

Aus der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie  
Ludwig-Maximilians-Universität München

angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ. Prof. Dr. Ernst Wagner

Vorgelegt an der  
Tierärztlichen Fakultät  
Department für Veterinärwissenschaften  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf)

# **HYPERTHERMIE ZUR TUMORGERICHTETEN THERAPIE MIT LIPOSOMEN UND GENTRANSFERKOMPLEXEN IM TIERMODELL**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Alenka Christiane Schwerdt  
aus  
Witzenhausen

München 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Wolf
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Hartmann

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

meinen Eltern

und

Felix

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Krebstherapie.....	3
2.2	Hyperthermie in der Krebstherapie.....	5
2.2.1	Thermosensitiver Gentransfer.....	7
2.2.2	Thermosensitive Liposomen.....	10
3	Material und Methoden.....	13
3.1	Chemikalien und Reagenzien.....	13
3.1.1	Polyethylenimin (PEI).....	13
3.1.2	DNS / Plasmide.....	13
3.1.3	Synthese der Polymere.....	13
3.1.4	Chemotherapeutika.....	13
3.1.5	Weitere Reagenzien.....	14
3.2	Bildung der Polyplexe.....	14
3.3	Herstellung der Hexadecylphosphocholin Liposomen.....	14
3.4	Zellkultur.....	15
3.5	Versuchstiere.....	15
3.6	Behandlung.....	16
3.6.1	Anästhesie.....	16
3.6.2	Implantation der Tumorzellen.....	16
3.6.3	Vermessen des Tumorumfanges.....	17
3.6.4	Hyperthermieaufbau.....	17
3.6.5	Regionale Hyperthermiebehandlung.....	18
3.6.6	Gentransfer Behandlung.....	18
3.6.7	Liposomale Behandlung.....	19
3.7	Probenentnahme und Aufbereitung.....	19
3.7.1	Blut-, Organentnahme und Lagerung.....	19
3.7.2	Luziferase-Reportergen-Expressions-Assay.....	20
3.7.3	Histologie.....	20
3.7.4	Nachweis von Doxorubicin mittels HPLC.....	21
3.7.4.1	Doxorubicin Nachweis aus Plasma.....	21
3.7.4.2	Doxorubicin Nachweis aus Gewebe.....	22
3.7.5	Hexadecylphosphocholin (HePC) mittels LC-MS/MS.....	22
3.7.6	Statistische Auswertung.....	23
4	Ergebnisse.....	24
4.1	Thermosensitiver Gentransfer.....	24
4.1.1	LPEI Luziferaseexpression.....	24
4.1.2	BPEI Luziferaseexpression.....	26
4.1.3	PEG-BPEI Luziferaseexpression.....	27
4.1.4	PVP Luziferaseexpression.....	29
4.1.4.1	Evaluierung Luziferaseexpression PVP10 und PVP20.....	29
4.1.4.2	Einfluss der TumorgroÙe auf PVP10 Luziferaseexpression.....	32
4.1.5	Histologie Cy3-gelabelter Polyplexe.....	40
4.2	Chemotherapeutika in Kombination mit Hyperthermie.....	42
4.2.1	Therapeutische Studie.....	42
4.2.2	Caelyx Freisetzung nach Hyperthermiebehandlung.....	45
4.2.2.1	Doxorubicinkonzentration im Tumor.....	45
4.2.2.2	Doxorubicinkonzentration im Plasma.....	48
4.2.3	HePC-Konzentration im Tumor.....	49

5	Diskussion .....	50
5.1	Thermosensitiver Gentransfer .....	50
5.2	Chemotherapeutika in Kombination mit Hyperthermie.....	54
5.2.1	Therapeutische Studie und Gewebeanreicherung.....	54
5.2.2	HePC-TSL Anreicherung im Gewebe .....	57
6	Zusammenfassung .....	59
7	Summary .....	61
8	Anhang .....	63
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	63
8.2	Veröffentlichungen.....	65
8.3	Posterpräsentationen.....	65
9	Literaturverzeichnis.....	66
10	Danksagung .....	73
11	Lebenslauf .....	75

# 1 Einleitung

Trotz verbesserter medizinischer Vorsorgeuntersuchungen und ermutigenden therapeutischen Erfolgen haben Krebserkrankungen seit Jahren eine steigende Inzidenz und gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Um die Ergebnisse der bisher verfolgten Ansätze der Krebstherapie zu verbessern ist es notwendig neue Therapiestrategien zu entwickeln. Dabei ist von besonderem Interesse die Spezifität und Effizienz der Therapien zu steigern und auftretende Nebenwirkungen zu verringern. Ein Ansatz der molekularmedizinischen Forschung ist die Kombination von Hyperthermiebehandlung und neu entwickelten thermosensitiven Trägersystemen zur lokalen Freisetzung von Therapeutika im Tumorgewebe.

Nach der Etablierung des Aufbaus zur Hyperthermiebehandlung von Mäusen wurden folgende Fragenstellungen bearbeitet:

## **Hyperthermieinduzierte Anreicherung und Expression von thermosensitiven Polyplexen in Tumoren**

Der Einfluss von Hyperthermiebehandlung und Tumorgroße auf die Spezifität und Effektivität von thermosensitiven Polyvenylpyrrolidone-Polyplexen (PVP) und deren Anreicherungsort im Tumorgewebe wurde im Neuro2A Tumormodell untersucht. Dafür wurde die Reporterexpression nach Behandlung mit thermosensitiven Polyplexen und nicht thermosensitiven Gentransfersystemen gemessen. Verglichen wurden sowohl die Organexpression als auch die gemessenen Expressionsraten in hyperthermierten und nicht hyperthermierten Tumoren.

## **Therapeutische Anwendung von Hyperthermie und Chemotherapeutika**

Untersucht wurde die Wirkung von Hyperthermiebehandlung auf das BFS-1 Tumormodell. Dazu wurde eine therapeutische Studie mit freiem Doxorubicin (Adriblastin<sup>®</sup>) und PEGyliertem, liposomalem Doxorubicin (Caelyx<sup>®</sup>) durchgeführt. Beurteilt wurde die Wirkung von Hyperthermiebehandlung in Kombination mit und

ohne Chemotherapeutika. Außerdem wurde die Auswirkung von Hyperthermiebehandlung auf die Pharmakokinetik von liposomalem Doxorubicin untersucht.

### **Hyperthermieinduzierte Anreicherung und therapeutische Wirkung von thermosensitiven Liposomen**

Da für HePC (Miltefosin<sup>®</sup>) in wässriger Lösung hämolytische Eigenschaften beschrieben sind, wurde die in vivo Toxizität nach systemischer Applikation von thermosensitiven HePC-Liposomen (HePC-TSL) untersucht. In weiteren Versuchen wurde die HePC-Konzentration im Tumorgewebe nach Hyperthermiebehandlung in Kombination HePC-TSL bestimmt und eine therapeutische Studie durchgeführt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Krebstherapie

Für solide Tumoren basieren die etablierten Therapien auf Kombinationen von chirurgischer Entfernung, Chemo- und/oder Strahlentherapie. Im Fall von lokal nicht zu beherrschenden Erkrankungen nach chirurgischer Entfernung oder Strahlentherapie und insbesondere bei einer drohenden oder manifesten Metastasierung ist eine systemische Behandlung erforderlich. Die verwendeten Substanzen führen durch fehlende Tumorselektivität oft zu erheblichen Nebenwirkungen und Toxizitäten, welche nicht nur deren Anwendung einschränken, sondern auch die Lebensqualität des Patienten beeinflussen. Daher ist es besonders für fortgeschrittene Stadien von Krebserkrankungen wichtig neue, wirksamere Behandlungsmethoden zu entwickeln.

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien besteht darin selektiv den Primärtumor und eventuelle Metastasen zu zerstören. Die Diversität der entarteten Zellen (selbst innerhalb der gleichen Tumorenentität), damit verbundene Resistenzen und unspezifische Mechanismen des Tumorgewebes erschweren die Entwicklung tumorspezifischer Wirkstoffe. Ein sehr erfolgsversprechender Ansatz, um die Effizienz der bestehenden Therapien signifikant und nachhaltig zu verbessern stellt die Entwicklung spezifischer Transportsysteme dar. Ein alternativer Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen ist das Einbringen von Genen in den Tumor, die Tumorsuppressorgene exprimieren oder Apoptose hervorrufen<sup>73</sup>. Auch für Genvektoren ist eine hohe Spezifität wichtig, um eine hohe Expressionsrate im Zielgewebe zu erhalten, die abhängig von einer effizienten Aufnahme des Genvektors in die Zielzelle ist.

Bereits für die klinische Anwendung entwickelte Transportsysteme sind u.a. verschiedene Polymere und Liposomen, die vielseitig einsetzbar sind<sup>1</sup>. Durch passiven Einschluss können Liposomen mit Wirkstoffen oder Genvektoren beladen werden, was in veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften und Toxizitäten der



Agenzien resultiert. Momentan befinden sich zwei mit Doxorubicin beladene Liposomenformulierungen (Caelyx<sup>®</sup>, Myocet<sup>®</sup>) in der klinischen Anwendung. Doxorubicin ist ein oft verwendetes Chemotherapeutikum zur Behandlung von soliden Tumoren, bei dem die als Nebenwirkung auftretende Kardiotoxizität dosislimitierend ist. Nach dem Einschluss von Doxorubicin in Liposomen wurde eine verringerte Kardiotoxizität beobachtet. Weiterhin wurde durch die Abschirmung von Liposomen mit PEG (Polyethylenglykol), wie es bei Caelyx<sup>®</sup> (Ldox, Abb. 1) der Fall ist, eine Verlängerung der Plasmahalbwertszeit erreicht, da Aufnahme und Abbau im RES (Reticuloendotheliales System) reduziert sind<sup>2-4</sup>. Dieses Phänomen wurde auch nach der PEGylierung von Genvektoren beobachtet<sup>5</sup>. Präklinische Studien in Mausmodellen<sup>4, 6-8</sup> zeigten eine gesteigerte passive Akkumulation von Doxorubicin im Tumorgewebe und ein verbessertes Ansprechen der Tumoren nach Therapie mit LDox. Dennoch konnte in der klinischen Anwendung kein Vorteil von LDox gegenüber freiem Doxorubicin (Abb. 2) beobachtet werden<sup>9</sup>.

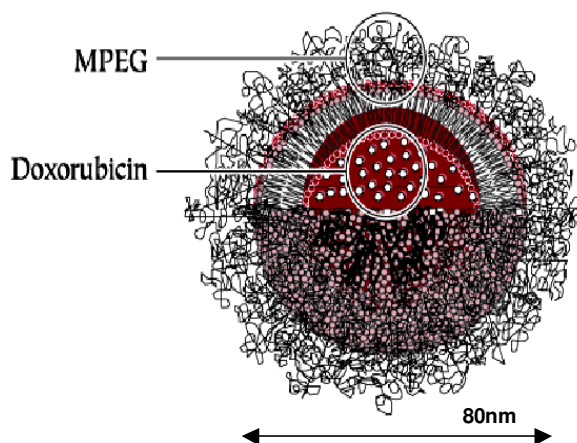


Abb. 1 Liposomales Doxorubicin (Caelyx<sup>®</sup>)  
nach Johnston SRD (2004) Schering-Plough Pharma

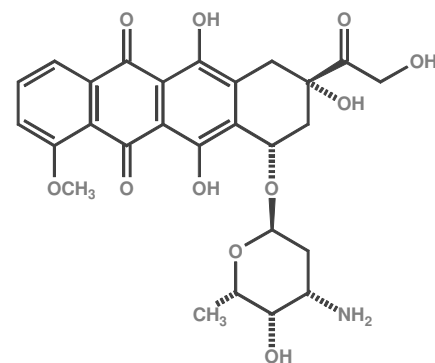


Abb. 2 Doxorubicin

Die Entwicklung von Makromolekülen (> 40 kDa) und die Strategie Wirkstoffe in Liposomen einzuschließen, um eine erhöhte Akkumulation im Tumorgewebe zu erreichen, beruht auf dem für Tumorgewebe bekannten Phänomen des gesteigerten Permeabilitäts- und Retentions-Effekt (EPR-Effekt). Dieser Effekt beschreibt die durch passive Diffusion vermehrte Anreicherung von Makromolekülen im Tumorgewebe. Er beruht auf den veränderten Eigenschaften des Tumorendothels,

das verglichen mit normalem Endothel undifferenziert und fenestriert ist, wodurch es durchlässig für Makromoleküle wird<sup>10</sup>. Der langsame venöse Rückfluss<sup>11, 12, 64</sup> und die niedrige lymphatische Aktivität des Tumorgewebes<sup>13, 14, 15</sup> führen dazu, dass bereits extravasierte Moleküle im Tumorgewebe zurückgehalten werden, während der Eintritt weiterer Moleküle fortschreitet<sup>10</sup>. Dieser Effekt ist passiv und somit nicht steuerbar.

Die Weiterentwicklung von Transportsystemen zum Erreichen einer spezifischen Freisetzung von antitumoralen Agenzien im Tumorgewebe ist notwendig, um die Möglichkeiten der Krebstherapie zu verbessern. Mit Hilfe solcher Systeme lassen sich auch systemische Nebenwirkungen reduzieren, da weniger Wirkstoff in gesundes Gewebe gelangt. Die aktuell verfolgten Strategien für eine spezifische Wirkstoffakkumulation im Tumorgewebe umfassen Oberflächenmarkierung von Trägersystemen mit Antikörpern oder gewebespezifischen Rezeptoren<sup>16</sup>. Außerdem werden physikalische Methoden wie Ultraschall, magnetische Felder, elektrische Felder, Licht oder Hyperthermie angewendet.

## **2.2 Hyperthermie in der Krebstherapie**

Die Behandlung mit Hyperthermie wird in der Klinik zur Therapie von soliden Tumoren angewendet<sup>17, 18</sup>. Mittels regionaler Tiefenhyperthermie wird das Tumorgewebe durch die Einwirkung eines elektromagnetischen Feldes (Mikro- und Radiowellen) auf Temperaturen von 40 - 44°C erwärmt. Bei Erreichen einer Temperatur von über 42,5°C wird ein direkter zytotoxischer Effekt hervorgerufen, wohingegen schon geringere Temperaturen die Wirkung von Strahlen – und Chemotherapie verbessern. Der beobachtete biologische Effekt der Temperaturerhöhung folgt einem Dosis-Wirkungsprinzip und ist quantifizierbar. Außerdem sind immunmodulatorische Effekte durch die Expression von Hitzeschockproteinen beschrieben. In mehreren klinischen Phase 1 und 2 Studien wurde gezeigt, dass regionale Tiefenhyperthermie in Kombination mit Chemotherapie effektiv ist<sup>19</sup>. Weitere Ergebnisse aus klinischen Phase 2 und 3 Studien zeigen, dass bei einigen Patienten eine signifikante Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle sowie der rezidivfreien Überlebenszeit durch Kombination

von Hyperthermie mit Strahlen- und/oder Chemotherapie erreicht wurde <sup>65</sup>. Die langjährigen Erfahrungen mit der Behandlungsmethode haben gezeigt, dass Hyperthermie risikoarm und gut verträglich ist. Die Hyperthermiebehandlung führt zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße <sup>63</sup>, wodurch vermehrt makromolekulare Substanzen wie Liposomen <sup>21-23</sup> und Polyplexe ins Tumorgewebe extravasieren können (Abb. 3). Zusätzlich kann durch die Erwärmung der EPR-Effekt im Tumorgewebe gesteigert werden. In verschiedenen Tiermodellen konnte nach Hyperthermiebehandlung sowohl eine vermehrte Anreicherung von Liposomen <sup>21, 23</sup> als auch eine effizientere Genexpression <sup>24</sup> in Tumoren beobachtet werden. Trotz der gesteigerten therapeutischen Effizienz von Chemotherapeutika in Kombination mit Hyperthermiebehandlung bleiben die durch die Wirkstoffe hervorgerufenen systemischen Nebenwirkungen immer noch ein dosislimitierender Faktor. Für die klinische Anwendung wäre daher eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs im Tumorgewebe oder innerhalb der Tumorgefäße von großem Vorteil.

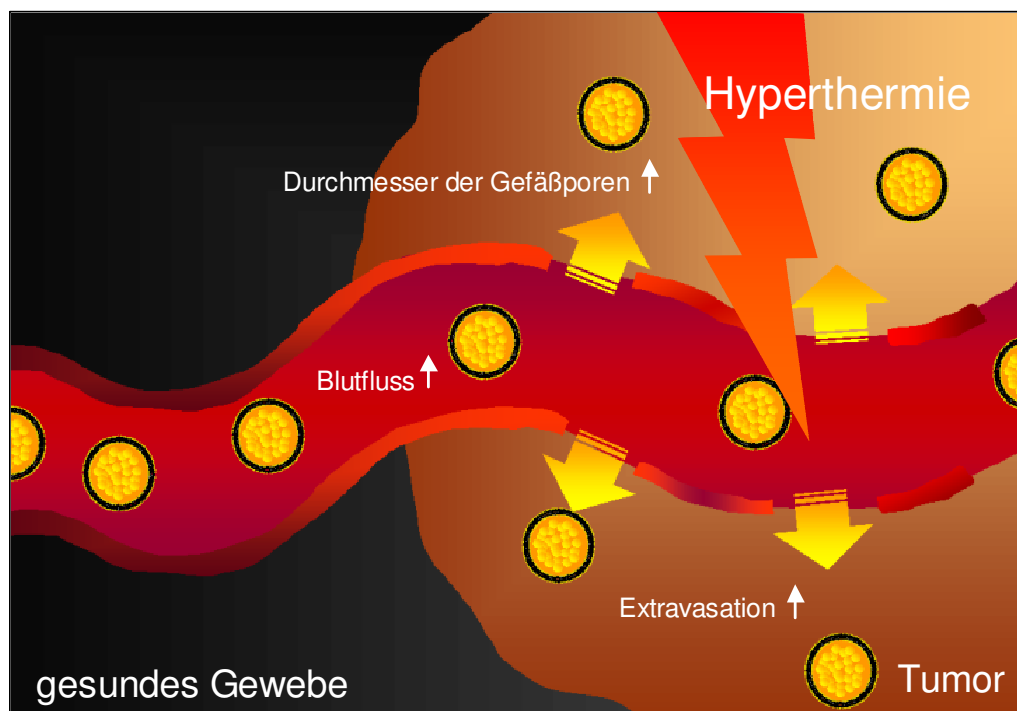


Abb. 3 Physiologische Veränderungen im Tumorgewebe durch Hyperthermiebehandlung

Es gibt verschiedene Ansätze der molekularmedizinischen Forschung thermosensitive Trägersysteme zu entwickeln. Einer ist die Herstellung von Liposomen, die nach Erreichen einer bestimmten Schwellentemperatur eingeschlossene Wirkstoffe freigesetzten<sup>21, 68, 69</sup>. Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung von thermosensitiven Genfähren, die bei Erreichen einer bestimmten Phasenumwandlungstemperatur aggregieren und dadurch eine effizientere endosomale Freisetzung bewirken<sup>25</sup>. Ziel ist die Entwicklung neuer, therapeutischer Ansätze die sich durch eine geringe Toxizität und eine möglichst lange Blutzirkulation vor Aufnahme und Abbau im RES auszeichnen. Besonders wichtig für thermosensitive Agenzien ist die Stabilität bei 37°C in Anwesenheit von Serum, damit keine unspezifische Akkumulation bzw. Freisetzung des Wirkstoffs außerhalb des Zielgewebes stattfindet.

### **2.2.1 Thermosensitiver Gentransfer**

Gentherapeutische Ansätze sind ein wachsender Bereich der molekularmedizinischen Forschung. Zwei Drittel der klinischen Studien auf dem Gebiet der Gentherapie sind derzeit gegen Krebs gerichtet<sup>26</sup>. Grundsätzlich ist zwischen viralem und nicht viralem Gentransfer zu unterscheiden. Durch die effektiven Mechanismen von Viren ihr Genom in das der Wirtszelle zu integrieren, ist bei viralem Gentransfer theoretisch ein einziges Viruspartikel ausreichend, um die Expression eines Gens zu bewirken. Allerdings besteht bei viralen Vektoren das Risiko einer unspezifischen Integration in das Wirtszellgenom, wodurch Onkogene aktiviert werden können<sup>27</sup>. Außerdem ist ihr Einsatz wegen immunologischen Effekten stark eingeschränkt. Vorteile von nicht viralem Gentransfer hingegen sind niedrigere Produktionskosten und geringere Immunogenität, was eine mehrfache Applikation ermöglicht. Das synthetische Design erlaubt durch unterschiedliche chemische und physikalische Modifikation eine hohe Flexibilität in der Entwicklung. Zusätzlich gibt es keine Limitierung für die Größe des integrierten Gens, wie es bei viralen Vektoren der Fall ist. Trotz dieser bestehenden Vorteile ist die Effizienz im Vergleich zu viralen Genvektoren geringer.

Zu den bisher in vivo etablierten nicht viralen Genvektoren gehören PEI-Polyplexe. PEI (Polyethylenimin) ist ein organisches Polykation mit einer hohen Dichte an protonierbaren Aminogruppen und eignet sich optimal für die Kondensierung und Komplexierung der negativ geladenen DNS (Abb. 4 und 5). Dadurch wird die DNS vor biochemischer und physikalischer Degradierung geschützt.



Abb. 4 Lineares Polyethylenimin (LPEI)

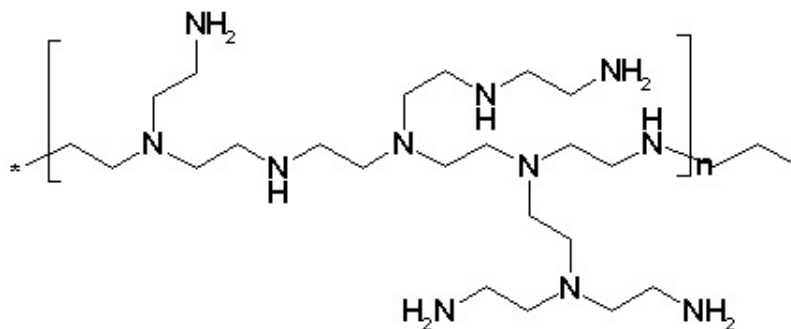


Abb. 5 Verzweigtes Polyethylenimin (BPEI)

Nach in vivo Applikation von PEI-Polyplexen ist vor allem im Lungengewebe eine hohe Expressionsrate messbar. Die positive Ladung von PEI-Polyplexen führt zu einer unspezifischen Interaktion mit Blutkomponenten und Gewebe, was den gezielten Gentransfer im Tumor erschwert. Ein weiterer Nachteil der PEI-Polyplexe ist, dass sie in physiologischer Salzlösung aggregieren<sup>28</sup> und eine hohe Toxizität in vivo aufweisen<sup>29</sup>. Durch eine kovalente Bindung von PEG findet eine Abschirmung der Polyplexe statt. Dies verlängert die Zirkulationszeit und ermöglicht somit eine gesteigerte, passive Anreicherung im Tumorgewebe bei gleichzeitiger Abnahme der Toxizität<sup>5</sup>. Die verbesserten Eigenschaften nach PEGylierung der PEI-Polyplexe

sind allerdings mit einer Abnahme der Effektivität verbunden. Ziel der Weiterentwicklung von nicht viralen Polyplexen ist daher die Effizienz und Spezifität durch selektive Anreicherung zu verstärken und dabei Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

Es gibt verschiedene Ansätze eine gezielte Genexpression durch Hyperthermiebehandlung zu erreichen. Neben der Verwendung von thermosensitiven Promotoren<sup>30, 31</sup> ist der Einsatz von thermosensitiven Polyplexen möglich. Die in dieser Arbeit eingesetzten thermosensitiven Polyplexe wurden aus PEI und einer statistischen Zusammensetzung von N,N-Isopropylacrylamid (NIPAM) und 1-Vinyl-2-pyrrolidinon (VP) synthetisiert<sup>25</sup> (Abb. 6).

