

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinischer Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Entwicklung neuer liposomaler Therapeutika und präklinische Testung in endokrinen Tumormodellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Constanze Hantel
aus
Münster
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Felix Beuschlein
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marc Dellian
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Helmut Kreppel Priv.Doz. Dr. Hans-Joachim Stemmler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	17.11.2010

Für meine Oma.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Nebennierenrindenzarzinom	10
1.2 Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET)	12
1.3 Liposomen.....	16
1.4 Liposomales Doxorubicin	16
1.5 PEGyliertes liposomales Doxorubicin	18
1.6 pH-abhängig freisetzende Liposomen.....	19
1.7 Immunoliposomen.....	20
1.8 Der IGF1-Signalweg	23
1.9 Ziel der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Laborgeräte und Materialien	25
2.2 Versuchstiere und Tierhaltung	26
2.1 Zellkultur (Zelllinien, Assays, Medien und Zusätze).....	27
2.1.3 Stabile Transfektion und G418-Selektion	27
2.1.4 Zellproliferations-ELISA, BrdU (colorimetrisch).....	28
2.1.5 MTT-Test	29
2.1.6 Luciferase-Assay	29
2.1.7 Caspase-Assay.....	29
2.2 Tumormodelle	30
2.2.1 Allgemeines.....	30
2.2.2 C26 Kolon Karzinom Modell (subkutan und Lebermetastasierung)	30
2.2.3 BON-Modell.....	32
2.2.4 BON [pfLuc-N1]-Modell	33
2.2.5 NCI-H295-Modell.....	33
2.2.6 NCI-H295 [pfLuc-N1]-Modell	33
2.2.7 BON/NCI-H295-Modell	33
2.3 Experimente zur Entwicklung liposomaler Therapien.....	35
2.3.1 Dosisfindung für EPC/Chol-Liposomen (C26-Modell).....	35
2.3.2 Pharmakokinetik pH-abhängig freisetzende SPC/Chol-Liposomen (C26-Modell)	36

2.3.3 Pharmakokinetik 1H7 gekoppelter Liposomen (BON-Modell).....	37
2.3.4 Doxorubicin Extraktion und fluorometrische Bestimmung.....	38
2.3.5 Therapie mit 1H7 gekoppelten Liposomen (im BON-Modell).....	38
2.3.6 Liposomen.....	39
2.4 Molekularbiologisches Material und Methoden.....	42
2.4.1 Plasmide für die Klonierung von pFLuc-N1.....	42
2.4.1.1 pGL4.17 [<i>luc2</i> /Neo].....	42
2.4.1.2 pEGFP-N1.....	43
2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	44
2.4.3 Restriktionsendonukleasen.....	44
2.4.4 DNA-Ligation.....	45
2.4.5 Visualisierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.4.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	46
2.4.7 Transformation Z-kompetenter Bakterien.....	46
2.4.9 Plasmid-Präparationen (Mini- und Maxi-Präparation).....	47
2.5 Gewebe-Array und Immunhistochemie.....	48
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Etablierung und Optimierung von Tumormodellen.....	50
3.1.1 Kolon Karzinom Modell inklusive hepatischer Metastasierung.....	51
3.1.2 Mausmodell für neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET).....	53
3.1.3 Nebennierenrindenzarzinom-Modell.....	54
3.1.4 Nebennierenrindenzarzinom/GEP-NET-Modell.....	55
3.1.5 Optimierung zur Tumordetektion mittels <i>in vivo</i> Biolumineszenz.....	56
3.1.5.1 Klonierung des Expressionsplasmids pFLuc-N1.....	57
3.1.5.2 <i>In vitro</i> Luciferase Detektion.....	58
3.1.5.3 <i>In vivo</i> Luciferase Detektion.....	59
3.2 Entwicklung liposomaler Therapien gegen endokrine Tumore.....	61
3.2.1 pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen.....	61
3.2.1.1 Dosisfindung für pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen.....	62
3.2.1.2 SPIT PEGylierte vs. konventionell PEGylierte pH-abhängig freisetzende SPC/Chol-Liposomen.....	63
3.2.1.3 Organdosen für pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen (SPIT).....	64
3.2.2 Der IGF1-Rezeptor als therapeutisches Target.....	68

3.2.2.1 IGF1-Rezeptor-Inhibition und Doxorubicin als Kombinationstherapie gegen GEP-NETs.....	69
3.2.2.2 Zelluläre Interaktion von anti-IGF1-R-AK gekoppelten Immunoliposomen mit humanen Tumorzellen <i>in vitro</i>	71
3.2.2.3 Pharmakokinetik 1H7 gekoppelter Liposomen.....	73
3.2.2.4 Therapeutische Wirksamkeit von anti-IGF1-R-AK-gekoppelten Immunoliposomen gegen humane BON Tumor Xenografts	76
4 Diskussion	79
4.1 Etablierung und Optimierung von Tumormodellen	79
4.1.1 Kolon Karzinom Modell inklusive hepatischer Metastasierung.....	79
4.1.2 Mausmodelle für neuroendokrine Tumoren (NET bzw. GEP-NET).....	79
4.1.3 Mausmodelle für Nebennierenrindenzarzinome.....	81
4.1.4 Nebennierenrindenzarzinom/GEP-NET-Modell	82
4.2 Liposomale Therapien gegen endokrine Tumore.....	84
4.2.1 pH-abhängig freisetzen EPC/Chol-Liposomen.....	84
4.2.1.1 Dosisfindung für pH-abhängig freisetzen EPC/Chol-Liposomen (SPIT).....	84
4.2.1.2 SPIT PEGylierte vs. konventionell PEGylierte pH-abhängig freisetzen SPC/Chol-Liposomen	85
4.2.1.3 Organdosen für pH-abhängig freisetzen EPC/Chol-Liposomen (SPIT)	86
4.2.2 Der IGF1-Rezeptor als therapeutisches Target.....	88
4.2.2.1 IGF1-Rezeptor-Inhibition und Doxorubicin als Kombinationstherapie gegen GEP-NETs.....	88
4.2.2.2 Zelluläre Interaktion von anti-IGF1-R-AK gekoppelten Immunoliposomen mit humanen Tumorzellen <i>in vitro</i>	89
4.2.2.3 Pharmakokinetik 1H7 gekoppelter Liposomen.....	91
4.2.2.4 Therapeutische Wirksamkeit von anti-IGF1-R-AK-gekoppelten Immunoliposomen gegen humane BON Tumor Xenografts	94
5 Ausblick	97
6 Zusammenfassung.....	98
Literaturverzeichnis.....	100
Danksagung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
CCD	Charge-coupled-Device
Chol	Cholesterol
cm	Zentimeter
CT	Computer Tomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXR	Doxorubicin
EC	enterochromaffin
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
EPC	Ei-Phosphatidylcholin
FACS	Durchflußzytometrie
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
¹⁸ F-FDG	2-[¹⁸ F] Fluor-2-deoxy-Glukose
g	Gramm
G418	Geneticin
GEP-NET	Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat/Schwefelsäure
1H7	IGF1-R inhibierender Antikörper
HCl	Salzsäure
HS	Pferdeserum
HSPC	hydriertes Soja-Phosphatidylcholin
I	Jod
IGF	Insulin like growth factor
IGF1-R	Insulin like growth factor receptor 1
In	Inulin
i.p.	intraperitoneal
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium-Supplement
i.v.	intravenös

kg	Kilogramm
kb	Kilobase
KG	Körpergewicht
konv.	konventionell
l	Liter
λ	Wellenlänge
Luc	Luciferase
M	molar
Mal	Maleinimidgruppe
mg	Milligramm
MIBG	Metajodbenzylguanidin
ml	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
TBE	Tris Borat EDTA
U	Unit
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
N	Normal
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NET	neuroendokrine Tumore
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NNR-Ca	Nebennierenrindenkarzinom
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIT	Post-Insertionstechnik
PPE	Palmar-Plantar Erythrodysesthesia

P/S	Penicillin/Streptomycin
Rh-PE	Rhodamin-Phosphatidylethanolamin
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SDS	Natriumlaurylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SSLD	sterisch stabilisiertes, liposomales Doxorubicin
SSLD-PEG+	sterisch stabilisiertes, liposomales, SPIT nachpegyliertes Doxorubicin
SSLD-IgG	sterisch stabilisiertes, liposomales, mittels SPIT IgG-gekoppeltes Doxorubicin
SSLD-1H7	sterisch stabilisiertes, liposomales, mittels SPIT 1H7-gekoppeltes Doxorubicin
SSTR	Somatostatin Rezeptor
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SPIT	Sterol-basierte Post-Insertionstechnik
UV	ultraviolett
vs	versus

1 Einleitung

Maligne endokrine Tumore der Nebennierenrinde (Nebennierenrindenzarzinom, NNR-Zarzinom) und neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET) sind insgesamt seltene Erkrankungen. Diese Tumore sind in vielen Fällen durch einen langen, klinisch zunächst asymptomatischen Verlauf, charakterisiert. Neben der damit einhergehenden verspäteten Diagnosestellung, die oft erst in fortgeschrittenen Tumorstadien mit lokaler Infiltration und beginnender Metastasierung erfolgt, stellt vor allem die bisher geringe Effektivität systemischer Therapiekonzepte ein Problem für die klinische Betreuung dieser Patienten dar.

1.1 Nebennierenrindenzarzinom

Nebennieren sind hormonbildende Organe, die auf den oberen Polen der Nieren sitzen. Sie sind umgeben von einer Bindegewebskapsel und bestehen aus Nebennierenrinde und Nebennierenmark. Beim Nebennierenrindenzarzinom handelt es sich um einen seltenen und oft hochmalignen Tumor der Nebennierenrinde. Die jährliche Inzidenz des NNR-Zarzinoms liegt bei 1-2 Fällen pro eine Millionen Einwohner. Hierbei ist eine bimodale Altersverteilung mit höheren Inzidenzen in der ersten und fünften Lebensdekade auffällig [1]. Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 3-4 Jahre, die 5-Jahresüberlebenszeit wird selten erreicht [2-4]. Einer der Gründe für die schlechte Prognose liegt im häufig zunächst inapparenten klinischen Verlauf und einer verzögerten Diagnosestellung, wenn es zu Beschwerden durch Raumforderungen oder Zeichen eines Hormonexzesses gekommen ist. Ein wachsender Anteil von NNR-Zarzinomen wird auch zufällig im Rahmen einer abdominalen Bildgebung gefunden. Die chirurgisch radikale Resektion eines NNR-Zarzinoms stellt zum jetzigen Zeitpunkt den einzigen kurativen Behandlungsansatz dar. Eine langfristige Heilung ist jedoch in den meisten Fällen auch durch die operative Therapie nicht mehr möglich, da der Tumor bis zur Diagnose meist schon umliegendes Gewebe infiltriert hat oder zunächst unerkannte Metastasen vorliegen ([5], Abb.: 1-1). Entsprechend kommt es selbst bei radikaler Tumorsektion in 85% der Fälle zum Rezidiv [2]. Mitotane, eine Substanz mit adrenolytischen Eigenschaften, stellt eine Behandlungsoption im Falle inoperabler Tumoren, Metastasierung oder auch nach partieller Tumorsektion dar. Erfahrungswerte in der Behandlung von Nebennierenrindenzarzinomen mit klassischen Chemotherapeutika basieren hingegen bisher noch auf recht kleinen nationalen Studien [2, 6,

7]. Dennoch konnte sowohl für Streptozotocin und Mitotane [8], als auch für eine kombinierte Behandlung mit Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Mitotane [9] signifikante therapeutische Effekte bei der Behandlung von Patienten mit NNR-Karzinomen dokumentiert werden. Diese Behandlungsprotokolle werden gegenwärtig im Rahmen einer Phase III Studie für NNR-Karzinome miteinander verglichen (FIRM-ACT First prospective randomized interventional trial for ACC, www.firm-act.org). In kleinen Studien werden darüber hinaus in den letzten Jahren auch neue therapeutische Strategien wie Inhibitoren von P-Glykoprotein (MDR-1), des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und von Tyrosinkinase für die Behandlung von NNR-Karzinomen evaluiert [7].

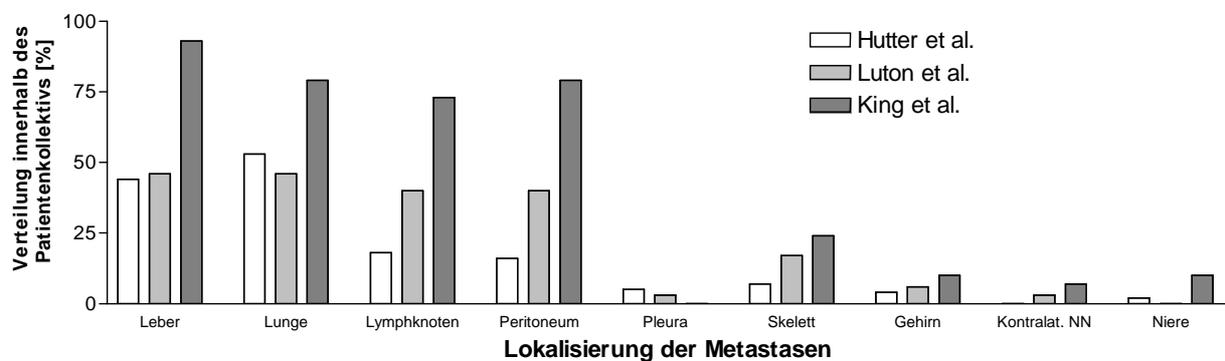


Abbildung 1-1: Bevorzugte Lokalisation von Fernmetastasen beim Nebennierenrindenzellkarzinom (Modifiziert nach [5])

Die Umsetzung neuer Therapiekonzepte ist hierbei allerdings erschwert durch die fehlende Verfügbarkeit unterschiedlicher *in vitro* und *in vivo* Modelle mit klinisch relevanten Eigenschaften. Die murine adrenokortikale Tumorzelllinie Y1 wurde in den letzten Jahren vielfach als Modell für NNR-Karzinome eingesetzt. Ein Nachteil dieser Zellen liegt allerdings in ihrer geringen steroidogenen Potenz zur Bildung von Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden [10]. Für die menschliche Tumorzelllinie Fang-8 wurde zwar eine Östrogenproduktion und Tumorentwicklung in Hamstern beschrieben, sie wurde in der Literatur allerdings nur zweimal aufgeführt und konnte sich als Standardmodell für NNR-Karzinome nicht durchsetzen [11, 12]. Für die adrenokortikalen humanen Tumorzellen SW-13 wurde mehrfach die Transplantierbarkeit in athymischen Mäusen beschrieben [13-15], jedoch zeigt diese Zelllinie keine Synthese und Sekretion von Steroidhormonen [16]. Bei der menschlichen Nebennierenrinde handelt es sich aber um ein komplexes endokrines Organ, welches in Abhängigkeit vom Besitz mit einer Kombination von Steroidbiosynthese-Enzymen unterschiedliche Steroidhormone sezerniert. Im Gegensatz zu den vorher genannten

Zelllinien hat sich die humane Nebennierenkarzinomzelllinie NCI-H295 hierfür in der Vergangenheit sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* als Tumormodell bewährt. NCI-H295 Zellen synthetisieren Mineralokortikoide, Glukokortikoide und adrenale Androgene und eignen sich daher gut als Modellsystem steroidogener Signalwege [10, 16, 17]. Zudem bilden NCI-H295 Zellen nach Tumorzellinjektion mit 90%-iger Anwachsrates menschliche Tumor-Xenografts in Nacktmäusen, welche typische Eigenschaften menschlicher NNR-Karzinome inklusive der Synthese von Steroidhormonen aufweisen [18]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dieses Modell allerdings noch auf die Induktion subkutaner Tumoren beschränkt, da es aufgrund mangelnder, wenig effizienter oder schwer zugänglicher bildgebender Verfahren an geeigneten Metastasierungsmodellen fehlt.

1.2 Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET)

Das diffuse neuroendokrine System umfasst die neuroendokrinen Zellen, die der embryonalen Neuralleiste, dem Neuroektoderm und Ektoderm entstammen und im adulten Organismus nicht als makroskopisch kompakte Organe organisiert sind [19]. Tumoren, die sich aus Zellen dieses Systems ableiten, zeichnen sich einerseits durch Ähnlichkeiten mit Neuronen und andererseits mit hormonproduzierenden, endokrinen Zellen aus. Viele neuroendokrine Tumore sind funktionell inaktiv und machen sich erst durch Komplikationen aufgrund des lokalen Tumorwachstums bemerkbar. Die Diagnosestellung erfolgt daher in vielen Fällen erst in fortgeschrittenen Tumorstadien mit lokaler Infiltration und beginnender Metastasierung [20]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt dementsprechend bei über 30% der Patienten mit NETs eine Metastasierung vor [21]. Endokrin aktive Tumore zeichnen sich durch eine übermäßige Hormonsekretion aus. Durch die Freisetzung spezifischer Hormone können sich dabei, abhängig von der Tumorentität, charakteristische klinische Syndrome herausbilden. NET können an verschiedensten anatomischen Stellen wie z.B. der Bronchialschleimhaut, Schilddrüse oder den Nebennieren auftreten. Die meisten NET sind allerdings im gastroenteropankreatischen System lokalisiert [19, 22]. Die Inzidenz neuroendokriner Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET) beträgt 2 – 4 pro 100 000 Einwohner pro Jahr [23, 24]. Die Malignitätsrate ist dabei auch abhängig von der Lokalisation des Primärtumors. Die 5-Jahresüberlebenszeit von Patienten mit metastasierten neuroendokrinen Tumoren pankreatischen Ursprungs beläuft sich auf nur 30%, während sie bei NET ilealen Ursprungs bei 45% liegt [25].

Bei den NET des Gastrointestinaltrakts unterscheidet man heute:

- die neuroendokrinen Tumore des Pankreas und
- die Karzinoide, die nach histogenetischen Gesichtspunkten in die Karzinoide des Vorder-, Mittel und Enddarms eingeteilt werden (Abb.:1-2) [26].

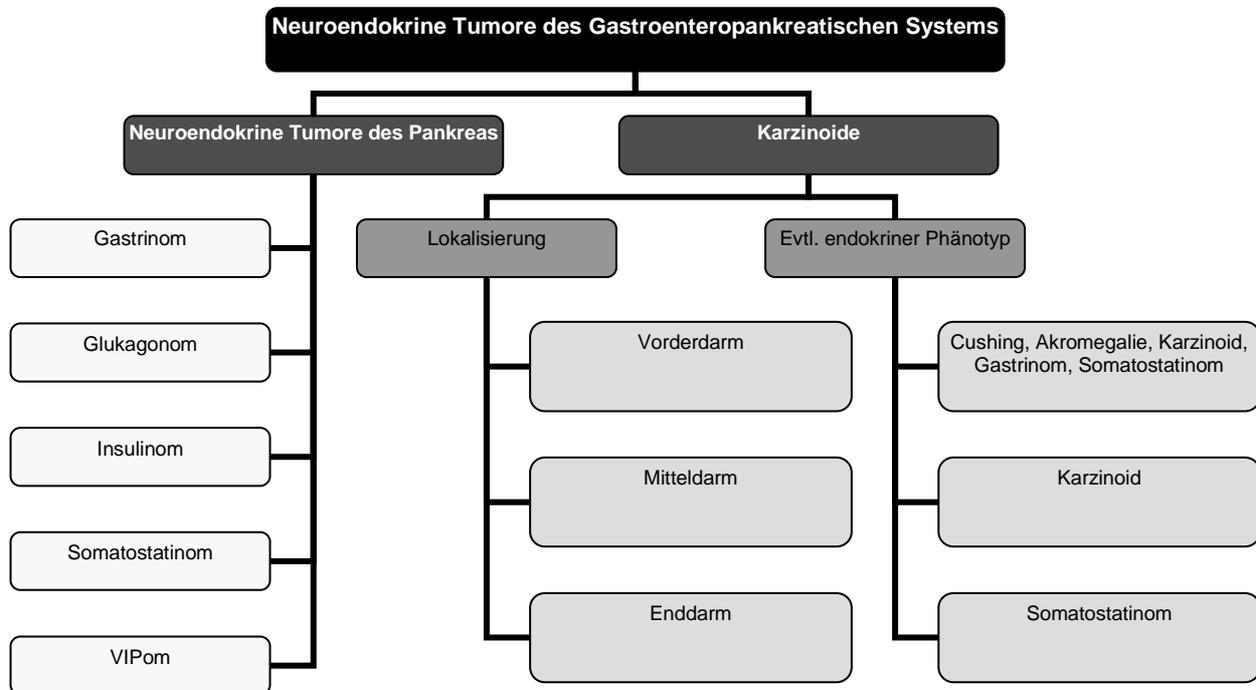


Abbildung 1-2: Einteilung der neuroendokrinen Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NETs) in neuroendokrine Tumore des Pankreas und Karzinoide (Modifiziert nach [26])

Karzinoide leiten sich von den enterochromaffinen (EC) Zellen des Gastrointestinaltrakts ab und können neben Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HAT) z.B. auch Bradykinin und Tachykinine sezernieren [19, 27]. Im Fall einer hormonellen Überproduktion dieser Peptide kommt es zur Ausbildung des klinisch charakteristischen Karzinoid-Syndroms mit Flush-Symptomatik, Diarrhö, asthmaartigen Anfällen und kardialen Manifestationen. Der embryogenetischen Verteilung der EC- Zellen im Körper folgend sind Karzinoide meist außerhalb des Pankreas lokalisiert ([28], Abb.: 1-3). Eine weitergehende Einteilung erfolgt nach Williams und Sandler (1963) in „Vorderdarm“ Karzinoide (Lunge, Bronchien, Thymus, Pankreas, proximales Duodenum, Abdomen), „Mitteldarm“ Karzinoide (distales Duodenum bis Colon ascendens) und „Enddarm“ Karzinoide (Colon transversum bis Rektum) [19, 29].

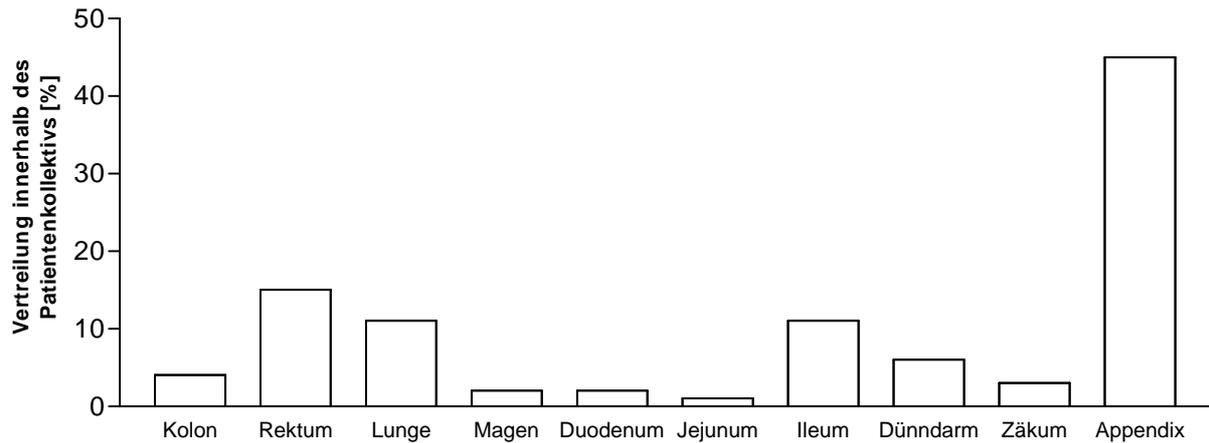


Abbildung 1-3: Prozentuale Verteilung der häufigsten Organmanifestationen bei Karzinoiden (Modifiziert nach [28])

Da ein Großteil bisher etablierter GEP-NET-Zelllinien aus Vorderdarm-Tumoren stammt [27, 30, 31], trägt der Mangel adäquater humaner Tumormodelle für Mitteldarm- und Enddarm-Karzinoiden zu der nur unzureichenden Datenlage zur Identifikation, Entwicklung und Therapie dieser Tumore bei [22]. Bisher wurden zwei neue Zelllinien aus Mitteldarm-Karzinoiden *in vitro* und deren Tumorstadium *in vivo* im subkutanen Tumormodell in Nacktmäusen etabliert [22, 32, 33]. CNDT2 Zellen bilden Kolonien in Soft-Agar, solide Tumoren in Nacktmäusen und exprimieren zudem einige Marker neuroendokriner Tumoren. Die Expressionsmuster variieren allerdings stark zwischen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen [22]. Die GOT1 Zelllinie zeichnet sich durch die Expression aller fünf Somatostatin-Rezeptor-Subtypen 1-5 (SSTR1-5) und der vesikulären Monoamintransporter Typ 1 und 2 aus (VMAT1 und VMAT2). Aufgrund dieser Eigenschaften konnten GOT1-Xenografts mithilfe des Somatostatin-Analogons ^{111}In -Oktreotid und des Katecholamin-Analogons ^{123}I -Metaiodobenzylguanidin erfolgreich szintigraphisch dargestellt werden. Darüber hinaus zeigen die Tumore eine starke Immunreaktivität für generelle endokrine Marker wie Chromogranin A und für spezifische Marker von Mitteldarm-Karzinoiden wie Serotonin [32]. Eine seit mehreren Jahren häufig verwendete Zelllinie ist die humane pankreatische Karzinoidzelllinie BON [22, 30, 34]. BON Zellen exprimieren sowohl epitheliale (Cytokeratin) und endokrine (Chromogranin A) Marker, als auch karzinoid-spezifische Peptide (Serotonin, Neurensin und Pancreastatin) [32] und führen bei Injektion einer ausreichend hohen Zellzahl zu 100% zur Bildung von Tumoren in Nacktmäusen [35]. Ursprünglich handelt es sich bei dieser Zelllinie um ein Vorderdarm-Karzinoid, sie vereinigt

aber einige Eigenschaften von Vorderdarm und Mitteldarm-Karzinoiden in sich. Mitteldarm-Karzinoiden zeichnen sich z.B. durch die Synthese und Sekretion von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) aus, Tumore des Vorder- und des Enddarms synthetisieren hingegen in erster Linie 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) [19, 34]. BON-Zellen enthalten allerdings sowohl 5-HT, als auch 5-HTP. Weiterhin weisen BON-Zellen sowohl runde, als auch pleiomorphe Granula auf. Runde Vesikel in der basalen Zellregion sind typisch für Vorderdarm-Karzinoiden, pleiomorphe Strukturen dagegen sind charakteristisch für Mitteldarm-Karzinoiden [19, 34]. Aus diesen Gründen werden BON-Zellen nun schon seit Jahren bevorzugt als GEP-NET Tumormodell eingesetzt. Dennoch bestehen immer noch enorme Einschränkungen in der vorklinischen Testung neuer Therapeutika durch die sehr limitierte Anzahl etablierter humaner Tumorzelllinien, denn gerade NET unterscheiden sich deutlich in ihren Eigenschaften abhängig von der vermuteten embryogenetischen Herkunft [22].

Die aktuellen Therapiekonzepte für Patienten mit GEP-NET basieren in erster Linie auf der primären Tumorresektion und im Fall bereits bestehender Metastasierung auf der Gabe von systemischen Therapeutika, sowie dem Einsatz Radionuklid-basierender Verfahren. Durch Therapieregime mit synthetischen Somatostatin-Analoga oder Interferon- α kann eine exzellente Kontrolle, der durch hormonelle Hypersekretion hervorgerufenen Symptomatik, erreicht werden. Allerdings zeigen diese Therapeutika nur in 5-11% der Behandelten zusätzlich eine antitumorale Wirkung. SOM230, ein neues Somatostatin-Analogon mit verlängerter Halbwertszeit von ungefähr 24 Stunden wurde vor kurzem entwickelt, um über seine Bindung an alle SSTR-Subtypen anti-tumorale Effekte zu verbessern [36, 37]. In der Vergangenheit wurden außerdem klassische Chemotherapeutika wie Streptozotocin, Fluoruracil, Doxorubicin, Dacarbazin, Etoposid und Cisplatin eingesetzt [36, 37]. Da das Ansprechen auf eine Monotherapie in der Regel sehr gering ist, wird in der Behandlung häufiger eine Kombinationstherapie gesetzt. Die Ansprechrate ist allerdings auch bei dieser Therapie stark abhängig vom Tumorursprung und dem proliferativen Potential [36]: Während NET pankreatischen Ursprungs Ansprechraten von 30-50% aufweisen [38], sind NET des Mitteldarms in der Regel resistent gegen zytotoxische Chemotherapien [36, 37, 39]. Das Versagen „klassischer“ Behandlungsmöglichkeiten wird demnach auch durch die individuelle Heterogenität dieser Tumorerkrankung bedingt.

Zusammenfassend besteht für keine der besprochenen endokrinen Tumorerkrankungen zurzeit eine effektive medikamentöse Behandlungsoption. Neben verspäteter Diagnosestellung und funktioneller Heterogenität endokriner Tumore, erklären sich hierdurch die schlechten 5-Jahresüberlebensraten für NNR-Karzinome und GEP-NET nach erfolgter Metastasierung. Dieses unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung sowohl neuer therapeutischer Ansätze und Zielstrukturen, als auch innovativer Tumormodelle für deren präklinische Testung.

1.3 Liposomen

Liposomale Therapieprinzipien haben in den letzten Jahren einen wichtigen Stellenwert als effiziente und nebenwirkungsarme Krebstherapien eingenommen. Leere Liposomen sind in der Regel nicht-toxisch, es sei denn sie werden in sehr hohen Dosen verabreicht. Ihre Zusammensetzung aus natürlich vorkommenden Lipiden und gut verträglichen Stabilisatoren macht sie daher attraktiv für die Verkapselung verschiedenster Substanzen [40]. Zu den pharmakologisch wirksamen Substanzen, die in liposomalen Präparationen verkapselt werden können, gehören Zytostatika, aber auch Nukleinsäuren wie Plasmid DNA, antisense Oligonukleotide oder siRNA [41]. Zudem können neben wasserlöslichen auch lipidlösliche Substanzen liposomal transportiert werden. Wichtige Voraussetzungen für einen optimalen liposomalen Transport sind allerdings eine hohe Verkapselungseffizienz, ein vermindertes Verteilungsvolumen im Organismus verglichen mit kleinmolekularen Therapeutika, eine hohe Blutstabilität und ein ideales Freisetzungsverhalten in Abhängigkeit von der jeweiligen Anwendung [42].

1.4 Liposomales Doxorubicin

Doxorubicin (DXR), ein zytostatisches Antibiotikum der Anthracyclin-Reihe, spielt eine bedeutende Rolle in der Chemotherapie solider Tumoren. Die meisten kleinmolekularen Chemotherapeutika weisen allerdings nach intravenöser Gabe ein hohes Verteilungsvolumen unter Einschluß gesunder Gewebe auf. Für freies Doxorubicin kann ein sehr hohes Verteilungsvolumen von 25 l/ kg angenommen werden [43]. Dieses begünstigt zusammen mit den zytotoxischen Eigenschaften des Chemotherapeutikums auch das Auftreten diverser unerwünschter Nebenwirkungen wie Kardiomyopathien, Myelosuppression, gastrointestinaler

Toxizität, Übelkeit, Erbrechen, aber auch Haarverlust, und Entzündungen der Schleimhaut [44]. Die Kardiotoxizität stellt hierbei die Dosis-limitierende Nebenwirkung dar [40]. Die liposomale Verkapselung von Doxorubicin hingegen schützt dieses nicht nur vor Metabolisierung und damit Inaktivierung im Plasma [40], sondern ändert auch dessen Gewebegängigkeit und damit Verteilung im Körper [45, 46]. Es kommt zum Effekt des „passiven Tumortargetings“ (Abb.: 1-4) [46, 47], mit dem man die erhöhte Liposomen-Akkumulation im Tumor bezeichnet. Die Größe der Liposomen (45-150 nm) bedingt, dass diese nicht mehr die 2 nm großen Poren des Gefäßendothels in gesundem Gewebe passieren können. In Leber und Milz, die sich durch ein grobporigeres, sogenanntes fenestriertes Endothel auszeichnen, können Liposomen zwar transfundieren, ein großer Teil wird allerdings durch Makrophagen wiederum herausgefiltert. Liposomales DXR akkumuliert auf diesem Wege im Tumor und im Umkehrschluss kommt es zu einer reduzierten Anreicherung der Substanz im Herzen und anderen Geweben im Vergleich zu freiem DXR. Darüber hinaus führen das Fehlen funktionierender Lymphbahnen, zusammen mit hohem interstitiellen Druck, zu einer Art Einschluss im Tumorgewebe, und einer daraus resultierenden verlangsamten Abbaurrate der verkapselten Substanz.

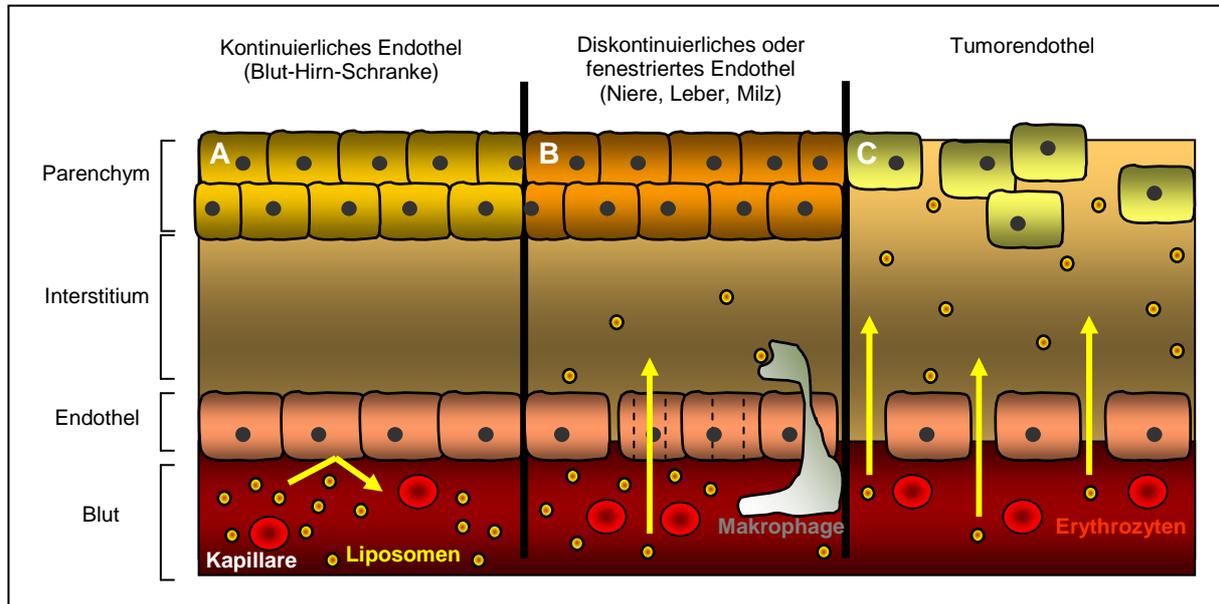


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des „passiven Tumortargetings“ liposomaler Präparationen (Modifiziert nach [48])

Diese Effekte konnten schon mit der ersten Generation liposomalen Doxorubicins genutzt werden. Hierzu zählen Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung, typischerweise aber

mit einem hohen Anteil an Phosphatidylcholin und Cholesterol [40]. Als prominenter Vertreter in klinischer Anwendung ist hier Myocet[®] (auch TLC D-99 oder liposomal verkapseltes DXR-Citrat) zu nennen [49]. Hierbei handelt es sich um eine nicht sterisch stabilisierte Form liposomalen DXRs [40, 50].

1.5 PEGyliertes liposomales Doxorubicin

PEGyliertes liposomales DXR weist ein pharmakokinetisches Profil auf, das sich durch eine erhöhte Blutzirkulationszeit in Kombination mit einem erniedrigten Verteilungsvolumen auszeichnet [47]. Die Blutstabilität der Wirksubstanz wird insbesondere durch zwei Faktoren beeinflusst: 1. Die Aufnahme zirkulierender Liposomen durch Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) und 2. die Stabilität der liposomalen Präparation, die im Wesentlichen die Abbaurate der verkapselten Substanz definiert [51]. Durch die Kopplung des voluminösen Makromoleküls Polyethylenglykol (PEG) an die Oberfläche von Liposomen wird deren Interaktion mit Plasma-Opsoninen verhindert und dadurch sterisch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen mit Komponenten des RES deutlich reduziert [40, 51, 52]. Aus diesem Grund wird diese Liposomenart auch als sterisch stabilisierte Liposomen oder STEALTH[®] Liposomen bezeichnet (Abb.: 1-5) [51, 53]. Die Erhöhung der Blutzirkulationszeit resultiert dann wiederum in einer signifikanten liposomalen Akkumulation und damit Wirkstoffanreicherung in Geweben mit erhöhter vaskulärer Permeabilität [45, 54, 55]. Im Gegensatz zu konventionellen Liposomen weisen sterisch stabilisierte Liposomen dosisunabhängige und verlangsamte Abbaukinetiken im Blut und erhöhte therapeutische Effizienzen auf [40, 46, 56-58]. Dabei erzielen in der Regel die PEGylierten liposomalen Präparationen mit der langsamsten Freisetzungsrates die höchste Wirkstoffakkumulation im Tumor [49, 59]. Der Stabilisator PEG ist in den für sterisch stabilisierte Liposomen verwendeten Dosierungen gut verträglich und wird unmetabolisiert mit dem Urin ausgeschieden [40]. Die Entwicklung der STEALTH[®] Technologie mündete in der klinischen Zulassung PEGylierten liposomalen DXRs, welches in Europa unter dem Namen Caelyx[®] und in den USA als Doxil[®] erhältlich ist [45, 51, 52]. Die Verkapselung von Doxorubicin in konventionelle oder sterisch stabilisierte Liposomen eliminiert bzw. reduziert signifikant die Therapie-limitierende Kardiotoxizität [46, 53]. Es kommt ebenfalls zur Verminderung der Myelosuppression, wobei die Reduktion bei sterisch stabilisierten Liposomen höher ist. Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall treten bei Caelyx[®]-Gabe kaum auf, bei Myocet[®] wurden diese Nebenwirkungen häufiger beobachtet, waren aber im Vergleich

zur freien Substanz deutlich reduziert. Die Dosis limitierende Nebenwirkung bei der Verwendung von Caelyx[®] ist das Palmar-Plantar Erythrodysesthesia-Syndrom. Hierbei handelt es sich um schmerzhafte Läsionen der Haut, die auch als Hand und Fuß-Syndrom bezeichnet werden [55, 60]. Aber auch bei einer Dosisreduktion zur Minimierung dieser Nebenwirkung bleibt eine hohe anti-tumorale Effizienz im Vergleich zu Standard-Chemotherapien erhalten [40].

