

Vorname	Markus
Name	Wolf
akad. Grad	Dr. rer. nat.
Dienststellung	wissenschaftlicher Angestellter
Nationalität	deutsch
Institution	Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Radiopharmazeutische Chemie (E030)
Dienstl. Adresse	Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg
Telefon	06221-422422 oder 06221-422444
Fax	06221-422690
E-mail	markus.wolf@dkfz.de

1.2. Thema

Zielgerichtete, enzymatisch induzierte in vivo Erzeugung von Licht mittels chemolumineszenter Adamantylylidenadamantan-1,2-dioxetane für die photochemisch induzierte Wirkstofffreisetzung aus Endosomen, photodynamische Therapie schwer zugänglicher Körperregionen und intraoperative Tumordiagnostik

1.3. Kennwort

Zielgerichtete, intrakorporale Lichterzeugung

1.4. Fachgebiet

Drug Targeting, Pharmazie, Drug Delivery

1.5. Zusammenfassung

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es, Licht mittels Chemolumineszenz direkt im Tumorgewebe zu erzeugen. Es soll also Licht an dem Ort erzeugt werden, wo es für therapeutische und diagnostische Zwecke gebraucht wird und wo keine externen Lichtquellen eingebracht werden können (insbesondere bei inoperablen Gehirntumoren). Das so erzeugte Licht könnte eine photochemische Freisetzung endosomal aufgenommener Wirkstoffe in vitro und in vivo bewirken und sogar eine photodynamische Therapie in schwer zugänglichen Körperregionen ermöglichen. Schließlich könnte vom Tumorgewebe emittiertes Licht der intraoperativen Tumordiagnostik dienen.

Die Stoffklasse der 1,2-Dioxetane eignet sich besonders, um Licht mittels Chemolumineszenz im Körper zu erzeugen, weil Licht mit nahezu gleich bleibender, hoher Intensität 30 Minuten lang emittiert wird. Adamantylylidenadamantan-1,2-dioxetan mit einer Sialinsäuregruppe (AMS) emittiert nach der Hydrolyse durch die Neuraminidase bei pH 6 bis 7 Licht einer Wellenlänge von 477 nm. Da das Tumorinterstitium einen leicht sauren pH-Wert aufweist, eignet sich AMS besonders für die Lichterzeugung im Tumor. Ohne enzymatische Hydrolyse kommt die Reaktionskaskade, die der Erzeugung des Lichtes dient nicht in Gang, weil AMS ein spezifisches Substrat der Neuraminidase ist. Zu einem geringen Maß findet im sauren Milieu eine Hydrolyse statt. Mit so genannten Chemolumineszenzenhancern wie Albumin ist es möglich, die Lichtausbeute um das 400fache zu steigern. Damit das Licht vorwiegend im Tumor entsteht, sollte die Zerfallsreaktion des Dioxetans, die zur Emission von Licht führt, hauptsächlich im Tumorgewebe stattfinden. Durch Konjugation der Neuraminidase an Albumin entstünde ein Makromolekül, das dem Enhanced Permeability and Retention Effect unterliegt, so dass es zu einer passiven Anreicherung dieses Konjugates im Tumorinterstitium käme. Außerdem dient Albumin als Chemolumineszenzenhancer. Daher soll zunächst ein Albumin-Neuraminidase-Konjugat hergestellt werden. Zuerst würde man das Albumin-Neuraminidase-Konjugat verabreichen und warten, bis es sich im Tumor angereichert hat. Nachfolgend sollte Adamantylylidenadamantan-1,2-dioxetan mit einer Sialinestergruppe systemisch appliziert werden. Das Zusammentreffen von AMS und der Neuraminidase im Tumor führt zur Lichterzeugung. Ziel ist es, nachzuweisen, dass auch in vivo eine Lichtmenge entsteht im Tumor entsteht, die für eine endosomale Wirkstofffreisetzung, photodynamische Therapie und auch für diagnostische Zwecke ausreicht. Die im Tumor entstehende Lichtmenge wird in tumortragenden Tieren, die zuerst das Albumin-Neuraminidase-Konjugat und zeitversetzt AMS bekommen haben, mittels charge coupled device (CCD) Kamera untersucht. Tumortragende Tiere sollen einer photodynamischen Therapie unterzogen werden, wobei intratumorales Licht als Lichtquelle dienen soll. Das Tumorstadium soll verglichen werden mit einer unbehandelten Kontrollgruppe sowie einer Gruppe, die mit externem Licht bestrahlt wird. Schließlich soll geprüft werden, ob die Freisetzung eines intralysosomal getrappten Arzneistoffes aus den Lysosomen mittels eines Photosensibilisators und im Tumor erzeugtem Licht möglich ist.

2. Stand der Forschung und eigene Vorarbeiten

2.1. Stand der Forschung

Chemolumineszenz (Chemische Lichterzeugung)

Von **Chemolumineszenz** wird gesprochen, wenn bei einer chemischen Reaktion Licht emittiert wird. Bei einigen chemischen Reaktionen entsteht ein Intermediat zunächst im energetisch angeregten Zustand (Soper et al. 1994). Beim Übergang des angeregten Elektrons vom höheren in den niedrigeren Energiezustand wird Licht emittiert, so beim Zerfall von 1,2-Dioxetanen.

Chemolumineszenz von Dioxetanen

Die Stoffklasse der 1,2-Dioxetane eignet sich besonders, um Licht mittels Chemolumineszenz im Körper zu erzeugen, weil Licht mit nahezu gleich bleibender, hoher Intensität 30 Minuten lang emittiert wird (Kricka 1991). Beim Zerfall der meisten 1,2-Dioxetane wird Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm emittiert (s. Abb. 1A). Es gibt auch eine Reihe neuer 1,2-Dioxetane, die gelbes oder rotes Licht (615-628 nm) erzeugen (Matsumoto et al. 1999). Die Lichtmenge und Zeitdauer der Lichtemission werden als vorteilhaft für das angedachte Forschungsvorhaben angesehen.

Es wurden eine Reihe von Dioxetankonjugaten entwickelt, deren Zerfall durch enzymatische Hydrolyse induziert wird, die in der klinischen Chemie der Quantifizierung von Enzymen dienen (Achyuthan et al. 2003, Buxton et al. 2000, Weiss et al. 2002). Das Enzym dient quasi als Lichtschalter, weil es die Licht erzeugende Reaktion erst in Gang setzt (Achyuthan et al. 2003, Buxton et al. 2000, Weiss et al.). Das durch den Zerfall der Dioxetane erzeugte Licht kann durch die Anwesenheit eines Chemolumineszenzenhancers (z.B. Serumalbumin) bis um das 400fache erhöht werden. Der Nachweis von 0,001 attomol eines Enzyms wurde dadurch möglich (Bronstein et al. 1989).

Das kommerziell erhältliche Dioxetan-Sialinsäurekonjugat 2-Chloro-5-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetane-3,2,9-(5-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl-phenyl-5-acet-amido-3,5-dideoxy-a-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (= AMS) (Strukturformel, s. Abb. 2) ist ein Neuraminidase substrat (= Enzym des Influenzavirus) (Achyuthan et al. 2003, Buxton et al. 2000). Weil die Neuraminidase ihr pH-Optimum bei pH 6-7 aufweist, ist die Hydrolyserate und damit auch die Lichtausbeute in diesem pH-Bereich am besten (Wang et al. 2005). Auch ohne die Anwesenheit des Enzyms zerfällt AMS im leicht sauren Milieu, aber wesentlich langsamer. AMS ist für das angedachte Forschungsvorhaben nicht nur wegen der hohen Intensität und der langen Emissionsdauer so interessant, sondern auch weil das Tumoreritium einen schwach sauren pH-Wert aufweist (Wike-Hooley et al. 1984). Der pH des Tumoreritiums somit liegt im pH-Optimum der Neuraminidase. Nach einer gezielten Anreicherung der Neuraminidase im Tumoreritium ließe sich durch die nachfolgende, zeitversetzte Applikation des Sialinsäure-Dioxetan-Konjugates Licht im Tumor erzeugen. Da die Neuraminidase ein körperfremdes Enzym ist, kommt es nur dort zur Spaltung von AMS, wo sich das Albumin-Neuraminidase-Konjugat angereichert hat.

AMS wird bisher zum quantitativen Nachweis des Influenzavirus in Körperflüssigkeiten verwendet (Achyuthan 2003, Buxton 2000). So lange das Enzym arbeitet und ausreichend AMS vorhanden ist, wird ein konstanter Lichtstrom emittiert, wobei die Lichtintensität proportional zur Enzymkonzentration ist (Abb. 1 B) (Achyuthan et al. 2003, Buxton et al. 2000). Der Mechanismus des Zerfalls wird in Abbildung 2 dargestellt. Beim Zerfall der 1,2-Dioxetane entstehen Carbonylverbindungen im angeregten Singulett-Zustand als Energie reiche Intermediate (Edwards et al. 1990). Diese Energie wird dann in Form von Licht abgegeben. Hat eines der Bruchstücke eine hohe Quantenausbeute, so wird bei dieser Reaktion viel Licht erzeugt. Wird durch das Enzym Neuraminidase der Sialinsäurerest abgespalten, so entsteht das entsprechende Phenolat-Anion. Ein Elektronentransfer vom

Phenolat zum Dioxetan induziert dessen Zerfall in Adamantanon und dem angeregten Anion des 3-Hydroxybenzoesäuremethylesters (Edwards et al. 1990). Beim Übergang des angeregten Zustandes in den Grundzustand wird schließlich ein Photon emittiert (Edwards et al. 1990). Bisher finden die Dioxetane nur Anwendung in der klinischen Chemie zur Quantifizierung von Enzymen (Nicolas et al. 1985). Noch nie wurde noch nie der Versuch unternommen, Licht im Körper zu erzeugen. Der Vorteil der Erzeugung von Licht im Körper durch eine chemische Reaktion besteht darin, dass prinzipiell an jeder Stelle des Organismus Licht erzeugt werden kann.

