

Entwicklung und in-vitro-Testung von Arzneistoffträgersystemen für antivirale und antitumorale Arzneistoffe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Martin Michaelis
aus Berlin-Charlottenburg

Frankfurt am Main, 2001
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Kreuter

2. Gutachter: Univ.-Doz. Dr. J. Cinatl

Datum der Disputation: 20. Juni 2001

Wer nichts weiß, muß alles glauben
(Marie Freifrau von Ebner-Eschenbach)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Virologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. J. Kreuter, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Univ.-Doz. Dr. J. Cinatl für die intensive Betreuung des virologischen und onkologischen Teils dieser Arbeit. Er war als Lehrer und Diskussionspartner immer ansprechbar, offen für neue Ideen und hat meine Arbeit mit großer Energie geleitet und unterstützt.

Ebenfalls ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer im pharmazeutisch-technologischen Bereich, Herrn Dr. K. Langer, für Betreuung, Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit, tatkräftige Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und seine große Geduld.

In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank auch der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Langer. Insbesondere ist hier Frau Dr. C Weber herauszustellen, die mit Ihren Untersuchungen die Grundlage für meine Arbeiten mit Nanopartikeln geschaffen hat. Außerdem hat sie das Labor mit mir geteilt. Ihrem ausgleichenden, geduldigen Wesen ist es zu verdanken, daß diese Zeit harmonisch und konfliktfrei verlief. Weiter ist hier Herr Dr. C. Coester zu nennen, der die Herstellung der Gelatine-Nanopartikel optimiert hat. Die Diskussionen innerhalb der Arbeitsgruppe hatten entscheidenden Anteil an dem Gelingen der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J.-U. Vogel vom Institut für Medizinische Virologie für die enge Zusammenhelt, hilfreiche Diskussionen und die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. H.W. Doerr danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Den technischen Angestellten am Institut für Pharmazeutische Technologie, Frau Sylvia Niederdorf, Frau Birgit Johann und Herrn Ullrich Hesse, möchte ich für die Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit danken.

Stellvertretend für die technischen Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Virologie möchte ich Frau Gesa Meincke danken.

Der Firma AnalytiCon AG und besonders dem Verein "Hilfe für krebskranke Kinder, Frankfurt/Main e.V." bzw. der "Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder der Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V." gebührt mein Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Therapie von HCMV-induzierten Erkrankungen	3
2.2	Therapie von Tumorerkrankungen	5
2.3	Metallchelatoren	10
2.3.1	Biologische Wirkungen von Metallchelatoren	13
2.3.1.1	Die Rolle von Eisen bei viralen Infektionen und bei Tumorerkrankungen	14
2.3.1.2	Antivirale und antitumorale Wirkungen von Metallchelatoren in vitro	16
2.3.1.3	Antivirale und antitumorale Wirkungen von Metallchelatoren in vivo	20
2.4	BS-RNase	24
2.5	Arzneistoffträgersysteme	27
3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	31
4	In vitro und in vivo Testung von Metallchelatoren	33
4.1	Material und Methoden	33
4.1.1	Bezugsquellen	33
4.1.2	Zellen und Viren	33
4.1.3	Cytotoxizitätsbestimmung	34
4.1.4	Virustitration	34
4.1.5	Plaque reduction assay	35
4.1.6	Tierexperimente	36
4.2	Ergebnisse	37
4.2.1	Antivirale Effekte von EDDS in vitro	37
4.2.1.1	Antivirale Wirksamkeit von EDDS gegenüber verschiedenen HCMV- und HSV-Stämmen	37
4.2.1.2	Antivirale Wirkung von EDDS bei Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten des HCMV-Replikationszyklus	38
4.2.1.3	Einfluß der Viruslast auf die antivirale Wirkung von EDDS	38

4.2.2	Antivirale Wirksamkeit der Metallchelatoren EDDS, DTPA und DFO in Mäusen	39
4.2.2.1	Einfluß von EDDS auf die MCMV-induzierte Mortalität in SCID Mäusen	39
4.2.2.2	Einfluß von DTPA und DFO auf die MCMV-induzierte Mortalität in SCID-Mäusen	40
4.3	Diskussion	42
4.3.1	Antivirale Wirkung von EDDS in vitro	42
4.3.2	Antivirale Wirkung von EDDS, DTPA und DFO in vivo	43
4.3.3	Schlußfolgerung	44
5	Bindung von Metallchelatoren an peptidische Trägersysteme und in vitro-Evaluierung	47
5.1	Material und Methoden	47
5.1.1	Bezugsquellen	47
5.1.2	Analytik und präparative Arbeiten	48
5.1.2.1	Herstellung von CaNa_3DTPA	48
5.1.2.2	Photometrische Bestimmung von DTPA	49
5.1.2.3	Photometrische Bestimmung von DFO	49
5.1.2.4	Photometrische Bestimmung von EDDS	49
5.1.2.5	Herstellung von HSA-Nanopartikeln	50
5.1.2.6	Herstellung von Gelatine-Nanopartikeln	50
5.1.2.7	Bestimmung der Polymermasse der Nanopartikelsuspensionen	50
5.1.2.8	Messung der Nanopartikelgrößen und der Größenverteilung	51
5.1.2.9	Zetapotentialmessung der Nanopartikel	51
5.1.2.10	Analyse der adsorptiven Bindung von DTPA an HSA	51
5.1.2.11	Kovalente Bindung von DTPA an Protein und Protein-Nanopartikel	51
5.1.2.12	Analyse der Bindung von DTPA an peptidische Trägersysteme	52
5.1.2.13	Kovalente Bindung von DFO an HSA-Nanopartikel	52
5.1.2.14	Bestimmung der Bindung von DFO an HSA-Nanopartikel	52
5.1.2.15	Autoklavierung	52

5.1.2.16	Bestimmung der Komplexierungsfähigkeit von an peptidische Trägersysteme gebundenem DTPA	53
5.1.2.17	Gel-Permeations-Chromatographie	53
5.1.3	Zellkultur-Versuche	53
5.1.3.1	Zellen und Viren	53
5.1.3.2	Cytotoxizitätsbestimmung	54
5.1.3.3	Antivirale Wirkung	54
5.2	Ergebnisse	56
5.2.1	Analytik und präparative Arbeiten	56
5.2.1.1	Photometrische Bestimmung von DTPA	56
5.2.1.2	Photometrische Bestimmung von EDDS	58
5.2.1.3	Photometrische Bestimmung von DFO	60
5.2.1.4	Adsorptive Bindung DTPA an peptidische Trägersysteme	61
5.2.1.5	Kovalente Bindung von DTPA an humanes Serumalbumin	62
5.2.1.6	Kovalente Bindung von DTPA an Gelatine	64
5.2.1.7	Kovalente Bindung von DTPA an Nanopartikel aus humanem Serumalbumin	65
5.2.1.8	Kovalente Bindung von DTPA an Nanopartikel aus Gelatine	67
5.2.1.9	Bestimmung der Komplexierungsfähigkeit von Protein-DTPA-Konjugaten	68
5.2.1.10	Kovalente Bindung von DFO an Nanopartikel aus humanem Serumalbumin	68
5.2.2	Zellkultur-Versuche	70
5.2.2.1	Antitumorale Wirkung von DTPA und seinen Konjugaten in vitro	70
5.2.2.1.1	Antitumorale Wirkung von DTPA	70
5.2.2.1.2	Antitumorale Wirkung von kovalent an Gelatine gebundenem DTPA	71
5.2.2.1.3	Antitumorale Wirkung von an humanes Serumalbumin gebundenem DTPA	78
5.2.2.1.4	Antitumorale Wirkung von an Nanopartikel gebundenem DTPA	79

5.2.2.2	Antivirale Wirkung der DTPA-Konjugate im Vergleich zu DTPA	81
5.2.2.3	Biologische Wirkung von DFO-Nanopartikeln	81
5.3	Diskussion	82
5.3.1	Herstellung und Charakterisierung der Konjugate	82
5.3.2	Antitumorale Wirkung von DTPA	83
5.3.3	Antitumorale Wirkung der DTPA-Konjugate	84
5.3.4	Antivirale Wirkung der DTPA-Konjugate	86
6	Biologische Wirkung des Enzyms bovine seminale Ribonuclease nach Bindung an Polymilchsäure-Nanopartikel	89
6.1	Material und Methoden	89
6.1.1	Bezugsquellen	89
6.1.2	Isolierung der bovinen seminalen Ribonuclease aus der seminalen Vesikelflüssigkeit von Rindern	90
6.1.3	Herstellung der Polymilchsäure-Nanopartikel	90
6.1.4	Beladung der PLA-Nanopartikel mit BS-RNase	91
6.1.5	Zellen	91
6.1.6	Bestimmung der zytotoxischen Effekte	92
6.1.7	Bestimmung der Apoptose-Induktion	92
6.1.8	Aspermatogene Effekte	92
6.1.9	Antiembryonale Effekte	93
6.2	Ergebnisse	95
6.2.1	Größe der PLA-NP und Oberflächenladung	95
6.2.2	Beladung der PLA-NP mit BS-RNase	95
6.2.3	Zytotoxische Effekte der BS-RNase und der BS-RNase-NP	95
6.2.4	Induktion von Apoptose durch BS-RNase und BS-RNase-NP	97
6.2.5	Aspermatogene Effekte	98
6.2.6	Antiembryonale Effekte	98
6.3	Diskussion	101
7	Zusammenfassung	105
8	Literatur	109

9	Lebenslauf	135
----------	-------------------	------------

Verwendete Abkürzungen

AIDS	=	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ALL	=	Akute lymphoblastische Leukämien
BS-RNase	=	Bovine Seminale Ribonuclease
CCG	=	Children`s Cancer Group
CMV	=	Cytomegalovirus
CPE	=	Cytopathogenic Effects
DFO	=	Desferrioxamin
DTPA	=	Diethylentriaminopentaacetic acid
EDDS	=	Ethylendiaminedisuccinic acid
EMEM	=	Eagle`s Minimal Essential Medium
EPR	=	Enhanced Permeability and Retention
FBS	=	Fötales bovines Serum
GCV	=	Ganciclovir
GelB	=	Gelatine Typ B
GelB-DTPA	=	kovalent an GelB gebundenes DTPA
GelB-DTPA-NP	=	kovalent an GelB-NP gebundenes DTPA
GelB-NP	=	Nanopartikel aus GelB
GPC	=	Gel-Permeations-Chromatographie
HA	=	Human Amnion Epithelial Cells
HCMV	=	Human Cytomegalovirus
HEL	=	Humane embryonische Lungenfibroblasten
HFF	=	Human Foreskin Fibroblasts
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
HPMPC	=	Cidofovir
HSA	=	Humanes Serumalbumin
HSA-DFO-NP	=	kovalent an HSA-NP gebundenes DFO
HSA-DTPA	=	kovalent an HSA gebundenes DTPA
HSA-DTPA-NP	=	kovalent an HSA-NP gebundenes DTPA
HSA-NP	=	Nanopartikel aus HSA

HSV-1	= Herpes Simplex Virus Typ 1
HSV-2	= Herpes Simplex Virus Typ 2
HUVEC	= Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IC ₅₀	= Inhibitorische Konzentration, bei 50 %iger Wirkung
IE	= HCMV Immediate Early Antigen
IMDM	= Iscove's modified Dulbecco's Medium
INSS	= International Neuroblastoma Staging System
i.p.	= intraperitoneal
LFA-1	= Leucocyte Function Associated Antigen-1
MCMV	= Murine Cytomegalovirus
MPS	= Mononukleäres Phagozytensystem
NB	= Neuroblastom
NP	= Nanopartikel
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PFU	= Plaque Forming Units
PLA	= Polylactic acid
PLA-NP	= Nanopartikel aus PLA
POG	= Pediatric Oncology Group
PUVA	= Psoralen-UVA-Therapie
PVA	= Polyvinylalkohol
RCMV	= Rat Cytomegalovirus
RNase A	= Ribonuclease A
rRNA	= Ribosomale Ribonucleinsäure
s.c.	= subcutan
S.D.	= Standard Deviation

1 Einleitung

Trotz großer Fortschritte auf allen Gebieten der medizinischen Forschung gibt es bis heute für verschiedene Erkrankungsformen noch keine befriedigenden Therapiemöglichkeiten. Zu diesen Erkrankungsformen gehören u.a. verschiedene Krebs- und Viruserkrankungen. Dies bedeutet, daß deren Behandlung bis heute häufig durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet ist und/oder ein Behandlungserfolg mit starken Nebenwirkungen und damit einer erheblichen Belastung und Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen verbunden ist. Daher kommt der Entwicklung neuer wirksamer und möglichst wenig toxischer Substanzen und Substanzzubereitungen große Bedeutung zu.

Neben dem Auffinden potentiell antiviral oder antitumoral einsetzbarer Substanzen ist deren Applikation häufig mit großen Unwägbarkeiten verbunden. So führt eine große Anzahl in-vitro wirksamer und vielversprechender Substanzen bei der in-vivo-Applikation aus verschiedenen Gründen nicht zu dem gewünschten Erfolg. Ursachen hierfür sind u.a. eine ungünstige Körperverteilung, eine kurze Plasmahalbwertszeit und hohe Antigenität der Arzneistoffe. Zur Überwindung dieser Problematik werden kolloidale und makromolekulare Arzneistoff-Trägersysteme erforscht, die Wirkstoffe möglichst gezielt an ihren Wirkort bringen sollen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit potentiellen antiviralen und antitumoralen Wirkstoffen, sowie mit der Entwicklung und in-vitro-Testung von geeigneten Arzneistoff-Trägersystemen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Therapie von HCMV-induzierten Erkrankungen

Im Zusammenhang mit der Immunschwächekrankheit AIDS, die durch HIV verursacht wird, sowie durch Fortschritte in der Transplantationsmedizin, entsteht ein wachsendes Kollektiv immunsupprimierter Patienten. Hierdurch erlangen opportunistische Krankheitserreger, die bei immunkompetenten Personen in der Regel keine schwerwiegenden Erkrankungen auslösen, zunehmend klinische Bedeutung. Einer dieser Erreger ist das humane Zytomegalievirus (HCMV), das nach der meist symptomlosen Erstinfektion im Körper ohne Krankheitsanzeichen auszulösen persistiert. Obwohl die Durchseuchung der Bevölkerung sehr hoch ist und in verschiedenen Gruppierungen bis zu 100 % erreicht, sind durch HCMV verursachte Erkrankungen bei Immunkompetenten eine Rarität (Weber, 1995; Field, 1999). Dagegen kann es bei Neugeborenen und Immunsupprimierten zu ernsthaften Erkrankungen führen. Ca. 1 % der Neugeborenen in den USA leiden unter Erkrankungen, deren Ursache eine kongenitale HCMV-Infektion ist. In 30 bis 50 % der Fälle erleiden die Betroffenen irreparable Folgeschäden, wie Hörverlust und mentale Retardierung (de Jong et al., 1998).

Bei HIV-Infizierten stellt die HCMV-induzierte Retinitis eine der häufigsten Manifestationen der Krankheit AIDS dar und tritt bei bis zu 30 % der AIDS-Kranken auf (Jabs et al., 1998a). In Organ-transplantierten Patienten ist HCMV die häufigste Infektionsursache (Weber & Doerr, 1994; Field, 1999).

Die derzeitige Therapie von HCMV-Infektionen ist mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Die klinisch eingesetzten Therapeutika sind das Nukleosidanalogue Ganciclovir (GCV), das Nukleotidanalogue Cidofovir (HPMPC), sowie das Pyrophosphatanalogue Foscarnet (Vogel et al., 1997). Diese inhibieren die Virusreplikation. Eine Eradikation des Virus ist bisher jedoch nicht möglich. Außerdem kann es zu pathogenen Zellveränderungen durch Immediate-Early-Proteine kommen, ohne daß eine Virusreplikation stattfindet (Cinatl et al., 1999c; Cinatl et al., 2000b; Cinatl et al., 2000c). Da es nach Beendigung der medikamentösen Behandlung häufig zu Rückfällen kommt (Bach et al., 1985;

2 Theoretischer Hintergrund

Felsenstein et al., 1985; Singer et al., 1985; Walmsley et al., 1988), folgt der Induktionsphase üblicherweise eine lebenslange Erhaltungstherapie (Walmsley & Tseng, 1999). Die Langzeittherapie führt jedoch in vielen Fällen zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber den verwendeten Therapeutika (Erice et al., 1989; Knox et al., 1991; Stanat et al., 1991; Leport et al., 1993; Harada et al., 1997; Jabs et al., 1998a; Jabs et al., 1998b). Nach 9-monatiger Behandlungsdauer sind 25 % der mit GCV, 14 bis 37 % der mit Foscarnet und 20 bis 30 % der mit HPMPD behandelten Patienten von Resistenzen betroffen (Jabs et al., 1998a; Jabs et al., 1998b).

Hinzu kommt, daß die Anwendung der klinisch etablierten Therapeutika mit starken Nebenwirkungen verbunden ist. GCV zeigt u.a. Myelotoxizität und bewirkt irreversible testikuläre Schäden, Foscarnet ist nephrotoxisch und verursacht eine Entgleisung des Elektrolythaushaltes, HPMPD führt zu einer asymptomatischen Neutropenie und Proteinurie (Felsenstein et al., 1985; Erice et al., 1987; Walmsley et al., 1988; Vogel et al., 1997; Walmsley & Tseng, 1999). Ein Antisense-Oligonukleotid (Fomiviren[®]) ist zur lokalen Behandlung von AIDS-assoziierten HCMV-Retinitiden zugelassen. Eine systemische Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden ist bis heute jedoch mit großen Problemen behaftet (Bijsterbosch et al., 1997).

Insbesondere aufgrund des zunehmenden Auftretens von Resistenzen, aber auch wegen der Toxizität der gegen HCMV verwendeten Substanzen, ist das Auffinden neuer Wirkstoffe mit alternativen Wirkmechanismen und einer möglichst geringen Toxizität von großer Bedeutung.

2.2 Therapie von Tumorerkrankungen

Die Therapiemöglichkeiten bei Tumorerkrankungen sind bis heute bei einem großen Anteil der Fälle unbefriedigend. Die Erzielung von Therapieerfolgen ist mit hohen Nebenwirkungen und großen Belastungen für die Patienten verbunden. Trotzdem bleibt die Mortalität bei verschiedenen Tumoren hoch.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der antitumoralen Wirkungen der hergestellten Zubereitungen verschiedene Zellkultursysteme verwendet. Dies waren Neuroblastom-Zellen (UKF-NB-3), Brustkrebszelllinien (MCF-7, MCF-R, BT474), humane cutane T-Lymphomzellen (H9) und humane T-Zell-Leukämie-Zellen (MOLT-4).

Das Neuroblastom (NB)

NB repräsentieren die häufigsten soliden Tumoren außerhalb des zentralen Nervensystems im Kindesalter. Sie werden klinisch nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS) in die INSS Stadien I-IV eingeteilt, wobei höhere Stadien mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Katzenstein & Cohn, 1998). Eine Ausnahme stellt hierbei das Stadium 4s dar. Trotz ausgeprägter Metastasierung ist hier die Prognose sehr günstig (Brodeur et al., 1988; Brodeur et al., 1993). Neben dem INSS Stadium hat sich das Alter bei Diagnosestellung als wichtiger Hinweis für die Prognosestellung erwiesen. Bei Diagnosestellung im Alter von über einem Jahr sinkt die Heilungswahrscheinlichkeit drastisch (Breslow & McCann, 1971; Evans et al., 1971) und nimmt mit zunehmendem Alter weiter ab (Hartmann et al., 1999). Es haben sich verschiedene tumorbiologische Faktoren, u.a. erhöhte N-myc Onkogenamplifikation und Deletionen im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 1, zur Prognose etabliert (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985; Laureys et al., 1990; Biegel et al., 1993; Katzenstein & Cohn, 1998). Die Patienten werden aufgrund von Untersuchungen der Children's Cancer Group (CCG) und der Pediatric Oncology Group (POG) je nach Vorliegen der prognostischen Faktoren zur Behandlung in Gruppen mit geringem Risiko („low risk patients“), mit mittlerem Risiko („intermediate risk

patients“) und mit hohem Risiko („high risk patients“) eingeteilt (Katzenstein & Cohn, 1998).

Während die Überlebensraten für Patienten mit geringem Risiko sehr gut sind und der Anteil der 5-Jahres-Überlebenden bei bis zu 98 % liegt (Matthay et al., 1989; Evans et al., 1996; Kushner et al., 1996), geht die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe mit mittlerem Risiko schon beträchtlich zurück (Katzenstein & Cohn, 1998). In der Gruppe der Hochrisiko-Patienten beträgt die Langzeitüberlebensrate trotz intensiver multimodaler Behandlung, gegebenenfalls mit Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation, nur zwischen 10 und 30 % (Philip et al., 1991; Katzenstein & Cohn, 1998). Daher kommt der Entwicklung effektiver, möglichst wenig belastender Therapieverfahren große Bedeutung zu.

Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist mit 1 Millionen Neuerkrankungen jedes Jahr die häufigste Krebsart bei Frauen. 18 % aller Krebserkrankungen bei Frauen sind Brustkrebs (McPherson et al., 2000). Ein früher Eintritt der Menstruation und eine spät eintretende Menopause gelten als Risikofaktoren. Frauen, die jung Kinder gebären, sind seltener betroffen als Kinderlose. Außerdem tritt Brustkrebs familiär gehäuft auf. Zwei Gene (BRCA1, BRCA2), die für Brustkrebs prädisponieren, wurden identifiziert, jedoch existieren mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere genetische Faktoren, die die Entstehung von Brustkrebs begünstigen. Die Bedeutung von Faktoren wie Ernährung, Übergewicht, Alkoholkonsum, Rauchen, Einnahme von Kontrazeptiva und postmenopausaler Hormonsubstitution sind noch nicht abschließend geklärt (Alberg et al., 2000; McPherson et al., 2000).

Metastatische Brustkrebskrankungen führen bei nahezu allen Erkrankten innerhalb von 5 Jahren zum Tode. Circa die Hälfte der Patientinnen mit primären, nicht metastasierten Erkrankungen sterben trotz chirurgischer Entfernung, Chemo-, Strahlen- und Hormontherapie ebenfalls innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung, (Peters et al., 2000). Durch Erhöhung der verabreichten chemotherapeutischen Dosis konnten klinische Verbesserungen erzielt werden (Bonadonna et al., 1995; Budman et al., 1998; Goldhirsch et al., 1998), doch ist die Dosis aufgrund der hohen Nebenwirkungen nicht beliebig steigerbar. Dies führt

dazu, daß ab einer bestimmten Dosierung die Überlebensrate wieder abnimmt. In einer Studie mit 1350 Brustkrebs-Patienten, bei denen Krebszellen bereits in den Lymphknoten nachweisbar waren, betrug die 10-Jahres-Überlebensrate in der günstigsten Behandlungsgruppe 60 % (Colleoni et al., 1998). Speziell bei älteren Patienten sind jedoch Verträglichkeit und Nutzen der adjuvanten Chemotherapie deutlich vermindert (Crivellari et al., 2000). Auch neue Ansätze, wie z.B. die Verwendung des monoklonalen Antikörpers Herceptin[®], führten zu keinem Durchbruch in Bezug auf die Therapiemöglichkeiten (Peters et al., 2000). Daher ist auch hier die Erforschung weniger toxischer und wirksamer Therapieformen weiterhin von großem Interesse.

Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL)

ALL repräsentieren die häufigste Form der Leukämie bei Kindern und damit die Krebsart mit der höchsten Prävalenz im Kindesalter. Es handelt sich um eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich in der Proliferation von lymphopoietischen Blast-Zellen manifestiert.

Die Gründe für das Auftreten von pädiatrischen ALL sind bisher nicht eindeutig identifiziert. Es ist davon auszugehen, daß multiple Faktoren an der Entstehung von ALL beteiligt sind (Uckun et al., 1998).

Leukämie-Zellen von ALL-Patienten präsentieren auf ihrer Oberfläche Kombinationen unterschiedlichster Antigene, die normalerweise auf Lymphozyten-Vorläuferzellen in unterschiedlichen Reifestadien zu finden sind (Smith et al., 1983; Greaves, 1986). Ca. 85 % der Patienten haben Oberflächenantigene von B-Lymphozyten auf der Zelloberfläche, während die restlichen ca. 15 % Oberflächenantigene von T-Lymphozyten (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) auf ihrer Oberfläche tragen (Borowitz et al., 1986; Crist et al., 1988; Uckun et al., 1996a; Uckun et al., 1998). Üblicherweise haben Patienten mit T-Linien assoziierten Oberflächen-Antigenen eine schlechtere Prognose (Borowitz et al., 1986; Crist et al., 1988; Shuster et al., 1990; Uckun et al., 1998). Eine hohe Anzahl weißer Blutzellen im Blut ist ein negativer prognostischer Faktor (Smith et al., 1996; Uckun et al., 1998). Eine hohe Expression von CD2 auf der Oberfläche der Blast-Zellen wurde mit einer günstigen Prognose korreliert (Steinherz et al., 1986;

Gaynon et al., 1988; Uckun et al., 1996b). Auch der Reifungsgrad der leukämischen T-Vorläuferzellen gibt prognostische Hinweise. Je weniger ausgereift die leukämischen Zellen sind, desto schlechter ist die Prognose (Uckun et al., 1997).

Das Auftreten von Chemoresistenzen gegenüber den verwendeten Arzneistoffen stellt im Falle von T-Zell-ALL ein weiteres Problem dar. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß die Behandlung von T-Zell-ALL mit dem Auftreten von Resistenzen verbunden war (Lauer et al., 1993; Barredo et al., 1994; Pieters et al., 1994; Kaspers et al., 1995).

Trotz moderner, intensiver Therapieformen, wie Radiochemotherapie mit anschließender Knochenmark-/Stammzelltransplantation versagt die Behandlung bei 20 bis 25 % der Patienten. Da eine Steigerung der Therapieintensität der Chemo- bzw. Radiotherapie aufgrund der toxischen Nebenwirkungen nicht mehr möglich ist (Uckun et al., 1998), kommt der Erforschung neuer, weniger toxischer Wirkstoffe auch bei dieser Tumorart große Bedeutung zu.

Kutanes T-Zell-Lymphom

Der Begriff kutanes T-Zell-Lymphom umfaßt eine Gruppe maligner Lymphome, die sich primär in der Haut manifestieren (Lutzner et al., 1975). Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen unterschiedlicher klinisch-pathologischer Entitäten, unterschiedlicher Prognose und unterschiedlicher histologischer Charakteristiken (Morales Suárez-Varela et al., 2000). In den USA werden jährlich ca. 1000 neue Fälle diagnostiziert, wobei das Risiko einer Erkrankung mit zunehmendem Alter erhöht ist (Weinstock & Horm, 1988; Koh et al., 1995). Das Erkrankungsrisiko von Industriearbeitern, die Hautkontakt mit unterschiedlichen Chemikalien und Substanzen haben, ist offenbar erhöht. Immunsupprimierte (infolge von AIDS oder nach Transplantationen) sind ebenfalls häufiger von kutanen T-Zell-Lymphomen betroffen (Nahass et al., 1991). Eine familiäre Häufung konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Cohen et al., 1980; Morales Suárez-Varela et al., 2000). Die Prognose von Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits die Lymphknoten betroffen waren, war signifikant schlechter als bei Patienten, bei denen dies nicht der Fall war (Cohen et al., 1980;

Morales Suárez-Varela et al., 2000). Üblicherweise werden kutane T-Zell-Lymphome in die Stadien T1 (< 10 % der Haut von Läsionen betroffen), T2 (> 10 % der Haut von Läsionen betroffen), T3 (Tumoren), T4 (generalisierte Erythrodermie) eingeteilt.

Die Behandlung erfolgt topisch mit Corticoiden und Cytostatika (Zackheim et al., 1990; Ramsay et al., 1995; Zackheim, 1999), durch Bestrahlung (UVB, PUVA, β -Strahlen; Resnik & Vonderheid, 1993; Herrmann et al., 1995; Wilson et al., 1996; Zackheim, 1999), durch systemische Zytostatika-Therapie (Foss & Kuzel, 1995; Rosen & Foss, 1995; Zackheim et al., 1996; Fierro et al., 1998; Zackheim, 1999), durch systemische Therapie mit Interferonen (Ross et al., 1993), durch systemische Anwendung von Retinoiden (Zackheim, 1999), bzw. durch Kombinationen der aufgezählten Behandlungsarten (Foss et al., 1994; Rosen & Foss, 1995; Zackheim, 1999). Problematisch ist hierbei insbesondere das potentielle Risiko durch Bestrahlung, insbesondere durch PUVA, neue Tumoren, z.B. Schwammzellkarzinome, Basalzellkarzinome, Melanome, zu induzieren (Resnik & Vonderheid, 1993; Morison et al., 1998).

Die 10-Jahres-Überlebensraten hängen stark von dem Stadium der Erkrankung ab. Dies bedeutet, daß die Überlebensrate im Stadium T1 bei 100 %, im Stadium T2 bei 67 %, im Stadium T3 bei 40 % und im Stadium T4 bei 41 % liegt. Insgesamt sterben 15-20 % der Patienten an der Krankheit oder durch sie verursachten Komplikationen (Zackheim et al., 1999).

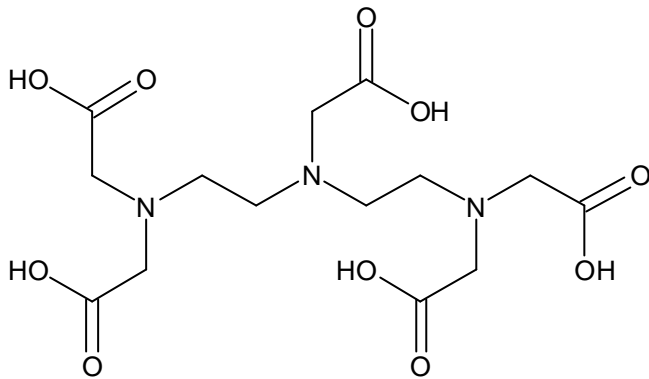
2.3 Metallchelatoren

Metallchelatoren werden zur Dekontamination eingesetzt. Mit ihrer Hilfe werden radioaktive Nuklide und Schwermetalle aus dem Körper entfernt (Wagner et al., 1994; Porru & Alessio, 1996; Staudinger & Roth, 1998). Sie werden außerdem zur Behandlung eines chronischen Eisenüberschusses, wie er infolge von regelmäßigen Bluttransfusionen z.B. bei Thalassämiekranken auftritt, eingesetzt (Kirking, 1991).

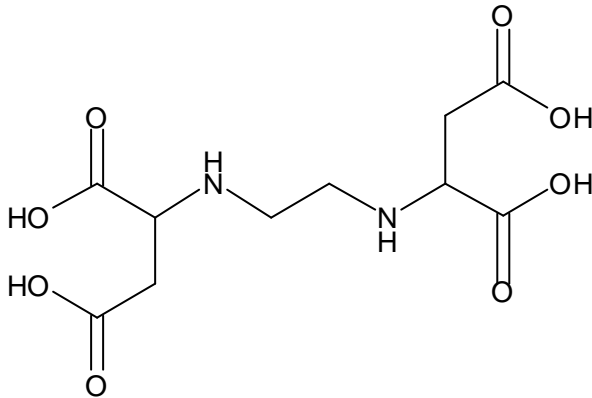
Neben diesen Anwendungsmöglichkeiten zeigen Metallchelatoren eine Reihe weiterer pharmakologischer Eigenschaften, die nicht immer zweifelsfrei auf ihre metallkomplexierenden Eigenschaften zurückzuführen sind.

Verschiedene Metallchelatoren zeigen antitumorale (Blatt & Stitely, 1987; Estrov et al., 1987; Becton & Bryles, 1988; Hoyes et al., 1992; Donfrancesco et al., 1996), antivirale (Hutchinson, 1985; Cinatl et al., 1994; Cinatl et al. 1995a, Gumbel et al., 1995; Scholz et al., 1997; Kloover et al., 1999), antibakterielle (Hartzen et al. 1994, Shen et al., 1999), antiinflammatorische (Blake et al., 1983, Andrews et al., 1987) und antiprotozoische (Hershko & Peto, 1988; Mabeza et al., 1996) Wirkungen.

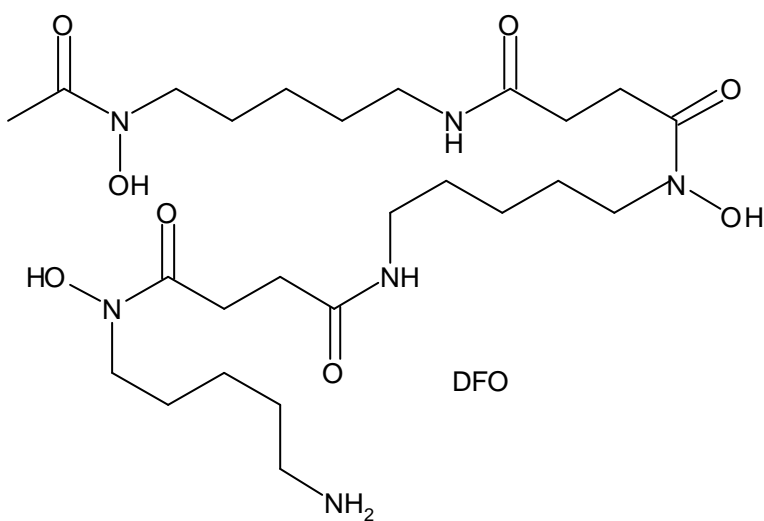
Diese Dissertation beschäftigte sich mit den antiviralen und antitumoralen Eigenschaften der Metallchelatoren Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), Ethylendiamindibernsteinsäure (EDDS) und Desferrioxamin (DFO, Abb. 2.3.1).