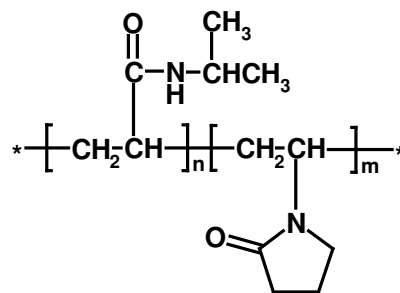


Abb. 6 PVP-Kopolymer synthetisiert aus N,N-Isopropylacrylamid (NIPAM) und 1-Vinyl-2-pyrrolidinon (VP)

NIPAM ist ein hydrophiles Kopolymer, das bei Temperaturen über 32°C eine Phasenumwandlung durchläuft und hydrophob wird. Abhängig vom Verhältnis der hydrophilen VP-Komonomere zu NIPAM-Kopolymeren steigt die Temperatur bei der NIPAM der Phasenumwandlung unterliegt. Auf Grund dieser Eigenschaft lassen sich durch variierende Zusammensetzung Poly-vinyl-pyrrolidinon-Kopolymere (PVP-Kopolymere) entwickeln, die unterschiedliche PT (Phasenumwandlungstemperaturen) haben und nach Erwärmung auf eine bestimmte Temperatur aggregieren. Für die Bildung von PVP-Polyplexen (PVP) werden PVP-Kopolymere kovalent an PEI gebunden und bilden somit eine hydrophile Abschirmung, die der von PEGylierten PEI-Polyplexen (PEG-PEI) ähnelt. Diese verhindert unspezifische Interaktionen und steigert die Stabilität bei physiologischen Temperaturen (37°C). Nach Erwärmung der PVP-Polymere über die für sie spezifische PT aggregieren die PVP-Polyplexe auf eine Größe von ~ 1000 nm. Auf Grund der Größenzunahme ist nach Aufnahme in die Zelle eine verbesserte endosomale Freisetzung ins Zytosol

möglich. Das verhindert einen möglichen Abbau durch lysosomale Enzyme und verstärkt die Genexpression <sup>25</sup> (Abb. 7). Dieser Mechanismus stellt ein vielversprechendes neues Verfahren für gezielte Expression von nicht viralen Genvektoren durch Hyperthermie im klinisch angewendeten Temperaturbereich dar.

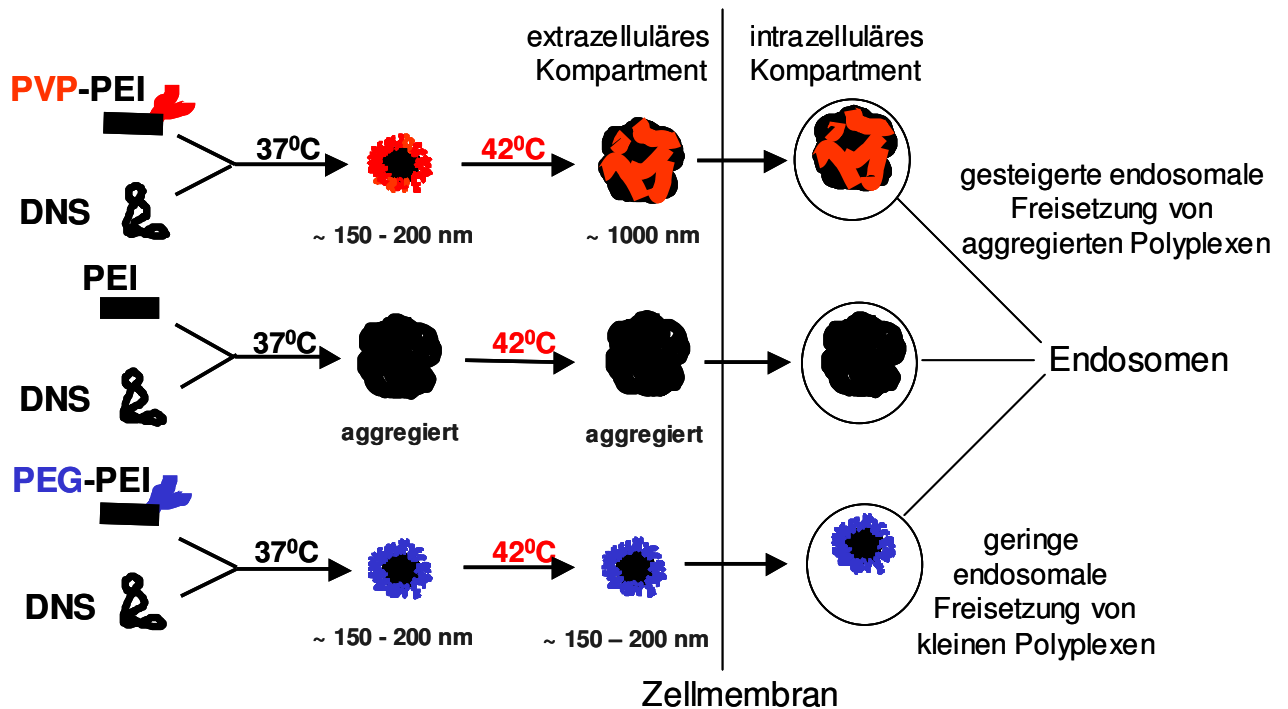


Abb. 7 Effekt von Hyperthermie auf die Zelltransfektion von Polyplexen

### 2.2.2 Thermosensitive Liposomen

Liposomen besitzen ein großes Potential als Verpackung von pharmazeutisch interessanten Verbindungen. Sie sind meist kleine (~ 50 – 200 nm) aus Phospholipiden bestehende Vesikel und vielfältig modifizierbar. Liposomen besitzen eine sphärische Form, bestehend aus konzentrischen Lipiddoppelschichten, die sich spontan bilden, wenn Phospholipide in wässriges Medium gegeben werden. Auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften ist der Einschluss von hydrophilen Agenzien in die Vesikel und der Einbau von hydrophoben Substanzen in ihre Lipidmembran

möglich<sup>71</sup>. Dies hat zur Folge, dass sich die Bioverfügbarkeit und Toxizität der eingeschlossenen Substanzen verändert. Bisher wurde durch liposomale Formulierungen von in der klinischen Anwendung befindlichen Wirkstoffen zwar eine Senkung der Nebenwirkung erreicht, aber keine gesteigerte Effizienz in der therapeutischen Wirkung beobachtet<sup>9, 32, 33</sup>.

Durch den Einsatz von thermosensitiven Liposomen (TSL) in Kombination mit Hyperthermie kann eine spezifische Akkumulation von Wirkstoffen hervorgerufen werden. Die Erwärmung des Tumors führt zu einer gesteigerten Extravasation und gezielter, schneller Freisetzung der eingeschlossenen Agenzien im Zielgewebe. Es gibt unterschiedliche Formulierungen von TSL, deren Zusammensetzung sich durch die verwendeten Lipide, Polymere und andere Modifizierungen unterscheidet. Eine der Formulierungen befindet sich nach erfolgreicher Anwendung in Tiermodellen<sup>34, 35</sup> zur Evaluierung in einer klinischen Phase 1 Studie (ThermoDox<sup>TM</sup>).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Hexadecylphosphocholin-TSL (HePC-TSL) bestehen aus 40 mol% 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC), 20 mol% 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC), 30 mol% 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglyceroglycerol (DPPGOG) und 10 mol% Hexadecylphosphocholin (Miltefosin<sup>®</sup>, HePC) (Abb. 8).

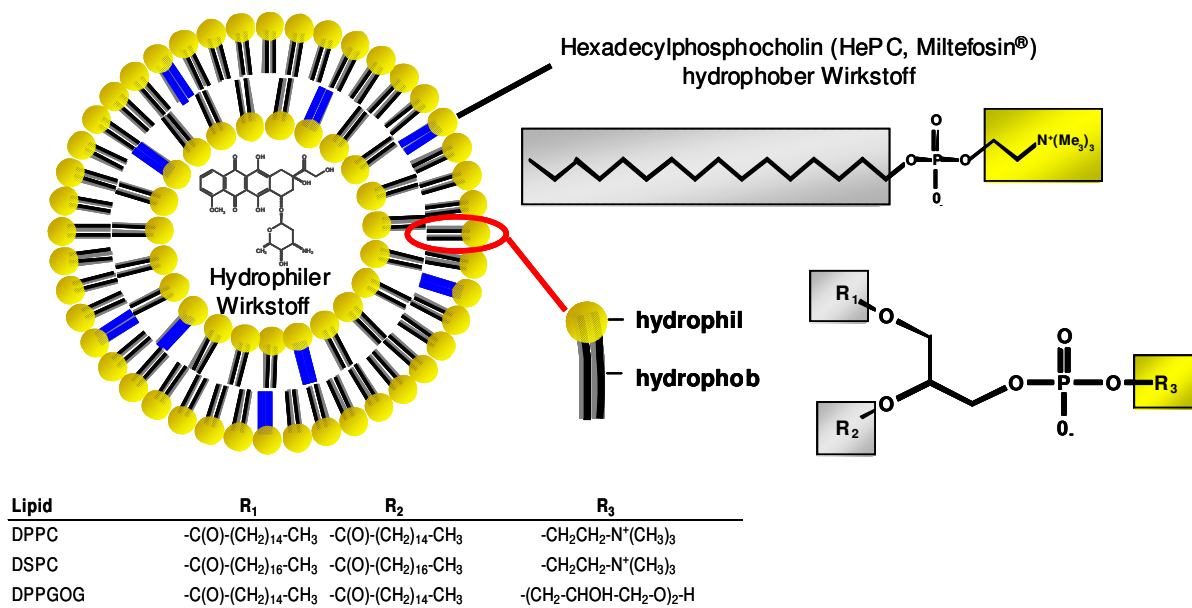


Abb. 8 Aufbau und Struktur von thermosensitiven Liposomen



Die PT der TSL ist hauptsächlich abhängig von dem Verhältnis der verwendeten Phospholipiden (z.B. Di-palmitoyl-PC, PT = 41,4 °C und Di-stearoyl-PC, PT = 54,9°C) zueinander und kann durch verschiedene Kombinationen variiert werden. Die Zugabe von DPPGOG verlängert die Zirkulationshalbwertszeit und verstärkt die Freisetzung des Liposomeninhalts bei Erwärmung<sup>23</sup>.

HePC gehört zur Molekülklasse der Alkylphosphocholine und ist das erste sich in der klinischen Anwendung befindliche Phospholipid<sup>71</sup>. Es wird zur topischen Behandlung von Hautmetastasen bei Brustkrebs<sup>70</sup> und oralen Behandlung von Leishmaniose<sup>72</sup> angewendet. Da es in wässriger Lösung hämolytische Eigenschaften hat, ist es für eine systemische Applikation nicht geeignet. Durch Integration von HePC in die Membran von thermosensitiven Liposomen sollte die Toxizität reduziert und eine i.v. Applikation ermöglicht werden. HePC-TSL sind im Serum bei 37°C stabil. Erst eine Erwärmung der TSL auf die für sie spezifische PT induziert eine Membranstabilität, wodurch eingeschlossene Wirkstoffe freigesetzt werden. In vitro führt nach Einbau von HePC in die Lipidmembran von TSL eine Erwärmung über die PT zu einer schnellen Freisetzung des Inhalts innerhalb von Sekunden und einer gesteigerten zytotoxischen Wirkung nach Anreicherung in Tumorzellen<sup>67</sup>. Durch den Einschluss von Chemotherapeutika und den Einbau von HePC in die Lipidmembran von TSL besteht die Möglichkeit zwei potente Wirkstoffe gezielt im Tumorgewebe mittels Hyperthermie im klinisch angewendeten Temperaturbereich anzureichern.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Chemikalien und Reagenzien**

#### **3.1.1 Polyethylenimin (PEI)**

Lineares PEI (LPEI) mit einem mittleren Molekulargewicht von 22 kDa wurde wie von Brissault et al beschrieben synthetisiert <sup>36</sup>. Verzweigtes PEI (BPEI) mit einem Molekulargewicht von 25 kDa wurden von Sigma-Aldrich (D-München) bezogen. Beide wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Dazu wurden sie in Wasser gelöst, mit HCl neutralisiert und danach auf einer Sephadex G-25 superfine Säule mit 20 mM HEPES, 0,25 M NaCl, pH 7,4 aufgereinigt <sup>37</sup>.

#### **3.1.2 DNS / Plasmide**

Das Plasmid pCMV-Luc 5 mg/ml (Photinus pyralis luziferase mit CMV Promotor/Enhancer), wie von Plank et al beschrieben <sup>38</sup>, wurde endotoxinfrei von der Plasmidfactory (D-Bielefeld) produziert.

#### **3.1.3 Synthese der Polymere**

PVP10 und PVP20 wurden von Dr. A. Zintchenko durch radikalische Kopolymerisation von N,N-Isopropylacrylamid und 1-Vinyl-2-pyrrolidinon (Firma Aldrich, D-München) in Wasser, mit Ammoniumpersulfat (Firma Amersham Biochemicals, D-Freiburg) als Initiator, in der Anwesenheit von BPEI synthetisiert <sup>25</sup>. PEG-BPEI (20 kDa PEG, PEG/PEI M/M ratio) wurde wie von Kursa et al beschrieben synthetisiert und aufgereinigt <sup>39</sup>.

#### **3.1.4 Chemotherapeutika**

PEGyliertes liposomales Doxorubicin (Caelyx<sup>®</sup>) wurde von der Firma Essex (D-München), freies Doxorubicin (Adriblastin<sup>®</sup>) von der Firma Pfizer (Deutschland) bezogen.

### 3.1.5 Weitere Reagenzien

Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % zur Injektion und Heparin 25000 I.E./5 ml wurden von Braun Melsungen AG (D-Melsungen) bezogen. Oleylphosphocholin (OLPC) 27,5 mg/l wurde von Herrn Prof. Eibl (D-Göttingen) hergestellt und von Herrn Dr. Vogeser angesetzt. Methanol wurde von der Firma J.T. Baker (NL-Deventer), Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), Isopropanol ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ) und Kaliumdi-hydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) von der Firma Merck (D-Damstadt) und Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) von der Firma Acros Organics (USA-New Jersey) bezogen. Daunorubicin wurde von der Firma Sigma (D-München) bezogen. Als Lösungsmittel wurde entionisiertes Wasser (Milli-Q Plus PF, Millipore GmbH) verwendet.

### 3.2 Bildung der Polyplexe

Die Polyplexe wurden wie von Zintchenko et al beschrieben hergestellt und charakterisiert <sup>25</sup>. Dafür wurde die Plasmid DNS mit den verschiedenen eingesetzten Polykationformulierungen in einem Massengewichtsverhältnis PEI-Stickstoff zu DNS-Phosphate (N/P ratio) von 6 gemischt. Die DNS-Polykation-Polyplexe wurden in einer DNS-Konzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hergestellt. 20  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNS-Lösung (5 mg/ml) wurde mit 480  $\mu\text{l}$  PEI oder PEI-Kopolymer (165  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PEI) in HEPES Puffer Glukose (HBG, 5% Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,1) durch schnelles auf- und abpipettieren gemischt, um eine möglichst homogene Partikelgröße zu erhalten. Zur Größencharakterisierung wurden die Transfektionskomplexe in einem Malvern Zetasizer 300HS (Malvern Instruments, UK-Worcestershire) mittels Laser-Licht Streuung vermessen <sup>25</sup>. Dazu wurden 20  $\mu\text{l}$  der Polyplexlösung in 480  $\mu\text{l}$  HBG-Puffer verdünnt und die Größe aus dem Mittel von 10 Messungen bestimmt. Die Polyplexe wurden in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/20$  g Maus eingesetzt.

### 3.3 Herstellung der Hexadecylphosphocholin Liposomen

Die Phosphatidylcholine 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC) wurden von der Firma Sygena Ltd. (CH-Liestal) bezogen. 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglyceroglycerol (DPPGOG) und Hexadecylphosphocholin (HePC) wurde von Prof. Eibl synthetisiert

<sup>40, 41</sup>. Die Liposomen wurden mittels Lipidfilm Hydratisierung und Extrusion, in einem Verhältnis von 10 mol% HePC, 30 mol% DPPGOG, 40 mol% DPPC und 20 mol% DSPC, wie von Lindner beschrieben hergestellt und charakterisiert <sup>23</sup>. Größe und Zeta-Potential wurden auf einem Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, UK-Worcestershire) bestimmt. Des Weiteren wurde eine Phosphatbestimmung durchgeführt <sup>42</sup>.

### **3.4 Zellkultur**

Die Zellkulturmedien, Fötale Kälberserum (FKS) und Trypsin/EDTA wurden von Invitrogen GmbH (D-Karlsruhe) bezogen. In Heracell Inkubatoren (Kendro Laboratory Produkts, D-Langenselbold) wurden die Zellen bei 37°C, in humider, 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre, ohne Antibiotikazugabe vermehrt. Die Neuro2A Zellen (murines Neuroblastom, ATCC CI-131) wurden in DMEM-niedrig-Glukose-Medium mit 10 % FKS kultiviert. BFS-1-Zellen (Methylcholantren induziertes Fibrosarkom) wurden von Dr. P. Manegold (ICF, D-München) zur Verfügung gestellt <sup>43</sup> und in RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS kultiviert.

### **3.5 Versuchstiere**

A/J-Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann (D-Borchen), C57BL/6-Mäuse von Elevage Janvier (Frankreich) bezogen. Die Tiere wurden in individuell ventilierten Käfigen (Typ II Techniplast IVC System, Buguggiate, Italien), mit jeweils 5 Tieren/Käfig, unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Autoklaviertes Wasser und Futter (Sniff, Spezialdiät Maus: Haltung, D-Soest) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Raumtemperatur betrug 21 °C, bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 %. Der Tag/Nacht-Rhythmus war 12 h. Als Einstreu wurden Sägespäne (3/4 Faser, Abedd, A-Koeflach) verwendet. Außerdem war jeder Käfig mit einem Nagertunnel aus Holz (Abedd, A-Koeflach), Zellstoff und einem roten Maushaus (Techniplast, Italien) ausgestattet. Die Käfige wurden vor der Benutzung mit ihrer vollständigen Ausstattung autoklaviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens eine Woche nach Anlieferung an ihre neuen Umgebung gewöhnt. Die durchgeführten Versuche waren gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes von der Regierung Oberbayern genehmigt. Tierversuchsantrag: „Neuartige

Liposomen für den selektiven Wirkstofftransport in Verbindung mit regionaler Hyperthermie und den Gentransfer“; Az: 211-2531-85/01.

## **3.6 Behandlung**

### **3.6.1 Anästhesie**

Die Injektionsnarkose bestand aus Ketavet<sup>®</sup> 100 mg/ml (Pfizer, Pharmacia GmbH, D-Karlsruhe), Rompun<sup>®</sup> 2% (Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen) und isotonischer Natriumchloridlösung 0,9 % im Verhältnis 38,5:23:38,5. Von dieser Lösung wurden 50 µl/Maus i.p. injiziert. Während der Hyperthermiebehandlung wurde vor Ausklingen der Injektionsnarkose die Anästhesie mittels eines Gemischs aus Forene<sup>®</sup> (Abott, D-Wiesbaden) und Sauerstoff im Verhältnis 30:70 aufrechterhalten. Die Inhalationsnarkose wurde auch während der Tumorimplantation verwendet.

### **3.6.2 Implantation der Tumorzellen**

Die Versuche wurden in zwei syngenen Tumormodellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben durch Zellkultur vermehrt. Bei Erreichen von 70 - 80 % Konfluenz der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen 2 Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden sie 5 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde FKS enthaltendes Medium hinzugegeben. Die gewonnene Zellsuspension wurde 5 min bei 150 g zentrifugiert, der Überstand verworfen. Um alle Mediumrückstände zu entfernen wurden die Zellen drei Mal in PBS resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Nach der zweiten Resuspension in PBS wurden die Zellen in einer Rosenberg Zählkammer unter Durchlichtmikroskopie gezählt. Entsprechend dem Tumormodell wurden zur Implantation in A/J-Mäuse  $1 \times 10^6$  Neuro2A Zellen und zur Implantation in C57BL/6-Mäusen  $1,5 \times 10^6$  BFS-1 Zellen in 50 µl steriler, isoosmolarer Lösung suspendiert. Zum Zeitpunkt der Tumorimplantation waren die Mäuse 8 - 10 Wochen alt. Unter Isofluran Inhalationsnarkose wurden die Hintergliedmaßen mit einem elektrischen Rasierer geschoren. Die Zellsuspension wurde subkutan mit einer 25 G Nadel in eine bzw. beide Hintergliedmaßen injiziert.

### 3.6.3 Vermessen des Tumorvolumens

Jeden zweiten bis dritten Tag wurde mit einem digitalen Messschieber (Digi-Met, Peisser, D-Gammertingen) die Tumorgroße vermessen und das Körpergewicht kontrolliert. Es wurden Länge (a), Breite (b) und Höhe (c) bestimmt und mit den Werten das Tumorumen mit der Formel  $a \cdot b \cdot c \cdot 0,52$  (a: Länge, b: Breite, c: Höhe) errechnet. Nach Erreichen des für den Versuch gewünschten Tumorumens wurde mit der Behandlung begonnen.

### 3.6.4 Hyperthermieaufbau

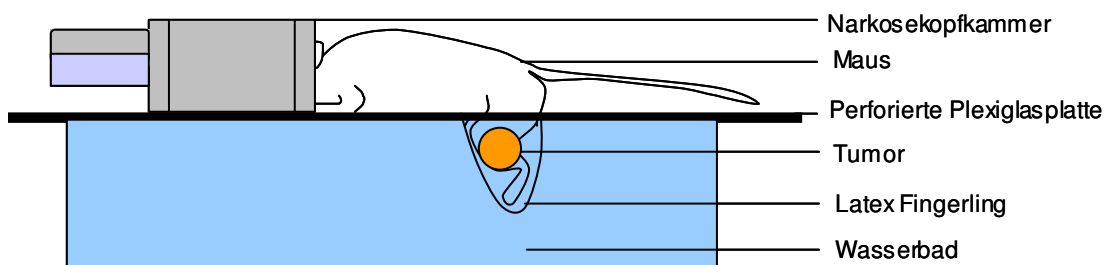


Abb. 9 Hyperthermieaufbau

Der Hyperthermieaufbau (Abb. 9) wurde in Anlehnung an den der Arbeitsgruppe von M. W. Dewhirst (Duke University Medical Center, Durham, USA-North-Carolina) entworfen<sup>20</sup>. Er besteht aus einem Wasserbad, das an einem Thermostat auf die gewünschte Temperatur eingestellt werden kann. Über dem Wasserbad befindet sich eine Plexiglasplatte mit im Durchmesser ca. 1 cm großen Löchern. Durch diese Löcher wurde die zu behandelnde Hintergliedmaße des Tieres in das Wasserbad

getaucht. Um eine Ödematisierung der Hintergliedmaße zu vermeiden<sup>20</sup>, wurde diese während der Behandlung in einen Fingerling aus Latex gesteckt. Zum Erhalt der Narkose ist für jeden Behandlungsplatz eine Kopfkammer, in die Inhalationsnarkotika geleitet werden können, auf der Plexiglasplatte fixiert.

