicht wird. Selbst wenn ICAM-1 im vorliegenden Fall wahrscheinlich nicht direkt als Endozytoserezeptor wirkt, so kann die Zelle aufgrund des riesigen Lipidangebotes auf ihrer Oberfläche unter Zusammenwirkung verschiedenster, auch unspezifischer Mechanismen eine beträchtliche Endozytoseleistung vollbringen. Eine vorangehende Akkumulation von Liposomen auf einer Zelloberfläche wird unter der Voraussetzung des prinzipiellen Vorhandenseins von Aufnahmemechanismen eine Internalisierung sicher stets positiv beeinflussen. Das wurde auch von der Arbeitsgruppe Scherphof für Lebersinusoidalendothelzellen nachgewiesen [142]. So war die Internalisierungsrate dieser Endothelzellen für unfunktionalisierte Liposomen (100nm) sehr gering, konnte aber nach Kopplung spezifischer Liganden für den auf dieser Endothelzellpopulation nachgewiesenen „Scavenger“-Rezeptor um ein Mehrfaches (von $0,06 \cdot 10^{-6}$ nmol auf $1,9 \text{ nmol} \cdot 10^{-6}$ nmol/Zelle) gesteigert werden. Allerdings muß bemerkt werden, daß es sich bei diesem Rezeptor zusätzlich um einen speziellen Endozytoserezeptor handelt.

Vergleicht man die Aufnahmeraten von J774 mit unseren Ergebnissen, so ergeben sich annähernd gleiche internalisierte Lipidmengen. Das bedeutet jedoch in diesem Fall eine bedeutend höhere Internalisierungsleistung durch die J774, da zum einen deutlich größere Liposomen bewältigt wurden und zum anderen das von der Arbeitsgruppe Ishiwata verwendete 5fach geringere Lipidangebot berücksichtigt werden muß. Zusätzlich liegt der Anteil internalisierter Liposomen an der Gesamtmenge zellassoziierter Lipids bei den Makrophagen um ca. 6 % höher. Das bessere Ergebnis für J774 beruht auf der Tatsache, daß es sich hierbei um eine makrophagenähnliche Zelllinie handelt, also um spezialisierte, phagozytierende Zellen. Die physiologische Hauptaufgabe des Endothels liegt dagegen in ihrer selektiven Barrierefunktion.

Es soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, daß der vorliegende Vergleich lediglich einer groben Orientierung in Hinblick auf die Beurteilung des Internalisierungsvermögens von HUVEC für Liposomen diene.

Wie zu erwarten war, zeigen Gefäßendothelzellen eine geringere Internalisierungsleistung als Makrophagen (siehe Kap. 4.3.1.7). HUVEC sind jedoch eindeutig in der Lage, in nachweisbarem Umfang unfunktionalisierte, kleine Liposomen aufzunehmen. Eine Interleukinstimulation der Endothelzellen bewirkt eine geringfügige Steigerung der internalisierten Lipidmenge. Es ist davon auszugehen, daß eine Anreicherung von Liposomen auf der Zelloberfläche über spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu einer weiteren Steigerung der Internalisierungsmenge führen kann.

4.3.2.6 Zusammenfassung des Abschnittes

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte die prinzipielle Fähigkeit von HUVEC zur Internalisierung von Liposomen überprüft werden. HUVEC dient dabei als Vertreter für Gefäßendothelzellen. Zunächst wurde dies mit dem Farbstoff Pyranin über eine pH-abhängige Fluoreszenzänderung versucht, wobei nur für spezifische Immunliposomen durch stimulierte Zellen eine endozytotische Aufnahme nachgewiesen werden konnte. Die erhaltenen negativen Ergebnisse für unspezifische Immunliposomen, unfunktionalisierte Liposomen und bei Verwendung unstimulierter Zellen wurden jedoch nicht als völliges Fehlen unspezifischer endozytotischer Aktivität gewertet, sondern auf eine fehlende Sensitivität der gewählten

Nachweismethode zurückgeführt. Nachfolgend kamen verschiedene mikroskopische Verfahren zum Einsatz. Mit ihrer Hilfe konnte eine Aufnahme von unfunktionalisierten Liposomen eindeutig (Dithionitmethode) nachgewiesen werden. Im Verlauf der Untersuchungen wurde deutlich, daß die Vesikelaufnahme Resultat des Zusammenwirkens mehrerer Mechanismen war. So konnten Fusionsprozesse mittels der klassischen Fusionsmethode unter Verwendung von Calcein gezeigt werden, gleichzeitig auch die Aufnahme intakter Vesikel mittels Doppelmarkierung der Liposomen. Die genaue Natur der beteiligten Endozytosemechanismen muß in weiterführenden Versuchen noch untersucht werden. Für die unfunktionalisierten Liposomen kommt vor allem die unspezifische adsorptive (elektrostatisch u./o. hydrophob) Endozytose in Frage. Aufgrund des Cholesterolgehaltes (30mol%/Gesamtlipid) der Liposomen ist auch eine rezeptorvermittelte Endozytose über LDL-Rezeptoren, deren Existenz auf Endothelzellen nachgewiesen wurden [149], denkbar. In diesem Zusammenhang findet man in der Literatur für diese Möglichkeit ein Beispiel, in dem die Tatsache ausgenutzt wurde, daß liposomal verkapselte Benzoporphyrinderivate stark an endogenes LDL binden und LDL so als Carrier zu proliferierenden Endothelzellen genutzt wurde [149].