Abb. 2.3.1. Strukturformeln von DTPA, EDDS und DFO

DTPA



EDDS



DFO

2 Theoretischer Hintergrund

Im Gegensatz zu DTPA und DFO, deren biologische Eigenschaften schon unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht wurden, liegen derartige Daten über EDDS bisher nicht vor.

DFO wird in großem Umfang zur Entfernung von überschüssigem Eisen bei Thalassämiekranken eingesetzt (Kirking, 1991). DTPA wurde unter anderem als preisgünstige Alternative zu DFO für diese Anwendung untersucht (Pippard et al., 1986; Pippard et al., 1988). Bestimmte DFO-bedingte Nebenwirkungen sind unter der Behandlung mit DTPA reversibel (Wonke et al., 1989) und es kann bei allergischen Reaktionen gegenüber DFO verwendet werden (Jackson & Brenton, 1983).

2.3.1 Biologische Wirkungen von Metallchelatoren

Metallchelatoren stellen keine einheitliche Substanzklasse dar. Ein Teil ihrer pharmakologische Wirkungen ist in der Komplexierung von Metallionen begründet. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer chemischen Struktur sehr stark. Dadurch ergeben sich große Unterschiede im Hinblick auf ihre Verteilung in Zellen und Organismus, im Hinblick auf ihr Komplexierungspotential und im Hinblick auf ihre Wechselwirkungen mit Zell- und Gewebestrukturen. Daher müssen auch die Erklärungsansätze für die Wirkmechanismen der einzelnen Chelatoren differenziert betrachtet werden. Die Bestimmung der antiviralen bzw. der antitumoralen Wirkung in vitro ist vergleichsweise einfach möglich. Im Organismus sind die Verhältnisse jedoch deutlich komplexer, da zu den antiviralen und antitumoralen Wirkungen weitere, unter Umständen schwer differenzierbare pharmakologische Effekte hinzukommen. Hierbei sind an erster Stelle antiinflammatorische immunmodulatorische Eigenschaften zu nennen, die die Interpretation von in-vivo-Daten erschweren.

2.3.1.1 Die Rolle von Eisen bei viralen Infektionen und bei Tumorerkrankungen

Hohe Eisenspiegel begünstigen offenbar sowohl die Entstehung von Krebserkrankungen, als auch das Auftreten von viralen Infektionen (Weinberg, 1996a; Weinberg, 1996b).

Dies wird auf verschiedene Ursachen zurückgeführt. Ein wichtiger Aspekt ist das Redoxpotential des $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ -Systems, das zu der Bildung von Hydroxylradikalen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies führt (Voest et al., 1994; Kadiiska et al., 1995). Diese Radikale können DNA-Stränge miteinander vernetzen und zu DNA-Strangbrüchen führen (Reid & Loeb, 1992). Sie schwächen das Immunsystem (Voest et al., 1994; Kadiiska et al., 1995) und beeinflussen durch Lipidperoxidation die Zellmembran-Konformation und dadurch mittelbar auch die Signaltransduktion, was zur Aktivierung von Onkogenen führen kann (Bacon & Britton, 1990; Sahu, 1990). Außerdem wurde gezeigt, daß CD4-Lymphozyten durch große Mengen Eisen direkt gehemmt werden können (Djeha & Brock, 1992).

Ein weiterer Aspekt ist, daß Eisen zu den kritischen Substanzen gehört, deren Vorhandensein die Proliferation von Tumorzellen und die intensive Virusreplikation in Virus-infizierten Zellen limitiert (Weinberg, 1996a, Weinberg, 1996b). Verschiedene Tumorzellen bilden daher vermehrt Rezeptoren zur Eisenaufnahme aus und verwenden einen größeren Teil des zellulär gespeicherten Eisens für metabolische Prozesse als nicht maligne Zellen (Brown et al., 1982; Zhou et al., 1987; Sorokin et al., 1989; Shterman et al., 1991).

Eine Abwehrstrategie des Körpers bei viralen und tumoralen Erkrankungen besteht im Entzug von Eisen aus den betroffenen Regionen (Magnusson et al., 1977; Weinberg, 1996a, Weinberg, 1996b). Dies geschieht u.a. durch vermehrte Bildung von Eisen-bindenden Proteinen (z.B. Transferrin, Lactoferrin, Ferritin) und durch eine verminderte Eisenaufnahme aus der Nahrung (Weinberg, 1996a, Weinberg, 1996b).

Die Relevanz dieser durch Eisen auf zellulärer Ebene verursachten Effekte für den Gesamtorganismus werden durch epidemiologische Untersuchungen gestützt. Dementsprechend waren Bevölkerungsgruppen mit genetisch bedingten erhöhten Eisenspiegeln häufiger von viralen Erkrankungen betroffen als Vergleichsgruppen (Deugnier et al., 1991; Weinberg, 1996a). Bei der Therapie von Hepatitis-Erkrankungen hatten Personen mit niedrigen Eisenspiegeln in der Leber eine höhere Therapie-Ansprechrage als solche mit vergleichsweise hohen Eisenspiegeln (Van Thiel et al., 1994; Piperno et al., 1996).

Es wurde außerdem gezeigt, daß eine erhöhte Eisenexposition das Risiko erhöht, an Krebs zu erkranken. Auch Personen, die krankheitsbedingt große Mengen Eisen im Körper speichern, scheinen dadurch öfter Krebserkrankungen zu erleiden. Die Gabe von hohen Dosen Eisen bzw. niedrigen Dosen kombiniert mit anderen krebsauslösenden Substanzen, die alleine in den eingesetzten Mengen keine Tumorbildung auslösten, führte zur Tumorbildung in einer großen Anzahl verschiedener Tiermodelle (Weinberg, 1996b).

2.3.1.2 Antivirale und antitumorale Wirkungen von Metallchelatoren in vitro

Metallchelatoren verhindern in Zellkultur zellschädigenden Einflüsse, wie DNA-Strangbrüche, die durch eine hohe Zugabe von Eisen entstehen. Hier kann die Wirkung auf die Komplexierung von Eisen und die damit verbundene erniedrigte Radikalbildung zurückgeführt werden, da Radikalfänger die Schädigungen ebenfalls verhindern (Toyokuni & Sagripanti, 1992). Der Entzug von Eisen löste in Lymphomzellen Apoptose aus. Die Apoptoseeinleitung war unabhängig von der Ursache des zellulären Eisenmangels. Komplexierung des Eisens mit DFO, Verwendung von Eisen-armem Medium und der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen den Maus-Transferrin-Rezeptor führten in gleicher Weise zur Einleitung von Apoptose (Kovar et al., 1997). Auch bei der antiviralen Wirkung von DFO, gibt es Befunde, die darauf hinweisen, daß die HCMV Replikation durch eine Verminderung der Bildung von Radikalen gehemmt werden kann. Durch Buthioninsulfoxim hervorgerufener oxidativer Streß erhöht die Replikationsrate von HCMV in Zellkultur (Scholz et al., 1996). Durch Antioxidantien kann die Virusproduktion der infizierten Zellen gehemmt werden (Gross et al., 1994; Gümbel et al., 1994; Cinatl et al., 1995b). Vergleichbare Effekte sind durch Komplexierung des Eisens und damit der Verminderung von Redoxvorgängen denkbar.

Es gibt jedoch eine Reihe weiterer in-vitro-Studien, bei denen die Komplexierung von Eisenionen zumindest nicht das einzige Wirkprinzip der Chelatoren darstellt.

Am intensivsten untersucht wurden die Wirkungen des Chelators DFO. DFO ist hydrophil und zellgängig (Peters et al., 1966; Bridges & Cudkowicz, 1984). Seine antitumoralen (Barankiewicz & Cohen, 1987; Estrov et al., 1987; Hann et al., 1990; Brodie et al., 1993; Hoyes et al., 1992; Timeus et al., 1994) und seine antiviralen (Cinatl et al., 1994; Cinatl et al., 1995a; Gümbel et al., 1995; Cinatl et al., 1996a; Scholz et al., 1997; Kloover et al., 1999) Eigenschaften wurden in-vitro häufig dokumentiert. Als cytotoxischer, antitumoraler Wirkmechanismus von DFO und anderen zellgängigen Chelatoren wird die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase durch Komplexierung des Eisens und dadurch die Hemmung der DNA-Synthese angesehen (Hoffbrand et al., 1976; Barankiewicz & Cohen, 1987; Cory et al.,

1995). Offenbar entzieht DFO der Zelle Eisen aus ihren intrazellulären Pools und damit dem Zellstoffwechsel (Richardson et al., 1994). In einer Studie gelang es die Affinität der Chelatoren zu Eisen mit ihrer antiproliferativen Wirkung in Tumorzellen zu korrelieren (Darnell & Richardson, 1999).

Die antiviralen Mechanismen verschiedener anderer Chelatoren wurden ebenfalls auf die Hemmung von Ribonukleotid-Reduktasen zurückgeführt. Verschiedene Viren der Herpes Familie kodieren eigene Ribonukleotid-Reduktasen, die sich von den zelleigenen Enzymen unterscheiden: HSV-1, HSV-2, Varizella Zoster Virus, Eppstein-Barr-Virus (Averett et al., 1983; Averett et al., 1984; Dutia et al., 1983; Goldschmidts et al., 1989; Spector et al., 1989). Diese viralen Ribonukleotid-Reduktasen werden durch verschiedene Metallchelatoren in deutlich stärkerem Umfang gehemmt, als die zelleigenen Enzyme. Die Wirkung von Aciclovir wurde durch Kombination mit diesen Metallchelatoren erhöht (Spector et al., 1985; Spector et al., 1989; Porter et al., 1990; Spector et al., 1991; Spector et al., 1992). Interessanterweise inhibierten zwei Chelatoren auch die HCMV-Replikation und steigerten die anti-HCMV-Wirkung von GCV, obwohl bei HCMV bisher keine viralen Ribonukleotid Reduktasen nachgewiesen wurden (Hamzeh et al., 1993). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die antiviralen Wirkungen von DFO gegenüber verschiedenen HCMV-Stämmen und klinischen Isolaten untersucht (Cinatl et al., 1994; Gümbel et al., 1995; Cinatl et al., 1995a; Cinatl et al., 1996a; Scholz et al., 1997). Die Replikation aller untersuchten HCMV-Stämme wurde stark gehemmt. Die Hemmung war durch Zugabe von Fe^{3+} aufhebbar. Die antivirale Wirkung des DFO beschränkte sich offenbar auf HCMV, da die Replikation von HSV-1, HSV-2, Poliovirus 1 und Adenovirus 3 nicht inhibiert wurde. Es ist jedoch bekannt, daß DFO die Ribonukleotid-Reduktase von HSV-1 inhibiert (Porter et al., 1990). Eine Erklärung hierfür könnte das Fehlen viraler Ribonukleotid-Reduktasen bei HCMV sein. HCMV ist dadurch auf die zelleigenen Ribonukleotid-Reduktasen angewiesen, wodurch die Gesamtmenge der verfügbare Ribonukleotid-Reduktasen in infizierten Zellen relativ gering ist und eine Hemmung mit geringeren DFO-Mengen möglich sein sollte. Diese Erklärung wird durch den Befund unterstützt, daß in den Konzentrationen, die die HCMV-Replikation inhibieren, zwar die Zellviabilität von

2 Theoretischer Hintergrund

HFF nicht beeinträchtigt wird, die DNA-Synthese jedoch gehemmt ist (Cinatl et al., 1996a).

Der Metallchelator DTPA wurde ebenfalls bereits auf seine antiviralen Eigenschaften hin untersucht. Auch hier scheint die inhibitorische Wirkung auf HCMV beschränkt zu sein, da die Replikation von HSV-1 nicht gehemmt wurde (Cinatl et al., 1996a; Scholz et al., 1997; Kloover et al., 1999). Der Reaktionsmechanismus des DTPA ist sicherlich verschieden von dem Mechanismus des DFO. Dies läßt sich aus den unterschiedlichen chemischen Strukturen ableiten. Im Gegensatz zu DFO ist DTPA nicht zellgängig und kann daher nur extrazelluläre Ionen komplexieren (Aisen & Listowsky, 1980). Außerdem verfügt DTPA über ein anderes Komplexbildungsprofil. DFO hat eine hohe Affinität zu Fe^{3+} -Ionen (Sillén & Martell, 1971; Nunez et al., 1983; Bridges & Cudkowicz, 1984; Polson et al., 1985). DTPA bildet mit einer Reihe von Metallionen stabile Komplexe, z.B. mit Zink, Mangan, Eisen, Kupfer, Yttrium und Indium. Die Komplexbildungskonstanten mit Ca^{2+} und Mg^{2+} sind relativ gering (Müller-Eberhard et al., 1963; Waxman & Brown, 1969; Sillén & Martell, 1971; Catsch & Hartmuth-Hoene, 1975). Daher kann Ca^{2+} gegen andere Metallionen mit höheren Komplexbildungskonstanten ausgetauscht werden. Hiermit steht in Einklang, daß bei der Verwendung von CaNa_3DTPA zur Entfernung von überschüssigem Eisen bei Thalassämie-Kranken zur Verhinderung eines Zinkmangels Zink supplementiert werden mußte (Jackson & Brenton, 1983; Pippard et al., 1986; Pippard et al., 1988). Die anti-HCMV-Wirkung war durch Zn^{2+} und Mn^{2+} inhibierbar. Interessanterweise ist die Komplexbildungskonstante von DTPA zu Fe^{3+} deutlich höher als die zu Zn^{2+} , obwohl Fe^{3+} die antivirale Aktivität von DTPA nur gering beeinflußt (Cinatl et al., 1996a). Dies weist darauf hin, daß die Wirkung von DTPA nicht allein auf die extrazelluläre Komplexbildung von DTPA zurückzuführen ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen zusätzlich auf einen eigenen Wirkmechanismus des DTPA hin. Hierbei wurden mit DTPA behandelte HCMV-infizierte HFF mit unbehandelten HCMV-infizierten Zellen verglichen. Virale Nukleokapside waren in behandelten und unbehandelten HCMV-infizierten HFF vorhanden. In den mit DTPA behandelten Zellen wurden jedoch keine viralen

Partikel mit Hülle, „dense bodies“ oder reife extrazelluläre Viruspartikel gefunden. Dies zeigt, daß die HCMV-Entwicklung mit hoher Wahrscheinlichkeit beim Zusammenbau der Viren oder beim Knospen der Viren aus der Kernmembran gehemmt wurde. DTPA war außerdem in Konzentrationen antiviral wirksam, in denen die DNA-Synthese nicht gehemmt wurde (Cinatl et al., 1996a). Diese Beobachtung stimmt wiederum mit früheren Studien überein, die zeigten, daß eine Beeinträchtigung der DNA-Synthese durch DTPA erst stattfand, wenn die Plasmamembran durch toxische Effekte bereits geschädigt war (Taylor & Jones, 1972; Lücke-Huhle, 1976).

Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei Hypothesen ableiten, um die Wirkung des DTPA zu erklären. Die erste Hypothese ist, daß die antivirale Wirkung des DTPA durch eine noch nicht näher spezifizierte extrazelluläre Komplexierung von Metallionen zustande kommt. Die zweite Hypothese ist, daß DTPA direkt mit Oberflächenstrukturen der Zellen wechselwirkt und dadurch die Signaltransduktion der Zellen verändert.

2.3.1.3 Antivirale und antitumorale Wirkungen von Metallchelatoren in vivo

Über die in-vivo-Anwendung von Metallchelatoren existieren sehr widersprüchliche Daten. DFO wurde bereits intensiv zur Therapie von Tumoren untersucht und klinisch getestet. Durch Behandlung mit DFO wurden die Lipidperoxidation und dadurch entstehende präneoplastische Veränderungen in der Leber von Ratten mit Diät-bedingten hohen Eisenspiegeln verhindert (Sakaida et al., 1999). Hierbei ist der Mechanismus mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Erniedrigung des Eisenspiegels zurückzuführen. Widersprüchlich sind jedoch die Ergebnisse zur therapeutischen Behandlung von Krebserkrankungen. In Tierversuchen wurde DFO erfolgreich gegen Leukämie (Estrov et al., 1987) und hepatozelluläre Karzinome eingesetzt (Hann et al., 1992). Diese Ergebnisse werden durch klinische Studien an NB Patienten unterstützt (Donfrancesco et al., 1990; Donfrancesco et al., 1996). In einer Phase I-Studie war die Wirkung von DFO in Kombination mit Doxorubicin an Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen nicht abschließend zu bewerten (Voest et al., 1993). Weitere Tierstudien an Neuroblastom- und Leukämie-Modellen dokumentierten hingegen keine antitumorale Wirkung von DFO (Blatt et al., 1991; Selig et al., 1998), obwohl im Neuroblastom-Modell die Eisenspiegel der Tiere nachweislich effektiv gesenkt wurden (Selig et al., 1998). Im Leukämie-Modell wurde das Scheitern auf die ungünstige Pharmakokinetik zurückgeführt, die ein Erreichen von wirksamen DFO-Konzentrationen im Tumor ohne inakzeptable Nebenwirkungen hervorzurufen unmöglich machte (Blatt et al., 1991). Zu dem selben Ergebnis kam eine klinische Studie in Neuroblastom-Patienten, bei der die applizierbaren DFO-Dosen zu keinem Ansprechen des Tumors auf die Therapie führten (Blatt, 1994). Ein weiteres Einsatzgebiet, das evaluiert wird, ist der Einsatz von Metallchelatoren in Kombination mit Anthracyclinen, um das vermehrte Auftreten von Hydroxylradikalen, die durch Anthracyclin-Fe³⁺-Komplexe in der Anwesenheit von reduzierenden Substanzen gebildet werden, zu verhindern (Voest et al., 1994; Hershko et al., 1996).

Zur antiviralen in vivo Anwendung von DFO und DTPA liegen ebenfalls bereits Daten vor. Bei nachgewiesenem Eisenüberschuß ist der Einsatz von DFO offenbar vielversprechend. Der Krankheitsverlauf HIV-infizierter Thalassämie Patienten konnte durch Behandlung mit erhöhten Dosen DFO signifikant verlangsamt werden. Jedoch wurde die Ursache hierfür nicht genau abgeklärt (Costagliola et al., 1994; Salhi et al., 1998). In mit RCMV infizierten Lewis Ratten zeigten jedoch weder die Behandlung mit DFO, noch mit DTPA eine protektive Wirkung, obwohl beide Substanzen die Replikation von RCMV in vitro inhibierten (Kloover et al., 1999). Ein Grund hierfür könnten wiederum die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften der Metallchelatoren für diese Anwendung sein. DTPA und DFO werden nach Verabreichung schnell aus dem Körper eliminiert (Guilmette et al., 1978; Durbin & Schmidt, 1989; Durbin et al., 1997; Dragsten et al., 2000). Deshalb erscheint das Erreichen von wirksamen Plasmaspiegeln ohne ein Überwiegen der toxischen Effekte sehr problematisch. Es ist jedoch ein Fall dokumentiert worden, in dem ein Patient mit AIDS-assoziiertes Retinitis, der auf die Behandlung mit GCV und Foscarnet nicht ansprach, mit DFO-Infusionen behandelt wurde (Gümbel et al., 1995). Die Behandlung führte zu dem Verschwinden der Retinitis. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Untersuchung eines Lebertransplantationsmodells in Ratten erzielt (Martelius et al., 1999). HCMV-Infektionen wird eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von transplantierten Organen zugeschrieben. Deshalb wurde in der zitierten Studie untersucht, ob die Verwendung von DFO die Abstoßung von RCMV-infizierten Rattenlebertransplantaten vermindert wird. Die CMV-induzierte Pathogenese wurde erfolgreich gehemmt. Allerdings ist bei der Interpretation dieses Ergebnisses zu berücksichtigen, daß Metallchelatoren auch immunmodulatorische Eigenschaften haben. So inhibierte DFO neuropathologische Autoimmunprozesse in Ratten mit experimentellen allergischen Enzephalomyelitiden, verhinderte Schäden an transplantierten Pankreaszellen in Mäusen und war bei 2 Kindern wirksam gegenüber Graft-versus-host-disease (Bower et al., 1984; Bradley et al., 1986; Weinberg et al., 1986; Voest et al., 1994). Die immunmodulatorischen Eigenschaften werden zumindest teilweise durch die Hemmung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch

Komplexierung von Eisen-Ionen erklärt (Voest et al., 1994; Kadiiska et al., 1995). Außerdem inhibieren DFO und DTPA direkt die durch verschiedene Substanzen induzierte proliferative Antwort der Lymphozyten (Lipsky & Lietman, 1980; Soyano et al., 1984; Scholz et al., 1996). Der Mechanismus der Hemmung der Lymphozyten ist noch nicht geklärt. Es wurde postuliert, daß der IL-2-Rezeptor (CD25) entweder direkt oder durch Eisen-Komplexierung gehemmt wird. Da Eisenchelatoren der strukturell sehr unterschiedlichen Gruppe der Hydroxypyridinone ebenfalls die Funktion von Lymphozyten beeinträchtigen, erscheint die Annahme, daß die Effekte durch Chelatisierung des Eisens verursacht werden nachvollziehbar (Pattanapanyasat et al., 1992). In HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurde die Expression von ICAM-1, einem Mitglied der Superimmunglobulin-Familie, sowie des E-Selectins ELAM-1 durch DFO unterdrückt (Cinatl et al., 1995a), was auf eine komplexere Beeinflussung von zellulären Vorgängen hinweist. Über die Interaktion von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (z.B. LFA-1) mit Endothelium-Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) und extrazellulärer Matrix wird der Eintritt von Leukozyten in das Gewebe gesteuert (Albelda et al., 1994; Hunt et al., 1996). Mit spezifischen Antikörpern gegen ICAM-1 und LFA-1 konnte die Abstoßung von transplantierten Organen und Geweben in Tierversuchen verhindert werden (Isobe et al., 1992; Jendrisak et al., 1993; Nakakura et al., 1993; Talento et al., 1993; Zeng et al., 1994; Nakao et al., 1995). Monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 und LFA-1 befinden sich zur Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Organen und im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen in klinischen Studien (Haug et al., 1993; Kavanaugh et al., 1996; Schneider et al., 1998; Salmela et al., 1999).

Daher bleibt die Frage, inwiefern das Verschwinden der HCMV-Retinitis durch antivirale und/oder antientzündliche Wirkungen des DFO verursacht wurde, ungeklärt. Es ist jedoch zu erwähnen, daß bei den Versuchen in Lewis Ratten auch die Therapie eines lokalen RCMV (Ratten-Zytomegalievirus)-Entzündungsmodells in der Pfote erfolglos war (Kloover et al., 1999).

2.4 BS-RNase

Das Enzym BS-RNase wurde als potentiell antitumoral einsetzbare Substanz von J. Matousek entdeckt. Seine antitumorale Wirkung wurde *in vitro* und *in vivo* belegt (Matousek, 1973; Matousek & Stanek, 1977; Cinatl et al., 1977; Laccetti et al., 1992; Soucek et al., 1996; Pouckova et al., 1998a; Pouckova et al., 1998b; Cinatl et al., 1999a; Kotchetkov et al., 2000). Neben den antitumoralen Eigenschaften besitzt BS-RNase auch aspermatogene (Hlinak et al., 1981), antiembryonische (Matousek & Grozdanovic, 1973), immunosuppressive (Tamburrini et al., 1990) und antivirale (Youle et al., 1994) Eigenschaften.

Der antitumorale Wirkungsmechanismus der BS-RNase unterscheidet sich von nahezu allen etablierten Chemotherapeutika. Gewöhnlich interagieren Chemotherapeutika mit der DNA-Synthese und der Zellteilung, wobei sie die sich schnell teilenden malignen Zellen stärker schädigen als die weniger aktiven normalen Zellen. BS-RNase hingegen inhibiert direkt die Proteinsynthese und ist dadurch in der Lage, auch sich nicht teilende Zellen abzutöten, wobei sie trotzdem spezifisch für Tumorzellen ist. Das Enzym wirkt gleichermaßen *in vitro* und *in vivo* gegen chemoresistente und sensitive parentale NB-Zelllinien (Cinatl et al., 1999a; Cinatl et al., 2000). Die cytotoxische Aktivität scheint auf eine Gruppe maligner Zellen beschränkt zu sein (Vescia & Tramontano, 1981; Mastronicola et al., 1995; Cinatl et al., 2000). Die antitumorale Wirkung war gegenüber metastatischen Tumorzellen stärker als gegenüber Zellen aus dem Muttertumor (Laccetti et al., 1992; Laccetti et al., 1994).

BS-RNase besteht aus zwei katalytisch aktiven Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (D'Alessio et al., 1975). Drei verschiedene Isoenzyme sind bekannt, die sich durch die Zusammensetzung aus alpha- und beta-Untereinheiten unterscheiden. BS-RNase kann aus zwei alpha-Untereinheiten, zwei beta-Untereinheiten und aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit aufgebaut sein (Di Donato et al., 1981). Sie degradiert im Cytosol die rRNA, verhindert dadurch die zelluläre Proteinsynthese und zerstört so die sensitiven Zellen (Mastronicola et al., 1995). Der antitumorale Wirkungsmechanismus,

insbesondere die spezifische Wirkung auf eine Gruppe von Tumorzellen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die dimere Struktur und die enzymatische Aktivität sind für die antitumorale Wirkung essentiell. Monomere RNase A hat keine derartige Wirkung (Di Donato et al., 1994; Mastronicola et al., 1995; Soucek, et al., 1996). Monomerisierte BS-RNase weist ebenfalls keine antitumorale Wirkung auf (Kim et al., 1995). Die monomere RNase A kann jedoch durch Dimerisierung in eine antitumoral wirksame Form gebracht werden (Di Donato et al., 1994). Allerdings unterscheidet sich die antitumorale Wirkung dimerisierter RNase A von der der BS-RNase. BS-RNase wirkt eher cytotoxisch, dimerisierte RNase A eher cytostatisch. Außerdem ist der Verlust von Bindungsstellen im aktiven Zentrum des Enzyms, d.h. der Verlust der enzymatischen Aktivität, nicht mit einem Verlust der antitumoralen Aktivität der dimerisierten RNase A verbunden. Hinzu kommt, daß dimerisierte RNase A die Lysosomen destabilisiert (Bartholeyns & Baudhuin, 1976), BS-RNase jedoch nicht (Youle und D'Alessio, 1997).

BS-RNase bindet an eine Reihe von Bindungsstellen der extrazellulären Matrix. Andere homologe RNasen, inklusive der monomeren Derivate, tun dies nicht. Maligne und normale Zellen internalisieren die BS-RNase. Jedoch treten nur in einer Gruppe maligner Zellen cytotoxische Effekte auf. Für die selektiven antitumorale Wirkungen werden zwei Erklärungen diskutiert. Eine Annahme ist, daß die Degradation der zellulären rRNA darauf zurückzuführen ist, daß die dimere BS-RNase im Gegensatz zu der monomeren RNase A nicht durch RNase-Inhibitor-Proteine inhibiert wird (Mastronicola et al., 1995; Murthy et al., 1996). Dieser Erklärung steht jedoch entgegen, daß monomere, für die getesteten Zellen untoxische RNase A durch Bindung an das HIV-Protein Tat, das als Fusionsprotein die Aufnahme von Molekülen in unterschiedliche Zellkompartimente vermittelt, zu einer cytotoxischen Substanz wurde (Fawell et al., 1994). Eine weitere Studie weist darauf hin, daß die Cytotoxizität von RNasen durch Transport in das Cytosol erhöht werden kann (Wu et al., 1995). Daher scheint die Toxizität von RNasen nicht nur von der Anwesenheit von Inhibitor-Proteinen, sondern auch von der intrazellulären Verteilung abzuhängen.

Der zweite Erklärungsansatz ist, daß in BS-RNase-sensitiven Zellen andere intrazellulären Pathways als in nicht-sensitiven Zellen existieren (Mastronicola et al., 1995). Dadurch könnte BS-RNase nur in den sensitiven Zellen ihre cytotoxische Wirkung entfalten. Die Art dieser postulierten Pathways wurde bisher noch nicht näher definiert.

Der Nachteil dieser vielversprechenden Substanz liegt in ihrer problematischen in-vivo-Anwendung. Während die intratumorale Applikation zu kurativen Effekten im Tierversuch führte, verlief die systemische Anwendung bisher erfolglos (Soucek et al., 1996, Pouckova et al., 1998a; Pouckova et al., 1998b).

2.5 Arzneistoffträgersysteme

Paul Ehrlich formulierte als Erster die Idee der „Magischen Kugeln“, die Wirkstoffe gezielt an ihre Wirkorte bringen und sie dort gesteuert freisetzen (Ehrlich, 1906). Dies würde zu einer optimalen Wirkung führen, die im Idealfall ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erzielt werden könnte. Dieser Ansatz wird mit der Verwendung von Arzneistoffträgersystemen verfolgt. In diesem Zusammenhang werden makromolekulare und kolloidale Arzneistoff-Trägersysteme erforscht.

Nanopartikel (NP) sind solide Teilchen im Nanometerbereich (10 – 1000 nm). Sie werden durch Polymerisation geeigneter Monomere oder durch Dispergieren bestehender Polymere hergestellt (Kreuter, 1983; Kreuter, 1991a; Allémann et al., 1993). Der Wirkstoff wird an sie adsorptiv, inkorporativ, durch ionische Wechselwirkungen oder kovalent gebunden. Makromolekulare Trägersysteme, an die Wirkstoffe üblicherweise kovalent gebunden werden, wie auch Nanopartikel sind geeignet, die Zirkulationszeit von Wirkstoffen im Körper zu verlängern bzw. ihre Elimination verlangsamen und dadurch die Halbwertszeit im Organismus zu erhöhen.

Arzneistoffträgersysteme in der Tumortherapie

Arzneistoffträgersysteme wie lösliche Makromoleküle und Nanopartikel reichern sich in Tumorzellen durch den EPR (Enhanced Permeability and Retention)-Effekt an. Die Anreicherung erfolgt aufgrund der hohen vaskulären Dichte in Tumoren verbunden mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Tumorgefäße. Diese erhöhte Durchlässigkeit ist auf eine fehlerhafte Gefäßarchitektur der Tumorgefäße, sowie eine durch Cytokine verursachte erhöhte Permeabilität zurückzuführen. Aufgrund einer verringerten oder fehlenden lymphatischen Drainage des Tumor-Interstitiums ist zusätzlich der Abtransport von Substanzen aus dem Tumor behindert (Matsumura & Maeda, 1986; Noguchi et al., 1998; Yuan et al., 1998).

Die Anwendung von verschiedenen Nanopartikelsystemen (Kreuter, 1991a; Beck et al., 1993; Allémann et al., 1996; Reszka et al., 1997; Yoo et al., 2000) und Makromolekülen (Sezaki & Hashida, 1984; Stehle et al., 1997a; Stehle et al., 1997b; Wunder et al., 1998; Gianasi et al., 1999; Stehle et al., 1999; Kopecek et

al., 2000; Minko et al., 2000) als Trägersysteme für antitumoral aktive Substanzen wurde in vivo bereits ausführlich dokumentiert. Die Verwendung von Trägersystemen führte in den unterschiedliche Studien durch Anreicherung der antitumoralen Substanzen im Tumorgewebe, durch Verlängerung der Verweildauer der Wirkstoffe im Körper und/oder durch Verringerung der Nebenwirkungen zu verbesserten antitumoralen Wirkungen. Verschiedene Zubereitungen, Nanopartikel als auch lösliche Trägersysteme, befanden bzw. befinden sich bereits in präklinischen und klinischen Studien (Kattan et al., 1992; Hartung et al., 1999; Julyan et al., 1999; Thomson et al., 1999; Vasey et al., 1999).

Nanopartikel in der HIV-Therapie

NP wurden auch zur Therapie von HIV-Infektionen untersucht. Dabei sollte ausgenutzt werden, daß sich Nanopartikel bevorzugt im MPS anreichern (Leu et al., 1984; Kreuter 1991a; Kreuter, 1991b; Kreuter, 1994), das bei HIV-Infektionen ein vielversprechendes Target darstellt. Eine Anreicherung von antiretroviralen Wirkstoffen in Makrophagen konnte in vitro und in vivo gezeigt werden (Schäfer et al., 1992; Bender et al., 1994; Leroux et al., 1995; Bender et al., 1996; Löbenberg & Kreuter 1996; Löbenberg et al., 1998a; Löbenberg et al., 1998b). In vitro wurde eine Erhöhung der anti-HIV-Wirkung von Saquinavir in infizierten Makrophagen gezeigt (Bender et al., 1996).