Die Abhängigkeit der intratumoralen Temperatur von der Wasserbadtemperatur wurde in mehreren tumortragenden Tieren evaluiert. Dafür wurden Temperaturmesssonden (Greisinger electronic GmbH) intratumoral in der Mitte des Tumors, rectal und im Wasserbad platziert und über 70 min in Abständen von 2 min abgelesen. Dabei wurde eine mittlere Temperaturdifferenz von  $1\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$  festgestellt. Daher wurde die Wasserbadtemperatur für die Versuchsdurchführung so gewählt, dass sie  $1\text{ °C}$  höher als die für die Versuchsdurchführung zu erreichende intratumorale Temperatur war.

### **3.6.5 Regionale Hyperthermiebehandlung**

Nach Eintritt der Narkose wurde das für die Hyperthermiebehandlung vorgesehene Hinterbein in einen Fingerling aus Latex gesteckt und durch eine dafür vorgesehene Perforation in der Plexiglasplatte, in das bereits temperierte Wasserbad gehängt. Die andere Hintergliedmaße verblieb bei Zimmertemperatur ohne weitere Behandlung. Nach der Gewebeaufwärmphase wurde die Injektionslösung i.v. in die Schwanzvene appliziert. Die Körpertemperatur der Tiere wurde über den gesamten Behandlungsverlauf rektal mittels einer Messsonde (GTF 101-5/05150, Greisinger electronic GmbH) kontrolliert. Bei Anstieg der Körpertemperatur über einen kritischen Wert von  $35\text{ °C}$  wurde ein bereitstehender Ventilator in Betrieb genommen, um die Körpertemperatur der Tiere zu senken. Nach Beendigung der Hyperthermiebehandlung wurden alle Tiere bis zum Abklingen der Narkose auf einer temperaturkontrollierten Heizmatte gebettet und nach ihrem Erwachen zurück in den Käfig gesetzt.

### **3.6.6 Gentransfer Behandlung**

Alle Gentransfer Versuche wurden in 8 - 10 Wochen alten weiblichen und männlichen A/J-Mäusen, mit Neuro2A Tumoren an beiden Hintergliedmaßen,

14 - 15 Tage nach Tumorimplantation durchgeführt. Nach der i.v. Injektion der Polyplexe (50 µg DNS/20 g Maus) wurde sofort mit der Hyperthermiebehandlung (30 min, 42°C) des Tumors begonnen. Die Organe wurden 48 h nach Beendigung der Behandlung entnommen.

### **3.6.7 Liposomale Behandlung**

Alle Versuche, in denen Liposomen zum Einsatz kamen, wurden an männlichen, 8-10 Wochen alten C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Für die Bestimmung der Freisetzung liposomaler Therapeutika wurden beide Hintergliedmaßen der Mäuse mit einem BFS-1-Tumor beimpft. Sofort nach der Injektion wurde mit 30 min Hyperthermiebehandlung begonnen. Die Organ- und Blutproben wurden entweder sofort oder 24 h nach Behandlungsende entnommen. Liposomales Doxorubicin (Caelyx<sup>®</sup>, LDox) und freies Doxorubicin (Adriblastin<sup>®</sup>, FDox) wurden in einer Dosis von 5 mg Doxorubicin/kg verabreicht, die HePC-TSL in einer HePC-Dosis von 3,5 µmol/kg oder 35 µmol/kg. Für die therapeutische Studie wurde den Tieren nur ein BFS-1-Tumor in eine Hintergliedmaße implantiert. Es wurden 6 Gruppen (n = 8 - 11) mit LDox, FDox oder 0,9 % NaCl 60 min mit Hyperthermie bei 42°C oder Normothermie bei 34°C behandelt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 50 Tagen beobachtet und bei massiven Gewichtsverlust von über 15 % oder einer Tumorgößenzunahme über 1,5 cm in Länge, Breite oder Höhe euthanasiert.

## **3.7 Probenentnahme und Aufbereitung**

### **3.7.1 Blut-, Organentnahme und Lagerung**

Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Danach wurde die Bauchhöhle eröffnet und mit einer heparinisierten Spritze aus der V. cava Blut entnommen. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die Blutproben auf Eis gekühlt. Darauf folgend wurden die Organe entnommen und bei - 20°C eingefroren. Die Blutproben wurden 10 min bei 2400 g zentrifugiert, um das Plasma von den festen Blutbestandteilen zu trennen. Für die Histologie der Cy3-markierten Plasmid-DNS-Polyplexe wurden die Tumoren in Tissue Tek (Sakura, USA) gebettet. Alle Proben wurden anschließend bei - 80°C gelagert.



### 3.7.2 Luziferase-Reporter-Expressions-Assay

Tumor, Muskelgewebe (an den Hintergliedmaßen entnommen) und Leber wurden auf einer Feinwaage gewogen und zur Aufbereitung in jeweils 100 - 150 mg Gewebestücken in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Lunge, Herz, Milz und Niere wurden im Ganzen weiterverarbeitet. Die Gewebezerkleinerung wurde mit einem Tissue Lyser (Qiagen, D-Hilden) durchgeführt. Dazu wurde zu jeder Probe 500 µl Cell Lysis Puffer (Promega, D-Mannheim) 1:5 mit Wasser verdünnt und eine 5 mm Wolframcarbid-Kugel gegeben. Die Proben wurden 2 mal 4 min bei 30 Hz geschüttelt und zwischendurch mindestens 15 Min auf Eis gekühlt. Nach der Gewebezerkleinerung wurden die Homogenate eines Organs miteinander gepoolt. Vor der Vermessung wurden die Proben 10 Min mit 4400 g bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 25 µl entnommen und die Luziferaseaktivität im Luminometer LB9507 (Berthold, D-Bad Wildbad) gemessen<sup>44</sup>, der Hintergrund (150 RLU [relative light units]) abgezogen und die RLU/Organ errechnet. Die gemessenen Werte wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\text{RLU/Organ} = \frac{(\text{E} - 150 [\text{RLU}]) * (\text{OG} + \text{L})}{25 \mu\text{l}}$$

E: gemessene Expression [RLU]; OG: Organgewicht [mg]; L: Lysispuffer [µl]

### 3.7.3 Histologie

Die Plasmid DNA wurde mittels Label IT Cy3 Kit (Mirus, Madison, WI) markiert. Die Polyplexe wurden wie in Kapitel 3.2. beschrieben synthetisiert (unter Zugabe von 20 % Cy3-gelabetem Plasmid, 80 % ungelabeltem Plasmid) und die A/J Mäuse, wie in Kapitel 2.6.6. beschrieben, behandelt. 4 h nach Behandlungsende wurden die Tumoren entnommen, in Tissue Tek eingebettet und bei – 80°C gelagert.

### Immunohistologie

Für die Immunohistologie wurden von den Tumoren mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Leica CM 3050s, Bensheim) bei – 20 °C 5 - 10 µm dünne Histologiepräparate angefertigt. Die Präparate wurden mit 4 % Paraformaldehyd 5 min auf Objektträgern fixiert und anschließend mit MACS-Puffer (PBS mit 5 % FKS) rehydriert. Zur

Darstellung von Endothelzellen wurden die Schnitte 12 h bei 4°C in feuchter Atmosphäre mit Ratten-anti-Maus CD31 Antikörper (CALTAG, Burlingame, USA) 1:200 in MACS-Puffer verdünnt inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut mit MACS-Puffer gewaschen und mit ALEXA488 Ziege-anti-Ratten Antikörper (Invitrogen, Oregon, USA) in einer 1:200 Verdünnung in MACS-Puffer für 2 h in feuchter Atmosphäre bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Boehringer, Mannheim) angefärbt. Vor dem Mikroskopieren wurden die Präparate mit MACS-Puffer gewaschen und in Vectashield® eingebettet.

### **Epifluoreszenz-Mikroskopie**

Unter einem Axiovert 200 Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss, D-Jena), ausgerüstet mit einer Zeiss AxioCam Kamera, wurde mit Hilfe eines 546 +/- 12 nm Filters (Em: 575 – 640 nm) die Cy3-Fluoreszenz angeregt und gemessen. Zur Darstellung der CD31-Endothelfärbung wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 520 nm detektiert. Die digitale Bildverarbeitung wurde mit der Software Axiovision 3.1 von Zeiss durchgeführt. Die Bilder wurden unter einem 63 x 1,4 NA Immersions-Objektiv von Zeiss aufgenommen.

### **3.7.4 Nachweis von Doxorubicin mittels HPLC**

#### **3.7.4.1 Doxorubicin Nachweis aus Plasma**

Zur Aufbereitung der Plasmaproben wurden 50 µl Plasma mit 450 µl PBS, 100 µl Daunorubicin (10 µg/ml interner Standard) und 5000 µl Dichlormethan-Isopropanollösung (1:10; v:v) 10 min in Reagenzgläsern im Reax 2 Überkopfmischer (Heidolph) gemischt. Danach wurden die Proben 10 min bei 1900 g in einer Minifuge (Heraeus RF) bei Raumtemperatur zur Phasentrennung zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde mittels Pasteurpipette entnommen, in ein neues Reagenzglas überführt und bei 40°C in einem Reacti-Therm Heizblock unter Zufuhr von Stickstoff über eine Reacti-Vap Bedampfungseinheit getrocknet. Die eingedampften Rückstände wurden in 1000 µl KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM und Acetonitril (730:270) gelöst und 20 min bei 4400 g zentrifugiert.

### 3.7.4.2 Doxorubicin Nachweis aus Gewebe

Um Doxorubicin aus Gewebeproben nachzuweisen, wurden diese abgewogen und in Mengen von je 100 - 120 mg in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Zu jeder Gewebeprobe wurden 100 µl Daunorubicin (10 µg/ml interner Standard), 500 µl Wasser, 1000 µl Methanol und eine 3 mm Wolframcarbid-Kugel gegeben. Die Gewebeproben wurden im Tissue Lyser (Qiagen, D-Hilden) 3 mal 5 Min bei 30 Hz zerkleinert. Die Homogenate wurden auf Eis gestellt und nach Zugabe von 200 µl 33 %iger Silbernitratlösung 10 min stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben in Reagenzgläser überführt, 5000 µl Dichlormethan-Isopropanollösung (2:1; v:v) dazu gegeben und 10 min im Reax 2 Überkopfmischer (Heidolph) gemischt. Danach wurden die Proben 10 min bei 1900 g in einer Minifuge (Heraeus RF) bei Raumtemperatur zur Phasentrennung zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, in ein Reagenzglas überführt und bei 40°C in einem Reacti-Therm Heizblock unter Zufuhr von Stickstoff über eine Reacti-Vap Bedampfungseinheit getrocknet. Die eingedampften Rückstände wurden in 1000 µl  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  80 mM und Acetonitril (730: 270) gelöst und 20 min bei 4400 g zentrifugiert.

Die Proben wurden auf einer Waters HPLC mit 2 Waters 510 HPLC Pumpen, Autoinjektor 717 plus, Fluoreszenzdetektor 470 (Ex 480 nm, Em 560) gemessen. Die Trennung erfolgte auf einer C18 Aquasäule (5 µm Partikelgröße, 125 Å Porengröße, 250 mm x 4.6 mm) von Phenomex Ltd. (Deutschland). Dazu wurden 100 µl der extrahierten Probenlösung auf die HPLC injiziert und mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert.

### 3.7.5 Hexadecylphosphocholin (HePC) mittels LC-MS/MS

Um HePC aus Gewebeproben nachzuweisen wurden diese abgewogen und in Mengen von je 100 - 120 mg in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Zu jeder Gewebeprobe wurden 100 µl OLPC (interner Standard), 500 µl Wasser, 1000 µl Methanol und eine 3 mm Wolframcarbid-Kugel gegeben. Die Gewebeproben wurden im Tissue Lyser (Qiagen, D-Hilden) 3 mal 5 Min bei 30 Hz zerkleinert. Darauf folgend wurden die Proben in spitze Reagenzgläser überführt, nach der Zugabe von 400 µl

4 % NaCl und 1000 µl Chloroform gemischt und 10 min bei 1900 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren bildeten sich 2 Phasen, von denen die organische Phase in ein neues Reagenzglas überführt wurde. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit 1200 µl Chloroform extrahiert, die erhaltenen organischen Phasen gepoolt und 10 min bei 1900 g zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden nun bei 40°C unter Zufuhr von Stickstoff getrocknet. Die Rückstände wurden vor der Messung in 5 ml Methanol (90 %ig) gelöst und 10 min bei 4400 g zentrifugiert. Um den HePC-Gehalt zu bestimmen wurden die Proben von Herrn PD Dr. Vogeser, im Institut für Klinische Chemie des Klinikum Großhadern in München, mittels LC-MS/MS vermessen.

### **3.7.6 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertungen wurde der Mann Whitney U-Test verwendet (WinStat, R. Fitch Software, D- Bad Krozingen). Die Erstellung der Diagramme und die Berechnung der Rohdaten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Auf Grund der teilweise großen Streuung der Luziferasexpression in den einzelnen Gruppen wurde für die Auswertung der Gentransferversuche der Medianwert angegeben. Zur Auswertung der Versuche mit liposomalen Therapeutika wurde der Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Thermosensitiver Gentransfer

Ziel der Gentransferversuche war die Evaluierung der Reporterexpression der von Zintchenko et al.<sup>25</sup> beschriebenen thermosensitiven Kopolymere PVP10 (PT 42 °C) und PVP20 (PUT 46 °C) im Tiermodell. Die Expressionsraten wurden mit denen von nicht thermosensitiven, standardisierten Gentransfersystemen wie LPEI, BPEI und PEG-BPEI verglichen. Die PVP-Kopolymere sind Ladungsneutral (Zetapotential: – 3 bis + 2 mV), wohingegen sowohl die BPEI-, als auch die LPEI-Polyplexe positiv geladen sind (Zetapotential: + 30 mV). Außerdem wurde die Reporterexpression von PEGylierten BPEI-Polyplexen (PEG-BPEI) in Abhängigkeit von Hyperthermiebehandlung untersucht. Durch die Abschirmung mit PEG sind die Polyplexe neutral geladen. Die eingesetzten Polyplexe hatten eine Größe von 150 – 200 nm. Die Reporterexpressionen wurden in Neuro2A Tumor tragenden A/J Mäusen untersucht (siehe Kapitel 3.6.6.) und in den unterschiedlichen Organen mittels Luziferase-Expressions-Assay bestimmt (siehe Kapitel 3.7.2.).

#### 4.1.1 LPEI Luziferaseexpression

Behandlungsbeginn war Tag 14 nach Tumorimplantation. Die Tumoren hatten ein mittleres Volumen von ca. 70 mm<sup>3</sup> (~ 430 mg Tumorgewicht bei Entnahme). Die Luziferaseexpression in der Lunge war mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Die Expression der übrigen Organproben nahm in der Reihenfolge Leber, hyperthermierter Tumor, Herz, Nieren, Milz, nicht hyperthermierter Tumor, hyperthermierter Muskel und nicht hyperthermierter Muskel ab (Abb. 10). Im Vergleich zu den hyperthermierten Tumoren zeigten die Lungen eine 682-fache und die Lebern eine um zweifach höhere Luziferaseexpression. In den hyperthermierten Tumoren konnte eine vier mal höhere Expression, als in den nicht hyperthermierten Tumoren und eine neun mal höhere Expression, als in den hyperthermierten Muskeln gemessen werden. In der Gegenüberstellung hyperthermierte versus nicht hyperthermierte Tumoren (Abb. 11) wird deutlich, dass die Anreicherung in den hyperthermierten Tumoren nicht signifikant höher als in den nicht hyperthermierten

Tumoren war. Dennoch wurde im Vergleich eine höhere Luziferaseexpression, in 4 von 5 erwärmten Tumoren festgestellt.

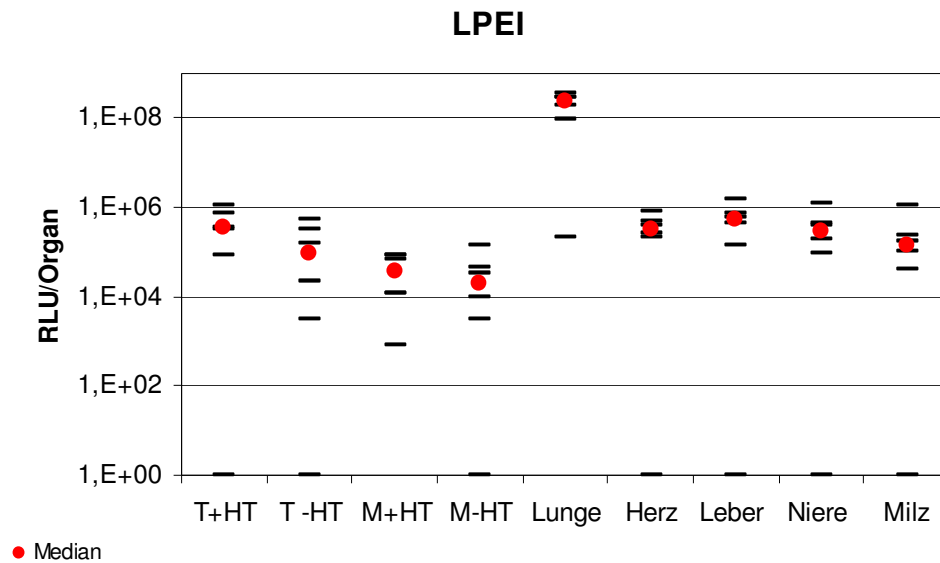


Abb. 10 Luziferase-Reportergenexpression 48 h nach i.v. Applikation von LPEI-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 5); Tumorgewicht: ~ 430 mg. Die Expressionsraten der hyperthermierten Tumoren waren vierfach höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren. Es war in allen Organen eine hohe Reportexpression messbar. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

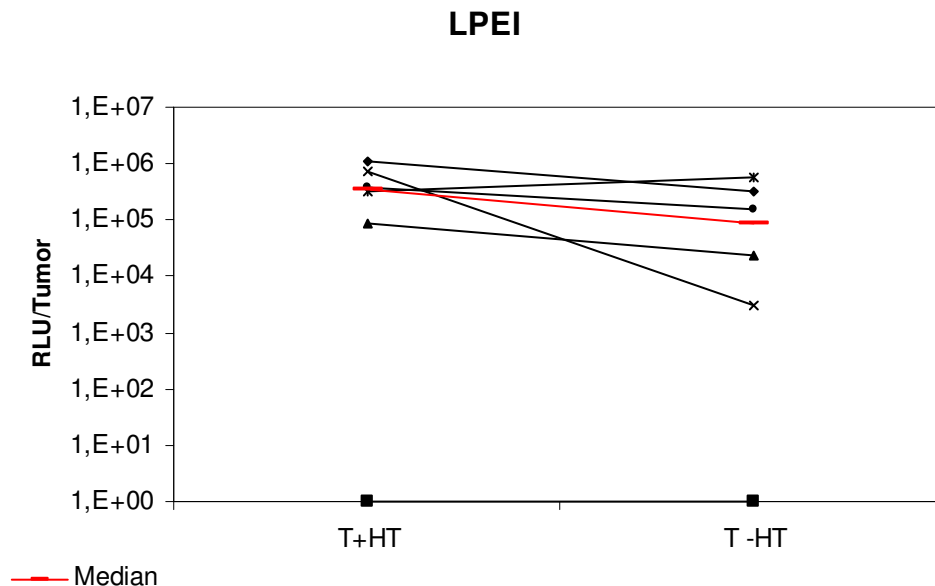


Abb. 11 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von LPEI-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 5); Tumorgewicht: ~ 430 mg. Die Expressionsraten der hyperthermierten Tumoren waren in 4 von 6 Tieren höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

### 4.1.2 BPEI Luziferaseexpression

Behandlungsbeginn war an Tag 15 nach Tumorimplantation. Das mittlere Tumorgewicht betrug ca. 250 mm<sup>3</sup> (~ 1070 mg Tumorgewicht bei Entnahme). Die Luziferaseexpression in der Lunge war am stärksten ausgeprägt. Die Expression der übrigen Proben nahm in der Reihenfolge hyperthermierter Tumor, nicht hyperthermierter Tumor, Nieren, hyperthermierter Muskel, Leber, nicht hyperthermierter Muskel, Herz und Milz ab (Abb. 12). Im Vergleich zu den hyperthermierten Tumoren zeigten die Lungen eine zehnfach höhere Expression. Die Expression der Tumoren war in den nicht hyperthermierten verglichen mit den hyperthermierten fast gleich hoch. Aus dem in (Abb. 13) dargestellten Vergleich der Tumoren ist ersichtlich, dass die Luziferaseexpression der Tumoren unabhängig von der Hyperthermiebehandlung war.

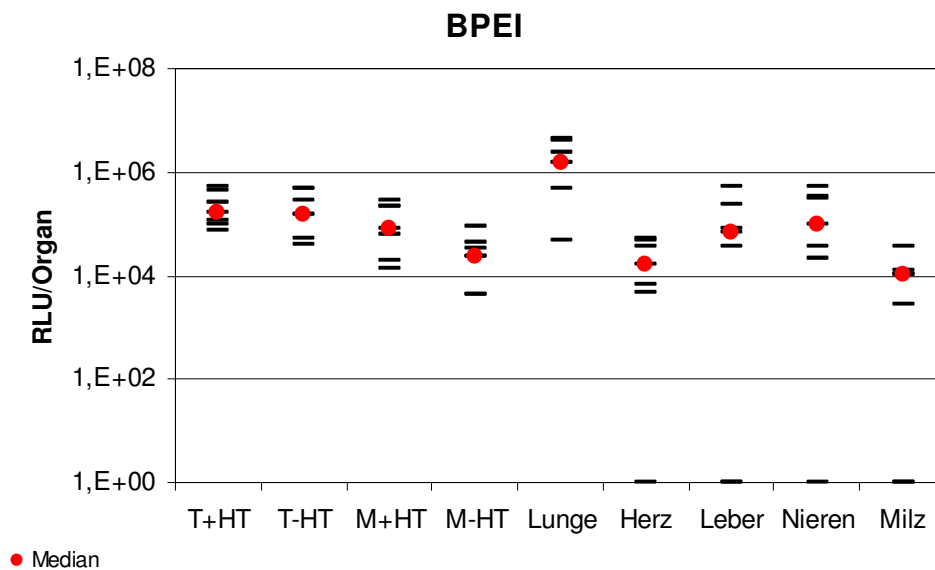


Abb. 12 Luziferase-Reporterexpression 48 h nach i.v. Applikation von BPEI-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 7); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Die Expressionsraten der Tumoren waren unabhängig von der Behandlung fast gleich hoch. Es war in allen Organen eine hohe Reporterexpression messbar. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

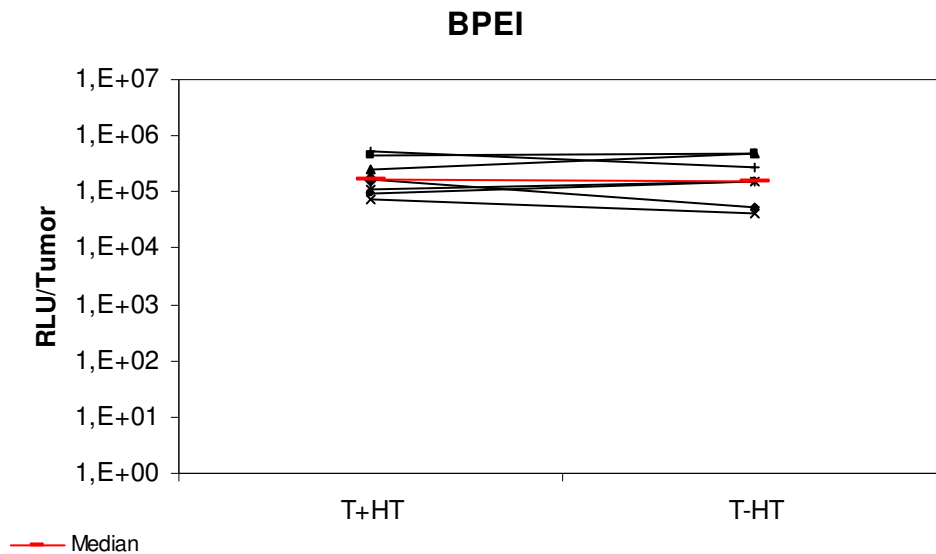


Abb. 13 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von BPEI-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung ( $n = 7$ ); Tumorgewicht:  $\sim 1070$  mg. Es konnte kein Einfluss der Hyperthermiebehandlung auf die Reporterexpression der Tumoren beobachtet werden. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

#### 4.1.3 PEG-BPEI Luziferaseexpression

Die Behandlung wurde an Tag 15 nach Tumorimplantation durchgeführt. Das mittlere Tumolvolumen betrug ca.  $250 \text{ mm}^3$  ( $\sim 1070$  mg Tumorgewicht bei Entnahme). Die Luziferaseexpression war am stärksten im nicht hyperthermierten Tumor ausgeprägt. Die Expression der übrigen Proben nahm in der Reihenfolge Leber, hyperthermierter Tumor und Lunge ab (Abb. 14). Im hyperthermierten sowie nicht hyperthermierten Muskel, Herz, Nieren und Milz konnte keine organspezifische Luziferaseexpression festgestellt werden. Im Vergleich zu den hyperthermierten Tumoren zeigten die nicht hyperthermierten Tumoren eine über sechsfach, die Lebern eine zweifach höhere und die Lungen eine zwölfmal niedrigere Expression. Die Gegenüberstellung hyperthermierte versus nicht hyperthermierte Tumoren (Abb. 15) zeigt, dass die Luziferaseexpression der Tumoren nicht in Korrelation mit der Hyperthermiebehandlung stand. In zwei von den insgesamt 14 Tumoren konnte keine Expression gefunden werden.



