

Untersuchungen zur Enkapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von

Friedrich Gruber
aus München

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. G. Winter betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, 25. März 2004

.....

(Friedrich Gruber)

Dissertation eingereicht am: 25. März 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Winter

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Friess

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Mai 2004

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Winter am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Winter für sein Vertrauen bei der Übertragung der Arbeit, seine Anleitung zu selbständigem und wissenschaftlichem Denken, seine Unterstützung in allen Problemen und die Schaffung eines hervorragenden Arbeitsklimas.

Mein Dank gilt auch allen Angestellten des Lehrstuhls, Fr. Gabriele Hartl, Fr. Maria Häringer, Fr. Ingrid Hiltmann sowie Fr. Imke Leitner, auf deren Hilfe ich mich stets verlassen konnte.

Ich danke Herrn Dr. Christian Welz für die freundschaftliche und stets fruchtbare Zusammenarbeit. Von seinem großen Fachwissen habe ich in außerordentlichem Umfang profitiert.

Für die Anleitung beim Zweiten Teil der Arbeit danke ich Herrn Dr. Heinrich Haas, der in dem Versuch, mir, als armen Apotheker, thermodynamische Vorgänge nahe zu bringen, selten verzagte.

Der Fa. Munich Biotech, Neuried, danke ich für die Kooperation bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich wünsche allen Mitarbeitern viel Erfolg bei der weiteren Entwicklung „unseres“ Projekts.

An die Doktoranden des Arbeitskreises: Ich schätze mich glücklich, die Promotionszeit mit Euch verbracht zu haben, ich werde stets mit Freude an das gemeinsam Erlebte zurückdenken.

Für die gewissenhafte und scharfsinnige Durchsicht der Arbeit gilt Fr. Silke Mohl mein herzlicher Dank.

Abkürzungsverzeichnis:

∅	Durchmesser
CPT	Camptothecin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DMTAP	1,2-Dimyristoyl-3-trimethylammoniumpropan
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-Chlorid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
GT	Gefriertrocknung
HLB-Wert	Hydrophilic-Lipophilic-Balance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
mol%	Anteil der entsprechenden Komponente am Gesamtlipid (mol/mol)
MOPC	1-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin oder 1-Oleoyl-Lysolecithin
mM	millimolar bzw. Millimol pro Liter, Maß für die Lipidkonzentration
MW	Molekulargewicht
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PI	Polydispersitätsindex
RES	Retikulo-Endotheliales-System
Upm	Umdrehungen pro Minute
Z _{ave}	mittlerer intensitätsgewichteter Liposomen-Durchmesser

Teil 1:

**Formulierung und Herstellung paclitaxelhaltiger
kationischer Liposomen**

Inhaltsverzeichnis

Teil 1: Formulierung und Herstellung paclitaxelhaltiger kationischer Liposomen

I. Einleitung.....	4
1. Liposomen als Arzneistoffträger.....	4
2. Herstellung von Liposomendispersionen	9
2.1. Film-Methode und anschließende Verfahren.....	9
2.2. Ethanolinjektions-Methode	10
2.3. Weitere Herstellungsmethoden	11
2.4. Lyophilisation von Liposomendispersionen	12
3. Liposomen in der zytostatischen Therapie.....	14
4. Targeting mittels kationischen Liposomen	19
5. Paclitaxel	24
6. Paclitaxel in verschiedenen Arzneiformen	27
6.1. Orale Applikation von Paclitaxel	27
6.2. Intratumorale Applikation von Paclitaxel.....	27
6.3. Paclitaxel zur intravenösen Applikation	28
6.3.1. Verwendung von Kosolventien und Tensiden	28
6.3.2. Herstellung von parenteralen Emulsionen.....	29
6.3.3. Verwendung von Cyclodextrinen zur Löslichkeitsverbesserung.....	29
6.3.4. Kolloidale Arzneistoffträgersysteme	30
7. Zielsetzung der Arbeit.....	32
II. Experimenteller Teil.....	34
1. Materialien	34
1.1. Lipide, Lösungsmittel und Hilfsstoffe	34
1.2. Arzneistoffe.....	35
1.3. Dispersionsmedien	35
2. Methoden zur Herstellung von Liposomendispersionen	35
2.1. Herstellung der Rohdispersionen	35
2.1.1. Filmmethode	35
2.1.2. Ethanolinjektion.....	36
2.2. Entfernung des Ethanols aus den Liposomen-Dispersionen	37

2.3.	Extrusion der Rohdispersionen.....	37
2.4.	Sterilfiltration.....	39
2.5.	Lyophilisation.....	39
3.	Analytische Methoden.....	41
3.1.	HPLC-Bestimmung von Paclitaxel.....	41
3.1.1.	Reagenzien und Lösungsmittel.....	41
3.1.2.	Probenaufbereitung und Standardlösungen.....	41
3.1.3.	HPLC-Anlage.....	41
3.1.4.	Fließmittel und Gradient.....	42
3.1.5.	Parameter.....	42
3.2.	Größenbestimmung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie.....	43
3.3.	Zeta-Potential-Messung mittels PCS.....	43
3.4.	Restfeuchtebestimmung mittels Karl-Fischer-Titration.....	43
3.5.	Kristallisationsvorgänge in paclitaxelhaltigen Liposomen.....	44
3.5.1.	Lichtblockademessungen.....	44
3.5.2.	Visuelle Inspektion der Zubereitungen.....	45
III.	Ergebnisse und Diskussion.....	46
1.	Einfluss von Formulierungshilfsstoffen.....	46
1.1.	Lysolipide.....	46
1.2.	Tenside.....	55
1.2.1.	Vorversuche an DOTAP-DOPC-Liposomen.....	55
1.2.2.	Herstellung paclitaxelhaltiger Liposomen mit Tensiden.....	57
1.2.3.	Auswirkungen auf die Kurzzeitstabilität.....	58
2.	Optimierung des Herstellungsverfahrens.....	62
2.1.	Filmmethode mit Extrusion und anschließender Gefriertrocknung.....	62
2.2.	Absenken der Herstellungstemperatur.....	69
2.3.	Ethanolinjektion.....	73
2.3.1.	Variation der Lipidkonzentration in Ethanol.....	73
2.3.2.	Variation der Rührdauer nach beendeter Injektion.....	74
2.3.3.	Verwendung unterschiedlicher Rührgeräte.....	75
2.3.4.	Anwendung unterschiedlicher Injektionsverfahren.....	75
2.3.5.	Variation der Lipidkonzentrationen in Glucose.....	76
2.4.	Kombination der Ethanolinjektion mit weiteren Verfahrensschritten.....	79
2.4.1.	Rohdispersion 1: 400 mM Lipidlösung in 5%iger Glucoselösung....	79

2.4.2.	Rohdispersion 2: 200 mM Lipidlösung in 5%ige Glucoselösung	81
2.4.3.	Rohdispersion 3: 400 mM Lipidlösung in 10%ige Trehaloselösung	83
2.5.	Einfluss der Lipid-Konzentrationen und der Ansatzgröße	85
2.5.1.	Grafische Auswertung des Versuchsplanes	87
2.6.	Erhöhung der Gesamtlipidmenge in der Trehaloselösung	91
2.7.	Erhöhung der Menge an Trehalose	93
2.8.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	93
3.	Herstellung paclitaxelhaltiger Liposomen mittels Ethanolinjektion und anschließender Gefriertrocknung	95
3.1.	Kationische Liposomen mit 3 bis 7 mol% Paclitaxel	95
3.2.	Lagerstabilität von Lyophilisaten mit 5 mol% Paclitaxel	100
3.3.	In-use-Stabilität einer nicht lyophilisierten Zubereitung	103
3.4.	In-use-Stabilität von rekonstituierten Zubereitungen	106
3.4.1.	Liposomengröße und Teilchengrößenverteilung	107
3.4.2.	Paclitaxelgehalt	107
3.4.3.	Haltbarkeit der suspendierten Formulierungen	108
IV.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	112
1.	Hilfsstoffe	112
1.1.	Lysolipide	112
1.2.	Tenside	112
2.	Herstellungsverfahren	113
3.	Pharmazeutische Qualität der Zubereitungen	114
3.1.	Bewertung der analytischen Verfahren	114
3.2.	Langzeitstabilität nach Lyophilisation	115
3.3.	Stabilität nach Rekonstitution	115
3.4.	Resümee und Ausblick	116
V.	Literaturverzeichnis	117

Teil 1:

Formulierung und Herstellung paclitaxelhaltiger kationischer Liposomen

I. Einleitung

1. Liposomen als Arzneistoffträger

Seitdem Bangham 1965 [17] das Verhalten von Phospholipiden in wässrigem Milieu beobachtete, rückten die später so genannten Liposomen ins Blickfeld der Wissenschaft. Bangham nannte diese kolloidalen Vesikel zunächst noch „smektische Mesophasen“. Ihren heutigen Namen bekamen sie erst 1968 von Sessa und Weissmann, die Bezeichnung „Bangasomes“ konnte sich nicht durchsetzen [145]. Zunächst dienten sie als Modell für biologische Membranen, zum Beispiel um Wirkmechanismen von Arzneistoffen zu erforschen [18, 145], kurze Zeit später erkannte man ihren Wert als Trägersysteme für Arzneistoffe. Sessa und Weissmann enkapsulierten 1970 erstmals Lysozym in Liposomen, um ein Modell für Lysosomen, enzymtragende Zellorganellen, zu erhalten [146]. Gregoriadis schloss 1971 Amyloglucosidase in Liposomen ein, um auf diesem Wege Medikamente gegen Glykogen-Speicher-Krankheiten (Glykogenose) zu entwickeln [76]. Mit der Enkapsulierung wollte er zum einen die mögliche Immunogenität des reinen Enzyms umgehen. Er dachte aber bereits auch daran, das Enzym zu bestimmten Geweben zu dirigieren. Gregoriadis war es auch, der 1974 erstmals die Injektion von Liposomen in Menschen beschrieb. Dabei wurden sechs Tumorpatienten mit ¹³¹Iod-gelabeltem Albumin beladene Liposomen verabreicht [77].

Diese Versuche waren die Grundlage für die Entwicklung der Liposomen zu weltweit beforschten kolloidalen Arzneistoffträgern, in die große Hoffnungen gesetzt werden und deren ganzes Potential selbst heute noch nicht ausgeschöpft scheint.

Es ist möglich, hydrophile Arzneistoffe ins wässrige innere Kompartiment, sowie hydrophobe Arzneistoffe in die Lipidmembran einzuschließen und somit vielfältige theoretische Vorteile zu erlangen:

1. Liposomen können als Lösungsvermittler für lipophile, in Wasser schwerlösliche Arzneistoffe dienen.
2. Die pharmakokinetischen Parameter des enkapsulierten Arzneistoffs treten zugunsten der Eigenschaften der Liposomen selbst in den Hintergrund. Diese Eigenschaften der Liposomen beruhen natürlich in erster Linie auf ihrer Oberflächenbeschaffenheit, die heutzutage auf mannigfaltige Art und Weise modifiziert werden kann. Wie in einem späteren Kapitel näher erläutert, kann z. B. die Verweildauer eines Arzneistoffs im Körper durch Einschluss in Liposomen verlängert werden, bestimmte Körpergewebe können vermieden bzw. bevorzugt erreicht werden.
3. Der Arzneistoff kann durch die Enkapsulierung in Liposomen stabilisiert bzw. vor schädlichen Einflüssen geschützt werden. Dies gilt sowohl für die Stabilität während der Lagerung (z.B. Schutz vor Licht), als auch nach der Applikation im Körper (z.B. Schutz vor Enzymen).
4. Liposomen können als Immunoadjuvanzien die immunologische Antwort des Körpers auf Antigene verstärken. Dieses Prinzip wird in mehreren liposomalen Vakzinen verwirklicht.
5. Im Falle der dermalen Applikation eines Arzneistoffs bieten die Liposomen eine bessere Arzneistoffpenetration durch das Stratum corneum bei geringerer perkutaner Absorption. Damit verbunden ist eine höhere Arzneistoffkonzentration in der Epidermis bei geringerer systemischer Verfügbarkeit [116, 22].

In der modernen Medizin werden Liposomen v.a. eingesetzt zur Modulation des Immunsystems bzw. als Träger von Impfstoffen [169], zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten durch Enkapsulierung von Antimykotika, Virustatika, Antibiotika [168], zur Therapie genetisch fixierter Erkrankungen mittels enkapsulierter DNA bzw. RNA, z.B. Krebs [52], Mukoviszidose [55]. Aber auch zur Optimierung der Krebstherapie mittels herkömmlicher Anti-Neoplastika [56, 71, 79], sowie als Träger kontrastgebender Mittel zur Tumordiagnostik [50, 133], werden Liposomen eingesetzt.

Eine Übersicht über liposomale Arzneimittel auf dem Markt bzw. in späteren Phasen der klinischen Prüfung gibt Tabelle 1 [99].

Hersteller	Produkt	Indikation	Status
Ortho Biotech (Johnson&Johnson)	Doxil® (pegyliertes, liposomales Doxorubicin)	Ovarialkarzinom	am Markt in den USA
Essex Pharma (Schering-Plough)	Caelyx® (pegyliertes, liposomales Doxorubicin)	Kaposi-Sarkom, Ovarial-/Mamma- karzinom	am Markt in Europa
Elan	Myocet® (liposomales Doxorubicin)	Mamma-Karzinom	am Markt
Skye Pharma	DepoCyt® (liposomales Cytarabin, DepoFoam® Technologie)	Lymphozytäre Meningitis	am Markt seit 1999
Inex	Onco TCS® (liposomales Vincristin)	non-Hodgkin's Lymphom	Phase II/III
Antigenics-Inc	Aroplatin® (liposomale Platinverbindung)	Kolorektal-Krebs	Phase II
OSI Pharmaceuticals	OSI-211 (liposomales Lurtotecan)	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Phase II
Endo Pharmaceuticals	DepoMorphine® (liposomales Morphin, DepoFoam® Technologie)	Postoperative Schmerzen	FDA- Zulassung beantragt in 7/03
Gilead	DaunoXome® (liposomales Daunorubicin)	Kaposi-Sarkom	am Markt
	Ambisome® (liposomales Amphotericin B)	Systemische Pilzinfektionen	am Markt
	MiKasome® (liposomales Amikacin)	Tuberkulose	Phase II

Hersteller	Produkt	Indikation	Status
Enzon	Abelcet® (liposomales Amphotericin B)	Systemische Pilzinfektionen	am Markt
Berna Biotech	Epaxal® (viro somale Vaccine)	Hepatitis-A	am Markt
	Inflexal® V (viro somale Vaccine)	Influenza	am Markt
NeoPharm	NeoLipid®-Technologie als Vehikel für verschiedene Arzneistoffe (Irinotecan-Metabolite, c-raf ODN, Mitoxantron)		Phasen I/II
Munich Biotech	MBT-0206 (liposomales Paclitaxel)	Verschiedene solide Tumoren	Phase II
	MBT-0312 (liposomales Camptothecin)		Phase I

Tabelle 1: Liposomale Arzneimittel auf dem Markt bzw. in der Entwicklung

Auffallend ist hier die Vielzahl an Tumorthapeutika. Der große Forschungseinsatz und die aufwändige Herstellung amortisieren sich in erster Linie bei lebensbedrohlichen Krankheiten mit genügend hohen Fallzahlen. Ebenso lässt sich das Nebenwirkungsspektrum der verarbeiteten Zytostatika durch die liposomale Darreichungsform günstig beeinflussen.

Diese Verbesserung der Verträglichkeit ist auch die treibende Kraft bei der Entwicklung des Präparates MiKasome der Fa. Gilead. Dabei lässt sich durch den liposomalen Einschluss von Amikacin die Nephro- und Ototoxizität des Aminoglykosids mindern, indem sowohl die glomeruläre Filtration, als auch die Anreicherung im Haarzell-Zytoplasma im Innenohr verringert werden [63, 180].

Die Eigenschaften von Liposomen als Lösungsvermittler machte man sich bei der Entwicklung liposomaler Amphotericin B – Zubereitungen zum Vorteil [36]. Durch den Einschluss in Liposomen wird auch hier die Nephrotoxizität im Vergleich zu freiem Amphotericin B gemindert. Dies kann auch dadurch erklärt werden, dass konventionelle Amphotericin B-Zubereitungen Natriumdeoxycholat als

Lösungsvermittler enthalten, welcher ebenfalls zur Nephrotoxizität beiträgt. Ein weiterer Vorteil der liposomalen Formulierungen liegt darin, dass die natürliche, größenabhängige Affinität kolloidaler Arzneistoffträger zu Zellen des RES zu einer erhöhten Wirkstoffkonzentration am Infektionsort führt.

Bei der in Tabelle 1 erwähnten DepoFoam® Technologie der Fa. Skye Pharma handelt es sich um multivesikuläre Liposomen, bestehend aus mehreren internen, wässrigen Kompartimenten, die durch ein zusammenhängendes Netzwerk aus Lipid-Membranen voneinander getrennt sind [183]. Diese Konstrukte besitzen eine Größe von ca. 1 bis 100 µm und sollen als intramuskuläres bzw. subkutan Depot den Arzneistoff über einen längeren Zeitraum hinweg hinhaltend freigeben.

2. Herstellung von Liposomendispersionen

Wenn amphiphile Moleküle, wie z. B. Phospholipide, mit wässrigen Medien in Kontakt kommen, werden sie sich spontan zu Assoziationskolloiden organisieren. Dabei verringert sich die Kontaktfläche zwischen hydrophoben Molekülstrukturen und dem Medium. Es entstehen, je nach räumlicher Struktur des Amphiphils und Eigenschaften des Mediums, Mizellen, planare Bilayer oder Liposomen. Um Liposomen definiert herstellen zu können, wurden inzwischen verschiedene Herstellungsmethoden entwickelt.

2.1. Film-Methode und anschließende Verfahren

Die älteste, und eine der einfachsten Methoden um Liposomen herzustellen, ist die so genannte Filmmethode [17]. Die Lipide werden dabei zunächst in einem organischen Lösungsmittel gelöst. In einem ausreichend dimensionierten Rundkolben wird dieses Lösungsmittel an einem Rotationsverdampfer abgezogen, der zurückbleibende Lipidfilm wird nun mittels Schütteln in einem wässrigen Medium aufgenommen. Die dabei entstehende Rohdispersion besteht aus uneinheitlich großen, multilamellaren Liposomen. Um einen lipophilen Arzneistoff zu enkapsulieren, wird dieser mitsamt den Lipiden im organischen Lösungsmittel gelöst. Soll ein hydrophiler Arzneistoff verarbeitet werden, wird dieser dem wässrigen Medium hinzugegeben. Die Filmmethode ist aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit und dem geringen Bedarf an instrumenteller Ausstattung im wissenschaftlichen Labor die Methode der Wahl.

Um die Liposomen nun in eine homogenere Form zu überführen, kann man sich mehrerer Techniken bedienen:

1. Ultraschallbehandlung: Diese Methode liefert in der Regel sehr kleine, unilamellare Liposomen. Nachteilig ist die relativ starke Erwärmung der Dispersion, sowie der zu erwartende Material-Abrieb der Titan-Sonotrode.
2. Hochdruckhomogenisation: Hier werden unter Drücken von bis zu 1500 bar die Liposomen durch einen Spalt gepresst und durch Kavitationskräfte zerkleinert. Um homogene Dispersionen zu erhalten, sind mehrere Zyklen nötig. Diese Anlagen können kontinuierlich betrieben werden, aber auch hier

besteht die Problematik der Temperaturkontrolle und des Materialabriebs. Dafür kann unter Umständen auf die Herstellung einer Rohdispersion verzichtet werden [15].

3. Extrusion: Die Rohdispersion wird mittels Stickstoff durch eine Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße gepresst. Nach etwa fünf bis zehn Extrusionen sind die Zubereitungen hinreichend homogenisiert. Diese Methode ist für die Liposomen relativ schonend.

Im Anschluss an die Homogenisation sollte die Abtrennung nicht enkapsulierten Arzneistoffs erfolgen. Dies kann durch Ionenaustausch- bzw. Größenausschluss-Chromatographie, oder auch Zentrifugations- und Filtrationstechniken erfolgen [170]. Falls Liposomen für die parenterale Anwendung hergestellt werden, ist ein geeignetes Verfahren zur Verminderung der Keimzahl durchzuführen. Obwohl Arbeiten über die Dampfsterilisation von Liposomen vorliegen [94, 104, 187] ist es offensichtlich, dass eine solche Behandlung in Hinsicht auf Partikelgrößenänderung, Lipid-Oxidation und Verlust von Arzneistoff der Stabilität abträglich ist. Daher werden liposomale Arzneiformen in der Praxis meist unter aseptischen Bedingungen hergestellt und abschließend einer aseptischen Entkeimungs-Filtration durch geeignete Filter unterzogen [69].

2.2. Ethanolinjektions-Methode

Eine andere Möglichkeit zur Herstellung von Liposomen-Dispersionen ist die Ethanol-Injektionstechnik; auch sie ist bereits seit den 70er Jahren bekannt [20]. Hierbei werden die Lipide in Ethanol gelöst und unter Rühren in die wässrige Phase gegeben, bei der Verdünnung des Alkohols entstehen dann die Vesikel. Im Gegensatz zur Filmmethode ist dieses Verfahren sehr gut auch für größere Ansätze geeignet. So berichtet Naeff über die Herstellung eines liposomalen Econazol-Gels in Ansatzgrößen von mehreren hundert Kilogramm je Charge [120]. Abbildung 1 zeigt ein Schema der dabei verwendeten Anlage.

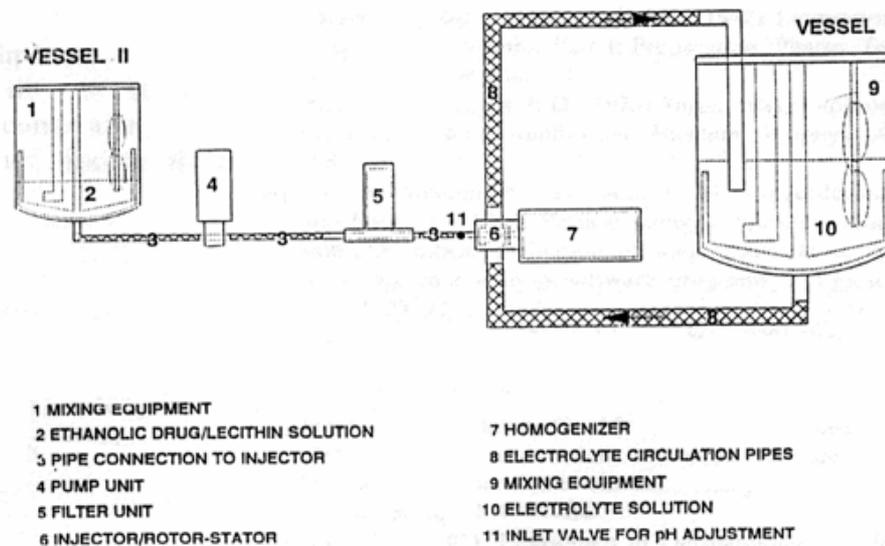


Abbildung 1: Anlage zur industriellen Herstellung von Liposomen mittels Ethanolinjektion (aus [120])

Auf einen weiteren Homogenisationsschritt wird bei der beschriebenen Methode verzichtet, da es sich um eine topische Arzneiform handelt. Die Größe der Liposomen liegt zwischen 150 und 200 nm, Angaben zur Teilchengrößenverteilung finden sich nicht.

2.3. Weitere Herstellungsmethoden

Die Liposomentechnologie ist weiter auf der Suche nach der optimalen Herstellungsmethode in Bezug auf Einfachheit, Scale-up, Einkapsulierungseffizienz, Vermeidung organischer Lösungsmittel, Stabilität der Produkte, usw. Aus der Vielzahl anderer Methoden möchte ich lediglich einige erwähnen [85, 124, 170, 179]:

- Bei der Herstellung mittels mechanischer Dispersion kommen neben Hochdruckhomogenisatoren (Fa. APV, Lübeck) auch Micro-Fluidizer (Fa. Microfluidics, Newton, MA, USA) oder Hochdruck-Molekularpressen (French® Press, Fa. Polytec, Waldbronn) zum Einsatz.
- Methoden bei denen Liposomen gebildet werden, indem organische Lösungsmittel durch wässrige Medien ersetzt werden, sind z.B. die so genannte Reverse-Phase-Evaporation-Technik [57] oder auch die Ether-Injektionsmethode.

- Bei der Detergent-Solubilization- bzw. Detergent-Removal-Technik werden die Lipide zunächst durch Zugabe von Detergenzien wie Triton®X oder Gallensalze in Form von Misch-Mizellen solubilisiert. Bei der anschließenden Entfernung des Detergens mittels Dialyse entstehen unilamellare Vesikel [123].
- Techniken, die sich nur schwer einer Kategorie zuordnen lassen, sind die Freeze-Thaw-Methode [93] und die Herstellung mittels Dehydratation-Rehydratation [150].

2.4. Lyophilisation von Liposomendispersionen

Liposomen sind thermodynamisch metastabile Systeme. Sie neigen dazu, ihre Oberfläche durch Fusions- oder Aggregationsvorgänge zu verringern [99]. Aber auch andere physikalische und chemische Instabilitäten haften ihnen an:

- Arzneistoff kann aus dem wässrigen Kern oder der Membran austreten („drug leakage“).
- Die verwendeten Lipide sind bei Vorhandensein ungesättigter Fettsäuren oxidationsanfällig. Bei Glycerinestern wie Lecithinen oder Phosphoethanolaminen besteht die Gefahr der Lysolipid-Bildung durch Hydrolyse am C2-Atom der Glycerol-Partialstruktur [170].

Durch Lyophilisation kann der Ablauf obiger Reaktionen deutlich verlangsamt und damit die Lagerdauer von Liposomendispersionen verlängert werden. Bereits 1978 patentierten Handjani und Vanlerberghe dieses Prinzip [78]. Crommelin und van Bommel berichteten 1983, dass die Lipid-Membran von Liposomen durch Frier/Tau-Zyklen hinsichtlich ihrer Integrität und Struktur Schaden nimmt, was insbesondere durch Verlust an enkapsuliertem Arzneistoff zum Ausdruck kommt [38, 162]. Destruktive Faktoren während des Gefriertrocknungsvorganges sind z. B. die Bildung von Eiskristallen, osmotischer Stress durch Gefrierkonzentration, das Durchlaufen thermo- und lyotroper Phasenübergänge [13, 42]. Die Stabilität der Liposomen konnte aber bald darauf durch den Einsatz potenter Cryo-Protectiva entscheidend verbessert werden. Insbesondere Trehalose (α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid), ein nicht-reduzierendes Disaccharid, erwies sich als sehr geeignet [45, 47]. Die Stabilisierung liposomaler Systeme durch Trehalose und andere Disaccharide beruht auf folgenden Hypothesen:

1. **Vitrification:** Disaccharide bilden während der Trocknung eine glasartige Matrix, die die Lipid-Membran vor Beschädigung durch Eiskristalle schützt und Fusionsvorgänge erschwert. Zudem führt diese Matrix zu einer verminderten Mobilität der Moleküle und setzt somit Reaktionsgeschwindigkeiten zusätzlich herab [157].
2. **Water replacement theory:** Disaccharide bilden Wasserstoff-Brückenbindungen mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide, verhindern somit Aggregations- und Fusionsvorgänge zwischen den Membranen [44].
3. **Herabsetzung der Phasenübergangstemperatur:** Disaccharide setzen die Phasenübergangstemperatur der Lipide herab und halten sie so während dem Einfrieren im flüssig-kristallinen Zustand, vermeiden damit Phasenübergänge [43].

Für die Praxis ist neben der Wahl eines geeigneten Cryoprotektivums auch der Ablauf des Lyophilisations-Programmes von Bedeutung. Van Winden et al. haben dessen Einfluss auf den stabilen Einschluss eines Fluoreszenzfarbstoffes hin untersucht [165]. In diesen Untersuchungen war ein langsames Einfrieren mit 0,5°C/min einem schnellen Einfrieren durch flüssigen Stickstoff vorzuziehen. Ähnliche Ergebnisse erzielte Higgins mit enkapsuliertem Streptomycin und einer optimalen Einfrierrate von 1 °C/min [83].

Sowohl arzneistoffbeladene Liposomen [164], als auch Lipid/DNA-Komplexe [9, 158] können, bei richtiger Justierung oben angesprochener Parameter, mittels Lyophilisation stabilisiert werden.

3. Liposomen in der zytostatischen Therapie

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite der heute verwendeten Zytostatika ist eine Chemotherapie für den Patienten mit starken Nebenwirkungen verbunden. Insbesondere sind rasch proliferierende Zellen des Organismus betroffen, z.B. im Gastro-Intestinal-Trakt (Nausea), die Haarfollikel (Alopezie), die Gonaden (Infertilität) sowie Blutzellen (Leukopenie, Thrombopenie). Hinzu kommen stoffspezifische Nebenwirkungen, z. B. die ausgeprägte Kardiotoxizität von Doxorubicin. Daher wäre es wünschenswert, die Toxizität zu reduzieren, ohne die antineoplastische Wirkung in gleichem Maße zu schwächen. Liposomale Zubereitungen können dieses Ziel prinzipiell auf zwei Wegen erreichen:

a) Der Arzneistoff wird am Zutritt zu gesundem, empfindlichem Gewebe gehindert. Dieses Prinzip bezeichnet man mit dem Begriff „site avoidance“ [37, 70].

b) Mittels „drug targeting“ versucht man, durch möglichst gezielte Anlieferung des Arzneistoffs an die Tumorzellen, die Konzentration an Arzneistoff dort möglichst hoch zu halten. Bei Liposomen kann man dabei prinzipiell zwischen aktivem und passivem Targeting unterscheiden [68, 101, 119].

Unter **aktivem Targeting** versteht man diejenigen Techniken, bei denen die Liposomenoberfläche mit Antikörpern („Immunoliposomes“) [16, 176], bzw. Liganden versehen wird, um entsprechende Epitope bzw. Rezeptoren auf Tumorzellen gezielt anzusteuern. Diese Oberflächenstrukturen sollten natürlich möglichst überwiegend, noch besser ausschließlich, auf den Tumorzellen vorhanden sein.

Hierbei wurden bereits vielfältige „Schlüssel-Schloss“-Kombinationen untersucht. So wurden als Liganden schon Kohlenhydrate, Hormone, Wachstumsfaktoren, virale Proteine, Polypeptide, Glykoproteine und Lektine verwendet. Nach Bindung der Liposomen an die Zellen, sollte das Liposom entweder desintegrieren und den Wirkstoff freisetzen, oder, im Falle internalisierender Rezeptoren, in die Zelle aufgenommen werden und den Arzneistoff direkt in die Zelle liefern [7].

Obwohl dieser Ansatz theoretisch sehr vorteilhaft erscheint, hat diese Art des Targeting aber doch entscheidende Nachteile [6]. Zum einen ist die Beladung von Liposomen mit oben genannten Liganden ein aufwändiges Mehrschritt-Verfahren, was nicht nur zeit- und kostenaufwändig, sondern auch in der Charakterisierung der Endprodukte problematisch ist. Zum anderen haben viele der oben genannten

Liganden immunogene Potenz, was bei wiederholter Applikation zur schnellen Elimination durch immunkompetente Zellen führen wird [8]. Ein weiterer Nachteil ist der Umstand, dass Tumorzellen in hohem Maß heterogene Ziele darstellen, je nachdem, in welchem Gewebe der Tumor wächst, in welchem Entwicklungsstadium er sich befindet usw. In diesem Fall wäre natürlich die Selektivität dieses Targeting-Prinzips ein Hindernis. Weinstein prägte 1992 den Begriff der „binding site barrier“ [175]. Auch dahinter verbirgt sich ein Problem des aktiven Targeting. Gemeint ist damit der Umstand, dass ligandenbeladene Liposomen mit den ersten Epitopen interagieren, die sich ihnen in den Weg stellen. Das sind konkret die Zellen in der Peripherie des Tumors, hier würde das Zytostatikum vermehrt freigesetzt, wohingegen die Zellen im Inneren des Tumors nicht beeinträchtigt würden.

Demgegenüber versteht man unter **passivem Targeting**, dass Liposomen aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften Tumorgewebe bevorzugt erreichen. Hierbei macht man sich zunutze, dass sich diese Gewebe durch verschiedene Parameter von gesundem Gewebe unterscheiden. Die Tatsache, dass Tumorzellen aufgrund einer hypoxischen Stoffwechsellage einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert aufbauen, versuchte man dadurch auszunutzen, dass man Liposomen konstruierte, die zwar bei physiologischem pH-Werten um 7.2 stabil sind, aber bei leicht saurem Milieu den Wirkstoff freisetzen [34, 74, 82, 182].

Auch die unterschiedliche Morphologie der versorgenden Blutgefäße liefert Ansätze zur gezielten Chemotherapie. So sind Blutgefäße, die der Tumor selbst zur Aufrechterhaltung seiner Versorgung sprossen lässt, häufig durch große interzelluläre Spalten zwischen den Endothelzellen und fehlende Basalmembranen ausgezeichnet [14, 132]. Liposomen definierter Größe können nun durch diese Spalten ins Gewebe austreten, jedoch nicht durch das vergleichsweise dicht geschlossene Endothel normaler Blutgefäße [121].

Ebenso versuchte man, durch lokale mechanische oder thermische Einflüsse Liposomen am gewünschten Wirkort zu desintegrieren, um den Wirkstoff gezielt freizusetzen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz temperatursensibler Liposomen, die durch Anwendung lokaler Hyperthermie ihren Arzneistoff selektiv am Wirkort freisetzen [74, 87, 108]. Diese lokale Erwärmung des Gewebes kann man beispielsweise durch Mikrowellen hervorrufen. Die Temperatur, bei der die Liposomenmembran in den flüssigkristallinen Zustand übergeht, ist durch die Lipid-Komposition steuerbar und sollte bei ca. 42°C liegen, so dass diese Liposomen bei

Körpertemperatur noch ausreichend stabil sind. Auch wurde versucht durch lokale Anwendung von Ultraschall oder Strahlung, z.B. Laserlicht oder Infrarotstrahlen, die Liposomen am Wirkort selbst zu destabilisieren [74]. Der Nachteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die, meist bei der Diagnose des Primärtumors bereits gebildeten, Metastasen nicht erfasst werden.

Auch scheinen kationische Liposomen, also Liposomen, die in physiologischem Milieu ein positives Zeta-Potential besitzen, eine bevorzugte Affinität für Endothelzellen in neu gebildeter Tumolvaskulatur zu besitzen. Da dieser Angriffsort im Rahmen der Entwicklung anti-angiogenetischer Krebstherapien von besonderem aktuellem Interesse ist und die Herstellung solcher Liposomen beispielsweise im Vergleich zu Immunliposomen (s.o.) wenig aufwändig ist, wird diesem Aspekt in Kapitel I.4. dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Obwohl die Einkapsulierung verschiedener Zytostatika relativ unproblematisch ist, gibt es auf dem Weg zum wirksamen Medikament weitere Hürden.

Zum ersten besitzen konventionelle Liposomen nach intravenöser Applikation eine relativ kurze Verweilzeit in der Zirkulation. Grund hierfür ist die rasche Aufnahme injizierter Liposomen in Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES), v.a. in gewebsresidente Makrophagen in Leber, Milz und Knochenmark. Liposomen als partikuläre Arzneistoffträger werden vom menschlichen Organismus als Fremdkörper erkannt und dementsprechend versucht zu eliminieren [128]. Wenn als Folge hieraus die Verweildauer der Liposomen in der Zirkulation, abhängig von Lipidzusammensetzung, Größe und Ladung nur wenige Minuten beträgt, würden auch die tumorgerichteten Eigenschaften der Liposomen nicht zum Tragen kommen. Somit wäre es nicht möglich, das Zytostatikum bis zu den Tumorzellen zu transportieren. Erst die Lösung dieses Problems hat die Anwendung der heutigen liposomalen Zubereitungen in der Krebstherapie ermöglicht.

Man hat erkannt, dass nach einer parenteralen Applikation die Liposomenoberfläche zunächst mit Plasmaproteinen interagiert. Besonders zu nennen sind hier zunächst bestimmte Lipoproteine (v.a. HDL), die durch Anlagerung und Lipidaustausch die Liposomenmembran destabilisieren [142], zum anderen Opsonine, z. B. Antikörper oder Komplement-Proteine, die das Liposom für die anschließende Aufnahme in Makrophagen markieren [127, 131]. Tatsächlich ist durch Verringerung dieser Interaktionen mit Plasmaproteinen durch Modifikationen der Liposomenoberfläche

eine bedeutend längere Verweildauer der Liposomen in der Zirkulation erreicht worden. Ende der 80er Jahre wurde entdeckt, dass eine Hydrophilisierung der Liposomenoberfläche durch Einbau von Polyethylenglykol (PEG) oder Monosialylgangliosid (GM1) in die Membran eine intravasale Verweildauer von mehreren Stunden bewirkt. Diese pegylierten Liposomen sind in der Literatur auch unter dem Namen long-circulating bzw. sterically stabilized Liposomen zu finden [5, 29, 97, 100]. Das Prinzip dieser besonderen Liposomen ließ sich 1991 die Fa. Liposome Technology, Inc., heute Fa. Alza, unter dem Namen Stealth®-Liposomen patentieren und ist im Präparat Doxil®/Caelyx® (Doxorubicin-haltige Stealth®-Liposomen) verwirklicht (siehe Abbildung 2).