Arzneistoffträgersysteme in der HCMV-Therapie

HCMV befällt bevorzugt endotheliale Zellen, epitheliale Zellen, die glatte Muskulatur und Fibroblasten (Plachter et al., 1996). Es ist jedoch bekannt, daß HCMV auch Monocyten und Makrophagen infizieren und dort sowohl zu latenten als auch zu produktiven Infektionen führen können (Ibanez et al., 1991; Fish et al., 1996; Sinclair & Sissons, 1996; Sinzger et al., 1996; Jahn et al., 1999; Onno et al., 2000). Hierbei dienen Vorläuferzellen im Knochenmark eventuell als Virusreservoir (Minton et al., 1994). In diesem Zusammenhang wird eine Beteiligung der Monocyten und Makrophagen bei der Ausbreitung des Virus im Körper postuliert. Dieser Virustransport durch Monocyten und Makrophagen stellt auch eine Erklärung für den Multiorganbefall durch HCMV bei akuten Infektionen dar (Ibanez et al., 1991; Plachter et al., 1996; Sinzger et al., 1996). Daher sind Monocyten und

2 Theoretischer Hintergrund

Makrophagen, in denen sich Arzneistoff-Trägersysteme effektiv anreichern, ein attraktives Ziel für die Therapie mit anti-HCMV-Wirkstoffen.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß sich Nanopartikel, Mikropartikel und Polymere in entzündeten Geweben anreichern (De Schrijver et al., 1987; Alpar et al., 1989; Seale et al., 1992; Kreuter, 1994). Folglich sollten sich Trägersysteme auch in durch HCMV verursachten akuten Entzündungen anreichern können und dadurch antivirale Arzneistoffe an den Wirkort bringen.

3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit gliederte sich in 3 Teilbereiche.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Metallchelator EDDS auf seine antiviralen Eigenschaften gegenüber HCMV in vitro und in vivo untersucht. Bei den in vivo Versuchen wurden gleichzeitig DTPA und DFO getestet, da die Datenlage zu deren Anwendung im Organismus widersprüchlich ist.

Der zweite Teil befaßte sich mit der Entwicklung und in vitro Testung von Konjugaten aus DTPA und peptidischen Trägersystemen (gelösten HSA- und Gelatine-Molekülen, HSA- und Gelatine-NP), da entsprechende Konjugate prinzipiell geeignet sind die beschriebenen pharmakokinetischen Probleme der Metallchelatoren zu überwinden. Da die antitumorale Wirkung verschiedener Metallchelatoren bekannt ist, wurde die in vitro Testung in Tumor- und in Virus-Modellen durchgeführt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde ein Nanopartikelträgersystem für das antitumoral aktive Enzym BS-RNase entwickelt, da dieses Enzym trotz vielversprechender Wirkungen in vitro und bei intratumoraler Applikation bei systemischer Gabe bisher nur unzureichend wirksam war. Die antitumorale Wirkung der partikulären Zubereitung wurde in vitro in verschiedenen Testsystemen untersucht.

4 In vitro und in vivo Testung von Metallchelatoren

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Bezugsquellen

<i>CaNa₃DTPA (Antiron)</i>	<i>Astrapin, Pfaffen-Schwabenheim</i>
<i>Cidofovir (Vistide)</i>	<i>Pharmacia & Upjohn, Erlangen</i>
<i>Dextransulfat (MW 5000)</i>	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
<i>DFO (Desferal)</i>	<i>Ciba-Geigy, Basel, Schweiz</i>
<i>EDDS</i>	<i>AnalytiCon AG, Potsdam</i>
<i>Ganciclovir (Cymeven)</i>	<i>Hoffmann-La Roche AG</i> <i>Grenzach-Wyhlen</i>
<i>HSV-1 KOS</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>HSV-2 G</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>Humane embryonische Lungenfibroblasten (HEL)</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>VR 194 (MCMV)</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>Zellkulturmedien und -zubehör</i>	<i>Seromed, Berlin</i>

4.1.2 Zellen und Viren

Die hier aufgeführten Zellkulturarbeiten wurden unter der Leitung von Univ.Doz. Dr. J. Cinatl am Institut für Medizinische Virologie, Zentrum der Hygiene, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität/Frankfurt am Main durchgeführt. Die in-vivo-Arbeiten wurden am Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven (Belgien) von Dr. J. Neyts durchgeführt.

Humane embryonische Lungenfibroblasten (HEL) einer niedrigen Passage wurden für die Zytotoxizitäts-Testung und die HCMV-Versuche genutzt. Die Kultivierung erfolgte in 96-Well Microtiter-Platten. Folgende HCMV-Stämme wurden verwendet: der Strain Davis (Referenz), ein klinisches Wildtyp-Isolat (CMV5usa), die UL97-defekten GCV-resistenten Isolate CMV6usa, LY9990, U9070 und der GCV- und HPMP- resistente Stamm Der530, der Defekte in den viralen Polymerasen aufweist (Snoeck et al., 1996).

Die Replikation von HSV-1 und HSV-2 wurde in Vero Zellen untersucht. Zur Bestimmung der anti-HSV-1 und HSV-2-Aktivität wurden der HSV-1-Stamm KOS und der HSV-2-Stamm G verwendet. Die Zellen wurden in EMEM mit 10 % FBS kultiviert.

Die Bestände an murinem Zytomegalievirus (MCMV) wurden, wie bereits beschrieben (Neyts et al., 1993) aus homogenisierten Speicheldrüsen von NMRI-Mäusen gewonnen, die mit einer subletalen MCMV-Dosis infiziert worden waren.

4.1.3 Cytotoxizitätsbestimmung

Die in-vitro-Cytotoxizität wurde mit Hilfe des MTT-Tests in HEL-Zellen bestimmt (Mosmann, 1983). Die Bestimmung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Cinatl et al., 1996a). HEL-Zellen wurden in einer Dichte von 4000 Zellen/100 µl in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und für 12 h bei 37°C bis zur Adhäsion inkubiert. Lösungen verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen in EMEM mit 10 % FBS wurden zugegeben. Reines Medium mit 10 % FBS dient als Kontrolle. Nach 4 Inkubationstagen wurde MTT-Lösung zugegeben und die Zellen damit 4 h inkubiert. Nach Zugabe von 20 %iger (w/v) Natriumdodecylsulfatlösung in 50 %iger Dimethylformamidlösung wurde die Absorption bei 570 nm in einem Multi-Well-ELISA-Reader bestimmt. Die Hintergrund-Absorption wurde abgezogen, und die Ergebnisse wurden in Prozent relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

4.1.4 Virustitration

HEL-Zellen und Vero Zellen wurden in EMEM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin und 0.3 % Natriumcarbonat kultiviert. Die Verdünnung der Virus-Lösungen erfolgte in log₁₀-Stufen mit MEM mit 2 % FBS, 1 % L-Glutamin und 0,3 % Natriumcarbonat benutzt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit 70 %igem Ethanol fixiert und mit 2,5 %iger Giemsa-Lösung, die zur Anfärbung der nicht virusinfizierten Zellen dient, gefärbt. Virale Plaques wurden bei 40-facher Vergrößerung im Mikroskop detektiert. Die Einteilung erfolgte in positiv (viruspezifische morphologische Veränderungen feststellbar) und negativ (keine viruspezifischen morphologische Veränderungen feststellbar). Die Berechnung des Virustiters, bei dem 50 % der

infizierten Zellkulturen ein positives Resultat zeigten ($TCID_{50}$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$TCID_{50} = 10^{Y_0 - \frac{d}{2} + \frac{d}{n} \times \sum Y_i \times \frac{1000}{v}}$$

Y_0 = positiver Exponent der höchsten Verdünnung, in der alle Proben positiv positiv reagieren

d = Dosisabstand der Logarithmen

n = Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Proben

$\sum Y_i$ = Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Proben

v = Inokulationsvolumen/Vertiefung in μ l

4.1.5 Plaque reduction assay

HEL- bzw. Vero-Zellmonolayer in 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit 100 PFU pro Well versetzt. Die infizierten Zellen wurden 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die verschiedenen Arzneistoffe wurden in verschiedenen Verdünnungen zugesetzt. Im Falle von HCMV wurden die Kulturen für weitere 7 bis 8 Tage, im Falle von HSV weitere 2-3 Tage inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 70 % Ethanol fixiert und mit 2,5 % Giemsa-Lösung gefärbt. Die zytopathogenen Effekte (CPE) wurden anhand einer Skala von 0 bis 5 mikroskopisch bestimmt. 0 bedeutet, daß keine CPE vorhanden sind, 5 bedeutet, daß die CPE vergleichbar der unbehandelten Viruskontrolle sind. Die antiviral wirksame Konzentration wurde als IC_{50} ausgedrückt. Die IC_{50} gibt die Konzentration an, bei der die Virus-induzierte Bildung von CPE bzw. von viralen Plaques um die Hälfte vermindert ist.

Um den Wirkungsmechanismus von EDDS mit antiviral aktiven Substanzen zu vergleichen, deren Wirkungsmechanismus bekannt ist, wurde EDDS zu verschiedenen Zeitpunkten des HCMV Replikationszyklus zugesetzt und die Wirkung mit der von Dextransulfat (MW 5000) bzw. Cidofovir (HPMPC) verglichen. Um den Einfluß von verschiedenen Virusmengen auf den antiviralen Effekt von EDDS zu untersuchen, wurden in einem weiteren Experiment HCMV-Konzentrationen von 100, 250, 330, 500 und 1000 PFU eingesetzt.

4.1.6 Tierexperimente

5- bis 6-Wochen alte SCID-Mäuse (C.B.-17 scid/scid Inzucht Stamm) mit einem Gewicht von ca. 20 g wurden verwendet. Die Mäuse wurden am Rega-Institut unter keimfreien Bedingungen gezüchtet und während der Experimente unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Infektion erfolgte i.p. mit 10^5 PFU MCMV in 0,2 ml EMEM injiziert. Die Test-Substanzen wurden s.c. in Volumina zu je 0,5 ml 2 mal täglich injiziert. Die Behandlung begann 2 h nach Infektion und erfolgte über 10 Tage im Falle von EDDS. Die mit DFO und DTPA behandelten Tiere wurden 12 Tage behandelt. Die Kontrolltiere wurden mit HPMPC (25 mg/kg/Tag) behandelt.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Antivirale Effekte von EDDS in vitro

4.2.1.1 Antivirale Wirksamkeit von EDDS gegenüber verschiedenen HCMV- und HSV-Stämmen

EDDS war vergleichbar aktiv gegenüber allen getesteten HCMV Stämmen (Tabelle 4.2.1.1.1). Hierunter befanden sich GCV-resistente und ein GCV- und HPMPC-resistenter Stamm. Die IC_{50} betrug zwischen 7 und 12 $\mu\text{g/ml}$. Im Gegensatz hierzu zeigte EDDS keine Wirkung gegenüber HSV-1 und nur eine geringe Wirkung gegenüber HSV-2 (Tabelle 4.2.1.1.1). Die Zellviabilität der HEL und Vero Zellen wurde in den getesteten Konzentrationen bis zu 250 $\mu\text{g/ml}$ nicht beeinflusst.

Tabelle 4.2.1.1.1 Wirksamkeit von EDDS gegenüber verschiedenen HCMV- und HSV-Stämmen (n = 3, die Standardabweichungen waren < 15 %).

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	EDDS	Ganciclovir	Cidofovir
HCMV:			
CMV5usa (WT)	12,0	0,6	-
CMV6usa (UL97 def.)	12,0	3,2	-
Ly9990 (UL97 def.)	10,5	> 50	0,4
U9070 (UL97 def.)	7,0	5,0	0,3
Dev530 (DNA pol def.)	9,6	7,7	44,0
Strain Davis	11,0	0,7	0,1
HSV:			
HSV-1 (KOS)	> 250	-	-
HSV-2 (G)	30,0	-	-

4.2.1.2 Antivirale Wirkung von EDDS bei Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten des HCMV-Replikationszyklus

EDDS wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des HCMV-Replikationszyklus zugesetzt (Tabelle 4.2.1.2.1). Bei Gabe während der Virus-Adsorption zeigte EDDS keinen Effekt auf die Virusreplikation. Das als Referenzsubstanz eingesetzte Dextran-Sulfat, das bekanntermaßen die Virusbindung einer Reihe von Viren hemmt (Neyts et al., 1995), inhibierte hingegen die Virusreplikation. Im Gegensatz zu Cidofovir, dessen Wirkung bei späterer Zugabe deutlich abnahm, konnte EDDS bis zu 48 h nach Virusadsorption gegeben werden, ohne daß es zu einem Wirkungsverlust kam.

Tab. 4.2.1.2.1 Einfluß von EDDS auf die HCMV Replikation bei Zugabe zu verschiedenen Zeiten des Replikationszyklus.

	IC ₅₀ (µg/ml)		
	EDDS	Dextransulfat MW 5000	Cidofovir
Antivirales Agens zugegeben			
1. zusammen mit dem Virus	> 100	0.1	
2. nach Virusadsorption	12	> 20	0,07
3. 24 h nach Virusadsorption	12	> 20	0,1
4. 48 h nach Virusadsorption	16	> 20	0,5

4.2.1.3 Einfluß der Viruslast auf die antivirale Wirkung von EDDS

Der Einfluß der Viruslast auf die EDDS-Wirkung ist in Tabelle 4.2.1.3.1 dargestellt. Die IC₅₀ Werte stiegen mit erhöhter Viruslast an. Bei allen Virus-Konzentrationen führte eine Zugabe von EDDS in einer Konzentration von 50 µg/ml zu einer vollständigen Inhibition der Virus-Replikation.

Tabelle 4.2.1.3.1 Einfluß von EDDS auf die HCMV (Strain Davis) Replikation bei unterschiedlich hoher Viruslast.

PFU/100µl	IC₅₀ (µg/ml)
1000	30
500	24
330	8
250	10
200	10

4.2.2 Antivirale Wirksamkeit der Metallchelatoren EDDS, DTPA und DFO in Mäusen

4.2.2.1 Einfluß von EDDS auf die MCMV-induzierte Mortalität in SCID Mäusen

EDDS, verabreicht in einer Dosis von 1000 mg/kg/Tag zeigte einen gewissen protektiven Effekt gegenüber einer letalen MCMV-Infektion in SCID-Mäusen. Höhere Dosen führten zu einer Lebenszeit-verkürzenden Toxizität (Tabelle 4.2.2.1.1).

Tabelle 4.2.2.1.1. Einfluß von EDDS auf die MCMV-induzierte Mortalität in SCID Mäusen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Behandlung	Mittlerer Todestag	Überlebende ^a
Virus Kontrolle	12,6 \pm 2,8	0/13
EDDS		
6000 mg/kg/Tag	7,2 \pm 5,6 ^b	0/7
3000 mg/kg/Tag	12,0 \pm 4,9	0/8
1000 mg/kg/Tag	17,2 \pm 4,7	0/8
500 mg/kg/Tag	10,7 \pm 0,7	0/8
250 mg/kg/Tag	10,5 \pm 1,2	0/8
Cidofovir		
25 mg/kg/Tag	> 25	8/8

^a 25 Tage nach MCMV Infektion

^b $p < 0,05$

4.2.2.2 Einfluß von DTPA und DFO auf die MCMV-induzierte Mortalität in SCID-Mäusen

Die mit DFO behandelten Mäuse starben früher, als die unbehandelten Mäuse. Dies deutet auf eine Toxizität der Substanz in den eingesetzten Dosen hin (Tabelle 4.2.2.2.1). Ebenfalls in Tabelle 4.2.2.2.1 ist der Einfluß von DTPA auf den Krankheitsverlauf von MCMV-infizierten SCID-Mäusen gezeigt. In den niedrigen getesteten Dosen (100 mg/kg/Tag, 200 mg/kg/Tag) war ein geringer protektiver Effekt erkennbar. Bei einer Behandlung mit 400 mg/kg/Tag kam es offenbar zu toxischen Effekten, wodurch die Überlebenszeit der behandelten Mäuse gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verkürzt war.

Tabelle 4.2.2.2.1. Einfluß von DTPA und DFO auf die MCMV-induzierte Mortalität in SCID-Mäusen

Behandlung	Mittlerer Todestag	Überlebende
Virus Kontrolle	10,6 ± 3,3	0/10
DTPA:		
400 mg/kg/Tag	7,4 ± 0,5	0/5
200 mg/kg/Tag	14,6 ± 4,1	0/5
100 mg/kg/Tag	13,6 ± 3,5	0/5
DFO:		
200 mg/kg/Tag	8,4 ± 0,5	0/5
50 mg/kg/Tag	8,2 ± 0,8	0/5

4.3 Diskussion

4.3.1 Antivirale Wirkung von EDDS in vitro

Im in-vitro-Teil dieser Untersuchungen wurde EDDS auf seine Wirksamkeit gegenüber HCMV- und HSV-Infektionen in Zellkultur untersucht. Während EDDS gegenüber HSV-1 und HSV-2 Infektionen unwirksam bzw. nur schwach wirksam war, wurde die Replikation von allen untersuchten Virusstämmen, einschließlich der GCV- und HPMPC-resistenten Stämme, in vergleichbaren Konzentrationen gehemmt. Dies weist darauf hin, daß der antivirale Wirkmechanismus des EDDS sich von den Wirkmechanismen der Nucleosid-Analoga GCV und HPMPC unterscheidet. EDDS wirkte nicht gegen HSV-Infektionen, gegen die GCV und HPMPC wirksam sind. Es inhibierte jedoch die Replikation der GCV- und HPMPC-resistenten HCMV-Stämme, sowie des sensitiven Vergleichsstammes Davis.

Bei Zugabe von EDDS zu verschiedenen Zeitpunkten des Virusreplikationszyklus zeigte sich ebenfalls der ihm eigene Wirkmechanismus. Während keine Interferenz mit der Virusadsorption festgestellt werden konnte, war es bei Gabe bis zu 48 h nach Virusadsorption unverändert wirksam. Im Gegensatz hierzu nahm die Wirksamkeit von HPMPC bei späterer Gabe ab.

Die bei der in-vitro-Untersuchung von EDDS erzielten Ergebnissen stehen im Einklang mit den bei der Untersuchung von DTPA erzielten Ergebnissen (Cinatl et al., 1996a). Ein vergleichbarer Wirkmechanismus ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Chelatoren denkbar. Obwohl die Fähigkeit von EDDS Zellmembranen zu überwinden nicht untersucht wurde, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesem äußerst hydrophilen Molekül, wie bei DTPA, um einen extrazellulären Chelator handelt.

Diese vergleichbare Wirkung wird durch die bisherigen in-vitro-Untersuchungen zur antiviralen Wirkung von DTPA unterstützt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die HCMV-Morphogenese mit hoher Wahrscheinlichkeit beim Zusammenbau der Viren oder beim Knospen der Viren aus der Kernmembran durch DTPA gehemmt wurde. Virale Nukleokapside waren

in mit DTPA behandelten und unbehandelten HCMV-infizierten HFF vorhanden. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen, konnten jedoch in den mit DTPA behandelten Zellen keine viralen Partikel mit Hülle, „dense bodies“ oder reife extrazelluläre Viruspartikel festgestellt werden (Cinatl et al., 1996a). Diese Beobachtung stimmt mit den vorliegenden Untersuchungen überein, die zeigten, daß EDDS auch zu einem späten Zugabezeitpunkt wirksam war und damit seinen Angriffspunkt am Ende der Virusreplikation hatte.

Ein weiteres Indiz für einen verwandten Wirkmechanismus von EDDS und DTPA ist die selektive Wirkung von DTPA gegen HCMV, wobei die Replikation von HSV-1 nicht gehemmt wurde (Cinatl et al., 1996a). Das gleiche Ergebnis wurde bei den hier beschriebenen Untersuchungen mit EDDS erzielt.

Mit Erhöhung der Viruslast stieg auch die IC_{50} an. Dies weist darauf hin, daß der Wirkungsmechanismus zumindest nicht allein auf der Komplexbildung von Metall-Ionen beruht. Wäre dies der Fall, sollte die Virusreplikation ab einer bestimmten EDDS-Menge, die ein bestimmtes Quantum Metall-Ionen komplexiert, unabhängig von der Viruslast, gehemmt sein.

4.3.2 Antivirale Wirkung von EDDS, DTPA und DFO in vivo

Die in vivo Untersuchungen in Mäusen führten zu vergleichbaren Ergebnissen, wie sie bereits bei der Verwendung von DFO und DTPA in Ratten erzielt wurden (Kloover et al., 1999). Es wurde kein oder nur ein schwach protektiver Effekt bei der Verwendung von EDDS und DTPA festgestellt. DTPA führte in hohen Dosierungen, DFO in allen Dosierungen zu einer Verkürzung der Lebenszeit, was auf toxische Effekte hinweist. HPMPD führte bei allen Mäusen zu einem Überleben bis Tag 25, an dem die Experimente beendet wurden.

Die Unwirksamkeit von DFO, DTPA und EDDS gegenüber CMV-Infektionen in vivo ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften zurückzuführen. Die Pharmakokinetik von DTPA und DFO ist intensiv untersucht worden (Peters et al., 1966; Guilmette et al., 1978; ; Durbin & Schmidt, 1989; Durbin et al., 1997; Dragsten et al., 2000). Sie werden schnell aus dem Körper eliminiert. Dies ist für ihre Anwendung zur Entfernung von Metallionen

aus dem Körper Voraussetzung (Kirking, 1991; Wagner et al., 1994; Porru & Alessio, 1996; Staudinger & Roth, 1998). Bei der Behandlung viraler Infektionen führt dies jedoch dazu, daß antiviral wirksame Konzentrationen im Körper nicht erzielt werden können oder, daß das Erreichen entsprechender Spiegel mit toxischen Nebenwirkungen verbunden ist. Die Pharmakokinetik von EDDS ist bisher noch nicht untersucht worden. Jedoch weisen das in vitro und in vivo Verhalten, sowie die chemisch dem DTPA nah verwandte Struktur darauf hin, daß die Pharmakokinetik der von DTPA vergleichbar sein sollte.

Der Widerspruch zu Studien, in denen DFO erfolgreich in vivo zur Beherrschung von CMV-Infektionen eingesetzt wurden (Gümbel et al., 1995; Martelius et al., 1999), konnte jedoch nicht beseitigt werden. Eventuell ist der erfolgreiche Einsatz in den beschriebenen Fällen auf die immunmodulatorischen Eigenschaften zurückzuführen (Lipsky & Lietman; Soyano et al., 1984; Bownen et al., 1984; Bradley et al., 1986; Weinberg et al., 1986; Cinatl et al., 1995a). Als in-vivo-anti-CMV-Wirkstoffe sind EDDS, DTPA und DFO nach den vorliegenden Daten bei alleiniger Gabe ungeeignet. Eine endgültige Bewertung der Metallchelatoren im Hinblick auf ihren in-vivo-Einsatz als immunmodulatorische Agenzien steht noch aus. Es ist jedoch auch hier kritisch anzumerken, daß die Behandlung lokaler RCMV-induzierter Entzündungen in Ratten nicht erfolgreich war (Kloover et al., 1999).

4.3.3 Schlußfolgerung

Eine abschließende Bewertung der Metallchelatoren DTPA, DTPA und DFO als antivirale Agenzien ist aufgrund der aktuellen Datenlage nicht möglich. Eine direkte Anwendung als anti-HCMV-Wirkstoffe erscheint aufgrund der beschriebenen Datenlage nicht möglich. Trotzdem handelt es sich bei den untersuchten Metallchelatoren um interessante antivirale Substanzen, da in vitro die Replikation Therapie-resistenter HCMV-Stämme inhibiert werden konnte. Daher kommt der exakten Aufklärung des Wirkungsmechanismus große Bedeutung zu. Mit Hilfe neuer Erkenntnisse über die exakte Wirkung der Chelatoren könnte die

4 In vitro und in vivo Testung von Metallchelatoren

Entwicklung neuer, spezifischer und weniger toxischer antiviraler Substanzen ermöglicht werden.

Ein zweiter Ansatz, der sich aus den bisher gewonnen Erkenntnissen ergibt, ist die Entwicklung von Arzneistoffträgersystemen, die die Aufenthaltsdauer der Chelatoren im Körper erhöhen. Dadurch könnte es möglich sein, die applizierte Chelatorosis und damit die Toxizität zu senken.

5 Entwicklung von peptidischen Trägersystemen für Metallchelatoren und in vitro-Evaluierung

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Bezugsquellen

<i>Aceton p.a.</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Albumin (human, Fraction V, Art.-Nr. A-1653)</i>	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
<i>Aluminium boats 0,12 ml</i>	<i>Lüdi AG, Flawil, Schweiz</i>
<i>Autosampler WISP 712</i>	<i>Waters, Eschborn</i>
<i>Bismut(III)-nitrat basisch sehr leicht reinst</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Calciumcarbonat DAB 10</i>	<i>Wasserfuhr GmbH, Bonn</i>
<i>CCD Video Camera LDH 0460</i>	<i>Philips, Niederlande</i>
<i>Centrifuge 5415 D</i>	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg</i>
<i>Dampfsterilisator Typ GEV 506</i>	<i>Getinge, Getinge, Schweden</i>
<i>Desferal (Desferrioxamin-Mesylat)</i>	<i>Ciba-Geigy, Basel, Schweiz</i>
<i>Diethylentriamin-pentaessigsäure purum</i>	<i>Fluka Chemie, Buchs, Schweiz</i>
<i>DTPA-Anhydrid</i>	<i>Fluka Chemie, Buchs, Schweiz</i>
<i>Eisen(III)chlorid</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Ethanol 96 % p.a.</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Gelatine Typ B (75 Bloom)</i>	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
<i>Glutaraldehyd-Lösung 8 %</i>	<i>Fluka Chemie, Buchs, Schweiz</i>
<i>Glutaraldehyd-Lösung 25 %</i>	<i>Fluka Chemie, Buchs, Schweiz</i>
<i>GPC-Säule TSKgel G 3000 SWXL 7,8 ´ 30 cm</i>	<i>TosoHaas, Stuttgart</i>
<i>HCMV (Stamm AD 169)</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>He-Ne-Laser MN 05-LHP-991</i>	<i>Melles Griot, Carlsbad, USA</i>
<i>Integrationssystem Maxima 825</i>	<i>Waters, Eschborn</i>
<i>72 kDa IEA (Antikörper gegen IE)</i>	<i>DuPont, Bad Homburg</i>
<i>Korrelator BI2030AT</i>	<i>Brookhaven, Holtsville, USA</i>
<i>Kupfer(II)acetat</i>	<i>Meck, Darmstadt</i>
<i>Laser Zee Meter Model 5</i>	<i>Penkam Inc., Bedford Hills, New York, USA</i>
<i>microcon 3 Ultrazentrifugationseinheiten</i>	<i>Amicon, Witten</i>

<i>Minisart NML 0,8 µm steril</i>	<i>Sartorius, Göttingen</i>
<i>Natriumhydrogencarbonat</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Natriumhydroxid Plätzchen reinst</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Natronlauge 1M bzw. 0,1M</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>NaH₂PO₄ · H₂O</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Na₂HPO₄ · 2 H₂O</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Na₂SO₄</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>PCS-Meßgerät Goniometer BI-200SM</i>	<i>Brookhaven, Holtsville, USA</i>
<i>Perchlorsäure, etwa 70 %</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Pumpe W600 E</i>	<i>Waters, Eschborn</i>
<i>Sartorius Supermicro Waage</i>	<i>Sartorius, Göttingen</i>
<i>S/W-Monitor LDH 2132/10</i>	<i>Philips, Niederlande</i>
<i>Trockenschrank</i>	<i>Ehret, Emmendingen</i>
<i>U3000 Spectrophotometer</i>	<i>Hitachi, Berkshire, Großbritannien</i>
<i>Ultraschallbad Transsonic digital</i>	<i>Elma, Singen</i>
<i>UV-Detektor UV 486</i>	<i>Waters, Eschborn</i>
<i>Zellkulturmedien und -zubehör</i>	<i>Seromed, Berlin</i>

5.1.2 Analytik und präparative Arbeiten

5.1.2.1 Herstellung von CaNa₃DTPA

CaNa₃DTPA wurde als Vergleichssubstanz in Zellkulturexperimenten und zur Evaluierung der Herstellungsmethode genutzt.

Rezeptur:

H ₅ DTPA	7,912 g
CaCO ₃	2,054 g
NaOH	2,052 g
Aqua MilliQ ad	100,0 ml

Herstellung:

75 ml MilliQ-Wasser werden in einem 150 ml-Becherglas bei 60-70°C (Magnetrührer Stufe 3) erwärmt. Dann wird H₅DTPA zugegeben, das sich nicht vollkommen löst. Nach langsamer Zugabe von CaCO₃ entsteht eine leicht trübe gelbliche Lösung. Der pH-Wert wird mit NaOH-Lösung auf 7,5 eingestellt. Die

Lösung wird im Meßkolben auf 100,0 ml aufgefüllt und durch 0,8 µm-Membranfilter filtriert, wobei eine klare Lösung entsteht, und bei Bedarf autoklaviert (5.1.2.15).

5.1.2.2 Photometrische Bestimmung von DTPA

Zur photometrischen, quantitativen Bestimmung von DTPA wurde die von Edgaonkar et al. (1974) publizierte Methode modifiziert. Es wurden verschieden konzentrierte CaNa_3DTPA -Lösungen in Wasser in einem Volumenverhältnis von 1 zu 1 mit 0,1 % Bi(III) nitrat-Lösung versetzt, um den Konzentrationsbereich zu identifizieren in dem die gemessene Absorption linear mit der DTPA-Konzentration korreliert. Die Herstellung der Bi(III) nitrat-Lösung erfolgte durch Suspension von 0,1 g Bismut(III)nitrat in 75 ml Wasser. Dann wurde konzentrierte Perchlorsäure zugetropft bis sich das Bismutsalz löste (pH ca. 0,6) und anschließend mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Vermessung erfolgte photometrisch bei 270 nm.

5.1.2.3 Photometrische Bestimmung von DFO

Die quantitative Bestimmung von DFO erfolgte photometrisch über den Eisen(III)-Komplex.

Verschieden konzentrierte wäßrige DFO-Lösungen wurden im Verhältnis von 1 zu 1 mit 0,1 %iger wäßriger FeCl_3 -Lösung versetzt und anschließend bei 445 nm photometrisch vermessen, um den Konzentrationsbereich zu identifizieren, in dem die gemessene Absorption linear mit der DFO-Konzentration korrelierte.

5.1.2.4 Photometrische Bestimmung von EDDS

Verschieden konzentrierte wäßrige EDDS-Lösungen wurden im Verhältnis von 1 zu 1 mit 1 %iger Cu(II) acetat-Lösung versetzt und anschließend bei 655 nm photometrisch vermessen, um den Konzentrationsbereich zu identifizieren, in dem die gemessene Absorption linear mit der EDDS-Konzentration korrelierte.

5.1.2.5 Herstellung von HSA-Nanopartikeln

HSA-Nanopartikel wurden nach der von Weber et al. publizierten Methode hergestellt (Weber et al., 2000a; Weber et al., 2000b). 200 mg HSA wurden in 2 ml gereinigtem Wasser gelöst. Dann wurden tropfenweise 6 ml Ethanol unter Rühren

bis zur Partikelbildung zugegeben. Die Quervernetzung erfolgte durch Zugabe von 235 µl Glutaraldehyd 8 % und Rühren über Nacht. Am nächsten Tag wurden die quervernetzten Nanopartikel durch 5-maliges Abzentrifugieren (8 min, 20000 rcf) und Resuspendieren im Ultraschallbad in gereinigtem Wasser gereinigt. Anschließend wurden der Polymergehalt der Suspension (siehe 5.1.2.7) und die Größe der Nanopartikel (siehe 5.1.2.8) bestimmt.

5.1.2.6 Herstellung von Gelatine-Nanopartikeln (GelB-NP)

Die GelB-NP wurden nach der von Coester et al. publizierten Methode hergestellt (Coester et al., 2000). 1,25 g Gelatine wurden unter Rühren in 25 ml demineralisiertem Wasser bei 50°C gelöst. Nach der Bildung einer klaren Lösung und der Zugabe von 25 ml Aceton unter Rühren, bildete sich am Boden ein Niederschlag. Der Überstand wurde abdekantiert und der Niederschlag erneut in 25 ml demineralisiertem Wasser bei 50°C gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes der Lösung auf ca. 12, wurden langsam unter Rühren 50 ml Aceton zugegeben, wodurch die Gelatine erneut desolvatisiert wurde. Die entstandenen NP wurden durch Zugabe von 500 µl Glutaraldehyd-Lösung 25 % über Nacht quervernetzt. Die quervernetzten NP wurden dann durch Abzentrifugieren (10 min, 10000 rcf) und Redispergieren in gereinigtem Wasser unter Ultraschall 5-mal gewaschen. Anschließend wurden der Polymergehalt der Suspension (siehe 5.1.2.7) und die Größe der NP (siehe 5.1.2.8) bestimmt.

