



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Die Entwicklung des Zytostatikums Pixantron“

verfasst von / submitted by

Michaela Semper

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Spreitzer

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit entstand am Department für Arznei- und Naturstoffsynthese der Universität Wien im Zeitraum von Oktober 2015 bis Jänner 2016.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Spreitzer für die Bereitstellung des Themas und Korrektur dieser Arbeit herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie.

Meinen Eltern, welche mich während des gesamten Studiums nicht nur finanziell, sondern auch moralisch unterstützt haben.

Meine beiden Schwestern, die mich während all den Höhen und Tiefen des Studiums immer wieder motiviert und aufgebaut haben.

Ganz besonders will ich mich aber bei meiner besten Freundin, Lisa Rapatz bedanken. Sie steht mir in jeder Lebenslage bei und ich kann mich immer auf sie verlassen. Unsere Freundschaft geht weit über das Studium hinaus und ich bin froh, sie kennen gelernt zu haben.

Danke an meinen Freund, Bernhard Knapp, der mir mit unendlicher Geduld während meines Studiums beiseite gestanden ist und mich in allen Phasen des Studiums unterstützt hat.

Abstract

Anthracycline, wie Doxorubicin und Daunorubicin, werden seit langer Zeit als Antitumorwirkstoffe eingesetzt. Ihr klinisches Potential wird jedoch aufgrund von Kardiotoxizität und Entwicklung von Resistenzen limitiert. Aufgrund dessen, wurden neue carbozyklische Wirkstoffe und eine Serie weiterer heterozyklischer Stoffe, die Aza-Anthracendione, synthetisiert.

Ziel war es, angelehnt an die Anthracendione Mitoxantron und Ametantron, eine neue Generation von Anthracendion-Derivaten mit einer Antitumorwirkung zu synthetisieren. Durch strukturelle Modifikationen am Grundgerüst, als auch an den Seitenketten der Verbindungen, wurde eine unterschiedliche antitumorale Wirkung als auch ein verändertes Nebenwirkungsprofil festgestellt.

Die Verbindung BBR2778, Pixantron, wurde als vielversprechender Wirkstoff in klinischen Studien bei Patienten mit verschiedenen Formen eines Non-Hodgkin Lymphoms, Brustkrebs oder einem kleinzelligen Lungenkarzinom untersucht.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Entwicklung des Zytostatikums Pixantron, beginnend bei den ersten Syntheseschritten bis hin zur Markteinführung, aufzuarbeiten.

The anthracyclines Doxorubicin and Daunorubicin are used in cancer chemotherapy for a long time. Their clinical profile is limited because of cardiotoxicity and resistances. Because of these limiting effects, new carbocyclic and heterocyclic compounds have been synthesized. Leaned on the chemical structures of the anthracendiones mitoxantrone and doxorubicine, a new generation of anthracendiones was created. Due to structural modifications in the basic structure as well as in the side chains of the molecules, differences in antitumor activity and side effects appeared.

The new aza-anthracendion BBR2778, called Pixantron, was selected for further clinical trials in patients with different kind of non-Hodgkin lymphoma, breast cancer or small cell lung cancer.

The aim of this diploma thesis was to work up the development of the new cytostatic drug, Pixantron.

Inhaltsverzeichnis

1. Präklinische Arbeiten	1
1.1. Anthracen-9,10-dione: Synthese und Antitumorevaluation.....	1
1.2. Aza-Anthracendione im Vergleich	2
2. Klinische Phase 1 Studien	4
2.1. Pharmakokinetische Studie von BBR2778	4
2.2. BBR2778 bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren	6
2.3. Pharmakokinetische Ergebnisse	7
2.4. Antitumorwirkung	8
2.5. Klinische Phase-I-Studie bei fortgeschrittenem oder refraktärem Non-Hodgkin Lymphom.....	8
3. Charakterisierung von Anthracendionen.....	9
4. Klinische Phase 2 Studie.....	13
4.1. Klinische Phase-II-Studie von BBR2778 bei Patienten mit rezidivierendem aggressivem Non-Hodgkin Lymphom	13
4.1.1. Allgemeines.....	13
4.1.2. Ergebnisse	14
5. Aktivierung von Pixantron durch Formaldehyd	15
5.1. Allgemeines	15
5.2. Formaldehyd-aktiviertes Pixantron formt kovalent gebundene DNA-Addukte	16
5.3. Zeitliche Labilität der Pixantron-Addukte	19
5.4. Thermische Abhängigkeit.....	20

5.5. Stabilität unter physiologischen Bedingungen	21
5.6. Abhängigkeit vom pH-Wert.....	22
6. Bindung von Pixantron an die DNA	23
6.1. CpG-Methylierung	23
6.2. Bindung an CpA-Dinukleotiden und Bulge-Strukturen.....	24
6.3. Induzierter Zelltod durch mitotische Störungen.....	26
6.4. Bis-Aza-anthracen-9,10-dion.....	29
7. Formulierung eines geeigneten therapeutischen Systems.....	31
7.1. Allgemein.....	31
7.2. Poly(γ -Glutaminsäure).....	32
7.3. In vitro Zytotoxizität.....	34
7.4. Sialinsäure.....	34
8. Anthracycline als Therapie bei Kindern	36
8.1. Allgemein.....	36
8.2. Dexrazoxan	36
8.3. Liposomales Doxorubicin	37
8.4. Präklinischer Test von Pixantron durch PPTP	38
8.5. Präklinische Evaluierung von Pixantron	40
9. Kardiotoxizität	42
9.1. Kardiotoxisches Potential von Pixantron.....	42
9.2. Doxorubicinol	43

10. Therapieansätze von Pixantron.....	45
10.1. Behandlung von Multiple Sklerose mit Mitoxantron und anderen Therapeutika.....	45
10.1.1. Allgemein.....	45
10.1.2. Therapie.....	45
10.1.3. Reduktion der Schwere einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).....	47
10.1.4. Der Effekt von Pixantron auf Immunzellen im Verlauf einer akuten EAE.....	48
10.1.5. Phase-I/II-Studie.....	49
10.1.6. Neue Immunsuppressiva in der MS-Therapie.....	50
10.2. Myasthenia Gravis	52
10.2.1. Allgemein.....	52
10.2.2. Pixantron reduziert den Schweregrad einer experimentellen, autoimmunen MG	52
10.3. Morbus Alzheimer.....	54
10.3.1. Allgemein.....	54
10.3.2. CE Identifizierung.....	55
10.3.3. Thioflavin T – Test.....	58
10.4. Die Rolle von Pixantron in der Therapie eines Non-Hodgkin- Lymphoms.....	59
10.4.1. Einleitung.....	59
10.4.2. Klinische Phase-I/II-Studie bei refraktärem, aggressiven NHL.....	60
10.4.3. Pixantron in Kombination mit Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon.....	61
10.4.4. Pixantron als Primärbehandlung bei aggressivem NHL	62
10.4.5. Pixantron in Kombination mit Rituximab bei rückfälligem, indolentem NHL.....	63
10.4.6. Klinische Phase-III-Studie	64
10.4.7. Pixantron in Kombination mit Fludarabin, Dexamethason und Rituximab	67
10.4.8. Komparative Studie.....	68
10.4.9. Einfluss von Indometacin.....	69
10.4.10. Zusammenfassung.....	70
11. Literaturverzeichnis	72

12. Abbildungsverzeichnis..... 76

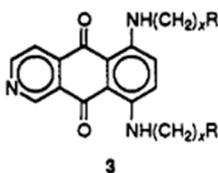
1. Präklinische Arbeiten

1.1. Anthracen-9,10-dione: Synthese und Antitumor-evaluation

Die Arbeitsgruppe von A. Paul Krapcho untersuchte 1993 an der Universität von Vermont, Burlington, die Positionierung des Stickstoffs an verschiedensten Stellen im Anthracen-9,10-dion Grundgerüst. Ziel dieser Forschungsgruppe war es, eine neue Generation von Anthracendion-Derivaten mit Antitumorwirkung zu synthetisieren, angelehnt an die Strukturen von Mitoxantron und Ametantron.

Es wurden Syntheseschritte entwickelt, welche letztendlich eine Reihe von 2-Azaanthracendionen liefern, welche sowohl in vivo als auch in vitro eine ausgeprägte Antitumorwirkung zeigen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Einführung eines Stickstoffes in Position 2 des Anthracendions um den entwickelten Substanzen die notwendige biologische Aktivität und Effizienz zu verleihen.

Vor allem Struktur **3c** aus Abbildung 1, ein gut verträgliches Anthracendion-Analogon, zeigt eine sehr gute antileukämische Wirkung, ähnlich Mitoxantron, mit einer sehr großen therapeutischen Breite.



- | | |
|---|---|
| a: $x = 2$, $R = N(CH_3)_2$ | l: $x = 2$, $R = NHCH_3$ |
| b: $x = 2$, $R = N-O-C_2H_4$ | m: $x = 2$, $R = NHCH_2CH_3$ |
| c: $x = 2$, $R = NH_2$ | n: $x = 2$, $R = NHCH_2CH_2CH_3$ |
| d: $x = 2$, $R = NHCOCH_3$ | o: $x = 2$, $R = NHCH(CH_3)_2$ |
| e: $x = 2$, $R = NHCO_2^tBu$ | p: $x = 2$, $R = N(CH_2CH_3)_2$ |
| f: $x = 2$, $R = NHCH_2CH_2OH$ | q: $x = 2$, $R = N[CH(CH_3)_2]_2$ |
| g: $x = 3$, $R = NH_2$ | r: $x = 2$, $R = N$ |
| h: $x = 4$, $R = NH_2$ | q: $x = 2$, $R = N$ |
| i: side chains = $NHCH_2C(CH_3)_2NH_2$ | t: $x = 3$, $R = N(CH_3)_2$ |
| j: $x = 2$, $R = NHCH_2CH_2OCH_3$ | u: $x = 2$, $R = OCH_2CH_2OH$ |
| k: $x = 2$, $R = N(CH_3)CO_2^tBu$ | |

Abbildung 1: 2-azaanthracen Derivate, A. Paul Krapcho et al, 1994

Die Position des Stickstoffes an Pos.2 ist von großer Bedeutung, da verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, dass die Einführung des Stickstoffes an einer anderen Position eine veränderte Antitumorwirkung ergibt. **3c** (BBR2778) scheint einer der vielversprechendsten 2nd-Generation Anthracendion-Analoga zu werden, die bisher entwickelt wurden. Neben der Aktivität gegen die P388 Zelllinie ist BBR2778 in vitro und in vivo viel effektiver und hat einen besseren therapeutischen Index als Mitoxantron. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass BBR2778 nicht bzw. nur gering kardiotoxisch wirkt und im Vergleich zu Mitoxantron in gleichen Dosierungen, die Zahl der Erythrozyten nicht so stark senkt. BBR2778 ist eine vielversprechende Verbindung. ¹

1.2. Aza-Anthracendione im Vergleich

Aza-Anthracendione sind neue Antitumorstoffe, die sowohl in vitro als auch in vivo gute Aktivität gegen eine große Breite von Tumorzelllinien zeigen. Die möglichen Targets der Anthracendione beinhalten DNA (Interkalation), Topoisomerase-II, Helikasen, Mikrotubuli und Protein C. Die Struktur der Anthracendione zeigt einen flachen, planaren Ring, welcher notwendig ist, um mit den Basenpaaren zu interkalieren. Es wurde eine Vielzahl an Verbindungen synthetisiert und es stellte sich heraus, dass sowohl die Position des Stickstoffs im Grundkörper, als auch die Modifikation der Seitenketten erhebliche Auswirkungen auf eine mögliche Zellschädigung haben. Zur genaueren Untersuchung wurden drei Strukturen ausgewählt BBR 2828, BBR 2778 und BBR 2378.

Die Ergebnisse über Zytotoxizität und DNA-Schäden wurden anhand von Arbeiten mit verschiedenen Zelllinien erhalten, L1210, murine Leukämiezellen, und S180, murine Sarkomzellen.

Es wurde eine über 30fach unterschiedliche Zytotoxizität zwischen BBR2828 und BBR2778 in L1210 und in S180 Zellen beobachtet, aber nur einen 5-10fachen Unterschied in der Stärke mit welcher sie Einzelstrangbrüche hervorrufen.

Durch alkalische und neutrale Elution, sowie durch KCl-SDS Ausfällung wurde festgestellt, dass alle drei Moleküle DNA-Strangbrüche verursachen. Diese Strangbrüche stehen aber nicht in direktem Zusammenhang mit der zellschädigenden Wirkung.

Es wurden signifikante Unterschiede bei den DNA-Strangbrüchen, welche durch diese Stoffe verursacht wurden, festgestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Arten der DNA-Brüche, reagiert auch die „Reparaturmaschinerie“ unterschiedlich. Es wird vermutet, dass der fehlende Zusammenhang von Einzelstrangbrüchen und Zytotoxizität möglicherweise davon abhängig ist, wo im Genom die Beschädigung passiert.

Die wahrscheinlich interessanteste Beobachtung während dieser Forschungsarbeiten war, dass BBR2378 keine Doppelstrangbrüche verursachte, was wiederum Topoisomerase-II als Target für diesen Wirkstoff in Frage stellte. Da es trotzdem zum Absterben der Zellen kommt, müssen andere Mechanismen dafür verantwortlich sein. Diese Hypothese wurde noch dadurch verstärkt, dass nur BBR2378 in CEM/CM-1 Zellen aktiv war. Diese Zellen zeigten eine Kreuzresistenz mit BBR2778 und BBR2828, welche beide als Topoisomerase-II-Inhibitoren bekannt sind.

Nachdem es strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen BBR2778 und BBR2378 gibt, könnte das unbekannte Target von BBR2378 auch ein möglicher Angriffspunkt von BBR2778 darstellen. ²

2. Klinische Phase 1 Studien

2.1. Pharmakokinetische Studie von BBR2778

Die Ziele dieser Phase-I-Studie, durchgeführt von Dawson et al. 2000, waren eine maximale tolerierbare Dosis (MTD) zu bestimmen und ein Toxizitätsprofil von BBR2778 zu erstellen. Weiters sollten die pharmakokinetischen Eigenschaften von BBR2778 bei unterschiedlichen Dosierungen bestimmt werden, um für nachfolgende Phase-II- Studien eine sichere Dosierung zu haben.

Durchgeführt wurde diese Phase-I-Studie als offene, nicht-randomisierte Studie, in welcher eine Dosisescalation bis zur dosislimitierenden Toxizität vorgesehen war. 24 Patienten (10 männliche und 14 weibliche) haben bei dieser Studie teilgenommen. Das Durchschnittsalter lag bei 56 Jahren (Einschlusskriterium war ein Alter von 27-66). Siebzehn Patienten hatten einen Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Status von 0 oder 1, bei den häufigsten Tumorformen handelte es sich um Nierenkarzinome und kolorektale Tumore.

BBR2778 wurde als lyophilisiertes Produkt formuliert, welches in Phiole bei Temperaturen unter -20°C gelagert wurde. Es wurde in 500ml einer 0,9% Natriumchlorid-Lösung verdünnt und als einstündige Infusion in einem Intervall von 21 Tagen verabreicht. Die Initialdosis betrug $20\text{mg}/\text{m}^2$, was 1/10 der murinen letalen Dosis entsprach (LD_{10}). Nachdem drei Patienten erfolgreich damit behandelt wurden, wurde die Dosis in folgenden Intervallen angehoben: 20, 40, 80, 120, 180 und $240\text{mg}/\text{m}^2$.

Dose (mg/m ²)	0	1	2	3	4
No. of patients at each CTC grade (neutropenia)					
20	3				
40	4				
80	2	1			
120	2				1
180	1	1	2	2	
240	1		1		3 ^a
No. of patients at each CTC grade (thrombocytopenia)					
20	3				
40	4				
80	3				
120	3				
180	6				
240	3			1	1

Abbildung 2: Hämatologische Toxizität nach BBR2778 iv., Dawson et al., 2000

BBR2778 wurde im Allgemeinen gut vertragen, es gab einige wenige zytotoxische Vorkommnisse welche als CTC 2.Grades klassifiziert wurden. Andere toxische Nebenwirkungen waren blaue Verfärbungen von Haut und Urin, Alopezie, Stomatitis, Nausea, Erbrechen und Lethargie.

Zusammenfassend ist BBR2778 ein gut verträgliches zytotoxisches Agens mit auftretender Neutropenie als dosislimitierender Toxizität bei einer Dosierung von 240mg/m².

Die vorgeschlagene Dosierung für weiterfolgende Phase-II-Studien liegt bei 180mg/m², welche ebenfalls als einstündige Infusion alle drei Wochen verabreicht werden sollte. BBR2778 stellt somit eine gute Alternative für Doxorubicin dar, da es ein geringeres Risiko für Kardiotoxizität in der Therapie von kleinzelligen Lungenkarzinomen aufweist.

Die Antitumorwirkung von BBR2778 gegen kleinzellige Lungenkarzinome und andere solide Tumore wird in klinischen Phase-II-Studien erwartet.³

2.2. BBR2778 bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren

Diese klinische Phase-1-Studie wurde, von Faivre et al., 2000, in Frankreich mit dem Ziel die maximale tolerierbare Dosis zu definieren, durchgeführt. Weiters sollten dosislimitierende Toxizitäten und das pharmakokinetische Profil von BBR2778 bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren festgestellt werden, um eine adäquate Dosis für weitere Phase-II-Studien vorschlagen zu können. BBR2778 wurde als 30minütige Infusion in drei aufeinander folgenden Tagen, in einem vierwöchigen Zyklus gegeben. Insgesamt wurden dreißig Patienten mit BBR2778 bei Dosierungen von 5 – 150 mg/m²/Woche behandelt. Die Dosislevel 5, 10, 16.5, 25, 37.5, 75, 112.5 und 150mg/m²/Woche wurden jeweils an Patientengruppen, individueller Anzahl und Zyklen, getestet. Die dosislimitierende Toxizität war Neutropenie, welche typischerweise am 14.Tag der Therapie auftrat und sich bis Tag 28 wieder normalisierte. Andere Nebenwirkungen fielen mild bis moderat aus, dabei handelte es sich vorwiegend um Thrombozytopenie, Lymphopenie, Alopezie, Nausea, Erbrechen und blaue Verfärbungen von Haut und Urin. Es wurde keine signifikante Kardiotoxizität beobachtet. Nachdem die maximale tolerierbare Dosis bei 150mg/m²/Woche lag, wurde die Dosierung von 112.5mg/m²/Woche für weitere Studien vorgeschlagen.

2.3. Pharmakokinetische Ergebnisse

Die Plasmakonzentration von BBR2778 nahm nach Beendigung der Infusion sehr schnell ab und bildete eine typische, biexponentielle Kurve.

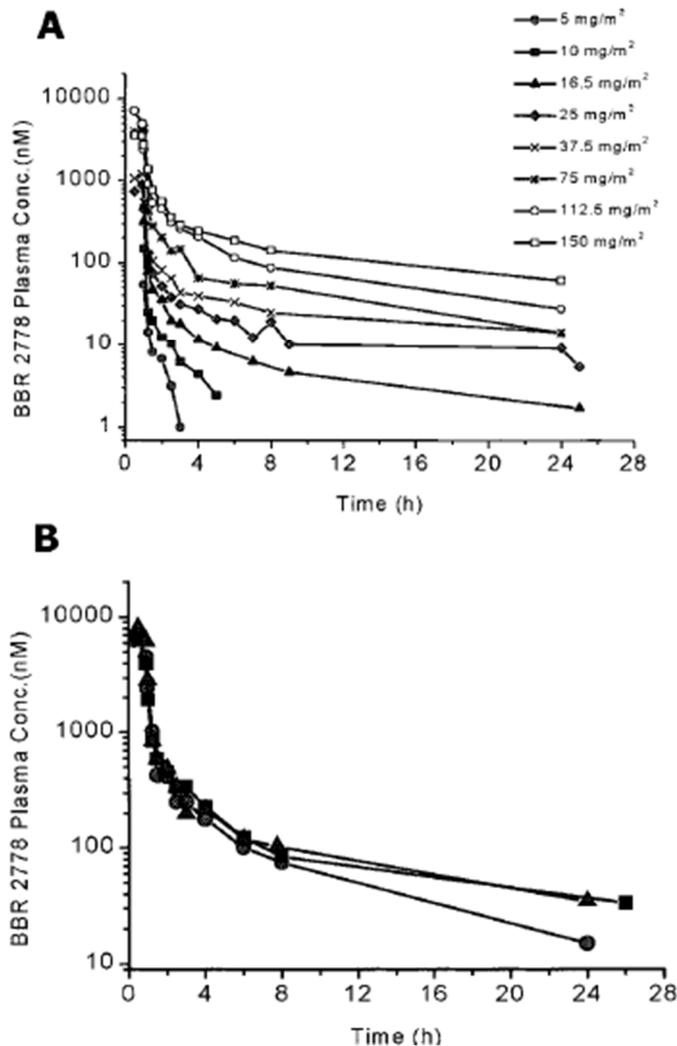


Abbildung 3: A) zeigt eine Konzentrations-Zeit-Kurve für jede einzelne Dosierung und B) drei individuelle Patienten, welche mit der vorgeschlagenen Dosierung von 112.5mg/m²/Woche behandelt wurden, Faivre et al., 2000

Das Medikament zeigt ein hohes Verteilungsvolumen. Es wird eine hohe Penetration von BBR2778 im intra- und extrazellulären Raum und eine Akkumulation im Gewebe erwartet, welche auch den Grund für die anhaltende Blaufärbung von Haut und Urin darstellt, die bei einer Dosierung $\leq 112.5\text{mg/m}^2/\text{Woche}$ beobachtet wurde.