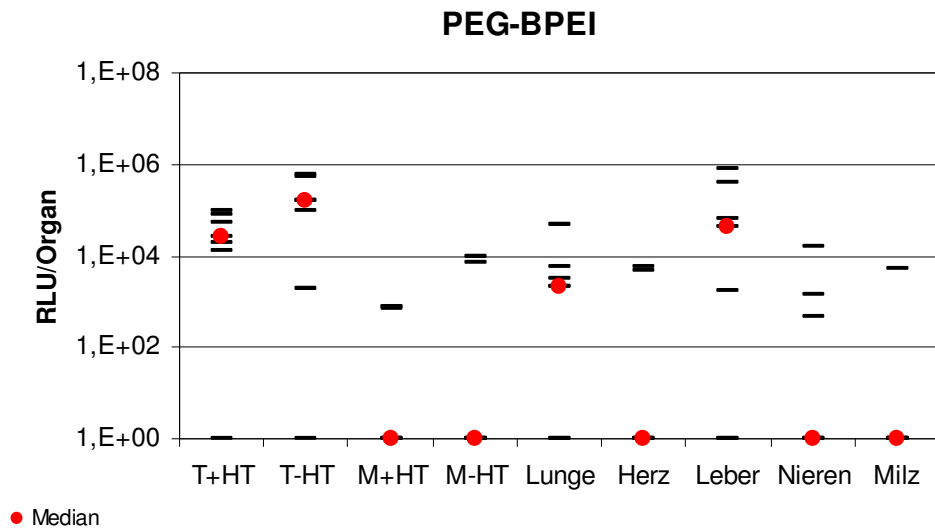


Abb. 14 Luziferase-Reporterexpression 48 h nach i.v. Applikation von PEG-BPEI-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 7); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Die Expressionsrate der nicht hyperthermierten Tumoren war 6-fach höher als die der hyperthermierten Tumoren. Es war in Lungen und Lebern eine hohe Reporterexpression messbar. In hyperthermierten sowie nicht hyperthermierten Muskeln, Herz, Nieren und Milz konnte keine organspezifische Luziferaseexpression festgestellt werden. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

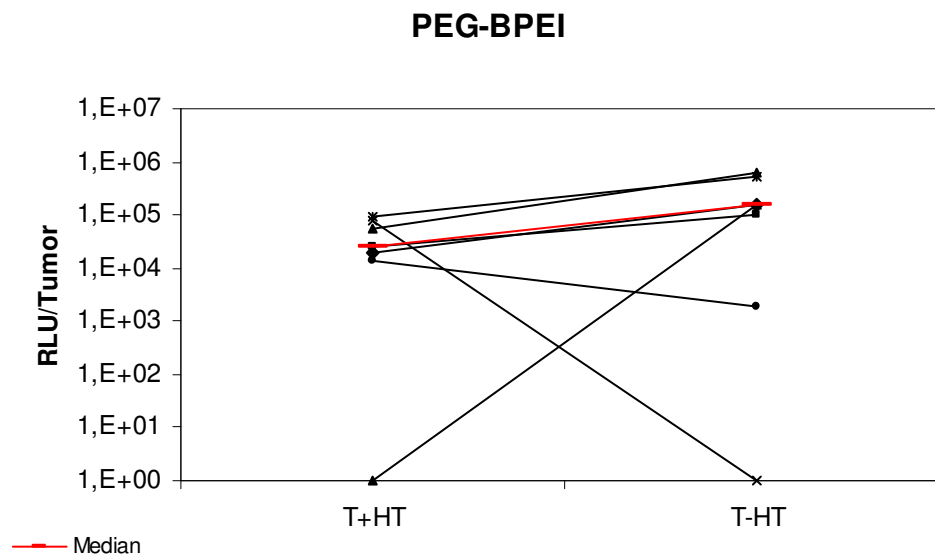


Abb. 15 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PEG-BPEI-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 7); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Es konnte kein Einfluss der Hyperthermiebehandlung auf die Reporterexpression der Tumoren beobachtet werden. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

#### 4.1.4 PVP Luziferaseexpression

##### 4.1.4.1 Evaluierung Luziferaseexpression PVP10 und PVP20

In der ersten Versuchsreihe wurde die Reporterexpression der beiden thermosensitiven Kopolymere PVP10 (PT 42°C) und PVP20 (PT 46°C) evaluiert, um deren Effizienz und Spezifität in vivo zu vergleichen. Behandlungsbeginn war Tag 14 nach Tumorimplantation. Die Tumoren hatten ein mittleres Volumen von ca. 70 mm<sup>3</sup> (~ 430 mg Tumorgewicht bei Entnahme).

Nach PVP10 Applikation war die Luziferaseexpression der hyperthermierten Tumoren am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich war die Luziferaseexpression der Lunge um den Faktor 12 geringer (Abb. 16). In den übrigen Organen konnte keine organspezifische Luziferaseexpression festgestellt werden. Bei der Gegenüberstellung der hyperthermierten und nicht hyperthermierten Tumoren (Abb. 17) wird deutlich, dass die Luziferaseexpressionen der hyperthermierten Tumoren signifikant ( $p = 0,03$ ) höher war.

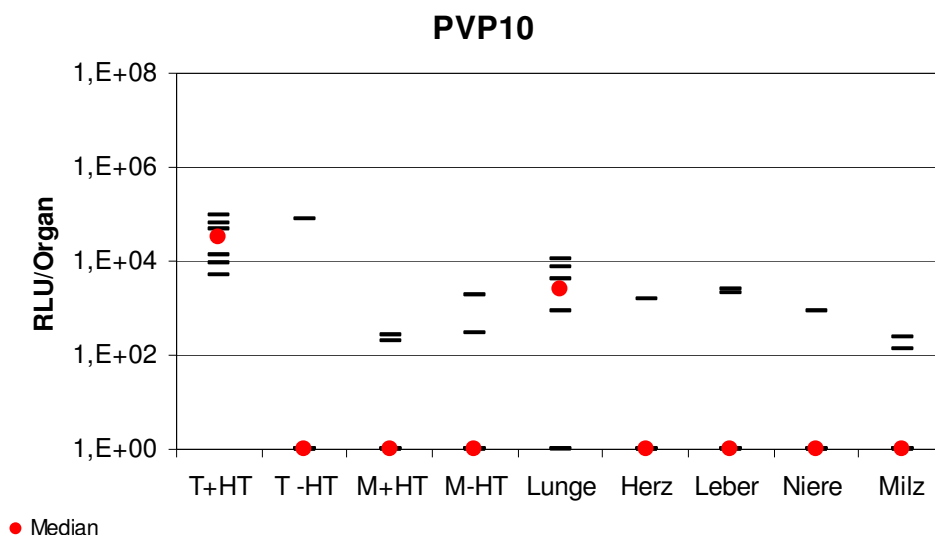


Abb. 16 Luziferase-Reporterexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung ( $n = 6$ ); Tumorgewicht: ~ 430 mg. Die Expressionsrate der hyperthermierten Tumoren war signifikant höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren ( $p = 0,03$ ). Es konnte außer in den Lungen keine organspezifische Reporterexpression gemessen werden. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

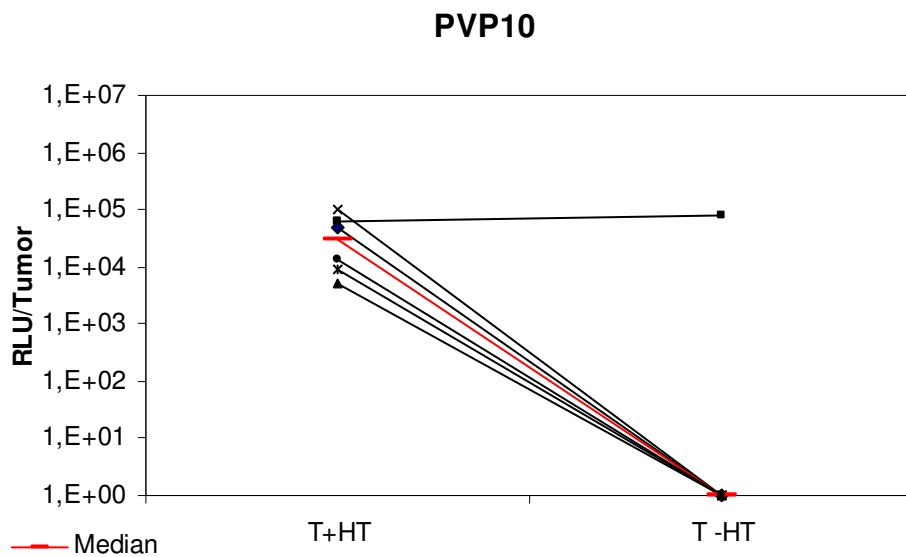


Abb. 17 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung ( $n = 6$ ); Tumorgewicht: ~ 430 mg. Die Reporterexpression der hyperthermierten Tumoren war signifikant höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren ( $p = 0,03$ ). Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

Nach der Applikation von PVP20-Polyplexen war die Luziferaseexpression in den hyperthermierten Tumoren wie bei Behandlung mit PVP10-Polyplexen am stärksten ausgeprägt (Abb. 18). Die Expressionsrate der Lungen im Vergleich zu der der hyperthermierten Tumoren war um den Faktor sieben geringer. Dennoch war sie höher, als in den Lungen der mit PVP10 behandelten Tiere. Außer in der Milz konnte in den übrigen Organen keine organspezifische Expression detektiert werden. Die Gegenüberstellung der Tumorzufiferaseexpressionen (Abb. 19) zeigt, dass die Luziferaseexpression in den hyperthermierten Tumoren signifikant ( $p = 0,01$ ) höher war als in den nicht hyperthermierten Tumoren. In einem Tier war nur im nicht hyperthermierten Tumor eine Reporterexpression zu finden.

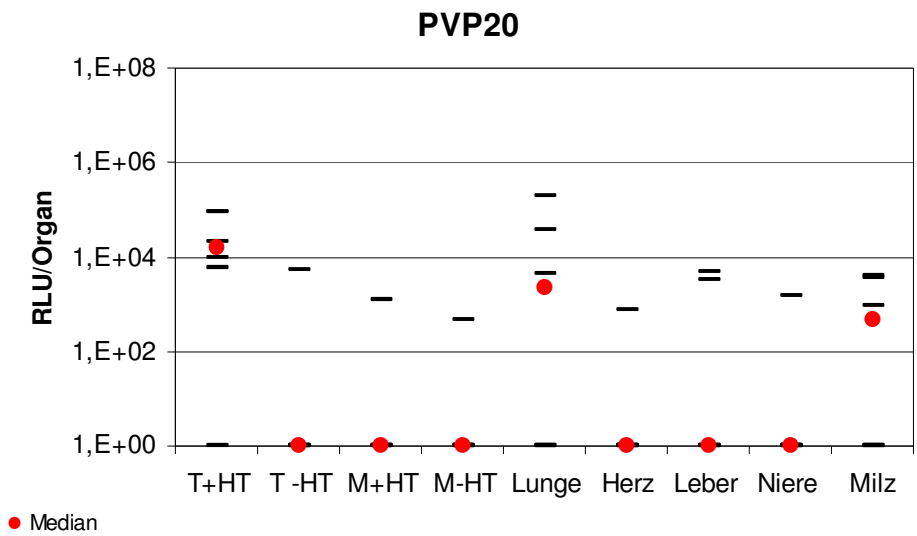


Abb. 18 Luziferase-Reportergenexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP20-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 6); Tumorgewicht: ~ 430 mg. Die Expressionsrate der hyperthermierten Tumoren war signifikant höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren (p = 0,01). Es konnte außer in den Lungen und der Milz keine organspezifische Reportergenexpression gemessen werden. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median..

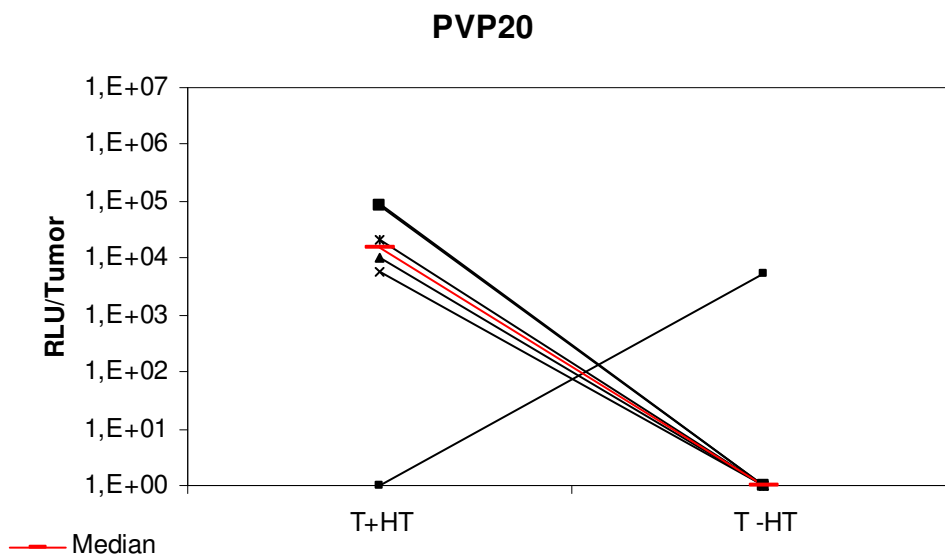


Abb. 19 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP20-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 6); Tumorgewicht: ~ 430 mg. Die Reportergenexpression der hyperthermierten Tumoren war signifikant höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren (p = 0,01). Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

Die Reporterexpression der PVP10-Polyplexe zeigen im Vergleich zu den PVP20-Polyplexen höhere Luziferaseexpressionsraten in den hyperthermierten Tumoren. Des Weiteren war im Mittel die Luziferaseexpression in den Lungen und anderen Organen nach Applikation der PVP10-Polyplexe niedriger. Da die Luziferaseexpressionseffizienz nach Applikation von PVP10 im hyperthermierten Tumor höher und dabei die in den restlichen Organen niedriger war, als die der PVP20-Polyplexe, wurden in weiteren Versuchen die PVP10-Polyplexe verwendet.

#### **4.1.4.2 Einfluss der TumorgroÙe auf PVP10 Luziferaseexpression**

Um Unterschiede in Effizienz und Spezifität der PVP10-Polyplexe in Abhängigkeit von der TumorgroÙe zu evaluieren wurde im nächsten Ansatz die Behandlung an deutlich größeren Tumoren mit einem mittleren Tumolvolumen von ca. 250 mm<sup>3</sup> (~ 1070 mg Tumorgewicht bei Entnahme) durchgeführt. Die Luziferaseexpression im hyperthermierten Tumor war am stärksten ausgeprägt. Die Expression der übrigen Organe nahm in der Reihenfolge nicht hyperthermierter Tumor, hyperthermierter Muskel, Lunge und Nieren ab (Abb. 20). Im nicht hyperthermierten Muskel, Leber, Herz und Milz konnte keine organspezifische Luziferaseexpression festgestellt werden. Im Vergleich zu den hyperthermierten Tumoren zeigten die nicht hyperthermierten Tumoren eine vierfach, die hyperthermierten Muskeln eine fünffach und die Lungen eine achtfach niedrigere Expressionen. In der Gegenüberstellung der Tumorzufiferaseexpressionsraten (Abb. 21) war die Anreicherung in den hyperthermierten Tumoren nicht signifikant höher als in den nicht hyperthermierten Tumoren ( $p = 0,58$ ). Dennoch wurde im Vergleich eine höhere Luziferaseexpression, in 6 von 8 erwärmten Tumoren festgestellt. In zwei der nicht hyperthermierten Tumoren konnte keine Luziferaseexpression gemessen werden.

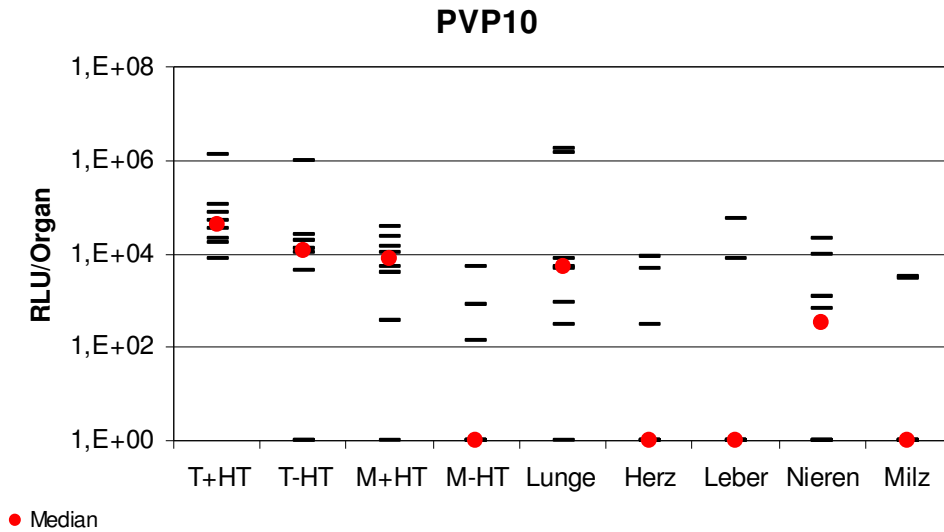


Abb. 20 Luziferase-Reportergenexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 8); Tumorgewicht: ~1070 mg. Die Expressionsrate der hyperthermierten Tumoren war am stärksten ausgeprägt und vierfach höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren. Es konnte außer in den Lungen, Nieren und hyperthermierten Muskeln keine organspezifische Reportergenexpression gemessen werden. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

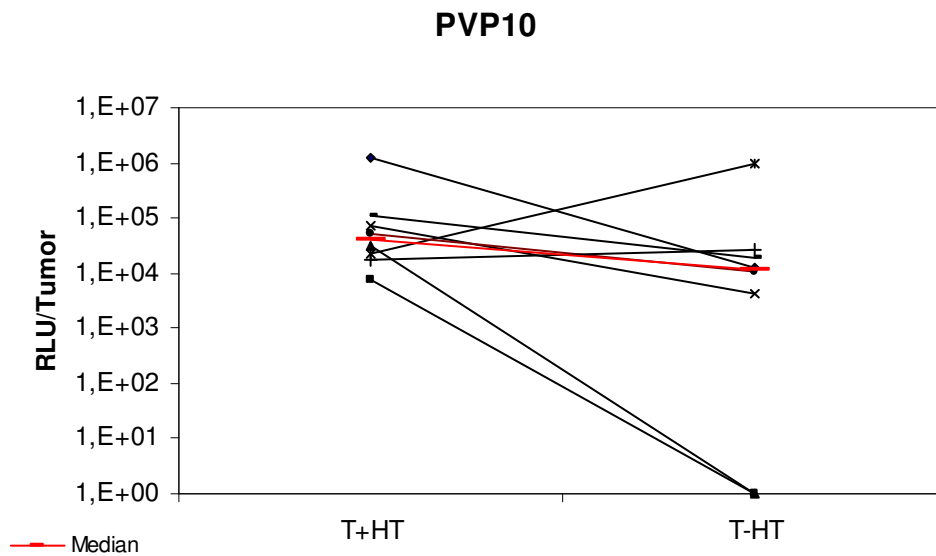


Abb. 21 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 8); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Die Expressionsraten der hyperthermierten Tumoren waren in 6 von 8 Tieren höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

Um die Auswirkung der Tumorgößen auf die Expressionsrate genauer zu untersuchen, wurden die Versuche mit den PVP10-Polyplexen in 4 Gruppen wiederholt. Dabei wurden zwei Gruppen ( $n = 5$ ) nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca.  $70 \text{ mm}^3$  ( $\sim 300 \text{ mg}$  Tumorgewicht bei Entnahme), zwei weitere Gruppen ( $n = 5$ ;  $n = 4$ ) nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca.  $250 \text{ mm}^3$  ( $\sim 1070 \text{ mg}$  Tumorgewicht bei Entnahme) behandelt. In den Gruppen mit den gleichen Tumolvolumina wurde eine nach Applikation von PVP mit, die andere ohne Hyperthermie behandelt.

Bei den mit Hyperthermie behandelten Tieren mit einem Tumorgewicht von ca.  $300 \text{ mg}$  wurde die höchste Luziferaseexpression im hyperthermierten Tumor gemessen (Abb. 22). In den restlichen Organen konnte keine Reporterexpression festgestellt werden. Die Gegenüberstellung der Tumorzufiferaseexpressionen (Abb. 23) zeigt, dass in 3 von 5 hyperthermierten Tumoren und 2 von 5 nicht hyperthermierten Tumoren Luziferaseexpression gemessen wurde. In zwei Tieren wurde nur in den hyperthermierten Tumor Luziferaseexpression detektiert. Bei einem der 5 Tiere wurde in keinem der beiden Tumoren Luziferaseexpression gemessen.