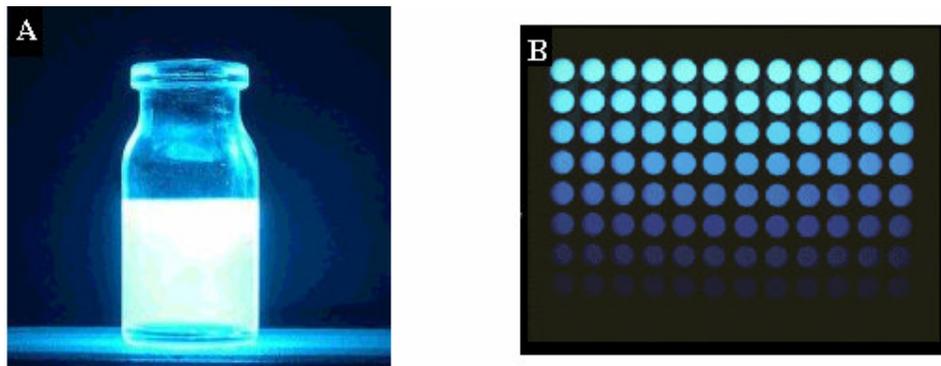


Abb 1.: Chemolumineszenz von AMS (A), Abhängigkeit der Lichtausbeute von AMS der Neuraminidasekonzentration in einem Mikrotiterplattenassay (B)

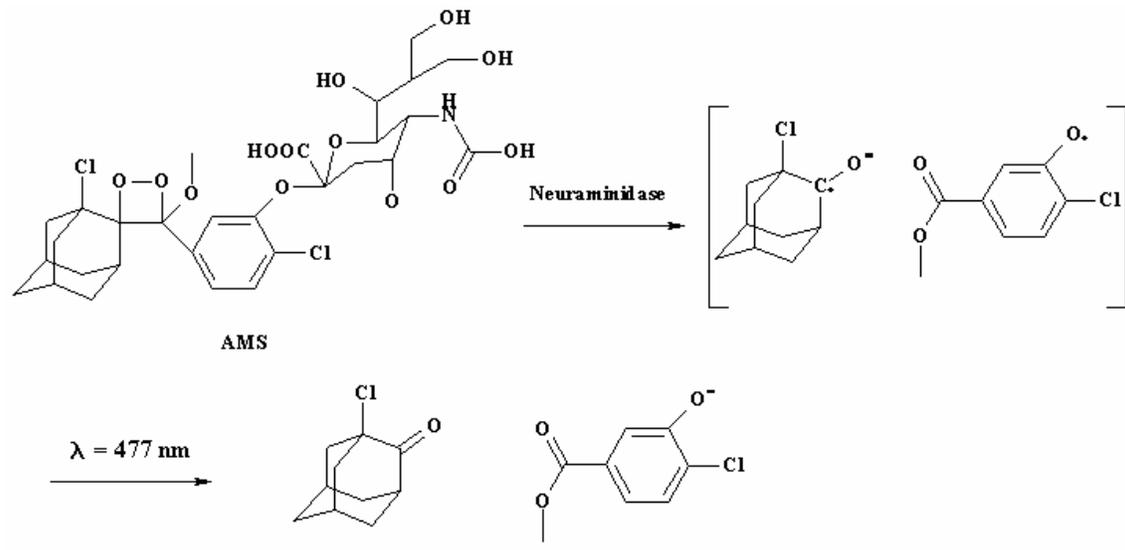


Abb. 2: Enzymatisch/chemisch induzierter Zerfall von AMS.

Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR Effekt). In normalem Gewebe sind die Endothelzellen durch interzelluläre Tight Junctions miteinander verbunden, aus denen in den meisten Geweben Öffnungen bis zu einer Größe von 2 nm resultieren (Drummond et al. 1999). Während deshalb für Makromoleküle/Liposomen ein Eindringen in das Gewebe unmöglich ist. Im Gegensatz dazu liegen aufgrund ihres im Vergleich zu normalen Blutgefäßen schnelleren Wachstums in Tumorgefäßen nur lückenhafte, unvollkommene Endothelzellschichten vor, und das Tumorgewebe weist ein höheres Extrazellulärvolumen als Normalgewebe auf, so dass Makromoleküle/Liposomen bis zu einer Größe von 400 – 600 nm in das Tumorgewebe gelangen können (Yuan et al. 1995). Da dort kein funktionierendes Lymphsystem für den Abtransport eingedrungener Substanzen zur Verfügung steht, erfolgt

eine Akkumulation im Tumorgewebe (Gerlowski & Jain 1986). Dieser Effekt der bevorzugten Anreicherung und erhöhten Verweildauer in Tumorgewebe wird in der Literatur als EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) beschrieben (Maeda und Matsumura 1989).

Konjugation zweier Proteine (Carlsson et al 1973, Hu T & Su Z 2003). Mit Hilfe eines heterobifunktionellen Linkers lassen sich Konjugate gewinnen, die aus zwei verschiedenen Proteinen bestehen. Einer Methode von Hu et al. folgend (Hu hat ein Albumin-Katalase-Konjugat hergestellt), soll Albumin über den heterobifunktionellen Linker *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate an Neuraminidase konjugiert werden. Die Aufreinigung kann über Größenausschlusschromatographie erfolgen. Albumin soll verwendet werden, weil es als Chemolumineszenzenhancer fungieren kann. Da Makromoleküle mit einer Molmasse zwischen und dem Enhanced Permeability and Retention Effect unterliegen, wird erwartet, dass es zu einer Anreicherung des Albumin-Neuraminidase-Konjugates im Tumor kommt. Da die Neuraminidase ein körperfremdes Enzym ist, kommt es nur dort zur Spaltung von AMS, wo sich das Albumin-Neuraminidase-Konjugat angereichert hat.

Photosensibilatoren

Photosensibilatoren können Licht absorbieren und die aufgenommene Energie an Sauerstoffmoleküle weitergeben. Dabei entsteht Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) (Kiesslich et al. 2006). Das ist eine energetisch angeregte Form von molekularem Sauerstoff, die sehr reaktionsfreudig ist (Rühling 2004). Der Singulett-Sauerstoff kann z. B. Lipide von Biomembranen zerstören (Rühling 2004). Für eine therapeutische Anwendung ist es wichtig, dass sich der Photosensibilisator selektiv im Tumorgewebe angereichert, um die Nebenwirkungen gering zu halten. Bei der Generierung von Singulett-Sauerstoff wirkt der Photosensibilisator ausschließlich als Katalysator (Rühling 2004). Das heißt, dass der Singulett-Sauerstoff in vielfachen Mengen des angereicherten Photosensibilisators produziert wird. Die Aktivierung der Photosensibilisatoren geschieht durch Licht einer spezifischen Wellenlänge. Die Erzeugung der substanz- und indikationsspezifischen Wellenlänge mit ausreichender Energie geschieht herkömmlicherweise durch Laser (Rühling 2004). Laser erzeugen ein monochromatisches Lichtstrahlenbündel mit hoher Energiedichte und exakt definierter Wellenlänge. Die gesamte Lichtleistung kann auf eine Fläche von weniger als 400 μm Durchmesser gebündelt und durch ein Glasfaserkabel auf die zu therapierende Stelle geleitet (Rühling 2004). Bei den klinisch bei der photodynamischen Therapie verwendeten Photosensibilisatoren handelt es sich meist um Porphyrinderivate. Auch Hypocrellin B (kein Porphyrin) ist ein Photosensibilisator, dessen Struktur und Absorptionsspektrum in Abb. 3 gezeigt wird (Chin et al. 2004). Durch den Zerfall von AMS entsteht Licht einer Wellenlänge von 477 nm. In diesem Bereich weist Hypocrellin B eine hohe Absorption auf. Daher wäre für die Hypocrellin B für das hier angedachte Forschungsvorhaben als Photosensibilisator geeignet. Zwar ist die Eindringtiefe von Licht in Gewebe umso geringer, je kleiner die Wellenlänge ist (Wan et al., 1981), aber die Eindringtiefe liegt aber immer noch in der Größenordnung mehrerer hundert Mikrometer (Abb. 4). Da aber mit AMS Licht im Tumor selbst erzeugt werden soll, ist eine geringe Eindringtiefe kein Problem. Die Zellen weisen eine Größe von 20 μm auf. Außerdem ist kurzwelligeres Licht energiereicher, so dass eine effektivere Therapie möglich wird. Im Bereich des roten Lichts (600-650 nm) ist der Absorptionskoeffizient nämlich niedriger.