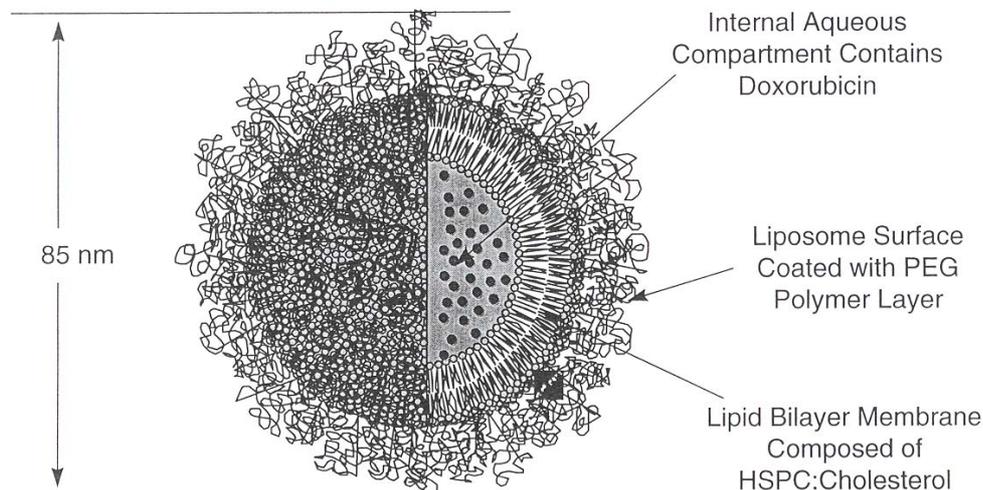


Fig. 1. Illustration of a DOXIL liposome. A single lipid bilayer membrane composed of hydrogenated soy phosphatidyl choline (HSPC), and cholesterol separates an internal aqueous compartment from the external medium. Doxorubicin is encapsulated in the internal compartment. Polymer groups (linear 2000 dalton segments of polyethylene glycol) are grafted to the liposome surface (although not shown, the polymer also extends from the inner monolayer of the membrane). The mean diameter of particle, including the PEG layer, is 85 nm.

Abbildung 2: Ein Stealth®-Liposom am Beispiel Doxil® (aus [111])

Dieses Präparat hat gegenüber freiem Doxorubicin den Vorteil, dass die kardiotoxische Wirkung entschieden gemindert wird. Zum einen werden durch die langsame Wirkstoff-Freisetzung aus den Liposomen hohe Plasmaspiegel-Spitzen von Doxorubicin vermieden. Zum anderen können die Liposomen aufgrund ihrer Größe zwar ins Tumorgewebe penetrieren, nicht jedoch durch das intakte Endothel der Herzmuskelzellen. Der Durchmesser sollte allerdings nicht zu groß sein, da eine geringe Teilchengröße, in diesem Fall ca. 100 nm, vorteilhaft für eine längere Zirkulationsdauer ist. Dieser Umstand ist zwar schon länger bekannt [91], die Mechanismen dahinter sind aber noch nicht en Detail geklärt.

Ein anderes Prinzip zur Verlängerung der Verweildauer im Blutkreislauf lässt sich anhand des Präparats DaunoXome® (Fa. Gilead, früher Fa. NeXstar) erkennen. Hier hat man durch eine sehr geringe Teilchengröße von ca. 50 nm, eine relativ starre Lipidmembran, die zu 50% (mol/mol) aus Cholesterol besteht, sowie durch die Verwendung von Di-Stearoyl-phosphatidylcholin, einem Lipid mit relativ hoher Phasenübergangstemperatur, eine längere Zirkulationsdauer erreicht [65].

Ein weiteres Problem der liposomalen Krebstherapie besteht darin, dass, selbst bei ausreichender Zirkulationszeit, die Anlieferung des Arzneistoffs zu den Tumorzellen selbst noch nicht vollständig gewährleistet ist. Gründe hierfür sind der bereits oben genannte hohe interstitielle Druck, der eine Konvektion von Teilchen oder großen Arzneistoffmolekülen aus den Blutgefäßen in das Tumorgewebe erschwert. Weiterhin sind schlecht durchblutete Tumorabschnitte natürlich auch schwerer chemotherapeutisch zu erreichen. Eine ausführlichere Diskussion der physiologischen Barrieren, die ein Zytostatikum auf dem Weg zum Tumorgewebe zu überwinden hat, findet sich in den Arbeiten von Jain [88, 89].

Die Betrachtung der oben genannten Probleme erklärt auch die relativ geringe Anzahl liposomaler Zytostatika auf dem Markt. Es gibt derzeit (November 2003) lediglich zwei Produkte mit verschiedenen Zytostatika (Doxorubicin, Daunorubicin), die aber derselben Substanzklasse (Anthracycline) angehören. Weitere Präparate befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Prüfung (siehe Tabelle 1).

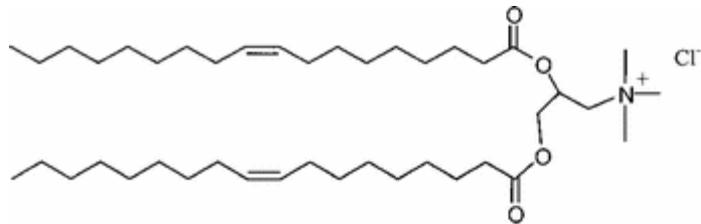
Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Hauptaugenmerk auf Liposomen mit positiver Oberflächenladung gerichtet. Im folgenden Abschnitt möchte ich daher auf die Besonderheiten dieser speziellen Arzneistoffträger-Systeme näher eingehen. Auch zu dem damit verbundenen Therapiekonzept des vaskulären Targetings möchte ich weitere Informationen geben, verbunden mit einem kurzen Überblick über Chancen der anti-angiogenetischen oder anti-vaskulären Therapie im Einsatz gegen Krebserkrankungen.

4. Targeting mittels kationischen Liposomen

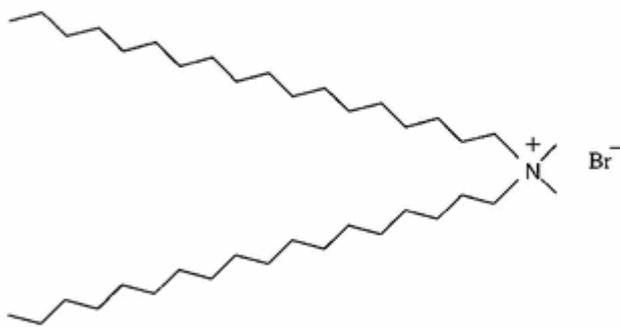
Kationische Liposomen sind in der Pharmazie bereits seit längerem Gegenstand des Interesses, da sie in der Gen-Therapie eine Alternative zu viralen Vektoren bieten. Kationische Liposomen sind im Vergleich zu neutralen Liposomen in der Lage, DNA effizient zu komplexieren und die Bindung dieser Komplexe an Zellen zu fördern. Über die genaue räumliche Form dieser so genannten Lipoplexe wird derzeit viel diskutiert, das Spektrum reicht von zylindrischen Konstrukten über flache lamellare Formen bis hin zum bekannten spaghetti-meatball-Modell [155]. Die Struktur beeinflussende Faktoren sind unter anderem das Herstellungsverfahren [33], das DNA-Lipid-Verhältnis [58], sowie die Art der eingesetzten Lipide [3, 62]. Auch die Transfektionseffizienz der Komplexe hängt von verschiedenen Parametern, wie Standzeit oder Mischungsverhältnis, ab. Eine umfangreiche Arbeit darüber verfasste z. B. Schroer aus dem Arbeitskreis Prof. Schubert [144]. Liposomen, die gänzlich aus kationischen Lipiden bestehen, zeigten in der Praxis schlechtere Transfektionsraten, als solche, denen ein so genanntes Helfer-Lipid, wie z.B. L- α -Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin (DOPE) oder 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC) hinzugefügt wurde.

Neben natürlich vorkommenden kationischen amphiphilen Substanzen wie z.B. Stearylamin und Sphingosin-Derivaten wurden bereits in den 80er Jahren synthetische Lipide zur Komplexierung von genetischem Material verwendet. Eine der ersten Arbeiten, die sich mit einem synthetischen Lipid - N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-Chlorid (DOTMA) - befassten, stammt von Felgner et al. aus dem Jahre 1987 [61]. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen synthetischen, kationischen Lipiden. Derlei Lipide bestehen aus einer positiv geladenen Kopfgruppe, meist eine quartäre Ammoniumfunktion, die über einen Linker mit dem hydrophoben Molekülteil verbunden ist. Diese Verbindung zwischen hydrophiler und lipophiler Molekülstruktur besteht z.B. bei oben genanntem DOTMA aus Etherbrücken. Ein Beispiel für eine Verlinkung mittels Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen ist Di-octadecyl-dimethyl-ammoniumbromid (DDAB). Im Gegensatz hierzu enthält das von uns verwendete 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) eine Esterfunktion als Linker. Dies geht zwar zu Lasten der chemischen Stabilität, führt aber aufgrund der Bioabbaubarkeit auch zu

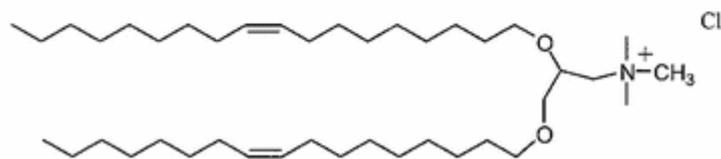
einer geringeren Toxizität in vivo. Die Strukturformeln der drei angesprochenen Lipide finden sich in Abbildung 3:



DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N, N, N-trimethylammonium chloride



DDAB dimethyldioctadecylammonium bromide



DOTMA N-(2,3-dioleoyloxypropyl)-N, N, N-trimethylammonium chloride

Abbildung 3: Drei kationische Lipide mit unterschiedlichen Linkern (aus [32])

Mittlerweile gibt es fertige Lipidmischungen für die experimentelle Transfektion eukaryotischer Zellen, in diesem Falle auch „Lipid-based Transfection“ oder kürzer „Lipofection“ genannt. Beispiele für solche ready-to-use Mischungen sind LipofectAMINE®, Lipofectin® (beide von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Trojane® (Fa. Avanti, Alabaster, AL, USA) Transfectam®, TransFast® (beide von Promega, Madison, WI, USA). Die Lipidmischung steht als getrockneter Lipidfilm oder als Lyophilisat zur Verfügung und ist vor den Experimenten zu resuspendieren und dann mit der DNA-Lösung zu mischen.

In der vorliegenden Arbeit werden kationische Liposomen jedoch nicht zum Gentransfer, sondern als Träger für ein zytostatisches Arzneimittel verwendet.

Grundlage dafür ist eine Publikation, die eine Arbeitsgruppe um Thurston an der University of California in San Francisco 1998 erstellte, in der sie die Aufnahme von intravenös applizierten kationischen Liposomen in normale und in angiogenetisch aktive Endothelzellen verglichen [160]. Sie stellten fest, dass kationische Liposomen eine 15- bis 33fach höhere Affinität zu angiogenetisch aktiven Endothelzellen besitzen [115]. Die Liposomen finden sich nach intravasaler Applikation zum Großteil an der luminalen Seite des Endothels, bzw. in den Endothelzellen selbst wieder, in welche sie zumindest teilweise durch endozytotische Vorgänge aufgenommen werden. Der Mechanismus für die bevorzugte Bindung an diese Zellen ist bis dato nicht geklärt. Diskutiert werden nicht spezifische Wechselwirkungen aufgrund entgegengesetzter Ladungen speziell mit fenestrierten Bereichen, auch spezifische Interaktionen mit Rezeptoren werden nicht ausgeschlossen. Dieses Konzept des vaskulären Targetings, also der gezielten Anlieferung von Arzneistoffen an angiogenetisch aktive Endothelzellen, wurde 1982 von Denekamp und Hobson als Angriffspunkt in der Krebstherapie vorgeschlagen [53, 54], denn sowohl das Wachstum [66], als auch die Metastasierung [59] solider Tumoren hängt entscheidend von ihrer Fähigkeit zur Blutgefäßneubildung ab.

Mittlerweile kennt man mehr Details über diese aktivierten Endothelzellen: Man findet sie insbesondere in wachsendem Tumorgewebe, aber auch in entzündetem Gewebe, an Stellen der Wundheilung und im Uterus der Frau. Durch die so entstehenden Blutgefäße sichert sich der Tumor seine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Es findet ein rasantes, infiltratives Wachstum statt, wohingegen sich Endothelzellen physiologischerweise durch eine geringe turn-over-Rate auszeichnen, sie teilen sich lediglich einmal pro Jahr. So unterscheiden sich dann auch Blutgefäße in Tumoren durch zahlreiche morphologische Unterschiede von gesundem Gefäß-Endothel [1]: Die vaskuläre Permeabilität ist z. B. durch große interzelluläre Spalten, sowie eine löchrige bzw. fehlende Basalmembran, deutlich erhöht, auch begleitende Lymphgefäße fehlen. Insbesondere diese beiden Faktoren führen zu einer Akkumulation von Makromolekülen und Liposomen in Tumorgeweben, im Gegensatz zu niedermolekularen Stoffen. Für dieses Phänomen wurde Mitte der 80er von einer Arbeitsgruppe um Matsumura und Maeda der Begriff „enhanced permeability and retention“ (EPR)-Effekt geprägt [106, 112]. Dieser Effekt ist im Gegensatz zu Thurstons Ansatz von der Liposomenladung unabhängig, sondern vielmehr abhängig vom Molekulargewicht bzw. der räumlichen Ausdehnung. Erst kürzlich wurden

aktuelle Erkenntnisse zu diesem Thema in einem Übersichtsartikel zusammengefasst [107]. Durch die fehlende Lymphdrainage erhöht sich der interstitielle Druck, der interstitielle Raum ist ausgedehnter, die Morphologie der Blutbahnen erscheint chaotisch (Windungen, Sackgassen, etc...) [80]. Da keine homogene Blutversorgung besteht, wechseln gut vaskularisierte Tumorgewebe mit unterversorgtem, nekrotischem Gewebe ab. Tumorzellen in diesen Bereichen sind oftmals hypoxisch und bewirken durch verstärkte Lactat-Bildung einen sauren extrazellulären pH-Wert [118]. Zusätzlich zeichnen sich von Tumoren neu initiierte Blutgefäße auf molekularer Ebene durch ein anderes oberflächliches Muster an Rezeptoren oder Antigenen aus. Übermäßig vorhanden sind z. B. Selektine (z. B. E-selectin), Integrine (z. B. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin) und andere Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM und VCAM, sowie verschiedene Rezeptoren, z.B. für den vascular endothelial growth factor (VEGF) oder den basic fibroblast growth factor (bFGF) [10, 12, 72]. Oben genannte Adhäsionsmoleküle vermitteln Zellkontakte, die im gesunden Menschen für die Neo-Angiogenese, aber auch z. B. für die Wundheilung notwendig sind. Auch an der Metastasierung von soliden Tumoren in entfernt gelegene Körperareale sind solche Adhäsionsmoleküle beteiligt. Erst durch sie kann eine einzelne, zirkulierende Tumorzelle an andere Zellen anhaften und sich erneut teilen. Ohne diese Anheftung wäre die Tumorzelle in der Zirkulation nicht sehr lange überlebensfähig.

Diese Besonderheiten der Blutgefäßbildung von soliden Tumoren führten zu einem neuartigen Behandlungskonzept, der so genannten anti-vaskularen oder anti-angiogenetischen Therapie. Dies beschränkt sich nicht nur auf die Onkologie, denn neben Krebserkrankungen zeichnen sich auch noch zahlreiche andere pathologische Zustände durch überschießende angiogenetische Aktivität aus, wie z. B. Psoriasis, diabetische Retinopathie, Makuladegenerationen und rheumatoide Arthritis [27, 125]. Dieser therapeutische Ansatzpunkt besitzt folgende Vorteile [73, 81]:

1. Als physiologischer, entwicklungsbiologischer Vorgang ist die Angiogenese im gesunden Erwachsenen ein weitgehend herunterregulierter Prozess. Daher sollte die Therapie auch bei längerer Dauer nicht zu unerwünschten Nebenwirkungen, in dem von herkömmlichen Antineoplastika bekanntem Maße, führen.
2. Aus der geringen Teilungsrate resultiert auch, dass die Ausbildung von Resistenzen bei dieser Art der Behandlung als unwahrscheinlich

eingeschätzt wird, was insbesondere in der Krebstherapie von immenser Bedeutung ist.

3. Die Angriffsorte dieser Medikamente sind nach intravasaler Applikation leicht zu erreichen. Normalerweise hat ein Zytostatikum auf dem Weg zu einer Tumorzelle nach erfolgter Extravasation Gewebe zu durchdringen und einige Hindernisse zu überwinden, z. B. oben erwähnten erhöhten interstitiellen Druck [88, 89, 119].

Angesichts dieser Vorteile und den oben genannten vielfältigen Indikationsmöglichkeiten ist es folgerichtig, dass dieses Gebiet intensiv beforscht wird und sich 1999 über 50 solcher Wirkstoffe in der klinischen Prüfung befanden [2, 113]. Ein Beispiel für eine bereits weit fortgeschrittene Entwicklung ist das Medikament Avastin® der Fa. Genentech (South San Francisco, CA, USA). Es handelt sich dabei um den Wirkstoff Bevacizumab, einen rekombinanten humanisierten VEGF-Antikörper, der sich in klinischen Prüfungen der Phase III gegen fortgeschrittene Kolorektal-Karzinome befindet [31].

Auch der von mir verwendete Arzneistoff, Paclitaxel, den ich im nächsten Abschnitt eingehender beschreiben möchte, zeichnet sich durch eine anti-angiogenetische Wirkungskomponente aus.

5. Paclitaxel

Paclitaxel ist ein in der Rinde verschiedener Eibenarten vorkommender Naturstoff, der erstmals in den 60er Jahren aus Extrakten der Rinde von *Taxus brevifolia*, der Pazifischen Eibe, isoliert wurde [174]. Der Gehalt an Paclitaxel beträgt aber lediglich ca. 0,01% des Trockengewichts, so dass ab Beginn der 90er Jahre intensiv nach anderen Ressourcen geforscht wurde [186]. Man machte sich dabei zunutze, dass auch in den Nadeln verschiedener *Taxus*-Arten Vorstufen des Paclitaxels, Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III, gefunden wurden. Aus diesen Vorstufen konnte nunmehr durch Partialsynthese Paclitaxel in größerem Maßstab gewonnen werden. Auch Totalsynthesen wurden entwickelt, sind aber angesichts der Komplexität der Struktur für die Herstellung großer Mengen nicht wirtschaftlich. Auch aus verschiedenen endophyten Pilzen und Bakterien kann Paclitaxel gewonnen werden, der Großteil stammt jedoch aus Pflanzenzellkulturen verschiedener *Taxus*-Spezies [186]. So bezieht die Fa. Bristol-Myers Squibb den Arzneistoff für ihr Präparat Taxol® von der Fa. Phyton-Inc. (Ithaca, NY, USA), die diesen mittels ihrer so genannten „plant cell fermentation technology“ in großem Maßstab herstellen [24].

Paclitaxel ist ein Zytostatikum mit einer außerordentlich breiten Wirksamkeit. Es wirkt gegen Melanome, Leukämien, Mamma- und Ovarialkarzinome, Blasen- und Kopf-Hals-Karzinome, kleinzellige (SCLC), als auch nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) [171, 181]. Taxol® selbst ist zugelassen für die Therapie von Ovarialkarzinomen (in Kombination mit Platinverbindungen), metastasierenden Mammakarzinomen, fortgeschrittenem NSCLC (in Kombination mit Cisplatin), sowie zur second-line Therapie des HIV-assoziierten Kaposi-Sarkoms.

Paclitaxel verfügt über einen im Vergleich zu herkömmlichen Zytostatika neuartigen Wirkmechanismus: Die Polymerisation der Mikrotubuli aus Tubulindimeren wird gefördert, wohingegen die Depolymerisation behindert wird. Hierdurch kann man es zwar durchaus in die Gruppe der Mitosehemmstoffe bzw. Spindelgifte einordnen, es unterscheidet sich aber von den anderen Stoffen dieser Gruppe wie z. B. Colchicin oder den Vinca-Alkaloiden, die ja bereits die Bildung der Mikrotubuli behindern. Des Weiteren bewirkt Paclitaxel eine abnorme Anordnung und Bündelung der Mikrotubuli während des gesamten Zellzyklus, beeinträchtigt somit die vitale Zellfunktion in der

Interphase und während der Mitose entscheidend und wirkt somit zytotoxisch [75, 86, 110]. Darüber hinaus besitzt Paclitaxel bereits in geringeren Konzentrationen anti-angiogenetische Eigenschaften [21, 96], die positiv zur zytostatischen Wirkung beitragen. Diese Eigenschaft beruht wahrscheinlich nicht auf einer Wechselwirkung mit den mikrotubulären Strukturen [173]. Eine weitere Wirkungskomponente ist die Bindung an das anti-apoptotische Protein Bcl-2, welches durch Phosphorylierung inaktiviert wird und als Folge der programmierte Zelltod der Krebszelle eintritt [139]. Die anti-angiogenetischen Eigenschaften des Paclitaxels macht man sich darüber hinaus noch bei einem weiteren Indikationsgebiet zunutze, nämlich bei der Verhinderung einer Restenose nach erfolgter Koronarangioplastie. Hierzu werden die einzusetzenden Stents mit Paclitaxel beschichtet [130].

Im Körper wird Paclitaxel in großem Ausmaß an Plasmaproteine gebunden (90-95%) und zu über 90% nach hepatischer Metabolisierung biliär eliminiert [154]. Die Elimination ist zudem sättigbar, was zu einer dosisabhängigen Clearance führt. Das Verteilungsvolumen im steady-state beträgt 42-162 L/m², was auf ausgeprägte Verteilung oder Gewebbindung hinweist. Paclitaxel wird über Cytochrom-P450-Enzyme in verschiedene hydroxylierte Metaboliten umgewandelt [161]. Weitere Daten zur Metabolisierung von Paclitaxel finden sich bei Crommentuyn et al. [39].

Häufigste und dosislimitierende unerwünschte Wirkung ist eine reversible Myelosuppression. Diese äußert sich vor allem in Neutropenien mit einhergehenden Infektionen. Die beobachteten Thrombozytopenien und Anämien verlaufen hingegen meist asymptomatisch. Neurotoxische Effekte in Form von Störungen des peripheren Nervensystems (Hör-/Sehstörungen, Krämpfe, Parästhesien) zeigen sich bei ca. 60 % der Patienten und verlaufen in 5% der beobachteten Fälle schwer. Ebenfalls bei ca. 60% der Patienten sind Arthralgien und Myalgien zu erwarten, in 13% der Fälle verbunden mit starken Schmerzen insbesondere in den Extremitäten. Weitere mögliche Nebenwirkungen betreffen das Herz- und Kreislaufsystem, den Gastrointestinaltrakt, den Wasser- und Elektrolythaushalt, sowie die Haut- und Hautanhangsgebilde [11, 161]

Chemisch betrachtet handelt es sich bei Paclitaxel um ein tetrazyklisches Diterpen mit einem Molekulargewicht von 853,9 g/mol (siehe Abbildung 4).

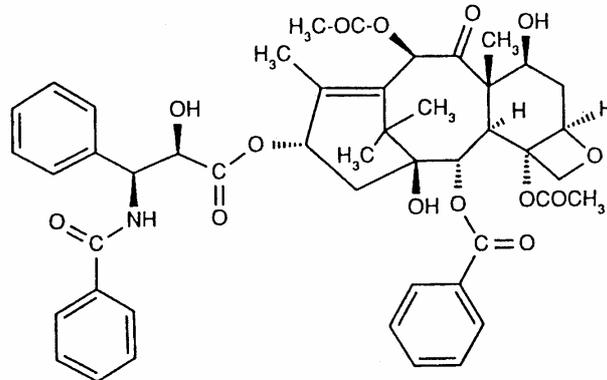


Abbildung 4: Strukturformel von Paclitaxel (aus [7])

Paclitaxel zeichnet sich durch eine sehr geringe Löslichkeit aus, in Wasser beträgt diese lediglich ca. 0.5 $\mu\text{mol/L}$. Daher ist es im derzeit auf dem Markt befindlichen Fertigarzneimittel Taxol® der Fa. Bristol-Myers Squibb in einer Mischung aus Cremophor® EL (Polyoxyethylen-35-Rizinusöl) und reinem Ethanol (50:50) gelöst. Die Dosierung beträgt je nach Indikation und Dauer der Infusion zwischen 135 und 175 mg/m^2 Taxol® in Form einer 3- bzw. 24stündigen Infusion. Cremophor® EL selbst steht jedoch im Verdacht nephro- bzw. neurotoxisch [23], sowie für das gehäufte Auftreten allergischer Reaktionen in Folge der Applikation dieses Arzneimittels verantwortlich zu sein [141]. Immerhin sind ca. 30% der Patienten betroffen, in 4% aller Fälle kommt es sogar zu schweren anaphylaktoiden Reaktionen. Daher geht einer Taxol®-Applikation eine Prämedikation mit H_1 - und H_2 -Histamin-Rezeptor-Antagonisten und Glucocorticoiden voraus. Dennoch überwiegen die Vorteile bei diesem Präparat eindeutig gegenüber den Risiken, es ist eines der meistverkauften Zytostatika auf dem Markt. Die Umsätze beliefen sich alleine im dritten Quartal 2003 auf 240 Millionen US\$.

Angesichts obiger Fakten sind bereits zahlreiche Versuche unternommen worden, die Verwendung von Cremophor® EL zu umgehen, daher möchte ich im nächsten Kapitel alternative Formulierungen von Paclitaxel vorstellen und auf einige Technologien näher eingehen. Ein Ansatz, auf den ich im Rahmen dieser Arbeit lediglich hinweisen möchte, ist die Synthese von besser wasserlöslichen Prodrugs von Paclitaxel [51, 132, 140].

6. Paclitaxel in verschiedenen Arzneiformen

Bislang wird Paclitaxel parenteral per intravenöser Infusion verabreicht. Andere Applikationsmöglichkeiten wären die orale Gabe, auch eine lokale Verabreichung des Arzneistoffs bei soliden Tumoren ist denkbar.

6.1. Orale Applikation von Paclitaxel

Die orale Gabe ist prinzipiell vorteilhaft hinsichtlich der problemloseren Anwendung durch den Patienten unabhängig von einem Krankenhausaufenthalt. Speziell bei Paclitaxel steht dem die geringe Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe entgegen. Sie liegt nur bei ca. 1%, was zum einen in der schlechten Löslichkeit, zum anderen aber in der Aktivität von P-Glykoproteinen (PGP) im Gastro-Intestinal-Trakt begründet liegt [109]. Dabei handelt es sich um membranständige Efflux-Pumpen, welche im gesunden Körper die Aufgabe haben, die Aufnahme von Xenobiotika zu verhindern. In Krebszellen dagegen sind sie durch eine Aktivierung des „multi-drug-resistance“-Gens (MDR1-Gen) häufig übermäßig exprimiert und dann für eine Mehrfachresistenz der Tumorzellen gegen Zytostatika verantwortlich. Durch eine gleichzeitige Gabe eines Inhibitors des P-Glycoproteins (z.B. Cyclosporin A) konnte die orale Bioverfügbarkeit von Paclitaxel in Abhängigkeit von der gegebenen Dosis auf bis zu 47% gesteigert werden. Dieses Prinzip verfolgt die Fa. Ivax (Miami, FL, USA) mit dem Präparat Paxoral® derzeit in mehreren klinischen Studien.

6.2. Intratumorale Applikation von Paclitaxel

Die lokale Applikation eines Zytostatikums ist z. B. nach chirurgischer Exzision angezeigt, um eventuell residuale Tumorzellen zu töten. Auch um die Tumormasse vor einer Exzision zu verringern, kann die so genannte neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt werden. Hier hat man erfahrungsgemäß mit der Löslichkeit eines Arzneistoffs weniger Probleme, die galenische Herausforderung liegt mehr in der Steuerung der Freigaberate, der Verhinderung von burst-Effekten, usw. Paclitaxel wurde in verschiedene bioabbaubare Implantate verarbeitet, die Freigaberate z. B. über unterschiedliche Lipophilie oder Abbaurate des Implantat-Polymers gesteuert [129, 172]. Einen ähnlichen Weg geht die Fa. MacroMed (Sandy, UT, USA) mit ihrem Präparat OncoGel®, welches sich in klinischen Prüfungen der Phase II gegen

Tumoren der Speiseröhre und des Pankreas befindet. Hier ist Paclitaxel in ein thermosensitives, bioabbaubares Tri-Block-Copolymer aus Polylactid-co-glycolid und Polyethylenglykol eingebettet. Es kann in flüssiger Form injiziert werden und bildet in situ ein Gel, aus dem der Wirkstoff über einen Zeitraum von sechs Wochen freigesetzt wird [184].

6.3. Paclitaxel zur intravenösen Applikation

Ein weitaus größerer Aufwand wird bei der Forschung nach alternativen, intravasal applizierbaren Arzneistoffträgersystemen betrieben. Das auf dem Markt befindliche Präparat Taxol® der Fa. Bristol-Myers Squibb wurde bereits beschrieben. Die wesentlichen Probleme mit diesem Arzneimittel seien hier zusammengefasst:

1. Der Lösungsvermittler Cremophor® EL ist verantwortlich für bedeutsame Nebenwirkungen, allen voran für schwere allergische Reaktionen [167].
2. Bei der Darreichungsform handelt es sich um ein Konzentrat, welches vor der Applikation verdünnt werden muss. Die Haltbarkeit dieser verdünnten Lösung ist dann auf 27 Stunden limitiert, da es zur Präzipitatbildung kommen kann [25].
3. Die Zubereitung muss durch einen 0,22 µm in-line Filter infundiert werden, um den Eintrag von partikulären Verunreinigungen auszuschließen. Auch während der Infusion sollte die Klarheit der Lösung stets beobachtet werden [25].
4. Das Lösungsmittelgemisch Cremophor® EL/Ethanol löst Diethylhexylphthalat, einen Weichmacher, aus herkömmlichen PVC Infusionsbeuteln und -bestecken. Der Hersteller schreibt daher die Verwendung von Materialien wie Glas oder Polyolefinen vor [25].

Um nun die Verwendung dieses problembehafteten Lösungsmittelgemisches zu umgehen, sind die folgenden Ansätze denkbar [126, 152].

6.3.1. Verwendung von Kosolventien und Tensiden

Ein nahe liegender Gedanke ist, Cremophor® EL gegen ein anderes, weniger toxisches Tensid auszutauschen. Untersucht wurden z. B. amphiphile Block-Copolymere [136, 185], aber auch verschiedene Cremophor-Derivate und

Polyoxyethylen-Sorbitan-Fettsäure-Ester [103]. Als problematisch an diesem Ansatz sehe ich die geringe Anzahl an zur parenteralen Anwendung zugelassenen Tensiden und zum anderen den Umstand, dass die toxische Eigenschaft eines Tensids mit seinem Lösevermögen teilweise einhergeht. Daher wird man auch von einem weniger toxischen Tensid, höhere Konzentrationen zur Solubilisierung einsetzen müssen. Alkan-Onyuksel und Mitarbeiter hingegen schlossen Paclitaxel in Mischmizellen aus Gallensalzen und Ei-Lecithin ein, die in gefriergetrockneter Form gelagert werden können und bei Verdünnung in liposomale Systeme übergehen [4].

6.3.2. Herstellung von parenteralen Emulsionen

Für einen derart lipophilen Arzneistoff wie Paclitaxel bietet sich auch die Formulierung in einer injizierbaren O/W-Emulsion an. Paclitaxel wird dabei meist in einer öligen Phase gelöst und dann in einer emulgatorhaltigen, wässrigen Phase dispergiert. Diese Dispersion kann mittels Ultraschall oder Hochdruckhomogenisation erfolgen. Kan und Mitarbeiter verwendeten verschiedene Triacylglycerole, z.B. Tricaproin, und verschiedene natürliche Öle, z.B. Baumwollsamöl in der Ölphase. Als Emulgatoren benutzten sie Ei-Lecithin und Polysorbat 80 [92]. Constantinides und Mitarbeiter zeigten anhand einer öligen Phase aus Tocopherol und Polyethylenglykol 400 mit einem Emulgatormischung aus Poloxamer 407 und Tocopherylpolyethylenglykol-1000 Succinat (TPGS), dass solche Emulsionen auch einer Sterilfiltration unterzogen werden können [35].

Natürlich stellen diese Systeme besonders hohe Anforderungen an die Stabilität, insbesondere hinsichtlich Phasentrennung und Größe der dispersen Phase.

6.3.3. Verwendung von Cyclodextrinen zur Löslichkeitsverbesserung

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, bestehend aus sechs oder mehr α -1,4-verknüpften Glucopyranose-Molekülen. Die zylindrischen Molekülverbände zeichnen sich durch eine hydrophile Oberfläche sowie eine hydrophobe Kavität aus, in der ein lipophiler Arzneistoff komplexiert werden kann. Durch Alkylierung oder Hydroxy-Alkylierung können die Eigenschaften der Cyclodextrine weiter variiert werden [102]. Mit solchen substituierten Cyclodextrinen konnte Sharma eine Löslichkeitsverbesserung von Paclitaxel um den Faktor 105 erreichen [149]. Allerdings benötigte er hierzu eine Cyclodextrin-Konzentration von 500 g/L, was

angesichts der systemischen Toxizität dieser Hilfsstoffe einen Einsatz in vivo derzeit noch ausschließen dürfte. Cserhati und Mitarbeiter untersuchten die Wechselwirkungen von 23 verschiedenen Zytostatika mit α - bzw. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin [48, 49]. Sie stellten fest, dass vor allem die Lipophilie und Größe der Arzneistoffmoleküle die Wechselwirkungen mit den Cyclodextrinen beeinflussen. Verschiedene Arbeitsgruppen verarbeiteten die Arzneistoff-/Cyclodextrin-Komplexe zu liposomalen Systemen weiter, so z.B. für Prednisolon [60] oder Dexamethason [114]. Damit soll zum einen eine zu schnelle Wirkstoff-Freigabe aus den Komplexen verhindert werden, zum anderen wird durch die geringere renale Filtration der liposomalen Zubereitung die Nephrotoxizität der Cyclodextrine vermindert.

6.3.4. Kolloidale Arzneistoffträgersysteme

Von einer Einkapsulierung in kolloidale Trägersysteme könnte ein Arzneistoff wie Paclitaxel in mehrerer Hinsicht profitieren:

1. Verbesserung der Löslichkeit unter Umgehung der Verwendung von Cremophor® EL
2. Vergrößerung der therapeutischen Breite durch gezielte Anlieferung an Tumorzellen
3. Verlängerung der Wirkungsdauer durch das zirkulierende Arzneistoffreservoir

Das Hauptaugenmerk der Forschung liegt dabei auf den liposomalen Systemen. Mit ihnen wurde bereits die meiste Erfahrung gesammelt und es stehen Rohstoffe zur Verfügung, die den Anforderungen an eine GMP-konforme Herstellung genügen. Daneben werden auch Nanokapseln [19], Mikrosphärulen [117] und Nanopartikel [67] aus bioabbaubaren Polymeren, vorwiegend PLGA, auf ihre therapeutische Verwendbarkeit hin untersucht. Auch Solid-Lipid-Nanopartikel mit einer festen Matrix aus Triglyceriden und Phosphatidylcholin als Emulgator, mit und ohne sterische Stabilisierung mittels Polyethylenglykol, wurden hergestellt [28].