Eine Internalisierung von Immunoliposomen ist neben unspezifischen Mechanismen über eine Endozytose durch Fc-IgG-Rezeptor-Vermittlungen möglich. Inwieweit das E-Selektin, über welches die Anreicherung der Liposomen vermittelt werden soll, auch als Endozytoserezeptor wirken kann, ist noch zu klären. Die Ergebnisse im Rahmen der fluorimetrischen Endozytoseuntersuchung (Kap. 4.3.1) lassen jedoch eine direkte Beteiligung des Selektins wahrscheinlich erscheinen.

Die Tatsache, daß stimulierte HUVEC gegenüber unstimulierten Zellen eine, wenn auch für den untersuchten Fall der unfunktionalisierten Liposomen nur sehr geringfügig erhöhte Internalisierungsrate für Liposomen zeigten, passt sich sehr gut in das Gesamtkonzept eines selektingerichteten Drug Delivery Systems für eine antiinflammatorische Therapie ein. Im Entzündungsfall exprimieren die Zielzellen damit zum einen die für eine Vesikelakkumulation nutzbaren Rezeptoren und zum anderen begünstigen sie eine vermehrte Aufnahme der Liposomen in die Zelle, dem eigentlichen Wirkort der meisten Arzneistoffe.

Zusammenfassend ist also zu sagen, daß nach diesen ersten Versuchen zum Internalisierungsverhalten das Gesamtkonzept eines selektingerichteten Drug Delivery Systems realisierbar erscheint. Die spezifische Anreicherung der Liposomen am Zielort konnte im Kapitel 4.2 gezeigt werden. In diesem Abschnitt wurde gezeigt, daß die Internalisierung der einmal angereicherten Liposomen der, wenn auch eventuell mengenmäßig limitierende, so jedoch nicht völlig blockierende Teilabschnitt innerhalb des Drug Delivery Systems ist. Es wird angenommen, daß mit Immunoliposomen aufgrund des zusätzlichen Mitwirkens spezifischer Endozytosemechanismen noch höhere internalisierte Lipidmengen erreicht werden können als mit den verwendeten unfunktionalisierten Liposomen. Das muß Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Kapitel 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Eignung vaskulärer Selektine als molekulare Zielstrukturen zur Anreicherung von Immunoliposomen am Gefäßendothel. Dieses Prinzip kann im Erfolgsfall als neuartige Strategie einer antiinflammatorischen Therapie ausgenutzt werden. Eine Targetierung der vaskulären E- und P-Selektine bietet sich vor allem durch ihre direkte räumliche und zeitliche Bindung an das Entzündungsgeschehen an.

In einem ersten Abschnitt der Arbeit wurden selektingerichtete Immunoliposomen als Wirkstoff-Transportvehikel präpariert. Im Anschluß an einen umfangreichen Vergleich etablierter Antikörper-Kopplungsmethoden wurde die Variante unter Bildung einer Carbodiimidbindung zwischen liposomalen Lipidanker und Antikörper favorisiert und genutzt. Sie zeichnet sich vor allem durch ihre einfache, unproblematische Durchführung und den Nichtbedarf einer Antikörperderivatisierung aus. Desweiteren konnte eine völlig neuartige Kopplungsmethode zur Darstellung sterisch stabilisierter Immunoliposomen mit PEG-terminaler Antikörperbindung entwickelt und charakterisiert werden. Die neue Kopplungsmethode erwies sich als eine Technik, die unkompliziert durchführbar ist, keine Aktivierungs- bzw. Derivatisierungsschritte enthält, in ihrer Anwendbarkeit nicht von einer aufwendigen und komplizierten Synthese des Ankerlipids limitiert wird und bezüglich der Kopplungseffizienz mit etablierten Methoden vergleichbar ist.

In anschließenden *in vitro*-Targeting-Untersuchungen konnte eine spezifische Anreicherung von Liposomen mit anti-E-Selektin-Antikörpern im Vergleich mit unspezifisch bzw. unfunktionalisierten Liposomen an verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden. Die spezifischen Immunoliposomen zeigten unter verschiedenen Versuchsbedingungen ein deutlich höheres Zell-Bindungsmaß als die Referenzliposomen. Zur weiteren Annäherung an die physiologischen Bedingungen in durchströmten Blutgefäßen wurden die Targetierungsuntersuchungen unter statischen Bedingungen durch Experimente unter den simulierten Scherflußbedingungen des kapillaren Blutstroms ergänzt. In diesem Zusammenhang kam eine spezielle Durchflußapparatur zum Einsatz, und es konnte auch unter diesen dynamischen Bedingungen ein deutlich höheres Bindungsmaß der spezifischen Immunoliposomen gegenüber den Referenzliposomen nachgewiesen werden.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde mit verschiedenen Techniken die prinzipielle Fähigkeit von HUVEC zur Internalisierung von Liposomen analysiert. HUVEC's dienten dabei als Vertreter für humane Gefäßendothelzellen. Die Tatsache, daß stimulierte HUVEC gegenüber unstimulierten Zellen eine, wenn auch für den untersuchten Fall der unfunktionalisierten Liposomen nur geringfügig erhöhte Internalisierungsrate zeigen, unterstützt das Gesamtkonzept eines selektingerichteten Drug Delivery Systems. Die Gefäßzellen liefern somit im Entzündungsfall durch die Selektinexpression zum einen spezifische Rezeptoren zur Akkumulation von Immunoliposomen am Ort des Geschehens und zum anderen begünstigen sie eine Aufnahme der angereicherten Liposomen unter diesen Bedingungen.

