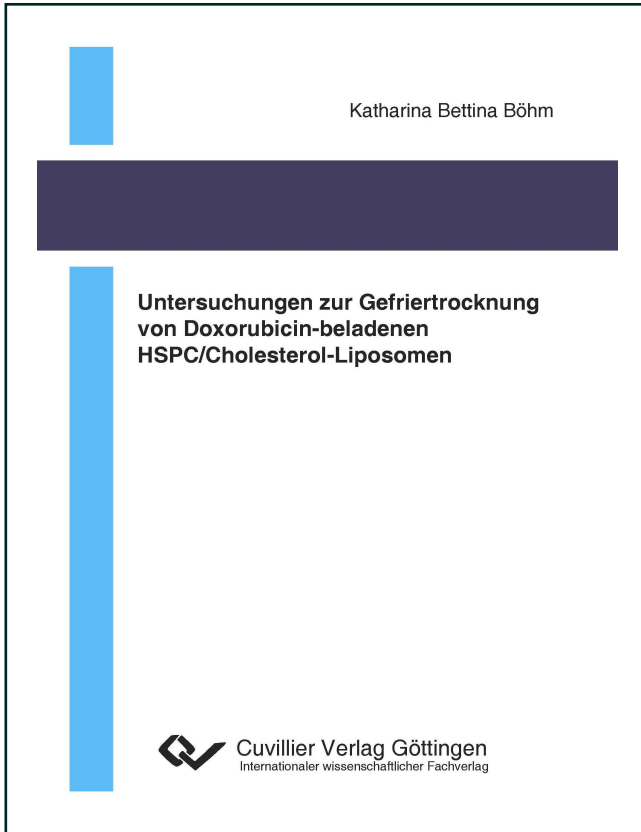




Katharina Bettina Böhm (Autor)

## **Untersuchungen zur Gefriertrocknung von Doxorubicin-beladenen HSPC/Cholesterol-Liposomen**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6159>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# 1. Einleitung

## 1.1. Liposomen

Liposomen gehören zu den Nanopartikulären Systemen (NPS) bzw. *Nanocarriern*. Sie setzen sich zum größten Teil aus Phospholipiden zusammen, die sich in Lipiddoppelschichten anordnen und einen wässrigen Innenraum umschließen. Beim Vorliegen von einer unilamellaren Schicht, werden zwischen SUV (*small unilamellar vesicle*), die im Allgemeinen eine Größe von  $< 50$  nm aufweisen und LUV (*large unilamellar vesicle*) mit einer Größe von 80-200 nm unterschieden. Zuletztgenannte werden häufig zum Transport von Wirkstoffen eingesetzt. Daneben gibt es noch die Möglichkeit, dass sich mehrere Lipiddoppelschichten übereinander anordnen. Diese Liposomen werden dann als OLV (*oligolamellar vesicle*) oder MLV (*multilamellar vesicle*) bezeichnet. Unter Umständen können sich schließlich noch multivesikuläre Systeme (MVV) (*multivesicular vesicle*) ausbilden, in denen sich meist mehrere kleinere Liposomen in einem größeren Liposomen befinden (Bauer et al. 2012). Durch die untoxischen Eigenschaften der Phospholipide und deren hohen Reinheit im Herstellungsprozess können die Lipide vielseitig eingesetzt werden (Mäder&Weidenauer 2010).

Der Aufbau der Phospholipide besteht aus einem Triglycerid, an das ein Phosphorsäurerest und zwei Fettsäureketten verestert sind. Der Phosphorsäurerest ist zusätzlich mit einer Base verbunden (Bayer&Walter 1998). Lipide können in zwei verschiedenen Phasen vorliegen: in einer festen Gelphase ( $L_{\beta}$ -Phase) oder in einer flüssigen-kristallinen Form ( $L_{\alpha}$ -Phase). Der Übergang erfolgt temperaturabhängig bei der Phasenübergangstemperatur. Beim Vorliegen der Phasenübergangstemperatur besteht ein Gleichgewicht aus beiden Phasen (Lee 1977).

Das Problem der Phospholipide liegt jedoch in deren Anfälligkeit gegenüber Oxidation und Hydrolyse. Bei der Oxidation kommt es zur Ausbildung freier Radikale und betrifft häufig Lipide mit ungesättigten Fettsäureketten. Im Gegenteil dazu erfolgt die Hydrolyse am Glycerophospholipid, wodurch es zur Bildung von Lysophospholipiden kommt (Samuni et al. 2000).



Um Phospholipide zu schützen gibt es mehrere Möglichkeiten, wie z.B. die Verwendung von Antioxidantien, die Lagerung der Lipide bei niedrigen Temperaturen ohne Tageslicht (Samuni et al. 2000). Eine weitere Option ist die Entfernung von Wasser. Das kann durch die Lyophilisation geschehen (Abdelwahed et al. 2006), die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzt wurde und auf die später genauer eingegangen werden soll.

Die Anwendungsgebiete von Liposomen sind ausgesprochen unterschiedlich. Durch z.B. die Auswahl der Lipide können Liposomen sogar bereits ohne Wirkstoff in der Therapie eingesetzt werden. Außerdem ist es Liposomen möglich große Volumina hydrophiler Substanzen aufzunehmen. Aufgrund des besonderen Aufbaus der Liposomen können sowohl hydrophile, lipophile als auch amphiphile Wirkstoffe eingeschlossen werden. (Mäder&Weidenauer 2010). Durch die Einlagerung soll die Bioverfügbarkeit erhöht und die toxischen Nebenwirkungen reduziert werden.