Riondel und Mitarbeiter beschrieben erstmals die intraperitoneale Injektion von liposomal eingeschlossenem Paclitaxel in tumortragende Mäuse [138]. Sharma und Straubinger testeten an über 300 verschiedenen Formulierungen den Einfluss der verwendeten Lipide in Hinsicht auf Stabilität, zytotoxische Aktivität in vitro und Toxizität in vivo [147, 148]. Sie stellten fest, dass bestimmte Formulierungen mit einem Paclitaxelgehalt von bis zu 3 mol% Paclitaxel ausreichende chemische und

physikalische Stabilität besitzen. Die maximal tolerierte Dosis (MTD) der liposomalen Zubereitung war nach intraperitonealer Gabe größer als bei in Cremophor®EL-Ethanol gelöstem Paclitaxel, die zytotoxische Aktivität war gegenüber den meisten verwendeten Zelllinien dennoch gleich groß. Prinzipiell ähnliche Ergebnisse für andere Formulierungen fanden Cabanes [26] und Shieh [151]. Crosasso und Mitarbeiter berichteten 1999 erstmals über Herstellung und Eigenschaften von pegylierten, paclitaxelhaltigen Liposomen mit längerer Zirkulationszeit [40]. Schmitt-Sody et al. stellten fest, dass paclitaxelbeladene, kationische Liposomen eine vierfach höhere Affinität zu tumorversorgenden Blutgefäßen als zum umliegenden normalem Gewebe haben [143]. Dass sich diese höhere Affinität auch therapeutisch auszahlen könnte, postulierten Kunstfeld et al. in einem Maus-Melanom-Modell [98]. Zu Beginn meiner Untersuchungen im August 1999 lagen also bereits Daten über die Wirksamkeit von Paclitaxel in kationischen Liposomen vor. Es stand aber kein standardisiertes und reproduzierbares Herstellungsverfahren zur Verfügung, auch über Einflussgrößen der Herstellung und physiko-chemische Eigenschaften der Zubereitungen war relativ wenig bekannt. Im folgenden Abschnitt werden daher Ziele meiner Arbeit konkreter formuliert.

7. Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von den Arbeiten von Thurston et al. [160] sollten kationische Liposomen mit Paclitaxel beladen werden, um damit den Arzneistoff selektiv an aktivierte Endothelzellen in Tumorgewebe anzuliefern.

Die Anforderungen an die Formulierung wurden folgendermaßen definiert:

- Die enkapsulierte Paclitaxelmenge sollte möglichst groß sein. Aus der Literatur war bekannt, dass sich Paclitaxel lediglich bis zu einer Menge von ca. 3 mol% hinreichend stabil in Liposomen enkapsulieren lässt [147, 156]. Aufgrund der Toxizität der kationischen Lipide [64] sollte durch möglichst effiziente Beladung die Menge an applizierten Lipiden möglichst gering gehalten werden. Auch das zu infundierende Volumen und die damit verbundene Infusionsdauer würden dann verringert.
- Die Viskosität der Zubereitung darf einer Infusion nicht entgegenstehen. Diese Forderung schränkt den Gesamt-Lipidgehalt der Formulierung ein.
- Die Zubereitung sollte über den gesamten Zeitraum der Infusion stabil sein, insbesondere im Hinblick auf Arzneistoff-Präzipitation und Trübungen. Da zu Beginn der Arbeit die Infusionsdauer noch nicht abzuschätzen war, orientierte ich mich an den für Taxol® empfohlenen 27 Stunden.
- Die Lagerstabilität („shelf-life“) des Produktes sollte im Rahmen der für pharmazeutische Anwendungen üblichen Zeiträume liegen, als grober Richtwert wurden 24 Monate vorgegeben.

Für das Herstellungsverfahren wurden folgende Ziele formuliert:

- Es sollte geeignet sein, Liposomen mit einer Größe von ca. 200nm mit einer möglichst schmalen Teilchengrößenverteilung herzustellen. Die Größenvorgabe war lediglich ein grober Richtwert, da der genaue Einfluss der Liposomen-Größe auf den therapeutischen Effekt noch nicht bekannt war. Die Relevanz der Liposomengröße auf die Effizienz des Targeting und der zytostatischen Wirkung wird ausführlich von Nagayasu diskutiert [121]. Die Größe der Liposomen bestimmt danach unter anderem die Extravasation in Tumorgewebe, da die Blutgefäße in Tumoren eine bestimmte maximale Poren-Größe besitzen [84]. Die geforderte schmale Teilchengrößenverteilung

trägt zur notwendigen, möglichst genauen Charakterisierung der hergestellten Liposomen bei.

- Das Herstellungsverfahren muss einen Schritt zur Keimreduktion enthalten. Wie bereits in Abschnitt I.2.1. erwähnt, ist für Liposomenpräparate die aseptische Herstellung mit anschließender Sterilfiltration die gängigste Methode.
- Das Verfahren sollte im Hinblick auf die Herstellung von Mustern zur präklinischen Prüfung, sowie auf mittlere Sicht auch zur Herstellung von Klinikmaterial, im größeren Maßstab durchführbar sein.

II. Experimenteller Teil

1. Materialien

1.1. Lipide, Lösungsmittel und Hilfsstoffe

- DOTAP = 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (als Chlorid), MW 698,55, als Lyophilisat (Avanti Polar-Lipids Inc., Alabaster, AL, USA)
- DOPC = 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, MW 786,13, als Lyophilisat (Avanti Polar-Lipids Inc., Alabaster, AL, USA)
- MOPC = 1-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin oder 1-Oleoyl-Lysolecithin, MW 521,7 (Fa. Sigma-Aldrich, Seelze)
- Cholesterinum purum (Caesar & Lorentz GmbH, Hilden)
- Chloroform p.a. (Fa. Merck KGA, Darmstadt)
- Ethanol absolut zur Synthese (Fa. Merck KGA, Darmstadt)
- Lutrol®F68 (Fa. BASF, Ludwigshafen). Hinter den verschiedenen Lutrol®- bzw. Pluronic®-Typen verbergen sich verschiedene nichtionische Tenside, die chemisch gesehen Polyethylenglykol-Polypropylenglykol-Copolymere mit unterschiedlichen Polymerisationsgraden darstellen. Während die Pluronic®-Typen technische Qualität aufweisen, eignen sich die Lutrol®-Produkte auch für pharmazeutische Anwendungen. Bei Lutrol®F68 (syn. Poloxamer 188) handelt es sich um ein Block-Copolymer aus Polyethylenglykol und Polypropylenglykol in einem Verhältnis von 81 zu 19 (w/w) mit einer mittleren Molekülmasse von 8600 Dalton, der HLB-Wert liegt bei 29.
- Tween®80 V Pharma (Fa. Uniqema, Emmerich), syn. Polysorbat 80, trägt auch die Bezeichnung Polyethylenglykol(20)-sorbitan-monooleat. Es besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 1310 Dalton und hat einen HLB-Wert von 15.
- Solutol®HS15 (Fa. BASF, Ludwigshafen), syn. Polyethylenglykol-660-hydroxystearat ist ein Gemisch aus 70 % Mono- und Di-Estern aus 12-Hydroxystearinsäure und Polyethylenglykol, sowie 30% freiem Polyethylenglykol. Der HLB-Wert von Solutol®HS15 wird mit 14-16 angegeben.

1.2. Arzneistoffe

- Paclitaxel aus *Taxus yunnanensis*, MW 853.9, Gehalt min. 97% (Fa. Sigma-Aldrich, Seelze)

1.3. Dispersionsmedien

- Glucoselösung 5%, steril (Fa. Braun Melsungen, Melsungen)
- α,α -Trehalose-Dihydrat, (Pfanstiehl Lab., IL, USA) in 10%iger Lösung, Reinstwasser entnommen aus Purelab Plus®-Anlage (USF Elga, Siershahn)

2. Methoden zur Herstellung von Liposomendispersionen

2.1. Herstellung der Rohdispersionen

2.1.1. Filmmethode

Lipide und Paclitaxel wurden in Chloroform gelöst. Betrug die Menge der Substanzen weniger als 80 mg, wurde die Lösung in einen 100 ml Rundkolben gegeben, bei größeren Mengen war ein 500 ml Rundkolben zu verwenden. Das Chloroform wurde an einem Rotationsverdampfer, Laborota 4001 (Fa. Heidolph, Schwabach) bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C, einer Umdrehungszahl von 180 Upm und einem Vakuum von 150 mbar abgezogen. Das Vakuum wurde erzeugt mittels Vakuumpumpstand CVC 2000 (Fa. Vacuubrand, Wertheim).

Danach wurde die Vorlage ausgeleert, die Qualität des Films kontrolliert und der Film bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C, einer Umdrehungszahl von 120 Upm und einem Vakuum von ca. 10 mbar 1 Stunde lang getrocknet. Der Film wurde nun bei Raumtemperatur durch Schütteln in einer entsprechenden Menge Glucoselösung aufgenommen. Bei den Versuchen, bei denen zur Rehydratherstellung gekühlte Glucoselösung verwendet wurde, wurde der Rundkolben zuvor für ca. 10 Minuten im Kühlschrank gelagert. Nachdem sich der Film vollständig abgelöst hat, wurde das Rehydrat für unterschiedliche Dauer im Kühlschrank gelagert. Hierbei wurden verschiedene Zeiträume untersucht, von sofortiger Extrusion bis hin zu 24stündiger Lagerung.

2.1.2. Ethanolinjektion

Lipide und Paclitaxel wurden in Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde nun in eine gerührte, wässrige Phase eingebracht. Dies geschah entweder bei Raumtemperatur oder bei 4 °C. Zum Rühren wurden folgende Geräte verwendet:

- a. Heidolph Rührwerk RZR 2021 (Fa. Heidolph, Schwabach) mit
 - 3-Blatt-Propeller-Rührer, Ø 40 mm (Fa. IKA, Staufen)
 - Turbinenrührer, Ø 30 mm (Fa. IKA, Staufen)
 - Kreuz-Balken-Rührer, Ø 14 mm (aus Feinmechanik-Werkstatt)
- b. IKA Ultraturrax T25 basic mit Rührwerk (Ø 10 mm)
- c. Heidolph Magnetrührer MR3001K mit Magnetrührstab Länge 20 mm, Ø 7 mm.

Die Injektion der ethanolischen Lipidlösung erfolgte mittels folgenden Geräten:

- a. Präzisions-Spritzenpumpe Perfusor® compact S (Fa. Braun, Melsungen), mit 50 ml Original Perfusor® Spritze (Fa. Braun), Kanüle 0,8x120 mm
- b. Hamilton-Spritze aus Glas, Kanüle 0,6x25 mm
- c. Eppendorf-Pipetten
- d. Einmalspritzen (1 bis 10 ml) mit Kanüle 0,9x70 mm

Tabelle 2 gibt einen Überblick über weitere Parameter, deren Einfluss auf die Liposomenherstellung mittels Ethanolinjektion untersucht wurde:

Parameter	Wert
Lipid-Konzentration in Ethanol	50 bis 400 mM
Lipid-Konzentration in Glucose	5 bis 20 mM
Injiziertes Volumen	250 bis 2000 µl
Rührgeschwindigkeit	200 bis 500 Upm (Ultraturrax 11000 Upm)
Temperatur	Raumtemperatur oder 4 °C
Injektionsgeschwindigkeit	Bolus oder 500 µl/Minute
Rührdauer nach beendeter Injektion	0 bis 45 Minuten

Tabelle 2: Untersuchte Parameter der Ethanolinjektions-Methode

2.2. Entfernung des Ethanols aus den Liposomen-Dispersionen

Bei einigen Ansätzen wurde im Anschluss an die Ethanolinjektion der Ethanol aus der Rohdispersion entfernt. Dies geschah durch Tangentialfluss-Filtration mithilfe eines Vivaflow®50 Ultrafiltrationskit versehen mit einer Polyethersulfon-Membran mit einer cut-off-Grenze von 100 kDa (Fa. Sartorius, Göttingen). Die Dispersion wurde mittels einer Peristaltik-Pumpe (Typ Masterflex, mit Easy-Load Pumpenkopf, Fa. Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) mit einer Flussrate von 400 ml/min im Kreis gepumpt und das abgepresste Volumen durch das jeweilige wässrige Dispersionsmedium ersetzt. Die Tangentialfluss-Filtration wurde solange fortgeführt, bis ca. das Zehnfache des ursprünglichen Volumens ausgetauscht wurde. Abbildung 5 zeigt den apparativen Aufbau dieses Verfahrens.



Abbildung 5: Versuchsaufbau der Tangentialfluss-Filtration

2.3. Extrusion der Rohdispersionen

Bei Ansätzen bis zu 10 ml Rehydratvolumen wurde ein 10ml Thermobarrel Extruder (Fa. Lipex, Vancouver, Kanada) verwendet. Nach Zusammenbau des Extruders wurde dieser zweimal mit einem entsprechenden Volumen Glukoselösung gespült. Mittels Stickstoff wurde dann die Suspension bei einem Druck von ca. 4 bar fünf bis zehn Mal durch eine Polycarbonatmembran (Fa. Osmonics, Minnetonka, USA) mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Porenweite von 100 – 400 nm extrudiert. Zur Stabilisierung der Filtermembran wurde diese auf eine so genannte drain disc aus Polyester (Fa. Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) aufgelegt.

In Abbildung 6 ist ein solcher Extruder in zerlegtem Zustand abgebildet.

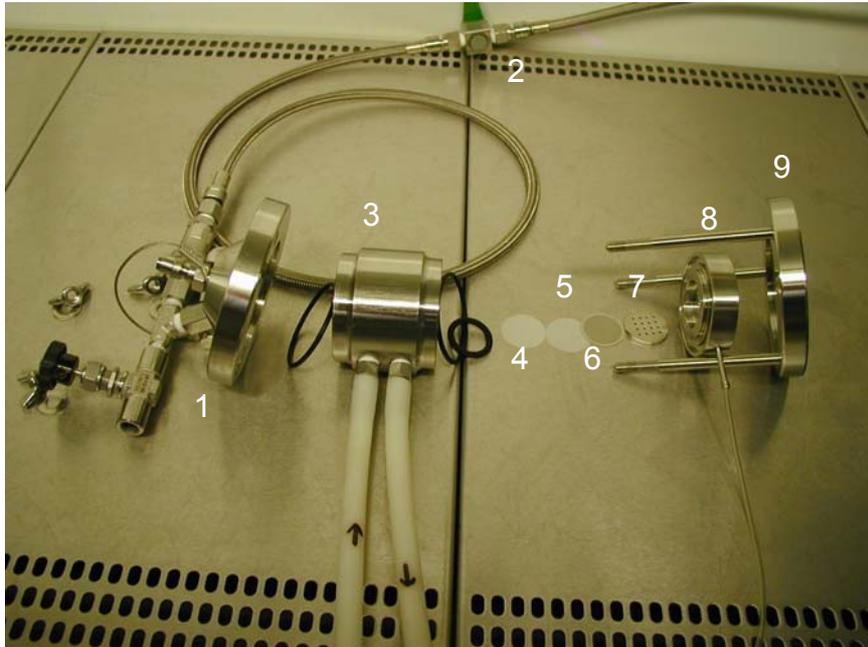


Abbildung 6: Aufbau des 10ml Thermobarrel Extruders

Man erkennt von links nach rechts folgende Bestandteile:

- 1 Oberteil mit Einfüllstutzen, Entlüftung und Stickstoff-Anschluss
- 2 Stickstoff-Regler
- 3 Thermobarrel mit Schläuchen zum Thermostaten
- 4 Extrusionsmembran
- 5 Drain disc
- 6 Stützgewebe aus Stahl
- 7 Stützscheibe aus Stahl
- 8 Bodenplatte mit Ablaufschlauch
- 9 Unterteil mit Gewindestangen

Für Ansätze bis zu 100 ml wurde ein 100 ml Thermobarrel Extruder (Fa. Lipex, Vancouver, Kanada) verwendet. Die Membranen und drain discs sind prinzipiell dieselben, haben aber einen Durchmesser von 47 mm.

Für Ansätze über 500 ml wurde eine Sterilfiltrationseinheit mit Aufgussraum Typ16274 (Fa. Sartorius, Göttingen) mit einem Fassungsvermögen von 2 Litern für die Extrusion verwendet. Auch hier wurden Extrusionsmembranen aus Polycarbonat

der Fa. Osmonics mit einem Durchmesser von 142 mm verwendet. Die stabilisierenden drain discs in dieser Größe wurden von der Fa. Sartorius bezogen. Die Extruder der Fa. Lipex besitzen einen doppelwandigen Stahlmantel und konnten somit temperiert werden. In meinen Versuchen betrug die Temperatur 30 bzw. 4 °C, eingestellt mit einem Kältethermostat RK8KP (Fa. Lauda, Lauda-Königshofen). Die extrudierte Dispersion wurde in einem geeigneten Gefäß aufgefangen, welches bei Bedarf ebenfalls in einem Eisbad gekühlt wurde.

2.4. Sterilfiltration

Die Dispersionen wurden unmittelbar im Anschluss an die Extrusion einmal durch Durapore®-Membran-Filter 0,22 µm GVWP aus Polyvinyliden-Difluorid (Fa. Millipore, Schwalbach) sterilfiltriert. Bei Ansätzen bis 10 ml wurde die Filtration im 10 ml Thermobarrel Extruder, Membrangröße 25 mm, bei größeren Ansätzen im 100 ml Thermobarrel Extruder, Membrangröße 47 mm, durchgeführt. Die Sterilfiltration wurde analog zur Extrusion bei Temperaturen von 30 bzw. 4 °C durchgeführt.

2.5. Lyophilisation

Unmittelbar nach der Extrusion und Sterilfiltration wurden die Proben in Glasvials abgefüllt, die GT-Stopfen locker aufgesetzt und in die GT-Anlage gestellt. Bei den Ansätzen, die unter gekühlten Bedingungen hergestellt wurden, erfolgte die Abfüllung in einem auf 4 °C temperiertem Kühlraum. Bei größeren Ansätzen wurden die Vials vor dem Einbringen in die Gefriertrocknungsanlage gewogen, um das zur Rekonstitution notwendige Volumen bestimmen zu können. Bei der Gefriertrocknungsanlage handelt es sich um den Typ Epsilon 2-D12 (Fa. Christ, Osterode) mit insgesamt 5 Stellplatten mit einer Fläche von 0,79 m² und einer Eiskondensatorkapazität von 12 kg. Die Anlage ist über eine RS232-Schnittstelle mit einem Rechner verbunden, der sowohl die Steuerung der Prozesse, als auch die Aufzeichnung der Prozess-Parameter leistete. Für kleine Ansätze wurden Aliquote à 500 µl in 2 ml - Glasvials abgefüllt, bei größeren Ansätzen wurden jeweils 15 ml Liposomendispersion in 50 ml Vials gegeben.

Das Gefriertrocknungsprotokoll lehnte sich an die Arbeiten von van Winden [163, 166] an: Die Stellflächen-Temperatur wurde von Raumtemperatur auf -40 °C mit einer Geschwindigkeit von 2 °C/min gesenkt und diese Temperatur für 2,5 Stunden gehalten. Die Haupttrocknung erfolgte über 30 Stunden bei einer Temperatur von -40

°C und einem Druck von 0,01 mbar. In der Nachtrocknung wurde die Temperatur auf -30 °C, auf -16 °C und schließlich auf $+20$ °C angehoben und dort jeweils für 5 Stunden getrocknet. Der Druck betrug dabei jeweils 0,001 mbar. Danach wurde mit Stickstoff bis zu einem Kammerdruck von ca. 800 mbar partiell belüftet und die Vials noch in der Anlage verschlossen. In Abbildung 7 ist der schematische Verlauf eines solchen Gefriertrocknungsprozesses dargestellt.

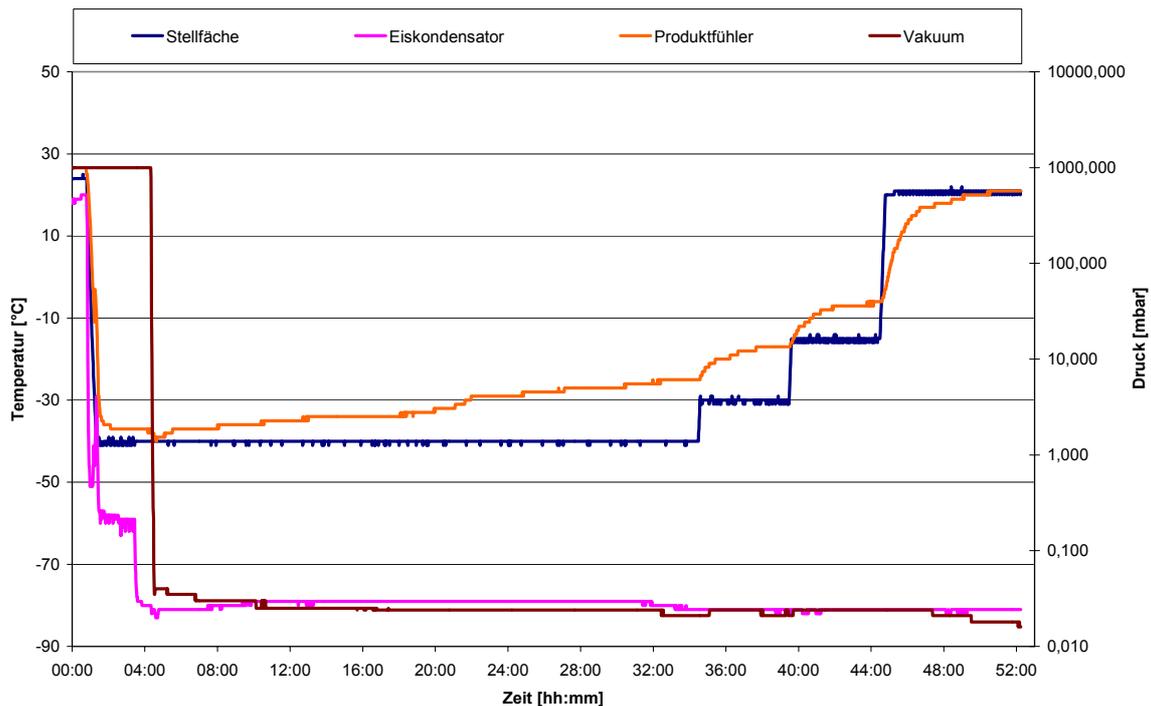


Abbildung 7: Graphische Darstellung eines Gefriertrocknungszyklus

Bei Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 200 ml oder größer wurden die Schritte in der Nachtrocknung auf jeweils 8 Stunden verlängert. Die Temperatur-Druck-Daten wurden als ASCII-File exportiert und mittels eines Visual-Basic-Makro in ein Microsoft-Excel-Datenfile umgewandelt [135].

Nach Beendigung der Lyophilisation wurden die Vials entnommen, mit Bördelkappen fest verschlossen und im Kühlschrank gelagert. Die Rekonstitution erfolgte mittels Reinstwasser.

3. Analytische Methoden

3.1. HPLC-Bestimmung von Paclitaxel

3.1.1. Reagenzien und Lösungsmittel

Methanol Gradient Grade (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

Acetonitril Gradient Grade (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

Tetrahydrofuran (THF) LiChroSolv (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

Triethylamin p.a.

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) p.a. (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

Reinstwasser, entnommen aus Purelab Plus®-Anlage (USF Elga, Siershahn)

Phosphorsäure 85% (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

3.1.2. Probenaufbereitung und Standardlösungen

Von den Liposomendispersionen wurden 200 µl entnommen und in einem HPLC-Vial anfangs mit einer Luftpolsterpipette (z. B. Typ Research, Fa. Eppendorf, Hamburg), später mittels einer Kapillar-Kolbenhub-Pipette (Transferpettor®, Fa. Brand, Wertheim) mit 400 µl Tetrahydrofuran versetzt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Paclitaxel in wässrigen Medien wurde davon ausgegangen, dass aller Arzneistoff in den Liposomen enkapsuliert war, solange keine Kristalle zu beobachten waren.

Als Standards wurden Lösungen von entsprechenden Mengen Paclitaxel in Tetrahydrofuran hergestellt. Diese Lösungen wurden mit 10%iger Trehaloselösung im Verhältnis zwei zu eins verdünnt, um dieselbe Matrixkomposition wie in den Proben zu gewährleisten.

3.1.3. HPLC-Anlage

Pumpe : Ternäre HPLC-Pumpe Typ SP8800 (Fa. Spectra-Physics)

Probengeber : Autoinjektor Typ SIL-6B mit Controller SCL-6B (Fa. Shimadzu, Duisburg)

UV-Detektor Typ UV100 (Fa. ThermoSeparationProducts)

Säule : LiChroCart 250-4 LiChroSpher 60 RP-select B (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

Auswertung mittels PC1000 Software (Fa. Thermoquest)

3.1.4. Fließmittel und Gradient

Eluent A (Elution von Paclitaxel):

400 ml Acetonitril

400 ml Wasser

160 ml Tetrahydrofuran

5 ml Triethylamin

1 g TBAHS

mit Phosphorsäure 85% auf pH 4.0 eingestellt

Eluent B (Elution der Lipide):

900 ml Methanol

60 ml Wasser

160 ml Tetrahydrofuran

5 ml Triethylamin

1 g TBAHS

mit Phosphorsäure 85% auf pH 4.5 eingestellt

Gradient :

Eluent A (0-8 min)

Eluent B (8.2-22 min)

Eluent A (22.2-34 min)

Der Gradient wurde nur bei den Proben angewendet, Standardlösungen wurden über eine Laufzeit von 8 Minuten mit reinem Eluent A analysiert.

3.1.5. Parameter

Flow 1 ml/min

Injektionsvolumen 20 µl

Detektionswellenlänge 227 nm

3.2. Größenbestimmung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie

Verwendet wurde ein Zetamaster® der Fa. Malvern Instruments (Herrenberg). 200 µl der Liposomendispersionen wurden in Polystyrol-Küvetten mit vier optischen Seiten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) eingefüllt und mit 5%iger Glucoselösung auf einen Milliliter verdünnt. Bei Zubereitungen mit höherem Gesamtlipidgehalt konnte auch mehr Glucose-Lösung hinzugegeben werden, die Countraten sollten im Bereich von ca. 100 kCps liegen. Bei der PCS wird nach dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung ein mittlerer intensitätsgewichteter Durchmesser (Z_{ave}) und der Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung der Liposomen bestimmt. Hat der PI einen Wert von maximal 0,06, spricht man von monodisperser Verteilung. Bei Werten zwischen 0,1 und 0,2 kann die Probe noch als eng verteilt angesehen werden. Da unterschiedlich große Partikel auch unterschiedlich starke Messsignale geben, ist der Z_{ave} -Wert ab einem PI >0,25 nur noch im relativen Sinne auswertbar.

3.3. Zeta-Potential-Messung mittels PCS

Als das Zetapotential dispergierter Teilchen bezeichnet man die Potentialdifferenz zwischen der Oberfläche an einer Scherebene und dem Neutralbereich des umgebenden Mediums. Die Bestimmung erfolgte über die Messung der elektrophoretischen Mobilität mittels einem Zetamaster der Fa. Malvern Instruments (Herrenberg). Hierzu wurden 600 µl der Dispersion mit 5,4 ml einer Pufferlösung pH 7,5, bestehend aus 50 mM Kaliumchlorid (Fa. Merck KGA, Darmstadt) und 10 mM TRIS (syn. Trometamol) (ebenfalls Fa. Merck KGA) in 10%iger Trehaloselösung, verdünnt.

3.4. Restfeuchtebestimmung mittels Karl-Fischer-Titration

Verwendet wurde hierzu ein Coulometer 737 KF der Fa. Metrohm (Filderstadt) mit Rührstand 703 TiStand. Lösungsmittel für die Lyophilisate war Hydranal Methanol dry (Fa. Riedel-de-Haën, Sigma Aldrich, Seelze), titriert wurde mit Karl-Fischer-Reagens Hydranal-Coulomat AG (Fa. Riedel-de-Haën)

Vorgehen:

Alle benötigten Reagenzien und Gefäße werden in eine Glovebox aus Plexiglas eingebracht und diese vor Beginn der Arbeiten ca. 1 Stunde mit Stickstoff geflutet.

Zuvor gewogene Vials mit Lyophilisat und leere Vials werden mit ca. 1,5 ml Hydranal Methanol dry gefüllt. Zunächst wurde der Wassergehalt des Methanols aus den beiden leeren Vials bestimmt (=Leerwert). Dazu wurden in eine Spritze ca. 500 µl Methanol aufgezogen, die Spritze tariert und das Methanol dann in die Messzelle eingespritzt. Die leere Spritze wurde zurückgewogen und so die injizierte Masse an Methanol bestimmt. Vor der Probenentnahme aus den produkthaltigen Vials werden diese ebenfalls genau gewogen und somit die zugegebene Menge an Methanol bestimmt. Die Messung erfolgt dann analog der Leerwert-Bestimmung. Nach Ende der Messungen werden die Vials getrocknet und erneut gewogen, um so die Masse des Gefriertrocknungskuchens zu ermitteln. Die Angabe der Restfeuchte erfolgte dann in % (w/w) bezogen auf die Masse des Lyophilisats.

3.5. Kristallisationsvorgänge in paclitaxelhaltigen Liposomen

Die physikalische Haltbarkeit der Paclitaxel-Liposomen ist so lange gegeben, so lange der Arzneistoff in der Lipidmembran eingeschlossen ist. Bedingt durch die geringe Löslichkeit des Paclitaxel in wässrigen Medien setzen unmittelbar nach dem Austritt aus der Membran Kristallisationsvorgänge ein. Ziel der Analytik war es nun, diese Kristalle zu erfassen. Je nach Ansatzgröße bediente ich mich dazu einer der nachfolgend beschriebenen Methoden.

3.5.1. Lichtblockademessungen

Für größere Ansätze mit einem Volumen von 15ml je Vial wurde das Lichtblockade-Gerät PAMAS-SVSS-C mit Sensor HCB-LD-25/25 (Fa. PAMAS, Partikelmess- und Analysesysteme GmbH, Rutesheim) verwendet. Die Proben wurden nach der Rekonstitution ca. 10 Minuten gelagert, bis mit bloßem Auge keine Luftblasen mehr zu erkennen waren. Das Analysenvolumen betrug mindestens 0,3 ml, zur Auswertung wurde dabei der Mittelwert aus drei Messungen herangezogen. Wann immer möglich, wurde auf eine Verdünnung der Proben verzichtet. Vor jeder Messung wurden die Proben kurz umgeschwenkt, um eventuelle Sedimente aufzuwirbeln. Die Proben wurden unmittelbar nach der Rekonstitution und danach in definierten Zeitabständen vermessen, zwischen den Messungen wurden die Vials im Kühlschrank gelagert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software PMA Partikel-Mess- und Analyseprogramm Version 1.28 (Fa. PAMAS). Sämtliche Partikelangaben beziehen sich auf ein Analysenvolumen von 1 ml und sind kumulativ wiedergegeben.

Das Gerät kann in 16 verschiedenen Klassen Partikel zwischen 1 und 200 μm erfassen. Zur besseren Übersicht beschränkte ich mich zur Auswertung auf die vier Klassen $>1 \mu\text{m}$, $>4,1 \mu\text{m}$, $>10 \mu\text{m}$ und $>25 \mu\text{m}$.

3.5.2. Visuelle Inspektion der Zubereitungen

Da vergleichende Partikelmessungen wie in Abschnitt 3.5.1 für die kleinen Ansätze von jeweils 500 μl je Vial nicht praktikierbar waren, wurden diese mit bloßem Auge auf Kristallisationsvorgänge hin begutachtet. Die Proben wurden unmittelbar nach der Rekonstitution und danach in definierten Zeitabständen unter Umschwenken betrachtet, zwischen den Messungen wurden die Vials im Kühlschrank gelagert. Als Lichtquelle eignet sich hierzu am besten Tageslicht. Für das menschliche Auge liegt die untere Grenze der Sichtbarkeit bei ungefähr 40 μm , d.h. diese Methodik ist weniger sensitiv als die oben beschriebene Lichtblockademessung. Da jedoch, sobald erste Kristallisationskeime vorhanden sind, die Kristallisation relativ rasch verläuft, wurde diese Ungenauigkeit in Kauf genommen. In der Tat sind einzelne Paclitaxel-Kristalle selten zu beobachten gewesen, diese wurden sehr rasch von einer deutlicheren Trübung abgelöst. Vollständig ausgefallenes Paclitaxel zeigt deutliche Flockenbildung. Abbildung 8 zeigt links eine stabile Formulierung, während rechts eine Zubereitung mit deutlichen Ausflockungen abgebildet ist.



Abbildung 8: Stabile und instabile Liposomendispersionen

Da mit dieser Methode selten ein genauer Zeitpunkt angegeben werden kann, wurde als Ergebnis oftmals ein Zeitintervall zwischen der letzten Beobachtung einer intakten Probe und den ersten Anzeichen der Instabilität angegeben.

III. Ergebnisse

1. Einfluss von Formulierungshilfsstoffen

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde versucht, durch die Verwendung von verschiedenen Hilfsstoffen die enkapsulierbare Menge an Paclitaxel zu erhöhen. Wie in Abschnitt I.6.3.4. bereits beschrieben, war der Literatur zufolge eine Encapsulierung von 3 mol% Paclitaxel als Maximum anzusehen. Diese Grenze definierten z.B. Sharma und Straubinger für Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol, die ihren Ergebnissen zufolge aus über 300 Formulierungen die höchste Einschlusskapazität für Paclitaxel zeigten [147]. Das Ziel unserer Versuche war, zumindest diese Menge Paclitaxel in kationische Liposomen einzuarbeiten, sowie die Stabilität der Zubereitungen für einen möglichst langen Zeitraum zu gewährleisten.

1.1. Lysolipide

Diese Versuche stützten sich auf die Untersuchungen Needhams und Sarpals, die feststellten, dass sich in Liposomen mit relativ weichen, dehnbaren Membranen größere Mengen an Paclitaxel enkapsulieren lassen, als in solche mit rigideren Membranen [122]. Zur Herstellung dieser Liposomen verwendeten sie unterschiedliche Mengen an 1-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (MOPC), einem so genannten Lysolipid, dessen Fettsäurekette an Position C2 des Glycerols durch eine Hydroxyl-Gruppe ersetzt wurde. Mit einem Anteil von 20 mol% MOPC in der Liposomenmembran erzielten Needham und Sarpal eine Encapsulierung von 2mM Paclitaxel, entsprechend 12,5 mol%. Angaben über die Haltbarkeit dieser Zubereitung werden aber nicht gegeben.

In unserer Versuchsreihe wurden Liposomen mit einem MOPC-Gehalt von 10 und 20% bei einem DOTAP-Gehalt von 40 und 50 %, sowie Paclitaxel-Anteilen von 3, 5, 7 und 10 % hergestellt, als Hilfslipid wurde in entsprechenden Anteilen DOPC verwendet. Eine Übersicht der Ansätze gibt Tabelle 3. Die Gesamtlipidmenge betrug jeweils 10 mM, das Dispersionsmedium war 5%ige Glucoselösung. Die Ansätze wurden mittels Filmmethode und anschließender Extrusion in einer Größenordnung

von 4 ml hergestellt. Das Rehydrat wurde vor einer 5maligen Extrusion durch eine 200nm-Membran über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Ziel der Versuche war vor allem die Beobachtung der Stabilität der erhaltenen Liposomen. Diese erfolgte makroskopisch auf Kristallisationsvorgänge, durch Größenmessungen mittels PCS und Gehaltsbestimmung von Paclitaxel mittels HPLC.