Das Gesamtkonzept eines selektingerichteten Drug Delivery Systems erscheint in der Zusammenfassung der Erkenntnisse dieser Arbeit als realisierbar. Es wurde sowohl eine spezifische Anreicherung der Immunoliposomen an Zielzellen, als auch deren prinzipielle Fähigkeit zur Internalisierung von Liposomen nachgewiesen. Es wird dabei angenommen, daß mit selektingerichteten Immunoliposomen aufgrund des zusätzlichen Einsetzens spezifischer Endozytosemechanismen noch deutlich höhere Internalisierungsraten erreichbar sind. Die Charakterisierung der Selektine als mögliche direkte Endozytose-Rezeptoren muß das Ziel weiterführender Untersuchungen sein.

Zusammenfassend stellen die vaskulären Selektine sehr attraktive und geeignete molekulare Zielstrukturen zur Anreicherung von Immunoliposomen am Gefäßendothel im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie dar. Über ihre Targetierung ist unter Entzündungsbedingungen ein sehr spezifischer Transport von Wirkstoffen direkt an den Ort des Krankheitsgeschehens möglich. Eine Lösung des im Zusammenhang mit einer späteren systemischen Applikation der Immunoliposomen auftretenden Immunogenitätsproblem erscheint durch den perspektivischen Ersatz der verwendeten Maus-Antikörper durch humanisierte anti-E-Selektin-Antikörper unproblematisch möglich [144].

Literaturverzeichnis

- [1] Manger,B. (1999) Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Zytokinantagonisten, *Z. Ärztl. Fortbild. Qualisch* 93, 101-104.
- [2] Smolen,J.S. (1999) Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulfasalazine in active rheumatoid arthritis: a double blind randomised, multicentre trial, *Lancet* 353, 259-266.
- [3] Gregoriadis,G. (1988) Liposomes as drug carriers: recent trends and progress, Wiley and Sons, New York.
- [4] Springer,T.A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and lymphocyte emigration, *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827-872.
- [5] Forssen,E., Willis,M. (1998) Ligand-targeted liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 29, 249-271.
- [6] Ehrlich,P. (1906) The relations existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action, in: *Collected studies on Immunity*, John Wiley and Sons, Ltd., New York, 404-443.
- [7] Gregoriadis,G. (1976) The carrier potential of liposomes, *New. Eng. J. Med.* 295, 704-710.
- [8] Papahadjopoulos,D. (1987) Liposomes and their use in biology and medicine, *New York Academy of Science* 308, 1-462.
- [9] Gilbreath,M.J., Nacy,D.L., Hoover,D.L., Alving,C.R., Swartz,G.M., Meltzer,M.S. (1985) Macrophage activation for micobicial activity against *Leishamina major*: inhibition of lymphokine activation by phosphatidylcholine-phosphatidylserine liposomes , *J. Immunol.* 134, 3420-3425.
- [10] Fiedler,I.J. (1990) Systemic activation of macrophages by liposomes containing muramyltripeptide phosphatidylethanolamine for therapy of cancer metastasis, *J. Liposome Res.* 1, 461-471.
- [11] Roberts,W.G., Palade,G.E. (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated, *Cancer Res.* 57, 765-772.
- [12] Jackson,R.C. (1996) in: *Computer techniques in preclinical and clinical drug development*, CRC Press, Boca Raton, pp. 238-245.
- [13] Gregoriadis,G., Neerunjun,T. (1975) Homing of liposomes to target cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 537-544.
- [14] Matthay,K.K., Heath,T.D., Badger,C.C., Bernstein,I.D., Papahadjopoulos,D. (1986) Antibody directed liposomes: comparison of various ligands for association, endocytosis and drug delivery, *Cancer Res.* 46, 4904-4910.