5.1.2.7 Bestimmung der Polymermasse der Nanopartikelsuspensionen

Die Polymermasse der erhaltenen NP-Suspensionen wurde über den Trocknungsverlust bestimmt. 50,0 µl NP-Suspension wurden in ausgewogene Aluminium-Boats pipettiert und im Trockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach abkühlen wurde der verbliebene Rückstand mit Hilfe der Analysenwaage bestimmt und der Polymergehalt berechnet.

5.1.2.8 Messung der Nanopartikelgrößen und der Größenverteilung

Die Bestimmung des hydrodynamischen Nanopartikeldurchmessers erfolgte mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) (Wagner, 1986; Bott, 1987;

Weiner, 1990; De Jaeger et al., 1991; Finsy & De Jaeger, 1991; Finsy et al., 1992; Finsy et al., 1993).

5.1.2.9 Zetapotentialmessung der Nanopartikel

Die Oberflächenladung der hergestellten Nanopartikel wurde als Zetapotential gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Mikroelektrophorese (Dittgen & Herbst, 1987).

5.1.2.10 Analyse der adsorptiven Bindung von DTPA an HSA

Zur Bestimmung der adsorptiven Bindung von DTPA an HSA wurden CaNa_3DTPA (Herstellung siehe 5.1.2.1) und durch Lösen von DTPA in verdünnter Natronlauge hergestelltes Na_5DTPA verwendet. Die Lösungen wurden mit in NaHCO_3 0,05 M pH 7,0 gelöstem HSA versetzt. Nach einstündigem Rühren wurde der gebundene DTPA-Anteil wie unter 4.1.1.12 beschrieben bestimmt.

5.1.2.11 Kovalente Bindung von DTPA an gelöste Proteine und Protein-Nanopartikel

Zur Bindung von DTPA an peptidische Trägersysteme wurde die von Hnatowich et al. publizierte Methode verwendet (Hnatowich & Schlegel, 1981; Hnatowich et al., 1983). 0,01 g DTPA-Anhydrid wurden vorgelegt. Dann wurden 10 ml unterschiedlich konzentrierte Proteinlösungen in 0,05 M NaHCO_3 -Puffer pH 7 bzw. Protein-NP-Suspensionen (Herstellung unter 5.1.2.5/ 5.1.2.6) in 0,05 M NaHCO_3 mit variierendem Proteingehalt zugegeben und ca. 1 h gerührt. Der an die peptidischen Trägersysteme gebundene DTPA-Anteil wurde wie unter 5.1.2.12 beschrieben bestimmt.

5.1.2.12 Analyse der Bindung von DTPA an peptidische Trägersysteme

Der gebundene Anteil des DTPA-Anhydrids wurde indirekt bestimmt. Die DTPA-Protein-Lösung bzw. DTPA-NP-Suspension wurde durch microcon 3 Ultrazentrifugationseinheiten filtriert (30 min, 10600 rcf). Durch photometrische Detektion der DTPA-Konzentration im Filtrat (5.1.2.2) wurde anschließend die ungebundene Fraktion kalkuliert. Die Bestimmung erfolgte relativ zu einer

äquivalent behandelten CaNa_3DTPA -Vergleichslösung. Die Absorption einer Protein- bzw. Protein-NP-Vergleichsprobe wurde ebenfalls ermittelt und von der Absorption des ungebundenen DTPA abgezogen. Der gebundene Anteil des DTPA an das Trägersystem wurde dann durch Subtraktion der ungebundenen DTPA-Menge von der eingesetzten DTPA- bzw. DTPA-Anhydrid-Menge ermittelt.

5.1.2.13 Kovalente Bindung von DFO an HSA-Nanopartikel

HSA-DFO-NP (HSA-NP mit kovalent gebundenem DFO) wurden über eine Quenching-Methode hergestellt. Die HSA-NP wurden wie unter 5.1.2.5 beschrieben hergestellt. 2 h nach der Zugabe des Glutaraldehyds wurde DFO-Lösung in einem Verhältnis von wässrige 60 mol DFO/mol HSA zugesetzt. Die Suspension wurde dann über Nacht rühren gelassen.

5.1.2.14 Bestimmung der Bindung von DFO an HSA-Nanopartikel

Die Bestimmung der Bindung von DFO erfolgte analog zu der unter 5.1.2.12 beschriebenen Methode zur Bestimmung der Bindung von DTPA an peptidische Trägersysteme. Nur wurde der ungebundene DFO-Anteil nach Ultrafiltration bei 445 nm nach Zugabe von FeCl_3 vermessen (siehe 5.1.2.3).

5.1.2.15 Autoklavierung

Sterilisation durch Autoklavieren wurde 20 min bei 2 bar und 121°C durchgeführt.

5.1.2.16 Bestimmung der Komplexbildungsfähigkeit von an peptidische Trägersysteme gebundenem DTPA

Die Komplexbildungsfähigkeit wurde nach der von Doan et al. publizierten Methode durchgeführt (Doan et al., 1975). $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ -Lösung hat ein Absorptionsmaximum bei 480 nm. DTPA bzw. das Protein-DTPA-Konjugat wird zu einer $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ -Lösung zugegeben. Das DTPA entzieht dann aufgrund seiner höheren Komplexbildungskonstanten dem $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ -Komplex Fe^{3+} -Ionen. Dadurch nimmt die Absorption ab. Über die Absorptionsabnahme kann die DTPA-Konzentration bestimmt werden.

5.1.2.17 Gel-Permeations-Chromatographie

<i>Fließmittel:</i>	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,1158 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	11,4788 g
	Na_2SO_4	14,2040 g
	MilliQ [®] -Wasser	ad 1000 ml

Die GPC wurde zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen von Proteinen genutzt. Es wurden Probenlösungen in einer Konzentration von 1 mg/ml Protein eingesetzt. Die Flußrate betrug 0,8 ml/min, die Laufzeit 20 min. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm.

5.1.3 Zellkultur-Versuche

Die Zellkultur-Versuche wurden unter der Leitung von Univ.-Doz. Dr. J. Cinatl am Institut für Medizinische Virologie, Zentrum der Hygiene, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität/Frankfurt am Main durchgeführt.

5.1.3.1 Zellen und Viren

Antivirale Versuche

HFF wurden in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) mit 10 % FBS kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Die HCMV wurden in HFF vermehrt und in EMEM mit 4 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zu den Zellen gegeben. Die Virustitration erfolgte analog zu 4.1.3, nur daß die virusbedingten Effekte nach der unter 5.1.3.3 beschriebenen Methode bestimmt wurde.

Antitumorale Versuche

Die NB- (UKF-NB-3) und Mammakarzinomzellen (MCF-7, MCF-R, BT474) wurden in Iscove's Modified Dulbeccos Medium (IMDM) supplementiert mit 10 % FBS kultiviert.

5.1.3.2 Cytotoxizitätsbestimmung

Die Cytotoxizität der untersuchten Zubereitungen wurde in vitro mit Hilfe des MTT-Testes bestimmt (Mosmann, 1983). Die unter 5.1.3.1 beschriebenen Zellen wurden in 96-Well-Microtiter-Platten in einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well ausplattiert. Dann wurden die Zellen mit Medium, das die Zubereitungen in verschiedenen

Konzentrationen enthielt, inkubiert. Nach 5-tägiger Behandlung erfolgte die Zugabe des MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, 1 mg/ml) und eine Inkubation der Platten bei 37°C für 4 h. Anschließend wurden die Zellen in einem Puffer, der 20 % (w/v) SDS und 50 % (v/v) N,N-Dimethylformamid bei einem pH-Wert von 4,5 enthielt, lysiert. Die Absorption wurde bei 570 nm in einem 96-Well-Multiscanner gemessen. Nach Abzug der Hintergrund-Absorption wurde die Viabilität der Zellen in Prozent relativ zu einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Aus der Zellviabilität wurde die Konzentration ermittelt bei der 50 % der Zellen zerstört waren (IC_{50}).

5.1.3.3 Antivirale Wirkung

Die antivirale Wirkung der untersuchten Zubereitungen wurde nach dem ELISA-Prinzip auf Monolayer humaner Vorhautfibroblasten (HFF) ermittelt (Cinatl et al., 1995a). Auf 24 Loch-Platten, in denen sich HFF als Monolayer befinden, wurde der zuvor durch Titration bestimmte HCMV-Überstand gegeben, wobei ca. 50 Plaques pro Loch erreicht werden sollten (ca. 0,3 ml/Loch). Jetzt wurde die Platte bei 37 °C 1-2 h im Brutschrank inkubiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Nach zwei-maligem Waschen mit PBS wurde anschließend der jeweilige antivirale Wirkstoff in absteigender Konzentration hinzu gegeben. Dabei mußten eine Reihe infizierter Zellen (ohne zu testendem Wirkstoff) als Referenz bereit gestellt werden. Nach 5–6 Tagen wurden die Plaques (infizierte Zellen) mit einem HCMV IE monoklonalen AK sichtbar gemacht, ausgezählt und als IC_{50} angegeben. Der IC_{50} gibt die Wirkstoffkonzentration an bei der die Zahl der infizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Viruskontrollen um die Hälfte verringert ist.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Analytik und präparative Arbeiten

5.2.1.1 Photometrische Bestimmung von DTPA

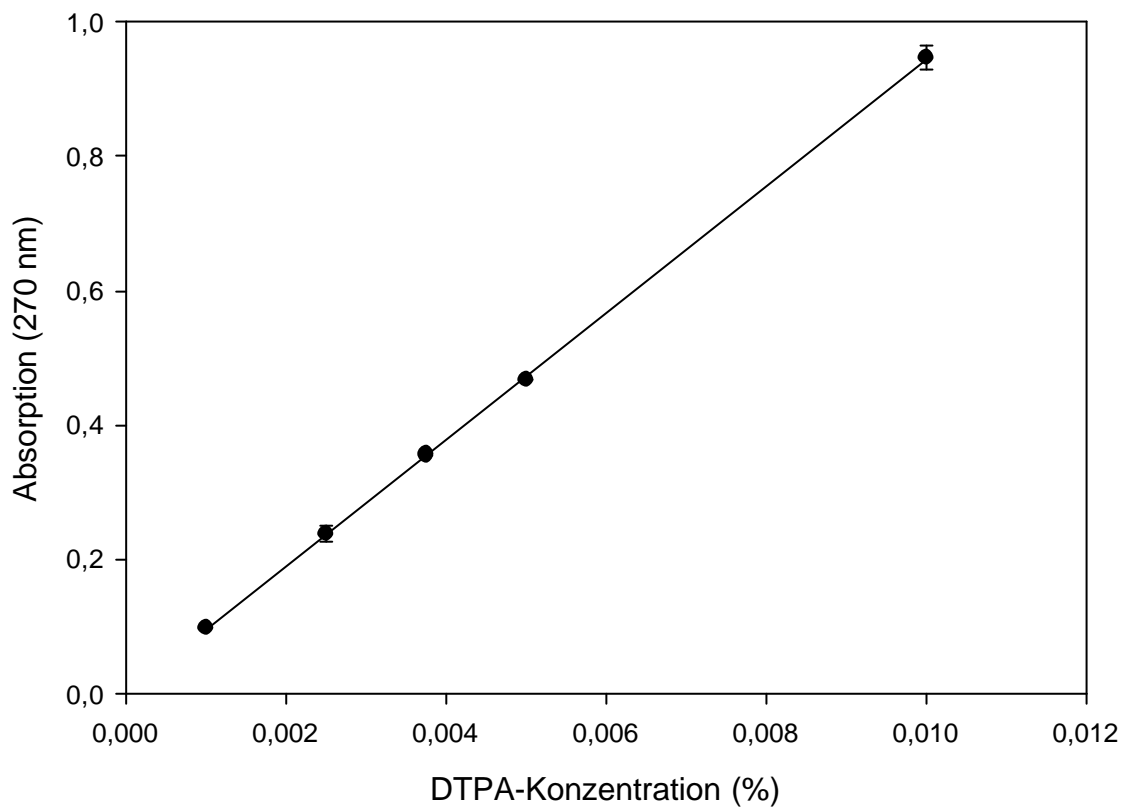
Es ließen sich Lösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,001 % (m/v) bestimmen (siehe Tabelle 5.2.1.1.1). Die CaNa_3DTPA -Lösungen wurden zur Bestimmung mit 0,1 %iger (m/v) Bi(III)nitrat-Lösung versetzt.

Tab. 5.2.1.1.1 Absorption von DTPA-Lösungen verschiedener Konzentrationen mit 0,1 %iger Bi(III)nitrat-Lösung (n = 3).

	Abs. (270 nm)
0,01 % DTPA	0,9475 ± 0,0186
0,005 % DTPA	0,4685 ± 0,0006
0,00375 % DTPA	0,3558 ± 0,0008
0,0025 % DTPA	0,2394 ± 0,0126
0,001 % DTPA	0,0984 ± 0,0007

Mit Hilfe einer linearen Regression ($r^2 = 0,9999$) wurde gezeigt, daß ein linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten DTPA-Konzentrationen und der Absorption bei 270 nm besteht:

Abbildung 5.2.1.1.1: Eichgerade für die Bestimmung von DTPA in einem Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,01 % (n = 3).



5.2.1.2 Photometrische Bestimmung von EDDS

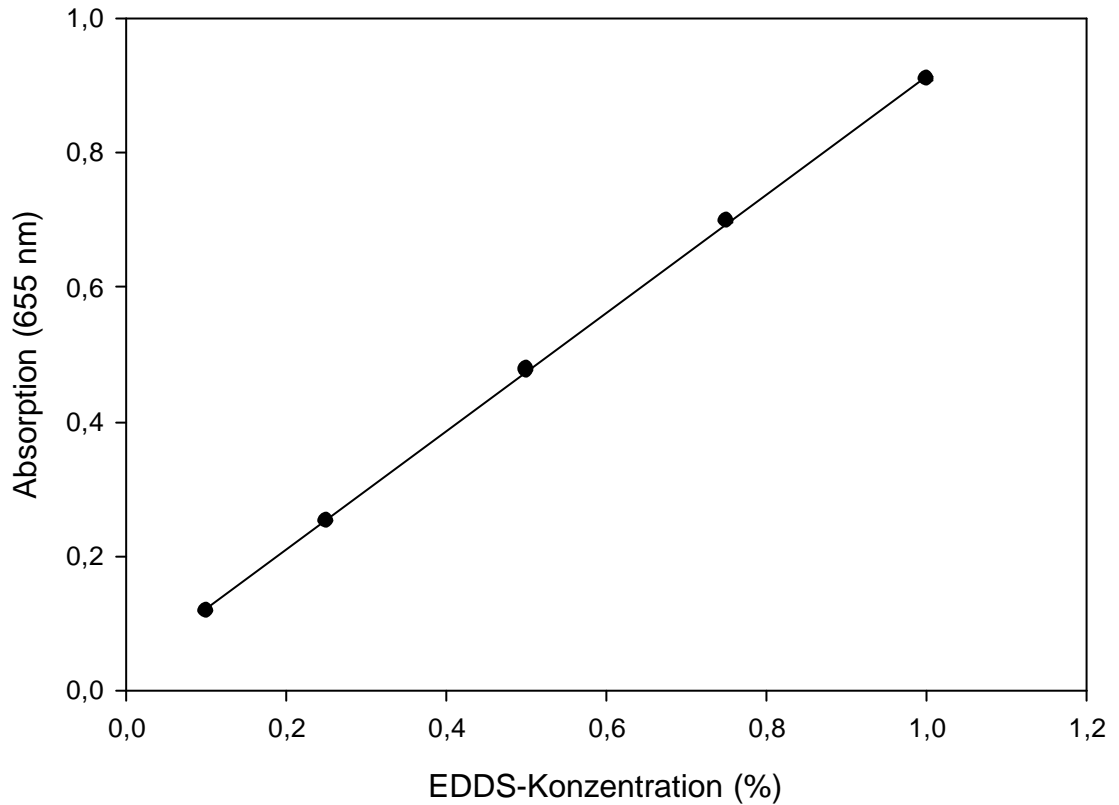
Es ließen sich EDDS-Lösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,01 % photometrisch bei 655 nm bestimmen. Die EDDS-Lösungen wurden zur Bestimmung in einem Volumenverhältnis von 1 zu 1 mit Cu(II)acetat-Lösung versetzt (Tab. 4.2.1.2.1).

Tab. 5.2.1.2.1 Absorption von EDDS-Lösungen verschiedener Konzentrationen versetzt mit Kupfer(II)acetat-Lösung 1 % bei 655 nm ($n = 3$).

Absorption bei 655 nm	
1 % EDDS	0,909 ± 0,003
0,75 % EDDS	0,696 ± 0,002
0,5 % EDDS	0,477 ± 0,003
0,25 % EDDS	0,253 ± 0,001
0,1% EDDS	0,119 ± 0,001

Mit Hilfe einer linearen Regression wurde nachgewiesen, daß die EDDS-Konzentration in dem untersuchten Bereich linear mit der Absorption bei 655 nm korrelierte ($r^2 = 0,9999$):

Abbildung 5.2.1.2.1: Eichgerade für die Bestimmung von EDDS in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 % (n = 3).



5.2.1.3 Photometrische Bestimmung von DFO

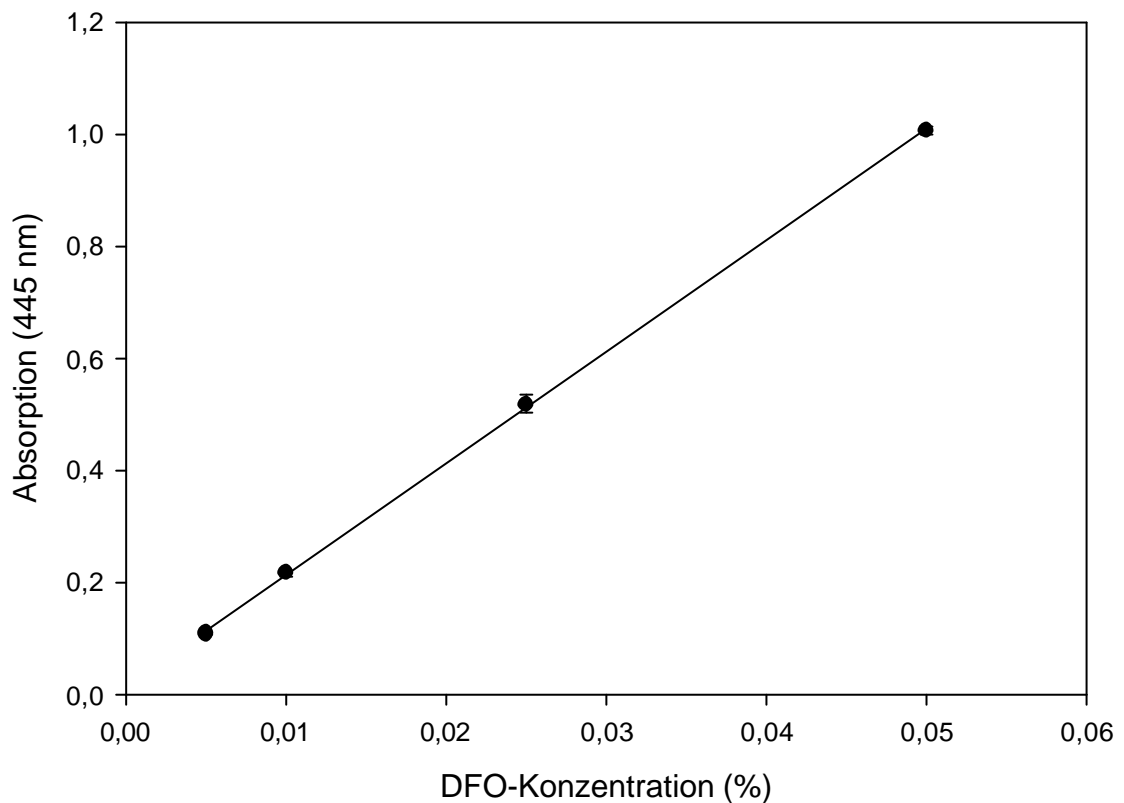
Es ließen sich DFO-Lösungen in Konzentrationen von 0,05 bis 0,005 % (Tab. 4.2.1.3.1) bestimmen. Hierbei waren eine frische Zubereitung der FeCl₃-Lösung und schnelle Messung notwendig, da die Absorption der Lösungen aufgrund des Fe³⁺-Überschusses infolge der Einstellung des Redoxgleichgewichtes $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ anstieg. Dieser Anstieg führte vor allem bei der Vermessung von Proben mit niedrigeren DFO-Konzentrationen zu einer Verfälschung der Meßergebnisse. Bei höheren DFO-Konzentrationen war die Veränderung der Absorption vernachlässigbar, da Fe³⁺ als DFO-Chelat-Komplex vor Redoxprozessen geschützt wurde.

Tab. 5.2.1.3.1 DFO-Lösung in verschiedenen Konzentrationen versetzt mit Eisen(III)chlorid-Lösung

	Absorption (445 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der FeCl ₃ -Lösung (n = 3)		
	sofort	nach 5 min	nach 1 h
0,05 % DFO	1,008 ± 0,007	1,000 ± 0,003	0,996 ± 0,008
0,025 % DFO	0,519 ± 0,016	0,519 ± 0,016	0,549 ± 0,028
0,01 % DFO	0,218 ± 0,006	0,220 ± 0,006	0,271 ± 0,005
0,005 % DFO	0,109 ± 0,001	0,113 ± 0,002	0,177 ± 0,010

Um nachzuweisen, daß die Absorption der Fe^{3+} -DFO-Komplexe in dem untersuchten Bereich tatsächlich linear mit ihrer Konzentration korreliert, wurde eine Eichgerade ($r^2 = 0,9998$) angefertigt:

Abbildung 5.2.1.3.1: Eichgerade für die Bestimmung von DFO in einem Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,05 % (n = 3).



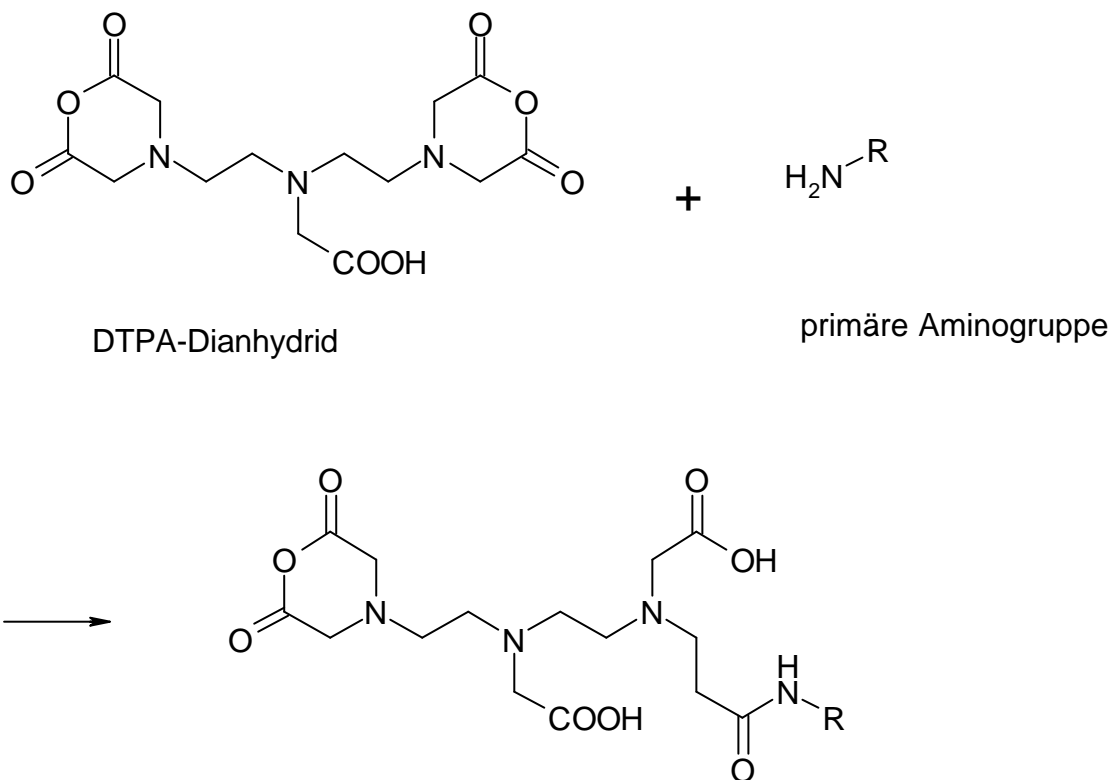
5.2.1.4 Adsorptive Bindung von DTPA an peptidische Trägersysteme

Es konnte keine adsorptive Bindung von DTPA an die verwendeten peptidischen Trägersysteme festgestellt werden. Die eingesetzte DTPA-Menge wurde nach Inkubation mit HSA, HSA-NP, GelB und GelB-NP und Filtration durch Ultrazentrifugationseinheiten mit einer Ausschlußgrenze von 3000 Da quantitativ im Filtrat wiedergefunden.

5.2.1.5 Kovalente Bindung von DTPA an humanes Serumalbumin

Die Bindung von DTPA an HSA erfolgte über das DTPA-Anhydrid (Hnatowich & Schlegel, 1981, Hnatowich et al., 1983). Hierzu wird das Dianhydrid von DTPA verwendet. Die Aminogruppen reagieren im Rahmen einer nucleophilen Substitution mit der Anhydridfunktion, wodurch eine Amidbindung entsteht:

Abbildung 5.2.1.5.1: Nucleophile Substitution des DTPA-Anhydrids mit primären Aminen.



Der Anteil des eingesetzten DTPA-Anhydrids, das an HSA gebunden wurde, hing vor allem von der Qualität des eingesetzten Anhydrids ab. Anhydride sind hydrolyseempfindliche Substanzen. Bei Kontakt des Anhydrids mit Wasser, z.B. bei Kontakt mit Luftfeuchtigkeit, entsteht das nicht reaktive DTPA. Daher wurde

frisch geöffnetes DTPA-Anhydrid, das vom Hersteller unter Schutzatmosphäre geliefert wurde, zu einem wesentlich größeren Anteil an HSA gebunden, als Anhydrid aus längere Zeit geöffneten Verpackungen. Es wurden je nach Qualität zwischen 9,11 % und 57,84 % der eingesetzten DTPA-Anhydrid-Menge an HSA gebunden. Der gebundene Anteil war unabhängig von der zugegebenen HSA-Menge, so lange die Aminogruppen des HSA im Überschuß vorlagen.

Bei der Verwendung von DTPA-Anhydrid aus einem Gefäß zu einem definierten Zeitpunkt, verlief die Bindung jedoch reproduzierbar ab (Tab. 5.2.1.5.1).

Tabelle 5.2.1.5.1. Bindung von DTPA an HSA über das DTPA-Anhydrid (molares Verhältnis DTPA-Anhydrid/ HSA 80:1, Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 6).

Molares Verhältnis DTPA/HSA im Konjugat	9,3 \pm 1,1
Anteil des eingesetzten DTPA-Anhydrid, das an das HSA gebunden hat (%)	12,0 \pm 1,9

Durch Variation der zugesetzten HSA-Menge war das molare Verhältnis von DTPA zu HSA im Konjugat, unter Berücksichtigung der Qualität des genutzten Anhydrids, steuerbar. Dies wurde in 2 exemplarischen Versuchen belegt (Tab. 5.2.1.5.2).

Tabelle 5.2.1.5.2. Steuerung des molaren Verhältnis DTPA/HSA im Konjugat durch Einsatz verschiedener molarer Ausgangsverhältnisse DTPA-Anhydrid zu HSA.

Versuch 1

Molares Verhältnis DTPA-Anhydrid/HSA	Moleküle DTPA/HSA-Molekül im Konjugat	%-Anteil des eingesetzten DTPA-Anhydrid, das an HSA gebunden hat
10:1	1,3	13,0
20:1	3,9	19,3
40:1	7,4	18,4

Versuch 2

molares Verhältnis DTPA-Anhydrid/HSA	Moleküle DTPA/HSA-Molekül im Konjugat	%-Anteil des eingesetzten DTPA-Anhydrid, das an HSA gebunden hat
10:1	2,1	20,6
20:1	3,1	15,4
40:1	7,3	18,1
80:1	13,1	16,3

5.2.1.6 Kovalente Bindung von DTPA an Gelatine

Die kovalente Bindung von DTPA an Gelatine erfolgte wie unter 5.1.2.11 beschrieben nach der Methode von Hnatowich et al. (Hnatowich & Schlegel, 1981; Hnatowich et al., 1983). Es wurde Gelatine Typ B verwendet. Auch hier schwankte der Anteil des DTPA-Anhydrids, der an die Gelatine gebunden wurde stark in Abhängigkeit von dem verwendeten Anhydrid. Der gebundene Anteil bewegte sich zwischen 7,5 % und 61,2 %. Da Gelatine ein Proteingemisch unterschiedlicher Molekülgrößen ist (Bauer et al., 1993) und somit die Angabe eine molaren Verhältnis von DTPA zu Gelatine im Konjugat wenig sinnvoll erscheint, wurden die Bindungsverhältnisse im Konjugat als $\mu\text{mol DTPA/g Gelatine}$ angegeben. Auch hier ließ sich das Bindungsverhältnis DTPA zu GelB im Konjugat durch Variation der GelB-Konzentration variieren (Tab. 5.2.1.6.1).

Tabelle 4.2.1.6.1. Steuerung des Verhältnis von DTPA zu Gelatine B im Konjugat durch Veränderung des Ausgangsverhältnis DTPA zu Gelatine B.

Ausgangsverhältnis DTPA- Anhydrid/ Gelatine B ($\mu\text{mol/ g GelB}$)	Verhältnis DTPA/Gelatine B im Konjugat ($\mu\text{mol/ g GelB}$)	%-Anteil des eingesetzten DTPA- Anhydrid, das an Gelatine B gebunden hat
140	44	31,4
280	49	17,5
560	71	12,7
1120	210	18,75

5.2.1.7 Kovalente Bindung von DTPA an Nanopartikel aus humanem Serumalbumin

Die kovalente Bindung von DTPA an HSA-NP erfolgte wie unter 4.1.1.11 beschrieben nach der Methode von Hnatowich et al. (Hnatowich & Schlegel, 1981; Hnatowich et al., 1983). Der Anteil des eingesetzten DTPA-Anhydrids, das an HSA-NP gebunden wurde, variierte zwischen 4,8 % und 68,0 %. Der Grund lag auch hier in der unterschiedlichen Qualität des eingesetzten Anhydrids. Damit wurden Bindungsraten zwischen 0,8 mol DTPA/ mol HSA und 14,0 mol DTPA/ mol HSA in den Konjugaten erzielt.

Um zu überprüfen, ob das Zetapotential der Nanopartikel durch Bindung von DTPA geändert wird, wurde von einer Charge HSA-NP und den daraus hergestellten HSA-DTPA-NP das Zetapotential bestimmt. Die HSA-DTPA-NP hatten DTPA in einem molekularen Verhältnis von 0,80 mol DTPA/ mol HSA gebunden. Um herauszufinden, ob die Nanopartikel autoklavierbar sind wurden die physikochemischen Kennzahlen beider Chargen vor und nach Autoklavieren bestimmt. Zusätzlich wurden die NP-Größen vor und nach Autoklavierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2.1.7.1 dargestellt.

Tabelle 5.2.1.7.1. Zetapotentiale und Nanopartikelgrößen vor und nach dem Autoklavieren.

5 Entwicklung von peptidischen Trägersystemen für Metallchelatoren

Zubereitung	Zetapotential (mV, n = 9)	Größe (nm, n = 3)
HSA-NP	-40,38 ± 2,02	474,20 ± 67,32
autoklavierte HSA-NP	-40,49 ± 2,01	519,00 ± 53,88
HSA-DTPA-NP	-44,92 ± 1,64	526,00 ± 10,47
autoklavierte HSA-DTPA-NP	-44,53 ± 1,61	449,15 ± 19,16

Die verschiedenen Zubereitungen wurden verglichen, um statistische Unterschiede zu belegen. Bei den Zeta-Potentialen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den HSA-NP, die DTPA gebunden hatten, und den HSA-NP ohne DTPA. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei den NP vor und nach Autoklavierung festgestellt werden (Tab. 5.2.1.7.2).

Tabelle 5.2.1.7.2. Statistischer Vergleich der Zetapotentiale von HSA-NP und HSA-DTPA-NP vor und nach Autoklavierung.

One way ANOVA

Test auf Normalverteilung:	Werte sind normalverteilt (P = 0,758)
Test auf Varianzenhomogenität:	Varianzen sind homogen (P = 0,792)
One way ANOVA:	Die Differenzen der untersuchten Mittelwerte sind signifikant verschieden (P < 0,001)

All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Tukey Test)

Vergleich:	statistisch signifikanter Unterschied (P < 0,05)
HSA-NP vs. autoklavierte HSA-NP	nein
HSA-DTPA-NP vs. autoklavierte HSA-DTPA-NP	nein
HSA-NP vs. HSA-DTPA-NP	ja
HSA-NP vs. autoklavierte HSA-DTPA-NP	ja
autoklavierte HSA-NP vs. HSA-DTPA-NP	ja
autoklavierte HSA-NP vs. autoklavierte HSA-DTPA-NP	ja

Die NP-Größenverteilungen wurden ebenfalls statistisch verglichen. Da die Varianzen hierbei inhomogen waren wurde eine Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks durchgeführt. Diese ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen untersuchten Zubereitungen (P = 0,476).

