

---

Stabilität von Phosphatidylglycerin-basierenden  
thermosensitiven Liposomen und ihre  
Wechselwirkungen mit Serumkomponenten

---



Dissertation von Zulfiya Syunyaeva  
München 2018



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Stabilität von Phosphatidylglycerin-basierenden  
thermosensitiven Liposomen und ihre  
Wechselwirkungen mit Serumkomponenten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Zulfiya Syunyaeva  
aus Moskau  
2018



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Lindner

Mitberichterstatter: PD Dr. Sebastian Kobold

PD Dr. Heike Beck

Prof. Dr. Dolores Schendel

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Hossann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Liposomen . . . . .	2
1.2	Freies und liposomales Doxorubicin . . . . .	3
1.3	Thermosensitive Liposomen . . . . .	5
1.4	Blutserum und sein Einfluss auf liposomale Membranen . . . . .	7
1.5	Therapeutische Wärmeapplikationen . . . . .	12
1.6	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
2.1	Lipide . . . . .	17
2.2	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Formulierungen . . . . .	18
2.3	Puffer und hergestellte Lösungen . . . . .	19
2.4	Verbrauchsmaterialien . . . . .	20
2.5	Geräte . . . . .	21
2.6	Programme . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Liposomenherstellung . . . . .	23
3.2	Liposomencharakterisierung . . . . .	25
3.3	Bestimmung der Menge des liposomal eingeschlossenen Wirkstoffes . . . . .	27
3.4	Temperaturprofil der TSL . . . . .	28
3.5	24 h - Temperaturprofil von DPPG <sub>2</sub> -TSL in FCS bei 37°C . . . . .	30
3.6	Öffnungskinetik . . . . .	30
3.7	Lagerstabilität . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1	Liposomencharakterisierung und Qualitätskontrolle . . . . .	33
4.2	In vitro Temperaturprofile von DPPG <sub>2</sub> -TSL . . . . .	37
4.3	Einfluss von Cholesterin-Einbau in der TSL-Membran . . . . .	41
4.4	Einfluss von Serumbestandteilen auf die Temperaturprofile von DPPG <sub>2</sub> -TSL . . . . .	45

4.5	In vitro Temperaturprofile PEG2000-haltiger-TSL . . . . .	55
4.6	Einfluss von Serumbestandteilen auf die Temperaturprofile PEG2000-haltiger TSL . . . . .	57
4.7	Lagerstabilität der Liposomen . . . . .	62
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
5.1	Freisetzungsverhalten DPPG <sub>2</sub> -TSL mit eingeschlossenem Carboxyfluore- scein und Doxorubicin . . . . .	65
5.2	Einfluss von Serumbestandteilen auf das Freisetzungsverhalten von DPPG <sub>2</sub> - TSL . . . . .	66
5.3	Einfluss von Cholesterineinbau in die TSL-Membran . . . . .	70
5.4	Einfluss von PEG2000-Einbau in die TSL-Membran . . . . .	72
5.5	Lagerstabilität . . . . .	73
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>77</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>79</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

„Krebs“ ist eine allgegenwärtige Erkrankung. Laut dem statistischen Bundesamt stellten maligne Neoplasien, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache im Jahr 2014 in Deutschland dar [1]. Derzeitige Therapien sind zum großen Teil mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, weshalb das Ziel effektive Therapien mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil zu entwickeln weiterhin besteht.

Die klassische Tumorthherapie besteht in der Regel aus drei Säulen: Die Chirurgie, die Chemotherapie und die Radiotherapie. In der modernen Medizin spielt auch die supportive Therapie eine immer größere Rolle, sodass diese inzwischen ein fester Bestandteil jeder antineoplastischen Therapie sein sollte. Je nach der Art und Stadium der Tumorerkrankung wird die passende Therapie bzw. die sinnvollste mögliche Kombination gewählt. An größeren Zentren finden dafür regelmäßig sogenannte „Tumorboard“-Sitzungen statt, in deren Rahmen interdisziplinär, d.h. unter Beisein erfahrener Ärzte verschiedener Fachrichtungen, die therapeutischen Möglichkeiten diskutiert und ein Therapieplan für den jeweiligen Patienten zusammengestellt werden kann.

Die Chirurgie und Strahlentherapie beschränken sich meist auf lokal begrenzte Tumoren oder werden unterstützend eingesetzt, während die Chemotherapie systemisch auf den gesamten Körper wirkt. Chemotherapeutika werden in der Regel intravenös und ggf. auch intrakavitär verabreicht und wirken auf alle sich teilenden Zellen im Körper, indem sie z.B. eine fehlerhafte Zellteilung provozieren.

Dadurch, dass klassische Zytostatika auf alle Zellen wirken, ist ihr Nebenwirkungsprofil hoch und oftmals der therapielimitierende Faktor. Maligne Zellen, die eine schnelle Zellteilung aufweisen sowie gesunde Körperzellen, die in ihrer Funktion einer häufigen Teilung unterliegen, sind zuerst betroffen. Es folgen: Zerstörung des Tumors, Durchfälle, Blutarmut, Infektanfälligkeit und Haarausfall sowie natürlich spezifische Nebenwirkungen der verabreichten Mittel.

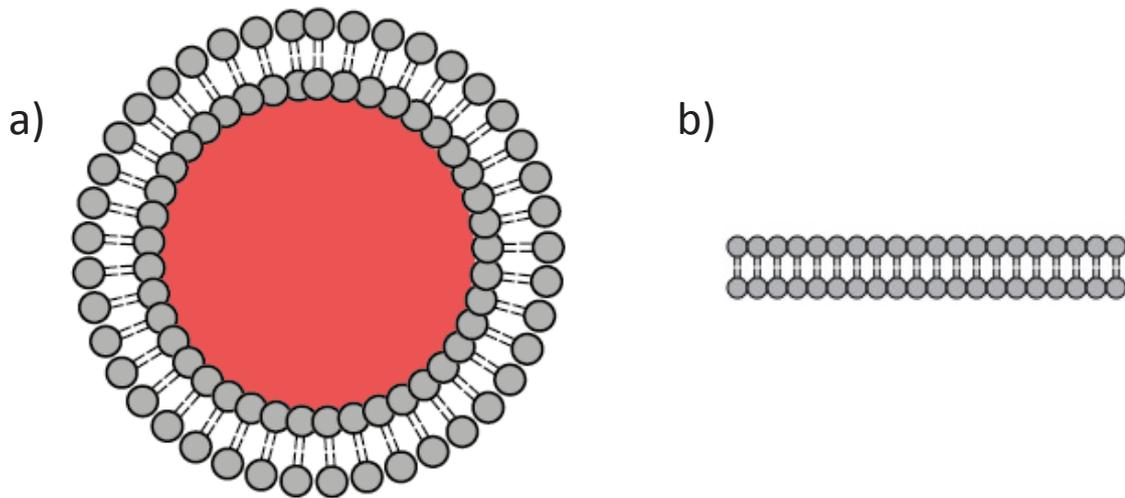
Eine Verpackung des Wirkstoffes und eine lokal begrenzte Freisetzung können die un-

erwünschten Wirkungen senken sowie einen stärkeren Effekt gegen die Tumorzellen erreichen [2–4]. Der medizinische Fachbegriff dafür ist „Drug Targeting“ und bezeichnet Möglichkeiten des Transports und der Freisetzung oder Aktivierung eines Wirkstoffs an dem Ort seines Gebrauchs. Dafür können chemische und physikalische Eigenschaften des Wirkstoffs, Transportmoleküle, speziell hergestellte Antikörper oder auch eine Verpackung des Wirkstoffes z.B. in eine Lipidhülle eingesetzt werden. Bereits in klinischer Anwendung sind einige Präparate mit liposomal eingeschlossenem Doxorubicin, z.B. Caelyx<sup>®</sup>. Es ist seit mehreren Jahren für die Therapie des Mamma-, des Ovarialkarzinoms, des Multiplen Myeloms als auch des Kaposi-Sarkoms zugelassen [5, 6].

Einen erfolgsversprechenden Ansatz für den klinischen Einsatz bieten auch thermosensitive Liposomen [3, 7]. Ihre potenziellen Einsatzmöglichkeiten und ihr temperaturabhängiges Verhalten unter Einfluss von Serum und Serumbestandteilen befinden sich in aktueller Erforschung.

## 1.1 Liposomen

Der Begriff Liposomen beschreibt eine kugelige aus einer Lipidmembran gebildete Struktur. Die liposomale Membran besteht in der Regel aus Phospholipiden mit einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Ende. Phospholipide sind somit amphiphile Moleküle. Vor allem durch diese physikalischen Eigenschaften entstehen in wässriger Lösung bevorzugt sphärische Strukturen mit einem inneren Hohlraum. Klinische Anwendung im Drug Targeting finden insbesondere Liposomen mit einer Doppellipidmembran. In deren Inneres können verschiedenste Substanzen, z.B. Chemotherapeutika oder Kontrastmittel eingebracht werden. Je nach den biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Substanzen kann der Einschluss passiv oder aktiv, z.B. über einen Ladungsgradienten, in die Liposomen erfolgen. Für das Drug Targeting lassen sich Mechanismen bzgl. a) eines gerichteten Transports oder b) einer gezielten Wirkstofffreisetzung und c) deren Kombinationen untersuchen. So lassen sich durch den Einbau von Antikörpern gegen besonders im Tumorgewebe exprimierte Rezeptoren, z.B. Folat-Rezeptoren [8] und Transferrin-Rezeptoren [9], ein Andocken und die dortige Akkumulation der Liposomen erreichen [3]. Je nach Zusammensetzung und Größe der liposomalen Membran lässt sich die Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs beeinflussen und verändern [10]. Versuche zur pH-Wert-induzierten Freisetzung, also einer Freisetzung v.a. bei den häufig vorliegenden azidotischen Verhältnissen im Tumor sind ebenfalls beschrieben [3, 11, 12], bergen jedoch den Nachteil einer oft schlechten Durchblutung des Tumors [13] sowie fehlende Möglichkeiten einer guten Steuerung des pH-Wertes von außen. Dem entgegengesetzt lässt sich z.B. die Temperatur von außen leicht verändern.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Liposoms und der liposomalen Membran.** a) Sphärisches Liposom mit einer Lipiddoppelmembran. Die hydrophoben Enden lagern sich aneinander. Die hydrophilen Kopfenden ragen nach außen und bilden eine kugelige Struktur mit geordneter Oberfläche. Im Inneren entsteht ein abgeschotteter, hydrophiler Hohlraum. b) Ausschnitt einer Doppellipidmembran. Die Fettsäureketten lagern sich an einander, während die polaren Kopfgruppen sich zu den Außenseiten ausrichten.

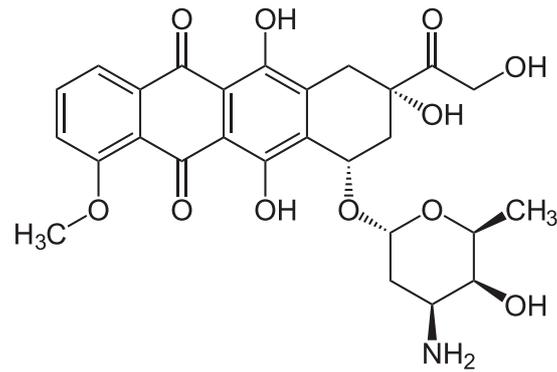
## 1.2 Freies und liposomales Doxorubicin

### 1.2.1 Doxorubicin

Doxorubicin (Dox) ist ein antineoplastisch wirksames Mittel aus der Gruppe der antibiotischen Zytostatika. Es zeichnet sich auch als Fluoreszenzfarbstoff mit einer Anregungswellenlänge von 480.0 nm und einer Emissionslänge von 580.0 – 590.0 nm aus. Dox zählt zu den am längsten klinisch eingesetzten antineoplastisch wirksamen Mitteln und wird z.B. bei zahlreichen soliden Tumoren, aber auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen eingesetzt [14]. Die Gabe von Dox erfolgt intravenös und muss über einen sicheren Zugang erfolgen, da es durch die ausgeprägte Gewebstoxizität bei einem Paravasat zu schwerwiegenden Gewebsnekrosen kommen kann.

Es zählt zu den Anthrazyklinen und entfaltet seine replikationshemmende Wirkung im Zellkern. Nach intravenöser Applikation diffundiert Dox in die Zellen und interkaliert in die DNS des Zellkerns, der Topoisomerase-II [15] und der mitochondrialen DNS [16], wodurch eine korrekte Vervielfältigung der genetischen Information verhindert und im Verlauf der Zelltod eingeleitet wird. Zu den bekannten Nebenwirkungen zählt neben der bedeutenden Myelosuppression u.a. die Kardiotoxizität der Anthrazykline, welche sowohl akut als auch chronisch auftreten kann [17]. Die akute Form tritt in der Regel innerhalb von 24 - 48 Stunden nach der Gabe auf und manifestiert sich in v.a. Herzrhythmusstörungen, die lebensgefährlich sein können [18]. Eine kardiale Sofortreaktion auf Dox stellt, nach den

**Abbildung 1.2: Strukturformel von Doxorubicin.** Dox ist ein antineoplastisch wirksames Molekül aus der Gruppe der Antibiotika. Es eignet sich auch als Fluoreszenzfarbstoff mit einer Emissionslänge bei 580.0 nm - 590.0 nm. Doxorubicin findet bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen Einsatz.



aktuellen Angaben der Fachinformation, keine Kontraindikation zu einer erneuten Gabe dar [14]. Eine Spätreaktion zeigt sich überwiegend nach einigen Monaten bis Jahren nach der Applikation von Dox. In den meisten Fällen kommt es dabei zur dilatativen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz. Das Risiko, eine Dox-induzierte Kardiomyopathie zu entwickeln, steigt mit der Höhe der kumulativ verabreichten Dosis [19] und wird in der Fachinformation mit 450 mg/m<sup>2</sup> bis maximal 550 mg/m<sup>2</sup> KOF angegeben [14]. Neben der Abwägung besonders gefährdeter Patienten, z.B. nach einer Bestrahlung des Mediastinums oder mit kardialen Vorerkrankungen, sind ggf. eine Dosisanpassung und obligatorische regelmäßige klinische, echokardiographische sowie Laborkontrollen unter Dox-haltiger Chemotherapie notwendig.

Octavia und Kollegen fassten 2012 [18] zusammen, dass eine eindeutige Ursache für die Anthrazyklin-induzierte Kardiomyopathie noch nicht gefunden werden konnte. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen, ausgelöst u.a. durch reaktive Sauerstoffspezies [17–19]. Im Verlauf kommt es zur Apoptose, Herzinsuffizienz und Reizleitungsstörungen. Um einer Dox-induzierten Kardiomyopathie vorzubeugen, sollten immer eine möglichst geringe Dosis bzw. gut verträgliche Formulierungen verabreicht werden. Ebenfalls kardiotoxische Substanzen sollten parallel, falls möglich, nicht gegeben werden. Kardioprotektive Substanzen, wie ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker oder Dexrazoxane können sich positiv auswirken [17, 20].

### 1.2.2 Liposomales Doxorubicin

Die erste liposomale Formulierung von Dox ist 1995 in den USA zur klinischen Anwendung zugelassen worden. Inzwischen sind zahlreiche weitere dazugekommen bzw. befinden sich in klinischer Erprobung.

Die erste Zulassung erhielt Caelyx<sup>®</sup> (Europa)/Doxil<sup>®</sup> (USA), welches eine pegylierte liposomale Membran aufweist und dadurch eine längere intravasale Zirkulationsdauer der Liposomen erreicht. Durch die Pegylierung wird die schnelle Aufnahme der Liposomen aus dem Gefäßsystem in das Retikulo-Endotheliale-System (RES) verhindert [15]. Hierdurch

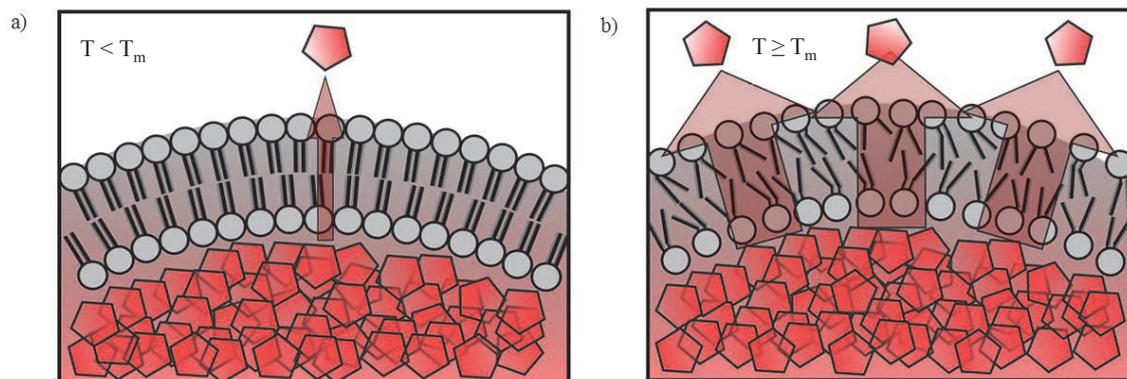
sollen eine lange Zirkulationsdauer und Akkumulation des Wirkstoffes im Tumor gewonnen werden. Auf Grund der tumorinduzierten, oftmals schnellen und ungenauen Angiogenese erscheint eine gesteigerte, passive Diffusion durch die poröse Endothelmembran in das Tumorgewebe möglich [7]. Dem entgegengesetzt ist durch TSL eine aktive und lokal begrenzte Dox-Freisetzung möglich, wodurch höhere Dox-Konzentrationen im Gewebe verglichen mit freiem Dox oder mit den zugelassenen liposomalen Dox-Formulierungen erreicht werden können [7]. Die weiteren Vorteile der Anwendung von liposomalen Dox liegen in der Reduktion der Kardiotoxizität bei gleicher antineoplastischer Wirksamkeit [15, 21]. Es wurde jedoch häufiger das Auftreten von reversibler palmar-planterer Erythrodysästhesie beobachtet [21], welche ebenfalls in vielen Fällen eine Dosisreduktion bzw. Therapiepause notwendig machen kann [22].

### 1.3 Thermosensitive Liposomen

Phospholipide können bei verschiedenen Temperaturen in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, sodass durch eine sorgfältige Auswahl der Lipide eine definierte sog. Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  für die Liposomenmembran festgelegt werden kann. Bei Erreichen dieser Temperatur wird die Membran von einem festen in einen flüssigen Aggregatzustand überführt [3, 7]. Geht die Membran von einer festen Phase in eine flüssige über, kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Membran [7]. Ist ein Wirkstoff liposomal eingeschlossen worden, resultiert eine schnelle intravasale Freisetzung des eingeschlossenen Pharmakons (s. Abbildung 1.3). Auch die Liposomengröße hat entscheidenden Einfluss auf das temperaturabhängige Verhalten und die Stabilität der Liposomen [4, 10]. Je nach Gewebeaffinität des enthaltenen Wirkstoffs fällt die Anreicherung im Gewebe unterschiedlich stark aus. Eine Dilution der liposomal freigesetzten Substanz im Gefäß und die lokale Wärmeapplikation können zu Schäden am Gewebe sowie den Gefäßwänden führen. Insbesondere durch die Gefäßschädigung könnte bei regelmäßiger Anwendung eine Beeinträchtigung der Blutversorgung des Tumors resultieren [23].

Bereits 1978 wurde von Yatvin et al die erste thermosensitive Formulierung [24] vorgestellt. Für die Phasenumwandlung war eine Temperatur von 44 °C nötig und auch die Freisetzung gelang noch nicht ausreichend schnell, sodass weitere Formulierungen untersucht werden mussten. Gute in vitro Ergebnisse erzielten Liposomenformulierungen mit sogenannten Lyso-Lipid-Anteilen, welche eine sehr schnelle Freisetzung durch die Bildung von Lyso-Lipid-Poren ermöglichen [7, 25]. In klinischer Erprobung befindet sich das liposomale DOX ThermoDox<sup>®</sup> (Celsion), welches Lyso-Lipid-Anteile in der Lipidmembran aufweist. Es wird aktuell in mehreren Studien für den Einsatz bei metastasiertem Brust- und Darmkrebs als auch Malignomen der Leber evaluiert [26–28].

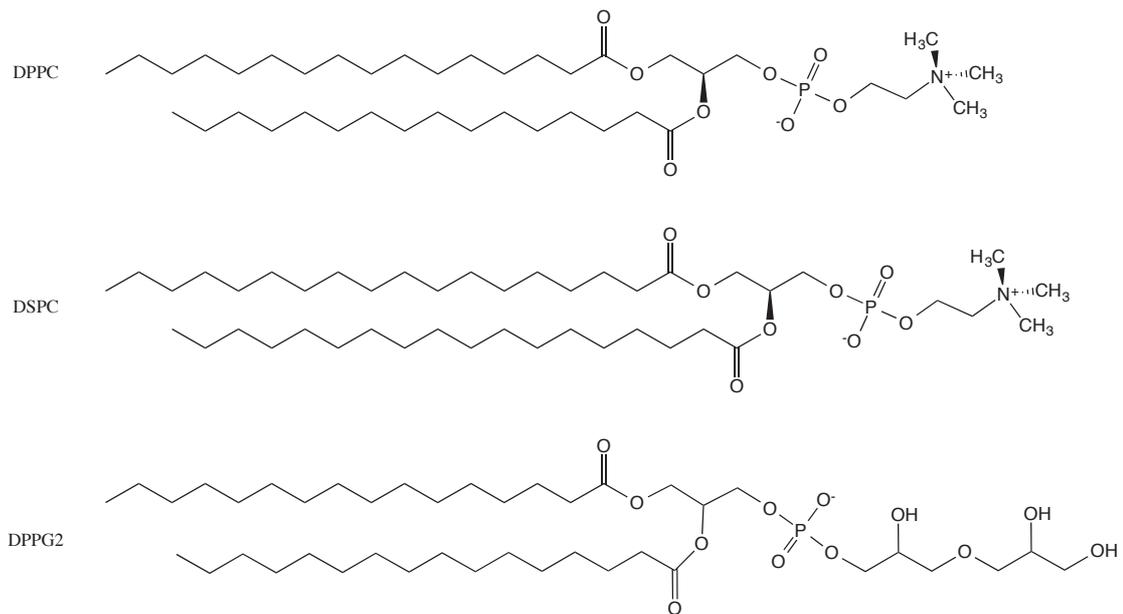
Eine gute intravasale Stabilität verbunden mit einer raschen temperaturabhängigen



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung einer liposomalen Membran vor und während der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$ .** a) Stabile Lipidmembran der thermosensitiven Liposomen bei Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$ . Die Membran ist nur gering durchlässig für die eingeschlossenen Moleküle, sodass nur geringe Mengen nach außen entweichen können. b) Dargestellt ist die Lipidmembran bei einer Umgebungstemperatur über der Phasenumwandlungstemperatur. Die liposomale Membran wird fluide und die einzelnen Lipide hiermit gut beweglich. Die enthaltenen Moleküle können einfach durch die Lipiddoppelschicht diffundieren und sich außerhalb des Liposoms verteilen. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Martin Hossann.

Freisetzung lässt sich durch eine Zusammenstellung der Membran aus 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC) / 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC) / 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG<sub>2</sub>) in einem Verhältnis von 50:20:30 (mol/mol) erreichen [29]. Die Phasenumwandlungstemperatur dieser Liposomen beträgt ca. 42 °C. Des Weiteren ist das Freisetzungsverhalten dieser Formulierung weniger abhängig von der Liposomengröße als z.B. von Liposomen mit Lyso-Lipid-Anteilen (PEG/Lyso-TSL: DPPC / 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin(P-Lyso-PC) / 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-methoxy(PEG)-2000 (DSPE-PEG2000) 90:10:4 (mol/mol)) [10].

Die in dieser Arbeit vor allem verwendeten synthetisch-hergestellten Lipide DPPC und DSPC sind natürlich vorkommende Phospholipide. Die Phasenumwandlungstemperaturen liegen bei 41,5 °C für DPPC und bei 56 °C für DSPC. Das synthetisch hergestellte DPPG<sub>2</sub> weist eine niedrigere Phasenumwandlungstemperatur von 39,7 °C auf und stellt den zweitgrößten Anteil in den hier v.a. hergestellten TSL dar. Durch Anknüpfen von Polyethylenglykol (PEG) verschiedener Längen (z.B. PEG2000) kann ein Schutzwall durch das Herausragen der PEG-Ketten und ein Abschirmen vor intermolekularen Wechselwirkungen erreicht werden [3, 7].



**Abbildung 1.4: Strukturformeln der Lipide DPPC, DSPC und DPPG<sub>2</sub>.** Strukturformeln der Bausteine von DPPG<sub>2</sub>-haltiger thermosensitiver Liposomenmembranen: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin [DPPC], 1,2-Distearoyol-sn-glycero-3-phosphocholin [DSPC] und 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphodiglycerin [DPPG<sub>2</sub>].

## 1.4 Blutserum und sein Einfluss auf liposomale Membranen

Blutserum besteht vor allem aus Wasser, Proteinen, Elektrolyten und in geringen Mengen aus Abfall-, Boten- und Nährstoffen. Korpuskuläre Blutbestandteile und Gerinnungsfaktoren sind im Vergleich zum Vollblut nicht mehr vorhanden. Es eignet sich beispielsweise für Untersuchungen zur Stabilität der Liposomen *in vitro*. Besonders häufig kommt dabei fetales Kälberserum (FCS) zur Anwendung, welches sich jedoch teilweise von humanem Serum unterscheidet. Da humanes Serum für wissenschaftliche Experimente nur schwer in den benötigten Mengen zu gewinnen ist und sich auch deutlich von Charge zu Charge unterscheiden würde, greift man auf FCS zurück, welches durch standardisierte Rahmenbedingungen weniger Abweichungen aufweist.

Das Verhalten von thermosensitiven Liposomen ändert sich im Beisein von Blutserum [30], sodass genaue Untersuchungen zum Verhalten von TSL in Serum bzw. einzelnen Serumkomponenten wichtig ist.

### 1.4.1 Proteine

Die Proteinkonzentration im Humanserum liegt in der Regel bei 66-83 g/l (s. Tabelle 1.1). Es finden sich v.a. Albumin, Transferrin, Haptoglobin, Coeruloplasmin, Komplementfaktoren und Immunglobuline. Albumin und Immunglobuline bilden die größten Anteile. Es

Parameter	Einheit	FCS	physiol. Norm
pH		7,28	7,37 - 7,45
Osmolalität	mosmol/kg	313	280 - 296
Enzyme			
Alkalische Phosphatase	U/l	402	35 - 105 (Frau) 40 - 130 (Mann)
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	U/l	46	bis 32 (Frau) bis 38 (Mann)
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)	U/l	8	bis 31 (Frau) bis 41 (Mann)
$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT)	U/l	8	bis 40 (Frau) bis 60 (Mann)
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	U/l	558	bis 250
Kreatin-Phosphokinase (CK)	U/l	97	bis 170 (Frau) bis 190 (Mann)
Hämoglobinstoffwechsel			
Hämoglobin	mg/100ml	23,88	12 - 16 (Frau) 13 - 17 (Mann)
Bilirubin total	mg/100ml	0,2	bis 1,1
Kohlenhydrate			
Glucose	mg/100ml	63	bis 100
Lipide			
Cholesterin	mg/100ml	38	bis 200
Proteine und N-haltige Verbindungen			
Protein (gesamt)	g/100ml	3,6	6,6 - 8,3
Albumin	g/100ml	1,7	3,5 - 5,2
$\alpha$ -Globulin	g/100ml	1,6	0,13 - 1,08
$\beta$ -Globulin	g/100ml	0,2	0,53 - 1,24
$\gamma$ -Globulin	g/100ml	0,1	0,73 - 1,83
Kreatinin	mg/100ml	2,74	bis 0,9 (Frau) bis 1,1 (Mann)
Harnstoff	mg/100ml	28	12 - 50
Hormone			
Estradiol	pg/ml	90,2	
Progesteron	ng/ml	< 0,2	
Testosteron	ng/ml	0,07	
Elektrolyte			
Natrium	mmol/l	144	135 - 145
Kalium	mmol/l	9,2	3,6 - 5,4
Calcium	mmol/l	2,97	2,2 - 2,6
Magnesium	mmol/l	1,08	0,75 - 1,05
Phosphat	mmol/l	2,55	0,84 - 2,4
Schwermetalle			
Eisen	$\mu$ g/100ml	162	50 - 150 (Frau) 50 - 160 (Mann)

**Tabelle 1.1: Gegenüberstellung der repräsentativen Zusammensetzung von FCS und Humanserum.** Auflistung der Bestandteile einer repräsentativen Charge (Charge 0661 L, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und der Standardangaben zu humanem Serum aus Herold Innere Medizin [31].

ist bekannt, dass sie in Interaktion mit liposomalen Membranen treten können [3, 7, 32].

### 1.4.2 Serumalbumin

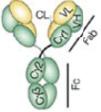
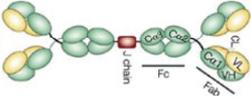
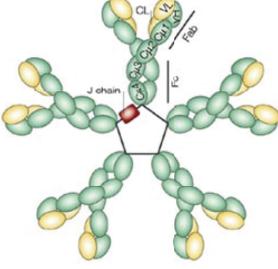
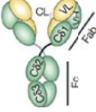
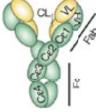
Albumin ist ein ca. 66,5 kDa schweres, von den Hepatozyten gebildetes Protein. Es stellt mit 60-65 % der Serumproteine einen Großteil der Blutproteine dar und trägt stark zur Erhaltung des onkotischen Drucks im Gefäß bei. Es dient ebenfalls als Transportprotein z.B. für Abbaustoffe, Aminosäuren oder Fettsäureketten sowie Hormone und fungiert als Antioxidans [33, 34]. Des Weiteren leistet Albumin durch seine ampholytischen Eigenschaften einen geringen Beitrag zur Pufferung des pH-Wertes im Blut.

Durch seine zahlreichen Bindungsmöglichkeiten stellt Albumin ein sehr gutes Transportprotein für medizinische Wirkstoffe dar und kann so z.B. die Halbwertszeit, die Freisetzung und das Nebenwirkungsprofil von Medikamenten beeinflussen [35]. Dabei unterscheidet man zwischen Medikamenten, die bereits an Albumin gebunden sind, und Wirkstoffen, welche nach Aufnahme durch den Körper an Albumin gebunden werden. Bereits zugelassene Wirkstoffe mit hoher Proteinbindung sind in der Endokrinologie z.B. Levemir (Insulin detemir) und in der Krebstherapie z.B. Abraxane (Paclitaxel als Nanopartikel exogen an Albumin gebunden) bei nichtkleinzelligem Lungen-, Brust- und Pankreaskarzinom [36]. Laufende Studien untersuchen Vorteile einer Applikation von Aldoxorubicin, einem Prodrug von Dox, welches schnell an Serumalbumin bindet und bei Änderung des pH-Wertes ins Saure, also z.B. im Tumorgewebe, wieder frei wird [37]. Mögliche Interaktionen von Albumin mit liposomalen Membranen sind beschrieben [32, 38].

### 1.4.3 Antikörper

Als fester Bestandteil des Immunsystems der Säugetiere spielen die fünf Antikörperklassen eine wichtige Rolle in der humoralen Immunantwort des Menschen. Sie tragen z.B. zur Opsonierung unbekannter Moleküle und Neutralisierung bereits bekannter Antigene bei und kommen membrangebunden sowie frei u.a. im Serum, Speichel- als auch Tränenflüssigkeit vor.

