(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 38 148 T2** 2009.02.26

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 140 022 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 38 148.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/30230**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 963 103.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/035422**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.12.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **22.06.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.02.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 9/127*** (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
113004 P **18.12.1998** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Alza Corp., Mountain View, Calif., US; Hadasit Medical Research Services and Development Ltd., Jerusalem, IL

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(72) Erfinder:
GABIZON, Alberto A., 96920 Jerusalem, IL; ZALIPSKY, Samuel, Redwood City, CA 94061, US; GOREN-RUBEL, Dorit, 93389 Jerusalem, IL; HOROWITZ, Aviva T., 92548 Jerusalem, IL

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR VERABREICHUNG VON EINER VERBINDUNG AN MEHRFACHRESISTENTE ZELLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Verabreichen einer therapeutischen Verbindung an Krebszellen mit Multi-Drug Resistance (mehrfache Arzneimittelresistenz).

Hintergrund der Erfindung

[0002] Nach den Herzerkrankungen ist Krebs die führende Todesursache in den USA. Mit den derzeitigen Behandlungsverfahren werden ungefähr ein Drittel der Patienten mit lokalen Maßnahmen, einer Operation oder Strahlentherapie, behandelt, die im Allgemeinen wirksam sind, wenn der Tumor bis zum Zeitpunkt der Behandlung keine Metastasen gebildet hat. In den restlichen Fällen ist eine frühe Mikrometastasierung ein charakteristisches Merkmal des Neoplasmas, was zeigt, dass ein systemischer Ansatz, wie etwa eine Chemotherapie, erforderlich ist, häufig zusammen mit einer Operation oder Bestrahlung.

[0003] Ein Problem bei der Krebschemotherapie ist die Arzneimittelresistenz. Einige Tumorarten, z. B. der nicht kleinzellige Lungenkrebs und Colonkrebs, zeigen eine primäre Resistenz, d. h. das Fehlen einer Reaktion auf die erste Einwirkung gegenwärtig verfügbarer, herkömmlicher chemotherapeutischer Mittel. Andere Tumorarten zeigen eine erworbene Resistenz, die sich in etlichen arzneimittelempfindlichen Tumorarten entwickelt. Arzneimittelresistente Krebszellen zeigen zwei Arten von erworbener Arzneimittelresistenz. Es gibt Zellen, die eine Resistenz gegen ein einzelnes Mittel oder solche, die eine Resistenz gegen eine einzelne Klasse von Antikrebsarzneimitteln mit dem gleichen Wirkungsmechanismus zeigen. Der zweite Typ umfasst Zellen, die eine breite Resistenz gegen etliche oder viele, chemisch verschiedene Antikrebsarzneimittel mit verschiedenen Wirkungsmechanismen zeigen. Dieser zweite Typ von erworbener Resistenz ist als „Multi-Drug Resistance" bekannt.

[0004] Eine Multi-Drug Resistance findet sich auch bei einigen Tumorzellarten, wie etwa Nieren- und Colontumoren, die eine primäre Resistenz zeigen. D. h., im Gegensatz zur Situation bei einer erworbenen Multi-Drug Resistance reagieren bestimmte Tumorarten nicht auf eine anfängliche Behandlung mit vielen chemotherapeutischen Mitteln.

[0005] Eine Multi-Drug Resistance steht häufig mit einer erhöhten Expression eines normalen Gens, dem MDR1-Gen, für ein Zelloberflächenglycoprotein, P-Glycoprotein, das am Arzneimittelabfluss beteiligt ist, im Zusammenhang. Die Expression des P-Glycoproteins korreliert mit einer Abnahme der intrazellulären Akkumulation von Arzneimittel, d. h. das P-Glycoprotein wirkt als eine energieabhängige Pumpe oder ein entsprechendes Transportmolekül, wodurch das Arzneimittel aus der Zelle entfernt wird, was wiederum ein Akkumulieren in der Zelle verhindert.

[0006] Das P-Glycoprotein wird normalerweise hauptsächlich auf epithelialen und endothelialen Oberflächen exprimiert und scheint eine Rolle bei der Absorption und/oder Sekretion zu spielen. Es handelt sich um einen aktiven Transporter, der hydrophobe Arzneimittel aus der Zelle pumpt, dadurch ihre zytoplasmatische Konzentration reduziert und deshalb ihre Toxizität. Bei normalen Zellen wirkt das P-Glycoprotein, indem es toxische Metaboliten oder xenobiotische Verbindungen aus dem Körper entfernt (Endicott, J. und Ling, V. Annu. Rev. Biochem., 58:137–171 (1989)).

[0007] Krebsarten, die P-Glycoprotein exprimieren, schließen Krebsarten ein, die sich von Gewebe ableiten, welches das MDR1-Gen normalerweise exprimiert, nämlich Krebsarten der Leber, des Colons, der Niere, des Pankreas und der Nebenniere. Eine Expression des Gens wird auch während des Verlaufs einer Chemotherapie mit Multi-Drug Resistance-Arzneimitteln bei Leukämien, Lymphomen, Brust- und Ovarialkrebs und vielen anderen Krebsarten beobachtet. Diese Krebsarten reagieren anfänglich auf eine Chemotherapie, wenn jedoch der Krebs wiederkehrt, exprimieren die Krebszellen häufig vermehrt P-Glycoprotein. Es gibt Krebsarten, die sich von Geweben ableiten, die normalerweise kein P-Glycoprotein exprimieren, bei denen jedoch die P-Glycoprotein-Expression während der Krebsentwicklung zunimmt. Ein Beispiel ist die chronische myeloische Leukämie, bei der, wenn es zur Blastenkrise kommt, unabhängig von der vorangehenden Behandlungsgeschichte vermehrt P-Glycoprotein exprimiert wird (Gornesman, M. M. Cancer Research, 53:747–754 (1993)).

[0008] Die MDRI-kodierte P-Glycoprotein-Pumpe erkennt und transportiert viele verschiedene Substanzen, einschließlich der meisten Arzneimittel gegen Krebs, bei denen es sich um natürliche Produkte handelt, wie etwa Doxorubicin, Daunorubicin, Vinblastin, Vincristin, Actinomycin D, Paclitaxel, Teniposid und Etoposid (Gornesman, M. et al. Current Opinion in Genetics and Development, 6:610–617 (1996)). Allgemeiner gesagt sind die Arzneimittel, die häufig an einer Multi-Drug Resistance beteiligt sind, Alkaloide oder Antibiotika aus Pflan-

zen oder Pilzen, und sie schließen die Vinca-Alkaloide, Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Dactinomycin ein. Gelegentlich wird eine Kreuzresistenz gegenüber alkylierenden Mitteln, wie etwa Melphalan, Nitrogen Mustard und Mitomycin C beobachtet (Endicott, J. und Ling, V., Annu. Rev. Biochem., 58:137–171, (1989)).

[0009] A. T. Hornwitz et al. ("Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, 11. Symposium 1997, Berchtesgaden", Hrsg. W. Pfleiderer und H. Rokos, Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, S. 353–356) bezieht sich auf die Zytotoxizität und Bindung von Folsäurezielgerichteten Liposomen (folic acid-targeted liposoms) mit eingeschlossenem Doxorubicin bei Zellen, die für das Arzneimittel empfänglich oder dagegen resistent sind. Die Autoren berichten, dass Liposomen mit Folsäure-zielgerichteten Liganden nicht an membranassoziierte Folatrezeptoren binden, sondern an eine nicht identifizierte Folatrezeptorbindungsstelle, die in der extrazellulären Matrix vorhanden ist.

[0010] D. Goren et al. (Proceedings of the International Symposium of Controlled Release of Bioactive Materials, Band 24, 1997, S. 865–866) bezieht sich auf das Anzielen des Folatrezeptors von Tumorzellen durch arzneimittelbeladene Liposomen mittels eines Folsäurezielgerichteten Liganden. Die Autoren berichten, dass ein an Liposomen gekoppelter Folatligand die Bindung der Liposomen an Tumorzellen verbessert, wodurch die Toxizität gesteigert wird.

[0011] R. J. Lee et al. (Biochemica et Biophysica Acta, Band 1233, 1995, S. 134–144) bezieht sich auf das Anzielen von Krebszellen durch ein Arzneimittel, Doxorubicin, durch Einschließen von Doxorubicin in Folat-zielgerichtete Liposomen.

[0012] WO 98/16202 bezieht sich auf die Abgabe einer in Liposomen eingeschlossenen Verbindung an das Zytoplasma einer Zelle durch Fusion der Liposomenlipiddoppelschicht mit der Zellmembran. In einer Ausführung wird ein Folatligand an das Liposom angefügt, um mit dem Liposom Folatrezeptoren auf Epithelzellen anzuzielen.

[0013] WO 98/13072 beschäftigt sich mit antisense-Oligonucleotiden, welche eine Expression des MDR1-Gens verhindern, um eine Multi-Drug Resistance auszuschalten. Bei einer Ausführung ist das antisense-Oligonucleotid mit einem anzielenden Molekül, wie etwa Folat, konjugiert, um eine zelluläre Abgabe des Oligonukleotids durch Folatrezeptorendozytose zu erreichen.

[0014] K. A. Mislick et al. (Bioconjugate Chemistry, Band 6, Nr. 5, 1995, Seiten 512–515) beschäftigt sich mit der intrazellulären Abgabe von DNA über Folatrezeptorendozytose.

[0015] Eindeutig schränkt eine Multi-Drug Resistance bei Krebszellen eine erfolgreiche Chemotherapie ein und legt eine schlechte Prognose für den Patienten nahe. Ein Ansatz, der beschrieben worden ist, um eine Multi-Drug Resistance zu überwinden, schließt die gleichzeitige Verabreichung von Calciumkanalblockern ein, wie etwa Verapamil, welche die Arzneimitteltransportwirkung von P-Glycoprotein mit dem chemotherapeutischen Mittel hemmen. Dieser Ansatz ist beim Menschen noch nicht bestätigt worden, und es werden andere Strategien zum Überwinden einer Multi-Drug Resistance benötigt.

Kurzfassung der Erfindung

[0016] Die Aufgabe der Erfindung ist es, eine Zusammensetzung zum Verabreichen eines therapeutischen Antikrebsmittels an Zellen mit Multi-Drug Resistance gemäß Anspruch 1 bereitzustellen.

[0017] Diese und andere Aufgaben und Merkmale der Erfindung werden beim Lesen der folgenden genauen Beschreibung der Erfindung zusammen mit den begleitenden Zeichnungen besser verstanden werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0018] Fig. 1 ist ein Schema der Synthesereaktion für die Herstellung eines Folsäure-PEG-DSPE-Konjugats, welches die Struktur des γ-Carboxy-verknüpften Konjugats zeigt.

[0019] Fig. 2 zeigt die Ergebnisse einer Studie zur kompetitiven Bindung, um die Bindung von radioaktiv markierter Folsäure in einer Konzentration von 0,1 μM an den zellulären Folatrezeptor bei Lungenkarzinomzellen der Maus mit einer hohen Dichte an Folatrezeptoren (M109R-HiFR) in Gegenwart der folgenden Kompetitoren zu bestimmen: freies Folat (offene Kreise), freies PEG_{2000} (geschlossene Quadrate) oder ein PEG-Folat-Konjugat (geschlossene Dreiecke) in verschiedenen Konzentrationen.

[0020] Die Fig. 3A bis Fig. 3F sind schematische Darstellungen der Liposomenzusammensetzungen, die zur Stützung der vorliegenden Erfindung hergestellt wurden.

[0021] Die Fig. 4A bis Fig. 4B zeigen eine Bindung von verschiedenen Folsäure tragenden Liposomen und Kontrollliposomen (kein Folsäureligand) an Lungenkarzinomzellen der Maus mit hoher (M109-HiFR) und niedriger (M109LoFR) Dichte des Folatrezepors (Fig. 4A) an menschliche epidermale Karzinomzellen mit hoher Dichte an Folatrezeptor (KB-HiFR) und niedriger Dichte an Folatrezeptor (KB-LoFR) (Fig. 4B).

[0022] Die Fig. 5A bis Fig. 5D sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von M109-HiFR-Zellen, die mit rhodaminmarkierten, Folat-zielgerichteten Liposomen (Fig. 5A bis Fig. 5B) und rhodaminmarkierten, Folat-zielgerichteten Liposomen mit zusätzlichen PEG-Ketten (Fig. 5C bis Fig. 5D) inkubiert wurden.

[0023] Die Fig. 6A bis Fig. 6B sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von M109-HiFR-Zellen, die mit Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}-Liposomen (HSPC/Chol/DSPE-PEG-Folat/DPPE-Rhodamin, 98,9:70:1,0:0,1) 30 Minuten (Fig. 6A) und 50 Minuten (Fig. 6B) inkubiert wurden.

[0024] Die Fig. 7A bis Fig. 7B sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von M109-HiFR-Zellen, die mit Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}-Liposomen und mit 2 mM freier Folsäure 4 Stunden (Fig. 7A) und 19 Stunden (Fig. 7B) inkubiert wurden.

[0025] Die Fig. 8A bis Fig. 8B sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von M109-HiFR-Zellen (Fig. 8A) und M019-Zellen, die mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (Fig. 8B) behandelt und mit Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}-Liposomen eine Stunde inkubiert wurden.

[0026] Die Fig. 9A bis Fig. 9F sind Aufnahmen von M109R-HiFR-Zellen (einer Sublinie von M109-Zellen, die wegen ihrer Multi-Drug Resistance ausgewählt wurde), die mit freiem Doxorubicin 7 Minuten (Fig. 9A) und 30 Minuten (Fig. 9B), mit Doxorubicin beladenen Folatzielgerichteten Liposomen 20 Minuten (Fig. 9C), 60 Minuten (Fig. 9D) und 90 Minuten (Fig. 9E) und mit nicht Folat-zielgerichteten Liposomen, die mit mPEG-DSPE beschichtet waren (kommerziell als DOXIL bekannt), 4 Stunden (Fig. 9F) inkubiert wurden.

[0027] Die Fig. 10A bis Fig. 10D sind Aufnahmen von M109R-HiFR-Zellen, die eine Stunde mit freiem Doxorubicin (Fig. 10A) oder mit Folat-zielgerichteten Liposomen, die Doxorubicin enthielten (Fig. 10B), und 24 Stunden in arzneimittelfreiem Medium nach einer Stunde Inkubation mit freiem Doxorubicin (Fig. 10C) oder mit Folat-zielgerichten Liposomen, die Doxorubicin enthielten (Fig. 10D), inkubiert wurden.

[0028] Die Fig. 11A bis Fig. 11B stellen die Ergebnisse eines Tests mittels Durchflusszytometrie bei M109R-HiFR-Zellen dar, die freiem Doxorubicin (Fig. 11A) und Folat-zielgerichteten Liposomen, die Doxorubicin trugen (Fig. 11B), in Gegenwart oder Abwesenheit von Verapamil, einem P-Glycoprotein-Blocker, ausgesetzt wurden.

[0029] Fig. 12 ist eine Darstellung, welche die Kinetik der Doxorubicin-Aufnahme durch M109R-HiFR-Zellen zeigt, die Doxorubicin, das in Folat-zielgerichteten Liposomen in einem Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid von 137,6 µg/µMol (geschlossene Kreise) und 11,3 µg/µMol(offene Kreise) ausgesetzt wurden.

[0030] Fig. 13 ist ein Balkendiagramm, welches die Akkumulation von Doxorubicin in M109R-HiFR-Zellen nach Einwirkung von freiem Doxorubicin und Doxorubicin, das in Folatzielgerichtete Liposomen eingeschlossen war, für eine Stunde oder 4 Stunden zeigt, wobei die Akkumulation für die Zellkerne und das Cytosol bestimmt wurde.

[0031] Die Fig. 14A bis Fig. 14B zeigen die Ergebnisse einer Cytotoxizitätsmessung bei M109-HiFR- (Fig. 14A) und M109-HiFR- (Fig. 14B) Zellen, wenn diese Doxorubicin in freier Form (geschlossene Kreise) oder in der in Folat-zielgerichtete Liposomen eingeschlossenen Form (geschlossene Dreiecke) oder in der in Liposomen eingeschlossenen nicht Folatzielgerichteten Form (geschlossene Quadrate) ausgesetzt wurden.

[0032] Fig. 15A zeigt den Zeitverlauf der mittleren Fußballendicke in mm nach Injektion von Tumorzellen in den Fußballen von Mäusen, wobei die Tumorzellen vor der Injektion in vitro mit freiem Doxorubicin (geschlossene Kreise), mit in Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin (offene Quadrate) oder mit Folsäure-zielgerichteten Liposomen (geschlossene Dreiecke) behandelt wurden. Die Kontrollmäuse erhielten unbehandelte Tumorzellen (offene Kreise).

[0033] Fig. 15B zeigt das mittlere Fußballentumorgewicht in g am Tag 34 der Testtiere von Fig. 15A, wobei das Fußballentumorgewicht als das Gewicht des Fußballens am Tag 34 minus das mittlere Fußballengewicht einer gesunden Maus genommen wurde.

[0034] Fig. 16 ist eine Darstellung, welche die Anzahl an tastbaren Tumoren nach subkutaner Injektion von unbehandelten (Kontrolle, offene Kreise) oder von in vitro behandelten Tumorzellen mit freiem Doxorubicin (geschlossene Kreise), in nicht zielgerichtete Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin (offene Quadrate) und in Folsäure-zielgerichtete Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin (geschlossene Dreiecke) zeigt.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0035] Die Erfindung ist unter einem Aspekt auf eine Zusammensetzung zur Verabreichung eines therapeutischen Mittels an eine Zelle mit Multi-Drug Resistance gerichtet. In der Praxis macht die Zusammensetzung die Verabreichung eines therapeutischen Mittels an eine Person verfügbar, die an Krebs leidet, und insbesondere an Krebs, bei dem P-Glycoprotein auf den Krebszelloberflächen exprimiert wird. Wie oben erwähnt, zeigen bestimmte Krebsarten, wie etwa Nierenkrebs oder Colonkrebs, eine primäre Resistenz im Gegensatz zu einer sekundären oder refraktären Resistenz gegenüber vielen chemotherapeutischen Mitteln. Die Zusammensetzung und das Verfahren der Erfindung machen eine Behandlung dieser Krebsarten verfügbar, ebenso wie jener Krebsarten, die refraktär sind, z. B. wie bei solchen Krebsarten, die eine Multi-Drug Resistance entwickeln, wobei der Krebs anfänglich auf ein therapeutisches Mittel oder eine Gruppe von Mittel reagiert, sich jedoch zu einem Zustand entwickelt, in dem er nicht länger auf das/die Mittel reagiert oder durch das/die Mittel erfolgreich behandelbar ist.