BBR2778 zeigt eine hohe Plasmaclearance und eine lange Eliminationshalbwertszeit. Die renale Elimination des unveränderten BBR2778 spielt nur eine sehr geringe Rolle, viel wichtiger dagegen sind die biliäre Exkretion über die Leber und Verstoffwechslung.⁴

2.4. Antitumorwirkung

BBR2778 zeigt im Bereich von 75-150mg/m²/Woche eine Antitumorwirkung. Die Aktivität wurde bei Patienten mit Brustkrebs, kleinzelligem Lungenkarzinom und einem dermalen Zylindrom beobachtet.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass BBR2778 ein tragbares Toxizitätsprofil aufweist, bei einer Dosierung von 112.5mg/m²/Woche in drei aufeinanderfolgenden Tagen in einem vierwöchigen Zyklus. Es zeigt eine vielversprechende Antitumoraktivität und sollte bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiotoxische Ereignisse angewendet werden.⁴

2.5. Klinische Phase-I-Studie bei fortgeschrittenem oder refraktärem Non-Hodgkin Lymphom

Diese klinische Phase-I-Studie wurde 2001 durchgeführt und auch in dieser Studie war es primär das Ziel, die maximale tolerierbare Dosis (MTD) festzustellen. Weitere Ziele waren, pharmakokinetische Parameter zu definieren und die dosislimitierende Toxizität (DLT), sowie die Antitumorwirkung zu bestimmen. BBR2778 wurde als einstündige, wöchentliche Infusion an Tag 1, 8 und 15 verabreicht. Insgesamt wurden 26 Patienten mit folgenden Dosierungen behandelt: 5, 10, 16.5, 25, 34, 56 und 84mg/m²/Woche.

BBR2778 wurde im Bereich von 5-56mg/m²/Woche gut vertragen, es wurden keine hämatotoxischen Ereignisse beobachtet. Die dosislimitierende Toxizität, Neutropenie, wurde bei einer Dosierung von 84mg/m²/Woche erreicht. In dieser Studie lag die MTD von BBR2778 bei 56mg/m²/Woche, aber für weitere Phase-II-Studien wird eine Dosierung von 84mg/m²/Woche empfohlen, um einer unwirksamen Behandlung vorzubeugen. Diese Dosierung wird bei Patienten mit geringer Vorbehandlung als sicher angesehen.

Die pharmakokinetischen Parameter von BBR2778, welche während dieser Studie festgestellt wurden, sind jenen von Mitoxantron sehr ähnlich. Sie beinhalten ein großes Verteilungsvolumen im Steady State und eine schnelle Plasmaclearance. Die renale Elimination ist mit 3.9% - 7.8% relativ gering, es wird vorwiegend über biliäre Exkretion oder hepatische Metabolisierung verstoffwechselt. Zusätzlich zeigt BBR2778 eine antitumorale Wirkung bei Patienten mit fortgeschrittenen, bereits behandelten oder therapierefraktären Non Hodgkin Lymphomen, welche eine schlechte Prognose zugesichert bekommen haben.

Bei insgesamt drei Patienten wurde eine totale Remission des Tumors festgestellt, bei zwei weiteren eine partielle Remission. ⁵

3. Charakterisierung von Anthracendionen

Die Anthracycline Doxorubicin und Daunorubicin werden seit langer Zeit als Antitumorwirkstoffe eingesetzt. Ihr klinisches Potential wird jedoch aufgrund von Kardiotoxizität und Entwicklung von Resistenzen limitiert. Aufgrund dessen, wurden neue carbozyklische Wirkstoffe synthetisiert, wie zum Beispiel DEH (1,4-bis[(2-aminoethyl)amino]-5,8-dimethyl-9,10-anthracendion) und eine Serie weiterer heterozyklischer Stoffe, die Aza-Anthracendione.

Es gibt einen gravierenden Unterschied in der biologischen Affinität zwischen 1-Aza und 2-Aza-Verbindungen. Nur im 2-Aza-Isomer wurde eine antitumorale Wirkung in vivo festgestellt.

Unter diesen 2-Aza-Molekülen wurden BBR2378 (6,9-bis[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]benzo[g]isoquinoline-5,10-dion) und BBR2778 (6,9-bis[(2-aminoethyl)amino]benzo[g]isoquinoline-5,10-dion) für weitere Studien ausgewählt. BBR2378 besitzt eine terminale, tertiäre Aminogruppe an beiden Seitenkettenarmen, wohin gegen BBR2778 eine terminale, primäre Aminogruppe an beiden Seitenkettenarmen trägt. Diese zwei Moleküle zeigen bei der Gelelektrophorese ähnliche Wanderungstrecken der DNA und haben ein ähnliches Zytotoxizitätsprofil. Ein biologischer Unterschied zwischen den beiden Verbindungen ist, dass BBR2778 eine Kreuzresistenz gegenüber Multi-Drug-Resistant-Zellen (MDR) zeigt, wobei BBR2378 gegenüber diesen Zellen aktiv ist. Der Grund warum BBR2378 aktiv gegen diese Zellen ist und BBR2778 nicht, liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Seitenketten welche mit dem P-Glykoprotein interagieren.

P-Glykoprotein ist ein membrangebundenes Protein, welches eine Vielzahl an Stoffen erkennt und aktiv aus Zellen heraustransportiert und so an der Entstehung von Multidrug-Resistance beteiligt ist.

Mit Hilfe der Photoaffinitätsmarkierungstechnik wurden Interaktionen zwischen einigen Antitumorstoffen und P-Glykoprotein untersucht. Die Photoaffinitätsmarkierung könnte weiters einige grundlegende Veränderungen in den Seitenketten des Moleküls, im Vergleich zur Ausgangsverbindung, mit sich bringen. Um die Auswirkung der Photoaffinitätsproben aufzuklären, wurden die Photoaffinitätsanaloga von DEH und BBR2778, durch Koppelung mit N-hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure über die primären Amino-Seitenketten, synthetisiert.

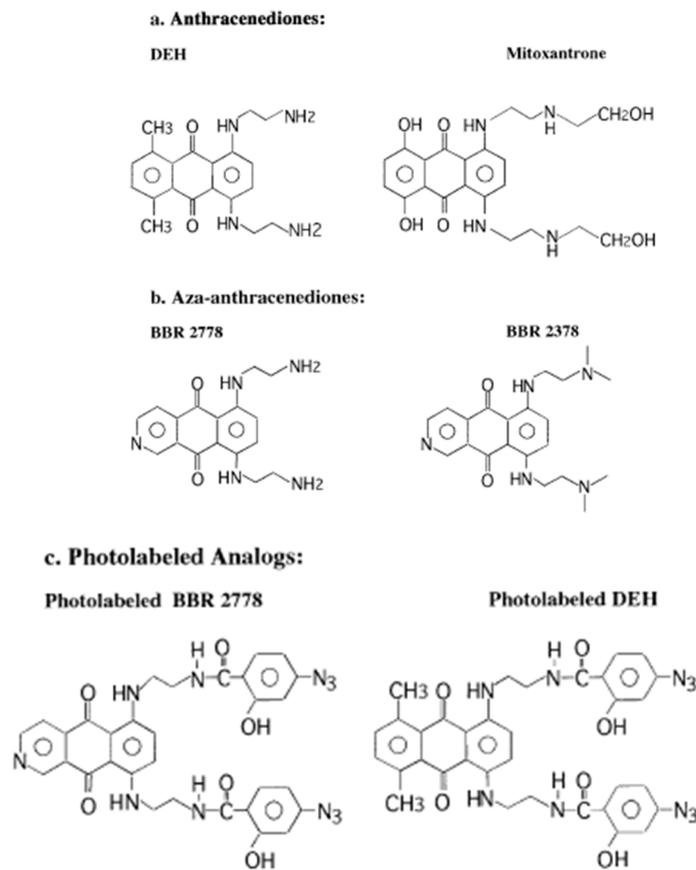


Abbildung 4: Strukturen der Verbindungen, Chou et al., 2001

Die Zytotoxizität aller genannten Verbindungen wurden gegen S180 und resistente S180/A10 Zellen getestet. BBR2778 war die potenteste Verbindung gegen S180 Zellen, zeigte aber gegen die S180/A10 Zellen eine 50-fache Verringerung der Aktivität. Im Vergleich dazu zeigte BBR2378, welches eine terminale, tertiäre Aminogruppe in beiden Seitenketten trägt, nur eine Verringerung um die Hälfte. Mitoxantron zeigte eine relativ hohe Potenz gegen S180 Zellen, zeigte aber eine Kreuzresistenz gegenüber den S180/A10 Zellen.

DEH zeigte nur sehr geringe Aktivität gegen die sensitiven S180 Zellen und keine Aktivität gegen S180/A10 Zellen. Die photomarkierten Analoga von BBR2778 und DEH zeigten keine Zytotoxizität gegen die beiden Zelllinien.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die chemische Struktur der Seitenketten eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Zytotoxizität und Kreuzresistenz spielt.

Nachdem feststeht, dass Mitoxantron, BBR2778 und DEH gegenüber S180/A10 Zellen Resistenzen zeigen, ist es möglich, dass all diese drei Strukturen auch vom P-Glykoprotein erkannt werden. Um die Bindungsaffinität von P-Glykoprotein zu den Strukturen zu messen, wurden die inhibitorischen Effekte der Moleküle gegen das, mit [³H]-Azidopin markierte, P-Glykoprotein untersucht. Vinblastin, ein weiteres Chemotherapeutikum, inhibiert zu 90% die Bindung von Azidopin zu P-Glykoprotein, was wiederum darauf schließen lässt, dass die Bindung von Azidopin spezifisch sein dürfte.

Obwohl BBR2778 und DEH beide zwei primäre Amine in den Seitenketten tragen, zeigt DEH eine Inhibierung von 73% und BBR2778 nur von 2%. Mitoxantron, mit sekundären Amin-Gruppen und einer terminalen Hydroxylgruppe an beiden Seitenketten, zeigt eine 70% Blockierung und das Aza-Anthracendion BBR2378, welches zwei tertiäre Aminseitenketten enthält, zeigt eine Inhibierung von 92%. Die Photoaffinitätsanaloga von BBR2778 und DEH zeigen im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen jeweils höhere Hemmung.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass zwei grundlegende chemische Strukturen notwendig sind, um vom P-Glykoprotein erkannt zu werden: eine aromatische Teilstruktur und ein lipophiler Anteil.

Hier kann das lipophilere Molekül BBR2378 effektiver als BBR2778 um die Bindungsstelle am P-Glykoprotein gegen Azidopin konkurrieren. Das ist ein sehr interessantes Phänomen, da BBR2778 eine hohe Kreuzresistenz gegenüber MDR-Zellen aufweist, wohingegen BBR2378 keine Kreuzresistenz zeigt.

Weiters sehr interessant erscheint die Tatsache, dass die ursprüngliche carbozyklische Verbindung DEH die Bindung von Azidopin an P-Glykoprotein um 73% blockiert, im Vergleich dazu blockiert BBR2778 die Bindung nur um 2%, obwohl die Strukturen der Seitenketten ident sind. Der offensichtliche Unterschied wird somit durch das Chromophor-Grundgerüst ausgelöst. Das lässt darauf schließen, dass

auch die Struktur des Grundgerüsts eine wichtige Rolle bei der Erkennung von P-Glykoprotein spielt. ⁶

4. Klinische Phase 2 Studie

4.1. Klinische Phase-II-Studie von BBR2778 bei Patienten mit rezidivierendem aggressivem Non-Hodgkin Lymphom

4.1.1. Allgemeines

Diese multizentrische, klinische Phase-II-Studie wurde, von Borchmann et al., 2003, gleichzeitig in Deutschland und Frankreich durchgeführt. Das primäre Ziel war, die Wirksamkeit von BBR2778 als alleiniges Agens bei einer Dosierung von 85mg/m², einmal pro Woche, alle drei Wochen, festzustellen. Weiters war die Dauer des Ansprechens und die Sicherheit dieser nichtverblindeten, nichtrandomisierten Studie zu evaluieren. Patienten mit einem aggressiven, rezidivierenden Non-Hodgkin Lymphom, welche der REAL-Klassifizierung („Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms“) zugehören, durften an der Studie teilnehmen. Insgesamt acht Zentren meldeten 33 Patienten zu der Studie an, das durchschnittliche Alter lag dabei bei 66 Jahren (Einschlusskriterium: 24-81). Die Mehrheit der Patienten, insgesamt 24, litt an einem diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), weitere 7 an einem Mantelzell-Lymphom und zwei Patienten litten an einem hochgradigen, folliculären Lymphom. 27 Patienten erhielten die komplette Dosis der geplanten Therapie an den Tagen 1,8 und 15. Bei den restlichen Patienten verzögerten sich die Infusionen an Tag 8 und 15 aufgrund von Hämatoxizität oder eines progressiven Krankheitsverlaufs. Nur 18%, also sechs Teilnehmer, haben den geplanten Ablauf von sechs Behandlungszyklen beenden können, die restlichen Teilnehmer mussten aufgrund der

fortschreitenden Erkrankung, nicht-hämatologischer Toxizitäten, oder in einem Fall aufgrund einer Septikämie, die Therapie vorzeitig beenden.⁷

4.1.2. Ergebnisse

Neutropenie war die am häufigsten beobachtete Hämatotoxizität. Bei insgesamt 19 von 33 Patienten trat eine Neutropenie 3. bzw. 4. Grades auf, dauerte aber im Durchschnitt nur 7,5 Tage (2-54 Tage). Die Dauer der Neutropenie stieg nicht mit der Anzahl der Behandlungszyklen.

Eines der Einschlusskriterien dieser Studie war ein linksventrikuläres Ejektionsvolumen (LVEF) von mehr als 30%, um einer Aufnahme von Patienten mit bestehenden kardialen Beeinträchtigungen vorzubeugen. Bei drei Patienten war ein Abfall von mehr als 10% des LVEF zu beobachten, diese Patienten wurden aber bereits mit Anthracyclinen vorab der Studie behandelt.

Generell wurde BBR2778 gut vertragen, aber das Auftreten einer Kardiotoxizität kann bei älteren Patienten, welche mit Anthracyclinen vorbehandelt wurden, nicht ausgeschlossen werden.

Bei fünf Patienten kam es zu einer kompletten Remission des Tumors, bei weiteren vier kam es zu einem teilweisen Ansprechen der Therapie auf das Tumorwachstum. Die Dauer der ersten Anzeichen eines Ansprechens der Therapie bis zu den ersten Symptomen einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes der Patienten lag ungefähr bei 17 Monaten oder mehr. Von den sieben Patienten mit einem rezidivierenden Mantelzell-Lymphom, kam es nur bei einem Studienteilnehmer zu einer Therapieantwort (komplette Remission für 15 Monate). Bei fünf Patienten wurde eine vorübergehende, aber signifikante Reduzierung des Tumors von >50% beobachtet.

Es ist schwierig, die erzielten Ergebnisse mit anderen Studienergebnissen zu vergleichen, da nur einige wenige Berichte über die Aktivität von Monotherapien vorliegen.

Um das kardiale Risiko weiter abzuklären, sind weitere Studien von BBR2778 gemeinsam mit Mitoxantron oder anderen Anthracyclinen erforderlich.⁷

5. Aktivierung von Pixantron durch Formaldehyd

5.1. Allgemeines

Pixantron interagiert mit der DNA durch Interkalation. Der Wirkstoff fungiert als Topoisomerase-II Inhibitor durch Stabilisierung des transient gebundenen Bindungsprotein-DNA Komplexes, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen steigt. Diese Strangbrüche korrelieren aber nicht ausschließlich mit der Wirksamkeit Pixantrons als zytotoxischer Wirkstoff. Es deutet darauf hin, dass Pixantron durch weitere, noch unbekannte, Wirkmechanismen mit der DNA in Interaktion treten muss. Mitoxantron, welches auch ein Topoisomerase-II Inhibitor ist, kann leicht oxidativ umgesetzt werden und eine reaktive Spezies bilden, welche kovalent an die DNA bindet. Eine Gemeinsamkeit dieser Untersuchungen war, dass jedes dieser oxidativen Systeme Hydrogenperoxid verwendet, aus welchem, in vitro, von vorhandenen Substraten durch Oxidation Formaldehyd generiert werden kann. Man geht davon aus, dass diese DNA-Addukte über sekundäre Aminogruppen einer Seitenkette von Mitoxantron verbunden sind. Obwohl Mitoxantron und Pixantron große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, verfügt Pixantron über eine primäre Aminogruppe in seiner Seitenkette. Deshalb ist es empfindlicher gegenüber einer Aktivierung durch Formaldehyd und dadurch ergibt sich auch ein größeres Potential, DNA-Addukte zu bilden.

Die Basis dieser in vitro geprüften Querverbindungen ist, dass DNA-stabilisierte Addukte die komplette Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) verhindern. Werden diese Proben dann in eine Elektrophorese eingebracht, werden die Banden der dsDNA langsamer wandern als die der einzelsträngigen DNA (ssDNA). Die Stabilisierung

der dsDNA ist eine funktionelle Konsequenz aus der Formation mancher Wirkstoff-DNA Addukte. Deshalb bietet sich der Prozentgehalt der dsDNA als direkte Messmethode für die Wirkstoff-DNA Adduktbildung.⁹

5.2. Formaldehyd-aktiviertes Pixantron formt kovalent gebundene DNA-Addukte

Anfangs war es notwendig zu klären, ob Pixantron, in Gegenwart von Formaldehyd, kovalent an die DNA bindet. Das wurde durch eine Wirkstoff-Konzentrationskurve überprüft. DNA, gewonnen aus *Escherichia coli*, wurde in Gegenwart von Formaldehyd und Phosphatpuffer (pH 7.0) inkubiert. Danach wurden die nicht-kovalent gebundenen Verbindungen entfernt und die Proben bei 52°C mit 60% Formamid für 5 Minuten denaturiert, und anschließend elektrophoretisch getrennt.

Abbildung 6A zeigt, dass die Proben, welche mit Pixantron reagiert haben, einen hohen Prozentsatz an dsDNA, schon bei geringer Konzentration, stabilisiert. Die Quantifizierung der Banden, welche in Abbildung 6B zu sehen sind, zeigt, dass 50% der dsDNA-Stabilisierung bei ~2,5µM Pixantron-Konzentration erreicht wurde. Im Vergleich dazu benötigt Mitoxantron ungefähr um das 10-fache mehr Wirkstoff um ein ähnliches Ausmaß an dsDNA zu stabilisieren.