Spezifische Antikörper werden erst nach Kontakt mit fremden Antigenen gebildet und passen genau zu diesem Epitop. Zum besseren Schutz und somit frühzeitiger Abwehrreaktion des Körpers werden auch Antikörper mit zufälligem Fab-Anteil gebildet. Die Bindung von Antikörpern an ähnliche, aber nicht spezifisch passende Epitope ist auch möglich, jedoch in der Regel weniger stabil und nur kurzfristig. Es ist bekannt, dass Antikörper mit liposomalen Membranen interagieren und dadurch ihre Festigkeit stören und die Membranen durchlässiger machen können [3, 32]. Dabei reagieren die verschiedenen Subklassen der Immunglobuline unterschiedlich stark mit den Lipiden [40]. Aber auch die Membranbestandteile bzw. vor allem das Vorhandensein von Anionen an der Membranoberfläche

Antikörper	Struktur	Funktion/Lokalisation	Häufigkeit
<b>IgG</b>		Erkennen v.a. virale, bakterielle Antigene und bakterielle Toxine	80 %
<b>IgA</b>		V.a. in Tränenfilm, Speichel u.ä. zur Erkennung und Abwehr von Antigenen vor Aufnahme in den Körper	13 %
<b>IgM</b>		Erste gebildete Antikörper nach Antigenkontakt. Anzahl sinkt nach Bildung von IgG-AK	6 %
<b>IgD</b>		Membrangebunden an B-Zellen	1 %
<b>IgE</b>		V.a. gebunden an basophilen und Mastzellen, wichtiger Bestandteil einer allergischen Reaktion sowie bei parasitärem Befall	0,002 %

**Tabelle 1.2: Immunglobulinklassen des Menschen und ihre Funktionen, Häufigkeiten und Vorkommen. Abbildung adaptiert aus [39].**

scheinen eine Rolle zu spielen [40]. Außerdem können Antikörper nicht nur direkt mit Liposomen interagieren, sondern auch an andere Serumproteine, die sich an die Membran anlagern, binden und auf diesem Weg ebenfalls eine Immunantwort bzw. ein Abfangen der Liposomen im RES bewirken [41]. Störungen der Membranstabilität bzw. ein Erkennen und Abfangen der intravenös verabreichten Liposomen sind besonders durch den Fc-Anteil der Antikörper möglich [40, 42].

#### 1.4.4 Cholesterin und Lipoproteine

Cholesterin (Chol) ist ein natürlich vorkommendes Molekül, das u.a. im Aufbau der Zellmembran und zur Synthese von Steroidhormonen unerlässlich ist [43, 44]. Es ist eine lipophile Substanz, die im Blut gebunden an Transportproteine wie Chylomikronen, HDL, IDL, LDL und VLDL transportiert werden muss [31]. Der gesamte Lipidgehalt im humanen Serum beträgt zwischen 4 bis 10 g/l (s. Tabelle 1.1) und findet sich auf Grund der Lipophilie v.a. zellassoziiert oder in Lipoproteinen. Somit ist ein Kontakt zu intravenös verabreichten Liposomen als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Cholesterinmoleküle können in der Zellmembran Transportkanäle ausbilden, über die lipophile Moleküle in die Zelle ein- und ausgeschleust werden können. Es ist bekannt, dass Phospholipide v.a. über Transportproteine zwischen lipidischen Vesikeln und Lipoproteinen wechseln können [32, 45]. Cholesterin und Lysolipide können auch frei zwischen Lipidvesikeln springen [32]. Bei Aufnahme oder Entweichen von Lipiden aus einer Membran wird deren Ordnung und Stabilität gestört, sodass es folglich zu einer Abnahme der Membranstabilität und einer Zunahme der -permeabilität kommt [32]. Der initiale Einbau von Cholesterin in liposomale Membranen führt zu einer stabileren Membran durch die Verringerung der Membranfluidität und Wasserdurchlässigkeit [3, 43]. Dies kann durch die Reduktion des Membran-Lipid-Verhältnisses und eine strengere Anordnung der Membranlipide, was zu einer dichteren Lipidmembran führt, erklärt werden [46]. Inwieweit die Eigenschaften von TSL durch intramembranöse Lipidbewegungen geändert werden und die Änderung der Membraneigenschaften durch Cholesterineinbau bleiben ein aktuelles Diskussionsthema.

#### 1.4.5 Niedermolekulare Serumbestandteile

Zu den niedermolekularen Bestandteilen des Serums zählen z.B. Elektrolyte, Aminosäuren, Zytokine und Abbaustoffe wie Harnstoff [47]. Ein ausgeglichener Elektrolythaushalt ist für die regelrechte Funktion des Körpers sehr wichtig. Bei stärkeren Abweichungen von der Norm kann es zu gravierenden Beeinträchtigungen der Bioelektrizität, z.B. zu neurologischen Störungen oder Problemen im Reizleitungssystem des Herzens, kommen [31]. Eine engmaschige Kontrolle und ggf. Einstellung des Elektrolythaushalts ist somit für den menschlichen Körper essentiell. Gerade bezüglich des einfach positiv geladenen Kaliums

findet sich eine deutlich höhere Serumkonzentration im fetalen Kälberserum im Vergleich zum Humanserum (s. Tabelle 1.1), sodass Untersuchungen zum Einfluss der niedermolekularen Bestandteile auf das Freisetzungsverhalten von thermosensitiven Liposomen sinnvoll erscheinen.

## 1.5 Therapeutische Wärmeapplikationen

In der Medizin finden sich zahlreiche Möglichkeiten der lokalen oder systemischen Wärmeapplikation. Zur gemeinsamen Nutzung und Erhöhung der antineoplastischen Effektivität befinden sich bisher insbesondere die lokale Hyperthermie und fokussierter Ultraschall in Anwendung [48].

### 1.5.1 Hyperthermie

Die künstlich herbeigeführte Erhöhung der Körpertemperatur wird bereits seit vielen Jahren additiv in der Krebstherapie eingesetzt [49, 50]. Aktuell kommt sie gelegentlich bei fortgeschrittenen oder inoperablen Tumoren zum gemeinsamen Einsatz mit systemischer Chemo- und lokaler Strahlentherapie. Man unterscheidet die Erwärmung des gesamten Körpers oder einzelner Körperteile bzw. Organe auf Temperaturen zwischen 39 °C–45 °C. Oberflächige Tumoren lassen sich gezielt mittels Oberflächenhyperthermie durch elektromagnetische Wellen im kurzwelligen Mikro- oder Radiowellenbereich erwärmen [48, 49]. Tiefer liegende Tumoren können durch die sog. regionale Tiefenhyperthermie durch Anwendung von längeren elektromagnetischen Wellen im Bereich „von 27 MHz bis etwa 120 MHz“, wie Lindner et al beschreiben, erreicht werden [48]. Weniger selektive Temperatursteigerungen sind durch Wärmebäder oder Spülungen, z.B. des Retroperitonealraums, möglich [50]. Die Dauer der Erwärmung beträgt in der Regel zwischen 60 [48] und 90 Minuten [49].

Durch die gezielte Erhöhung der Temperatur können eine Stimulierung des körpereigenen Immunsystems, eine thermische Schädigung des Gewebes und eine Wirksteigerung des Medikamentes bzw. der Bestrahlung folgen [50, 51].

Die Stimulation des Immunsystems beruht u.a. auf der Expression von Proteinen aus der Hitzeschockfamilie [50, 52]. Insbesondere die Expression von dem Hitzeschockprotein Hsp70 scheint im Rahmen von milder Hyperthermie zuzunehmen und dadurch eine verstärkte Immunantwort durch die Aktivierung der natürlichen Killerzellen gegen den Tumor auszulösen [53, 54]. Hierdurch ist eine Brücke zu einem möglichen additiven Ansatz bei der Immunkrebstherapie möglich.

Thermische Schädigungen wurden regelhaft ab Temperaturen über 41 °C beschrieben, es ist jedoch klar, dass nicht nur die erreichte Höchsttemperatur, sondern auch die Dauer der thermischen Einwirkung, der jeweilige Zelltyp und die aktuelle Phase des Zellzyklus

entscheidenden Einfluss auf die Reaktion haben [49]. Hildebrandt et al. [55] beschrieben Störungen des Spindelapparates und chromosomale Schäden je nach Zyklusphase der betroffenen Zelle. Auf Grund des schlecht kontrollierten und schnell voranschreitenden Wachstums des Tumors mit fehlerhaft ausgebildeter Vaskularisation, finden sich meist ein eher saures Milieu, eine hypoxische Stoffwechsellage und oft Nekroseareale im Tumorumneren (s. Kapitel 1.1). Dies prädisponiert die Tumorzellen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Stress. Eine zusätzliche Stressexposition, z.B. im Sinne von Hyperthermie, kann den Zelltod verfrüht einleiten [50].

### 1.5.2 Hyperthermie und Chemotherapie

Für zahlreiche Chemotherapeutika gibt es Untersuchungen, die eine Wirksteigerung unter Hyperthermie beschreiben [52]. Dies ist oftmals physikalisch durch eine gesteigerte Durchblutung und Gefäßpermeabilität des Tumorareals sowie der daraus folgenden Anreicherung des Mittels im Tumor erklärbar [52, 56–58]. Im Rahmen der Temperaturerhöhung sind auch ein schnelleres Anfluten des Wirkstoffes im Zellkern und die damit einhergehende Schädigung der DNS (Desoxyribonukleinsäure) möglich. Allerdings entstehen DNS-Schäden nicht allein durch die Hyperthermie, sondern insbesondere durch eine Störung der DNS-Reparaturproteine und den verwendeten Chemotherapeutika [52, 55].

Des Weiteren können die Zellen den Schaden durch zwei gleichzeitig einwirkende Stressoren schlechter ausgleichen. Auch gibt es Hinweise auf ein erneutes Ansprechen resistenter Zellen auf Platinderivate nach Gabe des Chemotherapeutikums unter Hyperthermie [59].

Bezüglich Dox erscheint eine intensiviertere Anreicherung im Tumorgewebe unter milder Hyperthermie möglich, sodass höhere intratumorale Konzentrationen erreicht werden können. Eine Wirksteigerung für Dox unter milder Hyperthermie lässt sich leider nicht beobachten, sodass der TER (thermal enhancement ratio), ein Quotient zur Quantifizierung des zytotoxischen Effekts unter verschiedenen Temperaturen, für Dox unter 41,5 °C und unter 43,5 °C bei jeweils 1,0 angesetzt wird [52, 60].

Da eine Anreicherung und ggf. Wirksteigerung des verabreichten Chemotherapeutikums sowie die Freisetzung des Wirkstoffes aus thermosensitiven Liposomen erreicht werden kann, bildet die lokale Hyperthermie einen vielversprechenden Ansatz zum Drug Targeting mit TSL.

### 1.5.3 Hyperthermie und Strahlentherapie

Im Rahmen einer multimodalen Krebstherapie kommt der Radiatio eine große Bedeutung zu. Milde Hyperthermie führt zu einer Strahlensensibilisierung der Zellen [48, 49, 55]. Die Zunahme der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung resultiert aus der erhöhten Durchblutung des Gewebes mit Verringerung des sauren Milieus und der hypoxischen Tu-

moranteile, welche sonst wenig strahlensensibel sind (vergleiche Kapitel 1.5.1) [43]. Overgaard [61] und van der Zee [50] fassten jeweils zusammen, dass sich die größten Effekte unter simultaner Anwendung von Wärme und Bestrahlung zeigen, was in der täglichen Praxis auf Grund der notwendigen stationären Geräte schwierig durchzuführen ist. Eine gute Option besteht darin, die Hyperthermie- und Strahlenbehandlung nacheinander durchzuführen [55,61]. Es muss jedoch festgehalten werden, dass die Steigerung der Radiotoxizität durch Hyperthermie gleichermaßen Tumor- und gesundes Gewebe trifft, sodass auch mit einer Erhöhung der Nebenwirkungen einer Strahlentherapie gerechnet werden muss. Durch den stetigen Fortschritt der technischen Entwicklungen kann das Strahlenfeld in der Zwischenzeit, insbesondere bei Anwendung von stereotaktischer Bestrahlung, gut begrenzt und Schäden am umliegenden Gewebe insgesamt verringert werden.

#### 1.5.4 Fokussierter Ultraschall

Fokussierter Ultraschall kann zur gezielten Erwärmung und auch Zerstörung von lokalen Tumoren eingesetzt werden [48,62]. Zur selektiven Erwärmung selbst tiefliegenden Gewebes eignet sich hoch-fokussierter Ultraschall (high-intensity focused ultrasound, HIFU), sodass es eine sehr gute Möglichkeit der Temperaturerhöhung und eine sinnvolle Kombination in der Therapie mit TSL darstellt [62,63]. Je nach Wahl der Wellenlänge, des Fokus und des Modus können die Temperatur und die Eindringtiefe gewählt als auch das Areal entweder mit kontinuierlichen (continuous wave-HIFU) oder pulsatilen (pulsed wave-HIFU) Schallwellen erwärmt werden [62]. Ein kurzzeitiger Druckaufbau kann ebenfalls zu einer erhöhten Freisetzung aus TSL beitragen.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

TSL können einen Beitrag zur erfolgreichen Tumorthherapie liefern. Durch die gezielte Freisetzung antineoplastischer Substanzen können Nebenwirkungen verringert, Dosislimitierungen umgangen und ein besseres Therapieansprechen erreicht werden. Das umgebende Medium beeinflusst wesentlich das Freisetzungserhalten der TSL. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, den Einfluss verschiedener Serumbestandteile auf TSL der Formulierung DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 mol/mol) aufzuschlüsseln und einen Ausblick auf die Möglichkeiten ihres klinischen Einsatzes zu geben. Besonderes Augenmerk wurde daher auf den Einfluss von Serum und hochmolekularen Serumbestandteilen auf das temperaturabhängige Freisetzungsverhalten DPPG<sub>2</sub>-haltiger TSL gelegt. Des Weiteren sollten Unterschiede des Freisetzungsverhaltens der TSL nach Variation der TSL-Membran durch Einbau von Cholesterin und PEG2000 beleuchtet werden. Da Serumbestandteile wesentlichen Einfluss auf die Membranstabilität der TSL haben und z.B. FCS von Charge zu Charge variiert, sollte ein künstliches Serum als mögliches standardisiertes Inkubations-

medium generiert werden. Die Lagerfähigkeit ist relevant für die praktische Anwendung im klinischen Alltag, sodass die Lagerstabilität der TSL bei 4°C untersucht werden sollte.



# Kapitel 2

## Material

### 2.1 Lipide

Abkürzung	Lipid	Molare Masse [g/mol]	Bezugsort
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	734,06	Genzyme Pharmaceuticals, Liestal, Schweiz
DSPC	1,2- Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	790,17	Genzyme Pharmaceuticals, Liestal, Schweiz
DSPE-PEG2000	1,2- Dipalmitoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylen-glycol)-2000]	2805,54	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA
DPPG <sub>2</sub>	1,2- Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphodiglycerin	819,04	CordenPharma, Liestal, Schweiz
P-Lyso-PC	1-Palmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	495,64	Genzyme Pharmaceuticals, Liestal, Schweiz
Chol	Cholesterin	386,66	Bereitstellung von Prof. Eibl, Göttingen

**Tabelle 2.1:** *Tabellarische Auführung der verwendeten Lipide.*

## 2.2 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Formulierungen

Name	Bezugsort
Ammoniaklösung 25 %	Merck, D-Darmstadt
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Merck, D-Darmstadt
Albumin, Alburnorm <sup>®</sup> 200 g/l	Octapharma GmbH, D-Langenfeld
Ammoniumhepta-Molybdat-Tetrahydrat	Merck, D-Darmstadt
Bidestilliertes-Wasser aus Reinstwasseranlage	Firma-Millipore, D-Darmstadt
Caelyx <sup>®</sup>	Krankenhausapotheke, Klinikum der Universität München, D- München
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim
Carboxyfluorescein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim
Chloroform	Merck, D-Darmstadt
Doxorubicin 2 mg/ml	Krankenhausapotheke, Klini- kum der Universität München, D- München und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Ethansäure (Eisessig)	Merck, D-Darmstadt
FCS	Biochrom AG, D-Berlin
Gepoolte Immunglobuline, Intradect <sup>®</sup> , 50 g/l	Biotest Pharma GmbH, D-Dreieich
HEPES	Biomol GmbH, D- Hamburg
L-Histidin	Roth, D-Buchenau
Methanol	Roth, D-Buchenau
Molybdänpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim
Molybdäntrioxid MoO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim
NaCl	Roth, D-Buchenau
Natronlauge 0,1 mol/l	Roth, D-Buchenau
Perchlorsäure HClO <sub>4</sub> 70%	Merck, D-Darmstadt
Phosphat-Standard, 1000 mg/l Phosphat	Merck, D-Darmstadt
Phosphor ICP Standard, 1000 mg/l Phosphor	Merck, D-Darmstadt
Salzsäure 0,1 mol/l bzw. 1 mol/l	Roth, D-Buchenau
Schwefelsäure H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96 %	Merck, D-Darmstadt
Sephadex <sup>®</sup> G-50	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D- Steinheim
Stickstoff (Reinheit > 99,99 %)	Linde
Triton-X100	Roth, D- Buchenau

**Tabelle 2.2:** *Aufistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Formulierungen.*

### 2.3 Puffer und hergestellte Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen wurde Reinstwasser (Aqua Millipore<sup>®</sup>) verwendet.

Name	Bestandteile / Zusammensetzung
Ammoniumsulfatpuffer	300 mM Ammoniumsulfat pH 4,0
Citratpuffer	300 mM Zitronensäure pH 4,0
Histidin-Puffer	L-Histidin 6,21 g (20 mM) NaCl 8,77 g (150 mM) Wasser ad 1 l pH 6,4
HN-Puffer	20 mM Hepes (4,8g ) 150 mM NaCl (8,8 g) Wasser ad 1 l (pH 7,4 oder pH 7,8)
Laufmittel	100 ml Chloroform 60 ml Methanol 20 ml Eisessig 5 ml Wasser
Lösung I	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 35,31 g, Wasser ad 100 ml
Lösung II	Ammoniumheptamolybdat- Tetrahydrat 3g, 10 % Triton X-100 120 mg, Wasser ad 100 ml
Molybdänblauspray	150 ml Lösung I Molybdäntrioxid 40,1 g ad 1 l 25 %ige H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 150 ml Lösung II - Molybdänpulver 1,8 g - Lösung I 500 ml Wasser 600 ml
NaCl 0,9 %	Natriumchlorid 4,5 g Wasser 500 ml
Sephadex <sup>®</sup> Säulenmaterial	Sephadex <sup>®</sup> G-50 10 g 0,9 % NaCl-Lösung ad 150 ml

**Tabelle 2.3:** Auflistung der verwendeten Puffer und im Labor hergestellten Lösungen.

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Amicon Ultra-15, MWCO 10 kDa	Millipore GmbH; D-Schwalbach
DC-Kieselgel 60 (10x20 cm-Platten)	Merck, D-Darmstadt
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf AG, D-Hamburg
Eppendorfer Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, D-Nümbrecht
Falcon Reaktionsgefäß, 50 ml Glas-Pasteurpipetten (230mm)	BD, Erembodegem, Belgien Brand, D-Wertheim
Glaswolle	Assistent, D-Sondheim
Kunststoff-Pipettenspitzen	Eppendorf AG, D-Hamburg
Nitril-Handschuhe Polycarbonatfilter (100 nm, 200 nm)	Berner, D-Elmshorn Whatman, D-Dassel

**Tabelle 2.4: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.**

## 2.5 Geräte

Name	Hersteller
Digitaler Vakuumregler Vac Control Automatic R	Heidolph Instruments, D-Schwabach
Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer	Varian, Pao Alto, Kalifornien, USA
Extruder Lipex	Northern Lipids Inc., Burnaby, Kanada
Feinwaage, Precisa 205 A SCS	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Heizblock Typ 53 LS 6301	Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, D-Bielefeld
Magnetrührer mit Heizplatte, Modell VMS-A	VMR International GmbH, D-Darmstadt
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, D-Wertheim
pH-Elektrode SenTix 81	WTW, D-Weilheim
pH-Meter inolab pH 720	WTW, D-Weilheim
Pierce Reacti-Vap <sup>TM</sup> Bedampfungseinheit	Thermo Fisher Scientific, D-Schwerte
Pierce Reacti-Vap <sup>TM</sup> Heizblock	Thermo Fisher Scientific, D-Schwerte
Pipettierhilfe Pipetus <sup>®</sup>	Hirschmann Laborgeräte, D-Eberstadt
Rotationsverdampfer Laborota 4001	Heidolph Instruments,
Scanner Hp Scanjet 3800	HP, Palo Alto, Kalifornien, USA
Spectrophotometer Beckmann DU <sup>®</sup> 640	Beckman Coulter GmbH, D-Krefeld
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, D-Hamburg
Vakuum Exsikkator	Nalgene, New York, USA
Vortex Genie 2 Waage	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Precisa BJ6100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Wärmebad, Pharmacia LKB-Multitemp II	Pharmacia, D-Freiburg
Zentrifuge ZK 380	Hermle Labortechnik, D-Wehingen
Zentrifugen 5415 D und 5415 C	Eppendorf AG, D-Hamburg
Zetasizer Nano series	Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien

**Tabelle 2.5: Geräteauflistung.**

## 2.6 Programme

Name
EndNote X6
Microsoft Office 2010
Pubmed
Zetasizer Nano series software
Un-scan-it gel Version 5.1 (Silk Scientific Corp.)

**Tabelle 2.6:** *Aufistung der verwendeten Programme und Datenbanken.*

# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1 Liposomenherstellung

#### 3.1.1 Lipidfilm

Für die Herstellung eines Lipidfilms wurden die gewünschten Lipide mit einer Feinwaage abgewogen und jeweils in einem Gefäß mit 20 ml Chloroform gelöst. Bei Verwendung von Cholesterin wurde darauf geachtet, dass der DPPG<sub>2</sub>-Anteil bei 30 mol% und das Verhältnis von DPPC zu DSPC unverändert blieben.

Aus jedem Gefäß wurden die benötigten Lipide entsprechend den Konzentrationen entnommen und in einen gemeinsamen Glasrundkolben pipettiert. Um einen gleichmäßigen Lipidfilm zu erzeugen, wurde der Glaskolben an einen bereits auf 40 °C vorgewärmten Rotationsverdampfer gehängt. Unter kontinuierlicher Rotation für 15 Minuten und Vakuum (375 mbarVakuum) verdampft das Lösungsmittel, wodurch ein gleichmäßiger Lipidfilm entsteht. Anschließend wurde der Film für mindestens 30 min bei 60 °C und 150 mbar sowie danach für 120 min bei 60 °C und 40 mbar getrocknet [29]. Vor weiterer Verarbeitung wurde jeder Lipidfilm für nicht weniger als 12 Stunden unter Lichtausschluss und in Vakuum gelagert.

#### 3.1.2 Hydratisierung

Durch Hydratisierung mit einem wässrigen Puffer oder einer Lösung eines Fluoreszenzfarbstoffes bilden sich aus dem Lipidfilm spontan Vesikel unterschiedlicher Größe. Hierfür wurde der Glaskolben an den vorgewärmten Rotationsverdampfer (60 °C) angeschlossen und mit dem gewünschten Puffer für ungefähr 30 min auf höchster Stufe rotiert. Mit dem bloßen Auge erkennbar löste sich der Lipidfilm von der Glasoberfläche und es bildete sich eine leicht trübe Suspension.

### 3.1.2.1 Hydratisierung mit Carboxyfluorescein

Zum getrockneten Lipidfilm wurde 100 mM Carboxyfluorescein (CF) (pH 7,3) hinzugegeben und der Lipidfilm unter Rotation gelöst. Bei Lösen des Lipidfilms in CF-haltigem Puffer wird ein Teil des CF passiv in die entstehenden Vesikel eingeschlossen und verbleibt im Inneren der kugelförmigen Partikel. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (s. 3.1.4) entfernt [29].

### 3.1.2.2 Hydratisierung mit Ammoniumsulfatpuffer

Die Herstellung von mit Ammoniumsulfatpuffer (pH 5,4) verschiedener Stoffmengenkonzentrationen (160 mM, 200 mM und 240 mM) beladenen Liposomen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Diese Lipidvesikel wurden für aktives Beladen über einen Ammonium-Gradienten, z.B. für Dox, benötigt.

### 3.1.3 Extrusion

Die in der Hydratisierung gebildeten Vesikel haben meist eine Größe  $> 1 \mu\text{m}$ , sodass sie mittels Extrusion weiter verarbeitet werden mussten. Die liposomale Suspension wurde hierfür im Extruder unter Druck durch Filter mit fester Porengröße (z.B. 100 nm, 200 nm) geführt. Dadurch werden Liposomen eines bestimmten Durchmessers generiert.

Beim Aufbau des Extruders wurden je zwei Polykarbonatfilter eingesetzt und mit zwei Stahlfiltern gestützt. Der Extruder wurde für mindestens 20 min auf 60 °C vorgewärmt, um die Extrusion der Lipidlösung zu erleichtern. Um die Lösung zu filtrieren, wurde eine Stickstoffflasche mit dem Extruder verbunden und ein Druck von 3 mbar eingestellt. Das Einpipettieren der bislang heterogenen Vesikel wurde möglichst ohne Luftblaseneinschluss durchgeführt, da dies zu einer Verstopfung der Filter führen kann.

Die Filtration wurde zehn Mal hintereinander wiederholt und die Filter anschließend auf mögliche Einrisse überprüft. Zwischen den Extrusionsvorgängen wurden die Liposomen in einem Wasserbad warmgehalten, um der Entstehung von anderen Lipidformationen vorzubeugen.

### 3.1.4 Säulenchromatographie der Liposomenproben

Die Säulenchromatographie dient dem Aufreinigen der Liposomensuspension. Je nach Wahl der Säule kann auch ein Umpuffern der Liposomen erzielt werden.

CF-Liposomen wurden in einer Sephadex<sup>®</sup>-Säule gegen 0,9 % NaCl und Dox-TSL gegen HN-Puffer (pH 7,8) bei Raumtemperatur gesäult. Da Liposomen mit CF bzw. Dox eine orange bzw. rote Farbe haben, ist das Auffangen der durchgelaufenen Liposomen einfach. Man beobachtete die Färbung der unten abtropfenden Lösung und sammelte

nur die kräftig gefärbte Fraktion. Bei jeder Säulenchromatographie musste stets darauf geachtet werden, dass die Säule nicht trocken lief.

### 3.1.5 Liposomaler Einschluss von Doxorubicin

Die Beladung von Liposomen mit amphiphilen Substanzen wie Dox verlief nach dem Remote-Loading-Verfahren über einen Ammoniumgradienten [64]. Für das Loading-Verfahren wurde u.a.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in den Molaritäten 160, 200 und 240 mM verwendet. Die Liposomen und die Dox-Lösung wurden bei 37 °C oder 38 °C im Thermomixer inkubiert. Die Dox-Menge richtete sich nach dem angestrebten Drug-to-Lipid-Verhältnis von 0,13. Während der Inkubation diffundiert das Dox über die liposomale Membran. Im Inneren der Liposomen erfolgt eine Protonierung des Moleküls durch den Überschuss an  $\text{NH}_4^+$ , sodass das Dox nicht mehr entweichen kann. Der liposomale Einschluss wurde über die Abnahme der Fluoreszenz (Ex 470 nm, Em 555 nm) bestimmt und beendet, sobald die Fluoreszenz auf 10 % des Ausgangswertes abgefallen war. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten ab dem Zeitpunkt 0 in 5-Minuten-Abständen. Nach dem Einschluss wurde die Probe für mindestens 30 Minuten bei 4 °C abgekühlt. Zur Entfernung von nicht eingeschlossenem Dox und ggf. entstandener unerwünschter liposomaler Strukturen wurde die Suspension zentrifugiert (2.000 g, 10 min, RT) und der Überstand weiter verarbeitet. Der Überstand wurde dann, verteilt auf Zentrifugenröhrchen, bei 19.000 U/min für 45 Minuten bei 15 °C zentrifugiert. Das nicht eingeschlossene Dox sammelte sich im Überstand und wurde verworfen. Das Pellet wurde in Histin-Puffer pH 6,4 resuspendiert und die Zentrifugation so oft wiederholt, bis der Überstand klar wurde. Zur Lagerung wurden die Liposomen erneut in Histidin-Puffer pH 6,4 resuspendiert und nach Abkühlung auf 4 °C bis zu ihrem Gebrauch bei -20 °C gelagert [65].

## 3.2 Liposomencharakterisierung

Die sorgfältige Herstellung der ausgewählten liposomalen Membran, die Liposomengröße und nicht zuletzt die eingeschlossenen Komponenten haben gravierenden Einfluss auf das Verhalten der Liposomen [4, 10]. Die genaue Charakterisierung jeder hergestellten Liposomencharge hat daher große Bedeutung für die Auswertung und den Vergleich der durchgeführten Experimente.

### 3.2.1 Liposomengröße, Polydispersionsindex und Zeta-Potenzial

Die Bestimmung der Größe (als *z*-Average), des Polydispersionsindex (PDI) und des Zeta-Potenzials der hergestellten Liposomen erfolgten im Zetaziser nano. Für die Messung der Größe und des PDI wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  der zu charakterisierenden Charge in destil-

liertem Wasser verdünnt (1:50) und die Größe sowie der PDI der Lösung dreimalig mittels Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt. Der Polydispersionsindex gibt dabei Auskunft über die Homogenität einer Lösung. Für die Messung des Zeta-Potenzials wurden die Proben in gleicher Weise in isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Bestimmung des Zeta-Potenzials erfolgte drei Mal [65].

### 3.2.2 Bestimmungen des Lipidgehaltes und der Lipidkomposition

#### 3.2.2.1 Lipidgehalt

Jede hergestellte Liposomen-Charge wurde auf ihren Gehalt an Lipiden untersucht. Dies erfolgte durch Messungen des Phosphatgehaltes der Suspension, da jedes eingebaute Phospholipid einen Phosphatrest hat und hierdurch auf den Lipidgehalt rückgeschlossen werden kann. Die hier verwendete Methode richtet sich nach der 1968 beschriebenen Phosphatbestimmung durch Eibl und Lands [66]. Hierfür wurde der Phosphatgehalt der Probe im Vergleich zu einer 1000 mg/L Standardlösung Phosphat (Firma Merck) vermessen. Die Liposomenproben wurden dafür mit Millipore<sup>®</sup> Reinstwasser verdünnt (1:40 und 1:50). Nach Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Schwefelsäure) und Perchlorsäure wurden die Phospholipide für zwei Stunden bei 300 °C inkubiert, um die Umwandlung zu anorganischem Phosphat zu erreichen. Hiernach erfolgte die Zugabe von Ammoniumheptmolybdat und Triton X-100. Triton X-100 wird als Detergens verwendet, während Ammoniumheptmolybdat mit dem anorganischen Phosphat einen Komplex bildet. Nach 20-minütiger Inkubationszeit kann der Phosphatgehalt im Fluoreszenzspektrometer bei einer Wellenlänge von 660 nm bestimmt werden. Die Berechnung des Phosphatgehaltes erfolgte in Korrelation zur gemessenen Fluoreszenz der Phosphat-Standardlösung.

#### 3.2.2.2 Lipidkomposition

Die Überprüfung der Lipidzusammensetzung und des Mengenverhältnisses erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (laborinternes Protokoll von Dr. M. Hossann und [29]). Hierfür wurde initial die Liposomenmembran durch dreimalige Zugabe von Chloroform und Methanol aufgelöst, die organischen Phasen jeweils zusammengeführt und anschließend unter Stickstoffzufuhr eingedampft:

1  $\mu$ mol Liposomenlösung wurden in 2 ml 5 %iger NaCl-Lösung mit 2 ml 1:1 (v/v) Chloroform:Methanol-Lösung gemischt und zentrifugiert (4200 U/min, 10 min). Die untere Phase wurde entnommen und bei Seite gestellt. Die obere Phase wurde mit 2 ml Chloroform:Methanol 3:1 (v/v) vermischt und zentrifugiert. Die jeweils entstandenen unteren Phasen wurden zusammengeführt und die obere Phase mit 1 ml Chloroform gemischt, anschließend zentrifugiert und die untere Phase entnommen. Die gesammelten unteren Phasen wurden dann bei 40 °C unter Stickstoffzufuhr eingedampft.

Vor dem Auftragen der getrockneten Lipide auf die Kieselgel-Platte wurden die Phospholipide in einer 9:1 Chloroform:Methanol (vol/vol)-Lösung gelöst. Je 1  $\mu\text{l}$  der Lipidprobe wurden auf die Kieselgelplatte neben der Standardlösung des Labors bestehend aus DPPC, DSPC, Lyso-PC und DPPG<sub>2</sub> aufgetragen. Die Standardlösung dient zum Nachweis einer erfolgreichen Lipidtrennung.