Für diese Arbeit werden dabei Doxorubicin und Idarubicin als Wirkstoffe gewählt. Liposomales Doxorubicin ist dabei als z.B. Caelyx<sup>®</sup> zur praktischen Anwendung bereits auf dem Markt. Das Problem dieser DXR-beladenen Liposomen liegt jedoch meist in einer geringen Lagerstabilität, die in dieser Arbeit versucht wird zu verbessern.

Auch die Möglichkeit die Spezifität über ein aktives Targeting (siehe 1.5.2) von Liposomen zu steigern, wird in einem weiteren Abschnitt näher eingegangen.

## 1.2. Liposomale Membranbestandteile

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Lipide und Lipidkomponenten eingesetzt. Dabei soll hier auf die beiden am häufigsten eingesetzten liposomalen Membranbestandteilen näher eingegangen werden: hydriertes Sojaphosphatidylcholin (HSPC) und Cholesterol. Daneben werden zusätzlich die Besonderheiten von CHEMS näher beschrieben.



### 1.2.1. HSPC (hydriertes Sojaphosphatidylcholin)

Für die Herstellung der Liposomen zur Gefriertrocknung wird HSPC (Abbildung 1-1) als Lipidkomponente eingesetzt. Das Grundgerüst dieses Lipids ist das Phosphatidylcholin, das in diesem Fall aus Soja gewonnen wird.

Bei HSPC liegt die hydrierte Form des Sojaphosphatidylcholin vor. Das hat zur Folge, dass die Gelphase ( $L_{\beta}$ -Phase) bei Temperaturen bis zu 50 °C vorliegt (Mäder&Weidenauer 2010). Nach Literaturangaben liegt die Phasenübergangstemperatur von HSPC bei etwa 55°C (Kawahara et al. 2003, Pradhan et al. 2008, Shimizu et al. 2010).

Hydriertes Sojaphosphatidylcholine wird auch als Lipidbestandteil bei Caelyx<sup>®</sup> (siehe 1.4) und AmBisome<sup>®</sup> (liposomales Antibiotikum) eingesetzt (Rote Liste 2012).

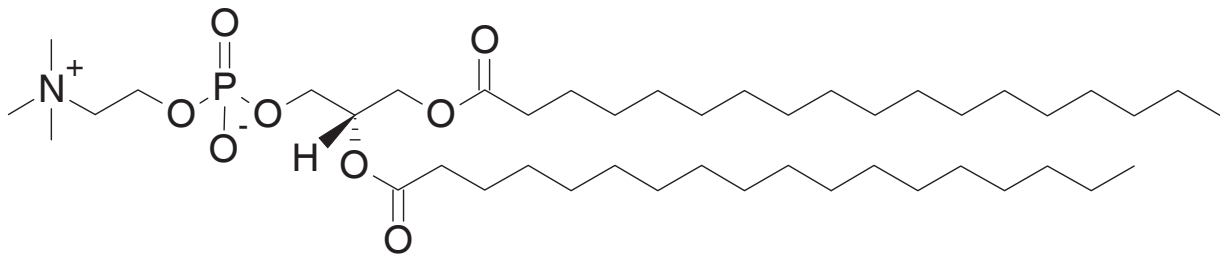


Abbildung 1-1 Hydriertes Sojaphosphatidylcholin (HSPC)

### 1.2.2. Cholesterol

Cholesterol (Abbildung 1-2) kann als weiterer Bestandteil der liposomalen Formulierung zugefügt werden. Für die Lyophilisationsversuche in dieser Arbeit wird es der liposomalen Präparationen zugefügt.

Wie bei Semple et al. 1996 zusammengefasst, kann Cholesterol unter anderem die Packungsdichte der Phospholipiddoppelschicht erhöhen und die Durchlässigkeit für eingeschlossene Substanzen verringern (Semple et al. 1996). Daneben wird auch die Phasenübergangstemperatur der Lipide gesenkt. Die maximale Zugabe von Cholesterol wird auf 50 mol % geschätzt (Ladbrook et al. 1968).

Bei der Einlagerung von Cholesterol in die Lipidmembran sortieren sich die Hydroxylgruppe des Cholesterols zwischen die Carbonylgruppen der Lipide und das Sterolgerüst fügt sich in die Fettsäure-Acylketten ein (Liang et al. 2004).



Da sich bei der Herstellung von IDA-beladenen Liposomen gezeigt hat, dass Cholesterol zur Reduktion der Einschlusseffizienz von IDA führen kann, muss der Einsatz von Cholesterol präparationsabhängig abgewägt werden, (Dos Santos et al. 2002).

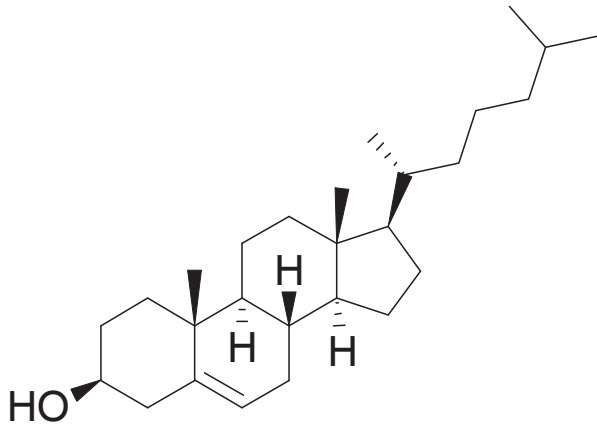


Abbildung 1-2 Cholesterol

### 1.2.3. CHEMS (Cholesterolhemisuccinat)

Cholesterolhemisuccinat (CHEMS) ist eine pH-abhängige Substanz, deren Struktur in Abbildung 1-3 gezeigt wird. Ausgehend von Cholesterol, kann durch eine Veresterung an der 3-Hydroxylgruppe, CHEMS synthetisiert werden (Ding et al. 2005). Ähnlich wie Cholesterol kann sich auch CHEMS in die liposomale Membran einlagern und durch dessen pH-Abhängigkeit zu pH-sensitiven Liposomen führen. Es ist davon auszugehen, dass die gesamte Succinatstruktur sich dabei in zwischen die polaren Lipidkopfgruppen einordnet und die Einlagerung des Sterolgerüst mit der von Cholesterol übereinstimmt (Carmo et al. 2008).