	DOTAP (mol%)	DOPC (mol%)	MOPC (mol%)	Paclitaxel (mol%)
FG7	50	37	10	3
FG8		35		5
FG9		33		7
FG19		30		10
FG10		27	20	3
FG11		25		5
FG12		23		7
FG20		20		10
FG13	40	47	10	3
FG14		45		5
FG15		43		7
FG21		40		10
FG16		37	20	3
FG17		35		5
FG18		33		7
FG22		30		10

Tabelle 3: Versuchsreihe zur Abklärung des Einflusses von MOPC als Membranbestandteil

Zunächst konnte eine überraschend hohe Stabilität der Liposomenformulierungen selbst mit hohem theoretischem Paclitaxel-Gehalt beobachtet werden. So waren Formulierungen mit einer Einwaage von 10 mol% Paclitaxel über einen Zeitraum von einer Woche stabil. Dies lag jedoch, wie sich bei der Auswertung der chromatographischen Gehaltsbestimmung von Paclitaxel herausstellte, daran, dass

die extrudierten Liposomen nur noch einen Bruchteil des eingesetzten Paclitaxels enthielten. Abbildung 9 zeigt dieses Phänomen anhand der Chargen mit jeweils 20 mol% MOPC:

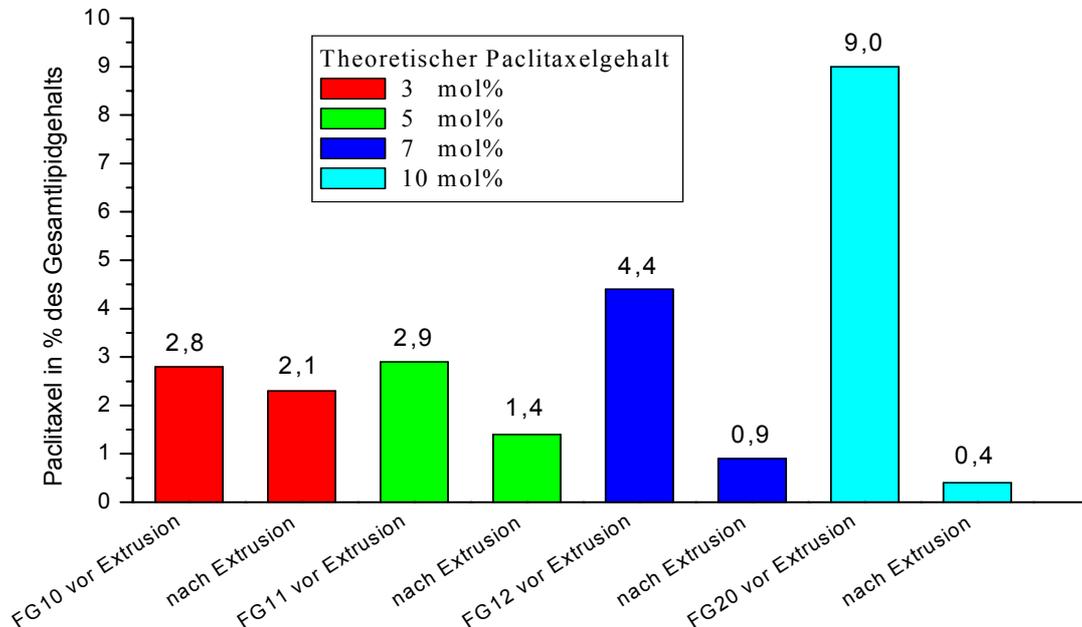


Abbildung 9: Paclitaxelgehalt der Chargen FG10-12 und FG20 vor bzw. nach der Extrusion

Anhand der Graphik kann man erkennen, dass der Paclitaxel-Gehalt nach der Extrusion um so kleiner ist, je größer der Gehalt vor der Extrusion war, d.h. der relative Anteil an offensichtlich zurückgehaltenem Material steigt mit der Konzentration sehr stark an.

Weiterhin ist zu erkennen, dass der Paclitaxelgehalt vor der Extrusion in einigen Fällen ebenfalls nicht der eingesetzten Menge entsprach. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

- Paclitaxel ist bereits vor der Extrusion aus den Liposomenmembranen ausgetreten. Durch die Trübung der Roh-Dispersionen könnte dann die Kristallisation unbemerkt geblieben sein.
- Die Herstellungsmethode war aufgrund der relativ geringen Erfahrung bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht genügend reproduzierbar.
- Song et al. berichten über die Adsorption von Paclitaxel an Glas-Behältnisse aus einer 1%igen Methanol-Lösung [153]. Diesen Ergebnissen wird zum einen aber von

MacEachern-Keith et al. widersprochen [105], zum anderen sollte die Abnahme dann bei allen Formulierungen auftreten.

Zu diesem Zeitpunkt wurde der Klärung dieses Umstands zunächst geringe Aufmerksamkeit geschenkt, da die Zielsetzung die Untersuchung der Stabilität der extrudierten Zubereitungen war.

Für die weitere Stabilitätsprüfung über einen Zeitraum von 6 Wochen wurden die Chargen mit 3 mol% Paclitaxel herangezogen (FG7, FG10, FG13, FG16).

Makroskopisch konnte bei diesen vier Formulierungen über diesen Zeitraum keine Bildung von Paclitaxel-Kristallen beobachtet werden.

Auch die Beobachtung der Größe und des Polydispersitätsindizes der Liposomen lassen den Schluss zu, dass diese vier Chargen über den gesamten Zeitraum der Beobachtungen in Bezug auf diese beiden Parameter gleich bleibende Qualität aufweisen. Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für Charge FG10:

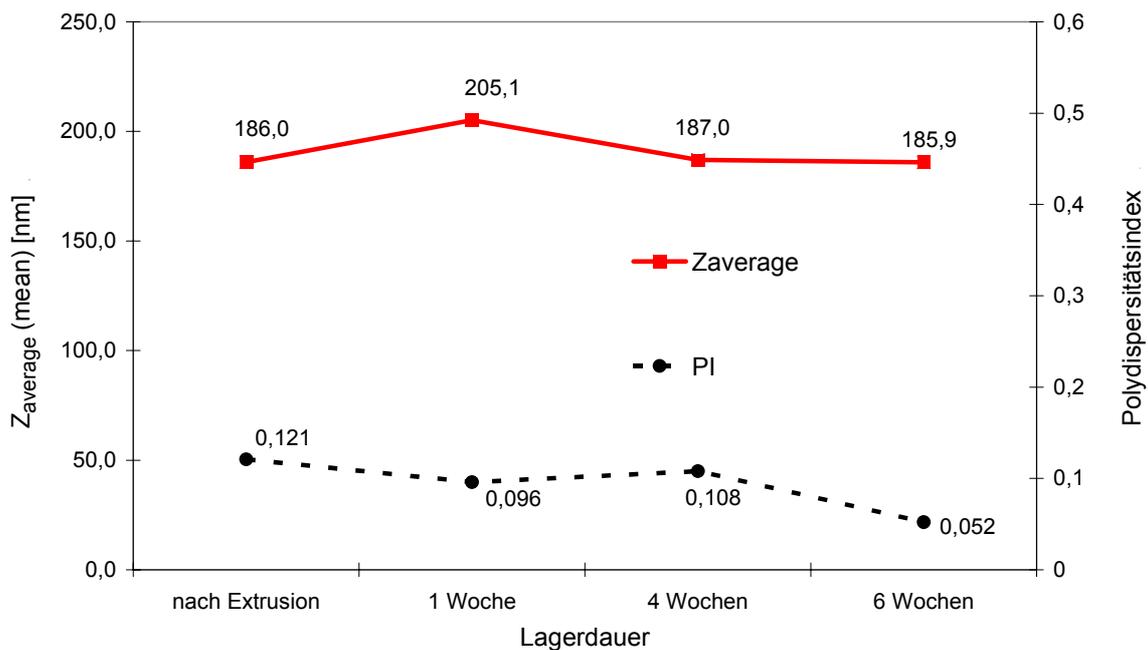


Abbildung 10: Entwicklung von Größe und PI der Charge FG10 über 6 Wochen Lagerung

Bei der Betrachtung des Paclitaxel-Gehalts ließ sich weiterhin feststellen, dass dieser in 6 Wochen Lagerzeit auf ca. 1,9 bis 2,0 mol% absank, unabhängig davon, wie hoch die Konzentration zu Beginn der Lagerung war (siehe Abbildung 11).

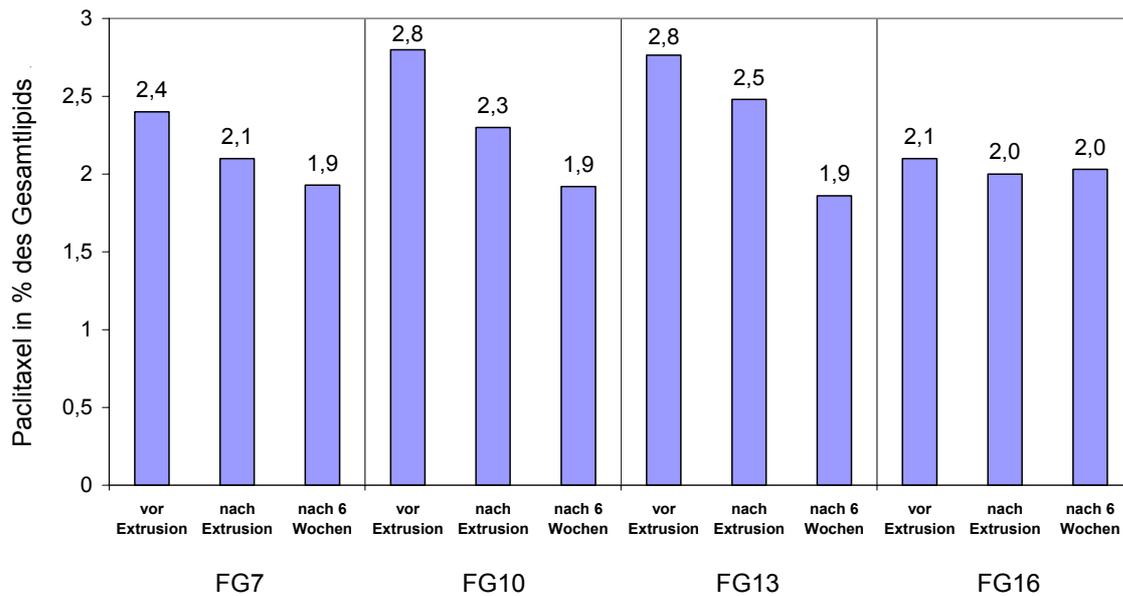


Abbildung 11: Paclitaxelgehalt nach 6 Wochen Lagerung

Für das Absinken des Paclitaxelgehaltes während der Lagerung könnten die folgenden Faktoren verantwortlich sein:

- a) oben beschriebene Adsorption an Glasoberflächen.
- b) Abbau des Paclitaxels zu verschiedenen Degradationsprodukten. Es war bis zu diesem Zeitpunkt wenig über die chemische Stabilität von Paclitaxel bekannt. Erst in späteren Versuchen wurde bei der Gehalts-Bestimmung mittels HPLC die Anwesenheit von Abbauprodukten mit untersucht.
- c) Ein Austreten aus der Membran während der Lagerung ist unwahrscheinlich. Bei den Differenzen handelt es sich um Paclitaxelmengen zwischen 68 und 204 μg in 4ml wässrigem Medium. Bei einer Löslichkeit von Paclitaxel in Wasser von 0,5 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 430 $\mu\text{g/L}$ sollten sich bereits Kristalle gebildet haben. Dies ist aber nicht beobachtet worden.

Eine endgültige Klärung dieses Phänomens erfolgte zunächst nicht, die Thematik wird aber in Abschnitt IV.3.1. eingehender diskutiert.

Es konnte mit obiger Versuchsreihe gezeigt werden, dass kationische Liposomen mit MOPC als Membranbestandteil hergestellt werden können, die mit einem Paclitaxel-Gehalt von ca. 2 mol% über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen lagerstabil sind. Ein positiver Einfluss von MOPC im Hinblick auf eine Erhöhung der Paclitaxelbeladung dieser Liposomen konnte aber nicht bewiesen werden.

Verantwortlich dafür war unter anderem der hohe Paclitaxelverlust bei der Extrusion. Diese Beobachtung ist nur so zu erklären, dass während der Lagerung im Kühlschrank Paclitaxel aus dem Lipid-Bilayer in die Glucoselösung austritt, um sich dann bei der Extrusion auf der Membran abzuscheiden.

In den folgenden Versuchen wurde daher der Behandlung des Rehydrats und die Auswirkungen auf dessen Qualität besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Die nächsten Chargen wurden in Analogie zu den vorangegangenen mittels Filmmethode und anschließender Extrusion hergestellt. Die Gesamtlipidmenge betrug ebenfalls 10 mM, die Zusammensetzung war DOTAP:DOPC:MOPC:Paclitaxel in einem molaren Verhältnis von 50:35:10:5. Die Herstellungstemperatur des Rehydrats variierte von 6 °C (FG29) über Raumtemperatur (FG27) bis 40 °C (FG28). Die Rehydrate wurden jeweils in drei Aliquote geteilt, die Extrusion erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Rehydratbildung, nach einer bzw. nach drei Stunden.

Bei allen drei hergestellten Chargen war das Rehydrat makroskopisch über eine Stunde stabil. Die Rehydrate, die bei 6 °C (FG29) bzw. bei Raumtemperatur (FG27) hergestellt wurden, waren auch nach drei Stunden makroskopisch unverändert. Die Stabilität der Rehydrate resultierte in einem unveränderten Paclitaxel-Gehalt der extrudierten Proben. Bei Charge FG28 zeigte sich das Rehydrat nach 3 Stunden Lagerdauer deutlich flockig und schlierig, die im Anschluss extrudierte Probe enthielt nur noch 45 % der ursprünglichen Arzneistoffmenge (siehe Tabelle 4 und Abbildung 12).

	FG29 (6 °C)	FG 27 (RT)	FG28 (40 °C)
vor Extrusion	3,70	3,91	4,05
sofort extrudiert	3,37	3,69	4,24
nach 1h extrudiert	3,72	3,53	3,57
nach 3h extrudiert	3,02	4,13	1,85

Tabelle 4: Paclitaxelgehalt in mol% der Chargen FG27-29 nach unterschiedlichen Standzeiten des Rehydrats

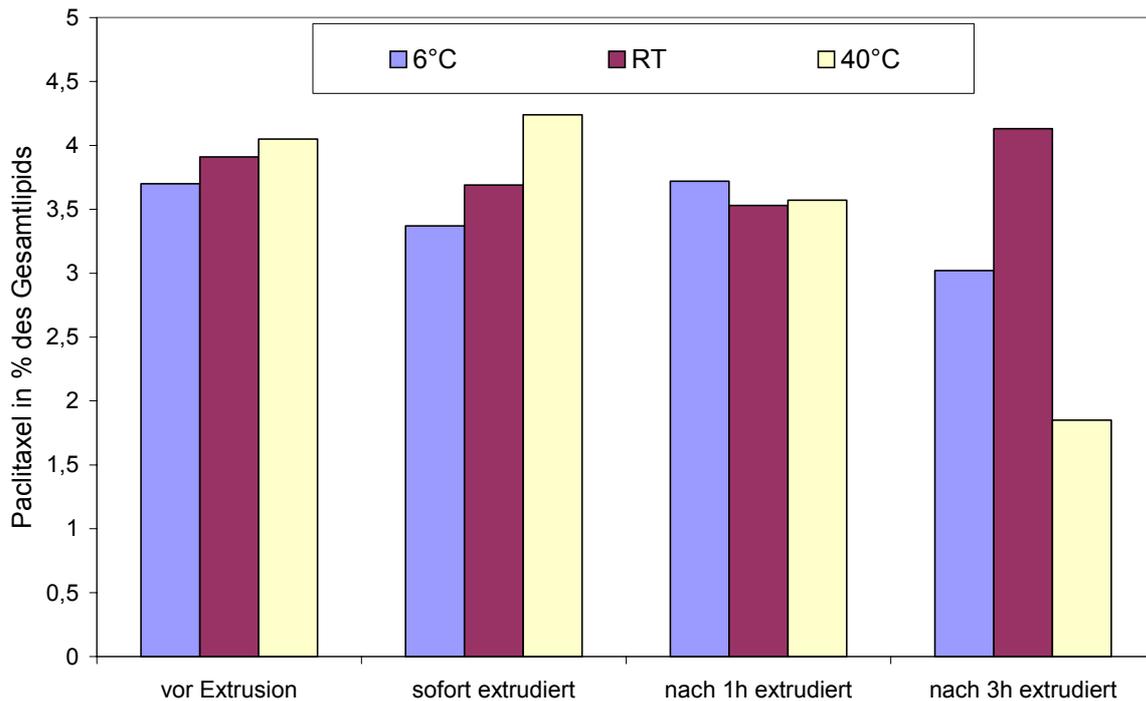


Abbildung 12: Paclitaxelgehalt der Chargen FG27-29 nach unterschiedlichen Standzeiten des Rehydrats

Die im Kühlschrank gelagerten Extrudate wurden über einen Zeitraum von einer bzw. zwei Wochen beobachtet. Eine Woche nach Extrusion waren alle drei Chargen noch frei von sichtbaren Paclitaxel-Kristallen, nach zwei Wochen jedoch waren alle Ansätze instabil.

Anhand dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von MOPC bis zu 4 mol% Paclitaxel über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen stabil in kationische Liposomen eingeschlossen werden kann.

Voraussetzung dafür ist allerdings eine schnelle Verarbeitung des hergestellten Rehydrats. Als maximaler Zeitraum für die Extrusion ergeben sich drei Stunden nach der Rehydratherstellung.

Die Rehydratherstellung bei 6 °C zeigte sich hier der Herstellung bei Raumtemperatur nicht überlegen, es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass damit die Verwendungsdauer des Rehydrats weiter erhöht werden kann.

In der folgenden Versuchsreihe sollte der Einfluss der zur Liposomenherstellung verwendeten MOPC-Menge untersucht werden. Von besonderem Interesse war, ob bereits geringe MOPC-Mengen zur Encapsulierung größerer Paclitaxel-Anteile

ausreichen. Hierzu wurden Liposomen mit einem DOTAP-Gehalt von 50 % und einem Paclitaxel-Anteil von 5 % hergestellt. Der MOPC-Gehalt variierte zwischen 0%, 3% und 5% bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration, die auch hier 10 mM betrug (siehe auch Tabelle 5).

	DOTAP (mol%)	DOPC (mol%)	MOPC (mol%)	Paclitaxel (mol%)
FG30	50	40	5	5
FG31	50	42	3	5
FG32	50	45	0	5

Tabelle 5: Rezeptur der Chargen FG30-32

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung zeigt Abbildung 13. Auch hier zeigt sich, dass der Paclitaxelverlust nach Extrusion durch eine möglichst kurze Standzeit des Rehydrats vermindert werden kann.

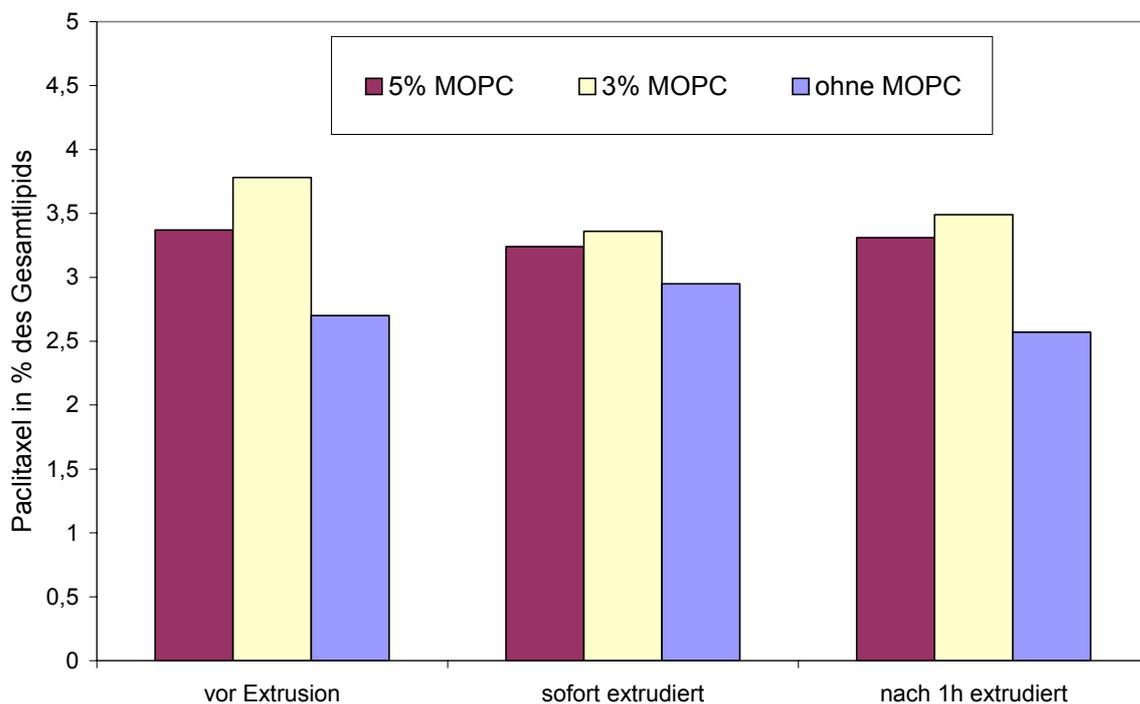


Abbildung 13: Paclitaxelgehalt der Ch. FG30-32 nach unterschiedlichen Standzeiten des Rehydrats

Auffallend aber auch hier, dass keine Zubereitung den deklarierten Gehalt an Paclitaxel erreicht.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Es konnte belegt werden, dass eine schnelle Verarbeitung des Rehydrats die Einkapsulierung auch größerer Mengen (ca. 4 mol%) Paclitaxel ermöglicht.

In allen Chargen konnten eine Woche nach der Extrusion bereits Paclitaxel-Kristalle beobachtet werden. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die nötige Menge an MOPC zur Verlängerung der Stabilität paclitaxelhaltiger Liposomen im Bereich von 10 % des Gesamtlipids oder sogar darüber liegen sollte. Damit lässt sich aber lediglich eine Haltbarkeit des Extrudats von einer bis zwei Wochen erzielen. Da diese Haltbarkeit für eine liposomale Arzneiform aber nicht ausreichend ist, und unter Berücksichtigung der Toxizität des MOPC, als Lysolipid besitzt es hämolytische Eigenschaften, wurden die Versuche mit diesem Hilfsstoff an dieser Stelle abgebrochen.

1.2. Tenside

In der Liposomentechnologie haben Tenside unter verschiedenen Gesichtspunkten bereits Anwendung gefunden. Chandaroy et al. benutzten Pluronic® F127 um eine temperaturkontrollierte Wirkstofffreisetzung aus DOPC/Cholesterol-Liposomen zu bewirken [30]. Andere Poloxamere wurden von Jamshaid et al. dazu benutzt, die Oberfläche von Liposomen zu hydrophilisieren und so deren Zirkulationsdauer im Körper zu verlängern [90].

In dieser Arbeit wurde versucht, durch die Kombination der solubilisierenden Eigenschaften von Tensiden und Lipiden die Enkapsulierungseffizienz und Stabilität von Paclitaxel-Liposomen zu erhöhen. Zur Auswahl standen im Sinne der Zielsetzung lediglich intravenös applizierbare Tenside. Genauer untersucht wurden Lutrol®F68, Tween®80 und Solutol®HS15.

1.2.1. Vorversuche an DOTAP-DOPC-Liposomen

In ersten Versuchen wurde untersucht, inwieweit Liposomen aus gleichen Teilen DOTAP und DOPC in der Gegenwart verschiedener Mengen an Tensiden überhaupt stabil sind. Dazu wurden Lyophilisate der Lipide in Trehalose aus einer anderen Versuchsreihe mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen der oben genannten Tenside rekonstituiert und die Größe und Teilchengrößenverteilung mittels PCS untersucht.

In den nachfolgenden Tabellen 6 bis 8 sind die Ergebnisse dieser Versuche dokumentiert:

Rekonstitutionsmedium	Größe (nm)	PI
Reinstwasser	182,1	0,268
0,01%ige Tween-80-Lösung	184,8	0,242
0,03%ige Tween-80-Lösung	172,0	0,251
0,05%ige Tween-80-Lösung	174,2	0,262
0,07%ige Tween-80-Lösung	175,8	0,276
0,1%ige Tween-80-Lösung	176,4	0,242

Tabelle 6: PCS-Ergebnisse der Rekonstitution von DOTAP-DOPC-Lyophilisaten mit Tween®80-Lösungen bzw. Reinstwasser

Rekonstitutionsmedium	Größe (nm)	PI
Reinstwasser	188,8	0,321
0,1%ige Lutrol®F68-Lösung	170,4	0,307
0,2%ige Lutrol®F68-Lösung	170,5	0,322
0,3%ige Lutrol®F68-Lösung	175,1	0,296
0,4%ige Lutrol®F68-Lösung	169,0	0,259
0,5%ige Lutrol®F68-Lösung	176,2	0,246

Tabelle 7: PCS-Ergebnisse der Rekonstitution von DOTAP-DOPC-Lyophilisaten mit Lutrol®F68-Lösungen bzw. Reinstwasser

Rekonstitutionsmedium	Größe	PI
Reinstwasser	154,3	0,286
0,03%ige SolutolHS15-Lösung	144,2	0,148
0,05%ige SolutolHS15-Lösung	152,5	0,289
0,1%ige SolutolHS15-Lösung	152,2	0,341

Tabelle 8: PCS-Ergebnisse der Rekonstitution von DOTAP-DOPC-Lyophilisaten mit Solutol®HS15-Lösungen bzw. Reinstwasser

Es lassen sich anhand der Ergebnisse folgende Aussagen treffen:

- Die Liposomengröße nimmt durch den Tensidzusatz geringfügig ab. Bei Tween®80 und Pluronic®F68 beträgt die maximale Abnahme ca. 5%, bei Solutol®HS15 ist der Effekt noch sehr viel geringer.
- Die Teilchengrößenverteilung der Liposomendispersionen wird durch Zugabe von Tensiden wenig bzw. nicht eindeutig beeinflusst. Lediglich bei Verwendung von Lutrol®F68 ist eine geringfügige Abnahme zu beobachten
- Der Zusammenhang zwischen Tensidkonzentration und Änderung von Teilchengröße bzw. Polydispersitätsindex ist nicht linear.
- Die Liposomen scheinen durch die zugesetzten Mengen an Tensiden nicht in ihrer Integrität beeinträchtigt.

1.2.2. Herstellung paclitaxelhaltiger Liposomen mit Tensiden

Ausgehend von den vorangegangenen Erfahrungen wurden weitere Versuche nun mit den höchsten getesteten Tensid-Konzentrationen durchgeführt, also Pluronic®F68 0,5%, Tween®80 und Solutol®HS15 jeweils 0,1%.

Die Liposomen wurden hierzu mittels Ethanolinjektion hergestellt. Dazu wurden 1mmol DOTAP, 0,9 mmol DOPC und 0,1 mmol Paclitaxel in 5,0 ml Ethanol gelöst. Von dieser Lösung wurden 250 µl in 9,75 ml gekühlte 10%ige Trehaloselösung injiziert, die das jeweilige Tensid in der entsprechenden Konzentration gelöst enthielt. Gerührt wurde mit einem Magnetrührfisch in einem Becherglas bei 400 U/min. Die Dispersionen wurden anschließend extrudiert, sterilfiltriert und in Aliquoten zu 600 µl in 2R-Vials lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden dann mit Reinstwasser rekonstituiert und hinsichtlich Paclitaxelgehalt, Größe und Polydispersität untersucht.

1.2.2.1 Ergebnisse mit Solutol®HS15

Zunächst fiel auf, dass die Zubereitung nach der Lyophilisation relativ trübe erschien. Die Ergebnisse der Analytik zeigt Tabelle 9:

	Paclitaxelgehalt (mol%)	Größe (nm)	PI
Vor Lyophilisation	4,60	201,8	0,09
Nach Lyophilisation	4,53	203,1	0,402

Tabelle 9: Paclitaxelhaltige Liposomen mit Solutol®HS15 vor bzw. nach Lyophilisation

Der Paclitaxelgehalt und der mittlere Teilchendurchmesser blieben also unverändert, wohingegen die Teilchengrößenverteilung deutlich breiter wurde.

1.2.2.2 Ergebnisse mit Lutrol®F68

Während der Extrusion und Sterilfiltration war hier starke Schaumbildung zu beobachten. Die Trübung dieser Dispersion nach Rekonstitution war noch ausgeprägter als bei obiger Charge. Die Begründung hierfür liefern die analytischen Daten. Während der Paclitaxelgehalt konstant blieb, stiegen hier sowohl der Polydispersitätsindex, als auch die Teilchengröße durch die Lyophilisation stark an (siehe Tabelle 10).

	Paclitaxelgehalt (mol%)	Größe (nm)	PI
Vor Lyophilisation	4,74	219,2	0,129
Nach Lyophilisation	4,90	338,0	0,514

Tabelle 10 : Paclitaxelhaltige Liposomen mit Lutrol®F68 vor bzw. nach Lyophilisation

1.2.2.3 Ergebnisse mit Tween®80

Die Zubereitungen mit 0,1% Tween®80 lieferten ein anderes Bild. Die makroskopische Erscheinungsweise erschien nach der Lyophilisation nahezu unverändert opaleszent. Wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, liefert diese Formulierung den niedrigsten Polydispersitätsindex der drei Ansätze. Der Paclitaxelgehalt blieb wiederum konstant, augenfällig ist die starke Abnahme der Partikelgröße, die allerdings wie in späteren Kapiteln beschrieben, kein spezielles Phänomen bei der Verwendung von Tensiden, sondern vielmehr auf das Herstellungsverfahren zurückzuführen ist.

	Paclitaxelgehalt (mol%)	Größe (nm)	PI
Vor Lyophilisation	4,71	220,7	0,098
Nach Lyophilisation	4,87	143,6	0,291

Tabelle 11: Paclitaxelhaltige Liposomen mit Tween®80 vor bzw. nach Lyophilisation

Aus diesen Versuchen ging Tween®80 als das am besten zur Herstellung von Liposomendispersionen geeignete Tensid hervor. Während die bloße Herstellung von Liposomen mittels Ethanolinjektion auch mit den beiden anderen getesteten Tensiden möglich ist, wurden bei ihrer Anwendung in Gefriertrocknungsprozessen die Membranintegrität und die Homogenität der Vesikel deutlich beeinträchtigt.

1.2.3. Auswirkungen auf die Kurzzeitstabilität

Es wurde nun der Einfluss von 0,1% Tween®80 auf die Kurzzeitstabilität von paclitaxelhaltigen, kationischen Liposomen untersucht. Die Herstellung verlief, wie in Kapitel III.1.2.2. beschrieben, mittels Ethanolinjektion mit anschließender Extrusion, Sterilfiltration und Gefriertrocknung.

Die einzelnen Schritte erfolgten in einem auf 4 °C temperiertem Raum. Auch die Trehaloselösung und der Extruder wurden zuvor im Kühlschrank gelagert.

Nach erfolgter Sterilfiltration wurde die Dispersion in Aliquoten zu 15 ml in 6R-Vials eingefüllt, verschlossen und einzeln gewogen, um das Rekonstitutionsvolumen zu erhalten.

Die Lyophilisate wurden im Anschluss mit Reinstwasser rekonstituiert und hinsichtlich Paclitaxelgehalt, Teilchengröße und Polydispersität analysiert. Die Stabilität konnte bei diesem größeren Ansatz mittels Lichtblockademessungen verfolgt werden. Wie Abbildung 14 an Stichproben aus 3 verschiedenen Vials zeigt, bleibt in Analogie zu obigen Ergebnissen der Paclitaxelgehalt vor und nach Lyophilisation unverändert.

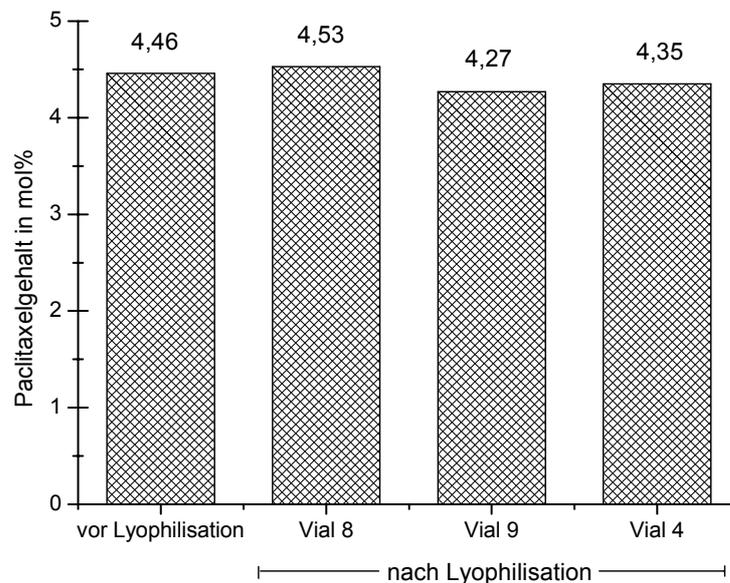


Abbildung 14: Paclitaxelgehalt in Tween®80-haltigen kationischen Liposomen vor bzw. nach Lyophilisation

Wie in vorangegangenen Versuchen beobachtet, nahm auch hier die Größe der Teilchen durch Lyophilisation und Rekonstitution ab und die Breite der Teilchengrößenverteilung zu. Das Ausmaß dieser Veränderungen lag in akzeptablen Grenzen und ist in Abbildung 15 grafisch dargestellt.

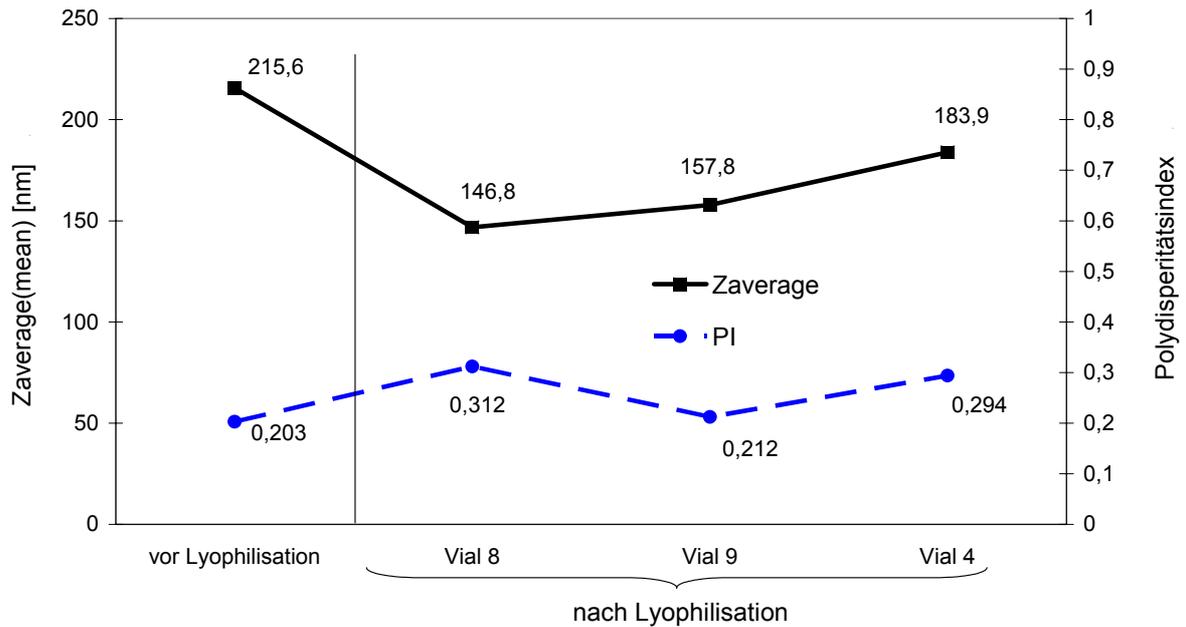


Abbildung 15: Liposomengröße und Größenverteilung in Tween®80-haltigen kationischen Liposomen vor bzw. nach Lyophilisation

Die in-use-Stabilität nach Rekonstitution wurde mittels Lichtblockademessungen im PAMAS-Gerät durchgeführt. Hierzu wurden unmittelbar nach der Rekonstitution und danach in bestimmten Zeitabständen die Anzahl an Partikeln mit einer Größe über 1µm, über 4,1 µm, über 10 µm sowie über 25 µm Größe erfasst und grafisch aufgetragen. Das sukzessive Auftreten von immer größeren Partikeln wurde als Indiz für einsetzende Kristallisation von Paclitaxel gewertet.

Als Ergebnis dieser Versuche kann man festhalten, dass die Verwendung von Tween®80 auf die Stabilität der rekonstituierten Proben einen eher geringen Effekt ausübt. Wie Abbildung 16 zeigt, lässt sich das Einsetzen eines Partikelwachstums nach einer Lagerdauer von ca. 24 Stunden beobachten. Dies ist, wie später gezeigt wird, in etwa genauso lang wie ohne die Verwendung von Tween®.

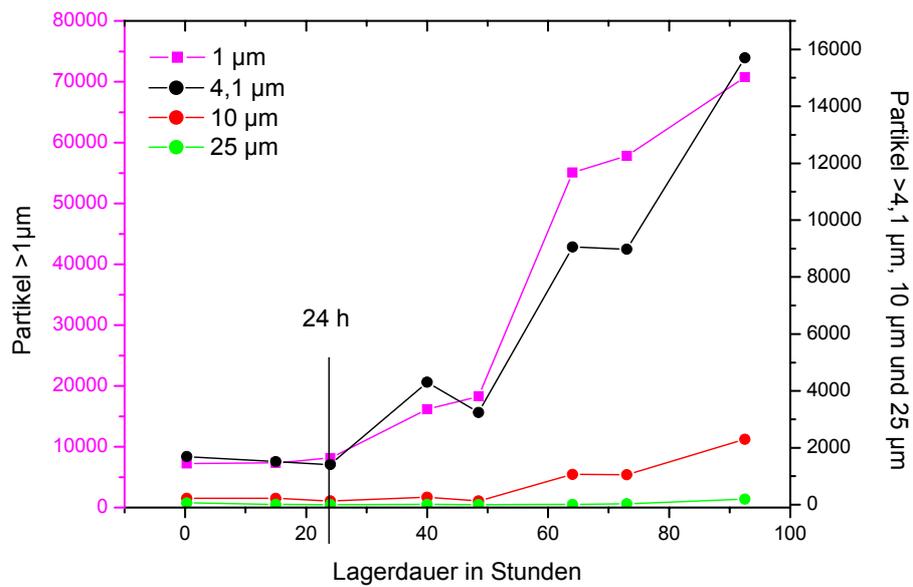


Abbildung 16: Ergebnisse der Lichtblockademessung von Tween®80-haltigen kationischen Liposomen

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse:

Mittels Ethanolinjektion sind liposomale Zubereitungen mit Solutol®HS15, Lutrol®F68 und Tween®80 herstellbar.