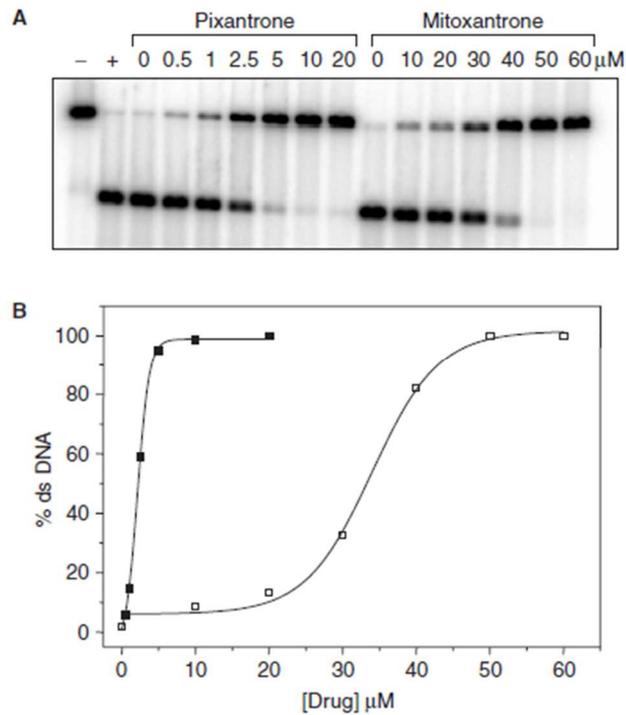


Abbildung 5: Pixantron und Mitoxantron binden in Gegenwart von Formaldehyd kovalent an DNA, Abb. B, schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007

Um zu bestätigen, dass die Pixantron-DNA Interaktion Formaldehyd benötigt, wurde eine Formaldehyd-konzentrationsabhängige Studie durchgeführt. Abbildung 6A zeigt eine deutliche Abhängigkeit von Pixantron gegenüber Formaldehyd bei der Pixantron-DNA Bindung. Durch eine steigende Formaldehydkonzentration, steigt auch die Möglichkeit der Stabilisierung der dsDNA. Wichtig hervorzuheben ist auch, dass in Abwesenheit von Formaldehyd keine DNA-Addukte gebildet wurden, das unterstreicht die Wichtigkeit von Formaldehyd bei der Aktivierung von Pixantron, DNA-Addukte zu formen. Die Quantifizierung dieses Gels (Abb. 6B) zeigt, dass bei 2mM Formaldehyd das Maximum durch Pixantron-DNA stabilisierte dsDNA erreicht wurde. Mitoxantron benötigt ebenfalls Formaldehyd für die Reaktion, aber im Vergleich zu Pixantron viel weniger.⁹

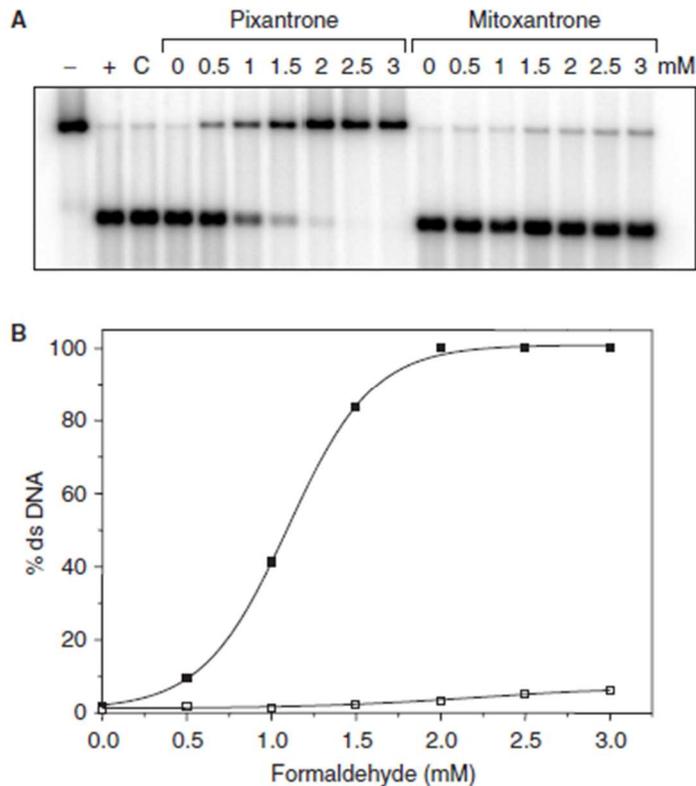


Abbildung 6: Formaldehyd als Anforderung für die Formation von Pixantron-DNA/Mitoxantron-DNA Addukten; schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron
 Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007

Formaldehyd unterliegt einem nukleophilen Angriff durch ein Amin der Seitenketten von Pixantron und formt eine Schiff'sche Base als Übergangsprodukt. Dieses reaktive Zwischenprodukt bietet eine Bindungsmöglichkeit für die DNA und ermöglicht die folgende Bildung eines Pixantron-DNA Addukts.

Die primäre Aminogruppe von Pixantron ist reaktiver als die sekundäre Aminogruppe von Mitoxantron, deshalb wird sie bevorzugt zur Adduktbildung herangezogen. Die primäre Aminogruppe ist nukleophiler und sterisch leichter zugänglich, als die sekundäre.⁹

5.3. Zeitliche Labilität der Pixantron-Addukte

Um die zeitliche Abhängigkeit der Pixantron-DNA Addukte zu messen, reagierten Formaldehyd mit 10 μ M Pixantron oder Mitoxantron miteinander. In Abbildung 7A ist das Ergebnis von Formaldehyd mit Pixantron zu sehen, in 7B das von Formaldehyd mit Mitoxantron. In Abbildung 7A ist weiters zu erkennen, dass die Formation von Pixantron-DNA Addukten ein zeitabhängiger Prozess ist, welches nach ungefähr 4 Stunden ein steady state erreicht. Mitoxantron formt bei äquimolaren Konzentrationen keine Addukte (7B).⁹

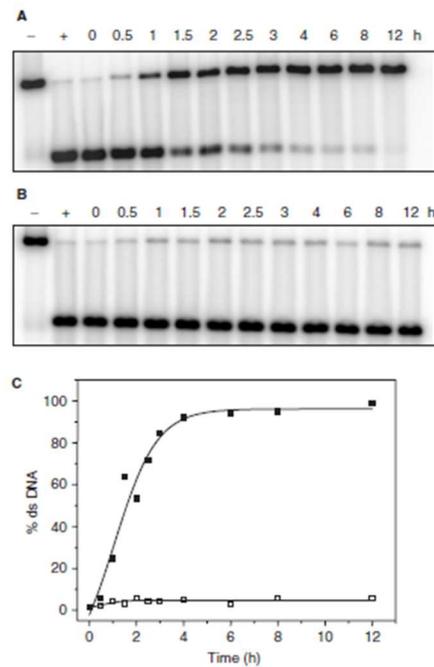


Abbildung 7: Zeitliche Abhängigkeit von Pixantron-DNA Addukten; Formaldehyd wurde entweder mit Pixantron (A) oder Mitoxantron (B) behandelt; (C) quantitative Auswertung als Funktion der Zeit; schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron

Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007

5.4. Thermische Abhängigkeit

Im Hinblick auf die thermische Abhängigkeit reagierten Formaldehyd und Pixantron zu unvollständigen (70-80%) dsDNA Proben, um sie anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen zu inkubieren. Pixantron-DNA Addukte gehen mit zunehmender Temperatur verloren (Abb.8 A+B), was darauf schließen lässt, dass hier eine thermische Labilität vorliegt. Die Quantifizierung von Abb. 8A+B ergibt eine Schmelzkurve. Die Kurve von Pixantron zeigt, dass 50% der DNA-Addukte bei 62,5°C verloren gehen. Im Vergleich dazu, bei Mitoxantron sind 50% bereits bei 49°C nicht mehr vorhanden (Abb. 8C). Pixantron-Addukte haben im Vergleich zum Äquivalent von Mitoxantron eine höhere thermische Stabilität.⁹

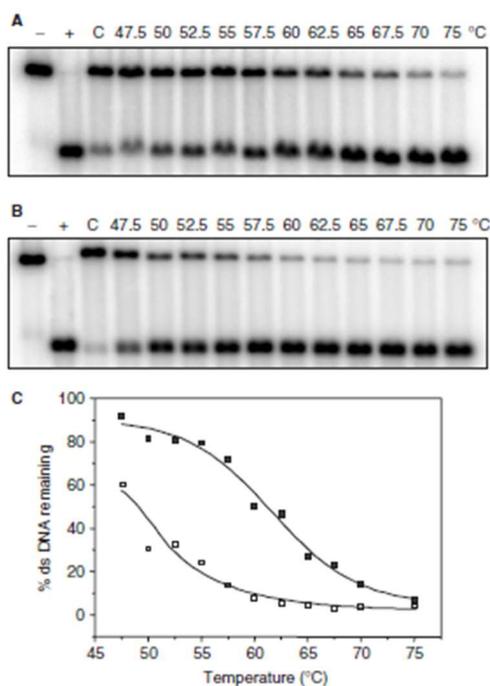


Abbildung 8: Thermische Abhängigkeit der Pixantron (A)/Mitoxantron (B)-DNA Addukte; C: der relative Betrag der dsDNA von A und B als Funktion der Temperatur; schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron

Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007

5.5. Stabilität unter physiologischen Bedingungen

Die Stabilität der Pixantron-DNA Addukte musste auch unter physiologisch relevanten Temperaturen getestet werden. Formaldehyd und Pixantron reagierten zu unvollständigen dsDNA Produkten und wurden für eine bestimmte Zeit bis hin zu zehn Stunden bei 37°C inkubiert. Abbildung 9 A und B demonstrieren das Verhalten von Pixantron und Mitoxantron, mit dem Resultat, dass auch bei 37°C eine thermische Instabilität vorliegt. Pixantron-DNA Addukte zeigen eine Halbwertszeit von 80min bei 37°C und sind somit stabiler als Mitoxantron-DNA Addukte, welche eine Halbwertszeit von 25min bei gleicher Temperatur aufweisen.⁹

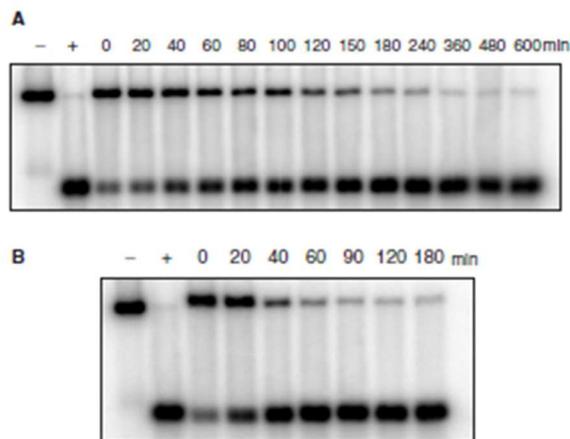


Abbildung 9: Abhängigkeit der Beständigkeit von Pixantron (A) und Mitoxantron (B)-DNA Addukten unter physiologischen Bedingungen;

Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007

5.6. Abhängigkeit vom pH-Wert

Um die Abhängigkeit der Addukte vom pH-Wert zu messen, wurden die Proben jeweils mit 2mM Formaldehyd und entweder 10 μ M Pixantron oder 50 μ M Mitoxantron versetzt und mit Phosphatpuffer auf bestimmte pH-Werte, von 5,3 bis 9 für jeweils vier Stunden, eingestellt (Abb.10 A). Der relative Betrag der dsDNA welche aus den Ergebnissen von Abb. A entnommen wurden, wurde als Funktion des pH-Werts ausgedrückt (Abb.10B).

Es ist anhand dieser Ergebnisse nicht sicher zu sagen, welche der vielen Reaktionsschritte letztendlich für die Bildung eines Addukts verantwortlich ist, aber es liegt wahrscheinlich zum größten Teil daran, dass die sekundäre Aminogruppe im Vergleich zu primären Aminogruppe basischer ist und deshalb eine geringere Nukleophilie aufweist und daher auch bei geringeren pH-Werten weniger gern ein Imin mit Formaldehyd bildet.⁹

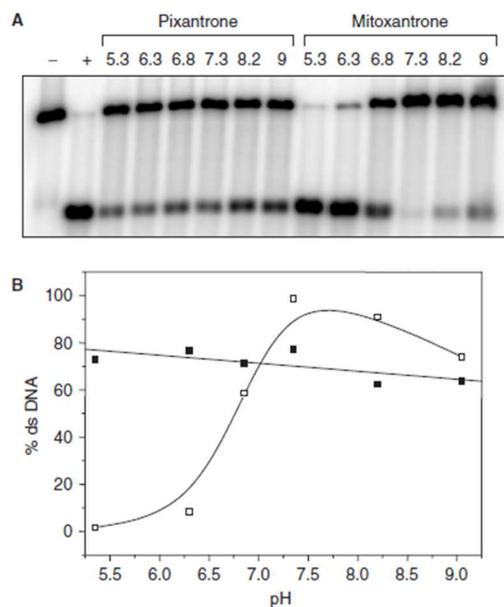


Abbildung 10: pH-Abhängigkeit der Pixantron- /Mitoxantron DNA Addukte; Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch Formaldehyd aktiviertes Pixantron effizienter mit der DNA reagiert und in vitro kovalent gebundene Wirkstoff-DNA Addukte bildet, als Mitoxantron. Dabei weisen die Pixantron-DNA Addukte auch eine höhere Stabilität im Vergleich zu Mitoxantron-DNA Addukten auf. Durch die längere Halbwertszeit von Pixantron könnte auch der Schaden, welche es an der DNA verrichtet, maximiert werden und so die Prozesse wie DNA Replikation und Transkription erheblicher stören. Dadurch würden verstärkt apoptotische Prozesse ausgelöst werden.⁹

6. Bindung von Pixantron an die DNA

6.1. CpG-Methylierung

Formaldehyd-aktiviertes Pixantron alkyliert die DNA selektiv an 5'-CpG- und 5'-CpA-Dinukleotiden. Im Gegensatz zu Pixantron ist der Wirkstoff BBR2378 nicht in der Lage Addukte zu formen, weshalb angenommen wird, dass Pixantron über die primären Aminogruppen der Seitenketten mit der DNA alkyliert. Pixantron generiert diese Addukte jedoch nur, wenn Guanin im Substrat präsent ist. Enthalten die Nukleotide jedoch Inosin, werden keine Addukte gebildet. Das bestätigt, dass die N2-Aminogruppe von Guanin den Angriffspunkt für eine kovalente Bindung darstellt.

DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation des Säugergenoms, welche an jedem Cytosinrest einer CpG-Struktur auftreten kann. Pixantron und Mitoxantron formen um das 2-5fache mehr kovalente Addukte an einer 5'-CpG Sequenz, wenn das Cytosin an Position C-5 methyliert wurde. Das CpG-Doublet ist sowohl das überwiegende Substrat der DNA-Methylierung, als auch das Ziel von einigen DNA-schädigenden Stoffen, wie z.B. Formaldehyd-aktiviertes Pixantron. Bereiche im eukaryotischen Genom, in dem die Dichte von Cytosin und Guanin stark erhöht ist, nennt man CpG-Inseln.

Eine Vielzahl an krebbsrelevanten Genen können durch eine abweichende Methylierung von CpG-Inseln in ihrer Promoterregion inaktiviert werden. Das kann signifikante Folgen bei der Krebsentstehung haben. Jeder Tumortyp hat ein unverkennbares Profil an CpG-Insel-Hypermethylierung. Das erleichtert eine Ansammlung von Biomarkern, welche für Tumorklassifizierung und Diagnose verwendet werden können. Die durch Hypermethylierung-vermittelte Inhibierung von BRCA1, einem DNA-Doppelstrang Reparaturgen, ist sehr häufig in Brust- und Ovarialtumoren zu finden, aber z.B. nicht bei anderen Krebstypen. Die DNA-Methylierungsmuster von unterschiedlichen Krebsarten können möglicherweise auch spezifische Arzneimitteltherapien festlegen. Es ist denkbar, dass CpG-spezifische Wirkstoffe, wie das aktivierte Pixantron, auch abweichende Methylierungsprofile, welche für Krebszellen typisch sind, erkennen können.

Diese Verbesserung ist stark von der Position des Methylsubstituenten abhängig, denn eine Methylierung an anderen Cytosinresten zeigt keinen Anstieg der Pixantron-DNA Alkylierung. Im Gegensatz dazu, nimmt die DNA-Modifizierung durch Formaldehyd-aktiviertes Doxorubicin, durch benachbarte CpG-Methylierung zu. Das weist darauf hin, dass die Bindung durch CpG-Methylierung nicht als eine allgemeine Eigenschaft aller Alkylantien angesehen werden darf.^{10,44,45}

6.2. Bindung an CpA-Dinukleotiden und Bulge-Strukturen

Wenn die Formaldehyd-aktivierten Addukte am N-2 des Guanins gebildet werden, würde man erwarten, dass die kovalente Bindung bevorzugt an der kleinen Furche stattfinden würde. Dadurch würde die aliphatische Seitenkette von Pixantron nahe dem N-2 des Guanins positioniert werden. Eine NMR-Studie, von N. Adnan et al. 2010, zeigte aber, dass Pixantron überwiegend an CpG-Dinukleotiden und methylierten CpG-Dinukleotiden der großen Furche bindet. Beobachtungen von schwachen NOE (Kern-Overhauser-Effekt) der Protonen der Methylseitenkette zu verschiedenen Protonen der

Oligonukleotide der kleinen Furche, lassen darauf schließen, dass ein geringer Teil des Pixantron auch an der kleinen Furche bindet. Das wiederum lässt den Schluss zu, dass der Unterschied der freien Bindungsenergie zwischen der kleinen und der großen Furche relativ gering sein muss.

In der Studie von Konda et al. 2015, wurde die Bindung von Pixantron an drei unterschiedlichen Oligonukleotiden untersucht. Die erste Sequenz, d(TCATATGA)₂, enthält zwei symmetrische CpA-Dinukleotide, das zweite Oligonukleotid, d(CCGAGAATTCCGG)₂ (DB= double bulge), enthält zwei symmetrisch verbundene Adenin-Bulge-Strukturen, welche an ein CpG-Dinukleotid angrenzen. Die dritte Sequenz enthält ein einzelnes Adenin-Bulge-Dinukleotid und ein nicht benachbartes CpG-Dinukleotid, d(TACGATGAGTA): d(TACCATCGTA) (SB=single bulge).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Pixantron bevorzugt an Bulge-Stellen als an CpG-Dinukleotiden bindet. Die Bindung ist wahrscheinlich deshalb begünstigt, da weniger Energie aufgebracht werden muss um eine Einlagerungstasche an einem Bulge zu formen, als im Vergleich zu jener Energie die aufgewendet werden muss, um an einem Duplex mit gewöhnlicher Basenpaarung zu binden. Bulge-Strukturen sind in der RNA weit verbreitet, im Gegensatz zur DNA, wo sie meistens das Ergebnis einer unerwünschten Fehlentwicklung des Duplex sind. Es gibt aber zunehmend Beweise dafür, dass DANN-Bulge-Strukturen Erkennungspunkte für DNA-bindende Proteine darstellen. Sie sind in der Lage, der DNA-Struktur eine gesteigerte Flexibilität zu verleihen, welche dann spezifisch von DNA-bindenden Proteinen erkannt werden.

Es ist aber unwahrscheinlich, dass die Bindung von Pixantron an DNA-Bulge Strukturen in einem signifikanten biologischen Effekt resultiert, da das Vorkommen von DNA-Bulge Strukturen relativ selten ist. Viel mehr dürfte die RNA ein wichtiges Ziel für Pixantron darstellen.^{11,45}

6.3. Induzierter Zelltod durch mitotische Störungen

Pixantron inhibiert die Topoisomerase-II Aktivität und interkaliert mit der DNA. Der exakte Mechanismus der Auslösung des Zelltods bleibt aber noch unklar. Neil Beeharry et al. untersuchten 2015 den Effekt von Pixantron auf soliden Tumorzellreihenplatten, um den Mechanismus des Zellsterbens besser zu verstehen.

Störungen in der Dynamik des Zellzyklus treten häufig in den Zellen auf, welche mit Wirkstoffen behandelt wurden, die mit der DNA interagieren. Die Aktivierung von komplexen biochemischen Reaktionen bewahren die Zellen, welche DNA-Schäden aufweisen, in die Mitose einzutreten. Diese Zellzyklus-Checkpoints dienen als „Wachmechanismus“ und achten auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Wird der Schaden an der DNA behoben, wird der Stillstand des Zellzyklus wieder aufgehoben und die Zellzyklus-Progression wird fortgesetzt. Ein anhaltender DNA-Schaden resultiert letztendlich im Zelltod.

Der Effekt von Pixantron auf die Zellproliferation wurde gegen eine Vielzahl von soliden Tumorzelllinien getestet. Zu den getesteten Zelllinien zählen Brustkrebszelllinien (MCF7, T47D, MCF10A), Pankreasadenokarzinom-Zelllinien (PANC1) und Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR5, OVCAR10, PEO1). Diese Zellen wurden für 72 Stunden mit Pixantron oder Doxorubicin behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass Pixantron die Proliferation nicht sehr stark beeinträchtigt. Eine klonogene Prüfung wurde durchgeführt, um eine chronische Behandlung mit anschließender Wirkstoffkarenz in einem in vivo Modell zu testen. Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pixantron behandelt und danach ausgewaschen. Sie wurden neun Stunden ohne Wirkstoff inkubiert und die überlebenden Kolonien wurden fixiert, gefärbt und quantifiziert. Pixantron reduziert dosisabhängig die Kolonienbildung in allen getesteten Zelllinien. Die gleiche Methode wurde verwendet, um das Verhalten der Zellen gegenüber Doxorubicin zu untersuchen. Die

Ergebnisse zeigten, dass die Zellen 4.5-18.5fach so empfindlich gegenüber Doxorubicin sind, siehe Abb 11.

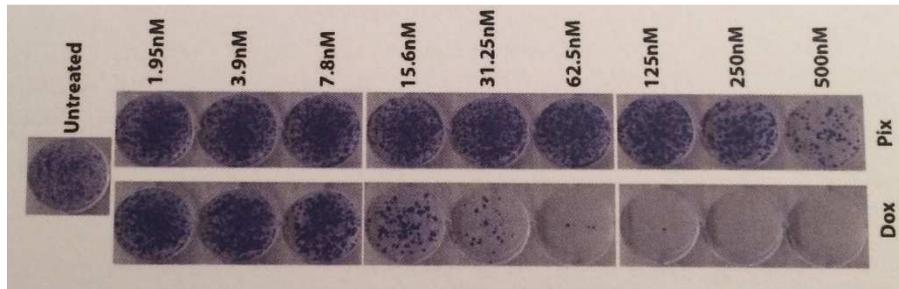


Abbildung 11: Zellplatten mit Pixantron (Pix) oder Doxorubicin (Dox) behandelten Zellen, Beeharry et al., 2015

Weiters wurde beobachtet, dass die Konzentrationen von Pixantron, welche zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens führen, auch einen Einfluss auf den Zellzyklus haben. Die Zelllinie T47D ist die empfindlichste gegenüber Pixantron, mit einem IC_{50} -Wert von 37.3nM, und zeigt auch in Zellzyklusstudien die höchste Sensibilität. Es kommt zu einer Reduzierung der G1-Fraktion bei 50Nm und zu einer gesteigerten G2/M – Fraktion über 1000Nm.