- [15] Kirpotin,W., Park,J.W., Hong,K., Zalipsky,S., Li, W.L., Carter,P., Bunz,C.C., Papahadjopoulos,D. (1997) Sterically stabilized anti HER-2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro, *Biochemistry* 36, 66-75.
- [16] Park,J.W., Hong,K. Crater,P., Kotts,C., Shalaby,R., Giltinan,D., Wirth,C., Asgari,H., Wood,W.I., Papahadjopoulos,D., Benz,C. (1993) Development of anti HER-2 immunoliposomes for breast cancer chemotherapy, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12, 118-123.
- [17] Koning,G.A., Corter,A., Scherphof,G.L., Kamps,J.A. (1999) Antiproliferative effects of immunoliposomes containing 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate on colon cancer cells, *Br. J. Cancer* 80, 1718-1725.
- [18] Ahmad,I., Longenecker,M., Samuel,J., Allen,T.M. (1993) Antibody-targeted delivery of doxorubicin-entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice, *Canc. Res.* 53, 1484-1488.
- [19] Miller,G.K., Naeve,G.S., Gaffar,S.A., Epstein,A.L. (1993) Immunologic and biochemical analysis of TNT-1 and TNT-2 monoclonal antibody binding to histones, *Hybridoma* 12, 689-698.
- [20] Bloemen,P.G., Henricks,P.A., van Bloois,L., van den Tweel,M.C.,Bloem,A.C., Nijkamp,F.P., Croomelin,D.J., Storm,G. (1995) Adhesion molecules: a new strategy for immunoliposome-mediated drug delivery, *FEBS Lett.* 357, 140-144.
- [21] Khaw,B.A., Torchilin,V.P., Vural,I., Narula,J. (1995) Plug and seal: prevention of hypoxic cardiocyte death by sealing membrane lesions with anitmyosin-liposomes, *Nat. Med.* 1, 1195-1198.
- [22] Scherphof,G., Roerdink,F., Waite,M., Parks,J. (1978) Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interactions with high density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 542, 296-303.
- [23] Alving,C.R., Richards,R.L. (1983) Immunologic aspects of liposomes, in: M.J. Ostro (Ed.), *Liposomes*, Marcel Dekker, New York, pp. 209.
- [24] Bonte,F., Hsu,M.J., Papp,A., Wu,K., regen,S.L., Juliano,R.L. (1987) Interactions of polymerizable phosphatidylcholine vesicles with blood components: relevance to biocompatibility, *Biochim. Biophys. Acta* 900, 1-9.
- [25] Senior,J., Gregoriadis,G. (1984) Methodology in assessing liposomal stability in the presence of blood, clearance from the circulation of injected animals, and uptake by tissues, in: G. Gregoriadis (Ed.), *Liposome technology*, Vol.3, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 263-282.
- [26] Kirby,C., Clarke,J., Gregoriadis,G. (1980) Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 186, 591-597.
- [27] Allen,T.M., Ryan,J.L., Papahadjopoulos,D. (1985) Gangliosides reduce leakage of aqueous-space markers from liposomes in the presence of human plasma, *Biochim. Biophys. Acta* 818, 205-210.

- [28] Huang,K.J., Luke,K.F.S., Baumier,P.L. (1980) Hepatic uptake and degradation of unilamellar shingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4030-4034.
- [29] Aragnol,D., Leserman,L.D. (1986) Immune clearance of liposomes inhibited by an anti-Fc receptor antibody in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2699-2703.
- [30] Patel,K.R., Li,M.P., Baldeschweiler,J.D. (1983) Suppression of liver uptake of liposomes by dextran-sulfate 500, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6518-6522.
- [31] Allen,T.M., Chonn,A. (1987) Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system, *FEBS Lett.* 223, 42-46.
- [32] Blume,G., Cevc,G. (1990) Liposomes for the sustained drug release, *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 91-97.
- [33] Maruyama,K., Yuda,T., Okamoto,A., Ishikura,C., Kojima,S., Iwatsura,M. (1991) Effect of molecular weight in amphipathic poly (ethyleneglycol) on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1620-1622.
- [34] Allen,T.M., Hansen,C., Martin,F., Redemann,C., Yang-Young,A. (1991) Liposomes containing synthetic derivatives of poly (ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1066, 29-36.
- [35] Klibanov,A.L., Maruyama,K., Beckerleg,A.M., Torchilin,V.P., Huang,L. (1991) Activity of amphipathic poly (ethyleneglycol) 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, 142-148.
- [36] Kenworthy,A.K., Simon,S.A., McIntosh,T.J. (1995) Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly (ethyleneglycol), *Biophys. J.* 68, 1921-1936.
- [37] Needham,D., McIntosh,T.J., Lasic,D.D. (1992) Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1108, 40-48.
- [38] Woodle,M.C., Newman,M.S., Cohen,J.A. (1994) Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties, *J. Drug Targeting* 2, 397-403.
- [39] Dijkstra,J., van Galen,W.J.M., Scherphof,G.L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 813, 287-297.
- [40] Debs,R.J., Heath,T.D., Papahadjopoulos,D. (1987) Targeting of anti-Thy 1.1 monoclonal antibody conjugated liposomes in Thy 1.1 mice after intravenous administration, *Biochim. Biophys. Acta* 901, 183-190.
- [41] Leserman,L.D., Machy,P., Devaux,C., Barbet,J. (1983) Antibody-bearing liposomes: targeting in vivo, *Biol. Cell* 47, 111-115.
- [42] Koning,G.A. (2000) Artikel in Vorbereitung für *Biochim. Biophys. Acta*.