Sollen diese Dispersionen anschließend gefriergetrocknet werden, übt Tween®80 den geringsten Einfluss auf Liposomendurchmesser und Polydispersität aus.

Tween®80 bietet jedoch in der untersuchten Konzentration von 0,1% (w/w) keinen Vorteil bei der stabilen Encapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen.

2. Optimierung des Herstellungsverfahrens

Parallel zur Optimierung der Rezeptur wurde versucht, durch Modifikationen des Herstellungsverfahrens die Haltbarkeit paclitaxelhaltiger, kationischer Liposomen positiv zu beeinflussen.

2.1. Filmmethode mit Extrusion und anschließender Gefriertrocknung

Die Lyophilisation bietet eine Möglichkeit zur Stabilisierung von in wässrigem Milieu instabilen Produkten. Obwohl die Erhaltung der Lipid-bilayer-Struktur während Trocknungsprozessen nicht unproblematisch ist, ist die Gefriertrocknung von Liposomen in der Literatur eingehend beschrieben (siehe Kapitel I.2.5.).

In den nachfolgenden Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit die Lyophilisation zur Stabilisierung paclitaxelhaltiger, kationischer Liposomen geeignet ist. Ausgehend von den in Abschnitt III.1. beschriebenen Erfahrungen mit Hilfsstoffen, wurden diese Versuche mit Liposomen aus DOTAP, DOPC und Paclitaxel durchgeführt. Der DOTAP-Anteil betrug dabei stets 50 mol%, der Paclitaxel-Anteil variierte zwischen 0 und 10 mol%, die Menge an DOPC wurde dementsprechend angepasst. Eine Übersicht über die hergestellten Chargen gibt Tabelle 12:

	DOTAP (mol%)	DOPC (mol%)	Paclitaxel (mol%)
FG52	50	47	3
FG53	50	45	5
FG54	50	43	7
FG55	50	40	10
FG56	50	50	0

Tabelle 12: Zusammensetzung der Chargen zur Herstellung mittels Filmmethode mit Extrusion und anschließender Lyophilisation

Die Gesamtlipidkonzentration betrug jeweils 5 mM in 5%iger Glucoselösung. Die Herstellung erfolgte mittels Filmmethode und Extrusion bei Raumtemperatur durch eine 200 nm-Membran in einer Ansatzgröße von jeweils 10 ml.

Unmittelbar nach der Extrusion wurden die Proben in Aliquoten zu 500 µl in Glasvials eingefüllt, die Stopfen locker aufgesetzt und in die Gefriertrocknungsanlage überführt. Das Gefriertrocknungsprotokoll wurde bereits in Kapitel II.2.5. beschrieben. Die Rekonstitution der Proben erfolgte mit Reinstwasser.

Die Analytik der Proben umfasste die Größen- und Größenverteilungsbestimmung mittels PCS, die Paclitaxel-Quantifizierung mittels HPLC, die Restwasserbestimmung durch Karl-Fischer-Titration, sowie die Bestimmung der Haltbarkeit mittels optischer Kontrolle auf Kristallisationen.

Da die Charge FG54 mit einem experimentell bestimmten Paclitaxelgehalt von 4,2 bis 5,1 mol%, sowie die Charge FG55 mit einem experimentell bestimmten Paclitaxelgehalt von 6,6 bis 6,7 mol% eine Haltbarkeit von weniger als 30 Minuten in der flüssigen Formulierung zeigten, beschränkt sich die folgende Darstellung der Ergebnisse auf die Chargen FG52 und FG53 mit einem theoretischen Paclitaxelgehalt in der Flüssigformulierung von 3 bzw. 5 mol%. Charge FG52 zeigte in der rekonstituierten Formulierung bei Lagerung über 7 Tage im Kühlschrank keinerlei Anzeichen von Kristallisationsvorgängen. Bei Charge FG53 trat die Kristallisation in allen beobachteten Vials in einem Zeitraum von 12 bis 24 Stunden ein.

Die Ergebnisse der PCS-Messungen von Charge FG52 sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt:

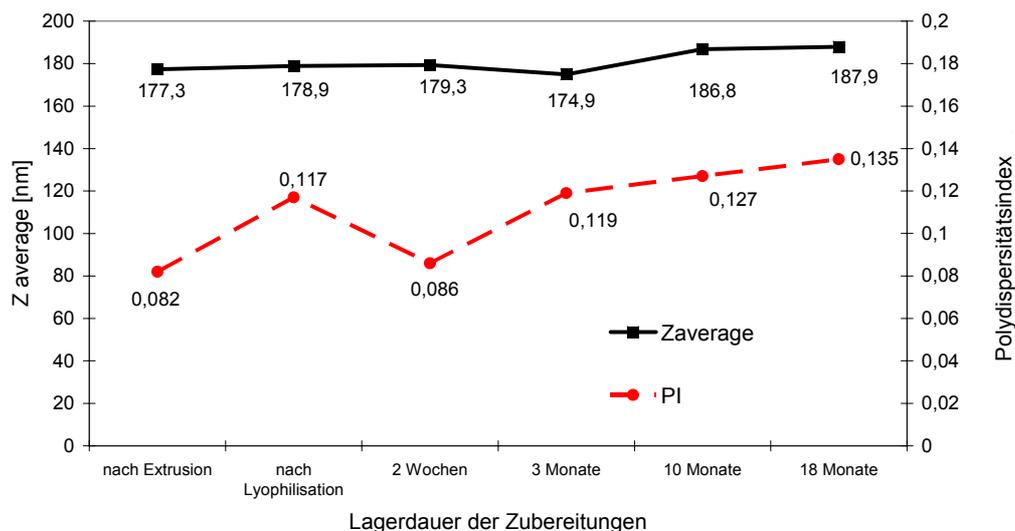


Abbildung 17: Größe und Polydispersität von Charge FG52 mit 3mol% Paclitaxel vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 18monatiger Lagerung der Lyophilisate

Man erkennt, dass die Lyophilisation sehr geringen Einfluss auf Größe und Polydispersitätsindex der Zubereitung zu haben scheint. Die Größe bleibt unverändert, der PI steigt leicht an. Im Verlauf der Lagerung erhöhen sich beide Werte nur wenig. Dies ist ein erstaunliches Ergebnis, wenn man die Erscheinungsform des Lyophilisates über diesen Zeitraum vergleicht. Abbildung 18 zeigt auf der linken Seite ein ungelagertes Lyophilisat und auf der rechten Seite ein Lyophilisat, welches 18 Monate im Kühlschrank gelagert war. Die poröse Struktur ist bei letzterem nicht mehr erhalten, das Lyophilisat ist kollabiert und zeigt sich als Substanz-Rückstand in der Mitte des Vial-Bodens.



Abbildung 18: Lyophilisate aus 5%iger Glucoselösung, 0 bzw. 18 Monate gelagert

Die Erklärung liegt in der Verwendung von Glucose, welche in der ursprünglichen Formulierung als Isotonisierungsmittel diente, aber aufgrund der niedrigen Glasübergangstemperatur nicht als Hilfsstoff für die Lyophilisation qualifiziert ist, der Einfachheit halber aber zunächst in der Formulierung belassen wurde. Denn obwohl sich verschiedene Frosch-Arten durch hohe Konzentrationen an Glucose eine gewisse Frost-Toleranz verschaffen können [95] und auch die Literatur Gefriertrocknungsversuche mit glucosehaltigen Liposomen-Dispersionen beschreibt [162], werden der Trehalose bessere protektive Eigenschaften bei der Lyophilisation von Lipid-Membranen attestiert [47, 41, 46]. Laut Literatur ist dafür die Fähigkeit der Disaccharide verantwortlich, die Flexibilität der Membranen während des Trocknens besser zu gewährleisten als Monosaccharide [159]. Wolfe und Bryant führen als Gründe für die besonders ausgeprägten protektiven Eigenschaften der Trehalose

deren hohe Glasübergangstemperatur und die geringe Kristallisationsneigung an [178]. Van Winden et al. beschreiben ebenfalls geschrumpfte Lyophilisate bei der Verwendung von 10% Glucose als Hilfsmittel, geben allerdings keine Angaben über die Lagerdauer bis zur Beobachtung des Phänomens [165].

Der Restwassergehalt der Lyophilisate wurde exemplarisch an Charge FG52 bestimmt. Der Mittelwert aus 2 Messungen betrug unmittelbar nach der Lyophilisation lediglich 0,2%, was für eine vollständige Trocknung spricht. Der Wassergehalt in den gelagerten, kollabierten Lyophilisaten lag hingegen bei 4,7%.

Die Ergebnisse der PCS-Messungen von Charge FG53 mit einer theoretischen Paclitaxel-Konzentration von 5 mol% ähneln weitgehend denen der Zubereitung mit 3 mol% (siehe Abbildung 19) und sprechen für eine weitgehend vergleichbare Stabilität im getrockneten Zustand. Die absoluten Werte für die Größe und den Polydispersitätsindex sind allerdings bei Charge FG53 etwas höher.

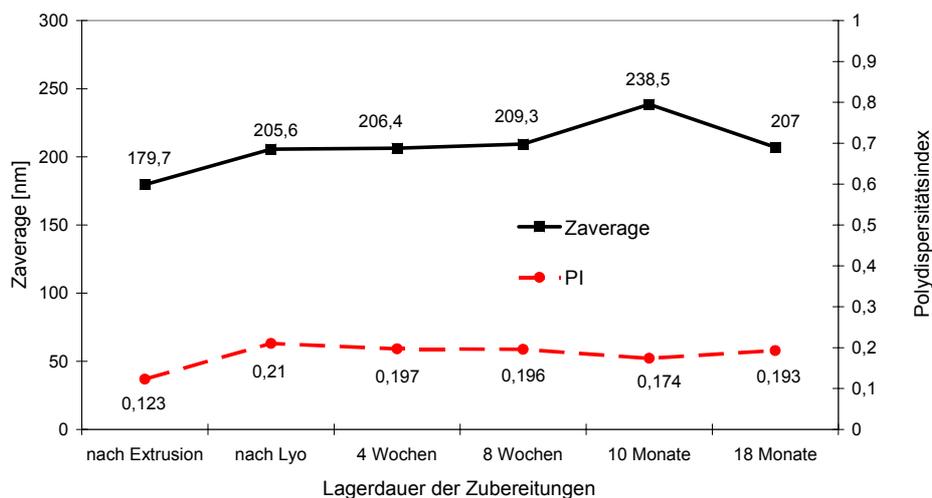


Abbildung 19: Größe und Polydispersität von Charge FG53 mit 5mol% Paclitaxel vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 18monatiger Lagerung der Lyophilisate

Wirft man einen Blick auf den Paclitaxelgehalt der Zubereitungen, so kann man zunächst keinen Qualitätsverlust über den beobachteten Zeitraum von 18 Monaten feststellen. Insbesondere die Gehalte unmittelbar nach Extrusion und nach 18 Monaten Lagerzeit sind annähernd gleich. Bei dieser Versuchsreihe wurde erstmals ein Abbauprodukt des Paclitaxels miterfasst, welches durch Vergleich mit einer Referenzlösung als 7-Epipaclitaxel identifiziert wurde. Der Gehalt dieses Abbauprodukts wurde nur über die Flächenanteile erfasst. Laut der USP Monographie für Paclitaxel ist es allerdings möglich, mittels einem Response Factor

die Flächenprozentage in Mengenanteile umzurechnen. Der Response Factor für 7-Epipaclitaxel ist 1.00.

In Abbildung 20 sind die Gehaltswerte für Paclitaxel und das Abbauprodukt (blaue Kurve) in Charge FG52 aufgetragen, Abbildung 21 zeigt die Daten für Charge FG 53.

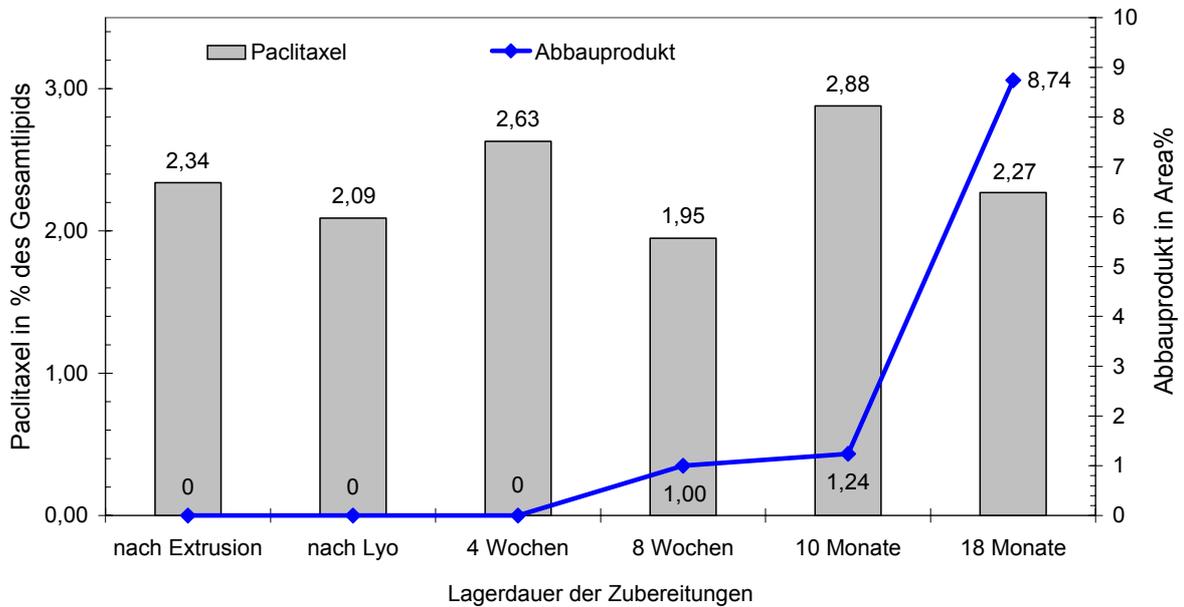


Abbildung 20: Paclitaxelgehalte und Anteile von 7-Epipaclitaxel in Charge FG52, vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 18monatiger Lagerung der Lyophilisate

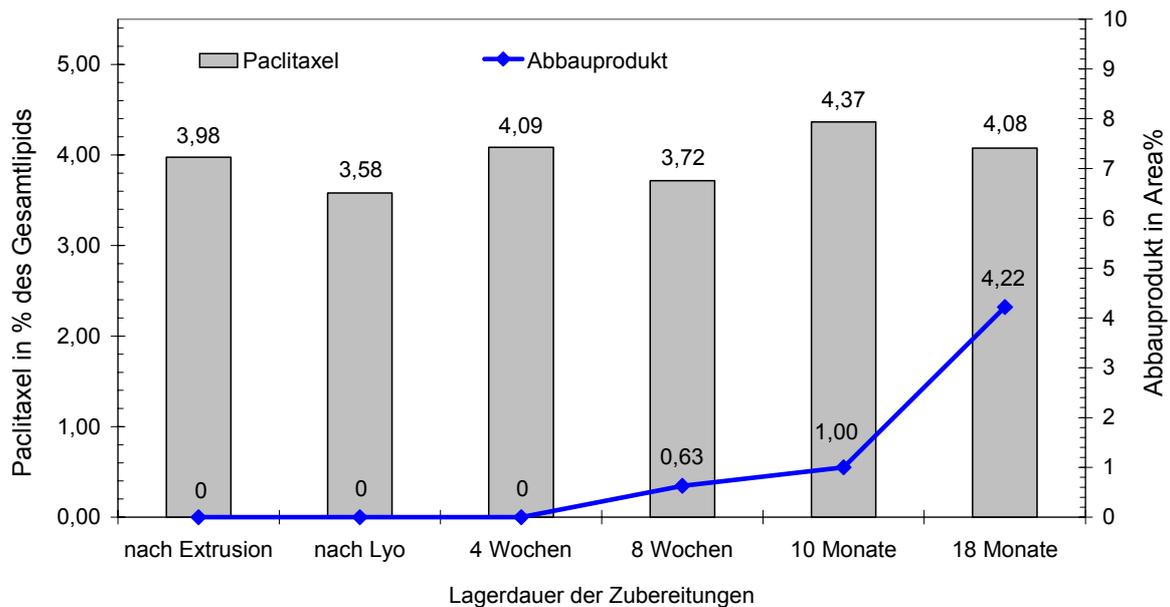


Abbildung 21: Paclitaxelgehalte und Anteile von 7-Epipaclitaxel in Charge FG53, vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 18monatiger Lagerung der Lyophilisate

Auch bei diesen Versuchen ist wieder festzustellen, dass die Anfangsgehalte in den einzelnen Zubereitungen um ca. 20% zu niedrig liegen.

Ebenso variieren die gefundenen Gehaltswerte von Probenzug zu Probenzug zum Teil erheblich. Zumindest bei den Proben nach der Lyophilisation, sowie nach 8 Wochen Lagerdauer scheint ein analytisches Problem die Ursache für den zu geringen Paclitaxel-Gehalt zu sein, da jeweils beide Chargen gleichzeitig einen zu niedrigen Gehalt zeigen und zum anderen bei beiden Chargen im nächsten Probenzug wieder höhere, plausiblere Werte liefern. Zur weiteren Diskussion sei auf Kapitel IV.3.1. verwiesen.

Bei der Betrachtung der Mengen an Abbauprodukt sollte beachtet werden, dass die gefundenen Werte nicht unbedingt nur durch die Lagerung in lyophilisierter Form bedingt sein müssen. Die Proben lagerten bis zum tatsächlichen Beginn der HPLC-Bestimmung einige Zeit in flüssiger Form im Kühlschrank. Es ist nicht auszuschließen, dass während dieser Lagerung der Gehalt an Abbauprodukt weiter zunahm.

7-Epipaclitaxel hat nach Ringel und Horwitz [137] sehr ähnliche pharmakodynamische Eigenschaften wie Paclitaxel, so dass diese Epimerisierungsreaktion nicht zwangsläufig zu einem Qualitätsverlust der Zubereitungen führen muss.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse:

Mittels Filmmethode, Extrusion und anschließender Lyophilisation konnten kationische Liposomenzubereitungen mit einer enkapsulierten Menge von ca. 4mol% Paclitaxel hergestellt werden, die lange genug stabil sind, um intakt in eine Gefriertrocknungsanlage überführt werden zu können.

Die Integrität der Liposomen selbst nahm durch den Vorgang der Lyophilisation keinen Schaden. Der Paclitaxelgehalt ändert sich nicht, Partikelgröße und Teilchengrößenverteilung nehmen geringfügig zu.

Trotz der beobachteten morphologischen Veränderungen ist die Qualität der lyophilisierten Proben nach Rekonstitution hinsichtlich Liposomengröße und Größenverteilung, Paclitaxelgehalt und in-use-Stabilität vergleichbar mit der, nicht gefriergetrockneter Proben.

In getrocknetem Zustand ist die Qualität der Zubereitungen über einen Zeitraum von 18 Monaten untersucht und bis zu einem Zeitraum von 8 Wochen positiv beurteilt worden. Nach diesem Zeitraum waren zum einen die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen zu beobachten und zum anderen stieg der Gehalt an 7-Epipaclitaxel auf über 1,0 Prozent an. Die Auswirkungen dieses Anstiegs auf die Wirksamkeit der Zubereitungen sind derzeit nicht abzuschätzen.

Die zunächst als Isotonisierungsmittel verwendete Glucose ist als Gerüstbildner bei der Lyophilisation liposomaler Zubereitungen nicht geeignet. Die gebildeten Lyophilisate erscheinen zunächst einwandfrei, überstehen jedoch die Lagerung nicht ohne Qualitätsverlust. Trotz des Verlustes der Lyophilisat-Struktur scheinen die Liposomen darin überraschenderweise unbeschadet zu bleiben. In Kapitel III.2.4. wird die Überlegenheit von Trehalose als Lyoprotektivum noch besonders verdeutlicht.

2.2. Absenken der Herstellungstemperatur

Nach einer Publikation von Wenk et al. aus dem Jahr 1995 nimmt die Löslichkeit von Paclitaxel in Lipid-Membranen mit sinkender Temperatur zu [177]. Sie stellten in ihren Versuchen Liposomen aus POPC (1-Palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphocholin) nach der Filmmethode mit anschließendem Schütteln und Ultraschallbehandlung her. Diese Vesikel wurden bei 22 °C zu einer gesättigten, wässrigen Paclitaxellösung mit einer Konzentration von $0,5 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ gegeben und die Titration kalorimetrisch und fluorimetrisch verfolgt. Die Versuche ergaben eine stark negative Bindungsenthalpie von $-25 \pm 3 \text{ kcal/mol}$, was darauf hinweist, dass die Einkapsulierung von Paclitaxel in diese Liposomen exotherm verläuft. Sie kommen zu dem Schluss, dass eine Temperaturerhöhung um 10 °C die Löslichkeit von Paclitaxel in der Lipidphase um den Faktor 4 erniedrigt.

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob diese Beobachtung auch in der Praxis zu einer erhöhten Einkapsulierungseffizienz und Lagerstabilität führen kann.

Hierzu wurde die Temperatur während der Herstellung des Rehydrats, sowie während Extrusion und Sterilfiltration (siehe Abschnitt III.2.1) abgesenkt.

Nach der Filmbildung wurde der Kolben für einige Minuten im Kühlschrank gelagert. Das Rehydrat wurde mit 10,0 ml 4 °C kalter 5%iger Glucose-Lösung hergestellt. Die Proben wurden unmittelbar im Anschluss extrudiert, wobei der Extruder auf 4 °C temperiert wurde. Das Extrudat wurde in einem ebenfalls gekühlten Probenröhrchen aufgefangen. Unmittelbar nach der Extrusion wurden die Proben in einem auf 4 °C gekühlten Raum in Aliquoten zu 500 μl in Glasvials eingefüllt und die Stopfen locker aufgesetzt. Die Proben wurden sofort in die auf -40 °C vorgekühlte Gefriertrocknungs-Anlage überführt. Um diese gekühlte Herstellung auf ihre Überlegenheit hinsichtlich der Stabilität der Produkte zu untersuchen, wurden zwei Chargen mit 5 bzw. 7 mol% Paclitaxel-Anteil hergestellt (siehe Tabelle 13).

	DOTAP (mol%)	DOPC (mol%)	Paclitaxel (mol%)
FG58	50	45	5
FG59	50	43	7

Tabelle 13: Zusammensetzung der Chargen FG58 und FG59 für die Kaltherstellung

Auch bei diesem Versuch stand die Überprüfung der Lagerstabilität unter den Gesichtspunkten Bestimmung des Auftretens von Kristallisationsvorgängen, Liposomengröße, Größenverteilung und Paclitaxelgehalt im Mittelpunkt.

Bei Charge FG58 konnten bei Lagerung im Kühlschrank Anzeichen von Kristallisationsvorgängen in einem Zeitraum zwischen 15 und 24 Stunden beobachtet werden. Bei Charge FG59 trat die Kristallisation in einer Zeitspanne von 8 bis 13 Stunden ein.

Abbildung 22 zeigt Größe und PI für Charge FG58, die Daten der Charge FG59 sind in Abbildung 23 verdeutlicht. Für beide Chargen gilt, dass die beiden untersuchten Parameter über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 Monaten annähernd unverändert blieben.

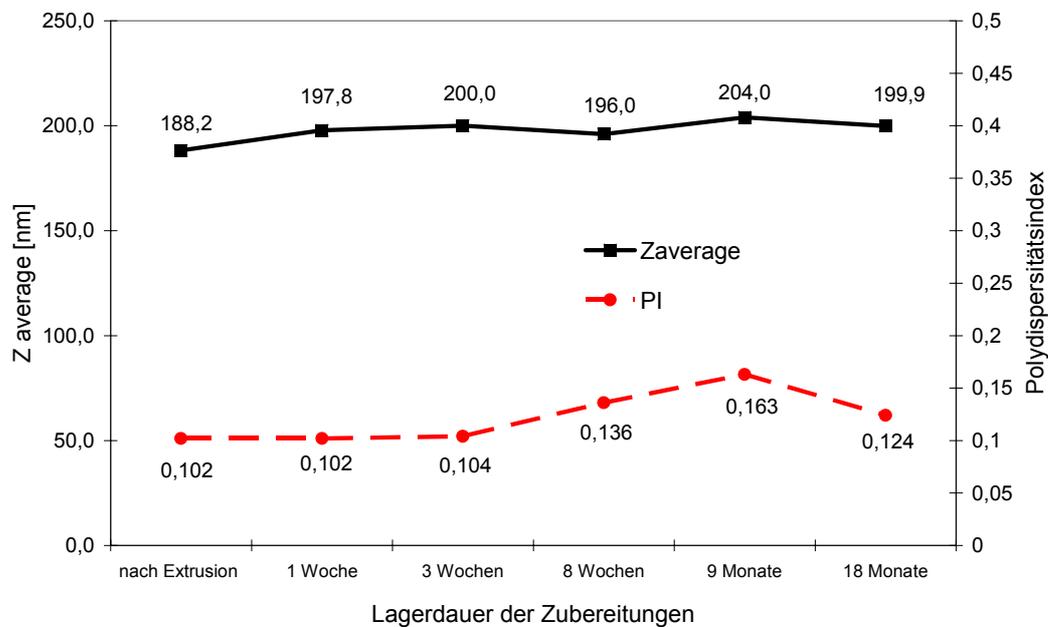


Abbildung 22: Größe und Polydispersität der Charge FG58 mit 5 mol% Paclitaxelgehalt

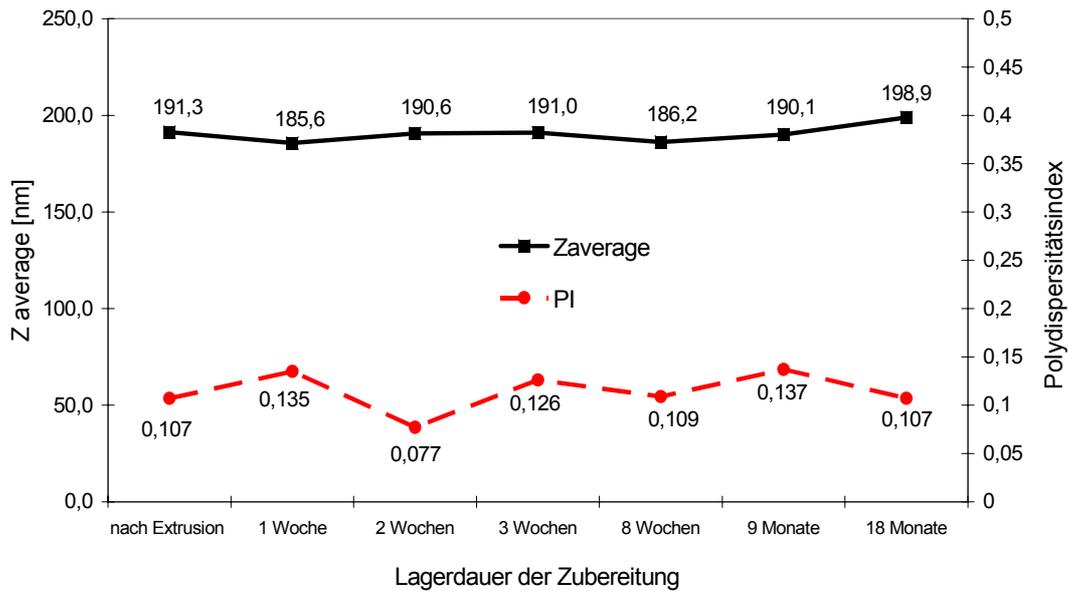


Abbildung 23: Größe und Polydispersität der Charge FG59 mit 7 mol% Paclitaxelgehalt

Abbildung 24 zeigt die Entwicklung der Paclitaxel- und 7-Epipaclitaxel-Gehalte der beiden Chargen vor und nach Lyophilisation, sowie im Laufe der Lagerung. Das erste Auftreten des 7-Epipaclitaxels ist nach einer Lagerdauer von 8 Wochen zu beobachten. Dessen Gehalt steigt nach insgesamt 18 Monaten Lagerdauer des Lyophilisats im Kühlschrank auf ca. 10% an. Der Paclitaxelgehalt in Charge FG58 ist nach 18monatiger Lagerung deutlich gesunken, bei Charge FG59 entspricht der Gehalt immer noch dem Wert vor Lyophilisation.

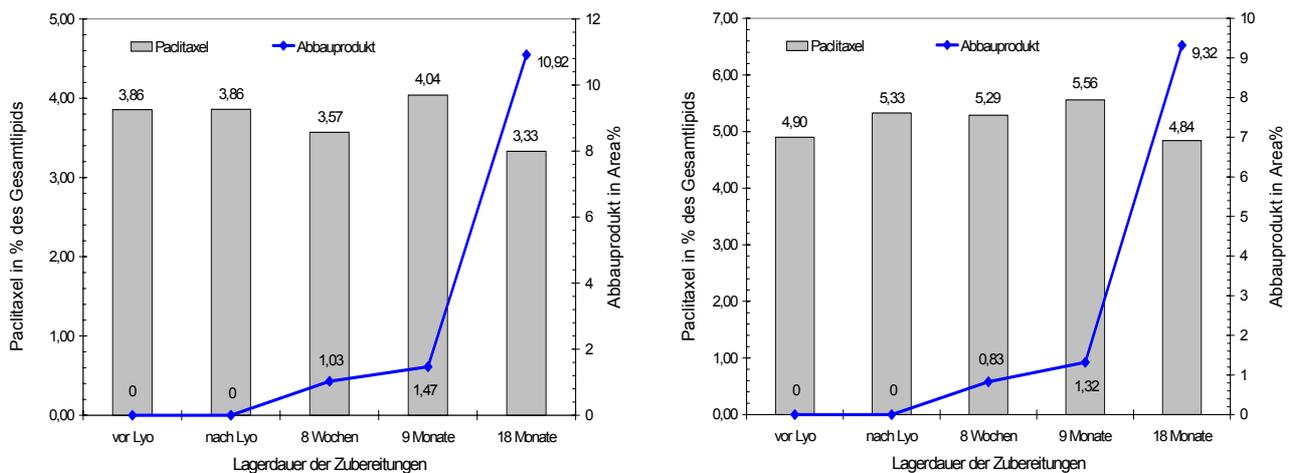


Abbildung 24: Paclitaxelgehalte und Anteile von 7-Epipaclitaxel in Chargen FG58 (links) und FG59 (rechts) vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 18monatiger Lagerung der Lyophilisate

Die in Abschnitt III.2.1. bereits beschriebene Problematik der im Vergleich zur Einwaage zu niedrigen Paclitaxel-Gehalte tritt hier ebenfalls wieder auf. Die im Verlauf der Stabilitätsprüfung beobachtete Schwankung der Werte ist aber nicht so ausgeprägt wie bei vorangegangenen Versuchen.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse:

Mit der hier evaluierten Methode lassen sich ca. 5 mol% Paclitaxel in kationische Liposomen über einen Zeitraum von 9 Monaten in der lyophilisierten Form, bzw. 8 bis 13 Stunden in der wässrigen Zubereitung einschließen. Nach 18 Monaten Lagerdauer hat der Paclitaxelgehalt signifikant abgenommen, im Gegenzug nahm der Gehalt des Abbauproduktes zu. Eine Überlegenheit der Liposomenherstellung unter gekühlten Bedingungen gegenüber der herkömmlichen Herstellung bei Raumtemperatur bzw. 30 °C ließ sich nicht belegen. Vergleicht man zwei Chargen mit einem Paclitaxelgehalt von 4 mol%, von denen die eine bei Raumtemperatur (FG53), die andere bei 4 °C (FG58) hergestellt wurde, kann man hinsichtlich der Haltbarkeit keine Unterschiede feststellen.

Methodische Unschärfen erschweren eine präzisere Aussage. Sowohl die visuelle Prüfung auf Kristallbildung, als auch die mit starken Schwankungen behaftete HPLC-Gehaltsbestimmungsmethode lassen keine exaktere Bewertung zu.

Eine genauere Bestimmung der Haltbarkeit der flüssigen Zubereitungen ist mittels Lichtblockade-Messungen möglich und wird in späteren Kapiteln beschrieben. Hierzu werden jedoch größere Volumina an Probenmaterial benötigt. Diese größeren Ansätze sollten erst dann hergestellt werden, wenn mehr Informationen zur Zusammensetzung und zum Herstellungsverfahren vorliegen.

Die Problematik der stark schwankenden Paclitaxel-Gehalte reduziert sich bei den späteren Versuchen. Eine Diskussion der Ursachen unter Einbeziehung weiterer Erkenntnisse wird in Kapitel IV.3.1. geführt.

2.3. Ethanolinjektion

Die ursprünglich verwendete Filmmethode eignet sich nicht zur Herstellung von Prüfpräparaten zur klinischen Anwendung. Als Alternative hierzu wurde die Ethanolinjektionsmethode eingehender untersucht.

Zunächst wurden in Vorversuchen verschiedene Parameter der Ethanolinjektion variiert und der Einfluss auf die Liposomengröße und die Größenverteilung in den hergestellten Rohdispersionen untersucht.

2.3.1. Variation der Lipidkonzentration in Ethanol

Der Einfluss der Konzentration der ethanolischen Lipidlösung auf die resultierende Dispersion wurde bereits von Pons et al. untersucht [134]. Danach sollte die Größe der hergestellten Liposomen direkt proportional zur Lipidkonzentration in Ethanol ansteigen.

Auf die Einarbeitung von Paclitaxel wurde bei diesen Versuchen noch verzichtet, die Liposomen bestanden aus gleichen molaren Anteilen von DOTAP und DOPC. Es wurden ethanolische Lösungen mit einem Lipidgehalt von 50 mM, 100 mM, 200 mM bzw. 400 mM hergestellt. Diese wurden mittels einer Hamiltonspritze bei Raumtemperatur in 5%ige Glucoselösung mit einer Geschwindigkeit von ca. 500 µl/min injiziert. Die Glucoselösung wurde mithilfe eines Magnetrührers mit 400 Upm gerührt. Die resultierende Dispersion sollte jeweils eine Lipidkonzentration von 10 mM haben, dazu waren also unterschiedliche Volumina an ethanolischer Lipidlösung zu injizieren. Die Ergebnisse des Versuchs zeigt Tabelle 14.

Lipidkonzentration in Ethanol [mM]	Größe [nm] (n=3)	Polydispersitätsindex (n=3)
50	/	/
100	97,3	0,320
200	206,3	0,293
400	644,9	0,550

Tabelle 14: Einfluss der Lipidkonzentration in Ethanol auf Größe und PI in der wässrigen Dispersion

Die Größe der resultierenden Liposomen steigt mit steigender Lipidkonzentration in Ethanol an. Der PI verhält sich nicht derart linear, die Werte sind ungefähr gleich bei 100 bzw. 200 mM Lipidgehalt, sehr viel größer bei 400 mM. Mit einer Lipidkonzentration von 50 mM in Ethanol lässt sich keine Liposomendispersion mit einer Konzentration von 10 mM in Glucose herstellen. Die Lösung nach Injektion zeigt sich klar und ist keiner Größenbestimmung zugänglich. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse bei diesem Ansatz enthält die Lösung allerdings auch die größte Menge an Ethanol.

2.3.2. Variation der Rührdauer nach beendeter Injektion

Es wurde auch der Einfluss der Rührdauer nach beendeter Injektion untersucht. Die Liposomendispersion wurde über einen Zeitraum von 45 Minuten gerührt und in bestimmten Zeitabständen Proben zur PCS-Messung entnommen.

Die Dauer des Rührvorgangs nach beendeter Injektion hat, wie Abbildung 25 zeigt, keinen Einfluss auf Größe und PI. Alle folgenden Chargen wurden daher lediglich 2 Minuten nach Injektionsende weiter gerührt.