MCF-10A und OVCAR5 Zellen zeigen nur eine gemäßigte Empfindlichkeit gegenüber Pixantron (IC_{50} = 126nM und 136nM) aber weisen ein eindeutiges Zellzyklusprofil auf. MCF10A Zellen unterliegen einem G1-vermittelten Arrest bei Konzentrationen von >100nM, während OVCAR5 Zellen eine minimale Zellzyklusstörung bei 200Nm zeigt. PANC1 Zellen unterliegen, bei Behandlung mit Pixantron bei einer Konzentration von 100nM, keinen offensichtlichen Veränderungen im Zellzyklus.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Pixantron-vermittelte Reduktion des klonogenen Überlebens nicht vollständig durch die Fähigkeit von Pixantron, den Zellzyklus zu beeinflussen, erklärt ist.

Weiters wurde gezeigt, dass Pixantron, bei Konzentrationen welche das klonogene Überleben um ungefähr 75% reduzieren (100nM), keine DNA Schäden induziert. Das wurde durch das Fehlen von γ -H2AX - oder RPA Foci nachgewiesen. Bei γ -H2AX handelt es sich um ein

phosphoryliertes Histon, welches sich um Doppelstrangbrüche der DNA ansammelt. Anhand eines Comet Assay wurde auch keine Zunahme des Olive Tail Moments (Kometenschweif) beobachtet. Ein Anstieg der Konzentration von Pixantron um das Fünffache, induziert aber γ -H2AX Foci und eine Zunahme des Olive Tail Moments. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Pixantron ab Konzentrationen welche bereits toxisch wirken, DNA Schäden induziert.

In diesen Untersuchungen wurde eine Live-Cell Video-Mikroskopie durchgeführt, welche demonstriert, dass mit Pixantron-behandelte Zellen dazu fähig sind, die Mitose zu betreten und zu verlassen.

Es gab während der Mitose einen Anstieg von Chromosomenbrücken, ein Defekt bei dem Schwesternkinetochore bei den Mikrotubuli an beiden Polen angeheftet sind. Diese fehlerhafte Anheftung wird von mitotischen Checkpoints nicht erfasst.

Wird Pixantron zu mitotischen Zellen hinzugegeben, verursacht es keine Brückenbildung. Um Brücken auszubilden, muss es deshalb schon während der Interphase anwesend sein. Das bedeutet wahrscheinlich, dass der mitotische Defekt aus Störungen während der Interphase resultiert, welche für Zentromere und Kinetochore entscheidend sind. Interessant ist aber, dass das Vorkommen von diesen Brücken nicht unmittelbar im Zelltod endet, aber es entstehen Mikrokerne, wenn Chromosomen während dem Mitoseende decondensieren.

Die Ausbildung von Pixantron-induzierten Mikrokerneln hat zwei wesentliche Auswirkungen. Zellen, welche Mikrokerne tragen, generieren häufig Tochterzellen, welche ebenfalls Mikrokerne ausbilden. Dadurch würden vielkernige Zellen entstehen. Diese vielkernigen Zellen beeinträchtigen die Lebensfähigkeit der Zellen und führen zu apoptotischem Zelltod. Weiters wird die Identifikation von Mikrokerneln als Biomarker verwendet, um die Wirksamkeit einer Strahlentherapie bei Krebs zu bewerten. Deshalb ist es möglich, dass die Identifikation von Mikrokerneln auch als hilfreicher Biomarker dient, um die Wirksamkeit von Pixantron zu bestimmen.

Während bei Pixantron-behandelten Zellen keine γ -H2AX Foci im Hauptkern zu finden sind, werden sie in Mikrokernen sehr häufig entdeckt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Pixantron einen latenten DNA Schaden anrichtet, der die Genauigkeit der Mitose beeinträchtigt, ohne aber die DNA-Schadensantwort auszulösen oder mitotische Checkpoints zu aktivieren. Nach einigen Durchläufen von abweichenden Zellteilungen ist es aber für die Zellen letztendlich tödlich. Pixantron-induzierter Zelltod ist also von der Zellteilung abhängig.^{52,8}

6.4. Bis-Aza-anthracen-9,10-dion

Antonini et al., synthetisierte 2008 eine Reihe von symmetrischen Bis-Derivaten, siehe Abb. 12. Diese Stoffe sind Dimere von verschiedenen Aza-Anthracendionen und Aza-Anthrapyrazolone, welche durch einen geeigneten Linker, einem Polyamin, miteinander verbunden werden. Die Bindungseigenschaften der neu synthetisierten Wirkstoffe wurden anhand fluorimetrischer Techniken untersucht. Es stellt sich heraus, dass diese Verbindungen exzellente DNA-Liganden sind, welche eine Bindungspräferenz für AT-reiche Duplices aufweisen. Sie zeigen eine hohe DNA-Affinität und eine längere Verweildauer in der DNA, im Vergleich zu den monomeren Ausgangsverbindungen.

Die zytotoxische Aktivität der Verbindungen **7-10** und von der Referenzsubstanz Pixantron (s. Abb. 12), wurde in vitro an der humanen Adenokarzinomzelllinie HT29 untersucht. Die Verbindungen **7** und **9** zeigen eine starke krebshemmende Wirkung. Die ausgewählten Dimere **7a** und **9a** werden als neue Derivate in der Krebstherapie in Betracht gezogen. Speziell Verbindung **9a** zeigt eine sehr starke zytostatische und zelltötende Wirkung. Diese frühe und verbesserte zytostatische Wirkung von Substanz **9a**, im Gegensatz zu **7a**, könnte das Resultat aus einer starken Hochregulierung von proapoptischen Genen und einer gleichzeitigen Runterregulierung von Überlebensgenen sein. Die Veränderungen der Regulierung dieser

Gene sensibilisiert die Karzinomzellen HT29 auf apoptotische Reize. Verbindung **9a** sollte in präklinischen Studien weiter evaluiert werden, da es in einer Kombinationstherapie, durch Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Chemotherapie, sehr nützlich sein könnte.⁵³

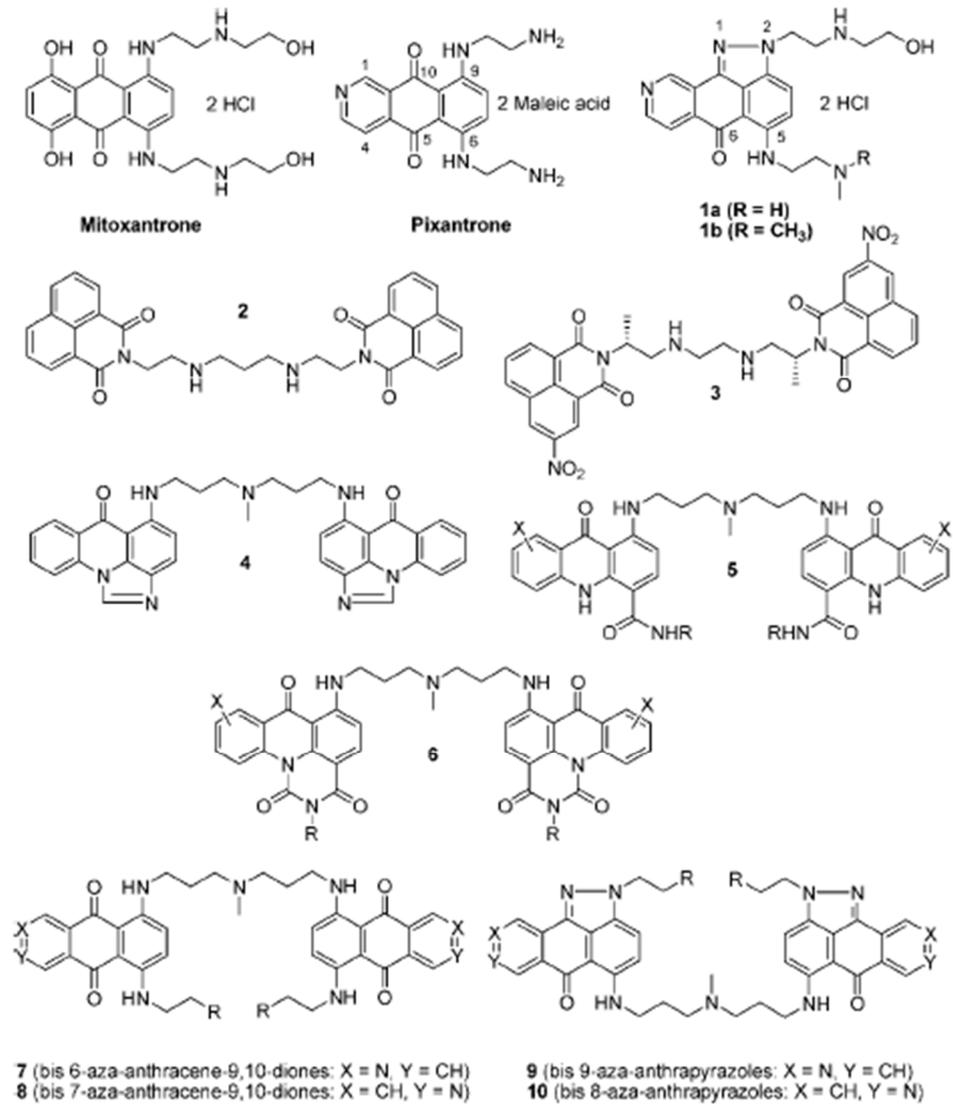


Abbildung 12: Strukturen von Mitoxantron, Pixantron und den neusynthetisierten dimeren Verbindungen, Antonini et al., 2008

7. Formulierung eines geeigneten therapeutischen Systems

7.1. Allgemein

Ein effektives Wirkstoffapplikationssystem kann für gewöhnlich eine therapeutische Substanz in den Körper einführen, seine Wirksamkeit und Sicherheit durch kontrollierte Gabe und Elimination verbessern und unerwünschte Wirkungen verhindern. Über die letzten Jahrzehnte, wurde eine Vielzahl an therapeutischen Systemen genutzt, wie Mizellen, Liposome, Prodrugs, Hydrogele und Nanopartikel. Die meisten dieser therapeutischen Formulierungen müssen intravenös verabreicht werden, was wiederum Schmerzen und eine Infektionsgefahr für die Patienten darstellt. Als Alternative erlangten orale therapeutische Systeme aufgrund ihrer Einfachheit, Sicherheit und wirtschaftlichen Kriterien, immer mehr an Attraktivität. Das vielversprechendste therapeutische System für orale Chemotherapeutika sind polymere Nanopartikel (NP). Wenn wirkstoffbeladene polymere NP oral verabreicht werden, gelangen sie über lymphatisches Gewebe und Transport zum Darmlumen, zu intraepithelialen Lymphozyten und durch das Lymphsystem in den Blutkreislauf. Die NP können bevorzugt in Tumoren, aufgrund des EPR-Effekts (= erhöhte Permeabilität und Retention), akkumulieren. Dabei wird der Wirkstoff in die Tumorzellen internalisiert und freigesetzt, es kommt zu einer krebsspezifischen Apoptose durch die spezielle Interaktion des Wirkstoffs mit den Tumorzellen.

Die praktische Anwendung dieser NPs wurde aufgrund komplizierter Herstellungsprozesse und der dabei verwendeten, schädlichen organischen Lösungsmittel, beeinträchtigt. Supramolekularer Selbstzusammenbau wurde zu einem wertvollen Werkzeug, welches in biomedizinischen Bereichen in den letzten Jahren angewandt wurde. Es beinhaltet nicht-kovalente intermolekulare Wechselwirkungen (WW),

wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Van der Waals WW, π - π und elektrostatische WW.¹⁶

7.2. Poly(γ -Glutaminsäure)

Poly(γ -Glutaminsäure) (γ .PGA) ist ein hydrophiles, biologisch abbaubares und natürlich verfügbares Biopolymer, welches in biomedizinischen Bereichen, wie z.B. Gentherapie und Gewebezüchtung weitverbreitet eingesetzt wird. Aufgrund seiner hervorragenden biologischen Abbaubarkeit, Bioverträglichkeit und nichtimmunogener Eigenschaften, qualifiziert es sich als wichtiges Biomaterial in Wirkstoffapplikationssystemen.

γ -PGA wurde ausgewählt, um mit Pixantron einen Komplex zu bilden und Pixantron/ γ -PGA-NPs zu produzieren. Dieser Komplex kommt durch elektrostatische WW zwischen der anionischen Carboxylgruppe von γ -PGA und der kationischen Amino-Gruppe von Pixantron in Wasser zustande. Ziel ist es, ein auf γ -PGA basierendes Wirkstoffapplikationssystem für das Zytostatikum Pixantron zu generieren. Aufgrund der starken negativen Ladung von γ -PGA wird eine sehr effektive Selbstassemblierung des Komplexes zwischen γ -PGA und Pixantron erwartet. Pixantron/ γ -PGA-NPs werden erhalten, wenn man die positiv geladene, wässrige Lösung von Pixantron (0.558mg mL^{-1}) mit der negativ geladenen, wässrigen Lösung von γ -PGA (0.129mg mL^{-1}) unter leichtem Rühren, bei Raumtemperatur mischt. Zieht man einige wichtige Faktoren in Betracht, wie Größe, Stabilität und dynamische Lichtstreuung, werden die Pixantron/ γ -PGA-NPs mit einem Lösungsvolumenverhältnis ($\text{SVR}_{\text{Pix}/\gamma\text{-PGA}}$) von 1:2 für ein Wirkstoffapplikationssystem-Modell ausgewählt. Um die Applikation von Pixantron/ γ -PGA-NPs als orales Chemotherapeutikum zu ermöglichen, muss die Wirkstofffreisetzung bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen werden. Dafür wurde ein Phosphatpuffer (pH 7.4 und 6.6) und ein Acetatpuffer (pH 2.6) verwendet um den pH-Wert des GI-Traktes zu simulieren. Abb. 13 zeigt das Verhalten der Freisetzung

von Pixantron aus den Nanopartikeln bei unterschiedlichen pH-Werten der Lösungen.¹⁶

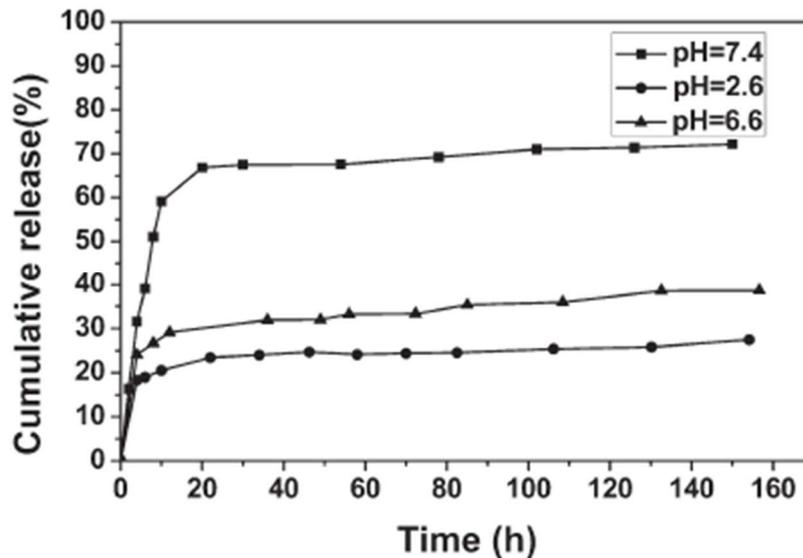


Abbildung 13: Freisetzungsprofil von Pixantron aus Pixantron/ γ -PGA NPs bei 37°C und unterschiedlichen pH-Werten; Meng et al., 2012

Alle *in vitro* Freisetzungsprofile zeigen einen initialen Freisetzungsimpuls, gefolgt von einer langsameren, konstanten Freisetzung. Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, schwankt diese initiale Freisetzung bei unterschiedlichen pH-Werten, z.B. beträgt die Wirkstofffreisetzung in den ersten zehn Stunden 59.1%, 28.5% und 20.% bei pH-Werten von 7.4, 6.6 und 2.6. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität von Pixantron/ γ -PGA-NPs vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Das ist nützlich für die orale Chemotherapie, da der pH-Wert in der Umgebung des GI-Traktes sukzessive von sauer, im Magen, auf leicht alkalisch, im Dünndarm, ansteigt. Durch perorale Applikation bleiben die Nanopeptide im sauren Milieu des Magens vorerst stabil und zerfallen anschließend in der alkalischen Umgebung des Darms. Durch die pH-gesteuerte Wirkstofffreisetzung sind die Pixantron/ γ -PGA Nanopeptide eine passende Formulierung für eine Krebsbehandlung durch orale Chemotherapie.¹⁶

7.3. In vitro Zytotoxizität

Die mögliche Toxizität von γ -PGA als Wirkstoffapplikationssystem wurde evaluiert. Die reaktive Zytotoxizität von γ -PGA wurde durch die Prüfung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) auf das Überleben von NIH/3T3 Zellen, eine embryonale fibroblastische Mauszelllinie, bestimmt. Das relative Zellüberleben liegt über 65%, auch wenn die Konzentration von γ -PGA bis zu $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ ansteigt. Daher ist es als Wirkstofftransporter sehr gut geeignet. Zusätzlich wurde auch das Überleben der Zellen nach Behandlung mit Pixantron/ γ -PGA NPs, sowie auch mit Pixantron alleine, getestet. Pixantron/ γ -PGA zeigt eine geringere Zytotoxizität als Pixantron alleine. Das könnte man auf die Neutralisation der Aminogruppen von Pixantron durch γ -PGA in den Pixantron/ γ -PGA NPs zurückführen.¹⁶

7.4. Sialinsäure

Sialinsäure ist ein Oberbegriff für die N- oder O-substituierten Derivate der Neuraminsäure. Die Sialinsäure ist ein wichtiges Kriterium bei der Tumorentwicklung und ihre Rezeptoren werden sehr stark auf tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) exprimiert. TAMs verbessern durch verschiedene Mechanismen die Krebsproliferation, Invasion und Metastasierung. Extensive TAM Infiltration korreliert mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten. Bei Säugetieren werden sialinsäurebindende Rezeptoren vermehrt auf der Oberfläche von TAMs exprimiert.

In der Studie von She et al., 2014, wurde versucht, den therapeutischen Effekt von Pixantron zu verbessern und die systemischen Nebenwirkungen zu reduzieren. Herkömmliche und pegylierte Liposome, welche mit Pixantron beladen sind, wurden entwickelt. Um die Antitumorwirkung von Pixantron zu verbessern, wurde ein Sialinsäure-Octadecylamin-Konjugat synthetisiert und auf die Oberfläche von Liposomen, welche mit Pixantron beladen sind,

aufgebracht. Die Parameter Wirkstoffbeladung, Stabilität, in vitro Freisetzung, Zytotoxizität und die Pharmakokinetik wurden evaluiert. Dieses modifizierte Pixantron-Liposom maximierte nicht nur die Überlebenszeit der behandelten Mäuse, sondern unterdrückte auch das Tumorstadium stärker als die Behandlungsgruppen, welche mit einer Kontrolllösung, der Pixantronlösung, dem herkömmlichen Liposom oder dem pegylierten Liposom behandelt wurden. Das krebsartige Gewebe wurde von den Tieren, welche mit dem modifizierten Pixantron-Liposom behandelt wurden, abgestoßen und die Wunden heilten langsam ab.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Sialinsäure-Octadecylamin-Konjugat ein vielversprechendes Ausgangsmaterial für die Formulierung von liposomalen Pixantron mit verbesserter Sicherheit und Antitumoraktivität, darstellt.¹⁷

8. Anthracycline als Therapie bei Kindern

8.1. Allgemein

Anthracycline spielen in der Krebstherapie von Kindern eine zentrale Rolle, bringen aber ein steigendes Risiko kardialer Dysfunktionen mit sich. Einige Behandlungsstrategien haben gezeigt, dass durch eine Vorbehandlung mit dem Eisenchelatbildner Dexrazoxan die Anthracyclin-induzierte Kardiotoxizität reduziert werden kann. Es wurde auch ein Fokus auf die Weiterentwicklung von Methoden gelegt, um die Toxizität der Ausgangsverbindungen zu senken, z.B. der Transport des Wirkstoffs als Liposom. Weiters wurde auch nach Anthracyclinderivaten geforscht, welche eine geringere Kardiotoxizität aufweisen sollten, wie z.B. Amrubicin und Pixantron.¹⁸

8.2. Dexrazoxan

Dexrazoxan ist ein Bisdioxopiperazin, welches ursprünglich, aufgrund der Hemmung von Topoisomerase-II, als Krebsmedikament eingeführt wurde. Nachträglich wurde festgestellt, dass Dexrazoxan nach einer Therapie mit Anthracyclinen kardioprotektiv wirkt. Der Grund für die kardioprotektive Wirkung liegt wahrscheinlich darin, dass Dexrazoxan freie Radikale bindet, vor allem aber Schwermetalle, wie z.B. Eisen. Dexrazoxan kann sicher in Kombination mit Doxorubicin bei Kindern verwendet werden. Es gibt keine Berichte über eine sinkende Überlebensrate, steigende therapiebezogene Toxizitäten oder über ein steigendes Risiko an sekundären Tumoren zu erkranken.¹⁸

8.3. Liposomales Doxorubicin

Es wurden einige Formulierungen von liposomalen Doxorubicin erstellt, jedoch wurde durch die FDA nur eines zum Gebrauch zugelassen, das pegylierte, liposomale Doxorubicin (Doxil). Diese Form setzt sich aus einem inneren, wässrigen Kompartiment von Doxorubicin zusammen, welches von einer Lipiddoppelmembran umgeben wird. Außen wird die Formulierung von einem Polyethylenglykol-Polymer ummantelt, siehe Abb. 14.¹⁸

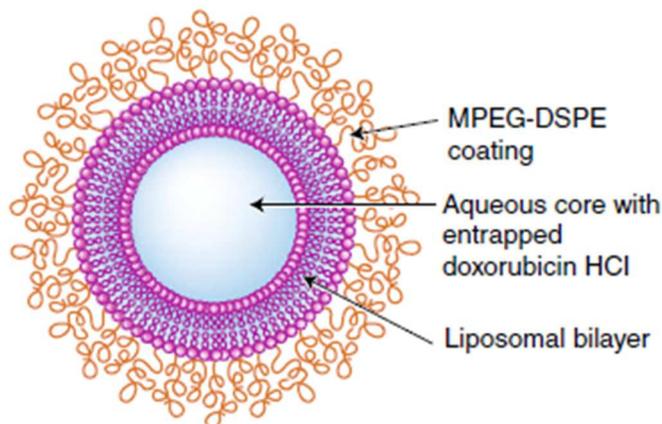


Abbildung 14: Aufbau vom liposomalen Doxorubicin; Joy M. Fulbright et al., © 2007

Es wurde in präklinischen Studien eruiert, dass liposomales Doxorubicin wirksamer ist als Doxorubicin und zudem weniger kardiotoxisch wirkt. Der Grund für die geringere Kardiotoxizität soll darin liegen, dass das liposomale Doxorubicin die Plasmaspiegel des freien Doxorubicins senken soll.