Die Gel-Platte wurde im Chromatographie-Gefäß mit Laufmittel (s. Kapitel 2.2) und Filterpapier so lange belassen bis das Lösungsmittel ca. 3/4 der Platte erreicht hatte. Bei diesem Vorgang ist auf einen ausreichenden Dampfdruck zu achten, welcher durch ein aufgestelltes und Lösungsmittel-getränktes Filterpapier gewährleistet werden kann. Die getrocknete Kieselgelplatte wurde mit Molybdänspray gefärbt, sodass die aufgetrennten Lipide bzw. ihre Phosphatreste sichtbar gemacht und zur qualitativen und quantitativen Auswertung eingescannt werden konnten.

### **3.3 Bestimmung der Menge des liposomal eingeschlossenen Wirkstoffes**

Die Bestimmung des eingeschlossenen CF und Dox erfolgte nach Zerstörung der liposomalen Membran und durch Messung der frei gewordenen Farbstoffe. Liposomal eingeschlossenes CF bzw. Dox ist durch die hohe intraliposomale Konzentration nicht quantitativ messbar. Nach Auflösen der Membran und durch Verdünnung ins extraliposomale Medium gelingt die fluoreszenzspektrometrische Quantifizierung der frei gewordenen Moleküle.

#### **3.3.1 Carboxyfluorescein-Gehalt**

Der CF-Gehalt wurde durch Auflösen der liposomalen Membran mit 10 %-igem Triton X-100 und anschließender Messung bei einer Extinktion von 493 nm und Emission von 513 nm bestimmt. Zur vollständigen Destruktion der Membran wurden die Liposomen für 15 Minuten bei 45 °C mit Triton X-100 inkubiert. Von jeder Liposomencharge wurden zwei Proben jeweils vierfach gemessen und der Mittelwert der Absorption bestimmt. Zum Vergleich diente eine laborinterne Referenzgerade.

#### **3.3.2 Doxorubicin-Gehalt**

20  $\mu\text{l}$  der Liposomenprobe wurden auf drei verdünnte Lösungen mit HN-Puffer (pH 7,4) aufgeteilt (1:3, 1:5, 1:6). 20  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Lösungen wurden zur Membrandestruktion mit 200  $\mu\text{l}$  Triton X-100 für 15 Minuten bei 45 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Messung der Fluoreszenz wurden 20  $\mu\text{l}$  entnommen, in 3 ml HN-Puffer (pH 7,4) verdünnt und im Varian-Fluoreszenzspektrometer (Ex 470 nm/Em 555 nm/900 V) vermessen. Als Referenz diente eine als Arzneimittel zugelassene Dox-Lösung (2 mg/ml) aus der Apotheke.

### 3.4 Temperaturprofil der TSL

Das Verhalten der TSL unter verschiedenen Temperaturen wurde durch Messungen des frei werdenden Farbstoffes, CF oder Dox, bestimmt. Hierfür wurden die jeweilige Liposomencharge für je 5 Minuten bei Temperaturen zwischen 37 °C bis 45 °C inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Probe vermessen. Alle fünf-Minuten-Werte wurden jeweils als Doppelmessungen durchgeführt und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Zur Beurteilung der Freisetzung nach längerer Inkubation erfolgten auch Messungen nach 1 Stunde bei 37 °C und 42 °C.

Vor und sofort nach dem Erwärmen wurden die Liposomen auf Eis gelagert, um die Permeabilität der liposomalen Membran zwischen den Arbeitsschritten möglichst gering zu halten.

#### 3.4.1 Temperaturprofil Carboxyfluorescein-haltiger TSL

Jede Liposomen-Probe wurde initial 1:50 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden z.B. mit 1000  $\mu\text{l}$  0,9 % NaCl oder FCS als Inkubationslösung versetzt. Aus diesen Lösungen wurden je 20  $\mu\text{l}$  entnommen, bei der entsprechenden Temperatur im Thermomixer erwärmt und anschließend auf Eis gelagert. Zur Messung im Fluoreszenzspektrometer wurden stets 1000  $\mu\text{l}$  NaCl/Tris zugegeben.

Als Referenzwert diente die maximale Fluoreszenz nach Auflösung der liposomalen Membran. Hierzu wurden 100  $\mu\text{l}$  der ersten Verdünnung mit 100  $\mu\text{l}$  10%igem Triton X-100 versetzt und anschließend für 15 Minuten bei 45 °C im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden 900  $\mu\text{l}$  0,9 % NaCl-Lösung hinzugefügt und von dieser Lösung 20  $\mu\text{l}$  in eine Küvette pipettiert, mit 1000  $\mu\text{l}$  NaCl/Tris aufgefüllt und im Fluoreszenzspektrometer (Varian, Ex 493 / Em 513 nm / 625 V) vermessen [29].

#### 3.4.2 Temperaturprofil Doxorubicin-haltiger TSL

Die Bestimmung der Freisetzung aus Dox-beladenen Liposomen erfolgte in FCS. Für die Messungen wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus Liposomen (80  $\mu\text{l}$ ) und FCS (800  $\mu\text{l}$ ) bei entsprechender Temperatur inkubiert, anschließend mit 1000  $\mu\text{l}$  HN-Puffer pH 7,4 verdünnt und die Fluoreszenz (Varian, Ex 470 nm / Em 550 nm / 800 V) bestimmt. Als Kontrollwert wurden 20  $\mu\text{l}$  der Liposomen mit 20  $\mu\text{l}$  10 % Triton X-100 versetzt, für 15 Minuten bei 45 °C inkubiert und anschließend mit 180  $\mu\text{l}$  HN-Puffer pH 7,4 verdünnt. Davon wurden 20  $\mu\text{l}$  in eine Küvette gegeben, mit 1000  $\mu\text{l}$  HN-Puffer pH 7,4 verdünnt und die Fluoreszenz bestimmt.

### 3.4.3 Temperaturprofile DPPG<sub>2</sub>- und PEG2000-TSL unter Zugabe von Serumbestandteilen

### 3.4.4 Niedermolekulare Serumbestandteile

Niedermolekulare Serumbestandteile wurden durch gleichzeitige Filtration und Zentrifugation von FCS mittels Zentrifugen-Filtereinheiten gewonnen. Das molecular weight cut off (MWCO) lag bei 10 kDa.

### 3.4.5 Hochmolekulare Serumbestandteile

Jede Liposomencharge wurde entsprechend Kapitel 3.4.1 verdünnt. 20  $\mu\text{l}$  der entstandenen Liposomenlösung wurden zur Erwärmung im Thermomixer mit der entsprechenden Menge Albumin, Immunglobulinen oder Lipidakzeptorvesikeln versetzt und nach der Inkubation auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Tritonwerte wurden 100  $\mu\text{l}$  der Liposomenlösung mit 100  $\mu\text{l}$  10 %-Triton-X-100 vermengt für 15 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 900  $\mu\text{l}$  (bestehend aus der jeweiligen Menge an Serumbestandteilen und der zu ergänzenden Menge an 0,9 % NaCl) verdünnt. 20  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden in 1000  $\mu\text{l}$  NaCl/Tris verdünnt und im Fluoreszenzspektrometer (Varian, Ex 493 / Em 513 nm / 625 V) vermessen.

Albuminlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Immunglobulinlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Lipidakzeptorvesikel [ $\mu\text{l}$ ]
50	50	10
100	100	20
200	200	40
300	300	60
400	360	80
500		100

**Tabelle 3.1:** *Verwendete Mengen an Albumin-, IgG- und Lipidakzeptorvesikellösungen zur Bestimmung der Temperaturprofile für jeweils einen Versuchsdurchgang.*

### 3.4.6 Lipidkontakt

Bei Kontakt von TSL mit Lipiden erscheint ein Austausch einzelner Fettsäuren möglich, sodass Lipidvesikel aus DPPC und Cholesterin (55:45 mol/mol) sowie reine DPPC-Vesikel hergestellt wurden. Es wurden DPPC- und DPPC/Cholesterin-Vesikel ohne Extrusion hergestellt, um eine breite Größenvielfalt zu erhalten. Die Temperaturprofile der TSL nach Inkubation mit Lipidvesikeln wurden analog zu Kapitel 3.4 bestimmt. Die maximale Fluoreszenz wurde mit TSL und der jeweiligen Menge an Lipidakzeptorvesikeln (0,4 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, 2,4 mM, 3,2 mM und 4,0 mM) nach Auflösen mittels Triton X 100 vermessen.

### 3.4.7 Temperaturprofile in künstlichen Seren

Zum weiteren Vergleich der CF-Freisetzung in FCS und nach Zugabe der einzelnen Serumkomponenten wurden auch künstliche Seren hergestellt. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 3.2 beschrieben. Dabei wurden die Zusammensetzungen von FCS und Humanserum bzgl. der mengenmäßig häufigen Anteile und ein Serum mit den jeweiligen physiologischen Konzentrationen bzgl. IgG, Albumin und Lipidvesikel nachgestellt. Die Bestimmung des Temperaturprofils erfolgte analog zu Kapitel 3.4.2. Die Tritonwerte wurden nach Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  des jeweiligen künstlichen Serums bestimmt.

	Künstliches FCS	Künstliches Humanserum	Künstliches Serum
Albuminlösung [ $\mu\text{l}$ ]	85	200	200
IgG-Lösung [ $\mu\text{l}$ ]	20	240	360
Lipidakzeptorvesikel			
DPPC/Chol 55:44 (mol/mol) [ $\mu\text{l}$ ]	55	65	65
Cholesterin 5,7 mmol/l in NaCl 0,9 % [ $\mu\text{l}$ ]		495	
KCL-Lösung 9,2 mM [ $\mu\text{l}$ ]	840		
NaCl 0,9 % [ $\mu\text{l}$ ]			375

**Tabelle 3.2:** *Künstlich hergestelltes FCS, Humanserum und Serum. Auflistung der Bestandteile und der verwendeten Mengen.*

## 3.5 24 h - Temperaturprofil von DPPG<sub>2</sub>-TSL in FCS bei 37°C

Die Temperaturprofile von TSL für längere Inkubationsdauer wurden unter Inkubation für bis zu 24 Stunden bei 37 °C bestimmt. Zu Beginn wurden 20  $\mu\text{l}$  der TSL-Probe 1:50 mit 0,9 % NaCl verdünnt und hiervon 100  $\mu\text{l}$  für die einzelnen Messungen in 1 ml FCS pipetiert. Die Proben wurden unter Mischen (750 rpm) für die jeweilige Zeitdauer inkubiert. Anschließend erfolgte die zweifache Bestimmung der Fluoreszenz im Fluorometer (20  $\mu\text{l}$  der Probe in 1000  $\mu\text{l}$  NaCl/Tris, Ex 493 nm / Em 513 nm). Als 100 %-Wert der Fluoreszenz diente der gemessene Wert nach Auflösung der TSL-Membran mit Triton-X100. Die Experimente erfolgten mit DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)-TSL und 10 mol% 20 mol% sowie 30 mol%-Chol-TSL.

## 3.6 Öffnungskinetik

Öffnungskinetiken zeigen das Freisetzungsprofil der TSL unter verschiedenen Temperaturen und in Abhängigkeit der Inkubationsdauer auf.

3 ml FCS wurden für 25 Minuten bei der jeweiligen Temperatur vor TSL-Zugabe

erwärmt. Nach Zugabe der TSL-Probe wurden die Lösungen in den Küvetten mittels kleinen Magnetrührstäbchen vorsichtig gerührt und je zwei Küvetten mit 20  $\mu\text{l}$  der verdünnten Liposomenprobe und zwei weitere Küvetten mit Triton-X100-Liposomenlösung befüllt.

Die Fluoreszenzbestimmungen erfolgten im Fluorimeter (Ex 470 nm / Em 555 nm / 875 V) alle 20 Sekunden für insgesamt 20 Minuten. Als 100 %-Referenzwert diente die Fluoreszenz nach vollständiger Auflösung der liposomalen Membran. Die Hintergrundfluoreszenzen (30 °C) der Inkubationslösungen, Triton und TSL wurden ebenfalls bestimmt.

## 3.7 Lagerstabilität

### 3.7.1 Lagerstabilität der Dox - TSL

Die Stabilität der Lipidzusammensetzung Dox-haltiger TSL wurde mittels DC (s. Kapitel 3.1.5) nach Lagerung für vier, acht und 12 Wochen bei 4 °C bestimmt.

Zur Bestimmung der Lagerfähigkeit wurden drei Liposomenchargen gleicher Lipidzusammensetzung (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)), unterschiedlicher Molarität (160 mM, 200 mM und 240 mM) des eingeschlossenen Puffers  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  vor aktiver Beladung mit Doxorubicin hergestellt. Nach dem Dox-Einschluss wurden die Liposomen für jeweils vier, acht und 12 Wochen bei 4 °C gelagert und anschließend die Lipidverhältnisse der liposomalen Membran durch Dünnschichtchromatographie (s. Kapitel 3.2.2.2) ermittelt.



# Kapitel 4

## Ergebnisse

*Teile der hier beschriebenen Ergebnisse sind im Rahmen der Publikation [32] veröffentlicht.*

### 4.1 Liposomencharakterisierung und Qualitätskontrolle

Jede hergestellte Liposomencharge wurde nach der Herstellung bzgl. ihrer Lipidzusammensetzung, Größe, PDI,  $\zeta$ -Potential,  $T_m$  und Temperaturprofile überprüft.

Tabelle 4.1 zeigt die hergestellten Liposomen und ihre Eigenschaften auf. Ziel ist es, reproduktive Ergebnisse von verschiedenen Chargen gleicher Zusammensetzung zu erlangen und so aussagekräftige Ergebnisse beim Vergleich verschiedener TSL-Formulierungen zu generieren. Die hier ermittelten biophysikalischen Eigenschaften der Liposomenformulierungen sind vergleichbar mit veröffentlichten Daten zu TSL [10, 29]. Im Folgenden soll die TSL-Charakterisierung exemplarisch beschrieben werden.

#### 4.1.1 Größenbestimmung, Polydispersionsindex und Zetapotenzial

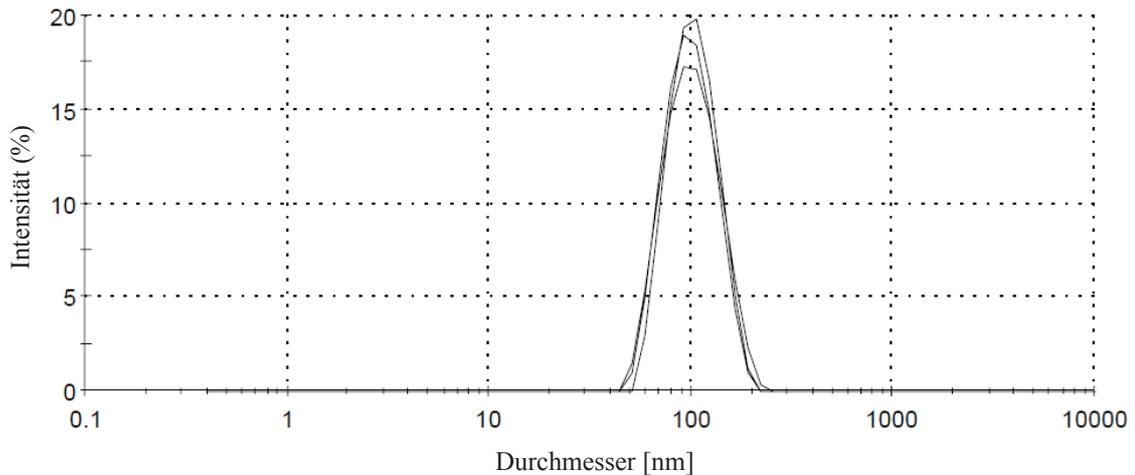
Durch die Druckextrusion sollten aus der TSL-Suspension Liposomen einer Größe generiert werden. Die monodisperse Größenverteilung um 100 nm des Durchmessers der TSL zeigt das Ergebnis einer als erfolgreich gewerteten Extrusion durch einen Filter mit 100 nm Porengröße an (s. Abbildung 4.1). Die dreifache Messung ergibt drei Peaks jeweils bei 100 nm ohne Aggregatspeaks. Der hier gleichzeitig ermittelte Polydispersionsindex 0,07 bestätigt eine sehr hohe Homogenität der TSL-Charge.

#### 4.1.2 Lipidzusammensetzung

Die quantitative Zusammensetzung der liposomalen Membran wurde mittels DC kontrolliert. Die Bande 0 in Abbildung 4.2 zeigt die Auftrennung der laborinternen Standardlösung mit den Lipiden P-Lyso-PC, DPPC, DPPG<sub>2</sub>, DSPE-PEG2000. Die Auswertung der Kieselgel-Platte erfolgte nach dem Einscannen. Es wurden die verschiedenen

Formulierung [mol/mol]	Extrusion / Membrangröße [nm]	Größe [nm]	$\zeta$ - Potential [mV]*	PDI	Phosphat- gehalt [mM]	drug:lipid (m/m)	$T_m$ [°C]	Einge- schlossener Wirkstoff	Wirkstoff- freisetzung** [%]
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> (50:20:30)	100	107	-23,3	0,10	29,3	0,13		Dox	0,7±0,1
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> (50:20:30)	100	106	-18,7	0,21	17,7	0,13		Dox	6,4±1,2
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> (50:20:30)	100	197	-22,6	0,39	15,7	0,12		Dox	8,1±0,9
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> (50:20:30)	200	190	-1,8	0,32	47,4	0,10		CF	4,0±4,6
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> (50:20:30)	200	135	-3,3	0,10	47,4	0,09	42,6	CF	5,3±0,1
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> /Chol (26:14:30:30)	200	128	-25,5	0,05	25,9 <sup>#</sup>	0,15		CF	7,2±4,1
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> /Chol (34:16:30:20)	200	132	-21,9	0,06	35,0 <sup>#</sup>	0,10	40,9	CF	16,1±7,4
DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> /Chol (42:18:30:10)	200	130	-21,0	0,09	40,3 <sup>#</sup>	0,10	41,5	CF	6,5±3,1
DPPC/DSPC/DSPE- PEG2000 (80:15:05)	200	119	3,0	0,10	36,5	0,08	43,8	CF	6,1±0,6

**Tabelle 4.1: Verwendete Liposomenformulierungen und ihre Eigenschaften.** \*:  $\zeta$ -Potential gemessen in 0,9 % NaCl. \*\*: 1 h Inkubation bei 37 °C in FCS. #: ohne Cholesterin.

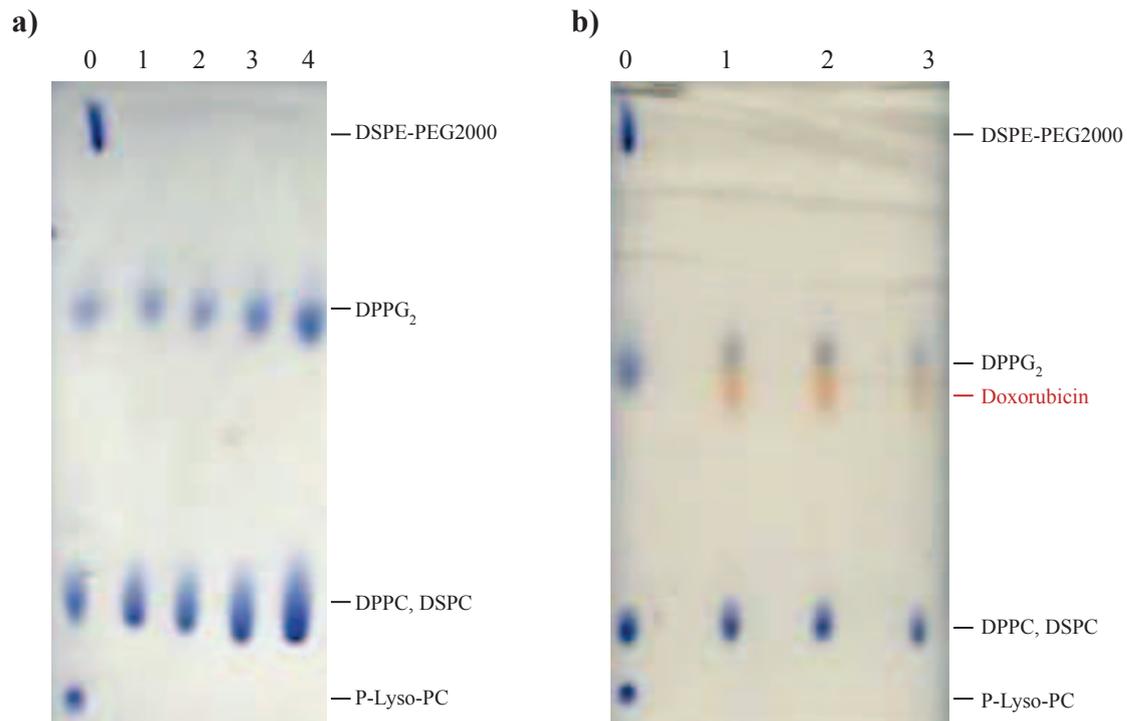


**Abbildung 4.1:** Größenverteilung von  $DPPG_2$ -TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)). Abgebildet ist eine repräsentative monodisperse Größenverteilung der vermessenen Liposomenlösung. Der Peak der Größenverteilung liegt, entsprechend dem gewählten Extrusionsfilter, bei einem Durchmesser von 100 nm. Es finden sich keine Aggregatspeaks.

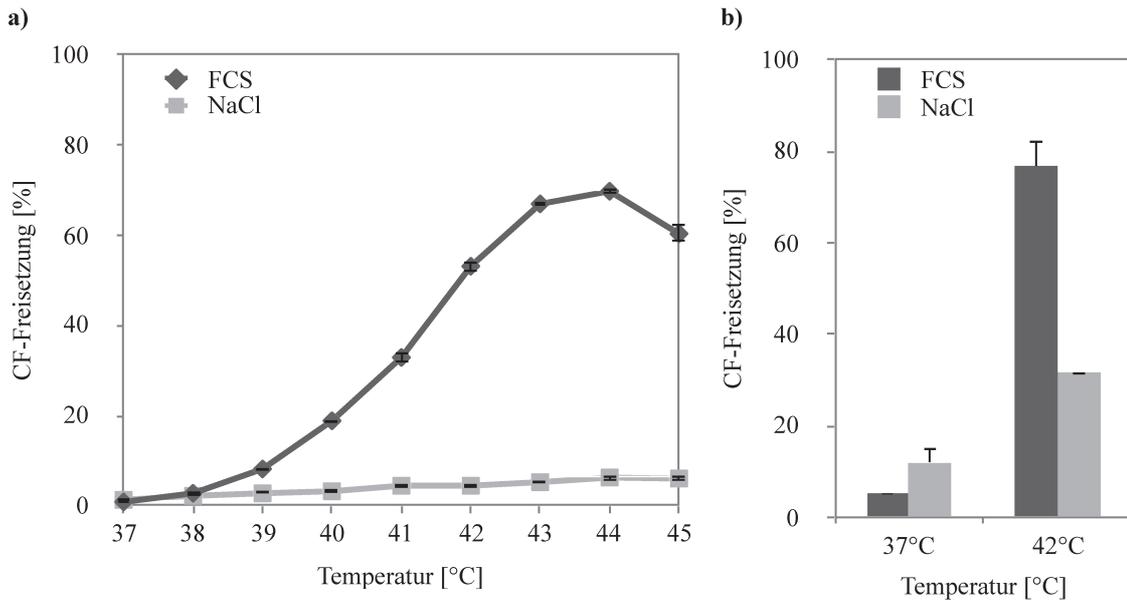
Laufstrecken, die Farbstoffintensitäten der einzelnen markierten Banden bestimmt und daraus eine quantitative Auswertung der Lipidanteile vorgenommen. DPPC- und DSPC-Lipide wandern auf der Gelplatte gleich weit, sodass sie in einer Bande abgebildet werden. Die prozentualen Mengenangaben beziehen sich in diesem Fall stets auf beide Lipide zusammen. In beiden Abbildungen sieht man neben der Kontrollbande 0 die exemplarische Auftrennung von drei (Abbildung 4.2 b) bzw. vier (Abbildung 4.2 a) Liposomenchargen der gleichen Zusammensetzung aus DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m). In Abbildung 4.2 b zeigt sich eine rote Bande. Diese entspricht Doxorubicin, welches vorher in die Liposomen eingeschlossen worden war.

Auf Grund ihrer kleinen Struktur und geringen Polarität ist der Wanderweg von Lyso-Lipiden im verwendeten Laufmittel am kürzesten. Sie entstehen mit zunehmendem Alter und Verarbeitungsschritten der Liposomen. Als nächste Bande zeichnen sich DPPC und DSPC ab. Nach DPPG<sub>2</sub> folgt DSPE-PEG2000, das größte Molekül mit der stärksten Polarität. In den hier überprüften Liposomenchargen sieht man deutlich, dass keine unerwünschten P-Lyso-PC-Anteile und kein DSPE-PEG2000 nachweisbar sind.

Als repräsentatives Beispiel zeigt die Auswertung der Reihe 3 der Kieselgel-Platte b) in Abbildung 4.2 einen Anteil von  $70,7 \pm 6,6$  % DPPC/DSPC und  $29,4 \pm 6,7$  % DPPG<sub>2</sub>. Somit findet sich eine korrekte Verteilung der Lipide in der Liposomenmembran entsprechend der gewünschten Formulierung DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (mol/mol) ohne Lysolipid-Anteil.



**Abbildung 4.2:** Zwei Kiesel-Gel-Platten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung DPPG<sub>2</sub>-haltiger Liposomen (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (mol/mol)). Die Phosphatreste werden mit Molybdänspray angefärbt. Als Laufmittel fungiert eine Lösung aus Chloroform, Methanol und Eisessig (s. Kapitel 2.3) Bande 0 repräsentiert eine Standardlösung mit Anteilen von P-Lyso-PC, DPPC und DSPC, DPPG<sub>2</sub> sowie DSPE-PEG2000. Auf der DC-Platte b) ist Dox als zusätzliche rote Bande abgebildet, da es zuvor in diese Liposomen eingeschlossen worden war.



**Abbildung 4.3: CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) in Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationsmedium.** a) Fünf Minuten-Werte bei Inkubation von 37 °C bis 45 °C in FCS und 0,9 % NaCl. Es zeigt sich eine Zunahme der CF-Freisetzung bei Inkubation in FCS mit ansteigender Temperatur. Die höchste Freisetzung wird mit  $69,7 \pm 0,7$  % bei 44 °C erreicht. In 0,9 % NaCl findet sich nur ein geringer Anstieg der Freisetzung auf maximal 6,3 % trotz Temperaturen größer oder gleich der Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$  42,6 °C). b) Inkubationen der TSL für eine Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C in FCS bzw. NaCl. Es gibt kaum CF-Freisetzung aus den TSL bei 37 °C in beiden Medien. In FCS verzeichnet man eine geringere Freisetzung als in 0,9 % NaCl ( $12,1 \pm 3,2$  % vs.  $5,3 \pm 0,1$  %). Bei 42 °C beträgt die CF-Freisetzung in FCS  $77,0 \pm 5,4$  %, in NaCl werden  $31,4 \pm 0,3$  % des CF frei.

## 4.2 In vitro Temperaturprofile von DPPG<sub>2</sub>-TSL

### 4.2.1 Temperaturprofile CF-haltiger DPPG<sub>2</sub>-TSL

In vitro Temperaturprofile der DPPG<sub>2</sub>-TSL stellen einen der wichtigsten Punkte zur Charakterisierung und Aussagen über den möglichen klinischen Einsatz der Liposomen dar. Die Bestimmungen der CF-Freisetzung nach fünf-minütiger Inkubation CF-haltiger Liposomen in 0,9 % NaCl bzw. FCS zeichnen ein genaues Bild der Temperatur- und Medium-abhängigkeit der liposomalen Membran. Aussagen zur Membranstabilität nach längerer Inkubationsdauer liefern die Versuche zu Inkubationen für eine Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C in 0,9 % NaCl bzw. FCS.

Bei fünf-minütigen Inkubationen der TSL mit der Formulierung DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m) in 0,9 % NaCl steigt die Intensität der Fluoreszenz von  $1,3 \pm 0,1$  % bei 37 °C auf maximal  $6,3 \pm 0,5$  % bei 44 °C. Eine einstündige Inkubation der TSL in 0,9 % NaCl ergibt eine CF-Freisetzung von  $12,1 \pm 3,2$  % bei 37 °C und  $31,4 \pm 0,3$  % bei 42 °C.

Bei gleichen Bedingungen und fünf-minütigen Inkubationen in FCS zeigt sich eine CF-Freisetzung von  $66,9 \pm 0$  % bei 43 °C ( $T_m$  42,6 °C, s. Tabelle 4.2). Ab 40 °C er-

reicht die CF-Freisetzung bereits  $18,9 \pm 0,3$  % und steigt weiterhin auf ein Maximum von  $69,7 \pm 0,7$  % bei  $44$  °C an. Bei  $45$  °C zeigt sich erneut eine leichte Abnahme der CF-Fluoreszenz ( $60,3 \pm 1,9$  %).

Nach einer Stunde Inkubation bei  $37$  °C tritt nur wenig CF aus den TSL aus ( $5,3 \pm 0,1$  %). Nach einer Stunde bei  $42$  °C werden bereits  $77,0 \pm 5,4$  % des CF frei (s. Abbildung 4.3).

Insgesamt weisen DPPG<sub>2</sub>-TSL nur eine minimale Freisetzung sowohl in  $0,9$  % NaCl als auch FCS bei Temperaturen von  $37$  °C bis  $39$  °C auf (s. Abbildung 4.3). Bei Erhöhung der Temperatur in den Bereich der  $T_m$  in FCS kommt es zu einem sprunghaften Anstiegs der Freisetzung, sodass hier die Temperatursensitivität und ein Zusammenhang mit dem Umgebungsmedium deutlich werden.

#### 4.2.2 Temperaturprofil Doxorubicin-haltiger DPPG<sub>2</sub>-TSL

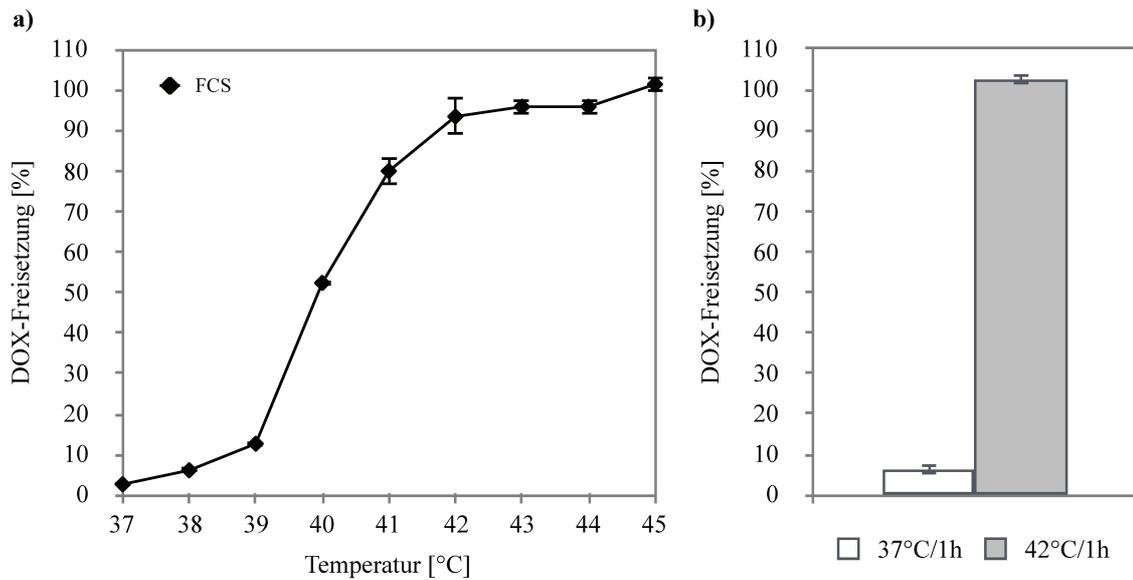
DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) mit eingeschlossenem Dox zeigen eine Zunahme der Dox-Freisetzung bei steigender Temperatur in FCS. Von Raumtemperatur bis  $39$  °C steigt die Dox-Freisetzung langsam auf ca.  $10$  %, bei  $40$  °C werden innerhalb 5 Minuten bereits  $52,4 \pm 0,7$  % des Dox frei (s. Abbildung 4.4). Bei mild hyperthermen Temperaturen ( $41$  °C -  $42$  °C) werden  $80 \pm 3,3$  % bzw.  $93,4 \pm 4,6$  % des CF außerhalb der TSL registriert. Hervorzuheben ist die geringe Freisetzung unterhalb dieser Temperaturen mit  $2,8 \pm 0,1$  % bei  $37$  °C bis  $12,8 \pm 0,7$  % bei  $39$  °C. Die Inkubationen für jeweils eine Stunde bei  $37$  °C bzw.  $42$  °C zeigen eine entsprechend niedrige bzw. vollständige Freisetzung ( $6,4 \pm 1,2$  % bzw.  $102,6 \pm 1,3$  %, s. Abbildung 4.4).