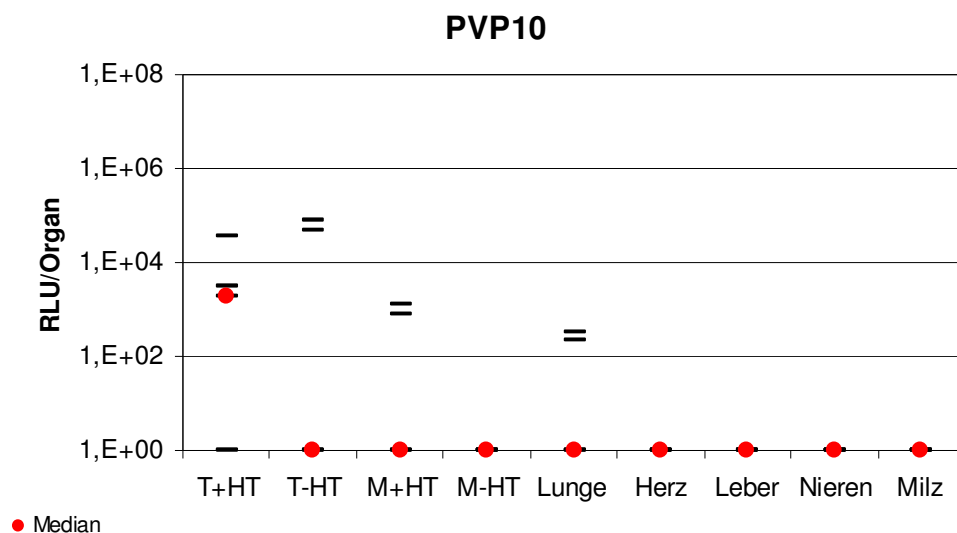


Abb. 22 Luziferase-Reporterexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen ( $50 \mu\text{g}$  Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung ( $n = 5$ ); Tumorgewicht:  $\sim 300 \text{ mg}$ . Der bestimmte Medianwert der hyperthermierten Tumoren zeigt eine höhere Expressionsrate als der der nicht hyperthermierten Tumoren. Es konnte keine weitere organspezifische Reporterexpression gemessen werden. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

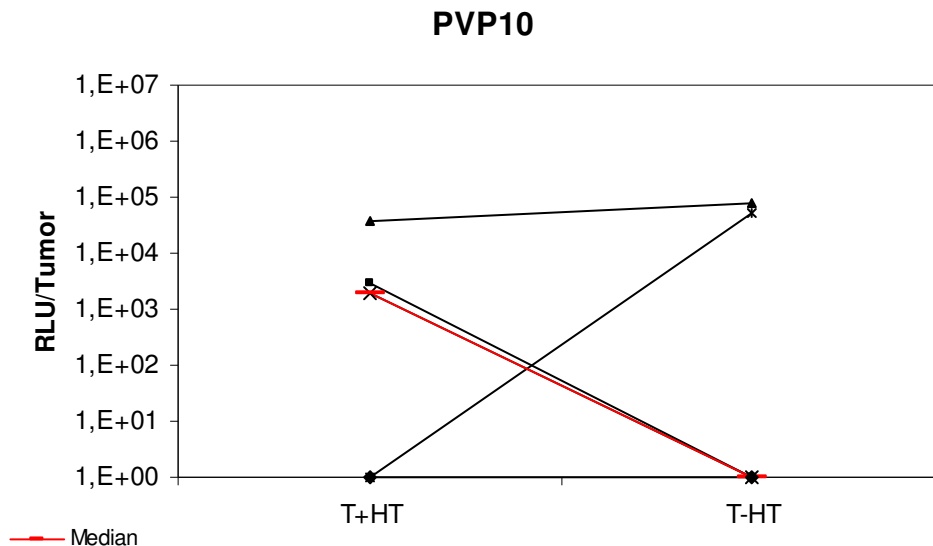


Abb. 23 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung ( $n = 5$ ); Tumorgewicht: ~ 300 mg. Es wurde in 3 von 5 hyperthermierten Tumoren und 2 von 5 nicht hyperthermierten Tumoren eine hohe Reporterexpression gemessen. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Bei einem der 5 Tiere konnte in keinem der beiden Tumoren Luziferaseexpression gemessen werden. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

Im Vergleich konnte bei der ohne Hyperthermie behandelten Gruppe mit einem Tumorgewicht von ca. 300 mg zusätzlich zu den hyperthermierten Tumoren eine organspezifische Expression der Lunge sowie dem Herz festgestellt werden (Abb. 24). Dabei war die Luziferaseexpressionsrate des Lungengewebes fast gleich hoch wie die der Tumoren der rechten Hintergliedmaße. In den restlichen Organen konnte keine organspezifische Expression festgestellt werden. Bei der Tumorgegenüberstellung (Abb. 25) wurde Luziferaseexpression bei einem Tier in beiden und in den restlichen 4 Tieren nur in einem der beiden Tumoren gefunden. Die Luziferaseexpression der Tumoren variierte intraindividuell.



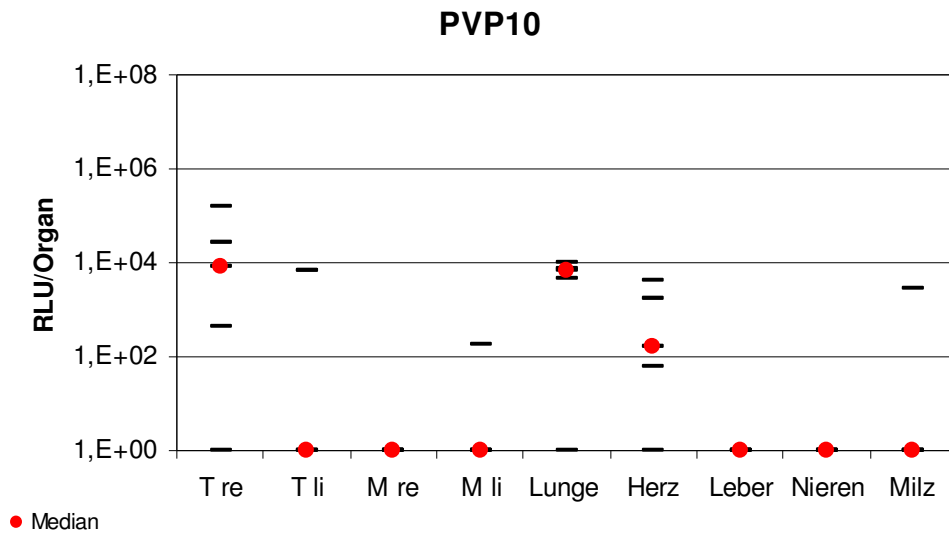


Abb. 24 Luziferase-Reportergenexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) ohne Hyperthermiebehandlung (n = 5); Tumorgewicht: ~ 300 mg. Der Medianwert der Tumoren der rechten Hintergliedmaße zeigt eine höhere Expressionsrate als der der linken. Es konnte außer in den Lungen und Herzen keine weitere organspezifische Reportergenexpression gemessen werden. Legende: T re: Tumor rechte Hintergliedmaße; T li: Tumor linke Hintergliedmaße; M re: Muskel rechte Hintergliedmaße; M li: Muskel linke Hintergliedmaße; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

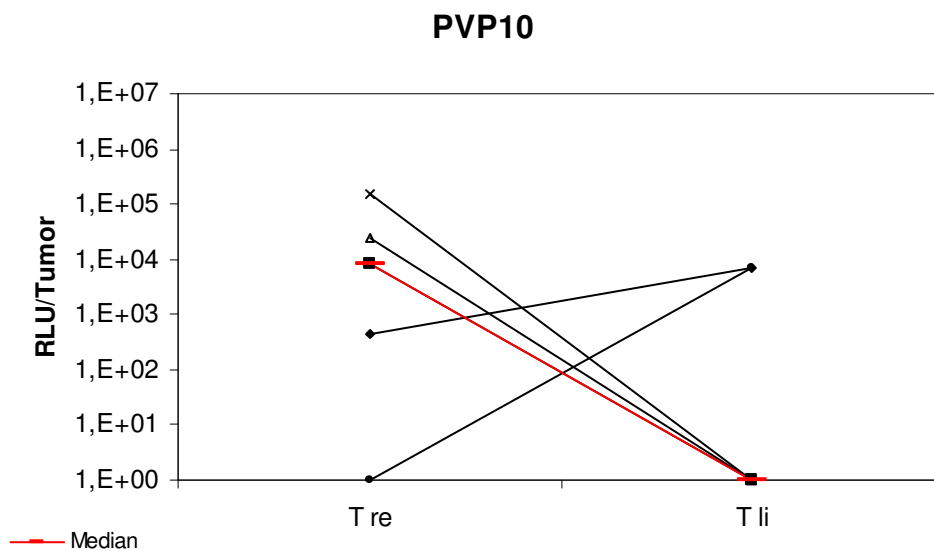


Abb. 25 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen ohne Hyperthermiebehandlung (n = 5); Tumorgewicht: ~ 300 mg. Es wurde in den Tumoren von beiden Hintergliedmaßen intraindividuell eine hohe Reportergenexpression gemessen. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression der Tumoren der rechten (T re) und der linken (T li) Hintergliedmaße; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

Bei den Tieren mit großen Tumoren, die ein Tumorgewicht von ca. 1070 mg hatten und mit Hyperthermie behandelt wurden, wurde die höchste Luziferaseexpression im hyperthermierten Tumor gemessen, gefolgt vom nicht hyperthermierten Tumor, Lunge und Herz (Abb. 26). Die Expressionsrate in den hyperthermierten Tumoren war siebenfach höher als die in den nicht hyperthermierten Tumoren. In den Muskelproben, Lebern, Nieren und Milzen konnten keine organspezifischen Expressionen festgestellt werden. Beim Vergleich der Tumorzufiferaseexpression (Abb. 27) war diese zwar in allen hyperthermierten Tumoren höher als in den nicht hyperthermierten Tumoren der anderen Extremität, aber nicht signifikant. Zwei der nicht hyperthermierten Tumoren zeigten keine Luziferaseexpression.

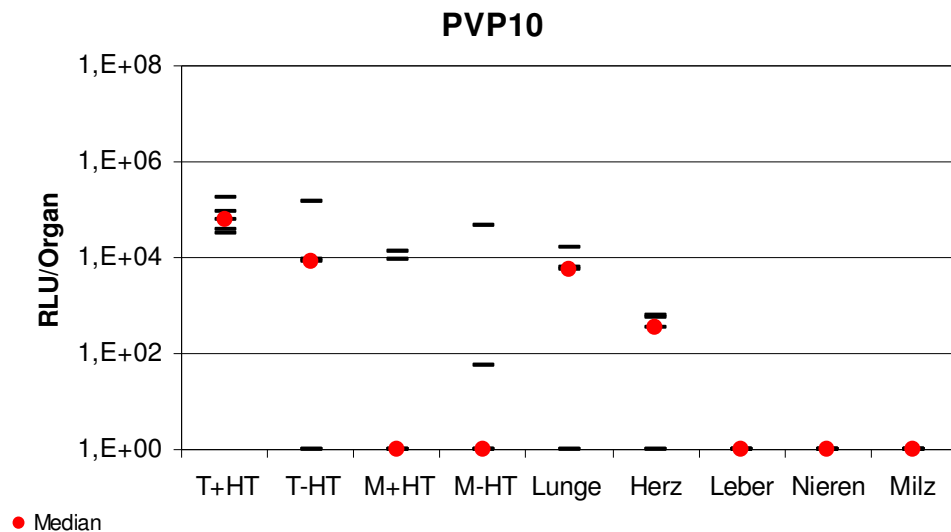


Abb. 26 Luziferase-Reportergenexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 5); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Die Expressionsrate der hyperthermierten Tumoren war am stärksten ausgeprägt und höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren. Es konnte außer in den Lungen und Herzen keine organspezifische Reportergenexpression gemessen werden. Legende: T + HT: hyperthermierter Tumor; T - HT: nicht hyperthermierter Tumor; M + HT: hyperthermierter Muskel; M - HT: nicht hyperthermierter Muskel; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

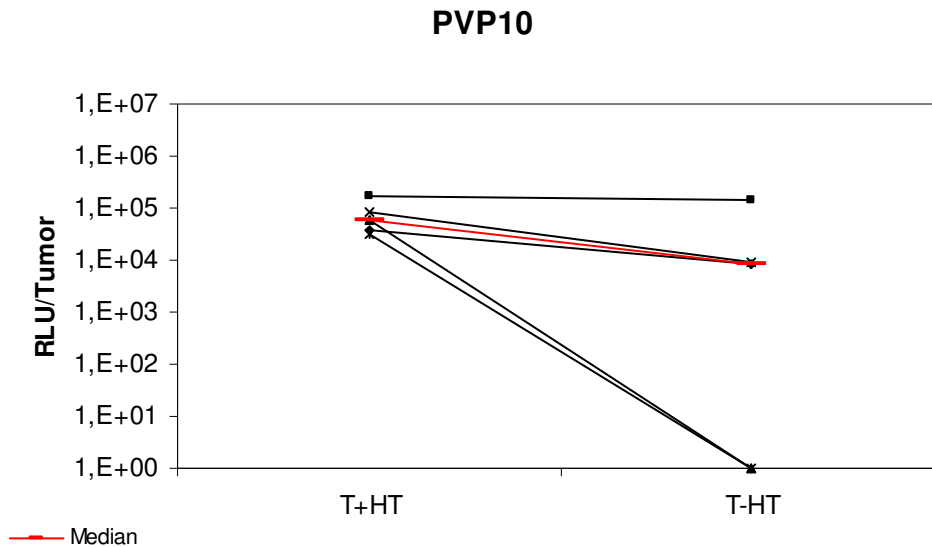


Abb. 27 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 5); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Die Reporterexpression des hyperthermierten Tumors in einem Tier war höher als die des nicht hyperthermierten Tumors. In zwei der nicht hyperthermierten Tumoren wurde keine Luziferaseexpression gemessen. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression von hyperthermiertem (T + HT) und nicht hyperthermiertem Tumor (T - HT) der einzelnen Tiere; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

In großen Tumoren mit einem Gewicht ca. 1070 mg, die ohne Hyperthermie behandelt wurden, konnte seitenunabhängig in beiden Tumoren hohe eine hohe Expressionsrate gemessen werden. Des weiteren nahmen die Expressionen in der Reihenfolge Lunge, Muskel des rechten Beins und Herz ab (Abb. 28). In im Muskel des linken Beins, Leber, Nieren und Milz wurde keine organspezifische Expression festgestellt. Aus der Gegenüberstellung der Tumorzufiferaseexpression (Abb. 29) ist die fast gleiche Verteilung des Reportergens in beiden Tumoren ersichtlich.

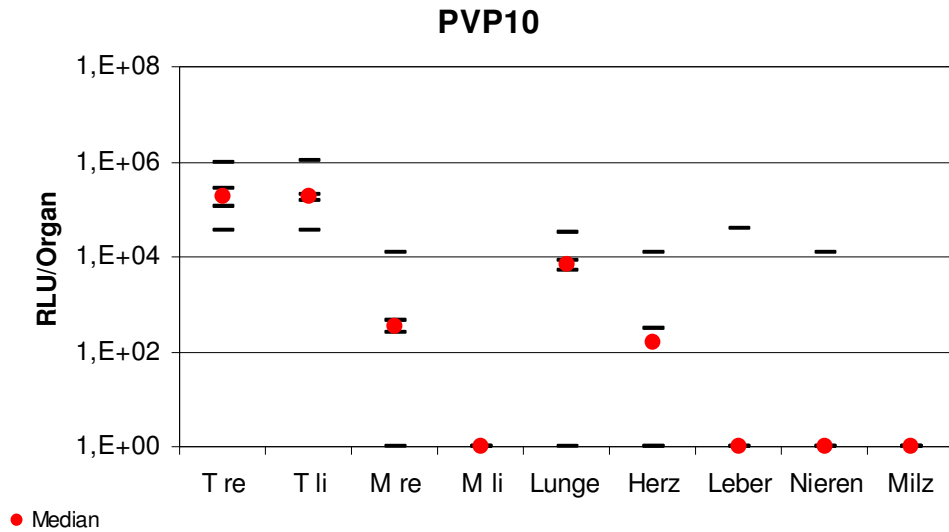


Abb. 28 Luziferase-Reportergenexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen (50 µg Plasmid DNS/20 g Maus) und ohne Hyperthermiebehandlung (n = 4); Tumorgewicht: ~ 1070 mg. Die Expressionsrate der Tumoren war in beiden Tumoren gleich hoch. Außer in den Muskeln des rechten Beins, Lunge und Herz wurde keine organspezifische Reportergenexpression gemessen. Legende: T re: Tumor rechte Hintergliedmaße; T li: Tumor linke Hintergliedmaße; M re: Muskel rechte Hintergliedmaße; M li: Muskel linke Hintergliedmaße; angegeben sind die Werte der einzelnen Tiere und der Median.

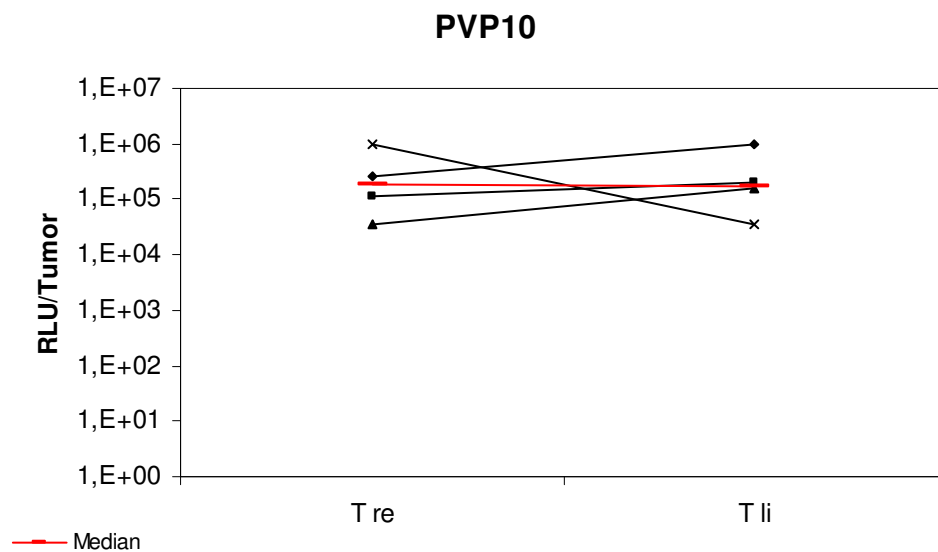


Abb. 29 Tumor Luziferaseexpression 48 h nach i.v. Applikation von PVP10-Polyplexen und 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 4); Tumorgewicht: ~1070 mg. Es konnte kein Einfluss der Hyperthermiebehandlung auf die Reportergenexpression der Tumoren beobachtet werden. Legende: die mit Linien verbundenen Datenpunkte zeigen den Unterschied der Luziferaseexpression der Tumoren der rechten (T re) und der linken (T li) Hintergliedmaße; der Medianwert ist rot hervorgehoben.

Im letzten Versuchsansatz war die mittlere Luziferaseexpression der mit PVP10-Polyplexen ohne Hyperthermie behandelten Tumoren im Verhältnis vierfach höher als die der hyperthermierten Tumoren der Gruppen mit gleichem Tumorgewicht. Dies trifft sowohl für den Vergleich der kleinen (~ 300 mg) als auch der großen (~ 1070 mg) Tumoren zu.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde eine signifikante Steigerung der Expressionsrate in den hyperthermierten Tumoren aller behandelten Gruppen gemessen ( $p = 0,03$ ). Insbesondere für mit PVP10 behandelte Tumoren war der Effekt der Hyperthermie hochsignifikant ( $p = 0,007$ ). Nach der Erwärmung des Tumorgewebes findet eine gezielte Luziferaseexpression durch thermosensitive PVP10-Polyplexe statt. Sonst ist nur in der Lunge eine Anreicherung der PVP10-Polyplexe zu finden, die im Median etwas über der Lungenreportergenexpression der mit PEG-BPEI-Polyplexen behandelten Tiere liegt.

#### **4.1.5 Histologie Cy3-gelabelter Polyplexe**

Die Histologie wurde an A/J Mäusen mit ca. 150 mm<sup>3</sup> großen Tumoren durchgeführt, um die Anreicherung der Polyplexe qualitativ im Tumor zu beurteilen. Zum Vergleich wurden die Tiere mit Cy3-markierten PVP10- und LPEI-Polyplexen behandelt. Vier Stunden nach Ende der Hyperthermiebehandlung wurden die Tumoren entnommen, eingefroren und wie in Kapitel 3.7.3. beschrieben weiter verarbeitet. In den histologischen Präparaten (Abb.: 30) wurde unabhängig von einer Hyperthermiebehandlung in einzelnen Bereichen Cy3-Signal der LPEI-Polyplexe sowohl Endothelassoziiert als auch im Tumorgewebe verteilt gefunden. In den mit PVP10-Polyplexen behandelten Tumoren hingegen konnte nur im hyperthermierten Tumor eine Anreicherung, kolokalisiert zum Endothel, dargestellt werden. Im nicht hyperthermierten Tumor wurde keine markierte Plasmid-DNS gefunden.

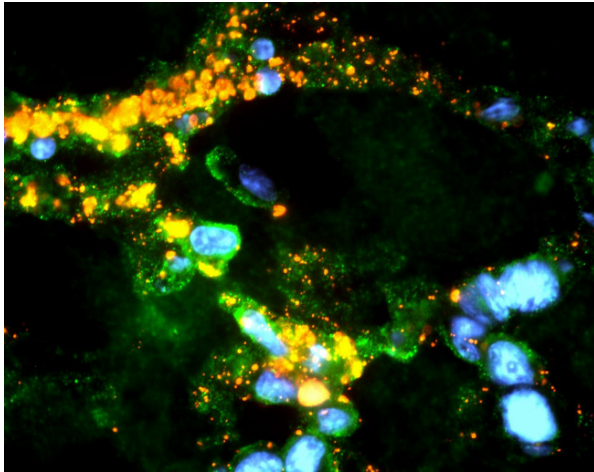


Abb. A: Tumor mit PVP10 und Hyperthermie behandelt

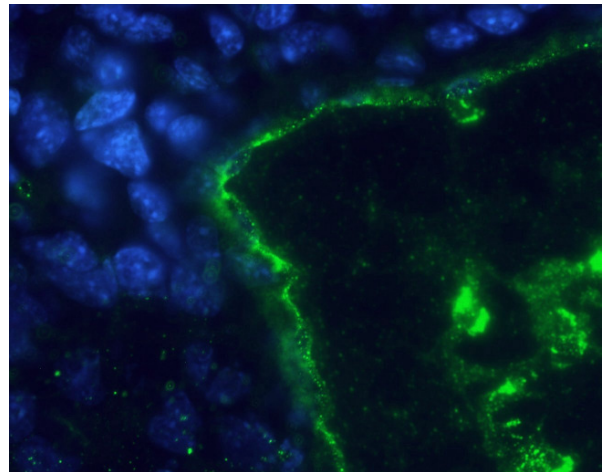


Abb. B: Tumor mit PVP10 ohne Hyperthermie behandelt

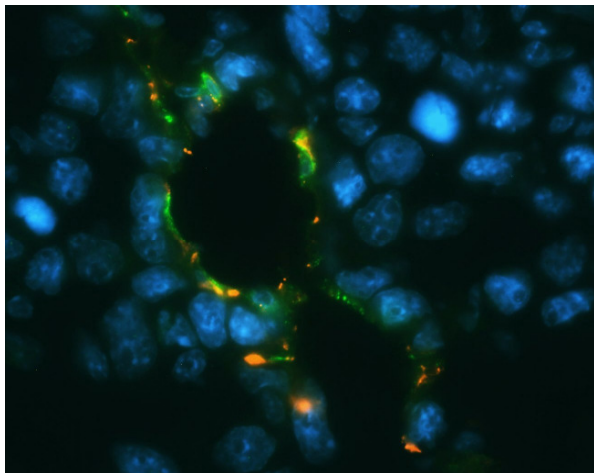


Abb. C: Tumor mit LPEI und Hyperthermie behandelt

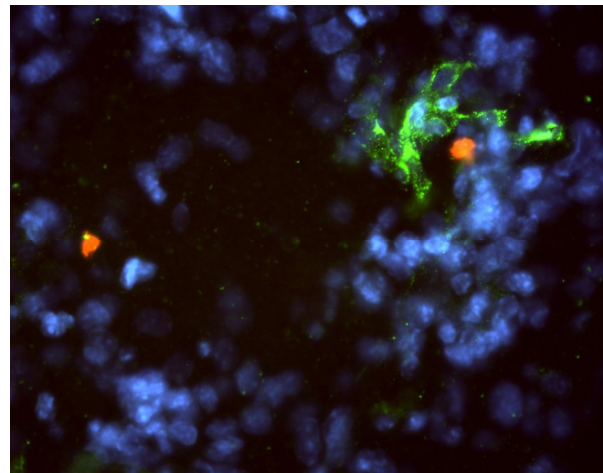


Abb. D: Tumor mit LPEI ohne Hyperthermie behandelt

Abb. 30 Histologische Präparate von Neuro2A Tumoren nach systemischer Applikation von Cy3-markierten Polyplexen. Nach Behandlung mit PVP10 wurde nur im hyperthermierten Tumor eine Cy3-Anreicherung kolo-kalisiert zum Endothel gefunden. Im nicht hyperthermierten Tumor konnte kein Cy3-Signal detektiert werden. Nach Behandlung mit LPEI wurden einzelne Cy3-Anreicherungen unabhängig von der Behandlung mit oder ohne Hyperthermie sowohl endothelassoziiert als auch im Tumorgewebe gefunden. Cy3 markierte DNS: rot; Endothel: grün; Zellkerne: blau.