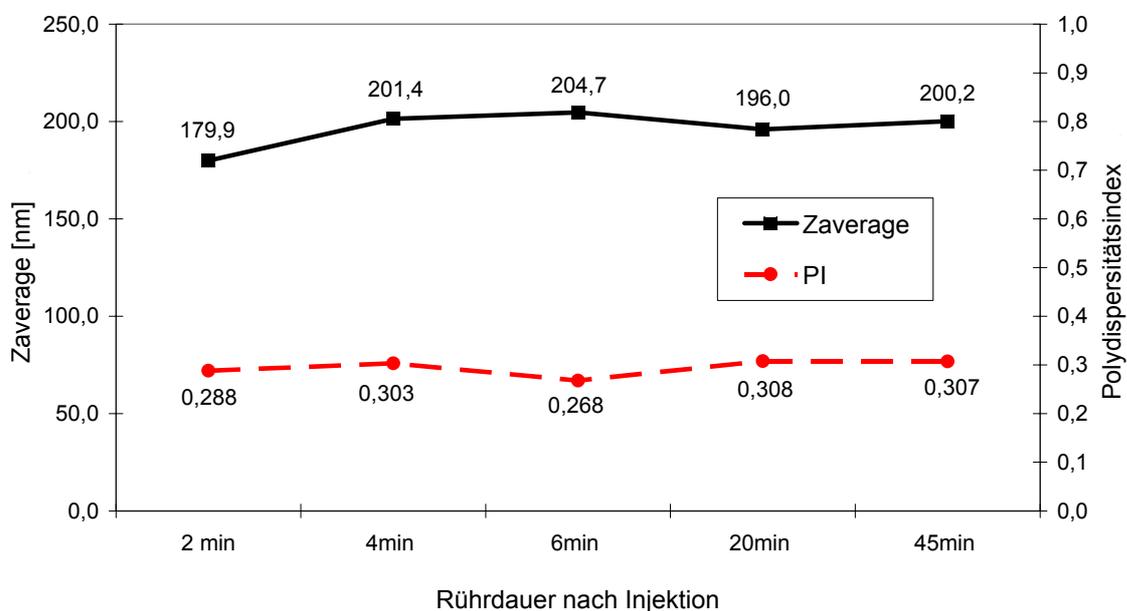


Abbildung 25: Einfluss der Rührdauer nach beendeter Injektion auf Größe und PI

2.3.3. Verwendung unterschiedlicher Rührgeräte

Anhand von Zubereitungen aus einer 200 mM ethanolischen Lipidlösung und einer Liposomendispersion in Glucose mit einem Lipidgehalt von 10 mM wurden verschiedene Rührgeräte verglichen. Wie Tabelle 15, zeigt ist hier der Einfluss auf die Größe der Liposomen minimal, der starke Energieeintrag mittels Ultraturrax führt nicht zu einer homogeneren Dispersion.

Rührgerät	Größe [nm] (n=3)	Polydispersitätsindex (n=3)
Magnetrührer (400 Upm)	206,3	0,293
Flügelrührer (500 Upm)	208,8	0,360
Ultraturrax (11000 Upm)	207,4	0,370

Tabelle 15: Effekt verschiedener Rührgeräte auf Größe und PI

2.3.4. Anwendung unterschiedlicher Injektionsverfahren

Untersucht wurden zwei Verfahren zum Einbringen der ethanolischen Lipidlösung in die wässrige Phase: Eine Möglichkeit besteht darin, die Ethanol-Lösung in eine Hamilton-Spritze aus Glas aufzuziehen und manuell in die Glucoselösung zu injizieren. Die Injektionsgeschwindigkeit wurde für die ersten Versuche willkürlich gewählt und lag bei ca. 500 µl/min. Bei einem Ansatz wurden bei ansonst gleichen Parametern 500 µl der ethanolischen Lipidlösung als Bolus injiziert, die Injektionsdauer betrug also anstatt einer Minute lediglich wenige Sekunden. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse dieses Vergleiches angeführt.

Injektionsgeschwindigkeit	Größe [nm] (n=3)	Polydispersitätsindex (n=3)
500µl/min	208,8	0,360
Bolus	209,1	0,415

Tabelle 16: Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit auf Größe und PI

Man erkennt, dass die Liposomengröße durch die Injektionsgeschwindigkeit nicht maßgeblich beeinflusst wird, der Polydispersitätsindex fällt jedoch dadurch etwas größer aus.

Bei aller Einfachheit der manuellen Injektion mit einer Spritze, hat diese Vorgehensweise jedoch auch bedeutsame Nachteile: Zum einen ist die Injektionsgeschwindigkeit schlecht reproduzierbar, zum anderen ist sie kaum für größere Ansätze geeignet. Deshalb wurde als weitere Möglichkeit die Verwendung einer Präzisions-Spritzenpumpe, wie man sie eigentlich aus der apparativen Infusionstechnik kennt, untersucht. Ich verwendete hierzu einen Perfusor®compact, der Fa Braun (Melsungen). Damit kann man stufenlos verschiedene Injektionsgeschwindigkeiten einstellen und so genau reproduzierbare Injektionsverhältnisse erhalten. Die Förderraten sind variierbar im Bereich von 0,01 bis 200,0 ml/h, ein maximales Volumen erreicht man durch die Verwendung von 50ml-Spritzen. Die Verwendung eines solchen Gerätes beeinflusste bei gleicher Injektionsgeschwindigkeit die hergestellten Liposomen nicht. Der Verlust an Lipidlösung, vor allem bedingt durch Rückstände in der Spritze, war bei dieser Methode relativ groß, da die kleinste verwendbare Spritze ein Volumen von 2ml hatte, ich für die meisten meiner Ansätze jedoch lediglich ein Volumen von 250 µl benötigte. Daher wurde bei Ansätzen im Labor weiterhin die manuelle Injektion durchgeführt, für die kommerzielle Herstellung von Liposomendispersionen in Ansatzgrößen von bis zu 2 Litern stellen Präzisions-Spritzenpumpen jedoch ideale Injektionssysteme dar.

2.3.5. Variation der Lipidkonzentrationen in Glucose

Mit einer ethanolischen Lipidlösung mit einer Konzentration von 200 mM wurden Liposomendispersionen in Glucose mit einer Konzentration von 5 mM, 10 mM und 20mM hergestellt. Die Unterschiede hinsichtlich Größe und PI der Liposomen waren nur sehr gering ausgeprägt und zeigten keinen eindeutigen Trend (siehe Tabelle 17).

Lipid-Konzentration in Glucose	Größe [nm] (n=3)	Polydispersitätsindex (n=3)
5	188,6	0,390
10	206,5	0,309
20	207,5	0,388

Tabelle 17: Einfluss der Lipidkonzentration in Glucose auf Größe und PI in der wässrigen Dispersion

Die erzielte Konzentration in wässriger Dispersion sollte in Hinblick auf Vorteile in der Applikation arzneimittelhaltiger Zubereitungen möglichst hoch sein. Deswegen wird dieser Aspekt in den Kapiteln III.2.6. und III.2.7. eingehender beleuchtet.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse:

Über die Herstellung von Liposomendispersionen mittels Ethanolinjektion lassen sich folgende Aussagen treffen:

Es handelt sich um eine sehr robuste Methode. Verfahrenstechnische Parameter wie Rührgerät, Rührgeschwindigkeit, Rührdauer, Injektionsverfahren und Injektionsgeschwindigkeit üben einen nur sehr geringen Einfluss auf die hergestellten Liposomen aus. Der größte Einflussfaktor ist die Lipidkonzentration in Ethanol. Aufgrund der ersten Erfahrungen sind Lipidkonzentrationen in Ethanol über 400 mM nicht praktikabel, da man an die Grenze der Löslichkeit der Lipide gerät. Bei Konzentrationen unter 200 mM steigt aufgrund des größeren benötigten Volumens die Ethanolkonzentration in der wässrigen Phase stark an, was einer Bildung von Liposomen entgegensteht.

Für die weiteren Untersuchungen, in denen weitere Bearbeitungsschritte wie Entfernen des Ethanols aus der Rohdispersion, Extrusion, Sterilfiltration und Lyophilisation angewendet wurden, wurden deswegen die folgenden Parameter für die Herstellung einer Rohdispersion von kationischen Liposomen mittels Ethanolinjektion übernommen (siehe Tabelle 18).

Lipidkonzentration in Ethanol	200-400 mM
Lipidkonzentration in Glucose	10 mM
Injektionsverfahren	Spritze mit aufgesetzter Kanüle
Injektionsgeschwindigkeit	500 µl/min
Rührgerät	Propeller-Rührer Ø40 mm bei Ansätzen über 10 ml Magnetrührer oder Kreuzbalken-Rührer Ø14mm bei Ansätzen bis 10 ml
Rührgeschwindigkeit	400 Upm
Rührdauer nach beendeter Injektion	2 min

Tabelle 18: Parameter der Ethanolinjektion für nachfolgende Versuche

2.4. Kombination der Ethanolinjektion mit weiteren Verfahrensschritten

Nachdem die Herstellung von Rohdispersionen aus DOTAP und DOPC untersucht wurde, sollte im nächsten Schritt die weitere Verarbeitung dieser Dispersionen genauer beleuchtet werden. Das Ziel dieser Versuche war herauszufinden, welche Verfahrensschritte möglich bzw. nötig sind, um mittels Ethanolinjektion hergestellte Liposomen lyophilisieren zu können. Es sollten folgende Methoden zur Anwendung kommen:

1. Extrusion durch Polycarbonatmembranen zur Reduzierung der Liposomengröße und der Breite der Größenverteilung
2. Sterilfiltration
3. Entfernung des Ethanol aus den Dispersionen mittels Tangentialfluss-Filtration
4. Lyophilisation zur Erhöhung der Lagerstabilität

2.4.1. Rohdispersion 1: 400 mM Lipidlösung in 5%iger Glucoselösung

Es wurde gemäß den Parametern aus Tabelle 19 eine Liposomen-Rohdispersion durch Ethanolinjektion hergestellt:

Zusammensetzung	DOTAP-DOPC 50:50
Lipidkonzentration in Ethanol	400 mM
Lipidkonzentration in Glucose	10 mM
Ansatzgröße	120 ml
Rührgerät	Propeller-Rührer Ø40 mm
Rührgeschwindigkeit	400 Upm

Tabelle 19: Parameter zur Herstellung der Rohdispersionen

Die Extrusion erfolgte 10mal durch eine 200nm-Polycarbonatmembran. Die Sterilfiltration erfolgte 1mal durch einen 0,22µm-Durapore® Membranfilter. Hierzu wurde die hergestellte Rohdispersion in mehrere Aliquote aufgeteilt und die oben genannten Verfahren in unterschiedlicher Reihenfolge durchgeführt. Die Arbeitsschritte sind in Abbildung 26 schematisch angeführt und gleichzeitig die

Ergebnisse der PCS-Messungen dokumentiert. Auf der linken Seite unter dem jeweiligen Arbeitsschritt steht die Größe der Liposomen in Nanometern, auf der rechten Seite ist der Polydispersitätsindex notiert.

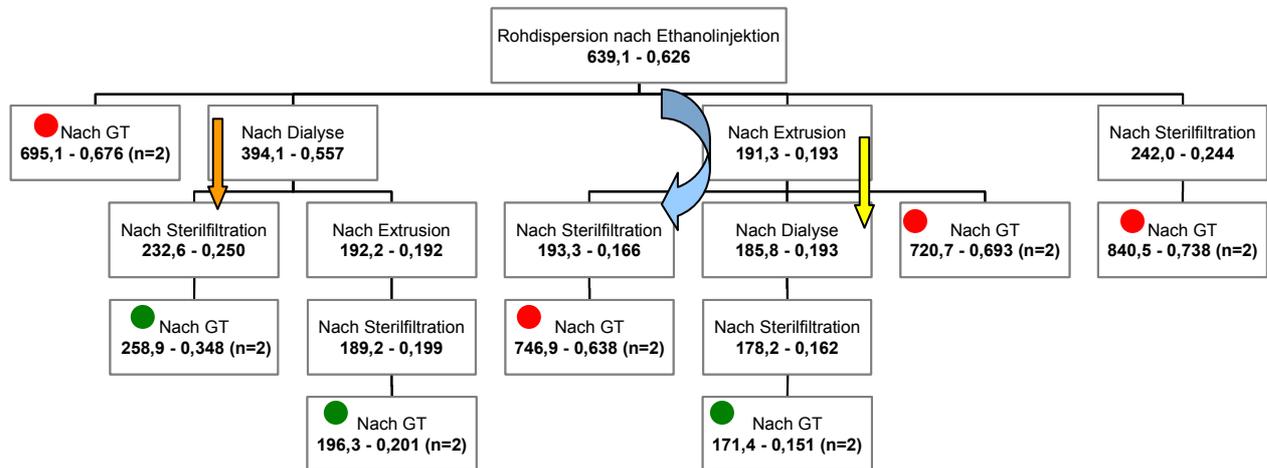


Abbildung 26: Injektion einer 400 mM Lipidlösung in 5%ige Glucoselösung, Lipidkonzentration der Rohdispersion 10 mM (Dialyse=Tangentialfluss-Filtration, GT=Gefriertrocknung); links unter den Schritten die Größe in nm, rechts der Polydispersitätsindex

Dieser Versuch lieferte folgende wesentliche Aussagen:

- Der homogenisierende Effekt von Extrusion und Sterilfiltration auf die Liposomen wird durch den enthaltenen Ethanol nicht beeinflusst. Es lassen sich aus der Rohdispersion durch Extrusion und Sterilfiltration Liposomen mit einer Größe von 193,3 nm und einem PI von 0,166 herstellen (blauer Pfeil).
- Die Tangentialfluss-Filtration selbst übt auch keinen Einfluss auf die Größe und Größenverteilung der Liposomen aus. Ein nach der Extrusion durchgeführter Dialyseschritt, verändert weder Größe noch PI (gelber Pfeil).
- Der Erhalt der Struktur der Liposomen, hier beschrieben durch Größe und PI, im Verlauf der Lyophilisation hängt ganz entscheidend davon ab, ob der Ethanol zuvor entfernt wurde. Ohne Entfernung des Ethanols erhält man unabhängig von der vorherigen Behandlung Liposomen mit einer Größe von ca. 700 bis 850 nm, bzw. einem PI von ca. 0,7 (rote Punkte).
- Wurde nach Dialyse der Rohdispersion lediglich eine Sterilfiltration durchgeführt, sank der PI auf 0,250, die Teilchengröße verringerte sich auf 232,6 nm (orangefarbener Pfeil). Nach der Lyophilisation stiegen diese Werte zwar wieder an, dennoch führten diese Ergebnisse zu der Überlegung, auf die

Extrusion gänzlich zu verzichten, bzw. die Anzahl der Extrusionszyklen zu reduzieren.

Positiv hervorzuheben ist, dass sich nach einer Entfernung des Ethanol die Zubereitungen gut lyophilisieren und rekonstituieren lassen. Weder Größe noch Polydispersitätsindex ändern sich dabei merklich (grüne Punkte)

2.4.2. Rohdispersion 2: 200 mM Lipidlösung in 5%ige Glucoselösung

Der Versuch wurde in gleicher Form wiederholt, diesmal allerdings mit einer Lipidkonzentration in Ethanol von lediglich 200mM. Vorgehen und Ergebnisse sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

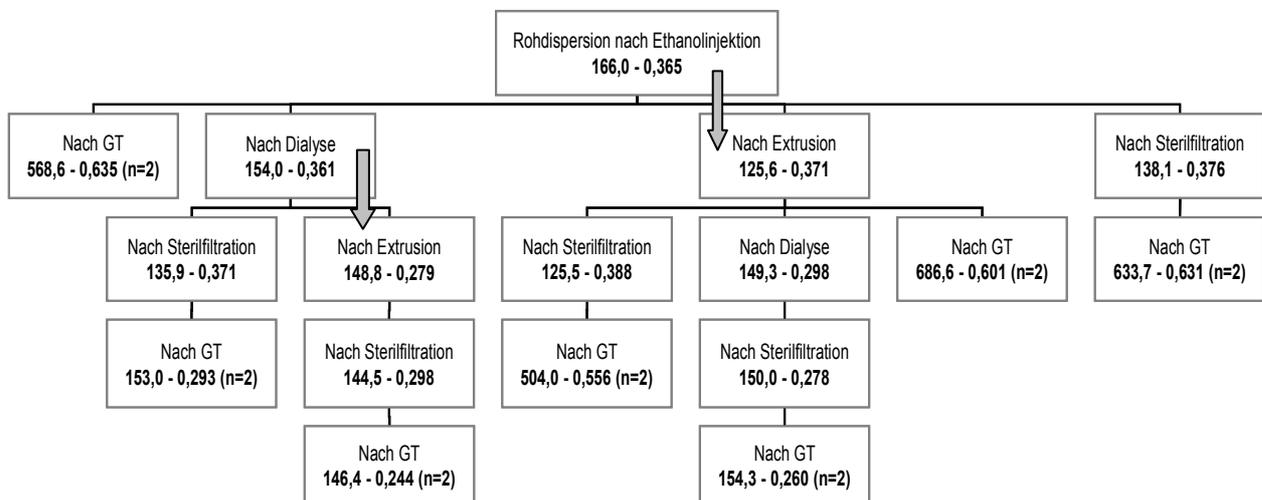


Abbildung 27: Injektion einer 200 mM Lipidlösung in 5%ige Glucoselösung, Lipidkonzentration der Rohdispersion 10 mM (Dialyse=Tangentialfluss-Filtration, GT=Gefriertrocknung); links unter den Schritten die Größe in nm, rechts der Polydispersitätsindex

Wie erwartet war die Größe der Liposomen in der Rohdispersion hier wesentlich geringer. Die Gefriertrocknung gelang nach Entfernung des Ethanol im Sinne kleiner Teilchengrößen ohne Probleme. Wurde der Ethanol zuvor nicht entfernt, war wiederum ein starker Anstieg in Liposomengröße und Polydispersitätsindex zu beobachten.

Ein weiterer Unterschied zum vorangegangenen Ansatz zeigt sich am Vergleich der PI-Werte vor und nach den Extrusionen (siehe graue Pfeile). Die Reduktion der Teilchengrößenverteilung gelingt hier bei weitem nicht so effektiv wie bei Versuchen ausgehend von 400 mM ethanolischer Lipidlösung. Die Begründung hierfür liefert ein

genauerer Blick auf die PCS-Daten: Während die breite Größenverteilung bei den Liposomen ausgehend von 400 mM Lipidlösung vor allem durch die Anwesenheit relativ großer Teilchen verursacht wird, geschieht dies bei denen ausgehend von einer 200 mM Lipidlösung eher durch vorwiegend kleinere Liposomen. Diese kleineren Liposomen sind aber dann durch eine nachfolgende Extrusion durch eine 200 nm Membran nicht zu eliminieren.

Abbildung 28 zeigt dies anhand der PCS-Messungen der Liposomen aus 400 mM Lipidlösung, wobei links die Rohdispersion und rechts die extrudierte Dispersion gezeigt sind.

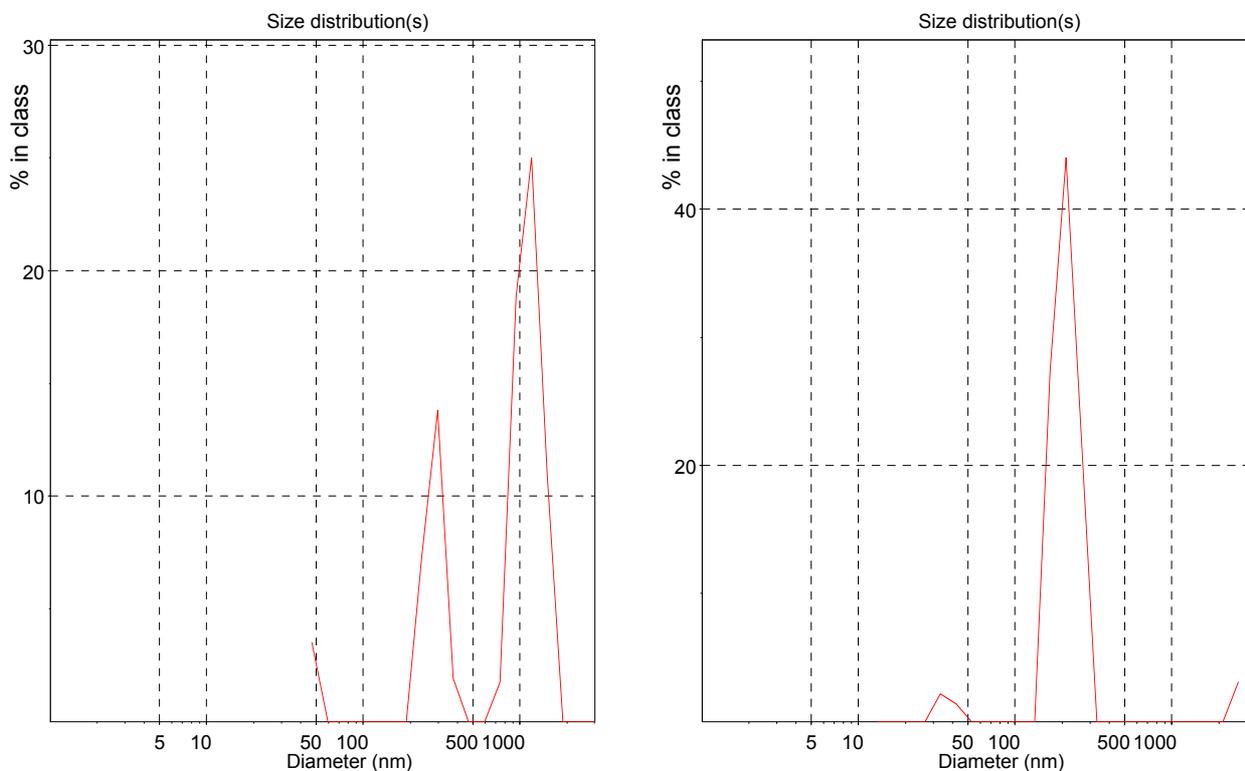


Abbildung 28: PCS-Signale von Liposomen hergestellt mittels Ethanolinjektion aus 400mM Lipidlösung, links Rohdispersion, rechts nach 10maliger Extrusion durch 200nm-Membran

Man erkennt, dass die in der Rohdispersion vorhandenen großen Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 1 μm nach der Extrusion nicht mehr vorhanden sind, dafür der Anteil an Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm größer geworden ist.

Im Vergleich hierzu zeigt Abbildung 29 PCS-Signale von Liposomen hergestellt aus einer 200 mM Lipidlösung.

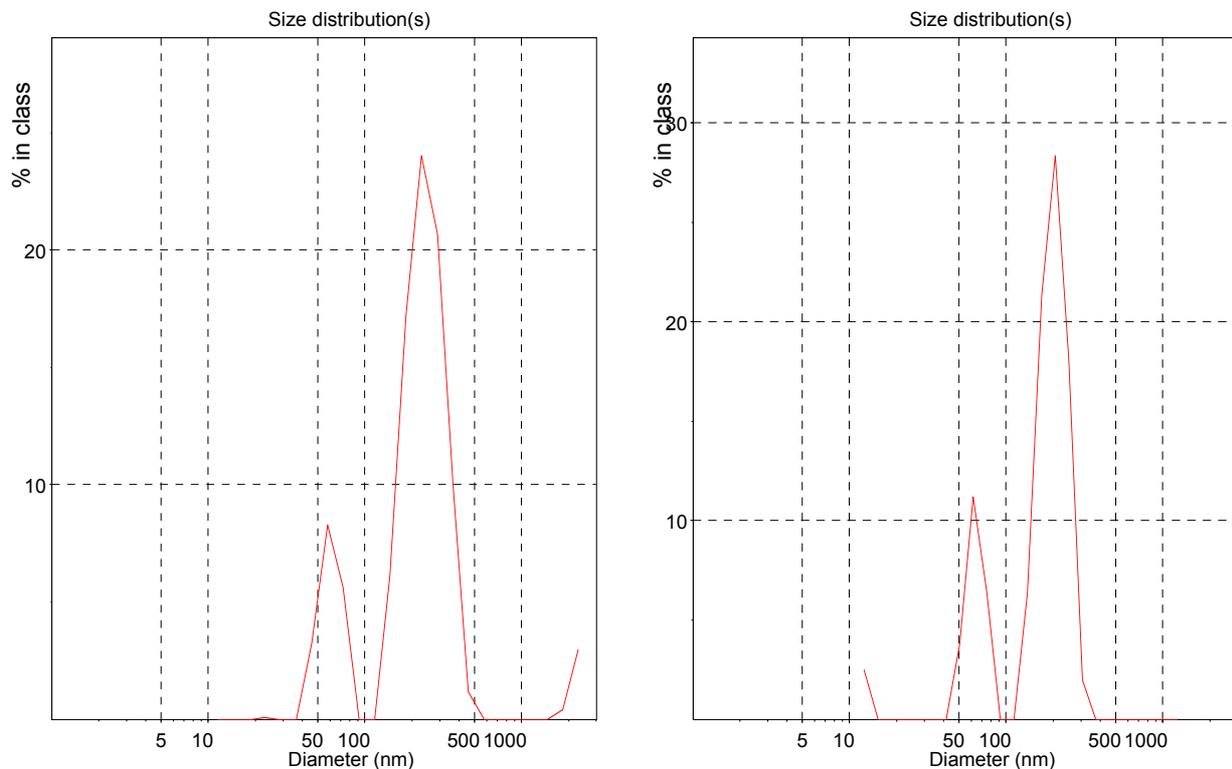


Abbildung 29: PCS-Signale von Liposomen hergestellt mittels Ethanolinjektion aus 200 mM Lipidlösung, links Rohdispersion, rechts nach 10maliger Extrusion durch eine 200nm-Membran

Auch hier kann man erkennen, dass die größeren Liposomen durch die Extrusion aus der Dispersion entfernt wurden, der Anteil der sehr kleinen Vesikel jedoch mit einer Größe von ca. 70 nm blieb unbeeinflusst. Der Polydispersitätsindex kann deshalb durch einen Extrusionsvorgang nicht gesenkt werden.

2.4.3. Rohdispersion 3: 400 mM Lipidlösung in 10%ige Trehaloselösung

Da Trehalose als besonders geeignetes Lyo-Protektivum für liposomale Zubereitungen beschrieben wird, wurde in der nächsten Versuchsreihe die 5%ige Glucoselösung durch eine 10%ige Trehaloselösung ersetzt. Injiziert wurde eine ethanolische Lipidlösung mit einer Konzentration von 400 mM. Die übrigen Parameter entsprachen den beiden vorangegangenen Versuchen. Die Arbeitsschritte und Ergebnisse der PCS-Messungen sind in Abbildung 30 dargestellt.

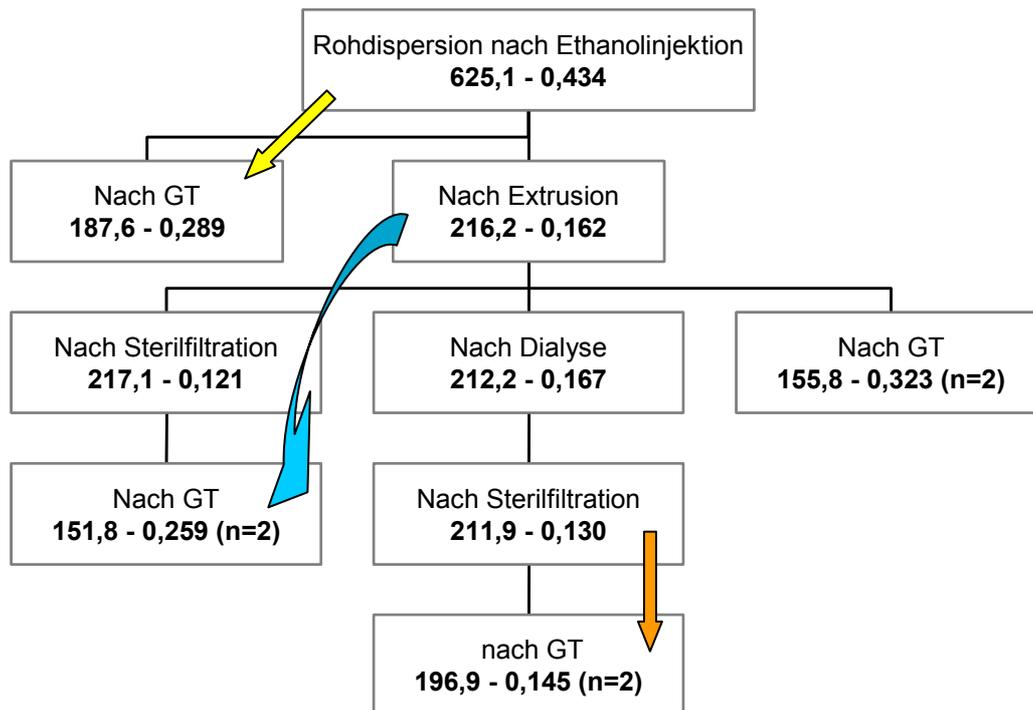


Abbildung 30: Injektion einer 400 mM Lipidlösung in 10%ige Trehaloselösung, Lipidkonzentration der Rohdispersion 10 mM (Dialyse=Tangentialfluss-Filtration, GT=Gefrier-trocknung); links unter den Schritten die Größe in nm, rechts der Polydispersitätsindex

Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass bei Verwendung von Trehalose-Lösung als wässriges Medium auf den Schritt der Tangentialfluss-Filtration verzichtet werden kann, ohne eine übermäßige Zunahme von Größe und PI zu beobachten. Im Falle von extrudierten und sterilfiltrierten Liposomenzubereitungen erhielt man nach Rekonstitution der Lyophilisate Liposomen mit einer Größe von 151,8 nm (blauer Pfeil). Sie waren somit kleiner, als vor der Lyophilisation (625,1 nm) und kleiner als diejenigen, bei denen im Verlauf der Herstellung der Ethanol entzogen wurde (196,9 nm). Der Polydispersitätsindex stieg ohne Entfernung des Ethanols durch die Lyophilisation von 0,121 auf 0,259. Wird der Ethanol im Laufe der Herstellung entzogen, steigt der Polydispersitätsindex auch, allerdings in geringerem Maße (orangefarbener Pfeil). Der Einfluss des Lyophilisationsvorganges auf die Liposomengröße und die Teilchengrößenverteilung ist nicht eindeutig. Im Falle der Rohdispersion nimmt sowohl die Teilchengröße, als auch der PI deutlich ab (gelber Pfeil).

Die Tatsache, dass bei der Verwendung von Trehalose als Lyoprotektivum auf den zeitaufwändigen Schritt der Tangentialfluss-Filtration verzichtet werden kann, ist insbesondere hinsichtlich der relativ kurzen Haltbarkeitsdauer der flüssigen Formulierungen ein besonders positives Ergebnis.

2.5. Einfluss der Lipid-Konzentrationen und der Ansatzgröße

In einer weiteren Versuchsreihe sollten nun Einflussgrößen wie die Lipidkonzentration in Ethanol, die Lipidkonzentration in der Trehaloselösung, als auch die Größe des Ansatzes hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Liposomeneigenschaften nach der Lyophilisation untersucht werden. Auf einen Schritt zur Entfernung des Ethanols wurde bei diesen Versuchen verzichtet.

In Tabelle 20 sind die Parameter der Ethanolinjektion zusammengefasst:

Zusammensetzung	DOTAP-DOPC 50:50
Lipidkonzentration in Ethanol	200, 300 bzw. 400 mM
Lipidkonzentration in Trehalose	10, 20 bzw. 50 mM
Ansatzgröße	10, 25 bzw. 50 ml
Injektionsverfahren	Hamilton-Spritze mit aufgesetzter Kanüle
Injektionsgeschwindigkeit	500 µl/min
Rührgerät	10- und 25 ml: Kreuzbalken-Rührer (Ø14 mm), 50 ml: 3-Blatt-Propeller-Rührer (Ø40 mm).
Rührgeschwindigkeit	400 Upm

Tabelle 20: Parameter zur Ethanolinjektion für Central-Composite-Versuchsplan

Die Extrusion erfolgte 5mal durch eine 200 nm Polycarbonat-Membran, die Sterilfiltration einmal durch einen 0,22 µm Durapore® Membranfilter. Die Zubereitungen wurden in Portionen zu 500 µl in Vials abgefüllt und lyophilisiert. Die Versuche folgten einem Central-Composite-Design, daher wurden drei Ansätze mit dem jeweiligen mittleren Niveau (Ansätze 7a-7c) hergestellt. Dieses Vorgehen hat gegenüber einem vollfaktoriellen Versuchsplan den Vorteil, dass statt 27 (=3³) Versuchen lediglich 17 durchzuführen sind. Auf die Herstellung der 50 ml-Ansätze mit einer Lipidkonzentration in Trehalose von 50 mM wurde aus Kostengründen

verzichtet. Aus Tabelle 21 lassen sich die Zusammensetzungen der einzelnen Ansätze, ebenso wie die Ergebnisse der PCS-Messungen vor bzw. nach der Extrusion, sowie nach Rekonstitution entnehmen.

Ansatz -Nr.	c (Lipid) in Ethanol (mM)	c (Lipid) in Trehalose (mM)	Ansatzgröße (ml)	Größe (nm) - PI vor Extrusion	Größe (nm) - PI nach Extrusion	Größe (nm) - PI nach Lyophilisation
1	400	10	10	621,2 – 0,373	204,3 – 0,137	156,3 – 0,301
2	400	10	50	389,0 – 0,375	211,0 – 0,135	152,2 – 0,279
3	400	20	25	470,7 – 0,314	205,2 – 0,169	207,4 – 0,479
4	400	50	10	445,9 – 0,268	201,7 – 0,158	641,1 – 0,581
5	300	10	25	314,2 – 0,309	229,4 – 0,191	133,0 – 0,368
6	300	20	10	285,8 – 0,248	224,1 – 0,155	243,5 – 0,446
7a	300	20	25	309,2 – 0,335	238,2 – 0,162	227,4 – 0,427
7b	300	20	25	478,8 – 0,304	224,6 – 0,172	188,4 – 0,444
7c	300	20	25	321,1 – 0,305	247,9 – 0,198	209,4 – 0,449
8	300	20	50	436,9 – 0,240	225,4 – 0,170	192,1 – 0,431
9	300	50	25	434,0 – 0,620	282,5 – 0,524	557,7 – 0,532
10	200	10	10	143,7 – 0,239	116,4 – 0,330	115,2 – 0,396
11	200	10	50	160,9 – 0,232	146,0 – 0,324	126,1 – 0,427
12	200	20	25	144,0 – 0,328	144,4 – 0,373	520,6 – 0,583
13	200	50	10	228,4 – 0,252	320,3 – 0,174	547,4 – 0,529

Tabelle 21: Versuchsplan und PCS-Ergebnisse zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Lipidkonzentration in Ethanol bzw. Trehalose , sowie der Ansatzgröße

2.5.1. Grafische Auswertung des Versuchsplanes

In der nachfolgenden Auswertung wird folgendermaßen unterschieden:

- Einflüsse auf die Liposomen unmittelbar nach Ethanolinjektion
- Einflüsse auf die Liposomen nach der Gefriertrocknung

Den bedeutendsten Einfluss auf die Größe der Liposomen unmittelbar nach der Ethanolinjektion hat die Konzentration an Lipiden in der ethanolischen Lösung. Zwischen diesen beiden Größen besteht ein linearer Zusammenhang.

Dies verdeutlicht auch Abbildung 31, in der die Liposomengröße in Abhängigkeit von den Lipidkonzentrationen in Ethanol bzw. in Trehalose aufgetragen ist. Man erkennt, dass die Lipidkonzentration in Trehalose keinen Einfluss auf die Liposomengröße hat.

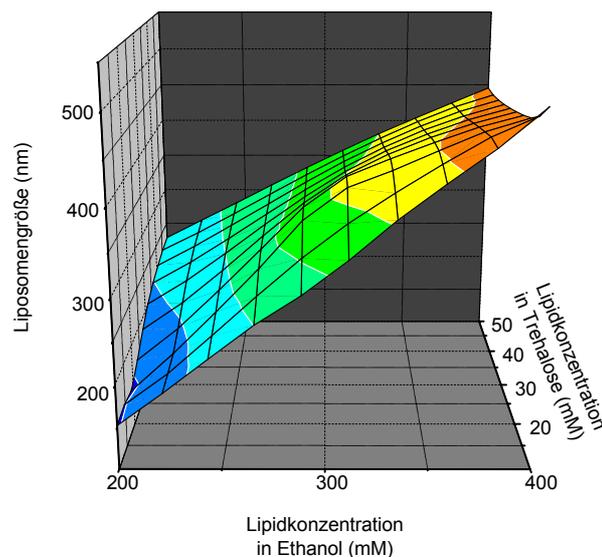


Abbildung 31: Liposomengröße nach der Ethanolinjektion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration in Ethanol bzw. in Trehalose

Auch die Ansatzgröße hat, wie Abbildung 32 zeigt, nur sehr geringe Auswirkungen auf die Größe der hergestellten Liposomen.