5.2.1.8 Kovalente Bindung von DTPA an Nanopartikel aus Gelatine

GelB-NP wurden wie beschrieben hergestellt (siehe 5.1.2.6). Die verwendeten GelB-NP hatten eine Größe in dem Bereich zwischen 300 und 500 nm. Es wurden 560 µmol DTPA-Anhydrid/ g GelB eingesetzt. Der gebundene DTPA-Anhydrid-

Anteil variierte in Abhängigkeit von der verwendeten Anhydrid-Qualität zwischen 5,6 % und 70,2 %.

5.2.1.9 Bestimmung der Komplexierungsfähigkeit von Protein-DTPA-Konjugaten

Die Methode war nicht quantitativ auswertbar. Dies lag an der stetig abnehmenden Absorption des $\text{Fe}(\text{SCN})_3$, die sich auch nicht durch die von Doan et al. (1975) beschriebene Zugabe von Salpetersäure verhindern ließ. Allerdings war eine Verminderung der Absorption nach Zugabe von CaNa_3DTPA , sowie nach Zugabe von löslichen HSA- und GelB-Konjugaten, nachweisbar. Diese ließ sich jedoch nicht quantitativ auswerten. Dadurch konnte nur qualitativ gezeigt werden, daß an peptidische Trägersysteme gebundenes DTPA seine Komplexierungsfähigkeit behält.

5.2.1.10 Kovalente Bindung von DFO an Nanopartikel aus humanem Serumalbumin

DFO wurde über eine Quenching-Methode (siehe 4.1.1.13) an HSA-NP gebunden (Weber et al., 2000c). Da sich nach der Desolvatation mit Ethanol frisch gebildete HSA-NP nach Entfernung des Ethanols wieder auflösen würden, wurden die Proteinmoleküle durch Aldehyde mit mehreren reaktiven Gruppen quervernetzt. In diesem Fall wurde das Dialdehyd Glutaraldehyd verwendet, dessen zwei Aldehydfunktionen mit den Aminogruppen der HSA-Moleküle reagieren. Die Aldehydgruppen reagierten hierbei nicht sofort vollständig ab, so daß bei Zugabe von zu bindenden Substanzen zu einem günstigen Zeitpunkt verbleibende Aldehydfunktionen der Glutaraldehydmoleküle, die nur an eine Proteinaminogruppe gebunden wurden, zur Bindung anderer Moleküle genutzt werden konnten. Auf diesem Prinzip basierte auch die Bindung des DFO an HSA-NP. DFO besitzt nur eine reaktive Aminogruppe, die mit Aldehyden unter den herrschenden Bedingungen (Raumtemperatur) reagieren kann. Diese primäre Aminogruppe befindet sich außerhalb des reaktiven Zentrums, das zur Komplexierung von Metallionen notwendig ist (Abb. 2.3.1). Die antitumoralen und antiviralen Wirkungen von DFO sind durch die Zugabe von Eisen(III)-Ionen inhibierbar. Dies weist darauf

hin, daß ein intaktes reaktives Zentrum Voraussetzung für die biologischen Wirkungen des DFO ist. Daher ist davon auszugehen, daß die Bindung von DFO an HSA-NP über diese Aminogruppe nicht zu einem Verlust der biologischen Wirkung führt. Ob eine Reaktion mit Glutaraldehyd, die Komplexierung von Fe^{3+} beeinflusst, wurde durch Bestimmung der Absorption von DFO alleine und DFO, das mit Glutaraldehyd reagiert hatte, bei einer Wellenlänge von 445 nm belegt. DFO und Glutaraldehyd wurden in einem molaren Verhältnis von 2 : 1 über Nacht reagieren gelassen, da Glutaraldehyd 2 reaktive Aldehydgruppen besitzt. Die DFO-Zubereitungen wurden dann in den gleichen molaren Konzentrationen mit 0,1 %iger FeCl_3 -Lösung versetzt und vermessen. Die Absorptionen unterschieden sich nicht signifikant, was darauf hindeutet, daß die Komplexierungsfähigkeit von DFO durch Bindung an Glutaraldehyd nicht beeinträchtigt wird (Tab. 5.2.1.10.1).

Tab. 5.2.1.10.1. Vergleich der Absorption von DFO mit und ohne Bindung an Glutaraldehyd (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3).

	Abs. 445 nm
DFO-Lösung	0,546 \pm 0,006
DFO-Lösung mit Glutaraldehyd	0,552 \pm 0,006

t-Test nach Student

Test auf Normalverteilung: Die Werte sind normalverteilt (P = 0,761)

Test auf Varianzenhomogenität: Varianzen sind homogen (P = 0,965)

t-Test: Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant (P = 0,278)

Außerdem wurde ein Absorptionsspektrum über den Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm aufgenommen. Hier waren die erhaltenen Kurven deckungsgleich.

Es wurden 7,7 mol DFO/ mol HSA an die HSA-NP mit der beschriebenen Quenching-Methode gebunden. Die verwendeten HSA-NP hatten eine Größe zwischen 150 und 250 nm.

Um eine Veränderung der NP-Oberfläche durch die Bindung von DFO nachzuweisen, wurde das Zetapotential der HSA-NP mit dem der HSA-DFO-NP

verglichen. Es bestand ein signifikanter Unterschied, der die Bindung von DFO auf die NP-Oberfläche bestätigt (Tab. 5.2.1.10.2).

Tabelle 5.2.1.10.2. Vergleich der Zetapotentiale von HSA-NP und HSA-DFO-NP (n = 12).

	Zetapotential
HSA-NP	- 39,0 ± 7,1
HSA-DFO-NP	- 25,1 ± 3,9

t-Test nach Student

Test auf Normalverteilung: Die Werte sind normalverteilt (P = 0,118)

Test auf Varianzenhomogenität: Varianzen sind homogen (P = 0,104)

t-Test: Die Werte unterscheiden sich signifikant (P < 0,001)

5.2.2 Zellkultur-Versuche

5.2.2.1 Antitumorale Wirkung von DTPA und seinen Konjugaten in vitro

5.2.2.1.1 Antitumorale Wirkung von DTPA

Die Cytotoxizität von DTPA wurde in verschiedenen Zellsystemen bestimmt. Als nicht maligne Zellen wurden HFF verwendet. Als maligne Zelllinien wurden humane NB-Zellen (UKF-NB-3, Cinatl et al., 1993), die humane Brustadenokarzinom-Zelllinie MCF-7 (Sugarman et al., 1985), die daraus abgeleitete Zelllinie MCF-R (Chu et al., 1991), sowie die ductale Brustkarzinom-Zelllinie BT474 (Lasfargues et al., 1978) eingesetzt. DTPA inhibierte das Wachstum aller untersuchten Zelllinien in den getesteten Konzentrationen 250 µM. Jedoch war seine Wirkung gegenüber MCF-7- und UKF-NB-3-Zellen am stärksten ausgeprägt. Bei den BT474-Zellen wurde der IC₅₀ in den untersuchten Konzentrationen nicht erreicht (Tab. 5.2.2.1.1.1).

Tab. 5.2.2.1.1.1. Cytotoxische Wirkung von DTPA in verschiedenen Zellsystemen (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

	IC₅₀ (μM)
HFF	209,6 \pm 22,1
UKF-NB-3	70,6 \pm 4,9
MCF-7	71,2 \pm 4,3
MCF-R	201,7 \pm 30,3
BT474	> 250

5.2.2.1.2 Antitumorale Wirkung von kovalent an Gelatine gebundenem DTPA

Der Einfluß der Bindung von DTPA an Gelatine auf seine cytotoxische Wirkung wurde untersucht (Tab. 5.2.2.1.2.1). Die Ergebnisse zeigen, daß die Bindung von DTPA an Gelatine zu einer erheblichen Steigerung der Toxizität des DTPA in allen untersuchten Zelllinien führte.

Tab. 5.2.2.1.2.1. Cytotoxische Wirkung von kovalent an Gelatine gebundenem DTPA (36 μmol DTPA/ g Gelatine). Die angegebenen Konzentrationen geben die eingesetzte DTPA-Menge im Konjugat an (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

Zelllinie	IC ₅₀ (μM)
HFF	24,9 \pm 4,8
UKF-NB-3	11,8 \pm 1,6
MCF-7	15,3 \pm 1,7
MCF-R	39,6 \pm 3,7
BT474	36,7 \pm 3,6

Anschließend wurde untersucht, ob unterschiedliche Bindungsverhältnisse DTPA zu GelB einen Einfluß auf die cytotoxische Wirkung der Konjugate hatte (Tab. 5.2.2.1.2.2, 5.2.2.1.2.3, 5.2.2.1.2.4). Hierzu wurden Konjugate mit Bindungsverhältnissen von 36 $\mu\text{mol/ g}$ GelB, 49 $\mu\text{mol/ g}$ GelB und 71 $\mu\text{mol/ g}$ GelB verwendet. Die Wirkung der Konjugate wurde in UKF-NB-3-, in MCF-7- und in BT474-Zellen verglichen. Die IC₅₀-Werte wurden auf statistische Unterschiede hin untersucht. Bei den 3 untersuchten Zubereitungen wurde in UKF-NB-3-Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied in der Wirkung festgestellt. Im Gegensatz hierzu waren die Wirkungen der Zubereitungen in MCF-7- und in BT474-Zellen signifikant verschieden. Allerdings konnten diese signifikanten Unterschiede nicht mit den verschiedenen Bindungsverhältnissen in Zusammenhang gebracht werden. Während in MCF-7-Zellen die am stärksten wirksame Zubereitung die mit 71 μmol DTPA/g Gelatine war, hatte in BT474-Zellen die Zubereitung mit 49 μmol DTPA/g Gelatine die größte Wirkung. Diese Zubereitung war jedoch in MCF-7-Zellen am schwächsten wirksam. Daher konnten die unterschiedlichen Wirksamkeiten der untersuchten Zubereitungen nicht auf die Bindungsverhältnisse DTPA zu Gelatine zurückgeführt werden.

Tab. 5.2.2.1.2.2. Vergleich von Gelatine-DTPA-Konjugaten mit unterschiedlichen Bindungsverhältnissen im Konjugat in UKF-NB-3-Zellen

(Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

Bindungsverhältnis	IC₅₀ (μM DTPA)
36 μ mol DTPA/g GelB	11,8 \pm 1,7
49 μ mol DTPA/g GelB	11,1 \pm 1,5
71 μ mol DTPA/g GelB	10,7 \pm 1,6

Statistik:

Test auf Normalverteilung:	P = 0.048
Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks:	P = 0.592

Tab. 5.2.2.1.2.3. Vergleich von Gelatine-DTPA-Konjugaten mit unterschiedlichen Bindungsverhältnissen im Konjugat in MCF-7-Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

Bindungsverhältnis	IC₅₀ (μM DTPA)
36 μ mol DTPA/g GelB	14,9 \pm 2,2
49 μ mol DTPA/g GelB	15,6 \pm 2,3
71 μ mol DTPA/g GelB	9,8 \pm 0,5
Statistik:	
Test auf Normalverteilung:	P = 0,615
Test auf Varianzenhomogenität:	P = 0,088
One Way ANOVA:	P = 0,003
Tukey Test:	
	P < 0,5
36 μ mol DTPA/g GelB gegenüber 49 μ mol DTPA/g GelB	Nein
36 μ mol DTPA/g GelB gegenüber 71 μ mol DTPA/g GelB	Ja
49 μ mol DTPA/g GelB gegenüber 71 μ mol DTPA/g GelB	Ja

Tab. 5.2.2.1.2.4. Vergleich von Gelatine-DTPA-Konjugaten mit unterschiedlichen Bindungsverhältnissen im Konjugat in BT474-Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

Bindungsverhältnis	IC₅₀ (μM DTPA)
36 μ mol DTPA/g GelB	36,7 \pm 3,6
49 μ mol DTPA/g GelB	27,9 \pm 3,2
71 μ mol DTPA/g GelB	30,4 \pm 2,2

Statistik:

Test auf Normalverteilung:	P = 0,670
Test auf Varianzenhomogenität:	P = 0,242
One Way ANOVA:	P = 0,007

Tukey Test:

	P < 0,5
36 μ mol DTPA/g GelB gegenüber 49 μ mol DTPA/g GelB	Ja
36 μ mol DTPA/g GelB gegenüber 71 μ mol DTPA/g GelB	Ja
49 μ mol DTPA/g GelB gegenüber 71 μ mol DTPA/g GelB	Nein

Um zu überprüfen, inwiefern die Wirkung von unabhängig voneinander hergestellten Chargen mit gleichem Bindungsverhältnis DTPA zu Gelatine vergleichbar wirken, wurde eine zweite Charge GelB-DTPA mit einem Bindungsverhältnis von 49 μ mol/ g Gelatine hergestellt. Diese neue Charge wurde in UKF-NB-3-Zellen in einem unabhängigen Experiment getestet und die Wirkung wurde mit der Wirkung der ersten Charge verglichen (Tab. 5.2.2.1.2.5). Ein t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zubereitungen (P = 0,152).

Tab. 5.2.2.1.2.5. Vergleich zweier unabhängig hergestellter GelB-DTPA-Zubereitungen mit einem Bindungsverhältnis von 49 $\mu\text{mol DTPA/g}$ Gelatine in UKF-NB-3-Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4$).

	IC₅₀ ($\mu\text{M DTPA}$)
Charge 1	13,18 \pm 2,45
Charge 2	11,09 \pm 1,48
t-Test	P = 0,152

Da DTPA peroral nicht absorbiert wird und Gelatine im Gastro-Intestinal-Trakt enzymatisch abgebaut wird, wäre die Anwendung am lebenden Organismus nur parenteral denkbar. Hierzu ist es notwendig sterile Zubereitungen herzustellen. Daher wurde evaluiert, inwiefern sich die Autoklavierung von GelB-DTPA-Zubereitungen auf deren Wirksamkeit auswirkt. Zunächst wurde mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie die Molekulargewichtsverteilung der Moleküle vor und nach Autoklavierung bestimmt. Hier zeigte sich, daß sich das Molekulargewicht durch den Autoklavierungsvorgang drastisch verringerte.

Dann wurde die Wirkung einer Zubereitung vor und nach Autoklavierung in UKF-NB-3-, MCF-7- und MCF-R-Zellen mit Hilfe des t-Testes verglichen (Tab. 5.2.2.1.2.6). Das Bindungsverhältnis DTPA zu Gelatine betrug 71 $\mu\text{mol DTPA/g}$ Gelatine. In UKF-NB-3- und MCF-R-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz hierzu war die autoklavierte Zubereitung in MCF-7-Zellen signifikant ($P = 0,015$) stärker wirksam. Allerdings kann hieraus nicht auf eine Wirksamkeitserhöhung durch den Autoklavierungsvorgang geschlossen werden. Zum einen ist der Unterschied der IC₅₀-Werte (9,8 μM zu 8,6 μM) in biologischen Systemen kaum als relevant zu bezeichnen. Zum anderen war sowohl in UKF-NB-3- als auch in MCF-R-Zellen die nicht autoklavierte Zubereitung in leicht geringeren Konzentrationen wirksam. Daher ist davon auszugehen, daß die Autoklavierung die Wirksamkeit der Zubereitungen, wenn überhaupt, nur vernachlässigbar beeinflusst.

Tab. 5.2.2.1.2.6. Vergleich der Wirksamkeit von GelB-DTPA vor und nach Autoklavierung (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

In UKF-NB-3-Zellen		
	IC ₅₀	t-Test
nicht autoklaviert	10,73 \pm 1,59	P = 0,688
autoklaviert	11,09 \pm 0,63	
In MCF-7-Zellen		
	IC ₅₀	t-Test
nicht autoklaviert	9,82 \pm 0,52	P = 0,015
autoklaviert	8,64 \pm 0,47	
In MCF-R-Zellen		
	IC ₅₀	t-Test
nicht autoklaviert	17,77 \pm 2,12	P = 0,857
autoklaviert	18,02 \pm 1,62	

Um zu überprüfen, ob die kovalente Bindung von DTPA an GelB zur Erhöhung der cytotoxischen Effekte notwendig ist, wurden zu der eben beschriebenen Charge Vergleichslösungen hergestellt, die in dem selben Verhältnis Gelatine und DTPA (71 μ mol DTPA/ g Gelatine) gelöst aber nicht kovalent gebunden enthielten. Die IC₅₀-Werte wurden wiederum in UKF-NB-3-, MCF-7-, sowie MCF-R-Zellen verglichen (Tab. 5.2.2.1.2.7). Die Vergleichslösung war in MCF-R-Zellen vollkommen unwirksam in Konzentrationen bis 40 μ M DTPA. In UKF-NB-3- und MCF-7-Zellen erreichten die Vergleichslösungen die IC₅₀ in den untersuchten Konzentrationen bis 40 μ M DTPA nicht.

Tab. 5.2.2.1.2.7. Vergleich der Cytotoxizität einer Charge GelB-DTPA (71 μ mol DTPA/ g Gelatine) mit einer Vergleichslösung, die Gelatine und DTPA in gleicher Konzentration und gleichem Verhältnis ungebunden enthält (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

In UKF-NB-3-Zellen	In MCF-7-Zellen	In MCF-R-Zellen
--------------------	-----------------	-----------------

5 Entwicklung von peptidischen Trägersystemen für Metallchelatoren

	IC ₅₀ (µM DTPA)	IC ₅₀ (µM DTPA)	IC ₅₀ (µM DTPA)
GelB-DTPA	10,73 ± 1,59	9,82 ± 0,52	17,77 ± 2,12
Vergleich	> 40	> 40	unwirksam bis 40 µM

Im Gegensatz zu dem als Vergleich eingesetzten DTPA, das als CaNa₃DTPA eingesetzt wurde, wurde den an GelB gebundenen Zubereitungen kein Calcium zugesetzt. Um auszuschließen, daß die durch GelB-DTPA verursachten stärkeren cytotoxischen Effekte auf das Fehlen von Calcium in der Zubereitung zurückzuführen sind, wurde einer Charge CaCl₂ zugesetzt. Die Cytotoxizität der Charge war mit und ohne Calcium-Zusatz identisch.

5.2.2.1.3 Antitumorale Wirkung von an humanes Serumalbumin gebundenem DTPA

Die cytotoxischen Wirkungen von HSA-DTPA-Konjugaten wurden in einer Reihe von malignen Zelllinien (UKF-NB-3-, MCF-7-, MCF-R-, BT474-Zellen) bestimmt. Der Einfluß auf nicht-maligne Zellen wurde in HFF ermittelt. Die Konjugate zeigten eine deutlich erhöhte Cytotoxizität im Vergleich zu dem ungebundenen DTPA (Tab. 5.2.2.1.3.1). Es wurden 2 Chargen mit unterschiedlichen molaren Bindungsverhältnissen DTPA zu HSA untersucht. Eine Charge enthielt 2,9 mol DTPA/mol HSA, die andere 11,6 mol DTPA/mol HSA. HSA-DTPA mit 11,6 mol DTPA/mol HSA war deutlich schwächer wirksam, als die Charge mit 2,9 mol DTPA/mol HSA (Tab. 4.2.2.1.3.1).

Tab. 5.2.2.1.3.1. Cytotoxische Wirkung von DTPA und HSA-DTPA-Konjugaten in verschiedenen Zelllinien (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

	HSA-DTPA (DTPA in μM)		DTPA (μM)
	2.9 mol DTPA/mol HSA	11.6 mol DTPA/mol HSA	
in HFF	30,7 \pm 5,3	> 40	209,6 \pm 22,1
in UKF-NB-3	10,3 \pm 1,2	> 40	70,6 \pm 4,9
in MCF-7	13,0 \pm 1,5	> 40	71,2 \pm 4,3
in MCF-R	25,5 \pm 3,2	> 40	201,7 \pm 30,3
in BT474	32,6 \pm 3,9	> 40	> 250

5.2.2.1.4 Antitumorale Wirkung von an Nanopartikel gebundenem DTPA

Die antitumorale Wirkung von an HSA-NP und GelB-NP gebundenem DTPA war in MCF-7 Zellen tendenziell, jedoch nicht signifikant schwächer als die Wirkung der löslichen Konjugate (Tab. 5.2.2.1.4.1, $P = 0,053$). Die DTPA-NP waren jedoch signifikant stärker cytotoxisch, als freies DTPA (Tab. 5.2.2.1.4.2, $P < 0,001$). Bei den NP war die Wirkung wie bei den löslichen GelB-Konjugaten unabhängig von der DTPA-Beladung/ mol HSA bzw. g Gelatine.

Tabelle 5.2.2.1.4.1. Vergleich von DTPA gebunden an lösliche Proteine mit an Nanopartikel gebundenem DTPA in MCF-7-Zellen

(Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

	IC₅₀ (μM DTPA)
HSA-DTPA (2,9 μ mol DTPA/ mol HSA)	13,0 \pm 1,5
HSA-DTPA-NP (14 mol DTPA/ mol HSA)	17,2 \pm 2,5
GelB-DTPA (36 μ mol DTPA/ g GelB)	15,3 \pm 1,7
GelB-DTPA-NP (50 μ mol/ g GelB-NP)	17,3 \pm 2,8
DTPA	71,2 \pm 4,3

One way ANOVA: P = 0,053

Tabelle 5.2.2.1.4.2. Vergleich der cytotoxischen Wirkung von an HSA-NP und GelB-NP gebundenem DTPA und freiem DTPA in MCF-7 Zellen

(Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4).

	IC₅₀ (μM DTPA)
HSA-DTPA-NP	
14 mol DTPA/ mol HSA	17,2 \pm 2,5
GelB-DTPA-NP	
175 μ mol/ g GelB-NP	17,3 \pm 2,8
DTPA	71,2 \pm 4,3

One way ANOVA: P = 0,053

All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Tukey Test):

	P < 0,05
HSA-DTPA-NP gegen GelB-DTPA-NP	nein
HSA-DTPA-NP gegen DTPA	ja
GelB-DTPA-NP gegen DTPA	ja

5.2.2.2 Antivirale Wirkung der DTPA-Konjugate im Vergleich zu DTPA

Die antivirale Wirkung von DTPA gegenüber HCMV wurde bereits belegt (Cinatl et al., 1996a; Scholz et al., 1997; Kloover et al., 1999). Nun wurde die Wirkung von an HSA bzw. Gelatine gebundenem DTPA mit der Wirkung von DTPA alleine verglichen (Tab. 5.2.2.2.1). Es zeigte sich, daß die Konjugate ca. um den Faktor 5 wirksamer waren als ungebundenes DTPA. HSA-DTPA-Konjugate inhibierten die Virusreplikation vollständig ab einer Konzentration von 1,25 µM DTPA. GelB-DTPA-Konjugate unterdrückten jegliche Virusreplikation vollständig ab einer Konzentration von 2 µM DTPA. Die IC₅₀-Werte lagen bei beiden Zubereitungen unter 1, während der Wert bei ungebundenem DTPA bei 5,15 µM lag. Um auszuschließen, daß das zur Herstellung der Konjugate verwendete DTPA-Anhydrid diesen Unterschied verursachte, wurde die antivirale Wirkung des DTPA-Anhydrids ebenfalls untersucht. Der IC₅₀-Wert war 5,01 µM. Zwischen dem DTPA-Anhydrid und dem CaNa₃DTPA bestand hinsichtlich der Wirksamkeit gegenüber HCMV bei Verwendung des t-Testes kein statistisch signifikanter Unterschied (P = 0,838).

Tab. 5.2.2.2.1. Einfluß von CaNa₃DTPA, DTPA-Anhydrid, an HSA gebundenem DTPA und an Gelatine gebundenem DTPA auf die HCMV-Replikation in HFF (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 4).

	IC ₅₀ (µM DTPA)
CaNa ₃ DTPA	5,15 ± 0,51
DTPA-Anhydrid	5,01 ± 1,21
HSA-DTPA (2,9 mol DTPA/mol HSA)	0,794 ± 0,071
GelB-DTPA (36 µmol DTPA/g Gelatine)	0,965 ± 0,035

5.2.2.3 Biologische Wirkung von DFO-Nanopartikeln

HSA-DFO-NP zeigten keine biologische Wirkung. Sie zeigten keine antiviralen, antitumoralen oder cytotoxischen Effekte. Ihre Wirkung unterschied sich nicht von den als Kontrolle eingesetzten untoxischen HSA-NP.

5.3 Diskussion

5.3.1 Herstellung und Charakterisierung der Konjugate

Zunächst wurde untersucht, ob eine adsorptive Bindung des DTPA an die untersuchten peptidischen Trägersysteme (HSA, HSA-NP, GelB, GelB-NP) stattfindet. Dies war nicht der Fall. Daher war davon auszugehen, daß in den weiteren Versuchen an die Trägersysteme gebundenes DTPA alleine über kovalente Bindungen nach dem unter 5.2.1.5 beschriebenen Mechanismus gebunden wurde. Unter der Voraussetzung, daß mit DTPA-Anhydrid gleichbleibender Qualität gearbeitet wurde, ließ sich reproduzierbar das Verhältnis DTPA zu Trägersystem in den Konjugaten steuern. Lösliche GelB-DTPA-Konjugate und DTPA-HSA-NP waren autoklavierbar, was im Hinblick auf die geforderte Sterilität zur parenteralen in vivo Applikation von großem Interesse ist. Die Komplexierungsfähigkeit konnte nur qualitativ untersucht werden (siehe 5.2.1.9). Es zeigte sich jedoch, daß die Komplexierungsfähigkeit des DTPA in den Konjugaten erhalten blieb. Außerdem wurde an einer Charge HSA-NP und HSA-DTPA-NP exemplarisch gezeigt, daß das Zetapotential durch Bindung des DTPA signifikant abnahm (siehe 5.2.1.7). Aufgrund der fehlenden Adsorption des DTPA an die Trägersysteme, verbunden mit der nachgewiesenen Komplexierungsfähigkeit der DTPA-Konjugate und der Abnahme des Zetapotentials von HSA-DTPA-NP wurde gefolgert, daß das DTPA tatsächlich kovalent an die Trägersysteme gebunden wurde.

DFO wurde über eine Quenching-Methode auf die Oberfläche von HSA-NP gebunden. Nach Weber et al. (2000c) können 5 bis 7 mol Cystamin an 1 mol HSA in Form von NP über diese Quenching-Methode erzielt werden. Die Bindungskapazität war ab der Verwendung eines 15 – 20-fachen Überschusses durch weitere Erhöhung der zugesetzten Cystaminmenge nicht mehr steigerbar. Um eine möglichst hohe Bindung des DFO an die NP-Oberfläche zu erzielen, wurde ein 60-facher molarer DFO-Überschuß gewählt, was zu einer vergleichsweise hohen Bindung in einem molaren Verhältnis von 7,7 mol DFO/ mol HSA führte.

Da die Komplexierungsfähigkeit mit den antitumoralen und antiviralen Wirkungen des DFO assoziiert ist (Hoffbrand et al., 1976; Barankiewicz & Cohen, 1987; Cinatl et al., 1994; Cory et al., 1995; Cinatl et al., 1996a), wurde davon ausgegangen, daß die biologische Wirkung bei Erhalt der Komplexierungsfähigkeit ebenfalls erhalten bleibt. Daher wurde gezeigt, daß die Reaktion mit Glutaraldehyd die Komplexierungsfähigkeit des DFO nicht beeinträchtigte. Ein Beweis dafür, daß DFO tatsächlich auf die NP-Oberfläche gebunden worden war, war die statistisch signifikante Änderung des Zetapotentials nach der DFO-Bindung (siehe 5.2.1.10).

5.3.2 Antitumorale Wirkung von DTPA

Im Gegensatz zu der antiviralen Wirkung von DTPA, die bereits belegt wurde (Cinatl et al., 1996a; Scholz et al., 1997; Kloover et al., 1999), wurde die antitumorale Wirkung von DTPA bisher noch nicht untersucht. Die antitumoralen Wirkungen von anderen Metallchelatoren wie DFO sind jedoch hinreichend belegt (Blatt & Stitely, 1987; Estrov et al., 1987; Becton & Bryles, 1988; Hoyes et al., 1992; Donfrancesco et al., 1996). Daher wurde zunächst die Cytotoxizität von DTPA in verschiedenen Zellsystemen bestimmt. Als nicht maligne Zellen wurden HFF verwendet. DTPA inhibierte nur das Wachstum der UKF-NB-3- und der MCF-7-Zellen stärker als das Wachstum der HFF. MCF-R-Zellen wurden in vergleichbarer Weise und BT474-Zellen schwächer gehemmt. Über den cytotoxischen Wirkmechanismus lassen sich hieraus keine Schlüsse ziehen. Offensichtlich sind diese Effekte nicht spezifisch auf bestimmte Zelltypen beschränkt. Es ist jedoch aufgrund der Datenlage nicht ausgeschlossen, daß bestimmte Zelltypen eine besondere Empfindlichkeit gegenüber DTPA aufweisen. Eine spezifische antitumorale Aktivität kann aber aus den erhobenen Daten nicht abgeleitet werden. Da DTPA kein zellgängiger Chelator ist (Aisen & Listowsky, 1980), muß die Toxizität durch extrazelluläre Prozesse verursacht werden. Hierbei besteht zum einen die Möglichkeit, daß die Wirkung durch die Komplexierung noch nicht spezifizierter Ionen zustande kommt. Andererseits ist auch eine Wechselwirkung mit zellulären Oberflächenstrukturen und eine dadurch veränderte zelluläre Signaltransduktion denkbar.

Eine therapeutische Anwendung von DTPA zur Therapie von Tumoren erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen nur schwer vorstellbar. Die stärkere cytotoxische Wirkung in den sensitiven Tumorzellen um den Faktor 3 ist im Vergleich zu den nicht malignen HFF sehr gering, so daß ein eventuelles therapeutisches Fenster sehr eng wäre. Hinzu kommt die ungünstige Pharmakokinetik des DTPA, die schon bei den antiviralen in vivo Versuchen zu Problemen führte (Kloover et al., 1999; siehe 3).

5.3.3 Antitumorale Wirkung der DTPA-Konjugate

Die Bindung des DTPA an die verschiedenen peptidischen Trägersysteme führte zu einer Erhöhung der Cytotoxizität um den Faktor 5 bis 10 in allen untersuchten Zelllinien. Die Erhöhung der Cytotoxizität wird nur beobachtet, wenn DTPA kovalent gebunden an die Trägersysteme vorliegt (Tab. 5.2.2.1.4.1). Eine Lösung in der GelB und DTPA zusammen aber ungebunden vorlagen zeigte keine entsprechende Wirkung. Daraus ergibt sich, daß der Einfluß des Trägersystems nur bei kovalenter Bindung des DTPA wirksam war. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Befund, daß DTPA keinerlei adsorptive Bindung mit HSA und Gelatine einging.

Die cytotoxische Wirkung von HSA-DTPA war höher, wenn das Verhältnis DTPA zu HSA im Konjugat gering war. Dies kann damit begründet werden, daß die Einführung von größeren Mengen DTPA zu einer strukturellen Veränderung des HSA führt. Die hierdurch bewirkte Veränderung der Eigenschaften könnte für die geringere Wirkung verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß die Bindung von Bernsteinsäure an Lysingruppen des Albumin und damit die Einführung von Carboxylgruppen dessen Konformation und Eigenschaften deutlich verändern kann (Jonas & Weber, 1970; Tayyab & Quasim, 1986; Tayyab & Quasim, 1987; Maruyama et al., 1993). Bei Gelatine war kein derartiger Effekt zu beobachten. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei Gelatine um eine Mischung denaturierter Proteine handelt (Bauer et al., 1993), die keine spezifische Konformation mehr aufweisen, wodurch die Einführung von Molekülen die Konformation nicht mehr zerstören kann. Ein weiteres Indiz hierfür

ist, daß bei den verwendeten HSA-NP das molare Bindungsverhältnis ebenfalls keine Rolle spielte.