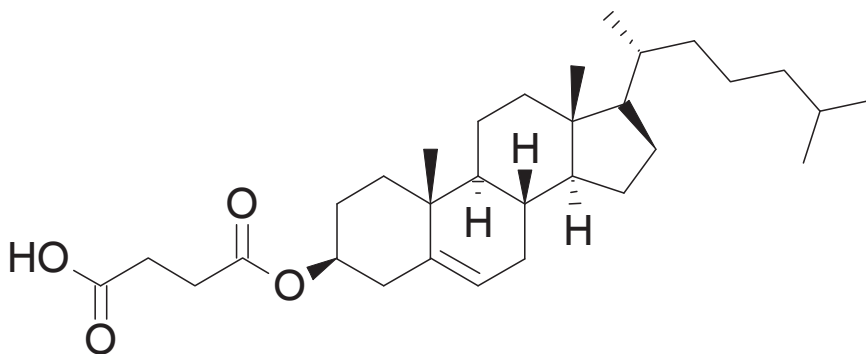


Abbildung 1-3 Cholesterolhemisuccinat



Wie bereits oben erwähnt zeigt CHEMS eine pH-Abhängigkeit. So liegt die Substanz in neutraler Umgebung negativ geladen vor. Beim Auftreten eines sauren pH-Wertes von  $< 5,5$  weist CHEMS keine Ladung mehr auf. Diese Ladungsänderung ist mit einer Veränderung seines Aufbaus verbunden. Die Folgen sind, dass die Stabilität der liposomalen Membran abnimmt und folglich eingeschlossene Wirkstoffe oder andere Substanzen verstärkt freigesetzt werden können (Mäder&Weidenauer 2010). Durch den meist niedrigen pH-Wert in Tumorgewebe kann dieser Effekt besonders bei Tumorbehandlungen von Bedeutung sein (Xu et al. 2008).

Zusätzlich ist bekannt, dass wenn Tumorzellen mit CHEMS vorbehandelt werden, eine Verbesserung der immunogenen Antwort auftreten kann und der Substanz konnte bisher keine Toxizität nachgewiesen werden (Ding et al. 2005).

Der Einfluss von CHEMS wird daher auch für Untersuchungen in diese Arbeit getestet.

### 1.3. Eingesetzte Zytostatika

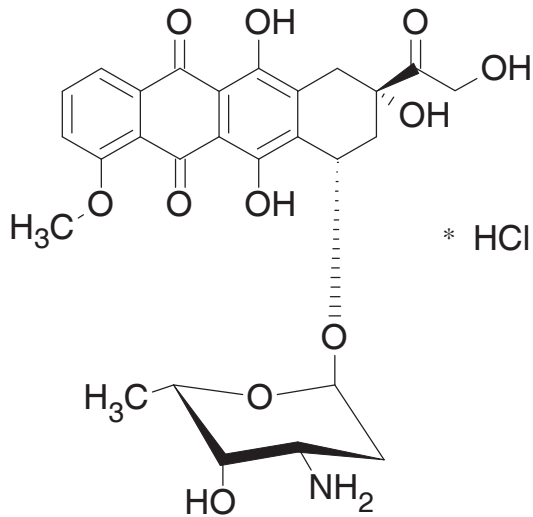
Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei zytotoxische Substanzen (Doxorubicin, Idarubicin) eingesetzt. DXR wird, liposomal verkapselt (z.B. Vanbommel&Crommelin 1984, Bally et al. 1990, van Winden&Crommelin 1997, Safra et al. 2000, Fritze et al. 2006) oder als freie Substanz (Bristow et al. 1981, Camaggi et al. 1988, Kogan et al. 2007) in vielen Forschungsbereichen heutzutage als Modellsubstanz oder für die antitumorale Therapie eingesetzt. IDA ist DXR strukturell betrachtet sehr ähnlich. So gibt es auch hier bereits einige Arbeitsgruppen, die IDA für den therapeutischen Einsatz testen (Eksborg et al. 1990, Dos Santos et al. 2002, Gubernator et al. 2010). Im Unterschied zu DXR ist IDA derzeit noch nicht liposomal verfügbar.

#### 1.3.1. Doxorubicin ( $C_{27}H_{29}NO_{11}$ )

DXR (Abbildung 1-4) gehört in die Gruppe der Anthrazykline und besteht chemisch betrachtet aus zwei Teilen: dem Chromophor Doxorubicinol ( $C_{21}H_{18}O_9$ ) und dem Aminozucker Daunosamin ( $C_6H_{13}NO_3$ ), die mittels Glykosidbindung miteinander verbunden sind. Doxorubicinol sorgt dabei für die rote Farbe von DXR



(Essex Pharma 2008). Das Chromophor ist jedoch pH-abhängig und zeigt bei pH 7 eine orange, bei pH 11 eine violette und bei pH 13 eine blaue Färbung an. Dieser Effekt basiert auf der Deprotonierung der Phenolgruppe von Doxorubicinol (Fiallo et al. 1999).