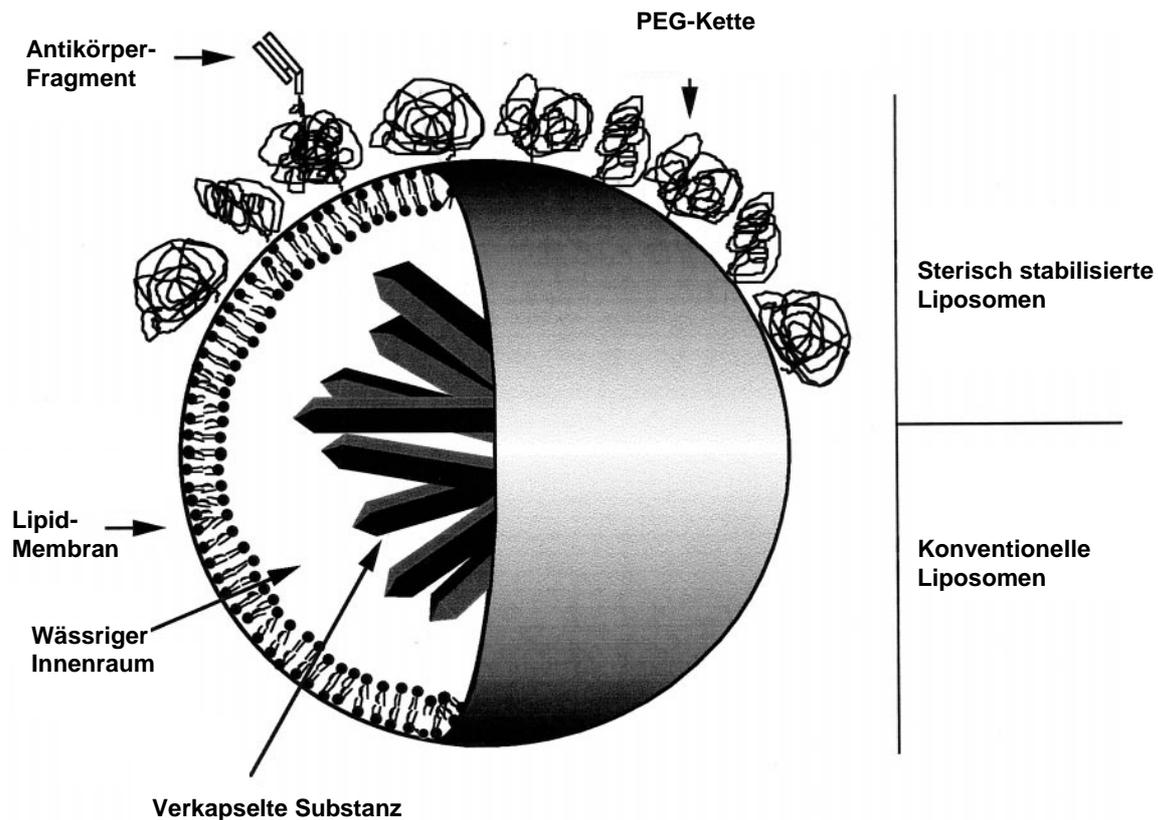


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung Substanz beladener Liposomen mit (sterisch stabilisiert) und ohne (konventionell) PEG-Oberflächenmodifikation (Modifiziert nach [40])

1.6 pH-abhängig freisetzen Liposomen

Eine Strategie zur Verbesserung der therapeutischen Effektivität liposomalen DXRs ist die Entwicklung einer pH-abhängigen Wirkstofffreisetzung aus Liposomen. Hierbei soll die verkapselte Substanz vermehrt in Umgebungen mit erniedrigten pH-Werten, wie dem Tumorgewebe und den darin enthaltenen endosomalen Kompartimenten, entlassen werden. Dieses kann entweder durch den Einbau pH-sensitiver Phospholipide und Peptide in

liposomale Membranen [53, 61] oder durch eine Veränderung des Beladungsverfahrens erreicht werden. Für schwache Basen wie DXR kann eine optimale Beladung über das sogenannte „Remote Loading“ erreicht werden. Bei dieser Art der Beladung kommt es zur Erzeugung eines transmembranalen pH-Gradienten und der nachfolgenden Diffusion von DXR in das Liposomeninnere. Oft wird hierfür, wie z.B. für Caelyx® ein Ammoniumsulfatgradient verwendet. In einem neu entwickelten Verfahren der Pharmazeutischen Technologie der Universität Freiburg erfolgt die Beladung über einen Ammoniumhydrogenphosphat-Gradienten. Für dieses Beladungsverfahren konnte *in vitro* eine pH-abhängige DXR-Freisetzung aus den Liposomen nachgewiesen werden [62]. Der Nachweis einer pH-abhängigen Freisetzung im Tumorgewebe steht allerdings noch aus und könnte *in vivo* eine deutliche Verbesserung der therapeutischen Effizienz zur Folge haben.

1.7 Immunoliposomen

Der Großteil nicht Signal-gekoppelter Liposomen interagiert nicht direkt mit den Zielzellen. Es wird vielmehr angenommen, dass die therapeutische Effektivität die Konsequenz einer unspezifischen Wirkstofffreisetzung im Tumor ist [47]. Um einen gezielteren Transport und eine noch effektivere Wirkstoff-Freisetzung in die Zielzellen zu erreichen, sind in den letzten Jahren verschiedene Strategien entwickelt worden, um spezifische Strukturen an der Oberfläche von Tumorzellen anzusteuern. Bei diesen Signalen kann es sich um verschiedenste Moleküle wie Antikörper [47, 63, 64], Antikörper-Fragmente [65-67], Peptide [68-70], Kohlenhydrate [71] oder auch Glykoproteine [72, 73] handeln. Im optimalen Fall sollte eine solche Interaktion zu einer Internalisierung des Liposoms führen, um den Wirkstoff innerhalb der Tumorzellen bioverfügbar zu machen [40].

Bei der Liganden-Kopplung besteht die Möglichkeit Antikörper direkt an der liposomalen Oberfläche (Abb.: 1-6 Typ A und B) oder an das freie Ende einer in der Membran-Doppelschicht verankerten PEG-Kette zu koppeln (Abb.: 1-6 Typ C) [74]. Für die zweite Möglichkeit wird im Wesentlichen zwischen der konventionellen und der Post-Insertionstechnik (PIT) unterschieden [75-77]. Der methodische Ablauf für beide Techniken ist ausführlich unter 2.3.7.1 und 2.3.7.2 beschrieben.

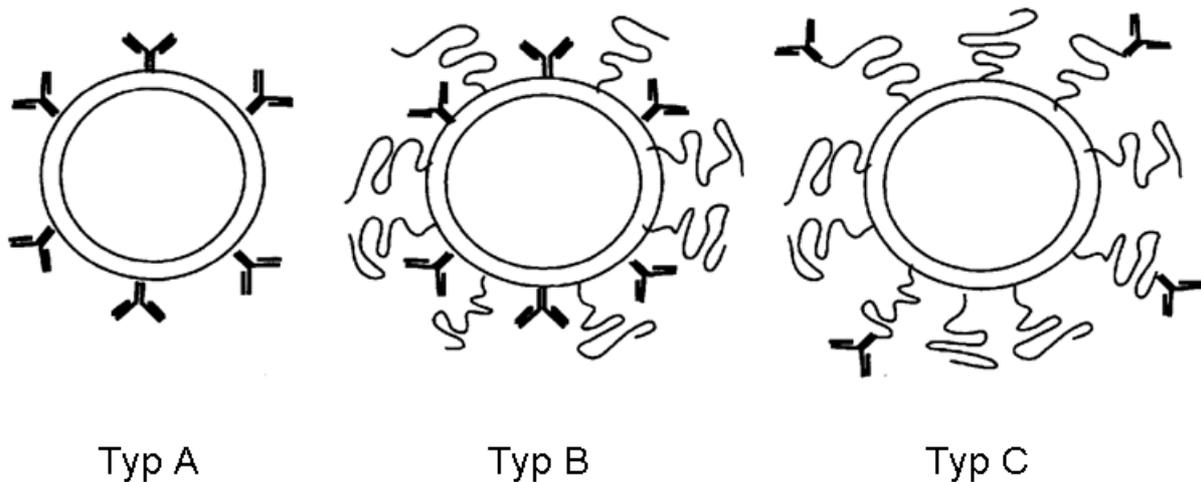


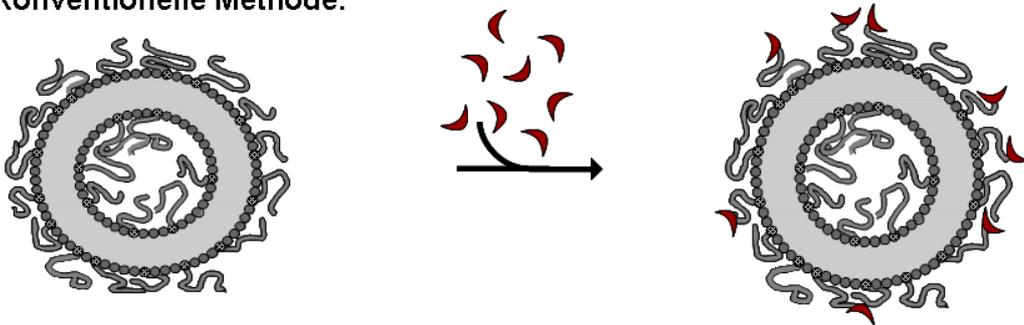
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Antikörpern auf der liposomalen Oberfläche. Dargestellt sind nicht-PEGylierte Liposomen (Typ A), PEGylierte konventionell gekoppelte (Typ B) und PEGylierte distal gekoppelte (Typ C) ([74]).

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal stellt der Zeitpunkt der Anker-Zugabe dar. Bei der konventionellen Kopplung erfolgt die Zugabe des Ankers schon bei der Herstellung des Lipidfilms zu Beginn der Synthese. Dadurch kommt es zu einer unselektiven Anreicherung des Ankers sowohl in der äußeren, als auch der inneren Liposomen-Membran. Infolge dessen steht reaktiver Anker auch im Innenraum zur Verfügung, welcher ungewollt mit der verkapselten Substanz reagieren und das maximale Beladungsvolumen reduzieren kann (Abb.: 1-7 A). Bei der PIT erfolgt eine selektive Verankerung eines Anker-Liganden-Konjugats in der äußeren Schicht schon fertiger Liposomen [76]. Als lipophiler Anker wird im Fall der Sterol-basierten Post-Insertionstechnik (SPIT) ein Sterolgerüst verwendet. Diese Zusammensetzung bietet den Vorteil einer Einlagerung des Konjugats in die äußere Membranoberfläche bei Raumtemperatur, was eine eventuelle wärmeinduzierte Denaturierung eines Liganden ausschließt (Abb.: 1-7 B) [78].

Ein großes Problem bei der Verwendung von Immunoliposomen stellt allerdings die erhöhte Immunogenität dar [79], die oft zu einer schnelleren immunvermittelten Eliminierung der Liposomen aus dem Blut führt [47]. Um einen effizienteren Wirkstoff zu erhalten, muss daher der Effekt, der durch die Signalkopplung erreicht wird, die Differenz der zirkulierenden Liposomen mindestens ausgleichen. Zusätzlich zu einer direkten Ansteuerung der Tumorzelle und einer Liganden-vermittelten Internalisierung des Liposoms, könnte dies über eine gleichzeitige Inhibierung eines für die Tumorzelle überlebenswichtigen Signalwegs erreicht

werden. Solche Effekte könnten durch den Einsatz funktionell relevanter monoklonaler Antikörper erzielt werden.

A Konventionelle Methode:



B Post-Insertionstechnik:

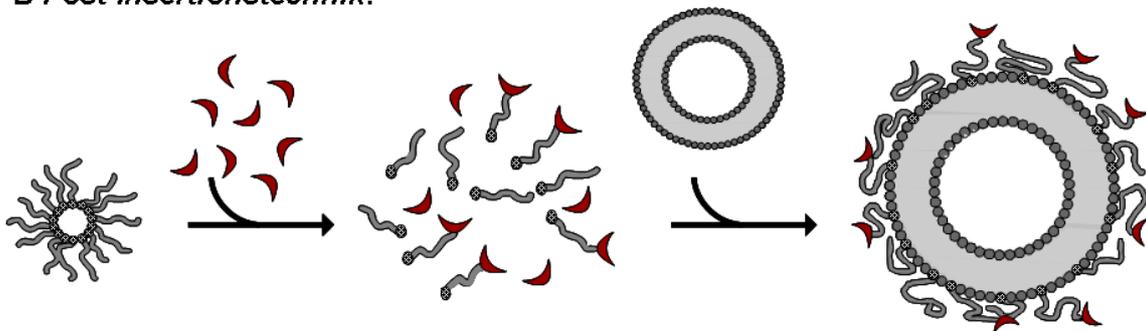


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Kopplungstechniken (Modifiziert nach [78])

Bisher wurde eine Vielzahl therapeutisch wirksamer, monoklonaler Antikörper entwickelt und mehr als 20 Moleküle in die klinische Anwendung zur Behandlung verschiedenster Krankheiten wie z.B. Autoimmunerkrankungen, kardiovaskulärer und Tumor-Erkrankungen aufgenommen [53, 80, 81]. Bei den entsprechenden Antigenen kann es sich sowohl um frei diffundierende Liganden wie TNF α (im Fall von Infliximab, Adalimumab, Certolizumab) oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (für Bevacizumab) handeln oder aber um Rezeptoren an der Zelloberfläche von Zielzellen. Beispiele hierfür sind Cetuximab (Erbix[®]) und Panitumumab (Vectibis[®]), die gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor gerichtet sind und speziell zur Antikörper-basierten Therapie von Kopf-Hals-Tumoren und metastasierten kolorektale Karzinomen entwickelt werden [81-84]. Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen Einsatz eines therapeutisch monoklonalen Antikörpers ist die Verwendung von humanisierten anti-HER2/neu-Antikörpern (Trastuzumab, Herceptin[®]) als alleinigem

Wirkstoff oder in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie bei der Behandlung des Mammakarzinoms [80, 84]. Park et al. gelang überdies die Herstellung von DXR beladenen Anti-HER2-Immunoliposomen, deren Internalisierung von HER2-überexprimierenden Tumorzellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte [85] und die in HER2-überexprimierenden Brustkrebs-Xenografts eine deutlich gesteigerte anti-tumorale Wirkung im Vergleich zu freiem und sterisch stabilisiertem liposomalen Doxorubicin zeigen [86].

Obwohl es sich bei therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörpern um eine interessante neue Behandlungsstrategie für einige Krebsarten handelt, erzielt in den meisten Fällen eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung deutlich erhöhte Effizienzen verglichen mit der alleinigen Gabe des Antikörpers [53, 83, 84, 87]. Dieses Vorgehen birgt allerdings bei konventionellen Chemotherapien wiederum das Risiko erhöhter Nebenwirkungen. Zudem handelt es sich um vielversprechende Ansätze, die jedoch bisher nur für eine recht begrenzte Anzahl an Tumorentitäten verfügbar sind, wozu endokrine Tumore zurzeit noch nicht zählen.

1.8 Der IGF1-Signalweg

Die Blockade des IGF1-R (Insulin like growth factor receptor 1) abhängigen Signalwegs stellt eine aussichtsreiche neue Strategie für die Behandlung verschiedener Tumorentitäten dar und ist damit auch eine interessante Zielstruktur für Immunoliposomen. Der IGF1 Rezeptor gehört zur Familie der transmembranen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und besteht aus zwei α und zwei β Untereinheiten mit Bindungsaffinitäten sowohl für IGF1 als auch IGF2. Die Bindung der Liganden an die extrazellulären α Ketten resultiert in einer Konformationsänderung des Rezeptors und Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI(3)K-Akt-mTOR) und des Ras/Raf/mitogen-activated protein (MAP) Kinase Signalwegs [88-90]. Durch Überexpression und übermäßige Aktivierung spielt das IGF-System eine Schlüsselrolle für Transformation, Wachstum und Überleben von Tumorzellen in einer Vielzahl menschlicher Tumorarten [91-98]. GEP-NETs und NNR-Cas gehören zu den Tumorentitäten, bei denen die Aktivierung von IGF1-R abhängigen Signalwegen, einschließlich einer PI(3)K-Akt-mTOR Aktivierung, eine signifikante Rolle bei der Tumorentwicklung spielen [97, 99-103]. Aufgrund der onkogenen Eigenschaften des IGF Systems wurden in den letzten Jahren verschiedene therapeutische Strategien entwickelt, die am IGF1-R ansetzen. Hierzu gehören neben monoklonalen Antikörpern, Tyrosinkinase-Inhibitoren, antisense RNA auch dominant negative IGF-1R Gen

Varianten und Peptid-Aptamere [88, 95, 104-108]. Bisher konnten einige dieser Substanzen mit ersten vielversprechenden Resultaten in präklinischen und frühen klinischen Studien getestet werden. Obwohl die Aktivität der einzelnen Substanzen für verschiedene Tumorentitäten demonstriert werden konnte [108-110] zeigen neueste Studien, dass kombinierte Behandlungen mit Zytostatika wie DXR die Effizienz dieser gerichteten Therapiestrategien erhöhen können [106, 111-113].

1.9 Ziel der Arbeit

Grundlage dieser Arbeit war die Etablierung und Optimierung bereits beschriebener Tumormodelle für endokrine Tumoren sowie die Entwicklung neuer Modelle, die die pathophysiologische Situation im Patienten besser abbilden. Einige dieser Tumormodelle sollten dann im weiteren Arbeitsprogramm der präklinischen Testung therapeutisch aktiver Substanzen dienen.

Hauptaugenmerk lag jedoch auf der Entwicklung neuer liposomaler Therapien gegen endokrine Tumore und deren pharmakokinetische und therapeutische Testung *in vivo*. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

1. Die Untersuchung des pharmakokinetischen Verhaltens neuer, pH-abhängig-öffnender Liposomen im Vergleich zu klinisch schon etabliertem liposomalen DXR (Caelyx[®]).
2. Die Entwicklung einer neuen gegen den IGF1-Rezeptor gerichteten liposomalen Tumorthherapie und die Evaluierung des pharmakokinetischen und therapeutischen Verhaltens *in vivo*.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Materialien

Gerätname/Materialien	Firma
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
BrdU Assay	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BSA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Caelyx	Essex Pharma, München
Caspase Glo 3/7-Assay	Promega, Mannheim
CCD-Kamera	IVIS 100 Imaging System, Xenogen, Alameda, CA, USA
DAB (3,3'-diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA Leiter (50bp, 100bp, 1kb)	New England Biolabs, Frankfurt
Domitor	Pfizer, Berlin
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, USA
ELISA-Mikrotiterplatten-Waschgerät Tecan SLT	SLT Labinstruments, Crailsheim
Gel Imager	Intas Göttingen
Heizblock Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator Ultra Turrax	IKA-Werke, Staufen
Hydrocortison	Pfizer, Berlin
IGF1-R-Antikörper (1H7)	Acris Antibodies, Herford
Isofluran - Forene®	Abbott GmbH, Wiesbaden
Lichtmikroskop (MPS52)	Leica Microsystems, Wetzlar
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ketanest	Pfizer, Berlin
Liquid Blocker Super PapPen, Fettstift	G.Kisker, Steinfurt
Living Image Software 2.50	Xenogen, Alameda, CA, USA
MiniLumat 9506	Berthold, Bad Wildbad
Mithras multiwellreader	Berthold, Bad Wildbad
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Novalgine-Tropfen	Hoechst, Frankfurt am Main
Pipetten Eppendorf Reference® PhysioCare	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Pipetman®	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Power Pac 300 (Spannungsquelle)	BioRad, Hercules, CA, USA
96 well Polystyren- Platte MaxiSorp™	Nunc, Langenselbold
QIAFilter™ Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Heidelberg
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Heidelberg
Reaktionsgefäße Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg

Gerätname/Materialien	Firma
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Promega, Mannheim
Skalpelle	PFM, Köln
SPECTRA Mikroplattenreader	SLT Labinstruments, Crailsheim
Spritzen BD Microfine (U40)	Becton Dickinson, Heidelberg
SV Total RNA Extraction System	Promega, Madison, WI, USA
T4-Ligase	Fermentas, St-Leon-Roth
UV-Schirm UVT-28	Herolab, Wiesloch
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, CA, USA
Victor ³ 1420 multi-label counter	Perkin Elmer, Rodgau
Whatman Filterpapiere	Schleicher & Schuell, Dassel
Z-Competent <i>E. Coli</i> -Transformation Kit	Zymo Research, CA, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge Hettich Ultra 2S	Hettich, Tuttlingen
Ziege anti-Maus biotinylierter IgG	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Ziegen-Serum	Jackson Immuno Research Lab Inc

Tabelle 2-1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Tiere/ Haltung	Herkunft
Balb/c 6-8 Wochen alt, weiblich Haltung im Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt in Standard-Maus-Käfigen mit einer Größe von 15 cm x 27 cm x 42 cm und einer Dichte von maximal 8 Tieren pro Käfig	Charles River Germany Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld
BDF-1 6-8 Wochen alt, weiblich Haltung im Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt in Standard-Maus-Käfigen mit einer Größe von 15 cm x 27 cm x 42 cm und einer Dichte von maximal 8 Tieren pro Käfig	Charles River Germany Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld
NMRI-Foxn1/nu 6-8 Wochen alt, weiblich Haltung in der Zentralen Versuchstierhaltung der Kliniken Innenstadt in IVC-Maus-Käfigen Typ II long mit einer Dichte von maximal 5 Tiere pro Käfig	Harlan Winkelmann Germany Gartenstraße 27, 33178 Borcheln

Tabelle 2-2: Mausstämme, Alter, Geschlecht, Haltungsbedingungen und Herkunft

2.1 Zellkultur (Zelllinien, Assays, Medien und Zusätze)

Zelltyp und Passagierung	Medien und Zusätze
hBON Humanes Karzinoid (1:10)	DMEM:F12 10% FBS 1% P/S
hBON-[pfLuc-N1] Humanes Karzinoid stabil transfiziert mit [pfLuc-N1] (1:10) (3.1.5.1)	DMEM:F12 10% FBS 1% P/S 400 µg/ml G418
mC26 Murines kolorektales Karzinom (1:10)	DMEM 10% FBS 1% P/S
hNCI-H295 Humanes Nebennierenrindenkarzinom (1:5)	RPMI 1640 10% FBS 1 x ITS 1 x 10 ⁻⁸ M Hydrocortison 1% P/S
hNCI-H295 [pfLuc-N1] Humanes Nebennierenrinden-karzinom stabil transfiziert mit [pfLuc-N1] (1:5) (3.1.5.1)	RPMI 1640 10% FBS 1 x ITS 1 x 10 ⁻⁸ M Hydrocortison 1% P/S 400 µg/ml G418
mACT1 [114] Murines Nebennierenrinden-karzinom transgener Maus 1 (1:5)	DMEM:F12 2,5% FBS 2,5% HS 1 x ITS 1% P/S
mACT7l [114] Murines Nebennierenrinden-karzinom transgener Maus 7 links (1:5)	DMEM:F12 2,5% FBS 2,5% HS 1x ITS 1% P/S

Tabelle 2-3: Auflistung der verwendeten Tumorzelllinien, Passagierung, Nährmedien und Zusätze.

Alle Medien und Zusätze für die Zellkultur stammten, wenn nicht anders erwähnt, von Invitrogen/Gibco.

2.1.3 Stabile Transfektion und G418-Selektion

Die Transfektion der Zelllinien BON und NCI-H295 erfolgte mit dem Transfektionsreagenz TransFast der Firma Promega (Mannheim, Deutschland). Hierfür wurden je 50 000 Zellen pro

Vertiefung auf 6well Platten ausgesät, frisches Transfast mit sterilem Wasser angesetzt und nochmal über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsmix laut Herstellerangaben für zwei DNA-Konzentrationen (0,75 und 1 μg) vorbereitet. Nach 10-15 minütiger Inkubation wurde dann vorsichtig das Zellmedium abpipettiert und je 200 μl Transfektionsmix über die Zellen gegeben. Nach Inkubation bei 37°C für eine Stunde wurde dieser dann mit 1 ml vorgewärmtem Medium überschichtet. Nach 24 Stunden bei 37°C erfolgte noch mal ein kompletter Austausch des Nährmediums. Vor der dann folgenden mehrwöchigen Selektion der transfizierten Zellen mit G418 waren für die Zelllinien BON und NCI-H295 G418-Konzentrationsreihen durchgeführt worden. Die getesteten Konzentrationen lagen hier bei 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 und 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418. Die ermittelte niedrigste G418-Konzentration, bei der alle nicht-transfizierten Zellen starben, lag sowohl für BON als auch für NCI-H295-Zellen bei 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und wurde im weiteren zur Selektion auf stabile Transfektanden eingesetzt. Der Einsatz des Selektionsmediums erfolgte dabei alternierend mit dem jeweils normalen Zellmedium (2.1.2).

2.1.4 Zellproliferations-ELISA, BrdU (colorimetrisch)

Zur *in vitro* Untersuchung der Zellproliferation wurde der Zellproliferations-ELISA, BrdU der Firma Roche Diagnostics, Mannheim verwendet. Mit diesem colorimetrischen Immunoassay erfolgte die Quantifizierung der Zellproliferation basierend auf der Messung des kompetitiven Einbaus des Thymidin-Analogons, 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese. Hierfür wurden Zellen in unterschiedlicher Anzahl (je nach Zelllinie) auf 96 well Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vom nächsten Tag an wurde die jeweilige Testsubstanz dann in einem finalen Volumen von 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ in Triplets mit den Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 72 Stunden folgte die BrdU-Markierung mit je 10 μl BrdU-Labeling-Lösung und anschließender sechsständiger Inkubation. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit je 200 μl FixDenat/well denaturiert und fixiert. Dann wurden je 100 μl Anti/BrdU—POD-Arbeitslösung (frisch angesetzte 1:100 Verdünnung von Anti/BrdU-Stock-Lösung mit Antikörper-Verdünnungs-Lösung) zugegeben und für 1 – 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließenden Waschschrte mit 1 x PBS wurden dreimal im „Microplattenwasher“ der Firma Tecan (Crailsheim, Deutschland) durchgeführt. Nach dem finalen Absaugen wurden je 100 μl Substratlösung/well zugegeben und noch einmal für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Reaktion wurde dann mit je 25 μl 1M

H₂SO₄ abgestoppt und anschließend bei 450 nm und 650 nm im SPECTRA Mikroplattenreader der Firma Tecan detektiert.

2.1.5 MTT-Test

Der Nachweis der Zellvitalität mithilfe des MTT-Tests beruht auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Der Test wurde im 96 well Platten-Verfahren durchgeführt. Dafür wurden je 20 000 BON-Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Testsubstanzen hinzu pipettiert. Nach 72-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und mit MTT versetztes Medium zugegeben (0,5mg MTT/ ml Medium). Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die gleiche Menge an 10% SDS/ 0,01 M HCl zugefügt und dann colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm mithilfe des SPECTRA Mikroplattenreaders der Firma Tecan detektiert.

2.1.6 Luciferase-Assay

Nach stabiler Transfektion von Zellen mit dem Plasmid pLuc-N1 (2.4.1), wurde die funktionelle Expression des firefly Gens *in vitro* mithilfe des Dual-GloTM-Luciferase-Assay Systems der Firma Promega überprüft. Die Messung erfolgte am Luminometer MiniLumat 9506 der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland).

2.1.7 Caspase-Assay

Zur Untersuchung der Apoptose Induktion nach Doxorubicin und 1H7 Behandlung (3.2.2.1) wurde der Caspase Glo 3/7-Assay der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet. Ausgesät wurden hierfür 20 000 BON Zellen pro well auf einer weißen 96 well Polystyren-Platte zur Detektion der Biolumineszenz (MaxiSorpTM, Nunc, Langenselbold, Deutschland) Für die kombinierte Behandlung erfolgte eine zweistündige Vorinkubation mit 1H7 vor einer sechsstündigen Behandlung mit Doxorubicin. Die Detektion erfolgte am Victor³ 1420 multi-label counter der Firma Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland).

2.2 Tumormodelle

2.2.1 Allgemeines

Bei den etablierten Tumormodellen handelte es sich um Allotransplantationen muriner Tumorzelllinien in syngene Mäuse bzw. Xenotransplantationen humaner Tumorzellen in athymische Mäuse. Die Induktion der Tumoren erfolgte dabei, mit Ausnahme vom Lebermetastasierungsmodell, immer über eine subkutane Injektion von Tumorzellen in den Nackenbereich von Mäusen (Abb.: 2-1).

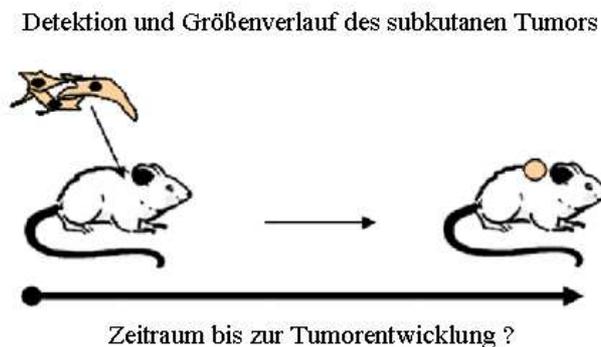


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Injektion von Tumorzellen in den Nackenbereich von Mäusen zur Induktion eines subkutanen Tumors.

Die murinen Tumorzelllinien C26, ACT1 und ACT71 (2.1.2) wurden in ihre syngenen, immunkompetenten Mäuse Balb/c bzw. BDF1 injiziert. Die Tumorentwicklung für die humanen Zelllinien NCI-H295 und BON wurde in heterologen Xenograft-Modellen in athymischen NMRI nu/nu Mäusen untersucht.

2.2.2 C26 Kolon Karzinom Modell (subkutan und Lebermetastasierung)

6-8 Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse wurden von der Firma Charles River Germany, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld bezogen. Die Tiere wurden ausschließlich zu Tierversuchszwecken gezüchtet. Alle Tiere wurden im Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt gehalten. Die Haltung erfolgte in Standard-Maus-Käfigen mit einer Größe von 15 cm x 27 cm x 42 cm und einer Dichte von maximal 8 Tieren pro Käfig. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden, die Tiere wurden *ad libitum* mit Standard-Maus-Futter und Wasser versorgt. Während der aktiven Versuchsteile erfolgte zweimal täglich eine Untersuchung der Tiere, um Verhaltensauffälligkeiten zu erkennen und die Tiere gegebenenfalls vorzeitig zu euthanasieren. Ein engmaschiges „Monitoring“ der Mäuse fand

über maximal 12 Wochen statt. Ein Versuchsabbruch erfolgte bei Erreichen einer maximalen Tumorgröße von 1,5 cm, darüber hinaus aber auch bei Tumorexulzeration, Gewichtsabnahme von über 30%, Veränderungen des Fells und jeglicher sichtbarer, körperlicher Beeinträchtigung. Die Versuchsteile und die Durchführung waren von der Regierungsbehörde Oberbayern genehmigt.

Die Anzucht der Zellen für die Tumorinduktion erfolgte in großem Maßstab in 225 cm² Zellkulturflaschen. Auch die weitere Vorbereitung der zu injizierenden C26-Zellen erfolgte komplett unter sterilen Bedingungen. Nach Abgießen des Zellmediums und Spülen mit 1 x PBS, wurde mit 5 ml Trypsin/EDTA ca. vier Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Zellen dann nach Zugabe von 20 ml C26-Medium (siehe 2.1.2) in Suspension gebracht und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation über fünf Minuten (Hettich Ultra 2S bei 3000 Umdrehungen pro Minute) wurde der Überstand abgegossen, Flüssigkeitsreste mit einer Pipette entfernt und das Pellet in 1-10 ml 1x PBS aufgenommen. Dann wurde mithilfe eines verdünnten Zell-Aliquots die Anzahl der Zellen über Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde nach mehrmaligen erneuten Durchmischen der Stammlösung gleichmäßig in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und falls nötig das Volumen mit 1 x PBS auf 200 µl/ Gefäß aufgefüllt. Der letzte Schritt unter sterilen Bedingungen war das Überführen der Aliquots in sterile 1ml U-40 Insulinspritzen (BD Microfine der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Wenn nicht anders vermerkt erfolgte für das C26-Modell die Induktion der Tumoren über eine subkutane Injektion von $0,5 \times 10^5$ Zellen der murinen Kolonkarzinom-Zelllinie C26 in das Nackenfell von Balb/c Mäusen. Zur gleichmäßigen Tumorerzeugung musste die Injektion sehr präzise erfolgen, weshalb eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt wurde.

Da subkutane Tumormodelle in ihrer Aussagekraft limitiert sind, wurde zeitgleich an der Optimierung der subkutanen Tumormodelle zu Metastasierungsmodellen gearbeitet. Die Detektion der nicht-exponierten Metastasen sollte über *in vivo* Biolumineszenz erfolgen. Mithilfe des Kolon-Karzinom-Modells sollte exemplarisch eine Metastasierungsroute etabliert werden. Hierfür wurden die C26-Zellen zunächst wie schon beschrieben vorbereitet. Die Tumorzellinjektionen erfolgten unter kurzer intraperitonealer Injektionsnarkose von 30µl/10g Körpergewicht Domitor (=Medetomidin) der Firma Pfizer [1mg/ml] in einer 1:10 Verdünnung mit Kochsalz und 120 µl/10g Körpergewicht Ketanest (=Ketamin) der Firma Pfizer [5mg/ml]. Metastasen wurden dann mittels intralienaler Injektion von $0,5 \times 10^5$ C26-Zellen induziert, welche sich nach portaler Streuung in der Leber bilden sollten (Abb.: 2-2).

Die Injektion wurde durch einen kleinen seitlich abdominellen Schnitt mit anschließender Naht durch einen Stich durchgeführt. Um einem Primärtumor in der Milz vorzubeugen, wurde diese fünf Minuten nach Tumorzellinjektion entfernt.

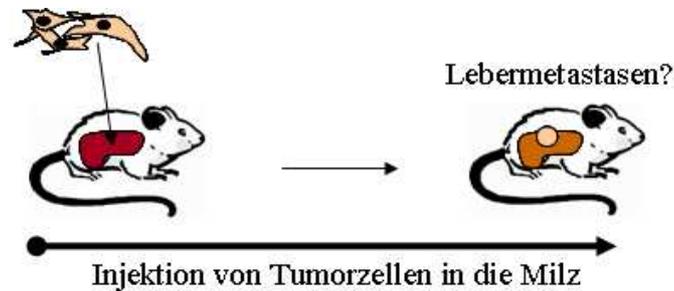


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung Injektion von C26-Tumorzellen in die Milz (dunkelrot dargestellt) von Balb/c Mäuse zur Induktion von Metastasen in der Leber (braun dargestellt).

Zur Behandlung eventueller postoperativer Schmerzen sollte Novalgin (5 Tropfen pro Tier, Hoechst, Frankfurt am Main, Deutschland) in die Schnauze eingetropfelt werden.

2.2.3 BON-Modell

Aufgrund des Fehlens eines syngenens Mausmodells für neuroendokrine Tumoren sollte ein heterologes System mit Transplantation der humanen BON Zellen in athymischen NMRI nu/nu Mäusen etabliert werden. Die NMRI nu/nu Mäuse wurden ausschließlich zu Tierversuchszwecken gezüchtet und über Harlan Winkelmann, Gartenstraße 27, 33178 Borcheln bezogen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung der Zentralen Versuchstierhaltung der Kliniken Innenstadt in IVC-Maus-Käfigen Typ II long mit einer Dichte von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden, die Tiere werden *ad libitum* mit Standard-Maus-Futter und Wasser versorgt. Die Vorbereitung der Zellen, sowie das „monitoring“ der Mäuse und die Versuchsabbruchskriterien entsprachen denen unter 2.2.2 für das C26-Modell beschriebenen. Abweichend wurden, wenn nicht anders vermerkt, zur Induktion der Tumoren $1,5 \times 10^7$ Zellen der humanen Karzinoid-Zelllinie BON subkutan in den Nackenbereich von NMRI nu/nu Mäusen injiziert.

2.2.4 BON [pfLuc-N1]-Modell

Zur erweiterten Verwendung des BON-Tumormodells als Metastasierungsmodell, sollte das subkutane Tumormodell zunächst für *in vivo* Biolumineszenz-Messungen optimiert werden. Hierfür wurden BON-Zellen stabil mit dem Plasmid pfLuc-N1 transfiziert (2.1.3 und 2.4.1). Die stabilen Transfektanden wurden analog zu dem in 2.2.5 beschriebenen Vorgehen in den Nackenbereich von NMRI nu/nu Mäusen injiziert. Zur Detektion des Tumors mithilfe einer CCD-Kamera (IVIS 100 Imaging System, Xenogen, Alameda, CA, USA) wurden die Tiere nach Entwicklung eines Tumors über eine intraperitoneale Injektion wie unter 2.2.3 beschrieben narkotisiert. Wenige Sekunden später wurde das Luciferase-Substrat D-Luciferin (100µl einer 30mg/ml mit sterilem Wasser angesetzten Lösung, pH 7 mit NaOH) intravenös verabreicht. Ca. zehn Minuten später wurde mit der Detektion begonnen. Die Belichtungszeit betrug dabei ein bis maximal zehn Minuten. Die Bildauswertung erfolgte mithilfe der Living Image Software 2.50 der Firma Xenogen.