[0036] Unter einem Aspekt schließt die Erfindung eine Zusammensetzung ein, die aus einem Träger, einem Folat-zielgerichteten Liganden und dem zu verabreichenden Arzneimittel zusammengesetzt ist. Der Folatligand wird kovalent an den Träger angefügt, und das Arzneimittel wird mit dem Träger in Verbindung gebracht. „In Verbindung gebracht" bedeutet, dass die Arzneimittel kovalent oder elektrostatisch angefügt werden oder mit dem Träger eingeschlossen oder eingekapselt werden. Wie unten beschrieben werden wird, ist die Zusammensetzung wirksam, um eine Akkumulation des Arzneimittels in Zellen mit einer Multi-Drug Resistance zu erreichen, d. h. Zellen, welche das P-Glycoprotein exprimieren, das als eine Abflusspumpe wirkt, um eine Akkumulation von Arzneimittel in der Zelle in einer Menge, die ausreicht, um für die Zelle zytotoxisch zu sein, zu verhindern. „Zytotoxisch" bedeutet, dass die Menge an Arzneimittel, das in der Zelle akkumuliert, ausreichend ist, um ein normales Funktionieren der Zelle zu verhindern und vorzugsweise, um den Zelltod zu verursachen.

[0037] An den Träger ist entweder an einem Ende oder entlang dem Träger selbst oder an der Oberfläche einer Mikrosphäre, die aus dem Träger hergestellt wurde, ein Folatligand angefügt, der unten beschrieben werden wird. Das zu verabreichende Arzneimittel ist auch an den Träger angefügt oder auf irgendeine Weise mit dem Träger verbunden, so dass es sich mit dem Träger und dem Folat-zielgerichteten Liganden bewegt. Wie unten beschrieben werden wird, bindet das Folat wirksam das Konjugat an eine Zelle mit einer Multi-Drug Resistance zur Abgabe und Akkumulation des Arzneimittels in die Zelle.

[0038] Der Träger ist ein Liposom. Bei Studien, die zur Stützung der Erfindung durchgeführt wurden, wurden Folat-zielgerichtete Liposomen hergestellt und das allgemeine Konzept wurde unter Verwendung der Trägerliposomen gezeigt. Es wird allerdings erkannt werden, dass die nützliche Lehre der Liposomenstudien auf eine Reihe von Träger anwendbar ist, wie aus den unter beschriebenen Studien offensichtlich werden wird.

I. Herstellung von Folatrezeptor-zielgerichteten Liposomen

A. Synthese und Charakterisierung von mPEG-Folsäure und Folsäure-PEG-DSPE

[0039] Konjugate, die aus Folat, Polyethylenglycol (PEG) und Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE) (Folsäure-PEG-DSPE) zusammengestzt waren, wurden wie in Fig. 1 gezeigt über eine Dicyclohexylcarbodiimidvermittelte Kopplung von Folsäure an H_2N-PEG-DSPE hergestellt. Wie in Beispiel 1A beschrieben, wurden die Ausgangs-Amino-PEG-Lipide aus PEG mit Molekulargewichten von 2000 Da und 3350 Da gemäß früher beschriebener Verfahren (Zalipsky, S. et al., FEBS Lett. 353: 71–74 (1994)) synthetisiert. Konjugate aus Folsäure und Methoxy-PEG, z. B. Konjugate ohne die Phospholipidgruppe, wurden unter Verwendung desselben Kopplungsverfahrens hergestellt. Die Strukturen der gereinigten Konjugate wurden durch ^{1}H-NMR, MALDI-TOFMS und UV-Spektroskopie bestätigt, wie in den Beispielen 1B bis 1C dargestellt. Carbodiimid-aktivierte Folsäure kann mit H_2N-PEG-DSPE entweder über α- oder γ-Carboxygruppen seines Glutamatrests gekoppelt werden. Das γ-Konjugat bindet an den Folatrezeptor, während das α-Konjugat nicht bindet, deshalb wurden

die relativen Mengen jedes Konjugats durch ein Verfahren unter Verwendung von Carboxypeptidase G (CPG) bestimmt. Wie in Beispiel 1E beschrieben, wurde ein Verfahren unter Verwendung von Carboxypeptidase G (CPG) verwendet, da bekannt ist, dass α-Konjugate gegenüber dem Enzym inert sind, während die γ-Konjugate einer Pteroat-Glutamat-Spaltung mit nennenswerter Geschwindigkeit unterliegen (Wang, S. et al., Bioconjugate Chem., 7: 56–62 (1996); Fan, J. et al., Biochemistry, 30: 4573–4580 (1991): Levy C. und Goldman P., Biol. Chem., 242:2933–2938 (1967)). Die Enzymspaltung wurde durch Verschwinden des Konjugatpeaks durch HPLC verfolgt. Diese Reaktion lief bis zu einem Umsatz von 80% trotz verlängerter Inkubationszeiten und mehrfacher Zugaben des Enzyms ab, was zeigt, dass Folsäure-PEG-DSPE zu 80% γ-Carboxyl-verknüpfte Konjugate enthielt und die restlichen 20% α-verknüpfte Konjugate waren. Derselbe Ansatz wurde verwendet, um zu bestimmen, dass 90% mPEG-Folsäure über die γ-Carboxygruppe verknüpft waren.

[0040] Die Konjugate wurden durch Bindungsstudien charakterisiert, wie sie jetzt beschrieben werden sollen. Wie in Beispiel 2 dargestellt, wurden drei der verwendeten Zelllinien, die Lungenkarzinom-Zelllinie der Maus (M109), eine Sublinie von M109 mit Multi-Drug Resistance (M109R) und eine menschliche Nasen-Rachen-Epidermiskarzinom-Zelllinie (KB) veranlasst, ihre Folsäurerezeptoren durch aufeinanderfolgende Passagen in folsäuredepletiertem Medium (3 nM Folsäure) aufzuregulieren. Dies führte bei drei Zellsublinien, die als „Hochfolatrezeptor" (high folat receptor, HiFR) bezeichnet wurden, zu einem 20 bis 80fachem Anstieg der Fähigkeit zur Folsäurebindung gegenüber den elterlichen Zelllinien, die hier als „Niedrigfolatrezeptor" (low folate receptor, LoFR) bezeichnet werden.

[0041] Diese Zelllinien und ihre Fähigkeit, Folsäure zu binden, wurden bestimmt, wie in Beispiel 2B dargestellt, indem die Zellen 30 Minuten mit Folsäure bei 37°C inkubiert wurden. Zwei der Zelllinien, die M109-LoFR- und KB-LoFR-Zellen, wurden auch auf eine Folsäurebindung nach 24 Stunden Inkubation in folsäuredepletiertem Medium untersucht. Es wurde auch die Folsäurebindung an normale menschliche Fibroblasten bei früher Passage und an einer menschlichen Melanom-Linie A375 bestimmt, um ein Spektrum verschiedener Zelllinien mit einem breiten Bereich von Niveaus einer Rezeptorexpression zu erhalten.

[0042] Die Ergebnisse werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Zelllinie	Abkürzung der Zelllinie	Folsäurebindung[a] femtomol/10^4 Zellen
Lungenkarzinom der Maus Niedrig-Folatrezeptor	M109-LoFR	20 ± 6
Lungenkarzinom der Maus Niedrig-Folatrezeptor	M109-LoFR[b]	25 ± 13
Multi-Drug-resistentes Lungenkarzinom der Maus Niedrig-Folatrezeptor	M109R-LoFR	27 ± 10
Lungenkarzinom der Maus Hoch-Folatrezeptor	M109R-HiFR	678 ± 255
Multi-Drug-resitenter Hochfolatrezeptor	M109R-HiFR	2179 ± 430
Nasen-Rachen-Epidermiskarzinom Niedrigfolatrezeptor	KB-LoFR[b]	6725 ± 323
Nasen-Rachen-Epidermiskarzinom Hochfolatrezeptor	KB-HiFR	9730 ± 79
Menschliche Melanom-Linie A375	A375	168 ± 33
Normale menschliche Fibroblasten	NHF	45 ± 3

[a] Inkubationszeit, 30 Minuten, bei 37°C
[b] nach Kultivierung in Folsäure-depletiertem Medium für 24 Stunden.

[0043] Als die Linie mit der niedrigsten (M109-LoFR) und der höchsten (KB-HiFR) Menge an Rezeptoren ver-

glichen wurden, wurden Unterschiede in der Fähigkeit zur Folsäurebindung um bis zu 485fach beobachtet. Wie Tabelle 1 ebenfalls für die Zelllinien, die 24 Stunden in folsäuredepletiertem Medium inkubiert wurden, zu entnehmen ist, regulierte M109-LoFR das Ausmaß der Folsäurebindung nicht auf. Im Gegensatz dazu zeigte KB-LoFR einen 15fachen Anstieg der Folsäurebindung, was eine rasche Aufregulierung der Rezeptorexpression zeigt.

[0044] In weiteren Studien, um die Bindung von Folsäure mit der den Folatrezeptor überexprimierenden Zelllinie M109-HiFR zu charakterisieren, wurden die folgenden Beobachtungen gemacht:

i) Die Bindung ist direkt proportional zur Zellzahl im Bereich von 10^3 bis $1{,}5 \times 10^6$ Zellen pro Platte.

ii) Monolayer-Kulturen von M109R-HiFR-Zellen, die mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) behandelt wurden (siehe Beispiel 2B) verlieren 99% ihrer Folsäurerezeptoren, wie durch einen Bindungstest mit Folsäure gezeigt, was zeigt, dass der überexprimierte Folatrezeptor an die Zellmembran durch einen Glycophospholipidanker gebunden ist. Im Gegensatz dazu beschädigte eine Behandlung mit Trypsin den Folatrezeptor nicht, wie dadurch gezeigt, dass (a) radioaktiv markierte Folsäure in ähnlichem Ausmaß an ausplattierte Zellen und an Suspensionszellen nach Trypsinisierung bindet und (b) zellgebundene radioaktiv markierte Folsäure nach Trypsinisierung fast vollständig (91 ± 11%) wiedergewonnen wird.

iii) Nach einem Waschschritt mit Säure (pH 3) bleiben nur 2 ± 1% Folsäure an M109R-HiFR-Zellmonolayer gebunden, was zeigt, dass die Bindung von Folsäure an die überexprimierten Rezeptoren pH-empfindlich ist. Um eine Internalisierung zu verhindern, fand der Folsäurebindungstest 30 Minuten bei ~1°C statt. Wenn M109-HiFR-Zellen 4 Stunden bei 37°C mit radioaktiv markierter Folsäure inkubiert werden und dann einem Waschschritt mit Säure unterzogen werden, bleiben 30 bis 40% des Liganden durch Zellen gebunden. Dies ist höchstwahrscheinlich die Fraktion des Folsäureliganden, der durch Zellen internalisiert wird, wodurch die pH-induzierte Dissoziation von dem Rezeptor vermieden wird.

[0045] Wie in Beispiel 2B beschrieben, wurde eine Studie zur Bindungskompetition mit Folsäure, mPEG-Folsäure und freiem PEG durchgeführt. Bei dieser Studie wurden M109R-HiFR-Zellen einer konstanten Menge an radioaktiv markierter Folsäure in einer Konzentration von 0,1 µM ausgesetzt. „Kalte" Folsäure, mPEG-Folsäure und freies PEG wurden den M109R-HiFR-Zellen in Konzentrationen zugesetzt, die von 0,1 bis 100 µM variierten. Das PEG_{2000} und das $mPEG_{2000}$-Folsäure-Konjugat waren frei wasserlösliche, nicht lipidgebundene Verbindungen. Letzteres Derivat kann als eine monovalente Version des Folsäure-PEG_{2000}-Liposoms betrachtet werden, wie unten diskutiert werden wird.

[0046] Die Ergebnisse des Tests zur Bindungskompetition werden in **Fig. 2** als prozentualer Anteil der Bindung gegen die Konzentration in µM jedes Kompetitors, freier Folsäure (offene Kreise), PEG-Folsäure (geschlossene Dreiecke) und PEG (geschlossene Quadrate), gezeigt. Wie zu sehen ist, war mPEG-Folsäure in Bezug auf eine Kompetition mit radioaktiver Folsäure um die Bindung an die Folatrezeptoren weniger wirksam als freie Folsäure, was nahelegt, dass die Anfügung von PEG an das Vitaminmolekül die Fähigkeit von Folsäure, an den Rezeptor zu binden, um das 5- bis 10fache vermindert. Freies PEG zeigte keine Zellbindung, was zeigt, dass keine Kompetition um die Folsäurebindung auftritt.

B. Liposomenherstellung

[0047] Es wurden sechs Liposomenformulierungen nach den in Beispiel 3 dargestellten Verfahren hergestellt. Die sechs Liposomenzusammensetzungen werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Verbindungen	Molares Verhältnis der Bestandteile	Abkürzung
HSPC:Chol:Folsäure-PEG_{2000}-DSPE	99,5:70:0,5	Folsäure-PEG_{2000}
HSPC:Chol:Folsäure-PEG_{3350}-DSPE	99,5:70:0,5	Folsäure-PEG_{3350}
HSPC:Chol:$mPEG_{2000}$-DSPE	99,5:70:0,5	Niedrig-$mPEG_{2000}$
HSPC:Chol:Folsäure-PEG_{2000}-DSPE:mPEG-DSPE	92,5:70:0,5:7	Folsäure-PEG_{2000}/mPEG
HSPC:Chol:Folsäure-PEG_{3350}-DSPE:mPEG-DSPE	92,5:70:0,5:7	Folsäure-PEG_{3350}/mPEG
HSPC:Chol:$mPEG_{2000}$-DSPE	92,5:70:7,5	Hoch-$mPEG_{2000}$

[0048] Wie Tabelle 2 entnommen werden kann, enthielten alle Formulierungen HSPC, Chol und DSPE, folglich werden sie hier nach dem Folsäure-PEG/m-PEG-Gehalt bezeichnet, wie in der rechten Spalte der Tabelle vermerkt. Die Fig. 3A bis Fig. 3F veranschaulichen schematisch die liposomalen Formulierungen. Es wurden vier Folat-zielgerichtete Liposomenformulierungen hergestellt (Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3E, Fig. 3F); zwei Formulierungen enthielten ein Folsäure-PEG-Konjugat, das mit PEG mit einem Molekulargewicht von entweder 2000 Da (Fig. 3B, Folsäure-PEG_{2000}) oder 3350 Da (Fig. 3C, Folsäure-PEG3350) hergestellt wurde, und zwei Formulierungen, die das Folsäure-PEG-Konjugat zusätzlich zu einem mPEG-DSPE-Konjugat enthielten, das mit mPEG mit einem Molekulargewicht von 2000 Da (Fig. 3E, Folsäure-PEG_{2000}/mPEG und Fig. 3F, Folsäure-PEG_{3350}/mPEG) hergestellt wurde. Bei allen vier Formulierungen war das Folsäure-PEG-Konjugat, das sich von PEG mit einem Molekulargewicht von 2000 oder 3350 Da ableitete, in einer molaren Fraktion von 0,5% des Gesamtgehalts an liposomalem Phospholipid enthalten. Die beiden Kontrollformulierungen enthielten kein Folat (Fig. 3A und Fig. 3D) und unterschieden sich in der Molfraktion des enthaltenden $mPEG_{2000}$ DSPE (0,5% bzw. 7,5%).

[0049] Bei den Studien zur Stützung der Erfindung, wie unten diskutiert, wurde festgestellt, dass die Kontrollliposomenformulierung, d. h. die nicht zielgerichteten Hoch-mPEG- und Niedrig-mPEG-Formulierungen, sich in vitro ähnlich verhalten, weshalb die Daten nur für die Hoch-mPEG-Liposomen dargestellt werden.

C. In vitro-Bindungsstudien

[0050] Die Bindung von radioaktiv markierten Folsäure-zielgerichteten Liposomen und der Kontrolle, nicht zielgerichteten Liposomen, wurde an Monolager-Kulturen oder Zelllinien mit Multi-Drug Resistance mit sowohl hohen als auch niedrigen Folatrezeptor-Spiegeln, M109R-HiFR- und M109R-LoFR-Zellen, 24 Stunden bei 37°C untersucht, wie in Beispiel 2B beschrieben. Die Ergebnisse werden in Fig. 4A gezeigt, wo die Menge an Liposomen, die an durch Trypsin freigesetzte Zellen gebunden ist, ausgedrückt in picoMol Phospholipid pro Million Zellen, für jede der Liposomenformulierungen gezeigt wird. Wie der Figur zu entnehmen ist, war die Bindung der nicht zielgerichteten, herkömmlichen mPEG-Liposomen an die Zellen mit Multi-Drug Resistance sehr niedrig für sowohl hohe als auch niedrige Folsäurerezeptorspiegel. Die zielgerichtete Formulierung mit der höchsten Bindungseffizienz waren die Liposomen mit dem Folsäure-PEG_{3350}-Konjugat, das einen 26fachen Anstieg der Bindung gegenüber den nicht zielgerichteten Liposomen erzielte. Dementsprechend enthält die Zusammensetzung bei einer Ausführung der Erfindung einen liposomalen Träger mit PEG-Polymerketten mit einem Molekulargewicht von mindestens 3500 Da mit einem bevorzugten Bereich zwischen 2500 und 10000 Da und einem stärker bevorzugten Bereich zwischen 3500 bis 10000 Da. In der Ausführung ist die Zusammensetzung wirksam, um mindestens einen 10fachen, stärker bevorzugt einen 20fachen und am stärksten bevorzugt einen 25fachen Anstieg der Bindung im Vergleich zu einer Zusammensetzung mit PEG-Ketten mit einem Molekulargewicht von weniger als ungefähr 2500 Da, und insbesondere einem Molekulargewicht von 2000 Da, zu erzielen.

[0051] Mit fortgesetzter Bezugnahme auf Fig. 4A verminderte eine Zugabe von mPEG zu der Formulierung oder ein Verkürzen des PEG von 3350 auf 2000 die Bindung wesentlich. Die Bindung war bei M109R-HiFR-Zellen größer als bei M109R-LoFR-Zellen bei allen Liposomenformulierungen. Interessanterweise zeigte die Liposomenformulierungen mit der höchsten Affinität, z. B. Liposomen mit Folsäure-PEG-3350,

den geringsten relativen Anstieg der Bindung (~30%), wenn die LoFR- und HiFR-Zellen verglichen wurden.

[0052] Fig. 4B ist eine ähnliche Darstellung wie Fig. 4A, außer dass die Studie mit der KB-Zelllinie durchgeführt wurde. Wie den Figuren zu entnehmen ist, verminderte die Zugabe von mPEG zu den Liposomen die Bindungseffizienz. In Abwesenheit von mPEG steigerte ein längerer PEG-Spacer (3350 Da) die Effizienz der Bindung an KB-Zellen nur wenig. Die Unterschiede zwischen KB-HiFR und KB-LoFR waren für einige der Liposomenzusammensetzungen kleiner, als bei den M109R-Zellen beobachtet wurde. Dies kann mit der schnellen Aufregulation von Folatrezeptoren in KB-Zellen während der 24stündigen Inkubationszeit zusammenhängen, wie oben unter Bezugnahme auf Tabelle 1 diskutiert.