Im direkten Vergleich von Dox-DPPG<sub>2</sub>-TSL und CF-DPPG<sub>2</sub>-TSL zeichnet sich eine frühere und höhere Freisetzung aus Dox-beladenen Liposomen ab. Beide TSL-Formulierungen weisen geringe Freisetzung bis  $39$  °C auf (s. Abbildung 4.5).

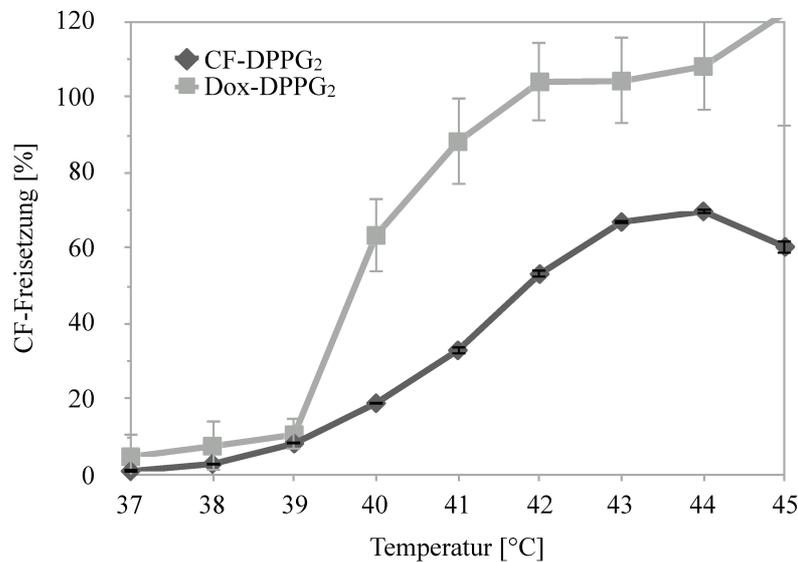
##### 4.2.2.1 Öffnungskinetik Dox-haltiger DPPG<sub>2</sub>-TSL

Öffnungskinetiken beschreiben die Freisetzung des liposomal eingeschlossenen Farbstoffes bei festgesetzter Temperatur in Abhängigkeit von der Zeit. In HN-Puffer pH  $7,4$  (s. Abbildung 4.6) zeigen sich die Dox-DPPG<sub>2</sub>-TSL bei normaler bzw. leicht erhöhter Körpertemperatur ( $37$  °C -  $39$  °C) stabil mit einer maximalen Freisetzung von  $7,0 \pm 0,9$  % nach 20 Minuten Inkubation bei  $39$  °C. Bei weiterer Erhöhung der Inkubationstemperatur und Erreichen mild hyperthermer Werte stellt sich eine rasche Freisetzung des Dox ein ( $42$  °C:  $t = 0,3$  min, Dox-Freisetzung  $57,0 \pm 1,7$  %;  $t = 1,0$  min, Dox-Freisetzung  $69,2 \pm 1,7$  %;  $t = 6,7$  min, Dox-Freisetzung  $90,9 \pm 0$  %).

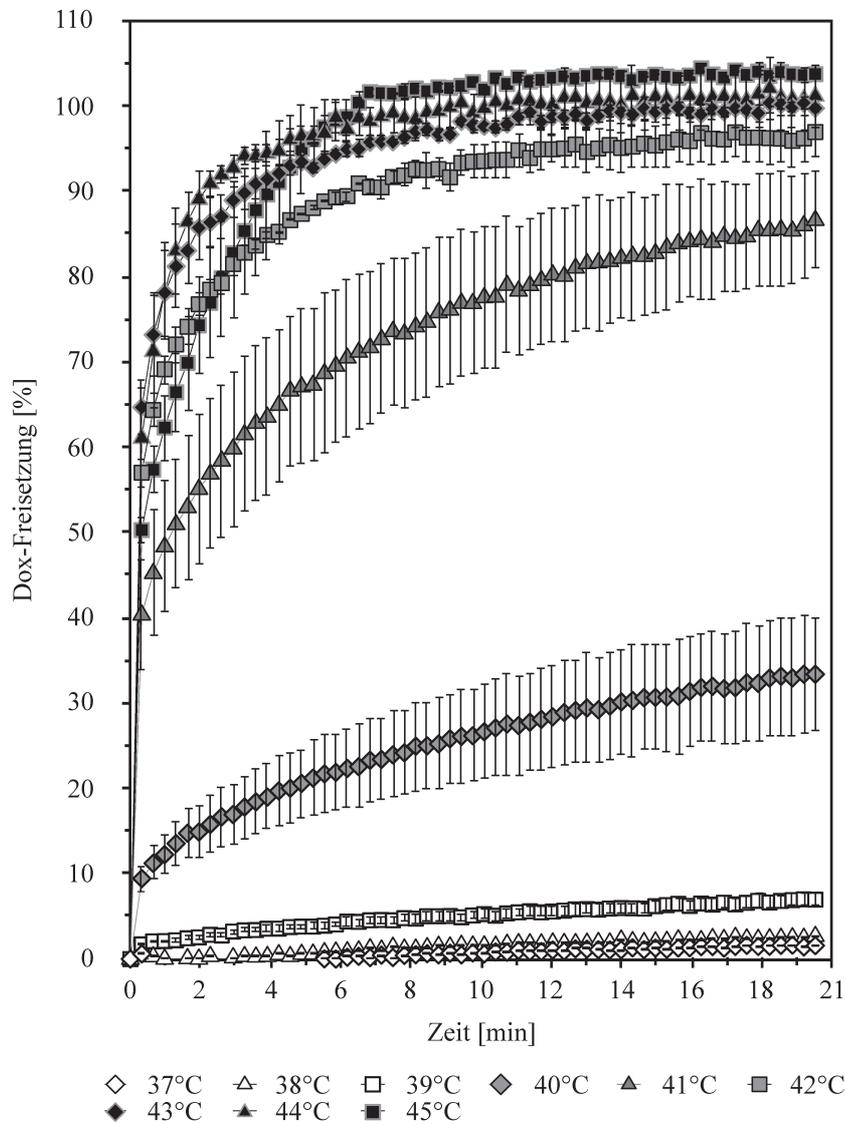
Bei Inkubationen in FCS (s. Abbildung 4.7) fällt eine deutlich höhere Freisetzung bei Körpertemperatur auf. Bei  $37$  °C werden zu Beginn ( $t = 1,0$  min)  $3,6 \pm 0,1$  % und nach 20 Minuten bis zu  $19,2 \pm 0,6$  % des Dox frei. Bei  $38$  °C steigt die Freisetzung auf bis zu



**Abbildung 4.4:** Doxorubicin-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)). a) Dox-Freisetzung nach fünfminütiger Inkubation in FCS von 37 °C bis 45 °C. Es zeigt sich eine geringe Freisetzung bis 39 °C (12,8±0,7 %) und ein rapider Anstieg ab 40 °C (40 °C: 52,4±0,7 %, 41 °C: 80,0±3,3 %, 42 °C: 93,4±4,6 %, 43 °C: 95,9±1,7 %). b) Nach einstündiger Inkubation bei 42 °C findet eine vollständige Freisetzung (102,6±1,3 %) des eingeschlossenen Dox in FCS statt. Nach einer Stunde in FCS bei 37 °C lassen sich nur 6,4±1,2 % des Dox außerhalb der Liposomen detektieren.



**Abbildung 4.5:** CF- und Dox-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) bei fünfminütigen Inkubationen in FCS bei Temperaturen von 37 °C bis 45 °C. Beide Kurven zeigen einen temperaturabhängigen Verlauf mit geringem Ausstrom des jeweils enthaltenen Farbstoffs bis 39 °C (Maximum CF-DPPG<sub>2</sub> 8,2±0,3 % und Maximum Dox-DPPG<sub>2</sub> 10,6±4,1 % bei 39 °C). Anschließend kommt es insbesondere bei Dox-beladenen Liposomen zu einer starken Zunahme des Ausstroms. Bei 41 °C werden bereits 88,2±11,7 % des Dox frei, während nur 32,9±1,2 % des CF detektiert werden.



**Abbildung 4.6:** Öffnungskinetik von Dox-beladenen DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) in HN-Puffer pH 7,4. Nach 20 Minuten bei Körpertemperatur (37 °C - 39 °C) beträgt die maximale Dox-Freisetzung 7,0±0,9 %. Bei Inkubationen bei 41 °C zeigen sich bereits deutlich höhere Dox-Freisetzungen mit 48,4±7,8 % nach 1,0 Minuten, 61,5±9,2 % nach 3,3 Minuten und 70,5±9,3 % nach 6,3 Minuten sowie 86,6±5,8 % nach 20 Minuten. Bei 42 °C werden 57±1,7 % nach 0,3 Minuten, 72,0±2,2 % nach 1,3 Minuten und 81,5±1,34 % nach 3,0 Minuten sowie stets > 90 % nach 6,7 Minuten erreicht.

T [°C]	Dox-DPPG <sub>2</sub> -TSL in FCS [10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> ]	Dox-DPPG <sub>2</sub> -TSL in HN- Puffer pH 7,4 [10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> ]
37	2,3	-0,8
38	2,8	-0,6
39	8,7	0,8
40	25,1	6,4
41	71,3	27,5
42	50,9	59,0

**Tabelle 4.2:** *Berechnete Öffnungskonstanten Dox-haltiger DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) in FCS und HN-Puffer pH 7,4 bei Temperaturen von 37 °C bis 42 °C.*

8,8±0,3 % nach 1 Minute und 29,0±0,8 % nach 20 Minuten an. Bei mild hyperthermen Temperaturen zeigen sich bereits bei 41 °C und nach 0,3 Minuten eine Dox-Freisetzung von 74,9±3,8 %. Nach Inkubationen für mind. 2,3 Minuten ist die Freisetzung mit  $\geq 90,2\pm 3,8$  % fast vollständig, sodass hier von einer sehr raschen in vitro Freisetzung bei milder Hyperthermie ausgegangen werden kann. Insgesamt sind die Öffnungskinetiken in FCS bereits bei mild hyperthermen Temperaturen schneller als in HN-Puffer. Hervorzuheben ist die schnelle Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffes bei Erreichen von mild hyperthermen Temperaturen bereits nach 0,3 Minuten.

#### 4.2.2.2 24-Stunden-Freisetzungsprofil von DPPG<sub>2</sub>-TSL

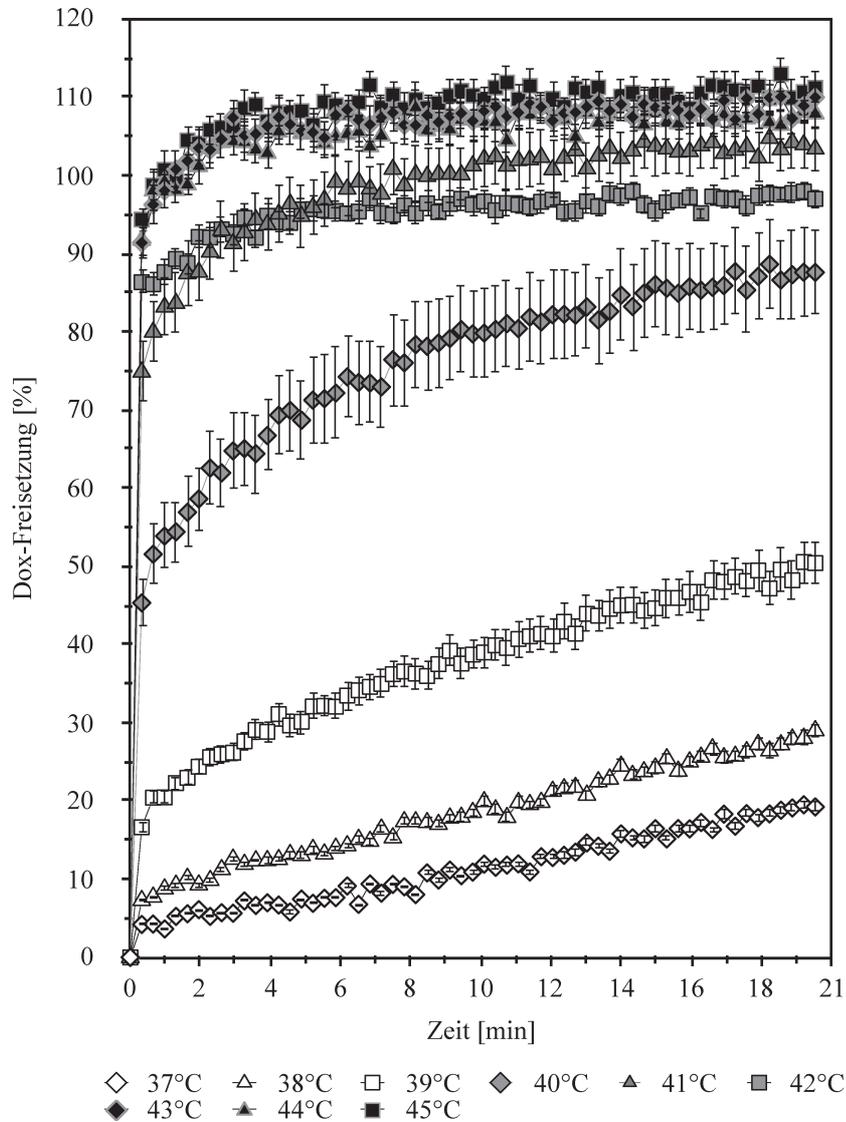
Das Freisetzungsverhalten von DPPG<sub>2</sub>-TSL unter Inkubationen für bis zu 24 h bei 37 °C in FCS zeigt eine zunehmende Freisetzung mit steigender Inkubationsdauer (s. Abbildung 4.8). Der 1-Stundenwert mit 2,9±0,7 % ist mit dem 1-Stundenwert aus Kapitel 4.2.1 mit 5,3±0,1 % (vgl. Abbildung 4.3) vergleichbar. Der Anstieg setzt sich langsam fort mit 11,8±0,8 % nach 6 h, 22,9±0,4 % nach 12 bis zu dem Maximum mit 56,2±0,1 % nach 24 Stunden fort.

### 4.3 Einfluss von Cholesterin-Einbau in der TSL-Membran

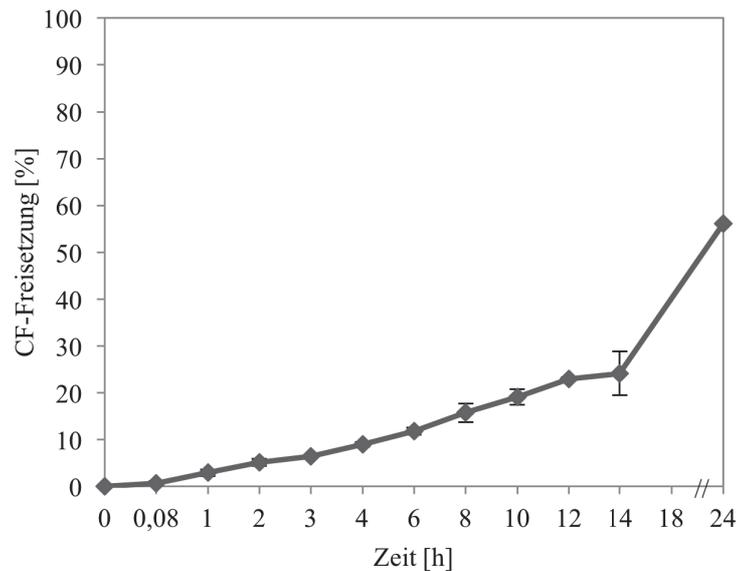
Der Einbau von Cholesterin und PEG2000 kann zur Stabilisierung liposomaler Membranen führen. Zur Beurteilung des Einflusses von Cholesterineinbau auf die Temperaturprofile von DPPG<sub>2</sub>-TSL wurden drei Liposomenchargen mit steigendem Cholesterinanteil hergestellt und die Temperaturprofile in FCS und 0,9 % NaCl bestimmt (s. Abbildung 4.9).

#### 4.3.1 CF-Freisetzung aus Cholesterin-DPPG<sub>2</sub>-TSL in FCS

Für 10 mol%-Cholesterin-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/Cholesterin 42:18:30:10 (m/m)) zeigt sich eine zunehmende CF-Freisetzung mit steigender Temperatur mit geringer Frei-



**Abbildung 4.7:** Öffnungskinetik von Dox-beladenen DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) in FCS. Bei Körpertemperatur ≤ 38 °C zeigt sich eine langsam steigende Dox-Freisetzung mit längerer Inkubationsdauer bis maximal 29,0±0,8 % nach 20 Minuten. Bei Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 40 °C findet sich eine rasche Zunahme des Dox-Ausstroms mit 51,6±4,0 % nach 0,7 Minuten, 62,6 ±4,7 % nach 2,3 Minuten und 70,0±5,2 % nach 4,7 Minuten. Bei 42 °C ist die Freisetzung mit 86,3±1,5 % nach 0,3 Minuten und einer Steigerung auf > 90 % nach 2,0 Minuten als sehr schnell anzusehen.



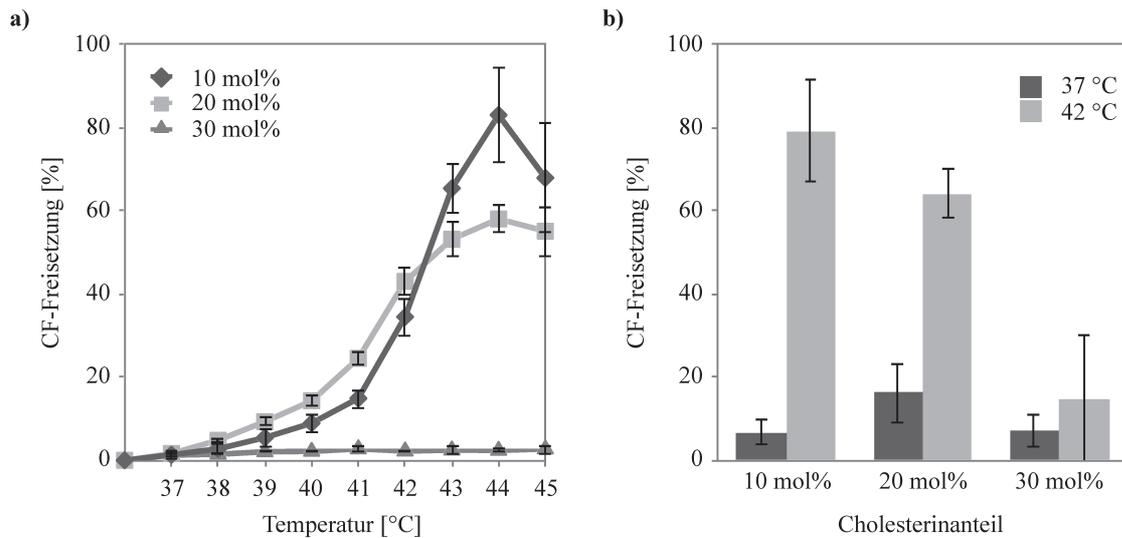
**Abbildung 4.8:** CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL nach Inkubationen für bis zu 24 Stunden bei 37 °C in FCS. Die Freisetzung nimmt mit zunehmender Dauer bis zu einem Maximum von 56,2±0,1 % nach 24 Stunden kontinuierlich zu.

setzung bis 41 °C (14,9±2,3 %) und einem raschen Freisetzungsanstieg bei weiterer Erwärmung für 5 Minuten (42 °C: 34,5±4,8 %; 43 °C: 65,4±6,1 %). Das Maximum wird bei 44 °C mit 83,0±11,4 % erreicht. Nach einer Stunde bei 37 °C bleibt der CF-Ausstrom gering (6,5±3,1 %), während es bei mild hyperthermen Temperaturen es zu einer hohen Freisetzung mit 79,2±12,4 % kommt (s. Abbildung 4.9 a).

Auch 20 mol% Chol-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/Cholesterin 34:16:30:20 (m/m)) zeigen einen temperaturabhängigen CF-Ausstrom mit früherer Freisetzung (41 °C: 35,5±1,9 %) als 10 mol%-Chol-TSL bis 42 °C, bei jedoch geringerer maximaler Freisetzung von 58,0±3,6 % nach 5 Minuten bei 42 °C. Übereinstimmung finden sich für 20 mol%-Chol-TSL eine höhere Freisetzung mit 16,1±7,4 % nach einer Stunde bei 37 °C und eine geringere Freisetzung mit 64,2±6,1 % bei 42 °C findet sich im direkten Vergleich zu 10 mol% Chol-TSL (s. Abbildung 4.9 b).

30 mol%-Chol-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/Cholesterin 26:14:30:30 (m/m)) weisen eine deutlich reduzierte CF-Freisetzung auf. Nach 5-minütigen Inkubationen finden sich hier maximal 2,8±0,9 % des CF außerhalb der Liposomen. Auch Inkubationen über eine Stunde bei Körpertemperatur oder 42 °C führen nicht zu einem wesentlichen Entweichen des CF aus den getesteten Liposomen (37 °C: CF-Freisetzung < 8 %; 42 °C: CF-Freisetzung < 15 %).

Im direkten Vergleich zu der Standardformulierung DPPG<sub>2</sub>-TSL (s. Abbildung 4.3) ohne Cholesterinanteil zeigt sich ein insgesamt ähnlicher Kurvenverlauf der DPPG<sub>2</sub>-Chol-TSL, ausgenommen der Liposomen mit 30 mol% Cholesterin. Bei Temperaturen bis 40 °C



**Abbildung 4.9: CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL mit aufsteigendem Cholesterinanteil der liposomalen Membran in FCS.** a) Freisetzungsraten nach fünf Minuten Inkubation unter der jeweiligen Temperatur ( $n = 3$ ). TSL mit 10 mol% Cholesterin-Anteil setzen bis 41 °C  $14,9 \pm 2,3$  % und bei 42 °C bereits  $34,5 \pm 4,8$  % des CF frei. Bei 43 °C werden  $65,4 \pm 6,1$  % des CF frei. TSL mit 20 mol% Cholesterin zeigen ebenfalls eine zunehmende Freisetzung bei steigender Temperatur. Die Freisetzung ist etwas höher als bei 10 mol%-Cholesterin-TSL, flacht jedoch ab Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur ab (42 °C:  $43,0 \pm 3,3$  %; 43 °C:  $53,2 \pm 4,6$  %). Liposomen mit 30 mol% Cholesterin setzen nach 5 Minuten max.  $2,8 \pm 0,9$  % (41 °C) frei. b) Inkubationen der TSL für 1 Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C. TSL mit 10 mol% setzen  $6,5 \pm 3,1$  % nach einer Stunde bei 37 °C bzw.  $79,2 \pm 12,4$  % bei 42 °C frei. TSL mit 20 mol% Cholesterinanteil geben  $16,1 \pm 7,4$  % des CF bei 37 °C bzw.  $64,2 \pm 6,1$  % bei 42 °C frei. TSL mit 30 mol% Cholesterin entweicht nach einer Stunde Inkubation am wenigsten CF, nämlich  $7,2 \pm 4,1$  % bei 37 °C und  $14,8 \pm 15,7$  % bei 42 °C.

werden max.  $8,9 \pm 2,2$  % aus 10 mol%-Chol-TSL und max.  $14,3 \pm 1,3$  % CF aus 20 mol%-Chol-TSL freigesetzt. Der 10 mol%-Cholesterinanteil bewirkt eine nur geringe Freisetzung unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur sowie einen rapiden Ansprung der Freisetzung bei 43 °C. Die weitere Steigerung des Cholesterinzusatzes bewirkt eine höhere CF-Freisetzung bei leichter Erwärmung und einen weniger starken Ausstroms bei leicht hyperthermen Temperaturen.

#### 4.3.2 24 h - Temperaturprofil DPPG<sub>2</sub>-TSL und Chol-TSL in FCS bei 37 °C

Inkubationen für bis zu 24 Stunden bei 37 °C zeigen eine langsam ansteigende CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) mit zunehmender Dauer der Inkubation. Dennoch ist die Freisetzung trotz langer Inkubation insgesamt gering mit  $9,0 \pm 0,5$  % nach 4 Stunden und  $19,1 \pm 1,7$  % nach 10 Stunden. Nach Inkubation für 24 Stunden werden  $56,2 \pm 0,1$  % des CF außerhalb der Liposomen gemessen. Der

Einbau von 10 mol% Cholesterin (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/Cholesterin 42:18:30:10 (m/m)) führt zu einer diskreten Abnahme der CF-Freisetzung im Vergleich zu den Standard-DPPG<sub>2</sub>-TSL (4 h: 8,1±0,9 %, 10 h: 16,1±0,2 %, 24 h: 68,1±1,6 %). 20 mol%-Chol-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/Cholesterin 34:16:30:20 (m/m)) zeigen einen abweichenden Kurvenverlauf mit deutlich stärkerem Ausstrom des CF (4 h: 23,0±2,2 %, 10 h: 66,9±1,4 %). Dabei fällt ein erneuter Abfall der CF-Freisetzung nach 12 Stunden auf (12 h: 62,5±3,8 %, 18 h: 56,2±5,8 %, 24 h: 41,4±1,7 %). Die maximale Freisetzung beträgt 66,9±1,4 % nach 10 Stunden. Übereinstimmend mit den ermittelten Werten zur 5-Minuten und 1-Stunden-Freisetzung aus 30 mol% Chol-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/Cholesterin 26:14:30:30 (m/m)) lassen sich kaum CF-Moleküle außerhalb der 30 mol%-Liposomen detektieren (maximale CF-Freisetzung nach 24 Stunden < 3 %, vgl. Abbildung 4.9).

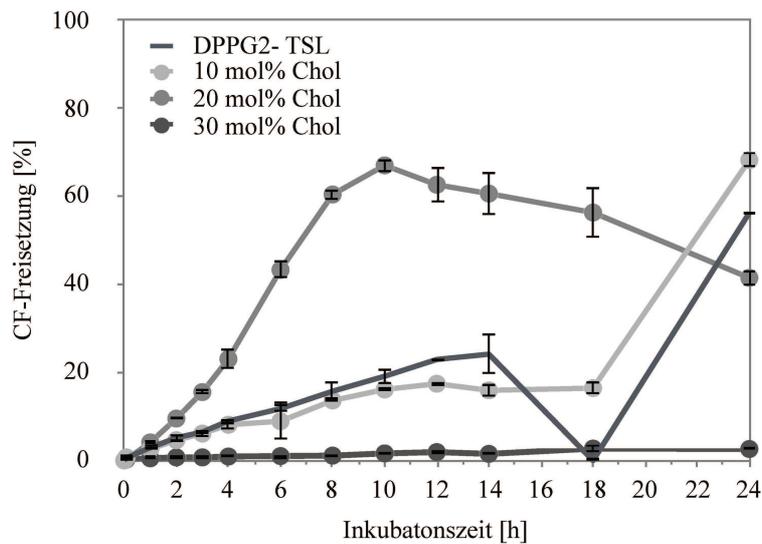
### 4.3.3 CF-Freisetzung aus Cholesterin-DPPG<sub>2</sub>-TSL in 0,9 % NaCl

Cholesterinhaltige DPPG<sub>2</sub>-TSL wurden auch auf ihre Stabilität in 0,9 % NaCl getestet (s. Abbildung 4.11). Bis 38 °C bleiben alle drei Formulierungen stabil (max. 3,8±1,3 % CF-Freisetzung). 30 mol%-Chol-DPPG<sub>2</sub>-TSL zeigen die insgesamt geringste Freisetzung (44 °C: 2,6±0,6 %) im Vergleich zu den anderen Chargen nach 5-minütigen Inkubationen zwischen 37 °C und 45 °C. 10 mol%-Chol-TSL setzen ebenfalls geringe CF-Mengen bis max. 9,4±0,7 % bei 42 °C frei. Bei Werten ab 43 °C findet sich ein leichter Rückgang der CF-Freisetzung (43 °C: 6,4±0,8 %; 44 °C: 6,8±0,7 %; 45 °C: 7,1±1,3 %). 20 mol%-Chol-TSL weisen einen sprunghaften Anstieg der Freisetzung bei 39 °C und 40 °C (27,1±11,1 % und 55,3±6,3 %) auf. Ab 41 °C zeichnet sich ein kontinuierlicher Abfall der CF-Freisetzung ab (41 °C: 44,3±11,0 %; 42 °C: 39,4±1,8 %; 43 °C: 30,6±9,1 %).

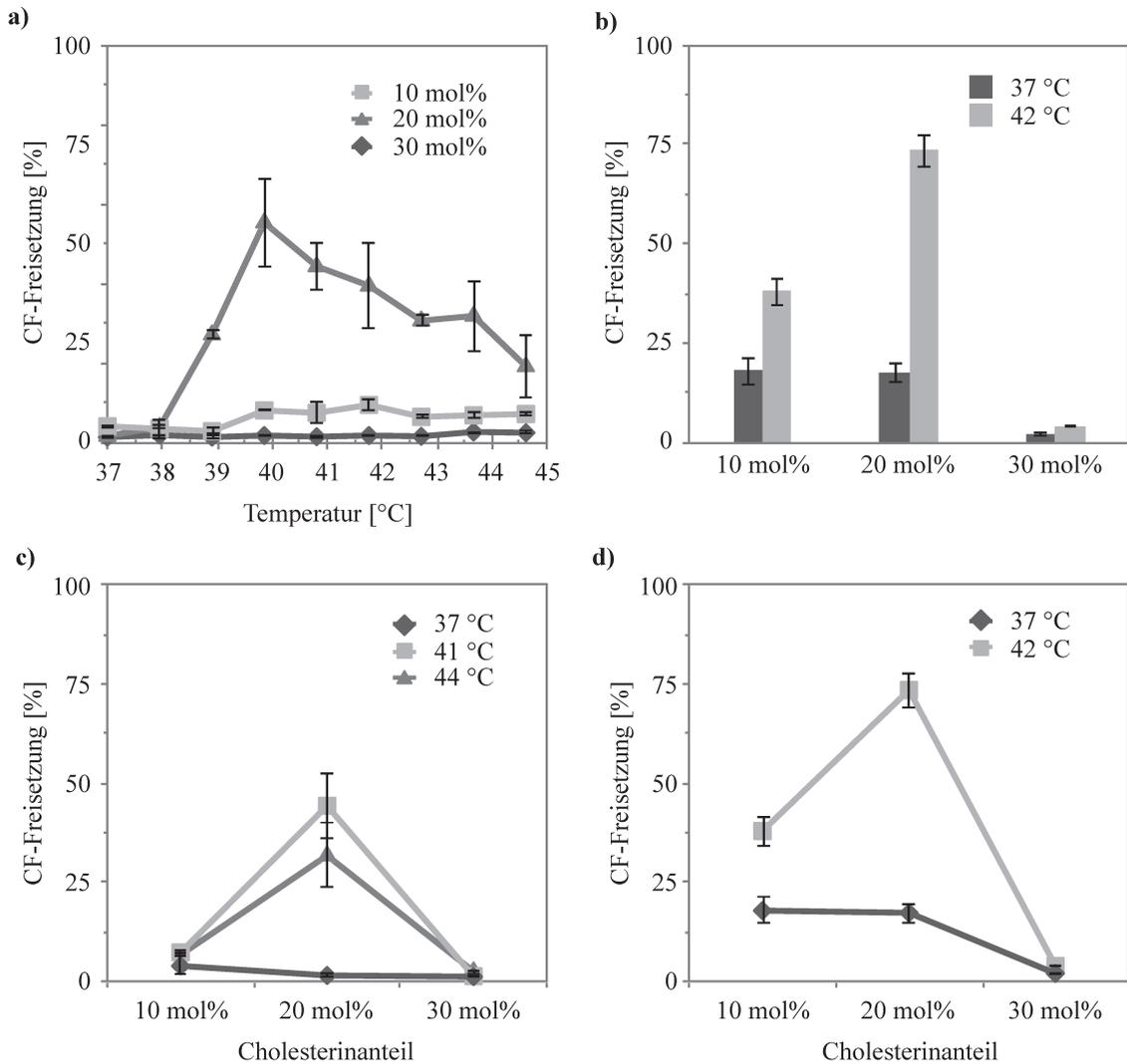
## 4.4 Einfluss von Serumbestandteilen auf die Temperaturprofile von DPPG<sub>2</sub>-TSL

Aus den bisherigen Beobachtungen zu DPPG<sub>2</sub>-TSL zeichnen sich unterschiedliche Temperaturprofile der TSL je nach Umgebungsmedium, eingeschlossenem Fluoreszenzfarbstoff und der Lipidzusammensetzung ab (vgl. Dox/CF, Chol/PEG2000, FCS/NaCl). Zur Evaluation der jeweiligen Einflüsse einzelner Serumkomponenten wurde initial die Freisetzung in niedermolekularen Serumbestandteilen untersucht. Aus Abbildung 4.12 wird deutlich, dass niedermolekulare Serumkomponenten die Membranpermeabilität von DPPG<sub>2</sub>-TSL nicht steigern.