2.2.5 NCI-H295-Modell

Die Haltung der Mäuse, das Monitoring, die Zellvorbereitung und die Tötungskriterien entsprachen den unter 2.2.3 und 2.2.4 schon beschriebenen. Zur Induktion der Tumoren wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen der humanen Nebennierenrindenzelllinie NCI-H295 subkutan in den Nackenbereich von NMRI nu/nu Mäusen injiziert.

2.2.6 NCI-H295 [pfLuc-N1]-Modell

Zur erweiterten Verwendung des NCI-H295-Tumormodells als Metastasierungsmodell, sollte das subkutane Tumormodell für *in vivo* Biolumineszenz-Messungen optimiert werden. Hierfür wurden NCI-H295-Zellen stabil mit dem Plasmid pfLuc-N1 transfiziert (2.1.3 und 2.4.1). Das weitere Vorgehen entsprach dem schon unter 2.2.4 für BON [pfLuc-N1] Zellen beschriebenen.

2.2.7 BON/NCI-H295-Modell

Das Vorgehen entsprach dabei dem wie zuvor in 2.2.3 und 2.2.5 für die einzelnen Modelle beschriebenen. Abweichend wurden hier allerdings beide schon beschriebenen Tumorzelllinien in eine Maus injiziert. Hierfür wurde anstatt in den mittleren Nackenbereich, links und rechts seitlich in die ausgeprägte Nackenhaut der NMRI nu/nu Mäuse injiziert. Es

musste dabei sehr auf die lokale Trennung der Einstichstellen geachtet werden, um einer Vermischung der Tumorzellen vorzubeugen und das getrennte Anwachsen der unterschiedlichen Tumorarten zu gewährleisten.

2.3 Experimente zur Entwicklung liposomaler Therapien

2.3.1 Dosisfindung für EPC/Chol-Liposomen (C26-Modell)

Zur *in vivo* Untersuchung eventueller Nebenwirkungen bei der pH-abhängigen Freisetzung von Doxorubicin aus EPC/Chol-Liposomen, wurde eine Dosisfindungsstudie durchgeführt. Hierfür wurden zunächst, wie unter 2.2.2 ausführlich beschrieben, C26-Tumore subkutan im Nackenfell von 40 Balb/c-Mäusen induziert. Sobald die Tumore zu ertasten waren, wurde den tumortragenden Mäusen (n=5-8) EPC/Chol-Liposomen einer bestimmten Dosierung (2,5 mg/kg; 5 mg/kg; 8 mg/kg; 10 mg/kg) bzw. 150µl Kochsalz-Lösung intravenös appliziert (Abb.: 2-3).

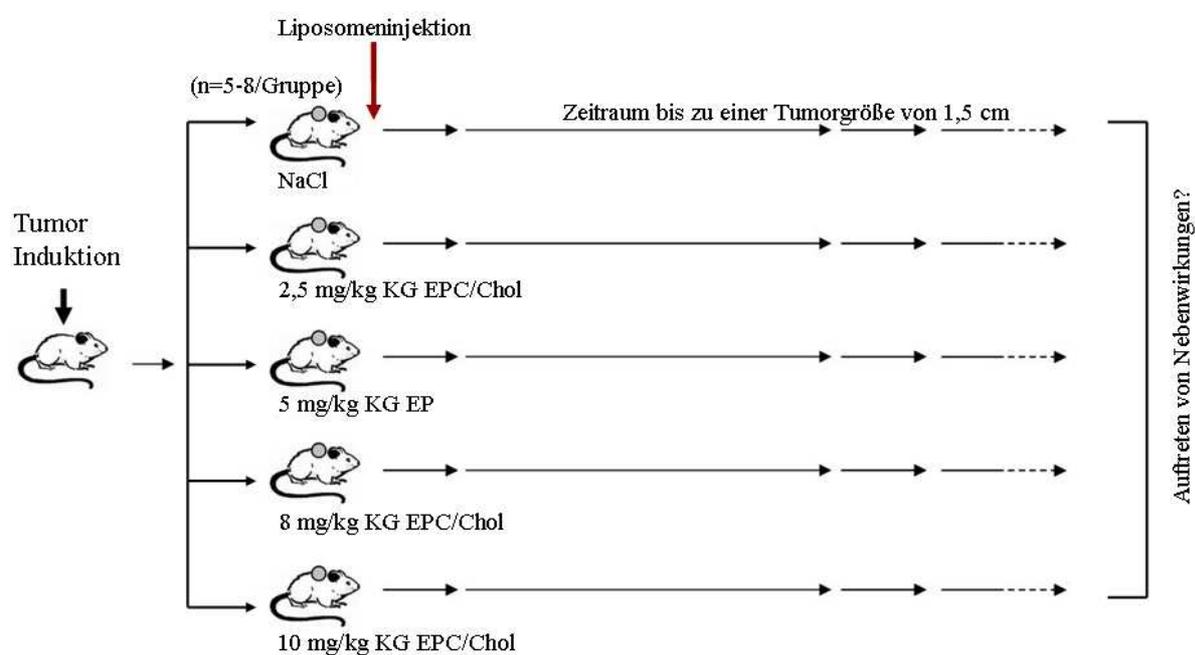


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens bei der Dosisfindung für den Einsatz von neuen pH-abhängig freisetzenden EPC/Chol-Liposomen in C26 Tumor tragenden Balb/c Mäusen. Dosierungen von 2,5 mg/kg; 5 mg/kg; 8 mg/kg; 10 mg/kg liposomaler Präparationen bzw. 150µl Kochsalz-Lösung wurden intravenös appliziert.

In den nachfolgenden Tagen wurden die Mäuse auf das Auftreten eventueller Nebenwirkungen hin untersucht und bei Auftreten eines der unter 2.2.2 aufgeführten Abbruchkriterien unverzüglich euthanasiert.

2.3.2 Pharmakokinetik pH-abhängig freisetzende SPC/Chol-Liposomen (C26-Modell)

Zur Untersuchung der Verteilung von Doxorubicin im Körper, sowie dessen Blutstabilität und Akkumulation im Tumor bei der pH-abhängigen Freisetzung aus SPC/Chol-Liposomen, wurde eine Pharmakokinetik durchgeführt. Hierfür wurden zunächst C26-Tumore subkutan im Nackenbereich von Balb/c-Mäusen induziert (2.2.2). Waren die Tumore ertastbar, wurde den Mäusen entweder 10 mg/kg SPC/Chol-Liposomen (SPIT PEGyliert), SPC/Chol-Liposomen (konventionell PEGyliert) (2.3.6), Caelyx[®] (sterisch stabilisiertes liposomales Doxorubicin, SSLD), freies Doxorubicin oder 150µl Kochsalz-Lösung intravenös appliziert (Abb.: 2-4). Nach 8, 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils eine Gruppe (n=7-8) jeden Behandlungstyps euthanasiert und Blut, Tumor, Stuhl, Urin, Thymus, Lunge, Gonaden, Leber, Herz, Haut, Nebennieren, Milz und Nieren zur Bestimmung der enthaltenen Doxorubicin Mengen entnommen.

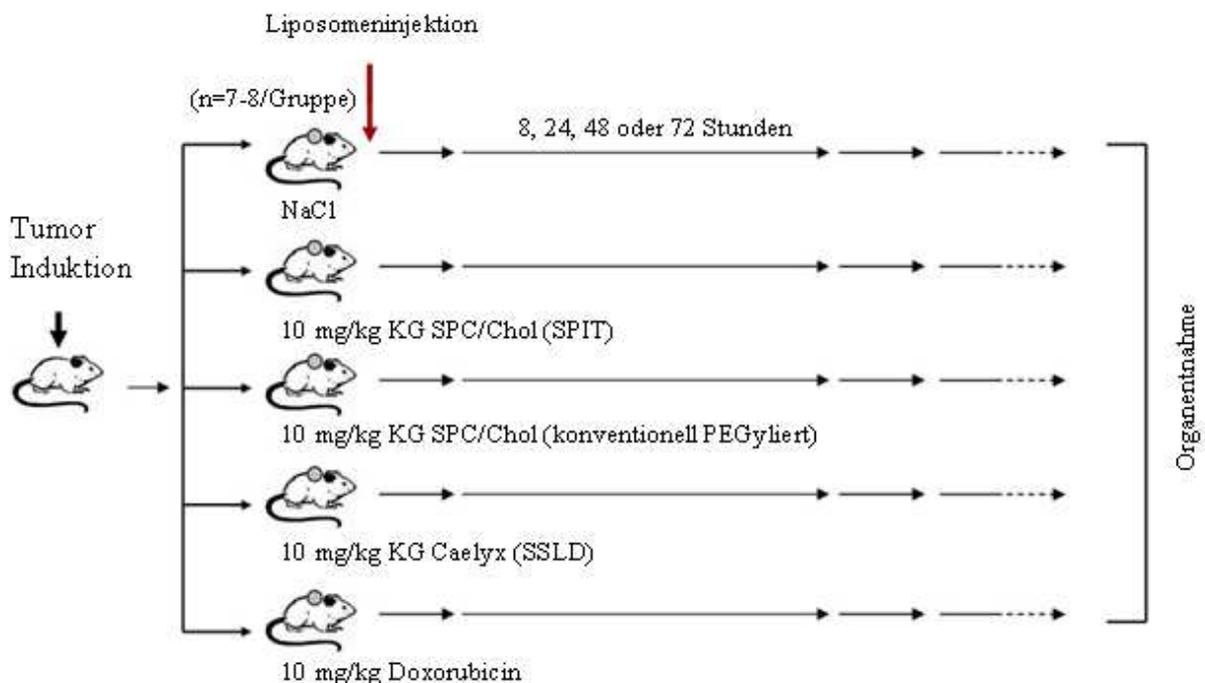


Abbildung 2-4: : Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens zur Erstellung einer Doxorubicin-Pharmakokinetik in C26 Tumor tragenden Balb/c Mäusen 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit je 10 mg/kg SPC/Chol-Liposomen (SPIT), Caelyx[®] (SSLD), freien Doxorubicins bzw. 150µl Kochsalz-Lösung.

Die Organe wurden zügig und immer in der gleichen Reihenfolge entnommen und Blut mithilfe eines kurzen Kochsalz Bades entfernt. Die Organentnahme und Aufbewahrung erfolgte im Rahmen eines straffen Zeitplans, der ca. 5 Minuten Sektionszeit/ Maus erlaubte und weitestgehend geschützt vor UV-Licht, um unterschiedliche DXR-Abbauraten in den

entnommenen Proben zu vermeiden. Die Extraktion und Quantifizierung des in den Proben enthaltenen Doxorubicins erfolgte dann wie unter 2.3.4 beschrieben.

2.3.3 Pharmakokinetik 1H7 gekoppelter Liposomen (BON-Modell)

Bei der Durchführung der Pharmakokinetik 1H7-gekoppelter Liposomen wurden zwei unterschiedliche Grundsubstanzen verwendet. Als basale Präparation dienten entweder die schon unter 2.3.2 aufgeführten SPC/Chol-Liposomen (SPIT PEGyliert) oder das kommerziell erhältliche Caelyx[®] (SSLD) der Firma Essex Pharma (München, Deutschland). Um Unterschieden im liposomalen PEG-Gehalt aufgrund der Kopplung vorzubeugen, wurde zu SSLD noch mal entsprechende Mengen sterol-PEG₁₃₀₀ (SSLD-PEG+). Die BON Tumore wurden wie unter 2.2.3 ausführlich beschrieben im Nacken athymischer NMRI-Mäuse induziert und entwickelten sich bis zu einem längsten Tumordurchmesser von ca. 1 cm. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte dann die Injektion der jeweiligen Substanz. Neben einer Kontrollgruppe ergaben sich weitere sechs Behandlungsgruppen: SPC/Chol-PEG₁₃₀₀, SPC/Chol-IgG, SPC/Chol-1H7, SSLD-PEG+, SSLD-IgG und SSLD-1H7 (Abb.:2-5).

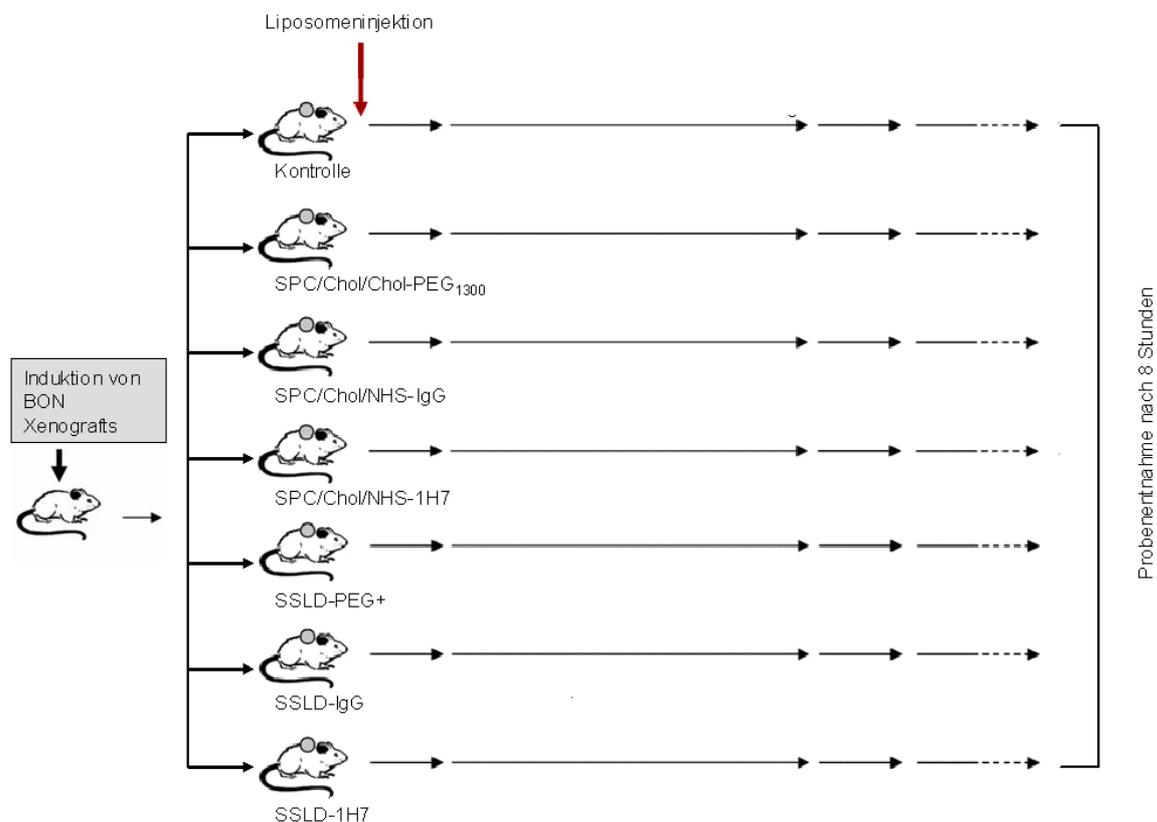


Abbildung 2-5: Pharmakokinetik von 1H7-gekoppelten Liposomen in BON Tumor tragenden NMRI Nacktmäusen (n=5) nach einmaliger Behandlung mit verschiedenen

Präparationen: SPC/Chol-PEG1300: SPC/Chol-Liposomen, SPC/Chol-IgG: IgG-gekoppelte SPC/Chol-Liposomen, SPC/Chol-1H7: 1H7-gekoppelte SPC/Chol-Liposomen, SSLD-IgG: IgG-gekoppeltes Caelyx[®]; SSLD-PEG+: nicht-AK-gekoppeltes Caelyx[®]; SSLD-1H7: 1H7-gekoppeltes Caelyx[®]. Alle Präparationen waren zu gleichen Teilen SPIT-PEGyliert.

8 Stunden nach Verabreichung der liposomalen Präparationen wurden alle Tiere euthanasiert und sowohl Blut, als auch Tumore entnommen. Die Doxorubicin Extraktion und fluorometrische Bestimmung erfolgte wie unter 2.3.4 beschrieben.

2.3.4 Doxorubicin Extraktion und fluorometrische Bestimmung

Die Doxorubicin Extraktion erfolgte mit geringer Anpassung zu der von Charrois&Allen beschriebenen Methode [59]. Von den Proben wurden zunächst 10% wässrige Gewebe-Homogenisate und 25% Blutlösungen hergestellt. Die Gewebezerkleinerung wurde dabei mit dem Ultra Turrax Homogenisator der IKA Werke (Staufen, Deutschland) vorgenommen. 200 µl der Proben wurden in ein 2ml Reagiergefäß überführt und 100 µl 10% Triton X, 200 µl Wasser und 1500 µl gesäuerten Isopropanol (mit 0,75 N Salzsäure) zugegeben. Nach gründlichem Mixen folgte die Extraktion von Doxorubicin und seinen Metaboliten bei -20°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Lösungen auf Raumtemperatur gebracht und anschließend jeweils 3 Minuten gevortext. Nach anschließender 40 minütiger Zentrifugation bei 10 000 g (Biofuge Fresco von Heraeus, Hanau, Deutschland) wurden die Proben entweder sofort analysiert oder bei -80° bis zur Analyse gelagert. Zur Analyse wurden 100 µl der Überstände in 96 well Platten zur fluorometrischen Bestimmung (MaxiSorp[™], Nunc, Langenselbold, Deutschland) überführt. Die Quantifizierung des Doxorubicins erfolgte dann fluorometrisch im Mithras „multiwellreader“ der Firma Berthold (Bad Wildbad, Deutschland) bei 470 und 590 nm.

2.3.5 Therapie mit 1H7 gekoppelten Liposomen (im BON-Modell)

Zur Untersuchung der therapeutischen Effektivität 1H7 gekoppelter Liposomen im Vergleich zu den Einzelkomponenten und auch einer kombinierten Gabe wurden BON Tumore wie unter 2.2.3 beschrieben im Nackenbereich von NMRI Mäusen induziert. Ab einem längsten Tumordurchmesser von 0,5-0,7 cm wurde den Tieren einmal 10 mg liposomal verkapseltes DXR/kg jeder Präparation bzw. 3mg 1H7/kg Körpergewicht appliziert (Abb.:2-6). Als liposomale Grundsubstanz wurde wiederum Caelyx[®] (SSLD) eingesetzt. Über die schon unter

2.3.3 getesteten SSLD-PEG+, SSLD-IgG und SSLD-1H7 wurden im therapeutischen Experiment auch der freie 1H7 Antikörper und die kombinierte Gabe von freiem 1H7 und SSLD-PEG+ untersucht. Nach Substanzgabe wurden die Tiere mindestens alle zwei Tage detailliert auf eventuelle Nebenwirkungen untersucht und der längste Tumordurchmesser vermessen. Mit Erreichen einer Größe von 1,5 cm erfolgte die Euthanasierung der Tiere.

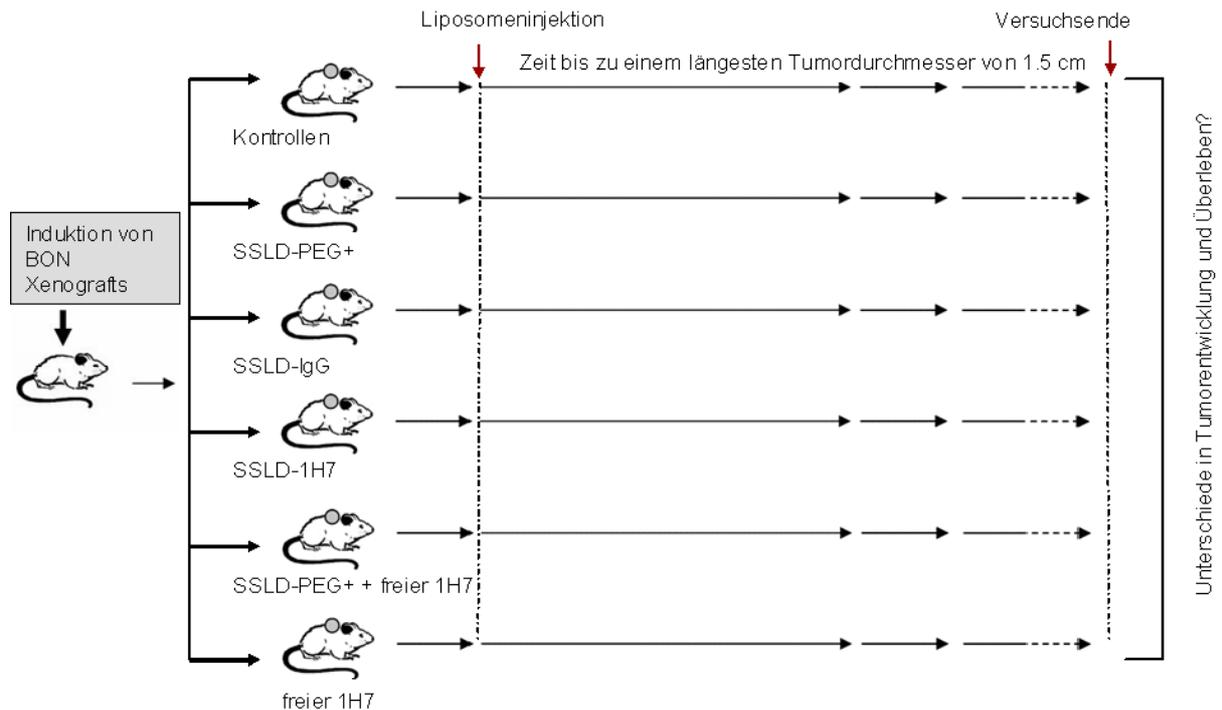


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der therapeutischen Experimente an BOM Tumor tragenden NMRI Nacktmäusen (n=4) nach einmaliger Behandlung mit verschiedenen Präparationen. Freier 1H7: freier IGF1-R blockierender AK; SSLD-IgG: IgG-gekoppelte Liposomen; SSLD-PEG+: nicht-AK-gekoppelte, nachPEGylierte Liposomen; SSLD-1H7: 1H7-gekoppelte Liposomen.

2.3.6 Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch Felicitas Lewrick in der Pharmazeutischen Technologie der Universität Freiburg unter Professor Dr. Regine Süß. Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Liposomen (ausgenommen Caelyx[®] der Firma Essex Pharma, München, Deutschland) wurden von ihr mittels Filmmethode mit anschließender Extrusion hergestellt bzw. modifiziert.

Alle im Folgenden verwendeten Liposomen basierten auf den drei in Tabelle 2-2 aufgeführten Standard-Lipidzusammensetzungen. Liposomen für durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden zusätzlich mit 0,5 mol% des Fluoreszenzmarkers Rhodamin-PE markiert.

Lipidkomponenten	Molares Verhältnis	Molarität und Volumen
EPC/Chol	7/3	10 mM/2ml oder 20 mM/1ml
SPC/Chol	7/3	10 mM/2ml oder 20 mM/1ml
HSPC/Chol/MPEG-DSPE (Caelyx ®)	12, 1/8, 2/1, 14	Essex Pharma

Tabelle 2-2: Zusammensetzung der verwendeten Liposomen.

Einzelne Präparationen enthielten zusätzliche Membranbestandteile zum Targeting und zur Verbesserung der Bluthalbwertszeit, die in den entsprechenden Methoden- und Ergebnisteilen explizit aufgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei Antikörper-Kopplungsmethoden liposomaler Präparationen zum Einsatz: Das konventionelle Verfahren unter Nutzung eines MAL-PEG₂₅₀₀-DSPE-Ankers (Abb.: 2-7) und die neue Sterol-basierte Post-Insertionstechnik (SPIT, sterol-based post-insertion technique; Abb.:2-8). [78]. Beim konventionellen Verfahren wird ein aktivierter Anker bereits bei der Produktion der Liposomen in den Bilayer integriert. Der MAL-PEG₂₅₀₀-DSPE-Anker trägt am distalen Ende der PEG-Kette eine Maleinimid-Funktion als reaktive Gruppe, welche mit thiolierten Liganden reagieren kann. Die Thiolierung der Liganden erfolgte vorab (Abb. 2-7, A) und im letzten Kopplungsschritt (Abb. 2-7, B) wurde der aktivierte Antikörper mit den MAL-PEG₂₅₀₀-DSPE-Anker enthaltenden Liposomen über Nacht im Verhältnis Antikörper zu Phospholipid 1/1000 mol/mol inkubiert, wobei es zur Ausbildung eines Thioethers zwischen der Thiolfunktion und der Maleinimidgruppe kommt.

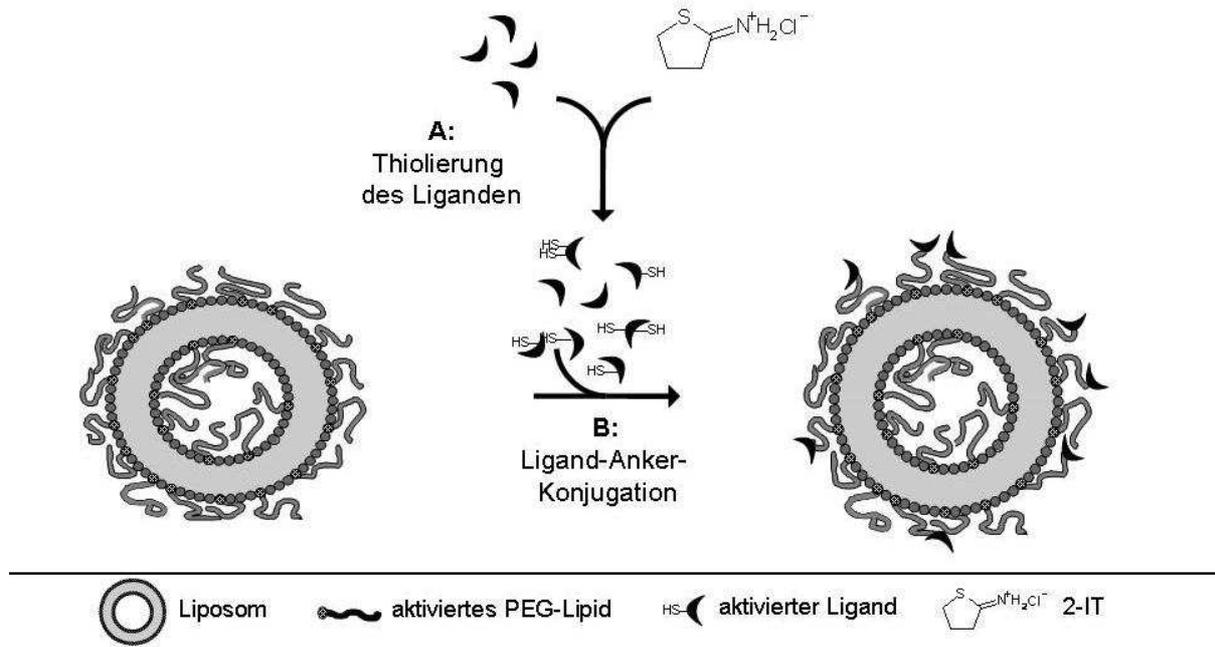


Abbildung 2-7:: Ablauf der konventionellen Kopplung mit MAL-PEG2500-DSPE

Bei der Sterol-basierten Post-Insertionstechnik (SPIT, Abb.: 2-8) reagiert in einem ersten Schritt der Anker mit dem Ligand. Das entstehende Konjugat wurde anschließend bei der Inkubation mit den fertigen Liposomen selektiv in den äußeren „Bilayer“ eingelagert.

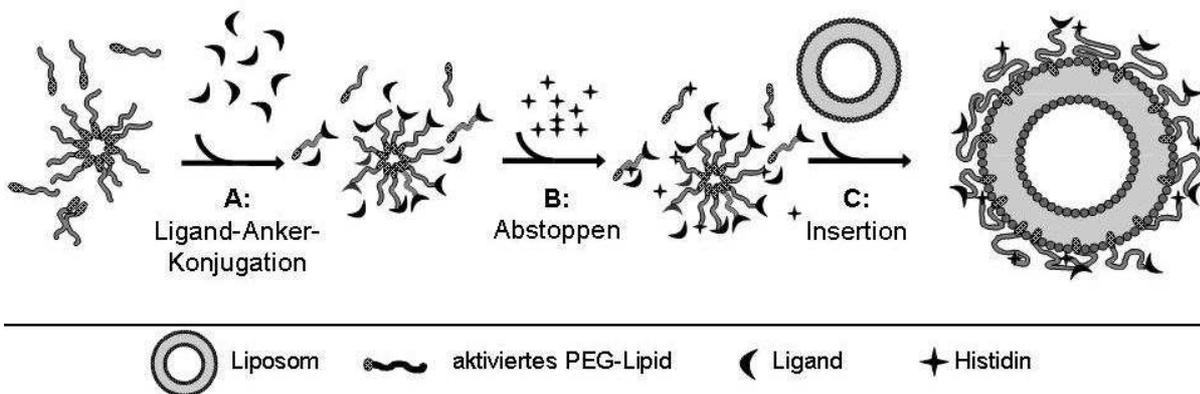


Abbildung 2-8: Ablauf der Sterol-basierten Post-Insertionstechnik (SPIT) mit Sterol-PEG1300-Ankern

2.4 Molekularbiologisches Material und Methoden

2.4.1 Plasmide für die Klonierung von pLuc-N1

2.4.1.1 pGL4.17 [*luc2*/Neo]

Für die Klonierung des neuen pLuc-N1 Plasmids zur stabilen Luciferase-Expression in den Zelllinien BON und NCI-H295 (2.1.3) für eine *in vivo* Detektion endokriner Tumoren (3.1.5) in NMRI Mäusen wurde der pGL4.17 [*luc2*/Neo] Vektor der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet (Abb.: 2-8).

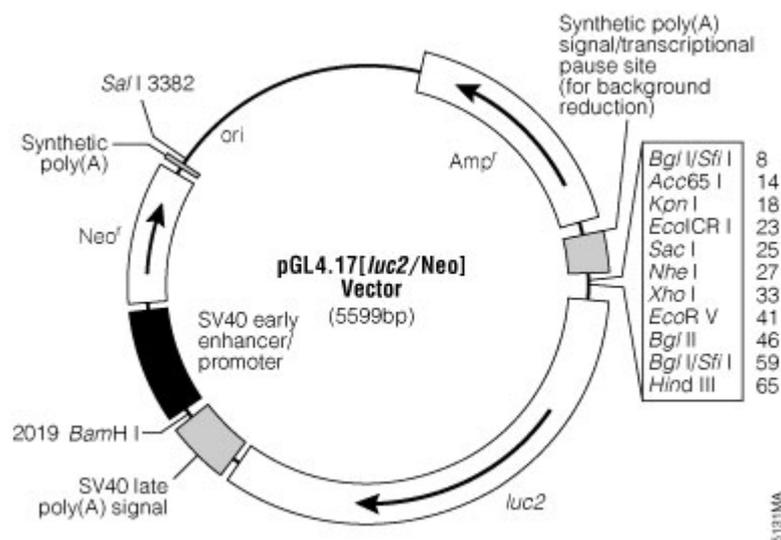


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung des Plasmids pGL4.17 [*luc2*/Neo]. Eingezeichnet ist neben der multiplen Klonierungsstelle auch das für die Firefly Luciferase kodierende *luc2*-Gen (Quelle: Promega, Mannheim).

Dieser Luciferase-Reportervektor verfügt zwar, wie alle Plasmide der pGL4 Reihe, über ein Luciferase- Gen, aber nicht über eine Promoterregion. Das für die Firefly Luciferase kodierende *luc2*-Gen wurde aus diesem Grund in das pEGFP-N1Plasmid (2.4.1.2) inkloniert. Verwendet wurden hierfür die Restriktionsendonukleasen Hind III und BamHI (2.4.3), die das *luc2*-Insert flankierend in der multiplen Klonierungsstelle und beim späten SV40 Poly-Adenylierungssignal schneiden (3.1.5.1). Das Ansetzen, die Auftrennung, Aufreinigung und Ligation des Restriktionsansatzes erfolgte wie unter 2.4.3 – 2.4.6 beschrieben.

2.4.1.2 pEGFP-N1

Als Vektorrückgrat wurde das pEGFP-N1 Plasmid der Firma Clontech (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet (Abb.: 2-9). Nach Restriktion mit den Endonukleasen BamHI und Hind III in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids, Auftrennung in einem Agarose-Gel (2.4.5), Isolierung des DNA-Fragments aus dem Gel (2.4.6) und Ligation (2.4.4) mit dem erhaltenen luc2-Insert (2.4.1.1), erfolgte die Transformation Z-kompetenter Bakterien (2.4.7).

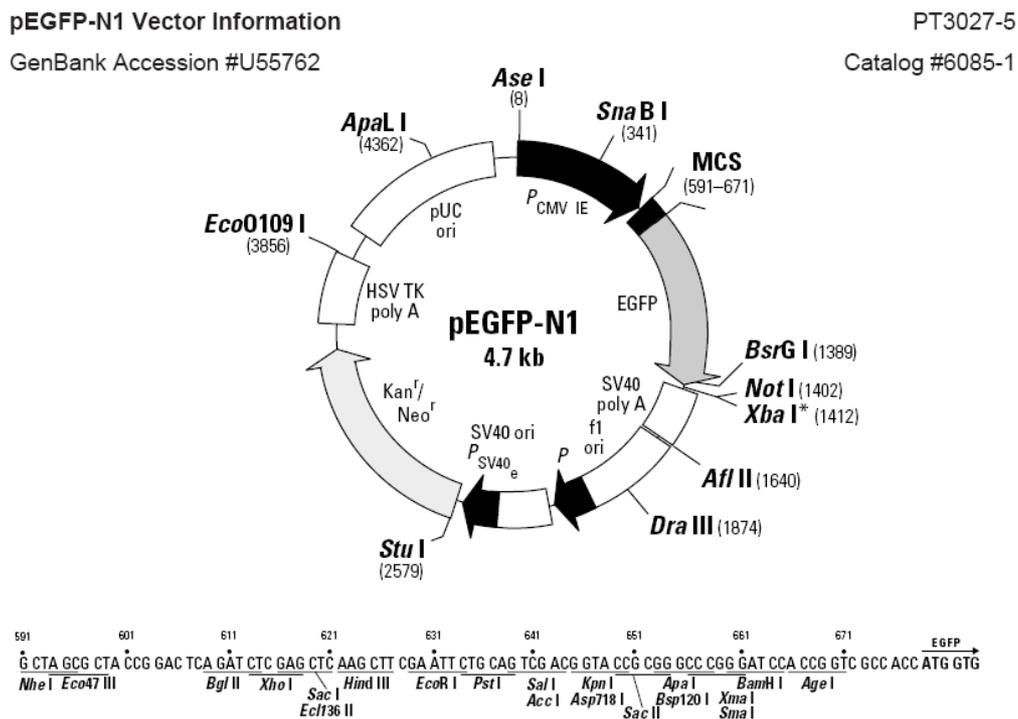


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des Plasmids pEGFP-N1. Eingezeichnet sind neben der codierenden Region für EGFP, auch die Lage des CMV-Promotors, der multiplen Klonierungsstelle und der Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette (Quelle: Clontech, Heidelberg).

Bakterienklone wurden von LB-Antibiotikum Platten gepickt und in flüssigem LB-Medium mit Zusatz von Antibiotikum über Nacht bei 37°C angezogen. Aus diesen Flüssigkulturen wurde potentielle pLuc-N1-DNA mittels Plasmid-Minipräparation (2.4.9) isoliert und mithilfe von Restriktionsendonukleasen (2.4.3) auf Richtigkeit überprüft (3.1.5.1).

2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde die Absorption (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Die Bestimmung und Berechnung erfolgte mithilfe des Bio-Photometers der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) nach folgenden Formeln:

$$\text{Doppelsträngige DNA:} \quad c = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml}$$

$$\text{Einzelsträngige DNA und Oligonukleotide:} \quad c = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 33\mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA:} \quad c = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 40\mu\text{g/ml}$$

Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient aus $\text{OD}_{260\text{nm}}$ und $\text{OD}_{280\text{nm}}$ bestimmt. Dieses Verhältnis wird umso geringer, je höher der Proteinanteil der Probe ist, da bei einer Wellenlänge von 280 nm aromatische Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum aufweisen, während der Absorptionskoeffizient von Nukleinsäuren im Bereich von 260 nm sein Maximum erreicht. Je höher also dieses Verhältnis war, desto reiner war die gemessene Probe. Bei reiner DNA-Lösung beträgt der Quotient ca. 1,8.

2.4.3 Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die DNA an definierten Stellen spalten. Die meist verwendeten Restriktionsenzyme erkennen dabei palindromische Sequenzen von vier, fünf, sechs oder acht Basen, innerhalb derer sie „schneiden“. Die Aktivität (1U) wird definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird 1 μg eines Standard-„Templates“ (Lambda oder Adenovirus-DNA) in einem Volumen von 50 μl bei optimaler Temperatur in einer Stunde vollständig zu schneiden. Meist wird lambda DNA als Kontroll-„Template“ verwendet. Die benötigte Enzymmenge ist von der Anzahl der Schnittstellen pro Nukleotide im „template“ abhängig. Demnach ergibt sich für die Berechnung der einzusetzenden Enzymmenge in Units/ μg DNA folgende Gleichung:

$$U = \frac{\text{Länge Standard-template}}{\text{Länge Test-template}} \times \frac{\text{Schnittstellen Test-template}}{\text{Schnittstellen Standard-template}}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für Spaltungen von DNA im Allgemeinen die doppelte der theoretisch benötigten Enzymmenge eingesetzt. Die Enzymmenge des Gesamtvolumens überschritt aber nie 10%, um das Erreichen einer kritischen Glycerinkonzentration im Ansatz zu verhindern. Verwendet wurden Restriktionsendonukleasen, und Puffer der Firma Promega (Mannheim, Deutschland).

2.4.4 DNA-Ligation

Die gerichtete Verknüpfung (Ligation) wurde mithilfe der niedrig konzentrierten T4-Ligase (1 Einheit/ μ l) der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) durchgeführt. Standardmäßig wurde eingesetzt:

1 μ l Vektor-Eluat (2.4.7)

8 μ l Insert-Eluat

10 μ l 2x T4-Ligationspuffer

1 μ l T4-Ligase (1U/ μ l)

Nach 2,5 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Transformation Z-kompetenter Bakterien (2.4.7)

2.4.5 Visualisierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Verwendet wurden 0,8 – 1%ige Agarose-Gele. Als Gel- und Laufpuffer wurde TBE verwendet.