[0053] Um zu untersuchen, ob die zellassoziierten Liposomen an die Zelloberfläche gebunden oder durch die Zellen internalisiert waren, wurde ein Säurewaschschritt mit Salzlösung, pH 3, am Ende des Bindungstests durchgeführt. Die Ergebnisse, die in der letzten Spalte von Tabelle 3 gezeigt werden, zeigen, dass ungefähr 22% der Folsäure-PEG_{3350}- und 32% der Folsäure-PEG_{3350}/mPEG-Liposomen durch den Säurewaschschritt entfernt wurden, was zeigt, dass mehr als zwei Drittel der zellassoziierten Liposomen durch M109R-Hi-FR-Zellen internalisiert worden sind. Ebenfalls in Tabelle 3 gezeigt werden Kompetitionsstudien mit 1 mM Folsäure (~700facher Überschuss gegenüber der Konzentration an liposomgebundener Folsäure), die der Liposomen/-Zell-Mischung entweder zu Beginn oder am Ende der Inkubation der Liposomen mit den Zellen zugesetzt wurden. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, hemmt Folsäure, die zu Beginn der Inkubation der zielgerichteten FA-PEG_{3350}-Liposomen mit den M109R-HiFR-Zellen zugesetzt wurde, die Liposomenbindung nur teilweise (46%). Die Zugabe der Folsäure am Ende der 24stündigen Inkubation von Liposomen und Zellen führte zu keiner wesentlichen Verdrängung der Folsäure tragenden Liposomen aus den Zellen trotz der Tatsache, dass, entsprechend der Säurewaschexperimente, ungefähr 20–30% der Liposomen noch an die Zelloberfläche gebunden waren. Diese Studien zeigen die größere Bindungsavidität von Folsäure-PEG-Liposomen gegenüber freier Folsäure zu dem zellulären Folatrezeptor, der im Gegensatz dazu 5 bis 10% weniger wirksam das monovalente Analogon, mPEG-Folsäure, bindet (Tabelle 1). Die stärkere Bindung von Folsäure-zielgerichteten Liposomen bezieht sich auf die multivalente Darstellung von Folsäureresten auf der liposomalen Oberfläche.

Tabelle 3

Zusätzliche Behandlung	1 mM Folsäure zum Zeitpunkt 0 (A)		1 mM Folsäure zum Zeitpunkt 24 h (B)		Waschen mit Säure nach 24 Stunden (C)	
Liposomenzusammensetzung	Folsäure-PEG	Folsäure-PEG/mPEG	Folsäure-PEG	Folsäure-PEG/mPEG	Folsäure-PEG	Folsäure-PEG/mPEG
Hemmung(%)	46 ± 8	86 ± 6	2 ± 3	8 ± 4	22 ± 2	32 ± 5

(a) M109R-HiFR-Zellen wurden 24 Stunden mit 3 nMol/ml FA-PEG3350- oder FA-PEG3350/mPEG-beschichteten Liposomen in Gegenwart oder Abwesenheit von freier Folsäure inkubiert,
(b) oder Folsäure wurde nach 24 Stunden Inkubation mit Liposomen für zwei Stunden zugesetzt,
(c) oder die Zellen wurden mit saurer Salzlösung (pH 3) gewaschen.

[0054] Wie oben angemerkt, legen diese Studien nahe, dass Liposomenformulierungen, die mPEG-DSPE zusätzlich zu den PEG-Ketten mit dem angefügten Folatliganden enthalten, z. B. die Folsäure-PEG_{2000}-mPEG- und Folsäure-PEG_{3350}/mPEG-Formulierungen, mit der Bindung an die Zielzellen interferieren. Diese Überlegung wurde weiter untersucht, indem Zellen rhodaminmarkierten Liposomen, hergestellt wie in Beispiel 4 beschrieben, ausgesetzt und die Zellen durch konfokale Mikroskopie betrachtet wurden. Es wurden M109-HiFR-Zellen mit Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}-Liposomen (HSPC/Chol/DSPE-PEG-Folat/DPPE-Rhodamin, 98,9:70:1,0:0,1) oder mit Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}/$mPEG_{2000}$-Liposomen (HSPC/Chol/mPEG-DSPE/DSPE-PEG-Folat/DPPE-Rhodamin, 91,9:70,7:1,0:0,1) 7 Stunden inkubiert und durch konfokale Mikroskopie untersucht. Die Ergebnisse werden in den Fig. 5A bis Fig. 5B und den Fig. 5C bis Fig. 5D für die Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}-Liposomen bzw. die Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}/$mPEG_{2000}$-Liposomen gezeigt. Wie den Fig. 5A bis Fig. 5B zu entnehmen ist, ist das Cytoplasma von M109-HiFR-Zellen, die Folat-zielgerichteten Liposomen ohne zusätzliche PEG-Ketten ausgesetzt wurden, mit rhodaminmarkierten Liposomen beladen. Im Gegensatz dazu, wie den Fig. 5C bis Fig. 5D zu entnehmen ist, weisen Liposomen mit dem zusätzlichen mPEG eine geringe Bindung an die Zellen auf, wie durch das schwache Signal von mit der Zelloberfläche assoziiertem Rhodamin und der Unfähigkeit der Liposomen, durch die Zellen internalisiert zu werden, bewiesen wurden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Folatligand in der Lage ist, eine Bindung und Internalisierung von Folatzielgerichteten Liposomen an Zellen mit überexprimierten Folatrezeptoren zu vermitteln, und dass die

zusätzlichen PEG-Ketten mit diesen Vorgängen zu interferieren scheinen.

[0055] Bei einer weiteren Studie, die zur Stützung der Erfindung durchgeführt wurde, wurden M109-HiFR-Zellen mit Rhodamin-Folsäure-PEG_{2000}-Liposomen (HSPC/Chol/DSPE-PEG-Folat/DPPE-Rhodamin, 98,9:70:1,0:0,1) in folatfreiem Medium inkubiert. Nach 30 Minuten und nach 50 Minuten Inkubation wurden die Zellen durch konfokale Mikroskopie sichtbar gemacht, und die Aufnahmen werden in den Fig. 6A bis Fig. 6B gezeigt. Wie Fig. 6A zu entnehmen ist, sind 30 Minuten nach der Inkubation die Folat-zielgerichteten Liposomen mit den M109-HiFR-Zellen assoziiert, und nach 50 Minuten, wie Fig. 6B zu entnehmen ist, sind einige Liposomen internalisiert und akkumulieren im Cytosol der Zelle. In derselben Studie wurden einige Zellen auch freier Folsäure in einer Konzentration von 2 mM ausgesetzt, was ungefähr einem 1000fachen der Konzentration des liposomengebundenen Folats entspricht. Diese Studie zur kompetitiven Bindung wurde durchgeführt, um eine Interaktion zwischen dem Folatliganden und dem Folatrezeptor zu bestätigen. Nach 30 Minuten und 50 Minuten Inkubation wurden die Zellen sichtbar gemacht, und es wurde keine Bindung von Liposomen beobachtet (**Fig.** 6), was nahelegt, dass das freie Folat in der Lage war, die Bindung der Folat-zielgerichteten Liposomen an den zellulären Folatrezeptor kompetitiv zu blockieren. Nach längeren Einwirkungszeiten von 4 Stunden und 19 Stunden war die Bindung von Folatzielgerichteten Liposomen an die M109-HiFR-Zellen durch das freie, lösliche Folat nicht länger blockiert und das Cytoplasma der Zelle war durch Rhodamin-Fluoreszenz gefärbt, wie den Fig. 7A bis Fig. 7B zu entnehmen ist.

[0056] Ohne an irgendeine besondere Theorie gebunden zu sein, können die Ergebnisse der Studie zur Bindungskompetition auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass im Hinblick auf die Multivalenz der Liposomen die Bindungsaffinität zu liposomalem Folat höher ist als zu freiem Folat. Allerdings wird bei den Folatliposomen nach einer längeren Zeitdauer ein Gleichgewicht erreicht, insbesondere im Hinblick auf den großen Überschuss (1000fach) an freiem Folat und die größere Mobilität von kleinen Molekülen im Vergleich zu Nanopartikeln (Liposomen).

[0057] Ein weiterer Beleg für die Beziehung zwischen Folatrezeptor und den Folat-zielgerichteten Liposomen bei M109-HiFR-Zellen wird durch die Studien bereit gestellt, die mit Zellen durchgeführt wurden, die mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) behandelt wurden (Beispiel 2B), um den Folatrezeptor zu zerstören. Eine Einwirkung von mit PI-PLC vorbehandelten M109-HiFR-Zellen durch rhodaminmarkierte, Folat-zielgerichtete Liposomen für eine Stunde bei 4°C führte zu keiner nachweisbaren Bindung, wie der Aufnahme von Fig. 8A zu entnehmen ist. Dieselben Liposomen allerdings wurden durch Zellen, die nicht mit PI-PLC behandelt wurden, gebunden, wie der Aufnahme von Fig. 8B zu entnehmen ist. Bei 4°C tritt eine Bindung an den Rezeptor auf, es tritt jedoch keine Internalisierung und Rezyklisierung des Rezeptors an die Zelloberfläche auf (Kamen B. A und Capdevila A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5983–5987 (1986)). Die mangelnde Fähigkeit der Folat-zielgerichteten Liposomen, mit den enzymbehandelten M109-HiFR-Zellen zu assoziieren, stellt einen Beleg bereit, dass der Glycophospholipid-verankerte Folatrezeptor an der Assoziation von Liposomen und Zellen beteilig ist.

1. In vitro-Bindungsstudien unter Verwendung von mit Doxorubicin beladenen Liposomen

[0058] Wie in Beispiel 5 beschrieben, wurden Folat-zielgerichtete Liposomen, die Doxorubicin enthielten, hergestellt und mit M109R-HiFR-Zellen inkubiert. Zum Vergleich wurden auch M109R-HiFR-Zellen mit freiem Doxorubicin oder mit Liposomen, die Doxorubicin, nicht jedoch den Folat-zielgerichteten Liganden enthielten, inkubiert. Die Bewegung des Doxorubicin-Moleküls wurde unter Verwendung von Fluoreszenz nachverfolgt, und die Ergebnisse werden in den Fig. 9A bis Fig. 9F gezeigt.

[0059] Die Fig. 9A bis Fig. 9B sind Aufnahmen von Zellen, die freiem Doxorubicin 7 Minuten (Fig. 9A) und 30 Minuten (Fig. 9B) ausgesetzt wurden. Der Einstrom vom freiem Doxorubicin durch die Zellmembran war sehr schnell, wie durch die helle zytoplasmatische Färbung in Fig. 9A gezeigt wird. Wie Fig. 9B entnommen werden kann, war das freie Arzneimittel bereits innerhalb von 30 Minuten im Kern lokalisiert.

[0060] Die Kinetiken der Interaktion von Zellen mit Doxorubicin-beladenen, Folat-zielgerichteten Liposomen unterschied sich erheblich von denen mit freiem Doxorubicin. Wie den Fig. 9C bis Fig. 9E zu entnehmen ist, wurde eine Anheftung von Liposomen an die Zellmembran innerhalb von ungefähr 20 Minuten beobachtet (Fig. 9C). Bis zu 60 Minuten hat eine Internalisierung stattgefunden und liposomales Doxorubicin wurde in dem Cytosol gefunden und in einigen Zellen begann das Arzneimittel, im Kern zu erscheinen (Fig. 9D). Nach 90 Minuten hatte das aus Folat-zielgerichteten Liposomen abgegebene Doxorubicin den Kern in den meisten Zellen erreicht, während die auf das Arzneimittel zurückzuführende cytoplasmatische Fluoreszenz verschwunden war (Fig. 9E). Im Gegensatz zu Folat-zielgerichteten Liposomen zeigte eine Formulierung von nicht zielgerich-

teten Liposomen, die mit mPEG-DSPE (kommerziell bekannt als DOXIL) beschichtet waren, selbst nach 4 Stunden Inkubation keine Assoziation mit den M109R-HiFR-Zellen, wie Fig. 9F zu entnehmen ist. Diese Studie wurde mit frischen und fixierten Zellen mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

[0061] In einer weiteren Studie wurde die Fähigkeit von M109R-HiFR-Zellen untersucht, Doxorubicin nach einer Stunde Behandlung mit entweder freiem Doxorubicin oder mit Doxorubicinbeladenen, Folat-zielgerichteten Liposomen, gefolgt durch 24 Stunden Inkubation in arzneimittelfreiem Medium, festzuhalten, untersucht. Wie den Fig. 10A bis Fig. 10D zu entnehmen ist, sind die Zellkerne durch Doxorubicin-Fluoreszenz nach einer Stunde Inkubation mit sowohl dem freien Arzneimittel (Fig. 10A) als auch durch das in Liposomen eingeschlossene Arzneimittel (Fig. 10B) gefärbt. Allerdings war die Fluoreszenz in den mit dem freien Arzneimittel behandelten Zellen nach 24 Stunden fast vollständig verschwunden, wie Fig. 10C zu entnehmen ist. Die Fluoreszenz in den mit Liposomen behandelten Zellen ist immer noch eindeutig nachweisbar, wie Fig. 10B zu entnehmen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass das liposomale Arzneimittel in den arzneimittelresistenten Zellen besser zurückgehalten wird als freies Arzneimittel.

2. Weiterer Beleg für die Arzneimittelakkumulation in MDR-Zellen

[0062] Wie in Beispiel 6 beschrieben, wurden Studien durchgeführt, um zu zeigen, dass die intrazelluläre Abgabe von Doxorubicin durch den Folatrezeptorweg in Form von Folatzielgerichteten, Doxorubicin tragenden Liposomen, die P-170-Glycoprotein-Abflusspumpe überwindet. In einer Studie wurde die Aktivität der P-170-Glycoproteinpumpe in M109R-HiFR-Zellen durch Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Rhodaminabfluss-Tests untersucht, und es wurde festgestellt, dass sie gegenüber einer Blockierung durch Verapamil empfindlich ist (Ergebnisse nicht gezeigt). Unter Verwendung dieser Technik wurde der Abfluss von Doxorubicin, das intrazellulär in freier Form und in in Folat-zielgerichtete Liposomen eingeschlossener Form abgegeben wurde, untersucht. Monolagers von M109R-HiFR-Zellen wurden Doxorubicin in freier Form oder in in Liposomen eingeschlossener Form eine Stunde in Gegenwart von Verapamil ausgesetzt. Die Zellen wurden gespült und erneut in 10 µMol Verapamil 2 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann auf den zellulären Doxorubicin-Gehalt unter Verwendung von Fluoreszenz und durch Durchflusszytometrie analysiert.

[0063] Die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie werden in den Fig. 11A bis Fig. 11B für die mit freiem Doxorubicin (Fig. 11A) und mit in Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin (Fig. 11B) gezeigt. Wie Fig. 11A zu entnehmen ist, zeigt die Kurvenverschiebung einen klaren Anstieg der Fluoreszenz bei M109R-HiFR-Zellen nach Einwirkung von freiem Doxorubicin in Gegenwart von Verapamil. Im Gegensatz dazu scheint das Ausmaß der zellulären Fluoreszenz in M109R-HiFR-Zellen nach Einwirkung des Folat-zielgerichteten liposomalen Arzneimittels in Gegenwart oder Abwesenheit von Verapamil unverändert (Fig. 11B). Diese Beobachtungen wurden durch quantitative Fluorometrie von Doxorubicin aus Zellextrakten bestätigt, wie in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4

Einwirkzeit (Minuten)	Intrazellulärer Doxorubizin-Gehalt ng/1,5 × 10^6 Zellen			
	freies Doxorubicin	freies Doxorubicin + Verapamil	zielgerichtetes liposomales Doxorubicin	zielgerichtetes liposomales Doxorubicin + Verapamil
30	24	89,8	155,7	151,5
60	42,5	166,5	198,5	192,2

[0064] Wie der Tabelle zu entnehmen ist, hat die Anwesenheit von Verapamil keine Wirkung auf die Menge an Arzneimittel, das in den arzneimittelresistenten Zellen akkumuliert, wenn es über Folat-zielgerichtete Liposomen abgegeben wird. Im Gegensatz dazu war die Zurückhaltung von in freier Form verabreichtem Doxorubicin in der Zelle ~4,5fach höher in Gegenwart von Verapamil. Die Zurückhaltung des Arzneimittels ist ungefähr 4 bis 6fach höher, wenn es durch Folat-zielgerichtete Liposomen verabreicht wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass freies Doxorubicin, das in die Zellen diffundiert, durch die Wirkung der P-170-Glycoproteinpumpe nach außen gepumpt wird, während der Eintritt von Doxorubicin über den Folatrezeptorweg die P-Glycoprotein-Abflussmaschinerie umgeht.

[0065] In einer zusätzlichen Studie, um die Verstärkung der Arzneimitttelabgabe an Zellen über Folat-zielge-

richtete Liposomen zu bestätigen, wurden arzneimittelresistente (M109R) Zellen und arzneimittelempfindliche (M109) Zellen 0,2 × 10^{-5} bzw. 0,5 × 10^{-6} M Doxorubicin ausgesetzt. Das Doxorubicin wurde den Zellen in freier Form und eingeschlossen in Folatzielgerichteten Liposomen verabreicht. Das zellassoziierte Arzneimittel wurde eine Stunde und 4 Stunden nach Einwirkung von Doxorubicin gemessen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5

Prozentualer Anteil an Doxorubicin in Zellen nach Verabreichung und Menge an Doxorubicin in Zellen

Einwirkzeit (Stunden)	Prozentualer Anteil an verabreichtem Doxorubicin, das in Zellen verbleibt[1] und intrazelluläres Doxorubicin (ng/1,5 × 10^6 Zellen)[2]			
	arzneimittelresistente Zellen		arzneimittelempfindliche Zellen	
	freies Doxorubicin	zielgerichtetes liposomales Doxorubicin	freies Doxorubicin	zielgerichtetes liposomales Doxorubicin
1	5,5 (159)	13,2 (385)	8,6 (25)	12,7 (37)
4	4,2 (122)	20,5 (595)	12,4 (36,1)	22 (64)

[1] fettgedruckte Werte stellen den prozentualen Anteil an verabreichtem Doxorubicin dar, das in der Zelle verbleibt
[2] Werte in Klammern werden in ng Doxorubicin in den Zellen angegeben

[0066] Die Werte in Tabelle 5 zeigen, dass arzneimittelresistente Zellen, die freiem Doxorubicin augesetzt werden, das Arzneimittel nach außen pumpen, selbst in Gegenwart eines Überschusses an Arzneimittel in dem extrazellulären Medium, in dem das Arzneimittel enthalten ist. Im Gegensatz dazu akkumuliert in arzneimittelresistenten Zellen, die Doxorubicin in Form von Folat-zielgerichteten Liposomen ausgesetzt werden, Doxorubicin in den Zellen. Wie erwartet, sind die arzneimittelempfindlichen Zellen in der Lage, Doxorubicin sowohl in freier Form als auch in der in Liposomen eingeschlossenen Form zu akkumulieren. Diese Werte zeigen, dass eine Arzneimittelabgabe und Akkumulation in den Zellen wirksam auftritt, wenn das Arzneimittel über den Folatweg abgegeben wird, während arzneimittelresistente Zellen, die freiem Doxorubicin ausgesetzt werden, das Arzneimittel wirksam nach außen pumpen.