Klinische Studien zeigten allerdings, dass der Einsatz vom liposomalen Doxorubicin bei Kindern limitiert ist. Marina et al., 2002, leitete eine klinische Phase-I-Studie, um die maximale tolerierbare Dosis von liposomalen Doxorubicin bei Kindern mit refraktären, soliden Tumoren festzustellen, welche im Vorfeld $<300\text{mg/m}^2$ Doxorubicin erhalten haben. Zweiundzwanzig Kinder waren an dieser Studie beteiligt. Die Dosis vom liposomalen Doxorubicin wurde von 40mg/m^2 bis 70mg/m^2 getestet. Bei der Dosierung von 70mg/m^2 , litten zwei von sechs Kindern an Mukositis 3. Grades, und sechs von sechs Kindern hatten Ausschlag. Die maximal, tolerierbare Dosis wurde anhand der Studienergebnisse

auf 60mg/m², alle vier Wochen, festgelegt. In einer Phase-II-Studie wurden acht Kinder ≤ 16 Jahren, mit rezidivierenden oder refraktären Sarkomen, mit 50mg/m² liposomalen Doxorubicin behandelt. Alle acht Kinder wurden bereits mit Anthracyclinen vorbehandelt. Es wurden bei allen Patienten keine Veränderungen in der kardialen Funktion verzeichnet. Die einzige unerwünschte Reaktion nach 29 Behandlungszyklen war das Auftreten eines Ausschlags. Auf der Basis dieser Ergebnisse der pädiatrischen Studien, scheint liposomales Doxorubicin als vielversprechende Formulierung bei Kindern. Patienten mit progressiver oder wiederkehrenden Krankheiten, welche bereits eine Anthracyclin-Therapie erhalten haben, könnten die Therapie mit liposomalen Doxorubicin fortsetzen. Andererseits könnte das liposomale Doxorubicin auch mit Wirkstoffen kombiniert werden, welche in alleiniger Therapie kardiotoxisch wirken würden.¹⁸

8.4. Präklinischer Test von Pixantron durch PPTP

Pixantron wurde anhand des PPTP (Preclinical Pediatric Testing Program) getestet um die Aktivität gegen die in vitro Zelllinien festzustellen. Die verschiedenen Zelllinien sind in Abb. 15 zu erkennen. Die Konzentrationen liegen zwischen 3.0nM und 30µM. Der durchschnittliche relative IC₅₀ (rIC₅₀) Wert der PPTP Zellen, lag bei 54nM. Der durchschnittliche rIC₅₀ Wert war bei der Ewing Sarcomplatte am geringsten (14nM) und am höchsten bei der Rhabdomyosarcomplatte (412nM).¹⁹

Cell Line	Histotype	rIC ₅₀ (nM)	Panel rIC ₅₀ /Line rIC ₅₀	Ymin (Observed)
RD	Rhabdomyosarcoma	145	0.4	0.00
Rh41	Rhabdomyosarcoma	679	0.1	0.00
Rh18	Rhabdomyosarcoma	1033	0.1	0.00
Rh30	Rhabdomyosarcoma	140	0.4	0.00
BT-12	Rhabdoid	67	0.8	0.00
CHLA-266	Rhabdoid	31	1.7	0.08
TC-71	Ewing sarcoma	56	1.0	0.00
CHLA-9	Ewing sarcoma	<3	18.6	0.00
CHLA-10	Ewing sarcoma	12	4.4	0.00
CHLA-258	Ewing sarcoma	15	3.6	0.00
SJ-GBM2	Glioblastoma	384	0.1	0.00
NB-1643	Neuroblastoma	64	0.8	0.14
NB-EBc1	Neuroblastoma	60	0.9	0.01
CHLA-90	Neuroblastoma	382	0.1	0.01
CHLA-136	Neuroblastoma	51	1.0	0.00
NALM-6	ALL	28	1.9	0.00
COG-LL-317	ALL	25	2.2	0.00
RS4;11	ALL	29	1.9	0.00
MOLT-4	ALL	21	2.6	0.00
CCRF-CEM (1)	ALL	49	1.1	0.00
CCRF-CEM (2)	ALL	29	1.9	0.00
Kasumi-1	AML	146	0.4	0.00
Karpas-299	ALCL	166	0.3	0.00
Ramos-RA1	NHL	47	1.1	0.00
Median		54	1.0	0.00
Minimum		<3	0.1	0.00
Maximum		1033	18.6	0.14

Abbildung 15: in vitro Aktivität von Pixantron gegen die PPTP Zelllinien, Kurmasheva et al., 2014

In vitro wurde an weiblichen Mäusen gegen acht PPTP soliden Tumoren getestet. Es wurde dabei eine Dosierung von 7.5mg/m² intravenös, insgesamt dreimal in einem Abstand von vier Tagen, verabreicht. Sowohl die Therapie- als auch die Kontrollgruppe bestand aus jeweils zehn Mäusen. Pixantron induzierte bei den behandelten Mäusen keine Toxizität. Eine vollständige Therapieantwort wurde bei den Wilm-Tumormodellen KT-10 beobachtet. Bei den embryonalen Rhabdomyosarcommodellen (Rh36) wurde eine Verzögerung der Zeit bis zum Auftreten eines Ereignisses gemessen. Pixantron zeigte keine signifikante Inhibierung des Tumorwachstums bei den drei Ewig Sarcom Xenograftmodellen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Pixantron einen Rückgang des Tumorwachstums bei Wilms Tumormodellen zeigt, aber nicht bei den sechs pädiatrischen Sarcommodellen. Nachdem Doxorubicin von den SCID Mausmodellen nur sehr schlecht toleriert wird, ist es nicht möglich die Aktivität von Pixantron mit der von Doxorubicin gegen die PPTP Modelle zu vergleichen.¹⁹

8.5. Präklinische Evaluierung von Pixantron

Die Studie wurde 2013 von Longo et al. ausgeführt, um die Effekte von Pixantron bei Kindern zu untersuchen und die mögliche Erholung oder Verlauf von wesentlichen unerwünschten Nebenwirkungen im Jugend- und Erwachsenenalter zu erfassen. Pixantron und Doxorubicin wurden in dieser Studie hinsichtlich ihrer Verträglichkeit in juvenilen Mäusen verglichen. Die Wirkstoffe wurden intraperitoneal an den postnatalen Tagen (PND) 10-42 verabreicht. Mäuse und Menschen zeigen eine vergleichbare Ontogenese, deshalb sind die in dieser Studie verwendeten Mäuse, vergleichbar mit Kindern im Alter zwischen einem Monat bis zu 12 Jahren. Die Beobachtungen nach Beendigung der Behandlungen, z.B. von PND 43-73 (Doxorubicin) oder 96 (Pixantron), ist vergleichbar mit dem Erwachsenenalter bei Menschen. In dem verwendeten Behandlungsplan wurde Pixantron (bis zu 27mg/kg/Tag) wesentlich besser vertragen als das neunmal niedriger dosierte Doxorubicin (3mg/kg/Tag).

In dieser Studie wurden zwei Arten von Toxizität untersucht. Die erste Toxizitätsart war die akute Toxizität. Sie resultiert aus der Zytotoxizität und steht in Bezug zu der starken pharmakologischen Aktivität der Wirkstoffe auf erneuernde Zelltypen, wie Haut oder männliche Reproduktionsorgane. Pixantron verursachte eine signifikante dosisabhängige Knochenmarkstoxizität, welche sich nach vier bis acht Tagen Behandlungspause teilweise oder komplett zurückgebildet hat. Hauttoxizität wurde bei Pixantron als komplette Alopezie beobachtet, welche während den Behandlungszyklen auftrat und sich nach Beendigung der Therapie vollständig erholte. Im Vergleich dazu,

beschränkte sich bei Doxorubicin die Alopezie um die Injektionsstelle. Es trat aber nach Beendigung der Applikation keine Genesung auf. Toxizität gegenüber Thymus, Milz und männlichen Reproduktionsorganen wurden bei beiden Wirkstoffgruppen beschrieben. Es wurde eine Verkleinerung der Organe beobachtet. Thymus und Milz bildeten sich nach vier bis acht Wochen nach Behandlungsende fast vollständig auf ihre normale Größe zurück, während Hoden, Samenblase und Nebenhoden nach wie vor in ihrer Größe reduziert blieben.

Der zweite untersuchte Toxizitätstyp war die chronisch, progressive Toxizität, welche typisch für Anthracycline ist und vorwiegend in Nieren, Leber, peripheren Nervensystem und Herz auftritt. Bei der Behandlung mit Pixantron oder Doxorubicin wurden keine Anzeichen einer Nephro- oder Hepatotoxizität beobachtet. Kardiotoxizität war bis zu einer Dosierung von 27mg/kg/Tag vernachlässigbar. Trotz der geringeren kardiotoxischen Ereignisse, zeigten die Tiere welche mit Doxorubicin behandelt wurden, am Ende der Behandlung eine signifikante Reduktion des Herzgewichtes.

Pixantron zeigte ein ähnliches toxikologisches Profil in juvenilen und erwachsenen Mäusen, während Doxorubicin trotz der niedrigeren Dosis nicht vertragen wurde.

Basierend auf diesen Ergebnissen, sollten weitere präklinische Studien mit juvenilen Tumormodellen durchgeführt werden. Pixantron scheint ein vielversprechender Wirkstoff für eine Therapie bei Kindern zu sein.

9. Kardiotoxizität

9.1. Kardiotoxisches Potential von Pixantron

In dieser Studie wurde 2006 durch Cavalletti et al. das kumulative kardiotoxische Potential von Pixantron mit dem von Doxorubicin und Mitoxantron, sowohl mit Doxorubicin-vorbehandelten Mäusen als auch in unbehandelten Mäusen, verglichen. Es wurden dazu weibliche CD1 Mäuse verwendet. Ihnen wurden einmal pro Woche für insgesamt drei Wochen 7.5mg/kg Doxorubicin verabreicht. Nach weiteren sechs Wochen folgte entweder eine sterile 0.9% Salzlösung, 7.5mg/kg Doxorubicin, 27mg/kg Pixantron oder 3mg/kg Mitoxantron einmal wöchentlich, für drei Wochen. Eine zweite Gruppe weiblicher CD1 Mäuse bekam zwei Zyklen, entweder von einer 0.9% Salzlösung, 27mg/kg Pixantron, 7.5mg/kg Doxorubicin oder 3mg/kg Mitoxantron. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet, um das Herz histopathologisch zu untersuchen. In den mit Doxorubicin-vorbehandelten Mäusen mit weiterer Behandlung von Doxorubicin oder Mitoxantron waren signifikante Verschlechterungen von vorbestehenden Kardiomyopathien zu erkennen. Im Gegensatz dazu, verschlechterte Pixantron bereits bestehende Kardiomyopathien nicht. Es wurden nur geringfügige kardiologische Veränderungen in den Mäusen festgestellt, die zwei Zyklen Pixantron erhalten haben, während zwei Zyklen von Doxorubicin oder Mitoxantron in schweren, degenerativen Kardiomyopathien endeten.

Demnach scheint Pixantron bei Patienten, welche bereits mit Anthracyclinen vorbehandelt wurden, möglicherweise von Nutzen zu sein.¹³

9.2. Doxorubicinol

Die Kardiotoxizität von Doxorubicin korreliert mit den Spiegeln von Doxorubicin im Herzen, der Redoxaktivität vom Superoxidanion zum Wasserstoffperoxid und der Bildung vom langlebigen, sekundären Metaboliten Doxorubicinol. Die Ausscheidung von Doxorubicin scheint unvollständig zu sein, da es auch noch Monate bis Jahre nach einer Doxorubicin Therapie im Herzen von behandelten Patienten nachgewiesen werden konnte. Das Risiko einer Kardiotoxizität steigt signifikant an, wenn Doxorubicin einer reduktiven Bioaktivierung unterliegt. Wenn das Chinon zu einem Semichinon reduziert wird, wird der Sauerstoff zu einem Superoxidanion (O_2^-) reduziert, welches weiter zu Wasserstoffperoxid reagiert. Wasserstoffperoxid verursacht im relativ ungeschütztem Herzgewebe oxidativen Stress. Bei einer Reduktion des Carbonylrests der Seitenkette entsteht der Metabolit Doxorubicinol (siehe Abb.1).

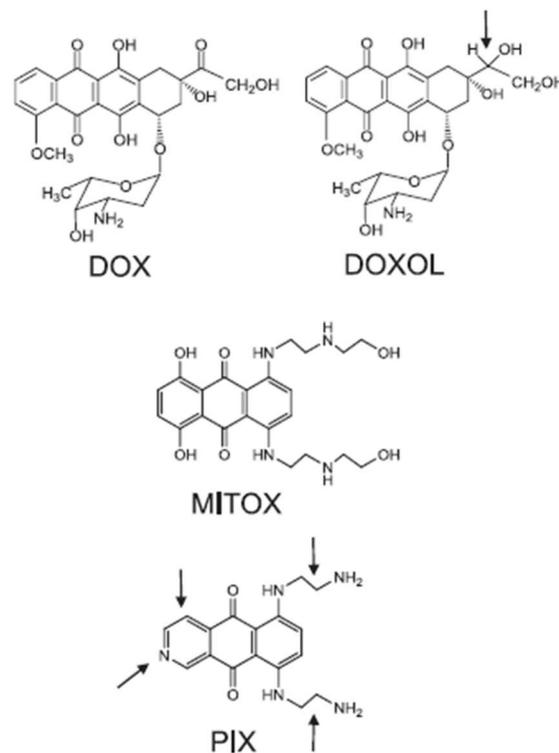


Abbildung 16: Strukturelle Unterschiede der einzelnen Substanzen, Salvatorelli et al., 2012

Dieser Metabolit ist polarer als Doxorubicin und zeigt keine kardiale Clearance. Die Akkumulierung von Doxorubicinol im Herz bringt ein lebenslanges Risiko einer Herzinsuffizienz mit sich.

Eine Zweit- oder Drittlinientherapie mit einem „nicht-anthracyclinem“ Chemotherapeutikum, könnte möglicherweise eine Kardiotoxizität, durch Unterbrechung der kardialen Ausscheidung von Doxorubicin, auslösen. Dadurch würden sich überwiegend reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden, oder es kommt zu einer zunehmenden Bildung von Doxorubicinol.

Studien über die kardiale Sicherheit und Toxizität von Antitumorwirkstoffen sind durch die metabolischen Unterschiede der Substanzen im Menschen und Versuchstieren limitiert.

Pixantron und Mitoxantron wurden *ex vivo* in menschlichen myocardialen Streifenmodellen, welche Doxorubicin-unempfindlich sind oder bereits mit Doxorubicin vorbehandelt wurden, um eine Doxorubicin-Therapie zu immitieren, validiert. In Doxorubicin-naiven Modellen wurde Pixantron besser aufgenommen als Mitoxantron. In den vorbehandelten Modellen, veränderten weder Pixantron noch Mitoxantron die Verteilung und die Ausscheidung von verbleibenden Doxorubicin Resten. Allerdings formte Mitoxantron synergistisch mit Doxorubicin mehr O_2^- und Wasserstoffperoxide. Im Gegensatz dazu, zeigt Pixantron eine verminderte Aufnahme bei vorheriger Doxorubicin Behandlung und es zeigt keinen Redox-Synergismus mit Doxorubicin. Es kommt zur Bildung von N-dealkylierten Produkten, welche die Reaktion vom restlichen Doxorubicin zu Doxorubicinol verhindern. Die Redox-Inaktivität und die Inhibierung der Doxorubicinol Bildung korrelieren mit der Sicherheit des Wirkstoffes Pixantrons bei Patienten, welche mit Doxorubicin vorbehandelt wurden.¹⁵

10. Therapieansätze von Pixantron

10.1. Behandlung von Multiple Sklerose mit Mitoxantron und anderen Therapeutika

10.1.1. Allgemein

Bei multipler Sklerose (MS) handelt es sich um eine immunvermittelte, chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems. Multiple Sklerose lässt sich in unterschiedliche Stadien einteilen, in die schubförmig remittierende MS und in die primäre bzw. sekundäre progrediente MS. Je nach Krankheitsstatus sind unterschiedliche Symptome und Verläufe typisch. Bis zu 80% der Patienten leiden anfänglich an einer schubförmigen, remittierenden MS. In diesem Krankheitsstadium bilden sich die Beschwerden nach einem akuten Anfall, unter Umständen bis zur gänzlichen Erholung, wieder zurück. Bis zu 60% der Betroffenen befinden sich 11-15 Jahre nach dem erstmaligen Ausbruch der Krankheit in der sekundär progredienten Phase.^{21,22}

10.1.2. Therapie

Von der FDA (Food and Drug Administration, US) wurden eine Reihe von Immunmodulatoren zur Therapie der multiplen Sklerose zugelassen. Es handelt sich um drei Interferone (IFN), Glatirameracetat, Fingolimod, Dimethylfumarat, Natalizumab, Teriflunomid, aber auch Mitoxantron. Immunmodulatoren werden bevorzugt bei der schubförmigen remittierenden MS eingesetzt, oder bei Patienten mit sekundärer progredienter MS, mit klinischen oder radiologisch nachgewiesenen aktiven Entzündungsprozessen.

Mitoxantron wird als Rescue-Therapie bei Patienten mit einer aggressiven, schnell fortschreitenden Verlaufsform eingesetzt. Dieses

Immunsuppressivum wird vor allem bei entzündlichen Prozessen und Pathomechanismen, welche für die Progression der neurologischen Defizite verantwortlich sind, eingesetzt. Nachdem Mitoxantron nachweislich kardiotoxisch und möglicherweise leukämogen wirkt, ist die Anwendungsdauer auf zwei bis drei Jahre begrenzt. Deshalb ist es dringend notwendig, die Effizienz der Immunmodulatoren zu steigern und deren Toxizitätsrisiken zu minimieren.

Da Pixantron, BBR2778, strukturell dem Mitoxantron sehr ähnlich ist, sind auch vergleichbare pharmakokinetische Profile zu erwarten. In vorherigen klinischen Phase-I-Studien wurden diese Ergebnisse bereits festgehalten. Die Elimination ist durch ein Dreikompartiment-Modell beschrieben. Die Plasmahalbwertszeit beträgt mehr als 31 Stunden. Pixantron kann im Urin sowie in den Fäzes auch noch acht Tage nach einer einmaligen Injektion nachgewiesen werden. Verglichen mit Mitoxantron wird Pixantron schneller aus dem Plasma entfernt, die Verteilung und Akkumulation in tieferen Geweben ist reduziert und die Halbwertszeit ist wesentlich geringer.

Das Risiko für verzögerte kardiotoxische Ereignisse, verursacht durch Pixantron, wurde im Tierversuch mit den Ergebnissen von Mitoxantron verglichen. Nach einer toxischen Einzeldosis oder auch nach wiederholten Gaben von Pixantron, wurden keine verzögerten myokardialen Läsionen beobachtet und es gab keine Unterschiede in der Kardiotoxizität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen. Im Gegensatz dazu entwickelten nach wiederholten Behandlungen mit Mitoxantron die Tiere typische kardiologische Läsionen und hatten im Vergleich zu den Placebogruppen eine signifikant höhere Rate an kardiotoxischen Ereignissen.