10 x TBE-Puffer:

Tris	0,89 mol/l
Borsäure	0,89 mol/l
EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III)	0,02 mol/l
Mit gereinigtem Wasser	ad 1 Liter

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,2 eingestellt.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Feldstärke von ca. 8-10 V/cm. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1µg/ml zugegeben. Dieser orange fluoreszierende Farbstoff interkaliert mit der DNA und ermöglicht es so Nukleinsäuren nach Anregung bei einer Wellenlänge von ca. 300-320 nm anhand ihrer orangenen Fluoreszenz sichtbar zu machen. Die Agarose wurde zunächst in entsprechender Konzentration 1 x TBE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1µg/ml zugegeben. Das Gel wurde in eine entsprechende Form gegossen und nach dem Erstarren des Gels wurden die mit 5 x Ladepuffer versetzten Proben aufgetragen und die Elektrophorese in einer Power-PAC 300 Gelkammer der Firma Bio RAD (München, Deutschland) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte im Gel Imager der Firma Intas (Göttingen, Deutschland).

2.4.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde, durch kurze Belichtung des Agarose-Gels auf einer UV-Platte (320 nm), lokalisiert. Die Markierung der Bande erfolgte durch rasche Einstiche mit einem Skalpell in das Gel. Das Ausschneiden des Gelstücks erfolgte dann aber ohne UV-Belichtung. Das weitere Vorgehen erfolgte laut Hersteller mithilfe des QIAquick Gel Extraktions Kits der Firma Qiagen (Heidelberg, Deutschland). Die Elutionen erfolgten mit je 50 µl Elutionspuffer. Die Lagerung bis zur Ligation erfolgte bei -20°C.

2.4.7 Transformation Z-kompetenter Bakterien

Die Herstellung Z-kompetenter Bakterien erfolgte nach dem Standard Protokoll des Z-kompetente *E.coli* Transformations Kits der Firma Zymo Research (CA, USA). Das Protokoll zur Transformation der Bakterien wurde folgendermaßen variiert:

Allgemeines Protokoll:

(Wurde verwendet zur Transformation von Ligationsansätzen und für alle Plasmide, die kein Ampicillin-Resistenzgen tragen)

Die kompetenten Zellen wurden entweder auf Eis oder in der Hand aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension nur eben flüssig, aber keinesfalls über 0 °C erwärmt wurde. Die Zellen wurden auf Eis ein- bis zweimal langsam auf- und abpipettiert. Nach Zugabe von 10 – 100 ng Plasmid DNA bzw. 10 µl eines gekühlten Ligationsansatzes und mehrmaligem langsamen Auf- und Abpipettieren auf Eis wurde der

Ansatz 20 – 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Im Anschluss daran wurden die Zellen nochmals fünf Minuten auf Eis belassen ehe 500µl LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum zugegeben wurden. Danach wurden die Zellen 1 Stunde bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Abschließend wurde der gesamte Ansatz auf vorgewärmten LB-Antibiotikum-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vereinfachtes Protokoll:

(Nur für die Transformation von Ligationsansätzen mit Ampicillin-Resistenzgen enthaltenden Plasmiden geeignet)

Hierbei wurde zunächst wie oben beschrieben vorgegangen. Anstatt die Zellen in Flüssigmedium ohne Antibiotikum auf dem Schüttler zu inkubieren, wurde der bis zu diesem Schritt erhaltene Ansatz direkt auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und dann bei 37°C über Nacht inkubiert.

Retransformation:

(Nur zur Vervielfältigung von bereits existierenden Plasmiden mit Ampicillin-Resistenzgen geeignet)

Die kompetenten Zellen wurden entweder auf Eis oder in der Hand aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension nur eben flüssig, aber keinesfalls über 0 °C erwärmt wurde. Die Zellen wurden auf Eis ein- bis zweimal langsam auf- und abpipettiert. Nach Zugabe von 0,01 – 1 µg Plasmid DNA und mehrmaligem langsamen Auf- und Abpipettieren auf Eis wurde der Ansatz 2 – 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C. Im Anschluss daran wurden die Zellen nochmals eine Minute auf Eis belassen und der komplette Ansatz dann direkt auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.9 Plasmid-Präparationen (Mini- und Maxi-Präparation)

Diese Methode dient der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Hierfür wurden für eine Präparation in kleinem Maßstab 3 ml entsprechenden LB-Selektionsmediums und für eine Maxi-Präparation 250 ml mit einer Bakterienkolonie bzw. schon vorinkubierten Bakterienkultur angeimpft und 12 – 18 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Anleitung der Hersteller für das Pure YieldTM Plasmid Miniprep System der Firma Promega und das Qiafilter Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen.

2.5 Gewebe-Array und Immunhistochemie

Der Gewebe-Array bestand aus 83 Proben verschiedener neuroendokriner Tumore gastroenteropankreatischen Ursprungs von 59 Patienten (hergestellt und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Aurel Perren, Institut für Pathologie, Universität Bern, Schweiz). Von 24 Patienten wurden sowohl Primärtumore, als auch Metastasen untersucht [115]. Die Lokalisation der Primärtumore war wie folgt: Colon= 4, Appendix= 30, Ileum= 22, Duodenum= 2 und Gallenblase= 1. Als Vergleich wurden je zwei Schnitte von Organen (Niere, Leber, Milz, Pankreas, Dünndarm, Lunge) zweier verschiedener Donoren analysiert. Die Untersuchungen waren vom lokalen Ethikkomitee genehmigt.

Für die immunhistochemische Aufarbeitung wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkohol-Reihe entparaffinisiert (jeweils 2x für 10 min in Xylol, 100 %igen EtOH und 95 %igen EtOH) und danach 1 min in destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 0,3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂ Merck, Darmstadt) in Methanol (Merck, Darmstadt) für 20 min bei RT. Dies hat den Zweck endogene, im Gewebe vorhandene Peroxidasen zu blockieren, weil diese zu einer unspezifischen Anfärbung des Schnittes führen können. Nun erfolgte die Einkreisung der Objekte zur Verringerung der benötigten Inkubationslösungen mit einem speziellen Fettstift (Super PapPen; G.Kisker). Auf diese Bereiche wurde dann eine mit 5 %igem Ziegen-Normalserum (Jackson ImmunoResearch Lab Inc.) versetzte „Blocking solution“ (bestehend aus 3 % (m/v) BSA und 0,5 % (v/v) Tween) geträufelt, um unspezifische Protein-Bindungsstellen zu blockieren. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurden die Schnitte dann mit einem anti-IGF1-R Antikörper (1H7, Acris Antibodies, Herford, Deutschland) über Nacht bei 4°C und 1:200 in Blocking Puffer verdünnt, in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 15 minütigem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem in Blocking Puffer aufgenommenen Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus biotinylierter IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Detektion wurde mithilfe des Vectastain ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA) laut Angaben des Herstellers durchgeführt und die Schnitte dann final mit einer 30 sekündigen Inkubation mit 3,3'-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefärbt und durch zweimaliges Waschen in PBS gestoppt. Die Schnitte wurden im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und zur verlängerten Haltbarkeit mit einem Kunstharz eingebettet (Permount, Fisher Chemicals, New Jersey).

In den meisten Fällen wiesen sowohl die untersuchten neuroendokrinen Tumore, als auch die Kontrollgewebe distinkte Zellpopulationen mit unterschiedlichen Färbintensitäten auf. Diese Zelltypen wurden zunächst einzeln identifiziert und quantifiziert und dann zu einem finalen Färbungsindex aufaddiert ($\% \text{ Zellpopulation A} * \text{Färbungsintensität [0-3]} + \% \text{ Zellpopulation B} * \text{Färbungsintensität [0-3]}$).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Optimierung von Tumormodellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene murine Tumormodelle etabliert werden. Im Vordergrund standen hierbei endokrine Tumormodelle. Zum schnellen „Screening“ allgemein anti-tumoral wirksamer Substanzen wurde jedoch zusätzlich noch ein Mausmodell ohne endokrinen Hintergrund etabliert. Für die Entwicklung jedes Modells wurden zunächst Tumorzellen in unterschiedlicher Zellzahl zur Tumorinduktion subkutan in den Nackenbereich syngener Mäuse bzw. athymischer Nacktmäuse injiziert (Tab.: 3-1).

Tumormodell/Zelllinie	Injizierte Zellzahl	Inkubationszeit (Wochen)	Tumorentwicklung
NN-Ca/mACT1	1 x 10 ⁶	11	Nein
NN-Ca/mACT1	5 x 10 ⁶	11	Nein
NN-Ca/mACT1	8 x 10 ⁶	8	Nein
NN-Ca/mACT1	10 x 10 ⁶	8	Nein
NN-Ca/mACT1	12 x 10 ⁶	5	Nein
NN-Ca/mACT1	15 x 10 ⁶	4	Nein
NN-Ca/mACT71	15 x 10 ⁶	12	Nein
NN-Ca/hNCI-H295	10 x 10 ⁶	5	Ja
NN-Ca/hNCI-H295	12 x 10 ⁶	3	Ja
NN-Ca/hNCI-H295	15 x 10 ⁶	1,5-2	Ja
GEP-NET/hBON	10 x 10 ⁶	3	Ja
GEP-NET/hBON	12 x 10 ⁶	1,5	Ja
GEP-NET/hBON	15 x 10 ⁶	1	Ja
Kolon-Ca/m26	0.5 x 10 ⁶	1,5	Ja
Kolon-Ca/mC26	1 x 10 ⁶	1	Ja

Tabelle 3-1: Übersicht über die Tumorarten, dafür verwendete Zellzahlen und Zelllinien, Inkubationszeit und Aussage bezüglich Tumorentwicklung. NN: Nebennierenrindenzarzinom; GEP-NET: neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems; Kolon-Ca: Kolon Karzinom.

Es wurden je nach Tumormodell Zellzahlen von 500 000 – 15 000 000 Tumorzellen/Injektion/Maus verwendet. Ein „Monitoring“ der Tumorinduktion fand anschließend über maximal 12 Wochen statt. Hatte sich innerhalb dieses Beobachtungszeitraums und nach Injektion der maximalen Zellzahl kein Tumor entwickelt, wurde dieses Tumormodell aufgrund mangelnder Praktikabilität verworfen. Dies war der Fall für die murinen Zelllinien ACT1 und ACT71, die in Zellzahlen bis zu 15×10^6 in den Nackenbereich ihrer syngenen BDF1-Mäuse injiziert wurden und bei denen sich auch zwölf Wochen nach Injektion noch keine Tumore detektieren ließen. Auf die anderen Tumormodelle basierend auf der humanen Nebennierenkarzinom-Zelllinie NCI-H295 (3.1.3, 3.1.4), der humanen Karzinoid Zelllinie BON (3.1.2, 3.1.4) und murinen C26, die das Kolon-Karzinom repräsentierten, wird im Folgenden (3.1.1) ausführlicher eingegangen. Im Anschluss an die Etablierung subkutaner Xenograft-Modelle mit guter Reproduzierbarkeit, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mit der Optimierung der Tumormodelle für die Entwicklung von Metastasierungsmodellen begonnen. Hierfür stand die Anwendung der Metastasierungstechnik (3.1.1 hepatische Metastasierung) und die Entwicklung einer Methode zur Tumordetektion mittels Biolumineszenz (3.1.5) im Vordergrund.

3.1.1 Kolon Karzinom Modell inklusive hepatischer Metastasierung

Zunächst konnte ein nicht-endokrines Tumormodell etabliert werden, welches ein solides Tumorstadium in immunkompetenten Mäusen versprach (2.2.2). Hierbei handelte es sich um ein Kolon Karzinom Modell unter Verwendung der murinen Tumorzelllinie C26.

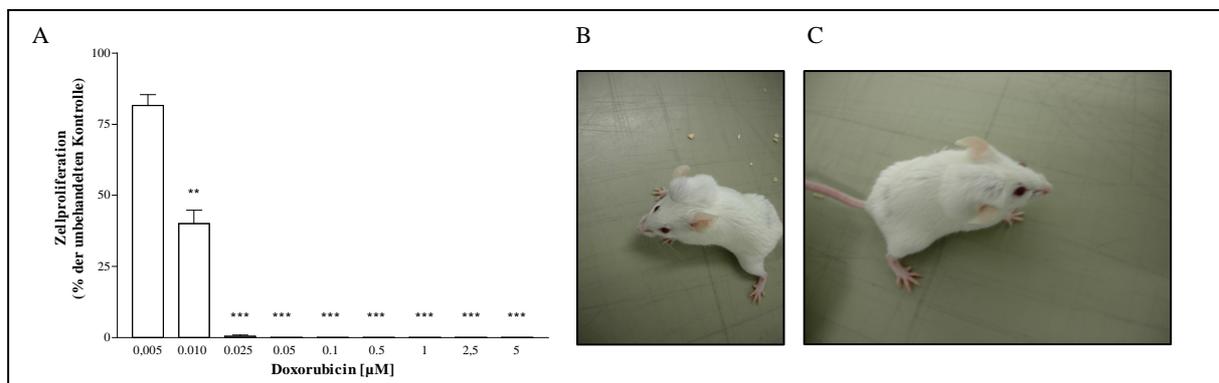


Abbildung 3-1: Doxorubicin-Sensitivität von C26 Zellen ermittelt über BrdU-Assay (n=3, A). Balb/c Maus mit C26 Tumor 12 Tage nach Injektion von 1×10^6 C26 Zellen bei Erreichen der maximalen Tumorstöße von 1,5 cm (B und C). Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollen.

Da die angestrebten Tumormodelle im Rahmen der Entwicklung einer liposomalen Therapie mit Doxorubicin (DXR) eingesetzt werden sollten, wurde zunächst die Sensitivität der Tumorzellen auf DXR mithilfe eines BrdU-Proliferationsassays (2.1.4) getestet (n=3, Abb.: 3-1 A). Die C26-Zellen zeigten sich hierbei auf der Basis dieses Assays *in vitro* als hoch Doxorubicin sensitiv. Schon ab DXR-Konzentrationen von 0,005 μM und 0,01 μM war eine Inhibition der Tumorzellproliferation auf $81,5 \pm 3,8$ % bzw. $40,1 \pm 4,7$ % ($p=0,003$) der Basalwerte detektierbar. Ab einer DXR-Konzentration von 0,025 μM war keine Proliferation der C26-Zellen im BrdU-Assay mehr feststellbar. Des Weiteren wurde *in vivo* die Tumorinduktion von C26-Xenografts in Balb/c Mäusen etabliert (Abb.: 3-1B und C). Die Tumorkinetik folgte den in der Literatur für dieses Modell beschriebenen kurzen zeitlichen Verläufen [116]. So entwickelte sich nach Injektion von $0,5 \times 10^6$ C26 Zellen ein Tumor einer gut sichtbaren Größe von 0,7 cm in einem Zeitraum von elf Tagen und nach Injektion von 1×10^6 Zellen sogar innerhalb von nur sieben Tagen. Zusätzlich zeichnete sich dieses Modell im Vergleich zu anderen Zelllinien durch eine relativ einfache Handhabung aus, da nur geringe Zellzahlen für die Etablierung eines Tumors injiziert werden mussten und die immunkompetenten Mäuse keine speziellen Haltungsbedingungen erforderten. Die Tumorinduktion erfolgte in den nachfolgenden Versuchen immer über die Injektion von 500 000 C26 Zellen in den Nackenbereich der Tiere.

Über das subkutane Tumormodell hinaus wurden die C26-Zellen auch für die methodische Etablierung von Metastasierungsmodellen herangezogen [117-120]. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte so schon die Entwicklung von Lebermetastasen erfolgreich an Balb/c-Mäusen induziert werden (Abb.3-2). Die intralienale Tumorzellinjektion in definierter Zellzahl (500 000 Zellen) erfolgte unter kurzer intraperitonealer Injektionsnarkose nach operativer Darstellung der Milz über einen linksseitigen Rippenbogenrandschnitt (Abb.: 3-2 A und B). Nach anschließender Splenektomie zur Vermeidung eines lienalen Primärtumors (Abb.: 3-2 C) und Hautverschluss (Abb.: 3-2 D) zeigte sich durchschnittlich nach 9 Tagen eine ausgeprägte hepatische Metastasierung durch die injizierten Tumorzellen (Abb.: 3-2 E-G).

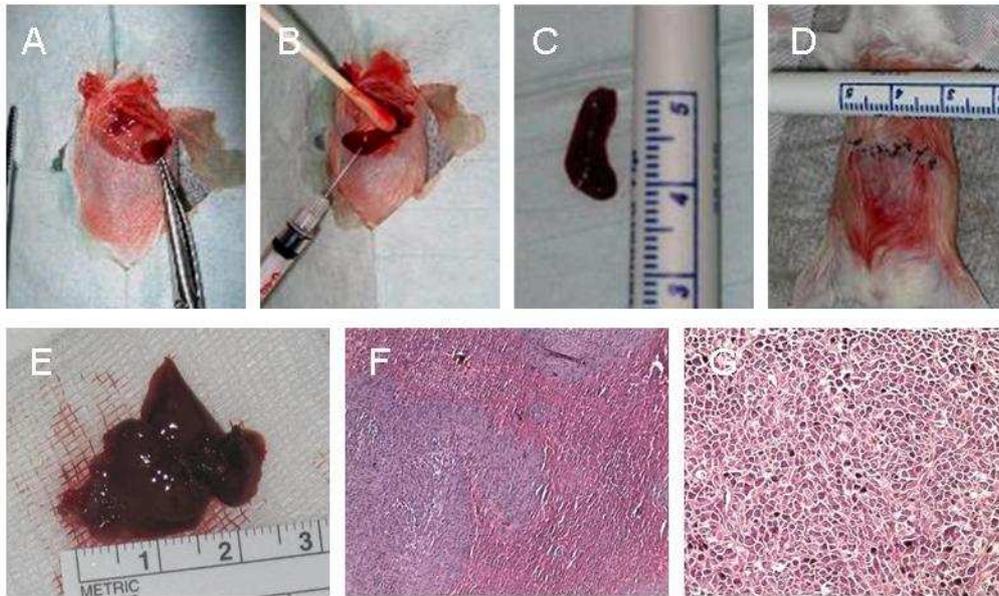


Abbildung 3-2 : Induktion von Lebermetastasen nach intralienaler Injektion (A - D) von C26 Tumorzellen in syngene Balb/c Maus. Makroskopisches Bild einer Metastasenleber und histologische Aufarbeitung (H&E-Färbung): Metastasenleber (F) und im Vergleich C26-Tumor (G).

3.1.2 Mausmodell für neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET)

Aufgrund des Fehlens eines syngenem Mausmodells für GEP-NET wurde ein heterologes Xenograft-Modell humaner BON Zellen in athymischen NMRI nu/nu Mäusen gewählt (2.2.3). Auch für die Etablierung dieses Tumormodells wurden vorab die verwendeten Tumorzellen auf DXR-Sensitivität untersucht (n=3). Die BON-Zellen erwiesen sich *in vitro* als DXR-sensitiv: Ab einer Konzentration von 0,01 μM war eine signifikante Inhibition der Tumorzellproliferation auf $83,5 \pm 2,6$ % (p=0,04) des Basalwerts detektierbar. Bei DXR-Konzentrationen von 0,025 μM und 0,05 μM war die Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auf $24,6 \pm 2,3$ % (p=0,0002) und $20,4 \pm 4,5$ % (p=0,0003) inhibiert. Ab einer Konzentration von 0,1 μM DXR konnte keine Proliferation der BON-Zellen im BrdU-Assay nachgewiesen werden (Abb.: 3-3 A).

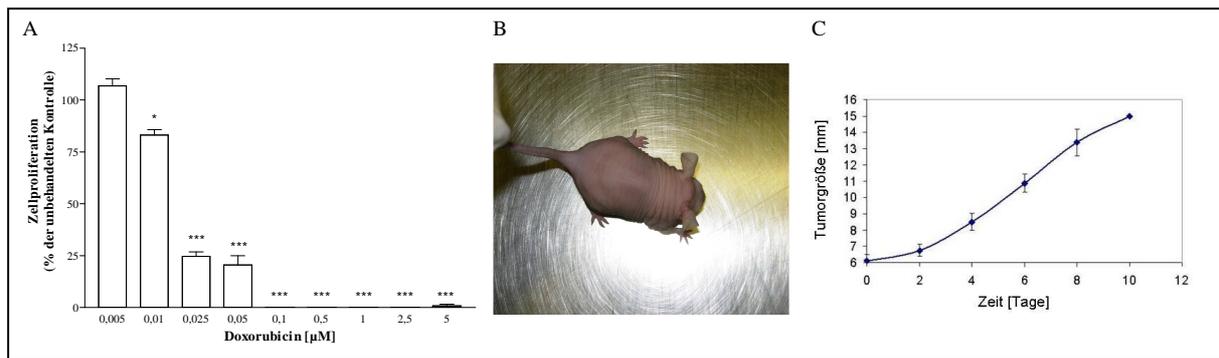


Abbildung 3-3: Doxorubicin-Sensitivität von BON Zellen ermittelt über BrdU-Assay (n=3, A), NMRI nu/nu Maus mit humanem BON-Tumor 15 Tage nach Injektion von 15 Millionen BON Zellen (B). Wachstumskurve subkutaner Tumore 10 Tage nach subkutaner Injektion von 15×10^6 BON-Zellen (n=4; C). Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Die Verwendung von BON-Zellen zur Tumorinduktion in Nacktmäusen war in der Literatur schon beschrieben [30, 35]. Die Tumorentwicklung konnte aber im Rahmen dieser Arbeit optimiert werden. Die Tumorinduktion über eine Injektion von 15 Millionen BON-Zellen subkutan in den Nackenbereich von athymischen NMRI nu/nu Mäusen (Abb. 3-3 B). Das BON-Modell zeichnete sich durch ein sehr zuverlässiges und gut reproduzierbares Tumorstadium aus. Die Abweichungen in der Tumorgöße innerhalb einer Gruppe erwiesen sich als sehr gering (Abb. 3-3 C).

3.1.3 Nebennierenrindenzellkarzinom-Modell

Da für das Nebennierenrindenzellkarzinom nur sehr wenige Zelllinien existieren und die murinen Zelllinien oft einen relativ undifferenzierten Phänotyp aufweisen, wurde ebenfalls die Etablierung eines heterologen Systems mit Xenograft der humanen NCI-H295 Zellen in athymischen NMRI nu/nu Mäusen angestrebt. Die Möglichkeit NCI-H295-Zellen als subkutane Tumoren in Nacktmäusen wachsen zu lassen ergab sich aus der Literatur [18], konnte aber nun weiter optimiert werden. Die Tumorinduktion erfolgte durch eine Injektion von 15 Millionen Zellen subkutan in den Nackenbereich athymischer NMRI nu/nu Mäuse (Abb. 3-4 B und C; 2.2.5). Die NCI-H295-Zellen wiesen eine geringere Sensitivität für freies Doxorubicin auf als die anderen getesteten Zelllinien. Eine signifikante Inhibition der Zellproliferation war nur bei getesteten Konzentrationen von 0.5 µM (p=0,020), 2,5 µM (p=0.015) und 5 µM (p=0,0076) DXR im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachweisbar (Abb. 3-4 A).

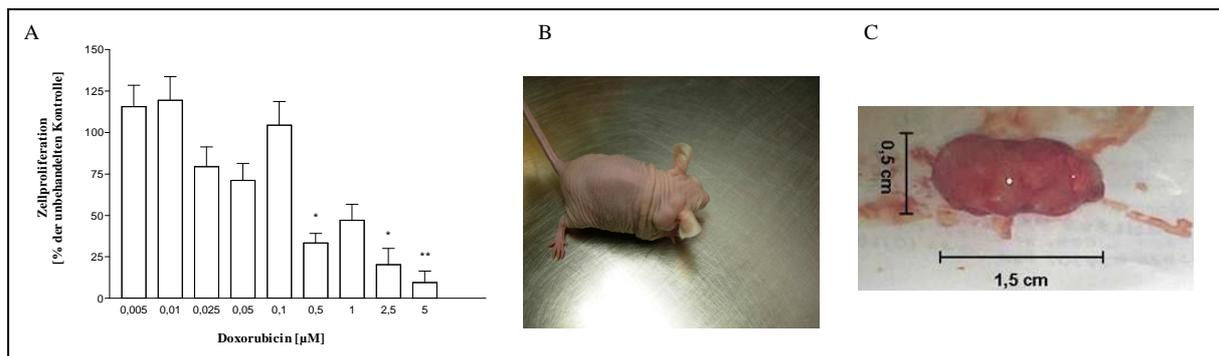


Abbildung 3-4: Doxorubicin-Sensitivität von NCI-H295 Zellen ermittelt über BrdU-Assay ($n=3$, A), NMRI nu/nu Maus mit humanem NCI-H295-Tumor 26 Tage nach Injektion von 15 Millionen NCI-H295 Zellen (B) und NCI-Tumor nach Entnahme bei einem längsten Tumordurchmesser von 1,5 cm (C). Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

3.1.4 Nebennierenrindenzarzinom/GEP-NET-Modell

Zur Vereinfachung pharmakokinetischer Untersuchungen einer Substanz an zwei endokrinen Tumorentitäten wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein kombiniertes Xenograft-Modell aus neuroendokrinen Tumor und Nebennierenrindenzarzinom etabliert (Abb. 3-5; 2.2.7). Die Tumore wurden mittels Injektion von 10×10^6 BON Zellen und 15×10^6 NCI-H295 Zellen in NMRI nu/nu Mäusen induziert. Die Tumorentwicklung beider Tumorarten verlief erfolgreich und zeigte zudem eine vergleichbare Wachstumskinetik.

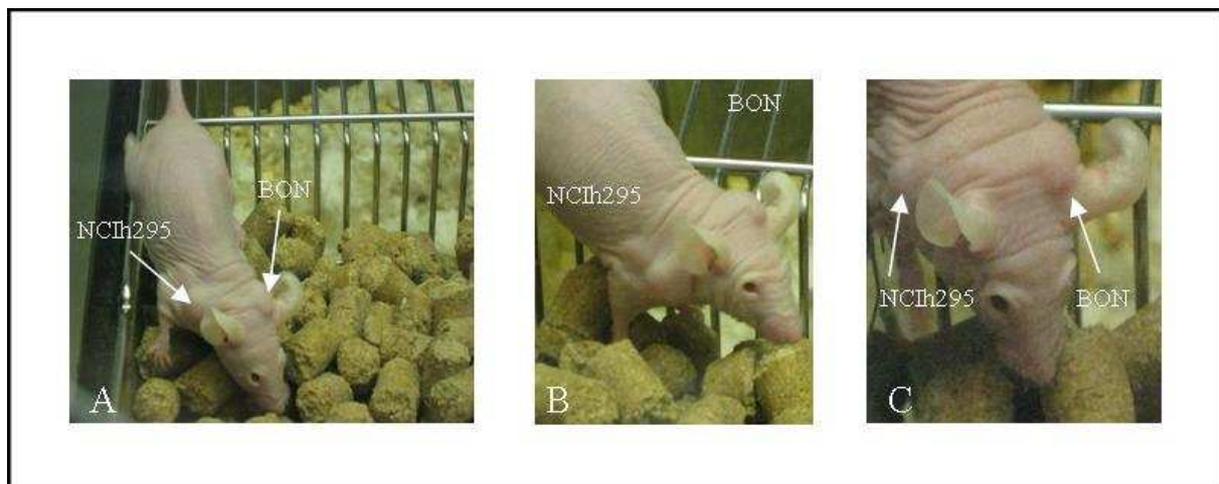


Abbildung 3-5: NMRI nu/nu Maus mit humanen NCI-H295- und BON-Tumoren 28 Tage nach Injektion von 15 Millionen NCI-H295 und 10 Millionen BON Zellen (A/B/C).

3.1.5 Optimierung zur Tumordetektion mittels *in vivo* Biolumineszenz

Subkutane Tumormodelle bieten wegen des oberflächlichen Tumorwachstums die Möglichkeit einer direkten Kontrolle der Tumorgöße. Wegen der insgesamt pathophysiologisch nicht relevanten Tumornische in der Subkutis nehmen allerdings Metastasierungsmodelle eine zunehmende Bedeutung als präklinisches Modell ein. Für diese disseminierten und/oder in der Tiefe wachsenden Tumorzellen sind jedoch geeignete Methoden erforderlich, die eine Quantifizierung der Tumormasse erlauben. Ausgehend von den subkutanen Tumormodellen wurden daher Erfahrungen gesammelt, die in einem weiteren Schritt auf die Metastasierungsmodelle angewendet werden sollen. Hierfür wurden NMRI-Mäuse mit etwa 0,7 cm großen BON Tumoren mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET, Abb. 3-6 A) oder Tumor Perfusion mithilfe von Computer Tomographie (CT, Abb. 3-6 B und C) dargestellt.

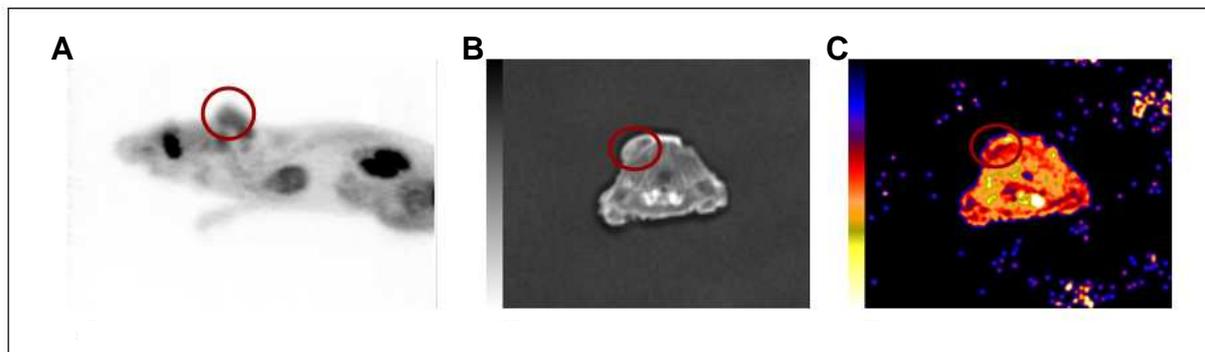


Abbildung 3-6: Bildgebung eines humanen BON Xenografts in einer athymischen NMRI nude Maus (A) mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie unter Verwendung eines ^{18}F -FDG (2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-Glucose) Tracers und der Tumor Perfusion mittels Computer Tomographie (B und C)

Die PET-Aufnahmen wurden von Frau Dr. Mustafa (Abteilung für Nuklearmedizin, Klinikum der Universität, München) durchgeführt. Verwendet wurde für die Aufnahmen ^{18}F -FDG (2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-Glukose) als Marker. 2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-Glukose wird im 1. Stoffwechselschritt (Phosphorylierung) in der Zelle wie Glukose behandelt und dient daher als Marker für den regionalen Glucose-Stoffwechsel. Ein erhöhter Glucose-Stoffwechsel findet sich im Herz, im Gehirn und in Tumor-Zellen. Die Darstellung des BON-Tumors durch PET war möglich, die erhaltenen Signale allerdings relativ gering. Das Gesamtergebnis war demnach nicht ausreichend, um auf dieser Basis ein Follow-up des Metastasierungsmodells etablieren zu können.

Herr Dr. Berger (Abteilung für Radiologie, Klinikum der Universität, München) ermöglichte die Tumor-Perfusionsmessungen eines BON Xenografts mithilfe der Computer-Tomographie. Doch auch diese Darstellung des Tumors war unbefriedigend, der Tumor ohne Wissen um die Lokalisation vermutlich nur schwer erkennbar. Aus diesen Gründen wurde eine andere Art der Bildgebung, die sogenannte „*in vivo* Biolumineszenz“ angestrebt. Die etablierten endokrinen Tumormodelle sollten so mithilfe stabil Luciferase exprimierender Tumorzellen für die Darstellung mittels „*in vivo* Biolumineszenz“ optimiert werden. Das dafür erforderliche Expressionsplasmid, mit Luciferase-Gen unter einem konstitutiv aktiven Promotor und einem in Säugetieren selektionierbarem Marker, musste zunächst noch kloniert werden.

3.1.5.1 Klonierung des Expressionsplasmids pFLuc-N1

Als Grundgerüst für das erstellte Luciferase-Expressionsplasmid diente der pEGFP-N1-Vektor (2.4.1.2). Dieser enthielt neben einer multiplen Klonierungsstelle auch einen in Säugetierzellen konstitutiv aktiven CMV-Promotor und als selektionierbaren Marker das Kanamycin/Neomycin-Gen (Abb.: 3-7 A)

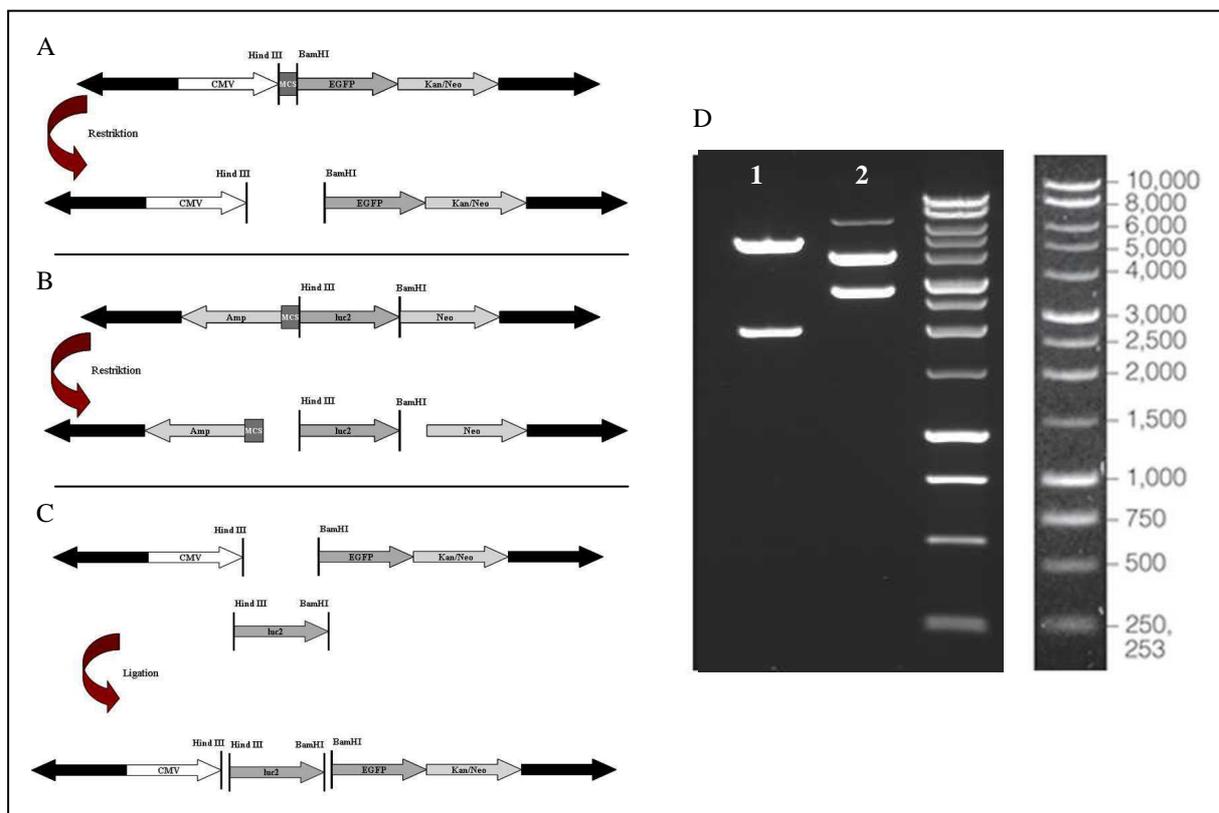


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Linearisierung von pEGFP-N1 mit HindIII und BamHI (A), der Restriktion von pGL4.17[luc2/Neo] mit HindIII und BamHI (B) und der

Ligation des linearisierten pEGFP-N1-Plasmids mit dem *luc2*-Gen (C). BamHI/HindIII (1) und XhoI/NotI (2) -Restriktionen zur Kontrolle der pfLuc-N1-Klonierung. Als Längenstandard diente die 1kb DNA Leiter der Firma Promega (D).

Nach Restriktion des Plasmids pEGFP-N1 in der Multiplen Klonierungsstelle mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI und anschließender Darstellung des linearisierten Vektors in einem Agarosegel, wurde das linearisierte, 4,7 kb große Fragment aus einem 1% Agarose-Gel eluiert. Für die Erstellung des „Inserts“ wurde eine Restriktion des Vektors pGL4.17[*luc2*/Neo] (2.4.1.1) ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und BamHI vorgenommen (Abb.: 3-7 B). Das, das Luciferase-Gen enthaltende Fragment von 2,1 kb, konnte anschließend durch Auftrennung in einem Agarosegel und anschließender Eluierung von dem 3,5 kb großen Vektor-Anteil getrennt werden. Im Anschluss erfolgte die Ligation von linearisiertem pEGFP-N1 und *luc2*-„Insert“ (Abb.: 3-7 C) und die Transformation z-kompetenter Bakterien mit dem Ligationsansatz. Nach der Anfertigung von Plasmid-Minipräparationen (2.4.9) wurden Kontrollspaltungen mit den Restriktionsenzymen XhoI/NotI bzw. BamHI/HindIII durchgeführt. Bei einer erfolgreichen Klonierung wurde ein 3,9 kb großes Vektor-Fragment und ein pfLuc-EGFP-Fragment von 2,8 kb bzw. ein 4 kb großes Vektor-Fragment und ein pfLuc-Fragment von 2 kb erwartet. Das so erhaltene Plasmid (Abb.:3-7 D), das im Folgenden als pfLuc-N1 bezeichnet wird, wurde zur stabilen Transfektion von Tumorzellen eingesetzt.