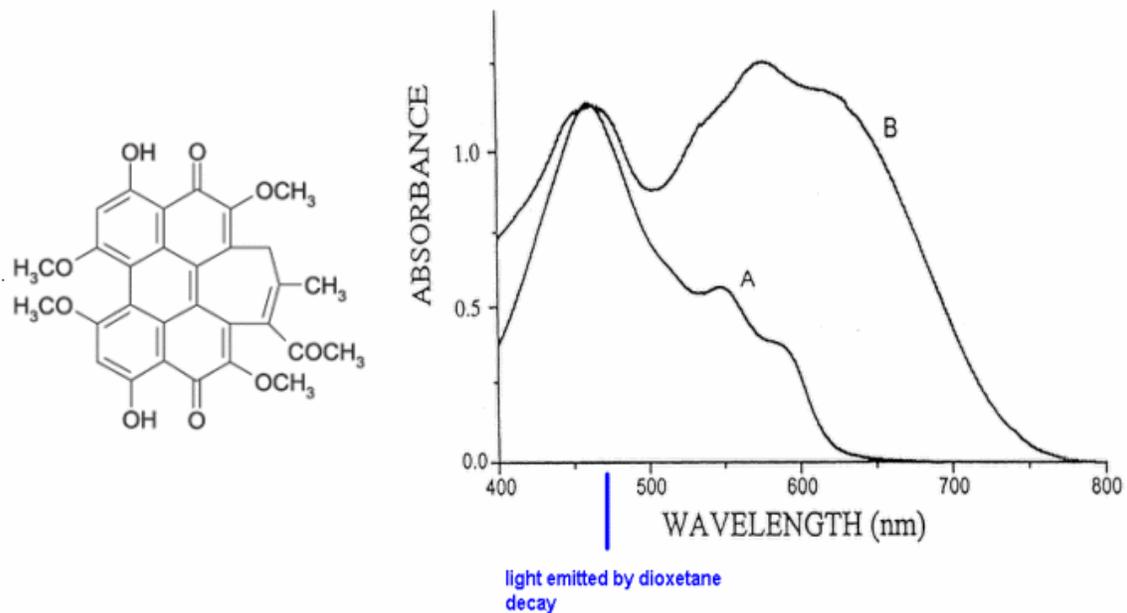


Abb. 3: Chemische Struktur und Exzitationsspektrum des Photosensibilisators Hypocrellin A und B.

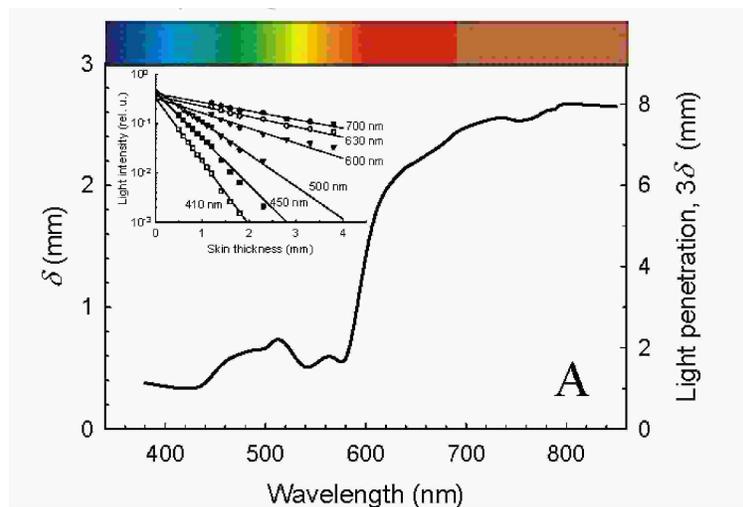


Abb. 4: Eindringtiefe von Licht im Organismus

Der photodynamische Effekt (Fähigkeit des Photosensibilisators Singulett-Sauerstoff zu erzeugen) ist auch von der Leistungsdichte, mit der das Licht appliziert wird abhängig, wobei 90 bis 160 mW (milli Watt)/cm² in der Praxis Anwendung findet. Photosensibilisatoren werden in der photodynamischen Therapie und auch bei der photochemischen Wirkstofffreisetzung aus Endosomen verwendet.

Photochemische Freisetzung von Wirkstoffen aus Endosomen (Prasmickaite L et al. 2002)

Viele potentielle Wirkstoffe sind makromolekular. Makromolekulare Arzneistoffe werden endozytotisch oder über Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen, wodurch sie in Endosomen und Lysosomen lokalisiert sind. Allerdings können sie die Endosomen und Lysosomen nicht verlassen. Der Wirkort dieser Wirkstoffe befindet sich aber im Zytoplasma oder in anderen subzellulären Strukturen. Um zu gewährleisten, dass die Wirkstoffe die Endosomen und Lysosomen auch verlassen können, um zu ihrem Wirkort zu gelangen, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Eine Strategie beruht darauf, dass Zellen vor oder nach der Gabe des Wirkstoffes mit einem Photosensibilisator inkubiert werden. Anschließend erfolgt die Bestrahlung der Zellen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Der

Photosensibilisator wird durch das Licht aktiviert, woraufhin Singulett-Sauerstoff entsteht. Es kommt bedingt durch den Singulett-Sauerstoff zur Lipidperoxidation der endosomalen/lysosomalen Membranen und zu einer Wirkstofffreisetzung aus den Endosomen. Abb. 3 zeigt die Funktionsweise des "Photochemical Drug Delivery"; so wird beispielsweise eine Freisetzung von Fluoresceinisothiocyanat-dextran (FITC-dextran), das normalerweise die Endosomen und Lysosomen nicht verlassen kann, aus diesen subzellulären Strukturen erzielt (Abb. 4). Ein Nachteil dieses Ansatzes beruht darauf, dass er nur in vitro uneingeschränkt funktioniert, aber in vivo nicht generell einsetzbar ist, weil Licht nur eine sehr geringe Eindringtiefe in den Organismus hat (Abb. 5). Je kürzer die Wellenlänge, desto geringer die Eindringtiefe. Hier könnte der in diesem Antrag angedachte Ansatz zu einer breiten in vivo Anwendung der photochemischen Wirkstofffreisetzung aus Endosomen und Lysosomen führen, weil das Licht dort erzeugt werden soll, wo die Wirkstofffreisetzung gewünscht wird. Prinzipiell kann das Licht überall erzeugt werden, auch in sonst für Lichtquellen unzugängliche Regionen.

Insbesondere Makromoleküle, small interfering RNA und Antisense-Oligonukleotide gelangen durch Endocytose in die Zellen, ihr Wirkort liegt aber im Zytoplasma (Selbo 2002). Bei solchen Wirkstoffen zeigt sich eine verbesserte Wirkung nach ihrer photochemischen Freisetzung aus Endosomen. Ohne eine photochemische Freisetzung gelangen diese Wirkstoffe kaum an den Wirkort im Zytoplasma.

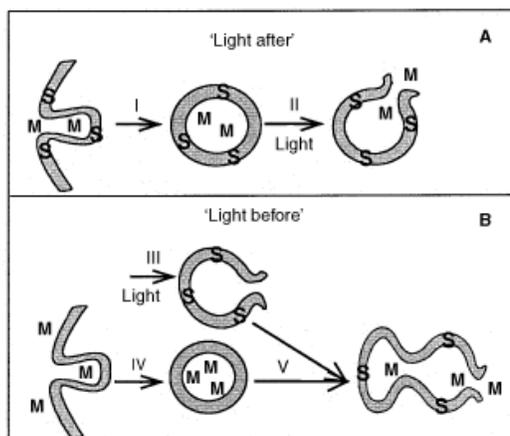


Abb. 5

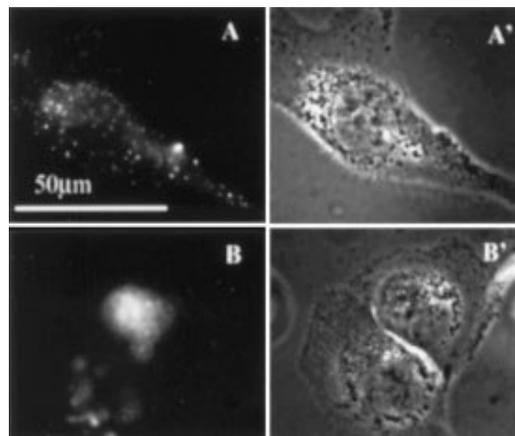


Abb. 6

Abb.5 (Prasmickaite L et al., 2002): Mechanismus der photochemischen Freisetzung aus Endosomen/Lysosomen

Abb.6 (Prasmickaite L et al., 2002): Photochemische Freisetzung eines FITC-Dextran Konjugates aus Endosomen (A: Kontrolle, kein Licht; A': Durchlicht; B: photochemisches Delivery; B': Durchlicht)

Photodynamische Therapie (Qiang et al. 2006, Awan & Tarin 2006)

Bei der Photodynamischen Therapie (PDT) handelt es sich um ein Verfahren zur Behandlung von Tumoren und anderen Gewebeeränderungen mit Licht in Kombination mit einer lichtempfindlichen Substanz, einem so genannten Photosensibilisator, und im Gewebe vorhandenem Sauerstoff. Dazu wird dem Patienten ein solcher Sensibilisator oder einer seiner Stoffwechsellvorläufer verabreicht, der sich selektiv im Tumor anreichert. Nach einer gewissen Wartezeit wird anschließend der Tumor und das ihn umgebende gesunde Gewebe mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt. Dabei werden durch photophysikalische Prozesse toxische Substanzen erzeugt, die aufgrund der Tumorselektivität des Sensibilisators gezielt den Tumor schädigen. Gegenüber einer chirurgischen Behandlung bietet die photodynamische Therapie den Vorteil eines nicht bzw. minimal-invasiven Verfahrens. Insbesondere entfällt die aus Sicherheitsgründen erforderliche weiträumige Entfernung von gesundem Gewebe in der Tumorumgebung. Eine Bestrahlung erfordert etwa 10 bis 100