- [43] Allen, T.M., Brandeis, E., Hansen, C.B., Kao, Y., Zalipsky, S. (1995) A new strategy of attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1237, 99-108.
- [44] Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S. (1995) Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipatic poly (ethyleneglycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies, *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 74-80.
- [45] Zalipsky, S. (1993) Synthesis of endgroup functionalized poly (ethyleneglycol)-lipid conjugates for preparation of polymer-grafted liposomes, *Bioconj. Chem.* 4, 296-299.
- [46] Chua, M.M., Fan, S.T., Karush, F. (1984) Attachment of Immunglobulin to liposomal membrane via protein carbohydrate, *Biochim. Biophys. Acta* 800, 291-300.
- [47] Courtenay-Luck, N.S., Epenetos, A.A., Moore, R., Larche, M., Pecatasides, D., Ritter, M.A. (1986) Development of primary and secondary immune response of mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasm, *Cancer Res.* 46, 6489-6493.
- [48] Park, J.W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L.Y., Keller, G.A., Wirth, C., Shalaby, R. (1995) Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1327-1331.
- [49] Dingermann, T. (1999) Monoklonale Antikörper –Das Immunsystem so gezielt wie möglich angreifen, *DAZ* 42., 65-66.
- [50] Baca, M., Presta, G.L., O'Connor, S.J., Wells, J. (1997) Antibody humanization using monovalent phage displays, *J. Biol. Chem.* 272, 10678-10684.
- [51] Santos, A.D., Padlan, E.A. (1998) Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnostics, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 60, 169-194.
- [52] Wright, S., Huang, L. (1989) Antibody-targeted liposomes as drug delivery vehicles, *Advanced Drug Delivery Reviews* 3, 379-390.
- [53] Herman, E.H., Rahman, A., Ferrans, V.J., Vick, J.A., Schein, P.S. (1983) Prevention of chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles in liposomal encapsulation, *Cancer Res.* 43, 5427-5432.
- [54] Sullivan, S., Connor, J., Huang, L. (1986) Immunoliposomes. Preparations, properties and applications, *Medic. Res. Rev.* 6, 171-195.
- [55] Kirpotin, W., Park, J.W., Hong, K., Keller, G., Benz, C.C., Papahadjopoulos, D. (1996) Binding and endocytosis of sterically stabilized anti HER-2 immunoliposomes by human breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3186-3190.
- [56] Mastrobattista, E., Storm, G., van bloois, L., Reszka, R., Bloemen, P.G.M., Crommelin, D.J.A., Henricks, P.A.J. (1999) Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithel cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1419, 353-363.

- [57] Leserman, L.D., Barbet, J., Kourilsky, F., Weinstein, J.N. (1980) Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A, *Nature* 288, 602-604.
- [58] Urdal, D.L., Hakomori, S. (1980) Tumor-associated Ganglio-N-triosylceramide: target for antibody-dependent, avidin-mediated drug killing of tumor cells, *J. Biol. Chem.* 255, 10509-10515.
- [59] Agrawal, A.K., Allen, T.M. (1992) Attachment of antibodies to pegylated liposomes by the biotin-avidin-method, *Biophys. J.* 61, 1493-1496.
- [60] Martin, F.J., Heath, T.D., New, R.R. (1990) Covalent attachment of proteins to liposomes, in: *Liposomes-a practical approach* IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- [61] Martin, F.J., Papahadjopoulos, D. (1982) Irreversible coupling of Immunoglobulin fragments to preformed vesicles, *J. Biol. Chem.* 257, 286-288.
- [62] Hansen, C.B., Kao, G.Y., Moase, E.H., Zalipsky, S., Allen, T.M. (1995) Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures, *Biochim. Biophys. Acta* 1239, 133-144.
- [63] Krieger, M., Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor related protein (LRP), *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601-637.
- [64] Weissig, V. (1991) Methoden zur Darstellung funktionalisierter Liposomen mit Adjuvaneffekt, *Habilitationschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [65] Bogdanov, A.A., Klibanov, A.L., Torchilin, V.P. (1988) Protein immobilization on the surface of liposomes via carbodiimide activation in the presence of N-hydroxysulfosuccinimide, *FEBS Lett.* 231, 381-384.
- [66] Ezpeleta, F.J., Irache, J.M., Stainmese, S., Chabenat, C., Gueguen, J., Orecchioni, A.M. (1996) Preparation of lectin-vicilin nanoparticles conjugates using the carbodiimid coupling technique, *Int. J. Pharm.* 142, 227-233.
- [67] Uster, P.S., Allen, T.M., Daniel, P.E., Mendez, C.Y., Newman, M.S., Zhu, G.Z. (1996) Insertion of poly (ethyleneglycol) derivatized phospholipids into preformed liposomes results in prolonged circulation time, *FEBS Lett.* 386, 243-246.
- [68] Suzuki, S., Watanabe, S., Masuko, T., Hasimoto, Y. (1995) Preparation of long circulating liposomes containing adriamycin by a novel method to coat immunoliposomes with poly (ethyleneglycol), *Biochim. Biophys. Acta* 1245, 9-16.
- [69] Maruyama, K., Takizawa, T., Takahashi, N., Tagawa, T., Nagaike, K., Iwatsura, M. (1996) Factors influencing longevity and target binding of PEG-immunoliposomes conjugated antibodies at PEG-terminus, *J. Liposome Res.* 6, 206-207.
- [70] Machy, P., Barbet, P., Leserman, L.D. (1982) Differential endocytosis of T and L lymphocyte surface molecules evaluated with antibody-bearing fluorescent liposomes containing methotrexate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 226-228.

