

Daniel Eikel

**Entwicklung eines Bestimmungsverfahrens
für liposomal verkapseltes Daunorubicin
(DaunoXome)**

Diplomarbeit

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 2000 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832431501

Daniel Eikel

Entwicklung eines Bestimmungsverfahrens für liposomal verkapseltes Daunorubicin (DaunoXome)

Daniel Eikel

Entwicklung eines Bestimmungsverfahrens für liposomal verkapseltes Daunorubicin (DaunoXome)

Diplomarbeit
an der Philipps-Universität Marburg
Fachbereich Chemie
März 2000 Abgabe



Diplomarbeiten Agentur
Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke
und Guido Meyer GbR

Hermannstal 119 k
22119 Hamburg

agentur@diplom.de
www.diplom.de

ID 3150

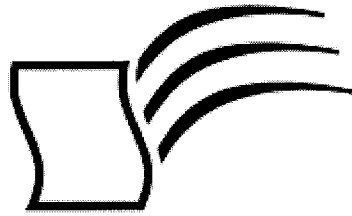
Eikel, Daniel: Entwicklung eines Bestimmungsverfahrens für liposomal verkapseltes Daunorubicin (DaunoXome) / Daniel Eikel - Hamburg: Diplomarbeiten Agentur, 2001
Zugl.: Marburg, Universität, Diplom, 2000

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey, Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke & Guido Meyer GbR
Diplomarbeiten Agentur, <http://www.diplom.de>, Hamburg 2001
Printed in Germany



Diplom.com

Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit.

Ihr Team der *Diplomarbeiten* Agentur

Diplomarbeiten Agentur

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey –
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke —
und Guido Meyer GbR —————

Hermannstal 119 k —————
22119 Hamburg —————

Fon: 040 / 655 99 20 —————
Fax: 040 / 655 99 222 —————

agentur@diplom.com —————
www.diplom.com —————

Abgabedatum: 31.03.2000
Erstgutachter: Prof. Dr. H. Jungclas
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Ensinger

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Krebsforschung als gesellschaftliche Herausforderung	1
1.2 Die konventionellen Therapiemöglichkeiten	3
1.3 Allgemeine Aspekte der Chemotherapie	5
1.4 Pharmakokinetik	7
1.5 Liposomal verkapseltes Daunorubicin (DaunoXome®)	9
1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit	10
2 Theoretische Hintergründe	12
2.1 Anthrazykline	12
2.1.1 Chemische Eigenschaften der Anthrazykline	12
2.1.2 Stabilität der Anthrazykline in wässrigen Medien	14
2.1.3 Anwendung der Anthrazykline in der Chemotherapie	15
2.1.4 Pharmakokinetik der Anthrazykline	17
2.1.5 Bisherige Analytik der Anthrazykline und alternative Bestimmungsverfahren	18
2.2 Liposomal verkapselte Zytostatika	20
2.2.1 Entwicklung der liposomal verkapselten Anthrazykline	20
2.2.2 DaunoXome®	22
2.2.3 Anwendung und Vorteile von DaunoXome® in der Chemotherapie	23
2.2.4 Pharmakokinetik von DaunoXome®	24
2.3 Festphasenextraktion von Pharmaka aus biologischen Matrices	27
2.3.1 Off-line Festphasenextraktion	27
2.3.2 On-line Festphasenextraktion durch LC-LC Kopplung	31
2.3.3 Extraktion mit restricted-access Material	33
2.4 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	35
2.4.1 Beurteilungsparameter für gute Chromatogramme in der HPLC	35
2.4.2 Probleme bei der Chromatographie basischer Analyten	37
2.4.3 Detektion mittels Fluoreszenz und Absorption	37