## 4.2 Chemotherapeutika in Kombination mit Hyperthermie

Ziel der Versuche war es, die therapeutische Wirkung von lokaler Hyperthermiebehandlung in Kombination mit systemischer Applikation von sich bereits in der klinischen Anwendung befindlichem freiem Doxorubicin (Adriblastin<sup>®</sup>, Fdox), PEGyliertem liposomalem Doxorubicin (Caelyx<sup>®</sup>, LDox) und neu entwickelten thermosensitiven Liposomen zu untersuchen. Dafür wurde der durch Hyperthermiebehandlung hervorgerufene Effekt, die Wechselwirkungen von Behandlung und Wirkstoff und die Konzentrationen von LDox und HePC-TSL in Plasma- und Gewebeproben bestimmt.

### 4.2.1 Therapeutische Studie

Doxorubicin ist eines der Standardchemotherapeutika in der Behandlung von Sarkomen, weshalb die Versuche in BFS-1 (murines Fibrosarkom) tragenden C57BL/6 Mäusen durchgeführt wurden. Dafür wurde den Tieren ein Tumor in eine Hintergliedmaße implantiert (siehe Kapitel 3.6.7.). Es wurden 6 Gruppen (n = 8 - 11) mit LDox (5 mg/kg), Fdox (5 mg/kg) oder 0,9 % NaCl 60 min mit Hyperthermie bei 42°C oder Normothermie bei 34°C behandelt. Diese Zeitspanne entspricht der üblichen Behandlungsdauer bei klinischer Anwendung von Hyperthermie<sup>18, 54</sup>. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 50 Tagen beobachtet. Dabei wurde jeden zweiten bis dritten Tag das Tumolvolumen und Körpergewicht bestimmt (Abb. 29). Bei massivem Gewichtsverlust von über 15 % oder einer Zunahme des Tumolvolumens über 1,5 cm in Länge, Breite oder Höhe wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und euthanasiert.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich betrug die mittlere Wachstumszeit bis zum Erreichen des 5-fachen Anfangstumolvolumens der bei 34°C mit 0,9 % NaCl behandelten Gruppe 14 Tage. Tumoren die mit Fdox bei 34°C und NaCl bei 42°C behandelt wurden, hatten mit 16,8 und 15,3 Tagen ähnliche Wachstumszeiten. Applikation von LDox führte bei 34°C mit 44,6 Tagen und bei 42°C mit 45,4 Tagen im Vergleich zu allen anderen Gruppen zu einer hoch signifikanten Verlängerung der Tumorstadiumszeit ( $p < 0,003$ ). Für die Behandlung mit Fdox bei 42°C mit 28,5 Tagen konnte eine signifikante ( $p < 0,02$ ) Verlängerung der Tumorstadiumszeit

gegenüber mit FDox bei Normothermie und den mit NaCl behandelten Gruppen beobachtet werden. Die durch die Chemotherapie hervorgerufene Wachstumsverzögerung nach der Behandlung bei 34°C betrug, verglichen mit der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe für die mit FDox behandelten Tumoren 2,8 Tage, für die mit LDox behandelten Tumoren 30,9 Tage. Es wurde nur nach der Behandlung mit FDox und Hyperthermie eine durch die Hyperthermie hervorgerufene Wachstumsverzögerung beobachtet. Eine totale Tumorregression konnte in 7/11 mit LDox bei 42°C behandelten Tieren, in 6/10 mit LDox bei 34°C behandelten Tieren und in 1/10 mit FDox bei 42°C behandelten Tieren beobachtet werden. Alle Tiere haben die Behandlung bei einer Dosis von 5 mg Doxorubicin/kg gut toleriert. Es wurde weder Gewichtsverlust noch Anzeichen von Nebenwirkungen beobachtet. Einige Tiere nahmen sogar während der Studie an Gewicht zu.

	LDox 42°C	LDox 34°C	FDox 42°C	FDox 34°C	NaCl 42°C	NaCl 34°C
<b>Wachstumszeit</b>	45,4	44,6	28,5	16,8	15,3	14,0
<b>Wachstumsverzögerung durch Chemotherapie:</b>	30,1	30,6	13,3	2,8		
<b>Wachstumsverzögerung durch Hyperthermie:</b>	0,8		11,8		1,3	
<b>Totale Regression:</b>	7/11	5/10	1/10	0/8	0/8	0/8

*Tab. 1: Übersicht der Tumorwachstumszeit und Tumorwachstumsverzögerung in Abhängigkeit von der Behandlung. Wachstumszeit: Tage bis zum Erreichen des 5-fachen Anfangstumolvolumens oder Tag 50 nach Tumorimplantation; Wachstumsverzögerung durch Chemotherapie = (Wachstumszeit 42°C oder 34°C - Wachstumszeit der entsprechend bei 42°C oder 34°C mit 0,9 % NaCl behandelten Kontrollgruppe); Wachstumsverzögerung durch HT in Tagen = (42°C Wachstumszeit - 34°C Wachstumszeit der gleichen Behandlungsgruppe); totale Regression in x/n Tieren; Legende: LDox 42°C: Caelyxapplikation mit Hyperthermiebehandlung; LDox 34°C: Caelyxapplikation mit Normothermiebehandlung; FDox 42°C: Doxorubicinapplikation mit Hyperthermiebehandlung; FDox 34°C: Doxorubicinapplikation mit Normothermiebehandlung; NaCl 42°C: 0,9 % NaCl-Applikation mit Hyperthermiebehandlung; NaCl 34°C: 0,9 % NaCl mit Normothermiebehandlung.*



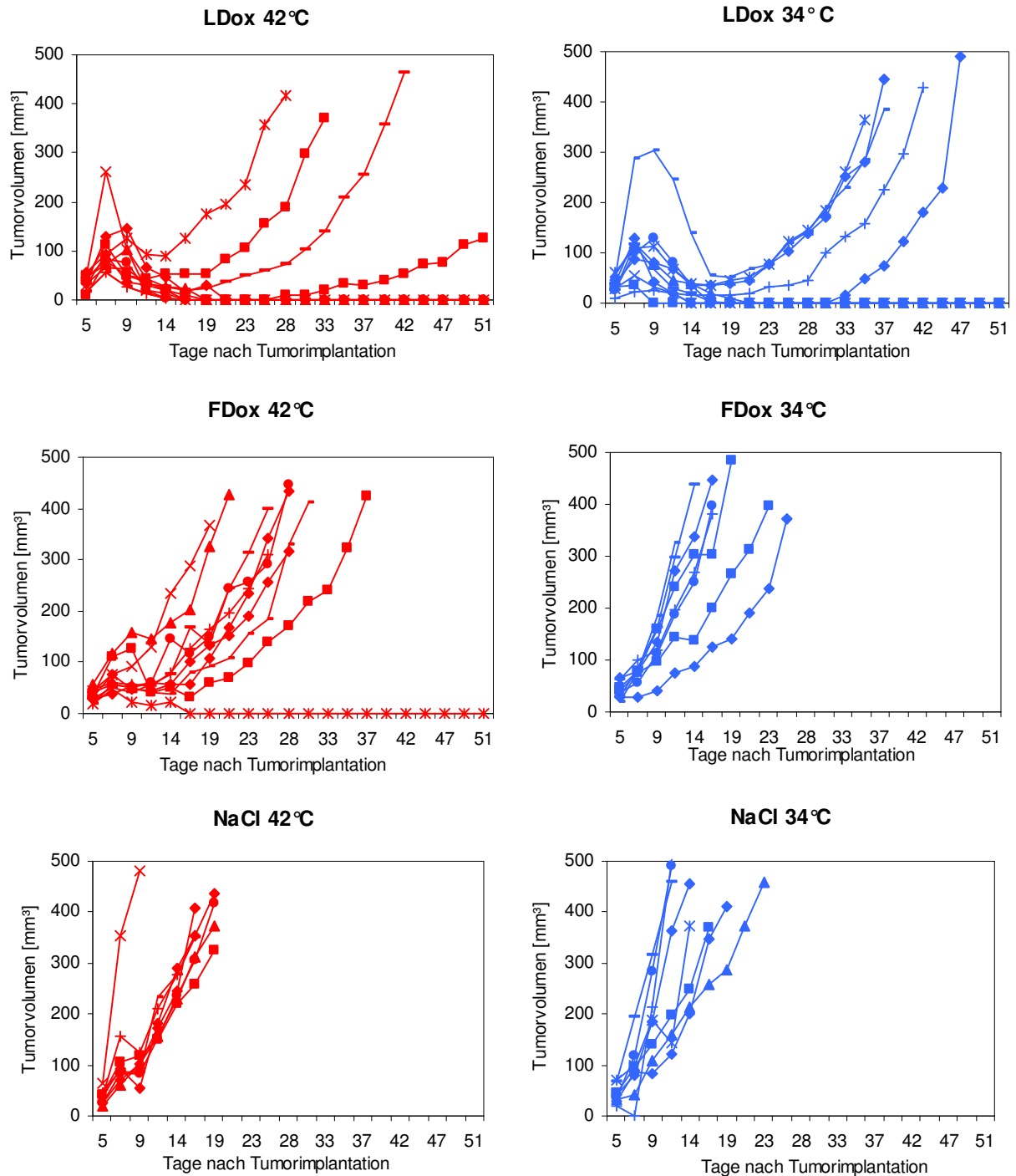


Abb. 31 Tumorwachstum nach einmaliger i.v. Applikation von LDox, FDox (5 mg Doxorubicin/kg) oder 0,9 % NaCl-Lösung und Hyperthermiebehandlung bei 42°C oder Normothermiebehandlung bei 34°C. Es wurde kein Effekt durch die alleinige Behandlung mit Hyperthermie beobachtet. LDox bewirkt unabhängig von der Hyperthermiebehandlung eine signifikantere Wachstumsverzögerung im Vergleich zu allen anderen Gruppen ( $p < 0,003$ ). Die Behandlung mit FDox und Hyperthermie hatte eine signifikante Steigerung der Wachstumsverzögerung gegenüber den mit FDox bei Normothermie und den mit NaCl behandelten Gruppen zur Folge ( $p < 0,02$ ). Legende: LDox 42°C: Caelyx-Applikation mit Hyperthermiebehandlung; LDox 34°C: Caelyx-Applikation mit Normothermiebehandlung; FDox 42°C: Doxorubicinapplikation mit Hyperthermiebehandlung; FDox 34°C: Doxorubicinapplikation mit Normothermiebehandlung; NaCl 42°C: 0,9 % NaCl-Applikation mit Hyperthermiebehandlung; NaCl 34°C: 0,9 % NaCl mit Normothermiebehandlung.

## **4.2.2 Caelyx Freisetzung nach Hyperthermiebehandlung**

Da für tumortragende Tiere eine niedrigere Halbwertszeit von LDox beschrieben ist<sup>56</sup> wurde die Plasmakonzentration und Akkumulation von LDox in BFS-1 tumortragenden Tieren nach 30 min Hyperthermiebehandlung untersucht. Nach i.v. Applikation wurde eine tumortragende Hintergliedmaße 30 min mit Hyperthermie behandelt. Einer Gruppe wurde sofort nach Ende der Behandlung Blutproben und Tumoren entnommen, der anderen 24 h nach Ende der Behandlung. Aus den Proben wurde mittels HPLC-Analyse der Doxorubicin Gehalt bestimmt (Kapitel 3.7.4.).

### **4.2.2.1 Doxorubicinkonzentration im Tumor**

In den Tumoren der Tiere, die sofort nach der Behandlung entnommen wurden, konnte kein Unterschied der Doxorubicinkonzentration zwischen hyperthermierten und nicht hyperthermierten Tumoren festgestellt werden. Im Vergleich dazu wurde 24 h nach Behandlungsende eine höhere Doxorubicinanreicherung im hyperthermierten Tumor gemessen, die allerdings nicht signifikant war (Abb. 32). In 3 von 8 Tieren deren Tumoren sofort nach der Behandlung entnommen wurden, wurde im hyperthermierten Tumor eine vermehrte Anreicherung von Doxorubicin verglichen mit den nicht hyperthermierten gemessen (Abb. 33). In fast allen der 24 h nach Hyperthermiebehandlung entnommenen Tumoren war ein geringe Zunahme der Doxorubicinkonzentration im hyperthermierten Tumor messbar (Abb. 34). Vergleicht man die Doxorubicinanreicherung in den Tumoren 24 h nach Hyperthermieende mit der direkt nach Behandlungsende war eine über zwanzigfache Steigerung der Doxorubicinkonzentration sowohl im hyperthermierten als auch im nicht hyperthermierten Tumor messbar.

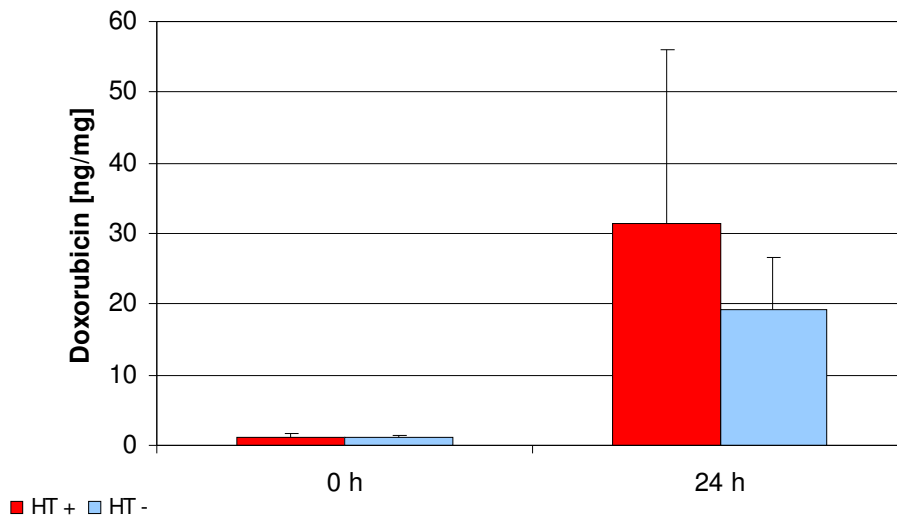


Abb. 32 Anreicherung von Doxorubicin im Tumor nach i.v. Applikation von LDox (5 mg/kg Doxorubicin), Tumorentnahme 0 h: sofort und 24 h: 24 h nach 30 min Hyperthermiebehandlung (n = 8); Mittelwert mit Standardabweichung. Direkt nach Behandlungsende konnte kein Einfluss der Hyperthermie auf die Doxorubicinkonzentration in den Tumoren beobachtet werden. 24 h nach Behandlungsende wurde in den hyperthermierten Tumoren eine gesteigerte Doxorubicinkonzentration im Vergleich zu den nicht hyperthermierten Tumoren gemessen, die allerdings nicht signifikant war. Die Doxorubicinkonzentration der Tumoren war 24 h nach Behandlungsende zwanzig mal höher als direkt nach der Behandlung. Legende: HT +: hyperthermierte Tumoren, HT -: nicht hyperthermierte Tumoren.

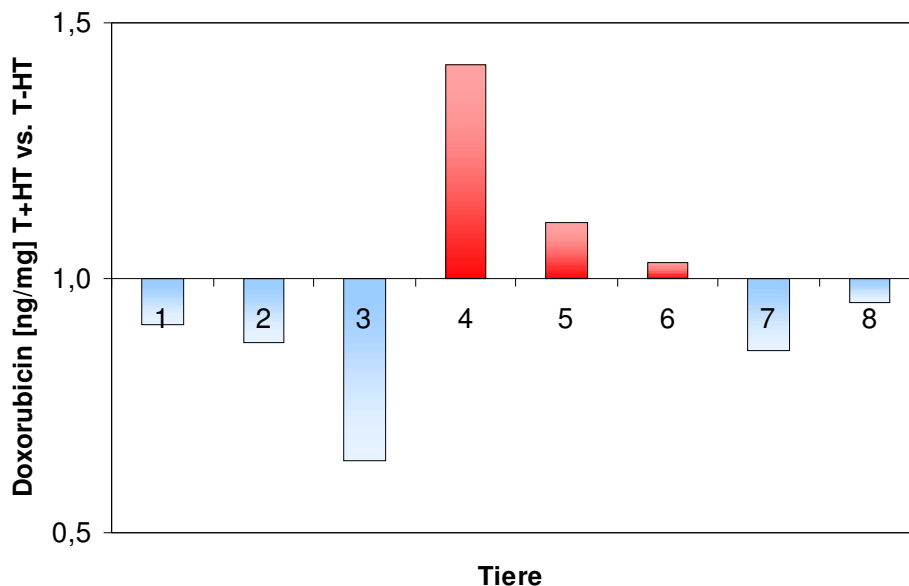


Abb. 33 Verhältnis der Doxorubicinanreicherung von hyperthermiertem (HT +) zu nicht hyperthermiertem (HT -) Tumor in einem Tier. Die Tiere wurden mit LDox (5 mg Doxorubicin/kg) in Kombination mit 30 min Hyperthermie behandelt. Die Tumoren wurden sofort nach Behandlungsende entnommen. Die Hyperthermiebehandlung hatte keinen Effekt auf die Doxorubicinkonzentration im Tumor.

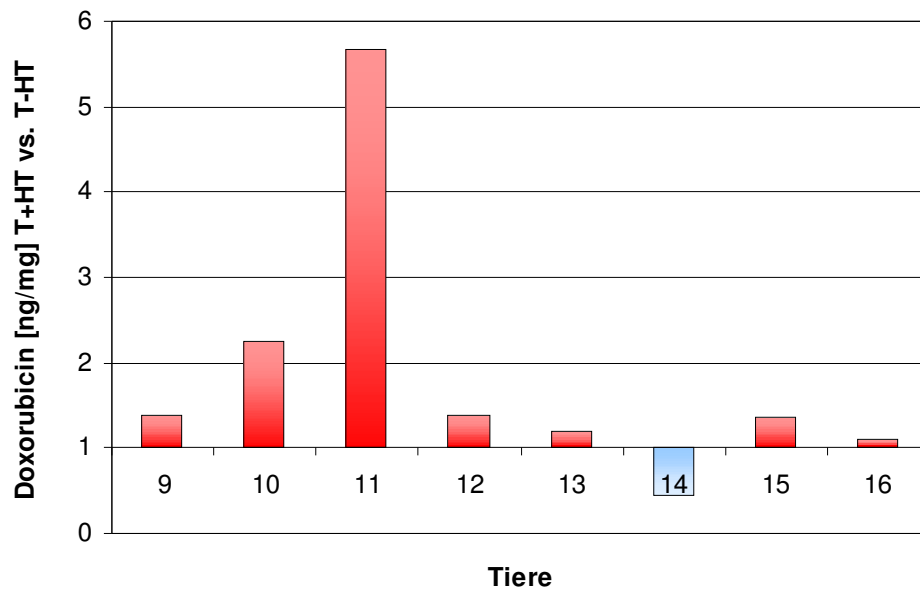


Abb. 34 Verhältnis der Doxorubicinanreicherung von hyperthermiertem (HT +) zu nicht hyperthermiertem (HT -) Tumor in einem Tier. Die Tiere wurden mit LDox (5 mg Doxorubicin/kg) in Kombination mit 30 min Hyperthermie behandelt. Die Tumoren wurden 24 h nach Behandlungsende entnommen. In 7 von 8 der hyperthermierten Tumoren konnte 24 h nach der Hyperthermiebehandlung eine höhere Doxorubicinkonzentrationen als in den nicht hyperthermierten Tumoren des gleichen Tieres gemessen werden.

#### 4.2.2.2 Doxorubicinkonzentration im Plasma

In den 24 h nach Hyperthermiebehandlung entnommenen Plasmaproben zirkulierten, bezogen auf die Konzentration direkt nach der Behandlung, noch 25 % der LDox im Blut der untersuchten Tiere (Abb. 35).

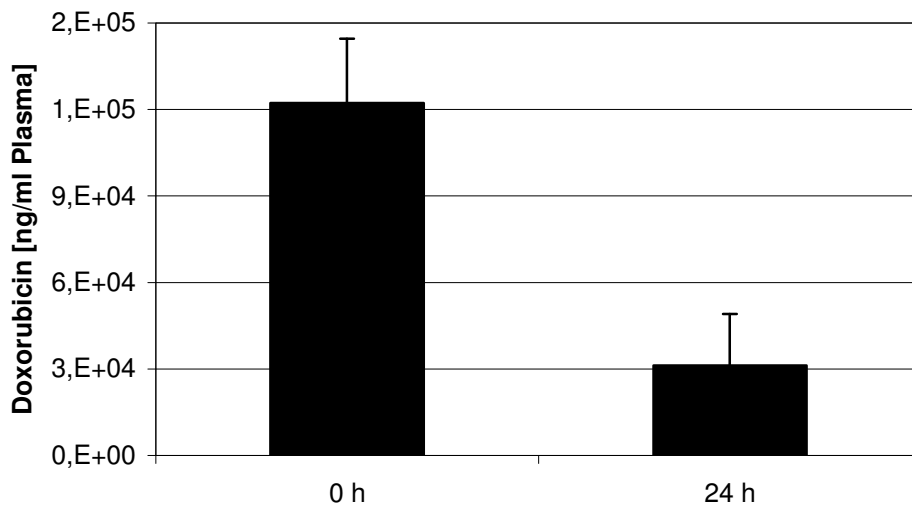


Abb. 35 Plasmadoxorubicingehalt nach i.v. Applikation von LDox (5 mg/kg Doxorubicin), Blutentnahme 0 h: sofort (Gruppen n = 13) und 24 h: 24 h nach 30 min Hyperthermiebehandlung (Gruppe n = 11); Mittelwert mit Standardabweichung. 24 h nach Ende der Hyperthermiebehandlung, bezogen auf die Konzentration direkt nach der Behandlung, zirkulieren noch 25% der Ldox im Plasma.

### 4.2.3 HePC-Konzentration im Tumor

Um die HePC Anreicherung im Tumor nach Hyperthermiebehandlung zu evaluieren wurden BFS1-Tumor tragenden C57BL/6-Mäusen HePC-TSL ( $35 \mu\text{mol/kg}$ ,  $n = 7$  und  $3,5 \mu\text{mol/kg}$ ,  $n = 12$ ) i.v. appliziert und eine Hintergliedmaße 30 min mit Hyperthermie behandelt. Die Tumoren wurden direkt nach der Behandlung entnommen und der HePC-Gehalt mittels LC-MS/MS bestimmt (siehe Kapitel 3.7.5) (Abb. 36). Es wurde eine signifikant höhere Anreicherung des HePCs in den hyperthermierten Tumoren im Vergleich zu den nicht hyperthermierten Tumor gemessen ( $p < 0,04$ ). Des weiteren wurde eine siebenfach erhöhte Anreicherung des HePCs im hyperthermierten Tumor nach Verabreichung der zehnfach höheren Dosis festgestellt.