- [71] Sendra,A., Pagano,R.E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2244.
- [72] Ho,R.J.Y., Rouse,B.T., Huang,L. (1986) Target-sensitive immunoliposomes; preparation and characterization. *Biochemistry* 25 , 5500-5506.
- [73] Ho,R.J.Y., Rouse,B.T., Huang,L. (1987) Target-sensitive immunoliposomes as an efficient drug carrier for antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 262, 13973-13978.
- [74] Pinnaduwege,P., Huang,L. (1992) Stable target-sensitive immunoliposomes. *Biochemistry* 31, 2850-2855.
- [75] Earl,R.T., Billett,E.E., Hunneyball,I.M., Mayer,R.J. (1987) Sendai viral HN and F glycoproteins as probes of plasma-membrane protein catabolism in HTC cells: Studies with fusogenic reconstituted Sendai viral envelopes, *Biochem. J.* 241, 801-808.
- [76] Alberts,B. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*, 3.Auflage, Weinheim: VCH, 729-739.
- [77] Mc Intyre,J.C., Sleight,R.G. (1991) Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry, *Biochemistry* 30, 11819-11827.
- [78] Wasmuth,C.R., Edwards,C., Hutcherson,R. (1964) *J. Phys. Chem.* 68, 423-425.
- [79] Ishiwata,H., Sato,S.B., Kobayashi,S., Oku,M. (1998) Poly (ethylene glycol) derivative of cholesterol reduces binding steps of liposome uptake by murine macrophage-like cell line J774 and human hepatoma cell line Hep G2, *Chem. Pharm. Bull.* 46 (12), 1907-1913.
- [80] Trudel,P. Gicquaud,C. (1985) Endocytosis of liposomes by *Entamoeba histolytica* and transport of encapsulated molecules toward the cytoplasm, *Eur. J. Biol.* 38, 27-33.
- [81] Vargas,J.L., Knecht,E., Grisolia,S. (1990) Endocytosis of liposomes containing lysosomal proteins increases intracellular protein degradation in growing L-132 cells, *Eur. J. Biochem.* 188, 99-109.
- [82] Machy,P., Truneh,A., Gennaro,D. (1985) Endocytosis and de novo expression of major histocompatibility complex encoded class I molecules: kinetic and ultrastructural studies, *Eur. J. Cell. Biol.* 45, 123-136.
- [83] Derksen,J.T., Morselt H.W., Kalicharan,D. (1987) Interactions of immunoglobulin coupled liposomes with rat liver macrophages in vitro, *Exp. Cell. Res.* 168, 105-115.
- [84] Singh,M., Glose,T., Faulkner,G., Kralovec,J. (1989) Targeting of methotrexate-containing liposomes with monoclonal antibody against human renal cancer, *Cancer Res.* 49, 3976-3984.
- [85] Dijkstra,J., van Galen,M., Regts,D., Scherphof,G.L. (1985) Uptake and processing of liposomal phospholipids by Kupffer cells in vitro, *Eur. J. Biochem.* 148, 391-397.
- [86] Takigawa,M., Danno,K., Furukawa,L. (1987) Effects of colchicine and cytochalasin B on distribution of concanavalin A receptors in isolated and cultured guinea pig epidermal cells, *Arch. Dermatol. Res.* 279, 392-397.

- [87] Finbloom,D.S., Martin,J.,Gordon,R.K. (1987) Endocytosis of particulate and soluble IgG immune complexes: differential effects of cytoskeletal modulating agents, *Clin .Exp. Immunol.* 67, 205-210.
- [88] New,R.R.C., Black,C.D.V., Parker,R.J., Puri,A., Scherphof,G.L. (1990) Liposomes in biological systems, in: *Liposomes-a practical approach* IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- [89] Kamps,J.A.A.M., Morselt,H.W.M., Swart,P.J., Meijer,D.K.F., Scherphof,G.L. (1997) Massive targeting of Liposomes, modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11681-11685.
- [90] Pan,L.F., Kreisler,R.A., Shi,Y.D. (1999) Expression of endothelial cell IgG Fc receptors and markers on various cultures, *Chinese Medical Journal* 112 (2), 157-161.
- [91] Helitanu,C., Simionescu,M., Simionescu,N. (1982) Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate characteristic high affinity binding sites in venules, *J. Cell. Biol.* 93, 357-364
- [92] Martinez,J., Sveinbjornsson,B., Vidal-Vanaclocha,F., Smedsrod,B. (1997) Inflammatory agents modulate the endocytotic activity of liver sinusoidal cells, in: *Cells of hepatic sinusoids* 6.
- [93] Schmittler,H.J., Wilke,A., Gress,T. (1990) Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium, *J. Physiol.* 431, 379-401.
- [94] Brett,J., Gerlach,H., Nawroth,P. (1989) Tumornecrosis factor increased permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins, *J. Exp. Med.* 169, 1977-1991.
- [95] Takahashi,K., Suzuki,K., Ichiki,Y. (1996) Transcytosis of lipid microspheres by human endothelial cells, *Pharmacology* 53, 37-47.
- [96] Defazio,G., Ribatti,D., Nico,B. (1997) Endocytosis of horseradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: an ultrastructural and morphometric study, *Brain Research Bulletin* 43, 467-472.
- [97] Rosenecker,J., Zhang,W., Hong,K. (1996) Increased liposome extravasation in solid tissue: Effect of Substance P, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7236-7241.
- [98] Zhang,W., Guo,L., Nadel,J.A. (1993) Inhibition of tracheal vascular extravasation by liposome-encapsulated albuterol in rats, *Pharm. Res.* 15, 455-460.
- [99] Peters,A.M. (1998) The use of nuclear medicine in infections, *Brit. J. Radiology* 71, 252-261.
- [100] Cansell,M., Parisel, C. (1999) Liposomes coated with chemically modified dextran interact with human endothelial cells, *J. Biomed. Res.* 44 , 140-148.
- [101] Cansell,M., Gouygou,J.P., Jozefonvicz,J. Letourneur,D. (1997) Lipid composition of cultured endothelial cells in relation to their growth, *Lipids* 32, 39-44.