**Abbildung 1-4 Doxorubicinhydrochlorid**

Der genaue Wirkmechanismus der Anthrazykline ist bisher noch nicht ganz geklärt. Es gibt jedoch mehrere Theorien, wie z.B. die Interkalation der DNS, wodurch die Synthese von DNA; RNA und Proteine gehemmt wird. Weitere Theorien gehen von einer Radikalbildung aus, die zu DNA-Schäden führen kann, sowie, dass DXR zur Bindung und Alkylierung an die DNA oder zu Quervernetzungen der DNA führt (Kizek et al. 2012).

Der Einsatz von DXR erfolgt heutzutage bei zahlreichen soliden Tumoren wie z.B. Brustkrebs, aber auch zur Behandlung von Leukämien (Maudens et al. 2011).

Als Nebenwirkungen ist bereits seit 1977 bekannt, dass DXR als freier Wirkstoff bei kumulativer Gabe zur Kardiotoxizität führen kann (Guthrie&Gibson 1977). Obwohl auch hier die genaue Ursache der anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität nicht vollständig geklärt ist, wird angenommen, dass es eine Interaktion zwischen DXR und Eisenionen gibt. Dies führt zu einer Umwandlung von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$ , wodurch es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt, die wiederum DNA-Schäden und Apoptose induzieren. Durch das Fehlen antioxidativer Enzymen in den Herzmuskelzellen ist besonders das Herzgewebe für freie Radikale anfällig (Kizek et al. 2012). Um diese unerwünschte Nebenwirkung zu reduzieren, werden



heutzutage kumulative DXR-Dosen von 450-500 mg/ m<sup>2</sup> eingesetzt (Safra et al. 2000).

Wie bei allen Zytostatika treten auch unter der DXR-Therapie Nebenwirkungen auf. Dazu gehören vor allem Knochenmarksdepression, Übelkeit und Erbrechen, wie auch Entzündungen der (Mund-)Schleimhaut und Haarausfall (Essex Pharma 2008). Um die Nebenwirkungsrate zu senken, werden häufig liposomale DXR-Präparate hergestellt. Damit werden die Risiken der Kardiotoxizität, Haarausfall und die Knochenmarksdepression gesenkt, aber nicht vollständig verhindert. So gibt es auf dem Markt bereits zwei liposomale DXR-Präparate: Doxil<sup>®</sup> (in den USA) bzw. Caelyx<sup>®</sup> (außerhalb der USA) mit PEGylierten, liposomalen DXR und Myocet<sup>®</sup> wobei hier keine PEGylierung der Präparation vorliegt (Haley&Frenkel 2008). Daneben werden auch einige Produkte verkauft, die DXR als freien Wirkstoff enthalten (Rote Liste 2012). Da in dieser Arbeit die liposomale Zubereitung (mit und ohne PEGylierung) von Caelyx<sup>®</sup> verwendet wird, soll ein einem folgenden Abschnitt (siehe 1.4) auf dieses Präparat näher eingegangen werden.

### 1.3.2. Idarubicin (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>9</sub>)

Idarubicin (Abbildung 1-5) gehört zu der Gruppe der halb-synthetischen Anthrazylinerivaten. Wie bei DXR besteht IDA aus einem Aglykon, das mit einem Aminozucker verbunden ist. Im Unterschied zu DXR, kann IDA nicht nur intravenös appliziert, sondern auch oral angewendet werden (Maudens et al. 2011).

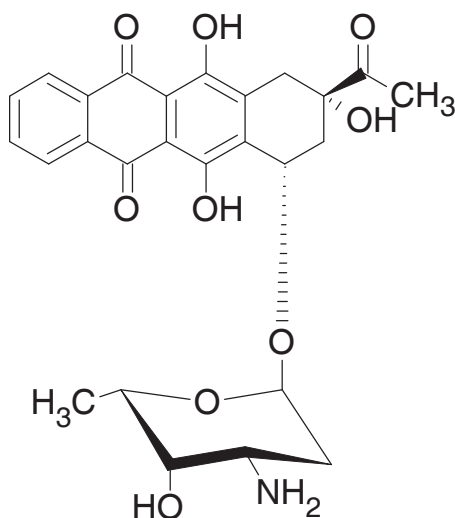


Abbildung 1-5 Idarubicin





Beim Vergleich des chemischen Aufbaus von DXR und IDA fällt auf, dass IDA durch das Fehlen der Methoxyfunktion an C4 einen hydrophoberen Charakter bekommt. Daraus resultiert auch eine ebenfalls höhere zytotoxische Aktivität. Im Vergleich mit Daunorubicin zeigt sich IDA 10-fach potenter (Dos Santos et al. 2005).

Der Wirkungsmechanismus von IDA liegt in der Inhibition von Topoisomerase II, wodurch als Folge Doppelstrangbrüche an der DNS entstehen (Binaschi et al. 1997). Wenn die Anzahl der DNS-Brüche zu sehr dabei ansteigt, dann sind Apoptose und damit das Absterben der Zelle die Folge (McClendon&Osheroff 2007).