Bei Tieren mit chronischer, disseminierter Enzephalomyelitis (MS), wurden täglich Mitoxantron bzw. Pixantron verabreicht. Obwohl die Dosis 25% der LD₁₀ Dosis betrug, wurden durch histopathologische Untersuchungen bei der Pixantron-Wirkstoffgruppe keine relevanten kardiologischen Läsionen gefunden. Mitoxantron wurde allerdings als kardiotoxisch eingestuft. Pixantron wurde weiters in drei klinischen Phase 2 Studien auf Kardiotoxizität bei Patienten mit Non-Hodgkin

Lymphomen oder soliden Tumoren untersucht. Zusammenfassend sind die Ergebnisse eindeutig, Pixantron hat ein weitaus geringeres kardiotoxisches Potential als Mitoxantron. Es gibt auch Daten, welche darauf hinweisen, dass Pixantron auch bei Patienten mit MS effektiv sein könnte.^{23,39,41}

10.1.3. Reduktion der Schwere einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis ist eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunkrankheit des zentralen Nervensystems. Sie wird weitverbreitet als Modell herangezogen um die immunpathologischen Mechanismen der multiplen Sklerose zu studieren.

Der Effekt von Pixantron bei akuter und chronischer experimenteller autoimmunen Enzephalomyelitis bei Ratten, sowie die in vitro Aktivität von antigen- und mitogen-induzierter T-Zell-Proliferation in humanen oder tierischen Zellen wurde untersucht. Ziel war es, die Wirksamkeit von Pixantron und seine Kardiotoxizität in Rattenmodellen darzulegen und die Immunaktivität im Vergleich zu Mitoxantron zu untersuchen. Im Modell der akuten EAE wurde die erste Injektion von Pixantron verzögert gegeben, um eine Antigenerkennung zu erlauben. Im chronischen EAE Modell wurden die Pixantron- und Mitoxantron-Therapie erst nach klinischen EAE-Anzeichen gegeben. Zirkulierende CD4+ und CD8+ wurden bis zum Ende der Therapie, z.B. bis vierundzwanzig Tage nach Erhalt der letzten Pixantron-Injektion, deutlich reduziert. Interessanterweise wurde ein ähnlicher Effekt auch an den CD45RA+ B-Zellen beobachtet. Unterschiedliche Dosen von Pixantron und Mitoxantron wurden verabreicht um die Toxizität und die klinische und immunologische Aktivität der Wirkstoffe zu testen.

Das wichtigste Ergebnis bei der Untersuchung der chronischen EAE war, dass die höchste Dosis von Pixantron die Zahl der rückfallfreien Ratten signifikant ansteigen lässt und dass der Wirkstoff nicht kardiotoxisch wirkt, während die Kardiotoxizität von Mitoxantron klar dargelegt wurde. Weiters hat Pixantron Einfluss auf immunkompetente

Zellen. Es reduziert die totale Anzahl der Leukozyten, genauer die CD3, CD4 und CD8 Zellen. Es reduziert massiv die Zahl der zirkulierenden B-Zellen und begleitend auch den Titer des anti-myelin-basischen-Protein-(anti-MBP)-Antikörpers.

Zusammenfassend ist bei diesem Experiment hervorzuheben, dass Pixantron ein positives Sicherheitsprofil aufweist und es sich als vielversprechendes Immunsuppressivum eignen könnte, welches für den klinischen Gebrauch bei Patienten mit multipler Sklerose evaluiert werden sollte.²⁴

10.1.4. Der Effekt von Pixantron auf Immunzellen im Verlauf einer akuten EAE

Nachdem bereits bewiesen wurde, dass Pixantron den Schweregrad einer akuten EAE reduziert und weiters auch die Anzahl der Rückfälle bei Rattenmodellen mit chronischer EAE unter Pixantron-Therapie gesunken ist, hat der Wirkstoff enormes Potential in der Therapie der multiplen Sklerose. Deshalb ist es notwendig, die immunmodulierende bzw. immunsuppressive Wirkung von Pixantron im Hinblick auf die zelluläre und humorale Immunantwort während einer EAE noch genauer zu untersuchen. Pixantron und Mitoxantron haben einen vergleichbaren proapoptotischen Effekt auf B-Zellen bei Ratten. Zytofluorimetrisch wurde die Reduktion von B-Zellen, genauer CD45RA+ Zellen, in der Milz behandelter Ratten nachgewiesen. Bei Tieren, welche mit Pixantron behandelt wurden, wurde auch die anti-MBP IgG Produktion komplett inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirksamkeit von Pixantron auf B-Zellen und auf eine antigenspezifische Antwort während einer akuten EAE, der Wirksamkeit von Mitoxantron sehr ähnlich ist.

Die Zytokinproduktion betreffend, wird ein Rückgang der Zytokinsekretion vor allem bei IFN- γ , TNF- α und IL-10 beobachtet. Im Modell der akuten EAE wurde vor allem eine Reduktion der MBP-induzierten IFN- γ -Produktion festgestellt. Dadurch wird bewiesen, dass Pixantron in der Lage ist, die Effektorfunktion der T-Zellen

herabzusetzen, vor allem die proinflammatorische Wirkung von Th1-Zellen. Weitere klinische Studien sind notwendig, um den Verlauf der Zytokinproduktion während einer langandauernden Immunsuppression sowohl bei EAE als auch bei MS im Detail zu klären.²⁵

10.1.5. Phase-I/II-Studie

Diese Studie wurde im Jahr 2015 von Gonsette et al. als offene, multizentrische, nichtkomparative Phase I/II designt. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Pixantron auf periphere Lymphozyten Untergruppen, sowie die fokalen demyelinisierenden Läsionen, welche durch eine Anreicherung von Gadolinium sichtbar gemacht werden, zu bewerten. Sekundäre Endpunkte der Studie waren die Sicherheit von Pixantron und sein Einfluss auf den Krankheitsverlauf, welcher durch den „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS), dem „timed 25-foot walk“ (T25-FW, gemessene Zeit für eine bestimmte Wegstrecke) und dem nine-hole-peg Test (9HPT) festgestellt wird.

Diese Studie hatte aufgrund der geringen Teilnehmerzahl von zwanzig Patienten nicht das Vermögen, das Ausmaß einer eventuellen Kardiotoxizität oder einer behandlungsbezogenen akuten Leukämie zu ermitteln.

Der interessante Effekt der Mitoxantron/Pixantron Kardiotoxizität ist der frühe, asymptotische Abfall der LVEF unter 50% nach geringen Dosen, welche sich nach einigen Wochen aber wieder erholt. Das war bei einem Patienten in dieser Studie der Fall. Der Mechanismus der reversiblen Kardiotoxizität ist bislang noch unklar. Es wurde von einem Patienten berichtet, der an einem verzögerten Abfall des LVEF unter 50% litt, welche sieben Monate nach der letzten Pixantron Infusion auftrat und sich innerhalb von drei Monaten spontan zurückbildete. Das Risiko eines verzögerten Abfalls der LVEF ist dosisabhängig und kann durch entsprechendes echokardiographisches Monitoring auf ein Risiko von 0.1% reduziert werden.

Durch die Behandlung mit Pixantron kam es zu einer absoluten Risikoreduktion (ARR) von 87% und die durchschnittliche Zahl der

Gadolinium Läsionen wurde um 86% reduziert, was seine entzündungshemmende Wirkung bestätigt. Der EDSS Wert verbesserte sich innerhalb zwölf Monate oder blieb unverändert.

Mitoxantron und Pixantron werden ins Gewebe abgesondert und nur langsam über Monate wieder freigegeben, dieser Mechanismus garantiert eine lange Wirkdauer. Die Zahl der B-Zellen wird innerhalb weniger Wochen massiv reduziert und bleibt mindestens ein Jahr unter 50%. Pixantron induziert eine milde T-Zell-Lymphopenie und reduziert die Helferfunktion.

Aufgrund der kurzen Laufzeit der Studie, konnten aber keine definitiven Schlussfolgerungen bezüglich des Einsatzes von Pixantron bei MS getroffen werden. Die Laufzeit war auf ein Jahr limitiert.

Die vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pixantron bereits nach vier intravenösen Gaben in einem dreiwöchigen Intervall, bei Patienten mit aktiver MS effizient wirkt. Dieser Effekt wird dem starken Abtöten der B-Zellen zugeschrieben. Es werden längerfristige Studien benötigt, um die Sicherheit und Wirksamkeit von Pixantron zu evaluieren.²⁶

10.1.6. Neue Immunsuppressiva in der MS-Therapie

Der Gebrauch von Immunsuppressiva zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis oder der systemische Lupus erythematodes, steigt stetig an. Sie werden nicht nur dazu verwendet, den Krankheitsausbruch zu verhindern, sondern sollen auch den Krankheitsfortschritt verlangsamen.

Immunsuppressiva werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in drei Familien hinsichtlich ihrer Zielstrukturen eingeteilt, intrazelluläre Liganden, Zelloberflächenliganden und Antizytokine.

Zu den neu entwickelten Wirkstoffen, welche an Zelloberflächenliganden wirken, zählen hauptsächlich monoklonale Antikörper oder Biopharmaka. Bislang durchgeführte klinische Studien mit monoklonalen Antikörpern waren enttäuschend. Nur Alemtuzumab erzielte positive Resultate, da die Entzündungswerte der MS deutlich

gesunken sind. Jedoch blieb der Krankheitsfortschritt langfristig gesehen unverändert.

Eine neue Klasse von Immunsuppressiva, welche den calciumaktivierten Kv1.3-Kaliumkanal inhibieren, wurden entwickelt. Dieser Kanal wird auf der Oberfläche von CD4 und CD8 Gedächtniszellen selektiv exprimiert. Dies stellt ein spezifisches Target für primär krankheitserregende Zellen bei der Therapie der MS dar.

Zwei neue Wirkstoffe, FTY720 und Epomycin M, interferieren mit Adhäsionsmolekülen. Im Vergleich zu Antikörper weisen sie einen komplett unterschiedlichen Wirkmechanismus auf. Das therapeutische Prinzip von FTY720 besteht aus einer phosphorylierten Verbindung, welche sich gegen vier Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren richtet. Es inhibiert die Immunantwort und Effektorzellen werden daran gehindert, in peripheren Organen Schäden zu verrichten. FTY720 wurde bereits bei einigen Autoimmunkrankheiten sehr effektiv eingesetzt, auch bei der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE).

Klinische Studien mit Immunsuppressiva welche auf Zytokine wirken, brachten unerwartete Resultate. Anti-TNF α Antikörper seien demnach sehr effektiv gegen EAE und wirken der proinflammatorischen Aktivität und Toxizität von Zytokinen entgegen.

Ein weiteres Zytokin, IL-12, ist ein mögliches Target für Immunsuppressiva in der Behandlung der MS. Der anti-IL-12 monoklonale Antikörper induziert deutliche suppressive Effekte gegen die neuronale Dysfunktion, als auch gegen die pathogenen Veränderungen der EAE.

Eine Studie mit Salbutamol, ein β_2 -Sympathomimetikum, welches die IL-12-Produktion drosselt, wird weitere Informationen über den Nutzen von anti-IL-12 Antikörpern in der MS-Therapie liefern.²⁷

10.2. Myasthenia Gravis

10.2.1. Allgemein

Myasthenia Gravis (MG) ist eine Autoimmunerkrankung, welche durch eine gestörte Signalübertragung zwischen dem Nervensystem und dem Muskel gekennzeichnet ist. Autoantikörper verursachen eine Blockierung der Acetylcholinrezeptoren an motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur. Myasthenia Gravis kann nach Ausbreitung oder Zeitpunkt des Auftretens eingeteilt werden. Dabei unterscheidet man die generalisierte und die okuläre Form. Bei der generalisierten Form breitet sich die Krankheit im Verlauf auf den gesamten Körper aus. Bei der okulären Form beschränken sich die Symptome auf das Auge. Weiters unterscheidet man die juvenile Form, hier tritt die Krankheit bereits im Kindesalter auf. Das Gegenteil wäre die Altersform, bei der die Krankheit ungefähr ab dem 40. Lebensjahr ausbricht.²⁸

10.2.2. Pixantron reduziert den Schweregrad einer experimentellen, autoimmunen MG

Die experimentelle autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG) in tierischen Modellen entspricht der humanen MG. Dieses Modell ist durch die Anwesenheit von Th-Zellen und Autoantikörper, vom IgG-Typ, welche spezifisch für den Acetylcholinrezeptor (AChR) sind, charakterisiert. EAMG imitiert die MG in ihren klinischen und immunologischen Manifestationen und ist ein sicheres Modell um die therapeutischen Strategien zur Behandlung von MG zu erforschen.

Im Jahr 2007 wurde erstmals Pixantron als mögliches Therapeutikum bei EAMG erforscht. EAMG kann in Lewis-Ratten entweder durch Immunisierung mit gereinigtem Torpedo AChR (TACHR) oder durch das immundominante Epitop 97-116 der AChR α -Untereinheit von Ratten, induziert werden. Speziell in dieser Studie wurde hauptsächlich

der Effekt von Pixantron in TACHR-induzierten EAMG-Modellen untersucht. Insgesamt gab es vier unterschiedliche Gruppen, welche einmal wöchentlich für insgesamt drei Wochen den jeweiligen Wirkstoff in der angegebenen Konzentration verabreicht bekommen haben; 1) die präventive Pixantron-Gruppe; die Verabreichung des Wirkstoffs begann vier Tage nach der Immunisierung mit 16.25mg/kg Pixantron i.v.; 2) die therapeutische Pixantron-Gruppe: die Verabreichung begann vier Wochen nach der Immunisierung mit 16.25mg/kg Pixantron i.v.; 3) die therapeutische Mitoxantron-Gruppe; 1.2mg/kg Mitoxantron i.v. und 4) die Kontrollgruppe; sterile Salzlösung. Die Dosen von Pixantron und Mitoxantron entsprachen einem Viertel der LD₁₀ Dosis für eine Einzeldosis Injektion bei Ratten. Zuerst wurde der Effekt von Pixantron in vitro auf die proliferative Antwort von T-Zelllinien, welche spezifisch für das Peptid 97-116 ist, untersucht. Pixantron inhibiert dosisabhängig die Proliferation bis hin zur kompletten Suppression. Ex vivo wurden als nächstes die Zellen der Lymphknoten von Pixantron-behandelten, TACHR-immunisierten Ratten untersucht. Sie zeigten, dass nicht nur die TACHR-spezifische T-Zellproliferation deutlich inhibiert wurde, sondern auch die Antwort der Lymphknotenzellen zum immundominanten Epitop R97-116. Die Gesamtzahl der Milzzellen und peripheren Lymphknotenzellen wurden durch Pixantron erheblich reduziert, aber ohne Effekt auf die CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Effekt von Pixantron auf die zirkulierenden B-Zellen bei der EAE. Die Kardiotoxizität betreffend, wurden keine Läsionen an den Kardiomyozyten der behandelten Tiere beschrieben.

Pixantron veränderte sowohl präventiv als auch in therapeutischen Dosierungen den Krankheitsverlauf positiv. Der klinische Effekt äußerte sich in einer markanten Reduktion der spezifischen anti-Ratten AChR Antikörper. Weiters gab es einen positiven Effekt auf die neuromuskuläre Endplatten. Basierend auf diesen Ergebnissen, könnte Pixantron ein vielversprechender Immunmodulator in der Therapie der MG werden, da es einen kombinierenden Effekt auf T- als auch auf B-Zellen aufweist. Patienten mit Kontraindikationen für Corticosteroide

sind die primäre Zielgruppe dieses neuen Wirkstoffes. Ein weiterer wichtiger Vorteil von Pixantron ist, dass die Verabreichung in einem Dosierungsintervall von drei bis vier Wochen stattfinden kann. Das wiederum reduziert die Nebenwirkungen, welche im Gegensatz zu einer täglichen Gabe des Wirkstoffs auftreten können.^{29,49}

10.3. Morbus Alzheimer

10.3.1. Allgemein

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung von cholinergen Neuronen, welche häufig ab dem 65. Lebensjahr zum ersten Mal auftritt. Untersuchungen an verstorbenen Alzheimer-Patienten zeigen, dass es hier häufig zu einer Ablagerung von β -Amyloid-Plaques und Tau-Protein kommt. Durch die zunehmende Hirnatrophie, nimmt auch die Konzentration von Acetylcholin (ACh) ab, was zu einer allgemeinen Leistungsschwäche des Gehirns führt. Das β -Amyloid-Peptid ($A\beta$) entsteht aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), einem integralen Membranprotein, das von Sekretasen gespalten wird. Durch das Spalten des APP entstehen Peptide, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Hauptsächlich entstehen $A\beta$ 1-40 Peptide, bestehend aus 40 Aminosäuren, aber auch $A\beta$ 1-42 Peptide. Die Länge der Peptide ist von großer Bedeutung, da die längeren $A\beta$ 1-42 eine wesentlich höhere Tendenz zur Aggregation aufweisen, als die etwas kürzeren und somit eine kritische Rolle bei der Ätiologie von Morbus Alzheimer spielt.^{30,31}

10.3.2. CE Identifizierung

Bereits an transgenen Mäusen durchgeführte in vivo Studien zeigten, dass extrazelluläre Anreicherungen von löslichen Oligomeren von A β in einem Ausmaß von ungefähr 56kDa, für die Abnahme der Gedächtnisleistung und kognitiven Fähigkeiten verantwortlich sind. Daher wurde eine Methode der Kapillarelektrophorese (CE) entwickelt, um die vorübergehenden Oligomere des A β 1-42 während der Entstehung von Fibrillen, zu separieren und zu quantifizieren. Diese Methode kann dafür verwendet werden, um den inhibitorischen Effekt kleiner Moleküle auf die Oligomerisierung von A β , zu testen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden einigen Wirkstoffen bereits eine inhibierende Wirkung auf die Oligomerisierung von A β zugeschrieben, dazu zählen unter anderem Curcumin, β -Cyclodextrin, Ginkgo Biloba Extrakte und Vanillin. Weiters wurden Mitoxantron und Pixantron hinsichtlich dieser Wirkung untersucht. Es ist wahrscheinlich, dass es zwischen den Aminogruppen der Wirkstoffe und den Phosphatanionen des DNA-Rückgrats zu Ionenbindungen kommt. Es ist möglich, dass ähnliche Interaktionen auch bei der Blockierung der Bildung von A β Fibrillen und den Anthracyclinen, eine wesentliche Rolle spielen. Die Methode der CE Separation gibt Information darüber, wann ein Molekül das entstehende Oligomer gezielt angreift.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde belegt, dass das oligomere Zwischenprodukt unter Peak B, welches in Abb. 11-A zu sehen ist, ein Molekulargewicht von über 50kDa aufweist und toxisch wirkt. Wobei niedrigere Molekulargewichte wie bei Peak A nicht toxisch sind. Durch die Verwendung von Membranfiltern mit einer Grenze von 100kDa, wird sichergestellt, dass kleinere Oligomere zurückgehalten werden und nur die Oligomere, welche eine Größe über 100kDa aufweisen, im Peak B sichtbar sind. Betrachtet man nun die Flächen von Peak A und B gemeinsam, ist zu erkennen, dass der Anstieg der Fläche B aus einer Konversion von kleineren zu größeren Oligomeren resultiert, bis es schließlich zu einer Ablagerung von Fibrillen kommt.

Die elektrophoretischen Profile in Abb.17 B und C, welche neun Stunden nach dem Lösen der Peptidproben mit einem Überschuss an Suramin oder der Substanz 573 aufgenommen wurden, zeigen, dass die Fläche unter Peak B nicht verändert wurde. Im Gegensatz dazu, induzieren sowohl Mitoxantron als auch Pixantron, bei einem Peptid-Wirkstoffverhältnis von 1:2, einen wesentlichen Effekt auf den Verlauf der Fibrillognese. In Anwesenheit von Mitoxantron, ist Peak B beachtlich reduziert im Vergleich zur Kontrollsubstanz. Bei Anwesenheit von Pixantron, ist das >100kDa toxische Oligomer schon am Beginn der Messung, bei t_0 , nahezu komplett gelöscht. Wie in Abb. 17A zu sehen ist, werden noch Moleküle mit leichterem Molekulargewicht detektiert.