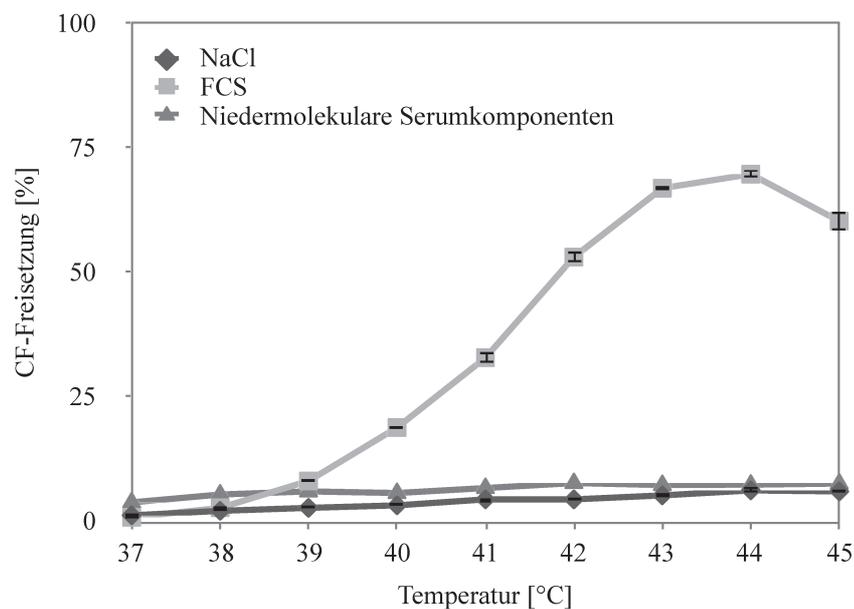
Aus den hochmolekularen Serumkomponenten wurden Albumin, Immunglobuline und separat hergestellte Lipidakzeptorvesikel (s. Kapitel 3.4.6) ausgewählt und deren Einfluss auf die Freisetzung der liposomal eingeschlossenen Farbstoffe untersucht.



**Abbildung 4.10: 24-Stunden Inkubation von DPPG<sub>2</sub>-TSL und Chol-DPPG<sub>2</sub>-TSL in FCS bei 37 °C.** Standard-DPPG<sub>2</sub>-TSL und 10 mol%-Chol-DPPG<sub>2</sub>-TSL zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf mit kontinuierlichem Anstieg der CF-Freisetzung mit zunehmender Inkubationsdauer (1 h: DPPG<sub>2</sub>: 2,9±0,7 %, 10 mol%-Chol: 2,6±0,2 %; 6 h: DPPG<sub>2</sub>: 11,8±0,8 %, 10 mol% Chol: 8,9±4,3 %; 12 h: DPPG<sub>2</sub>: 22,9±0,4 %, 10 mol% Chol: 17,4±0,2 %; 24 h: DPPG<sub>2</sub>: 56,2±0,1 %, 10 mol% Chol: 68,1±1,6 %). 20 mol% Chol-TSL weisen eine höhere und frühere Freisetzung mit bereits 43,2±1,9 % nach 6 h auf. Nach dem Maximum mit 66,9±1,4 % nach 10 h flacht die Freisetzungskurve auf 41,1±1,7 % bei 24 h ab. 30 mol% Chol-TSL zeigen durchgehend keine relevante CF-Freisetzung (max. 2,7±0,7 % nach 18 h).



**Abbildung 4.11: CF-Freisetzung aus Chol-DPPG<sub>2</sub>-TSL nach Inkubation in 0,9 % NaCl.** a) Fünf-Minuten Werte bei Inkubationen von 37 °C bis 45 °C. TSL mit 10 mol% Chol zeigen eine stabile Membran und setzen maximal  $9,4 \pm 0,7$  % CF bei 42 °C frei. 20 mol%-Chol-DPPG<sub>2</sub>-TSL weisen eine instabilere Membran mit einer maximalen CF-Freisetzung mit  $55,3 \pm 6,3$  % bei 40 °C auf. b) Nach 1 h Inkubation bei 37 °C werden aus 10 mol% und 20 mol%-Chol-TSL jeweils ca. 17 % des CF frei. Bei 42 °C beträgt die CF-Freisetzung  $37,9 \pm 3,7$  % aus 10 mol-Chol-TSL und  $73,4 \pm 4,3$  % aus 20 mol%-Chol-TSL. Aus TSL mit 30 mol% Chol entweichen nur geringe Mengen CF (1 Stunde bei 42 °C:  $4,0 \pm 0,1$  %), sodass diese Membranzusammensetzung keine temperaturabhängige Freisetzung gewährleistet. c) Nach 5 Minuten bei 41 °C und 44 °C zeigt sich nur bei 20 mol%-Chol-TSL eine deutliche CF-Freisetzung mit  $44,3 \pm 11,0$  % und  $31,8 \pm 8,3$  %. d) Nach 1 h bei 37 °C und 42 °C zeigt sich auch bei 20 mol%-Chol-TSL die insgesamt höchste CF-Freisetzung. Die geringste Freisetzung findet sich bei 30 mol%-Chol-TSL mit  $2,1 \pm 0,5$  % bei 37 °C und  $4,0 \pm 0,1$  % bei 42 °C.



**Abbildung 4.12:** CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) bei Inkubation in 0,9 % NaCl, FCS oder niedermolekularen Serumbestandteilen. In FCS zeigt sich eine zunehmende Freisetzung mit steigender Umgebungstemperatur (37 °C: 0,9±0 %, 41 °C: 32,9±1,2 %, 43 °C: 66,9±0 %). Bei Inkubation in 0,9 % NaCl und niedermolekularen Serumbestandteilen werden nur geringe Mengen des CF frei. Die maximale Freisetzung in 0,9 % NaCl beträgt 6,3±0,5 % bei 44 °C und in niedermolekularen Serumkomponenten 7,8±0,1 % bei 42 °C.

#### 4.4.1 Einfluss von Albumin auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

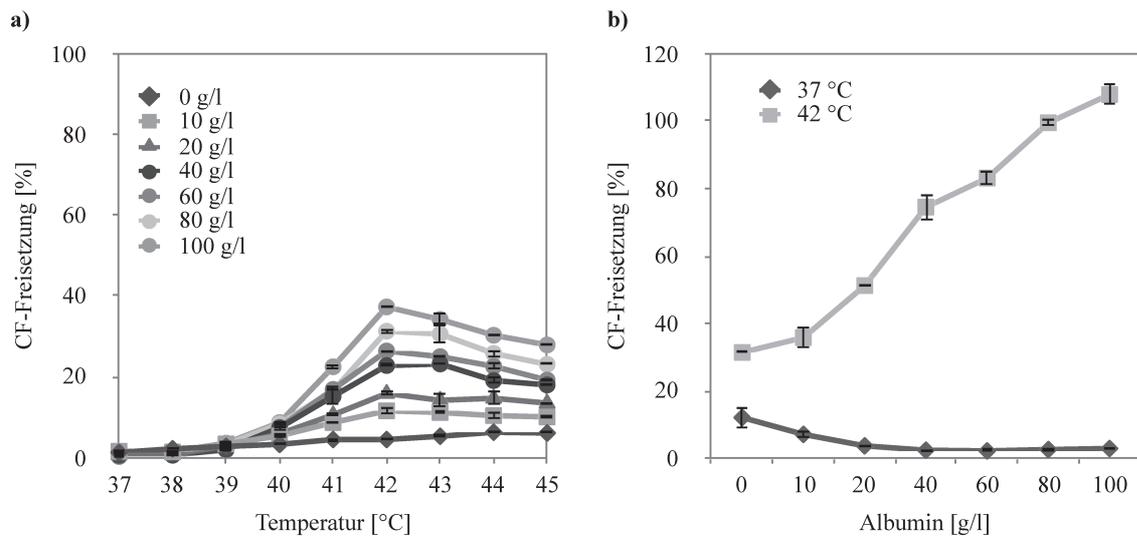
Albumin wurde in aufsteigender Dosierung zu 0,9 % NaCl hinzugegeben und die Temperaturprofile der DPPG<sub>2</sub>-TSL darunter bestimmt (s. Abbildung 4.13). Bei 37 °C wurde die CF-Freisetzung mit max.  $1,6 \pm 0,1$  % gemessen. Die Freisetzung ist damit ähnlich zur Inkubation in 0,9 % NaCl ( $1,3 \pm 0,1$  %, s. Abbildung 4.3). Bis 40 °C bleibt die CF-Freisetzung insgesamt gering mit unter 10 %, während es bei weiterer Erwärmung zu stärkerer CF-Freisetzung kommt. Hierbei zeichnet sich eine Abhängigkeit von der Albuminmenge ab, da unter mehr Albumin mehr CF freigesetzt wird. Die stärkste Freisetzung wird bei 42 °C erreicht und beträgt  $37,3 \pm 0,2$  % nach der Inkubation mit 100 g/l Albumin. Bei Betrachten der Kurve mit 40 g/l Albuminbeimengung, welche ungefähr dem humanphysiologischen Albumingehalt im Serum entspricht, zeigt sich ein temperaturabhängiger Verlauf mit einer maximalen CF-Freisetzung von  $23,3 \pm 0,2$  % bei 43 °C. Dies liegt deutlich unter der Freisetzung in FCS (s. Abbildung 4.3).

Bei Inkubationen über eine Stunde bei 42 °C zeigt sich eine deutliche Zunahme der CF-Freisetzung mit steigender Albuminmenge bis zur vollständigen Freisetzung mit  $99,5 \pm 1,2$  % für 80 g/l Albumingehalt. Nach einer Stunde bei 37 °C findet sich hingegen eine Verringerung der CF-Freisetzung mit zunehmendem Albumingehalt (10 g/l:  $7,1 \pm 0,9$  %, 40 g/l:  $2,4 \pm 0,3$  %, s. Abbildung 4.13 b).

#### 4.4.2 Einfluss von Immunglobulinen auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

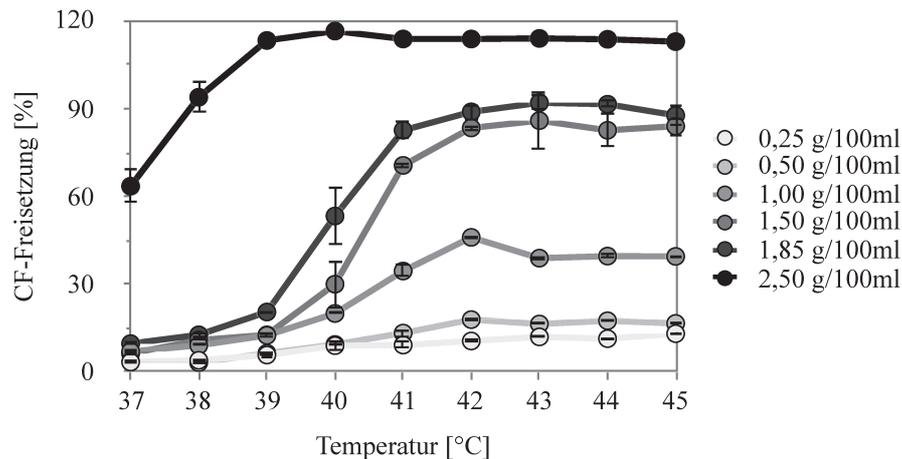
Analog zur Albuminzugabe wurde der Effekt von gepoolten humanen Immunglobulinen (vereinfacht als IgG bezeichnet) auf das Freisetzungsverhalten DPPG<sub>2</sub>-TSL untersucht. Mit steigender Zugabe von IgG zeigte sich eine zunehmende CF-Freisetzung. Bei Zugabe von bis zu 1,85 g/100 ml IgG findet sich eine geringe CF-Freisetzung (max.  $20,5 \pm 0,4$  %) bis zu 39 °C nach jeweils 5 Minuten. Bei weiterer IgG-Erhöhung (2,5 g/100 ml) zeigte sich eine sprunghafte Erhöhung der CF-Freisetzung mit Erreichen einer absoluten Freisetzung ab 39 °C. Somit zeichnet sich bei IgG-Mengen von 0,25 g/100 ml bis 1,85 g/100 ml ein temperatur- und IgG-abhängiger Verlauf der CF-Freisetzung mit geringer Freisetzung bis 39 °C ab (s. Abbildung 4.14).

Die physiologische IgG-Menge im humanen Serum beträgt zwischen 0,73 bis 1,83 g/100 ml und liegt im Bereich der Kurven mit 1,0 g/100 ml bzw. 1,5 g/100 ml. Nach Inkubationen mit 1,0 g/100 ml IgG steigt die CF-Freisetzung bis auf  $46,0 \pm 0$  % bei 42 °C an und sinkt anschließend gering-gradig (auf ca. 39 %) ab. Bei 1,5 g/100 ml IgG findet sich ein sprunghafter Anstieg der Freisetzung bei Zunahme der Temperatur von 40 °C auf 41 °C ( $30,0 \pm 8,0$  % bzw.  $70,6 \pm 0,6$  %). Ab 42 °C werden bereits über 80 % des eingeschlossenen CF frei (s. Abbildung 4.14). Ausgenommen ist der Kurvenverlauf unter 2,5 g/100 ml IgG,



**Abbildung 4.13: Einfluss von Albumin auf die CF-Freisetzung aus DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m))-TSL nach 5 Minuten- und 1h-Inkubationen.**

a) 5-Minuten-Inkubationen: Unter Zugabe von Albuminlösung in steigender Menge wurde zunehmend mehr CF außerhalb der Liposomen detektiert. Bis 40 °C wurden maximal  $8,7 \pm 0,1$  % des CF frei (Albuminbeimengung bis 100 g/l). Ab 41 °C zeichnet sich eine stärkere Freisetzung unter höheren Albuminmengen ab. Die maximale CF-Menge wird mit  $37,3 \pm 0,2$  % bei 42 °C detektiert. b) Nach 1 h bei 37 °C werden mit zunehmender Albuminmenge weniger CF frei (0,9 % NaCl:  $12,1 \pm 3,2$  %, 10 g/l:  $7,1 \pm 0,9$  %, 40 g/l:  $2,4 \pm 0,3$  %, 60 g/l:  $2,2 \pm 0$  %, 100 g/l:  $2,9 \pm 0,1$  %). Nach 1 h bei 42 °C steigt die Freisetzung mit zunehmendem Albuminanteil der Inkubationslösung an (0,9 % NaCl:  $31,4 \pm 0,3$  %; 10 g/l:  $35,8 \pm 2,9$  %, 40 g/l:  $74,5 \pm 3,7$  %, 60 g/l:  $83,1 \pm 2,0$  %, 80 g/l:  $99,5 \pm 1,2$  %).



**Abbildung 4.14:** Freisetzung von CF aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) unter Zugabe von gepoolten IgG. Unter Zugabe von 0,25 g/100 ml bis 1,85 g/100 ml IgG zeigt sich ein temperaturabhängiger Verlauf der CF-Freisetzung bei 5-Minuten-Inkubationen zwischen 37 °C bis 45 °C. Bei 39 °C werden maximal 20,5±0,4 % des CF frei. Bei weiterer Erwärmung findet eine zunehmende Freisetzung bei steigendem IgG-Gehalt statt. Die maximalen Freisetzungen werden bei 42 °C bzw. 43 °C gemessen und erreichen bei 0,25 g/100 ml IgG 11,4±0,4 % sowie bei 1,85 g/100 ml 92±2,8 %. Bei Zugabe von 2,5 g/100 ml IgG werden eine sehr starke Freisetzung bereits ab 37 °C gemessen (63,5±5,7 %) sowie eine vollständige CF-Freisetzung ab 39 °C.

	Größe [nm]	PDI	ζ-Potential [mV]
DPPC/Chol-Vesikel 55:45 (mol/mol)	4282	0,30	3,2
DPPC-Vesikel	7430	0,71	0,3

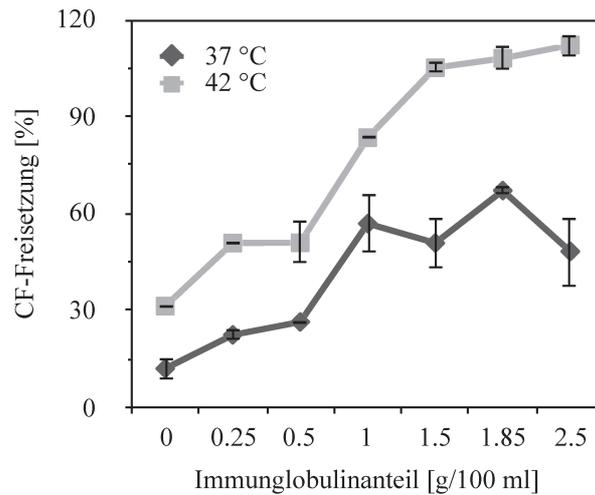
**Tabelle 4.3:** Eigenschaften der verwendeten Lipidvesikel.

da hier eine frühe und sehr starke Freisetzung stattfindet.

Bei 1h-Inkubationen bei 37 °C und IgG-Zugabe zeigt sich insgesamt eine stärkere Freisetzung als in 0,9 % NaCl (minimale CF-Freisetzung mit IgG 22,5±1,5 % vs. maximale Freisetzung in 0,9 % NaCl 12,1±3,2 %). Die CF-Freisetzung steigt nach 1 Stunde mit zunehmendem IgG (s. Abbildung 4.15). Nach 1 Stunde bei 42 °C werden bereits für 0,25 g/100 ml IgG über 50 % des CF frei.

#### 4.4.3 Einfluss von Lipidvesikeln auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

Neben den bereits untersuchten Serumbestandteilen gilt es den Einfluss von Lipiden als Lipidvesikel auf die CF-Freisetzung aus TSL zu untersuchen.



**Abbildung 4.15:** 1-Stunde-Inkubationen von DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) unter Zugabe von IgG. Es zeigen sich eine insgesamt höhere CF-Freisetzung bei 42 °C im Vergleich zu 37 °C sowie höhere CF-Freisetzungen nach Zugabe von IgG im Vergleich zu reinem 0,9 % NaCl. Bereits bei geringen Mengen IgG wird deutlich CF freigesetzt (0,25 g/100 ml: 22,5±1,5 % bei 37 °C und 50,9±0,2 % bei 42 °C).

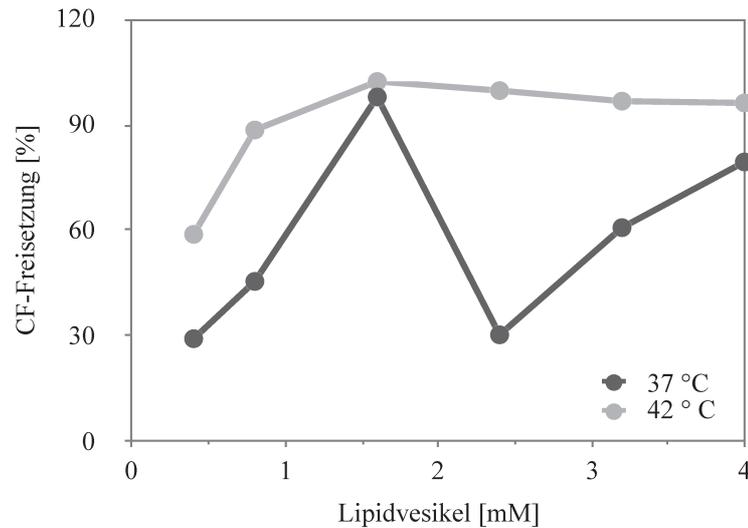
#### 4.4.3.1 Einfluss von DPPC/Cholesterin-Vesikeln auf die TSL-Stabilität

Inkubationen von DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) mit Lipidvesikeln aus DPPC und Cholesterin (55:45 mol:mol) unterschiedlicher Größe führen zu einer temperaturabhängigen Zunahme der CF-Freisetzung mit steigendem Vesikelgehalt (s. Abbildung 4.17) im Vergleich zu Inkubationen in 0,9 % NaCl (vgl. Abbildung 4.3). Der Kurvenverlauf nach Zugabe von 0,4 mM und 0,8 mM Vesikel weist insgesamt geringe CF-Freisetzungen auf (max. 19,1±3,6 % bei 43 °C), während bei weiterer Erhöhung der zugegebenen Vesikelmenge (z.B. 1,6 mM, 43 °C: 45,5±2,9 %) bereits deutlich mehr CF freigesetzt wird.

Inkubationen der Standard-DPPG<sub>2</sub>-TSL für 1 h bei 37 °C und 42 °C nach Zugabe von DPPC/Chol-Vesikeln weisen eine stärkere CF-Freisetzung bei 42 °C auf (s. Abbildung 4.16). Nach Zugabe von 0,8 mM DPPC/Cholesterin-Vesikel wird bei 42 °C eine fast vollständige CF-Freisetzung erreicht (88,5 %). Bei 37 °C wird ebenfalls mehr CF mit steigender Vesikelmenge frei, mit jedoch einem Ausreißer bei 1,6 mM und bereits vollständiger CF-Freisetzung (0,4 mM: 29,1 %, 0,8 mM: 45,4 %, 3,2 mM: 60,7 %, 4,0 mM: 79,4 %). Die Versuche sind ein Mal durchgeführt worden.

#### 4.4.3.2 Einfluss von DPPC-Vesikeln auf die CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

Analog zu DPPC/Cholesterin-haltigen Lipidvesikeln wurde der Einfluss reiner DPPC-Vesikel (s. Tabelle 4.3) auf die CF-Freisetzung von Standard-DPPG<sub>2</sub>-TSL untersucht. Bei

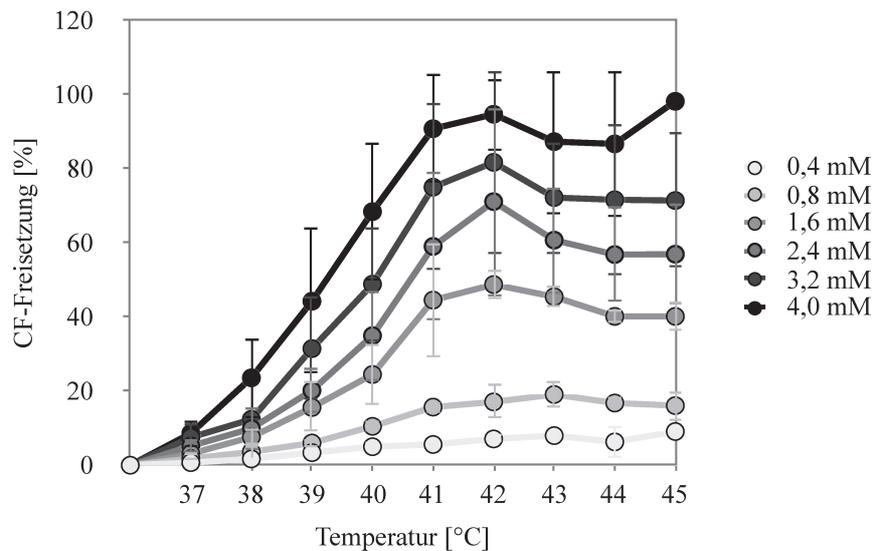


**Abbildung 4.16:** CF-Freisetzung nach 1 Stunde Inkubationen von TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) mit DPPC/Chol-Vesikeln (55:45 mol:mol), n = 1. Nach einer Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C und Zugabe von 0,4 mM bis 4,0 mM DPPC/Chol-Vesikel finden sich CF-Freisetzungen von 29 % bis 80 % bei 37 °C. Nach Inkubationen bei 42 °C ist die Freisetzung nach Zugabe von 0,4 mM Lipidvesikel bei 59 % und steigt bei weiterer Erhöhung der Vesikelmenge an (0,8 mM: 88 %).

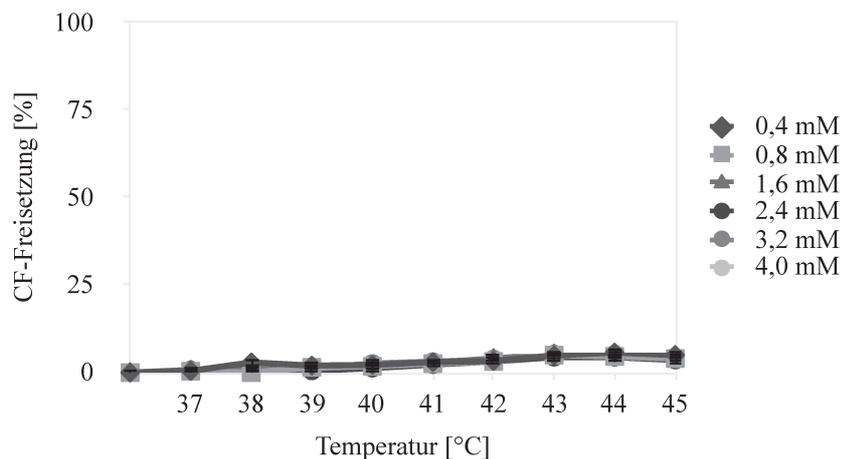
Inkubationen für jeweils fünf Minuten unter ansteigender Inkubationstemperatur und Vesikelmenge wurde nur eine sehr geringe CF-Freisetzung erreicht (max. 5,3 %, s. Abbildung 4.18). Nach Inkubationen für 1 h bei 37 °C werden max. 2,7 % des CF frei. Bei 42 °C werden max. 24,9 % des CF frei, dabei zeigt sich eine abnehmende CF-Freisetzung mit steigender Vesikelmenge (s. Abbildung 4.19: 0,4 mM: 24,9 %, 0,8 mM: 19,4 %, 2,4 mM 16,2 %, 4,0 mM: 15,9 %). Im Vergleich zur CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL nach 1 Stunde Inkubation in 0,9 % NaCl zeigt sich eine geringere Freisetzung nach Zugabe von DPPC-Vesikeln (s. Abbildung 4.3 b).

#### 4.4.4 Temperaturprofile von DPPG<sub>2</sub>-TSL in künstlichen Seren

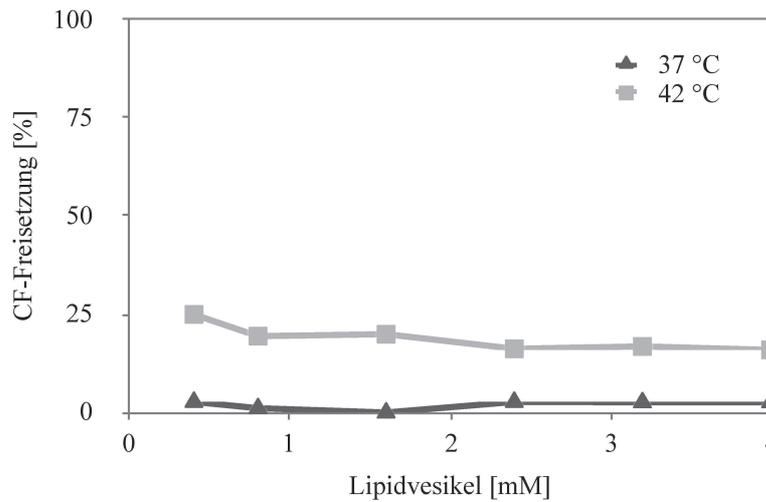
Im direkten Vergleich der CF-Freisetzungen aus DPPG<sub>2</sub>-TSL in FCS, 0,9 % NaCl und IgG- sowie Albuminbeimischung in physiologischer Konzentration zeigen sich eine stärkere Freisetzungen unter Zugabe von IgG bei 37 °C bis 39 °C (s. Abbildung 4.20). Ab 40 °C trennt sich der Kurvenverlauf unter 1,5 g/100 ml IgG durch eine höhere CF-Freisetzung ab. Die CF-Freisetzung in FCS und 1,0 g/100 ml IgG verläuft ähnlich bei Inkubationstemperaturen von 40 °C bis 42 °C. Nach Zugabe von 40 g/l Albumin steigt die CF-Freisetzung langsam und bis auf ein Maximum mit 23,3±0,2 % bei 43 °C an und fällt anschließend wieder leicht ab (45 °C, 18,0±0,3 %). In 0,9 % NaCl bleibt die liposomale Membran für



**Abbildung 4.17:** CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) nach 5-minütigen Inkubationen zwischen 37 °C und 45 °C unter Zugabe von Lipidakzeptorvesikeln aus DPPC und Cholesterin (55:45 mol:mol), n = 1. Nach Zugabe von 0,4 mM bis 0,8 mM Lipidvesikeln werden maximal 19,1±3,6 % des CF bei 43 °C frei. Bei weiterer Erhöhung der Vesikelmenge auf 1,6 mM zeichnet sich eine sprunghaft höhere Freisetzung mit deutlicher Temperaturabhängigkeit mit einer maximalen CF-Freisetzung von 48,8±3,7 % bei 42 °C ab. Nach Zugabe von 2,4 mM bis 4,0 mM findet sich eine jeweils frühere und verstärkte CF-Freisetzung mit nahezu vollständiger Freisetzung nach Zugabe von 4,0 mM Lipidvesikel. Die höchste Freisetzung nach Zugabe von 1,6 mM bis 4,0 mM der Vesikel wird jeweils bei 42 °C erreicht, mit Ausnahme einer kompletten Freisetzung bei 45 °C nach Zugabe von 4,0 mM.



**Abbildung 4.18:** CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-haltigen TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) nach Zugabe von reinen DPPC-Lipidvesikeln und Inkubationen für jeweils fünf Minuten zwischen 37 °C und 45 °C, n = 1. Die CF-Freisetzung bleibt trotz Erhöhung der Temperatur und Zugabe von 0,4 mM bis 4,0 mM DPPC-Vesikel sehr gering bis max. 5,3 %.