Es zeigt sich dabei, dass IDA eine Substanz mit sehr hoher zytotoxischer Wirkung darstellt (Binaschi et al. 1997). Der nach der Applikation von IDA entstehende Metabolit Idarubicinol, zeigt im Gegensatz zu anderen Metaboliten ebenfalls hohe zytotoxische Wirkung. Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass IDA und Idarubicinol zu den gleichen Schäden an der DNA führen können (Kuffel et al. 1992). Bezüglich der Reduktion der Kardiotoxizität von IDA laufen, wie von Minotti et al. 2004 zusammengefasst, die Meinungen kontrovers, so dass weitere Studien auf diesem Gebiet sicherlich notwendig sind (Minotti et al. 2004).

Der therapeutische Einsatz von IDA liegt hauptsächlich in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (Willmore et al. 2002, Bogason et al. 2009), jedoch wird es auch bei weiteren Tumorbehandlungen wie z.B. Lymphadenom, Plasmozytom und Brustkrebs eingesetzt (Borchmann et al. 1997).

Bisher allerdings befindet sich nur eine sehr begrenzte Anzahl von IDA-Präparaten auf dem Markt. Interessant dabei ist, dass IDA bisher nur als freie Substanz, und nicht in liposomaler Form, therapeutisch zum Einsatz kommt. Lyophilisiertes IDA dagegen ist als Zavedos® erhältlich. Auch die orale Applikation (Zavedos® Oral 5 mg/- 10 mg/- 25 mg Hartkapseln) befindet sich auf dem Markt (Rote Liste 2012).

Im Unterschied zu liposomalem DXR, kann IDA in cholesterolfreien Liposomen besser eingeschlossen werden (Dos Santos et al. 2002). Dabei führen die Verwendung von PEG und der Einsatz eines iso-osmotischen Citratpuffers zu einer deutlichen Verlängerung der Bluthalbwertszeit (Dos Santos et al. 2005). Jedoch ist anzumerken, dass wie von Gubernator et al. 2010 beschrieben, Langzeituntersuchungen hinsichtlich Stabilität von cholesterolfreien Liposomen nicht präsent sind. Dagegen kann in der gleichen Publikation gezeigt werden, dass ein



EDTA-Ionengradient zur Verbesserung der Beladung mit IDA beiträgt. Bei Verwendung dieses IDA-EDTA Salzes kann sowohl bei Cholesterol-haltigen als auch Cholesterol-freien PEGylierten Liposomen eine Langzeitstabilität bei 4 °C, 25 °C und 37 °C mit nahezu keiner Freisetzung von IDA nachgewiesen werden (Gubernator et al. 2010).

## 1.4. CAELYX<sup>®</sup>

Caelyx<sup>®</sup> ist, wie in der wissenschaftlichen Produktinformation der Firma Essex Pharma beschrieben, „eine PEGylierte liposomale Formulierung von Doxorubicin-Hydrochlorid mit langer Zirkulationszeit“ (Essex Pharma 2008).

Der Einsatz von DXR in liposomaler Form führt neben einer gesteigerten antitumoralen Wirkung zu einer reduzierten Nebenwirkungsrate. Bezüglich der Therapie mit DXR ist hierbei v.a. die Reduktion der von dieser Substanzklasse ausgehenden Kardiotoxizität von Interesse. Dies kann z.B. durch die liposomale Verkapselung erreicht werden (Maruyama 2011).

Dieses Produkts besteht aus mehreren Bestandteilen. Für die Präparation der Liposomen werden HSPC (Abbildung 1-1) und Cholesterol (Abbildung 1-2) als Membranbestandteile eingesetzt. Die PEGylierung erfolgt mit MPEG-DSPE. Die Liposomen weisen einen Partikeldurchmesser von 85 nm auf und DXR -Hydrochlorid liegt in einer Konzentration von 2 mg/ ml vor. Alle zusätzlich angegeben Substanzen (Ammoniumsulfat, Histidin, Saccharose und Wasser) dienen als Puffer oder Isotonitäts- und Lösungsmittel (Essex Pharma 2008).

Caelyx<sup>®</sup> ist zur Behandlung des AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkoms, Ovarialkrebs und Brustkrebs im Einsatz. Wie bereits oben erwähnt, werden auch hier die Vorteile von PEGylierten DXR-Liposomen genutzt, wie z.B. die Verringerung der Kardiotoxizität durch eine geringere Einlagerung ins Herz (Allen et al. 2005). Daneben weißt Caelyx<sup>®</sup> eine lange Plasmahalbwertszeit mit nur geringer Freisetzung von DXR auf (Ranson et al. 2001).

So gibt es bereits mehrere Publikationen, in denen Caelyx<sup>®</sup> eingesetzt wird (Fiavre et al. 2004, Allen et al. 2005, Salzberg et al. 2007, Hagtvet et al. 2011).



Im August/ September 2011 jedoch treten Sterilitätsprobleme im Zusammenhang mit Caelyx<sup>®</sup> auf. Im „Roter Hand Brief“ vom 28.11.2011 wird beschrieben (<http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/20111128.pdf>), dass keine weiteren Patienten mit Caelyx<sup>®</sup> behandelt werden sollen, weil beim amerikanischen Lohnhersteller Herstellungsprobleme aufgetreten sind.

## 1.5. Targeting

Als Targeting wird die gezielte Lenkung eines Arzneistoffes bzw. einer Arzneiform zu einem Zielort, der meist auch der Wirkort ist, bezeichnet. Wie in den nachfolgenden Abschnitten erläutert kann man zwischen einem passiven und einem aktiven Targeting unterscheiden (Torchilin 2000).

Das Ziel des Targetings ist die lokale Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes zu erhöhen und gleichzeitig toxische Nebenwirkungen zu reduzieren. Gleichzeitig soll durch das Targeting die Effektivdosis/Wirkdosis reduziert werden, was auch zu einer verbesserten Pharmakotherapie beiträgt (Molema&Meijer 2001).