[0067] Die Abhängigkeit von Arzneimittelaufnahme und -akkumulation bei arzneimittelresistenten Zellen vom Folatweg wird durch die in Fig. 12 dargestellt Studie weiter unterstützt. In dieser Studie wurden zwei Formulierungen von Folat-zielgerichteten Liposomen mit eingeschlossenem Doxorubicin hergestellt. Eine Formulierung wies ein Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid von 137,6 µg/µMol auf (geschlossene Kreise in Fig. 12) und die andere wies ein Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid von 11,3 µg/µMol auf (offene Kreise). Es wurden M109R-HiFR-Zellen mit den Liposomenformulierungen inkubiert, und die Aufnahme von Arzneimittel in die Zelle wurde als eine Funktion der Zeit kontrolliert. Wie Fig. 12 zu entnehmen ist, war die zelluläre Akkumulation von Doxorubicin ständig um einen Faktor von ~10 höher bei den Liposomen, welche das 10fach höhere Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid aufwiesen. Die gleichbleibende Akkumulation von zielgerichtetem liposomalem Arzneimittel durch Tumorzellen während der 24stündigen Inkubationsdauer ohne Anzeichen eines Abflusses und ohne Plateau ist auch aus den Kuren in Fig. 12 offensichtlich.

[0068] Bei einer anderen Studie wurde die quantitative Menge an Doxorubicin, das im Zellkern und im Zellcytosol akkumuliert war, durch Zellfraktionierung bestimmt. Es wurden M109R-HiFR-Zellen mit freiem Doxorubicin oder mit in Folat-zielgerichtete Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin eine Stunde oder 4 Stunden inkubiert. Eine Akkumulation von Doxorubicin in den Zellkernen und im Cytosol wurde fluorimetrisch nach Trennung der Zellkerne von dem Cytosol gemessen, wie in Beispiel 7 dargestellt. Die Ergebnisse werden in Fig. 13 gezeigt, der zu entnehmen ist, dass nach einer Stunde Inkubation das meiste Arzneimittel in der Kernfraktion sowohl bei freiem Doxorubicin (DOX) als auch bei zielgerichtetem liposomalem Doxorubicin gefunden wird. Nach 4 Stunden Inkubation übertrifft die mit zielgerichtetem liposomalem Doxorubicin erhaltene Arzneimittelkonzentration im Kern eindeutig die Konzentration, die mit freiem Doxorubicin erhalten wird. Eine HPLC-Analyse von in Zellen akkumuliertem Arzneimittel, wobei die Zellen Folat-zielgerichteten Liposomen ausgesetzt wurden, zeigt, dass das akkumulierte Arzneimittel als intaktes Arzneimittel vorliegt (Ergebnisse nicht gezeigt), was darauf hinweist, dass dieser Abgabeweg nicht zu einem Arzneimittelabbau führt. Auch wur-

den nach einer oder 4 Stunden Einwirkung von entweder freiem Doxorubicin oder Folat-zielgerichtetem liposomalem Doxorubicin auf Tumorzellen keine wesentlichen Mengen an Metaboliten nachgewiesen.

3. Zytotoxizität

[0069] Die Zytotoxizität von Doxorubicin, das an M109-HiFR-Zellen in freier Form und in Folatzielgerichteter, in Liposomen eingeschlossener Form abgegeben wurde, wurde verglichen, wie in Beispiel 8 beschrieben. Kurz zusammengefasst wurden M109-HiFR-Zellen freiem oder liposomalem Doxorubicin eine Stunde ausgesetzt, dann gewaschen und 5 Tage (120 Stunden) in frischem Medium weiter inkubiert. Wie **Fig. 14A** zu entnehmen ist, ist die Wachstumshemmkurve von Doxorubicin in Folat-zielgerichteten Liposomen (geschlossene Dreiecke) ähnlich der für Doxorubicin, das in freier Form verabreicht wurde (geschlossene Kreise) und erheblich höher, wenn Doxorubicin in Form von herkömmlichen, nicht zielgerichteten Liposomen verabreicht wurde (geschlossene Quadrate).

[0070] Es wurde ein ähnlicher Zytotoxizitätstest unter Verwendung der Sublinie M109R-HiFR mit Multi-Drug Resistance durchgeführt, und die Ergebnisse werden in **Fig.** 14E gezeigt. Eine eindeutige Verstärkung der Zytotoxizität wurde erhalten, wenn das Arzneimittel den Zellen über Folat-zielgerichtete Liposomen verabreicht wurden (geschlossene Dreiecke) im Vergleich zu Arzneimittel, das aus herkömmlichen, nicht-zielgerichteten Liposomen verabreicht wurde (geschlossene Quadrate).

II. In vitro-Charakterisierung der Zusammensetzung

[0071] Um die biologische Aktivität von Arzneimittel, das über den Folatweg aus Folatzielgerichteten Liposomen abgegeben wurde, in einem weiteren Modell zu untersuchen, wurden M109R-HiFR-Zellen in vitro einem Testarzneimittel ausgesetzt. Es wurden Mäusefußballen mit diesen Zellen beimpft. Auf diese Weise wurde das Wachstum von Zellen über eine sehr viel längere Zeitspanne verfolgt als bei in vitro-Experimenten, und der Einfluss von in vivo-Faktoren in der Mikroumgebung wurde ins Spiel gebracht. Anders als therapeutische Experimente allerdings bleibt diese Art von in vivo-Adoptionstest durch pharmakokinetische Faktoren und Faktoren der biologischen Verteilung unbeeinflusst, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

[0072] Dementsprechend wurden Tumorzellen in vitro mit freiem Doxorubicin oder mit in Liposomen eingeschlossenem, nicht Folat-zielgerichtetem Doxorubicin (DOXIL®) oder mit Folatzielgerichtetem, in Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin gemäß der Erfindung inkubiert. Wie in Beispiel 9 beschrieben, wurden die Tumorzellen in Gegenwart der ausgewählten Formulierung eine Stunde inkubiert und dann wurden 1×10^6 Zellen in den Fußballen einer Maus injiziert, wobei jede Behandlungsformulierung in 8 Mäuse injiziert wurde. Die Dicke des Fußballens von jeder Maus aus jeder Behandlungsgruppe wurde gemessen, und die Ergebnisse werden in **Fig. 15A** gezeigt.

[0073] Wie der Figur zu entnehmen ist, wies die Kontrollmaus (offene Kreise), d. h. die Maus, der Tumorzellen injiziert wurden, die nicht mit Doxorubicin behandelt wurden, einen kontinuierlichen Anstieg der Dicke des Fußballens nach Injektion der Tumorzellen auf. Mäuse, die Zellen erhalten hatten, die mit freiem Doxorubicin behandelt wurden (geschlossene Kreise), und Mäuse, die Tumorzellen erhalten hatten, die mit in Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin behandelt wurden (offene Quadrate), erfuhren ebenfalls eine Zunahme der Dicke der Fußballen. Nur die Maus, der Zellen injiziert wurden, die mit den Folat-zielgerichteten Liposomen behandelt wurden (geschlossene Dreiecke), wies keine Zunahme der Fußballendicke auf.

[0074] Am Ende der Studie am Tag 34 nach Injektion der behandelten Tumorzellen wurde das Gewicht von jedem tumortragenden Mäusefußballen bestimmt und vom mittleren Gewicht eines Mäusefußballens abgezogen, um das Tumorgewicht jedes Mäusefußballens zu bestimmen.

[0075] **Fig. 15B** zeigt das Fußballentumorgewicht in g für jedes Behandlungsschema. Wie zu sehen ist, wiesen die Tumoren in den Mäusen, die Zellen erhalten hatten, die mit dem Folatzielgerichteten, in Liposomen eingeschlossenen Doxorubicin behandelt wurden (geschlossene Dreiecke) das geringste mittlere Tumorgewicht auf.

[0076] Tabelle 5 fasst die Tumorhäufigkeit und das mittlere Tumorgewicht für jede der Behandlungsgruppen zusammen.

Tabelle 5

Behandlung	Endgültige Tumorhäufigkeit[c] (%)	Mittleres Tumorgewicht (Bereich) (mg)
unbehandelt	13/20 (65%)	381 (48–825)
freies DOX[a]	8/19 (42%)	239 (32–683)
DOXIL®[,b]	10/19 (53%)	397 (13–512)
Folat-Lipo-DOX	2/20 (10%)	57 (27–87)

[a]DOX = Doxorubicin
[b]Ergebnisse aus zwei Experimenten
[c]Exakter Fischer-Test: Folat-zielgerichtetes DOX vs. unbehandelt, p = 0,0008; Folatzielgerichtetes DOX vs. DOXIL, p = 0,0057; Folat-zielgerichtetes DOX vs. freies DOX, p = 0,0310. Alle anderen Vergleiche nicht signifikant.

[0077] Die Ergebnisse in der Tabelle 6 weisen auf eine statistisch signifikante Abnahme der Anzahl des Auftretens von Tumoren bei Mäusen auf, denen Tumorzellen injiziert wurden, die Folatzielgerichtetem, liposomalem Doxorubicin ausgesetzt wurden, im Vergleich zu freiem Doxorubicin, DOXIL und der Kontrolle nach 5 Wochen. Bei der Gruppe mit den Folatzielgerichteten Liposomen waren die Tumorgewichte ebenfalls kleiner.

[0078] Bei einer ähnlichen Studie wurden Tumorzellen, die mit jeder der Formulierungen behandelt worden waren, subkutan Mäusen injiziert, und es wurde die Anzahl an tastbaren Tumoren als eine Funktion der Zeit nach Injektion bestimmt. Die Ergebnisse werden in **Fig. 16** gezeigt, und die Kontrollmäuse (offene Kreise) wiesen die höchste Anzahl an Tumoren auf. Die Mäuse, die mit freiem Doxorubicin behandelte Zellen erhalten hatten (geschlossene Kreise), wiesen nach einer langsamen anfänglichen Tumorwachstumsphase auch eine signifikante Anzahl an Tumoren nach ungefär 20 Tagen auf. Die Mäuse, welche die Liposomenformulierungen erhalten hatten (offene Quadrate für nicht-zielgerichtete Liposomen und geschlossene Dreiecke für Folat-zielgerichtete Liposomen), wiesen die wenigsten Tumoren auf, wobei das Doxorubicin in Folat-zielgerichteten Liposomen zu der geringsten Anzahl an Tumoren führte.

III. Beispiele

[0079] Die folgenden Beispiele veranschaulichen Verfahren zum Herstellen und Charakterisieren der Liposomenzusammensetzung der Erfindung und beabsichtigen keinesfalls, die Erfindung einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung und Charakterisierung von Folsäure-PEG-DSPE-Konjugaten

A. Synthese von Konjugaten

[0080] Folsäure (Fluka, 100 mg, 0,244 mMol) wurde in DMSO (4 ml) gelöst. Es wurden Amino-PEG_{2000}-DSPE (hergestellt wie dargestellt in Zalipsky, S. et al., FEBS Lett. 353: 71–74 (1994)) (400 mg, 0,14 mMol) und Pyridin (2 ml) zu der Folsäure-DMSO-Lösung, gefolgt durch Dicyclohexylcarbodiimid (130 mg, 0,63 mMol), gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 4 Stunden fortschreiten gelassen. Eine TLC an Silicagel GF (Chloroform/Methanol/Wasser, 75:36:6) zeigte einen neuen Fleck (R_1 = 0,57), der auf die Bildung des Produkts zurückzuführen ist. Ein Verschwinden von Amino-PEG-DSPE (R_1 = 0,76) aus der Reaktionsmischung wurde durch Ninhydrin-Spray bestätigt. Das Pyridin wurde durch Rotationsverdampfung entfernt. Der Reaktionsmischung wurde Wasser (50 ml) zugesetzt. Die Lösung wurde zentrifugiert, um unlösliche Spuren zu entfernen. Der Überstand wurde in einem Schlauch (Molekulargewichtsausschluss 300.000) von Spectra/Por CE (Spectrum, Houston, TX) gegen Salzlösung (50 mM, 2 × 2000 ml und Wasser, 3 × 2000 ml) dialysiert. Die sich ergebende Lösung, die nur das Produkt enthielt (ein einzelner Fleck durch TLC), wurde lyophilisiert und der Rückstand unter Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: 400 mg, 90%. Die Synthese wird in **Fig. 1** veranschaulicht.

[0081] Das gleiche Protokoll wurde verwendet, um Folsäure-PEG-DSPE aus H_2N-PEG_{3350}-DSPE herzustellen. Bei einem ähnlichen Verfahren wurde Folsäure an $mPEG_{2000}NH_2$ angefügt (Zalipsky, S. et al., Eur. Polyur. J., 19: 1177–1183 (1983)). Das Produkt, mPEG-Folsäure, wurde an einer Säule aus Silicagel (Korngröße

70–200, 60 Å) unter Verwendung eines schrittweisen Gradienten aus Methanol (10 bis 80%) in Chloroform und dann Chloroform/Methanol/Wasser (65:30:5) zur Elution des reinen Produkts gereinigt.

B. Charakterisierung des Konjugats durch UV-Analyse

[0082] Der Wert für den Folatgehalt wurde durch quantitative UV-Spektrophotometrie der Konjugate in Methanol (0,05 mg/ml) unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten ε = 27.500 M^{-1} × cm ^{1} bei λ_{max} = 285 nm bestimmt. Es wurden die folgenden Werte für den Folsäuregehalt berechnet: 0,29 mMol/g (94% des theoretischen Werts, 0,31 mMol/g) für Folsäure-PEG_{2000}-DSPE; 0,21 mMol/g (97% des theoretischen Werts, 0,22 mMol/g) für Folsäure-PEG_{3350}-DSPE, und 0,40 mMol/g (98% des theoretischen Werts, 0,41 mMol/g) für mPEG_{2000}-Folsäure.

C. Charakterisierung des Konjugats durch ^{1}H-NMR (360 MHz, DMSO-D6/CF_3CO_2D, ~10/1 V/V)

[0083] Für Folsäure-PEG-DSPE: δ 0,84 (t, CH_3, 6H); 1,22 (s, CH_2, 56H); 1,49 (m, CH_2CH_2CO, 4H); 2,1–2,3 (überlappend 2 × ı, CH_2CH_2CO & m CH_2 von Glu, 8H); 3,2 (m, CH_2CH_2N, 4H); 3,50 (s, PEG, ~180H und ~300H für Derivate von PEG_{2000} bzw. PEG_{3350}); 4,02 (t, CH_2OCONH, 2H); 4,1 (dd, trans-PO_4CH_2CH, 1H); 4,3 (dd, cis-PO_4CH_2CH, 1H); 4,37 (m, α-CH, 1H); 4,60 (d, 9-CH_2-N, 2H); 5,15 (M, PO_4CH_2CH, 1H); 6,65 (d 3',5'-H, 2H); 7,65 (d, 2',6'-H); 8,77 (s, C7-H, 1H) ppm. Für mPEG-Folsäure: δ 1,85-2,1 (m, β-CH_2 von Glu, 2H); 2,3 (m, γ-CH_2 von Glu, 2H); 3,11 (m, CH_2CH_2N, 4H); 3,50 (s, PEG, $^{-}$180H); 4,3 & 4,37 (geringeres & größeres α-CH_2 von Glu, 1H); 4,60 (9-CH_2-N, 2H); 6,65 (d, 3',5'-H, 2H); 7,66 (d, 2', 6'-H, 2H), 8,77 (s, C7-H, 1H) ppm.

D. Charakterisierung des Konjugats durch Massenspektren (MALDI-TOFMS)

[0084] Die Spektren wurden durch Charles Evans & Associates (Redwood City, CA) mit einem Flugzeitmassenspektrometer PHI-EVANS MALDI triele electrostatic analyzer (Desorptionslaser: 337 nm, 600 psec Pulsbreite) unter Verwendung von Gentisinsäure (gentrinsic acid) als Matrixmaterial erhalten. Die Spektren zeigten glockenförmige Verteilungen von 44 Dabeabstandeten Linien, zentriert bei 3284 für Folsäure-PEG_{2000}-DSPE (berechnetes Molekulargewicht 3200 Da); 4501 für Folsäure-PEG_{3350}-DSPE (berechnetes Molekulargewicht 4540 Da); und bei 2400 für mPEG-Folsäure (berechnetes Molekulargewicht 2423 Da).

E. HPLC-Überwachung der durch Carboxypeptidase G vermittelten Spaltung

[0085] Es wurde ein HPLC-System, Shimadzu 10A, ausgerüstet mit einer Säule Phenomenex Prodigy C8 (4.6.50 mm), bei 1 ml/min verwendet, wobei die Chromatographie bei λ = 285 nm überwacht wurde. Zur Analyse von Folsäure-PEG-DSPE wurde das System im isokratischen Betrieb, Methanol/10 mM Natriumphosphat, pH 7,0 (92:8, V/V) verwendet. Das Konjugat eluierte als ein einzelner Peak mit einer Retentionszeit von 5,7 min. Die Analyse von mPEG-Folsäure wurde durch einen Gradientenbetrieb unter Verwendung von 10 mM Natriumphosphat, pH 7,0 mit Methanol (0–35% in 25 min) durchgeführt. Das Konjugat eluierte als ein einzelner Peak mit einer Retentionszeit von 19,6 min. In beiden Fällen war es möglich, die enzymatische Spaltung von Pteroat aus der Folsäuregruppe der Konjugate durch Abnahme der Gesamtfläche des Konjugatpeaks zu verfolgen. Es wurde eine Lösung aus Folsäure-PEG-DSPE (0,1 mg/ml) in 150 mM Tris-Puffer, pH 7,3 hergestellt. Ein Aliquot (10 µl) dieser Lösung wurde in die HPLC-Apparatur eingespritzt, um die Peakintegration zum Zeitpunkt Null zu erhalten. Das Enzym Carboxypeptidase G (CPG, Sigma, 1 Unit) wurde der Folsäure-PEG-DSPE-Lösung zugesetzt. Die sich ergebende Lösung wurde bei 30°C im Wasserbad inkubiert, und es wurden Aliquots (10 µl) in die HPLC-Apparatur zu verschiedenen Zeitintervallen eingespritzt. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse war zu Beginn hoch, und nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden verlangsamte sich die Hydrolyse. Es wurden weitere Aliquots mit 1 Unit CPG zu der Reaktionsmischung nach 4 Stunden und 20 Stunden gegeben. Die Daten wurden bis zu 27 Stunden gesammelt. Trotz der verlängerten Inkubationszeiten und der Vielzahl von Zugaben des Enzyms übertraf das Verschwinden des Konjugatpeaks 20% des anfänglichen Integrationswertes nicht, was anzeigt, dass 80% des Folsäure-PEG-DSPE über die γ-Carboxygruppe verknüpft war. Das mit mPEG-Folsäure als Substrat durchgeführte Experiment zeigte, dass dieses Konjugat ~90% Folsäurereste enthielt, die über die γ-Carboxygruppe verknüpft waren.