- [102] Epstein,F.H. (1997) Nuclear faktor κ B –a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, *N. Engl. J. Med.* 336, 1066-1071.
- [103] Murohara,T. et al. (1995) Cardioprotection by liposome-conjugated Sialyl-Lewis x-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 30, 965-974.
- [104] Klareskog,L., Rönnelid,J., Holm,G. (1995) Immunopathogenesis and immunotherapy in rheumatoid arthritis, *J. Intern. Med.* 238, 191-206.
- [105] Vora,D.K. (1997) Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins : separate effects of synthesis and surface expression, *Circ. Res.* 80, 810-818.
- [106] Morigi,M. (1998) Leukocyte-endothelial interactions is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion, *J. Clin. Invest.* 101, 1905-1915.
- [107] Biacone,L. (1996) Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo, *J. Exp. Med.* 183, 581-587.
- [108] Ohmoto,H. (1998) Studies on electin blockers 1 structure activity relationships of Sialyl Lewis x analogs, *J. Med. Chem.* 39, 1339-1343.
- [109] Norman,K.E., (1998) Sialyl Lewis x and sLex mimetic, CGP69669A, disrupt E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo, *Blood* 91, 475-483.
- [110] Wong,C.H. (1997) Small molecules as structural and functional mimics of sLex tetrasaccharide in selectin inhibition: A remarkable enhancement of inhibition by additional negative charge and for hydrophobic groups, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8152-8158.
- [111] Bendas,G. (1999) Selektine als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung, *Pharm. Ztg.* 46, 10-16.
- [112] Rekonen, O. (1997) Synthesis of new nanomolar saccharide inhibitors of lymphocyte adhesion: Different polyactosamine backbones present multiple Sialyl Lewis x determinants to L-selectin in high affinity mode, *Glycobiology* 7, 453-461.
- [113] Elangham,C.S., Qualls,C.W., Dahlgren,J.R.a. R.R., Cell adhesion molecules-Update, *Vet. Pathol.* 34, 61-73.
- [114] Stahn,R., Schäfer,H., Kernchen,F., Schreiber, J. (1998) Multivalent sLex ligands of definite structures as inhibitors of E-selectin mediated cell adhesion, *Glycobiology* 8, 311-319.
- [115] Geisslinger,G. (2000) *Pharm. Ztg.* 5 , 26–30.
- [116] Corkill,M.M. (1991) Gold treatment of rheumatoid rthritis decreases synovial expression of the endothelial leukocyte adhesion receptor ELAM-1, *J. Rheumatol.* 18, 1435-1460.

- [117] Fritz,J., Anselmetti,D., Jarchow,J., Fernandez-Busquets,X. (1997) Probing single biomolecules with atomic force microscopy, *J. Struct. Biol.* 119, 165-171.
- [118] Manger,B. (1999) Therapie der rheumtoiden Arthritis mit Zytokinantagonisten, *Z. Ärztl. Fortbild. Quallsich* 93, 101-104.
- [119] Weinblatt,M.E. et al. (1999) A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexat, , *N. Engl. J. Med.* 340, 253-259.
- [120] Peterson,G.L., (1977) *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
- [121] Schmidt,R. (1997) Darstellung und Charakterisierung von Immunliposomen zur spezifischen Anreicherung an Adhäsionsrezeptoren, *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [122] Ames,B.N., Dubin,D.T. (1960) The role of polyamines in the neutralization of Bacteriophage deoxyribonucleic acid, *J.Biol.Chem.* 235, 769-775.
- [123] Wyszynska,K., Przybojewska,B., Spiechowicz,E. Chiwalkowska-Liro, Dziubaltowska,E. Rydzynski,K. (1994) Cyanuric chloride has no genotoxic and mutagenic properties in bacteria and bone marrow cells, *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 7, 281-289.
- [124] Suzuki,T., Kanbara,N., Tomono,T. (1984) Physicochemical and biological properties of poly (ethyleneglycol)-coupled immunoglobulin G, *Biochim. Biophys. Acta* 788, 248-255.
- [125] Gombolz,W.R., Wang,G.H., Horbett,T.A. (1991) Protein adsorption to poly (ethylene oxide) surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 1547-1562.
- [126] Krause,A. (1996) Präparation, Charakterisierung und Anwendung lektinfunktionalisierter Liposomen als Zellmodelle, *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [127] Allen,T.M., Hansen,C., Rutledge,J. (1989) Liposomes with prolonged circulation times: factors effecting uptake by reticuloendothelial and other tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 981, 27-35.
- [128] Maruyama,K., Yuda,T., Okamoto,A., Ishikura,C., Kojima,S. Iwatsura,M (1991) Effect of molecular weight in amphipatic poly (ethyleneglycol) on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1620-1622.
- [129] Klibanov,A.L., Maruyama,K., Beckerleg,A.M., Torchilin,V.P., Huang,L. (1991) Activity of amphipatic poly (ethyleneglycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the size and is unfavorable for immunoliposome binding to target, *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 142-148.
- [130] Maruyama,K.M., Takahashi,N., Tagawa,T., Nagaike,K., Iwatsuru, M. (1997) Immunoliposomes bearing poly (ethyleneglycol)-coupled Fab´ fragments show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo, *FEBS Lett.* 413, 177-180.