Die Erhöhung der Cytotoxizität wurde durch alle verwendeten peptidischen Trägersysteme vermittelt. Dies deutet darauf hin, daß der Effekt nicht durch spezifische Mechanismen verursacht wird. Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten der Wirkweise der Trägersysteme denkbar. Zum einen wäre eine Vermittlung einer Zellaufnahme denkbar, was bereits für verschiedene NP- und makromolekulare Arzneistoffträgersysteme gezeigt wurde (De Jaeghere et al., 2000; Kopecek et al., 2000; Kunath et al., 2000). Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da an HSA-NP gebundenes DFO jegliche Cytotoxizität verlor (siehe 5.2.2.3). Würde das Trägersystem auch nur eine geringe Zellaufnahme vermitteln, so müßte zumindest eine geringe Wirksamkeit des DFO erhalten bleiben. Wahrscheinlicher erscheint die Annahme, daß durch die peptidischen Trägersysteme der Kontakt des DTPA mit der Zelloberfläche verlängert wurde. Kolloidale Trägersysteme und Makromoleküle sind für ihre Zelladhäsion bekannt (Lehr, 1994; Lowe & Temple, 1994). Diese Annahme steht im Einklang mit der in der Einleitung formulierten Hypothese, daß die cytotoxischen Wirkungen durch eine Wechselwirkung mit der Zelloberfläche verursacht werden könnten, was möglicherweise zu einer veränderten Signaltransduktion führt. Würde die Wirkung durch extrazelluläre Komplexierung von Metallionen verursacht, so wäre es unwahrscheinlich, daß eine verringerte DTPA-Konzentration durch Bindung an peptidische Trägersysteme zu einer Erhöhung der Wirkung führen sollte.

Für eine antitumorale in vivo Anwendung sind die hergestellten DTPA-Konjugate in dieser Form jedoch kaum geeignet. Das therapeutische Fenster hat sich durch die Bindung nicht vergrößert. Selbst unter Berücksichtigung der durch Senkung der DTPA-Konzentration und der damit verringerten toxischen Effekte durch Ausschwemmung von Metallionen und einer Tumoranreicherung durch den EPR-Effekt (Matsumura & Maeda, 1986; Noguchi et al., 1998; Yuan et al., 1998) erscheint die Anwendung im Organismus schwierig. Auf jeden Fall müßten erst umfassende Daten zum Verhalten gegenüber verschiedenen normalen Zellen und Geweben gesammelt werden, um die Risiken abschätzen zu können.

5.3.4 Antivirale Wirkung der DTPA-Konjugate

Die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen zur anti-HCMV-Wirkung der löslichen Protein-DTPA-Konjugate sind analog zu den Ausführungen zur antitumoralen Wirkung zu bewerten. Die antivirale Wirkung des DTPA wurde durch die Bindung an HSA- und GelB-Moleküle um den Faktor 5 gesteigert. Allerdings stieg auch die Cytotoxizität an. Dadurch ergibt sich keine Verbesserung des therapeutischen Indexes des Konjugates im Vergleich zu der Ausgangssubstanz. Trotzdem erscheint die antivirale Anwendung eher erfolgversprechend zu sein als die antitumorale Anwendung, da die IC_{50} -Werte der antiviralen Wirkung deutlich niedriger waren, als die IC_{50} -Werte der antitumoralen Toxizität, deren Spezifität außerdem noch nicht belegt werden konnte. Von Vorteil bei einer in vivo Applikation dieser Zubereitung gegenüber der Anwendung von ungebundenem DTPA wäre die geringere Menge an DTPA, die zur Erzielung eines Effektes verabreicht werden müßte und der damit verbundene verminderte Verlust von Metallionen durch Komplexbildung. Dies könnte die toxischen Wirkungen, die durch den Entzug von Metallionen in-vivo verursacht werden reduzieren. Außerdem sollte durch die Bindung an Trägersysteme die Zirkulationszeit erhöht (Kreuter, 1983; Kreuter, 1991a; Allémann et al., 1993) und unter Umständen eine Anreicherung in entzündeten Geweben erreicht werden (De Schrijver et al., 1987; Alpar et al., 1989; Seale et al., 1992; Kreuter, 1994), wodurch die Dosis in vivo eventuell weiter gesenkt werden könnte. Hinzu kommt, daß die Stammzellen im Knochenmark vermutlich ein Reservoir für HCMV im Körper darstellen (Minton et al., 1994). Eventuell könnte eine Anreicherung des Trägersystem-gebundenen DTPA in Makrophagen und Monozyten, wie sie bereits vielfach für Arzneistoffträgersysteme beschrieben wurde (Schäfer et al., 1992; Bender et al., 1994; Leroux et al., 1995; Bender et al., 1996; Löbenberg & Kreuter 1996; Löbenberg et al., 1998a; Löbenberg et al., 1998b), die Ausbreitung von HCMV im Organismus effektiv hemmen (Ibanez et al., 1991; Plachter et al., 1996; Sinzger et al., 1996). Trotzdem bedarf der Wert der entwickelten Zubereitungen für den antiviralen Einsatz in vivo einer genauen Evaluierung.

Neben der Betrachtung der potentiellen Eignung der Zubereitungen zur in vivo Anwendung, können aus den Ergebnissen Schlüsse auf den Reaktionsmechanismus gezogen werden. Die mechanistischen Befunde entsprechen denen, die bei der Untersuchung der antitumoralen Wirkung gewonnen wurden. Der genaue Mechanismus bleibt ungeklärt. Die vorliegenden Ergebnisse belegen jedoch, daß die Wirkung nicht alleine auf die Komplexierung von Metallionen zurückzuführen ist, da so die erhöhte Wirkung bei verringerter DTPA-Menge und damit verringerter Komplexierungskapazität nicht zu erklären wäre. Da die Cytotoxizität und die antivirale Wirkung durch die Bindung an Trägersysteme steigen, liegt der Schluß nahe, daß der antivirale und der antitumorale Angriffspunkt an vergleichbaren Stellen des Zell- bzw. Virusreplikationszyklus liegen. Sollte die Hypothese, daß DTPA über Wechselwirkung mit Strukturen der Zelloberfläche die Signaltransduktion beeinflusst zutreffen, dann könnte der Angriffspunkt durchaus identisch sein. Eine Reihe von Substanzen, z.B. Aphidicolin und L-Cycloserin, deren Wirkmechanismus bekannt ist, hemmen über den selben zellulären Angriffspunkt die Virusvermehrung und das Zellwachstum (Bucknall et al., 1973; Ikegami et al., 1978; Mizrachi et al., 1996; Cinatl et al., 1999b). Für die antivirale Therapie, könnten entsprechende Substanzen von großer Bedeutung sein, da eine Hypothese davon ausgeht, daß Substanzen, die ihre antivirale Wirkung über eine Wechselwirkung mit dem Zellzyklus entwickeln, nicht zur Bildung von viralen Resistenzen führen (Lori et al., 1994). Daher könnte die Aufklärung des Wirkmechanismus von DTPA zu der Entwicklung neuer antiviraler Substanzen führen. Dies gilt insbesondere, wenn man die antivirale Wirkung von EDDS in vitro gegenüber resistenten Viren berücksichtigt. Das dem DTPA strukturell sehr ähnliche EDDS inhibierte GCV- und HPMP- resistente HCMV-Stämme. Es ist wahrscheinlich, daß der Wirkung dieser beiden Substanzen vergleichbare Mechanismen zugrunde liegen.

6 Biologische Wirkung des Enzyms bovine seminale Ribonuclease nach Bindung an Polymilchsäure-Nanopartikel

6.1 Material und Methoden

6.1.1 Bezugsquellen

<i>Cell Death Detection ELISApplus</i>	<i>Roche, Mannheim</i>
<i>Eppendorf Zentrifuge 5417</i>	<i>Gerätebau Eppendorf, Engelsdorf</i>
<i>H-9 Zellen</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>Microcon 100 Ultrazentrifugations-Einheiten</i>	<i>Amicon, Witten</i>
<i>Millex-GV Filter Units (0,22 µm Membran-Filter)</i>	<i>Millipore Corp., Bedford, USA</i>
<i>MOLT-4 Zellen</i>	<i>ATCC, Rockville, USA</i>
<i>Polymilchsäure (Resomer[®] L104)</i>	<i>Boehringer Ingelheim, Ingelheim</i>
<i>Polyvinylalkohol (Mowio[®])</i>	<i>Hoechst AG, Frankfurt/Main</i>
<i>Rannie High Pressure Laboratory Homogeniser, Model MINI-LAB, type8.30H</i>	<i>APV Homogenisers AS, Albertslund, Dänemark</i>
<i>U3000 Spectrophotometer</i>	<i>Hitachi, Berkshire, Großbritannien</i>
<i>Ultra Turrax</i>	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
<i>Ultrazentrifuge Optima L-80</i>	<i>Beckmann, München</i>
<i>Zellkulturmedien und -Zubehör</i>	<i>Seromed, Berlin</i>
<i>HPLC-Anlage:</i>	
<i>Superformance Säule 600-16 Fractogel EMD BioSEC (S)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>HPLC Pump 64</i>	<i>Knauer, Berlin</i>
<i>Lambda-Max Model 481 LC Spectrophotometer</i>	<i>Waters, Eschborn</i>
<i>Rührzelle:</i>	
<i>Modell 402 microconcentrator</i>	<i>Amicon, Witten</i>
<i>Diaflo YC05-Membran</i>	<i>Amicon, Witten</i>

6.1.2 Isolierung der bovinen seminalen Ribonuclease aus der seminalen Vesikelflüssigkeit von Rindern

Die Gewinnung der Roh-BS-RNase wurde von Dr. Josef Matousek am Institute of Animal Physiology and Genetics in Libechov (Tschechische Republik) durchgeführt:

Die seminale Vesikelflüssigkeit wurde von geschlachteten Bullen bzw. aus dem seminalen Plasma von Bullen in Besamungsstationen gewonnen. Die seminale Flüssigkeit wurde mit dem 2,5fachen Volumen 2%iger Essigsäure versetzt. Der sich bildende Protein-Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Dem Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zum Erreichen einer 3 M Lösung zugesetzt. Dann wurde der Überstand gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Die weitere Aufreinigung durch Größenausschluß-Chromatographie erfolgte am Institut für Pharmazeutische Technologie der J.W. Goethe-Universität (Frankfurt am Main):

Das Rohmaterial wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in demineralisiertem Wasser gelöst bzw. suspendiert. Diese Suspension wurde durch 0,22 µm Membran Filter zum Erhalt einer klaren Lösung filtriert. Aliquote von 1 ml wurden in einer HPLC-Anlage mit einer Größenausschluß-Säule aufgereinigt. Die Flußrate betrug 0.8 ml/min, das Fließmittel war ein 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die erhaltenen BS-RNase-Fractionen wurden in einer Rührzelle ca. um den Faktor 10 aufkonzentriert, mit demineralisiertem Wasser gewaschen und dann gefriergetrocknet.

6.1.3 Herstellung der Polymilchsäure-Nanopartikel

Es wurde eine Prä-Emulsion (o/w) aus 0.5 %iger (w/v) wäßriger PVA-Lösung und einer 5 %igen (w/v) PLA-Lösung in Dichlormethan in einem Volumen-Verhältnis von 5 : 1 mit einem Ultra-Turrax bei 8000 U/min für 2 min hergestellt. Die Prä-Emulsion wurde anschließend unter Hochdruck homogenisiert (400 bar, 5 Zyklen). Das Dichlormethan wurde dann durch 24-stündiges Rühren bei Raumtemperatur entfernt. Die entstandenen Nanopartikel wurden 5 mal durch Zentrifugation bei $46500 \times g$, Verwerfen des Überstandes und anschließender Redispersion in

demineralisiertem Wasser gewaschen. Die NP-Konzentration wurde gravimetrisch bestimmt, und die NP wurden autoklaviert. NP-Größe und das Zetapotential wurden bestimmt (siehe 4.1.1.8, 4.1.1.9).

6.1.4 Beladung der PLA-Nanopartikel mit BS-RNase

Für die Beladungsexperimente wurde BS-RNase mit den PLA-NP in Konzentrationen von 0,1 bis 4,0 mg BS-RNase/ mg PLA-NP in Wasser für 24 h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Nach dem Inkubieren wurde die Suspension bei $20800 \times g$ 45 min lang zentrifugiert. Aliquote von 450 μ l des Überstandes wurden in Microcon 100 Ultrazentrifugations-Einheiten überführt und nochmals für 45 min bei $10600 \times g$ zentrifugiert. Eine BS-RNase-Lösung, sowie eine PLA-NP-Suspension wurden in der gleichen Weise behandelt. Die BS-RNase-Konzentration im Filtrat wurde bei 278 nm photometrisch bestimmt. Die Menge der ungebundenen BS-RNase wurde dann relativ zu den Vergleichswerten berechnet. Die absolute Beladung (w/w) wurde in mg Arzneistoff gebunden an 1 mg Trägersystem angegeben.

6.1.5 Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden am Institut für Medizinische Virologie im Zentrum der Hygiene des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Univ.-Doz. Dr. Jindrich Cinatl durchgeführt.

Humane T-Zell-Leukämie Zellen (MOLT-4) und humane T-Lymphom Zellen (H9) wurden verwendet. MOLT-4^rARA-C²⁵⁰ und H9^rARA-C⁶⁰⁰-Zellen wurden durch Exposition von MOLT-4 und H9 Zellen mit ansteigenden Dosen von Cytarabin (Ara-C), wie von Cinatl et al. (1998) beschrieben, gewonnen. MOLT-4^rARA-C²⁵⁰ und H9^rARA-C⁶⁰⁰, die länger als ein Jahr in Gegenwart von 250 μ M bzw. 600 μ M Ara-C Medium gewachsen sind, wurden in den Experimenten genutzt. HFF und HA (Human Amnion Epithelial Cells) wurden zwischen der ersten und der dritten Subkultur nach ihrer Isolierung verwendet (Cinatl et al., 1992). Alle Zellen wurden in IMDM supplementiert mit 10 % FBS kultiviert.

6.1.6 Bestimmung der cytotoxischen Effekte

Die cytotoxischen Effekte BS-RNase-PLA-NP, der BS-RNase und der PLA-NP wurden wie unter 5.1.3.2 beschrieben mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt.

6.1.7 Bestimmung der Apoptose-Induktion

Die Apoptose-Induktion der BS-RNase-Zubereitungen wurde in H9^rARA-C⁶⁰⁰ und HFF bestimmt. Histon-assoziierte DNA-Fragmente aus dem Cytoplasma (Mono- und Oligonucleosomen) wurden quantifiziert, um zu bestimmen, ob die getestete Zubereitung Apoptose induziert. Zur Messung wurde ein photometrischer Enzym-Immunoassay mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen DNA und Histone genutzt. Die Bestimmung der Apoptose wurde in Kulturen durchgeführt, die 3 Tage mit 12,5 bis 50 µg/ml BS-RNase in Form von BS-RNase und BS-RNase-PLA-NP behandelt worden waren.

6.1.8 Aspermatogene Effekte

Die Prüfung auf aspermatogene Effekte wurde von Dr. Josef Matousek am Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, in Libechov (Tschechische Republik) durchgeführt:

Die aspermatogenen Effekte der BS-RNase-NP, der BS-RNase und der PLA-NP wurden wie bereits beschrieben bestimmt (Matousek, 1994; Matousek et al., 1995). Erwachsenen männlichen ICR Mäusen wurden die Präparationen, die 100 µg BS-RNase enthielten, in einen Testis injiziert. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse getötet, und beide Testes wurden mit den Epididymides entnommen, gewogen und histologisch studiert. Das Index-Gewicht (Testis-Gewicht in mg \times 10/Körpergewicht in g) wurde bestimmt. Destruktive Effekte der Testes wurden anhand des Verlustes spermatogener Zellen, der Abnahme der Breite der spermatogenen Schicht und des Durchmessers der Samen-führenden Hodenkanäle definiert. Der Grad des testikulären Schadens wurde in einer Skala von 0 (normale histologische Erscheinung) bis 4 (keine Zellen der spermatogenen Schicht vorhanden) dargestellt. Zwischen 50 und 60 Hodenkanäle im zentralen Teil der Testes wurden mikroskopisch vermessen.

6.1.9 Antiembryonale Effekte

Die Prüfung auf antiembryonische Effekte wurde von Dr. Josef Matousek am Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, in Libechov (Tschechische Republik) durchgeführt:

Die antiembryonischen Effekte der BS-RNase-NP, der BS-RNase und der PLA-NP wurde bestimmt wie von Matousek et al. beschrieben (Matousek et al., 1995). Die kryoprotektiven Substanzen wurden von kryokonservierten Mäuse-Embryonen (8-64 Blastomere) abgewaschen. Dann wurden die Embryos mit BS-RNase (100µg/ml), BS-RNase-PLA-NP (100 µg/ml BS-RNase), und PLA-NP in 1 ml MEMD Medium supplementiert mit 20 % FBS bei 37°C auf mit Paraffinöl überzogenen Kultivierungs-Falcon-Platten in einer Atmosphäre aus 90 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxyd (v/v), inkubiert. Die Mortalität der Embryos wurde 24, 48 und 72 h nach Zugabe der Präparationen bestimmt. Der Todeszeitpunkt wurde definiert als Ende der Zellteilung mit anschließender Degranulierung.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Größe der PLA-NP und Oberflächenladung

Die PLA-NP lagen in einer Größenordnung zwischen 200 und 250 nm. Das Zetapotential betrug ca. -22 mV in demineralisiertem Wasser.

6.2.2 Beladung der PLA-NP mit BS-RNase

Die Beladung wurde 3 mal bestimmt. Bis zu einer Konzentration von $0,34 \pm 0,01$ mg BS-RNase/ mg PLA-NP wurde die BS-RNase quantitativ an die NP gebunden. Bei einer weiteren Erhöhung der BS-RNase-Konzentration kam es zu keiner weiteren Bindung.

6.2.3 Zytotoxische Effekte der BS-RNase und der BS-RNase-NP

Die zytotoxischen Effekte der Substanzen wurden in den chemosensitiven parentalen H9 und MOLT4 bzw. den daraus abgeleiteten resistenten Zelllinien 5 Tage lang kontinuierlich in Konzentrationen zwischen 0,75 und 50 µg getestet und mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Wie in Abbildung 6.2.3.1 zu erkennen, zeigten BS-RNase und die BS-RNase-NP vergleichbare Toxizitäten gegenüber den Tumorzelllinien, waren jedoch gegenüber HFF und HA untoxisch. Die antitumorale Aktivität erstreckte sich gleichermaßen auf Cytarabin-sensitive (H9, MOLT-4) und -resistente (MOLT-4^rARA-C²⁵⁰, H9^rARA-C⁶⁰⁰) Tumorzellen.

Die PLA-NP zeigten bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml im Zellkultur-Medium keine Toxizität gegenüber allen getesteten Zelllinien.

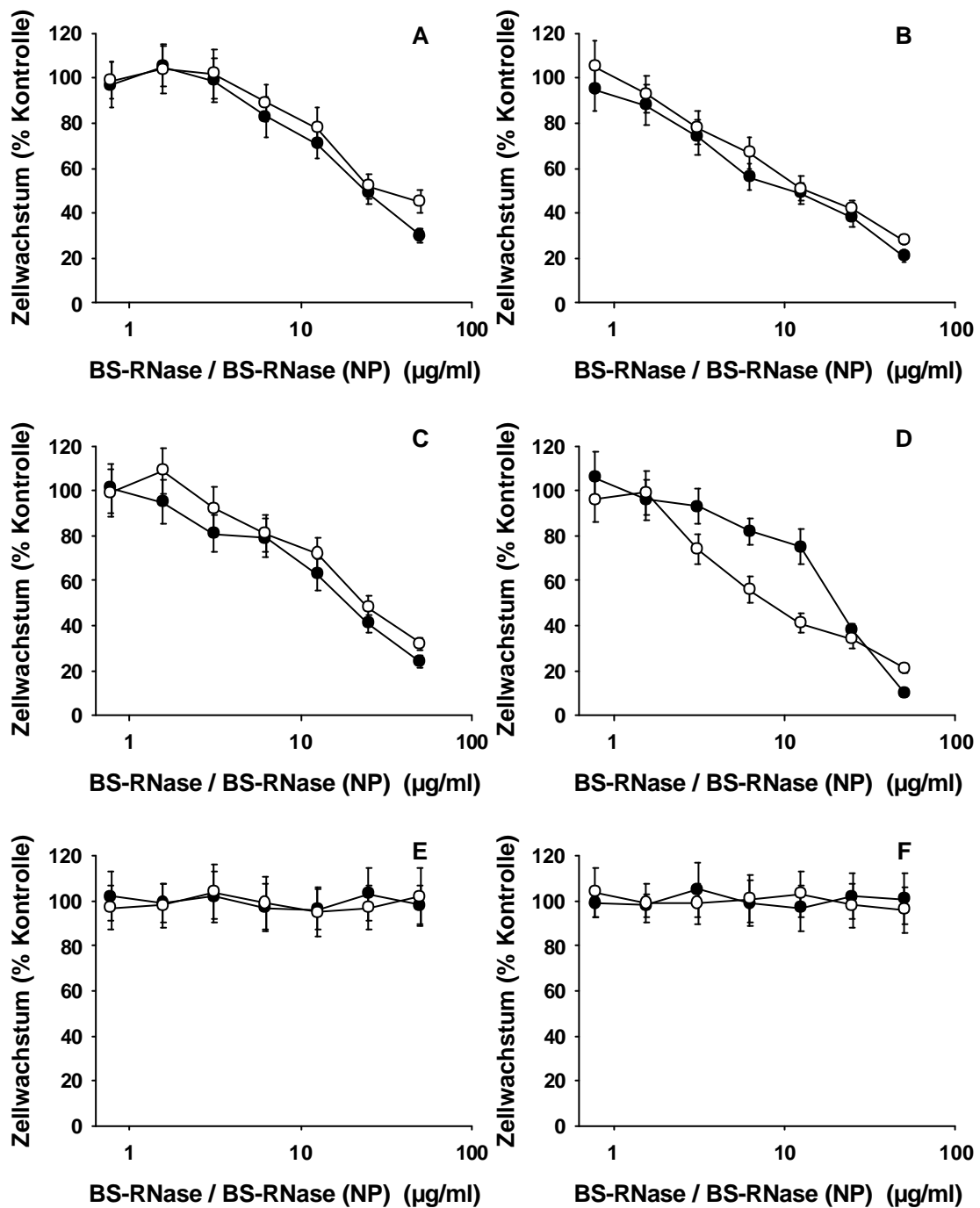


Abb. 6.2.3.1:

Cytotoxizität von BS-RNase und BS-RNase-NP in verschiedenen Zelllinien: A. MOLT4 Zellen, B. H9 Zellen, C. MOLT-4^rARA-C²⁵⁰ Zellen, D. H9^rARA-C⁶⁰⁰ Zellen, E. HFF, und F. HA Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3)

6.2.4 Induktion von Apoptose durch BS-RNase und BS-RNase-NP

Es ist bekannt, daß BS-RNase Apoptose in NB-Zelllinien induziert (Cinatl et al., 1999a). Ob dies auch bei anderen Zelltypen zutrifft, wurde in H9-Lymphomzellen getestet. Beide BS-RNase-Zubereitungen induzierten Apoptose in H9-Zellen. Sie führten zu einer vergleichbaren, dosisabhängigen Bildung von DNA-Fragmenten (Tab. 6.2.4.1). Die Behandlung von HFF führte nicht zu einer Apoptose-Induktion.

Tab. 6.2.4.1 Relative DNA-Fragmentierung durch BS-RNase appliziert als Lösung oder gebunden an PLA-Nanopartikel.

BS-RNase- Konzentration in µg/ml	HFF		H9-Zellen	
	BS-RNase	BS-RNase- PLA-NP	BS-RNase	BS-RNase- PLA-NP
12,5	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2
25	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2
50	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,4	3,3 ± 0,4

6.2.5 Aspermatogene Effekte

Im Vergleich zur freien BS-RNase zeigten die BS-RNase-PLA-NP einen verstärkten aspermatogenen Effekt (Tab. 6.2.5.1). Dieser verstärkte Effekt kann insbesondere an der reduzierten Dicke des spermatogenen Layers festgestellt werden. Die Vergleichsproben, die mit PBS-Puffer oder PLA-NP behandelt wurden zeigen keine bzw. nur einen schwachen Einfluß auf die Spermatogenese.

Hervorzuheben ist eine Beobachtung aus der Gruppe der mit BS-RNase-PLA-NP behandelten Mäuse. Bei einer Maus war der aspermatogene Effekt stärker in dem unbehandelten als in dem behandelten Testis ausgeprägt. Da keine direkte Verbindung zwischen den Testes besteht, ist ein Erreichen des zweiten Testis nur über eine Verteilung im Blutkreislauf möglich. Dies deutet darauf hin, daß PLA-NP in der Lage sein könnten eine Verteilung der BS-RNase im Organismus zu vermitteln.

6.2.6 Antiembryonale Effekte

Die antiembryonalen Effekte der getesteten Zubereitungen sind in Tabelle 6.2.6.1 gezeigt. In der unbehandelten Gruppe starben 14 % der Embryonen nach 24 h und 65 % der Embryonen überlebten 72 h. Nach dieser Zeit wurde das Experiment beendet. Im Gegensatz hierzu, starben 72 % der mit freier BS-RNase behandelten Embryonen innerhalb der ersten 24 h und kein Embryo überlebte länger als 48 h. In der Gruppe der mit BS-RNase-NP behandelten Gruppe starben alle Embryos in den ersten 24 h, was auf eine deutlich verstärkte Wirkung gegenüber der freien BS-RNase hindeutet. Zwischen der Kontrolle und den PLA-NP konnten nur sehr geringe Unterschiede festgestellt werden.

Tab. 6.2.5.1 Aspermatogene Effekte nach Injektion von BS-RNase und BS-RNase-PLA-Nanopartikel in männlichen Mäusen.

Injizierte Substanz	Anzahl der Mäuse	Testes-Gewicht \pm SEM		Breite der spermatogenen Layer der Testes in $\mu\text{m} \pm$ SEM		Durchmesser der Samenkanäle der Testes in $\mu\text{m} \pm$ SEM		Größe des testikulären Schadens in den injizierten Testes (0-4)
		injizierte Testes	nicht-injizierte Testes	injizierte Testes	nicht-injizierte Testes	injizierte Testes	nicht-injizierte Testes	
BS-RNase	10	20 \pm 6	32 \pm 3	31 \pm 8	61 \pm 7	135 \pm 23	162 \pm 10	2 - 3
BS-RNase-PLA-NP	7	19 \pm 8	31 \pm 6	15 \pm 10	51 \pm 19	126 \pm 47	151 \pm 26	2 - 4
PLA-NP	6	28 \pm 5	29 \pm 5	54 \pm 3	58 \pm 6	151 \pm 19	151 \pm 11	0 - 1
PBS	5	28 \pm 4	29 \pm 5	62 \pm 8	63 \pm 6	160 \pm 14	159 \pm 15	0

6 Biologische Wirkung von BS-RNase gebunden an PLA-Nanopartikel

Tab. 6.2.6.1 Toxische Effekte von BS-RNase, BS-RNase-PLA-NP und PLA-NP gegenüber Mäuse-Embryonen (100 µg/ml BS-RNase)

Entwicklung der Embryonen nach	Medium (Kontrolle)			PLA-NP			BS-RNase			BS-RNase-PLA-NP		
	Zahl der wachsenden Embryonen	Mortalität No.	%	Zahl der wachsenden Embryonen	Mortalität No.	%	Zahl der wachsenden Embryonen	Mortalität No.	%	Zahl der wachsenden Embryonen	Mortalität No.	%
0h	43	0	0	29	0	0	41	0	0	26	0	0
24h	37	6	14	23	6	21	12	29	72	0	26	100
48h	34	9	21	21	8	28	0	41	100	0	26	100
72h	28	15	35	18	11	38	0	41	100	0	26	100

6.3 Diskussion

Das Enzym BS-RNase ist eine vielversprechende, antitumoral aktive Substanz, die Tumorzellen selektiv zerstört. Allerdings verlief die systemische Applikation im Tierversuch bisher mit unbefriedigendem Erfolg (Pouckova et al., 1998a; Pouckova et al., 1998b). Dies wird auf ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften (z.B. schnelle Elimination) und auf die hohe Antigenität und die damit verbundene schnelle Inaktivierung zurückgeführt. Da die intratumorale Applikation jedoch kurative Effekte im Tiermodell zeigte, erscheint eine Verbesserung der Pharmakokinetik erfolgversprechend. Kolloidale Trägersysteme reichern sich in soliden Tumoren aufgrund des EPR-Effektes an (Matsumura & Maeda, 1986; Noguchi et al., 1998; Yuan et al., 1998). Außerdem sind kolloidale Trägersysteme geeignet die Zirkulationszeit von schnell eliminierten Substanzen zu verlängern und instabile Substanzen vor Abbau zu schützen (Kreuter, 1991; Allemann et al., 1993). Daher wurde in diesem Teil der Arbeit die Wirksamkeit der freien BS-RNase mit der Wirksamkeit der an PLA-NP gebundenen BS-RNase verglichen. PLA-NP wurden als Trägersystem ausgewählt, da BS-RNase adsorptiv in ausreichendem Maß an sie bindet und es sich um ein gut bioverträgliches und bioabbaubares Material handelt (Athanasίου et al., 1996).

Die Cytotoxizität der beiden BS-RNase-Zubereitungen wurde in parentalen und Cytarabin-resistenten Lymphom- und leukämischen Zellen bestimmt. Zur Abschätzung der Wirkung der Zubereitungen auf nicht-maligne Zellsysteme wurden HFF und HA verwendet. Cytarabin-resistente Zellen wurden ausgewählt, da Cytarabin Bestandteil primärer Therapieregimen zur Behandlung von Lymphomen und sekundärer Therapieregimen zur Behandlung von lymphozytischen Leukämien ist (Bryan et al., 1974; Cadman et al., 1977). Außerdem ist bekannt, daß die Behandlung von Tumorzellen mit Cytarabin zu einer auf multiplen Mechanismen beruhenden Resistenzbildung führen kann (Allegra & Grem, 1997). In den Untersuchungen wurden keine Unterschiede zwischen der Wirkung von freier und an NP gebundener BS-RNase festgestellt. Beide Zubereitungen zeigten starke cytotoxische Effekte gegenüber den parentalen und den chemoresistenten Zellen.

Gegenüber nicht-malignen Zellen waren sie jedoch in den untersuchten Konzentrationen untoxisch. In den leukämischen Zellen wurde nachgewiesen, daß die antitumorale Wirkung auf der Induzierung von Apoptose beruht, während in HFF keine Anzeichen einer Apoptoseinduktion entdeckt wurden. Diese Ergebnisse sind von großem Interesse, da das Auftreten von Resistenzen als einer der Hauptgründe für das Therapieversagen von Krebstherapien betrachtet wird (Volm, 1998). Sie stehen im Einklang mit Untersuchungen, die bereits mit Neuroblastomzellen durchgeführt wurden. Auch hier zeigte sich, daß BS-RNase parentale und chemoresistente Zellen selektiv durch Einleitung von Apoptose abtötete (Cinatl et al., 1999a; Cinatl et al., 2000).

BS-RNase und BS-RNase-PLA-NP wurden dann auf ihre aspermatogenen und antiembryonalen Effekte hin untersucht. Diese beiden Testsysteme werden eingesetzt, um die antitumorale Wirkung von BS-RNase-Zubereitungen im Tierversuch abzuschätzen, da diese biologischen Effekte im Zusammenhang mit der antitumoralen Wirkung stehen.

Die aspermatogenen und antiembryonalen Effekte der nanopartikulären Zubereitung waren hier stärker ausgeprägt, als die der BS-RNase-Lösung, wobei die besonders ausgeprägten antiembryonalen Effekte herauszuheben sind. Außerdem ist erwähnenswert, daß in der Gruppe der Mäuse, die mit BS-RNase-PLA-NP behandelt wurden, bei einer Maus der aspermatogene Effekt in dem unbehandelten Testis stärker ausgeprägt war, als in dem behandelten. Dies weist darauf hin, daß PLA-NP möglicherweise eine Veränderung der Körperverteilung vermitteln können, da für gewöhnlich nur der behandelte Testis von aspermatogenen Effekten betroffen ist. Da keine direkte Verbindung zwischen den Testes besteht, kann die Zubereitung den zweiten Hoden nur über den Körperkreislauf erreicht haben. Bei der Behandlung mit gelöster BS-RNase wurden derartige Effekte jedoch noch nie beobachtet, so daß diese Beobachtung mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bindung der BS-RNase an PLA-NP und eine dadurch veränderte Pharmakokinetik zurückzuführen ist. Ob sich diese Ergebnisse auch im Tumormodell bestätigen, muß sich in Tierversuchen zeigen.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gliederte sich in 3 Teilbereiche. Der erste Teilbereich beschäftigte sich mit der antiviralen in vitro Wirkung von EDDS (Ethylendiamindinbernsteinsäure), sowie mit der Wirkung von EDDS, DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) und DFO (Desferrioxamin) im Tiermodell. EDDS zeigte in vitro eine vielversprechende Wirkung gegenüber verschiedenen HCMV-Stämmen. Hierunter befanden sich GCV- und HPMP- resistente Stämme. Dies ist von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Wirkstoffe, da die Therapie von HCMV-bedingten Erkrankungen mit hohen Nebenwirkungen verbunden ist und zudem durch vermehrtes Auftreten von Resistenzen gegenüber den etablierten Therapeutika GCV, HPMP und Foscarnet erschwert wird. Die in-vitro-Daten legen einen ähnlichen antiviralen Wirkmechanismus des EDDS verglichen mit DTPA nahe. Diese Ähnlichkeit wird durch die enge strukturelle Verwandtschaft der Stoffe noch unterstrichen.