Beispiel 2

Zellkultur und Bindungsstudien

A. Zellkultur

[0086] Es wurden Zellen in normalem oder folsäurefreiem RPMI-Medium mit 10% fötalem Rinderserum, Glutamin 2 mM, Penicillin 50 U/ml und Streptomycin 50 µg/ml kultiviert. Die Konzentration von Folsäure in dem Serum enthaltenden folsäurefreien Medium beträgt nur 3 nM im Gegensatz zu 2,26 µM (1 mg/l) unter normalen Kulturbedingungen. Die Zellen wurden routinemäßig durch Behandlung mit Trypsin (0,05%)-EDTA (0,02%)-Lösung in Industries (Beyt Haernek, Israel) passagiert, und fötales Rinderserum war von GIBCO (Grand Island, NY).

(i) Zelllinien: Bei den meisten Studien wurde M109, eine Lungenkarzinomlinie der Maus aus BALG/c-Mäusen (Marks, T. A. et al. Cancer Treat. Rep., 61: 1459–1470 (1997)), und eine Sublinie dieser Zellen, M109R, die eine Multi-Drug Resistance zeigt (ungefähr eine 100fach gesteigerte Resistenz gegenüber Doxorubicin), verwendet. Beide Zelllinien exprimieren in vitro geringe Mengen an Folsäurerezeptoren und werden deshalb als M109-LoFR und M109R-LoFR bezeichnet. Durch Kultivieren dieser Zellen in folsäurefreiem Medium über etliche Passagen wurden zwei Sublinien erhalten, die große Menge an Folsäurerezeptoren exprimieren. Diese Sublinien wurden daran angepasst, unter Bedingungen von wenig Folsäure zu wachsen, wobei Verdopplungszeiten erreicht wurden, die denen der Originallinien ähnlich sind. Die Sublinien werden als M109-HiFR und M109R-HiFR bezeichnet, um die Überexpression an Folsäurerezeptoren hervorzuheben.

[0087] KB-Zellen, ein menschliches Nasen-Rachen-Epidermiskarzinom (Saikawa, Y., Biochemistry, 34: 9951–9961 (1995)) wurden ebenfalls in Medium mit geringem Folsäuregehalt wachsen gelassen, um Zellen zu erhalten, die Folsäurerezeptoren überexprimieren, KB-HiFR-Zellen. Andere bei dieser Studie verwendete Zelllinien waren A375, eine menschliche Melanomlinie, und normale menschliche Fibroblasten, die freundlicherweise durch das Genetics Department des Hadassah Hebrew University Hospital zu Verfügung gestellt wurden.

B. Zellbindung von freiem Folat, Folsäure-PEG-Konjugaten und Liposomen

[0088] Die Bindung wurde durch Messung von ^{3}H-Chol oder ^{3}H-Folsäure in zellassoziierter liposomaler Form untersucht. 48 Stunden vor einem Test wurden 5×10^5 Zellen in einer 35 mm-Schale ausgesät, um ungefähr 10^6 Zellen/Platte zu erhalten. Platten, die mit Medium und Serum zwei Tage ohne Zellen vorinkubiert wurden, wurden als Kontrollen verwendet. Für die Tests wurden die Platten zweimal mit folsäurefreiem RPMI-Medium gewaschen und bei 37°C mit 1 ml folsäurefreiem RPMI-Medium, das 0,1 µM radioaktiv markierte Folsäure oder Liposomen in Mengen von 30 bis 300 nMol Phospholipid enthielten, inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten dreimal mit 2 ml eiskalter PBS gewaschen, und die radioaktiven Markierungen wurden mit 1 ml 0,5 N NaOH über Nacht extrahiert, gefolgt durch Neutralisierung mit 1 ml 0,5 N HCl. Um die mit Zellen assoziierte Radioaktivität zu analysieren, wurden die Zellen von den Platten durch Trypsin-EDTA-Behandlung freigesetzt, dreimal mit PBS gewaschen und dann unter Durchführung desselben Verfahrens extrahiert. Die Radioaktivität wurde durch Flüssigkeitszintillationszählung bestimmt. Auf der Grundlage des spezifischen Verhältnisses von cpm/Phospholipid für jede Liposomenformulierung wurden die Ergebnisse in pMol Phospholipid pro Millionen Zellen übersetzt.

[0089] Zur Behandlung durch einen Säurewaschschritt, welcher der Bindung folgte, wurde jede Schale zweimal mit angesäuerter Salzlösung (pH = 3) gewaschen, gefolgt durch einen Waschschritt mit PBS, und dann wurde wie oben beschrieben extrahiert.

[0090] Zur Behandlung von Zellen mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) wurden M109-HiFR-Zellen zweimal mit folatfreiem RPMI-Medium gespült und 0,1 Units/ml Phosphoinositol-Phospholipase C (PI-PLC) (Boehringer, Mannheim) in folatfreiem RPMI-Medium 60 Minuten bei 37°C ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit folatfreiem RPMI-Medium gespült und Folat-zielgerichteten Liposomen eine Stunde bei 4°C ausgesetzt. Die mikroskopische Untersuchung wurde mit fixierten Zellproben durchgeführt.

[0091] Bei Studien, die mit Zellen in Suspension durchgeführt wurden, wurden Zellen von Monolagern durch Trypsin-EDTA-Behandlung freigesetzt, gefolgt durch drei Waschschritte (7 Minuten, 500 g Zentrifugation) in folsäurefreiem RPMI-Medium. Die suspendierten Zellen (1 bis 10×10^6 Zellen/ml) wurden mit radioaktiv markier-

ter freier Folsäure oder Liposomen (Konzentration wie für jede Studie angegeben) 30 Minuten in 5 ml Kunststoffröhrchen inkubiert. Nicht gebundenes Material wurde durch vier Waschschritte mit PBS entfernt.

Beispiel 3

Herstellung von Liposomen

[0092] Liposomen, die aus hydriertem Sojabohnen-Phosphatidylcholin (HSPC) (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL), Cholesterin (Chol) (Sigma, St. Louis, MO) und Methoxy-PEG_{2000}-DSPE (mPEG-DSPE) zusammengesetzt waren, wurden wie früher beschrieben (Zalipsky, S. et al. Bioconjugate Chem., 4: 296–299 (1993)) hergestellt. Die Liposomenzusammensetzungen werden in Tabelle 2 oben dargestellt und wie besprochen, da alle Formulierungen HSPC, Chol und DSPE enthielten, werden sie folglich hier nach ihrem Folsäure-PEG/mPEG-Gehalt bezeichnet. **Fig.** 3 veranschaulicht die Formulierungen schematisch.

[0093] Alle Liposomenpräparationen wurden mit geringen Menge an ^{3}H-Cholhexadecylether (NEN, Bosten, MA) versetzt („spiked"). Die Liposomen wurden durch Hydratation bei 55–60°C von entweder einem dünnen trockenen Lipidfilm, der durch Rotationsverdampfung einer Lipidlösung in Chloroform:Methanol (1:1) erhalten wurde, oder von einem gefriergetrockneten Lipid-„Kuchen", der durch Lyophilisierung einer tert-Butanol-Lipidlösung erhalten wurde, hergestellt. Der verwendete Puffer war 5% Dextrose/15 mM Hepes, pH 7,4, in einer Konzentration von 50 bis 100 µMol Phospholipid/ml. Der Hydratation folgte eine Hochdruckextrusion durch doppelt geschichtete Polycarbonatmembranen mit Porengrößen von 1,0 bis 0,05 µm unter Verwendung einer Vorrichtung aus Edelstahl von Lipex Biomembranes (Vancouver, BC). Die Liposomen wurden durch Filtration durch 0,22 µm Zellulosemembranen sterilisiert. Die Charakterisierung der Liposomen beinhaltete Folgendes: Phospholipidkonzentration auf der Grundlage des Phosphorgehalts, Folsäurekonzentration auf der Grundlage der UV-Absorption von Folsäure bei 285 nm nach Aufbrechen der Liposomen in Natriumdodecylsulfatlösung (10%), Vesikelgröße, wie durch dynamische Lichtstreuung bestimmt, und in einigen Präparationen den Fettsäuregehalt, um die Phospholipidhydrolyse zu überprüfen. Alle Liposomenpräparationen wiesen eine mittlere Vesikelgröße zwischen 70 und 90 nm mit einer Standardabweichung < 25% und einer unimodalen Größenverteilung auf. Eine Phospholipidhydrolyse wurde in den hier untersuchten Präparationen nicht nachgewiesen.

Beispiel 4

Bindung und Internalisierung von Folat-zielgerichteten Liposomen an M109-HiFR-Zellen

A. Herstellung von Liposomen

[0094] Es wurden Liposomen nach dem Verfahren von Beispiel 3 wie folgt hergestellt, um DPPE-Rhodamin (Avanti Polar Lipids, Birminghan, AL) zu enthalten:

Formulierung	Liposomenbestandteil, molarer prozentualer Anteil				
	HSPC	Chol	DS-PE-PEG_{2000}-Folat	mPEG-$DSPE_{2000}$	DPPE-Rhodamin
Rh[1]-Folsäure-PEG_{2000}	98,9	70	1,0	0	0,1
Rh-Folsäure-PEG_{2000}/mPEG	91,9	70	1,0	7	0,1

[1]Rh = Rhodamin

B. Konfokalmikroskopie

[0095] Es wurden M109-HiFR-Zellen 24 Stunden vor jeder Studie auf 24 mm-Deckplättchen, die in 35 mm-Kulturschalen eingeführt wurden, ausplattiert. Die Einwirkzeiten der Liposomenzusammensetzung oder von freiem Doxorubicin auf die Zellen werden für jede Studie angegeben. Die Zellen wurden mit gepufferter PBS-Lösung, die 4% Formalin/1,5% Methanol (Bio-Labs, Israel) enthielt, bei 4°C 15 Minuten fixiert, dann wurden sie viermal mit PBS (Gibco, Grand Island, NY) gewaschen. Als nächstes wurden die Deckplättchen auf Objektträger gesetzt, die mit gepuffertem Bedeckungsmedium beschichtet waren, das 90% Glycerin/10%

PBS/0,1% NaN_3 und 3% DABCO (Sigma) als Mittel gegen das Ausbleichen enthielt.

[0096] Die mikroskopische Sichtbarmachung von lebenden (nicht fixierten) Zellen wurde in PBS vorgenommen, die 2 mM $MgSO_4$/1 mM HEPES (Sigma), pH 7,5 enthielt.

[0097] Die Untersuchung der Zellen wurde mit einem Konfokal-Laser-Raster-Umkehrmikroskop von Zeiss (LSM410) (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die maximale Anregung wurde durch die 543 nm-Linie des internen He-Neon-Lasers erreicht, und die Fluoreszenzemission wurde oberhalb von 570 nm mit einem Langpass-Sperrfilter LP-570 für Rhodamin beobachtet. Für Doxorubicin wurde die maximale Anregung bei der 488 nm-Linie des internen Argonlasers durchgeführt: die Fluoreszenzemission wurde oberhalb von 515 nm mit einem Langpass-Sperrfilter LP-515 beobachtet. Es wurde ein Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat 63 × 1,2 W corr. (Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden in ein TIF-File-Format konvertiert, und das Ausmaß des Kontrasts und der Helligkeit der Aufnahmen wurde unter Verwendung des Zeiss LSM410-Programms eingestellt. Die Aufnahmen wurden durch einen QMS Magicolor 2-Drucker mit 1200 dpi ausgedruckt.

Beispiel 5

Herstellung von Doxorubicin-Liposomen und in vitro-Bindung

A. Herstellung von Liposomen

[0098] Die Herstellung von Liposomen wurde wie bei Gabizon (J. Drug Targeting, 3: 391–398, (1996)) durchgeführt, und die Liposomen waren aus hydriertem Sojabohnen-Phosphatidylcholin (HSPC, Avanti Polar Lipids, Birmingham, LA, USA), Cholesterin (Sigma), DSPE-PEG-Folat zusammengesetzt. Das Verhältnis von Doxorubicin zu Phospholipid betrug zwischen 110 bis 150 µg/µMol. Doxorubicin-markierte Liposomen, denen der Folatzielgerichtete Ligand fehlte, die jedoch eine Oberflächenbeschichtung aus PEG aufwiesen, waren wie sie bei Cabanes, A. et al., Clinical Cancer Res. 4: 499–505 (1998) beschrieben und wie unter dem Markennamen DOXIL (Sequus Pharmaceuticals, Inc.) vertrieben werden.

B. In vitro-Bindung

[0099] M109R-HiFR-Zellen wurden mit freiem Doxonmbicin oder mit Doxorubicin, das in Folatzielgerichteten Liposomen eingeschlossen war, in einer Doxorubicin-Konzentration von 4×10^{-5} M inkubiert. Das Doxorubicin-Molekül wurde unter Verwendung von Fluoreszenz nachverfolgt.

Beispiel 6

Verapamil-Blockade der Abflusspumpe und Abgabe von Doxorubicin

[0100] Monolager von M109R-HiFR-Zellen in 35 mm-Kulturschalen wurden $0,5 \times 10^{-5}$ M Doxorubicin als freiem Arzneimittel oder in Folat-zielgerichteten Liposomen 1 Stunde bei 37°C in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 µMol Verapamil (Teva, Israel) inkubiert, gefolgt durch einen Waschschritt mit PBS (7 Minuten, 500 g Zentrifugation). Dann wurden die gewaschenen Zellen gespült und mit Verapamil zwei Stunden weiter inkubiert. Die Zellen wurden aus dem Monolager mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Gibco, Grand Island, NY) freigesetzt, und sie wurden in zwei Fraktionen aufgeteilt, eine Fraktion zur Bestimmung von zellulären Doxorubicin unter Verwendung von Fluoreszenz und die andere Fraktion für einen Durchflusszytometrietest. Die Bestimmung von zellulärem Doxorubicin wurde durch Extrahieren des Doxorubicins mit 0,075 N HCl/90% Isopropylalkohol bei 4°C über Nacht, Zentrifugieren und Untersuchen des gesammelten Überstands auf Doxorubicin durch Fluoreszenz unter Verwendung eines Fluorimeters (Kontron, Lumitron, Israel) bei Ex 470 nm, Ein 590 nm untersucht.

[0101] Der durchflusszytometrische Test wurde wie folgt durchgeführt. Suspendierte M109R-HiFR-Zellen, wie oben beschrieben, wurden durch Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Durchflusszytometers FACS-Star Plus (Becton-Dickinson, Immunofluometry System, Mountain View, CA) analysiert. Die Zellen wurden mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 1000 Zellen/sec durch eine 70 µm-Düse unter Verwendung von Kochsalzlösung als Transportflüssigkeit hindurchtreten gelassen. Ein 488 nm-Argonlaserstrahl bei 250 mW diente als Lichtquelle für die Anregung. Die rote (von Doxorubicin stammende) Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines 575 nm DF 26 Bandpassfilters gemessen.

[0102] Die Ergebnisse werden in den **Fig. 11A** bis **Fig. 11B** und in Tabelle 4 gezeigt.

Beispiel 7

Quantifizierung von zellulärem Doxorubicin und Doxorubicin im Kern

[0103] M109-HiFR- und M109R-HiFR-Zellen wurden freiem Doxorubicin oder in Folatzielgerichteten Liposomen eingeschlossenem Doxorubicin eine Stunde oder 4 Stunden ausgesetzt. Die Quantifizierung von Arzneimittel, das in den Zellen akkumulierte, wurde fluorimetrisch an trypsinisierten Zellen wie oben in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt. M109R-HiFR-Zellen, die Doxorubicin ausgesetzt, trypsinisiert und mit PBS gewaschen waren, wurden 10 Minuten bei 4°C in der folgenden Lösung suspendiert: 100 mM NaCl/1 mM EDTA/1% Triton X-100 (Sigma)/10 mM Tris (Sigma), pH 7,4, dann wurden sie zentrifugiert (15 Minuten, 800 g). Das Zellkernpräzipitat wurde vom Zellcytosol getrennt, und Doxorubicin wurde aus beiden Fraktionen wie in Beispiel 6 beschrieben extrahiert. Die Ergebnisse werden in Fig. 13 gezeigt.

Beispiel 8

Zytotoxizitätsstudien

[0104] M109-HiFR- und M109R-HiFR-Zellen in folatfreiem RPMI-Medium, die in 96-Well-Platten (6-Fachbestimmungen) in einer Dichte von 10^3/Well ausgesät waren, wurden eine Stunde Doxorubicin in freier Form, eingeschlossen in nicht zielgerichteten Liposomen und eingeschlossen in Folat-zielgerichteten Liposomen ausgesetzt. Nach Einwirkung auf die Zellen wurden diese zweimal gespült und weiter 120 Stunden in dem oben bezeichneten Medium gewaschen. Ein Zellwachstumstest wurde unter Verwendung von 2,5% Glutaraldehyd (Merck) als Fixativ durchgeführt, gefolgt durch Färbung mit Methylenblau (Merck) und Absorptionsmessung bei 620 nm auf einem automatischen Plattenlesegerät. Die Ergebnisse werden in den Fig. 14A bis Fig. 14B gezeigt.

Beispiel 9

Test zum in vivo-Wachstum des Adoptivtumors

[0105] Zehn Wochen alte BALB/c-Mäuseweibchen wurden in einer speziellen pathogenfreien Einrichtung gehalten. M109R-HiFR-Zellen in in vitro-Suspension (10^7 Zellen/ml) wurden in 10^{-5} M Doxorubicin entweder in freier Form, eingeschlossen in Liposomen (DOXIL®) oder eingeschlossen in Folat-zielgerichteten Liposomen zwei Stunden ausgesetzt, mit PBS gewaschen und dann in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen resuspendiert. Gesunden, syngenen BALB/c-Mäusen wurden in den rechten Hinterfußballen 50 µl (10^6 Zellen) injiziert. Die Fußballendicke wurde mit Zirkeln einmal oder zweimal wöchentlich über fünf Wochen gemessen. Nach 35 Tagen wurden die Mäuse getötet, die endgültige Anzahl an Tumoren aufgenommen, und die Fußballen der Kontrolle und die mit Tumorzellen beimpften Fußballen wurden auf Höhe des Gelenks abgetrennt und gewogen. Das Tumorgewicht wurde als Unterschied zwischen dem Gewicht des normalen und eines tumortragenden Fußballens bestimmt.

[0106] Die statistische Signifikanz von Unterschieden beim endgültigen Auftreten von Tumoren pro Gruppe wurde durch Kontingenztabellen und dem exakten Fischer-Test analysiert. Die Ergebnisse werden in den Fig. 15A bis Fig. 15B und in Fig. 16 und in Tabelle 5 gezeigt.