Um ein Targeting zu erreichen werden zwei Systeme eingesetzt: die Drug-Targeting-Systeme und die Drug-Delivery-Systeme. Bei den Drug-Targeting-Systeme erfolgt die Kopplung eines geeigneten Target-Liganden unmittelbar an das Arzneistoff-Molekül, bei den Drug Delivery Systemen werden die Arzneistoffe zunächst in ein geeignetes Vehikel verpackt, bevor diese Systeme mit einem Liganden versehen werden. Als Drug Delivery Systeme kommen hierbei z.B. Liposomen zum Einsatz. Ein wesentlicher Vorteil der Drug Delivery Systeme zu den Drug Targeting Systemen ist in der höheren Effektivität zu sehen.

Während für ein erfolgreiches Drug Targeting jedes Arzneistoff-Molekül mit einem Target-Liganden versehen werden muss, können in die Delivery Systeme zahlreiche Arzneistoff-Moleküle verpackt werden. Für ein erfolgreiches Targeting kann bereits die Kopplung weniger Target-Liganden an die Oberfläche der Delivery-Systeme ausreichen. Des Weiteren sind der Schutz des Arzneistoffes vor vorzeitiger Inaktivierung bzw. Metabolisierung und die Partikelgröße als Vorteil der Drug Delivery Systeme zu werten. Aufgrund ihrer Größe können diese Systeme das gesunde Endothel nicht durchdringen, wodurch dahinterliegende gesunde Gewebe



nicht erreicht werden und u.a. das Verteilungsvolumen der Zubereitungen reduziert wird. In krankhaft veränderten Geweben weist das Endothel häufig Lücken von einigen hundert nm auf, was zu einer Akkumulation der Systeme in diesen Arealen führt. Dieser Effekt wird für das passive Targeting ausgenutzt (Taylor&Howes 1991, Kreuter 1991, Okada et al. 1994, Seki et al. 2004).

Die Targetingeffekte von Drug-Delivery-Systemen werden v.a. bei der Behandlung mit stark wirksamen Arzneistoffen wie es z.B. Zytostatika, Antibiotika eingesetzt. So werden z.B. z.B. AmBisome<sup>®</sup>, DepoCyte<sup>®</sup> und Caelyx<sup>®</sup> als Drug Delivery Systeme vermarktet (Rote Liste 2012).

### 1.5.1. Passives Targeting

Unter einem passiven Targeting versteht man die spontane Akkumulation von Wirkstoff in bestimmten Geweben, die allein durch morphologische Gegebenheiten geschieht. Hierbei können Parameter wie die Größe endothelialer Lücken, die Temperatur oder der pH-Wert der Zielregion eine Rolle spielen (Torchillin 2000).

Da die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Liposomen für eine parenterale Applikation vorgesehen sind, soll sich die folgende Beschreibung des passiven Targeting auf diesen Verabreichungsweg beschränken. So muss nach intravenöser Verabreichung zunächst das Endothel überwunden werden.

In gesundem Gewebe (Abbildung 1-6) liegen die kapillaren Endothelzellen meist sehr eng beisammen und sind von einer durchgezogenen Basalmembran umgeben, dem kontinuierlichen Endothel. Ein Teil dieser Endothelzellen liegt jedoch als fenestrierte Endothelschicht vor, in der Löcher und Lücken erkennbar sind. Als weitere Gruppe ist schließlich noch die diskontinuierliche Endothelschicht bekannt (Aird 2007).

Parenteral verabreichte Liposomen oder andere nanopartikuläre Systeme können die Blutbahn an solchen Stellen, die durch ein kontinuierliches oder fenestriertes Endothel ausgekleidet werden, nicht verlassen, so dass sie in der Blutbahn zirkulieren (Abbildung 1-6, links). Lediglich in Geweben, die ein diskontinuierliches Endothel aufweisen können die Zubereitungen die Blutbahn verlassen. Nach der



Opsonisierung werden diese Zubereitungen in Makrophagen aufgenommen (Abbildung 1-6, rechts). Die Phagozytose von liposomalen Zubereitungen durch die Zellen des MPS führt zu einer raschen Elimination aus dem Organismus, wodurch die Bioverfügbarkeit reduziert wird (Bauer et al. 2012)

Das MPS bildet einen wesentlichen Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr, dem vor allem Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zugeordnet werden (Chow et al. 2011). Als Hauptaufgaben des MPS seien die Identifizierung, Aufnahme und Eliminierung von pathogenen körperfremden Substraten und gealtertem oder krankhaft veränderten körpereigenen Materialien zu nennen. Für die Identifizierung sind dabei sowohl zelluläre als auch humorale Faktoren wichtig. Zelluläre Faktoren können über spezifische Oberflächenstrukturen, die Substratgröße oder –Ladung zu einer Identifizierung durch das MPS führen. Bei den humoralen Komponenten handelt es sich meist um Komplementfaktoren oder Serumproteine, die durch die Bindung an die Substrate zu deren Erkennung durch das MPS führen. Dieser Mechanismus wird auch als Opsonisierung bezeichnet (Allen 1994).