3.1.5.2 *In vitro* Luciferase Detektion

Um eine stabile Luciferase-Expression in den Zelllinien, die für die endokrinen Tumormodelle verwendet wurden zu gewährleisten, wurden BON und NCI-H295-Zellen mit pfLuc-N1 transfiziert und in den darauf folgenden Wochen alternierend mit G418 auf dieses Plasmid hin selektiert (2.1.3) Die Expressionslevel verschiedener Klone wurden mittels Luciferase-Assay (2.1.6) verglichen (Abb.: 3-8).

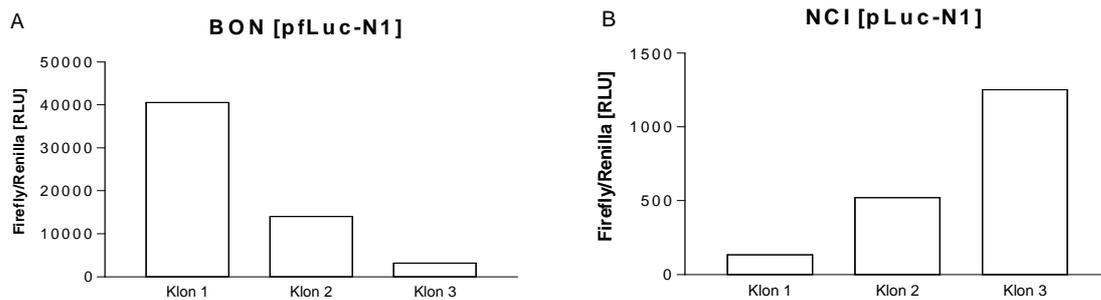


Abbildung 3-8: Luciferase-Assays für jeweils drei Klone der stabil mit pfLuc-N1 transfizierten Zelllinien BON (A) und NCI-H295 (B).

Die Luciferase-Expressionslevel unterschieden sich stark zwischen den verwendeten Zelllinien, aber auch zwischen den individuellen Klonen. Für beide Zelllinien wurde der jeweils am stärksten lumineszierende Klon (BON Klon1 und NCI-H295 Klon3) für eine Injektion in Versuchstiere ausgewählt.

3.1.5.3 *In vivo* Luciferase Detektion

Die stabilen Transfektanten BON [pfLuc-N1] Klon 1 und NCI [pLuc-N1] Klon 3 wurden in großem Maßstab in der Zellkultur angezogen und je 15 Millionen Zellen subkutan in den Nackenbereich athymischer NMRI-Nacktmäuse injiziert (2.2.4 und 2.2.6). Nach drei Wochen Tumorwachstum wurde zunächst Luciferin intravenös appliziert und dann die Mäuse mittels intraperitonealer Domitor/Ketamin-Injektion für die Bildgebung narkotisiert. Etwa zehn Minuten nach erfolgter Anästhesie wurde die Detektion mithilfe einer speziellen CCD-Kamera vorgenommen. In den Versuchstieren waren für beide Tumorarten spezifische Signale außergewöhnlich hoher Intensität detektierbar (Abb. 3-9 A und B).

Zusammen mit der Etablierung des hepatischen Metastasierungsmodells (3.1.1) wurde durch die Entwicklung der stabilen Transfektanten BON [pfLuc-N1] Klon 1 und NCI-H295 [pLuc-N1] Klon 3, die in Kombination mit NMRI Mäusen für die Tumor-Detektion mithilfe von *in vivo* Biolumineszenz geeignet sind, die Grundlagen zur Entwicklung neuer, pathophysiologisch relevanter, endokriner Tumormodelle geschaffen.

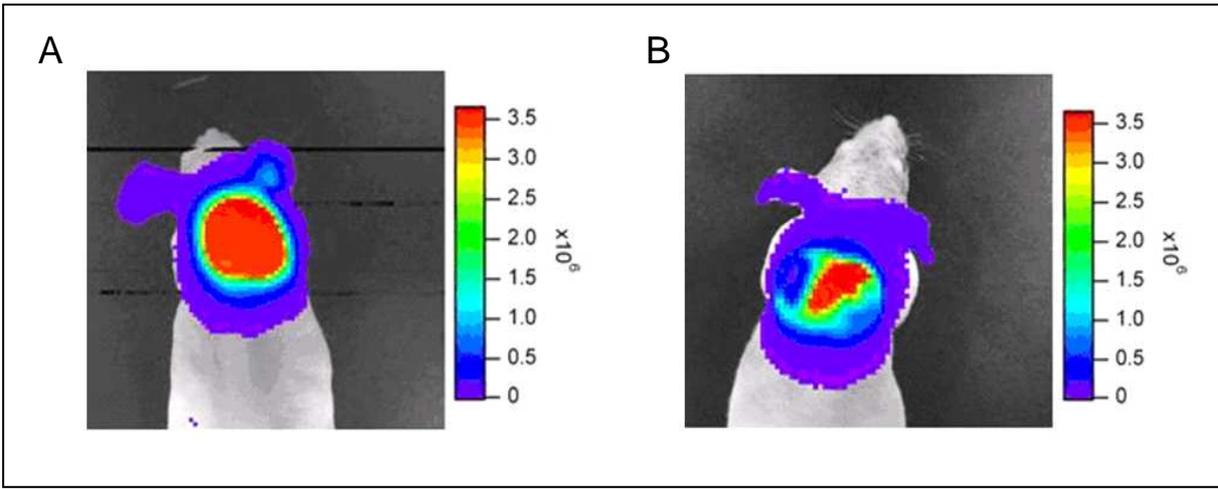


Abbildung 3-9: *In vivo* biolumineszierender BON [pfLuc-N1] Klon 1-Tumor (A) und NCI-H295 [pfLuc-N1] Klon 3-Tumor (B) in NMRI nu/nu Mäusen.

3.2 Entwicklung liposomaler Therapien gegen endokrine Tumore

Die Optimierung liposomaler Therapien kann mithilfe verschiedener Modifikationen erfolgen. Hierzu gehören neben unterschiedlichen zu verkapselnden Substanzen, einer großen Auswahl an Lipiden und Veränderungen der Vesikelgröße, auch die Modifikation der liposomalen Oberfläche und des gewählten Beladungsverfahrens. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen neue pH-abhängig freisetzbare Liposomen erstmals *in vivo* untersucht, deren Eigenschaften auf einem veränderten Beladungsverfahren beruhen (3.2.1), sowie eine neue IGF1-Rezeptor-Antikörper (IGF1-R-AK) gekoppelte, liposomale Therapie entwickelt (3.2.2). Als Vergleichspräparationen dienten freies DXR und Caelyx[®] (SSLD). Die Herstellung der liposomalen Präparationen, sowie die aufgeführten FACS-Analysen wurden von Felicitas Lewrick am Institut für pharmazeutische Technologie der Universität Freiburg (AG Süß) durchgeführt.

3.2.1 pH-abhängig freisetzbare EPC/Chol-Liposomen

Im Rahmen einer Untersuchung zur Optimierung des Beladungsverfahrens von Liposomen mit DXR wurden am Institut für pharmazeutische Technologie der Universität Freiburg (AG Süß) neue, pH-abhängig freisetzbare Liposomen hergestellt, die im Vergleich zu Caelyx[®] (SSLD, Abb.: 3-10 A) DXR *in vitro* bei niedrigem pH-Wert verstärkt freigaben (Abb.: 3-10 B, 2.3.6, [62]).

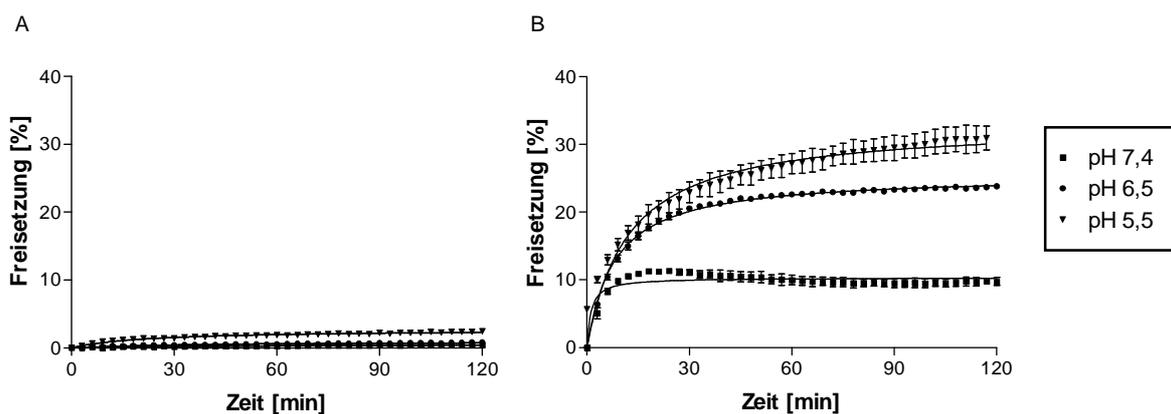


Abbildung 3-10: Darstellung der unterschiedlichen DXR-Freisetzung (n=3) von Caelyx[®] (A) und mittels eines Ammonium-Phosphat-Gradienten beladener EPC/Chol-Liposomen (B) bei einem pH-Wert von 7,4 ; 6,5 oder 5,5.

Eine höhere DXR-Akkumulation im sauren Milieu des Tumors *in vivo* könnte in vermehrter therapeutischer Effektivität im Vergleich zu gebräuchlichem liposomalen DXR wie Caelyx[®] resultieren. Diese Annahme wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des C26-Modells (3.1.1) überprüft. Hierbei wurde zusätzlich eine neue PEGylierungstechnik (SPIT, Sterol-basierte Post-Insertionstechnik) für die Herstellung der pH-abhängig freisetzen Liposomen verwendet und erstmals deren Auswirkungen auf Blutstabilität und Akkumulationseigenschaften des verkapselten DXRs im Tumor untersucht (3.2.1.2).

3.2.1.1 Dosisfindung für pH-abhängig freisetzen EPC/Chol-Liposomen

Da die pH-abhängig freisetzen Liposomen zuvor ausschließlich *in vitro* getestet wurden, gab es keinerlei Vergleichswerte zu Dosierung oder eventuell auftretenden Nebenwirkungen für *in vivo* Experimente. Aus diesem Grund wurde eine Dosisfindung (2.3.1) durchgeführt. Verwendet wurden hierbei Konzentrationen, die auch bei verstärkter DXR-Freisetzung die für DXR beschriebene maximal tolerierte Dosis für Mäuse, nicht überschreiten würden. Die gewählten vier Konzentrationen lagen bei 2,5 mg, 5mg, 8mg und 10mg verkapseltem DXR pro kg Körpergewicht. Die intravenöse Liposomeninjektion erfolgte nach sichtbarer Entwicklung eines subkutanen C26-Tumors. Der Zeitraum bis zum Erreichen einer Tumorgroße von 1,5 cm wurde gemessen. Zu diesem Zeitpunkt, beim Vorliegen einer Tumorexulzeration oder sichtbarer Beeinträchtigung der Mäuse durch den Tumor, wurden diese euthanasiert. Während des gesamten Beobachtungszeitraums und unter engmaschigem „Monitoring“ konnten keinerlei Auffälligkeiten an den Versuchstieren (n=5-8) beobachtet werden. Alle gewählten Konzentrationen konnten demnach als für die Versuchstiere einsetzbar eingestuft werden. Aus den erhaltenen Daten wurden zusätzlich die entsprechenden Überlebenskurven ermittelt, anhand derer sich tendenziell eine Abhängigkeit der Überlebenszeit von der eingesetzten DXR-Konzentration ableiten ließ (Abb.: 3-11). Eine signifikante Verlängerung der Mittleren Überlebenszeit (Tage) war für eine Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht pH-abhängig freisetzen EPC/Chol-Liposomen (SPIT) ($9,6 \pm 1,4$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ($4,63 \pm 0,7$; $p=0,01$) und im Vergleich zu 2,5 mg/kg ($6,83 \pm 0,5$; $p=0,03$) und 5mg/kg ($5,88 \pm 0,61$; $p=0,02$) liposomalen Doxorubicins detektierbar. Aufgrund dieser ersten Hinweise auf Verträglichkeit und therapeutische Effizienz wurde für die folgenden Versuche eine Wirkstoffkonzentration von 10mg/kg Körpergewicht gewählt.

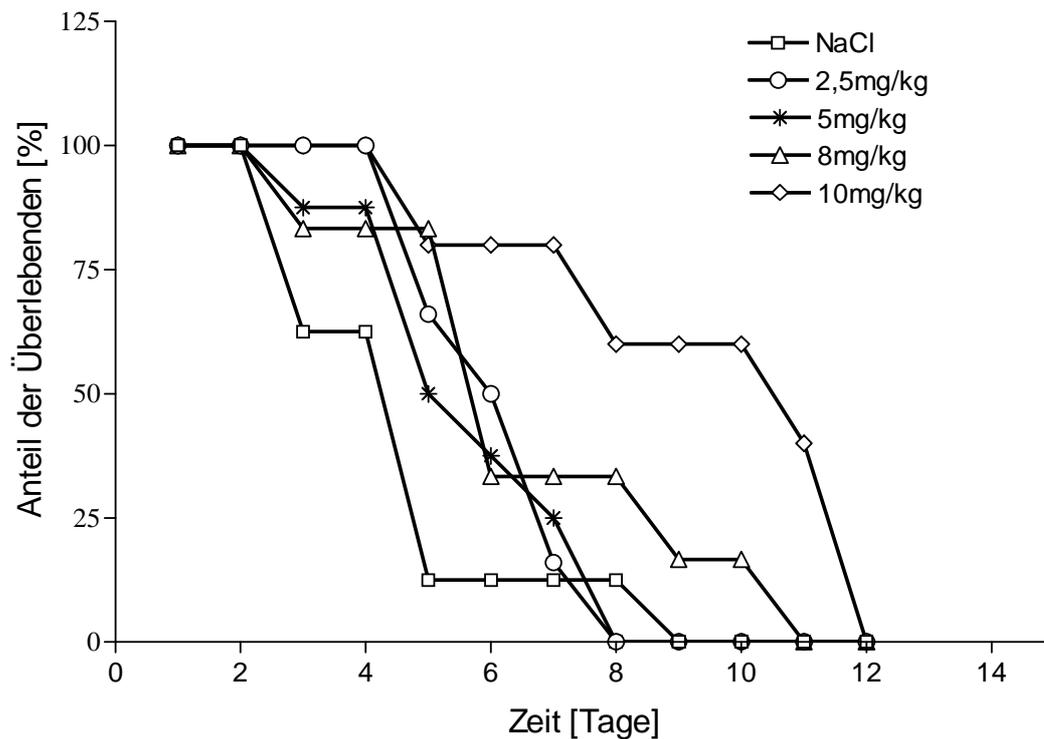


Abbildung 3-11: Effekte auf die Überlebenskurve von C26-Tumor tragenden Balb/c Mäusen (n=5-8) nach Behandlung mit pH-abhängig freisetzenden EPC/Chol-Liposomen verschiedener Konzentrationen.

3.2.1.2 SPIT PEGylierte vs. konventionell PEGylierte pH-abhängig freisetzende SPC/Chol-Liposomen

SPC/Chol-Liposomen sind den im vorangegangenen Versuch verwendeten EPC/Chol-Liposomen strukturell so ähnlich, dass zwischen diesen Präparationen keine großen Unterschiede in der Pharmakokinetik zu erwarten waren. Die SPC/Chol-Liposomen wurden daher aus methodischen Gründen zur Herstellung in großem Maßstab gewählt. Um jedoch eventuelle Auswirkungen der neuen SPIT-Technik im Vergleich zur konventionellen Kopplungstechnik ausschließen zu können, wurden DXR-Blutstabilität und Tumorakkumulation zweier Vergleichspräparationen ermittelt (2.3.2). Die intravenöse Injektion von 10mg/kg liposomaler Präparation erfolgte nach Entwicklung eines subkutanen C26-Tumors in Balb/c-Mäuse (n=5-7). Die DXR-Werte in Blut und Tumor ($\mu\text{g/g}$ Gewebe oder ml Blut) 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Verabreichung wurden anschließend ermittelt. Die DXR-Blutstabilität der konventionell PEGylierten liposomalen Präparation erwies sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 8 – 72 Stunden nach Verabreichung

signifikant stabiler, als die SPIT-PEGylierten Liposomen (8 Std.: konv. $1,26 \pm 0,05$ vs. SPIT $0,91 \pm 0,03$, $p = 0,0005$; 24 Std.: konv. $1,03 \pm 0,08$ vs. SPIT $0,02 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; 48 Std.: konv. $0,86 \pm 0,11$ vs. SPIT $0,03 \pm 0,03$, $p = 0,0001$; 72 Std.: konv. $0,84 \pm 0,12$ vs. SPIT $0,00 \pm 0,00$, $p = 0,0001$; Abb.: 3-12 A).

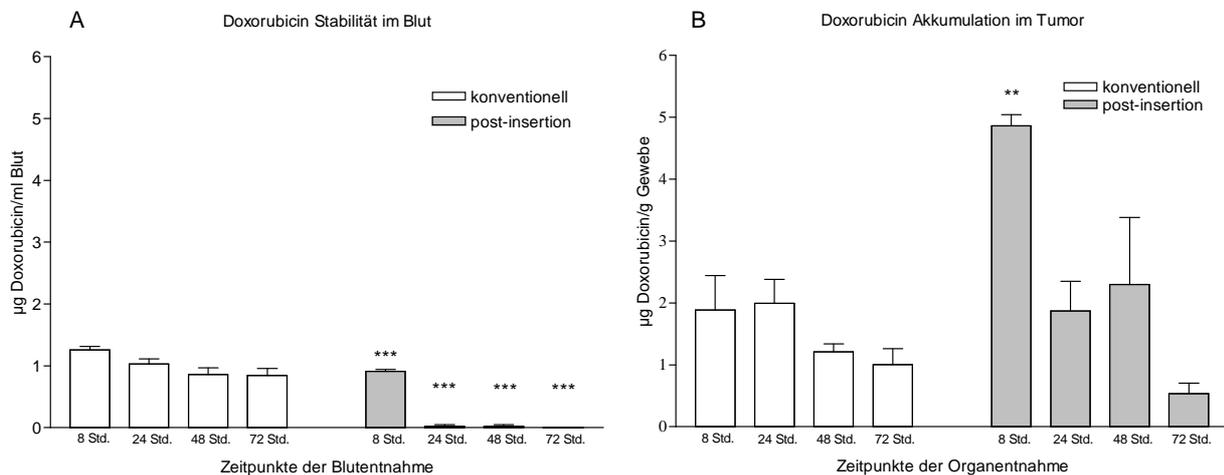


Abbildung 3-12: *In vivo* Doxorubicin (DXR) Akkumulation in Blut (A) und C26 Tumoren (B) 8, 24, 48 und 72 Stunden nach einer einmaligen Behandlung von Balb/c Mäusen ($n=5-7$) mit konventionell PEGylierten (weiße Balken) oder SPIT PEGylierten (graue Balken) SPC/Chol-Liposomen. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber der konventionellen Präparation des gleichen Zeitpunkts.

Die DXR-Akkumulation der SPIT-Gruppe im Tumor hingegen lag trotz der deutlich erniedrigten Blutstabilität für den ersten Messzeitpunkt signifikant höher, als die der konventionell PEGylierten Liposomen (8 Std.: konv. $1,89 \pm 0,55$ vs. SPIT $4,86 \pm 0,18$, $p = 0,01$). Für die anderen Zeitpunkte waren zwischen den verschiedenen Präparationen keine signifikanten Unterschiede detektierbar (24 Std.: konv. $2,00 \pm 0,39$ vs. SPIT $1,87 \pm 0,48$; 48 Std.: konv. $1,21 \pm 0,131$ vs. SPIT $2,3 \pm 1,08$; 72 Std.: konv. $1,01 \pm 0,25$ vs. SPIT $0,53 \pm 0,18$; Abb.: 3-12 B). Aus den vorliegenden Daten konnte man schließen, dass die SPIT-Technik im Vergleich zu einer konventionellen PEGylierung keine Nachteile in Bezug auf die Tumorrakkumulation birgt.

3.2.1.3 Organdosen für pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen (SPIT)

Des Weiteren wurde die Wirkstoff-Akkumulation der pH-abhängig freisetzenden, SPIT-PEGylierten Liposomen im Vergleich zu freiem DXR und sterisch stabilisiertem, liposomalen

DXR (Caelyx[®], SSLD) untersucht (2.3.2). Caelyx[®] setzt sich zusammen aus hydriertem Soja Phosphatidylcholin (HSPC), Cholesterol und 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-poly-(ethylenglycol)2000] (MPEG). Die Präparation zeichnet sich gerade aufgrund der letztgenannten Komponente durch eine sehr hohe Blutstabilität, damit einhergehende effiziente Wirkstoffakkumulation in Tumoren und einen im Vergleich zu freiem DXR reduziertem Nebenwirkungsprofil aus. Die experimentelle Vorgehensweise der pharmakokinetischen Testung dieser Präparation, entsprach der schon unter 3.2.1.2 für die Ermittlung von Organdosen, beschrieben (n=5-8). Die verwendeten Substanzen wurden wiederum in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Die Probenentnahme erfolgte ebenfalls nach 8, 24, 48 und 72 Stunden. Die DXR-Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{ml}$) im Blut waren für pH-abhängig freisetzende, SPIT-PEGylierte SPC/Chol-Liposomen (8 Std.: $0,91\pm 0,03$, $p<0,0001$; 24 Std.: $0,02\pm 0,02$, $p<0,0001$; 48 Std.: $0,03\pm 0,03$, $p=0,005$; 72 Std.: $0,00\pm 0,00$, $p=0,003$), genauso wie für freies DXR (8 Std.: $0,22\pm 0,05$, $p<0,0001$; 24 Std.: $0,22\pm 0,09$, $p<0,0001$; 48 Std.: $0,58\pm 0,18$, $p=0,01$; 72 Std.: $0,00\pm 0,00$, $p=0,003$), im Vergleich zu Caelyx[®] (8 Std.: $10,32\pm 0,82$; 24 Std.: $6,16\pm 0,61$; 48 Std.: $2,35\pm 0,54$; 72 Std.: $1,00\pm 0,23$) deutlich erniedrigt (Abb. 3-13 A).

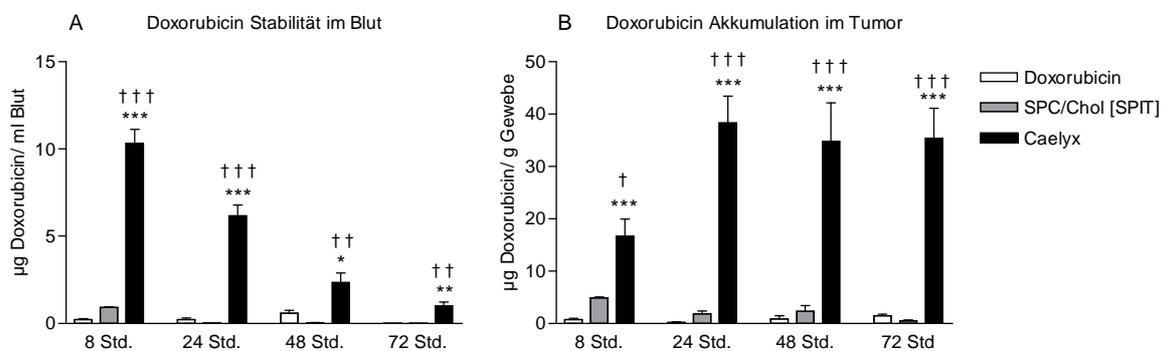


Abbildung 3-13: *In vivo* Doxorubicin (DXR) Akkumulation in Blut (A) und C26 Tumoren (B) 8, 24, 48 und 72 Stunden nach einer einmaligen Behandlung von Balb/c Mäusen (n=5-8) mit verschiedenen Präparationen. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede von Caelyx[®] gegenüber freiem DXR, Kreuze im Vergleich zu SPC/Chol [SPIT].

Ebenso wenig reichte freies DXR (8 Std.: $0,74\pm 0,25$, $p=0,0003$; 24 Std.: $0,17\pm 0,13$, $p<0,0001$; 48 Std.: $0,86\pm 0,57$, $p=0,0003$; 72 Std.: $1,42\pm 0,36$, $p=0,002$) oder die neue liposomale Präparation (8 Std.: $4,86\pm 0,18$, $p=0,029$; 24 Std.: $1,87\pm 0,48$, $p<0,0001$; 48 Std.: $2,3\pm 1,082$, $p=0,001$; 72 Std.: $0,53\pm 0,18$, $p<0,0001$) an die DXR Akkumulationswerte im Tumor von

Caelyx[®] heran (8 Std.: $0,22 \pm 0,05$, $p < 0,0001$; 24 Std.: $0,22 \pm 0,09$, $p < 0,0001$; 48 Std.: $0,58 \pm 0,18$, $p = 0,01$; 72 Std.: $0,00 \pm 0,00$, $p = 0,003$; Abb. 3-13 B).

Zusätzlich wurden weitere Proben (Stuhl, Urin, Thymus, Lunge, Gonaden, Leber, Herz, Haut, Nebennieren, Milz und Nieren) entnommen und die DXR-Akkumulation gemessen. Beispielhaft sind in Abb. 3-14 die Organdosen für den Zeitpunkt 48 Stunden nach Verabreichung aufgeführt.

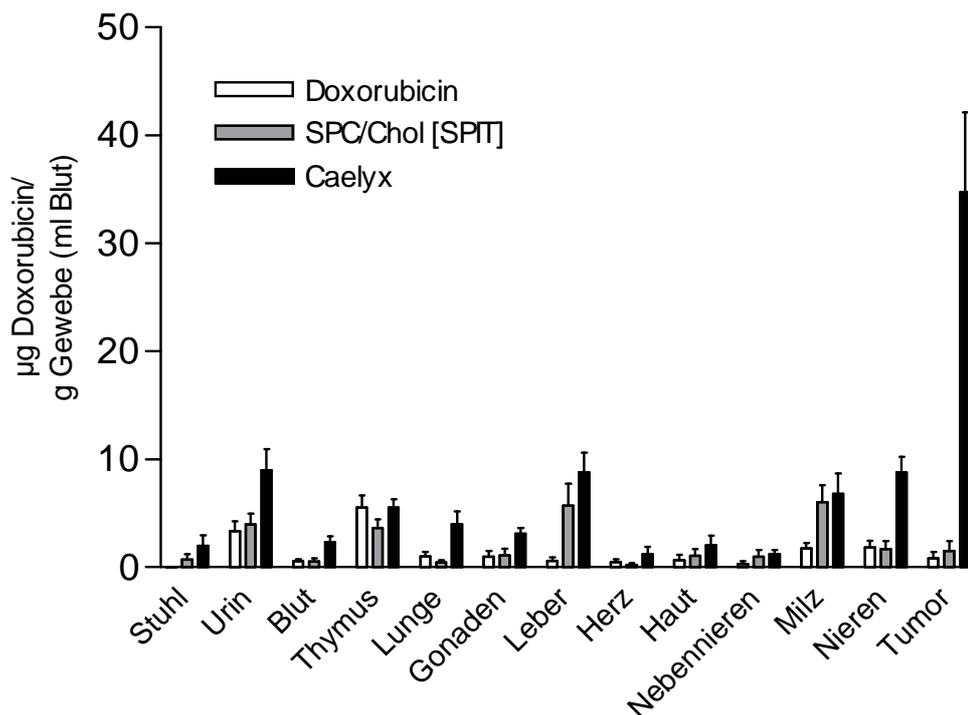


Abbildung 3-14: *In vivo* Doxorubicin (DXR) Akkumulation in verschiedenen Organen und C26-Tumoren 48 Stunden nach einer einmaligen Behandlung von Balb/c-Mäusen (n=7-8) mit verschiedenen Präparationen.

Im Urin ($9,0 \pm 2,0$), der Leber ($8,8 \pm 1,9$), der Milz ($6,8 \pm 1,9$) und den Nieren ($8,8 \pm 1,4$) kam es hierbei zu einer leichten Akkumulation von Caelyx[®], die im Vergleich zu freiem DXR in allen untersuchten Organen signifikant erhöht war (Urin: $3,4 \pm 0,9$, $p = 0,02$; Leber: $0,6 \pm 0,3$, $p = 0,0005$; Milz: $1,8 \pm 0,5$, $p = 0,016$; Nieren: $1,8 \pm 0,7$, $p = 0,0004$). Die SPC/Chol-Liposomen nahmen hier eine Mittelstellung zwischen Caelyx[®] und freiem Doxorubicin ein. Für die SPC/Chol-Liposomen waren die DXR Werte im Urin ($4,0 \pm 1,0$, $p = 0,042$) und den Nieren ($1,7 \pm 0,76$, $p = 0,0008$) im Vergleich zu Caelyx[®] signifikant erniedrigt, für Leber und Milz gab

es hier jedoch keine signifikanten Unterschiede. Verglichen mit DXR gab es ebenso keine signifikanten Unterschiede im Urin und den Nieren, allerdings eine signifikant höhere Wirkstoff-Akkumulation in Milz ($6,0 \pm 1,6$, $p=0,018$) und Leber ($5,7 \pm 2,0$, $p=0,0195$). Auch in den Gonaden und in der Lunge reicherte sich bei Caelyx[®]-Gabe signifikant mehr DXR an (Gonaden: $3,1 \pm 0,5$; Lunge: $4,0 \pm 1,2$), als bei Applikation von freiem DXR (Gonaden: $1,0 \pm 0,6$, $p=0,0162$; Lunge: $1,0 \pm 0,44$, $p=0,0227$) oder SPC/Chol-Liposomen (Gonaden: $1,1 \pm 0,6$, $p=0,0283$; Lunge: $0,4 \pm 0,3$, $p=0,0097$) feststellbar war. Für Herz, Haut und Thymus konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Präparationen detektiert werden (Herz DXR: $0,5 \pm 0,3$, SPC/Chol: $0,2 \pm 0,2$, Caelyx[®]: $1,2 \pm 0,7$; Haut DXR: $0,7 \pm 0,5$, SPC/Chol: $1,1 \pm 0,6$, Caelyx[®]: $2,1 \pm 0,9$; Thymus DXR: $5,5 \pm 1,2$, SPC/Chol: $3,6 \pm 0,8$, Caelyx[®]: $5,5 \pm 0,8$).

Zusammenfassend konnte für die neuen pH-abhängig freisetzen Liposomen festgestellt werden, dass die liposomale Beladung mit DXR mittels eines Ammonium-Phosphat-Gradienten zu keiner Erhöhung der DXR-Freisetzung im sauren Milieu des Tumors führte. Zudem spielte der Einsatz der neuen SPIT-Kopplungstechnik keine entscheidende Rolle. Die Tumor-Akkumulationswerte und Blutstabilität einer etablierten Präparation wie Caelyx[®] konnten weder nach konventioneller PEGylierung, noch nach SPIT-PEGylierung, erreicht werden. Obwohl die DXR-Akkumulation im Tumor nicht als einziger Parameter die therapeutische Effizienz definiert, war bei den großen Unterschieden im Vergleich zu Caelyx[®] keine vermehrte therapeutische Wirkung der neu entwickelten Liposomen *in vivo* zu erwarten.

3.2.2 Der IGF1-Rezeptor als therapeutisches Target

Der IGF1-Rezeptor stellt für eine Reihe verschiedener Tumorentitäten eine interessante therapeutische Zielstruktur dar. Zum einen sollte die Überexpression ein aktives Targeting zur Verbesserung der Effizienz und Spezifität von liposomalen Chemotherapien erlauben, zum anderen spielt der IGF1-Rezeptor durch seine endogene Aktivierung selbst eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und Tumorzellproliferation. Für die nachfolgenden Versuche wurde der IGF1-Rezeptor-blockierende Antikörper 1H7 verwendet, welcher mit hoher Affinität an die alpha-Untereinheit des IGF1-Rezeptors bindet, die Bindung der nativen Liganden IGF1 und IGF2 inhibiert und somit als funktioneller Antagonist fungiert [121]. Um zu überprüfen ob sich GEP-NET Tumore für eine Behandlung mit einer anti-IGF1-R gerichteten Therapie eignen, wurden zunächst die IGF1-R Expressionslevel anhand menschlicher Tumorproben im Vergleich zu normalem Gewebe immunhistochemisch untersucht (Abb. 3-15).

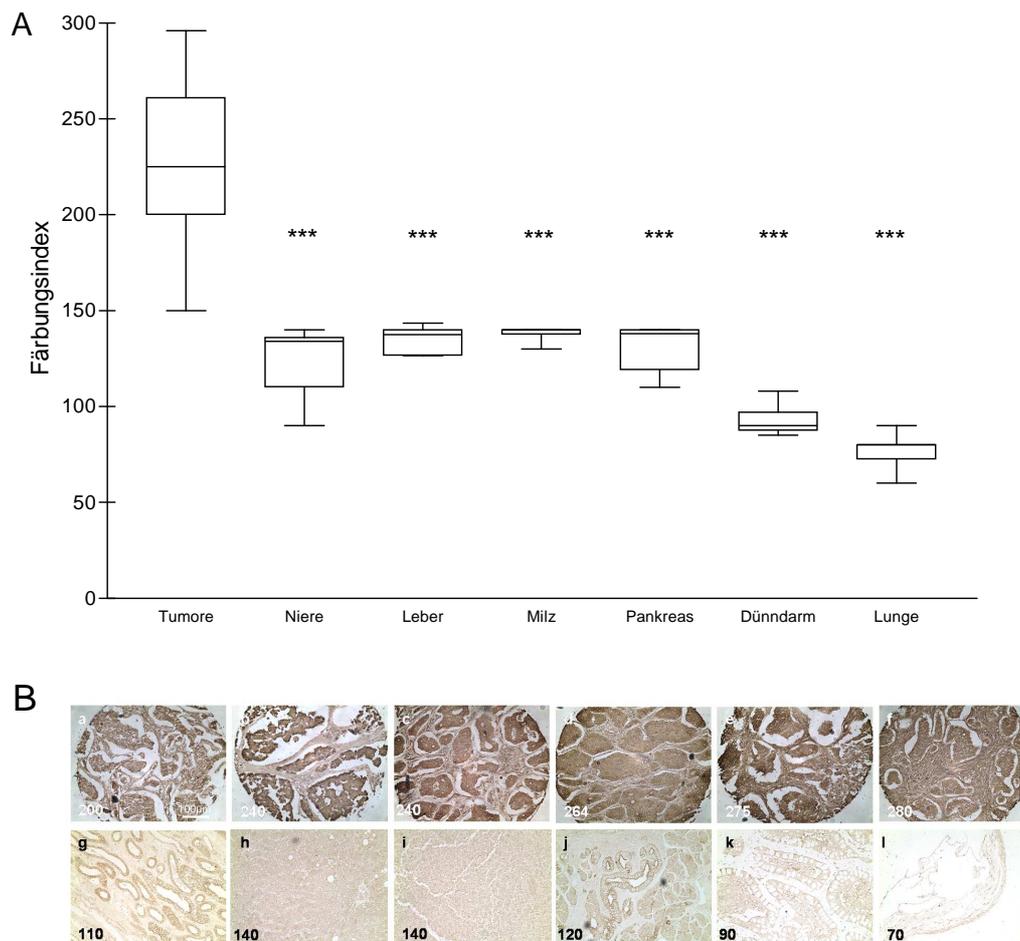


Abbildung 3-15: IGF1-R Expressionsanalyse verschiedener menschlicher GEP-NET Tumorproben im Vergleich mit normalem Gewebe. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber Tumor Material (A). Die Bilder a-l zeigen Beispiele für die

immunhistochemischen Färbungen der verschiedenen Gewebe: Tumore [a-f], Niere [g], Leber [h], Milz [i], Pankreas [j], Dünndarm [k] und Lunge [l] (B). Die Zahlen repräsentieren das Ergebnis der Auswertung, welches sich zusammensetzt aus prozentuaalem Anteil positiv gefärbter Zellen und den jeweiligen Färbungsintensitäten [0-3].

In den untersuchten GEP-NET Proben konnte eine hohe cytoplasmatische Expression des IGF1-Rezeptors (Färbungsindex: $229,1 \pm 3,1$ %) im Vergleich zu den Kontrollgeweben (Niere, $123,8 \pm 6,0$ %; Leber, $7134,8 \pm 2,4$ %; Milz, $138,1 \pm 1,2$ %; Pankreas, $130,5 \pm 4,1$ %; Dünndarm, $92,8 \pm 2,8$ %; Lunge, $74,4 \pm 2,4$ %; jedes Gewebe $p < 0,0001$ vs. GEP-NET, Abb.: 3-15 A+B) detektiert werden. Auch im Vergleich mit dem durchschnittlichen Färbungsindex aller untersuchten gesunden Gewebe ($115,7 \pm 3,7$ %) konnte für alle untersuchten Patiententumore eine erhöhte IGF1-R-Expression nachgewiesen ($p < 0,001$).