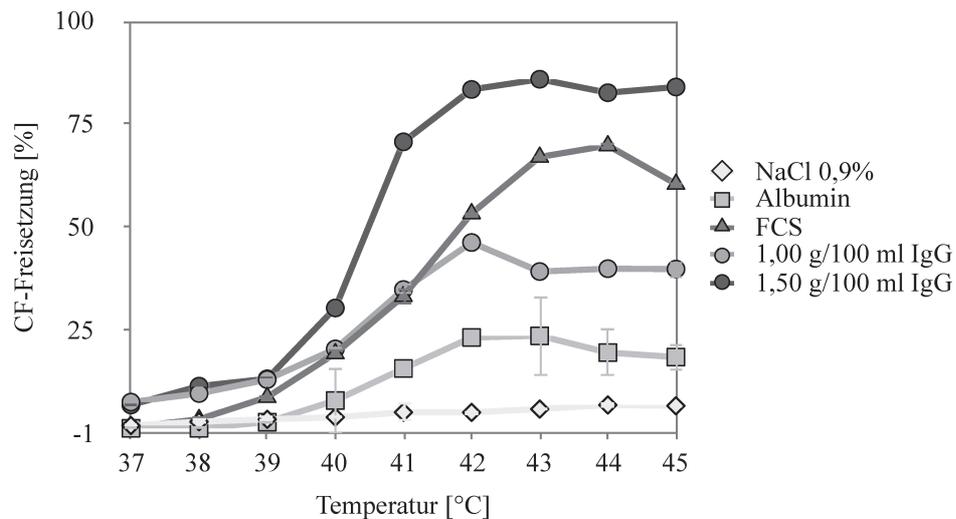
**Abbildung 4.19:** CF-Freisetzung aus DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m))-TSL nach 1 Stunde Inkubationen bei 37 °C bzw. 42 °C nach Zugabe von DPPC-Vesikeln,  $n = 1$ . Die Freisetzung bei 37 °C ist durchgängig sehr niedrig (max. 2,7 %). Bei Inkubationen mit 42 °C ist die Freisetzung höher als bei 37 °C und sinkt mit zunehmender Menge an DPPC-Vesikeln ab (0,4 mM: 24,9 %, 4,0 mM: 15,9 %).

den Farbstoff fast undurchlässig (max.  $6,3 \pm 0,3$  %). Insgesamt wird unter Zugabe der einzelnen Serumkomponenten weniger CF freigesetzt als in FCS bei Temperaturen ab 40 °C. Bei Körpertemperatur kommt es unter Zugabe von IgG zu stärkerer Freisetzung als in FCS (s. Abbildung 4.20).

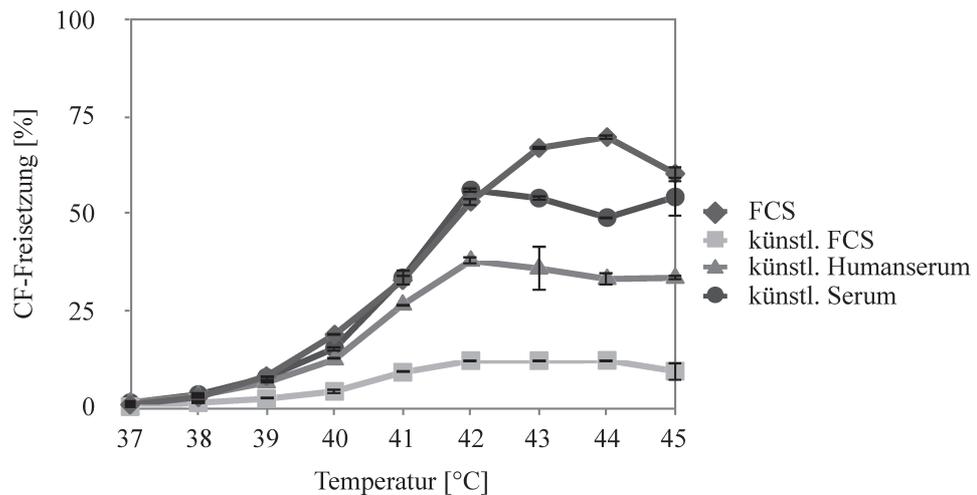
Entsprechend den Zusammensetzungen von FCS und Humanserum wurden künstliche Seren hergestellt und deren Effekt auf die CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL bestimmt (s. Abbildung 4.21). Es zeigen sich geringere CF-Freisetzungen in künstlichem FCS und künstlichem Humanserum als in FCS bei weiterhin steigender Freisetzung mit Erhöhung der Inkubationstemperatur. Ab 43 °C sinkt die CF-Freisetzung in den künstlichen Seren erneut ab (künstl. FCS:  $12,2 \pm 0,1$  %; künstl. Humanserum:  $35,9 \pm 5,9$  %). In FCS erreicht die CF-Freisetzung bei 44 °C ihr Maximum ( $69,7 \pm 0,7$  %) und wird bei 45 °C wieder geringer ( $60,3 \pm 1,9$  %). Diesem Kurvenverlauf am ähnlichsten verhält sich die CF-Freisetzung aus der künstlich hergestellten Serumlösung. Das Temperaturprofil ändert sich lediglich ab 43 °C mit abfallender CF-Freisetzung (43°C:  $54,0 \pm 0,9$  %). Die Verringerung der CF-Freisetzung tritt somit 2 °C früher als in FCS ein.

#### 4.5 In vitro Temperaturprofile PEG2000-haltiger-TSL

Zum weiteren Vergleich der Standard-DPPG<sub>2</sub>-TSL des Labors wurden die DPPG<sub>2</sub>-TSL um DSPE-PEG2000 ergänzt und ihr Freisetzungsverhalten untersucht. Die Lipidzusammenstellung entsprach DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub>/DSPE-PEG2000 50:15:30:5 (m/m). PEG2000-



**Abbildung 4.20:** CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) unter Zugabe von gepoolten IgG und Albumin (40 g/l) in Konzentrationen ähnlich der Konzentrationen im Humanserum und Vergleich des Kurvenverlaufs mit Inkubationen in 0,9 % NaCl sowie FCS aus DPPG<sub>2</sub>-TSL. Von 37 °C bis 39 °C ist die CF-Freisetzung in FCS und 0,9 % NaCl geringer als unter Zugabe von IgG (max.  $8,2 \pm 0,3$  % und  $2,8 \pm 0,3$  % vs.  $12,7 \pm 0,4$  %). Bei weiterer Erwärmung zeigt sich ein ähnlicher Anstieg der Freisetzung in FCS und 1,0 g/100 ml IgG bis 42 °C ( $53,1 \pm 1,0$  % und  $46,0 \pm 0$  %). Ab 43 °C wird mehr CF in FCS frei ( $66,9 \pm 0$  % vs.  $38,9 \pm 0,3$  %). Nach Zugabe von 1,5 g/100 ml IgG findet durchgehend eine höhere CF-Freisetzung als in FCS statt. Die Zugabe von Albumin führt zu einem langsamen Anstieg der CF-Freisetzung bis zu einem Maximum mit  $23,3 \pm 0,2$  % bei 43 °C. Bei weiterer Erwärmung sinkt die Freisetzung wieder auf bis zu  $18,0 \pm 0,3$  %. In 0,9 % NaCl wird über den gesamten Kurvenverlauf wenig CF frei (max.  $6,3 \pm 0,3$  %).



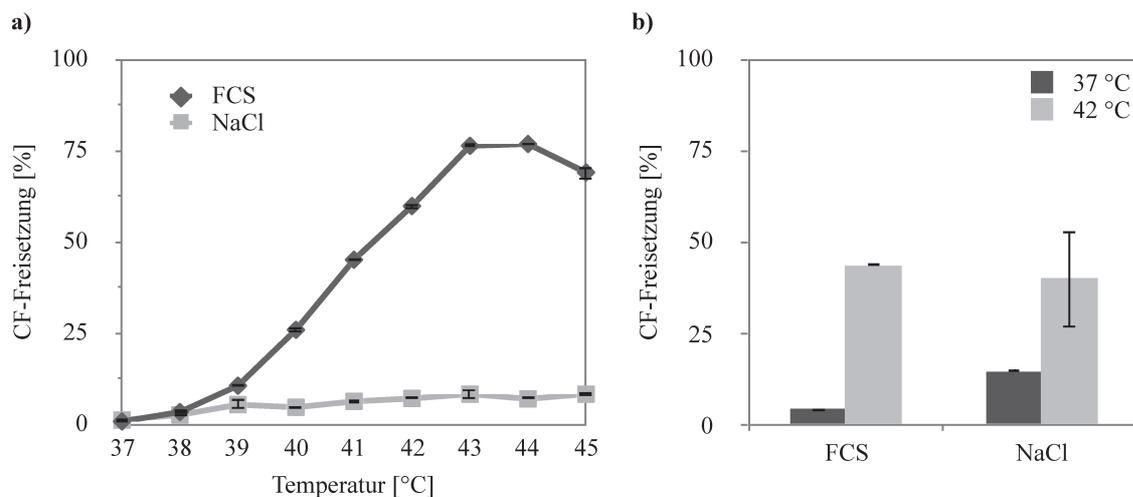
**Abbildung 4.21:** CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> (50:20:30 (m/m)) unter Zugabe von FCS, künstlichem FCS, künstlichem Humanserum und künstlicher Serumlösung. In den experimentell hergestellten FCS und Humanserum zeigen sich in künstlichem FCS und Humanserum geringere Freisetzungen als in FCS über den gesamten Temperaturverlauf (künstl. FCS/künstl. Humanserum/FCS) 37 °C: 0,4±0,1 % / 1,4±0,1 % / 0,9±0,1 %; 42 °C: 12,2±0,1 % / 37,9±1,2 % / 43,1±1,0 %; 45 °C: 9,5±2,4 % / 33,5±0,5 % / 60,3±1,9 %. Die CF-Freisetzung in künstlicher Serumlösung weist einen ähnlichen Verlauf zu FCS auf mit jedoch einen früheren Abfall der Freisetzung bei 43 °C (42 °C: 56,1±0,9 %; 43 °C: 54,0±0,9 %).

haltige TSL weisen eine temperaturabhängige CF-Freisetzung in FCS auf. Die CF-Freisetzung bei 5-minütiger Inkubation steigt ab 39 °C bis 43 °C kontinuierlich auf bis zu 76,8±0,1 % an. In 0,9 % NaCl bleibt die Freisetzung < 10 %. Die 1-Stunden-Werte weisen geringe Freisetzungen bei 37 °C auf, wobei eine höhere Freisetzung in NaCl 0,9 % (14,8±0,2 %) als in FCS (4,1±0 %) erreicht werden (s. Abbildung 4.22). Bei 1 Stunde und 42 °C beträgt die CF-Freisetzung 43,8±0,1 % in FCS und 39,8±13,2 % in NaCl.

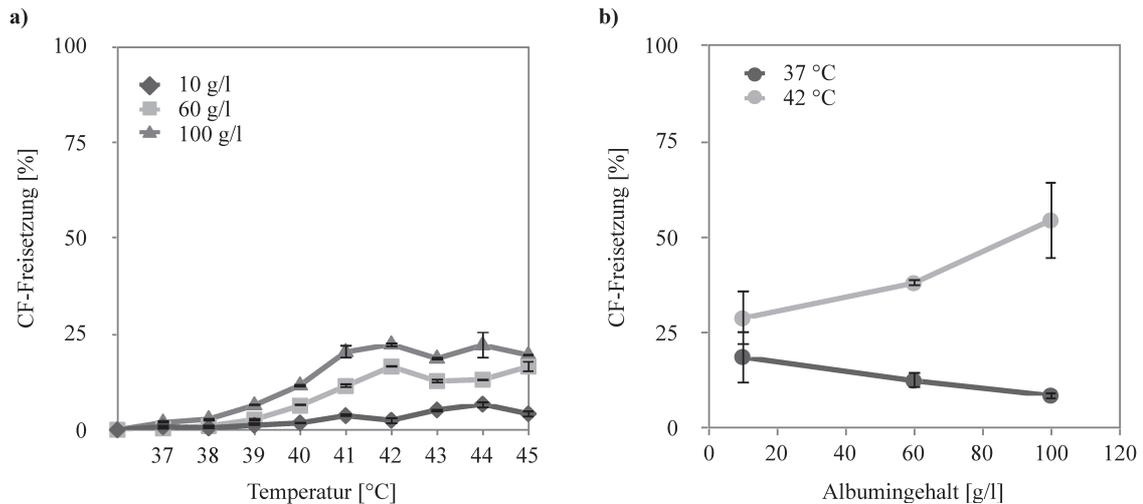
## 4.6 Einfluss von Serumbestandteilen auf die Temperaturprofile PEG2000-haltiger TSL

### 4.6.1 Einfluss von Albumin auf die Temperaturprofile von PEG2000-TSL

PEG2000-haltige TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) weisen eine zunehmende CF-Freisetzung mit höherer Albuminmenge bei Inkubationen für 5 Minuten auf. Unter Zugabe von 100 g/l Albumin setzten PEG2000-TSL bis zu 22,3±0,5 % CF (5 Minuten, 42 °C, s. Abbildung 4.23) frei. Die Temperaturprofile bei Inkubationen für eine Stunde zeigen eine Abnahme der CF-Freisetzung mit steigender Albuminmenge bei 37 °C. Bei 42 °C findet entgegengesetzt eine Zunahme der Freisetzung mit steigendem



**Abbildung 4.22:** TSL mit DSPE-PEG-2000-Anteil in der liposomalen Membran (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)). a) Prozentuale CF-Freisetzung nach fünfminütiger Inkubation unter der jeweiligen Temperatur in FCS und 0,9 % NaCl. In NaCl findet sich eine geringe Freisetzung unter 10 %. In FCS zeigen PEG2000-haltige Liposomen einen temperaturabhängigen Verlauf mit einer raschen Zunahme der Freisetzung ab 40 °C. Die maximale Freisetzung nach fünf-minütiger Inkubation wird zwischen 43 °C und 44 °C erreicht ( $76,8 \pm 0,1$  %). b) CF-Freisetzung aus PEG2000-haltigen TSL nach 1 h Inkubation in FCS und 0,9 % NaCl bei 37 °C und 42 °C. In FCS zeigt sich eine sehr geringe Freisetzung bis maximal  $4,1 \pm 0$  % bei 37 °C. Unter 42 °C lassen sich  $43,8 \pm 0,1$  % CF außerhalb der TSL detektieren. In NaCl stellen sich die Freisetzung mit  $14,8 \pm 0,2$  % bei 37 °C und  $39,8 \pm 13,2$  % dar.

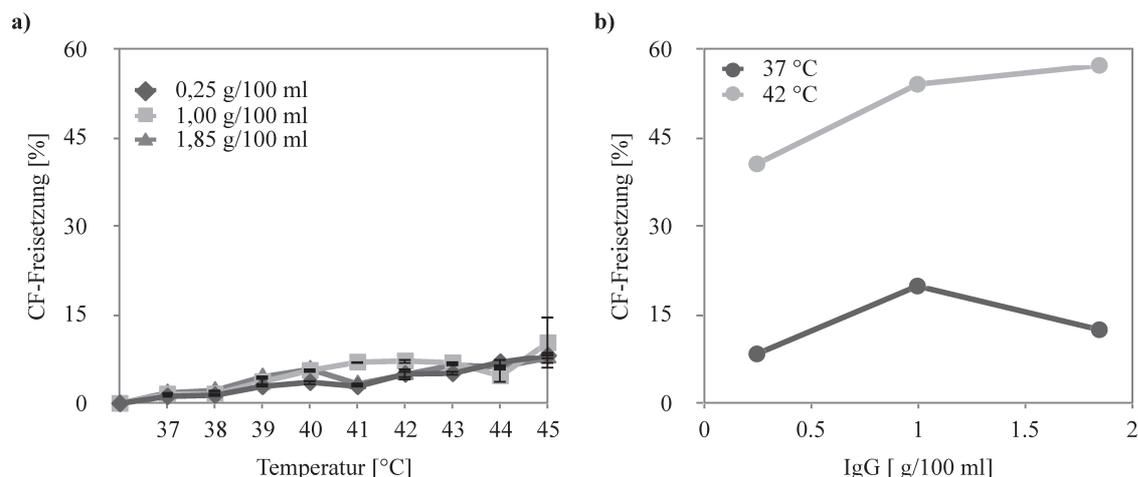


**Abbildung 4.23:** *CF-Freisetzung aus DSPE-PEG2000-haltigen TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) unter Zugabe von humanem Albumin in ansteigender Konzentration.* a) Nach 5 Minuten-Inkubationen zeigt sich eine geringe Freisetzung nach Zugabe von 10 g/l mit einer minimalen CF-Detektion von 0,5 % bei 37 °C-38 °C und einer maximalen CF-Freisetzung mit  $5,7 \pm 0,9$  % bei 44 °C. Nach Zugabe von 60 g/l Albumin werden maximal  $16,5 \pm 0,4$  % bzw.  $16,5 \pm 1,3$  % bei 42 °C bzw. 45 °C frei. b) Nach 1 Stunde bei 42 °C findet sich eine Zunahme der Freisetzung mit steigender Albumin-Konzentration (10 g/l:  $28,8 \pm 7,2$  %, 60 g/l;  $38,0 \pm 1,0$  %, 100 g/l:  $54,4 \pm 10,1$  %). Bei 37 °C findet sich eine Verringerung der CF-Freisetzung mit steigendem Albumingehalt mit einer minimalen CF-Detektion von  $8,6 \pm 0,8$  % nach Zugabe von 100 g/l Albumin (10 g/l:  $18,7 \pm 6,8$  %, 60 g/l:  $12,5 \pm 2,0$  %).

Albumingehalt statt. Bereits nach Zugabe von 10 g/l Albumin werden ca. 30 % des CF frei. Bei 100 g/l Albumin werden über 50 % des CF frei (s. Abbildung 4.23). Im Vergleich zur Freisetzung in FCS wird jedoch weniger CF freigesetzt (vgl. Abbildung 4.22).

#### 4.6.2 Einfluss von IgG auf die Temperaturprofile von PEG2000-TSL

Die Zugabe von IgG zu DSPE-PEG2000-TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) führt zu einer maximalen CF-Freisetzung von  $10,3 \pm 4,3$  % bei 45 °C nach Inkubation für fünf Minuten für 1,00 g/100 ml IgG. Eine weitere Erhöhung des IgG-Gehalts fördert die Freisetzung nicht (s. Abbildung 4.24). Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C findet sich ebenfalls die höchste Freisetzung ( $19,9 \pm 2,2$  %) unter Zugabe von 1,00 g/100 ml IgG, bei weiterer Steigerung fällt die gemessene CF-Freisetzung  $12,5 \pm 3,0$  % ab. Nach 1 Stunde bei 42 °C findet sich eine Zunahme der CF-Freisetzung unter steigender IgG-Menge bis max.  $57,3 \pm 3,1$  % für 1,85 g/100 ml IgG. Im Vergleich zu DPPG<sub>2</sub>-TSL (vgl. Abbildung 4.24, Abbildung 4.15) ist die CF-Freisetzung aus PEG2000-TSL nach Zugabe von IgG geringer (z.B. 1 h, 37 °C, 1,00 g/ 100 ml IgG: DPPG<sub>2</sub>-TSL  $56,9 \pm 8,9$  %; PEG2000-TSL:  $19,9 \pm 2,2$  %; 1 h, 42 °C, 1,00 g/100 ml: DPPG<sub>2</sub>-TSL:  $83,5 \pm 0,6$  %; PEG2000-TSL:  $54,1 \pm 3,4$  %):

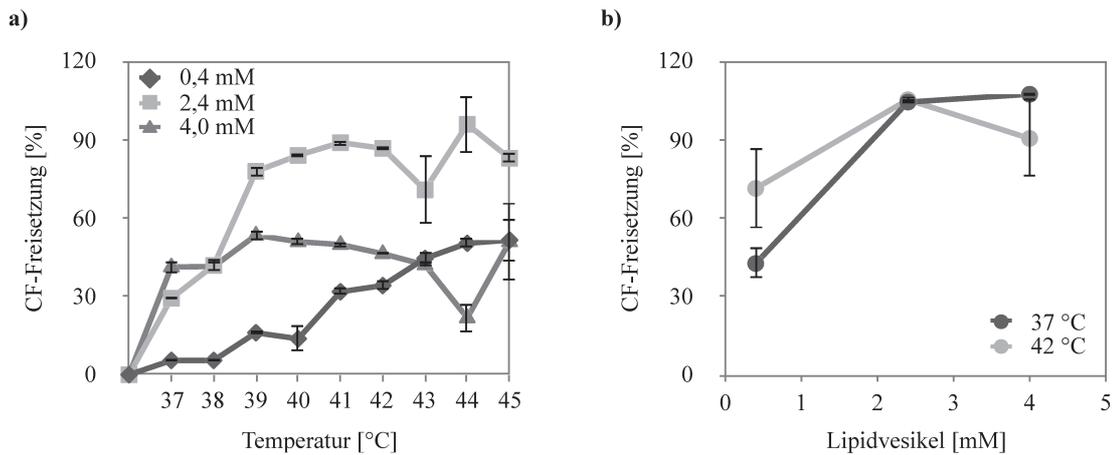


**Abbildung 4.24:** CF-Freisetzung aus DSPE-PEG2000-TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) nach Inkubationen für 5 Minuten bei Temperaturen von 37 °C bis 45 °C und für eine Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C unter Zugabe von IgG. a) Nach Zugabe von IgG zeigt sich ein Anstieg der CF-Freisetzung bis max.  $10,3 \pm 4,3$  % nach 5 Minuten bei 45 °C für 1,0 g/100 ml IgG. b) Nach einer Stunde bei 37 °C beträgt die CF-Freisetzung  $8,4 \pm 0,1$  % für 0,25 g/100 ml IgG,  $19,9 \pm 2,2$  % für 1,0 g/100 ml IgG und  $12,5 \pm 3,0$  % für 1,85 g/100 ml IgG. Bei Erwärmung auf 42 °C werden nach Zugabe von 0,25 g/100 ml bereits  $40,6 \pm 2,5$  % des CF frei. Bei weiterer Erhöhung der IgG-Menge werden > 50 % des CF außerhalb der TSL detektiert, nämlich  $54,1 \pm 3,4$  % nach Zugabe von 1,0 g/100 ml IgG und  $57,3 \pm 3,1$  % nach 1,85 g/100 ml IgG.

### 4.6.3 Einfluss von Lipidvesikeln auf die Temperaturprofile von PEG2000-TSL

#### 4.6.3.1 Einfluss von DPPC/Cholesterin-Vesikeln auf die Temperaturprofile von PEG2000-TSL

Unter Zugabe von DPPC/Cholesterin-Lipidvesikel stellt sich die CF-Freisetzung aus PEG2000-TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) insgesamt höher als in 0,9 % NaCl dar (vgl. Abbildung 4.22). Insbesondere nach Zugabe von 2,4 mM bzw. 4,0 mM DPPC/Chol-Vesikel zeigt sich eine deutlich frühere CF-Freisetzung mit  $41,9 \pm 2,2$  % für 2,4 mM bei 38 °C als in 0,9 % NaCl und FCS ( $2,6 \pm 0,4$  % bzw.  $3,1 \pm 0,1$  %, vgl. Abbildung 4.22). Nach Zugabe von 0,4 mM DPPC/Chol-Vesikel steigt die CF-Freisetzung mit steigender Temperatur bis max.  $51,6 \pm 8,1$  % bei 45 °C an. Nach Zugabe von 2,4 mM DPPC/Chol-Vesikel zeigt sich nach einem deutlichen Anstieg der CF-Freisetzung mit einem Maximum bei 41 °C mit  $89,0 \pm 0,9$  % ein angedeutetes Plateau der CF-Freisetzung. Nach Zugabe von 4,0 mM Lipidvesikel kommt es bereits bei 39 °C zu einem Anstieg der CF-Freisetzung auf  $53,5 \pm 1,8$  % und anschließend einem leichten Abfall der messbaren Fluoreszenz (41 °C:  $49,1 \pm 1,1$  %, s. Abbildung 4.25). Nach Inkubationen für eine Stunde fällt eine höhere CF-Freisetzung bei 42 °C als bei 37 °C für 0,4 mM Vesikel auf ( $71,4 \pm 14,9$  % vs.  $42,7 \pm 5,9$  %)

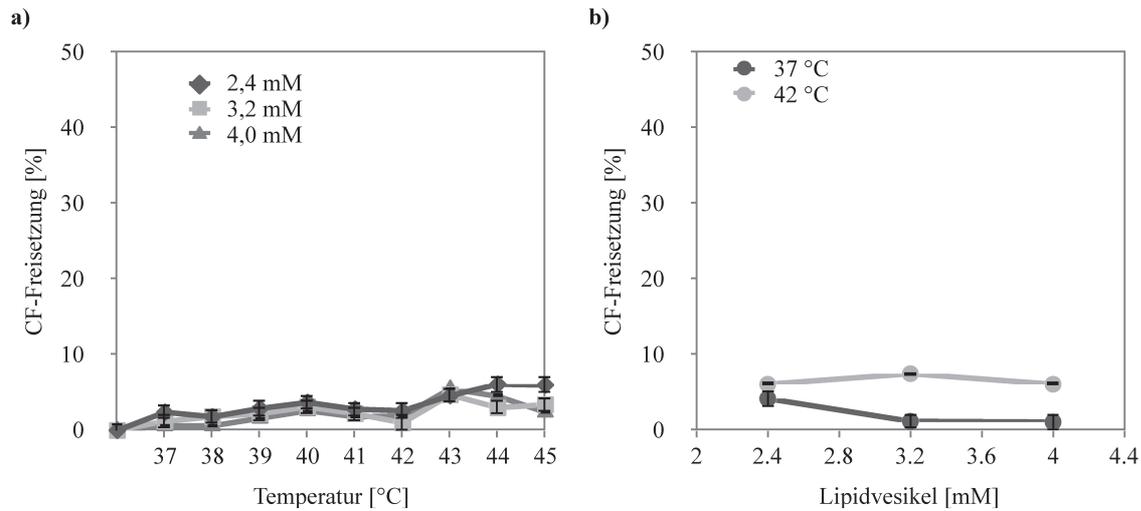


**Abbildung 4.25:** CF-Freisetzung aus PEG-2000-haltigen TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) nach Inkubation mit DPPC/Cholesterin-Vesikeln. a) 5-Minuten-Inkubationen bei Temperaturen zwischen 37 °C und 42 °C. Nach Zugabe von 0,4 mM Lipidvesikel ist ein temperaturabhängiger Verlauf mit steigender CF-Freisetzung unter erhöhter Temperatur ersichtlich. Die minimale Freisetzung findet sich bei 37 °C und 38 °C mit jeweils  $5,5 \pm 0,1$  %. Die maximale CF-Detektion gelingt bei 45 °C mit  $51,6 \pm 8,1$  %. Die Zugabe von 2,4 mM DPPC/Cholesterin-Vesikel führt zu einer raschen CF-Freisetzung mit  $78,0 \pm 1,6$  % bei 39 °C und einer vollständigen Freisetzung mit  $96 \pm 10,9$  % bei 44 °C. Nach Zugabe von 4,0 mM Vesikel werden bereits  $29,3 \pm 0,1$  % des CF bei 37 °C frei. Die maximale Freisetzung beträgt  $53,5 \pm 1,8$  % bei 39 °C. b) Inkubationen für jeweils eine Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C. Es zeigt sich eine Zunahme der CF-Freisetzung mit steigender Lipidbeimengung und steigender Temperatur nach einstündigen Inkubationen (0,4 mM: 37 °C  $42,7 \pm 5,9$  %, 42 °C  $71,4 \pm 14,9$  %; 2,4 mM: 37 °C  $104,4 \pm 0,3$  %, 42 °C  $105,3 \pm 0,9$  %; 4,0 mM: 37 °C  $107,4 \pm 0$  %, 42 °C  $90,5 \pm 15,0$  %).

für 2,4 mM und 4,0 mM findet eine annähernd vollständige Freisetzung unter 37 °C als auch 42 °C statt (2,4 mM: 37 °C  $104,4 \pm 0,3$  %, 42 °C  $105,3 \pm 0,9$  %; 4,0 mM: 37 °C  $107,4 \pm 0$  %, 42 °C  $90,5 \pm 15,0$  %).

#### 4.6.3.2 Einfluss von DPPC-Vesikeln auf die Temperaturprofile von PEG2000-TSL

Die Zugabe von reinen DPPC-Lipidvesikel führt zu geringen CF-Freisetzungen aus PEG2000-TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)), max. 6,1 % bei 44 °C für 2,4 mM. Bei 37 °C zeigt sich eine Tendenz zur Abnahme der CF-Freisetzung mit steigender DPPC-Menge (2,4 mM: 4,2 %, 3,2 mM: 1,2 %, 4,0 mM: 1,1 %, s. Abbildung 4.26). Im Vergleich zur CF-Freisetzung aus PEG2000-TSL nach 1 Stunde in 0,9 % NaCl ist die Freisetzung nach Zugabe der Lipidvesikel geringer (vgl. Abbildung 4.22, z.B. CF-Freisetzung aus PEG2000-TSL bei 42 °C: für 4,0 mM Vesikel 6,1 % im Vergleich zu  $39,8 \pm 13,2$  % in 0,9 % NaCl).



**Abbildung 4.26:** Inkubation von PEG2000-TSL (DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000 80:15:5 (m/m)) mit reinen DPPC-Lipidvesikeln,  $n = 1$ . a) 5-Minuten bei Temperaturen zwischen 37 °C und 45 °C ergeben für alle getesteten Lipidkonzentrationen nur geringe CF-Freisetzung bis max. 6,1 % bei 44 °C und Zugabe von 2,4 mM Vesikel. b) Auch die Inkubationen für jeweils eine Stunde ergeben eine maximale CF-Freisetzung von max. 6,1 % bei 42 °C bei Zugabe von 2,4 mM DPPC-Vesikel. Es besteht eine Tendenz zur geringeren CF-Freisetzung bei 37 °C und steigender Vesikelmenge (2,4 mM: 4,2 %, 3,2 mM: 1,2 %, 4,0 mM: 1,1 %).

## 4.7 Lagerstabilität der Liposomen

DPPG<sub>2</sub>-TSL wurden mit und ohne eingeschlossenes Doxorubicin bei 4 °C für bis zu 12 Wochen gelagert und die Lipidverhältnisse anschließend mittels DC untersucht. Lysolipide sind initial nicht in die liposomale Membran integriert gewesen (s. Tabelle 4.4). In den vierwöchentlich durchgeführten Dünnschichtchromatographien zeigten sich insgesamt keine wesentlichen Änderungen in der Membranzusammensetzung von DPPG<sub>2</sub>-TSL. Nach 12 Wochen Lagerung findet sich erstmalig ein sehr geringer Anteil an Lysolipiden in der Lipidauftrennung der 200 mM und 240 mM Liposomen mit Doxorubicin. Des Weiteren fällt eine Verschiebung von DPPC/DSPC in Richtung des DPPG<sub>2</sub>-Anteils der 160 mM und 200 mM Liposomen auf. Auf Grund der gemeinsamen Abbildung von DPPC und DSPC ist keine Differenzierung zwischen dem Gehalt dieser Phospholipide möglich.

Molarität [mmol/l]	DPPC/DSPC [%]	DPPG <sub>2</sub> [%]	Lysolipide [%]
160	75,7±10,7	24,3±10,7	0,0±0
200	74,5±10,5	25,6±10,5	0,0±0
240	70,7±6,6	29,4± 6,7	0,0±0

**Tabelle 4.4:** Lipidverhältnisse DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) mit eingeschlossenem Dox nach der Herstellung. Die Lipidanteile wurden mittels DC bestimmt und zeigen gute Ergebnisse bzgl. der gewünschten Lipidkonzentrationen. Es finden sich keine Lysolipide.

Molarität [mmol/l]	DPPC/DSPC [%]	DPPG <sub>2</sub> [%]	Lysolipide [%]
160	72,5±5,7	27,5±5,7	0,0±0,0
200	70,3±6,5	29,4±6,2	0,3±0,4
240	70,9±5,9	28,7±5,5	0,3±0,4

**Tabelle 4.5:** Lipidverhältnisse von DPPG<sub>2</sub>-Liposomen (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) mit eingeschlossenem Dox nach 12 Wochen Lagerung bei 4 °C. Die Lipidauftrennung der aufgelösten liposomalen Membran erfolgte mittels DC. In den Chargen mit 160 mM und 200 mM Ammoniumsulfatpuffer pH 5,4 in der initialen Herstellung findet sich eine Verschiebung der Anteile in Richtung DPPG<sub>2</sub>. Außerdem wurden erstmalig Lysolipide der 200 mM und 240 mM TSL detektiert.