3 Entwicklung des Bestimmungsverfahrens	39
3.1 Detektion der Anthrazykline	39
3.2 Stabilität der Anthrazykline in wässrigen Medien	45
3.3 Auswahl der chromatographischen Phase und Optimierung der Trennparameter	52
3.4 Optimierung der Probeninjektion	62
3.5 Entwicklung der off-line Extraktion	67
3.6 Validierung der off-line Festphasenextraktion – Kalibrierfunktion	83
3.7 Entwicklung der on-line Extraktion	90
3.8 Validierung der on-line Festphasenextraktion – Kalibrierfunktion	95
3.9 Vergleich der Extraktionsverfahren	100
4 Anwendung des Bestimmungsverfahrens auf Patientenproben	101
4.1 Bestimmung der Plasmakonzentration von DaunoXome®	101
4.2 Pharmakokinetik von DaunoXome®	105
5 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	114
6 Literaturverzeichnis	116
7 Anhang	123
7.1 Verzeichnis wichtiger Abkürzungen und Symbole	123
7.2 Verwendete Geräte und Materialien	124
7.3 Verwendete Chemikalien	125
7.4 Danksagung	126

1 Einleitung

1.1 Krebsforschung als gesellschaftliche Herausforderung

In der Statistik der Todesursachen ist Krebs seit 1900 in den Industrieländern von der siebten auf die zweite Stelle vorgerückt. Überflügelt wird er nur noch von den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zu den tumorinduzierenden Faktoren zählen ultraviolette und ionisierende Strahlung, krebserregende Stoffe und krebserzeugende (onkogene) Viren. Formale Ursachen der Steigerung der Krebserkrankungen sind die zunehmend steigende Lebenserwartung und die deutlich verbesserte Diagnostik von Krebsleiden. Tatsächliche Steigerungen der Todesrate begründen sich in zunehmender Exposition der Bevölkerung gegenüber tumorinduzierenden Faktoren. Hier seien besonders die Risiken des Rauchens hervorgehoben, da etwa 20 % aller Raucher im Verlauf ihres Lebens an Lungenkrebs erkranken. Auch die zunehmende Strahlenbelastung durch diagnostische Verfahren wie Röntgen, die Belastung durch Sonneneinstrahlung in Kombination mit mangelndem Hautschutz und die Belastung durch die Einwirkung karzinogener Chemikalien sind als Ursache von Krebsleiden zu sehen [1].

Bei Menschen im Erwerbstätigenalter von 16-60 Jahren liegt Krebs in der Statistik der Todesursachen sogar an erster Stelle und stellt damit nicht nur ein persönliches Schicksal und Leid dar, sondern auch eine gesellschaftliche Herausforderung. Trotz dieser Tatsachen existiert in Deutschland noch immer kein Krebsregister, das alle auftretenden Krebserkrankungen anonymisiert verwaltet. Eine solche Datenbank könnte eindeutige Auskünfte über Häufigkeit, regionale Verteilung, zeitliche Veränderungen, mögliche Ursachen und Therapierbarkeit von Tumorerkrankungen geben. Infolgedessen liegen keine gesicherten statistischen Daten über die Krebsituation in Deutschland vor. Schätzungen gehen von jährlich weit über 350.000 Neuerkrankungen aus, von denen etwa 50 % die folgenden 5 Jahre nicht überleben [2].

Jede einzelne der rund 30 Billionen Körperzellen kann durch eine Reihe physikalischer, chemischer oder biologischer Einflüsse an jedem beliebigen Ort des Körpers in eine Tumorzelle umgewandelt werden. Jeder Tumor geht auf die Mutation einer einzelnen Zelle zurück, die in eine Phase unkontrollierter Zellteilung eingetreten ist. Benigne oder gutartige Tumore gefährden in der Regel nicht das Leben des Patienten, da sie sich vom umliegenden Gewebe abkapseln, lokal verbleiben und keinen zerstörenden Einfluß auf benachbarte Zellen nehmen. Anders ist dies bei den malignen oder bösartigen Tumoren, die invasiv in das umliegende Gewebe hineinwachsen, Zellverbände zerstören und durch Ausschüttung von Tumorzellen in die Blutbahn oder das Lymphsystem an anderen Orten im Körper Metastasen erzeugen.