3.2.2.1 IGF1-Rezeptor-Inhibition und Doxorubicin als Kombinationstherapie gegen GEP-NETs

Zunächst wurde die Wirkung des anti-IGF1-R-Antikörpers 1H7, freien DXRs und der kombinierten Gabe auf Zellproliferation, Zellvitalität und Apoptoseinduktion in humanen BON Tumorzellen mittels BrdU, MTT und Caspase Assay untersucht. DXR bewirkte eine signifikante Inhibition der BON Zellproliferation in dosisabhängiger Weise (0,625 ng/ml: $43,7 \pm 4,0$ %, $p = 0,0015$ und 2,5 ng/ml: $7,6 \pm 1,3$ %, $p = 0,0001$ vs. unbehandelte Kontrollen, $100,0 \pm 6,9$ %; Abb. 3-16 A). Gleichermaßen resultierte die Behandlung mit DXR in einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität ($85,3 \pm 3,2$ %) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ($100,0 \pm 1,9$ %, $p = 0,03$; Abb. 3-16 B). Darüber hinaus kam es unter Doxorubicin zu einer Apoptose-Induktion, gemessen an einer Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität ($122,6 \pm 4,9$ %), im Vergleich zu Basalwerten ($100,0 \pm 1,2$ %; $p = 0,01$) (Abb. 3-16 C). Eine einmalige Behandlung mit freiem 1H7 resultierte in einer Reduktion der BON Zellproliferation ($78,4 \pm 1,7$ %, $p = 0,02$ vs. unbehandelte Kontrolle). Zudem war eine leichte, aber nicht signifikante, Abnahme der Zellvitalität ($94,2 \pm 2,6$ %, $p = 0,2$ vs. unbehandelte Kontrolle), sowie auch eine Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität ($125,7 \pm 1,7$ % $p = 0,0003$ vs. unbehandelte Kontrolle) detektierbar. Obwohl kombinierte Behandlungen für alle Assays in signifikanten Effekten im Vergleich zu unbehandelten Zellen resultierten (Proliferation: 0,625 ng/ml DXR und 1 μ g/ml 1H7: $37,5 \pm 2,7$ %, $p = 0,0008$ 2,5 ng/ml DXR und 1 μ g/ml 1H7: $4,2 \pm 0,5$ %, $p < 0,0001$; Vitalität: $78,4 \pm 3,9$ %, $p = 0,02$; Apoptose: $131,7 \pm 1,4$ %, $p < 0,0001$),

unterschieden sich die induzierten Effekte nicht signifikant von einer alleinigen DXR Behandlung.

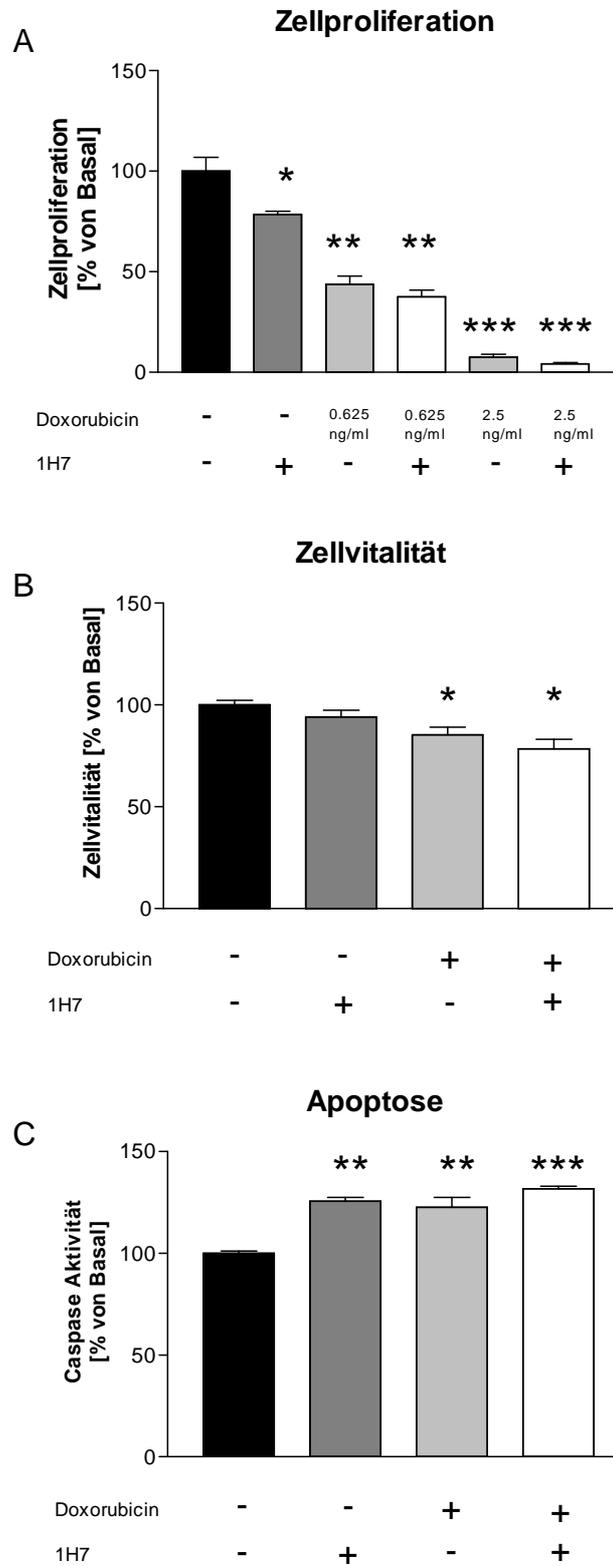


Abbildung 3-16: *In vitro* Effekte von Doxorubicin (DXR) und freiem IGF1-R blockierenden Antikörper (1H7) auf Zellproliferation (A), Zellvitalität (B), und Caspase Aktivität (C) in humanen neuroendokrinen BON Zellen. Die Zellen wurden entweder mit 0,625 ng/ml oder

2,5 ng/ml DXR (hellgraue Balken) oder 1µg/ml 1H7 und zusätzlich 0,625 ng/ml oder 2,5 ng/ml DXR (weiße Balken) für 24 Stunden für BrdU Assays (A), mit 250 ng/ml 1H7 und 2,5 ng/ml DXR für 24 Stunden für MTT Assays (B) und 1µg/ml 1H7 plus 8µg/ml DXR für 8 Stunden für die Quantifizierung der Caspase Aktivität, behandelt. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollen.

3.2.2.2 Zelluläre Interaktion von anti-IGF1-R-AK gekoppelten Immunliposomen mit humanen Tumorzellen *in vitro*

Die Herstellung der im weiteren eingesetzten liposomalen Präparationen, sowie die in Abb. 3-17 und 3-18 dargestellten *in vitro* Experimente wurden von Felicitas Lewrick am Institut für pharmazeutische Technologie der Universität Freiburg (AG Süß) im Rahmen einer Kooperation zur Entwicklung neuer, liposomaler Therapien gegen endokrine Tumore durchgeführt. Zum IGF1-Rezeptor Targeting wurde der anti-IGF1-R-AK 1H7 an Standard-Liposomen (SPC/Chol) gekoppelt. Um eine effektive Verankerung des Antikörpers an der liposomalen Oberfläche zu erreichen wurde die auch schon unter 3.2.1 eingesetzte „sterol-based post-insertion technique“ (SPIT, Abb. 2-7) verwendet. Die zelluläre Assoziation dieser spezifisch-gekoppelten Liposomen im Vergleich zu nicht-gekoppelten und unspezifisch-gekoppelten Präparationen mit BON Zellen wurden durchflusszytometrisch (FACS) untersucht (Abb.: 3-17 A).

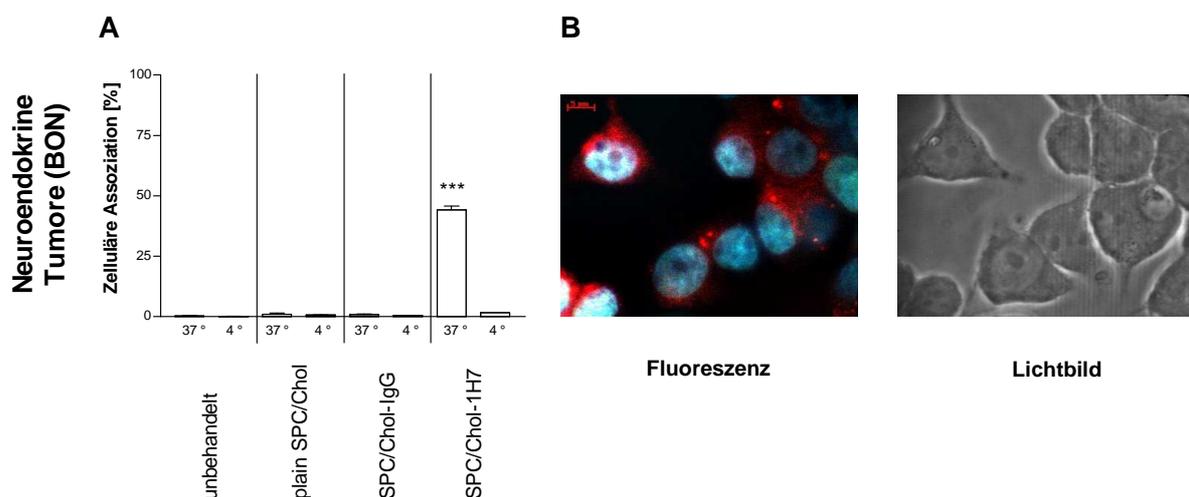


Abbildung 3-17: Zelluläre Assoziation von IGF1-R-AK gekoppelten Liposomen (SPC/Chol-1H7) basierend auf SPC/Chol/Rhodamin-PE bei 37 °C und 4 °C im Vergleich zu nicht-gekoppelten (plain SPC/Chol) und unspezifisch-gekoppelten (SPC/Chol-IgG) Liposomen mit humanen BON Zellen mittels FACS Analyse (n = 3) (A) und fluoreszenzmikroskopische

Aufnahmen der Internalisierung spezifisch gekoppelter SPC/Chol/Rhodamin-PE-1H7 Liposomen (rot; DAPI angefärbte Zellkerne, blau) (B).

Die FACS-Analysen ergaben hohe und signifikante zelluläre Interaktionen spezifisch gekoppelter 1H7-Liposomen ($44,2\pm 1,6\%$) mit den Zielzellen, während nicht-gekoppelte oder unspezifisch an einen IgG-AK gekoppelte Liposomen nicht mit den neuroendokrinen Tumorzellen interagierten ($0,5\pm 0,3\%$ und $0,8\pm 0,3\%$, $p < 0,0001$ vs. SPC/Chol-1H7). Darüber hinaus deutete ein Mangel an zellulärer Assoziation bei 4°C ($1,58\pm 0,0\%$) auf eine Internalisierung spezifisch gekoppelter Liposomen nach Bindung an den IGF1-R hin, welche durch Visualisierung intrazellulärer Fluoreszenz von 1H7-gekoppelten Liposomen in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden konnte (Abb.: 3-17 B). Durchflusszytometrische Analysen mit den Zelllinien MCF7 ($64,9\pm 2,3\%$ vs. $0,04\pm 0,1\%$, $p < 0,0001$), Kelly ($21,8\pm 2,9\%$ vs. $0,02\pm 0,009\%$, $p = 0,002$) und DU145 ($31,9\pm 0,7\%$ vs. $0,06\pm 0,02\%$, $p < 0,0001$) bestätigten diese Ergebnisse auch für weitere menschliche Tumorzelllinien, welche Brustkrebs, Neuroblastom und Prostatakarzinom repräsentieren (Abb.3-18).

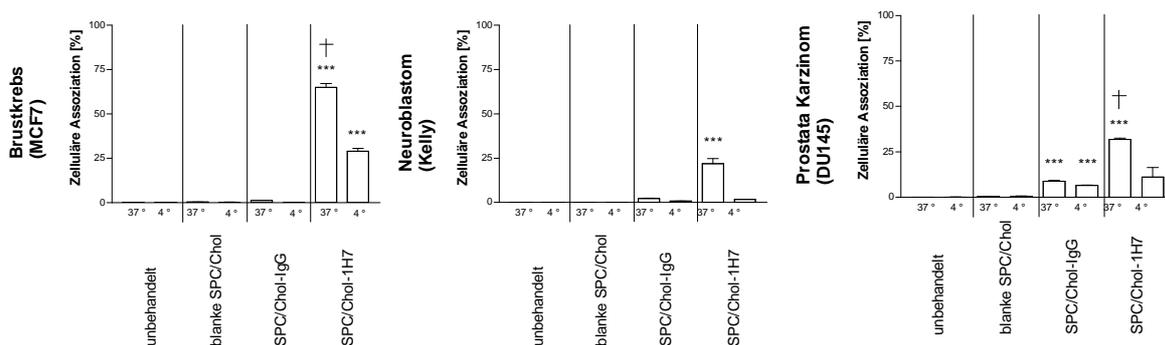


Abbildung 3-18: Zelluläre Assoziation von IGF1-R-AK gekoppelten Liposomen (SPC/Chol-1H7) basierend auf SPC/Chol/Rhodamin-PE bei 37°C und 4°C im Vergleich zu nicht-gekoppelten (plain SPC/Chol) und unspezifisch-gekoppelten (SPC/Chol-IgG) Liposomen mit Kelly, MCF7 und DU145 Zellen mittels FACS Analyse ($n=3$).

Diese Analysen belegten demnach ein hochspezifisches, aktives Targeting 1H7-gekoppelter Liposomen am IGF1-Rezeptor verschiedener Tumorzelllinien *in vitro*. Diese vielversprechenden Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des BON-Xenograft-Modells *in vivo* untersucht.

3.2.2.3 Pharmakokinetik 1H7 gekoppelter Liposomen

Zur Untersuchung des aktiven Targetings *in vivo*, wurden verschiedene mit DXR beladene SPC/Chol-Präparationen, entweder mit einem spezifischen 1H7-AK (SPC/Chol/NHS-1H7) oder mit einem unspezifischen IgG-Ak (SPC/Chol/NHS-IgG) modifiziert. Als Kontrolle wurden Ak-ungekoppelte, aber ebenfalls PEGylierte SPC/Chol-Liposomen verwendet. Acht Stunden nach Injektion von 10 mg liposomal-verkapselten DXR/kg Körpergewicht wurden die BON-Tumor tragen NMRI-Mäusen euthanasiert und nach Extraktion des DXR dessen Verteilung ($\mu\text{g/g}$ Gewebe oder ml Blut) in den entnommenen Proben (Tumor, Blut, Leber, Milz, Nebennieren, Gonaden) analysiert (Abb. 3-19; 2.3.3 und 2.3.4).

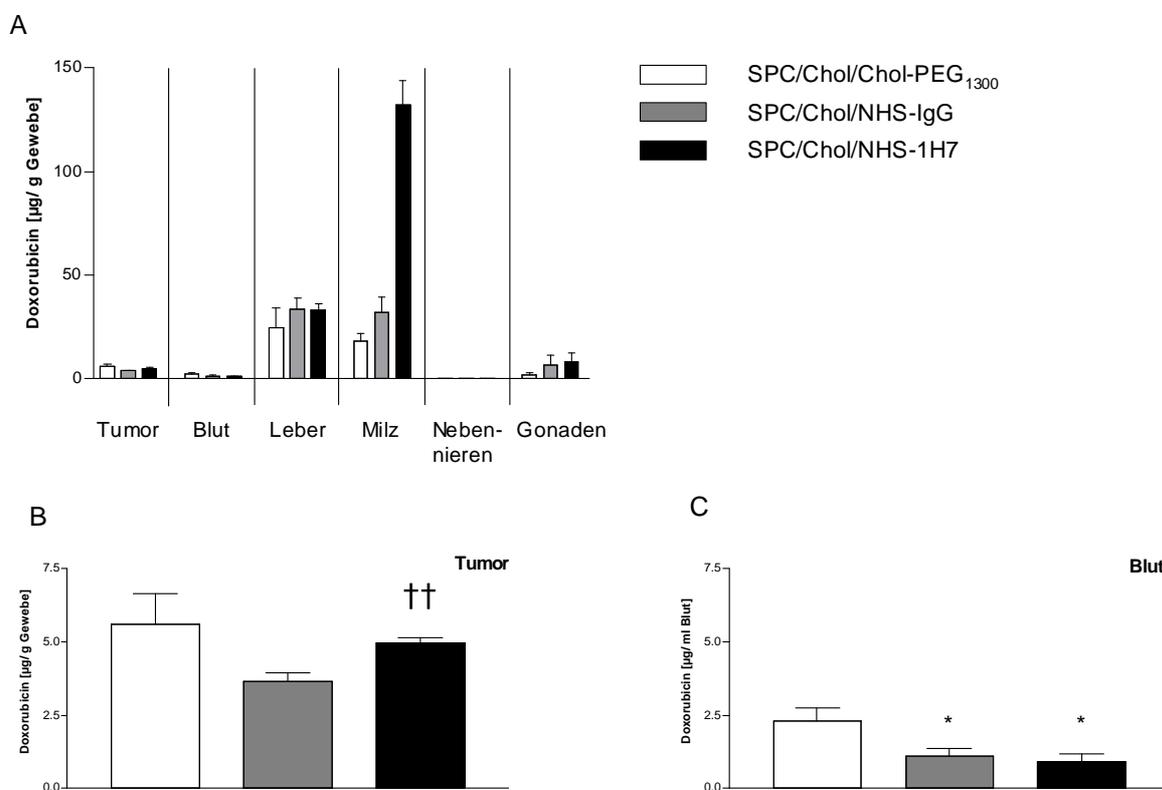


Abbildung 3-19: *In vivo* Doxorubicin (DXR) Akkumulation in verschiedenen Organen (A), BON Tumoren (B) und Blut (C) 8 Stunden nach einer einmaligen Behandlung von NMRI nu/nu Mäusen (n=5) mit verschiedenen liposomalen Präparationen. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber SPC/Chol-PEG₁₃₀₀, während Kreuze signifikante Unterschiede zwischen SPC/Chol/NHS-IgG und SPC/Chol/NHS-1H7 repräsentieren.

Während alle Präparationen zu keiner oder nur relativ geringer DXR-Akkumulation in Nebennieren (SPC/Chol-PEG: 0 ± 0 ; SPC/Chol/NHS-IgG: 0 ± 0 ; SPC/Chol/NHS-1H7: 0 ± 0) und

Gonaden (SPC/Chol-PEG: $1,7 \pm 1,1$; SPC/Chol/NHS-IgG: $6,4 \pm 4,7$; SPC/Chol/NHS-1H7: $8 \pm 4,4$) führten, war in der Leber eine deutliche Wirkstoff-Anreicherung detektierbar (SPC/Chol-PEG: $24,2 \pm 9,6$; SPC/Chol/NHS-IgG: $33,3 \pm 5,5$; SPC/Chol/NHS-1H7: $33,1 \pm 2,8$; Abb. 3-19 A). Die Verabreichung spezifisch-gekoppelter SPC/Chol/NHS-1H7-Liposomen führte überdies zu einer außergewöhnlich hohen DXR-Anreicherung in der Milz ($132 \pm 11,65$) verglichen mit IgG-gekoppelten ($31,9 \pm 7,6$, $p < 0,0001$) und ungekoppelten Liposomen ($18,2 \pm 3,5$, $p < 0,0001$). Die DXR-Werte im Blut waren für SPC/Chol/NHS-IgG ($1,1 \pm 0,3$; $p = 0,045$) und SPC/Chol/NHS-1H7 ($0,9 \pm 0,3$; $p = 0,03$) im Vergleich zu den PEGylierten SPC/Chol-Liposomen ($2,3 \pm 0,4$) signifikant erniedrigt (Abb. 3-19C). Bezogen auf die Tumorkkumulation waren nach 8 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen 1H7-gekoppelten und Kontroll-Liposomen detektierbar ($5,3 \pm 1$ vs. $5 \pm 0,2$). Die DXR-Werte der unspezifisch gekoppelten Präparation ($3,6 \pm 0,3$) lagen hingegen signifikant niedriger als die der 1H7-Liposomen ($p = 0,008$). Die Kopplung des spezifischen 1H7-Antikörpers bewirkte einen Anstieg der DXR-Akkumulation im Tumor verglichen mit SPC/Chol/NHS-IgG (Abb. 3-19 B). Für die folgenden *in vivo* Experimente wurde kommerziell erhältliches, sterisch stabilisiertes, liposomales DXR (SSLD, Caelyx[®]) als Grundsubstanz verwendet. Um das IGF1-R-Targeting *in vivo* zu untersuchen, wurde die Oberfläche des SSLDs wiederum mit einem spezifischen 1H7-Ak (SSLD-1H7) bzw.- mit einem unspezifischen IgG-Ak (SSLD-IgG) modifiziert. Um Unterschiede in der Blutstabilität durch unterschiedlichen liposomalen PEG-Gehalt zu vermeiden, der durch die bei der Kopplungsprozedur verwendeten Anker hätten bedingt sein können, wurden entsprechende Mengen sterol-PEG₁₃₀₀ zu der nicht-gekoppelten SSLD Kontrollgruppe (SSLD-PEG+) gegeben. Für die Untersuchungen der DXR Akkumulation im Tumorgewebe und der Blutstabilität *in vivo* wurden BON-Tumor tragende NMRI Nacktmäuse mit 10 mg liposomal-verkapselten DXR/kg Körpergewicht behandelt. Acht Stunden nach einer einmaligen Gabe wurden die DXR-Werte der Proben bestimmt. Eine leichte Akkumulation in den Gonaden (SSLD-PEG+: $9,8 \pm 1,8$; SSLD-IgG: $9,8 \pm 1,32$; SSLD-1H7: $7,6 \pm 2,4$) war für alle Präparationen in diesem Experiment erkennbar, ebenso wie eine hohe Anreicherung der ungerichteten Liposomen in den Nebennieren im Vergleich zu SSLD-IgG und SSLD-1H7 (SSLD-PEG+: $46,1 \pm 32,1$; SSLD-IgG: $2,7 \pm 2,7$; SSLD-1H7: $1,7 \pm 1,7$). Hierbei variierten die Messwerte allerdings gerade für SSLD-PEG+ deutlich (Abb. 3-20 A). Auch in diesem Experiment zeigte sich die schon vorab beobachtete DXR Akkumulation in der Leber (SSLD-PEG+: $20,3 \pm 6$; SSLD-IgG: $32,8 \pm 17$; SSLD-1H7: $32,8 \pm 8,8$), die Anreicherung in der Milz (SSLD-PEG+: $5,1 \pm 1,75$; SSLD-IgG: $5,3 \pm 2,75$; SSLD-1H7: $9,5 \pm 0,9$) war hingegen nicht so stark ausgeprägt wie zuvor bei den SPC/Chol-Liposomen. Vor

allem eine außergewöhnlich hohe DXR-Anreicherung der 1H7-gekoppelten Präparation in der Milz, wie für SPC/Chol/NHS-1H7 im vorangegangenen Versuch, war nicht erkennbar (SSLD-1H7: $9,5 \pm 0,9$ vs. SPC/Chol/NHS-1H7 $132 \pm 11,65$, $p < 0,0001$). Die DXR Werte im Blut ($\mu\text{g/ml}$ Blut) waren im Vergleich zu den SPC/Chol-Liposomen deutlich erhöht, aber für die SSLD-Präparationen untereinander nicht signifikant verschieden (SSLD-PEG+ $13,4 \pm 1,0$ vs. SSLD-IgG $10,6 \pm 1,2$, $p = 0,13$ und SSLD-1H7, $9,3 \pm 2,3$, $p = 0,15$; Abb.: 3-20 C).

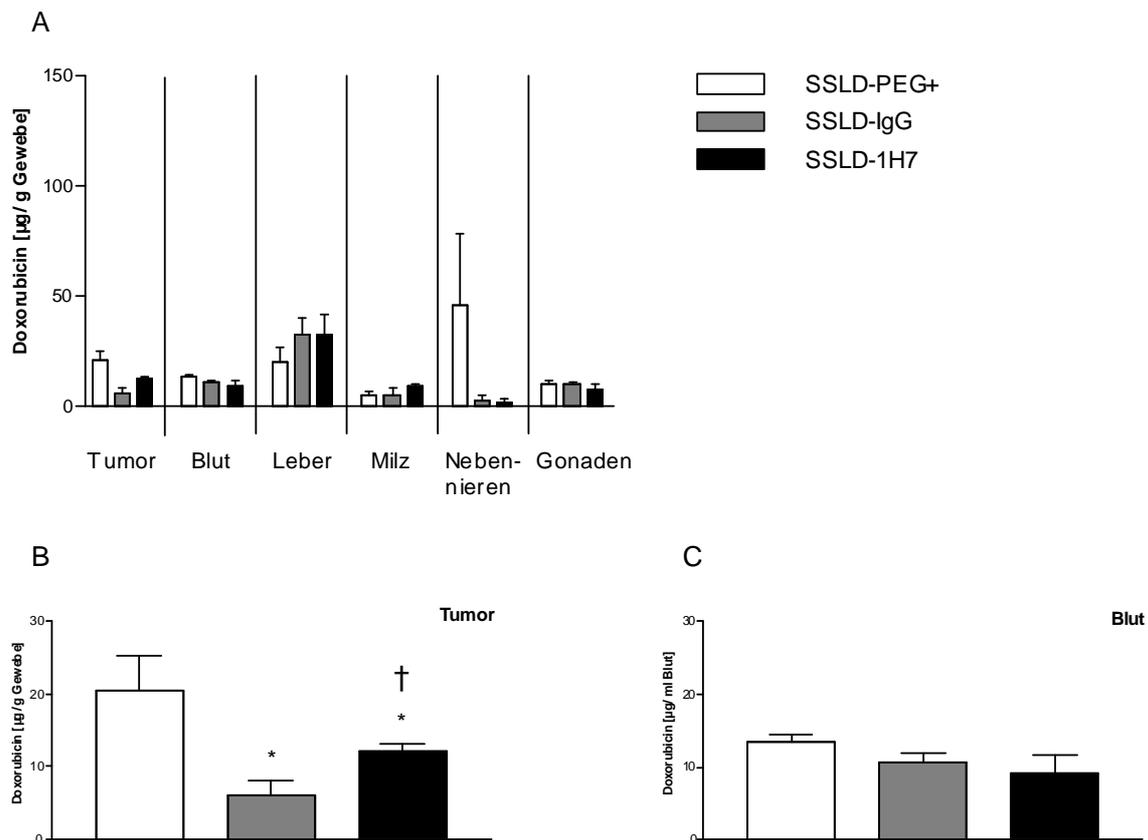


Abbildung 3-20: *In vivo* Doxorubicin (DXR) Akkumulation in verschiedenen Organen (A), BON Tumoren (B) und Blut (C) 8 Stunden nach einer einmaligen Behandlung von NMRI nu/nu Mäusen ($n=5$) mit verschiedenen liposomalen Präparationen. SSLD-PEG+: nicht-AK-gekoppelte Liposomen; SSLD-IgG: IgG-gekoppelte Liposomen; SSLD-1H7: 1H7-gekoppelte Liposomen. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber SSLD-PEG+, während Kreuze signifikante Unterschiede zwischen SSLD-IgG und SSLD-1H7 repräsentieren.

Im Gegensatz dazu war die DXR Akkumulation im Tumor (μg DXR/g Gewebe) für SSLD-IgG signifikant reduziert ($6,1 \pm 1,9$, $p = 0,02$) und ebenfalls geringer für SSLD-1H7 ($12,1 \pm 1,1$, $p = 0,17$) im Vergleich zu SSLD-PEG+ ($20,6 \pm 4,7$; Abb.: 3-20 B). Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass die detektierten DXR Konzentrationen im Tumor Gewebe für SSLD-1H7

signifikant höher waren, als die für SSLD-IgG ($p=0,04$), was nicht auf Unterschiede in der Blutstabilität zurückgeführt werden kann.

3.2.2.4 Therapeutische Wirksamkeit von anti-IGF1-R-AK-gekoppelten Immunoliposomen gegen humane BON Tumor Xenografts

Die antitumorale Wirksamkeit von anti-IGF1-R-AK-gekoppelten Liposomen wurde anhand von humanen neuroendokrinen BON Xenografts in athymischen NMRI Nacktmäusen *in vivo* untersucht (2.3.5; Abb.: 3-21 A).

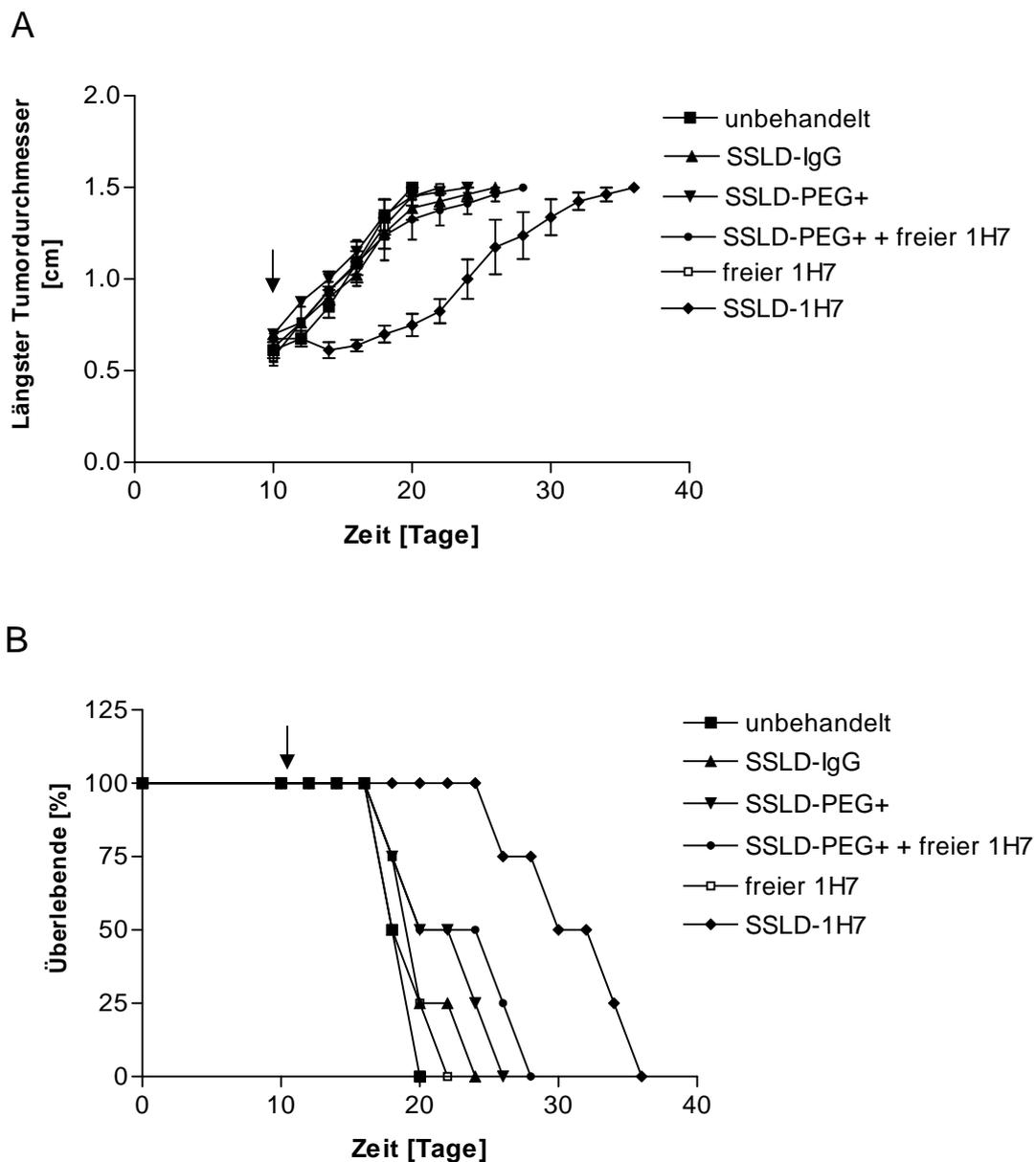


Abbildung 3-21: Effekte auf Tumordurchmesser von BON-Xenografts in NMRI nu/nu Mäusen (A) und Überlebenskurve (B) der Tiere ($n=4$) nach einmaliger Behandlung mit verschiedenen Präparationen. Freier 1H7: freier IGF1-R blockierender AK; SSLD-IgG: IgG-

gekoppelte Liposomen; SSLD-PEG+: nicht-AK-gekoppelte Liposomen; SSLD-1H7: 1H7-gekoppelte Liposomen.

Verwendet wurden hierbei die auf Caelyx[®] (SSLD) basierenden Präparationen, die in den Vorversuchen die besseren Ergebnisse für Blut-Stabilität und DXR Akkumulation im Tumor gezeigt hatten (3.2.2.3). Die Tiere wurden einmal mit 10 mg liposomal verkapseltem DXR/kg Körpergewicht jeder Präparation behandelt, nachdem die Tumore eine Größe von 0,5-0,7 cm erreicht hatten. Diese therapeutischen Untersuchungen demonstrierten die Überlegenheit der neuen SSLD-1H7 Liposomen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen genauso wie gegenüber SSLD-PEG+, SSLD-IgG, freiem 1H7 und der kombinierten Gabe von SSLD-PEG+ und freiem 1H7. Eine einmalige Behandlung mit SSLD-1H7 führte zu einer deutlichen Verzögerung des Tumorwachstums. Demzufolge waren, bei dem gewählten Versuchsdesign mit Mäusen mit großen BON Tumoren, auch signifikante Effekte auf die Mittlere Überlebenszeit (Tagen) schon nach einer einmaligen Behandlung mit den neuen anti-IGF1-R-Ak gekoppelten Immunoliposomen SSLD-1H7 ($31,5 \pm 2,2$) verglichen mit unbehandelten Kontrollen ($19 \pm 0,6$, $p = 0,008$) und ebenfalls im Vergleich zu allen anderen Behandlungen (freier 1H7, $20 \pm 0,8$; $p = 0,007$; SSLD-IgG, $20 \pm 1,4$; $p = 0,006$; SSLD-PEG+, $22 \pm 1,8$; $p = 0,02$; SSLD-PEG+ plus freier 1H7, $23 \pm 2,4$; $p = 0,03$; Abb.: 3-21 B und Tabelle 3-2), nachweisbar.

	Mittlere Überlebenszeit [Tage]	Erhöhung der Lebenszeit [%]	Signifikanz gegenüber Kontrollen	Signifikanz gegenüber SSLD-1H7
unbehandelt	$19 \pm 0,6$			0,008
freier 1H7	$20 \pm 0,8$	5,3	NS	0,007
SSLD-IgG	$20 \pm 1,4$	5,3	NS	0,006
SSLD-PEG+	$22 \pm 1,8$	15,8	NS	0,02
SSLD-PEG+ & 1H7	$23 \pm 2,4$	21,1	NS	0,03
SSLD-1H7	$31,5 \pm 2,2$	65,8	0,008	

Tabelle 3-2: Effekte auf die mittlere Überlebenszeit und Erhöhung der Lebenszeit nach therapeutischen Experimenten mit verschiedenen liposomalen Präparationen ($n = 4$). Erhöhung der Lebenszeit = (Mittlere Überlebenszeit behandelter Tiere / Mittlere Überlebenszeit unbehandelter Tiere x 100) - 100; NS = nicht signifikant ($p > 0,05$).

Hieraus hätte sich nach Behandlung mit SSLD-1H7 eine signifikante Erhöhung der Lebenszeit von 65,8% abgezeichnet, während für SSLD-PEG+ (15,8%) und die kombinierte Gabe von SSLD-PEG+ und freiem 1H7 eine tendenzielle Erhöhung mittlerer Überlebenszeit und Lebenszeitverlängerung im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden konnte (21,1%).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl endokrine Tumormodelle in der Maus etabliert und optimiert, als auch neue liposomale Tumorthérapien mithilfe dieser Modelle entwickelt und getestet.

4.1 Etablierung und Optimierung von Tumormodellen

4.1.1 Kolon Karzinom Modell inklusive hepatischer Metastasierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst ein nicht-endokrines Tumormodell zur allgemeinen Untersuchung anti-tunoraler Substanzen etabliert und zur Erstellung hepatischer Metastasierungsmodelle optimiert werden. Die Tumorentwicklung entsprach dabei den in der Literatur beschriebenen kurzen zeitlichen Verläufen [116]. Neben dem zeitlichen Aspekt bietet dieses Modell den Vorteil der guten Handhabbarkeit des Zellvolumens, da hier im Vergleich zu anderen Modellen eine relativ geringe Zellzahl für die Tumorinduktion ausreichend ist. Da die etablierten Tumormodelle in erster Linie der Untersuchung neuer, Doxorubicin enthaltender, liposomaler Präparationen dienen sollten, wurde überdies die Doxorubicin-Sensitivität der eingesetzten Zelllinien überprüft. Für die verwendeten murinen C26-Zellen war im BrdU-Proliferations-Assay ein starkes Ansprechen auf Doxorubicin detektierbar (3.1.1). Zudem wurde das C26-Modell, wie schon zuvor in der Literatur beschrieben [117-119], zur methodischen Etablierung einer hepatischen Lebermetastasierungsroute herangezogen. 9 Tage nach Tumorzellinjektion in die Milz, konnte eine ausgeprägte hepatische Metastasierung in der Leber behandelter Mäuse nachgewiesen werden. Die Methode konnte demzufolge erfolgreich angewendet werden und steht unserer Arbeitsgruppe nun auch für die Entwicklung neuer Metastasierungsmodelle zur Verfügung.

4.1.2 Mausmodelle für neuroendokrine Tumoren (NET bzw. GEP-NET)

Wie für das BON-Modell in der Literatur [35] und unter 3.1.2 beschrieben, führt die subkutane Inokulation Zellen der Tumorzelllinie BON zu 100% zur Bildung von Tumoren in athymischen Nacktmäusen. Die BON-Zellen erwiesen sich zudem im BrdU-Assay als Doxorubicin-sensitiv, ein wichtiges Charakteristikum für den späteren Einsatz zur Untersuchung einer Anti-IGF1-R/Doxorubicin-Kombinationstherapie (3.2.2.1). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Tumorinduktion über eine Injektion von 15 Millionen Zellen und

resultierte in zügigem, sehr zuverlässigem und gut reproduzierbarem Tumorwachstum. In der Literatur ist für den therapeutischen Einsatz ohne die Verwendung besonderer bildgebender Verfahren in der Regel ein methodisch kompliziertes Vorgehen über eine Injektion von 10 Millionen BON-Zellen, Wachstum über 6 Wochen, Tumorentnahme und Aufteilung, sowie nachfolgender Reimplantation in Mäuse, gefolgt von einer erneuten Phase des Anwachsens, beschrieben [33, 35, 122, 123]. Evers et al. nennen ansonsten als charakteristische Wachstumszeit der Zelllinie BON in athymischen Nacktmäusen nach Injektionen von 10 bzw. 20 Millionen Zellen einen Zeitraum von 10 bzw. 7 Tagen bis zum ersten Sichtbarwerden der Xenografts [35]. Im Rahmen dieser Arbeit waren in der Regel 5 Tage nach einmaliger subkutaner Tumorzellinjektion schon BON-Tumore einer Größe von 0,3-0,5 cm detektierbar. Diese Verbesserung, hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der Tumorentwicklung, war dabei in erster Linie auf die Optimierung des methodischen Vorgehens, wie z.B. zügigeres und schonenderes Vorbereiten der Zellen und schnellere Tumorzellinjektion, zurückzuführen.