Molarität [mmol/l]	DPPC/DSPC [%]	DPPG <sub>2</sub> [%]	Lysolipide [%]
160	71,7±6,0	28,3±6,0	0,0±0,0
200	72,4±5,5	27,7±5,5	0,0±0,0
240	k.D.v.	k.D.v.	k.D.v.

**Tabelle 4.6:** Lipidverhältnisse der DPPG<sub>2</sub>-TSL (DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)) mit eingeschlossenem Ammoniumsulfatpuffer pH 5,4 nach mindestens 12 Wochen Lagerung bei 4 °C. Die Lipidkomposition zeigt sich ähnlich zu der initial gewünschten Lipidzusammensetzung. k.D.v. = keine Daten vorhanden.



# Kapitel 5

## Diskussion

*Einige Aspekte dieser Diskussion sind im Rahmen der Publikation [32] veröffentlicht.*

### 5.1 Freisetzungverhalten DPPG<sub>2</sub>-TSL mit eingeschlossenem Carboxyfluorescein und Doxorubicin

DPPG<sub>2</sub>-TSL weisen unterschiedliche CF-Freisetzungverhalten je nach dem Umgebungsmedium (NaCl 0,9 % und FCS, s. Abbildung 4.3) und dem eingeschlossenem Wirkstoff auf (s. Abbildung 4.5). Doxorubin wird bei Erreichen mild hyperthermer Temperaturen stärker freigesetzt als CF, z.B. werden bei 41 °C innerhalb von 5 Minuten 88,2±11,7 % Dox, aber nur 32,9±1,2 % CF freigesetzt (vgl. Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). Für beide Formulierungen bleibt die Freisetzung nach Erreichen der Phasenübergangstemperatur und weiterer Steigerung der Temperatur stabil bzw. fällt langsam ab (vgl. Abbildung 4.3), was durch einen initial maximalen Ausstrom des eingeschlossenen Farbstoffes und anschließend einer langsameren Verteilung entsprechend dem Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extraliposomaler Verteilung des Dox bzw. CF erklärt werden kann. Die Wirkstofffreisetzung von CF und Dox erfolgt bei Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur als „burst release“ und wird für Dox durch den Zusammenbruch des pH-Gradienten zusätzlich verstärkt [67, 68].

Außerdem interagiert Dox mit Phospholipiden, wodurch die Membranstabilität herabgesetzt und eine Absenkung der Phasenumwandlungstemperatur bewirkt werden kann [69, 70]. Unterschiede in der molaren Masse, Ladung, Hydrophilie, Einschlussmethode und intraliposomalen Konzentration spielen des Weiteren eine Rolle in der liposomalen Freisetzung und können die Membranstabilität verschlechtern [71], wodurch Differenzen in der Freisetzung erklärt werden können [4, 72]. Allgemeingefasst entsteht die erhöhte Wirkstofffreisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL mit steigender Temperatur durch zunehmende Fluidität der Liposomenmembran und der Ausbildung sog. grain boundaries im Bereich der  $T_m$  [7],

wodurch sich kleine Wellen bzw. Brüche in der Lipidanordnung an den Phasengrenzen innerhalb der Membran ergeben [73], sowie durch Wechselwirkungen mit Serumbestandteilen [32] (s. Kapitel 5.2).

Positiv zu werten ist, dass die hier getesteten DPPG<sub>2</sub>-TSL-Formulierungen bei 37 °C nur geringe Farbstofffreisetzungen (CF: 1,3±0,1 %; Dox: 4,7±5,9 %) und bei Erreichen mild hyperthermer Werte eine rasche Zunahme der Freisetzung aufweisen (vgl. Kapitel 4.2.1, 4.2.2). Auch nach Inkubationen für bis zu 24 Stunden bei Körpertemperatur zeigen DPPG<sub>2</sub>-TSL geringe CF-Freisetzungen auf (max. 56,2±0,1 %, vgl. Abbildung 4.8), sodass potenziell eine gute Stabilität bei Körpertemperatur mit geringer Wirkstofffreisetzung während der Zirkulation im Blutkreislauf in nicht erwärmten Arealen möglich erscheinen. Hierdurch wird das Potenzial von DPPG<sub>2</sub>-TSL als möglichen gezielten Wirkstoffträger unterstrichen.

## 5.2 Einfluss von Serumbestandteilen auf das Freisetzungsverhalten von DPPG<sub>2</sub>-TSL

Die klinische Anwendung von Liposomen als Wirkstoffträger ist u.a. an einen Einsatz im Vollblut gebunden. Für die präklinische Evaluation *in vitro* eignet sich FCS als anerkannter Ersatz für Vollblut. Zu bedenken ist, dass in Serum die Gerinnungsfaktoren nicht mehr und z.B. Kalzium in verringerter Menge vertreten sind. Außerdem bestehen Unterschiede zwischen FCS und Humanserum, z.B. bzgl. des pH-Werts (FCS pH 7,28 vs. Humanserum pH-Wert 7,37-7,45) und des Proteingehalts (FCS 3,6 g/100 ml vs. Humanserum 6,6-8,3 g/100 ml, vgl. Tabelle 1.1). FCS bietet sich auf Grund der Verfügbarkeit gut für *in vitro* Versuche an und gibt Hinweise auf das Verhalten von TSL in Serum. Es kann jedoch nicht direkt auf das Verhalten *in vivo* geschlossen werden. Da Serum die Membranstabilität und das temperaturabhängige Freisetzungsverhalten von TSL im Vergleich zur Inkubation in 0,9 % NaCl (vgl. Abbildung 4.3) verändert [10, 29, 30, 38], ist der Einfluss einzelner Serumkomponenten genauer zu beleuchten.

Dox-beladene TSL setzen das Doxorubicin schneller in Serum als in Puffer bei Erreichen der Phasenübergangstemperatur frei (vgl. Kapitel 4.2.2.1), sodass ein destabilisierender Effekt der Serumkomponenten auf die TSL-Membran vorliegen muss. Die Inkubation von TSL in Gegenwart von ausschließlich niedermolekularen Serumbestandteilen zeigte ein ähnliches Freisetzungsprofil der Liposomen wie bei der Inkubation in 0,9 % NaCl, sodass der Fokus für die weiteren Untersuchungen auf hochmolekulare Komponenten gelegt werden konnte (s. Kapitel 4.4, Abbildung 4.12). Als wesentliche Komponenten der hochmolekularen Serumbestandteile wurde der Einfluss von Proteinen, Cholesterin und Lipidvesikel auf die Freisetzung untersucht. Da Proteine mit TSL-Membranen interagieren können [3, 7, 32, 38, 74], wurden der Einfluss von den im Serum häufigsten Proteinen

Albumin und Immunglobulinen (s. Tabelle 1.1) genauer untersucht. Der Anteil von lipophilen Serumkomponenten, z.B. Cholesterin beträgt 38 mg/100 ml in FCS und bis zu 200 mg/100 ml in Humanserum (s. Tabelle 1.1). Cholesterin und z.B. Lipidtransportmoleküle können durch ihre Lipophilie ebenfalls leicht mit TSL-Membranen in Wechselwirkungen treten [38, 75, 76], sodass auch deren Einfluss beleuchtet wurde.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit die Wechselwirkungen von TSL-Membranen mit verschiedenen Serumbestandteilen quantifiziert, was die Klassifizierung der Serumbestandteile nach ihrem Einfluss auf das Freisetzungsverhalten ermöglichte. Geringe Wechselwirkungen und damit leicht stabilisierende oder destabilisierende Effekte von niedermolekularen Serumkomponenten wurden hier nicht evaluiert. Da die Wechselwirkungen der TSL-Membranen mit den Serumbestandteilen jeweils separat untersucht wurden, können Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Serumkomponenten nicht ausgeschlossen werden und bieten einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Experimente.

### 5.2.1 Einfluss von Albumin auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

Albumin bildet gemeinsam mit Immunglobulinen den größten Proteinanteil in humanem Serum (Albumin ca. 4 g/100 ml, IgG ca. 1 g/100 ml, vgl. Tabelle 1.1). Für beide Serumkomponenten sind Interaktionen mit liposomalen Membranen und Lipiden bekannt [3, 34, 38, 40].

Insbesondere Albumin beeinflusst z.B. die Halbwertszeit von Wirkstoffen mit hoher Plasmaproteinbindung (z.B. Levemir, orale Antikoagulantien [77]). Außerdem können Pharmazeutika exogen an Albumin gebunden und dadurch in ihrer Toxizität reduziert bzw. in ihrer in vivo-Stabilität erhöht werden [14, 37, 78].

Auch die liposomale Freisetzung von eingeschlossenen hydrophilen Substanzen wird unter Zugabe von Albumin bei Inkubationen unter Körpertemperatur reduziert und im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur verstärkt (vgl. Abbildung 4.13). Hierdurch erscheint ein stabilisierender bzw. schützender Effekt von Albumin auf DPPG<sub>2</sub>-TSL-Membranen in der soliden Gelphase und ein destabilisierender Effekt bei der Phasenumwandlung hin zur frühkristallinen Phase naheliegend. Solange die Lipide in ihrer Anordnung fest gepackt sind, kann Albumin auf Grund seiner Größe und Struktur vermutlich nicht ausreichend in die Membran eindringen, um eine Destabilisierung zu bewirken. Bei Erreichen der Phasenumwandlungstemperatur werden die Lipide innerhalb der liposomalen Membran zunehmend beweglich und es kommt zur Ausbildung von sog. grain boundaries [73]. Hierdurch kann Albumin leichter mit der Membran interagieren und ihre Stabilität zusätzlich stören [38, 63], was die deutliche Zunahme der Freisetzung mit zunehmender Albuminmenge erklären kann. Bei Inkubationen über eine Stunde nimmt die CF-Freisetzung hingegen mit zunehmendem Albumingehalt ab, sodass in Anbetracht der dreidimensionalen, großflächigen Struktur von Albuminmolekülen eine Anlagerung und ein

Schutz der Membran möglich erscheinen. Da dies auch unter Zugabe von 40 g/l Albumin, also entsprechend dem physiologischen Albumingehalt im Humanserum, passiert, kann Albumin die langanhaltende Stabilität der TSL bei 37 °C (vgl. Abb. 4.8) unterstützen. Da die CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL nach Zugabe von bis zu 100 g/l Albumin (entspricht dem fünffachen des Albumingehalts in FCS) bei Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur geringer als in FCS ist (vgl. Kapitel 4.4.1), kann Albumin jedoch nicht der einzige einflussreiche Faktor sein.

### 5.2.2 Einfluss von Immunglobulinen auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

Immunglobuline weisen durch ihre Struktur zahlreiche Interaktionsmöglichkeiten mit Serumbestandteilen und Antigenen, z.B. von Fremdstrukturen auf. Der Kontakt zu Lipiden passiert vor allem durch Bindung der Fc-Domäne [40,42] der Immunglobuline an die liposomale Membran [42]. Bereits geringe Mengen IgG, welche unterhalb des physiologischen  $\gamma$ -Globulingehalts im Humanserum liegen, schränken die Membranstabilität der TSL stark ein und führen zu einer starken Freisetzung bereits vor der Phasenumwandlungstemperatur (vgl. Kapitel 4.4.2). Die CF-Freisetzung in FCS ist allerdings geringer als in IgG-Lösungen mit vergleichbaren IgG-Konzentrationen (vgl. Abbildung 4.3 und 4.14). Im Serum könnten IgG mit anderen Molekülen interagieren, wodurch die effektive IgG Konzentration geringer würde. Alternativ könnten die Liposomen durch andere Serumbestandteile, wie z.B. Albumin, geschützt werden. IgG können somit als eindeutig stark destabilisierende Faktoren für TSL-Membranen betrachtet werden, haben im Serum jedoch einen geringeren Einfluss als in reinen IgG-Lösungen.

### 5.2.3 Einfluss von Lipidvesikeln auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL

Durch die intravasale Liposomenapplikation ist der Kontakt zu weiteren Biomembranen und Lipiden, v.a. gebunden an Transportmoleküle, anzunehmen und der Austausch einzelner Lipide möglich. Durch den Austausch kann es zu einer Störung der Membranintegrität und folglich -stabilität kommen [45,46,76]. Zur Evaluation des Einflusses von Lipidvesikeln auf die DPPG<sub>2</sub>-TSL wurden Vesikel aus reinem DPPC und DPPC/Chol hergestellt und die Temperaturprofile der TSL bestimmt. In den hier durchgeführten Versuchen bewirken reine DPPC-Vesikel allerdings keine erhöhte CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL nach 5 Minuten (maximal  $\sim 5\%$ , s. Abbildung 4.18). Kapitel 4.4.3 zeigt aber eine Zunahme der CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL nach Zugabe von DPPC/Cholesterin-haltigen Vesikeln (z.B. DPPC/Chol 1,6 mM:  $45,5 \pm 2,9\%$  bei 43 °C, 5 Minuten). Auch nach längerer Inkubation mit reinen DPPC-Vesikeln bei 42 °C ist die Freisetzung relativ gering (max. ca. 25 %, vgl. Abbildung 4.19), während unter DPPC/Chol-Vesikeln über 85 % des eingeschlos-

senen CF entweichen (vg. Abbildung 4.16). Somit interagieren nur DPPC/Chol-haltige Vesikel mit DPPG<sub>2</sub>-TSL, wodurch eine Störung der Membranintegrität und eine Zunahme der CF-Freisetzung entstehen. Möglich ist, dass hierfür v.a. Cholesterin verantwortlich ist, da es ein kleineres Molekül als DPPC ist und leichter zwischen Lipidmembranen migrieren kann [45]. Sowohl Cholesterin als auch DPPC sind in Wasser kaum löslich, sodass der Austausch vor allem durch direkten Membrankontakt erklärt werden kann. Da die DPPC- und DPPC/Chol-Vesikel im Rahmen dieser Versuche nicht extrudiert wurden, liegen durch die unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen auch unterschiedliche Größenverteilungen und damit Kontaktflächen der Vesikel vor. Durchschnittlich sind die DPPC-Vesikel mit 7430 nm um 3000 nm größer als die DPPC/Chol-Vesikel (4282 nm) und die Größenverteilung der DPPC-Vesikel ist stärker gestreut (vgl. Tabelle 4.3). Allerdings ergeben sich durch die Größenunterschiede unterschiedlich stark gekrümmte Vesikelmembranen. Mit abnehmendem Vesikeldurchmesser und folglich einer stärkeren Membrankrümmung steht die Membran unter zunehmender Spannung, sodass einzelne Lipide leichter entweichen können und somit der leichtere Austausch erklärt werden könnte [10, 32].

Da die hier verwendeten Lipidkonzentrationen unterhalb der physiologischen Normwerte liegen, ist eine direkte Übertragung auf den in vivo-Einfluss von Lipiden bzw. Lipoproteinen leider nicht möglich. Die durchgeführten Experimente deuten jedoch auf eine Interaktion von DPPG<sub>2</sub>-TSL insbesondere mit Cholesterin hin, wodurch Cholesterin als ein destabilisierender Serumbestandteil für DPPG<sub>2</sub>-TSL angesehen werden kann. Weitere Versuche, z.B. mit DPPC und DPPC/Chol-Vesikeln gleicher Größe, sowie Experimente zum Cholesterinaustausch zwischen DPPG<sub>2</sub>-TSL und Lipidvesikeln, sind in Zukunft nötig um den Einfluss von Lipidvesikeln auf das Freisetzungsverhalten von TSL genauer zu beleuchten.

		Freisetzung
Niedermolekulare Serumbestandteile		kein Einfluss
Albumin	Reduktion unter $T_m$ / Verstärkung über $T_m$	Verstärkung
Immunglobuline		
DPPC-Vesikel		kein Einfluss
DPPC/Cholesterin-Vesikel		Verstärkung

**Tabelle 5.1:** *Einfluss verschiedener Serumkomponenten auf die CF-Freisetzung von DPPG<sub>2</sub>-TSL.*

#### 5.2.4 Künstliches Serum

Um die Ergebnisse zum Freisetzungsverhalten von TSL von in vitro Experimenten auf die Anwendung zum Drug Targeting in vivo übertragen zu können, sollten die in vitro Versuchsbedingungen möglichst ähnlich zu den in vivo Bedingungen sein, bzw. das in vivo Freisetzungsverhalten widerspiegeln. FCS bietet sich als in vivo Analogon an, vari-

iert allerdings stark zwischen verschiedenen Chargen. Basierend auf den hier untersuchten Serumbestandteilen wurde eruiert, ob künstliche Seren mit definierten Bestandteilen hergestellt (vgl. Tabelle 3.2) und dadurch die Chargenunterschiede minimiert werden können. Das künstliche Serum reproduziert die temperaturabhängige Form der CF-Freisetzung im Vergleich mit FCS, wobei die absolute Freisetzung bei hohen Temperaturen niedriger als in FCS ausfällt (z.B. 43 °C künstliches Serum:  $54 \pm 0,9$  %; FCS:  $66,9 \pm 0$  %, vgl. Abbildung 4.21). Das künstliche Humanserum bewirkt eine geringere CF-Freisetzung, was durch die Abnahme des IgG-Gehalts bei gleicher Albumin- und Lipidvesikelmenge erklärt werden kann (vgl. Tabelle 3.2). Im künstlichen FCS sind IgG und Albumin am wenigsten vertreten und die Freisetzung folglich am geringsten (max.  $12,2 \pm 0,1$  %). Hieraus ergibt sich, dass in fetalem Kälberserum andere Bestandteile auch in niedrigenden Mengen für die Destabilisierung von TSL mitverantwortlich sind.

Für die hier verwendeten künstlichen Seren wurden lediglich die wichtigsten hochmolekularen Serumbestandteile verwendet. Die Eigenschaften der künstlichen Seren könnten durch Verwendung von weiteren Serumsbestandteilen noch verbessert werden. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse den Einfluss der getesteten Serumbestandteile auf die Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL und die Aussicht auf ein standardisiertes Inkubationsmedium. Die Experimente mit einzelnen Komponenten geben Hinweise auf die Größe und den Einfluss der Interaktionen mit der liposomalen Membran (vgl. Abbildung 4.21, Tabelle 5.1), die bestehenden Wechselwirkungen sind hiermit jedoch nicht abgebildet.

### 5.3 Einfluss von Cholesterineinbau in die TSL-Membran

Cholesterin ist ein natürlich vorkommendes Membranlipid und Forschungsgegenstand bzgl. seines Einflusses auf die Stabilität von Lipidmembranen. Der Cholesterineinbau reduziert die Membranfluidität, bewirkt eine dichtere Lipidanordnung und Reduktion kleinerer Lücken in der Membran [3, 46, 79] und verändert dadurch die Phasenumwandlungstemperatur sowie die Membranstabilität der TSL [80].

Die Phasenumwandlungstemperatur von TSL wird ab einem Anteil von 30 mol% Cholesterin unterdrückt [44, 81], was durch Zunahme der Rigidität und Stabilität der Membran erklärt werden kann [3, 46]. Dies stimmt mit den hier gewonnenen Ergebnissen (Kapitel 4.3) für Inkubationen in FCS und 0,9 % NaCl überein.

Bei geringem Cholesterineinbau (10 – 20 mol%) zeigt sich in FCS und 0,9 % NaCl eine temperaturabhängige CF-Freisetzung. In FCS setzen 20 mol%-Chol-TSL sowohl nach 5-minütigen Inkubationen als auch nach 1 Stunde bei bis 42 °C weniger CF frei als 10 mol%-Chol-TSL. Bei weiterer Erwärmung nimmt die Freisetzung für 10 mol%-Chol-TSL zu, wodurch diese Formulierung stabiler bei geringer Temperatur und eine hohe Freisetzung ab 43 °C aufweist (vgl. Abbildung 4.9). Auch nach Inkubationen für 1 Stunde setzen

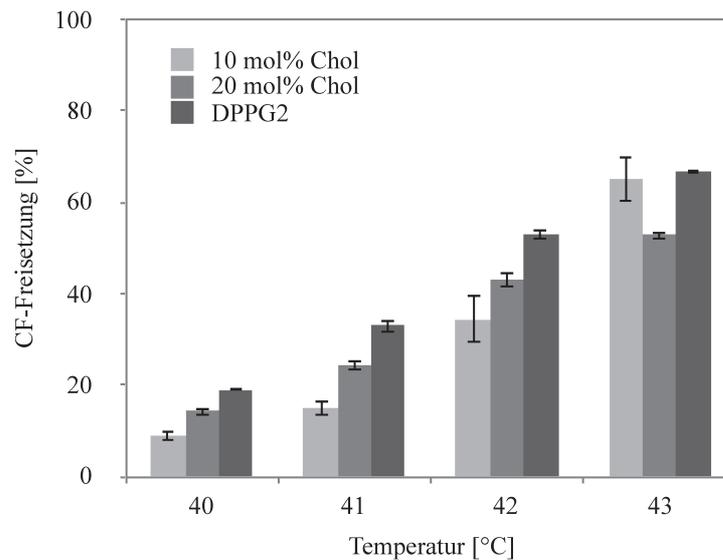
10 mol%-Chol-TSL weniger CF als 20 mol%-Chol-TSL bei 37 °C frei und erreichen höhere CF-Freisetzen bei Inkubationen bei 42 °C. 30 mol%-Chol-TSL setzen durchgängig < 3 % des CF frei, sodass diese Formulierung nicht mehr temperatursensitiv ist (vgl. Abbildung 4.9).

In 0,9 % NaCl setzen sowohl 10 mol%- als auch 30 mol%-Chol-TSL nach 5-minütigen Inkubationen zwischen 37-45 °C nur wenig CF frei (< 10 %, vgl. Abb. 4.11). 20 mol%-Chol-TSL hingegen setzen bis zu 55 % des CFs bei 40 °C frei. Bei 37 °C stellt sich sowohl nach 5 Minuten sowie nach 1 Stunde eine Abnahme der CF-Freisetzung mit steigendem Cholesteringehalt der TSL-Membran dar (vgl. Abbildung 4.11 c und d). Bei Erwärmen auf über 41 °C wird deutlich, dass 20 mol%-Chol-TSL insgesamt wesentlich mehr CF als die 10 mol%- und 30 mol%-Chol-TSL-Formulierungen freisetzen. Somit liegt keine lineare Zunahme der Membranstabilität im Bereich des Phasentübergangs der Membranen mit zunehmendem Cholesteringehalt bei DPPG<sub>2</sub>-Chol-TSL vor.

Im direkten Vergleich der CF-Freisetzen bei mild hyperthermen Temperaturen und 5-minütigen Inkubationen in FCS sind DPPG<sub>2</sub>-TSL auf Grund der höheren Freisetzung den 10 mol%- und 20 mol%-Chol-TSL überlegen (s. Abbildung 5.1). Bei längeren Inkubationen für bis zu 24 Stunden bei Körpertemperatur in FCS ergibt sich für 10 mol%-Chol-TSL ein ähnliches Freisetzungsprofil zu DPPG<sub>2</sub>-TSL mit langsam zunehmender Freisetzung bei längerer Inkubationsdauer (vgl. Abbildung 4.10). 20 mol%-Chol-TSL weisen eine viel stärkere CF-Freisetzung auf, während 30 mol%-Chol-TSL keinen CF-Ausstrom aufweisen. Somit zeigen DPPG<sub>2</sub>-TSL einen Vorteil bzgl. rascher Freisetzung in erwärmten Arealen, während 10 mol%-Chol-TSL eine etwas stärkere Membranstabilität bei Inkubationen bei Körpertemperatur für bis zu 18 Stunden aufweisen (s. Abbildung 4.10) und somit ebenfalls für einen möglichen klinischen Einsatz evaluiert werden könnten. Es bleibt zu bedenken, dass Cholesterinmoleküle während der Gefäßzirkulation in die TSL-Membran immigrieren können (vgl. Kapitel 5.2.3). Hierdurch kann es zu einem zunehmenden Cholesterinanteil und dadurch zu einer Änderungen der Membranstabilität intravasal kommen. Die hier gewonnen Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch Cholesterinzugabe und Beimengungen bis zu 10 mol% Cholesterinanteil die DPPG<sub>2</sub>-TSL ihre Temperatursensitivität erhalten und eine etwas bessere Stabilität bei 37 °C erreichen (vgl. Abb 4.9, 4.10).

Welche Cholesterinbeimengung  $\leq$  20 mol% in DPPG<sub>2</sub>-TSL zu einer dichteren Membran und bei weiterer Steigerung ggf. zu neuen Membranunregelmäßigkeiten und Poren führen, kann aus diesen Versuchen nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Forschung.

Für pegylierte Liposomen kann ein geringer Cholesterinanteil der TSL-Membran auch von Vorteil sein, da trotz Pegylierung und Abschirmen der TSL vor Opsonisierung anschließend ein leichteres Verschmelzen mit Tumorzellen möglich ist [3]. Da der Cholesterinanteil in der liposomalen Membran großen Einfluss auf das temperaturabhängige Verhal-



**Abbildung 5.1:** *CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>-TSL und DPPG<sub>2</sub>-TSL mit Cholesteranteil bei leicht hyperthermen Temperaturen von 40 bis 43 °C in FCS. Die Freisetzung steigt mit höherer Temperatur an, ist für Chol-TSL jedoch geringer als für Standard-DPPG<sub>2</sub>-TSL.*

ten und die Membranstabilität der TSL hat sowie die Interaktionen mit Serumproteinen verändert [45, 82, 83] sind weitere Versuche zur genaueren Evaluation des DPPG<sub>2</sub>-TSL mit Cholesteranteil und Einfluss z.B. von Albumin und Immunglobulinen in Zukunft notwendig.

## 5.4 Einfluss von PEG2000-Einbau in die TSL-Membran

Pegylierte Liposomen weisen einen Schutz vor dem natürlichen Abbau durch das RES-System des Körpers auf [84–86], wodurch eine längere Zirkulationsdauer der Liposomen erreicht wird. Dies führt einerseits zu einer höheren Akumulation der Liposomen im Tumorgewebe [3], andererseits werden pegylierte Liposomen durch die herausragenden Ketten weniger leicht in die Tumorzellen aufgenommen [87].

Die Einbindung von hydrophilem PEG2000 in eine TSL-Membran führt zu einer Verschiebung des Zeta-Potenzials der Liposomen aus dem negativen in den positiven Bereich (vgl. Tabelle 4.1).

Herausragende hydrophile PEG2000-Ketten können TSL räumlich abschirmen, sodass Interaktionen von TSL mit hochmolekularen Serumbestandteilen reduziert werden. Kapitel 4.6.2 bestätigt eine deutlich reduzierte CF-Freisetzung aus PEG2000-TSL im Vergleich zu DPPG<sub>2</sub>-TSL nach Zugabe von IgG bei Körpertemperatur und hyperthermen Temperaturen für 5 Minuten (PEG2000-TSL max.  $10,3 \pm 4,3$  %; DPPG<sub>2</sub>-TSL vollständige Freisetzung, s. Abbildung 4.24). Nach 1 Stunde unter 42 °C steigt die Freisetzung, sodass man

von einer zunehmenden Interaktion der Serumbestandteile mit PEG2000-haltigen Membranen bei zunehmender Fluidität der Membran ausgehen kann. Der Einfluss von IgG auf die Freisetzung aus PEG2000-TSL geringer als DPPG<sub>2</sub>-TSL. Bei Zugabe DPPC/Chol-Vesikel ist eine Zunahme der Freisetzung ähnlich der DPPG<sub>2</sub>-TSL ersichtlich, sodass die Pegylierung - wie erwartet - keinen schützenden Effekt vor lipophilen Serumkomponenten bietet und von einem Cholesterinaustausch zwischen den PEG2000-TSL und DPPC/Chol-Vesikel auszugehen ist.

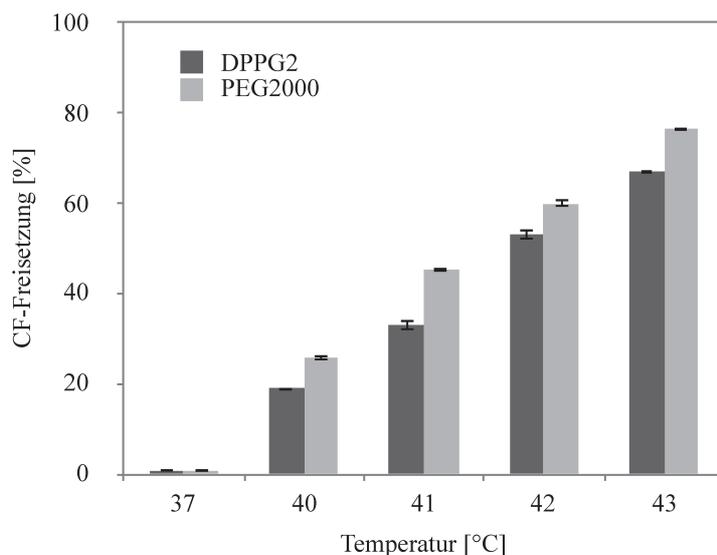
Hervorzuheben ist auch hier der zweiseitige Effekt von Albumin. Bei Körpertemperatur zeigt sich ein schützender Albumineffekt auf PEG2000-TSL, da auch hier die CF-Freisetzung mit steigendem Albumingehalt abnimmt (60 g/l, 37 °C: 38,0±1,0 %; 42 °C: 12,5±2,0 %, s. Abbildung 4.23 b). Obwohl die Phasenumwandlungstemperatur der hergestellten PEG2000-TSL höher ist als die der DPPG<sub>2</sub>-TSL (43,8 °C vs. 42,6 °C, vgl. Tabelle 4.1) und die Interaktion mit Serumbestandteilen durch die Pegylierung als geringer anzunehmen ist, ist ihre CF-Freisetzung nach 5-minütiger Inkubation in FCS bei 40 °C bis 43 °C höher als aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (z.B. 41 °C, DPPG<sub>2</sub>-TSL: 32,9±1,2 %; PEG2000: 45,1±0,5 %, s. Abbildung 5.2). In 0,9 % NaCl zeigen sich hingegen keine wesentlichen Unterschiede in der Freisetzung zwischen den zwei TSL-Formulierungen (PEG2000 max. 8,3±1,1 %; DPPG<sub>2</sub> max. 6,3 %, vgl. Abbildung 4.7 und 4.22).

Bei hyperthermer Inkubation *in vitro* über eine Stunde ist die Freisetzung aus PEG2000-TSL > 30% geringer als aus DPPG<sub>2</sub>-TSL (s. Abbildung 5.1), was durch die Pegylierung erklärt werden kann. Somit spielen für die verlängerte *in vivo*-Zirkulationsdauer pegylierter Liposomen nicht nur das Vermeiden der Aufnahme durch das RES, sondern auch die Serumwechselwirkungen eine wesentliche Rolle. Zum Vergleich der *in vivo*-Zirkulationsdauer von DPPG<sub>2</sub>-TSL und pegylierten DPPG<sub>2</sub>-TSL sind jedoch weitere tierexperimentelle Versuche notwendig.

## 5.5 Lagerstabilität

Der Schwerpunkt im Rahmen der Evaluation eines möglichen klinischen Einsatzes der TSL liegt v.a. auf einer raschen Freisetzung bei mild hyperthermer Umgebungstemperatur und einer guten Stabilität während der Zirkulation im Blutkreislauf bei Körpertemperatur. Für den täglichen klinischen Gebrauch ist die Lagerstabilität der Wirkstoffe nach Herstellung ebenfalls von praktischer Bedeutung. Gefordert werden stabile TSL ohne wesentliches Entweichen des eingeschlossenen Wirkstoffs und mit genauer Charakterisierung der entstehenden Abbau- und Zersetzungsmoleküle während der Herstellung, Lagerung und intravenöser Anwendung [88, 89], sodass die Lagerstabilität Dox-beladener DPPG<sub>2</sub>-TSL untersucht wurde.