Im Mausmodell zeigte jedoch keiner der 3 untersuchten Chelatoren eine erfolgversprechende protektive Wirkung gegenüber MCMV-Infektionen. Damit wurden vorangegangene Untersuchungen im Rattenmodell bestätigt. Trotz vielversprechender anderslautender Ergebnisse, die auf eine in-vivo-Wirkung von DFO gegenüber CMV-Infektionen hinwiesen, scheint damit der Einsatz der Chelatoren aufgrund ihrer sehr kurzen Halbwertszeit im Körper stark limitiert.

Der zweite Teil der Dissertation befaßt sich mit der Entwicklung und Untersuchung von peptidischen Wirkstoffträgersystemen für DTPA. Hierbei ließen sich reproduzierbar lösliche HSA-DTPA- und GeIB-DTPA-Konjugate, sowie HSA-DTPA- und GeIB-DTPA-NP herstellen. Die antivirale und die antitumorale Wirkung dieser Konjugate wurde in vitro untersucht. Da für die antitumorale Wirkung von DTPA bisher keine Daten vorlagen, wurde zunächst die Cytotoxizität in einer NB-Zelllinie und in 3 Brustkrebs-Zelllinien bestimmt. Als Vergleich dienten HFF. Es zeigte sich, daß DTPA in unterschiedlichen Konzentrationen gegenüber den untersuchten Zelllinien cytotoxisch war, eine Tumorspezifität konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die Cytotoxizität und die antivirale Wirkung des DTPA wurden in vitro durch Bindung an die unterschiedlichen peptidischen Trägersysteme deutlich erhöht. Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der therapeutischen Breite, da HFF in gleichem Maße stärker geschädigt wurden. Trotzdem bieten die Trägersystem-Zubereitungen im Hinblick auf eine in-vivo-Anwendung einige Vorteile. Es könnten geringere Mengen DTPA eingesetzt werden, was eine verringerte Ausschwemmung von Metallionen zur Folge hätte. Neben einer verlängerten Zirkulationszeit im Organismus könnte die veränderte Körperverteilung zu Verbesserungen führen. Im Falle der antitumoralen Anwendung wäre dies eine Anreicherung im Tumor aufgrund des EPR-Effektes. Für die antivirale Anwendung wären die Anreicherung in entzündeten Geweben, sowie die Anreicherung in Monozyten und Makrophagen von großem Interesse, da diesen Zellen ein entscheidender Anteil an dem durch CMV verursachten Multiorganbefall zugerechnet wird. Trotzdem bedarf der in-vivo-Einsatz einer eingehenden Evaluierung und erscheint aufgrund der geringen therapeutische Breite insbesondere im Hinblick auf die Therapie von Tumoren stark eingeschränkt.

Bezüglich des cytotoxischen Mechanismus weist die Wirkung der DTPA-Konjugate darauf hin, daß DTPA den Zellzyklus und die Virusreplikation durch Wechselwirkung mit der Zellmembran und dadurch Veränderung der Signaltransduktion beeinflusst. Da eine geringere DTPA-Menge größere Effekte verursacht, erscheint es unwahrscheinlich, daß die Komplexierung von Metallionen für die Wirkungen verantwortlich war.

Im dritten Teil dieser Dissertation wurde eine PLA-NP-Trägersystem für das antitumoral wirksame Enzym BS-RNase entwickelt. BS-RNase zeigte in vitro und bei intratumoraler Applikation sehr vielversprechende, selektive antitumorale Effekte gegenüber proliferierenden und ruhenden Tumorzellen. Die systemische Applikation war jedoch nicht erfolgreich. Dieses Scheitern wurde auf hohe Antigenität, kurze Halbwertszeit der Substanz im Körper und auf eine ungenügende Körperverteilung zurückgeführt. NP sind geeignet die Zirkulation im Körper zu verlängern und reichern sich in Tumoren aufgrund des EPR-Effektes an. PLA-NP wurden ausgewählt, da sie BS-RNase in ausreichendem Maß binden und da PLA

7 Zusammenfassung

ein bioabbaubares und bioverträgliches Material ist. In vitro unterschied sich die nanopartikuläre Zubereitung bei der Wirkung gegenüber normalen, Lymphom- und Leukämiezellen nicht. Beide BS-RNase-Zubereitungen induzierten Apoptose in parentalen und chemoresistenten Krebszellen. Normale Zellen wurden nicht in ihrer Viabilität beeinträchtigt. Die aspermatogenen und antiembryonalen Wirkungen von BS-RNase-Zubereitungen weisen auf ihre antitumoralen Eigenschaften hin. In diesen beiden Testsystemen übertraf die nanopartikuläre Zubereitung die Wirkung der BS-RNase-Lösung. In-vivo-Versuche müssen nun den tatsächlichen Stellenwert der BS-RNase-PLA-NP zeigen.

8 Literatur:

- Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem* 49, 357-393 (1980)
- Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8, 504-512 (1994)
- Alberg AJ, Singh S, May JW, Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol* 12, 515-520 (2000)
- Allegra GJ, Grem JL. Pharmacology of cancer chemotherapy. Antimetabolites. In: DeVita VT jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, New York, Lippincot-Raven Publishers, 432-452 (1997)
- Allémann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles – preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* 39, 173-191 (1993)
- Allémann E, Rousseau J, Brasseur N, Kudrevich SV, Lewis K, van Lier JE. Photodynamic therapy of tumours with hexadecafluoro zinc phthalocynine formulated in PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles. *Int J Cancer* 66, 821-824 (1996)
- Alpar HO, Field WN, Hyde R, Lewis DA. The transport of microspheres from the gastro-intestinal tract to inflammatory air pouches in the rat. *J Pharm Pharmacol* 41; 194-196 (1989)
- Andrews FJ, Morris CJ, Kondratowicz G, Blake DR. Effect of iron chelation on inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 327-333 (1987)
- Athanasίου KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17, 93-102 (1996)
- Averett DR, Lubbers C, Elion GB, Spector T. Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex type 1 virus. Characterization of a distinct enzyme. *J Biol Chem* 258, 9831-9838 (1983)
- Averett DR, Furman PA, Spector T. Ribonucleotide reductase of herpes simplex virus type 2 resembles that of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 52, 981-983 (1984)
- Bach MC, Bagwell SP, Knapp NP, Davis KM, Hedstrom PS. 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for cytomegalovirus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 103, 381-382 (1985)
- Bacon BR, Britton RS. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? *Hepatology* 11, 127-137 (1990)
- Barankiewicz J, Cohen A. Impairment of nucleotide metabolism by iron-chelating deferoxamine. *Biochem Pharmacol* 36, 2343-2347 (1987)

- Barredo JC, Synold TW, Laver J, Relling MV, Pui CH, Priest DG, Evans WE. Differences in constitutive and post-methotrexate folylpolyglutamate synthetase activity in B-lineage and T-lineage leukemia. *Blood* 84, 564-569 (1994)
- Bartholeyns J, Baudhuin P. Inhibition of tumor cell proliferation by dimerized ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 573-576 (1976)
- Bauer KH, Frömming K-H, Führer C. *Pharmazeutische Technologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 165-167 (1993)
- Beck P, Kreuter J, Reszka R, Fichtner I. Influence of polybutylcyanoacrylate nanoparticles and liposomes on the efficacy and toxicity of the anticancer drug mitoxantrone in murine tumour models. *J Microencapsul* 10, 101-114 (1993)
- Becton DL, Bryles P. Deferoxamine inhibition of human neuroblastoma viability and proliferation. *Cancer Res* 48, 7189-7192 (1988)
- Bender A, Schäfer V, Steffan AM, Royer C, Kreuter J, Rübsamen-Waigmann H, von Briesen H. Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles. *Res Virol* 145, 215-220 (1994)
- Bender AR, von Briesen H, Kreuter J, Duncan IB, Rübsamen-Waigmann H. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1467-1471 (1996)
- Biegel JA, White PS, Marshall HN, Fujimori M, Zackai EH, Scher CD, Brodeur GM, Emanuel BS. Constitutional 1p36 deletion in a child with neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 52, 176-182 (1993)
- Bijsterbosch MK, Manoharan M, Rump ET, De Vruh RL, van Veghel R, Tivel KL, Biessen EA, Bennett CF, Cook PD, van Berkel TJ. In vivo fate of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial liver cells. *Nucleic Acids Res* 25, 3290-3296 (1997)
- Blake DR, Hall ND, Bacon PA, Dieppe PA, Halliwell B, Gutteridge JM. Effect of a specific iron chelating agent on animal models of inflammation. *Ann Rheum Dis* 42, 89-93 (1983)
- Blatt J, Stitely S. Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Res* 47, 1749-1750 (1987)
- Blatt J, Boegel F, Hedlund BE, Arena VC, Shadduck RK. Failure to alter the course of acute myelogenous leukemia in the rat with subcutaneous deferoxamine. *Leuk Res* 15, 391-394 (1991)
- Blatt J. Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Res* 14, 2109-2112 (1994)
- Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast

8 Literatur

- cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 332, 901-906 (1995)
- Borowitz MJ, Dowell BL, Boyett JM, Pullen DJ, Crist WM, Quddus FM, Falletta JM, Metzgar RS. Clinicopathologic aspects of E rosette negative T cell acute lymphocytic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 4, 170-177 (1986)
- Bott SE. Submicron particle sizing by photon correlation spectroscopy: Use of multi-angle detection. In: Povder T (Ed.). Particle size distribution - Assessment and characterization. ACS Symposium Series No. 332, American Chemical Society, Washington, DC, Chapter 5 (1987)
- Bowern N, Ramshaw IA, Clark IA, Doherty PC. Inhibition of autoimmune neuropathological process by treatment with an iron-chelating agent. *J Exp Med* 160, 1532-1543 (1984)
- Bradley B, Prowse SJ, Bauling P, Lafferty KJ. Desferrioxamine treatment prevents chronic islet allograft damage. *Diabetes*. 35, 550-555 (1986)
- Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res* 31, 2098-2103 (1971)
- Bridges KR, Cudkowicz A. Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J Biol Chem* 259, 12970-12977 (1984)
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121-1124 (1984)
- Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI, Haase G, Hartmann O, Hayes FA, Helson L, Kemshead J, Lampert F, Ninane J, Ohkawa H, Philip T, Pinkerton CR, Pritchard J, Sawada T, Siegel S, Smith EI, Tsuchida Y, Voute PA. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 6, 1874-1881 (1988)
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castle V, Castleberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, Kaneko M, Kemshead J, Lampert F, Lee REJ, Look T, Pearson ADJ, Pkilippe T, Roald B, Sawada T, Seeger RC, Tsuchida Y, Voute PA. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11, 1466-1477 (1993)
- Brodie C, Siriwardana G, Lucas J, Schleicher R, Terada N, Szepesi A, Gelfand E, Seligman P. Neuroblastoma sensitivity to growth inhibition by deferrioxamine: evidence for a block in G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 53, 3968-3975 (1993)
- Brown JP, Hewick RM, Hellstrom I, Hellstrom KE, Doolittle RF, Dreyer WJ. Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature* 296, 171-173 (1982)

- Bryan JH, Henderson ES, Levental BG. Cytosine arabinoside and 6-thioguanine in refractory acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 33, 539-544 (1974)
- Bucknall RA, Moores H, Simms R, Hesp, B. Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporinum aphidicola*. *Antimicrob Agents Chemother* 4, 4294-4298 (1973)
- Budman DR, Berry DA, Cirrincione CT, Henderson IC, Wood WC, Weiss RB, Ferree CR, Muss HB, Green MR, Norton L, Frei E. Dose and dose intensity as determinants of outcome in the adjuvant treatment of breast cancer. The Cancer and Leukemia Group B. *J Natl Cancer Inst* 90, 1205-1211 (1998)
- Cadman E, Farber L, Berd D, Bertino J. Combination therapy for diffuse leukocytic lymphoma that includes antimetabolites. *Cancer Treat Rev* 61, 1109-1116 (1977)
- Catsch A, Harmuth-Hoene AE. New developments in metal antidotal properties of chelating agents. *Biochem Pharmacol* 24, 1557-1562 (1975)
- Chu E, Drake JC, Koeller DM, Zinn S, Jamis-Dow CA, Yeh GC, Allegra CJ. Induction of thymidylate synthase associated with multidrug resistance in human breast and colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 39, 136-143 (1991)
- Cinatl J, Matousek J, Stanek R. Action of A RNase and AS RNase on growth of cells in vitro. *Folia Biol.* 23, 235-242 (1977)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Mainke M, Weissflog A, Steigmann G, Rabenau H, Doerr HW, Kornhuber B. Aphidicolin selectively kills neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett* 67, 199-206 (1992)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Mainke M, Weissflog A, Rabenau H, Kornhuber B, Doerr HW. In vitro differentiation of human neuroblastoma cells induced by sodium phenylacetate. *Cancer Lett* 70, 15-24 (1993)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Rabenau H, Gumbel HO, Kornhuber B, Doerr HW. In vitro inhibition of human cytomegalovirus replication by desferrioxamine. *Antiviral Res* 25, 73-77 (1994)
- Cinatl J jr, Scholz M, Weber B, Cinatl J, Rabenau H, Markus BH, Encke A, Doerr HW. Effects of desferrioxamine on human cytomegalovirus replication and expression of HLA antigens and adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *Transpl Immunol* 3, 313-320 (1995a)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Gumbel HO, Chenot JF, Scholz M, Encke A, Doerr HW. In vitro inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral Res* 27 405-418 (1995b)
- Cinatl J jr, Hoffmann F, Cinatl J, Weber B, Scholz M, Rabenau H, Stieneker F, Kabickova H, Blasko M, Doerr HW. In vitro inhibition of human cytomegalovirus replication by calcium trisodium diethylenetriaminepentaacetic acid. *Antiviral Res* 31, 23-34 (1996a)

8 Literatur

- Cinatl J jr, Vogel J-U, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Novak M, Kornhuber B, Doerr HW. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line. *Int J Cancer* 65, 90-96 (1996b)
- Cinatl J jr, Kotchetkov R, Groschel B, Cinatl J, Hernáiz Driever P, Kabickova H, Kornhuber B, Schwabe D, Doerr HW. Azidothymidine resistance of H9 human T-cell lymphoma cells is associated with decreased sensitivity to antitumor agents and inhibition of apoptosis. *Int J Mol Med* 2, 685-691 (1998)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Kotchetkov R, Vogel J-U, Woodcock BG, Matousek J, Pouckova P, Kornhuber B. Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis. *Int J Oncol* 15, 1001-1009 (1999a)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Kotchetkov R, Pouckova P, Vogel J-U, Rabenau H, Michaelis M, Kornhuber B. Cytotoxicity of L-cycloserine against human neuroblastoma and medulloblastoma cells is associated with the suppression of ganglioside expression. *Anticancer Res* 19, 5349-5354 (1999b)
- Cinatl J jr, Kotchetkov R, Scholz M, Cinatl J, Vogel J-U, Hernaíz Driever P, Doerr HW. Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the tumor suppressor protein p53. *Am J Pathol* 155, 285-292 (1999c)
- Cinatl J jr, Cinatl J, Kotchetkov R, Matousek J, Woodcock BG, Koehl U, Vogel J-U, Kornhuber B, Schwabe D. Bovine seminal ribonuclease exerts selective cytotoxicity toward neuroblastoma cells both sensitive and resistant to chemotherapeutic drugs. *Anticancer Res* 20, 853-859 (2000a)
- Cinatl J jr, Bittoova M, Margraf S, Vogel J-U, Cinatl J, Preiser W, Doerr HW. Cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 and -2 in cultured human retinal glial cells: effects of antiviral agents. *J Infect Dis* 182, 643-651 (2000b)
- Cinatl J jr, Blaheta R, Bittoova M, Scholz M, Margraf S, Vogel J-U, Cinatl J, Doerr HW. Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelial cells is mediated by virus-induced Up-regulation of fas ligand independent of neutrophil apoptosis. *J Immunol* 165, 4405-4413 (2000c)
- Coester CJ, Langer K, van Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul* 17, 187-19 (2000)
- Cohen SR, Stenn KS, Braverman IM, Beck GJ. Clinicopathologic relationships, survival, and therapy in 59 patients with observations on occupation as a new prognostic factor. *Cancer* 46, 2654-2666 (1980)
- Colleoni M, Price K, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Coates A, Lindtner J, Collins J, Gelber RD, Thurlimann B, Rudenstam CM. Dose-response effect of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil (CMF) in node-

- positive breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Eur J Cancer* 34, 1693-700 (1998)
- Cory JG, Cory AH, Rappa G, Lorico A, Liu MC, Lin TS, Sartorelli AC. Structure-function relationships for a new series of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones on ribonucleotide reductase activity and tumor cell growth in culture and in vivo. *Adv Enzyme Regul* 35; 55-68 (1995)
- Costagliola DG, de Montalembert M, Lefrere JJ, Briand C, Rebullia P, Baruchel S, Dessi C, Fondu P, Karagiorga M, Perrimond H, Girot R. Dose of desferrioxamine and evolution of HIV-1 infection in thalassaemic patients. *Br J Haematol* 87, 849-852 (1994)
- Crist WM, Shuster JJ, Falletta J, Pullen DJ, Berard CW, Vietti TJ, Alvarado CS, Roper MA, Prasthofer E, Grossi CE. Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 72, 1891-1897 (1988)
- Crivellari D, Bonetti M, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rudenstam CM, Thurlimann B, Price KN, Coates AS, Hurny C, Bernhard J, Lindtner J, Collins J, Senn HJ, Cavalli F, Forbes J, Gudgeon A, Simoncini E, Cortes-Funes H, Veronesi A, Fey M, Goldhirsch A. Burdens and benefits of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and tamoxifen for elderly patients with breast cancer: the International Breast Cancer Study Group Trial VII. *J Clin Oncol* 18, 1412-1422 (2000)
- D'Alessio G, Malorni MC, Parente A, Dissociation of bovine seminal ribonuclease into catalytically active monomers by selective reduction and alkylation of the intersubunit disulfide bridges. *Biochemistry* 14, 1116-1122 (1975)
- Darnell G, Richardson DR. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents III: the effect of the ligands on molecular targets involved in proliferation. *Blood* 94, 781-792 (1999)
- De Jaeger N, Demeyere H, Finsy R, Sneyers R, Vanderdeelen J, Van der Meer P, Van Laethem M. Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part I: Monodisperse latices: Influence of scattering angle and concentration of dispersed material. *Part Part Syst Charact* 8, 179-186 (1991)
- De Jaeghere F, Allemann E, Feijen J, Kissel T, Doelker E, Gurny R. Cellular uptake of PEO surface-modified nanoparticles: evaluation of nanoparticles made of PLA: PEO diblock and triblock copolymers. *J Drug Target* 8, 143-53 (2000)
- De Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. Summary of the II International Symposium on cytomegalovirus. *Antivir Res* 39, 141-162 (1998)

8 Literatur

- De Schrijver M, Streule K, Senekowitsch R, Fridrich R. Scintigraphy of inflammation with nanometer-sized colloidal tracers. *Nucl Med Commun* 8, 895-908 (1987)
- Deugnier Y, Battistelli D, Jouanolle H, Guyader D, Gueguen M, Loreal O, Jacquelinet C, Bourel M, Brissot P. Hepatitis B virus infection markers in genetic haemochromatosis. A study of 272 patients. *J Hepatol* 13, 286-290 (1991)
- Di Donato A, D'Alessio G. Heterogeneity of bovine seminal ribonuclease. *Biochemistry* 20, 7232-7237 (1981)
- Di Donato A, Cafaro V, D'Alessio G. Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J Biol Chem* 269, 17394-17396 (1994)
- Dittgen M, Herbst B. Das Zetapotential - Grundlagen, Meßmethoden und Anwendung in der Pharmazie. *Pharmazie* 42, 641-656 (1987)
- Djeha A, Brock JH. Effect of transferrin, lactoferrin and chelated iron on human T-lymphocytes. *Br J Haematol* 80, 235-241 (1992)
- Doan NG, Parks JE, Lindenbaum A. Rapid spectrophotometric determination of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in urine. *Biochem Med* 14, 220-229 (1975)
- Donfrancesco A, Deb G, Dominici C, Pileggi D, Castello MA, Helson L. Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. *Cancer Res* 50, 4929-4930 (1990)
- Donfrancesco A, Deb G, De Sio L, Cozza R, Castellano A. Role of deferoxamine in tumor therapy. *Acta Haematol* 95, 66-69 (1996)
- Dragsten PR, Hallaway PE, Hanson GJ, Berger AE, Bernard B, Hedlund BE. First human studies with a high-molecular-weight iron chelator. *J Lab Clin Med* 135, 57-65 (2000)
- Durbin PW, Schmidt CT. Predicting the kinetics of chelating agents in man from animal data. *Health Phys* 57, 165-173 (1989)
- Durbin PW, Kullgren B, Schmidt CT. Circulatory kinetics of intravenously injected ²³⁸Pu(IV) citrate and ¹⁴C-CaNa₃-DTPA in mice: comparison with rat, dog, and reference man. *Health Phys* 72, 222-235 (1997)
- Dutia BM. Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus has a virus-specified constituent. *J Gen Virol* 64, 513-521 (1983)
- Edgaonkar PS, Atchaya M, Subbaraman PR. Spectrophotometric estimation of Bi(III) & Pb(II) with Diethylenetriaminepentaacetic acid. *Indian J Chem* 13, 400-402 (1974)
- Ehrlich P. The relations existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action. In: Ehrlich P (ed). *Collected Studies on Immunity*. John Wiley and Sons, London (1906)

- Erice A, Jordan MC, Chace BA, Fletcher C, Chinnock BJ, Balfour HH. Ganciclovir treatment of cytomegalovirus disease in transplant recipients and other immunocompromised hosts. *JAMA* 257, 3082-3087 (1987)
- Erice A, Chou S, Biron KK, Stanat SC, Balfour HH, Jordan MC. Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *N Engl J Med* 320, 289-293 (1989)
- Estrov Z, Tawa A, Wang XH, Dube ID, Sulh H, Cohen A, Gelfand EW, Freedman MH. In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood* 69, 757-761 (1987)
- Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's Cancer Study Group A. *Cancer* 27, 374-378 (1971)
- Evans AE, Silber JH, Shopilsky A, D'Angio GJ. Successful management of low-stage neuroblastoma without adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single institution. *J Clin Oncol* 14, 2504-2510 (1996)
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 664-668 (1994)
- Felsenstein D, D'Amico DJ, Hirsch MS, Neumeyer DA, Cederberg DM, de Miranda P, Schooley RT. Treatment of cytomegalovirus retinitis with 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]guanine. *Ann Intern Med* 103, 377-380 (1985)
- Field AK. Human cytomegalovirus: challenges opportunities and new drug development. *Antivir Chem Chemoth* 10, 219-232 (1999)
- Fierro MT, Quaglino P, Savoia P, Verrone A, Bernengo MG. Systemic polychemotherapy in the treatment of primary cutaneous lymphomas: a clinical follow-up study of 81 patients treated with COP or CHOP. *Leuk Lymphoma* 31, 583-588 (1998)
- Finsy R, De Jaeger N. Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part II: Average values. *Part Part Syst Charact* 8, 187-193 (1991)
- Finsy R, De Jaeger N, Sneyers R, Gelade E. Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part III: Mono and bimodal distributions and data analysis. *Part Part Syst Charact* 9, 125-137 (1992)
- Finsy R, Deriemaker L, De Jaeger N, Sneyers R, Vanderdeelen J, Van der Meeren P, Demeyere H, Stone-Masui J, Haestier A, Clauwaert J, De Wispelaere W, Gillioen P, Steyfkens S, Gelade E. Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part IV: Resolution of bimodals and comparison with other particles sizing methods. *Part Part Charact* 10, 118-128 (1993)
- Fish KN, Britt W, Nelson JA. A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages. *J Virol* 70, 1855-1862 (1996)

8 Literatur

- Foss FM, Ihde DC, Linnoila IR, Fischmann AB, Schechter GP, Cotelingam JD, Steinberg SM, Ghosh BC, Stocker JL, Bastian A, Phares JC, Sausville EA. Phase II trial of fludarabine phosphate and interferon alfa-2a in advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome. *J Clin Oncol* 12, 2051-2059 (1994)
- Foss FM, Kuzel TM. Experimental therapies in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9, 1127-1137 (1995)
- Gaynon PS, Bleyer WA, Steinherz PG, Finklestein JZ, Littman PS, Miller DR, Reaman GH, Sather HN, Hammond GD. Modified BFM therapy for children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia and unfavorable prognostic features. Report of Children's Cancer Study Group Study CCG-193P. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 10, 42-50 (1988)
- Gianasi E, Wasil M, Evagorou EG, Kedde A, Wilson G, Duncan R. HEMA copolymer platinates as novel antitumour agents: in vitro properties, pharmacokinetics and antitumour activity in vivo. *Eur J Cancer* 35, 994-1002 (1999)
- Goldhirsch A, Coates AS, Colleoni M, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD. Adjuvant chemoendocrine therapy in postmenopausal breast cancer: cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil dose and schedule may make a difference. International Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 16, 1358-1362 (1998)
- Goldschmidts WL, Ginsburg M, Pearson GR. Neutralization of Epstein-Barr virus-induced ribonucleotide reductase with antibody to the major restricted early antigen polypeptide. *Virology* 170, 330-333 (1989)
- Greaves MF. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science* 234, 697-704 (1986)
- Gross V, Scholz M, Blaheta RA, Cinatl J jr, Encke A, Markus BH. Inhibition of glutathion synthetase leads to enhanced expression of cytomegalovirus-specific proteins in human endothelial cells. *Immunobiology* 191, 253 (1994)
- Guilmette RA, Cerny EA, Rahman YE. Pharmacokinetics of the iron chelator desferrioxamine as affected by liposome encapsulation: potential in treatment of chronic hemosiderosis. *Life Sci* 22, 313-320 (1978)
- Gümbel H, Cinatl J jr, Rabenau H, Doerr HW, Ohrloff C. Antiviral effect of L-ascorbic acid 2-phosphate on the replication of human cytomegalovirus in cultured fibroblasts. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 35, 1311 (1994)
- Gümbel H, Cinatl J Jr, Rabenau H, Vogel JU, Doerr HW, Ohrloff C. Selektive Hemmung der Replikation des humanen Zytomegalievirus durch Desferrioxamin in vitro und in vivo (Fallbericht). *Ophthalmologie* 92, 840-843 (1995)
- Hamzeh FM, Spector T, Lietman PS. 2-Acetylpyridine 5-[(dimethylamino)thiocarbonyl]-thiocarbonohydrazone (1110U81) potently inhibits human cytomegalovirus replication and potentiates the antiviral effects of ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 602-604 (1993)

- Hann HW, Stahlhut MW, Hann CL. Effect of iron and desferoxamine on cell growth and in vitro ferritin synthesis in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 11, 566-569 (1990)
- Hann HW, Stahlhut MW, Rubin R, Maddrey WC. Antitumor effect of deferoxamine on human hepatocellular carcinoma growing in athymic nude mice. *Cancer* 70, 2051-2056 (1992)
- Harada K, Eizuru Y, Isashiki Y, Ihara S, Minamishima Y. Genetic analysis of a clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting resistance against both ganciclovir and cidofovir. *Arch Virol* 142, 215-225 (1997)
- Hartmann O, Valteau-Couanet D, Vassal G, Lapierre V, Brugieres L, Delgado R, Couanet D, Lumbroso J, Benhamou E. Prognostic factors in metastatic neuroblastoma in patients over 1 year of age treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation: a multivariate analysis in 218 patients treated in a single institution. *Bone Marrow Transplant* 23, 789-795 (1999)
- Hartung G, Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Heeger S, Kranzle M, Edler L, Frei E, Fiebig HH, Heene DL, Maier-Borst W, Queisser W. Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. *Clin Cancer Res* 5, 753-759 (1999)
- Hartzen SH, Frimodt-Moller N, Thomsen VF. The antibacterial activity of a siderophore. 3. The activity of deferoxamine in vitro and its influence on the effect of antibiotics against *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS* 102, 219-226 (1994)
- Haug CE, Colvin RB, Delmonico FL, Auchincloss H Jr, Tolkoff-Rubin N, Preffer FI, Rothlein R, Norris S, Scharschmidt L, Cosimi AB. A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. *Transplantation* 55, 766-772 (1993)
- Herrmann JJ, Roenigk HH jr, Hurria A, Kuzel TM, Samuelson E, Rademaker AW, Rosen ST. Treatment of mycosis fungoides with photochemotherapy (PUVA): long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol* 33, 234-242 (1995)
- Hershko C, Peto TE. Deferoxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *J Exp Med* 168 375-387 (1988)
- Hershko C, Pinson A, Link G. Prevention of anthracycline cardiotoxicity by iron chelation. *Acta Haematol* 95, 87-92 (1996)
- Hlinak Z, Matousek J, Madlafousek J. The effect of bull seminal ribonuclease on reproductive organs and sexual behaviour in male rats. *Physiol Bohemoslov* 30, 539-542 (1981)
- Hnatowich DJ, Schlegel P. Albumin microspheres labeled with Ga-67 by chelation: concise communication. *J Nucl Med* 22, 623-626 (1981)

8 Literatur

- Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL, Lanteigne D, Davis MA. Radioactive labeling of antibody: A simple and efficient method. *Science* 220, 613-615 (1983)
- Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JW, Tattersall MH. Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. *Br J Haematol* 33, 517-526 (1976)
- Hoyes KP, Hider RC, Porter JB. Cell cycle synchronization and growth inhibition by 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators in leukemia cell lines. *Cancer Res* 52, 4591-4599 (1992)
- Hunt SW, Harris ES, Kellermann SA, Shimizu Y. T-lymphocyte interactions with endothelium and extracellular matrix. *Crit Rev Oral Biol Med* 7, 59-86 (1996)
- Hutchinson DW. Metal chelators as potential antiviral agents. *Antiviral Res* 5, 193-205 (1985)
- Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C, Nelson JA. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* 65, 6581-8 (1991)
- Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M, Oguro M, Nagano H, Mano Y. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature* 275, 458-460 (1978)
- Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255, 1125-1127 (1992)
- Jabs DA, Enger C, Dunn JP, Formann. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. CMV retinitis and viral resistance study group. *J Infect Dis* 177, 770-773 (1998a)
- Jabs DA, Enger C, Formann M, Dunn JP. Incidence of foscarnet resistance and cidofovir resistance in patients treated for the cytomegalovirus retinitis and viral resistance group. Incidence of foscarnet resistance and cidofovir resistance in patients treated for cytomegalovirus retinitis. *Antimicrob Agents Chemoth* 42, 2240-2244 (1998b).
- Jackson MJ, Brenton DP. DTPA in the management of iron overload of thalassaemia. *J Inher Metab Dis* 6, 97-98 (1983)
- Jahn G, Stenglein S, Riegler S, Einsele H, Sinzger C. Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages. *Intervirology* 42, 365-372 (1999)
- Jendrisak M, Jendrisak G, Gamero J, Mohanakumar T. Prolongation in murine cardiac allograft survival with monoclonal antibodies to LFA-1, ICAM-1, and CD4. *Transplant Proc* 25, 825-827 (1993)
- Jonas A, Weber G. Partial modification of bovine serum albumin with dicarboxylic anhydrides. Physical properties of the modified species. *Biochemistry* 9, 4729-4735 (1970)

- Julyan PJ, Seymour LW, Ferry DR, Daryani S, Boivin CM, Doran J, David M, Anderson D, Christodoulou C, Young AM, Hesselwood S, Kerr DJ. Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine. *J Control Release* 57, 281-290 (1999)
- Kadiiska MB, Burkitt MJ, Xiang QH, Mason RP. Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *J Clin Invest* 96, 1653-1657 (1995)
- Kar L, Matsumura P, Johnson ME. Bivalent-metal binding to CheY protein. Effect on protein conformation. *Biochem J* 287, 521-531 (1992)
- Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ. Clinical and cell biological features related to cellular drug resistance of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 19, 407-416 (1995)
- Kattan J, Droz JP, Couvreur P, Marino JP, Boutan-Laroze A, Rougier P, Brault P, Vranckx H, Grognet JM, Morge X, Sancho-Garnier H. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Invest New Drugs* 10, 191-199 (1992)
- Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Curr Opin Oncol* 10, 43-51 (1998)
- Kavanaugh AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH, Lipsky PE. A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23, 1338-1344 (1996)
- Kim JS, Soucek J, Matousek J, Raines RT. Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities. *Biochem J* 308, 547-550 (1995)
- Kirking MH. Treatment of chronic iron overload. *Clin Pharm* 10, 775-783 (1991)
- Kloover JS, Scholz M, Cinatl J Jr, Lautenschlager I, Grauls GE, Bruggeman CA. Effect of desferrioxamine (DFO) and calcium trisodium diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) on rat cytomegalovirus replication in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 44, 55-65 (1999)
- Knox KK, Drobyski WR, Carrigan DR. Cytomegalovirus isolate resistant to ganciclovir and foscarnet from a marrow transplant patient. *Lancet* 337, 1292-1293 (1991)
- Koh HK, Charif M, Weinstock MA. Epidemiology and clinical manifestations of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9, 943-960 (1995)
- Kopecek J, Kopeckova P, Minko T, Lu Z. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *Eur J Pharm Biopharm* 50, 61-81 (2000)