Laut Literatur stehen als gut reproduzierbare *in vivo* Modelle neuroendokriner Tumoren nur Xenograft-Modelle mit subkutaner Tumorinduktion zur Verfügung [30, 124-126]. Dieses Vorgehen erleichtert zwar die Quantifizierung der Tumorentwicklung, vernachlässigt aber die pathophysiologische Relevanz der Tumornische. Eine einzelne Studie beschreibt die hepatische Metastasierung von BON-Tumorzellen nach intralienaler Injektion [127]. Für einen effizienten Einsatz pathophysiologisch relevanter Tumormodelle sind allerdings geeignete bildgebende Verfahren unerlässlich, die eine kontrollierte Quantifizierung der Tumormasse in der lebenden Maus erlauben. Das bereits etablierte BON-Tumormodell wurde daher herangezogen, um in einem ersten Schritt existierende Bildgebungsverfahren auf ihre Einsetzbarkeit zu testen. Hierfür wurden BON-Tumor tragende Mäuse zunächst in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Tumor Perfusion mithilfe von Computer Tomographie (CT) dargestellt (3.1.5). Die PET-Aufnahmen wurden durch Frau Dr. Mustafa (Nuklearmedizin der Medizinischen Klinik Innenstadt, München), die Tumor-Perfusionsmessungen von Herrn Dr. Berger (Radiologie des Klinikums Großhadern in München) durchgeführt. Für beide Verfahren war jedoch die Problematik der herkömmlichen Bildgebungen ersichtlich. Die Darstellung eines BON-Tumors durch PET war zwar erfolgreich, die erhaltenen Signale allerdings insgesamt relativ gering. Zudem ist bei der Verwendung von ^{18}F -FDG (2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-Glukose) als Marker auch immer eine gewisse Akkumulation in anderen Organen detektierbar, da es sich um einen Marker des regionalen Glucose-Stoffwechsel und nicht um einen ausschließlich tumor-spezifischen

Marker handelt. Eine solche tumor-unabhängige Akkumulation wurde auch schon beim Einsatz von ^{123}I -Metaiodobenzylguanidin (^{123}I -MIBG) in BON-Tumor tragenden Mäusen detektiert [125]. Zudem wird im letztgenannten Fall vorab eine zusätzliche Injektion von MIBG zur Verbesserung des Verhältnisses der Tumor/Nicht-Tumor-Akkumulation vorgeschlagen. Hierdurch wird die methodische Anwendbarkeit aufgrund zweimaliger Injektion bei großen Versuchsgruppen deutlich erschwert. Auch die Darstellung eines BON-Tumors in der CT-Angiographie war nicht zufrieden stellend. Die Signalintensität im Zielgewebe war sogar noch geringer und die Hintergrundaktivität im Vergleich zum PET noch mal deutlich erhöht, was eine weitere Adaption des Verfahrens für einen präklinischen Einsatz notwendig machen würde.

Aus diesen Gründen wurde an der Optimierung des beschriebenen Tumormodells zur *in vivo* Biolumineszenz gearbeitet. Zusammen mit der unter 3.1.1 beschriebenen Metastasierungsrouten soll das Verfahren zukünftig die Grundlage für die Entwicklung von Metastasierungsmodellen endokriner Tumore bilden. Leja et al. zeigten mithilfe retroviraler Transformation von BON Zellen die prinzipielle Einsetzbarkeit der *in vivo* Biolumineszenz für das BON-Tumormodell [124]. Da für diese Art der Detektion allerdings *in vitro* zeitaufwendige Vorarbeiten bis zur Standardisierung nötig sind, befinden sich solche Modelle trotz klarer Vorteile noch nicht in breitem Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl das erforderliche Expressionsplasmid kloniert (3.1.5.1), die stabile Transfektion der BON Zellen und Luciferase-Expression *in vitro* (3.1.5.2), als auch die Detektion am murinen Modell *in vivo* (3.1.5.3) erfolgreich durchgeführt werden. In den Versuchstieren waren spezifische Signale außergewöhnlich hoher Intensität ohne relevante Hintergrundaktivität detektierbar (Abb. 3-9 A). Diese Methode war demnach für das BON-Modell den weiteren verfügbaren Techniken, wie PET und CT, im Tiermodell deutlich überlegen.

4.1.3 Mausmodelle für Nebennierenrindenzinome

Es existieren zurzeit nur wenige Zelllinien, die als geeignete Modelle für das Nebennierenrindenzinom genutzt werden können. Wie schon unter 1.1 ausführlich beschrieben, wird aufgrund verschiedener tumorspezifischer Charakteristika in der Regel die Tumorzelllinie NCI-H295 als Standardmodell für Nebennierenrindenzinome zurückgegriffen [10, 16, 17]. Wie in der Literatur und unter 3.1.3 beschrieben führt die subkutane Inokulation von NCI-H295 Zellen zur Bildung von Tumoren in athymischen Nacktmäusen. Logié et al. beobachteten für die Entwicklung von NCI-H295-Xenografts eine Wachstumszeit von durchschnittlich 6,5 Wochen nach einmaliger Tumorzellinjektion von 6

Millionen Zellen an [18]. Im Rahmen dieser Arbeit waren in der Regel schon 1,5 bzw. 5 Wochen nach einmaliger subkutaner Injektion von 15 bzw. 5 Millionen NCI-H295-Zellen schon Tumore in einer Größe von 0,3 cm nachweisbar. Diese Verbesserung hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der Tumorentwicklung war dabei, wie auch schon für das BON-Modell (4.1.2) beschrieben, in erster Linie auf die Optimierung des methodischen Vorgehens, wie die Vorbereitung der Zellen und den zeitlichen Ablauf der Tumorzellinjektion, zurückzuführen. Die NCI-H295-Zellen erwiesen sich zudem im BrdU-Assay als Doxorubicin-sensitiv, ein wichtiges Charakteristikum für nachfolgende Untersuchungen der neu entwickelten Anti-IGF1-R/Doxorubicin-Kombinationstherapie gegen Nebennierenrindenzarzinome.

Pathophysiologisch relevante Tumormodelle, wie z.B. für das Phäochromozytom beschrieben, existieren für das Nebennierenrindenzarzinom bisher nicht [128]. Die Entwicklung eines hepatischen Metastasierungsmodells ist aber, wie schon für das BON-Modell beschrieben, unter entsprechenden Voraussetzungen denkbar. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit am Einsatz des NCI-H295-Tumormodells zur *in vivo* Biolumineszenz gearbeitet. Zusammen mit der unter 3.1.1 beschriebenen Metastasierungsrouten soll das Verfahren zukünftig die Grundlage für die Entwicklung eines hepatischen Metastasierungsmodells für Nebennierenrindenzarzinome bilden. Analog zum BON-Modell konnten im Rahmen dieser Arbeit neben der stabilen Transfektion der NCI-H295-Zellen und deren Luciferase-Expression *in vitro* (3.1.5.2), auch die Detektion Luciferase exprimierender NCI-H295-Xenografts am murinen Modell *in vivo* (3.1.5.3) erfolgreich durchgeführt werden. In den Versuchstieren waren spezifische Signale sehr hoher Intensität detektierbar (Abb. 3-9 B).

4.1.4 Nebennierenrindenzarzinom/GEP-NET-Modell

Für dieses Modell wurden Xenografts zweier verschiedener Tumorentitäten gleichzeitig in derselben Maus induziert (3.1.4). Damit das Wachstum mit vergleichbarer Kinetik erfolgte, wurden unterschiedliche Zellzahlen injiziert. Diese Zellzahlen basierten auf Erfahrungswerten, die mit den einzelnen Modellen erzielt worden waren. Neben den unterschiedlichen Wachstumskinetiken bestand das potentielle Risiko einer gegenseitigen Beeinflussung und Repression der beiden Inokulate. Solche Tumor-Tumorinteraktionen wurden bisher mehrfach beschrieben [129]. Beobachtete Resistenzen gegenüber einem zweiten Tumor waren hierbei in der Regel umgekehrt proportional zur Größe des zweiten Inoculums und direkt proportional zur Größe des ersten Tumors [130, 131]. Um die

Möglichkeit der Bildung eines etablierten Primärtumors weitgehend zu verhindern, wurden im Rahmen dieser Arbeit beide Xenografts gleichzeitig und mit weitgehend vergleichbarer Tumormasse, bezogen auf Zellzahl und deren Wachstumsgeschwindigkeit, induziert. Im Fall des Nebennierenrindenzellkarzinom/GEP-NET-Modells konnte so die Tumorentwicklung beider Tumorentitäten in der gleichen Maus erfolgreich erreicht werden. Dieses Modell würde sich prinzipiell für pharmakokinetische Schnelltests von Substanzen eignen, deren Wirkung auf beide Tumorarten noch gänzlich unbekannt ist.

4.2 Liposomale Therapien gegen endokrine Tumore

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung einer neuen liposomalen Therapie gegen endokrine Tumore. Hierbei wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum Einen die *in vivo* Untersuchung neu entwickelter pH-abhängig freisetzender Liposomen [62]. Die Wirkstoff-Akkumulation sollte dabei mithilfe des „passiven Tumortargetings“ liposomaler Präparationen erfolgen [46, 47], aber zusätzlich in einer gesteigerten Freisetzung des Wirkstoffs im sauren Milieu des Tumors resultieren. Der zweite Ansatz verfolgte die Entwicklung und Charakterisierung einer immunliposomalen, anti-IGF1-R gerichteten Kombinationstherapie. Eine gesteigerte therapeutische Effizienz sollte in diesem Fall auf dem zielgerichteten Transport der Liposomen an IGF1-R überexprimierendes Tumorgewebe, einer Inhibition des IGF1-R-Signalwegs an den Zielzellen und einer liposomalen Chemotherapie basieren.

4.2.1 pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen

Im Rahmen der Kooperation mit der AG Süß der Pharmazeutischen Technologie der Universität Freiburg wurden neue pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen im Hinblick auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften *in vivo* untersucht. Die Verwendung eines neuen liposomalen Beladungsverfahrens über einen Ammoniumhydrogenphosphat-Gradienten resultierte *in vitro* in einer pH-abhängigen DXR-Freisetzung [62]. Es sollte nun die Hypothese getestet werden, dass der Nachweis einer erhöhten, pH-abhängigen Freisetzung im Tumorgewebe *in vivo* eine deutliche Verbesserung der therapeutischen Effizienz zur Folge haben könnte. Die entsprechenden Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit, unter Verwendung des C26-Tumormodells vorgenommen.

4.2.1.1 Dosisfindung für pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen (SPIT)

Da die neu entwickelte liposomale Präparation im Rahmen dieser Arbeit erstmals *in vivo* untersucht wurde, existierten keinerlei Vergleichswerte für eine therapeutisch effiziente und dennoch nebenwirkungsarme Dosierung. Daher wurde zunächst eine Dosisfindung (3.2.1.1) mithilfe des C26-Tumormodells (3.1.1) durchgeführt. Hierüber sollte vorab ausgeschlossen werden, dass durch einen eventuell erhöhten Anteil freien Doxorubicins durch pH-abhängig freisetzende Liposomen, auch eine erhöhte Toxizität *in vivo* resultierte. Getestet wurden Konzentrationen die, sowohl für freies Doxorubicin (18mg/kg), als auch für liposomales

Doxorubicin (55mg/kg) deutlich unter der maximal tolerierten Dosis in Mäusen lagen [132]. Während des gesamten Versuchs konnten bei keiner der vier Konzentrationen (2,5 mg, 5mg, 8mg und 10mg verkapseltes DXR pro Kilogramm Körpergewicht) Auffälligkeiten an den Versuchstieren beobachtet werden. Obwohl mit der Behandlung erst nach Etablierung eines großen soliden Tumors begonnen wurde, konnten für die verwendeten Konzentrationen vorläufige Überlebenskurven ermittelt werden, die ersten Aufschluss auf putative, therapeutische Effektivität zuließen. Eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit war für eine Dosierung von 10mg/kg pH-abhängig freisetzender EPC/Chol-Liposomen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen und 2,5 mg/kg, sowie 5mg/kg liposomal verkapseltes Doxorubicins detektierbar. Aufgrund dieser ersten Hinweise auf Verträglichkeit und therapeutische Effizienz, wurde für die folgenden Versuche eine Wirkstoffkonzentration von 10mg/kg Körpergewicht ausgewählt.

4.2.1.2 SPIT PEGylierte vs. konventionell PEGylierte pH-abhängig freisetzende SPC/Chol-Liposomen

Da für die anstehenden pharmakokinetischen Untersuchungen die Herstellung liposomaler Präparationen in einem weitaus größeren Maßstab und mit höheren Verkapselungseffizienzen als für *in vitro* Versuche nötig wurden und sich dafür SPC/Chol-Liposomen methodisch besser eignen, als die im vorangegangenen Versuch verwendeten EPC/Chol-Liposomen, wurde als Grundsubstanz des Weiteren zur Herstellung pH-abhängig freisetzender Liposomen SPC/Chol herangezogen. Aufgrund großer struktureller Übereinstimmungen waren hinsichtlich pharmakokinetischer Untersuchungen keine großen Unterschiede zwischen beiden liposomalen Präparationen zu erwarten. Für die folgenden Untersuchungen wurden die pH-abhängig freisetzenden Liposomen allerdings zusätzlich zur Verlängerung ihrer Bluthalbwertszeit mit 5 mol% Sterol-PEG₁₃₀₀ nachträglich PEGyliert, um eine Vergleichbarkeit zu Caelyx[®] zu gewährleisten. Hierbei wurden erstmals Liposomen *in vivo* eingesetzt, die mithilfe der neuen Sterol-basierten Post-Insertionstechnik (SPIT) hergestellt worden waren (1.7). Im Vergleich zur konventionellen Kopplung kommt es dabei ausschließlich zu einer selektiven Anreicherung des PEG-Moleküls in der äußeren Liposomen-Membran. Hierbei wird ein Sterolgerüst verwendet, welches im Vergleich zur konventionellen Post-Insertionstechnik (PIT) (1.7) den Vorteil einer Einlagerung des Konjugats in die äußere Membranoberfläche bei Raumtemperatur bietet, wodurch eine eventuelle wärmeinduzierte Denaturierung eines Liganden bei der Herstellung von Immunoliposomen verhindert werden kann.

Zum Ausschluss eventueller funktioneller Auswirkungen der neu verwendeten SPIT-Technik im Vergleich zur konventionellen Kopplungstechnik, wurden DXR-Blutstabilität und Tumorakkumulation zweier Vergleichspräparationen *in vivo* ermittelt. Obwohl die Blutstabilität der konventionell PEGylierten, liposomalen Präparation sich hierbei als signifikant erhöht im Vergleich zu den SPIT-PEGylierten Liposomen herausstellte, muss festgestellt werden, dass die betrachteten Messwerte in einem sehr engen Bereich unter 1 µg/ml Blut lagen. Diese leicht erniedrigte Blutstabilität hatte keine Verminderung der DXR-Akkumulation im Tumor zur Folge. Die detektierten DXR-Werte im Tumor waren für den ersten Messpunkt (nach acht Stunden) im Vergleich zur konventionell gekoppelten Präparation sogar signifikant erhöht. Verglichen mit einer konventionellen PEGylierung waren demnach keine Nachteile der SPIT-Technik in Bezug auf die Tumorakkumulation erkennbar und konnte daher für die weiteren Experimente eingesetzt werden.

4.2.1.3 Organdosen für pH-abhängig freisetzende EPC/Chol-Liposomen (SPIT)

Für die weitere pharmakokinetische *in vivo* Charakterisierung der neuen pH-abhängig freisetzenden Liposomen wurde die Wirkstoff-Akkumulation im Vergleich zu freiem DXR und sterisch stabilisiertem, liposomalen DXR (Caelyx[®], SSLD) in Thymus, Lunge, Gonaden, Leber, Herz, Haut, Nebennieren, Milz, Nieren, Tumor, sowie Blut, Stuhl und Urin untersucht. Caelyx[®] zeichnet sich im Vergleich zu freiem Doxorubicin durch eine stark erhöhte Blutstabilität [51, 53], eine daraus resultierende effizientere Wirkstoffakkumulation in soliden Tumoren [54, 55] und ein reduziertes Nebenwirkungsprofil aus [46, 53]. Mit den vorgenommenen Untersuchungen sollten die pharmakokinetischen Eigenschaften der neuen liposomalen Präparation, im Vergleich zu schon im klinischen Einsatz befindlichen Substanzen, getestet werden. Die neue liposomale Präparation wies nach 8 Std. und 24 Std. signifikant erhöhte Akkumulationswerte im Vergleich zu freiem DXR auf. Hier konnte demnach durch die liposomale Verkapselung eine gesteigerte DXR-Akkumulation in den behandelten, Tumor-tragenden Mäusen erreicht werden, aus dem eine Steigerung der therapeutischen Effektivität der neuen liposomalen Präparation im Vergleich zu freiem DXR resultieren könnte. Zu allen Zeitpunkten war aber sowohl die Blutstabilität, als auch die DXR-Akkumulation in den entnommenen Tumoren, für Caelyx[®] im Vergleich zu freiem DXR, aber auch verglichen mit den neuen pH-abhängig freisetzenden Liposomen stark erhöht.

Da für die pH-abhängig freisetzenden Liposomen auch schon *in vitro* bei 37 °C für pH 7,4 eine erhöhte DXR-Freisetzung detektiert wurde (3.2.1, Abb.: 3-10), ist anzunehmen, dass die beobachteten Effekte auf eine erniedrigte Blutstabilität von SPC/Chol (SPIT) zurückzuführen

ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Präparation sehr schnelle Freisetzungsraten wie z.B. Myocet[®] aufweist und dadurch das freigesetzte DXR dann einem schnelleren Abbau unterliegt, wodurch nur geringere Akkumulationsraten im Tumor erreicht werden [49]. Mayer et al. untersuchten ausführlich die Auswirkungen der Liposomen-Stabilität auf die akute Toxizität liposomaler Präparationen und stellten fest, dass erhöhte Freisetzungsraten eng mit einer Abnahme des Cholesterolgehalts liposomaler Kompositionen korreliert. Hierbei entsprach die Blutstabilität und das Nebenwirkungsprofil cholesterolfreier Liposomen nahezu dem freien Doxorubicin [133]. Da es sich bei den eingesetzten Liposomen aber um SPC/Chol, also um cholesterolhaltene Liposomen handelte, erklärt dies allein nicht die vermutete schlechtere Stabilität. Hingegen können auch andere Faktoren, wie Liposomenladung oder Doppelschicht-Fluidität, die auf unterschiedlichen Lipid-Kompositionen basieren, sowie die Wahl des Beladungsverfahrens oder die Art der PEGylierung deutlichen Einfluss auf die pharmakokinetischen und therapeutischen Charakteristika liposomaler Präparationen haben [40]. Da die gleiche Art der PEGylierung aber, zusammen mit dieser anderen liposomalen Grundsubstanz, keine vergleichbar hohen Effekte auf die Blutstabilität zeigt, ist auch diese als Ursache eher auszuschließen. Um näheren Aufschluss über den ausschlaggebenden Mechanismus der geringeren liposomalen Stabilität zu erhalten, wären an dieser Stelle weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die neuen pH-abhängigen Liposomen, als auch die Anwendung der neuen SPIT-Technik erstmals im Rahmen der beschriebenen Versuche *in vivo* untersucht werden konnten. Nach diesen Experimenten zeichnet sich ab, dass ein Einsatz der neuen pH-abhängig freisetzen Liposomen, in therapeutischen Studien Vorteile gegenüber freiem DXR aufweisen könnte, aber vermutlich nicht in einer gesteigerten therapeutischen Effektivität verglichen mit Caelyx[®] resultieren würde. Da zudem zwar die DXR-Akkumulation in Niere, Lunge und Gonaden im Vergleich zu Caelyx[®] leicht erniedrigt war, diese Unterschiede aber in Relation zu den unterschiedlichen Tumorakkumulationen relativ gering ausfielen, ist auch nicht mit einer deutlichen Verbesserung des Nebenwirkungsprofils zu rechnen. Vielmehr könnte ein erhöhter Anteil freien Doxorubicins im Organismus auch eine erhöhte Toxizität zur Folge haben [49]. Aus diesen Gründen wurde auf die Durchführung einer weitergehenden therapeutischen Studie verzichtet.

4.2.2 Der IGF1-Rezeptor als therapeutisches Target

Das IGF-System und speziell die Überexpression des IGF1-Rezeptors spielen eine wichtige Rolle für die Tumorgenese, Tumorzellproliferation und Metastasierung einer Vielzahl menschlicher Tumoren [91-97, 134, 135]. Folgerichtig sind in den letzten Jahren verschiedene therapeutische Strategien entwickelt worden, die auf den IGF1-Rezeptor als Zielstruktur abzielen. Hierzu gehören neben monoklonalen Antikörpern [88], Tyrosinkinase-Inhibitoren [106-108] und antisense RNA [95, 105] auch dominant negative IGF-1R Genvarianten und Peptid Aptamere [104], von denen einige mit vielversprechenden Ergebnissen in präklinischen und frühen klinischen Studien getestet werden.

Endokrine Tumoren können beispielhaft als Tumorentitäten angeführt werden, bei denen IGF1-R abhängige Signalwege, einschließlich PI(3)K-Akt-mTOR, eine signifikante Rolle bei der Tumorentwicklung spielen. Dieses spiegelt sich in der hohen Forschungsaktivität auf diesem Gebiet in den vergangenen Jahren wieder [98, 102, 103, 136-139]. Um eine potentielle Anwendbarkeit anti-IGF1-R gerichteter Tumorthérapien gegen neuroendokrine Tumore zu testen, wurde im Rahmen dieser Arbeit initial der IGF1-R Expressionsstatus in humanen GEP-NET Gewebeproben untersucht (3.2.2). Dieses erfolgte über die immunhistochemische Aufarbeitung eines GEP-NET-Gewebe-Arrays im Vergleich zu anderen menschlichen Gewebeproben (Niere, Leber, Milz, Pankreas, Dünndarm und Lunge). In diesen Untersuchungen konnte in allen Tumorproben eine deutliche Überexpression des IGF1-R im Vergleich zum Kontrollgewebe detektiert werden. IGF1-R-Überexpression scheint demnach ein gemeinsames Merkmal dieser ansonsten sehr heterogenen Tumorentität darzustellen. Der IGF1-R könnte damit potentiell als gemeinsame therapeutische Zielstruktur für die Behandlung von GEP-NETs genutzt werden.

4.2.2.1 IGF1-Rezeptor-Inhibition und Doxorubicin als Kombinationstherapie gegen GEP-NETs

Obwohl eine therapeutische Aktivität anti-IGF1-R gerichteter Substanzen gegen verschiedene Tumorarten nachgewiesen werden konnte, ist insgesamt unklar, ob die Blockierung dieser Signalkaskaden allein ausreicht, eine therapeutisch relevante Wirkung zu induzieren. Um die therapeutische Effizienz zu steigern, wurden in der Vergangenheit IGF1-R abhängige Wirkprinzipien daher mit zytostatischen Substanzen kombiniert, wodurch eine Zunahme der anti-tumoralen Effekte erreicht werden konnte [108-110]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in*

in vitro Experimente mit einem monoklonalen IGF1-R blockierenden Antikörper (1H7), DXR oder der Kombination beider Komponenten an humanen neuroendokrinen BON Tumorzellen durchgeführt. Untersucht wurden die resultierenden Effekte auf Zellproliferation, Vitalität und Apoptoseinduktion. In diesen Experimenten konnte eine Reduktion der Zellproliferation und eine leichte Abnahme der Zellvitalität in Kombination mit einem Anstieg der Caspase Aktivität nach 1H7-Behandlung nachgewiesen werden. Ähnliche Effekte waren nach Inkubation mit DXR feststellbar, welches eine signifikante Inhibition der Proliferation, sowie eine signifikante Abnahme der Vitalität und Apoptosezunahme in BON Zellen induzierte. Jedoch blieben synergistische Effekte, wie für andere Tumorzelllinien beschrieben, bei kombinierter Behandlung mit beiden Substanzen, aus. Dieses deutete darauf hin, dass für das untersuchte Tumormodell eine deutliche Steigerung der therapeutischen Aktivität anti-IGF1-R gerichteter Tumorthérapien allein durch eine kombinierte Gabe mit DXR nicht zu erwarten wäre. Da die einzelnen Komponenten aber deutliche anti-tumorale Effekte aufzeigten, wurde eine neue liposomale Wirkstoffkombination entwickelt, die die kombinatorischen Effekte der freien Substanzen übertreffen sollte.

4.2.2.2 Zelluläre Interaktion von anti-IGF1-R-AK gekoppelten Immunoliposomen mit humanen Tumorzellen *in vitro*

Obwohl es sich bei freiem DXR um ein potentes und klinisch vielfach eingesetztes Zytostatikum handelt, weist es den Nachteil eines hohen Verteilungsvolumens im Organismus auf. Damit assoziiert sind starke Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität und Myelosuppression [140]. Die Verkapselung von Zytostatika in Liposomen führt zu einer stark veränderten Verteilung im Körper. Ausschlaggebend für die Verteilung von Liposomen sind die Beschaffenheit des Blutgefäßendothels und die Liposomengröße. Die Größe der Liposomen führt dazu, dass diese nicht mehr das kontinuierliche Gefäßendothel gesunden Gewebes passieren können. Liposomales DXR akkumuliert durch lückenhaftes Gefäßendothel dennoch im Tumor und gleichzeitig kommt es zu einer reduzierten Anreicherung der Substanz im Herzen und anderen Geweben verglichen mit freiem DXR. Durch die PEGylierung von Liposomen kann zudem eine deutliche Erhöhung der Blutzirkulationszeit erreicht werden [40, 46, 51, 52, 56]. Die reduzierte Organaufnahme, zusammen mit einer erhöhten Akkumulation liposomal verkapselter Substanzen in soliden Tumoren, wird als erhöhter Permeabilitäts- und Retentionseffekt (*enhanced permeability and retention* EPR) von Liposomen bezeichnet [141-143]. Insgesamt weisen PEGylierte liposomale Präparationen verlangsamte und dosisunabhängige Abbaukinetiken im Blut und erhöhte therapeutische Effizienzen auf [51,

56-58]. Um die Vorteile liposomalen Doxorubicins und einer anti-IGF1-R gerichteten Therapien miteinander zu kombinieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der AG Süss der Pharmazeutischen Technologie der Universität Freiburg neue therapeutische Präparationen entwickelt. Als Grundsubstanz für die ersten *in vitro* Experimente wurde liposomales DXR auf SPC/Chol-Basis verwendet. Dieses bietet den Vorteil eines fluoreszenzmikroskopischen Nachweises durch den Einbau Rhodamin-PE-markierter Lipide. Kommerziell erhältliches, sterisch stabilisiertes, liposomales DXR auf HSPC/Chol Basis (SSLD, Caelyx) kann zwar, wie in den weiteren Versuchen nachgewiesen (3.2.2.3, 3.2.24), durchaus effizient post-PEGyliert werden, eine nachträgliche Modifikation zur fluoreszenzmikroskopischen Bildgebung ist aber nicht möglich.

Zunächst konnte so das erfolgreiche IGF1-R targeting *in vitro* mittels Durchflusszytometrie an humanen neuroendokrinen Tumorzellen nachgewiesen werden (3.2.2.2). Die Kopplung von 1H7 Antikörpern an die Oberfläche von SPC/Chol-Liposomen erhöhte signifikant die zelluläre Assoziation der Liposomen mit neuroendokrinen Tumorzellen, während keine Assoziation für ungekoppelte oder unspezifisch-gekoppelte Liposomen feststellbar war (3-17 A). Besonders hervorzuheben ist hierbei die hohe Differenz zwischen den detektierten 37°C und 4°C Werten 1H7-gekoppelter Liposomen. Da aktive metabolische Prozesse nicht bei 4°C ablaufen können, spiegeln diese Werte ausschließlich assoziative Prozesse an der Zelloberfläche wieder. 37°C Werte hingegen stehen für die Kombination aus zellulärer Assoziation und aktiven Aufnahmeprozessen. Eine hohe Differenz zwischen diesen Werten deutet demnach auf eine aktive Aufnahme 1H7-gekoppelter Liposomen in die Zielzellen hin [144], was durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zusätzlich bestätigt werden konnte (Abb.: 3-17 B). Hierbei handelt es sich um ein außergewöhnliches Phänomen und deutet auf einen Aufnahmemechanismus hin, der schon allein, ohne die zusätzliche therapeutische Komponente der IGF1-Rezeptor-Blockade, eine starke Erhöhung der therapeutischen Effektivität der neu entwickelten Substanz zur Folge haben könnte. Bisher wurden nur wenige signal-gekoppelte liposomale Präparationen beschrieben, bei denen eine Internalisierung in die Zielzellen beobachtet werden konnte. Für Folat-gekoppelte Liposomen wurde die Internalisierung in murine, Folat-Rezeptor überexprimierende Lungenkarzinomzellen nachgewiesen [145]. Für Anti-HER2-Immunoliposomen, bei denen Antikörper-Fragmente gekoppelt wurden für die als Zielstruktur p185^{HER2} Rezeptor-Tyrosinkinase fungiert, konnte die Internalisierung in HER2 überexprimierende Brustkrebs Zellen beschrieben werden [85, 86]. Ein anderes Beispiel ist die Kopplung des monoklonalen

2C5 Antikörpers, der an die Tumorzelloberfläche gebundene Nukleosomen bindet, wodurch die liposomale Präparation von verschiedenen Tumorzelllinien für Kolon, Prostata, Lunge und Brustkrebs internalisiert wird [144]. Die Behandlung mit diesen Präparationen resultierte in erhöhten zytotoxischen Effekten, reduzierten Resistenzen im Vergleich mit freiem DXR, sowie gesteigerten therapeutischen Effizienzen *in vivo*. Hierbei wird angenommen, dass es sich bei der Aufnahme der Liposomen mittels Endozytose und der anschließenden effektiveren Freisetzung des Wirkstoffs in der Zielzelle um eine alternative Route handelt, über die außerdem ein P-Glykoprotein-vermittelter Efflux umgangen werden kann [145, 146]. Zudem könnte eine hohe Internalisierungsrate von Rezeptor-Liposomen-Komplexen zu einer Reduktion des membranständigen IGF1-R-Anteils und damit einer zu einer Einschränkung des IGF1-R-Signalweges in den betroffenen Tumorzellen führen [147].

Nach diesen vielversprechenden *in vitro* Ergebnissen an humanen neuroendokrinen Tumorzellen wurde die zelluläre Assoziation der neuen liposomalen Präparation auch an anderen menschlichen Zelllinien untersucht. Durchflusszytometrische Analysen ergaben für die bisher untersuchten Zelllinien Kelly (Neuroblastom), MCF7 (Brustkrebs) und DU-145 (Prostatakarzinom) ebenfalls hohe zelluläre Assoziationen 1H7-gekoppelter Liposomen im Vergleich zu nicht-gekoppelten oder IgG-gekoppelten Liposomen. Diese Bindungsaffinitäten waren mit den zuvor für BON-Zellen nachgewiesenen vergleichbar. Zudem deuteten die Ergebnisse auch für diese humanen Tumorzelllinien auf eine Internalisierung 1H7-gekoppelter Liposomen hin (Abb.: 3-18), was für Kelly und MCF7-Zellen bisher auch fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Analysen, zusammen mit einer hohen IGF1-R-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten [91, 148-151] sprechen für eine potentiell breite Einsetzbarkeit der neu entwickelten Präparation für verschiedene Tumorarten.

4.2.2.3 Pharmakokinetik 1H7 gekoppelter Liposomen

Basierend auf diesen Versuchen wurden 1H7-gekoppelte liposomale Präparationen in BON Xenografts *in vivo* auf ihre Stabilität im Blut und Anreicherung in verschiedenen Geweben untersucht (3.2.2.3). Obwohl die therapeutische Effizienz liposomaler Präparationen nicht allein auf der Blutzirkulationszeit und DXR-Akkumulation basiert, handelt es sich dennoch um zwei wichtige pharmakologische Charakteristika. Aus diesem Grund wurden als basale Substanzen entweder PEGyliertes liposomales DXR auf SPC/Chol-Basis oder kommerziell erhältliches, sterisch stabilisiertes, liposomales DXR auf HSPC/Chol Basis (SSLD, Caelyx[®])

verwendet. Letzteres verfügt nachgewiesenermaßen im Vergleich zu freiem, aber auch konventionell verkapseltem liposomalem DXR, über eine stark erhöhte Blutstabilität und deutlich erhöhte Wirkstoff-Akkumulation im Tumor [51, 56].

Insgesamt konnten acht Stunden nach Verabreichung beider liposomaler Grundsubstanzen, in gekoppelter oder nicht-gekoppelter Form, deutliche Unterschiede im DXR-Gehalt von Blut und Tumor festgestellt werden. Nach Gabe der liposomalen Substanzen ließen sich in Blut- und Tumorproben bei Verwendung beider Grundsubstanzen Unterschiede auf Basis des detektierten Doxorubicins zwischen den unterschiedlich gekoppelten Präparationen finden. Für SPC/Chol-basierte Liposomen wurde sowohl eine signifikante Reduktion in der Blutstabilität der gekoppelten Präparationen festgestellt, als auch eine signifikante Differenz in der DXR-Akkumulation IgG-gekoppelter Liposomen im Vergleich zu SPC/Chol/NHS-1H7. SSLD-Liposomen auf HSPC/Chol Basis (Caelyx[®]) zeigten ebenfalls eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Erniedrigung in der Blutstabilität verglichen mit der Grundsubstanz. Für die DXR-Akkumulation im Tumor waren sowohl für SSLD-IgG, als auch für SSLD-1H7 signifikante Abnahmen im Vergleich zu SSLD-PEG+ erkennbar. Die erniedrigten DXR-Blutwerte für die Antikörper-gekoppelten Präparationen sind vermutlich auf die schon mehrfach beschriebene erhöhte Immunogenität von Immunliposomen und folgender Aktivierung des unspezifischen Immunsystems zurückzuführen [47, 79, 152, 153]. Da es sich bei der neuen liposomalen Präparation aber um eine Substanz mit verschiedenen Wirkmechanismen handelt, deren therapeutische Effektivität allein über eine pharmakokinetische Studie nicht ermittelbar waren, blieben therapeutische Experimente für eine finale Bewertung der neuen Substanz abzuwarten. Bemerkenswert war allerdings in beiden Experimenten eine signifikant erhöhte DXR-Akkumulation in Tumoren 1H7-liposomal behandelte Mäuse verglichen mit IgG-Liposomen. Dieser Effekt konnte, wie zuvor beschrieben, nicht auf Unterschiede in den Blutwerten der gekoppelten Präparationen zurückgeführt werden, sondern ließ vielmehr auch *in vivo* auf ein funktionell relevantes aktives Targeting des Tumorgewebes schließen. Insgesamt zeichneten sich überdies die SSLD-basierten Präparationen auch schon nach acht Stunden im Vergleich zu den SPC/Chol-Liposomen durch eine deutlich höhere Blutstabilität und daraus resultierende erhöhte DXR-Akkumulationswerte im Tumor aus.

Sowohl für SPC/Chol-basierte, als auch HSPC/Chol-basierte Liposomen wurden die Doxorubicin-Mengen in Leber, Milz, Nebennieren und Gonaden untersucht. Leber und Milz

gehören zu den klassischerweise untersuchten Geweben, da es hier immer zu einer gewissen Wirkstoffakkumulation freien und liposomalen Doxorubicins kommt [44, 116]. Für die Akkumulation in der Leber und der sehr geringen Anreicherung in den Gonaden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Präparationen detektiert werden. Bisher wurden für sterisch, stabilisiertes, liposomales Doxorubicin, trotz beobachteter Wirkstoff-Akkumulation in der Leber, bei den klinisch eingesetzten Konzentrationen keinerlei Nebenwirkungen beschrieben. Für sterisch stabilisiertes liposomales Doxorubicin konnte zudem nach Mehrfachgabe trotz einer signifikanten Erhöhung der Plasma-Halbwertszeit und Tumoranreicherung, eine Reduktion der Wirkstoff-Akkumulation in Leber und Milz über die Zeit beobachtet werden [154]. Als Dosis limitierende Nebenwirkung bei der Verwendung von Caelyx[®] ist das Palmar-Plantar Erythrodysesthesia- Syndrom zu nennen. Beim Auftreten dieser Nebenwirkung wird in der Regel eine Dosisreduktion eingeführt, trotz derer eine hohe antitumorale Effizienz im Vergleich zu Standard-Chemotherapien erhalten bleibt [40]. Da es sich bei den für SSLD-1H7 beobachteten Effekten nicht um signifikant erhöhte Effekte im Vergleich zur basalen liposomalen Präparation handelt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht von einer Veränderung des zytotoxischen Nebenwirkungsprofils an hepatischem Gewebe auszugehen. Allerdings können hierbei Effekte, die auf den verwendeten Antikörper zurückzuführen wären, nicht mit ausgewertet werden, da diese mit den beschriebenen pharmakokinetischen Experimenten nicht detektiert werden können. Hierfür müssen noch weitergehende immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

In der Milz waren für HSPC/Chol-Liposomen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen getesteten Präparationen erkennbar. Dieses unterschied sich stark von denen für SPC/Chol/NHS-1H7 beobachteten Effekten. Hier war eine außergewöhnlich hohe Wirkstoff-Akkumulation verglichen mit ungekoppelten und unspezifisch-gekoppelten Liposomen zu beobachten, die toxische Auswirkungen auf die Milz zur Folge haben könnte. Eine hohe Anreicherung war für SSLD-PEG+ in den Nebennieren im Vergleich zu SSLD-IgG und SSLD-1H7 zu beobachten. Hierbei war aber eine hohe Varianz in den Messwerten feststellbar, so dass hier eine Wiederholung der Untersuchung unter Einschluss einer größeren Gruppengröße näheren Aufschluss über das beobachtete Phänomen geben müsste. Vor allem muss dabei berücksichtigt werden, dass eine solche Anreicherung nicht bei den mit Caelyx[®] behandelten Tieren in Versuch 3.2.1.3 erkennbar war. Es könnte sich zwar durchaus um ein Mausstamm-spezifisches Phänomen handeln, ein methodischer Fehler müsste aber mit einer weitergehenden Studie an größeren Versuchsgruppen ausgeschlossen werden.