DPPG<sub>2</sub>-TSL, welche über das Remoate-Loading-Verfahren mit Doxorubicin beladen



**Abbildung 5.2:** *CF-Freisetzung aus DPPG<sub>2</sub>- und PEG2000-DPPG<sub>2</sub>-TSL nach 5-minütigen Inkubationen in FCS. Beide Formulierungen setzen nur geringe Mengen CF bei Körpertemperatur frei. Bei mild hyperthermen Temperaturen setzen PEG2000-TSL durchgehend etwas mehr CF frei als DPPG<sub>2</sub>-TSL.*

wurden, zeigen nach Lagerung bei 4 °C nur geringe Änderungen der Lipidzusammensetzung in der DC (vgl. Kapitel 4.7). Es finden sich nur minimale Mengen von Lysolipiden (max.  $0,3 \pm 0,4$  %) und eine Zunahme des DPPG<sub>2</sub>-Anteils unter Abnahme des DSPC/DPPC-Anteils um jeweils  $\sim 3\%$  (s. Tabelle 4.4, Tabelle 4.5, Tabelle 4.6) nach bis zu 12 Wochen Lagerung. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das Beladungsverfahren durch einen pH-Gradienten erfolgt und im TSL-Inneren ein pH-Wert von 4,0 und 6,5 außerhalb der TSL gebildet wird. Bei Lagerung kommt es zur Hydrolyse der Lipide, welche bei pH 4,0 langsamer abläuft als bei stark sauren oder basischen pH-Werten [90], sodass hierdurch die Membranqualität erhalten bleiben sollte. In der DC zeigten sich max.  $0,3-0,4$  % Lysolipide, sodass keine gravierende Zunahme der Membranporosität zu erwarten ist und daher von einer erhaltenen Membranstabilität ausgegangen werden kann. Die temperaturinduzierte Freisetzung und somit das Freisetzungsprofil werden womöglich leicht zugunsten niedrigerer Temperaturen verschoben, da DPPG<sub>2</sub> mit 39,7 °C die niedrigste Phasenumwandlungstemperatur der verwendeten Phospholipide aufweist [91]. Durch eine Zunahme des Lysolipidanteils würde die Phasenumwandlungstemperatur ebenfalls zu niedrigeren Temperaturen verschoben werden können. Ein Herabsetzen der Phasenumwandlungstemperatur ist für DPPC/PEG2000/Lysolipid-TSL bei einer Menge von 10 mol/mol Lysolipidanteil durch Needham [25] beschrieben. Nach Lagerung der TSL für 12 Wochen bei 4 °C mit eingeschlossenem Ammoniumsulfat-Puffer (pH 5,4) ohne Doxorubicin ist ebenfalls eine Zunahme des DPPG<sub>2</sub>-Anteils zu vermerken. Lysolipide sind nicht nach-

weisbar, sodass das Auftreten von Lysolipiden durch Doxorubicin und den pH (4,0) im TSL-Inneren verursacht werden kann. Die Lagerung in HN-Puffer (pH 6,5) außerhalb der TSL bietet eine gute Option zum Erhalt der Membranqualität.

Zur genaueren Charakterisierung des TSL-Freisetzungsverhaltens und des intraliposomalen Wirkstoffgehalts nach Lagerung sind weitere Untersuchungen, insbesondere Freisetzungsprofile und die Dox-Bestimmung nach Lagerung, sinnvoll.

Zusammenfassend sprechen die gewonnenen Ergebnisse für einen zufriedenstellenden Erhalt der TSL-Membraneigenschaften bei Lagerung in HN-Puffer (pH 6,5). Bei Dox-haltigen TSL ist jedoch nach 12 Wochen mit dem Auftreten von Lysolipidanteilen zu rechnen.



## Kapitel 6

# Zusammenfassung und Ausblick

Thermosensitive Liposomen sind vielversprechende Vehikel für den zielgerichteten Wirkstofftransport z.B. im Rahmen der Malignomtherapie. In die Liposomen können Chemotherapeutika eingeschlossen und mittels milder Hyperthermie lokal freigesetzt werden. Dadurch können eine höhere Wirkstoffkonzentration im Bereich des Tumors erreicht und die systemische Wirkung wie auch das Nebenwirkungsprofil reduziert werden. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von Serumkomponenten auf das Freisetzungsverhalten und die Stabilität von DPPG<sub>2</sub>-basierenden TSL systematisch zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass hochmolekulare Serumbestandteile einen großen Einfluss auf die Freisetzung aus TSL haben, während niedermolekulare Serumbestandteile das Freisetzungsverhalten nicht beeinflussen. Albumin, welches einen großen Teil der hochmolekularen Serumbestandteile bildet, bewirkt eine reduzierte Freisetzung aus TSL bei Körpertemperatur und steigert die Freisetzung mit zunehmender Temperaturerhöhung. Hiermit unterstützt Albumin die besonderen Eigenschaften von DPPG<sub>2</sub>-TSL einer guten Stabilität bei Körpertemperatur und einer raschen Freisetzung im hyperthermen Bereich. Immunglobuline hingegen führen bei Einzelinkubation zu einer hohen Freisetzung ab 39 °C, welche die Freisetzung im Serum übersteigt. Der destabilisierende Einfluss von Immunglobulinen auf die TSL wird also im Serum wahrscheinlich durch Interaktionen mit anderen Serumbestandteilen oder TSL-stabilisierende Serumkomponenten reduziert. Auch der Kontakt zu Cholesterin bewirkt eine Steigerung der Freisetzung, was durch den leichten Wechsel von kleinen Lipidmolekülen zwischen Lipidmembranen zu erklären ist. Aussagen bezüglich des Effekts von Lipoproteinen sind im Rahmen dieser Arbeit nur begrenzt möglich, da physiologisch vorkommende Lipoproteine sehr unterschiedlicher Zusammensetzung sind und damit schwer zu rekonstituieren sind. Änderungen der Lipidzusammensetzung durch den initialen Einbau von Cholesterin in DPPG<sub>2</sub>-TSL-Membranen führen hingegen in niedrigen (10 mol% Cholesterin) und hohen Mengen (30 mol% Cholesterin) zu einer Stabilisierung der Membran, da es eine dichte Lipidanordnung und Verfestigung

der Membran bewirkt [3,46,79]. Der Einbau von PEG2000 zu DPPG<sub>2</sub>-TSL führt zu diskret höheren Freisetzungen bei mild hyperthermen Temperaturen unter Erhalt der Stabilität bei Körpertemperatur, sodass DPPG<sub>2</sub>-PEG2000-TSL ebenfalls einen erfolgsversprechenden Ansatz zur temperaturinduzierten liposomalen Freisetzung bieten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DPPG<sub>2</sub>-TSL eine gute Stabilität bei Körpertemperatur aufweisen und eine Lagerung der TSL bei 4 °C für bis zu 12 Wochen ohne relevante Änderung der Lipidzusammensetzung gewährleistet werden kann.

Zusammenfassend stellen die hier untersuchten DPPG<sub>2</sub>-TSL eine erfolgsversprechende Möglichkeit des Drug Targetings dar. Bisher wird das Freisetzungsverhalten von TSL überwiegend in FCS, welches jedoch von Charge zu Charge Unterschiede aufweist untersucht. Daher wäre ein standardisiertes Medium, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Laboren und TSL-Formulierungen zu gewährleisten, wünschenswert. Die in dieser Arbeit identifizierten Bestandteile könnten hierbei als Grundlage eines künstlichen und reproduzierbaren Serumanalogons dienen. Ein genaues Verständnis über die Auswirkungen der verschiedenen Serumbestandteile auf das Freisetzungsverhalten der TSL könnte weiterhin verwendet werden, um das Freisetzungsverhalten der TSL rational zu beeinflussen. Beispielsweise wäre eine Anpassung des Freisetzungsverhaltens, basierend auf abweichenden Serumbestandteilen, an verschiedene Organismen oder an Individuen vorstellbar.

# Publikationen

*Im Rahmen dieser Promotionstätigkeit sind folgende Publikationen entstanden:*

M. Hossann, Z. Syunyaeva, R. Schmidt, A. Zengerle, H. Eibl, R. D. Issels, and L. H. Lindner

**Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes**

*J Control Release* 162(2), (2012).

M. Hossann, T. Wang, Z. Syunyaeva, M. Wiggernhorn, A. Zengerle, R. D. Issels, M. Reiser, L. H. Lindner, and M. Peller

**Non-ionic Gd-based MRI contrast agents are optimal for encapsulation into phosphatidylglycerol-based thermosensitive liposomes**

*J Control Release* 166(1), (2013).



# Literaturverzeichnis

- [1] Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10 [Internet], 22.10.2016 2015.
- [2] E. Perez-Herrero and A. Fernandez-Medarde. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 93:52–79, 2015.
- [3] P. Yingchoncharoen, D. S. Kalinowski, and D. R. Richardson. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: What is available and what is yet to come. *Pharmacol Rev*, 68(3):701–87, 2016.
- [4] L. H. Lindner and M. Hossann. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13(1):111–23, 2010.
- [5] Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit, Caelyx, Doxorubicin-Hydrochlorid. *European Medicines Agency*, Oktober 2010.
- [6] A. A. Gabizon. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest*, 19(4):424–36, 2001.
- [7] B. Kneidl, M. Peller, G. Winter, L. H. Lindner, and M. Hossann. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int J Nanomedicine*, 9:4387–98, 2014.
- [8] X. Q. Pan, H. Wang, and R. J. Lee. Antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal doxorubicin in a KB oral carcinoma murine xenograft model. *Pharm Res*, 20(3):417–22, 2003.
- [9] Y. Guo, L. Wang, P. Lv, and P. Zhang. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer. *Oncol Lett*, 9(3):1065–1072, 2015.

- [10] M. Hossann, T. Wang, M. Wiggenhorn, R. Schmidt, A. Zengerle, G. Winter, H. Eibl, M. Peller, M. Reiser, R. D. Issels, and L. H. Lindner. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release*, 147(3):436–43, 2010.
- [11] L. Wang, D. Geng, and H. Su. Safe and efficient pH sensitive tumor targeting modified liposomes with minimal cytotoxicity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 123:395–402, 2014.
- [12] E. S. Lee, Z. Gao, and Y. H. Bae. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *J Control Release*, 132(3):164–70, 2008.
- [13] R. J. Gillies, P. A. Schornack, T. W. Secomb, and N. Raghunand. Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia*, 1(3):197–207, 1999.
- [14] Rote Liste. *Fachinformation Doxorubicinhydrochlorid Teva<sup>®</sup> 2 mg/ml, Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung*. Rote Liste Service GmbH, 2014.
- [15] E. Tahover, Y. P. Patil, and A. A. Gabizon. Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: focus on liposomes. *Anti-cancer Drugs*, 26(3):241–58, 2015.
- [16] N. Ashley and J. Poulton. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun*, 378(3):450–5, 2009.
- [17] Y. Shi, M. Moon, S. Dawood, B. McManus, and P. P. Liu. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*, 36(4):296–305, 2011.
- [18] Y. Octavia, C. G. Tocchetti, K. L. Gabrielson, S. Janssens, H. J. Crijns, and A. L. Moens. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*, 52(6):1213–25, 2012.
- [19] K. Chatterjee, J. Zhang, N. Honbo, and J. S. Karliner. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 115(2):155–62, 2010.
- [20] P. Vejpongsa and E. T. Yeh. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*, 64(9):938–45, 2014.
- [21] J. Rom, S. Bechstein, C. Domschke, M. Golatta, C. Mayer, J. Heil, J. Thum, K. Smetanay, C. Windemuth-Kieselbach, M. Wallwiener, F. Marme, F. Schuetz, C. Sohn, and A. Schneeweiss. Efficacy and toxicity profile of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with advanced breast cancer. *Anticancer Drugs*, 25(2):219–24, 2014.

- [22] A. J. Templeton, K. Ribi, C. Surber, H. Sun, S. F. Hsu Schmitz, M. Beyeler, D. Dietrich, M. Borner, A. Winkler, A. Muller, L. von Rohr, R. C. Winterhalter, C. Rochlitz, R. von Moos, K. Zaman, B. J. Thurlimann, T. Ruhstaller, and Center Swiss Group for Clinical Cancer Research Coordinating. Prevention of palmar-plantar erythrodysesthesia with an antiperspirant in breast cancer patients treated with pegylated liposomal doxorubicin (SAKK 92/08). *Breast*, 23(3):244–9, 2014.
- [23] N. Kawai, D. Kobayashi, T. Yasui, Y. Umemoto, K. Mizuno, A. Okada, K. Tozawa, T. Kobayashi, and K. Kohri. Evaluation of side effects of radiofrequency capacitive hyperthermia with magnetite on the blood vessel walls of tumor metastatic lesion surrounding the abdominal large vessels: an agar phantom study. *Vasc Cell*, 6:15, 2014.
- [24] M. B. Yatvin, J. N. Weinstein, W. H. Dennis, and R. Blumenthal. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science*, 202(4374):1290–3, 1978.
- [25] D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, and M. W. Dewhirst. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res*, 60(5):1197–201, 2000.
- [26] Celsion. A Study of ThermoDox<sup>TM</sup> in Combination With Radiofrequency Ablation (RFA) in Primary and Metastatic Tumors of the Liver. 2007.
- [27] Celsion. Phase 1/2 Study of ThermoDox With Approved Hyperthermia in Treatment of Breast Cancer Recurrence at the Chest Wall (DIGNITY). 2009.
- [28] Celsion. Phase 2 Study of ThermoDox as Adjuvant Therapy With Thermal Ablation (RFA) in Treatment of Metastatic Colorectal Cancer(mCRC) (ABLATE). 2011.
- [29] M. Hossann, M. Wiggenhorn, A. Schwerdt, K. Wachholz, N. Teichert, H. Eibl, R. D. Issels, and L. H. Lindner. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1768(10):2491–9, 2007.
- [30] M. H. Gaber, K. Hong, S. K. Huang, and D. Papahadjopoulos. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm Res*, 12(10):1407–16, 1995.
- [31] Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. 2015.
- [32] M. Hossann, Z. Syunyaeva, R. Schmidt, A. Zengerle, H. Eibl, R. D. Issels, and L. H. Lindner. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *J Control Release*, 162(2):400–6, 2012.

- [33] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, and E. Bourdon. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, 582(13):1783–7, 2008.
- [34] U. Anand and S. Mukherjee. Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12):5394–404, 2013.
- [35] K. Yamasaki, V. T. Chuang, T. Maruyama, and M. Otagiri. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12):5435–43, 2013.
- [36] Rote Liste Service GmbH Fachinfo Service. *Fachinformation ABRAXANE<sup>®</sup> 5 mg/ml*. 2015.
- [37] F. Kratz. A clinical update of using albumin as a drug vehicle - a commentary. *J Control Release*, 190:331–6, 2014.
- [38] T. Hosokawa, M. Sami, Y. Kato, and E. Hayakawa. Alteration in the temperature-dependent content release property of thermosensitive liposomes in plasma. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 51(11):1227–32, 2003.
- [39] R. Rojas and G. Apodaca. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(12):944–55, 2002.
- [40] G. Weissmann, A. Brand, and E. C. Franklin. Interaction of immunoglobulins with liposomes. *J Clin Invest*, 53(2):536–43, 1974.
- [41] X. Yan, G. L. Scherphof, and J. A. A. M. Kamps. Liposome opsonization. *J of Liposome Res*, 15(1):109–139, 2005.
- [42] J. Sabin, G. Prieto, J. M. Ruso, P. V. Messina, F. J. Salgado, M. Nogueira, M. Costas, and F. Sarmiento. Interactions between DMPC liposomes and the serum blood proteins HSA and IgG. *J Phys Chem B*, 113(6):1655–61, 2009.
- [43] L. Hosta-Rigau, Y. Zhang, B. M. Teo, A. Postma, and B. Stadler. Cholesterol—a biological compound as a building block in bionanotechnology. *Nanoscale*, 5(1):89–109, 2013.
- [44] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):112–24, 2008.
- [45] Z. Huang, M. R. Jaafari, and Jr. Szoka, F. C. Disterolphospholipids: nonexchangeable lipids and their application to liposomal drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(23):4146–9, 2009.

- [46] T. J. Yacoub, A. S. Reddy, and I. Szleifer. Structural effects and translocation of doxorubicin in a DPPC/chol bilayer: the role of cholesterol. *Biophys J*, 101(2):378–85, 2011.
- [47] R. S. Tirumalai, K. C. Chan, D. A. Prieto, H. J. Issaq, T. P. Conrads, and T. D. Veenstra. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2(10):1096–103, 2003.
- [48] L. H. Lindner, M. Angele, H. R. Durr, J. Rauch, and C. Bruns. Systemic therapy and hyperthermia for locally advanced soft tissue sarcoma. *Chirurg*, 85(5):398–403, 2014.
- [49] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, and P. M. Schlag. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3(8):487–97, 2002.
- [50] J. van der Zee. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*, 13(8):1173–84, 2002.
- [51] R. Stahl, T. Wang, L. H. Lindner, S. Abdel-Rahman, M. Santl, M. F. Reiser, and R. D. Issels. Comparison of radiological and pathohistological response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) and study of response dependence on the applied thermal parameters in patients with soft tissue sarcomas (STS). *Int J Hyperthermia*, 25(4):289–98, 2009.
- [52] R. D. Issels. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*, 44(17):2546–54, 2008.
- [53] A. Jolesch, K. Elmer, H. Bendz, R. D. Issels, and E. Noessner. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur J Cell Biol*, 91(1):48–52, 2012.
- [54] V. Milani and E. Noessner. Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol Immunother*, 55(3):312–9, 2006.
- [55] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, and H. Riess. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 43(1):33–56, 2002.
- [56] C. W. Song, A. Shakil, J. L. Osborn, and K. Iwata. Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. 1996. *Int J Hyperthermia*, 25(2):91–5, 2009.
- [57] C. W. Song, H. J. Park, C. K. Lee, and R. Griffin. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia*, 21(8):761–7, 2005.

- [58] C. D. Landon, J. Y. Park, D. Needham, and M. W. Dewhirst. Nanoscale drug delivery and hyperthermia: The materials design and preclinical and clinical testing of low temperature-sensitive liposomes used in combination with mild hyperthermia in the treatment of local cancer. *Open Nanomed J*, 3:38–64, 2011.
- [59] K. E. Wallner, M. W. DeGregorio, and G. C. Li. Hyperthermic potentiation of cis-diamminedichloroplatinum(II) cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells resistant to the drug. *Cancer Res*, 46(12 Pt 1):6242–5, 1986.
- [60] J. B. Marmor, D. Kozak, and G. M. Hahn. Effects of systemically administered bleomycin or adriamycin with local hyperthermia on primary tumor and lung metastases. *Cancer Treat Rep*, 63(8):1279–90, 1979.
- [61] J. Overgaard. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 16(3):535–49, 1989.
- [62] C. Oerlemans, R. Deckers, G. Storm, W. E. Hennink, and J. F. Nijsen. Evidence for a new mechanism behind HIFU-triggered release from liposomes. *J Control Release*, 168(3):327–33, 2013.
- [63] M. Hossann, T. Wang, Z. Syunyaeva, M. Wiggenhorn, A. Zengerle, R. D. Issels, M. Reiser, L. H. Lindner, and M. Peller. Non-ionic Gd-based MRI contrast agents are optimal for encapsulation into phosphatidylglycerol-based thermosensitive liposomes. *J Control Release*, 166(1):22–9, 2013.
- [64] A. Fritze, F. Hens, A. Kimpfler, R. Schubert, and R. Peschka-Suss. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta*, 1758(10):1633–40, 2006.
- [65] R. Schmidt. Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren: Charakterisierung in vitro und in vivo. *Dissertation*, 2011.
- [66] Celsion Corporation. Celsion corporation and mytomorrows partner to introduce thermodox<sup>®</sup> early access program in europe for patients with recurrent chest wall breast cancer. page 2, 2015.
- [67] A. V. Andriyanov, E. Koren, Y. Barenholz, and S. N. Goldberg. Therapeutic Efficacy of Combining PEGylated Liposomal Doxorubicin and Radiofrequency (RF) Ablation: Comparison between Slow-Drug-Releasing, Non-Thermosensitive and Fast-Drug-Releasing, Thermosensitive Nano-Liposomes. *PLOS ONE*, 9(5):1–12, 05 2014.
- [68] R. J. Lee, S. Wang, M. J. Turk, and P. S. Low. The Effects of pH and Intraliposomal Buffer Strength on the Rate of Liposome Content Release and Intracellular Drug Delivery. *Bioscience Reports*, 18(2):69–78, 1998.

- [69] M. M. Mady, M. W. Shafaa, E. R. Abbase, and A. H. Fahium. Interaction of doxorubicin and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Cell Biochem Biophys*, 62(3):481–486, Apr 2012.
- [70] J. K. Seydel, E. A. Coats, H. P. Cordes, and M. Wiese. Drug membrane interaction and the importance for drug transport, distribution, accumulation, efficacy and resistance. *Archiv der Pharmazie*, 327(10):601–610, 1994.
- [71] D. R. Khan, E. M. Rezler, J. Lauer-Fields, and G. B. Fields. Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability. *Chem Biol Drug Des*, 71(1):3–7, 2008.
- [72] M.-L. Briuglia, Chiara Rotella, Amber McFarlane, and Dimitrios A. Lamprou. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res*, 5(3):231–242, Jun 2015.
- [73] T. Kaasgaard, C. Leidy, J. H. Crowe, O. G. Mouritsen, and K. Jørgensen. Temperature-Controlled Structure and Kinetics of Ripple Phases in One- and Two-Component Supported Lipid Bilayers. *Biophys J*, 85(1):350–360, oct 2003.
- [74] J. Sabín, G. Prieto, J. M. Ruso, P. V. Messina, F. J. Salgado, M. Nogueira, M. Costas, and F. Sarmiento. Interactions between DMPC Liposomes and the Serum Blood Proteins HSA and IgG. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(6):1655–1661, 2009. PMID: 19159271.
- [75] M. Foradada, A. Manzano, T. Roig, J. Estelrich, and J. Bermúdez. Serum-liposome interaction is an oxygen-dependent process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1345(1):43 – 55, 1997.
- [76] J. N. Weinstein, R. D. Klausner, T. Innerarity, E. Ralston, and R. Blumenthal. Phase transition release, a new approach to the interaction of proteins with lipid vesicles application to lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 647(2):270 – 284, 1981.
- [77] R. Karow, T. und Lang-Roth. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2013*. Selbstverl. des Verf., 20. edition, 2012.
- [78] N. Nordisk. Highlights of prescribing information for LEVEMIR<sup>®</sup> (insulin detemir injection), solution for subcutaneous injection. 2015.
- [79] K. Simons and E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569–572, 06 1997.

- [80] L. H. Lindner, M. E. Eichhorn, H. Eibl, N. Teichert, M. Schmitt-Sody, R. D. Issels, and M. Dellian. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res*, 10(6):2168–2178, 2004.
- [81] T. Lian and R. J. Y. Ho. Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci*, 90(6):667–680, jul 2017.
- [82] J. Senior and G. Gregoriadis. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: The effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sciences*, 30(24):2123 – 2136, 1982.
- [83] Y. Zhang, Y. Chen, and G. Jin. PEGylated phospholipid membrane on polymer cushion and its interaction with cholesterol. *Langmuir*, 26(13):11140–11144, 2010.
- [84] D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, and C. Redemann. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(24):11460–11464, dec 1991.
- [85] M. C. Woodle. Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. *Adv Drug Deliv Rev*, 32(1):139 – 152, 1998.
- [86] M. Wang and M. Thanou. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res*, 62(2):90 – 99, 2010. Towards clinical applications of nanoscale medicines.
- [87] A. Garg, A. W. Tisdale, E. Haidari, and E. Kokkoli. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int J Pharm*, 366(1):201 – 210, 2009.
- [88] ICH, Expert Working Group. Impurities in new drug products Q3B(R2). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, June 2006.
- [89] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. *European Medicines Agency*, Feb 2013.
- [90] J. Budweiser. Hydrolyseverhalten der synthetischen Phospholipide DPPG<sub>x</sub> (x=1,2,3) im Vergleich zu DPPC in thermosensitiven Liposomen. *Ludwig-Maximilians-Universität München*, Dezember 2015.
- [91] O. Schagon. *Liposomen als potentielle Arzneistoffträger: Variation der biopharmazeutischen Eigenschaften durch 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-oligo-glycerine*. Berichte aus der Pharmazie. Shaker, 1997.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung eines Liposoms und der liposomalen Membran. . .	3
1.2	Strukturformel von Doxorubicin. . . . .	4
1.3	Schematische Darstellung einer liposomalen Membran vor und während der Phasenumwandlungstemperatur $T_m$ . . . . .	6
1.4	Strukturformeln der Lipide DPPC, DSPC und DPPG <sub>2</sub> . . . . .	7
4.1	Größenverteilung von DPPG <sub>2</sub> -TSL . . . . .	35
4.2	Zwei Kiesel-Gel-Platten nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung DPPG <sub>2</sub> -haltiger Liposomen . . . . .	36
4.3	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL in Abhängigkeit von Temperatur und In- kubationsmedium . . . . .	37
4.4	Doxorubicin-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL . . . . .	39
4.5	CF- und Dox-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL bei fünfminütigen Inkubationen in FCS bei Temperaturen von 37 °C bis 45 °C . . . . .	39
4.6	Öffnungskinetik von Dox-beladenen DPPG <sub>2</sub> -TSL in HN-Puffer pH 7,4 . . .	40
4.7	Öffnungskinetik von Dox-beladenen DPPG <sub>2</sub> -TSL in FCS . . . . .	42
4.8	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL nach Inkubationen für bis zu 24 Stunden bei 37 °C in FCS . . . . .	43
4.9	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL mit aufsteigendem Cholesterinanteil der liposomalen Membran in FCS . . . . .	44
4.10	24-Stunden Inkubation von DPPG <sub>2</sub> -TSL und Chol-DPPG <sub>2</sub> -TSL in FCS bei 37 °C . . . . .	46
4.11	CF-Freisetzung aus Chol-DPPG <sub>2</sub> -TSL nach Inkubation in 0,9 % NaCl . . .	47
4.12	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL bei Inkubation in 0,9 % NaCl, FCS oder niedermolekularen Serumbestandteilen . . . . .	48
4.13	Einfluss von Albumin auf die CF-Freisetzung aus DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> - TSL nach 5 Minuten- und 1h-Inkubationen . . . . .	50
4.14	Freisetzung von CF aus DPPG <sub>2</sub> -TSL unter Zugabe von gepoolten IgG . . .	51
4.15	1-Stunde-Inkubationen von DPPG <sub>2</sub> -TSL unter Zugabe von IgG . . . . .	52

4.16	CF-Freisetzung nach 1 Stunde Inkubationen von TSL mit DPPC/Chol- Vesikeln (55:45 mol:mol), n = 1 . . . . .	53
4.17	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL nach 5-minütigen Inkubationen zwischen 37 °C und 45 °C unter Zugabe von Lipidakzeptorvesikeln aus DPPC und Cholesterin (55:45 mol:mol), n = 1 . . . . .	54
4.18	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -haltigen TSL nach Zugabe von reinen DPPC- Lipidvesikeln und Inkubationen für jeweils fünf Minuten zwischen 37 °C und 45 °C, n = 1 . . . . .	54
4.19	CF-Freisetzung aus DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> -TSL nach 1 Stunde Inkubatio- nen bei 37 °C bzw. 42 °C nach Zugabe von DPPC-Vesikeln, n = 1 . . . . .	55
4.20	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL unter Zugabe von gepoolten IgG und Al- bumin (40 g/l) . . . . .	56
4.21	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL unter Zugabe von FCS, künstlichem FCS, künstlichem Humanserum und künstlicher Serumlösung . . . . .	57
4.22	TSL mit DSPE-PEG-2000-Anteil in der liposomalen Membran . . . . .	58
4.23	CF-Freisetzung aus DSPE-PEG2000-haltigen TSL unter Zugabe von hu- manem Albumin in ansteigender Konzentration . . . . .	59
4.24	CF-Freisetzung aus DSPE-PEG2000-TSL nach Inkubationen für 5 Minuten bei Temperaturen von 37 °C bis 45 °C und für eine Stunde bei 37 °C bzw. 42 °C unter Zugabe von IgG . . . . .	60
4.25	CF-Freisetzung aus PEG-2000-haltigen TSL nach Inkubation mit DPPC/Cho- lesterin-Vesikeln . . . . .	61
4.26	Inkubation von PEG2000-TSL mit reinen DPPC-Lipidvesikeln, n = 1 . . . . .	62
5.1	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> -TSL und DPPG <sub>2</sub> -TSL mit Cholesterinanteil bei leicht hyperthermen Temperaturen von 40 bis 43 °C in FCS . . . . .	72
5.2	CF-Freisetzung aus DPPG <sub>2</sub> - und PEG2000-DPPG <sub>2</sub> -TSL nach 5-minütigen Inkubationen in FCS . . . . .	74

# Tabellenverzeichnis

1.1	Gegenüberstellung der repräsentativen Zusammensetzung von FCS und Humanserum. . . . .	8
1.2	Immunglobulinklassen des Menschen und ihre Funktionen, Häufigkeiten und Vorkommen. . . . .	10
2.1	Tabellarische Aufführung der verwendeten Lipide . . . . .	17
2.2	Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Formulierungen . .	18
2.3	Auflistung der verwendeten Puffer und im Labor hergestellten Lösungen . .	19
2.4	Auflistung der Verbrauchsmaterialien . . . . .	20
2.5	Geräteauflistung . . . . .	21
2.6	Auflistung der verwendeten Programme und Datenbanken . . . . .	22
3.1	Verwendete Mengen an Albumin-, IgG- und Lipidakzeptorvesikellösungen zur Bestimmung der Temperaturprofile für jeweils einen Versuchsdurchgang	29
3.2	Künstlich hergestelltes FCS, Humanserum und Serum . . . . .	30
4.1	Verwendete Liposomenformulierungen und ihre Eigenschaften . . . . .	34
4.2	Berechnete Öffnungskonstanten Dox-haltiger DPPG <sub>2</sub> -TSL in FCS und HN-Puffer pH 7,4 bei Temperaturen von 37 °C bis 42 °C . . . . .	41
4.3	Eigenschaften der verwendeten Lipidvesikel . . . . .	51
4.4	Lipidverhältnisse DPPG <sub>2</sub> -TSL mit eingeschlossenem Dox nach der Herstellung . . . . .	62
4.5	Lipidverhältnisse von DPPG <sub>2</sub> -Liposomen mit eingeschlossenem Dox nach 12 Wochen Lagerung bei 4 °C . . . . .	63
4.6	Lipidverhältnisse der DPPG <sub>2</sub> -TSL mit eingeschlossenem Ammoniumsulfatpuffer pH 5,4 nach mindestens 12 Wochen Lagerung bei 4 °C . . . . .	63
5.1	Einfluss verschiedener Serumkomponenten auf die CF-Freisetzung von DPPG <sub>2</sub> -TSL . . . . .	69



# Danksagung

Herzlichen Dank an Professor Lars Lindner für die Ermöglichung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe und seine Unterstützung. Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Hossann, der mir stets mit Fachwissen, Rat und Tat sowie aufbauenden Worten zur Seite stand! Für seine herausragende Betreuung und Geduld bis zum Ende dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Frau Anja Zengerle möchte ich ebenfalls von Herzen für die Einarbeitung und Hilfe sowie die freundschaftliche Atmosphäre im Labor danken! Ebenso möchte ich mich bei meinen Mitdotorandinnen Rebecca und Simone bedanken, die immer für fachliche und persönliche Gespräche da waren.

Meinen Eltern und Brüdern sowie deren Familien gilt ganz herzlicher Dank! Ich schätze jeden Moment mit euch und weiß, dass ihr immer für mich da seid. Ebenso größten Dank an Jonas für das Korrekturlesen und seine persönliche Unterstützung immer und überall! Danke, dass Du so sehr an mich glaubst!

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden, Kollegen und Mitarbeitern des Klinikums der LMU bedanken, die mich unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



# Eidesstattliche Versicherung

Syunyaeva, Zulfiya

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## **Stabilität von Phosphatidylglycerin-basierenden thermosensitiven Liposomen und ihre Wechselwirkungen mit Serumkomponenten**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Garching bei München, 20.11.2018

Ort, Datum

Zulfiya Syunyaeva

Unterschrift Doktorandin