Um diesem Effekt der Phagozytose entgegenzuwirken, können die Liposomen mit hydrophilen Polymeren wie z.B. PEG oder Ganglioside umhüllt werden. Die Hydrophilisierung der liposomalen Oberfläche führt zu einer reduzierten Opsonisierung und damit zu einer verminderten Aufnahme in Zellen des MPS. Dieser Effekt wird auch als Stealth Effect bezeichnet, die Liposomen dementsprechend als Stealth-Liposomen. Im Vergleich zu den konventionellen Liposomen weisen die PEGylierte Liposomen eine deutlich längere Bluthalbwertszeit auf, was zu einer höheren Bioverfügbarkeit führt (Allen&Hansen 1991, Lu et al. 2004). Der Einsatz von PEG hat dabei gegenüber den Gangliosiden den Vorteil, dass es relativ einfach und kostengünstig herstellbar ist und dabei eine hohe Reinheit erreicht wird. (Papahadjopoulos et al. 1991).

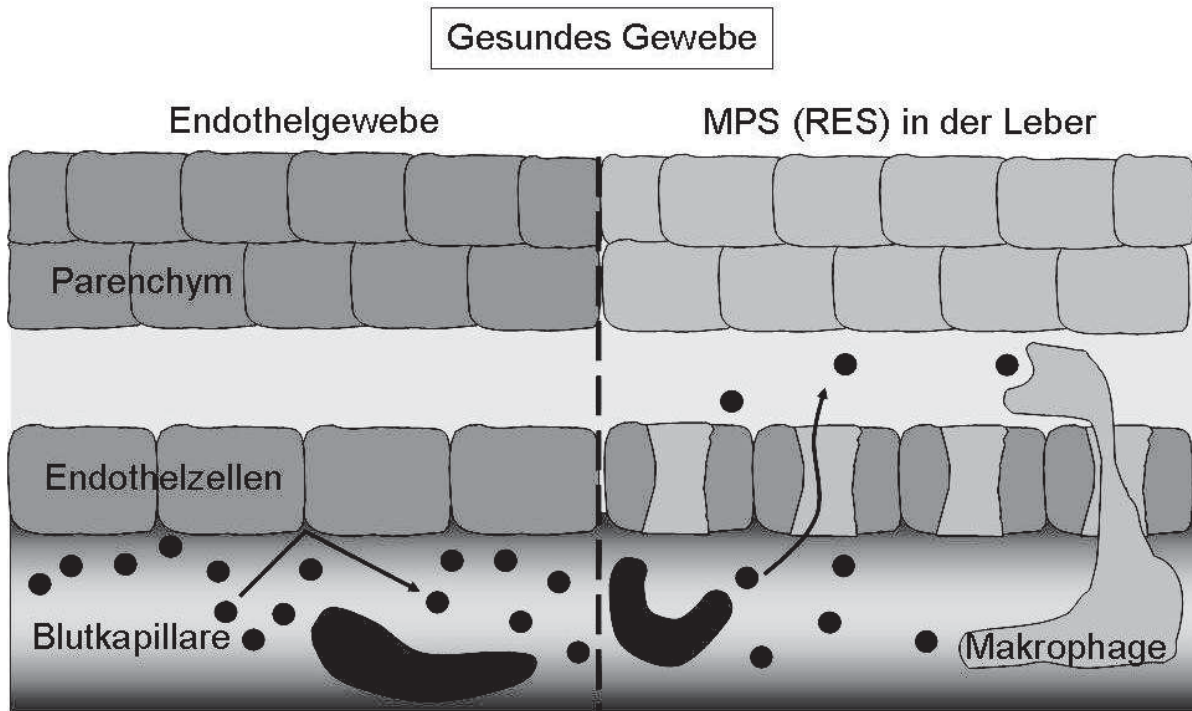


Abbildung 1-6 Aufbau eines gesunden Epithels (nach Bauer et al. 2002)

Ein typisches Merkmal von malignen Tumoren ist ihr schnelles Wachstum, bei dem vor allem im Anfangsstadium die Versorgung durch Diffusion aus den angrenzenden Blutgefäßen gewährleistet wird. Erst in späteren Stadien führt die Neovaskularisierung zur Bildung von Kapillaren, wodurch der Tumor ein eigenes Gefäßsystem entwickelt und somit seine Versorgung sichert (Beecken&Shing 2000).

Das schnelle Wachstum führt zu der Bildung eines Endothels mit Lücken von 100-600 nm. Liposomen mit Größen von typischerweise 100-200 nm können die Blutgefäße durch diese Lücken verlassen und im Tumorgewebe akkumulieren (Maruyama 2011). Ein weiteres Charakteristikum von malignen Tumoren ist die geringe Ausprägung von Lymphgefäßen, wodurch der Tumor sich selbst vor dem Abbau durch z.B. Zellen des MPS schützt. Gleichzeitig sind hierdurch der Abbau und die Eliminierung der Zubereitungen im Tumorgewebe reduziert. Diese Besonderheit zusammen mit der Tatsache, dass im Tumorgewebe, kaum Abbau und Elimination stattfinden, führt zu einer Akkumulation und längeren Verweildauer. Das Phänomen wird als EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention-Effekt*) bezeichnet (Maeda 2001). Diese ungesteuerte und auf Wahrscheinlichkeit beruhenden Anreicherung von Liposomen oder anderen nanopartikulären Systemen, aufgrund



der morphologischen und funktionellen Besonderheiten, wird passives Targeting (Abbildung 1-7, links) bezeichnet (Maruyama 2011).

## 1.5.2. Aktives Targeting

Um die Akkumulation einer Zubereitung am Wirkort zu fördern, besteht neben dem passiven Targeting auch die Möglichkeit eines aktiven Targetings (Haley&Frenkel 2008).