Minuten. Typische Bestrahlungsstärken liegen bei 100 mW/cm^2 . Die Erwärmung des Gewebes beträgt daher nur wenige Grad Celsius. Eine Narkose ist nur im Fall schwer zugänglicher innerer Organe nötig. Die PDT von Tumoren erfolgt im Normalfall in einer einmaligen Bestrahlungssitzung, jedoch besteht durchaus die Möglichkeit der Wiederholung. Da die Bestrahlung mit normalem Licht geschieht, ist die Belastung der Patienten im Vergleich zu den "klassischen" Therapieverfahren relativ gering. Eine photodynamische Behandlung versperrt nicht den Weg für andere Therapieansätze, diese können gegebenenfalls noch durchgeführt werden, sollte keine vollständige Heilung erreicht worden sein. Der Nachteil der photodynamischen Therapie ist im Wesentlichen die geringe Eindringtiefe von Licht von nur einigen Millimetern (s. Abb. 5), so dass in der Regel nur nicht zu fortgeschrittene oder flächig wachsende Tumore erfolgreich therapiert werden können. Es bieten sich daher vor allem z.B. Hauttumoren, wie aktinische Keratosen, das Basaliom, aber auch Warzen als Einsatzgebiet für die photodynamische Therapie an. Durch den Einsatz von Lasern in Kombination mit Lichtleitfasern lassen sich auch Tumore an endoskopisch zugänglichen, körperinneren Oberflächen behandeln. Durch das Einstecken solcher Fasern in das Gewebe lassen sich auch größere Tumore therapieren, dieses Vorgehen ist jedoch selten. Die photodynamische Behandlung von inneren Tumoren ist bislang wenig verbreitet und wird meist nur palliativ eingesetzt wie beispielsweise in der Speiseröhre, bei Gallengangskarzinom oder bei Hirntumoren. Das Hauptproblem bei der photodynamischen Therapie besteht darin, dass in schwer zugängliche Körperregionen kein Licht eingebracht werden kann. Durch die chemische Erzeugung von Licht in den Körperregionen, in die kein Licht von außen (auch nicht durch ein Endoskop) kommen kann, wäre die photodynamische Therapie breiter einsetzbar, auch für sonst nicht zugängliche Tumoren, z.B. Hirntumoren. Auch endoskopische Applikationen, die für den Patienten eine gewisse Belastung darstellen, könnten überflüssig werden. Insofern könnte der Ansatz, Licht im Tumor zu erzeugen, die Therapieoptionen bei inoperablen und chemoresistenten Tumoren erweitern, weil dann eine photodynamische Therapie möglich wäre.

Intraoperative optische Diagnostik

Die Abgrenzung zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe kann verbessert werden, indem vor der Operation ein Fluoreszenzfarbstoff appliziert wird, der sich im Tumor anreichert, aber nicht im umliegenden Nicht-Tumorgewebe (Wolf et al. 2006). Solche Fluoreszenzdiagnostika erleichtern dem Chirurgen die Arbeit. Insbesondere bei Hirntumoren kann auf diese Weise so viel gesundes Normalgewebe wie möglich erhalten werden. Ein Nachteil besteht darin, dass während der Operation das Operationsgebiet mit Licht einer Wellenlänge bestrahlt werden muss, die zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes nötig ist (Abb. 7) Besser wäre es den Tumor direkt zum Leuchten zu bringen. Wenn man zielgerichtet Lumineszenz durch Gabe einer Substanz im Tumor erzeugen könnte, dann hätte man ein Diagnostikum zur Verfügung, das den Tumor selbst zum Leuchten bringt. Genau das soll durch die chemische Erzeugung von Licht im Tumor mit Hilfe der Dioxetane erfolgen.

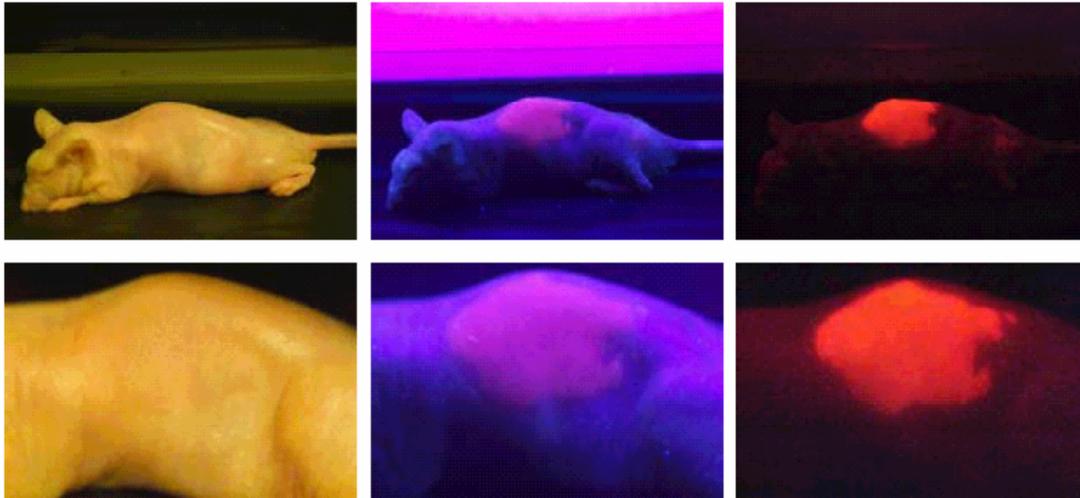


Abb. 7: Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren (rechts: Tageslicht, Mitte: nach Fluoreszenzanregung ohne Filter; nach Fluoreszenzanregung mit Filter)

2.2. Eigene Vorarbeiten

Die eigenen Vorarbeiten für dieses Forschungsvorhaben bestehen in Zellkulturexperimenten, bei denen untersucht wurde, ob die durch Chemolumineszenz erzeugte Lichtmenge ausreicht, um eine photochemisch induzierte Wirkstofffreisetzung aus Endosomen und Lysosomen zu bewirken und ob die Lichtmenge für eine photodynamische Therapie genügt.

In einem zellfreien Vorversuch, der in einer lichtundurchlässigen Dunkelkammer stattfand, wurden AMS und Neuraminidase in Zellkulturmedium zusammengebracht. Das erzeugte Licht wurde mittels einer CCD Kamera gemessen, die sich im Photon Counting Mode befand. Auf diese Weise sollte geprüft werden wie lange die Chemolumineszenz andauert.

Es wurde untersucht, ob endosomal-lysosomal getrappte Fluoreszenzfarbstoffe (FITC-dextran und Acridinorange), aus diesen Organellen freigesetzt werden, nachdem die Zellen mit einem Photosensibilisator und mit durch Chemolumineszenz erzeugtem Licht (direkt im Zellkulturmedium) behandelt wurden. Hela Zellen (humanes Zervixkarzinom) wurden mit Acridinorange oder FITC-dextran inkubiert. Die subzelluläre Verteilung dieser Fluoreszenzfarbstoffe wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht, wobei in beiden Fällen die Fluoreszenz nur in Endosomen und Lysosomen nachzuweisen war (FITC-dextran: grün, Acridinorange: rotorange). In Zellen, die nach der Inkubation mit Acridinorange oder FITC-dextran mit dem Photosensibilisator Hypocrellin B und Licht behandelt wurden, war FITC-dextran nun auch im Zytoplasma sichtbar, Acridinorange auch im Zellkern. Egal ob das Licht von einer externen Lichtquelle stammt oder aber im Zellkulturmedium mittels AMS und Neuraminidase erzeugt wurde, in beiden Fällen wurde die Freisetzung der Fluoreszenzfarbstoffe aus den Endosomen und Lysosomen beobachtet. Abbildung 8 zeigt die subzelluläre Verteilung von FITC-dextran und Acridinorange vor und nach der Behandlung mit Hypocrellin B und chemisch erzeugtem Licht. In vitro entsteht eine Lichtmenge durch den Zerfall von AMS (durch die Neuraminidase wird der Zerfall initiiert), die ausreicht, um endosomal eingeschlossene Stoffe aus diesen Organellen freizusetzen.

Abb. 8 Photochemisch induzierte Wirkstofffreisetzung mittels AMS und Neuraminidase

Des Weiteren wurde untersucht, ob im Zellkulturmedium chemisch erzeugtes Licht, als Lichtquelle für eine photodynamische Therapie geeignet wäre. Hela Zellen wurden mit dem Photosensibilisator Hypocrellin B inkubiert und nachfolgend Licht ausgesetzt. Bei der

Positivkontrolle wurden die Zellen mit einer externen Lichtquelle bestrahlt und nachfolgend die Zellviabilität bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit Licht bestrahlt wurden.

Außerdem wurde Licht im Zellkulturmedium erzeugt, indem das Zellkulturmedium mit AMS und Neuraminidase versetzt wurde, als Ersatz für die externe Strahlenquelle. Sowohl die externe Lichtquelle als auch das chemisch im Zellkulturmedium erzeugte Licht führten zu einer deutlichen Proliferationshemmung. In Abb. 9 werden die Wachstumskurven gezeigt. Die Viabilität dieser Zellen wurde mit dem MTS Assay bestimmt.