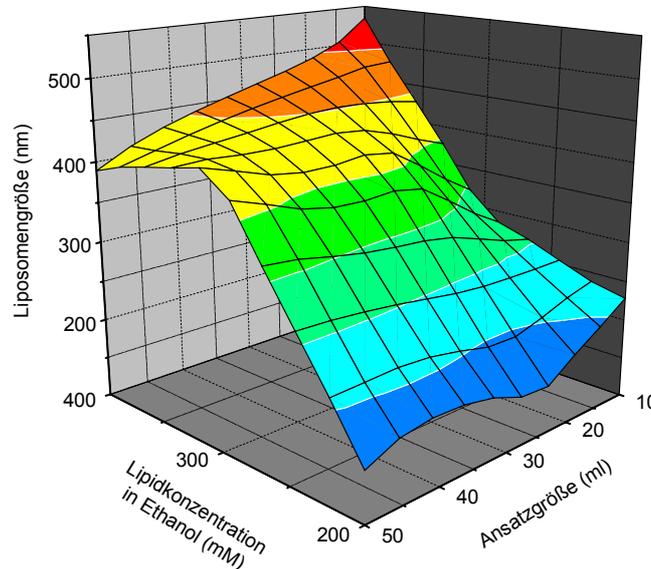


Abbildung 32: Liposomengröße nach der Ethanolinjektion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration in Ethanol bzw. der Ansatzgröße

Zu beobachten ist eine geringfügige Abnahme der Liposomengröße mit steigender Ansatzgröße. Dies kann aber zum einen dadurch erklärt werden, dass bei den 50 ml Ansätzen ein anderer, wahrscheinlich effektiverer Rührflügel benutzt wurde. Zum anderen machen sich hier die zwei fehlenden Ansätze mit 50 mM Gesamtlipid in Trehalose und 50 ml Ansatzvolumen statistisch bemerkbar, da dann überproportional viele Ansätze mit 50 mM Gesamtlipid in einer kleinen Ansatzgröße in die Berechnungen einfließen.

Der Polydispersitätsindex stellt sich unmittelbar nach der Ethanolinjektion relativ unabhängig von den geprüften Parametern in einem Bereich zwischen 0,3 und 0,4 ein (siehe Abbildung 33).

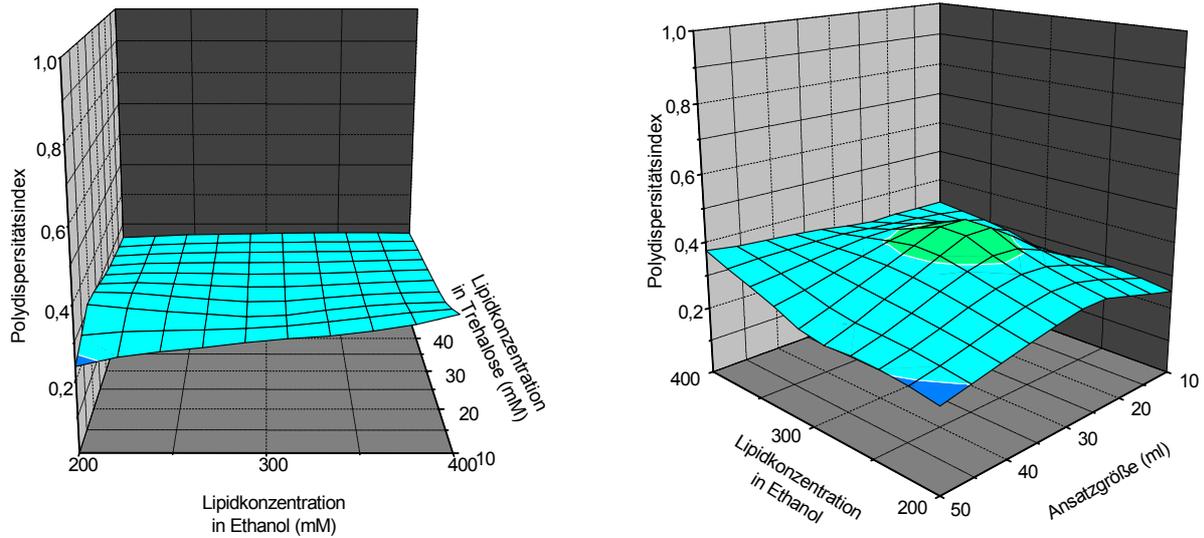


Abbildung 33: Polydispersitätsindex nach der Ethanolinjektion in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration in Ethanol, der Lipidkonzentration in Trehalose bzw. der Ansatzgröße.

Nach der Lyophilisation stellen sich die Zusammenhänge anders dar. Die Liposomengröße ist nun weitestgehend von der Lipidkonzentration in Trehalose abhängig. Liposomen mit einer Größe von ca. 200 nm sind nur im Bereich bis 20mM Lipidgehalt zu erhalten und dies auch nur bei Verwendung einer ethanolischen Lipidlösung mit einer Konzentration von 300 mM oder 400 mM (siehe Abbildung 34)

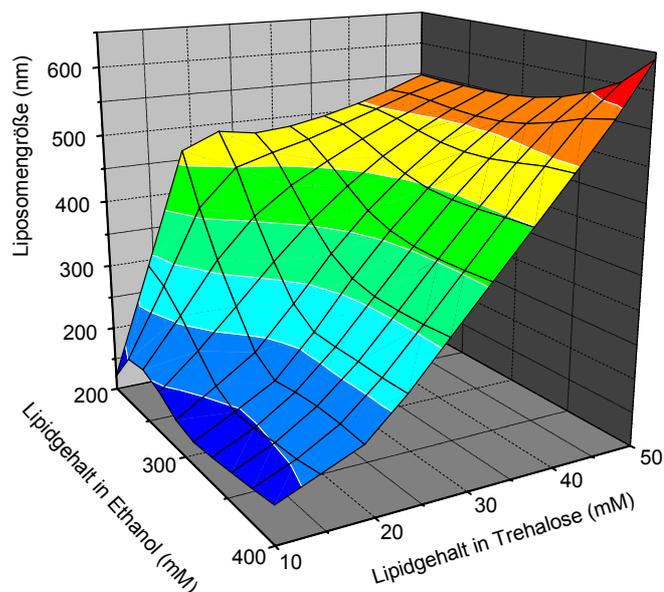


Abbildung 34: Liposomengröße nach der Lyophilisation in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration in Ethanol bzw. in Trehalose

Der Polydispersitätsindex nach Lyophilisation zeigt sich wieder über einen großen Bereich konstant, besitzt aber ein Minimum bei Formulierungen mit niedriger Lipidkonzentration in Trehalose hergestellt durch Injektion einer 400mM ethanolischen Lipidlösung (siehe Abbildung 35).

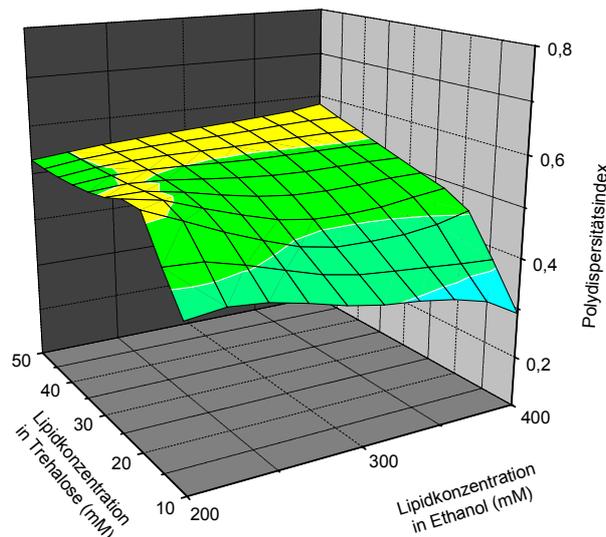


Abbildung 35: Polydispersitätsindex nach der Lyophilisation in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration in Ethanol bzw. in Trehalose

Auf eine grafische Auswertung der Abhängigkeit von Liposomengröße und Polydispersitätsindex von der Ansatzgröße wurde unter Berücksichtigung der zwei fehlenden 50ml Ansätze verzichtet.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Ergebnisse nach Ethanolinjektion: Die Größe der Liposomen nahm mit steigender Lipidkonzentration in Ethanol zu. Der Polydispersitätsindex zeigte kaum Abhängigkeit.

Ergebnisse nach Lyophilisation: Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen wurden dahingehend bestätigt, dass eine Lipidkonzentration in Ethanol von 200 mM zwar sehr kleine, aber auch relativ breit gestreute Teilchengrößen ergibt. Die engsten Teilchengrößenverteilungen nach Lyophilisation wurden von Liposomendispersionen erreicht, die ausgehend von einer Injektion einer 400 mM Lipidlösung hergestellt wurden.

Prinzipiell ließen sich Lipiddispersionen mit 20 mM Gesamtlipid in Trehaloselösung problemlos herstellen. Nach der Extrusion ähnelten diese Zubereitungen jenen mit einem Lipidgehalt von 10 mM. Nach der Lyophilisation hatte die Polydispersität dieser Zubereitungen jedoch stark zugenommen. Zubereitungen mit 50 mM Gesamtlipidkonzentration in Trehalose waren hinsichtlich der Verarbeitbarkeit problematisch. Sie waren durchwegs sehr viskos, was die Extrusion erschwerte. Die aus 200 mM ethanolischer Lipidlösung hergestellten Ansätze schäumten zudem stark. Auch nach der Rekonstitution lyophilisierter Zubereitungen mit 50 mM Gesamtlipidkonzentration erhielt man durchwegs sehr viskose, gallertartige Proben. Diese Liposomen waren deutlich größer und inhomogener als vor der Lyophilisation. Der Einfluss der Ansatzgröße erwies sich als relativ gering. Diese Erfahrung ist im Hinblick auf ein mögliches scale-up der Herstellungsmethode von Vorteil.

2.6. Erhöhung der Gesamtlipidmenge in der Trehaloselösung

Durch die Erhöhung der Gesamtlipidmenge wäre man in der Lage, das einem Patienten zu verabreichende Infusionsvolumen zu reduzieren und damit auch die Infusionsdauer zu verkürzen. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch nochmals genauer untersucht, inwieweit wässrige Liposomendispersionen mit einer Konzentration von 20 mM, 30 mM, bzw. 40 mM Lipid hergestellt werden können. Mittels einer Spritze wurde eine 400 mM Lipidlösung aus 50 mol% DOTAP und 50 mol% DOPC in eine mittels Kreuzbalken-Rührer ($\varnothing 14$ mm) agitierte 10%ige Trehaloselösung injiziert. Diese Rohdispersion wurde 5mal durch eine 200 nm Membran extrudiert und danach einmalig durch eine 0,22 μm Durapore® Membran sterilfiltriert. Dieser Ansatz mit 10 ml Volumen wurde wieder in Aliquoten zu 500 μl in Vials abgefüllt und lyophilisiert.

Die Ergebnisse der Größenbestimmung dieser Ansätze zeigt Abbildung 36:

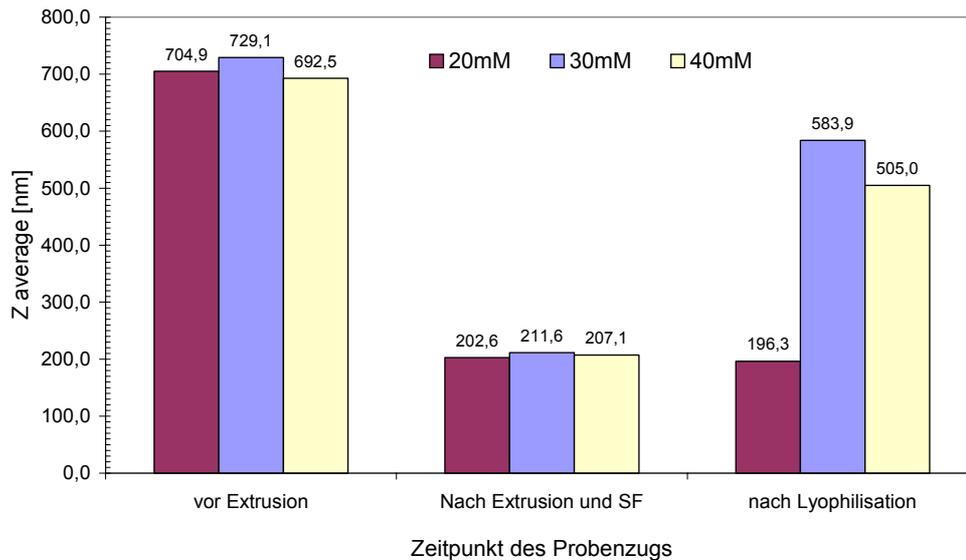


Abbildung 36: Liposomengrößen der Zubereitungen mit 20 mM, 30 mM bzw. 40 mM Gesamtlipidkonzentration;

Nach der Lyophilisation blieb lediglich die Liposomengröße der Zubereitung mit 20 mM auf dem Niveau vor der Lyophilisation. Die Größen der beiden anderen Zubereitungen stiegen stark an.

Bei der Betrachtung der Teilchengrößenverteilung nach der Lyophilisation zeigen alle drei Formulierungen polydisperses Verhalten. Der Polydispersitätsindex steigt auf Werte um die 0,5, was im Sinne unserer Zielsetzung nicht akzeptabel ist (siehe Abbildung 37).

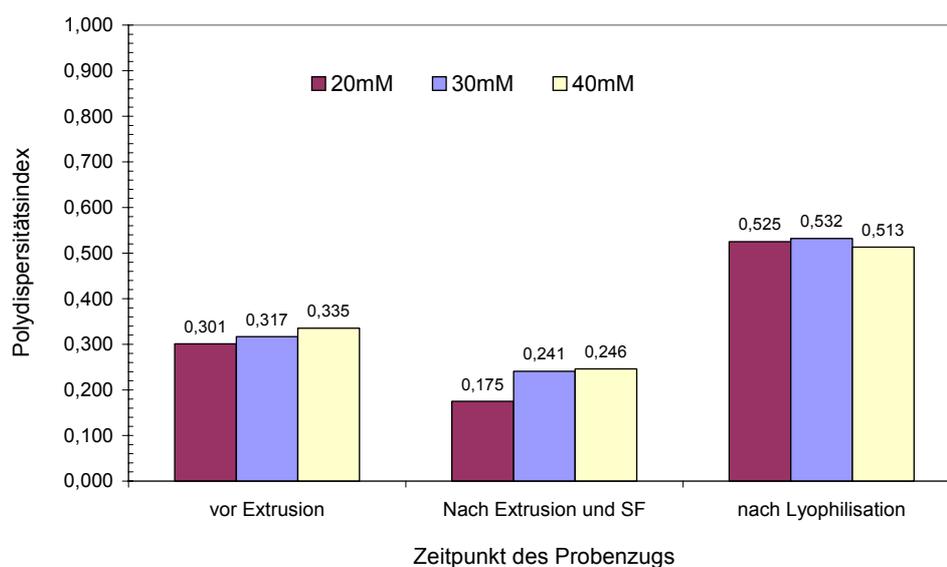


Abbildung 37: Polydispersitätsindices der Zubereitungen mit 20 mM, 30 mM bzw. 40 mM Gesamtlipidkonzentration;

2.7. Erhöhung der Menge an Trehalose

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, inwieweit eine Erhöhung der Trehalose-Menge die Gefriertrocknung von Liposomenzubereitungen mit einem Gesamtlipidgehalt von 20 mM in wässriger Dispersion optimieren könnte. Dazu wurde die ethanolische Lipidlösung unter ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen in 15%ige (w/v) Trehaloselösung injiziert. Wie man Tabelle 22 entnehmen kann, bringt diese Maßnahme aber nicht den erwünschten Effekt, die Teilchengröße beträgt auch hier ca. 200 nm, ein Polydispersitätsindex nach der Lyophilisation von ca. 0,5 zeigt eine sehr breite Teilchengrößenverteilung an.

	Größe (nm)	PI
Nach Extrusion und Sterilfiltration	224,5	0,188
Nach Lyophilisation	197,2	0,493

Tabelle 22: Größe und PI einer Liposomendispersion mit einer Lipidkonzentration von 20 mM in 15%iger (w/v) Trehaloselösung

2.8. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Ethanolinjektionsmethode in Kombination mit weiteren Verfahrensschritten wie Extrusion und Sterilfiltration eignet sich zur Herstellung kationischer Liposomen aus äquimolaren Anteilen aus DOTAP und DOPC. Bei Verwendung einer ethanolischen Lipidlösung mit einer Konzentration von 400 mM lassen sich Dispersionen in wässrigen Medien mit Konzentrationen bis zu 50 mM herstellen. Die Teilchengrößen dieser Dispersionen liegen nach Extrusion durch geeignete Membranen im Bereich um die 200 nm, der Polydispersitätsindex als Maß für die Teilchengrößenverteilung liegt dabei unter 0,2.

Bei Zubereitungen mit einer Lipidkonzentration von 10 mM in Trehalose sinkt die Größe der Liposomen durch die Lyophilisation auf Werte von ca. 150 nm. Der Polydispersitätsindex steigt hingegen auf ca. 0,3. Bei höher konzentrierten Dispersionen liegen die PI-Werte unabhängig von der Ausgangs-Konzentration in der ethanolischen Lösung bei höheren Werten zwischen 0,4 und 0,6. Eine Erhöhung der

Menge an Trehalose als Lyo-Protektivum von 10% auf 15% (w/v) bringt hierbei keine Verbesserung.

Eine Entfernung des Ethanol vor der Lyophilisation kann bei Verwendung von Trehalose umgangen werden. Der Polydispersitätsindex nach Lyophilisation ist nach vorheriger Tangentialfluss-Filtration zwar geringer, angesichts des aufwändigen Verfahrens relativiert sich dieser Vorteil jedoch.

Für die Qualität der Liposomen nach der Lyophilisation sind in erster Linie die Konzentrationen der Lipide in ethanolischer Lösung bzw. im wässrigen Medium ausschlaggebend. Die anderen untersuchten Parameter haben untergeordnete Bedeutung.

Im folgenden Abschnitt sollte nun untersucht werden, inwieweit diese Erkenntnisse auf die Herstellung paclitaxelhaltiger Zubereitungen übertragen werden können.

3. Herstellung paclitaxelhaltiger Liposomen mittels Ethanolinjektion und anschließender Gefriertrocknung

Für die Herstellung paclitaxelhaltiger Liposomen mittels Ethanolinjektion und anschließender Gefriertrocknung wurde eine Lipid-Konzentration in Ethanol von 400 mM als optimal betrachtet, die Konzentration in der wässrigen Dispersion sollte 10 mM betragen. Als Isotonisierungsmittel und Lyo-Protektivum diente Trehalose in einer Konzentration von 10% (w/v). Auf einen Schritt zur Entfernung des Ethanols wurde verzichtet. Die Extrusionen erfolgten 5mal durch eine 200 nm Polycarbonatmembran, eine Sterilfiltration mittels 0,22 µm Durapore®-Membranfilter wurde durchgeführt. Die Ansatzgröße variierte je nach Versuchsplan und anschließender Analytik. Die Lyophilisation wurde nach dem bislang verwendeten Protokoll durchgeführt. Die Formulierungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei 4 °C hergestellt.

3.1. Kationische Liposomen mit 3 bis 7 mol% Paclitaxel

Aus den Erfahrungen mit paclitaxelhaltigen Liposomen, die mittels Filmmethode hergestellt wurden (siehe Kapitel III.2.1. bzw. III.2.2.), war zu erwarten, dass eine Beladung von kationischen Liposomen mit einer Paclitaxel-Menge von ca. 5 mol% erreicht werden könnte. In den ersten Versuchen mit paclitaxelhaltigen Liposomen, die durch Ethanolinjektion hergestellt und anschließend einer Lyophilisation unterzogen wurden, sollte diese Obergrenze an Paclitaxel genauer definiert werden. Die Herstellung erfolgte gemäß nachfolgenden Parametern (Tabelle 23).

Lipidkonzentration in Ethanol	400 mM
Lipidkonzentration in Trehalose	10 mM
Ansatzgröße	je 10 ml
Injektionsverfahren	Spritze mit aufgesetzter Kanüle
Injektionsgeschwindigkeit	500 µl/min
Rührgerät	Magnetrührfisch
Rührgeschwindigkeit	400 Upm

Tabelle 23: Parameter zur Herstellung der Chargen FG151 bis FG154

Nach Extrusion und Sterilfiltration erfolgte die Lyophilisation in Aliquoten zu je 500 µl. Die Formulierungen wurden vor der Extrusion, nach der Sterilfiltration und unmittelbar nach der Lyophilisation hinsichtlich Liposomengröße, Polydispersität, Paclitaxel-Gehalt und Stabilität im suspendierten Zustand analysiert. Zudem wurden die Lyophilisate über einen Zeitraum von 12 Monaten im Kühlschrank gelagert und in gewissen Zeitabständen wiederum der Analytik unterzogen.

Tabelle 24 gibt einen Überblick über die hergestellten Formulierungen:

Charge	DOTAP [mol%]	DOPC [mol%]	Paclitaxel [mol%]
FG151	50	47	3
FG152	50	45	5
FG153	50	44	6
FG154	50	43	7

Tabelle 24: Zusammensetzung der Chargen FG151-154 bei 10 mM Gesamtlipid

Zunächst fiel auf, dass Charge FG154 mit einem Paclitaxelgehalt von 6,0 mol% unmittelbar nach der Ethanolinjektion, sowie 5,13 mol% nach der Extrusion nicht ausreichend lange stabil war, um in die Gefriertrocknungsanlage überführt werden zu können. Bereits beim Abfüllen der Zubereitung in die Lyophilisations-Vials konnten Paclitaxel-Kristalle beobachtet werden. Auch bei Charge FG153 konnten innerhalb von 30 Minuten Ausflockungen beobachtet werden. Auf eine Darstellung der Gehalte nach der Lyophilisation wurde deswegen bei diesen beiden Chargen verzichtet. Die analysierten Paclitaxelmengen in den einzelnen Chargen zeigt Abbildung 38:

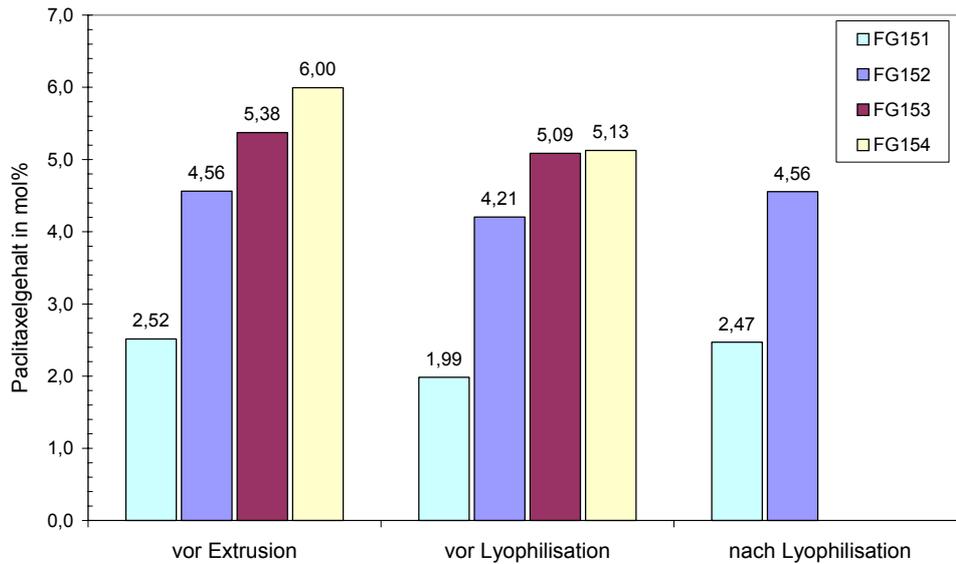


Abbildung 38: Paclitaxel-Gehalte der Chargen FG151 - FG154 vor Extrusion, sowie unmittelbar vor und nach Lyophilisation

Die analysierten Werte lagen ca. 10-15% unter den theoretisch erwarteten Werten. Bei allen Chargen nahm der Gehalt nach Extrusion und Sterilfiltration ab. Am stärksten geschah dies bei Charge FG151, bei der der Gehalt auf ca. 2 mol% absank. Nach der Lyophilisation stiegen die Gehalts-Werte für die Chargen FG151 und FG152 wieder auf ihre Werte vor der Extrusion an.

Abbildung 39 zeigt nochmals die Paclitaxel-Gehalte dieser beiden Chargen, diesmal ergänzt durch die Werte nach 3 bzw. 12 Monaten Lagerung der Lyophilisate im Kühlschrank und die korrespondierenden Mengen des Abbauproduktes.

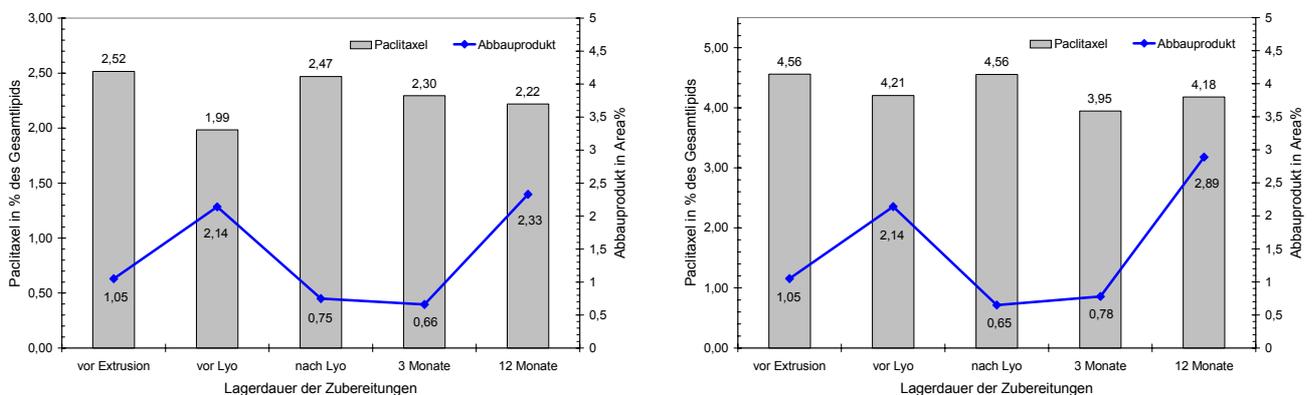


Abbildung 39: Paclitaxelgehalte und Anteile von 7-Epipaclitaxel in Chargen FG151 und FG152 vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 12monatiger Lagerung der Lyophilisate

Man erkennt trotz Schwankungen einen nur leicht abnehmenden Gehalt, was auf eine relativ stabile Encapsulierung des Arzneistoffs in der lyophilisierten Zubereitung über einen Zeitraum von 12 Monaten schließen lässt. Der Gehalt an 7-Epipaclitaxel erreicht nach dieser Lagerung Werte zwischen 2,3 und 2,9 %. Das Abbauprodukt ist bei diesen Ansätzen bereits in den nicht gelagerten Proben nachzuweisen. Dies ist vermutlich auf die Lagerung der Proben bis zur Durchführung der HPLC-Analytik zurückzuführen.

Die Stabilität der Lyophilisate zeigt sich auch in den Daten der PCS-Messungen. Über den gesamten Verlauf sind fast unveränderte Werte für Liposomengröße und Polydispersitätsindex sowohl bei Charge FG151 mit 3 mol% Paclitaxel (Abbildung 40), als auch für Charge FG152 mit 5 mol% Paclitaxel (Abbildung 41) zu erkennen.

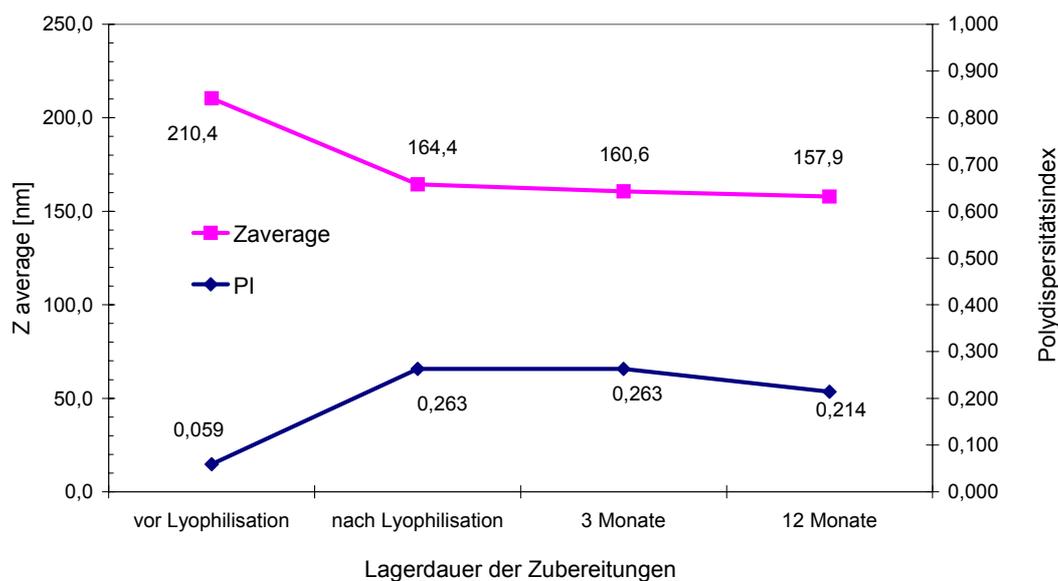


Abbildung 40: Größe und PI von Charge FG151 (3 mol% Paclitaxelgehalt) vor und nach Lyophilisation, sowie nach Lagerung der Lyophilisate

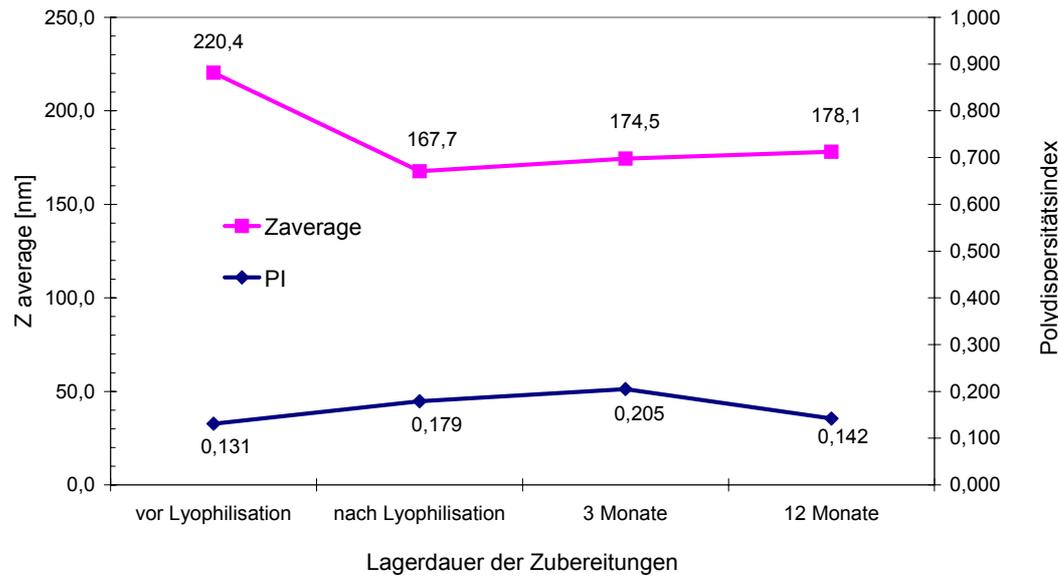


Abbildung 41: Größe und PI von Charge FG152 (5 mol% Paclitaxelgehalt) vor und nach Lyophilisation, sowie nach Lagerung der Lyophilisate

Die Analyse der Haltbarkeit der beiden Zubereitungen erfolgte mittels optischer Kontrolle auf Bildung von Paclitaxel-Kristallen in der wässrigen Suspension. Dies erbrachte für FG151 eine Haltbarkeit von über 48 Stunden, sowie für FG152 eine Haltbarkeit von ca. 12 – 15 Stunden. Dies korreliert angesichts der tatsächlich enthaltenen Mengen an Paclitaxel gut mit den Daten der Chargen FG58 und FG59, die mittels Filmmethode und anschließender Lyophilisation hergestellt wurden (siehe Kapitel III.2.2). Auffallend ist dabei die relativ lange Haltbarkeit der Charge FG152 im Vergleich zu den Chargen FG153 und FG154. Obwohl der Unterschied in der enkapsulierten Paclitaxel-Menge lediglich 0,5 mol% beträgt, sind die beiden letztgenannten nicht über einen Zeitraum von 30 Minuten stabil. Dies sind Anzeichen dafür, dass es eine „kritische“ Paclitaxel-Menge gibt, deren Überschreitung die sofortige Freigabe des Paclitaxels aus der Lipid-Membran zur Folge hat und die im Falle unserer Formulierung und Herstellungsmethodik zwischen 5 und 6 mol% Paclitaxel liegt.

Das Aussehen der Lyophilisate hat sich über den gesamten beobachteten Zeitraum nicht verändert. Die Gerüst-Struktur blieb hier im Vergleich zu den Lyophilisaten aus Glucoselösung (Kapitel III.2.2.) erhalten.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde bei der weiteren Optimierung der Herstellungsmethode stets eine Formulierung von 50 mol% DOTAP, 45 mol% DOPC und 5 mol% Paclitaxel verwendet.

3.2. Lagerstabilität von Lyophilisaten mit 5 mol% Paclitaxel

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, welche Haltbarkeit kationische Liposomen mit einem Paclitaxelgehalt von 5 mol% in lyophilisierter Form besitzen. Hierzu wurden zwei Ansätze mit einem Volumen von jeweils 10 ml hergestellt. Die Injektion erfolgte durch Eintropfen der ethanolischen Lipidlösung aus einer Eppendorfpipette in eine mittels Magnetrührer bewegte 10%ige Trehaloselösung. Neben der Haltbarkeit der Zubereitungen wurde erneut der Einfluss der Herstellungstemperatur untersucht, daher wurde ein Ansatz (Charge FG195) unter gekühlten Bedingungen, der andere (Charge FG196) bei Raumtemperatur hergestellt.

Die Größe und die Teilchengrößenverteilung wurde nach Extrusion und Sterilfiltration, unmittelbar nach der Lyophilisation sowie nach 3, 8 und 24 Monaten Lagerung der Lyophilisate im Kühlschrank bestimmt. Die Ergebnisse für Charge FG195 sind in Abbildung 42 dargestellt.

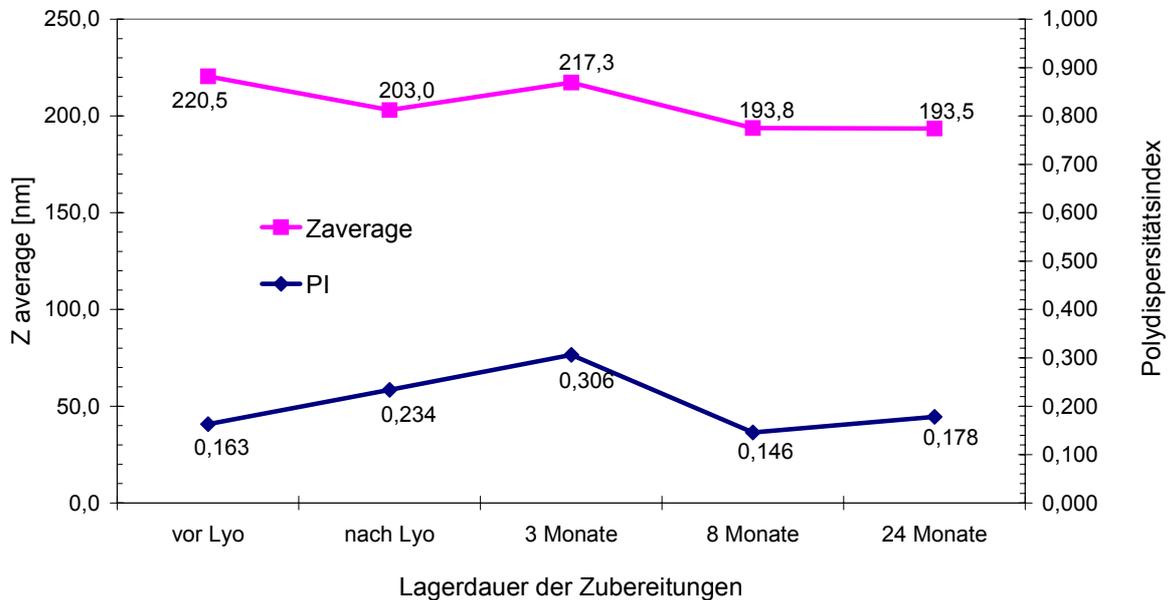


Abbildung 42: Größe und PI von Charge FG195 (gekühlte Herstellung) vor und nach Lyophilisation, sowie nach Lagerung der Lyophilisate

Zu erkennen ist hier wiederum die Abnahme der Liposomengröße, sowie die Zunahme der Polydispersität durch die Lyophilisation. Im Laufe der Lagerung über 24 Monate ändert sich die Liposomengröße kaum, der Polydispersitätsindex nimmt,

allerdings unter Schwankungen, geringfügig ab. Eine ähnliche Situation zeigt Abbildung 43, in der die PCS-Daten für Charge FG196 aufgetragen sind.