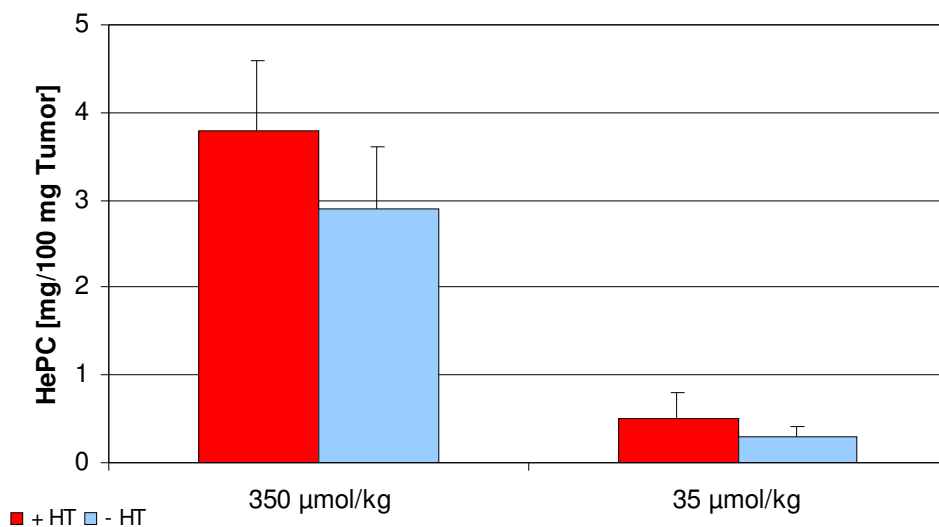


Abb. 36 Anreicherung von liposomalem HePC im Tumor nach i.v. Applikation von HePC-TSL ( $35 \mu\text{mol HePC/kg}$ ,  $n = 7$  oder  $3,5 \mu\text{mol HePC/kg}$ ,  $n = 12$ ) und 30 min Hyperthermiebehandlung; Mittelwert mit Standardabweichung. Die HePC-Konzentration in den hyperthermierten Tumoren war signifikant höher als die der nicht hyperthermierten Tumoren ( $p = 0,04$ ). Legende: HT +: hyperthermierte Tumoren, HT -: nicht hyperthermierte Tumoren.

## 5 Diskussion

### 5.1 Thermosensitiver Gentransfer

Untersucht wurde der Einfluss von regionaler Hyperthermiebehandlung auf die in-vivo-Reporterexpression nach systemischer Applikation von thermosensitiven PVP10- und PVP20-Kopolymeren. Zur Evaluierung wurde die Expressionsrate der PVP-Polyplexe mit der von etablierten, nicht thermosensitiven Polyplexen LPEI, BPEI und PEG-BPEI verglichen.

Die in dieser Arbeit erhobenen in-vivo-Ergebnisse zeigen, dass die Reporterexpression in den mit PVP behandelten, hyperthermierten Tumoren im Vergleich zu den nicht hyperthermierten Tumoren signifikant ( $p < 0,04$ ) höher ist. Betrachtet man jedoch die Expressionsraten der mit nicht thermosensitiven Gentransferkomplexen behandelten Gruppen (Abb. 11, 13, 15), ist keine vermehrte Anreicherung in den hyperthermierten Tumoren zu finden. Dies bestätigt in-vitro Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass Hyperthermie keinen Effekt auf PEI- und PEG-PEI-Polyplexe und ihre Expressionseigenschaften hat, wogegen nach Hyperthermiebehandlung mit PVP-Polyplexen eine erhöhte Reporterexpression gemessen wurde <sup>25</sup>. Beim Vergleich von PVP10 mit PVP20 wurde eine höhere Reporterexpression nach Behandlung mit PVP10 in den Tumoren (Abb. 17, 19) und eine niedrigere in den Lungen gemessen (Abb. 16, 18). Daher wurden die weiteren Versuche mit PVP10 durchgeführt.

PVP10-Polyplexe zeigen, wie PEG-PEI-Polyplexe, eine hohe Spezifität für Tumorgewebe im Vergleich zu den LPEI- und BPEI-Polyplexen (Abb. 10, 12, 14, 16). Nach Behandlung mit PVP-Polyplexen war nur die Luziferaseexpression der Lungen vergleichbar mit der nach Behandlung mit PEG-PEI (Abb. 16, 14). Die Expressionsraten in den übrigen Organen waren geringer. Die hohe Tumorspezifität der PVP- und PEG-PEI-Polyplexe lässt sich durch deren hydrophile Abschirmung erklären. Abgeschirmte Polyplexe sind im Gegensatz zu nicht abgeschirmten Polyplexen bei 37°C in physiologischer NaCl-Lösung stabil <sup>25</sup> und interagieren weniger mit Erythrozyten und anderen Blutkomponenten <sup>45</sup>. Das hat eine verlängerte

Zirkulationszeit der Polyplexe zur Folge, steigert die Akkumulation im Tumor <sup>45</sup> und verhindert eine unspezifische Gewebefindung <sup>5</sup>.

Die signifikant höheren PVP10-Luziferaseexpression in den hyperthermierten Tumoren gegenüber den nicht hyperthermierten Tumoren des gleichen Tieres, in den mit Hyperthermie behandelten Gruppen (Abb. 17, 21, 23, 27), verglichen mit den mit PEG-PEI behandelten Tieren (Abb. 14), steht wahrscheinlich in Kontext mit der geringeren Anreicherung von PVP10 in den restlichen Organen (Abb. 16, 20, 22, 26). Da PVP10 unter Einfluss von Wärme aggregiert ist es möglich, dass die Polyplexe im hyperthermierten Tumor abgefangen werden. Dadurch nimmt die Zahl der systemisch zirkulierenden Polyplexe ab, was sowohl eine Akkumulation in den restlichen Organen verhindert als auch eine niedrige oder keine Reporterexpression in den nicht hyperthermierten Tumoren erklärt.

Trotz der hohen Organspezifität von PVP10 ist die Expressionseffizienz in Kombination mit Hyperthermie geringer als nach systemischer Applikation von PVP10 ohne darauf folgende Hyperthermiebehandlung. Um eine effiziente Genexpression in vivo zu erreichen, müssen die zirkulierenden Partikel aus den Gefäßen extravasieren und in den Tumor aufgenommen werden (Abb. 25, 29). Die Neuro2A Tumoren, an denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, besitzen eine sehr gut ausgebildete Gefäßversorgung, die undifferenziert ist, viele Lücken aufweist und diskontinuierlichen Enden hat, wobei für sie eine Porengröße von bis zu 770 nm beschrieben ist <sup>46</sup>. In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Größe von Molekülen Einfluss auf deren mikrovaskuläre Permeabilität hat <sup>47</sup>. Je größer die Partikel werden, desto weniger Poren in der entsprechenden Größe stehen zur Extravasation zur Verfügung <sup>21</sup>. Eine Erklärung für die niedrigere Reporterexpression nach Hyperthermiebehandlung wäre, dass PVP10 nach Erwärmung in den Blutgefäßen des behandelten Tumors aggregiert, aber durch die Größenzunahme die Diffusionsrate ins Gewebe abnimmt und ein Teil der Polyplexe somit nicht in das Zielgewebe aufgenommen wird. Die Anzahl der Poren in Größe der aggregierten Partikel (~ 1000 nm) könnte zu gering sein, so dass nur wenige der Partikel extravasieren, was eine niedrige Expressionsrate zur Folge hat. Diese These deckt sich auch mit der Beobachtung, dass die Extravasation kleiner Partikel (100 – 200 nm) diffus entlang der Gefäße stattfindet, wohingegen größere Partikel (380 – 780 nm) eher in einigen, abgegrenzten Arealen angehäuften werden <sup>48</sup>. Auch von Kong



und Dewhirst wurde beschrieben, dass kleine Partikel mit einer Größe von 70 nm – 200 nm besser extravasieren als große <sup>22</sup>. Diese Beobachtungen und das Phänomen des EPR-Effekts <sup>10</sup> (siehe Kapitel 2.1) könnten die höheren Luziferaseexpressionen in den Tumoren der ohne Hyperthermie behandelten Gruppen erklären, wobei die Kopolymere hydrophil und klein (150 – 200 nm) bleiben, da sie nicht aggregieren (Abb. 7).

Da bei in-vitro Versuchen beobachtet wurde, dass eine lange Hyperthermiebehandlung der Neuro2A Zellen mit hoher Zytotoxizität verbunden ist, wäre es außerdem möglich, dass PVP10 unter Einwirkung von Hyperthermie zwar im behandelten Tumor aggregiert, aber durch die Erwärmung eine zytotoxische Schädigung der Zellen stattfindet <sup>49, 50</sup>, wodurch gewöhnlich eine Inhibition von DNS, RNS und Proteinsynthese hervorgerufen wird <sup>51</sup>. Ein solcher Effekt könnte die geringere Effizienz der PVP10-Reporterexpression in den Tumoren der mit Hyperthermie behandelten Gruppen gegenüber den ohne Hyperthermie behandelten Gruppen erklären.

Weiterhin scheint ein Zusammenhang zwischen Reporterexpression und Tumorgroße zu bestehen. Dabei wird in großen Tumoren (~ 1070 mg) (Abb. 21, 27, 29) gegenüber kleinen Tumoren (~ 350 mg) (Abb. 17, 23, 25) durch die Hyperthermiebehandlung eine geringere Spezifität bei einer höheren Expressionsrate erreicht. Die höhere Luziferaseexpression in großen Tumoren könnte in Zusammenhang mit der steigenden Gefäßpermeabilität in Abhängigkeit von der Zunahme der Tumorgroße <sup>52</sup> und erhöhten Wachstumsrate <sup>53</sup> stehen, wobei das Gefäßsystem sich weiter ausbildet und größere Lücken entwickelt, durch die mehr aggregierte Polyplexe ins Tumorgewebe austreten können.

Die histologischen Untersuchungen (Abb. 30) nach Behandlung mit Cy3 markierten Polyplexen geben Aufschluss über den Ort der Akkumulation von Plasmid-DNS im Tumor. Es ist zu erkennen, dass sich in den hyperthermierten Tumoren aggregierte PVP10-Polyplexe ans Endothel heften, was deren Aufnahme ins Gewebe erschwert. Im nicht hyperthermierten Tumor der mit PVP10 behandelten Tiere hingegen wurde keine Akkumulation der Plasmid-DNS gefunden. Bei mit LPEI behandelten Tieren wurde in beiden Tumoren ein Cy3-Signal, unabhängig von der Hyperthermiebehandlung gefunden. Die Akkumulation von LPEI war diffus über den

ganzen Tumor verteilt zu finden. Die histologischen Untersuchungen unterstützen die These, dass PVP10 schlechter als LPEI ins Gewebe gelangt und daher eine geringere Reporterexpression hervorruft. Die Ergebnisse sind konsistent mit denen den gemessenen Luziferaseexpressionsraten und unterstreichen die Vermutung, dass die Aggregation von PVP10-Polyplexen in besonders englumigen Kapillaren der hyperthermierten Tumoren zu einem Verschluss des Gefäßes führen könnte, wodurch eine weitere Zirkulation der Polyplexe im Plasma verhindert wird.

Die evaluierten PVP10-Polymere bieten einen interessanten, neuen Ansatz um eine gezielte Genexpression im Tumorgewebe in Kombination mit Hyperthermiebehandlung zu erreichen. Es sind weitere Versuche geplant, in denen der Zusammenhang von Expressionseffizienz und Hyperthermiebehandlung und die Verteilung im Tumor untersucht werden soll.

## **5.2 Chemotherapeutika in Kombination mit Hyperthermie**

### **5.2.1 Therapeutische Studie und Gewebeanreicherung**

Untersucht wurde die therapeutischen Wirkung von Hyperthermiebehandlung in Kombination mit systemischer Applikation von freiem Doxorubicin (Fdox) und liposomalem Doxorubicin (Ldox) auf das BFS-1 Tumormodell. Dafür wurde der durch Hyperthermiebehandlung hervorgerufene Effekt und die Wechselwirkungen von Behandlung und Wirkstoff beurteilt. Außerdem wurde die Auswirkung der LDox Konzentration in Plasma- und Gewebeproben auf die therapeutische Wirkung untersucht.

#### **Kein Hyperthermieeffekt auf Tumorwachstum**

Der Einfluss von Hyperthermie auf das Tumorwachstum wurde durch den Vergleich der beiden bei 34 °C und 42 °C mit NaCl behandelten Kontrollgruppen bestimmt. In dem gewählten Studiendesign hatte eine alleinige Hyperthermiebehandlung keinen Einfluss auf das Tumorwachstum in diesem Tiermodell (Tab. 1). Dies ist konsistent mit Beobachtungen von Papahadjopoulos und Oleson <sup>4, 55</sup>, laut denen es nach einer Gewebeerwärmung auf 42 °C für 60 min zu keiner messbaren Einschränkung des Tumorwachstums kam.

#### **Kein Hyperthermieeffekt auf LDox Wirkung**

Anhand der durchgeführten Studie konnte für die mit LDox behandelten Gruppen eine signifikant längere Wachstumsverzögerung als für die mit FDox und NaCl behandelten Gruppen beobachtet werden (Abb. 31). Dennoch wurde keine Steigerung des therapeutischen Effekts durch Hyperthermie festgestellt (Tab. 1). LDox ist mit einer Halbwertszeit von ca. 12 h in der Maus <sup>4</sup>, ein langzirkulierendes Liposom, das nur langsam im RES aufgenommen und abgebaut wird <sup>2</sup>. Die gemessenen Pharmakokinetik Untersuchungen im BFS-1 Tumormodell zeigen, dass verglichen mit sofort nach Behandlungsende entnommenen Proben, 24 h nach Behandlungsende noch 25 % der Ldox im Blut zirkulieren (Abb. 35). Außerdem war in den Tumoren 24 h nach Hyperthermieende eine zwanzigfach höhere

Doxorubicinkonzentration als sofort nach der Behandlung messbar (Abb. 32). Die erhöhte Akkumulation 24 h nach Applikation von LDox im Tumorgewebe wurde auch in früheren Studien beobachtet<sup>57</sup>. Durch die lange Zirkulationszeit von LDox ist eine Anreicherung in Gewebe mit hoher Gefäßpermeabilität, wie es in Tumoren vorkommt, möglich<sup>4, 8</sup>. Auch nach Ende der Hyperthermiebehandlung treten weiterhin Liposomen ins Tumorgewebe aus und akkumulieren dort durch den EPR-Effekt<sup>10</sup> (siehe Kapitel 2.1). Die LDox zirkulieren bis zu 2 - 3 Wochen nach Applikation im Blut<sup>7</sup>, wodurch eine Anreicherung und Wirkstofffreisetzung im Tumor über einen langen Zeitraum stattfindet, die eine hohe antitumorale Wirkung in diesem Tumormodell zur Folge hat.

### **Hyperthermieeffekt auf FDox Wirkung**

Nach der Applikation von FDox konnte durch Hyperthermiebehandlung eine signifikante Wachstumsverzögerung der Tumoren gegenüber den mit FDox bei Normothermie behandelten sowie den mit NaCl behandelten Kontrollgruppen erzielt werden (Tab. 1). Dabei wurde eine Wachstumsverzögerung um 12 Tage gegenüber der bei 34 °C behandelten Gruppe und in einem Tier eine totale Tumorregression beobachtet. Da FDox schnell in Gewebe und Zellen diffundiert<sup>58, 76</sup> hat es in der Maus eine Halbwertszeit von ca. 12 min<sup>4</sup>. Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von FDox im Tumor in den ersten 30 min nach Applikation höher ist, als die höchste gemessene Konzentration von LDox über einen Zeitraum von 48 h<sup>59</sup>. Die verbesserte therapeutische Wirkung von FDox nach Hyperthermiebehandlung ist wahrscheinlich auf die mit der Behandlung verbundene gesteigerte Permeabilität der Gefäße<sup>63, 21</sup> und den erhöhten Tumorblutfluss<sup>73, 77</sup> zurückzuführen, wodurch eine höhere Anflutung des Wirkstoffs im Tumorgewebe und somit ein gesteigerter Antitumoreffekt erreicht wird. Der synergistische Effekt von Hyperthermie und FDox ist auch in-vitro beschrieben<sup>75</sup>.

### **LDox effizienter als FDox**

In den durchgeführten Versuchen wurde beobachtet, dass LDox, unabhängig von der Hyperthermiebehandlung, eine effektivere Wachstumsverzögerung als FDox hervorruft (Tab. 1). Trotz der für Hyperthermiebehandlung bekannten Effekte wie gesteigerte Gefäßpermeabilität, erhöhter Blutfluss und damit verbundene vermehrte

Extravasation <sup>21</sup> (siehe Kapitel 2.2) war kein Unterschied in der Wirkung von LDox und Hyperthermie- oder Normothermiebehandlung zu beobachten. In unserem Labor von Dr. M. Hossann durchgeführte in-vitro-Versuche haben gezeigt, dass 60 min Erwärmung von LDox in Plasma auf 42°C, verglichen mit Messungen bei 37°C, keinen Einfluss auf die Freisetzung von Doxorubicin hat (unpublizierte Daten). Da keine vermehrte Freisetzung von Doxorubicin aus LDox durch Hyperthermiebehandlung hervorgerufen wird, hat die Hyperthermie nur Einfluss auf die Tumorphysiologie. Dies erklärt, dass keine gesteigerte Wachstumsverzögerung durch Wärmebehandlung beobachtet werden konnte. Die bessere therapeutische Wirkung der LDox ist auf deren lange Zirkulationszeit und der damit vermehrten Anreicherung im Tumor zurückzuführen. Die Antitumoraktivität ist abhängig von der erreichten Wirkstoffkonzentration im Tumor <sup>60</sup>. Da der Wirkstoff aus LDox unabhängig von der Hyperthermiebehandlung nach und nach freigesetzt wird <sup>58</sup>, bleibt über einen längeren Zeitraum ein Wirkstoffspiegel im Tumorgewebe erhalten, der ausreicht um das Tumorstadium einzudämmen. Schon in früheren Untersuchungen wurde für die Behandlung mit FDox festgestellt, dass eine höhere Wirkstoffkonzentration notwendig ist, um die gleiche Antitumoraktivität wie nach Applikation von LDox zu erreichen <sup>59, 61, 62</sup>. Durch die langanhaltende Abgabe des Wirkstoffs aus LDox wird im Tumor zwar ein geringerer Wirkstoffspiegel als direkt nach FDox Applikation erreicht <sup>59</sup>, dennoch ist er ausreichend um in der durchgeführten Studie eine signifikante Wachstumsverzögerung nach Behandlung mit LDox hervorzurufen, die bei über der Hälfte der behandelten Tiere in einer totalen Regression resultierte.

### 5.2.2 HePC-TSL Anreicherung im Gewebe

Bei in-vitro-Untersuchungen von HePC-TSL in Kombination mit Hyperthermiebehandlung wurde eine vermehrte Konzentration von HePC in sowie eine durch HePC hervorgerufene zytotoxische Wirkung auf BFS-1 Tumorzellen beobachtet<sup>67</sup>. Deshalb wurde die HePC-Tumorkonzentration in BFS-1 Tumor tragenden Mäusen nach systemischer HePC-TSL Applikation und Hyperthermiebehandlung (42°C) untersucht.

Da für die systemische Applikation von HePC in wässriger Lösung hämolytische Eigenschaften bekannt sind, wurde zuerst untersucht, ob nach Einbau in die Lipidmembran von TSL eine toxische Wirkung durch HePC hervorgerufen wird. Dafür wurde über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen drei Tieren jeden zweiten bis dritten Tag HePC-TSL in einer HePC-Dosis von 35 µmol/kg injiziert. Während der Behandlung wurden keine Anzeichen von Toxizität beobachtet. Die HePC-TSL wurden von allen Tieren gut vertragen und es konnte kein Gewichtsverlust der Tiere festgestellt werden. Nach der Integration von HePC in die Membran von TSL ist eine i.v. Injektion möglich, da der Wirkstoff gebunden und somit nicht bioverfügbar ist.

In einem darauffolgenden Versuch wurde die Konzentration von HePC im Tumorgewebe nach systemischer HePC-TSL Applikation mit und ohne Hyperthermiebehandlung untersucht. Die gemessenen Tumorkonzentrationen zeigten, dass sowohl nach Applikation einer niedrigen HePC-Dosis (3,5 µmol/kg) als auch nach Applikation einer hohen HePC-Dosis (35 µmol/kg) und 30 min Hyperthermiebehandlung eine signifikant ( $p < 0,04$ ) höhere Anreicherung von HePC in hyperthermierten Tumoren im Vergleich zu nicht hyperthermierten Tumoren zu finden ist (Abb. 36). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der in vitro gemessenen Anreicherung von HePC in BFS-1 Zellen nach HePC-TSL-Behandlung in Kombination mit Hyperthermie<sup>67</sup>. HePC-TSL sind im Serum bei 37°C stabil und haben eine Phasenumwandlungstemperatur von 42°C, bei der die Lipidmembran fluide wird. Die Ergebnisse der Zellkulturversuche zeigen, dass sich HePC möglicherweise unter Erwärmung aus der Lipidmembran löst und Mizellen bildet, die an die Zellmembran fusionieren. Außerdem wäre es möglich, dass durch den unter Erwärmung gesteigerten Blutfluss<sup>73, 77</sup>, die erhöhte Gefäßpermeabilität<sup>63</sup> und

Extravasation<sup>21</sup> vermehrt HePC-TSL in den Tumor aufgenommen werden, wodurch eine gesteigerte Anreicherung von HePC in im Tumor messbar wird. Durch den zusätzlichen Einschluss von hydrophilen Wirkstoffen in HePC-TSL könnte die lokale Anreicherung von zwei synergistisch wirksamen Substanzen im hyperthermierten Tumorgewebe ermöglicht werden.

HePC (Miltefosin<sup>®</sup>) wird in der klinischen Therapie zur topischen Behandlung von Hautmetastasen bei Brustkrebs eingesetzt. Nachdem eine gesteigerte Anreicherung der HePC-TSL nach Hyperthermiebehandlung beobachtet werden konnte, wurde eine therapeutische Studie in BFS-1 tumortragenden C57Bl/6 Mäusen durchgeführt (unpublizierte Daten). Die Tiere (n = 6 pro Behandlungsgruppe) wurden zwei Mal pro Woche nach systemischer Applikation von HePC-TSL (35 µmol HePC/kg) oder 0,9 % NaCl 30 min mit Hyperthermie (42°C) oder Normothermie (34°C) behandelt. Allerdings konnte kein therapeutischer Effekt durch Applikation der HePC-TSL, unabhängig von Hyperthermie- oder Normothermiebehandlung, beobachtet werden. Das schlechte Ansprechen der Tumoren auf die Therapie könnte sowohl an einer zu geringen HePC-Konzentration im Tumorgewebe liegen als auch am gewählten Studiendesign. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die im Tumor akkumulierten HePC-TSL den Wirkstoff nur langsam freisetzen, wodurch dessen Konzentration zu niedrig ist, um einen antitumoralen Effekt hervorzurufen. Auf Grund der in diesem Versuch gewonnenen Erkenntnisse sollte die therapeutische Wirkung von HePC-TSL in Kombination mit Hyperthermiebehandlung erneut mit anderem Studiendesign durchgeführt werden. Dabei könnte die Therapieeffizienz durch frühere Initiierung der Behandlung sowie einer Erhöhung der HePC-Dosis als auch der Dauer der Hyperthermiebehandlung erreicht werden.