[0107] Obwohl die Erfindung im Hinblick auf bestimmte Ausführungen beschrieben worden ist, wird für den Fachmann offensichtlich sein, dass verschiedene Änderungen und Modifikationen vorgenommen werden können, ohne sich von der Erfindung zu entfernen.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Zusammensetzung, bestehend aus:
einem Liposomenträger, zusammengesetzt aus hydriertem Sojabohnen-Phosphatidylcholin (HSPC), Cholesterin und Distearoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol-Folat (DSPE-PEG-Folat) und
Doxorubicin, eingeschlossen in dem Liposomenträger, wobei das Verhältnis von Doxorubicin zu Phospholipid 110–150 µg/µMol beträgt,
zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von mehrfach arzneimittelresistentem Krebs.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

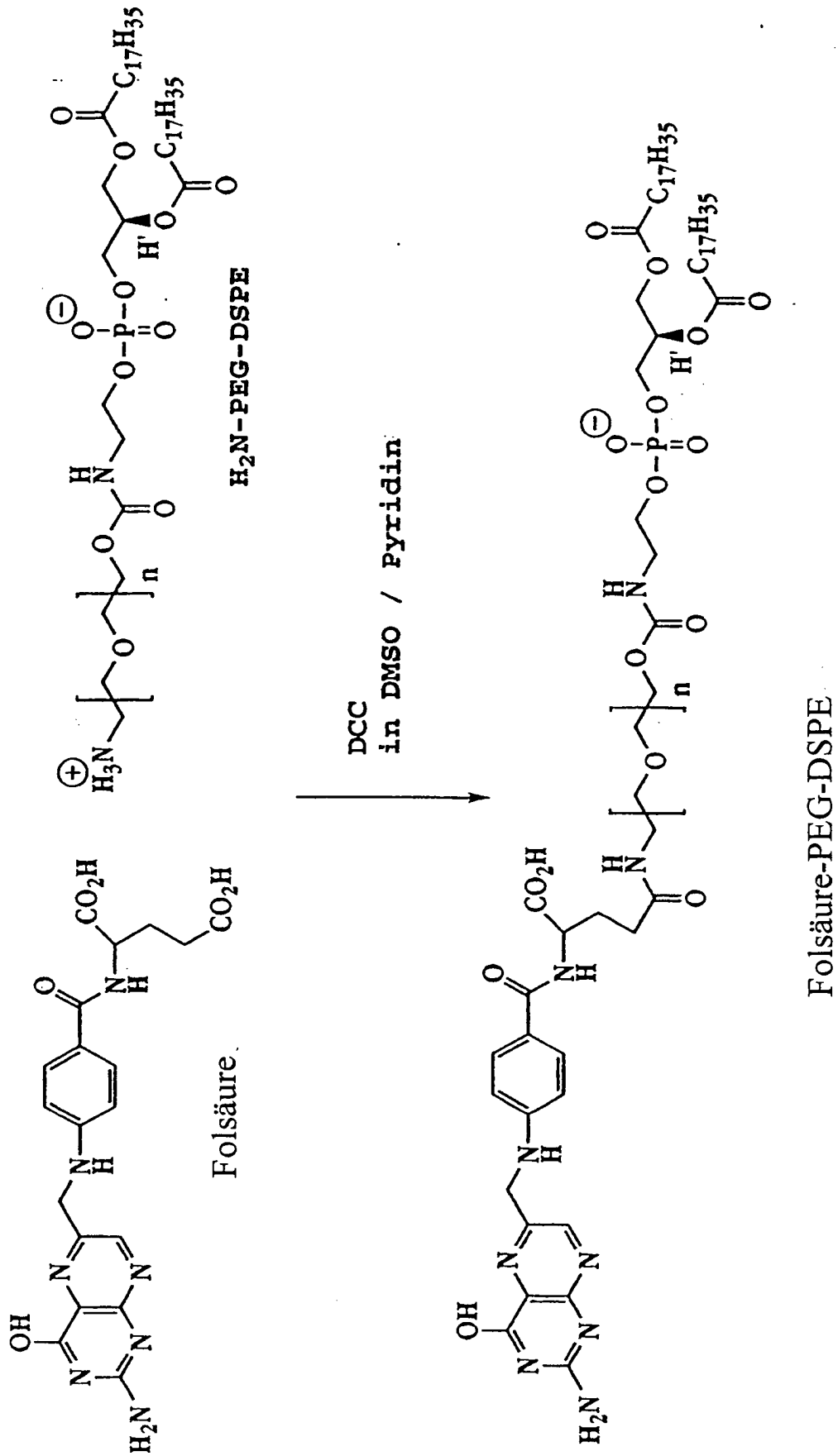


Fig. 1

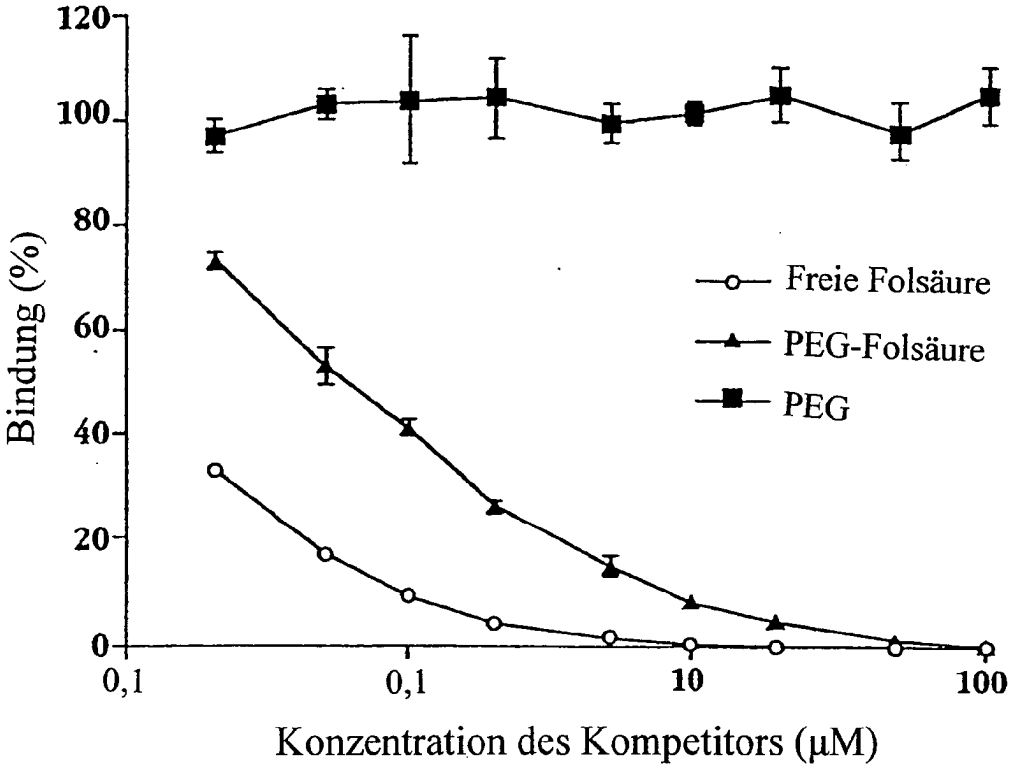
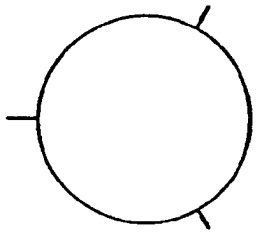
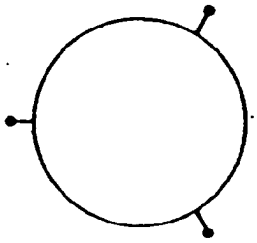

120
100
80
60
40
20
0
Bindung (%)
Freie Folsäure
PEG-Folsäure
PEG
0,1
0,1
10
100
Konzentration des Kompetitors (µM)

Fig. 2



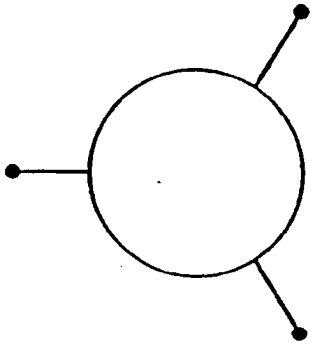
Niedrig-mPEG2000

Fig. 3A



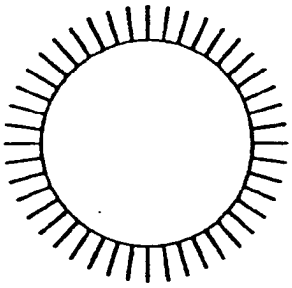
Folsäure-PEG2000

Fig. 3B



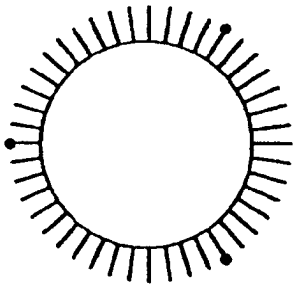
Folsäure-PEG3350

Fig. 3C



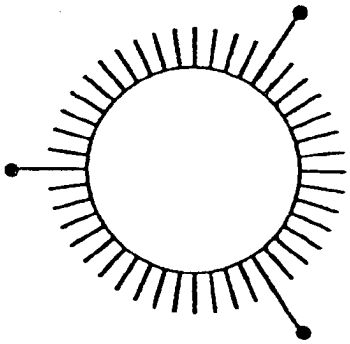
Hoch-mPEG2000

Fig. 3D



Folsäure-PEG2000/mPEG

Fig. 3E



Folsäure-PEG3350/mPEG

Fig. 3F

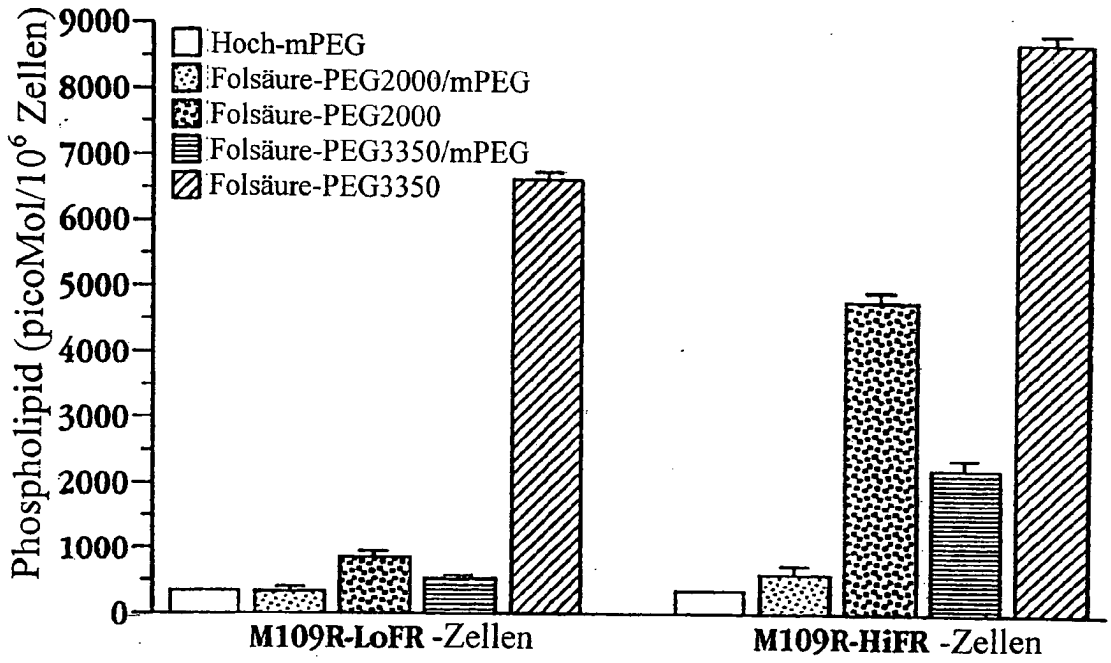

Phospholipid (picoMol/10^6 Zellen)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Hoch-mPEG
Folsäure-PEG2000/mPEG
Folsäure-PEG2000
Folsäure-PEG3350/mPEG
Folsäure-PEG3350
M109R-LoFR -Zellen
M109R-HiFR -Zellen

Fig. 4A

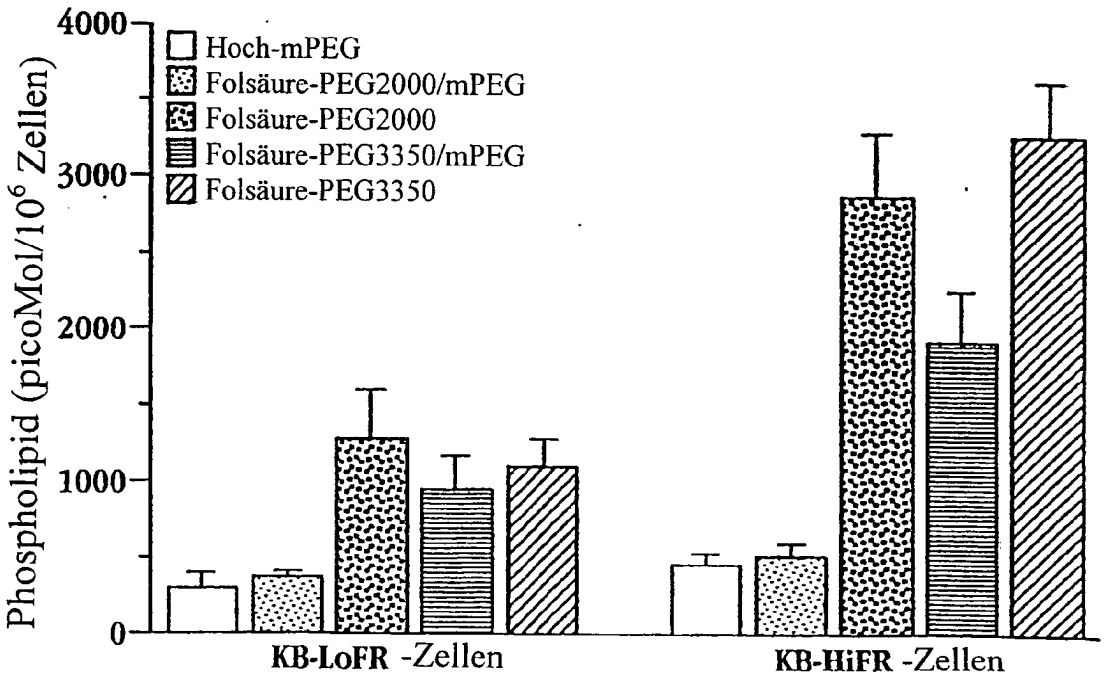

Phospholipid (picoMol/10^6 Zellen)
4000
3000
2000
1000
0
Hoch-mPEG
Folsäure-PEG2000/mPEG
Folsäure-PEG2000
Folsäure-PEG3350/mPEG
Folsäure-PEG3350
KB-LoFR -Zellen
KB-HiFR -Zellen