Abb. 9 Dosis-Wirkungskurven. Photodynamische Therapie, einmal mit einer externen Lichtquelle und mit AMS und Neuraminidase.

3. Ziele und Arbeitsprogramm

3.1. Ziele

Das Hauptziel dieses Forschungsvorhabens ist es, Licht auf chemische Weise direkt im Tumorgewebe zu erzeugen, also an dem Ort, wo es für therapeutische und diagnostische Zwecke gebraucht wird und wo keine externen Lichtquellen (einschließlich Endoskopen) eingebracht werden können (insbesondere bei inoperablen Gehirntumoren). Dieses Licht könnte eine photochemische Freisetzung endosomal aufgenommener Wirkstoffe *in vitro* und *in vivo* bewirken und sogar eine photodynamische Therapie in schwer zugänglichen Körperregionen ermöglichen. Schließlich könnte vom Tumorgewebe emittiertes Licht der intraoperativen Tumordiagnostik dienen. Zur Lichterzeugung sind zwei Komponenten erforderlich, AMS und die Neuraminidase. Die Neuraminidase soll im Tumorinterstitium angereichert werden, wo sie als Lichtschalter fungieren soll. Nachdem die Neuraminidase (der Lichtschalter) sich im Tumor angereichert hat, muss der Lichtschalter noch gedrückt werden, damit Licht entsteht. Das Drücken des Lichtschalters wird durch die Zugabe von AMS realisiert. Die Funktionsweise des Konzeptes wird in Abb. 8 verdeutlicht. Zunächst wird ein Albumin-Neuraminidase-Konjugat appliziert. Dieses reichert sich aufgrund des Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effekt im Tumor an. Zu einem späteren Zeitpunkt, nachdem sich das Neuraminidase-Albumin-Konjugat im Tumor angereichert hat, wird AMS verabreicht. Dieses gelangt nun ebenfalls ins Tumorinterstitium, wo es durch das Enzym gespalten wird. Durch die Spaltungsreaktion kommt es zur Entstehung von Licht. Es ist zu erwarten, dass mindestens dreißig Minuten Licht erzeugt wird. Das Licht wird extrazellulär erzeugt.

AMS, Albumin und Neuraminidase sind kommerziell erhältlich, nicht aber ein Albumin-Neuraminidase-Konjugat. Zunächst ist es erforderlich, ein solches Konjugat zu synthetisieren. Dieses Konjugat kann nach einer Methode von Tao Hu hergestellt werden. Albumin und Neuraminidase werden durch *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat, einem heterobifunktionellen Linker miteinander verknüpft. Das Konjugat ließe sich dann durch Größenausschlusschromatographie aufreinigen. Das Fusionsprotein, bestehend aus Albumin und der Neuraminidase, könnte auch gentechnisch gewonnen werden. Die Konjugation der Neuraminidase an Albumin soll eine tumorselektive Anreicherung der Neuraminidase ermöglichen. Makromoleküle unterliegen dem Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effekt, d.h. der höheren Durchlässigkeit von Tumor versorgenden Blutgefäßen im Vergleich zu gesundem Gewebe und reichern sich daher bevorzugt im Tumorinterstitium an. Albumin wurde gewählt, weil es als Chemolumineszenzenhancer fungieren kann, und somit eine höhere Lichtintensität erzielt werden kann. Nachdem das Konjugat hergestellt wurde, muss geprüft werden, wann das Maximum der Anreicherung im Tumorinterstitium erreicht wird. Um dies zu ermitteln, soll das Konjugat radioiodiert werden. In tumortragenden Tieren soll nachfolgend eine zeitabhängige, quantitative Organverteilung des Konjugates bestimmt werden. In einem weiteren Vorversuch muss die Neuraminidase-Aktivität des Konjugates ermittelt werden, um zu zeigen, dass auch in konjugierter Form die Neuraminidaseaktivität erhalten bleibt.

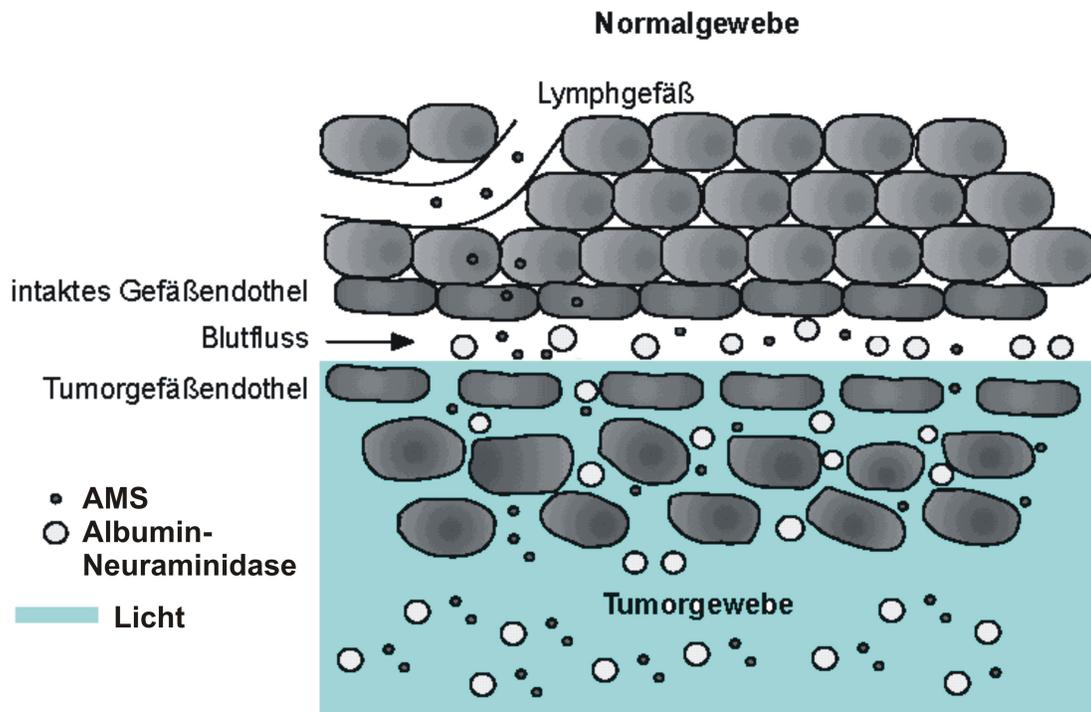


Abb. 10: Anreicherungsmechanismus

Die geringe Reichweite von kurzwelligem Licht ist auch von Vorteil, weil auf diese Weise auch Nebenwirkungen noch weiter minimiert werden können.

Markierung, Nachweis der Anreicherung und Ermittlung des Anreicherungsmaximums. Radioaktive Albumin-Neuraminidase markieren.

Die maximal tolerable Dosis von AMS und des Albumin-Neuraminidase-Konjugates müssen ermittelt werden. Wenn beide Dosen bekannt sind, soll auch die maximal tolerable Dosis der einer Kombination aus AMS und Albumin-Neuraminidase-Konjugate ermittelt werden. Um diese zu ermitteln soll das 3+3 Eskalationschema Anwendung finden.

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es, Licht auf chemische Weise direkt im Tumorgewebe zu erzeugen. Es soll also Licht an dem Ort erzeugt werden, wo es für therapeutische und diagnostische Zwecke gebraucht wird und wo keine externen Lichtquellen eingebracht werden können (insbesondere bei inoperablen Gehirntumoren). Das so erzeugte Licht soll eine photodynamische Therapie in schwer oder nicht zugänglichen Körperregionen ermöglichen. Schließlich könnte vom Tumorgewebe emittiertes Licht der intraoperativen Tumordiagnostik dienen.

Ziel ist es, nachzuweisen, dass auch in vivo eine Lichtmenge im Tumor entsteht, die für die photodynamische Therapie und auch für diagnostische Zwecke ausreicht. Die im Tumor entstehende Lichtmenge soll in tumortragenden Tieren mittels charge coupled device (CCD) Kamera untersucht werden. Tumortragende Tiere sollen einer photodynamischen Therapie unterzogen werden, wobei im Tumor erzeugtes Licht als Lichtquelle dienen soll. Das Tumorstadium soll verglichen werden mit einer unbehandelten Kontrollgruppe sowie einer Gruppe, die mit externem Licht bestrahlt wird.

3.2. Arbeitsprogramm

Synthese eine Neuraminidase-Albumin-Konjugates. Mit Hilfe eines heterobifunktionellen Linkers lassen sich Konjugate gewinnen, die aus zwei verschiedenen Proteinen bestehen (Carlsson et al 1973, Hu T & Su Z 2003). Einer Methode von Hu et al. und Carlsson et al. folgend (HU T hat ein Albumin-Katalase-Konjugat hergestellt), soll Albumin über den heterobifunktionellen Linker *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (Strukturformal s. Abb. 11) an Neuraminidase konjugiert werden. Die Konjugation der Neuraminidase an Albumin hat zwei Gründe. Zum einen soll durch die Konjugation an Albumin, die Bioverteilung der Neuraminidase so gesteuert werden, dass das Albumin-Neuraminidase-Konjugat dem Enhanced Retention and Permeability Effect unterliegt, damit es zu einer passiven Anreicherung der Neuraminidase im Tumor kommt. Zusätzlich soll Albumin Chemolumineszenzenhancer fungieren, um die Lichtausbeute noch zu erhöhen.