Aufgrund der erniedrigten Blut- und Tumorwerte für die SPC/Chol- basierten Präparationen im Vergleich zu SSLD-Liposomen und der zusätzlich sehr hohen Wirkstoffakkumulation in der Milz wurden in der nachfolgenden therapeutischen Studie ausschließlich Liposomen auf SSLD-Basis eingesetzt.

4.2.2.4 Therapeutische Wirksamkeit von anti-IGF1-R-AK-gekoppelten Immunliposomen gegen humane BON Tumor Xenografts

Die Überlegenheit der neuen liposomalen Präparation war in einer therapeutischen Studie im gleichen Tumormodell deutlich erkennbar und resultierte in einer deutlichen Retardierung des Tumorwachstums und einer Verlängerung der Überlebenszeit um knapp 66% im Vergleich zu den Kontrolltieren (3.2.2.4). Keine signifikanten therapeutischen Effekte waren hingegen für die einzelnen Substanzen SSLD-PEG+, SSLD-IgG, den freien Antikörper und auch für die kombinierte Behandlung erkennbar. Hierfür sind verschiedene Erklärungsansätze denkbar: Einmal könnte eine geringere Stabilität des freien Antikörpers im Blut, im Vergleich zu an sterisch, stabilisierte Liposomen gekoppelten Antikörper, eventuelle therapeutische Effekte maskiert haben, die *in vitro* am gleichen Tumormodell nachgewiesen werden konnten. Dieser Effekt könnte zudem noch durch das experimentelle Design mit großen etablierten Tumoren und einer einmaligen Substanzinjektion für den freien Antikörper unterstützt und das Ausbleiben einer therapeutischen Effektivität der liposomalen Präparationen ausschlaggebend sein [155]. Huang et al. untersuchten diese Abhängigkeiten ausführlich an C26-Tumor tragenden Mäusen und konnten hierbei ebenfalls nur geringe therapeutische Effekte mit sterisch, stabilisiertem, liposomalem Doxorubicin erreichen, obwohl eine Behandlung sogar schon ab Tag 1 nach Tumor-Inokulation erfolgte. Eine deutliche Erhöhung anti-tumoraler Effekte konnte erst nach Mehrfachgaben beginnend ab Tag 1 beobachtet werden [116]. So wären therapeutische Effekte auch im BON-Tumormodell nach Mehrfachgabe mit kurzen zeitlichen Intervallen, wie auch für andere Studien beschrieben, denkbar [67]. Demzufolge spricht das beobachtete Ergebnis eher für potente therapeutische Effekte der neuen liposomalen Präparation, als für das Versagen klassischen liposomalen Doxorubicins im gewählten Tumormodell. Für diese Erklärungen spricht auch, dass für die kombinierte Gabe der Einzelsubstanzen durchaus leichte, wenn auch keine signifikanten anti-tumoralen Effekte, beobachtet werden konnten.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass im Rahmen dieser Arbeit eine neue effiziente liposomale Therapie entwickelt werden konnte, deren Wirkungsweise auf distinkten

pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften, verglichen mit den Einzelsubstanzen und deren Kombination, basiert. Nach den bisherigen Untersuchungen deutet vieles auf folgenden Wirkmechanismus hin:

Nach Bindung der Liposomen über 1H7 an den IGF1-R erfolgt ausschließlich für SSLD-1H7 die Internalisierung in die Zielzellen, was in einer effizienteren Aufnahme des Wirkstoffs mittels Endozytose, verglichen mit ungekoppelten oder unspezifisch-gekoppelten Liposomen, resultiert (Abb.:4-1). Die Wirkstofffreisetzung über die schon unter 4.2.2.2 detaillierter diskutierte Route könnte erhöhte therapeutische Effizienzen, sowie die Umgehung eines P-Glykoprotein vermittelten Effluxes zur Folge haben [144, 146, 156]. Gerade für die getestete Tumorentität könnte Verminderung der Resistenz eine wichtige Rolle spielen, da GEP-NETs sich oft durch eine ausgeprägte Chemoresistenz auszeichnen [36, 37, 39]. Wie die Freisetzung von Doxorubicin dabei in den Zielzellen initiiert wird, ist bisher noch unklar. Eine enzymatische Aktivität cytoplasmatischer Phospholipasen wird diskutiert [145].

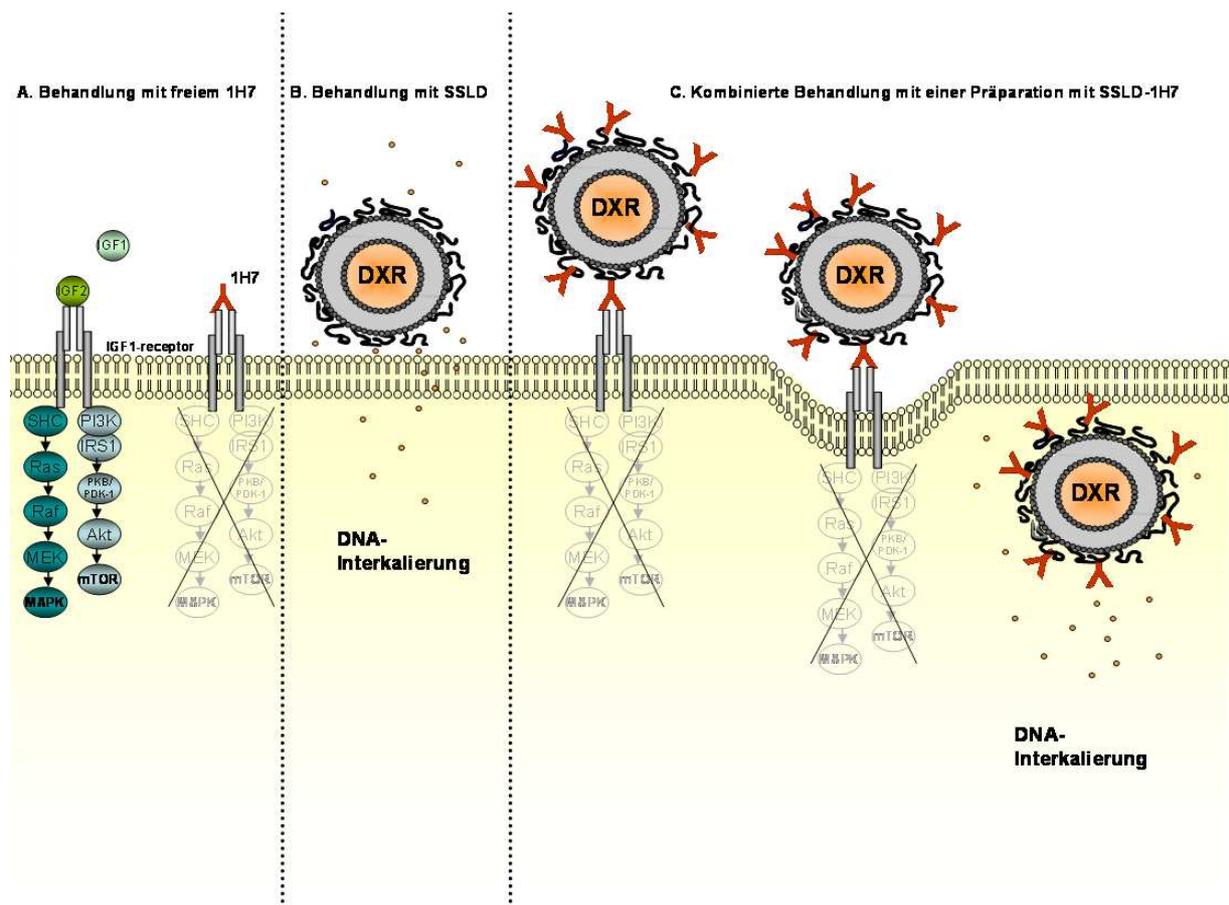


Abbildung 4-1: Putatives Modell der therapeutischen Wirkmechanismen:

A Die Inhibition IGF1-R abhängiger Signalwege mit einem inhibitorischen Antikörper führt *in vivo* in einer kurzzeitigen Blockierung der Adhäsion, Migration und Mitogenese, sowie zur Apoptose-Induktion in den Zielzellen.

B PEGyliertes liposomales Doxorubicin (DXR) akkumuliert im Tumorgewebe. Hier wird DXR aus den Liposomen freigesetzt und teilweise von den Tumorzellen aufgenommen, was in einer Inhibition der Replikation und Transkription durch Interkalation mit der zellulären DNA resultiert.

C Die kombinierte liposomale Präparation resultiert in synergistischen anti-tumoralen Effekten durch liposomale Internalisierung und damit einhergehender Inhibition IGF1-R abhängiger Signalwege. Zusätzliche Mechanismen wie eine Erhöhung der Blutstabilität des gekoppelten Antikörpers durch Kopplung an die liposomale Präparation sind im Vergleich mit dem freien Antikörper möglich. Zusätzlich kann eine Erniedrigung in der IGF1-R Präsentation an der Zelloberfläche nach Rezeptor-Internalisierung zu der beobachteten starken therapeutischen Effizienz beitragen.

Nach Internalisierung der Rezeptor-Liposomen-Komplexe ist überdies eine Reduktion in der Anzahl präsentierter IGF1-R-Moleküle denkbar, was eine weitere Erhöhung anti-tumoraler Effekte zur Folge haben könnte. Darüber hinaus ist eine Erhöhung DXR abhängiger Effekte auch *in vivo* durch eine zusätzliche Inhibition IGF1-R abhängiger Signalwege möglich. Im Fall der SSLD-1H7 Liposomen können dabei alle therapeutischen Komponenten an derselben Zielzelle wirken. Dieses ist für die einzelnen Substanzen nicht möglich und auch bei einer kombinierten Gabe relativ unwahrscheinlich, da Blutstabilität und Gewebeverteilung der einzelnen Substanzen sehr unterschiedlich sind.

5 Ausblick

Die hier präsentierten pharmakokinetischen und therapeutischen Daten der im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten, anti-IGF1-R gerichteten, liposomalen Tumortherapie zeigen deutlich die Überlegenheit der gekoppelten Präparation verglichen mit den Einzelsubstanzen und einer kombinatorischen Gabe. Die Aufklärung des exakten Aufnahme- und Wirkmechanismus wird nach diesen vielversprechenden Daten zukünftig detailliert angegangen. Die neu entwickelte liposomale Therapie könnte sich daher in Zukunft zu einem ganz neuen Behandlungskonzept für GEP-NET Patienten entwickeln. Dieses könnte überdies erst den Anfang eines breiten Anwendungsspektrums gegen viele Tumorarten darstellen, da weiterführende Untersuchungen an Tumorzelllinien für Brustkrebs, Neuroblastom, Prostatakarzinom und Nebennierenrindenzellkarzinom ebenfalls auf eine Einsetzbarkeit hindeuten. Zudem geben publizierte Ergebnisse Hinweise auf die Existenz einer Vielzahl anderer Tumorentitäten, die eine Überexpression des IGF1-R aufweisen und daher mit der neuen Therapie ebenfalls potentiell behandelbar sein sollten. Zurzeit wird von uns die Wirkung der neuen 1H7-gekoppelten Liposomen gegen Nebennierenrindenzellkarzinome anhand des beschriebenen NCI-H295-Modells untersucht. Die beobachteten hohen zellulären Assoziationen und Internalisierungen in die Tumorzellen BON, MCF-7, Kelly und DU-145, konnten ebenfalls für NCI-H295-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte sich für diese Zelllinie zusätzlich das außergewöhnliche Phänomen einer hohen Internalisierungsrate ungekoppelter Liposomen, welches zukünftig näher untersucht werden soll. Die Aufklärung dieses Mechanismus könnte zusätzlich der Verbesserung der therapeutischen Effizienz klassischer liposomaler Präparationen dienen.

Weiterhin wurde, basierend auf den Erfahrungen mit den sich mittlerweile in standardisiertem Einsatz befindlichen zellulären Tumormodellen, die Entwicklung neuartiger patienten-individueller Tumormodelle initiiert (Daten nicht gezeigt). Durch die direkte Implantation humanen OP-Materials in athymische Nacktmäuse, wurde so erfolgreich das Wachstum patienten-individueller Xenografts in einem murinen Modell erreicht. Erste Ergebnisse deuten auf eine erfolgreiche Versorgung des Tumormaterials durch das Wirtsgewebe hin welches dabei, basierend auf ersten immunhistochemischen Untersuchungen, nicht die Charakteristika des Herkunftsgewebes verliert. Durch diese Modelle könnte zukünftig, neben der methodischen Erschließung neuer Tumortypen durch die zellulären Tumormodelle, auch die breite Heterogenität endokriner Tumore patienten-individuell bei der Wahl einer geeigneten Therapie berücksichtigt werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits beschriebene Tumormodelle endokriner Tumoren für die standardisierte Verwendung in unserer Arbeitsgruppe etabliert und darüber hinaus für die weitere Entwicklung von Metastasierungsmodellen optimiert werden. Zwei Ansätze wurden hierbei erfolgreich initiiert: Erstens wurde eine hepatische Metastasierungsrouten in einem nicht-endokrinen Tumormodell (C26-Colon-Karzinom-Modell) methodisch etabliert, welche in Zukunft auch auf die vorhandenen endokrinen Tumormodelle übertragen werden soll. Zweitens konnte sowohl das Modell für neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET), als auch das Nebennierenrindenzarzinom-Modell für eine Detektion mittels *in vivo* Biolumineszenz optimiert werden, was eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz pathophysiologisch relevanter Tumormodelle darstellt. Über die beschriebenen Modelle hinaus, konnte zudem das gemeinsame Wachstum zweier endokriner Tumorentitäten in einer Maus mit vergleichbaren Wachstumskinetiken erfolgreich induziert werden. Dieses Modell könnte zukünftig der Durchführung schneller pharmakokinetischer Vortests unbekannter Substanzen und deren Wirkung auf zwei Tumorarten in einem einzigen Versuchsansatz dienen.

Einige der beschriebenen Tumormodelle werden mittlerweile standardmäßig in unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung neuer anti-tumoraler Substanzen eingesetzt. So diente das C26-Modell im Rahmen dieser Arbeit der Charakterisierung neuer pH-abhängig freisetzender Liposomen *in vivo*. Trotz vielversprechender *in vitro* Vordaten kann nach den durchgeführten pharmakokinetischen Untersuchungen nicht von einer gesteigerten therapeutischen Effizienz dieser Präparation in ihrer jetzigen Form ausgegangen werden. Diese Daten zeigen erneut, dass *in vitro* Untersuchungen als alleinige Kriterien zur Bewertung einer neuen liposomalen Therapie nicht ausreichend sind. Nur *in vivo* Modelle spiegeln die tatsächliche Komplexität eines lebenden Organismus wieder, die die pharmakologischen Eigenschaften einer liposomalen Substanz im Wesentlichen definiert. Daher ist die Durchführung dieser Studie dennoch als erfolgreich einzustufen, da sie die noch bestehenden Mängel der neuen liposomalen Präparation deutlich aufzeigen konnte. So wären auch weitere *in vivo* Experimente unabdingbar, um den zweifelfrei guten therapeutischen Ansatz einer pH-abhängig freisetzenden liposomalen Präparation weiter zu entwickeln und im Vergleich zu klassischen Behandlungsmethoden zu optimieren.

Der wesentliche Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf der Untersuchung des IGF1-Rezeptors als therapeutisches Target für die Behandlung von GEP-NETs. Basierend auf immunhistochemischen Analysen an einem Tumor-Gewebe-Array konnte, im Vergleich zu Kontrollgewebe, eine deutliche Überexpression des IGF1-R in GEP-NETs nachgewiesen werden. Dieser Rezeptor stellt damit eine vielversprechende Zielstruktur für die Behandlung dieser ansonsten sehr heterogenen Tumorentität dar. Darüber hinaus konnte eine neue, anti-IGF1-R gerichtete, liposomale Wirkform entwickelt werden, die die Vorteile einer zielgerichteten liposomalen Chemotherapie und therapeutische Inhibition des IGF1-Signalweges in einer Präparation vereint. In *in vitro* Studien konnten wir zeigen, dass die neuen Immunoliposomen von den untersuchten Tumorzellen internalisiert wurden, was auf einen neuartigen Aufnahmemechanismus hindeutet, der nach jetzigem Stand unserer Analysen auch *in vivo* in veränderten pharmakologischen Charakteristika und einer deutlich gesteigerten therapeutischen Effizienz resultiert.

Literaturverzeichnis

1. Mansmann, G., et al., *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 309-40.
2. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
3. Libe, R., A. Fratticci, and J. Bertherat, *Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(1): p. 13-28.
4. Allolio, B., M. Fassnacht, and W. Arlt, [*Malignant tumors of the adrenal cortex*]. *Internist (Berl)*, 2002. **43**(2): p. 186-95.
5. Allolio, B., et al., *Management of adrenocortical carcinoma*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004. **60**(3): p. 273-87.
6. van Ditzhuijsen, C.I., R. van de Weijer, and H.R. Haak, *Adrenocortical carcinoma*. *Neth J Med*, 2007. **65**(2): p. 55-60.
7. Kirschner, L.S., *Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(1): p. 14-21.
8. Khan, T.S., et al., *Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use*. *Ann Oncol*, 2000. **11**(10): p. 1281-7.
9. Berruti, A., et al., *Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer*. *Cancer*, 1998. **83**(10): p. 2194-200.
10. Rainey, W.E., I.M. Bird, and J.I. Mason, *The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies*. *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **100**(1-2): p. 45-50.
11. Fang, V.S., *Establishment and characterization of a strain of human adrenal tumor cells that secrete estrogen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(3): p. 1067-71.
12. Furuhashi, N. and V.S. Fang, *A role of guanosine 3',5'-monophosphate in human-prolactin-induced estrogen production by feminizing adrenal neoplastic cells*. *Tohoku J Exp Med*, 1980. **132**(1): p. 87-92.
13. Yamamoto, N., et al., *Restoration of transforming growth factor-beta type II receptor reduces tumorigenicity in the human adrenocortical carcinoma SW-13 cell line*. *Horm Metab Res*, 2006. **38**(3): p. 159-66.
14. Ohrvall, U., et al., *Scintigraphy and biodistribution of monoclonal adrenocortical antibody in mice grafted with human adrenocortical carcinoma*. *Surgery*, 1995. **118**(5): p. 893-900.
15. Wu, Y.W., C.L. Chik, and R.A. Knazek, *An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13 adrenocortical carcinoma*. *Cancer Res*, 1989. **49**(14): p. 3754-8.
16. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. *Cancer Res*, 1990. **50**(17): p. 5488-96.
17. Hecker, M., et al., *Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **217**(1): p. 114-24.
18. Logie, A., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma xenograft model*. *Endocrinology*, 2000. **141**(9): p. 3165-71.
19. Leotlela, P.D., et al., *Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours*. *Endocr Relat Cancer*, 2003. **10**(4): p. 437-50.
20. Modlin, I.M. and A. Sandor, *An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors*. *Cancer*, 1997. **79**(4): p. 813-29.

21. Yao, J.C., et al., *One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States*. J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 3063-72.
22. Van Buren, G., 2nd, et al., *The development and characterization of a human midgut carcinoid cell line*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(16): p. 4704-12.
23. Rindi, G., et al., *TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system*. Virchows Arch, 2006. **449**(4): p. 395-401.
24. Rindi, G., et al., *TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system*. Virchows Arch, 2007. **451**(4): p. 757-62.
25. Modlin, I.M., et al., *A three-decade analysis of 3,911 small intestinal neuroendocrine tumors: the rapid pace of no progress*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(7): p. 1464-73.
26. Nawroth and Ziegler, *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*. 2001.
27. Debons-Guillemain, M.C., et al., *Serotonin and histamine production by human carcinoid cells in culture*. Cancer Res, 1982. **42**(4): p. 1513-6.
28. Godwin, J.D., 2nd, *Carcinoid tumors. An analysis of 2,837 cases*. Cancer, 1975. **36**(2): p. 560-9.
29. Williams, E.D. and M. Sandler, *The classification of carcinoid tumors*. Lancet, 1963. **1**(7275): p. 238-9.
30. Evers, B.M., et al., *Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth*. Gastroenterology, 1991. **101**(2): p. 303-11.
31. Brandt, D.W., S.J. Pandol, and L.J. Deftos, *Calcium-stimulated parathyroid hormone-like protein secretion: potentiation through a protein kinase-C pathway*. Endocrinology, 1991. **128**(6): p. 2999-3004.
32. Kolby, L., et al., *A transplantable human carcinoid as model for somatostatin receptor-mediated and amine transporter-mediated radionuclide uptake*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 745-55.
33. Johanson, V., et al., *Antitumoural effects of the pyridyl cyanoguanidine CHS 828 on three different types of neuroendocrine tumours xenografted to nude mice*. Neuroendocrinology, 2005. **82**(3-4): p. 171-6.
34. Parekh, D., et al., *Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion*. Pancreas, 1994. **9**(1): p. 83-90.
35. Evers, B.M., et al., *The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **733**: p. 393-406.
36. Kaltsas, G.A., G.M. Besser, and A.B. Grossman, *The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors*. Endocr Rev, 2004. **25**(3): p. 458-511.
37. Oberg, K., *Management of neuroendocrine tumours*. Ann Oncol, 2004. **15 Suppl 4**: p. iv293-8.
38. Falconi, M., et al., *Well-differentiated pancreatic nonfunctioning tumors/carcinoma*. Neuroendocrinology, 2006. **84**(3): p. 196-211.
39. Arnold, R., et al., *Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2005. **19**(4): p. 649-56.
40. Drummond, D.C., et al., *Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 691-743.
41. Fenske, D.B., A. Chonn, and P.R. Cullis, *Liposomal nanomedicines: an emerging field*. Toxicol Pathol, 2008. **36**(1): p. 21-9.
42. Mozafari, M.R., *Liposomes: an overview of manufacturing techniques*. Cell Mol Biol Lett, 2005. **10**(4): p. 711-9.

43. Speth, P.A., Q.G. van Hoesel, and C. Haanen, *Clinical pharmacokinetics of doxorubicin*. Clin Pharmacokinet, 1988. **15**(1): p. 15-31.
44. Lu, W.L., et al., *A pegylated liposomal platform: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity in mice using doxorubicin as a model drug*. J Pharmacol Sci, 2004. **95**(3): p. 381-9.
45. Gabizon, A.A., *Liposomal drug carrier systems in cancer chemotherapy: current status and future prospects*. J Drug Target, 2002. **10**(7): p. 535-8.
46. Harrington, K.J., K.N. Syrigos, and R.G. Vile, *Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer*. J Pharm Pharmacol, 2002. **54**(12): p. 1573-600.
47. Tardi, P., M.B. Bally, and T.O. Harasym, *Clearance properties of liposomes involving conjugated proteins for targeting*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **32**(1-2): p. 99-118.
48. Bauer, Frömming, and Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. 2006. **8.Auflage**.
49. Allen, T.M., D.R. Mumbengegwi, and G.J. Charrois, *Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3567-73.
50. Swenson, C.E., et al., *Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. as Myocet (TLC D-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(3): p. 239-46.
51. Gabizon, A., H. Shmeeda, and Y. Barenholz, *Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**(5): p. 419-36.
52. Gabizon, A., et al., *Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models*. J Drug Target, 2002. **10**(7): p. 539-48.
53. Huwyler, J., J. Drewe, and S. Krahenbuhl, *Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs*. Int J Nanomedicine, 2008. **3**(1): p. 21-9.
54. Gabizon, A. and D. Papahadjopoulos, *Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6949-53.
55. Harrington, K.J., et al., *Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(2): p. 243-54.
56. Papahadjopoulos, D., et al., *Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11460-4.
57. Sakakibara, T., et al., *Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes is superior to free drug or drug-containing conventional liposomes at suppressing growth and metastases of human lung tumor xenografts*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3743-6.
58. Williams, S.S., et al., *Arrest of human lung tumor xenograft growth in severe combined immunodeficient mice using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes*. Cancer Res, 1993. **53**(17): p. 3964-7.
59. Charrois, G.J. and T.M. Allen, *Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1663**(1-2): p. 167-77.
60. Lorusso, D., et al., *Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome)*. Ann Oncol, 2007. **18**(7): p. 1159-64.

61. Cheong, I., et al., *Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire*. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 9605-8.
62. Fritze, A., et al., *Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(10): p. 1633-40.
63. Hansen, C.B., et al., *Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1239**(2): p. 133-44.
64. Allen, T.M., et al., *A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1237**(2): p. 99-108.
65. Sugano, M., et al., *Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6942-9.
66. Sapra, P., et al., *Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab' fragments*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(3): p. 1100-11.
67. Pastorino, F., et al., *Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice*. *Cancer Res*, 2003. **63**(1): p. 86-92.
68. Moreira, J.N., et al., *A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1514**(2): p. 303-17.
69. Moreira, J.N., R. Gaspar, and T.M. Allen, *Targeting Stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1515**(2): p. 167-76.
70. Holig, P., et al., *Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells*. *Protein Eng Des Sel*, 2004. **17**(5): p. 433-41.
71. Murohara, T., et al., *Cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewisx-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1995. **30**(6): p. 965-74.
72. Bakowsky, H., et al., *Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(1): p. 242-9.
73. Soni, V., D.V. Kohli, and S.K. Jain, *Transferrin coupled liposomes as drug delivery carriers for brain targeting of 5-fluorouracil*. *J Drug Target*, 2005. **13**(4): p. 245-50.
74. Maruyama, K., *PEG-immunoliposome*. *Biosci Rep*, 2002. **22**(2): p. 251-66.
75. Moreira, J.N., et al., *Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity*. *Pharm Res*, 2002. **19**(3): p. 265-9.
76. Iden, D.L. and T.M. Allen, *In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1513**(2): p. 207-16.
77. Ishida, T., D.L. Iden, and T.M. Allen, *A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs*. *FEBS Lett*, 1999. **460**(1): p. 129-33.
78. Gantert, M., et al., *Receptor-specific targeting with liposomes in vitro based on sterol-PEG(1300) anchors*. *Pharm Res*, 2009. **26**(3): p. 529-38.

79. Phillips, N.C. and J. Dahman, *Immunogenicity of immunoliposomes: reactivity against species-specific IgG and liposomal phospholipids*. Immunol Lett, 1995. **45**(3): p. 149-52.
80. Weiner, L.M., M.V. Dhodapkar, and S. Ferrone, *Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy*. Lancet, 2009. **373**(9668): p. 1033-40.
81. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 220-33.
82. Marquardt, F., et al., *Molecular targeted treatment and radiation therapy for rectal cancer*. Strahlenther Onkol, 2009. **185**(6): p. 371-8.
83. Dimitrov, D.S. and J.D. Marks, *Therapeutic antibodies: current state and future trends--is a paradigm change coming soon?* Methods Mol Biol, 2009. **525**: p. 1-27, xiii.
84. Levene, A.P., G. Singh, and C. Palmieri, *Therapeutic monoclonal antibodies in oncology*. J R Soc Med, 2005. **98**(4): p. 146-52.
85. Park, J.W., et al., *Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1327-31.
86. Park, J.W., et al., *Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 1172-81.
87. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
88. Ryan, P.D. and P.E. Goss, *The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer*. Oncologist, 2008. **13**(1): p. 16-24.
89. Li, W. and W.T. Miller, *Role of the activation loop tyrosines in regulation of the insulin-like growth factor I receptor-tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23785-91.
90. Pautsch, A., et al., *Crystal structure of bisphosphorylated IGF-1 receptor kinase: insight into domain movements upon kinase activation*. Structure, 2001. **9**(10): p. 955-65.
91. Ouban, A., et al., *Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas*. Hum Pathol, 2003. **34**(8): p. 803-8.
92. Singleton, J.R., A.E. Randolph, and E.L. Feldman, *Insulin-like growth factor I receptor prevents apoptosis and enhances neuroblastoma tumorigenesis*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4522-9.
93. Sell, C., et al., *Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 3604-12.
94. Shimizu, M., et al., *EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(3): p. 947-53.
95. Pavelic, J., et al., *Insulin-like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma*. Mol Med, 2002. **8**(3): p. 149-57.
96. Carboni, J.M., et al., *Tumor development by transgenic expression of a constitutively active insulin-like growth factor I receptor*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3781-7.
97. Logie, A., et al., *Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line*. J Mol Endocrinol, 1999. **23**(1): p. 23-32.
98. Barlaskar, F.M., et al., *Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 204-12.

99. Weber, M.M., C. Fottner, and E. Wolf, *The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumourigenesis*. Eur J Clin Invest, 2000. **30 Suppl 3**: p. 69-75.
100. Fottner, C., et al., *Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis*. Horm Metab Res, 2004. **36**(6): p. 397-405.
101. Boulle, N., et al., *Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(5): p. 1713-20.
102. Grozinsky-Glasberg, S., et al., *Octreotide and the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in a neuro-endocrine tumour cell Line*. Neuroendocrinology, 2008. **87**(3): p. 168-81.
103. Zitzmann, K., et al., *The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells*. Neuroendocrinology, 2007. **85**(1): p. 54-60.
104. Bahr, C. and B. Groner, *The insulin like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a drug target: novel approaches to cancer therapy*. Growth Horm IGF Res, 2004. **14**(4): p. 287-95.
105. Pietrzkowski, Z., et al., *Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor I*. Cancer Res, 1993. **53**(5): p. 1102-6.
106. Martins, A.S., et al., *Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3532-40.
107. Warshamana-Greene, G.S., et al., *The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(4): p. 1563-71.
108. Clemmons, D.R., *Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(10): p. 821-33.
109. Burtrum, D., et al., *A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8912-21.
110. Goetsch, L., et al., *A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts*. Int J Cancer, 2005. **113**(2): p. 316-28.
111. Toretsky, J.A., et al., *Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewing's sarcoma family of tumors*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5745-50.
112. Cohen, B.D., et al., *Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type I insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(5): p. 2063-73.
113. Bauer, T.W., et al., *Targeting of insulin-like growth factor-I receptor with a monoclonal antibody inhibits growth of hepatic metastases from human colon carcinoma in mice*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(10): p. 2838-46.
114. Ragazzon, B., et al., *Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis*. Endocrinology, 2006. **147**(4): p. 1805-18.
115. Schmitt, A.M., et al., *Islet 1 (Isl1) expression is a reliable marker for pancreatic endocrine tumors and their metastases*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(3): p. 420-5.

116. Huang, S.K., et al., *Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma*. *Cancer Res*, 1992. **52**(24): p. 6774-81.
117. Bouvet, M., et al., *In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases*. *Cancer Res*, 2006. **66**(23): p. 11293-7.
118. Kitakata, H., et al., *Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6682-7.
119. Smakman, N., et al., *Validation of bioluminescence imaging of colorectal liver metastases in the mouse*. *J Surg Res*, 2004. **122**(2): p. 225-30.
120. Mezhir, J.J., et al., *Establishment of a syngeneic model of hepatic colorectal oligometastases*. *J Surg Res*, 2006. **136**(2): p. 288-93.
121. Li, S.L., et al., *Two new monoclonal antibodies against the alpha subunit of the human insulin-like growth factor-I receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **196**(1): p. 92-8.
122. Evers, B.M., et al., *Novel therapy for the treatment of human carcinoid*. *Ann Surg*, 1991. **213**(5): p. 411-6.
123. Bold, R.J., et al., *All-trans-retinoic acid inhibits growth of human pancreatic cancer cell lines*. *Pancreas*, 1996. **12**(2): p. 189-95.
124. Leja, J., et al., *A novel chromogranin-A promoter-driven oncolytic adenovirus for midgut carcinoid therapy*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(8): p. 2455-62.
125. Taal, B.G., et al., *Improved effect of 131I-MIBG treatment by predosing with non-radiolabeled MIBG in carcinoid patients, and studies in xenografted mice*. *Ann Oncol*, 2000. **11**(11): p. 1437-43.
126. von Marschall, Z., et al., *Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(6): p. 437-48.
127. Musunuru, S., et al., *A mouse model of carcinoid syndrome and heart disease*. *J Surg Res*, 2005. **126**(1): p. 102-5.
128. Colombo-Benkmann, M., et al., *Induction of orthotopic rat adrenomedullary neoplasia by intraadrenal pheochromocytoma cell transplantation*. *World J Surg*, 2002. **26**(1): p. 35-42.
129. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. *Cell*, 1994. **79**(2): p. 315-28.
130. Gorelik, E., *Resistance of tumor-bearing mice to a second tumor challenge*. *Cancer Res*, 1983. **43**(1): p. 138-45.
131. Himmele, J.C., B. Rabenhorst, and D. Werner, *Inhibition of Lewis lung tumor growth and metastasis by Ehrlich ascites tumor growing in the same host*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1986. **111**(2): p. 160-5.
132. Parr, M.J., et al., *Accumulation of liposomal lipid and encapsulated doxorubicin in murine Lewis lung carcinoma: the lack of beneficial effects by coating liposomes with poly(ethylene glycol)*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. **280**(3): p. 1319-27.
133. Mayer, L.D., et al., *Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice*. *Cancer Res*, 1989. **49**(21): p. 5922-30.
134. Baserga, R., *The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth?* *Cancer Res*, 1995. **55**(2): p. 249-52.
135. Kaleko, M., W.J. Rutter, and A.D. Miller, *Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(2): p. 464-73.

136. Haluska, P., et al., *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009.
137. Van Gompel, J.J. and H. Chen, *Insulin-like growth factor 1 signaling in human gastrointestinal carcinoid tumor cells*. *Surgery*, 2004. **136**(6): p. 1297-302.
138. von Wichert, G., et al., *Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4573-81.
139. Wulbrand, U., et al., *mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours*. *Eur J Clin Invest*, 2000. **30**(8): p. 729-39.
140. Theodoulou, M. and C. Hudis, *Cardiac profiles of liposomal anthracyclines: greater cardiac safety versus conventional doxorubicin?* *Cancer*, 2004. **100**(10): p. 2052-63.
141. Gabizon, A.A., H. Shmeeda, and S. Zalipsky, *Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting*. *J Liposome Res*, 2006. **16**(3): p. 175-83.
142. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. *J Control Release*, 2000. **65**(1-2): p. 271-84.
143. Torchilin, V.P., *Drug targeting*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. **11 Suppl 2**: p. S81-91.
144. Elbayoumi, T.A. and V.P. Torchilin, *Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated liposomes against various tumor cell lines*. *Eur J Pharm Sci*, 2007. **32**(3): p. 159-68.
145. Goren, D., et al., *Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 1949-57.
146. Reddy, J.A. and P.S. Low, *Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1998. **15**(6): p. 587-627.
147. Shang, Y., et al., *Antixenograft tumor activity of a humanized anti-insulin-like growth factor-I receptor monoclonal antibody is associated with decreased AKT activation and glucose uptake*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(9): p. 2599-608.
148. Bruchim, I., Z. Attias, and H. Werner, *Targeting the IGF1 axis in cancer proliferation*. *Expert Opin Ther Targets*, 2009. **13**(10): p. 1179-92.
149. Samani, A.A., et al., *The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(1): p. 20-47.
150. Guerreiro, A.S., et al., *IGF-IR: potential role in antitumor agents*. *Drug News Perspect*, 2006. **19**(5): p. 261-72.
151. Casa, A.J., et al., *The type I insulin-like growth factor receptor pathway: a key player in cancer therapeutic resistance*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 3273-87.
152. Kamps, J.A., et al., *Uptake of long-circulating immunoliposomes, directed against colon adenocarcinoma cells, by liver metastases of colon cancer*. *J Drug Target*, 2000. **8**(4): p. 235-45.
153. Bendas, G., et al., *The influence of repeated injections on pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1609**(1): p. 63-70.
154. Arnold, R.D., et al., *Effect of repetitive administration of Doxorubicin-containing liposomes on plasma pharmacokinetics and drug biodistribution in a rat brain tumor model*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8856-65.
155. Pastorino, F., et al., *Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy*. *Cancer Res*, 2006. **66**(20): p. 10073-82.
156. Mamot, C., et al., *Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance*. *Drug Resist Updat*, 2003. **6**(5): p. 271-9.

Danksagung

An aller erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Felix Beuschlein. Herr Beuschlein, ich danke dir für deine Diskussionsfreude, Geduld, Neugierde an immer neuen Projekten, deinen Humor und deine Ruhe auch in stressigen Zeiten. Aber vor allem danke ich dir für dein Vertrauen und den Mut dieses Projekt anzugehen und deinen langen Atem es durchzuziehen.

Ich danke vielmals Herrn Prof. Dr. med. Martin Reincke für seine Unterstützung und die Ermöglichung dieser spannenden Dr. Arbeit.

Ich danke sehr unseren Freiburger Kooperationspartnern Prof. Dr. Regine Süß und Dr. Felicitas Lewrick. Ich freue mich auf kommende Projekte!

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen und vor allen Dingen Freunden Alex, Aria, Inga und Moni. Tussi 1, Lady Spyrogli, Ingay und Möni: Vielen Dank für eure offenen Ohren, aufmunternden Worte und die vielen vielen Lacher! Danke für die schöne Zeit bisher und auf geht's in die nächsten Jahre!!! Von ganzem Herzen danke ich aber auch meinen „Bonner Freunden“, die mir auch nach vier Jahren München das Gefühl geben, als würde ich nur um die Ecke wohnen und die ein wichtiger Teil meines Lebens sind.

Vielen Dank natürlich auch an die gesamte Arbeitsgruppe. Mein besonderer Dank gilt dabei Brigitte und Igor, unserem 24 Stunden abdeckenden Einsatzteam technischer Assistenz.

Vor allem danke ich aber meiner Familie, insbesondere meiner Mama, die immer an mich glaubt, immer für mich da ist und sagt dass man alles schaffen kann, wenn man es nur wirklich will!