8 Literatur

- Kotchetkov R, Cinatl J, Matousek J, Vogel J-U, Pouckova P, Wagner M, Kornhuber B, Schwabe D, Cinatl J jr. Bovine seminal ribonuclease inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 7, 363-367 (2000)
- Kovar J, Stunz LL, Stewart BC, Kriegerbeckova K, Ashman RF, Kemp JD. Direct evidence that iron deprivation induces apoptosis in murine lymphoma 38C13. *Pathobiology* 65, 61-68 (1997)
- Kreuter, J., Evaluation of nanoparticles as drug delivery systems I: preparation methods. *Pharm. Acta Helv.* 58, 196–209 (1983)
- Kreuter J. Nanoparticle-based drug delivery systems. *J Control Rel* 16, 169-176 (1991a)
- Kreuter J. Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. *Infection* 19, S224-228 (1991b)
- Kreuter J. Nanoparticles. In: Kreuter J (ed.) *Colloidal Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker Inc., New York, 219-342 (1994)
- Kunath K, Kopeckova P, Minko T, Kopecek J. HEMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. 3. The effect of free and polymer-bound adriamycin on the expression of some genes in the OVCAR-3 human ovarian carcinoma cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 49, 11-15 (2000)
- Kushner BH, Cheung NV, LaQuaglia MP, Ambros PF, Bonilla MA, Ladanyi M, Gerald WL. International neuroblastoma staging system stage 1 neuroblastoma: a prospective study and literature review. *J Clin Oncol* 14, 2174-2180 (1996)
- Laccetti P, Portella G, Mastronicola MR, Russo A, Piccoli R, D'Alessio G, Vecchio G. In vivo and in vitro growth inhibitory effect of bovine seminal ribonuclease on a system of rat thyroid epithelial transformed cells and tumors. *Cancer Res* 52, 4582-4586 (1992)
- Laccetti P, Spalletti-Cernia D, Portella G, De Corato P, D'Alessio G, Vecchio G. Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 54, 4253-4256 (1994)
- Lasfargues EY, Coutinho WG, Redfield ES. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 61, 967-978 (1978)
- Lauer SJ, Camitta BM, Leventhal BG, Mahoney DH Jr, Shuster JJ, Adair S, Casper JT, Civin CI, Graham M, Kiefer G, Pullen J, Steuber CP, Kamen B. Intensive alternating drug pairs for treatment of high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group pilot study. *Cancer* 71, 2854-2861 (1993)
- Laureys G, Speleman F, Opdenakker G, Benoit Y, Leroy J. Constitutional translocation t(1;17)(p36;q12-21) in a patient with neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 2, 252-254 (1990)

- Lehr CM. Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11, 119-160 (1994)
- Leport C, Puget S, Pepin JM, Levy S, Perronne C, Brun-Vezinet F, Vilde JL. Cytomegalovirus resistant to foscarnet: clinicovirologic correlation in a patient with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 168, 1329-1330 (1993)
- Leroux JC, Cozens R, Roesel JL, Galli B, Kubel F, Doelker E, Gurny R. Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice. *J Pharm Sci* 84, 1387-1391 (1995)
- Leu D, Manthey B, Kreuter J, Speiser P, DeLuca PP. Distribution and elimination of coated polymethyl [2-¹⁴C]methacrylate nanoparticles after intravenous injection in rats. *J Pharm Sci* 73, 1433-1437 (1984)
- Lipsky JJ, Lietman PS. Iron and deferoxamine in lymphocyte blastogenesis. *J Immunopharmacol* 2, 179-187 (1980)
- Löbenberg R, Kreuter J. Macrophage targeting of azidothymidine: a promising strategy for AIDS therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 1709-15 (1996)
- Löbenberg R, Araujo L, von Briesen H, Rodgers E, Kreuter J. Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats. *J Control Release* 50, 21-30 (1998a)
- Löbenberg R, Maas J, Kreuter J. Improved body distribution of ¹⁴C-labelled AZT bound to nanoparticles in rats determined by radioluminography. *J Drug Target* 5, 171-179 (1998b)
- Lori F, Malykh A, Cara A, Sun D, Weinstein JN, Lisziewicz J, Gallo RC. Hydroxyurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. *Science* 266, 801-805 (1994)
- Lowe PJ, Temple CS. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J Pharm Pharmacol* 46, 547-552 (1994)
- Lücke-Huhle C. Proliferation-dependent cytotoxicity of diethylene-triaminepentaacetate (DTPA) in vitro. *Health Phys* 31, 349-354 (1976)
- Lutzner M, Edelson R, Schein P, Green I, Kirkpatrick C, Ahmed A. Cutaneous T-cell lymphomas: the Sezary syndrome, mycosis fungoides, and related disorders. *Ann Intern Med* 83, 534-552 (1975)
- Mabeza GF, Biemba G, Gordeuk VR. Clinical studies of iron chelators in malaria. *Acta Haematol* 95, 78-86 (1996)
- Magnusson G, Flodh H, Malmfors T. Oncological study in rats of Ferastral, an iron-poly-(sorbitol-gluconic acid) complex, after intramuscular administration. *Scand J Haematol Suppl* 32, 87-98 (1977)

8 Literatur

- Martelius T, Scholz M, Krogerus L, Hockerstedt K, Loginov R, Bruggeman C, Cinatl JJr, Doerr HW, Lautenschlager I: Antiviral and immunomodulatory effects of desferrioxamine in cytomegalovirus-infected rat liver allografts with rejection. *Transplantation* 11, 1753-1761 (1999)
- Maruyama T, Lin CC, Yamasaki K, Miyoshi T, Imai T, Yamasaki M, Otagiri M. Binding of suprofen to human serum albumin. Role of the suprofen carboxyl group. *Biochem Pharmacol* 45, 1017-1026 (1993)
- Mastronicola MR, Piccoli R, D'Alessio G. Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. *Eur J Biochem* 230, 242-249 (1995)
- Matousek J. The effect of bovine seminal ribonuclease (AS RNase) on cells of Crocker tumour in mice. *Experientia* 29, 858-859 (1973)
- Matousek J, Grozdanovic J. Specific effect of bull seminal ribonuclease (AS RNase) on cell systems in mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 46A, 241-248 (1973)
- Matousek J, Stanek R. Action of bull seminal vesicle ribonuclease on mouse leukaemic cells BP-8 and EL-4. *Folia Biol (Prague)* 23, 56-65 (1977)
- Matousek J. Aspermatogenic effect of the bull seminal ribonuclease (BS RNase) in the presence of anti-BS RNase antibodies in mice. *Anim Genet* 25, 45-50 (1994)
- Matousek J, Soucek J, Riha J, Zankel TR, Bennert SA. Immunosuppressive activity of angiogenin in comparison with bovine seminal ribonuclease and pancreatic ribonuclease. *Comp Biochem Physiol B* 112B, 235-241 (1995)
- Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer therapy : mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agents SMANCS. *Cancer Res.* 46, 6387-6392 (1986)
- Matthay KK, Sather HN, Seeger RC, Haase GM, Hammond GD. Excellent outcome of stage II neuroblastoma is independent of residual disease and radiation therapy. *J Clin Oncol* 7, 236-244 (1989)
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Brit Med J* 321, 624-628 (2000)
- Minko T., Kopeckova P., Kopecek J. Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMA copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 86, 108-117 (2000)
- Minton EJ, Tysoe C, Sinclair JH, Sissons JG. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J Virol* 68, 4017-4021 (1994)
- Mizrachi Y, Lev M, Harish Z, Sundaram SK, Rubinstein A. L-cycloserine, an inhibitor of sphingolipid biosynthesis, inhibits HIV-1 cytopathic effects, replication, and infectivity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 11, 137-141 (1996)

- Morales Suarez-Varela MM, Llopis Gonzalez A, Marquina Vila A, Bell J. Mycosis fungoides: review of epidemiological observations. *Dermatology* 201, 21-28 (2000)
- Morison WL, Baughman RD, Day RM, Forbes PD, Hoenigsmann H, Krueger GG, Lebwohl M, Lew R, Naldi L, Parrish JA, Piepkorn M, Stern RS, Weinstein GD, Whitmore SE. Consensus workshop on the toxic effects of long-term PUVA therapy. *Arch Dermatol* 134, 595-598 (1998)
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65, 55-63. (1983)
- Müller-Eberhard U, Erlandson ME, Glinn HE, Smith CH. Effect of trisodium calcium diethylenetriaminepentaacetate on bivalent cations in thalassemia major. *Blood* 22, 209-217 (1963)
- Murthy, B.S., De Lorenzo, C., Piccoli, R., D'Alessio, G., Sirdeshmukh, R., Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase. *Biochemistry* 35, 3880-3885 (1996)
- Nahass GT, Kraffert CA, Penneys NS. Cutaneous T-cell lymphoma associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Dermatol* 127, 1020-1022 (1991)
- Nakakura EK, McCabe SM, Zheng B, Shorthouse RA, Scheiner TM, Blank G, Jardieu PM, Morris RE. Potent and effective prolongation by anti-LFA-1 monoclonal antibody monotherapy of non-primarily vascularized heart allograft survival in mice without T cell depletion. *Transplantation* 55, 412-417 (1993)
- Nakao Y, Mackinnon SE, Strasberg SR, Hertl MC, Isobe M, Susskind BM, Mohanakumar T, Hunter DA. Immunosuppressive effect of monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1 on peripheral nerve allograft in mice. *Microsurgery* 16, 612-620 (1995)
- Neyts J, Sobis H, Snoeck R, Vandeputte M, De Clercq E. Efficacy of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)-cytosine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)-guanine in the treatment of intracerebral murine cytomegalovirus infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12, 269-279 (1993)
- Neyts J, Reymen D, Letourneur D, Jozefonvicz J, Schols D, Este J, Andrei G, McKenna P, Witvrouw M, Ikeda S, Clement J, De Clercq. Differential antiviral activity of derivatized dextrans. *Biochem Pharmacol*; 50: 743-751 (1995)
- Noguchi Y., Wu J., Duncan R., Strohal J., Ulbrich K., Akaike T., Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res* 89, 307-314 (1998)

8 Literatur

- Nunez MT, Cole ES, Glass J. The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptake as determined by the mechanism of alpha, alpha'-dipyridyl inhibition. *J Biol Chem* 258, 1146-1151 (1983)
- Onno M, Pangault C, Le Friec G, Guilloux V, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 164, 6426-6434 (2000)
- Pattanapanyasat K, Webster HK, Tongtawe P, Kongcharoen P, Hider RC. Effect of orally active hydroxypyridinone iron chelators on human lymphocyte function. *Br J Haematol* 82, 13-19 (1992)
- Peters G, Keberle H, Schmid K, Brunner H. Distribution and renal excretion of desferrioxamine and ferrioxamine in the dog and in the rat. *Biochem Pharmacol* 15, 93-109 (1966)
- Peters WP, Dansey RD, Klein JL, Baynes RD. High-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of breast cancer. *Oncologist* 5, 1-13 (2000)
- Philip T, Zucker JM, Bernard JL, Lutz P, Bordigoni P, Plouvier E, Robert A, Roche H, Souillet G, Bouffet E, Michon J, Lopez M, Vilcoq JM, Gentet JC, Philip I, Ladenstein R, Favrot M, Chauvin F. Improved survival at 2 and 5 years in the LMCE1 unselected group of 72 children with stage IV neuroblastoma older than 1 year of age at diagnosis: is cure possible in a small subgroup? *J Clin Oncol* 9, 1037-1044 (1991)
- Pieters R, Kaspers GJ, Klumper E, Veerman AJ. Clinical relevance of in vitro drug resistance testing in childhood acute lymphoblastic leukemia: the state of the art. *Med Pediatr Oncol* 22, 299-308 (1994)
- Piperno A, Sampietro M, D'Alba R, Roffi L, Fargion S, Parma S, Nicoli C, Corbetta N, Pozzi M, Arosio V, Boari G, Fiorelli G. Iron stores, response to alpha-interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver* 16, 248-254 (1996)
- Pippard MJ, Jackson MJ, Hoffman K, Petrou M, Modell CB. Iron chelation using subcutaneous infusions of diethylene triamine penta-acetic acid (DTPA). *Scand J Haematol* 36, 466-472 (1986)
- Pippard MJ, Jackson MJ, Modell CB. Subcutaneous diethylene triamine pentaacetic acid: comparison with desferrioxamine in thalassemic patients with iron overload. *Birth Defects Orig Artic Ser* 23, 105-109 (1988)
- Plachter B, Sinzger C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46, 195-261 (1996)
- Polson RJ, Jawed A, Bomford A, Berry H, Williams R. Treatment of rheumatoid arthritis with desferrioxamine: relation between stores of iron before treatment and side effects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291, 448 (1985)

- Porru S, Alessio L. The use of chelating agents in occupational lead poisoning. *Occup Med* 46, 41-48 (1996)
- Porter DJ, Harrington JA, Spector T. Herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase: selective and synergistic inactivation by A1110U and its iron complex. *Biochem Pharmacol* 39, 639-646 (1990)
- Pouckova, P., Soucek, J., Matousek, J., Zadinova, M., Hlouskova, D., Polivkova, J., Navratil, L., Antitumor action of bovine seminal ribonuclease. *Folia Microbiol. (Praha)* 43(5), 511-512 (1998a)
- Pouckova, P., Soucek, J., Jelinek, J., Zadinova, M., Hlouskova, D., Polivkova, J., Navratil, L., Cinatl, J., Matousek, j., Antitumor action of bovine seminal ribonuclease. Cytostatic effect on human melanoma and mouse seminoma. *Neoplasma* 45(1), 30-34 (1998b)
- Ramsay DL, Meller JA, Zackheim HS. Topical treatment of early cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9, 1031-1056 (1995)
- Reid TM, Loeb LA. Mutagenic specificity of oxygen radicals produced by human leukemia cells. *Cancer Res* 52, 1082-1086 (1992)
- Resnik KS, Vonderheid EC. Home UV phototherapy of early mycosis fungoides: long-term follow-up observations in thirty-one patients. *J Am Acad Dermatol* 29, 73-77 (1993)
- Reszka R, Beck P, Fichtner I, Hentschel M, Richter J, Kreuter J. Body distribution of free, liposomal and nanoparticle-associated mitoxantrone in B16-melanoma-bearing mice. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 232-237 (1997)
- Richardson D, Ponka P, Baker E. The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res* 54, 685-689 (1994)
- Rosen ST, Foss FM. Chemotherapy for mycosis fungoides and the Sezary syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* 9, 1109-1116 (1995)
- Ross C, Tingsgaard P, Jorgensen H, Vejlsgaard GL. Interferon treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 51, 63-72 (1993)
- Sahu SC. Oncogenes, oncogenesis, and oxygen radicals. *Biomed Environ Sci* 3, 183-201 (1990)
- Sakaida I, Hironaka K, Uchida K, Okita K. Iron chelator deferoxamine reduces preneoplastic lesions in liver induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Dig Dis Sci* 44, 560-569 (1999)
- Salhi Y, Costagliola D, Rebullia P, Dessi C, Karagiorga M, Lena-Russo D, de Montalembert M, Girot R. Serum ferritin, desferrioxamine, and evolution of HIV-1 infection in thalassemic patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 18, 473-478 (1998)
- Salmela K, Wramner L, Ekberg H, Hauser I, Bentdal O, Lins LE, Isoniemi H, Backman L, Persson N, Neumayer HH, Jorgensen PF, Spieker C, Hendry B, Nicholls A, Kirste G, Hasche G. A randomized multicenter trial of the anti-

8 Literatur

- ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 67, 729-736 (1999)
- Schäfer V, von Briesen H, Andreesen R, Steffan AM, Royer C, Troster S, Kreuter J, Rübsamen-Waigmann H. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharm Res* 9, 541-546 (1992)
- Schneider D, Berrouschot J, Brandt T, Hacke W, Ferbert A, Norris SH, Polmar SH, Schafer E. Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke. *Eur Neurol* 40, 78-83 (1998)
- Scholz M, Cinatl J, Gross V, Vogel JU, Blaheta RA, Freisleben HJ, Markus BH, Doerr HW. Impact of oxidative stress on human cytomegalovirus replication and on cytokine-mediated stimulation of endothelial cells. *Transplantation* 61, 1763-1770 (1996)
- Scholz M, Blaheta RA, Markus BH, Doerr HW, Cinatl J jr. Immunomodulation and anticytomegalovirus activity of antioxidant metal chelators. *Transplant Proc* 29, 1272-1273 (1997)
- Seale L, Love WG, Amos N, Williams BD, Kellaway IW. Accumulation of polyvinylpyrrolidone within the inflamed paws of adjuvant-induced arthritic rats. *J Pharm Pharmacol* 44, 10-14 (1992)
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313, 1111-1116 (1985)
- Selig RA, White L, Gramacho C, Sterling-Levis K, Fraser IW, Naidoo D. Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res* 58 473-478 (1998)
- Sezaki H, Hashida M. Macromolecule-drug conjugates in targeted cancer chemotherapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1, 1-38 (1984)
- Shen AY, Chen CP, Roffler S. A chelating agent possessing cytotoxicity and antimicrobial activity: 7-morpholinomethyl-8-hydroxyquinoline. *Life Sci* 64, 813-825 (1999)
- Shterman N, Kupfer B, Moroz C. Comparison of transferrin receptors, iron content and isoferritin profile in normal and malignant human breast cell lines. *Pathobiology* 59, 19-25 (1991)
- Shuster JJ, Falletta JM, Pullen DJ, Crist WM, Humphrey GB, Dowell BL, Wharam MD, Borowitz M. Prognostic factors in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 75, 166-173 (1990)
- Sillén LG, Martell AE. Stability constants of metal-ion complexes, Suppl. 1. The Chemical Society London, 728-730 (1971)

- Sinclair J, Sissons P. Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* 39, 293-301 (1996)
- Singer DR, Fallon TJ, Schulenburg WE, Williams G, Cohen J. Foscarnet for cytomegalovirus retinitis. *Ann Intern Med* 103, 962 (1985)
- Sinzger C, Plachter B, Grefte A, The TH, Jahn G. Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis* 173, 240-245 (1996)
- Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H, McCulloch EA. Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* 61, 1138-1145 (1983)
- Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reamon G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, Ungerleider R. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14, 18-24 (1996)
- Snoeck R, Andrei G, De Clercq E. Patterns of resistance and sensitivity to antiviral compounds of drug-resistant strains of human cytomegalovirus selected in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15, 574-579 (1996)
- Sorokin LM, Morgan EH, Yeoh GC. Transformation-induced changes in transferrin and iron metabolism in myogenic cells. *Cancer Res* 49, 1941-1947 (1989)
- Soucek J, Pouckova P, Matousek J, Stockbauer P, Dostal J, Zadinova M. Antitumor action of bovine seminal ribonuclease. *Neoplasma* 43, 335-340 (1996)
- Soyano A, Chinea M, Romano EL. The effect of desferrioxamine on the proliferative response of rat lymphocytes stimulated with various mitogens in vitro. *Immunopharmacology* 8, 163-169 (1984)
- Spector T, Averett DR, Nelson DJ, Lambe CU, Morrison RW Jr, St Clair MH, Furman PA. Potentiation of antiherpetic activity of acyclovir by ribonucleotide reductase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4254-4257 (1985)
- Spector T, Harrington JA, Morrison RW Jr, Lambe CU, Nelson DJ, Averett DR, Biron K, Furman PA. 2-Acetylpyridine 5-[(dimethylamino)thiocarbonyl]-thiocarbonohydrazone (A1110U), a potent inactivator of ribonucleotide reductases of herpes simplex and varicella-zoster viruses and a potentiator of acyclovir. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1051-1055 (1989)
- Spector T, Harrington JA, Porter DJ. Herpes and human ribonucleotide reductases. Inhibition by 2-acetylpyridine 5-[(2-chloroanilino)-thiocarbonyl]-thiocarbonohydrazone (348U87). *Biochem Pharmacol* 42, 91-96 (1991)
- Spector T, Lobe DC, Ellis MN, Blumenkopf TA, Szczech GM. Inactivators of herpes simplex virus ribonucleotide reductase: hematological profiles and in vivo potentiation of the antiviral activity of acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 934-937 (1992)

8 Literatur

- Stanat SC, Reardon JE, Erice A, Jordan MC, Drew WL, Biron KK. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates: mode of resistance to ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 2191-2197 (1991)
- Staudinger KC, Roth VS. Occupational lead poisoning. *Am Fam Physician* 57, 719-728 (1998)
- Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Schutt S, Maier-Borst W, Heene DL. The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anticancer Drugs* 8, 677-685 (1997a)
- Stehle G, Wunder A, Sinn H, Schrenk HH, Schutt S, Frei E, Hartung G, Maier-Borst W, Heene DL. Pharmacokinetics of methotrexate-albumin conjugates in tumor-bearing rats. *Anticancer Drugs* 8, 835-844 (1997b)
- Stehle G, Wunder A, Schrenk HH, Hartung G, Heene DL, Sinn H. Methotrexate-albumin conjugate causes tumor growth delay in Dunning R3327 HI prostate cancer-bearing rats. *Anticancer Drugs* 10, 405-411 (1999)
- Steinherz PG, Gaynon P, Miller DR, Reaman G, Bleyer A, Finklestein J, Evans RG, Meyers P, Steinherz LJ, Sather H. Improved disease-free survival of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for early relapse with the New York regimen--a new intensive therapy protocol: a report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 4, 744-752 (1986)
- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230, 943-945 (1985)
- Talento A, Nguyen M, Blake T, Sirotina A, Fioravanti C, Burkholder D, Gibson R, Sigal NH, Springer MS, Koo GC. A single administration of LFA-1 antibody confers prolonged allograft survival. *Transplantation* 55, 418-422 (1993)
- Tamburrini M, Scala G, Verde C, Ruocco MR, Parente A, Venuta S., D'Alessio G. Immunosuppressive activity of bovine seminal RNase on T-cell proliferation. *Eur J Biochem* 190, 145-148 (1990)
- Taylor DM, Jones JD. Effects of ethylenediaminetetraacetate and diethylenetriaminepentaacetate on DNA synthesis in kidney and intestinal mucosa of folate treated rats. *Biochem Pharmacol* 15, 3313-3315 (1972)
- Tayyab S, Qasim MA. Influence of succinylation of bovine serum albumin on its conformation and bilirubin binding. *Biochim Biophys Acta* 913, 359-67 (1987)
- Tayyab S, Qasim MA. A correlation between changes in conformation and molecular properties of bovine serum albumin upon succinylation. *J Biochem* 100, 1125-1136 (1986)
- Thomson AH, Vasey PA, Murray LS, Cassidy J, Fraier D, Frigerio E, Twelves C. Population pharmacokinetics in phase I drug development: a phase I study of PK1 in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 81, 99-107 (1999)

- Timeus F, Valle P, Crescenzo N, Ruggieri L, Rosso P, Pagliardi GL, Cordero di Montezemolo L, Gabutti V, Ramenghi U. Effect of desferrioxamine and hydroxypyridones on hemopoietic progenitors and neuroectodermal tumor cells. *Am J Hematol* 47, 183-188 (1994)
- Torti SV, Torti FM, Whitman SP, Brechbiel MW, Park G, Planalp RP. Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood*. 92, 1384-1389 (1998)
- Toyokuni S, Sagripanti JL. Iron-mediated DNA damage: sensitive detection of DNA strand breakage catalyzed by iron. *J Inorg Biochem* 47, 241-248 (1992)
- Uckun FM, Reaman G, Steinherz PG, Arthur DC, Sather H, Trigg M, Tubergen D, Gaynon P. Improved clinical outcome for children with T-lineage acute lymphoblastic leukemia after contemporary chemotherapy: a Children's Cancer Group Study. *Leuk Lymphoma* 24, 57-70 (1996a)
- Uckun FM, Steinherz PG, Sather H, Trigg M, Arthur D, Tubergen D, Gaynon P, Reaman G. CD2 antigen expression on leukemic cells as a predictor of event-free survival after chemotherapy for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 88, 4288-4295 (1996b)
- Uckun FM, Gaynon PS, Sensel MG, Nachman J, Trigg ME, Steinherz PG, Hutchinson R, Bostrom BC, Sather HN, Reaman GH. Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 15, 2214-2221 (1997)
- Uckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, Sather HN, Reaman GH, Gaynon PS. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 91, 735-746 (1998)
- Van Thiel DH, Friedlander L, Fagioli S, Wright HI, Irish W, Gavalier JS. Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 20, 410-415 (1994)
- Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditch TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E, Cassidy J. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. *Clin Cancer Res* 5, 83-94 (1999)
- Vescia, S., Tramontano, D., Antitumoral action of bovine seminal ribonuclease. *Mol. Cell Biochem.* 36(3), 125-128 (1981)
- Voest EE, Neijt JP, Keunen JE, Dekker AW, van Asbeck BS, Nortier JW, Ros FE, Marx JJ. Phase I study using desferrioxamine and iron sorbitol citrate in an attempt to modulate the iron status of tumor cells to enhance doxorubicin activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 31, 357-362 (1993)
- Voest EE, Vreugdenhil G, Marx JJ. Iron-chelating agents in non-iron overload conditions. *Ann Intern Med* 120, 490-499 (1994)

8 Literatur

- Vogel J-U, Scholz M, Cinatl J jr. Treatment of cytomegalovirus diseases. *Intervirology* 40, 357-367 (1997)
- Volm M. Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res* 18, 2905-2917 (1998)
- Wagner J. Teilchengrößenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung. *Chem-Ing-Tech* 58, 578-583 (1986)
- Wagner RH, Boles MA, Henkin RE. Treatment of radiation exposure and contamination. *Radiographics*. 14, 387-396 (1994)
- Walmsley SL, Chew E, Read SE, Vellend H, Salit I, Rachlis A, Fanning MM. Treatment of cytomegalovirus retinitis with trisodium phosphonoformate hexahydrate (Foscarnet). *J Infect Dis* 157, 569-572 (1988)
- Walmsley S, Tseng A. Comparative tolerability of therapies for cytomegalovirus retinitis. *Drug Saf* 21, 203-224 (1999)
- Waxman HS, Brown EB. Clinical usefulness of iron chelating agents. *Prog Hematol* 6, 338-373 (1969)
- Weber B, Doerr HW. Diagnosis and epidemiology of transfusion-associated human cytomegalovirus infection: recent developments. *Infusionsther Transfusionsmed* 1994 Suppl 1, 32-39 (1994)
- Weber B, Rabenau H, Berger A, Scheuermann EH, Staszewski S, Kreuz W, Scharrer I, Schoeppe W, Doerr HW. Seroprevalence of HCV, HAV, HBV, HDV, HCMV and HIV in high risk groups/Frankfurt a.M., Germany. *Zentralbl Bakteriol* 282, 102-112 (1995).
- Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm* 194, 91-102 (2000a)
- Weber C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int J Pharm* 196, 197-200 (2000b)
- Weber C, Reiss S, Langer K. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *Int J Pharm* in press (2000c)
- Weiner B. Particle sizing using photon correlation spectroscopy. Brookhaven Instruments Corporation, Ronkonkoma, New York (1990)
- Weinberg K, Champagne J, Lenarsky C, Peterson J, Nguyen T, Felder B, Parkman R. Desferrioxamine (DFO) inhibition of interleukin 2 receptor (IL2R) expression: potential therapy of graft versus host disease. *Blood* 68, S286 (1986)
- Weinberg ED. Iron withholding: a defense against viral infections. *Biometals* 9, 393-399 (1996a)
- Weinberg ED. The role of iron in cancer. *Eur J Cancer Prev* 5, 19-36 (1996b)
- Weinstock MA, Horn JW. Mycosis fungoides in the United States. Increasing incidence and descriptive epidemiology. *JAMA* 260, 42-46 (1988)

- Wilson LD, Quiros PA, Kolenik SA, Heald PW, Braverman IM, Edelson RL, Kacinski BM. Additional courses of total skin electron beam therapy in the treatment of patients with recurrent cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 35, 69-73 (1996)
- Wonke B, Hoffbrand AV, Aldouri M, Wickens D, Flynn D, Stearns M, Warner P. Reversal of desferrioxamine induced auditory neurotoxicity during treatment with Ca-DTPA. *Arch Dis Child* 64, 77-82 (1989)
- Wu Y, Saxena SK, Ardelt W, Gadina M, Mikulski SM, De Lorenzo C, D'Alessio G, Youle RJ. A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem* 270, 17476-17481 (1995)
- Wunder A, Stehle G, Schrenk HH, Hartung G, Heene DL, Maier-Borst W, Sinn H. Antitumor activity of methotrexate-albumin conjugates in rats bearing a Walker-256 carcinoma. *Int J Cancer* 76, 884-890 (1998)
- Yoo HS, Lee KH, Oh JE, Park TG. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J Control Release* 68, 419-431 (2000)
- Youle RJ, Wu YN, Mikulski SM, Shogen K, Hamilton RS, Newton D, D'Alessio G, Gravell M. RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 91, 6012-6016 (1994)
- Youle RJ, D'Alessio G. Antitumor RNases. In: *Ribonucleases – Structures and Functions*. D'Alessio, G., Riordan, J.F. (Editors), 491-514, Academic Press, Inc., New York (1997)
- Yuan F. Transvascular drug delivery in solid tumors. *Semin Radiat Oncol* 8, 164-175 (1998)
- Zackheim HS, Epstein EH jr, Crain WR. Topical carmustine (BCNU) for cutaneous T cell lymphoma: a 15-year experience in 143 patients. *J Am Acad Dermatol* 22, 802-810 (1990)
- Zackheim HS, Kashani-Sabet M, Hwang ST. Low-dose methotrexate to treat erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: results in twenty-nine patients. *J Am Acad Dermatol* 34, 626-631 (1996)
- Zackheim HS, Kashani-Sabet M, Amin S. Topical corticosteroids for mycosis fungoides. Experience in 79 patients. *Arch Dermatol* 134, 949-954 (1998)
- Zackheim HS. Cutaneous T cell lymphoma: update of treatment. *Dermatology* 199, 102-105 (1999)
- Zackheim HS, Amin S, Kashani-Sabet M, McMillan A. Prognosis in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long-term survival in 489 patients. *J Am Acad Dermatol* 40, 418-25 (1999)
- Zeng Y, Torres MA, Thistlethwaite JR Jr, Montag A, Bluestone JA. Prolongation of human pancreatic islet xenografts by pretreatment of islets with anti-human ICAM-1 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 26, 1120 (1994)

8 Literatur

Zhou XD, DeTolla L, Custer RP, London WT. Iron, ferritin, hepatitis B surface and core antigens in the livers of Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 59, 1430-1437 (1987)

9 Lebenslauf

Name: Martin Michaelis
Anschrift: Am Schloßchen 13
63571 Gelnhausen
geboren: 18.05.1972
in Berlin Charlottenburg

Bildungsweg

August 1978 - Juli 1982	Besuch der Philipp-Reis-Schule in Gelnhausen
August 1982 – Juni 1991	Besuch des Grimmelshausen-Gymnasiums Gelnhausen
07.06.1991	Abitur
Oktober 1992 - April 1997	Studium der Pharmazie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main
05.09.1995	1. Staatsexamen
21.04.1997	2. Staatsexamen
Mai 1997- Oktober 1997	Pharmaziepraktikum: Bock-Apotheke, Frankfurt am Main
November 1997- April 1998	Pharmaziepraktikum: Institut für Pharmazeutische Technologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main
25.05.1998	3. Staatsexamen
27.05.1998	Erteilung der Approbation als Apotheker
Mai 1998 – Dezember 2000	Doktorand am Institut für Pharmazeutische Technologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Zivildienst:	
Juli 1991- September 1992	Burckhardtthaus, Gelnhausen

Wissenschaftliche Publikationen

Weber C, Michaelis M, Vogel J-U, Cinatl J jr, Kreuter J, Langer K. Simple and efficient method for the detection of diethylenetriaminepentaacetic acid. *J Chromatogr B* 736, 299-303 (1999)

Michaelis M, Matousek J, Vogel J-U, Slavik T, Langer K, Cinatl J, Kreuter J, Schwabe D, Cinatl J jr. Bovine seminal ribonuclease attached to nanoparticles made of polylactic acid kills leukemia and lymphoma cell lines in vitro. *Anticancer Drugs* 11, 369-376 (2000)

Michaelis M, Vogel J-U, Cinatl J, Langer K, Kreuter J, Schwabe D, Driever PH, Cinatl J jr. Cytotoxicity of aphidicolin and its derivatives against neuroblastoma cells in vitro: synergism with doxorubicin and vincristine. *Anticancer Drugs* 11, 479-485 (2000)

Michaelis M, Langer K, Vogel J-U, Kreuter J, Rabenau HF, Doerr HW, Cinatl J jr. In vitro antiviral activity of aphidicolin and its derivatives: synergistic effects of aphidicolin with other antiviral drugs. *Arzneimittel-Forsch* *in press*