N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat wird an Neuraminidase konjugiert, wobei die aktivierte Estergruppe des Linkers mit einer Aminogruppe der Neuraminidase reagiert, wodurch eine Amidbindung entsteht (Abb. 11). Die Abtrennung des nicht an die Neuraminidase gekoppelten Linkers erfolgt durch Gelfiltration über Sephadex 25. Die mit dem Linker derivatisierte Neuraminidase wird nun zu einer gepufferten Albumin Lösung gegeben, um schließlich durch die Bildung einer Disulfidbrücke das Albumin-Neuraminidase-Konjugat zu erhalten (Abb 11). Prinzipiell ist auch die umgekehrte Kopplungsreihenfolge möglich. Beide Varianten sollen getestet werden. Unter den Bedingungen von Carlsson et al (Carlsson et al, 1973) ist es möglich, eine Mehrfachkonjugation zu vermeiden.

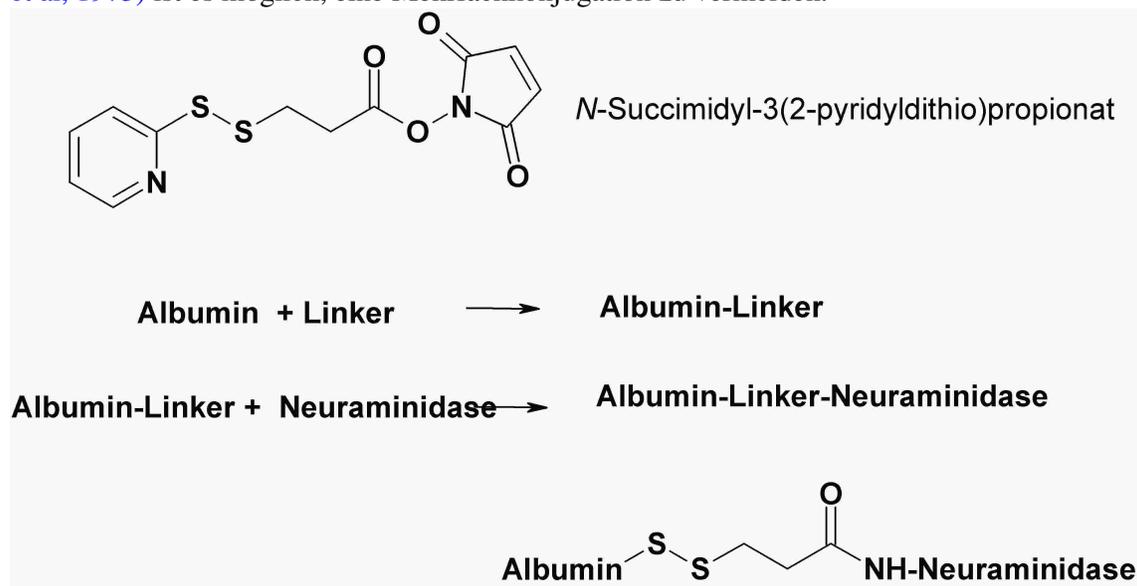


Abb. 11: Herstellung des Albumin-Neuraminidase-Konjugates

Bestimmung der Kopplungseffizienz. Nachfolgend soll die Kopplungseffizienz bestimmt werden. Im zweiten Kopplungsschritt, wenn die mit dem Linker modifizierte Neuraminidase an Albumin gekoppelt wird, bildet sich Pyridin-2-thion, das sich UV-Vis spektrometrisch quantifizieren lässt. Pyridin-2-thion entsteht nur, wenn der letzte Kopplungsschritt funktioniert hat. Je höher die entstandene Pyridin-2-thion, desto höher ist die Absorption der Reaktionslösung bei 343 nm und desto höher ist damit auch die Kopplungseffizienz (Carlsson et al 1973). Der Linker selbst und auch die Proteine zeigen bei dieser Wellenlänge keine Absorption, so dass man durch die Quantifizierung von Pyridin-2-thion auf die Kopplungseffizienz schließen kann (Carlsson et al 1973).

Funktionstestung des Neuraminidase-Albumin-Konjugates. Nach der Kopplung der Neuraminidase an Albumin könnte die Neuraminidase-Aktivität beeinträchtigt sein. Daher wird die Neuraminidase Aktivität des Konjugates mit der unkonjugierter Neuraminidase verglichen. Dazu wird das Neuraminidase-Albumin-Konjugat mit AMS 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wird die emittierte Lichtmenge bei 477 nm mittels CCD kamera oder Chemolumineszenzreader gemessen (Achyuthan 2003, Buxton 2000). Wenn das Konjugat nach wie vor – wie unkonjugierte Neuraminidase – AMS spalten und damit Licht erzeugen kann, dann zeigt das Konjugat unverändert Neuraminidaseaktivität.

Radioiodierung des Neuraminidase-Albumin-Konjugates. Um eine optimale Lichtausbeute im Tumor zu erzielen, muss die Gabe des Neuraminidase-Albumin-Konjugates und von AMS zeitversetzt erfolgen. Erst nachdem das Neuraminidase-Albumin-Konjugat seine maximale Tumoranreicherung erzielt hat, ist es sinnvoll AMS zu applizieren. Daher soll der Zeitpunkt der maximalen Tumoranreicherung des Neuraminidase-Albumin-Konjugates ermittelt werden. Es ist vorgesehen, das Neuraminidase-Albumin-Konjugat radioaktiv zu markieren, um die zeitabhängige Organverteilung des Konjugates zu bestimmen. Die Radioiodierung ist die einfachste Möglichkeit, das Konjugat zu markieren, wobei die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren iodiert werden. Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, z.B. die Chloramin T (p-Toluolsulfonsäurechloramidnatrium)-Methode an – das am häufigsten verwendete Iodierungsverfahren, das erfolgreich für die Markierung einer Vielzahl verschiedener Proteine und Peptide wie Albumine, Globuline, Neuropeptide und Chemokine verwendet wurde. Es handelt sich hierbei um ein oxidatives Verfahren, bei dem das zu markierende Protein für kurze Zeit (2 Minuten) mit Chloramin T und [¹³¹I]⁻, ausgesetzt wird, wodurch Proteine oder Peptide mit hoch spezifischer Aktivität erzeugt werden, die mit trägerfreiem Radioiod markiert sind (Hunter & Greenwood 1962). Alternativ könnte die Iodierung mit anstelle von Chloramin T mit Iodogen-Reagens durchgeführt werden, einem schonenderen Verfahren (Salacinzki 1981). Die Markierung mit Bolton Hunter Reagenz ist das schonendste Verfahren, weil es handelt sich dabei um eine nicht-oxidative Methode handelt. Der aktive Ester acyliert Aminoendgruppen mit dem iodierten p-Hydroxyphenylpropionrest, was dies zu einem effektiven Verfahren zur Einführung radioaktiven Iods in eine Vielzahl verschiedener Proteine und Peptide macht. Verfahren markierte Proteine und Peptide wie TSH, hGH, Insulin und hLH haben eine hohe Immunreaktivität und unveränderte Rezeptorbindung gezeigt (Rudinger & Ruegg 1973, Bolton & Hunter 1973).

Tierexperimentelle Untersuchungen. Es sind eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen vorgesehen. Ein Tierversuchsantrag wurde gestellt und genehmigt. Eine Kopie des Antrages sowie des Genehmigungsschreibens des Regierungsbezirkspräsidiums Karlsruhe liegen bei. Insgesamt sind vier verschiedene Teilversuche notwendig, um die Effektivität intratumoral erzeugten Lichtes in der photodynamischen Therapie zu prüfen. Zunächst muss die Dosierung der einzelnen Substanzen bestimmt werden. Da die einzelnen Substanzen zur Lichterzeugung zeitlich versetzt appliziert werden müssen, ist es außerdem erforderlich, dass der optimale Zeitpunkt der Substanzapplikation bestimmt wird (Teilversuch 2). Nachdem Dosierungen und auch Dosierungszeitpunkte ermittelt worden sein werden, soll die im Tumor erzeugbare Lichtmenge und die Dauer der Lichtemission in einem dritten Teilversuch bestimmt werden. Dieser Teilversuch gibt auch Aufschluss darüber, ob die Lichterzeugung direkt im Tumor für eine intraoperative Tumordiagnostik geeignet ist. Schließlich soll noch der therapeutische Effekt des intratumoral erzeugten Lichtes im Rahmen der photodynamischen Therapie evaluiert werden. Generell werden die Tiere vor Versuchsbeginn mit einer Ohrmarke markiert. Für Injektionsnarkose mit Ketanest Rompun gilt bei allen Teilversuchen: Intraperitoneale Applikation und folgende Dosierung Ketanest

(100 mg/kg)/ Rompun (20 mg/kg). Die Substanzen werden als isotone Lösungen in PBS Puffer (mit physiologischem pH-Wert) einmalig intravenös in die Schwanzvene appliziert. Das Injektionsvolumen beträgt maximal 100 μ L. Die Tumoriionokulation erfolgt so, dass 100 μ L eine Suspension von 3×10^6 Zellen (entweder HeLa oder C6 Gliom) in PBS subkutan in die linke Flanke des Tieres erfolgen. Wenn der mittlere Tumordurchmesser eine Größe von 8 mm beträgt, beginnen die Versuche mit den tumortragenden Tieren.