Die Art eines malignen Tumors kann unterteilt werden, indem man den Ort der Entstehung als Kriterium heranzieht. Bösartige Tumore im Epithelgewebe wie Haut und Schleimhaut

werden als Karzinome, im Bindegewebe wie Muskel, Fett und Knochen als Sarkome bezeichnet. Eine bösartige Erkrankung der weißen Blutkörperchen im blutbildenden System bezeichnet man als Leukämie [3].

Aufgrund der vielfältigen Entstehungsmöglichkeiten von Tumoren besteht die wichtigste Maßnahme zur Abwehr einer Tumorerkrankung in der Minimierung von Risikofaktoren und einer frühzeitigen Erkennung durch umfassende medizinische Diagnostik. Allein durch diese Maßnahmen, kombiniert mit den bestehenden Therapieverfahren, könnten etwa $\frac{2}{3}$ aller Krebserkrankungen vermieden bzw. die Heilungschancen drastisch verbessert werden [1].

1.2 Die konventionellen Therapiemöglichkeiten

Die Behandlung der Tumorerkrankungen hat in den letzten Jahren beständig Fortschritte gemacht, so daß die Heilungsraten weiter angehoben wurden, die Überlebenszeit selbst bei unheilbar Kranken verlängert, und die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert werden konnte. Wissenschaftliche Erfolge bedeuten für den einzelnen Patienten neue wirksame Behandlungsmethoden, eine verbesserte Verträglichkeit bestehender Behandlungsschemata und einen effektiven Schutz vor unerwünschten Begleiteffekten durch gezielte Gegenmaßnahmen. Wenn trotz aller Anstrengungen eine Heilung nicht mehr möglich ist, gewinnt das Ziel der Erhaltung von Lebensqualität die höchste Priorität.

Die konventionellen Therapien beruhen im wesentlichen auf drei Säulen zur Bekämpfung eines Tumors. Geschwülste, die auf ihren Entstehungsort begrenzt sind und keine Fernmetastasen gesetzt haben, können mit guten Heilungschancen durch einen operativen Eingriff entfernt werden. Mit der Weiterentwicklung der Laser-Technik und der Nutzung endoskopischer Verfahren konnten hier in den letzten Jahren deutliche Fortschritte erzielt werden. Auch bei einer schon fortgeschrittenen Erkrankung, verbunden mit einer großen Tumormasse, ist die operative Entfernung und Reduktion des Tumors mittels chirurgischer Eingriffe der erste Therapieschritt.

Zur Behandlung lokaler Tumore steht alternativ auch die Strahlentherapie zur Verfügung. Das Wirkprinzip bei der Applikation von Photonen- oder Teilchenstrahlen beruht auf einem direkten Energieübertrag der Strahlung auf die Tumorzellen. Diese werden auf molekularer Ebene geschädigt und sterben ab. Die Wirkung läßt sich nicht exakt auf die Tumorzellen begrenzen, es werden immer auch Zellen in unmittelbarer Umgebung und den Einschußrichtungen der Strahlung geschädigt. Durch neue Entwicklungen in der Technik der Strahlenanwendung können diese Nebenwirkungen aber deutlich vermindert werden. Die Vorteile der Strahlentherapie liegen darin, daß die gesunden Körperzellen nach und nach den Platz des Tumors einnehmen können, ohne daß weitere Funktionsbeeinträchtigungen zu erwarten sind, wie dies bei einem großräumigen chirurgischen Eingriff der Fall ist.

Als drittes mächtiges Werkzeug steht dem Arzt die antineoplastische Chemotherapie durch Applikation von Zytostatika zur Verfügung. Die Wirkung der Zytostatika beruht auf chemischen Reaktionen, die auf molekularer Ebene zu einer Störung der Zellteilung führen, so daß eine Hemmung des Zellwachstums und idealerweise der Zelltod der Tumorzelle ausgelöst wird. Körpereigene Abwehrstoffe und Abwehrzellen greifen die so geschädigten Tumorverbände an, lösen sie auf und bauen die Zellfragmente ab. Auf diese Weise schrumpft der Tumor und gesundes Gewebe gewinnt wieder die Oberhand.