Fig. 4B

Fig. 5A

Fig. 5B

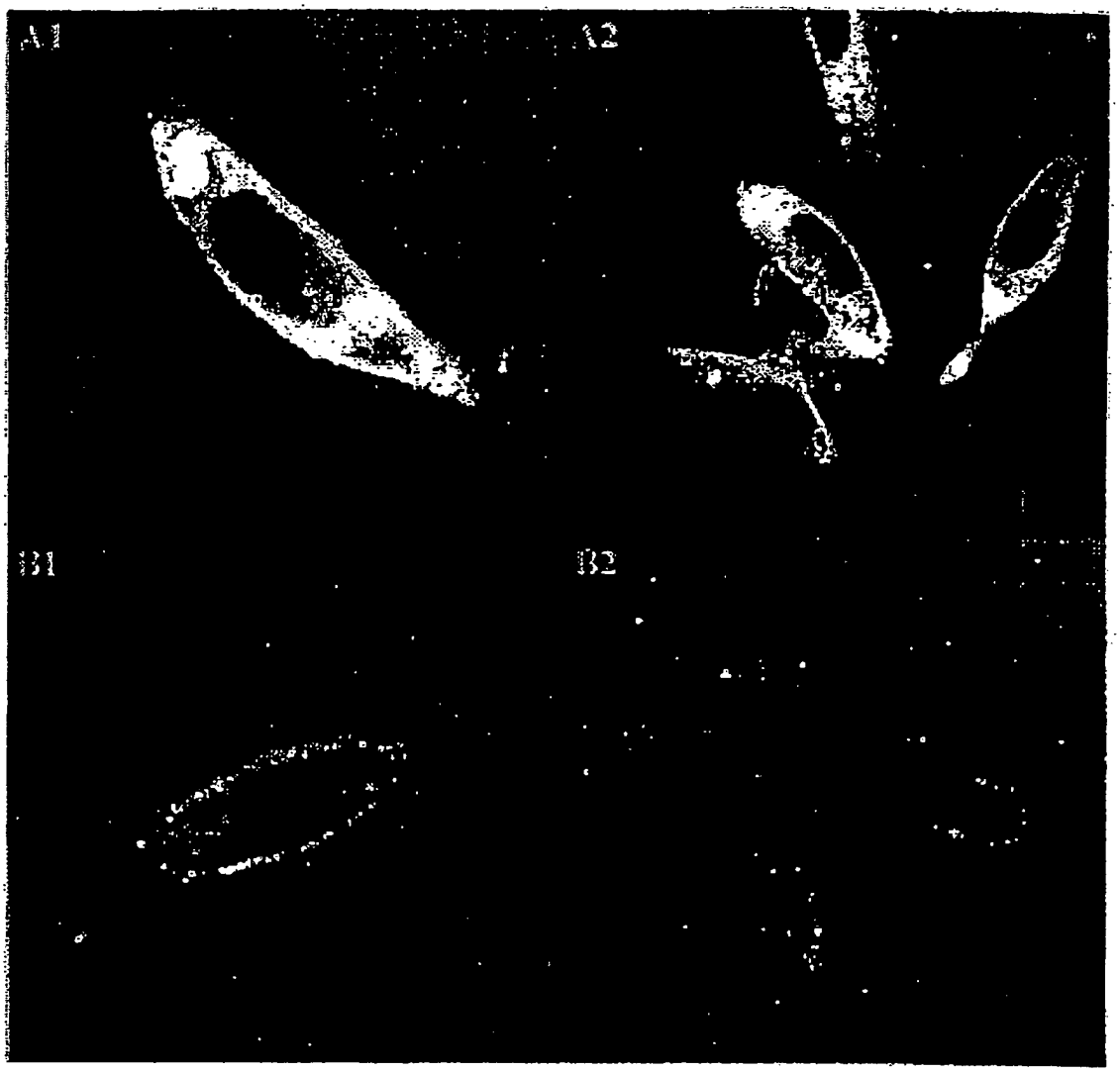


Fig. 5C

Fig. 5D

Fig. 6A

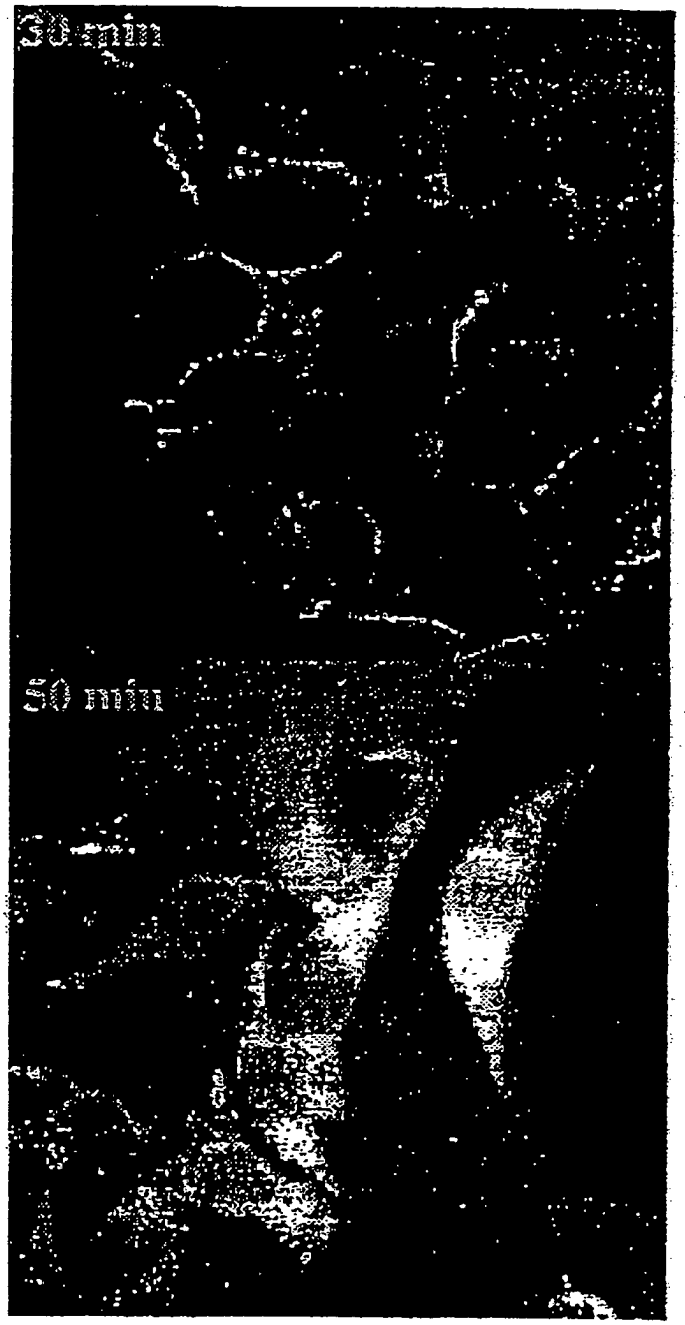


Fig. 6B

Fig. 7A

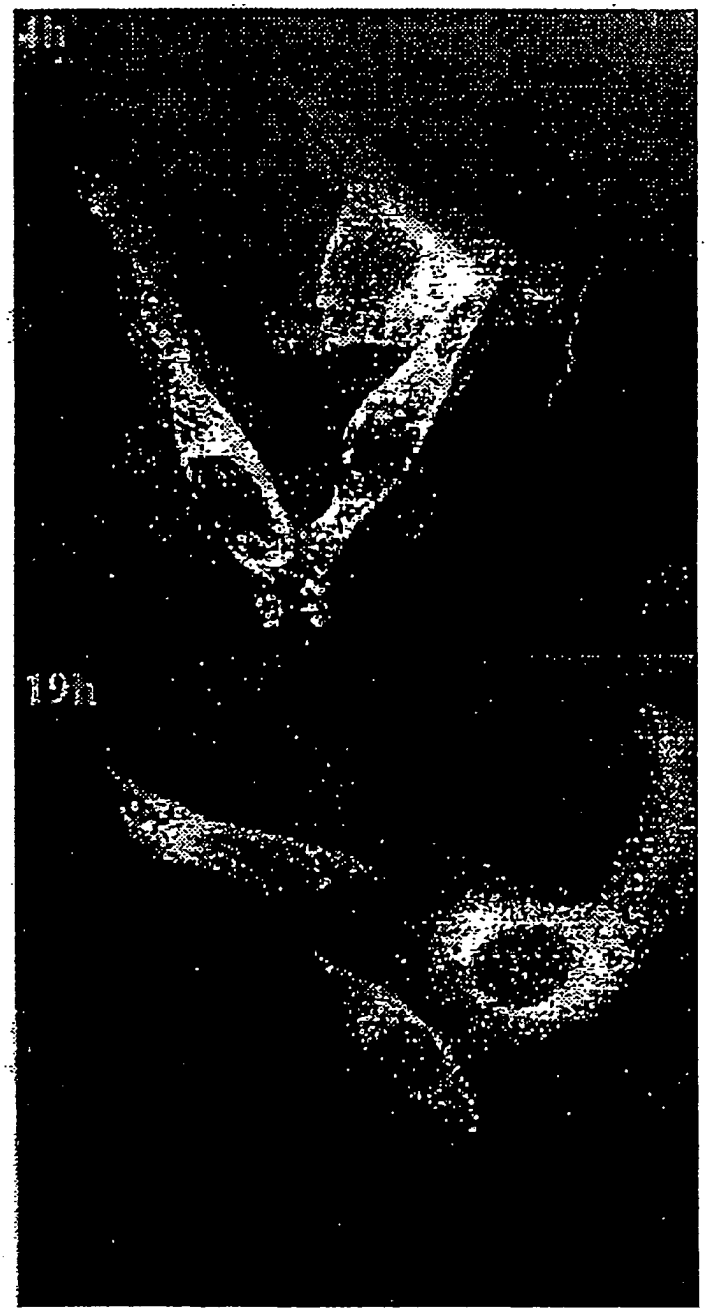


Fig. 7B

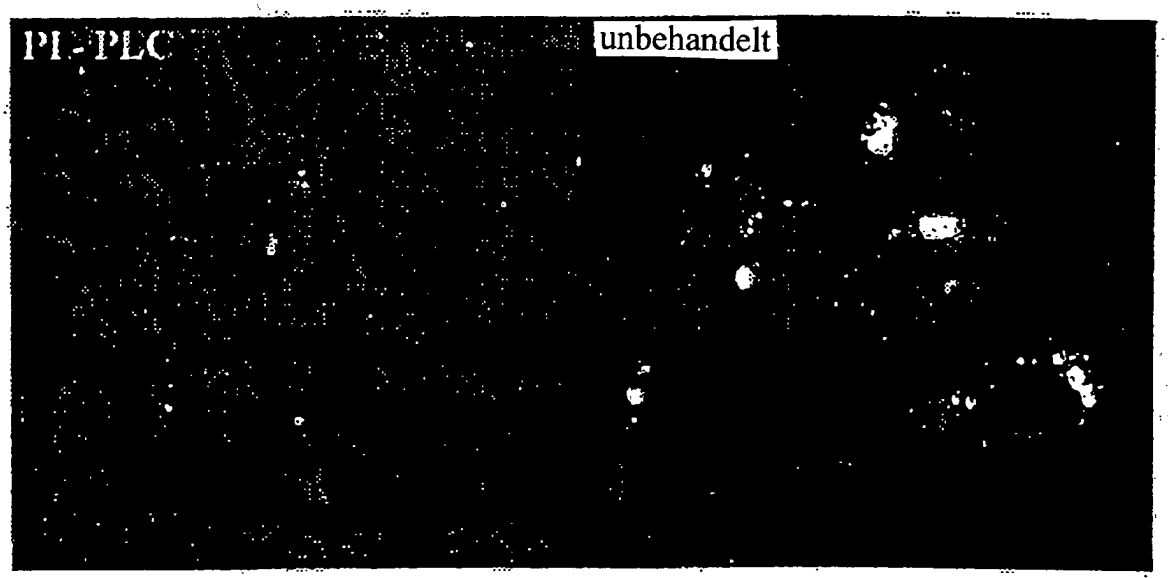


Fig. 8A

Fig. 8B



Fig. 9A Fig. 9B

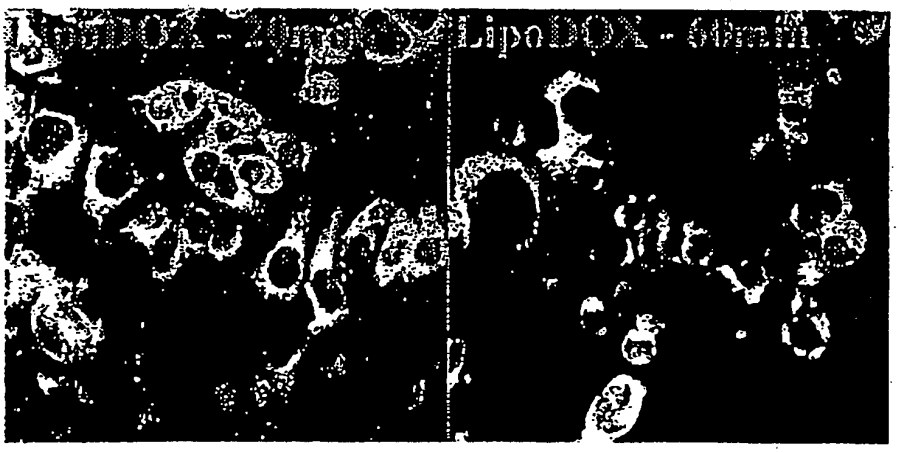


Fig. 9C Fig. 9D

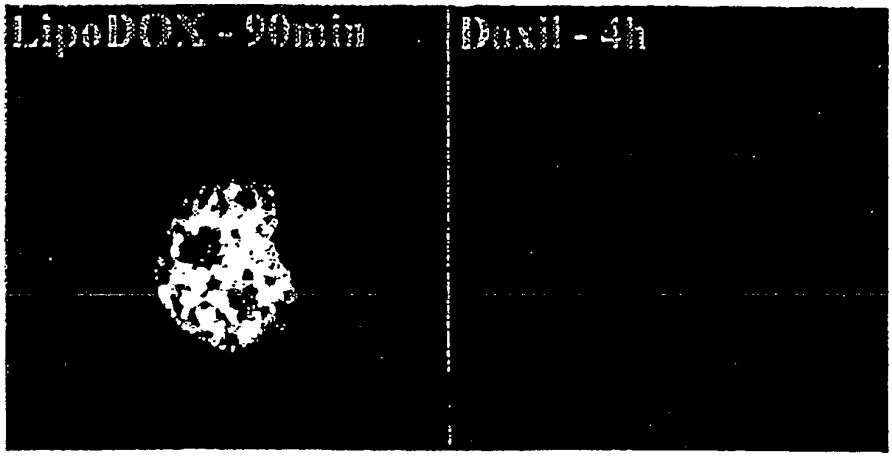


Fig. 9E Fig. 9F



Fig. 10A

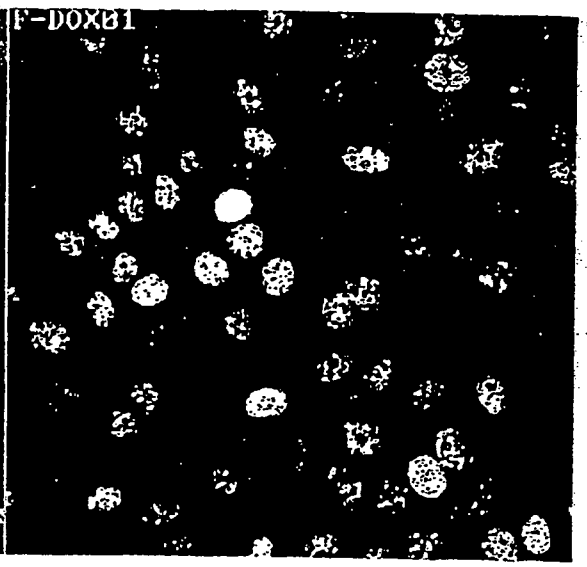


Fig. 10B

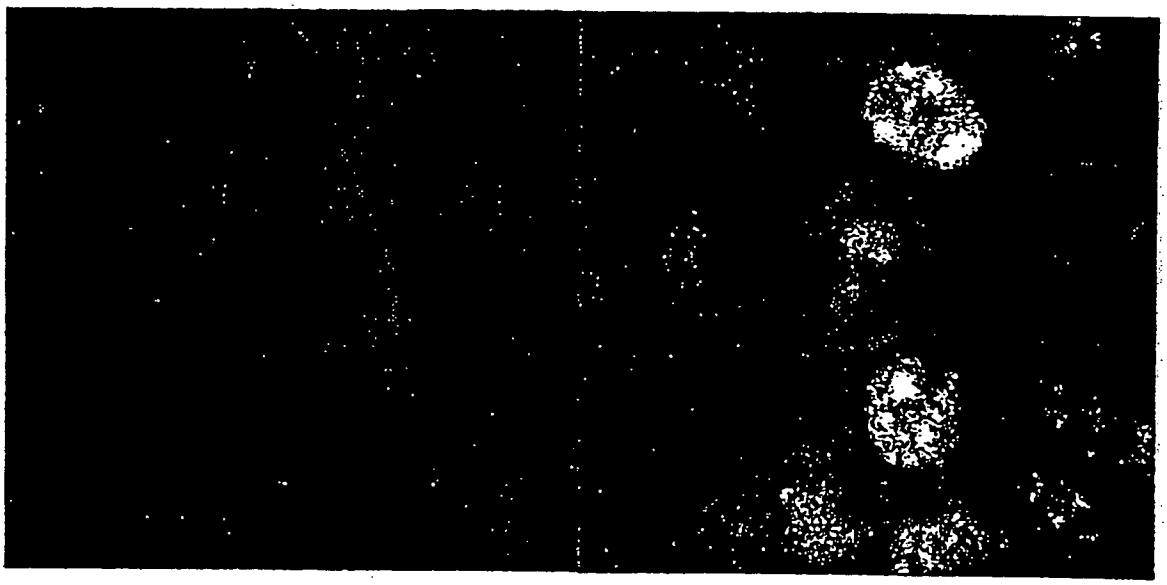


Fig. 10C

Fig. 10D

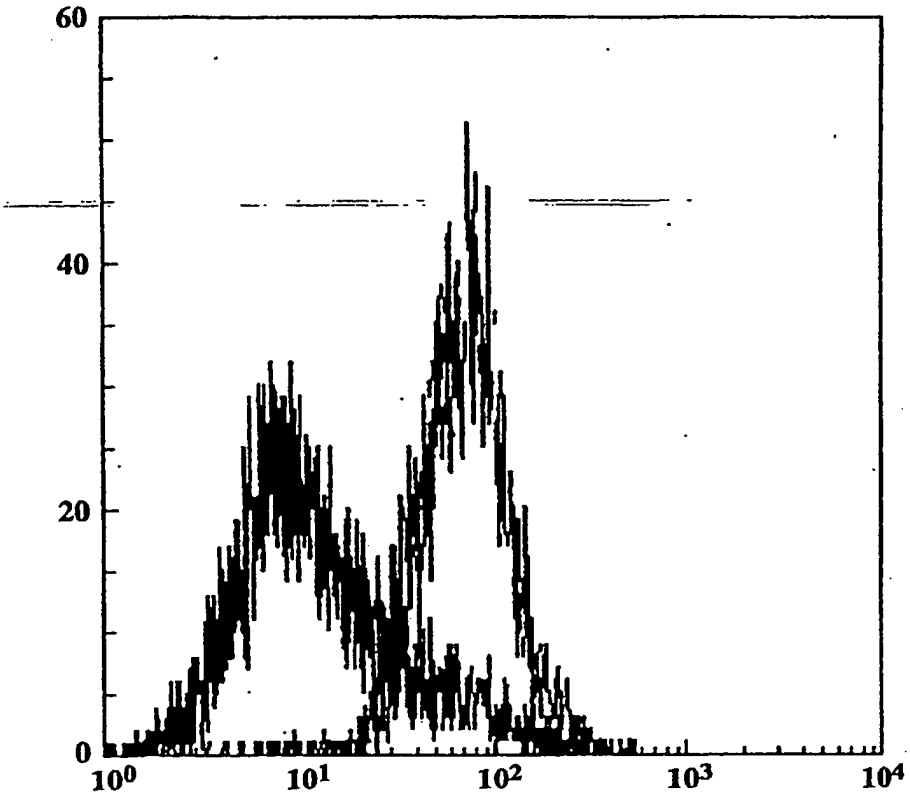


Fig. 11A

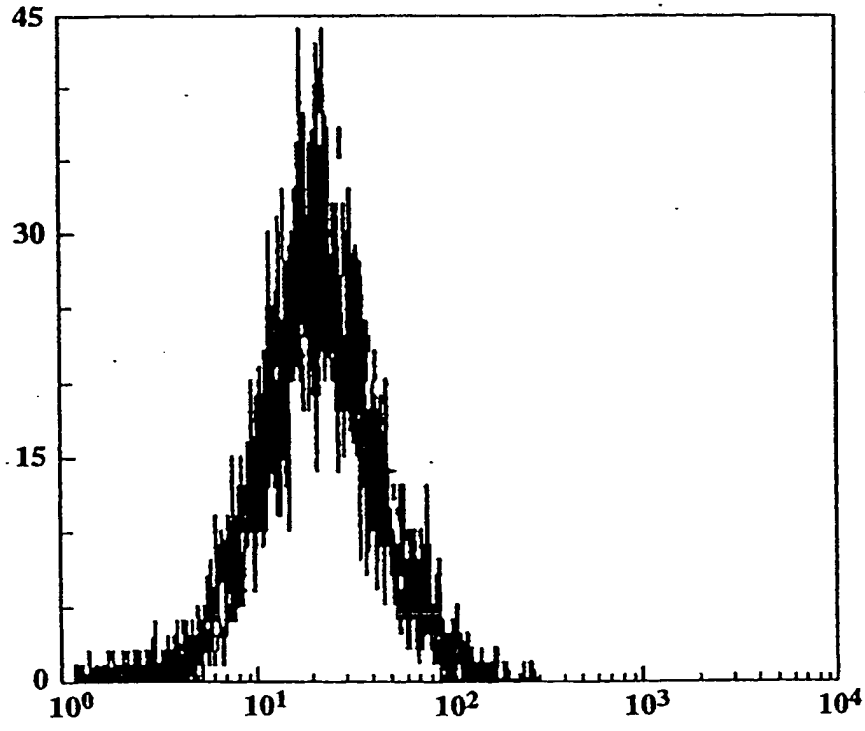


Fig. 11B

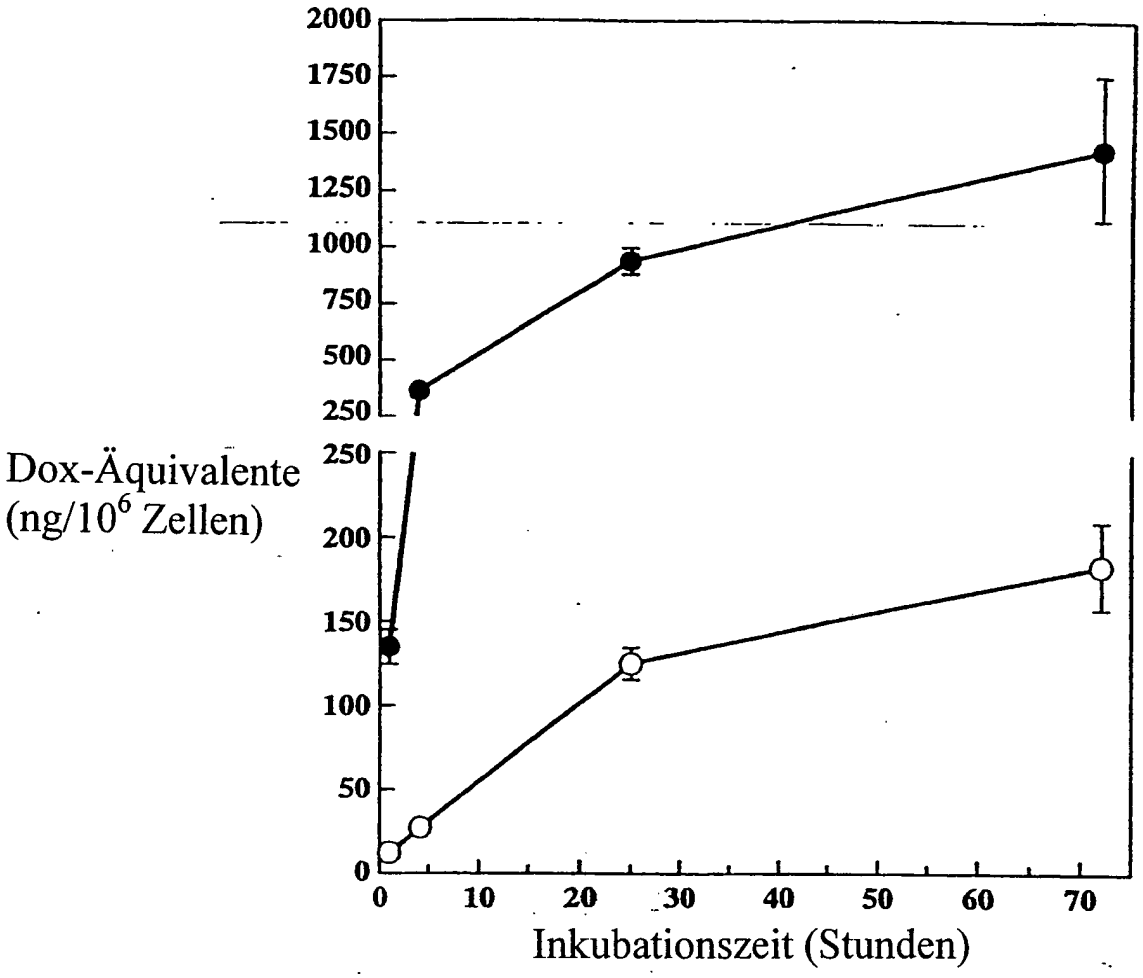

2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
250
200
150
100
50
0
Dox-Äquivalente
(ng/10^6 Zellen)
0
10
20
30
40
50
60
70
Inkubationszeit (Stunden)