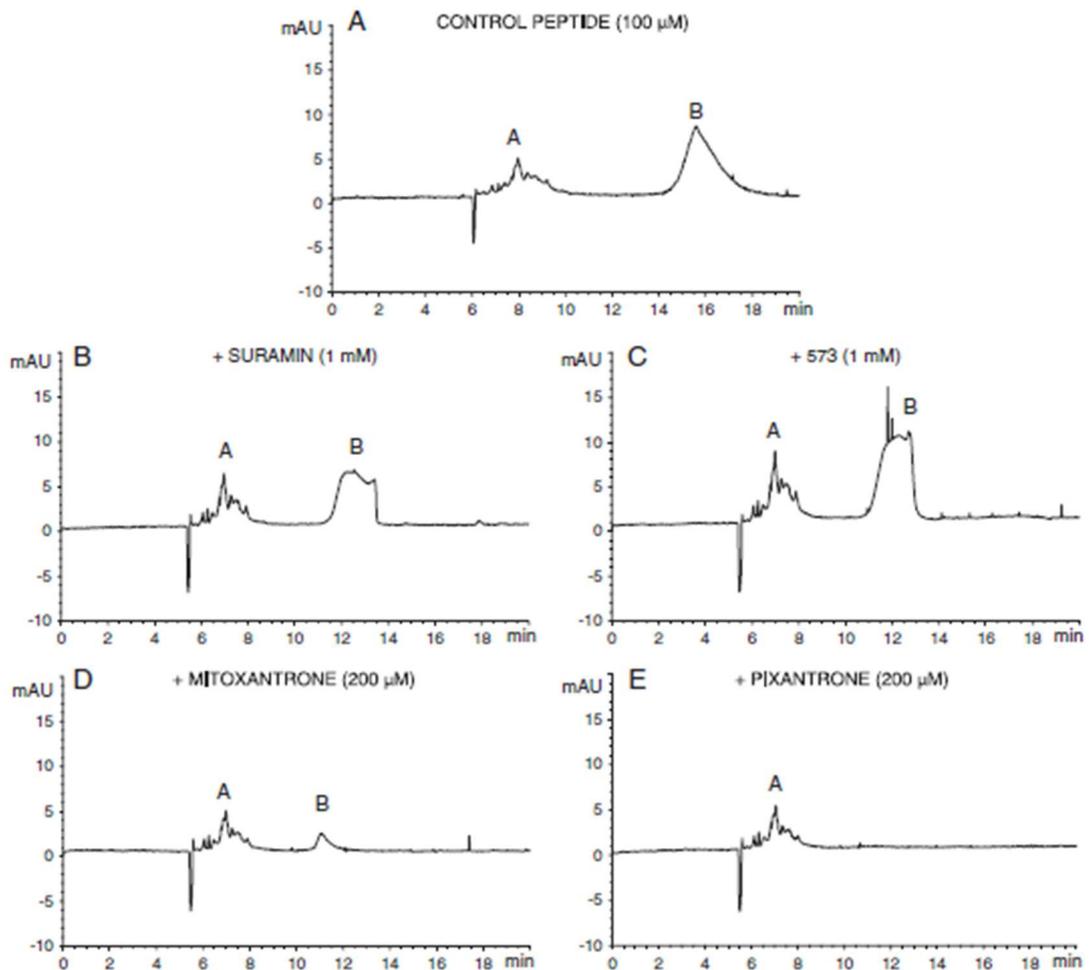


Abbildung 17: Effekt von Zugabe der getesteten Substanzen im elektrophoretischen Profil von Aβ1-24. Alle Elektropherogramme wurden 9h nach Lösen der Probensubstanzen aufgenommen (t_0), $\lambda=200\text{nm}$; Raffaella Colombo et al.,2008

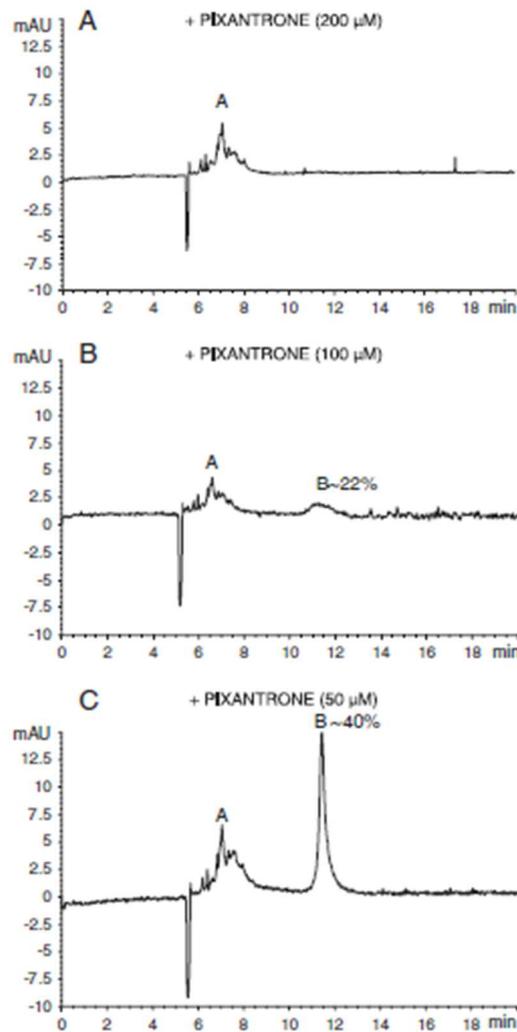


Abbildung 18: 100µM Peptid mit Zusatz von Pixantron; Alle Elektropherogramme wurden zum Zeitpunkt t_0 aufgenommen. $\lambda=200\text{nm}$
Raffaella Colombo et al.,2008

Pixantron dürfte demnach einen ähnlichen Effekt wie Mitoxantron aufweisen, jedoch mit wesentlich schneller Kinetik. Um die geringste, aktive Konzentration von Pixantron zu finden, wurde der Effekt von Pixantron auf das A β 1-24 Peptid mit weit geringeren Konzentrationen vermessen. Die geringste Konzentration, welche nachweislich einen Effekt auf die Fläche unter Peak B (Abb18C) zeigt, liegt bei 50µM Pixantron.

10.3.3. Thioflavin T – Test

Der Thioflavin T – Test (ThT) ist eine häufig verwendete Methode, um die A β -Polymerisation genauer zu untersuchen. Es basiert auf der ansteigenden Fluoreszenz von ThT durch Bindung an Amyloid-Aggregate. Hier wird untersucht, ob der Effekt von Mitoxantron oder Pixantron auf die Formation von Oligomeren auch mit der antifibrillogenen Aktivität zusammenhängt. Die Intensität der Fluoreszenz von A β 1-42, in Abwesenheit und in Anwesenheit der Wirkstoffe, wurde für zwei Wochen gemessen. Wie Abb. 19A zeigt, ist bei dem Kontrollpeptid ein sigmoidaler Anstieg der ThT-Bindung zu sehen, welches ein typischer Verlauf für eine Fibrillogenese ist. Weiters ist eindeutig zu erkennen, dass es bei Anwesenheit von Mitoxantron und Pixantron zu keinem Anstieg der Fluoreszenz kommt. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die beiden Wirkstoffe auch die Fibrillogenese inhibieren. Der ThT-Test erlaubt auch eine Quantifizierung des Hemmungspotentials von Pixantron gegenüber A β 1-42, Abb. 19B.³⁰

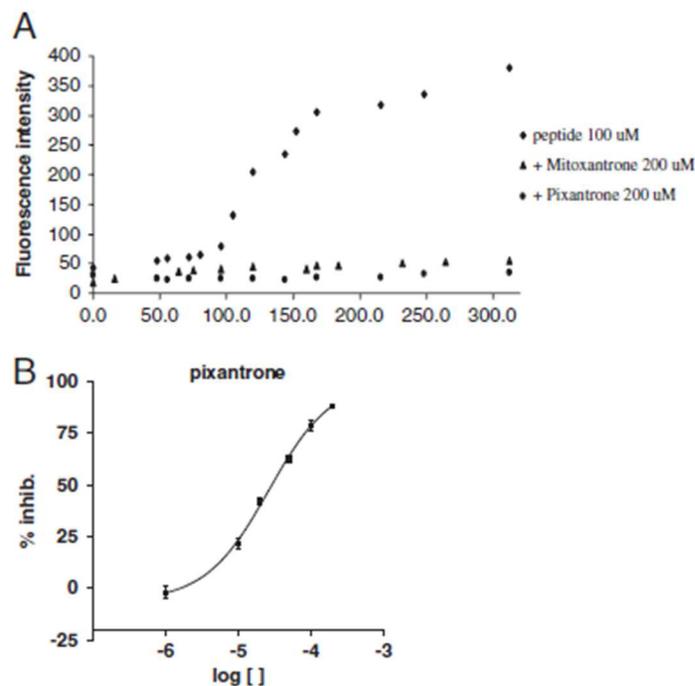


Abbildung 19: (A) Fluoreszenz Test (ThT) von A β 1-42 in Anwesenheit und Abwesenheit von Mitoxantron und Pixantron; (B) typische Dosis-Wirkungsbeziehung um die inhibitorische Wirkung (IC₅₀) von Pixantron auf die A β -Formation zu zeigen; Raffaella Colombo et al., 2008

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass bei Blockierung oder Reduzierung der Akkumulation von Konformeren, es auch gleichzeitig zu einer Abwesenheit von fibrillären Ablagerungen kommt. Diese Erkenntnis war der Ansatzpunkt für weitere Strukturmodifikationen der untersuchten Anthrachinone, mit dem Ziel, die intrinsische Toxizität zu verringern, das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke zu erleichtern und das neurologisch aktive Potential von der bisher bekannten Antitumorwirkung abzugrenzen.³⁰

10.4. Die Rolle von Pixantron in der Therapie eines Non-Hodgkin-Lymphoms

10.4.1. Einleitung

Obwohl der Wirkmechanismus von Pixantron noch nicht vollständig geklärt ist, dürfte er ähnlich dem von Mitoxantron sein. Es wirkt durch Inhibierung der Topoisomerase-II und durch DNA-Interkalation. Die Ergebnisse der präklinischen Evaluierung zeigen aber doch zwei markante unterschiedliche Eigenschaften im Vergleich zu Mitoxantron und dem Standard-Anthracyclin, Doxorubicin. Und zwar zeigt Pixantron eine deutlich verbesserte Antitumorwirkung gegen unterschiedliche Arten von Lymphomen und bei Leukämie. Weiters ist wiederum die Kardiotoxizität in Tiermodellen weitaus geringer, wenn der Wirkstoff in therapeutisch wirksamen Dosen gegeben wird. Diese doch gravierenden Unterschiede zu Mitoxantron und Doxorubicin weisen auch auf ein unterschiedliches pharmakodynamisches Verhalten von Pixantron hin.

Basierend auf bereits vorliegende präklinische Ergebnissen und auf Resultate bereits absolvierter Phase-I-Studien, fokussiert sich die klinische Entwicklung von Pixantron auf maligne Non-Hodgkin-Lymphome.³²

Die gegenwärtigen Behandlungen eines aggressiven NHL beruhen auf einem ausgedehnten Einsatz von Anthracyclinen in Therapieschemata wie z.B. CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und

Prednisolon), ACVBP (Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Prednisolon) und EPOCH (Etoposid, Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid und Prednisolon), mit oder ohne Beteiligung von Rituximab. Diese Therapieschemata gehören zu den Standardtherapien und erzielen eine Heilungsrate von ~ 65 - 75%. Neben dem hohen Wirkungsgrad dieser Therapieformen, beinhalten sie aber auch einige signifikante Langzeitnebenwirkungen.

Für die 25 -35% der Patienten, welche nach einer Primärbehandlung mit diesen Behandlungsprofilen einen Rückfall erleiden, gibt es nur einen geringen Fortschritt bei Rescue-Therapien. Eine Wiederbehandlung mit Anthracyclinen wird aufgrund der extensiven Kardiotoxizität nicht empfohlen. Pixantron wäre in diesem Fall eine vielversprechende Alternative.⁵¹

10.4.2. Klinische Phase-I/II-Studie bei refraktärem, aggressiven NHL

Der Zweck dieser multizentrischen, prospektiven Phase-I/II-Studie, durchgeführt von Lim et al. 2007, mit Patienten mit einem refraktärem, aggressiven NHL war, die Sicherheit, die Effizienz und die pharmakokinetischen Eigenschaften von Pixantron zu ermitteln. Etoposid wird hier im Behandlungsplan „ESHAP“ (Etoposid, Methylprednisolon, Cytarabin und Cisplatin) durch Pixantron „PSHAP“ ersetzt, um die Wirksamkeit einer zytostatischen Therapie zu erhöhen. Ziele dieser Studie waren eine Dosierungsempfehlung für Pixantron in Kombination mit Cytarabin, Methylprednisolon und Cisplatin abzugeben und das Sicherheitsprofil dieser Kombination festzustellen.

Alle 19 Patienten erhielten in früheren Therapien Doxorubicin und die Mehrheit (79%) litten an einem diffusen, großzelligen B-Zell Lymphom.

Die empfohlene Dosis von Pixantron in diesem PSHAP Behandlungsplan beträgt 80mg/m². Es traten zwar bei dieser Dosierung auch dosislimitierende Nebenwirkungen auf, diese wurden aber als klinisch

akzeptabel eingestuft. Kein Patient verstarb an einer Infektion oder Blutung und nur ein Patient erlitt eine fieberhafte Neutropenie. Das Ausbleiben von kardiovaskulären Toxizitäten ist ein wichtiges Kriterium bei Patienten, die schon früher eine Behandlung mit Doxorubicin erhalten haben. Die PSHAP-Therapie zeigte eine hohe Antitumorwirkung, mit einer Gesamtrücklaufquote von 58%. Pharmakokinetische Wechselwirkungen zwischen Pixantron und den kombinierten Wirkstoffen ist unwahrscheinlich. Pixantron hat eine geringe Plasmaproteinbindung, der unfraktionierte Anteil beträgt 0.5%, es wird schlecht metabolisiert und zeigt in in-vitro Studien vernachlässigbares Potential CYP450 Isoenzyme zu inhibieren. Cytarabin und Cisplatin sind ebenfalls keine Substrate für CYP450 Enzyme. Die Beobachtungen während dieser Studie bestätigen die Vermutung, dass sich durch die Komedikation der verschiedenen Wirkstoffe, die AUC_{0-24h} von Pixantron nicht verändert. Zusammenfassend ist der PSHAP Behandlungsplan eine geeignete, gut verträgliche und effektive Rescuetherapie und sollte, als mögliche „zyto-reduzierende“ Therapie vor einer Stammzelltransplantation, weiter evaluiert werden.¹²

10.4.3. Pixantron in Kombination mit Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon

Diese Studie ist eine nicht-vergleichende Phase-I/II-Studie, in welcher Pixantron anstatt von Doxorubicin in der Standardbehandlung „CHOP“ evaluiert wurde. Sie wurde, von Borchmann et al. 2011, bei Patienten mit rückfälligen, aggressiven NHL durchgeführt, welche davor schon eine CHOP-Behandlung, mit oder ohne Rituximab, erhalten haben und welche aufgrund des fortgeschrittenen Alters oder früherer Stammzelltransplantation (SCT) für keine weitere Transplantation geeignet sind. Pixantron wurde an Tag 1 eines 21 Tage dauernden Zyklus verabreicht. In Phase-I waren 30 Patienten involviert, es kam hier zu einer Dosisescalation von 80mg/m² bis 180mg/m². Das Ergebnis

dieser Dosisescalation legte die Dosis für die klinische Phase-II bei 150mg/m² fest. Durch unterstützende Behandlungen wie die Gabe von G-CSF, war es nahezu allen Patienten in Phase-II möglich, alle geplanten sechs Behandlungszyklen zu durchlaufen. Die objektive Ansprechrates betrug 73%, die vollständige Ansprechrates lag bei 47% und die durchschnittliche Überlebensdauer lag bei 17.9 Monaten. Myelosuppression trat nahezu bei allen Patienten auf, sechs davon erlitten eine fieberhafte Neutropenie. Die linksventrikuläre Auswurf-fraktion nahm bei 14 Patienten um $\leq 10\%$ ab, die Reduktion des LVEF schien aber dosisunabhängig und transient zu sein. Bei vier Patienten trat eine symptomatische Herzinsuffizienz auf.

Einige Patienten verzeichneten noch längere Zeit danach einen anhaltenden, langfristigen Behandlungserfolg.

Diese Beobachtungen suggerieren einen dauerhaften Behandlungseffekt durch eine CPOP (Cyclophosphamid, Pixantron, Vincristin, Prednisolon) Behandlung, bei Patienten, bei denen bereits verschiedene Therapien wie R-CHOP (Rituximab-CHOP) und SCT fehlgeschlagen sind.^{14,40}

10.4.4. Pixantron als Primärbehandlung bei aggressivem NHL

Die PIX203 Studie ist eine randomisierte Phase-II-Studie, in welcher die Behandlungsstrategien CHOP-R mit CPOP-Rituximab (CPOP-R) als Primärtherapie bei DLBCL Grad II-IV verglichen wurden. In dieser Studie werden keine weiteren Patienten aufgenommen und bis jetzt wurden nur Zwischenergebnisse veröffentlicht. Wenn man die ersten vierzig Patienten betrachtet, sind vergleichbare CR Raten (CR= kompletten Remission) bei CPOP-R (33%) und CHOP-R (37%) zu beobachten. Auch die Nebenwirkungen sind sehr ähnlich, in beiden Gruppen erlitten acht Patienten eine asymptotische Verschlechterung des LVEF von $\geq 10\%$. Es wurden bislang über keine Herzinsuffizienz berichtet und auch die fieberhafte Neutropenie trat in der CPOP-R Gruppe weit weniger auf (4% vs. 23%). Die

Auswirkungen und Konsequenzen dieser Studie sind noch abzuwarten.^{33,34,46,50}

10.4.5. Pixantron in Kombination mit Rituximab bei rückfälligem, indolentem NHL

10.4.5.1. Follikuläres Lymphom

Das follikuläre Lymphom (FL) ist die häufigste Form eines indolentem NHL und ist mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 6-12 Jahren verbunden. Mit den gegenwärtigen Therapien ist das FL momentan nicht heilbar und die Patienten erleiden möglicherweise Rückfälle und benötigen dann weitere Behandlungen.

Die Einführung von Rituximab in die Therapie hat zu einer signifikanten Verbesserung des Versorgungsstandards bei FL geführt.⁴²

10.4.5.2. PIX 302 – Phase-III-Studie

Diese Studie PIX302 ist eine randomisierte Phase-III-Studie, welche die Wirksamkeit und die Verträglichkeit von Pixantron in Kombination mit Rituximab (R-P) als alleinigem Wirkstoff verglichen hat. Die Studie umfasste 38 Patienten mit rückfälligem, indolentem NHL. Die Gesamttrücklaufrate lag bei 75% in der R-P Gruppe, mit einer Zeitspanne von 13.2 Monaten bis zum Auftreten einer Progression. Bei der Rituximab-Gruppe lag die Gesamtansprechrate bei 33%, mit einer Dauer von nur 8.1 Monaten bis zu einer Progression. Die Studie wurde aufgrund schlechten Verlaufs frühzeitig beendet. Möglicherweise wurden von Klinikärzten Kombinationsbehandlungen gegenüber dem Einzelwirkstoff Rituximab bevorzugt.³³

10.4.6. Klinische Phase-III-Studie

Die PIX301 (EXTEND)-Studie ist eine nicht verblindete, randomisierte, kontrollierte und multizentrische klinische Phase-III-Studie. Die Studie wurde an insgesamt 66 Spitälern in Europa, Indien, Russland, Südamerika, UK, und in den USA, im Zeitraum von 2004-2008 durchgeführt. Sie handelt von Pixantron im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika als Drittlinientherapie oder Nachbehandlung bei Patienten mit aggressiven NHL, welche einen Rückfall erlitten haben. Für diese Studie war ursprünglich eine Gesamtzahl von 320 Patienten geplant. Aufgrund des extrem langsamen Zuwachses an Patienten, musste sie bereits nach nur 140 rekrutierten Patienten geschlossen werden.

Der primäre Endpunkt der Studie war, die Rate der kompletten Remission nach dem Intent-to-treat Prinzip festzustellen. Weitere Ziele waren die totale Überlebensrate zu bestimmen, die komplette Remission und die unbestätigte Remission, welche histologisch bestätigt sind, festzustellen. Weiters wurde die Gesamtrücklaufquote über mindestens vier Monate und die Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit gemessen. Einschlusskriterien waren unter anderem eine Vorbehandlung mit Rituximab. Der Behandlungsplan beinhaltete eine langsame Infusion von $85\text{mg}/\text{m}^2$ Pixantron über eine Stunde, an Tag 1, 8 und 15 in einem 28 Tage Zyklus und es waren bis zu sechs Zyklen pro Patient vorgesehen. Die Vergleichswirkstoffe wurden von den Investoren ausgesucht, siehe Abb. 20.^{46,47,48}

	Dose	Days of cycle*	Length of cycle
Study drug			
Pixantrone dimaleate	85 mg/m ²	1, 8, and 15	28 days
Comparator drugs†			
Vinorelbine ¹¹	30 mg/m ²	1, 8, 15, and 22	4 weeks
Oxaliplatin ¹¹	100 mg/m ²	1	3 weeks
Ifosfamide ^{11,12}	3000 mg/m ²	1 and 2	4 weeks
Etoposide ^{11,12}	100 mg/m ²	1, 2, 3, 4, and 5	4 weeks
Etoposide ^{11,12} ‡	50 mg/m ²	Daily for 21 days	4 weeks
Mitoxantrone ^{11,12}	14 mg/m ²	1	3 weeks
Gemcitabine ^{11,13}	1250 mg/m ²	1, 8, and 15	4 weeks
Rituximab ¹⁴	375 mg/m ²	1, 8, and 15 of cycle 1 and day 1 of cycle 2	3 weeks

*Days of cycle on which dose was given; up to a maximum of six cycles, except for rituximab (two cycles only). †Published studies of dose and responses were used to determine which comparator drugs to test. ‡Administered orally; all other regimens were administered intravenously.

Abbildung 20: Behandlungsplan für Studien- und Vergleichswirkstoffe, Pettengell et al., 2012

Die Nullhypothese, welche aussagt, dass es keinen Unterschied zwischen der CR und Cru (unbestätigte, komplette Remission) bei Patienten welche mit Pixantron behandelt wurden und den Patienten aus der Kontrollgruppe, gibt, sollte mithilfe eines Hypothesentests untersucht werden. Mit Stichproben konnte die Nullhypothese bei einer Remissionsrate von mindestens 10% oder mehr, widerlegt werden.