Dosierungsfestlegung, Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (Teilversuch 1). Zur Lichterzeugung werden insgesamt zwei Substanzen benötigt, das Neuraminidase-Albumin-Konjugat und das Substrat dieses Enzyms (AMS). Durch die Spaltung des Substrates durch das Enzym entsteht Licht. Die maximal tolerable Dosis dieser beiden zur Lichterzeugung erforderlichen Stoffe soll ermittelt werden, da von der Dosis dieser Stoffe die maximale Lichtausbeute abhängt. Da eine photodynamische Therapie durchgeführt werden soll, braucht man neben dem Licht einen Photosensibilisator. Hypocrellin B wurde als Photosensibilisator ausgewählt, weil sein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge, die der Wellenlänge des Lichtes entspricht, die durch die chemische Reaktion entsteht. Auch die maximal tolerable Dosis des Photosensibilisators muss getestet werden. Da insgesamt drei Substanzen (Funktion der Substanzen wurde im vorherigen Absatz genauer beschrieben) notwendig sind, soll die maximal tolerable Dosis aller drei Substanzen ermittelt werden. Die maximal tolerable Dosis soll für jede Substanz einzeln ermittelt werden. Da die erzeugte Lichtmenge linear (direkt proportional) zur Dosis des Enzymes und AMS ist, soll die Dosis dieser beiden Substanzen bei diesem Teilversuch linear gesteigert werden, das Neuraminidase-Albumin-Konjugat (10 bis 100 Units/kg Körpergewicht) und AMS (1 bis 50 mg/kg Körpergewicht). Nur bei Hypocrellin B ist ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung zu sehen, daher erfolgt hier die Dosiserhöhung um Wurzel 3, wobei der zu testende Dosisbereich zwischen 1 und 41,9 mg/kg liegen soll. Die Bestimmung der maximal tolerable Dosis soll nach dem aufsteigenden 3+3 Eskalationsschema erfolgen. Dabei wird 3 Mäusen zunächst die niedrigste Dosierung verabreicht. Die Dosissteigerung erfolgt so lange, bis entweder alle Tiere versterben/starke Toxizitätserscheinungen zeigen oder aber 1 von 3 Tieren verstirbt/starke Intoxikationssymptome zeigt. Ist das letztere der Fall, dann wird die gleiche Dosis nochmals drei weiteren Tieren gegeben. Zeigen diese keine Toxizitätserscheinungen, dann wird der Versuch mit der nächst höheren Dosis fortgesetzt. Sollte aber wieder mindestens 1 Tier starke Intoxikationssymptome zeigen, dann endet der Versuch. Die Dosis, bei der alle Tiere überlebt und keine starken Intoxikationssymptome gezeigt haben, ist dann die maximal tolerable Dosis. Eine kombinierte Substanzgabe ist nicht vorgesehen, weil die Applikation der einzelnen Substanzen nicht zeitgleich, sondern zeitlich versetzt erfolgt. Man müsste ansonsten bei diesem Teilversuch auch noch den Parameter Zeit variieren, was zu einer wesentlich höheren Tierzahl führen würde. Außerdem ist aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur der einzelnen Substanzen keine gegenseitige toxikologische Beeinflussung zu erwarten. Die nachfolgende Tabelle zeigt die vorgesehene Gruppeneinteilung.

Tierzahl Gruppe 1	Dosis Albumin- Neuraminidase- Konjugat [Unit/kg]	Tierzahl Gruppe 2	Dosis Hypocrellin B [mg/kg]	Tierzahl Gruppe 3	Dosis AMS [mg/kg]
3	10	3	1	3	1
3	15	3	1,7	3	2
3	20	3	2,9	3	5
3	30	3	4,9	3	10
3	40	3	8,4	3	15
3	50	3	14,2	3	20
3	75	3	24,2	3	25
3	100	3	41,9	3	50

Nebenwirkungen. Blutuntersuchungen an den Tieren (Blutentnahme nach Tötung). Es wird direkt nach dem Töten der Tiere Blut aus dem Herzen der Tiere entnommen, um mögliche Nebenwirkungen zu evaluieren. Neben einem großen Blutbild, werden auch Kreatininclearance und Leberwerte bestimmt, um weitere Informationen über die Toxizität zu erhalten.

Ermittlung der maximalen Anreicherung des Albumin-Neuraminidase-Konjugates (Teilversuch 2). Dieser Teilversuch soll an Tumor tragenden Mäusen durchgeführt werden, wobei zwei verschiedene Tumoren (HeLa und C6 Gliom) vorgesehen sind. Zur Lichterzeugung werden insgesamt zwei Substanzen benötigt. Dabei ist es wichtig, dass sich zunächst das Enzym im Tumor anreichert. Erst kurz vor der maximalen Tumoranreicherung des Enzyms soll AMS appliziert werden, um eine maximale Lichtausbeute zu erzielen. Außerdem soll die zeitabhängige Enzymkonzentration im Tumor ermittelt werden. Da für den Zeitpunkt der Applikation von AMS Ausschlag gebend ist, wann es zur maximalen Tumoranreicherung des Albumin-Neuraminidase-Konjugates kommt, soll die zeitabhängige Bioverteilung des Enzym-Konjugates bestimmt werden. Die Tiere erhalten einmalig 1 MBq des radioiodierte Albumin-Neuraminidase-Konjugates pro Tier. Zu den in Tabelle 2 unter 1.4.2. c) angegebenen Zeitpunkten werden die Tiere mittels CO₂ getötet. Dem toten Tier werden die Organe entnommen und die Menge der Radioaktivität im Tumor und auch in anderen Organen (Leber, Niere, Lunge, Gehirn) mit Hilfe eines Gamma-Counters bestimmt. Bei 2 verschiedenen Tumoren, sowie 8 Zeitpunkten (pro Zeitpunkt eine Dreifachbestimmung) werden insgesamt 48 Tiere benötigt.

Für jede der beiden Tumorarten (Hela und C6 Gliom) ergibt sich folgender Versuchsplan:

Beobachtungs- zeitpunkt	Tiere mit subkutanem C6 Gliom	Tiere mit subkutanem HeLa Tumor
1 Std	3	3
2 Std	3	3
4 Std	3	3
6 Std	3	3
8 Std	3	3
10 Std	3	3
16 Std	3	3
24 Std	3	3
Summe	24	24

Messung des im Tumor erzeugten Lichtes (Teilversuch 3). Nachdem Teilversuch 1 Informationen über die Dosen der Substanzen und Teilversuch 2 über den Zeitpunkt der Applikation des Neuraminidase-Albumin-Konjugates geliefert haben, soll nun getestet werden, welche Lichtmenge sich tatsächlich erzeugen lässt. Zuerst erfolgt die Gabe des Enzymkonjugates. Kurz bevor das Neuraminidase-Albumin-Konjugat die maximale Tumoranreicherung erzielt hat, wird AMS appliziert (= Zeitpunkt 1, in der Tabelle mit T1 bezeichnet). Die Tiere werden einige Minuten nach Applikation von AMS narkotisiert und mit einer CCD (charge coupled device) Kamera untersucht, wobei die entstehende Lichtmenge detektiert werden kann und auch die Dauer der Lichtemission. Bei einer zweiten Gruppe soll AMS nicht kurz vor der maximalen Anreicherung des Albumin-Neuraminidase-Konjugates (der maximal Anreicherungszeitpunkt geht aus Teilversuch 2 hervor), sondern nach dessen Anreicherung appliziert werden (= zweiter Zeitpunkt, in der Tabelle als T2 bezeichnet). Zwei Zeitpunkte sind vorgesehen, weil erwartet wird, dass das Enzym länger im Tumor bleibt, so dass bei einer zweiten Gruppe die Gabe von AMS erst nach der maximalen Anreicherung des Enzymkonjugates erfolgen soll.

Die Menge des im Tumor erzeugten Lichtes soll an tumortragenden Tieren bestimmt werden. Bei zwei Tumoren, zwei Zeitpunkten (die beiden Zeitpunkte unterscheiden sich voneinander durch den Applikationszeitpunkt von Substanz 3) und einer Fünffachbestimmung pro Tumor werden insgesamt 20 Tiere benötigt. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Gruppenaufteilung.

Gruppe (Tumor)	Tierzahl	Dosis Neuraminidase- Albumin- Konjugat	Dosis AMS	Zeitpunkt der Injektion von AMS	Untersuchungs- zeitpunkt
1 (HeLa)	5	MDT	MDT	1	T1
2 (HeLa)	5	MDT	MDT	2	T2
3 (C6 Gliom)	5	MDT	MDT	1	T1
4 (C6 Gliom)	5	MDT	MDT	2	T2
20					

MDT = maximal tolerable Dosis

Photodynamische Therapie der Tumors (Teilversuch 4). Um den therapeutischen Nutzen intratumoral erzeugten Lichts für die photodynamische Therapie zu beurteilen, soll der therapeutische Effekt an tumortragenden Mäusen (HeLa und C6 Gliom) geprüft werden. Es sind pro Tumor zwei Kontrollgruppen/Vergleichsgruppen vorgesehen. Die eine Kontrollgruppe ist eine Gruppe, die in keiner Weise behandelt wird. Die zweite Kontrollgruppe/Vergleichsgruppe wird einer photodynamischen Therapie unterzogen, wobei das Licht von einer externen Lampe kommt. Die eigentliche Therapiegruppe wird einer photodynamischen Therapie unterzogen, wobei das Licht direkt im Tumor mit Hilfe von AMS und dem Neuraminidase-Albumin-Konjugat erzeugt werden soll. Die beiden Behandlungsgruppen werden einer einmaligen photodynamischen Therapie unterzogen. Der Hauptvergleich ist zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Gruppe, die der neuen Therapie (chemische Erzeugung von Licht im Tumor) unterzogen wird. Außerdem wird die Gruppe, die der neuen Therapie (Licht auf chemische Weise im Tumor erzeugt) unterzogen wird, mit der Gruppe verglichen, die der herkömmlichen photodynamischen Therapie (externe Lichtquelle) unterzogen wird. Bei den zwei vorgesehenen Tumorarten (HeLa und C6 Gliom) werden bei Teilversuch 4 aus biometrischen Gründen 24 Tiere pro Gruppe benötigt, bei insgesamt 6 Gruppen also 144 Tiere. Für jede der beiden Tumorarten ergibt sich folgender Versuchsplan:

Gruppe	Albumin-neuraminidase-Konjugat	Hypocrellin B	AMS	Tiere
K0 C6 Gliom	-	-	-	24
K1 C6 Gliom	-	+ (MDT)	-	24
Therapie C6 Gliom	+ (MDT)	+ (MDT)	+ (MDT)	24
Summe				72

Gruppe	Albumin-neuraminidase-Konjugat	Hypocrellin B	AMS	Tiere
K0 HeLa	-	-	-	24
K1 HeLa	-	+ (MDT)	-	24
Therapie HeLa	+ (MDT)	+ (MDT)	+ (MDT)	24
Summe				72

144

Bei Gruppe K1 erfolgt die Bestrahlung des Tumors mit einer Lampe von außen. Es erfolgt die einmalige Applikation des photosensibilisators, des Neuraminidase-Albumin-Konjugates und von AMS, wobei sich die Dosierungen und Dosierungszeitpunkte aus den einzelnen Teilversuchen ergeben. Die Tiere werden noch 14 Tage nach der Gabe der Substanzen beobachtet, wobei täglich die mechanische Messung der Tumorgroße erfolgt. 14 Tage nach Therapiebeginn oder nach Erreichen einer mittleren Tumordurchmessers von 13,5 mm in der Kontrollgruppe oder beim Auftreten schwerwiegender Vergiftungserscheinungen (Futterverweigerung, stark eingeschränktes Reaktionsvermögen, Gewichtsverlust > 10 %) wird der Versuch sofort beendet.

Histologische Untersuchungen der therapierten Tumore. Ein Tag nach der Therapie (bei zwei Tieren der Therapiegruppe) und auch nach Therapierende werden die Tumoren entnommen und mit 10%igem Formalin fixiert. Nachfolgend werden Gewebeschnitte angefertigt und die Tumore auf Apoptose (Anti-CD95-Maus-Antikörper) und Nekrose (Eosin-Hämotoxylin) untersucht und mit unbehandelten Kontrolltumoren untersucht. Auf diese Weise soll ebenfalls der therapeutische Effekt überprüft werden.

Photochemical induced drug delivery. [*N*-(2-diethylaminoethyl)]-2-methylamino-benzamid (BZA) reichert sich in Lysosomen an. In der unprotonierten Form diffundiert das Benzamidderivat in die Lysosomen, wo es aufgrund des dort herrschenden sauren pH-Wertes protoniert wird. In der protonierten Form bleibt es in den Lysosomen gefangen. Daher soll das BZA als Modellsubstanz dienen, um die photochemisch induzierte Wirkstofffreisetzung zu testen. Tumortragende Mäuse erhalten zunächst 30 mg/kg BZA (die maximal tolerable Dosis wurde bereits in einem Vorversuch ermittelt). 30 Minuten später werden das Neuraminidase-Albumin-Konjugat und der Photosensibilisator Hypocrellin B appliziert. Wiederum zeitlich versetzt (der Injektionszeitpunkt wurde in Teilversuch 2 und 3 ermittelt), erfolgt die Applikation von AMS. Es sind eine Kontrollgruppe und eine Vergleichsgruppe vorgesehen. Die Vergleichsgruppe erhält BZA und den Photosensibilisator, als Lichtquelle fungiert eine externe Lampe. Die Kontrollgruppe erhält nur BZA. Nach Tötung der Tiere werden die Tumoren entnommen. Die angefertigten Dünnschnitte werden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Gruppe	BZA	Albumin- Neuraminidase- Konjugat	Hypocrellin B	AMS	Tiere
K0 C6 Gliom	-	-	-	24	24
K1 C6 Gliom	-	+ (MDT)	-	24	24
Therapie C6 Gliom	+ (MDT)	+ (MDT)	+ (MDT)	24	24
Summe					72

Gruppe	BZA	Albumin- Neuraminidase- Konjugat	Hypocrellin B	AMS	Tiere
K0 C6 Gliom	-	-	-	24	24
K1 C6 Gliom	-	+ (MDT)	-	24	24
Therapie C6 Gliom	+ (MDT)	+ (MDT)	+ (MDT)	24	24
Summe					72

144

Literatur

Achyuthan KE, Pence LM, Appleman JR, Shimasaki CD. ZstatFlu-II test: a chemiluminescent neuraminidase assay for influenza viral diagnostics. *Luminescence* 2003; **18(3)**: 131-9.

Awan MA, Tarin SA. Review of photodynamic therapy. *Surgeon*. 2006; **4(4)**: 231-6.

Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. *Biochem J*. 1973; **133(3)**: 529-39.

Bronstein I, Edwards B, Voyta JC. 1,2-dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. *J Biolumin Chemilumin* 1989; **4**: 99-111.

Buxton RC, Edwards B, Juo RR, Voyta JC, Tisdale M, Bethell RC. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal Biochem*. 2000; **280(2)**: 291-300.

Carlsson J, Drevin H, Axen R. Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat , a new hetero-bifunctional reagent. *Biochem J* 1978; **173**: 723-37.

Chin W, Lau W, Cheng C, Olivo M. Evaluation of Hypocrellin B in a human bladder tumor model in experimental photodynamic therapy: biodistribution, light dose and drug-light interval effects. *Int J Oncol*. 2004; **25(3)**: 623-9.

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999; **51(4)**: 691-743.

Edwards B, Sparks A, Voyta JC, Bronstein I. Unusual luminescent properties of odd- and even-substituted naphthyl-derivatized dioxetanes. *J Biolumin Chemilumin*. 1990; **5(1)**: 1-4

Gerlowski L. E., Jain R. K. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 1986; **31(3)**: 288-305.

Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962; **194**: 495-6.

Hu T, Su Z. A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate. *J. Biotechnol* 2003; **100(3)**: 267-75.

Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2006; **13(18)**: 2189-204.

Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*. 1991; **37(9)**: 1472-81.

Kricka LJ. Strategies for immunoassay. *Pure Appl Chem* 1996; **68**: 1825-30.

Maeda H., Matsumura Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1989; **6(3)**: 193-210.

Matsumoto M, Hiroshima T, Chiba S, Isobe R, Watanabe N, Kobayashi H. Synthesis of 3-ethoxy-4,4-diisopropyl-1,2-dioxetanes bearing a benzo(b)furan-2-yl or a benzo(b)thiophen-2-yl group: CIEEL-active dioxetanes emitting red light. *Luminescence* 1999; **14(6)**: 345-8.

Nicolas JC, Terouanne B, Boussioux AM, Crastes de Paulet A. Chemiluminescence and bioluminescence in clinical analysis. Perspectives of development. *Ann Biol Clin* 1985; **43(2)**: 201-5.

Prasmickaite L, Hogset A, Selbo PK, Engesaeter BO, Hellum M, Berg K. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2002; **86**: 652-7.

Qiang YG, Zhang XP, Li J, Huang Z. Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin Med J (Engl)*. 2006; **119(10)**: 845-57.

Rudinger J, Ruegg U. Appendix: Preparation of N-succinimidyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate. *Biochem J*. 1973; **133(3)**: 538-539

Rühling M. Dissertation 2004. Freie Universität Berlin. Wirkungen der photodynamischen Therapie mit dem Photosensibilisator mTHPC (Foscan®) auf Grosse Blutgefäße, Nerven und Muskelgewebe im Kaninchen-Tiermodell.

Salacinzki PRP, McLean C, Sykes JE, Clement-Jones VV, Lowry PJ. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal. Biochem* 1981; **117**: 136-46.

Selbo PK, Hogset A, Prasmickaite L, Berg K. Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. *Tumour Biol*. 2002; **23(2)**: 103-12.

Soper SA, McGown BL, Warneroit IM. Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry. *Anal. Chem*. 1994; **66**: 428R-444R.

Wan S, Parrish JA, Anderson RR, Madden M. Transmittance of nonionizing radiation in human tissues. *Photochem Photobiol*. 1981; **34(6)**: 679-81

Wang Q, Chang BJ, Mee BJ, Riley TV. Neuraminidase production by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol*. 2005; **107(3-4)**: 265-72.

Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiotherapy and Oncology* 1984; **2(4)**: 343-366.

Weiss D, Flammersheim HJ, Baader WJ. Bioluminescence & Chemiluminescence, Progress & Current Applications. World Scientific 2002, 169-172.

Wolf M, Bauder-Wüst U, Pipkorn H, Eskerski H, Eisenhut M. Fluorophor-labeled spermidine derivatives as fluorescent markers in optical tumor imaging. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; **16(12)**: 3193-6.

Yuan F., Dellian M., Fukumura D., Leunig M., Berk D. A., Torchilin V. P., Jain R. K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size in: *Cancer Res* 1995; **55**: 3752-6.