Fig. 12

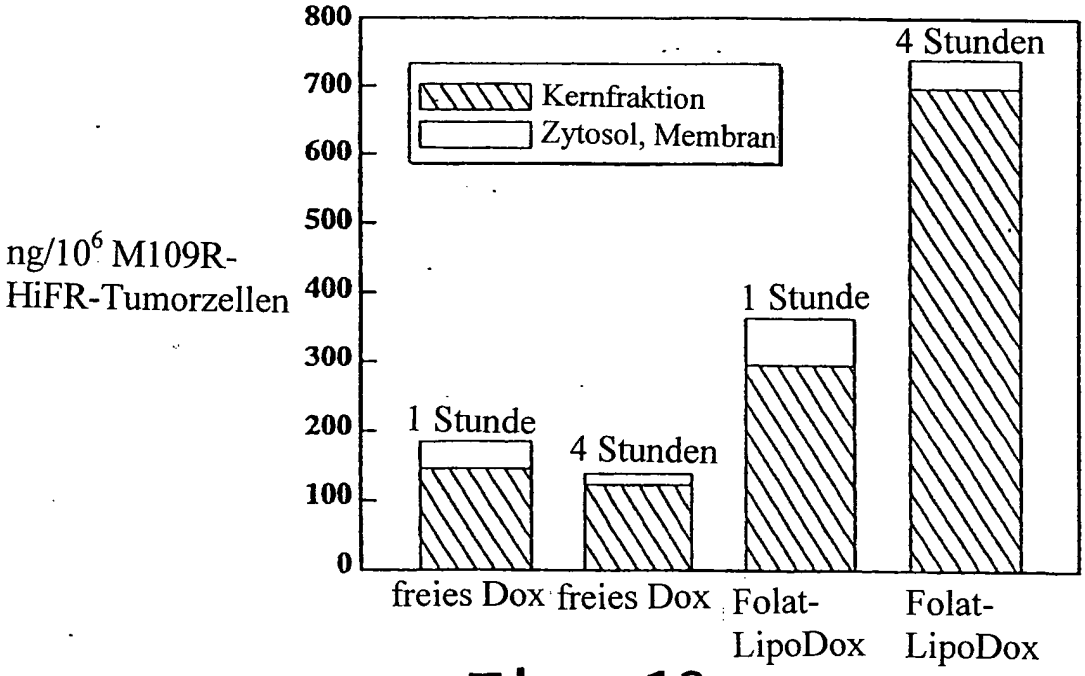

800
700
600
500
400
300
200
100
0
ng/10^6 M109R-
HiFR-Tumorzellen
Kernfraktion
Zytosol, Membran
1 Stunde
4 Stunden
1 Stunde
4 Stunden
freies Dox
freies Dox
Folat-
LipoDox
Folat-
LipoDox

Fig. 13

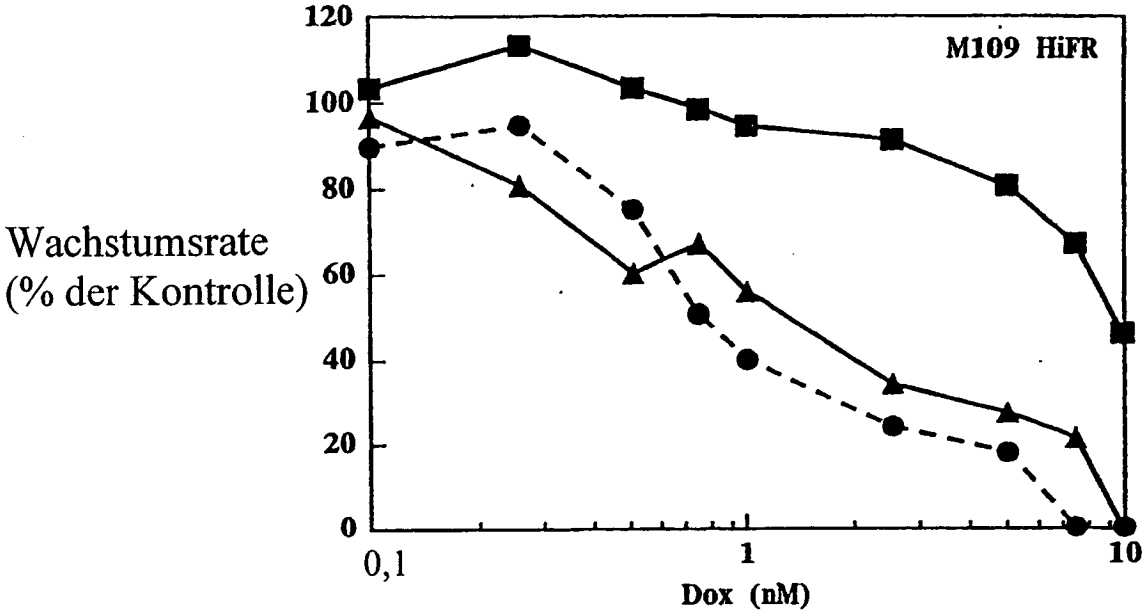


Fig. 14A

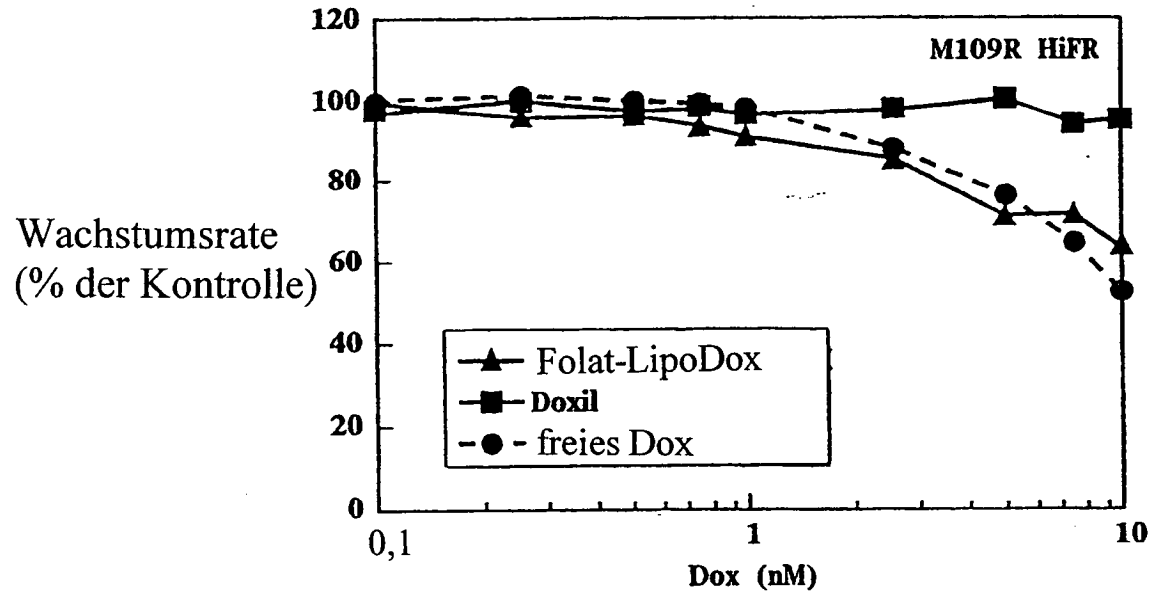


Fig. 14B

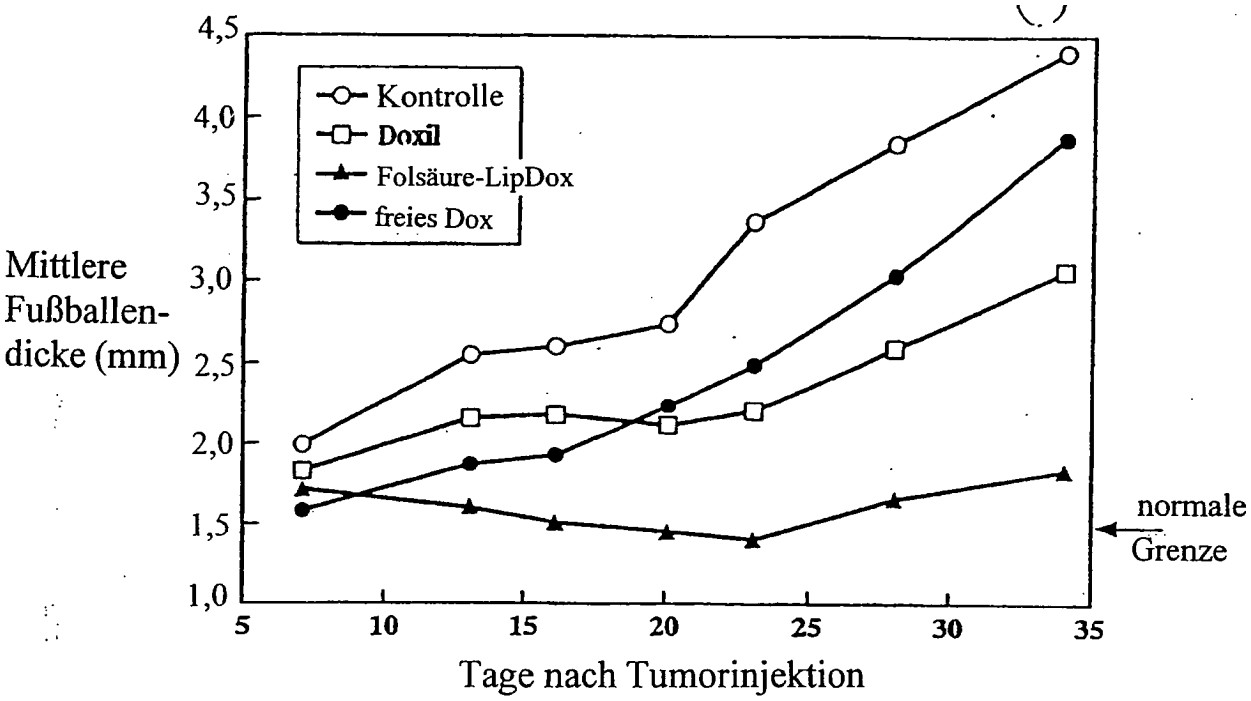


Fig. 15A

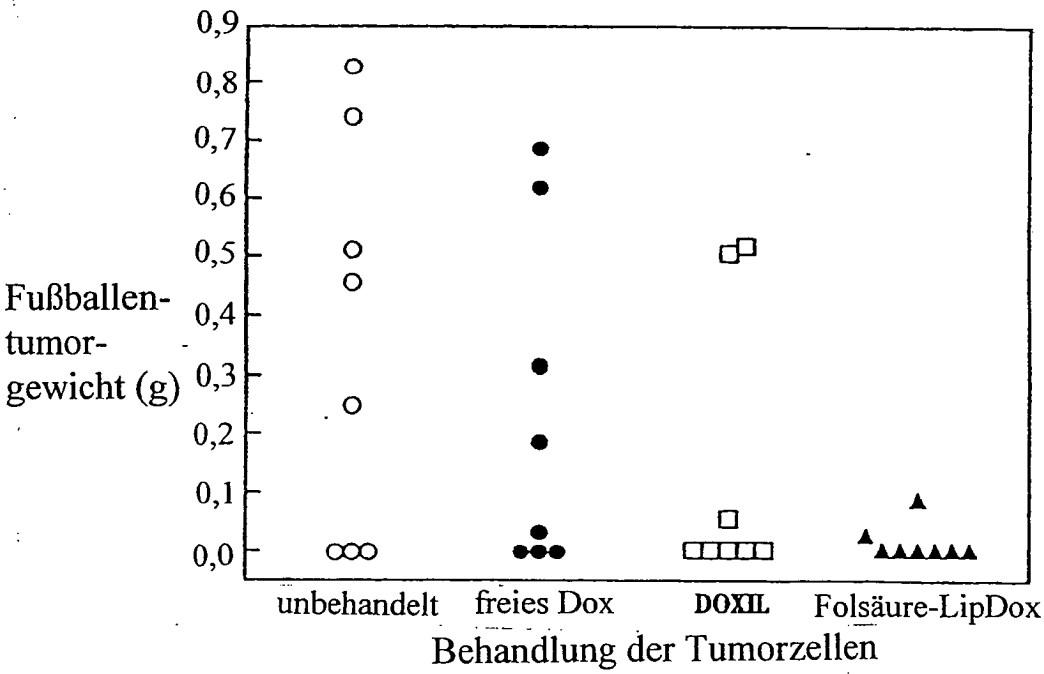


Fig. 15B

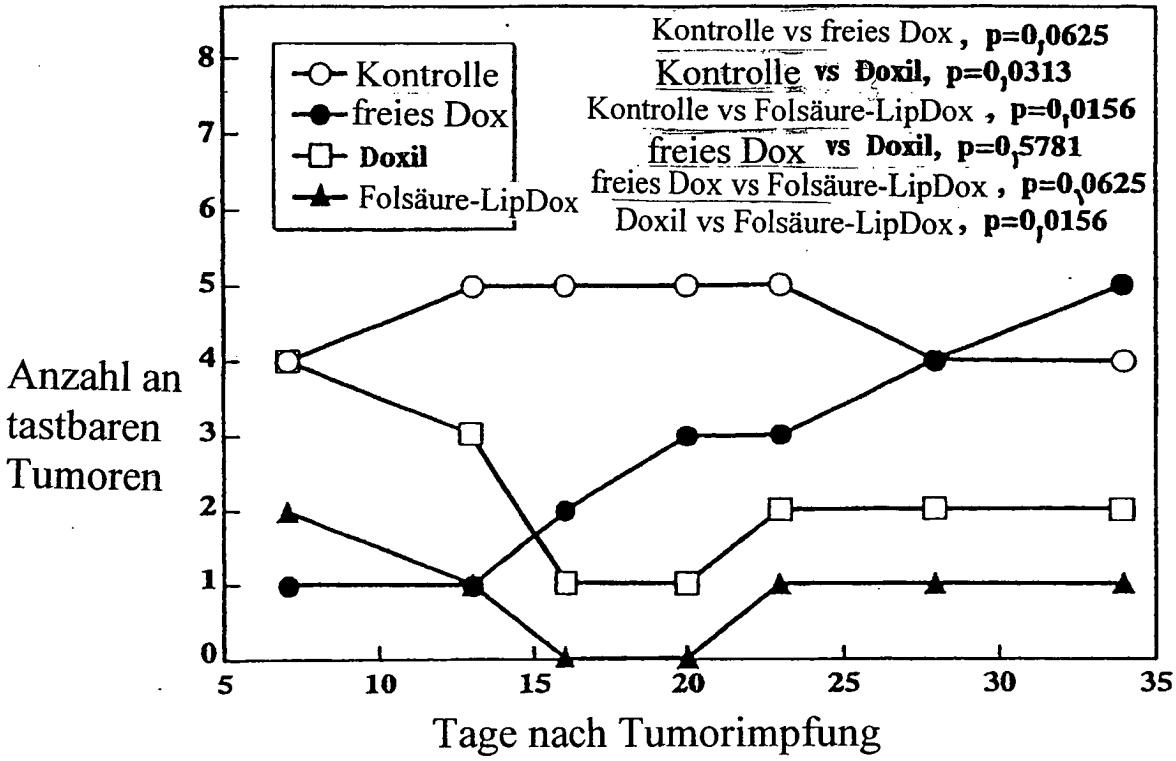

Kontrolle
freies Dox
Doxil
Folsäure-LipDox
Kontrolle vs freies Dox , p=0,0625
Kontrolle vs Doxil, p=0,0313
Kontrolle vs Folsäure-LipDox , p=0,0156
freies Dox vs Doxil, p=0,5781
freies Dox vs Folsäure-LipDox , p=0,0625
Doxil vs Folsäure-LipDox, p=0,0156
Anzahl an tastbaren Tumoren
0
1
2
3
4
5
6
7
8
5
10
15
20
25
30
35
Tage nach Tumorimpfung

Fig. 16