Das aktive Targeting bezeichnet die Funktionalisierung der liposomalen Oberfläche mit spezifischen Liganden. Dies führt zu einer direkten, spezifischen Interaktion der Zubereitungen mit den jeweiligen Zielzellen (Haley&Frenkel 2008).

Die Möglichkeiten für Liganden sind zahlreich. Es können Antikörper eingesetzt (Pagnan et al. 1999, Gantert et al. 2009, Adrian et al. 2011). Daneben gibt es auch die Möglichkeit anderer Liganen wie z.B. Antikörperfragmente (Kirpotin et al. 1997, Gao et al. 2010), Peptide (Saad et al. 2008; Chandna et al. 2007) oder Hyaluronsäure (Peer et al. 2003).

Beim aktiven Targeting werden meist solche Strukturen angestrebt, die am Wirkort selektiv vorhanden sind bzw. dort überexprimiert werden. Die Zielstrukturen können dabei in drei Kategorien eingeteilt werden. Neben den Strukturen, die hauptsächlich von den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert werden wie z.B. der Integrin-Rezeptor, können auch Targets angesteuert werden, die krankheitsspezifisch überexprimiert werden, z.B. von Tumorzellen. Eine dritte Kategorie bilden schließlich solche Strukturen, die in gleichem Ausmaß von gesunden und krankhaft veränderten Zellen wie z.B. Tumorzellen exprimiert werden. In diese Kategorie ist z.B. der GD19-Rezeptor einzuordnen (Marcucci&Lefoulon 2004).

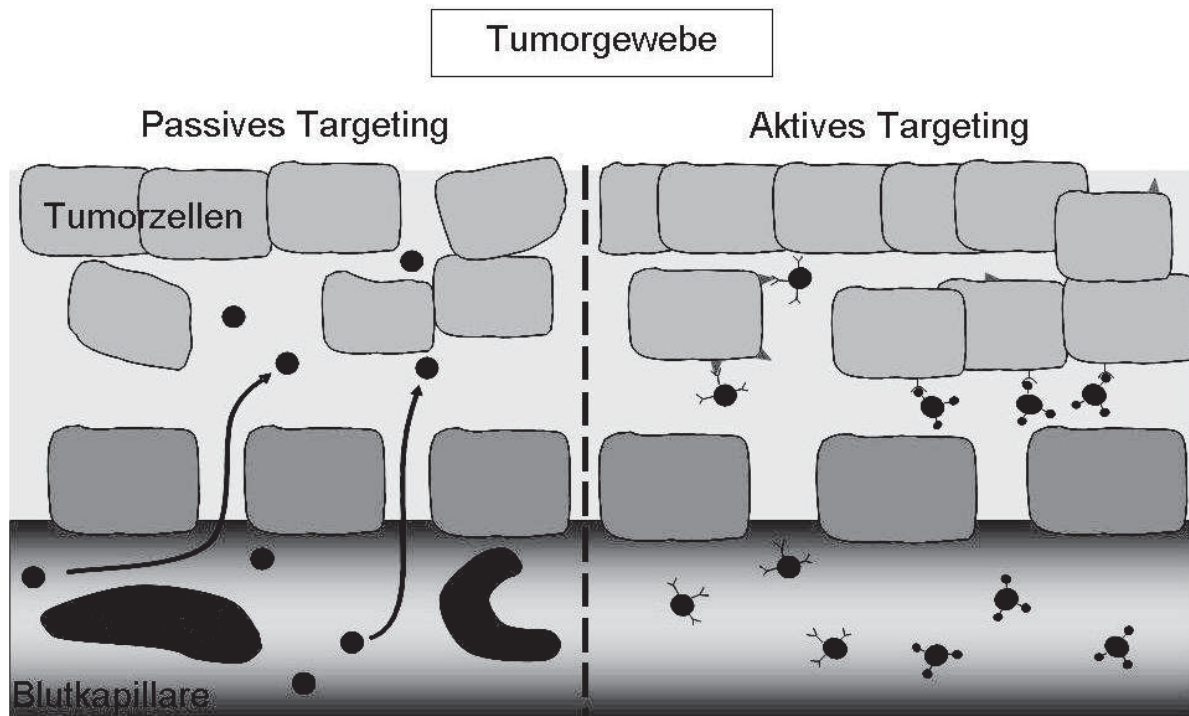


Abbildung 1-7 Passives und aktives liposomales Targeting (nach Bauer et al. 2002)

Im Rahmen dieser Arbeit die Kopplung eines anti-GD2-Aks untersucht. Dieser Antikörper ist gegen das Disialogangliosid GD2 gerichtet, das auf Neuroblastomzellen überexprimiert wird. Dieses Target zählt somit zu der zweiten Kategorie der genannten Zielstrukturen.

## 1.6. Lyophilisation

Die Lyophilisation (synonym: Gefriertrocknung) ist ein Begriff mit griechischer Herkunft. Es setzt sich aus den beiden Wörtern „lyein“ (=lösen) und „phil“ (liebend) zusammen. Es ist somit ein Verfahren, um ein Produkt „lösungsfreundlich“ macht (Bauer et al. 2012). Während der Lyophilisation wird Wasser aus einer Präparation unterhalb deren Gefrierpunktes entfernt (Rupprecht 1993). Durch das Entziehen von Wasser und den niedrigen Temperaturen wird die Gefriertrocknung zur Erhöhung der Lagerstabilität von Substanzen eingesetzt, die empfindlich gegenüber Wasser oder Wärme sind (van Winden 1996)

Die technologische Aufbau und die Durchführung sind heutzutage bekannt. Jedoch ist das Lyophilisationsprotokoll für eine Präparation nicht auf eine andere