- [131] Zalipsky,S., Brandeis,E., Newman,M.S., Woole,M.C. (1994) Long circulating cationic liposomes containing Amino-PEG-Phosphatidylethanolamine, *FEBS Lett.* 353, 71-74.
- [132] Maruyama,K. Takazawa,T., Takahashi,N., Tagawa,T., Nagaike,K., Iwatsuru,M. (1997) Targeting efficiency of PEG-immunoliposome-conjugated antibodies at PEG-terminals, *Advanced Drug Delivery Reviews* 24, 235-242.
- [133] Spragg,D.D., Alford, D.R., Greferath,R., Larsen,C.E., Lee,K.D., Gurtner,G.C. (1997) Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: A strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8795-8800.
- [134] Straubinger,R.M., Papahadjopoulos,D., Hong,K. (1990) Endocytosis and intracellular fate of liposomes using Pyranine as a probe, *Biochemistry* 29, 4929-4939.
- [135] Daleke,D.L., Hong,K., Papahadjopoulos,D. (1990) Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes by a new fluorescence assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1024, 352-366.
- [136] Lee,K.D., Hong,K., Papahadjopoulos,D. (1992) Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density, *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 185-197.
- [137] Tanaka,Y., Schroit,A.J. (1985) In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes, *J. Biol. Chem.* 260, 392-397.
- [138] Higashi,N., Sumamoto,J. (1995) Endocytosis of poly (ethyleneglycol)-modified liposome by human lymphoblastoid cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 386-392.
- [139] Tedgui,A. (1996) Endothelial permeability under physiological and pathological conditions, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54, 27-29.
- [140] Defazio,G., Ribatti,D., Nico,B., Ricchitui,F. (1997) Endocytosis of horseradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: an ultrastructural and morphometric study, *Brain Research Bulletin* 43, 467-472.
- [141] Takahashi,K., Suzuki,K., Ichiki,Y. (1996) Transcytosis of lipid micropheres by human endothelial cells, *Pharmacology* 53, 37-47.
- [142] Kamps,J.A.A.M., Morselt,H.W.M., Scherphof,G.L. (1999) Uptake of liposomes containing phosphatidylserine by liver cells in vivo and by sinusoidal liver cells in primary culture: in vivo-in vitro differences, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 256, 57-62.
- [143] Dini,L., Falasca,L.,Ruzzittu,M.T. (1998) Interactions between isolated and purified liver cells and small unilamellar liposomes, *Liver*, 229-238.
- [144] He,X.Y., Melrose,J., Mallowney,A., Vasquez,M., Queen,C., Vexler,V., Klingbeil,C., Co,M.S., Berg,E.L. (1998) Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-Selectin, *J. Immunol.* 160, 1029-1035.
- [145] Simionescu,M., Simionescu,N. (1991) Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis, *Cell. Biol. Rev.* 25, 1-80.

- [146] Urdal,D.,L., Hakomori, S. (1980) Tumor-associated Ganglio-N-triosylceramide target for antibody-dependent , avidin-mediated drug killing of tumor cells, *J. Biol. Chem.* 255, 10509-10515.
- [147] Loughrey,H., Bally,M.B., Cullis,P.R. (1987) A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 901, 157-160.
- [148] Harding,J.A., Engbers,C.M., Newman,M.S., Goldstein,N.J., Zalipsky,S. (1997) Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly (ethyleneglycol)- grafted immunoliposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1327, 181-192.
- [149] Schmidt-Erfurth,U., Hasan,T., Schomacker,K., Flotte,T., Birngruber,R. (1995) In vivo uptake of liposomal benzoporphyrin derivative and photothrombosis in experimental corneals neovascularization, *Laser Surg. Med.* 17, 178-188.
- [150] Süß,W., Neumerkel,O., Häußler,F. (1999) Raster-Kraft-Mikroskopie, *DAZ* 48, 45-47.

Lebenslauf

geboren: 07.03.1973
in Wermsdorf

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979 – 1989 Polytechnische Oberschule Wermsdorf

1989 – 1991 Erweiterte Oberschule Oschatz, Erwerb des Abiturs

01.10.1991 – 30.09.1995 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle, Ablegen des 1. und 2. Abschnittes der Pharmazeutischen Prüfung

01.10.1995 – 31.03.1996 Tätigkeit als Diplomand im Institut für Pharmazeutische Chemie

01.04.1996 – 30.09.1996 Praktikum in der Markt-Apotheke Mügeln

Oktober 1996 Ablegen des 3. Abschnittes der Pharmazeutischen Prüfung, Erlangung der Approbation

01.11.1996 – 31.12.1999 Tätigkeit als Doktorand im Institut für Pharmazeutische Chemie

Erklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle, im Juni 2000

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. habil. P. Nuhn für die Überlassung der interessanten Thematik sowie die gewährten Unterstützungen und Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas.

Zu großem Dank bin ich Herrn PD Dr. habil. U. Rothe für die Möglichkeit der Nutzung der Zell-Labore seiner Arbeitsgruppe sowie sein großes Interesse am Gelingen der Arbeit und für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft verpflichtet.

Bei Frau U. Goder bedanke ich mich ganz herzlich für ihre freundliche und kompetente Hilfe bei vielen praktischen Arbeiten. Herrn M. Klapperstück von der Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Vermessung von Zellansätzen am Durchflußzytometer .

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dipl. Pharm. J. Vogel für seine stets vorhandene große Hilfsbereitschaft und die umfangreiche Unterstützung bei den Arbeiten am Fluoreszenzmikroskop.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Bendas für die umfassende Betreuung und sein Verständnis während der gesamten Promotionszeit, für die tägliche kollegiale Zusammenarbeit und die unzähligen Anregungen und Hilfestellungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Frau R. Müller und Dominik danke ich besonders für ihr Verständnis und die moralische Unterstützung während meiner Doktorandenzeit.