## 6 Zusammenfassung

Trotz der vielen verschiedenen Möglichkeiten der Krebstherapie stellen die durch fehlende Tumorselektivität ausgelösten Nebenwirkungen immer noch einen dosislimitierenden Faktor dar. Dies hat eine geringe Wirkungseffizienz zur Folge. Ein sich bereits in der klinischen Anwendung befindlicher Ansatz zur Steigerung der Effizienz von bestehenden Therapien ist die lokale Behandlung von Tumoren mit Hyperthermie. Um nicht nur die Effizienz, sondern auch die Spezifität der Behandlung zu verbessern und die Nebenwirkungen zu verringern, ist die Entwicklung von thermosensitiven Transportsystemen, mit einer Phasenumwandlungstemperatur im Bereich der Temperaturen von klinisch angewendeter Hyperthermie, Gegenstand der Forschung.

Nach systemischer Applikation von thermosensitiven PVP-Polyplexen in Neuro2A tumortragenden Mäuse wurde in Kombination mit Hyperthermiebehandlung eine signifikant höhere Reporterexpression in hyperthermierten Tumoren gemessen. Die Kombinationstherapie von PVP10-Polyplexen und Hyperthermie zeichnet sich durch eine hohe Tumorspezifität aus, wobei die Expressionseffizienz jedoch geringer ist, als nach systemischer Applikation von PVP10 ohne darauf folgende Hyperthermiebehandlung. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der Expressionseffizienz und Spezifität in Abhängigkeit von der Größe der Tumoren festgestellt. Große Tumoren zeigen zwar hohe Expressionsraten, diese sind allerdings unabhängig von der Behandlung mit Hyperthermie. Bei histologischen Untersuchungen wurde eine Endothelassoziation der aggregierten PVP-Polyplexe festgestellt, wodurch ihre Aufnahme ins Tumorgewebe erschwert wird, was eine niedrigere Effizienz zur Folge hat. Verglichen mit etablierten nicht viralen, nicht thermosensitiven Gentransfersystemen wurde eine selektive Anreicherung von thermosensitiven Gentransferkomplexen im hyperthermierten Tumorgewebe beobachtet. Weitere Untersuchungen sind geplant, um den Mechanismus der thermosensitiven Polyplexe zu untersuchen, die Behandlung zu optimieren und somit die Expressionseffizienz zu steigern.

Zur Untersuchung des Hyperthermieeffekts auf sich in der klinischen Anwendung befindliche Chemotherapeutika im BFS-1 Tumormodell wurden die Tiere mit



liposomalem und freiem Doxorubicin mit Hyperthermie und Normothermie behandelt. Dabei wurde kein alleiniger Effekt der Hyperthermiebehandlung auf das Tumorwachstum festgestellt. Die Behandlung mit freiem Doxorubicin in Kombination mit Hyperthermie zeigte einen synergistischen Effekt und resultierte in einer signifikant längeren Wachstumsverzögerung als die Behandlung ohne Hyperthermie oder mit physiologischer Kochsalzlösung. Nach der Gabe von liposomalem Doxorubicin wurde unabhängig von der Hyperthermie eine signifikante Wachstumsverzögerung gegenüber allen anderen Gruppen beobachtet. Hyperthermiebehandlung steigerte die Effektivität von freiem Doxorubicin durch Änderung der physiologischen Eigenschaften des Tumorgewebes. Dennoch war die Wachstumsverzögerung nach Gabe von liposomalem Doxorubicin durch die verlängerte Plasmahalbwertszeit auch ohne Hyperthermiebehandlung effizienter. Die Anwendung von Hyperthermie stellt einen viel versprechenden Ansatz für die Steigerung der Effizienz von herkömmlichen Chemotherapeutika dar.

In einer durchgeführten Toxizitätsstudie wurde keine toxische Wirkung von liposomalem HePC in vivo beobachtet. Durch die Integration von HePC in die Lipidmembran von thermosensitiven Liposomen ist eine systemische Applikation des sonst hämolytischen Wirkstoffs möglich. Nach der Behandlung mit HePC-TSL in Kombination mit Hyperthermie wurde eine signifikant höhere HePC-Konzentration im hyperthermierten Tumorgewebe gemessen. Dennoch konnte in einer therapeutischen Studie nach Behandlung mit HePC-TSL und Hyperthermie keine Wirkung auf das Tumorwachstum beobachtet werden. Dies könnte sowohl mit dem niedrigen Wirkstoffspiegel als auch mit dem gewählten Studiendesign in Zusammenhang stehen.

Die Entwicklung von thermosensitiven Trägersystemen stellt einen viel versprechenden Ansatz zur Verbesserung der Krebstherapie dar. In Kombination mit Hyperthermiebehandlung ermöglichen sie sowohl eine Steigerung der Spezifität als auch eine lokale Anreicherung von Substanzen im Zielgewebe.

## 7 Summary

### **“Hyperthermia for tumour targeted therapy with liposomes and gene transfer complexes in vivo”**

Despite various approaches of cancer treatment, side effects due to the missing tumour selectivity are still dose limiting and result in inefficient therapy outcome. Local hyperthermia of tumour tissue is crucial to increase the efficiency of common therapies and already made its way to clinical application. To further increase efficiency and specificity of antitumoural treatments and to decrease toxicity, thermosensitive carriers with a phase transition temperature designed for hyperthermic applications were developed.

After systemic application of thermosensitive PVP-polyplexes in Neuro2A tumour bearing mice combined with hyperthermia treatment a significantly higher and more selective gene expression was found in hyperthermia treated tumours. Combination of PVP10-polyplexes and hyperthermia showed a high specificity on tumours whereas the treatment was less efficient compared to systemic application of PVP10 without hyperthermia. Furthermore, efficiency and specificity correlated with tumor size, showing higher but less specific reporter gene expression in larger tumours. Histology showed that PVP-polyplexes are associated to tumour endothelium which probably decreased the uptake into the tumour tissue and resulted in lower efficiency. In conclusion, despite established non viral gene transfer polyplexes the evaluated PVP-polyplexes are remarkably specific when combined with hyperthermia. Further experiments are on their way to enlighten the mechanism of thermosensitive polyplexes and to optimise efficiency of treatment.

To determine the effect of hyperthermia on clinically used chemotherapeutics BFS-1 tumour bearing mice were treated with liposomal and free doxorubicin at hyperthermic and normothermic conditions. No effect on tumour growth was observed by hyperthermia alone. The combination of free doxorubicin with hyperthermia showed a synergistic effect and resulted in a significant tumour growth delay compared to chemotherapy alone or controls. Hyperthermia increases the

efficiency of free doxorubicin via changing the physiological properties of tumour tissue. However, liposomal doxorubicin out rated the hyperthermia effect due to increased plasma circulation time. Nevertheless hyperthermia is a promising approach to increase the efficiency of chemotherapeutic drugs.

An in vivo toxicity study of liposomal HePC did not show any side effects. Because of HePC integration into the lipid membrane a systemic application of the usually haemolytic drug is possible. After the treatment with HePC-TSL and hyperthermia a significant increase of HePC concentration was found in hyperthermia treated tumours. However, due to low drug levels or study design no effect on tumour growth was detected. Further studies will focus on the addition of hydrophilic drugs within the core of HePC-TSL and therefore enrich two synergistic drugs in hyperthermia treated tumor tissue.

The development of thermosensitive carriers might be a very promising improvement of cancer treatment. Combined with hyperthermia those carriers result in a specific, local enrichment of drugs in targeted tissues.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

BPEI	verzweigtes Polyethylenimin (25 kDa)
BFS-1	Methylcholantren induziertes Fibrosarkom
DAPI	4, 6 – Diamindino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPGOG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglycerol
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-Effekt	gesteigerter Permeabilitäts- und Retentions-Effekt
Fdox	freies Doxorubicin
FKS	Fötale Kälberserum
g	relative Zentrifugenkraft
HT	Hyperthermie
HBG	HEPES gepufferte Glukose
HCL	Salzsäure
HePC	Hexadecylphosphocholin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethanesulfonsäure)
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographische Tandem Massenspektrometrie
LDox	PEGyliertes liposomales Doxorubicin
LPEI	lineares Polyethylenimin (22 kDa)
n	Anzahl
Neuro2A	murines Neuroblastom
NaCl	Natriumchloridlösung
N/P ratio	Verhältnis von PEI Stickstoff zu DNA Phosphat
NIPAM	N,N-Isopropylacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEG-BPEI	PEGyliertes verzweigtes Polyethylenimin (25 kDa)
PEG-PEI	PEGyliertes verzweigtes Polyethylenimin
PEI	Polyethylenimin
PVP	N,N-Isopropylacrylamid und 1-Vinyl-2-pyrrolidinon
PVP10	PVP mit 10 % 1-Vinyl-2-pyrrolidinon feed
PVP20	PVP mit 20 % 1-Vinyl-2-pyrrolidinon feed
RES	Reticuloendotheliales System
RLU	relative Lichteinheiten
TSL	thermosensitive Liposomen
VP	1-Vinyl-2-pyrrolidinon
v/v	Verhältnis von Volumen zu Volumen

## 8.2 Veröffentlichungen

„In vitro stability and content release properties of phosphatidylglycerol containing thermosensitive liposomes“ (submitted)

M. Hossann, M. Wiggerhorn, A. Schwerdt, K. Wachholz, N. Teichert, H. Eibl, R. D. Issels, L. H. Lindner

## 8.3 Posterpräsentationen

### **STM - Society for Thermal Medicine:**

“Evaluation of thermosensitive liposomes composed of DPPGOG and hexadecylphosphocholine in the BFS-1 tumor model in mice” (2006)

A. Schwerdt, M. Ogris, M. Hossann, N. Teichert, K. Wachholz, H. Eibl, R. Issels, L.H. Lindner

### **ESHO – European Society for Hyperthermic Oncology:**

“Novel Thermosensitive Non-Viral Vectors: Combination of Gene Therapy with Hyperthermia” (2006)

A. Schwerdt and A. Zintchenko, M. Ogris, L. H. Lindner, E. Wagner

### **ISMRM - International Society for Magnetic Resonance in Medicine:**

„MRI-monitoring of hyperthermia induced Gadodiamide release from long-circulating thermosensitive liposomes in tumors“ (2007)

M. Peller, A. Schwerdt, M. Hossann, H. M. Reinl, R. D. Issels, L. H. Lindner and M. Reiser

## 9 Literaturverzeichnis

1. Torchilin VP. Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Adv Drug Deliv Rev.* Jan 2 2005;57(1):95-109.
2. Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta.* Jan 9 1991;1061(1):56-64.
3. Allen TM, Hansen C, Rutledge J. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim Biophys Acta.* May 19 1989;981(1):27-35.
4. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 15 1991;88(24):11460-11464.
5. Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* Apr 1999;6(4):595-605.
6. Gabizon A, Catane R, Uziely B, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* Feb 15 1994;54(4):987-992.
7. Gabizon AA. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest.* 2001;19(4):424-436.
8. Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs.* 1997;54 Suppl 4:15-21.
9. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf.* 2001;24(12):903-920.
10. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today.* Sep 2006;11(17-18):812-818.
11. Courtice FC. Lipoprotein transport across the vascular endothelium. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* Oct 1 1962;139:371-379.

12. Greish K, Fang J, Inutsuka T, Nagamitsu A, Maeda H. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(13):1089-1105.
13. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* Dec 1986;46(12 Pt 1):6387-6392.
14. Skinner SA, Frydman GM, O'Brien PE. Microvascular structure of benign and malignant tumors of the colon in humans. *Dig Dis Sci.* Feb 1995;40(2):373-384.
15. Skinner SA, Tutton PJ, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.* Apr 15 1990;50(8):2411-2417.
16. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* Jul 1 2006;66(13):6732-6740.
17. Schlemmer M, Lindner LH, Abdel-Rahman S, Issels RD. [Principles, technology and indication of hyperthermia and part body hyperthermia]. *Radiologe.* Apr 2004;44(4):301-309.
18. Issels RD, Schlemmer M, Lindner LH. The role of hyperthermia in combined treatment in the management of soft tissue sarcoma. *Curr Oncol Rep.* Jul 2006;8(4):305-309.
19. Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia.* Jan-Feb 2001;17(1):1-18.
20. Hauck ML, Dewhirst MW, Bigner DD, Zalutsky MR. Local hyperthermia improves uptake of a chimeric monoclonal antibody in a subcutaneous xenograft model. *Clin Cancer Res.* Jan 1997;3(1):63-70.
21. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res.* Aug 15 2000;60(16):4440-4445.
22. Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia.* Sep-Oct 1999;15(5):345-370.
23. Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, et al. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res.* Mar 15 2004;10(6):2168-2178.



24. Chang E, Chalikonda S, Friedl J, et al. Targeting vaccinia to solid tumors with local hyperthermia. *Hum Gene Ther.* Apr 2005;16(4):435-444.
25. Zintchenko A, Ogris M, Wagner E. Temperature dependent gene expression induced by PNIPAM-based copolymers: potential of hyperthermia in gene transfer. *Bioconjug Chem.* May-Jun 2006;17(3):766-772.
26. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med.* Jun 2004;6(6):597-602.
27. Hacein-Bey S, Yates F, de Villartay JP, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies: from mice to humans. *Neth J Med.* Aug 2002;60(7):299-301.
28. Wightman L, Kircheis R, Rossler V, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* Jul-Aug 2001;3(4):362-372.
29. Chollet P, Favrot MC, Hurbin A, Coll JL. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med.* Jan-Feb 2002;4(1):84-91.
30. Vekris A, Maurange C, Moonen C, et al. Control of transgene expression using local hyperthermia in combination with a heat-sensitive promoter. *J Gene Med.* Mar-Apr 2000;2(2):89-96.
31. Madio DP, van Gelderen P, DesPres D, et al. On the feasibility of MRI-guided focused ultrasound for local induction of gene expression. *J Magn Reson Imaging.* Jan-Feb 1998;8(1):101-104.
32. Verweij J, Judson I, van Oosterom A. STI571: a magic bullet? *Eur J Cancer.* Oct 2001;37(15):1816-1819.
33. Cagnoni PJ, Walsh TJ, Prendergast MM, et al. Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J Clin Oncol.* Jun 2000;18(12):2476-2483.
34. Chen Q, Tong S, Dewhirst MW, Yuan F. Targeting tumor microvessels using doxorubicin encapsulated in a novel thermosensitive liposome. *Mol Cancer Ther.* Oct 2004;3(10):1311-1317.
35. Hauck ML, LaRue SM, Petros WP, et al. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res.* Jul 1 2006;12(13):4004-4010.

36. Brissault B, Kichler A, Guis C, Leborgne C, Danos O, Cheradame H. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjug Chem.* May-Jun 2003;14(3):581-587.
37. Kircheis R, Schuller S, Brunner S, et al. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med.* Mar-Apr 1999;1(2):111-120.
38. Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Mechtler K, Wagner E. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem.* Nov-Dec 1992;3(6):533-539.
39. Kursa M, Walker GF, Roessler V, et al. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem.* Jan-Feb 2003;14(1):222-231.
40. Eibl H. Synthesis of glycerophospholipids. *Chem Phys Lipids.* Jun 1980;26(4):405-429.
41. Kotting J, Marschner NW, Neumuller W, Unger C, Eibl H. Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. *Prog Exp Tumor Res.* 1992;34:131-142.
42. Eibl H, Lands WE. A new, sensitive determination of phosphate. *Anal Biochem.* Jul 1969;30(1):51-57.
43. Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood.* Mar 1 2003;101(5):1970-1976.
44. Ogris M, Carlisle RC, Bettinger T, Seymour LW. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J Biol Chem.* Dec 14 2001;276(50):47550-47555.
45. Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, Wagner E. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release.* Aug 28 2003;91(1-2):173-181.
46. Smrekar B, Wightman L, Wolschek MF, et al. Tissue-dependent factors affect gene delivery to tumors in vivo. *Gene Ther.* Jul 2003;10(13):1079-1088.
47. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* Sep 1 1995;55(17):3752-3756.

48. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 14 1998;95(8):4607-4612.
49. Dewhirst MW, Prosnitz L, Thrall D, et al. Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future. *Semin Oncol*. Dec 1997;24(6):616-625.
50. Lepock JR. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia*. Dec 2005;21(8):681-687.
51. Laszlo A. The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif*. Mar 1992;25(2):59-87.
52. Blasberg RG, Kobayashi T, Patlak CS, et al. Regional blood flow, capillary permeability, and glucose utilization in two brain tumor models: preliminary observations and pharmacokinetic implications. *Cancer Treat Rep*. 1981;65 Suppl 2:3-12.
53. Heuser LS, Miller FN. Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer*. Feb 1 1986;57(3):461-464.
54. Issels RD. Hyperthermia and thermochemotherapy. *Cancer Treat Res*. 1993;67:143-160.
55. Oleson JR. Prostate cancer: hot, but hot enough? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 20 1993;26(2):369-370; discussion 373.
56. Hong RL, Huang CJ, Tseng YL, et al. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clin Cancer Res*. Nov 1999;5(11):3645-3652.
57. Huang SK, Stauffer PR, Hong K, et al. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res*. Apr 15 1994;54(8):2186-2191.
58. Gabizon A, Horowitz AT, Goren D, Tzemach D, Shmeeda H, Zalipsky S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res*. Dec 15 2003;9(17):6551-6559.
59. Ning S, Macleod K, Abra RM, Huang AH, Hahn GM. Hyperthermia induces doxorubicin release from long-circulating liposomes and enhances their anti-tumor efficacy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Jul 1 1994;29(4):827-834.
60. Charrois GJ, Allen TM. Multiple injections of pegylated liposomal Doxorubicin: pharmacokinetics and therapeutic activity. *J Pharmacol Exp Ther*. Sep 2003;306(3):1058-1067.

61. Colbern GT, Hiller AJ, Musterer RS, Working PK, Henderson IC. Antitumor activity of Herceptin in combination with STEALTH liposomal cisplatin or nonliposomal cisplatin in a HER2 positive human breast cancer model. *J Inorg Biochem.* Oct 1999;77(1-2):117-120.
62. Lu WL, Qi XR, Zhang Q, et al. A pegylated liposomal platform: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity in mice using doxorubicin as a model drug. *J Pharmacol Sci.* Jul 2004;95(3):381-389.
63. Hauck ML, Coffin DO, Dodge RK, Dewhirst MW, Mitchell JB, Zalutsky MR. A local hyperthermia treatment which enhances antibody uptake in a glioma xenograft model does not affect tumour interstitial fluid pressure. *Int J Hyperthermia.* May-Jun 1997;13(3):307-316.
64. Greish K, et al. Enhanced permeability and retention (EPR) effect and tumorselective delivery of anticancer drugs. *Delivery of protein and peptide drugs in cancer* (Torchillin VP, ed.). Imperial College Press, London. 2006, pp. 37 – 52.
65. Schlemmer M, Lindner LH, Issels RD. Hyperthermie. *Die Onkologie* (Hiddemann W, Huber H, Bartram CR, eds.). Springer Verlag, Berlin. 2004;1.Auflage,5-15.
66. Courtice FC. The origin of lipoproteins in lymph. *Lymph and Lymphatic system* (Mayerson HS, ed.). Charles C Thomas, Springfield, IL. 1963; pp. 89-126.
67. Lindner LH, Hossann M, Vogeser M, Teichert N, Wachholz K, Eibl H, Hiddemann W, Issels RD. Dual role of Hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: active ingredient and mediator of drug release. (Publikation in Vorbereitung)
68. Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Dec 31;53(3):285-305.
69. Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos D. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm Res.* 1995 Oct;12(10):1407-16.
70. Leonard R, Hardy J, van Tienhoven G, Houston S, Simmonds P, David M, Mansi J. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001 Nov 1;19(21):4150-9.
71. Unger C, Eibl H. [Drug development from phospholipids]. *Onkologie.* 2001 Feb;24 Suppl 1:18-23. German.

72. Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2002 Dec;15(6):593-8
73. Karino T, Koga S, Maeta M. Experimental studies of the effects of local hyperthermia on blood flow, oxygen pressure and pH in tumors. *Jpn J Surg.* 1988 May;18(3):276-83.
74. Haupt S, Haupt Y. Importance of p53 for cancer onset and Therapy. *Anticancer Drugs.* 2006;17(7):725-732.
75. Hayashi S, Kano E, Tsuji K, Furukawara-Furuya M, Yoshikawa S, Hatashita M, Matsumoto H, Jin ZH, Ohtsubo T, Kitai R. Modification of thermosensitivity and chemosensitivity induced by combined treatments with hyperthermia and adriamycin. *Int J Mol Med.* 2001 Oct;8(4):417-422.
76. Eksborg S, Pharmacokinetics of anthracyclines. *Acta Oncol.* 1989;28:873-876
77. Pence D, Song C. Effects of heat on bloodflow. *Hyperthermia in cancer treatment.* (Angghileri L and Robert J, eds.) Boca Raton: CRC Press; 1986, Vol.2:1-16

## 10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. E. Wolf für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken.

Des weitern bedanke ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Ernst Wagner für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung.

Meinen Betreuern Dr. Manfred Orgis und Dr. Lars Lindner danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei Planung und Auswertung der Experimente.

Bei meinem Kollegen Dr. Martin Hossann möchte ich mich besonders herzlich für sein immer „offenes Ohr“, die fortwährende Unterstützung und das ausführliche Korrekturlesen meiner Promotionsschrift bedanken.

Dr. Michael Günther sowie Dr. Jaroslav Pelisek danke ich für die Unterstützung in fachlichen Fragen und die gute Zusammenarbeit.

Bei Dr. Silke van der Piepen und Siiri Lüdemann möchte ich mich für die Einweisung in die Arbeit mit den Tieren bedanken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse bedanke ich mich herzlich bei PD Dr. Carsten Culmsee.

Bei Dr. Arkardi Zintchenko möchte ich mich für die Herstellung der Polyplexe bedanken.

Für die Bereitstellung der BFS-1 Tumorzellen bedanke ich mich bei Dr. Manegold.

Dr. Vogeser danke ich für die Messung der Proben auf dem LCMS/MS.

Kirsten Wachholz danke ich für die Hilfe bei der Aufbereitung von Organproben und den Messungen auf der HPLC. Melinda Kiss danke ich für die Hilfe bei den histologischen Untersuchungen. Nicole Teichert danke ich für die Herstellung und Charakterisierung der thermosensitiven Liposomen.

Unserem Tierpfleger Markus Kovac danke ich besonders für die regelmäßigen Aufheiterungen an langen Versuchstagen; „mehr sog i ned“.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner „Lieblingskollegin“ Nicole Morgenstern, für die oft telepathische Kommunikation und ihren grandiosen, ironischen Humor, ohne die ich im letzten Jahr sicher nur halb soviel gelacht hätte.

Weiterhin bedanke ich mich bei David Schaffert, Lilja Thoenes, Nicole Tietze und Verena Russ für die nette Zusammenarbeit und anregende Unterhaltungen.

Für die Hilfe bei der Formatierung meiner Promotionsschrift danke ich Dagmar Pfeffer.

Ein riesengroßer Dank geht außerdem an Roland Reibke für die Unterstützung und die breite Schulter zum Anlehnen und all meinen Freunden, die mir in den letzten Jahren mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vor allem danke ich meinen Eltern und Geschwistern für die stetige Unterstützung in allen Lebenslagen und dafür, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

**Danke!**

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Geboren	20.07.1978 in Witzenhausen
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildung:

Schulausbildung	1984 - 1988	Grundschule, Witzenhausen
	1988 - 1990	Bonifatiuschule II, Göttingen
	1990 - 1997	Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen
	Juni 1997	Abschluss mit Abitur
Berufsausbildung	1997 – 1999	Ausbildung zur Tierärzthelferin Tierklinik Dr. Doering, Kassel
Beruf	ab Feb. 1999	Arzthelferin
Studium	ab Nov. 1999	Studium der Tiermedizin Ludwig-Maximilian-Universität, München
	Januar 2005	Tierärztliche Abschlussprüfung
	Feb. 2005	Approbation als Tierärztin
	Promotion	ab März 2005