Nennenswert war der Nutzen für ältere Patienten über 65 Jahren, Frauen und für Patienten, welche weniger als drei vorausgehende Behandlungen erhalten haben. Die aufgetretenen Nebenwirkungen waren in beiden Studiengruppen tragbar. Wobei eine längere Behandlungsdauer mit Pixantron auch zu einer längeren Zeitspanne für auftretende, negative Ereignisse während der Studiendauer führte. Die am häufigsten aufgetretene Nebenwirkung in der Pixantron-Gruppe war Neutropenie. Eine fieberhafte Neutropenie trat in beiden Gruppen selten auf und eine Myelosuppression verstärkte sich, mit zunehmender Zahl an Behandlungszyklen, auch nicht.

Im Gegensatz zu Anthracyclinen, generiert Pixantron, aufgrund seiner Unfähigkeit Eisen zu binden oder dauerhafte Alkoholmetaboliten zu formen, weniger wahrscheinlich reaktive Sauerstoffspezies.

Diese Charakteristika sollten die kardialen Nebenwirkungen reduzieren und die Ergebnisse dieser Studie unterstützen auch diese Hypothese. Obwohl das Auftreten kardialer unerwünschter Ereignisse in der Pixantron-Gruppe höher war als in den Vergleichsgruppen, stieg die Anzahl der Ereignisse nicht mit steigender Exposition an Pixantron. Es handelte sich hier hauptsächlich um einen asymptomatischen Abfall des LVEF 1. bis 2. Grades. Erwähnenswert ist auch, dass fünf Patienten in der Pixantron-Gruppe, bereits Vorerkrankungen, wie Herzinsuffizienz oder Kardiomyopathien, zu Studienbeginn aufgewiesen haben. Die Studie war limitiert durch die geringe Teilnehmeranzahl und den möglicherweise verzerrenden Einfluss, welcher eine kleine Population auf die Untersuchungsergebnisse haben kann.

Die Resultate dieser Studie zeigen aber auch, dass bei Pixantron als Monotherapie in Form einer Rescue-Therapie bei Patienten mit rückfälligem, refraktärem NHL bessere Ergebnisse und Tumorantworten zu erwarten sind, als bei einem Vergleichsagens. Zukünftige Studien beinhalten unter anderem eine multizentrische Phase-III-Studie, welche die Wirksamkeit von Pixantron gemeinsam mit Rituximab mit der von Gemcitabin plus Rituximab, bei Patienten mit rückfälligem oder refraktärem DLBCL, vergleichen und evaulieren soll. ^{33,34,35}

Die FDA befand diese Ergebnisse aber nicht für sicher genug, um eine behördliche Zulassung zu genehmigen. Der Grund für diesen langsamen Zuwachs an Patienten bei dieser Studie, vor allem in den USA, ist die Bevorzugung von kombinierten Therapieschemata bei Rückfällen nach einer Monotherapie und die Präferenz für palliative Behandlungen in späten Stadien der Erkrankung. ^{43,50}

10.4.7. Pixantron in Kombination mit Fludarabin, Dexamethason und Rituximab

Diese Phase-I-Studie wurde designt, um eine Dosisempfehlung für Pixantron abzugeben und die Sicherheit und Wirksamkeit der FPD-R (Fludarabin, Pixantron, Dexamethason, Rituximab) Behandlungsstrategie, bei Patienten mit rezidivierendem oder refraktärem, indolentem NHL, zu evaluieren. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen die hämatologischen Toxizitäten mit einer geringen Inzidenz einer fieberhaften Neutropenie (4%), es wurde aber über keine schwerwiegenden Infektionen berichtet. Das Auftreten von unerwünschten kardialen Ereignissen während der FPD-R Behandlung war akzeptabel, obwohl eine Mehrheit der Patienten mit Doxorubicin vorbehandelt wurde. Während dieser Studie wurde über keine kardiovaskulären Ereignisse 3. oder 4. Grades berichtet. Bei acht Patienten trat eine Verschlechterung des LVEF 1. bis 2. Grades auf, davon erhielten aber sieben Patienten eine frühere Anthracyclintherapie.

Im Vergleich dazu, ereigneten sich, bei zwei von 21 Patienten, in einer Phase-I-Studie von FND (Fludarabin, Mitoxantron, Dexamethason) kardiale Nebenwirkungen 3. bis 4. Grades mit Dyspnoe und sinkendem LVEF. In einer Phase-II-Studie des Behandlungsschemas FND, ereigneten sich bei zwei von 51 Patienten eine Herzinsuffizienz und ein Patient erlitt eine asymptotische Verschlechterung des LVEF. Alle betroffenen Patienten erhielten vorab eine Anthracyclintherapie. Es ist also dringend notwendig in zukünftigen FPD-R-Studien, die kumulative Dosis der Anthracycline und die Herzfunktionen genau zu beobachten.³⁶

10.4.8. Komparative Studie

Diese Studie ist eine offene, multizentrische, komparative Phase-II Studie, welche von Herbrecht et al. 2013, an nicht vorbehandelten Patienten, durchgeführt wurde. Insgesamt waren 124 Patienten, welche kürzlich die Diagnose eines DLBCL erhalten haben, an dieser Studie beteiligt und wurden gleichmäßig in die beiden Behandlungsgruppen, CHOP-R und CPOP-R, eingeteilt. Es wurden sechs bis acht Behandlungszyklen appliziert um eine komplette Remission zu erzielen, aber nur vier Zyklen, um eine partielle Remission zu erreichen. Im Behandlungsarm waren insgesamt 61 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 68 Jahren und 46% der Patienten wiesen einen unvorteilhaften IPI (International Prognostic Index) von ≥ 3 auf. Im Arm des Behandlungsschemas CPOP-R liegt die CR/Cru bei 75% gegenüber 84% bei der Behandlung mit CHOP-R.

Wichtig zu erwähnen ist hierbei aber, dass die Studie vor Erreichen von 240 Studienteilnehmern geschlossen wurde, was für das Nichterreichen des Endpunktes verantwortlich ist. Die Gesamtansprechrage lag bei der Behandlung mit CPOP-R bei 82% und die von CHOP-R bei 90%. Das progressionsfreie Intervall wurde bei CPOP-R nicht erreicht, im Gegensatz dazu lag es bei CHOP-R bei 40 Monaten. Die Gesamtüberlebensrate war bei CPOP-R geringer, mit einer höheren Anzahl an Todesfällen (30% vs. 14%). Den Investoren nach, ist es unwahrscheinlich, dass die gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, die Todesfälle betreffend, behandlungsabhängig waren, da die am häufigsten medikamentenbedingten Nebenwirkungen in beiden Therapiearmen mit gleicher Inzidenz auftraten. Die ernsthaften kardialen Nebenwirkungen traten häufiger bei der Therapie mit CHOP-R auf und beinhalteten Herzinsuffizienz, mit einer Reduktion von mehr als 15% des LVEF und Erhöhung des Troponin T Levels im Serum.³⁷

10.4.9. Einfluss von Indometacin

Koch et al. untersuchten 2015 den Einfluss von Indometacin auf das Verhalten von Tumorzellen gegenüber Doxorubicin oder Pixantron. Die Ergebnisse zeigten, dass Lymphomzellen Doxorubicin und Pixantron über extrazelluläre Vesikel verdrängen und entgiften. Dieser Stoffwechselweg kann durch Inhibierung der Expression des ABC-Transportes A3 unterbrochen werden. Dadurch steigt die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber den zytostatischen Wirkstoffen.

Nach primärer Progression oder einem Rückfall bei Lymphomen entwickeln die Krebszellen gegenüber den zytostatisch wirksamen Substanzen, Resistenzen. Ein wichtiger Mechanismus bei Entwicklung von Resistenzen ist dabei das Transportprotein ATP-bindende Kasette (ABC). ABC-Transporter sind dafür verantwortlich, Anthracycline über die Plasmamembran in den extrazellulären Raum zu bringen. Der ABC-Transporter der Unterklasse B1, auch als MDR1 (= Multi Drug Resistance) bekannt, transportiert ein weites Spektrum an zytostatisch wirksamen Substanzen. Es wurde beobachtet, dass eine starke Expression dieses Transporters in Zusammenhang mit Misserfolgen von Chemotherapien steht.

In dieser Studie wurde der vesikuläre Export von Anthracyclinen zu aggressiven Lymphomzellen und deren Verpackung in Exosome untersucht. Verändert man diese vesikulären Exportmechanismen, steigt die intrazelluläre Konzentration des Wirkstoffs an und das resultiert in einer verstärkten zytotoxischen Wirksamkeit.

Indometacin, ein Inhibitor der Cyclooxygenasen 1 und 2, unterdrückt die Expression vom ABC-Transporter A3 auf Ebene der Transkription. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Unterdrückung des ABCA3 Transporters auf transkriptioneller Ebene durch Indometacin, die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin und Pixantron verstärkt.

Durch Inhibierung der ABCA3-unterstützten Biosynthese von Exosomen, steigt die Retention von Doxorubicin und Pixantron in

Tumorzellen. Während die Zellkerne der Kontrollgruppe, welche ohne Indometacin behandelt wurden, nach vierundzwanzig Stunden wirkstofffrei waren, hielten die mit Indometacin behandelten Tumorzellen die Wirkstoffe zurück.

Das therapeutische Fenster von Anthracyclinen ist durch auftretende Toxizitäten limitiert. Durch den steigenden Gehalt an intrazellulärem Anthracyclinen könnten möglicherweise schädliche Nebenwirkungen auftreten. Nachdem Pixantron nachweislich eine signifikant geringere Kardiotoxizität als andere Anthracycline oder Anthrachinone aufweist, wird hier angenommen, dass die steigenden intrazellulären Spiegel in den Kardiomyozyten und anderen Zellen möglicherweise nur gering toxisch wirken. Indometacin könnte also parallel zu Pixantron verabreicht werden, ohne das Herz zu gefährden.

Die Kombination von COX-Inhibierung und Chemotherapie wurde bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs angewandt, mit vielversprechenden Ergebnissen. Die Ergebnisse von Anthracyclinen und COX-Inhibierung wurden weder durch eine klinische Studie noch durch retrospektive Reihen geprüft. Die Kombination von Indometacin und Pixantron wäre ein mögliches Behandlungsschema und muss in klinischen Studien weiter untersucht werden.³⁸

10.4.10. Zusammenfassung

In klinischen Studien zeigte sich Pixantron sowohl als Monotherapie als auch in Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika bei der Behandlung von indolenten und aggressiven NHL als sehr wirksam. Es hat ein tolerierbares Toxizitätsprofil und wirkt auch bei Patienten, welche schon eine intensive Vorbehandlung aufgrund des aggressiven NHL erfahren haben. Es gibt momentan noch keine Standardtherapie mit verlässlicher und dauerhafter Wirksamkeit bei Patienten mit aggressiven NHL, welche nach spätestens zwei vorangegangenen Behandlungen einen Rückfall erlitten haben.

Am 10.Mai 2012 wurde durch die europäische Kommission eine eingeschränkte Zulassung von Pixantron für die Behandlung von erwachsenen Patienten mit multiplen Rückfällen oder refraktärem, aggressivem NHL ausgestellt.

11. Literaturverzeichnis

1. Krapcho et al., 1994, 6,9-Bis[(aminoalkyl)amino]benzo[g]isoquinoline-5,10,-diones. A novel Class of Chromophore-Modified Antitumor Anthracene-9,10-diones: Synthesis and Antitumor Evaluations
2. Hazlehurst et al., 1994, Comparison of aza-anthracenedione-induced DNA damage and cytotoxicity in experimental tumor cells
3. Dawson et al., 2000, A clinical phase I and pharmacokinetic study of BBR 2778, a novel anthracenedione analogue, administered intravenously, 3 weekly
4. Faivre et al., 2000, A Phase I and Pharmacokinetic Study of the Novel Aza-Anthracenedione Compound BBR 2778 in Patients with Advanced Solid Malignancies
5. Borchmann et al., 2001, Phase I study of BBR 2778, a new aza-anthracenedione, in advanced or refractory non-Hodgkin's lymphoma
6. Chou et al., 2001, Characterization of anthracenediones and their photoaffinity analogs
7. Borchmann et al., 2003, Phase-II study of the new aza-anthracenedione, BBR2778, in patients with relapsed aggressive non-Hodgkin's lymphomas
8. Beeharry et al., 2015, Pixantron induced cell death through mitotic perturbations and subsequent aberrant cell divisions
9. Evison et al., 2007, Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent
10. Evison et al., 2009, CpG methylation potentiates pixantrone and doxorubicin-induced DNA damage and is a marker of drug sensitivity
11. Konda et al., 2015, Binding of pixantrone to DNA at CpA dinucleotide sequences and bulge structures
12. Lim ST. et al., 2007, A phase I/II trial of pixantrone (BBR2778), methylprednisolone, cisplatin, and cytosine arabinoside (PSHAP) in relapsed/refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma

13. Cavalletti et al., 2006, Pixantrone (BBR 2778) has reduced cardiotoxic potential in mice pretreated with doxorubicin: comparative studies against doxorubicin and mitoxantrone
14. Borchmann P et al., 2011, Phase I/II study of pixantrone in combination with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in patients with relapsed aggressive non-Hodgkin lymphoma
15. Salvatorelli et al., 2012, The novel anthracenedione, pixantrone, lacks redox activity and inhibits doxorubicinol formation in human myocardium: insight to explain the cardiac safety of pixantrone in doxorubicin-treated patients
16. Meng et al., 2012, Preparation of Pixantrone/Poly(g-glutamic acid) Nanoparticles through Complex Self-Assembly for Oral Chemotherapy
17. She et al., 2014, The anticancer efficacy of pixantrone-loaded liposomes decorated with sialic acidoctadecylamine conjugate
18. Fulbright et al., 2010, Can Anthracycline Therapy for Pediatric Malignancies Be Less Cardiotoxic?
19. Kurmasheva et al., 2014, Initial Testing (Stage 1) 73ft he Topoisomerase II inhibitor Pixantrone, by the Pediatric Preclinical Testing Program
20. Longo et al., 2014, Tolerability and toxicological profile of pixantrone (Pixuvri®)in juvenile mice. Comparative study with doxorubicin
21. http://flexikon.doccheck.com/de/Multiple_Sklerose
22. https://de.wikipedia.org/wiki/Multiple_Sklerose
23. Gonsette et al., 2004, A comparison of the benefits of mitoxantrone and other recent therapeutic approaches in multiple sclerosis
24. Cavaletti et al., 2003, Pixantrone (BBR2778) reduces the severity of experimental allergic encephalomyelitis
25. Mazzanti et al., 2005, Effects of pixantrone on immune-cell function in the course of acute rat experimental allergic encephalomyelitis

26. Gonsette et al., 2015, Pixantrone: a B-cell-depleting immunosuppressant for multiple sclerosis patients with active disease
27. Gonsette et al., 2004, New immunosuppressants with potential implication in multiple sclerosis
28. https://de.wikipedia.org/wiki/Myasthenia_gravis
29. Ubiali et al., 2008, Pixantrone (BBR2778) Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in Lewis Rats
30. <https://de.wikipedia.org/wiki/Alzheimer-Krankheit>
31. Colombo et al., 2008, CE can identify small molecules that selectively target soluble oligomers of myloid β protein and display antifibrillogenic activity
32. Borchmann et al., 2005, The role of pixantrone in the treatment of non-Hodgkins's lymphoma
33. El-Helw et al., 2007, Pixantrone: a novel aza-anthracendione in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas
34. Papadatos-Pastos, Ruth Pettengell, 2013, Pixantrone: merging safety with efficacy
35. Engert et al., 2006, EXTEND PIX301: A Phase III Randomized Trial of Pixantrone Versus Other Chemotherapeutic Agents as Third-Line Monotherapy in Patients with Relapsed, Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma
36. Srokowski et al., 2011, Pixantrone Dimaleate in Combination With Fludarabine, Dexamethasone, and Rituximab in Patients With Relapsed or Refractory Indolent Non-Hodgkin Lymphoma
37. Comparison of pixantrone-based regimen (CPOP-R) with doxorubicin-based therapy (CHOP-R) for treatment of diffuse large B-cell lymphoma
38. Koch et al., 2015, Nuclear trapping through inhibition of exosomal export by indomethacin increases cytostatic efficacy of doxorubicin and pixantrone
39. R.E.Gonsette, 2004, Pixantron (BBR2778): a new immunosuppressant in multiple sclerosis with a low cardiotoxicity
40. Brian L.Abbott, 2006, Diagnosis and Management of Lymphoma

41. R. E. Gonsette, 2007, Compared benefit of approved and experimental immunosuppressive therapeutic approaches in multiple sclerosis
42. Mathias Rummel, 2008, Considerations with Newer Regimens for Indolent Non-Hodgkin Lymphoma
43. Mukherji and Pettengell, 2010, Pixantron for the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma
44. Evison et al., 2008, Formaldehyd-Activated Pixantron Is a Monofunctional DNA Alkylator That Binds Selectively to CpG and CpA Doublets
45. Adnan et al., 2010, DNA binding by pixantrone
46. Jamal-Hanjani and Pettengell, 2011, Pharmacokinetic evaluation of pixantrone for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma
47. Pettengell et al., 2012, Pixantrone dimaleate versus other chemotherapeutic agents as a single-agent salvage treatment in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: a phase 3, multicentre, open-label, randomised trial
48. Péan et al., 2013, The European Medicines Agency Review of Pixantrone for the Treatment of Adult Patients With Multiply Relapsed or Refractory Aggressive Non-Hodgkin's B-Cell Lymphomas: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use
49. Marolda et al., 2013, Differential targeting of immune-cells by Pixantron in experimental myasthenia gravis
50. Volpetti et al., Pixantrone for the treatment of adult patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin B-cell lymphomas
51. Boyle and Morschhauser, 2015, Pixantrone: a novel anthracycline-like drug for the treatment of non-Hodgkin lymphoma
52. <https://metasystemsinternational.com/de/products/solutions/comet-foci/>
53. Antonini et al., 2008, Synthesis and Antitumor Evaluation of Aza-anthracen-9,10-diones and Bis Aza-anthrapyrazole-6-ones

12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 2-azaanthracen Derivate, A. Paul Krapcho et al, 1994	1
Abbildung 2: Hämatologische Toxizität nach BBR2778 iv., Dawson et al., 2000	5
Abbildung 3: A) zeigt eine Konzentrations-Zeit-Kurve für jede einzelne Dosierung und B) drei individuelle Patienten, welche mit der vorgeschlagenen Dosierung von 112.5mg/m ² /Woche behandelt wurden, Faivre et al., 2000	7
Abbildung 4: Strukturen der Verbindungen, Chou et al., 2001	11
Abbildung 5: Abbildung 6 Pixantron und Mitoxantron binden in Gegenwart von Formaldehyd kovalent an DNA, Abb. B, schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007	17
Abbildung 7: Zeitliche Abhängigkeit von Pixantron-DNA Addukten; Formaldehyd wurde entweder mit Pixantron (A) oder Mitoxantron (B) behandelt; (C) quantitative Auswertung als Funktion der Zeit; schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron	19
Abbildung 8: Thermische Abhängigkeit der Pixantron (A)/Mitoxantron (B)-DNA Addukte; C: der relative Betrag der dsDNA von A und B als Funktion der Temperatur; schwarze Kästchen=Pixantron, leere Kästchen= Mitoxantron.....	20
Abbildung 9: Abhängigkeit der Beständigkeit von Pixantron (A) und Mitoxantron (B)-DNA Addukten unter physiologischen Bedingungen;	21
Abbildung 10: pH-Abhängigkeit der Pixantron- /Mitoxantron DNA Addukte; Quelle: Pixantrone can be activated by formaldehyde to generate a potent DNA adduct forming agent, ©2007	22
Abbildung 11: Zellplatten mit Pixantron (Pix) oder Doxorubicin (Dox) behandelten Zellen, Beeharry et al., 2015	27
Abbildung 12: Freisetzungsprofil von Pixantron aus Pixantron/ γ -PGA NPs bei 37°C und unterschiedlichen pH-Werten; Meng et al., 2012.....	33

Abbildung 13: Aufbau vom liposomalen Doxorubicin; Joy M. Fulbright et al., © 2007	37
Abbildung 14: in vitro Aktivität von Pixantron gegen die PPTP Zelllinien	39
Abbildung 15: Strukturelle Unterschiede der einzelnen Substanzen, Salvatorelli et al., 2012.....	43
Abbildung 16: Effekt von Zugabe der getesteten Substanzen im elektrophoretischen Profil von A β 1-24. Alle Elektropherogramme wurden 9h nach Lösen der Probensubstanzen aufgenommen (t_0), $\lambda=200\text{nm}$; Raffaella Colombo et al.,2008	56
Abbildung 17: 100 μM Peptid mit Zusatz von Pixantron; Alle Elektropherogramme wurden zum Zeitpunkt t_0 aufgenommen. $\lambda=200\text{nm}$	57
Abbildung 18: (A) Fluoreszenz Test (ThT) von A β 1-42 in Anwesenheit und Abwesenheit von Mitoxantron und Pixantron; (B) typische Dosis-Wirkungsbeziehung um die inhibitorische Wirkung (IC_{50}) von Pixantron auf die A β -Formation zu zeigen; Raffaella Colombo et al.,2008	58
Abbildung 19: Behandlungsplan für Studien- und Vergleichswirkstoffe, Pettengell et al., 2012	65