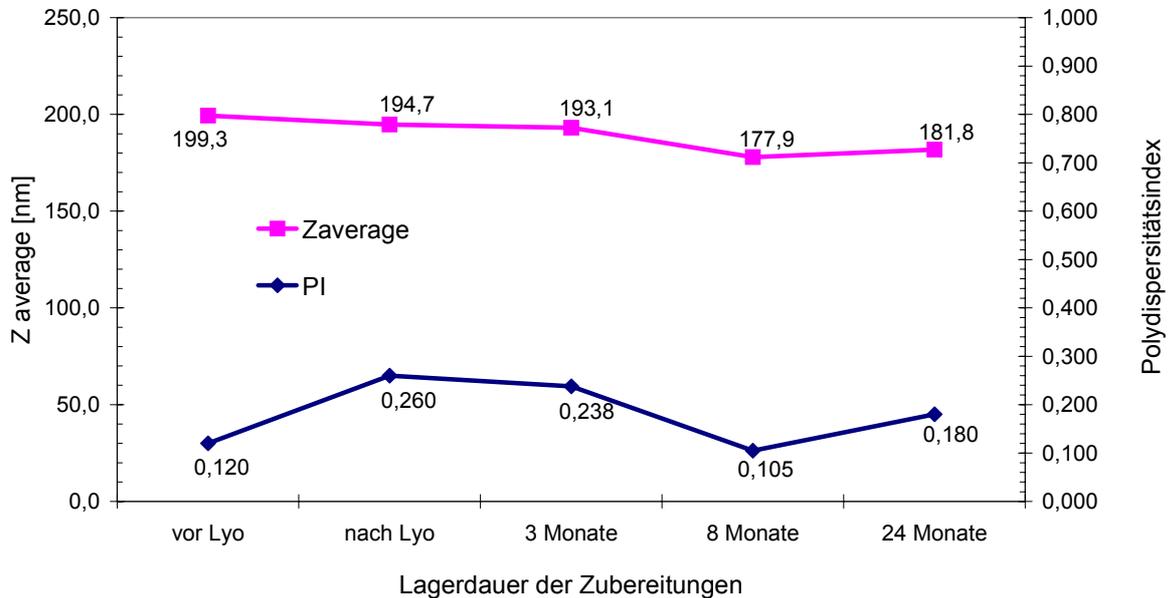


Abbildung 43: Größe und PI von Charge FG196 (Herstellung bei RT) vor und nach Lyophilisation, sowie nach Lagerung der Lyophilisate

Die Teilchengrößen verhalten sich bei diesem Ansatz vergleichbar zu den Daten für Charge FG195. Bei den Werten für den Polydispersitätsindex fällt eine relativ gesehen größere Zunahme nach der Lyophilisation auf, auch hier beobachtet man über die beobachtete Lagerdauer tendenziell eine leichte Abnahme der Werte.

Auch die gemessenen Gehaltswerte für Paclitaxel zeigen eine gleichbleibende Qualität der Lyophilisate an. In Abbildung 44 sind die gemessenen Werte für die beiden Chargen vor bzw. nach der Gefriertrocknung, sowie nach bis zu 24monatiger Lagerung der Lyophilisate im Kühlschrank graphisch dargestellt.

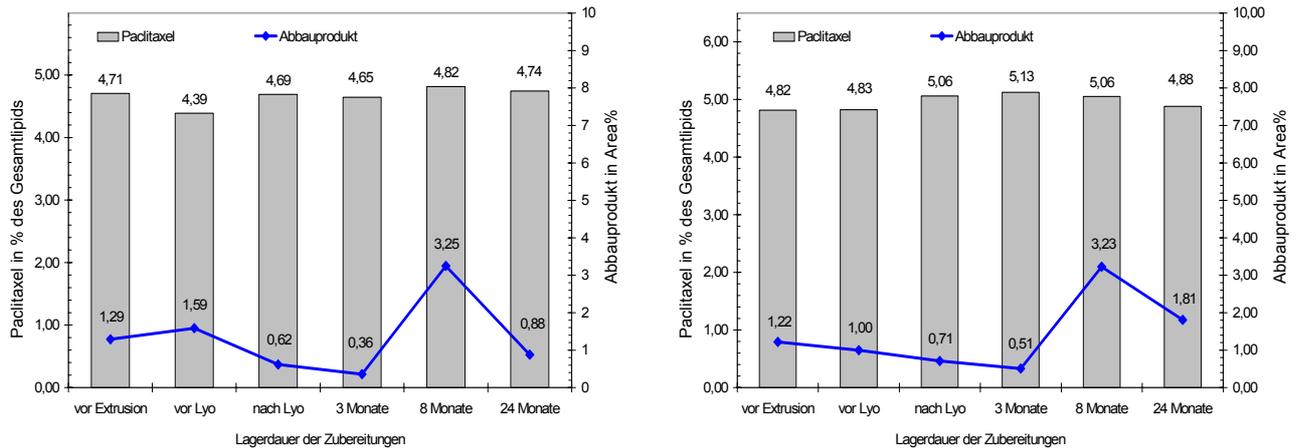


Abbildung 44: Paclitaxelgehalte und Anteile von 7-Epipaclitaxel in Chargen FG195 und FG196 vor und nach Lyophilisation, sowie nach bis zu 24monatiger Lagerung der Lyophilisate

Der Verlauf der beiden Trendlinien macht deutlich, dass der Paclitaxelgehalt in beiden Zubereitungen über den Beobachtungszeitraum konstant bleibt. Bei Charge FG195 ist nach Extrusion und Sterilfiltration eine leichte Abnahme des Gehalts sichtbar, in den rekonstituierten Proben allerdings liegt der Gehalt stets auf dem Niveau der Werte vor der Extrusion. Auch hier ist das Abbauprodukt in den frisch hergestellten Proben bereits nachweisbar. Die möglichen Gründe dafür wurden weiter oben bereits angesprochen. Positiv ist, dass der Gehalt an 7-Epipaclitaxel selbst nach 24 Monaten Lagerung lediglich bei 0,9 bzw. 1,8 % liegt.

Während der Wassergehalt der beiden Zubereitungen unmittelbar nach der Lyophilisation bei ca. 0,8% lag, ergaben die Messungen nach 24 Monaten Lagerdauer eine Feuchtigkeit von 1,7 % für Charge FG195 und 1,6 % für Charge FG196. Im Vergleich zu den Zubereitungen mit Glucose als Hilfsstoff (Kapitel III.2.1, Chargen FG52 und 53) ist dieser Wert relativ gering und dürfte auch zum geringen Gehalt an Abbauprodukt beitragen.

Die Lyophilisate haben sich innerhalb der 24monatigen Lagerung in ihrem Aussehen nicht verändert.

Die Haltbarkeit in den resuspendierten Formulierungen wurde aufgrund der geringen Menge an Liposomen-Dispersionen in den Vials lediglich optisch bestimmt und lag bei beiden Formulierungen in einer Größenordnung von ca. 24 Stunden. Dies ist angesichts der Menge an enkapsuliertem Paclitaxel ein relativ hoher Wert, auch im Vergleich mit den Ergebnissen aus Kapitel III.2. und würde eine Anwendung des Arzneimittels nach Rekonstitution in der Klinik ermöglichen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnten in diesem Versuch kationische Liposomen mit einem gemessenen Paclitaxelgehalt von 4,7 bis 5,1 mol% hergestellt werden, die in ihrer lyophilisierten Form über einen Zeitraum von 24 Monaten eine gleich bleibende Qualität aufwiesen. Eine Kristallisation des Paclitaxels war in den rekonstituierten Proben beider Chargen trotz des hohen Paclitaxel-Gehaltes erst nach ca. 24 Stunden zu erkennen. Unterschiede zwischen den beiden Formulierungen aufgrund der unterschiedlichen Temperaturen bei der Herstellung waren in keinem der untersuchten Parameter auszumachen.

3.3. In-use-Stabilität einer nicht lyophilisierten Zubereitung

Angesichts der Ungenauigkeit der Bestimmung der Stabilität einer suspendierten Zubereitung mittels optischer Kontrolle auf Kristallisationsvorgänge wurde im nächsten Versuch nun anhand eines Ansatzes mit einer Chargengröße von 40 ml diese Stabilitätsprüfung durch Lichtblockademessungen durchgeführt. Die Herstellung dieser Charge (FG183) erfolgte analog den vorangegangenen Ansätzen. Die wässrige Phase wurde mittels Magnet-Rührfisch gerührt, die Injektion erfolgte durch Eintropfen der ethanolischen Lipidlösung mittels Eppendorf-Pipette. Zur Extrusion und Sterilfiltration wurde ein Lipex-Extruder mit einem Gesamtvolumen von 100ml verwendet. Alle Herstellungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Es erfolgte keine Lyophilisation.

Der Paclitaxelgehalt nach Ethanolinjektion, sowie nach Extrusion und Sterilfiltration wurde mit 4,64 mol% bestimmt. Nach der Sterilfiltration betrug die Größe der Liposomen 204,0 nm bei einem Polydispersitätsindex von 0,171.

Unmittelbar nach der Sterilfiltration wurden die Partikelzahlen dieser Zubereitung mittels Lichtblockade gemessen und der Ansatz danach im Kühlschrank gelagert. Danach wurden in Abständen von 1 bis 6 Stunden über einen Gesamt-Zeitraum von 27 Stunden die Messungen wiederholt.

Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen, wobei die Anzahl der Partikel in Abhängigkeit von der Lagerungszeit im Kühlschrank aufgetragen ist. In der rechten Graphik ist ein vergrößerter Ausschnitt abgebildet, um eine genauere Betrachtung zu gestatten.

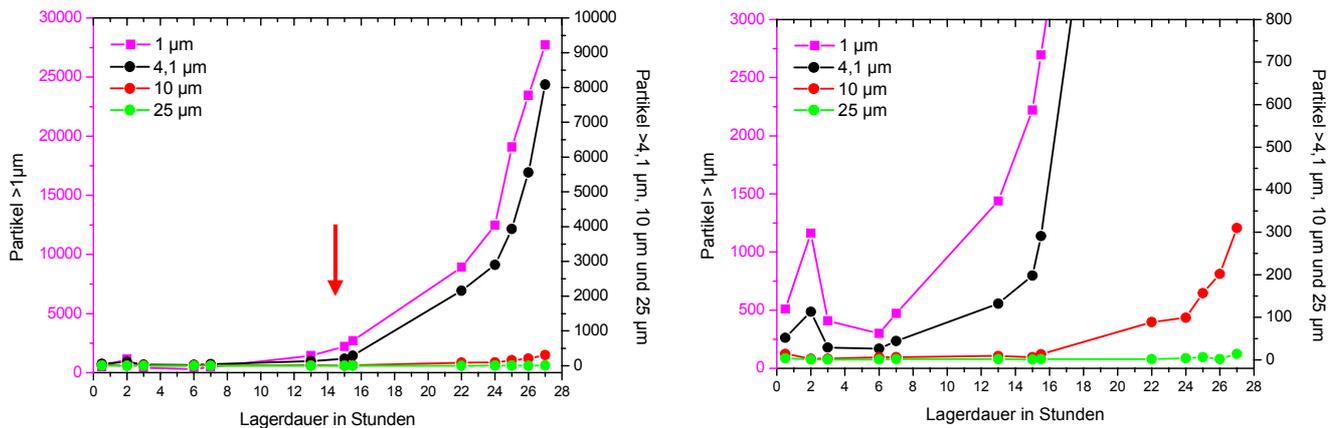


Abbildung 45: Ergebnisse der Lichtblockademessungen von Charge FG183; rechts vergrößert

In der rechten Graphik ist zu erkennen, dass ab einem Zeitpunkt von ca. 7 Stunden nach Beendigung der Sterilfiltration vor allem die Anzahl an Partikeln kleiner 10 µm sprunghaft ansteigt. Ab einem Zeitpunkt von ca. 15 Stunden nach der Herstellung beginnt auch die Zunahme an Partikeln zwischen 10 und 25 µm. Partikel über 25 µm sind erst bei der letzten Messung mit einer Anzahl von 14 Partikel je ml Probe in nennenswerter Anzahl vertreten. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich der Beginn der Kristallisation von Paclitaxel im wässrigen Medium auf einen Zeitraum zwischen 13 und 15 Stunden festlegen (roter Pfeil). Optisch waren die Kristalle erst ab ca. 28 Stunden zu erkennen. Die maximal zulässige Anzahl an Partikeln in Parenteralia gemäß den Monographien in USP26 (<788> Particulate Matter in Injections) bzw. Ph.Eur. 2.9.19 wäre nach 24 Stunden erreicht gewesen.

In parallel hierzu durchgeführten PCS-Messungen konnte keine Veränderung der Liposomengröße bzw. des Polydispersitätsindex erkannt werden. Die einzelnen Werte zeigt Tabelle 25.

Lagerdauer (Stunden)	Größe (nm)	Polydispersitätsindex
0	204,0	0,171
8	211,2	0,181
14	216,7	0,160
19	220,5	0,165

Tabelle 25: Daten der PCS-Messungen von Charge FG183

Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels Lichtblockademessungen kann der Eintritt der Kristallisation von Paclitaxel in wässrigen Liposomendispersionen genau und sensitiv verfolgt werden. Die in den Proben enthaltenen Partikel können auch quantitativ erfasst werden, wobei in unseren Versuchen die Bestimmung des Zeitpunkts der Zunahme an Partikeln mit bestimmter Größe im Mittelpunkt stand.

Die Zunahme an Partikeln ist in der hier hergestellten Zubereitung ca. 12 Stunden vor dem visuell erkennbaren Auftreten der Kristallisation detektierbar. Die Charge FG183 mit einem Paclitaxelgehalt von ca. 4,6 mol% hätte demnach eine in use-Stabilität von ca. 13 Stunden.

Obwohl für unsere üblichen Ansatzgrößen der Bedarf an Probenvolumen von ca. 1,5ml je Messung relativ viel ist, erscheint er unter dem Aspekt der angestrebten Herstellung von Mustern zur Klinischen Prüfung hingegen eher gering.

Mittels PCS-Messungen kann der Beginn der Kristallisation nicht erfasst werden. Wahrscheinlich kommt es im Verlauf der Bildung von Paclitaxel-Kristallen zu Sedimentationsvorgängen, die die gebildeten Partikel der Messung entziehen.

Abbildung 46 zeigt eine PCS-Messung einer Probe, in der optisch bereits deutliche Paclitaxel-Ausflockungen zu beobachten waren. In der Werte-Tabelle rechts sieht man sowohl für die Größe, als auch für den PI Werte, die auch mit stabilen Zubereitungen gemessen werden.

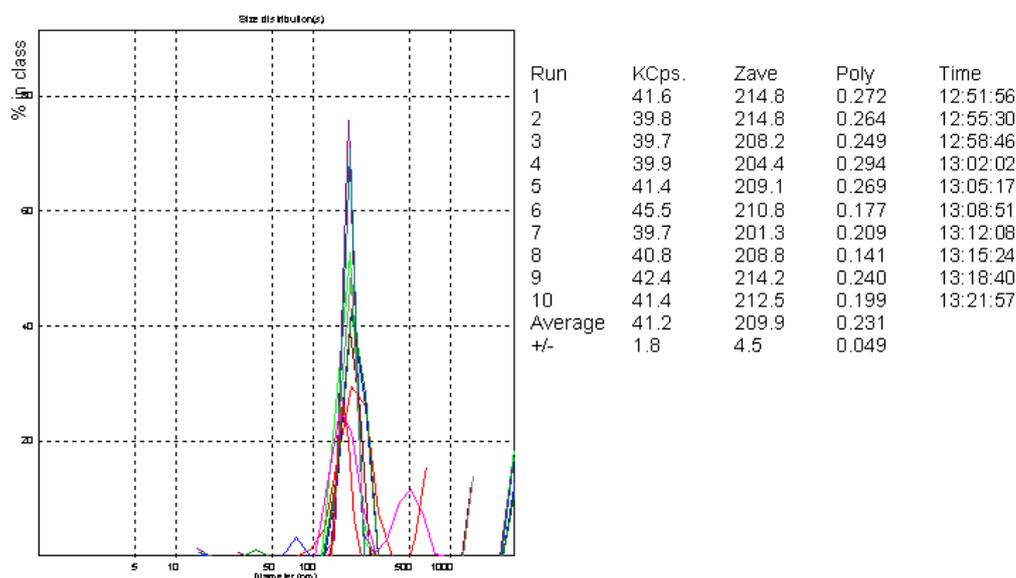


Abbildung 46: Graph und Wertetabelle der PCS-Messung einer instabilen Probe

3.4. In-use-Stabilität von rekonstituierten Zubereitungen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit die Erfahrungen aus Kapitel III.3.3. auch auf lyophilisierte Zubereitungen nach ihrer Rekonstitution zutreffen. Hierzu wurden zwei Ansätze durch Injektion einer ethanolischen Lipidlösung in 10%iger Trehaloselösung gemäß Tabelle 26 hergestellt.

Zusammensetzung (mol%)	DOTAP-DOPC-Paclitaxel 50:45:5
Lipidkonzentration in Ethanol	400 mM
Lipidkonzentration in Trehalose	10 mM
Ansatzgröße	je 200 ml
Injektionsverfahren	Spritze mit aufgesetzter Kanüle
Injektionsgeschwindigkeit	3 ml/min
Rührgerät	Magnetrührfisch
Rührgeschwindigkeit	400 Upm

Tabelle 26: Parameter zur Herstellung der Chargen FG211 und FG212

Um den Einfluss der Herstellungstemperatur zu untersuchen, wurde ein Ansatz bei Raumtemperatur hergestellt (FG212), ein zweiter Ansatz in einem auf 4°C temperiertem Kühlraum (FG211). Für beide Chargen wurde die Zeitspanne zwischen der Sterilfiltration und dem Einbringen in die Gefriertrocknungsanlage konstant gehalten. Die Ansätze wurden zur Lyophilisation in Aliquote à 15 ml geteilt, diese Vials wurden unmittelbar vor Einbringen in die Gefriertrocknungsanlage gewogen und bei der Rekonstitution mit Reinstwasser auf das ursprüngliche Gewicht aufgefüllt.

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Kurzzeitstabilität nach Rekonstitution bezüglich der Parameter Größe, Polydispersitätsindex, Paclitaxelgehalt, Zeta-Potential und Kristallisationsphänomenen zu bestimmen.

3.4.1. Liposomengröße und Teilchengrößenverteilung

Tabelle 27 zeigt die Veränderung der Liposomengröße und des Polydispersitätsindices während der Herstellung. Die Werte nach der Lyophilisation sind Mittelwerte von 6 bzw. 5 rekonstituierten Lyophilisaten.

Charge FG211	Größe (nm)	PI
Vor Extrusion	539,0	0,605
Vor Lyophilisation	225,2	0,218
Nach Lyophilisation	192,6±9,4	0,200±0,038
Charge FG212		
Charge FG212	Größe (nm)	PI
Vor Extrusion	549,0	0,745
Vor Lyophilisation	204,2	0,285
Nach Lyophilisation	185,1±8,5	0,200±0,060

Tabelle 27: Größe und PI der Chargen FG211 (4°C) und FG212 (RT) nach Ethanolinjektion bzw. vor und nach Lyophilisation

Man erkennt, dass die Liposomengröße nach der Lyophilisation, wie bereits bei früheren Versuchen beobachtet, abnimmt. Zudem nehmen die Teilchengrößenverteilungen auf einen Mittelwert von 0,200 ab.

Zwischen der Herstellung bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur ist hinsichtlich der PCS-Daten insbesondere nach Lyophilisation kein Unterschied festzustellen.

Die Polydispersitätsindices nach der Ethanolinjektion, bzw. nach Extrusion und Sterilfiltration sind bei Charge FG212 größer, dieser Unterschied ist jedoch nach der Lyophilisation nicht mehr feststellbar.

3.4.2. Paclitaxelgehalt

Auch bei den Paclitaxelgehalten sind zwischen den beiden Zubereitungen lediglich geringfügige Unterschiede zu beobachten. In Abbildung 47 sind die Werte beider

Chargen abgebildet. Der Wert nach Lyophilisation ist der Mittelwert aus 6 bzw. 5 rekonstituierten Lyophilisaten.

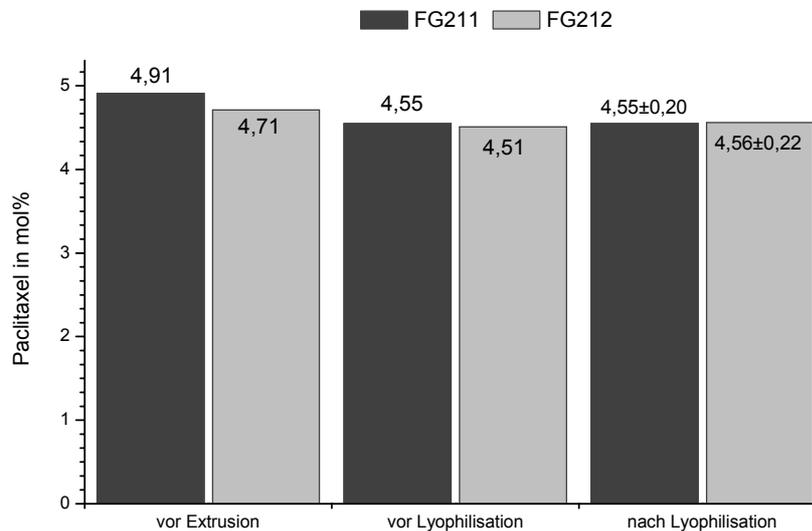


Abbildung 47: Paclitaxelgehalt von Charge FG211 nach Ethanolinjektion bzw. vor und nach Lyophilisation

Nach Extrusion und Sterilfiltration liegt der Paclitaxelgehalt um ca. 7% niedriger als unmittelbar nach der Ethanolinjektion. Nach Gefriertrocknung ist keine Änderung des Gehalts festzustellen. Die Standardabweichung ist relativ gering.

Die Abnahme des Paclitaxelgehaltes nach Extrusion und Lyophilisation beträgt bei beiden Chargen ca. 4%, die Lyophilisation beeinflusst den Paclitaxelgehalt wiederum nicht.

Vergleicht man die beiden Chargen miteinander, ergibt sich nach der Gefriertrocknung kein signifikanter Unterschied, unmittelbar nach der Ethanolinjektion ist der Wert der bei 4 °C hergestellten Charge FG211 um 0,2 mol% höher.

3.4.3. Haltbarkeit der suspendierten Formulierungen

Das Auftreten von Paclitaxel-Kristallen in flüssigen Zubereitungen wurde nach Rekonstitution mittels PAMAS-Messungen überprüft. Bei beiden Chargen war vor der Lyophilisation ein Anstieg in den Partikelzahlen bereits nach ca. 8 Stunden festzustellen. Abbildung 48 zeigt die Daten der PAMAS-Messungen. Die Zeitpunkte, an denen die Zunahme der Partikelzahlen einsetzt, sind mit roten Pfeilen markiert.

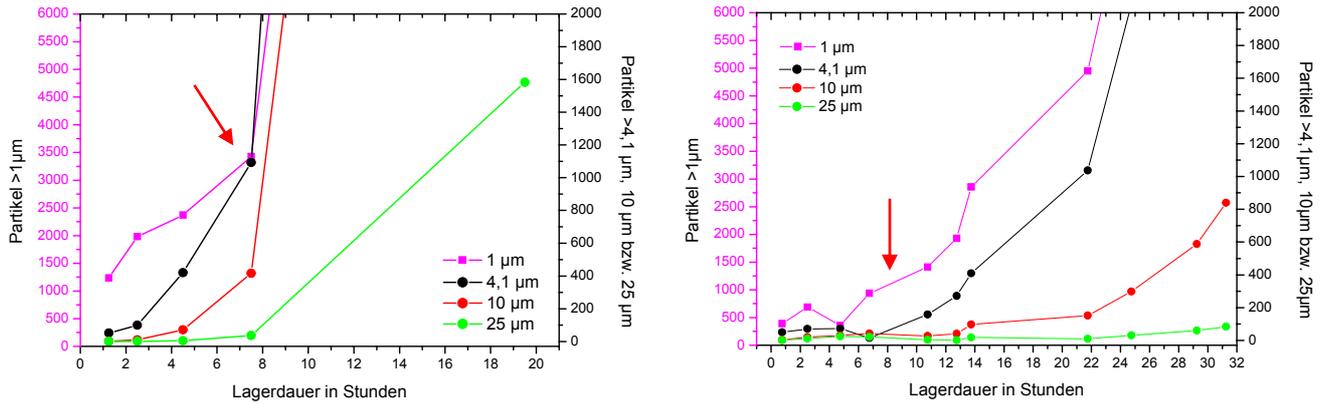


Abbildung 48: Lichtblockademessungen der Chargen FG211 (links) bzw. FG212 (rechts) vor Lyophilisation

Nach der Lyophilisation hingegen setzte die Zunahme in den Partikelzahlen erst sehr viel später ein. In Abbildung 49 links sind die Partikelzahlen von Charge FG211, Vial 10, und auf der rechten Seite die Werte für FG212, Vial 4, abgebildet.

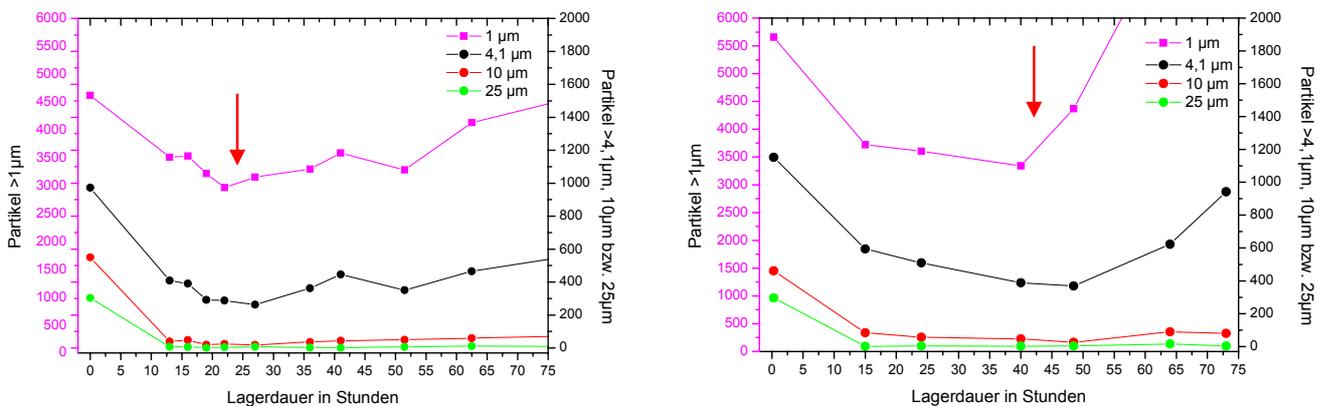


Abbildung 49: Lichtblockademessungen der Chargen FG211 (links) bzw. FG212 (rechts) nach Lyophilisation

Bei den beiden Proben erfolgt zunächst eine Abnahme der Partikelzahlen. Dies ist auf das Vorhandensein zahlreicher Luftblasen infolge der Rekonstitution der Lyophilisate zurückzuführen, die erst nach und nach aus der Dispersion entweichen. Man erkennt für Charge FG211 (links) einen Beginn der Partikelzunahme nach ca. 24 bis 27 Stunden. Bei Charge FG212 (rechts) beginnt dieser Prozess nach ca. 40h (siehe rote Pfeile).

Die mittels Lichtblockademessungen ermittelten Haltbarkeiten der anderen rekonstituierten Vials zeigt Tabelle 28.

FG211 (4°C)	Zeit [h]		FG212 (RT)	Zeit [h]
Vial4	40		Vial 3	41
Vial6	34		Vial4	40
Vial8	31		Vial8	49
Vial9	50		Vial9	43
Vial10	27			
Mittelwert	36		Mittelwert	43
Standardabweichung	9		Standardabweichung	4
Rel. Standardabweichung	25%		Rel. Standardabweichung	9%

Tabelle 28: Zeiträume bis zur Detektion von Kristallisationsphänomenen mittels PAMAS-Messungen von rekonstituierten Lyophilisaten der Chargen FG211 und FG212

Verschiedene Parameter wurden in einem zeitlichen Abstand von 48 Stunden nach der Rekonstitution erneut gemessen und mit den Ausgangswerten verglichen (siehe Tabelle 29).

	FG211, Vial 3 (4°C)			FG212, Vial 5 (RT)	
	Ausgangswert	Nach 48 h		Ausgangswert	Nach 48 h
Größe (nm)	194,5	203,3		188,9	196,8
PI	0,158	0,206		0,154	0,257
Zeta-Potential (mV)	44,6	56,8		43,0	38,1
Paclitaxel (mol%)	4,85	4,91		4,92	4,95
7-Epipaclitaxel (Area%)	0	0		0	0
Aussehen	klar	klar		klar	klar

Tabelle 29: Gegenüberstellung der untersuchten Parameter der Chargen FG211 und FG212

Man kann der Tabelle entnehmen, dass die Parameter Größe, Gehalt und Aussehen nach 48h Lagerung der rekonstituierten Probe im Kühlschrank unverändert blieben. Der Polydispersitätsindex nahm bei beiden Zubereitungen zu. Das Zetapotential nahm im Falle von Charge FG211 zu, bei Charge FG212 dagegen ab. Derartige Schwankungen traten jedoch auch bereits bei verschiedenen Vials derselben Charge auf. Auch die chemische Stabilität hinsichtlich der Bildung von 7-Epipaclitaxel ist über 48 Stunden gewährleistet.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte keine Überlegenheit der Kaltherstellung gegenüber der Herstellung bei Raumtemperatur hinsichtlich der physikalischen Haltbarkeit festgestellt werden.

Als positives Ergebnis dieser Ansätze ist, die im Gegensatz zu früheren Ansätzen relativ lange Haltbarkeit der rekonstituierten Zubereitungen im Bereich von 36 bis 43 Stunden zu bewerten.

Die mittels HPLC-Analytik bestimmte Menge an Paclitaxel entspricht weitgehend der Einwaage im Rahmen der Messungengenauigkeit. Die bei den anfänglichen Versuchen beobachteten Einwaageverluste traten bei den größeren Ansätzen (siehe auch Charge FG183 in Abschnitt III.3.3) nicht auf.

IV. Zusammenfassung und Diskussion

1. Hilfsstoffe

1.1. Lysolipide

Die Verwendung von MOPC als Membranbestandteil führte nicht zu einer erfolgreichen Stabilisierung paclitaxelhaltiger, kationischer Liposomen. Innerhalb eines Zeitraums von ein bis zwei Wochen war die Kristallisation des Wirkstoffs in Formulierungen mit ca. 4 mol% Paclitaxel zu beobachten. Diese Formulierungen entstanden in einem sehr frühen Stadium der Arbeit und die damit gemachten Erfahrungen führten zu Verbesserungen am Herstellungsverfahren selbst. Eine Optimierung der enkapsulierten Menge auf ca. 5 mol% und auch eine Lyophilisation der Zubereitungen zur Erhöhung der Lagerstabilität wurde zunächst nicht durchgeführt. Weitere Versuche mit MOPC wurden nicht in Erwägung gezogen, da die zum Zeitpunkt der Versuche vorliegenden Daten keinen entscheidenden Vorteil des Einsatzes von MOPC zeigten.

1.2. Tenside

Die Versuche mit Tensiden als Formulierungs-Hilfsstoffe erfolgten zu einem Zeitpunkt als bereits Erfahrungen über die Lyophilisation zur Stabilisierung paclitaxelhaltiger, kationischer Liposomen vorlagen. Die Daten aus diesen Versuchen sind daher grundsätzlich mit Ergebnissen aus Ansätzen ohne Tenside vergleichbar. Die prinzipielle Kompatibilität von Tween®80 als Hilfsstoff für paclitaxelhaltige, kationische Liposomen konnte belegt werden. Ein positiver Einfluss dieses Tensids auf die Verlängerung der Lagerbarkeit konnte jedoch weder in lyophilisierten, noch in suspendierten Liposomenzubereitungen belegt werden. Ob Tween®80 bezüglich pharmakokinetischer Parameter, z.B. der Verlängerung der Zirkulationszeit, vorteilhafte Eigenschaften besitzt, wurde nicht untersucht.

2. Herstellungsverfahren

Im ersten Teil der Arbeit wurde festgestellt, dass sich mit Hilfe der Filmmethode die Ziele dieser Arbeit nicht erreichen lassen. Vor allem im Hinblick auf die Herstellung größerer Ansätze und ein möglichst rasch durchzuführendes Herstellungsverfahren wurde die Entwicklung der Ethanolinjektions-Methode vorangetrieben.

Nach der Abklärung wichtiger Einflussgrößen wurde die Methode mit der Lyophilisation kombiniert. In einfacher Weise konnte durch diese Kombination sowohl Ethanol wieder aus der Dispersion entfernt werden, als auch die Lagerstabilität entscheidend verlängert werden. Hierbei war die Verwendung von Trehalose als Isotonisierungsmittel und Lyoprotektivum notwendig.

Bei der Optimierung der Ethanolinjektionsmethode stellte sich heraus, dass die entscheidenden Prozessfaktoren für die Eigenschaften der Formulierung die Konzentrationen der Lipide in der zu injizierenden Ethanol-Lösung und in der wässrigen Phase waren. Durch die Verwendung einer Ethanollösung mit einem Gesamtlipidgehalt von 400 mM konnten durch Extrusions- und Sterilfiltrationsschritte mit anschließender Gefriertrocknung Liposomen hergestellt werden, die hinsichtlich Größe und Teilchengrößenverteilung die Vorgaben erfüllten. Die Viskosität der Zubereitungen wurde aufgrund des relativ kleinen Probenvolumens nicht bestimmt, die beobachtete Fließfähigkeit erschien jedoch ausreichend für eine intravasale Anwendung.

Eine Optimierung des Gefriertrocknungs-Protokolles bezüglich möglichst kurzer Prozesszeiten fand nicht statt, die Restwassergehalte belegten jedoch, dass in allen Fällen eine ausreichende Trocknung erreicht wurde. Bei größeren Ansätzen, wie sie zur Durchführung von klinischen Studien erforderlich sind, ist eine Anpassung der Trocknungsschritte an das in die Gefriertrocknungs-Anlage eingebrachte Probenvolumen vorzunehmen.

Ein positiver Einfluss niedriger Herstellungstemperatur auf die Kurzzeitstabilität paclitaxelhaltiger, kationischer Liposomen konnte letztendlich nicht bewiesen werden. Im Sinne herabgesetzter Geschwindigkeiten chemischer Reaktionen bei tieferen Temperaturen ist die gekühlte Herstellung hinsichtlich der chemischen Stabilität der verwendeten Stoffe von Vorteil. Eine Verlängerung der physikalischen Stabilität konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Für die Herstellung von Ansätzen in größerem Maßstab zu präklinischen, als auch klinischen Untersuchungen ist das von uns entwickelte Herstellungsverfahren gut geeignet. Die technischen Anlagen, wie Rührbehältnisse und Gerätschaften zur Extrusion und Sterilfiltration sind verfügbar, das Einbringen der ethanolischen Lipidlösung ist ein unkomplizierter Vorgang. Die Lyophilisation solcher Mengen unter aseptischen Bedingungen ist ein alltäglich praktizierter Schritt.

3. Pharmazeutische Qualität der Zubereitungen

3.1. Bewertung der analytischen Verfahren

Die Beurteilung der physikalisch-chemischen Haltbarkeit unserer Formulierungen gestaltete sich über einen längeren Zeitraum hinweg schwierig. Die Bildung von Paclitaxel-Kristallen war mittels Lichtblockade-Messungen quantitativ und zuverlässig zu erfassen, diese waren mit Lyophilisaten mit einem Volumen von 500 µl jedoch nicht durchführbar. Erst bei den späteren, großen Ansätzen, die in Aliquoten von 15 ml lyophilisiert wurden, konnte diese Technik Anwendung finden.

Die Quantifizierung von Paclitaxel in frühen Versuchen erschien stets fehlerbehaftet. So wurden nur selten die eingewogenen Mengen an Paclitaxel in den Rohdispersionen gefunden, auch bei der Beurteilung der Lagerstabilität wurden oftmals stark schwankende Konzentrationen bestimmt. Erst im Verlauf der Versuche wurden genügend Daten und genügend Erfahrung gesammelt, um die Ursachen dieser Probleme diskutieren zu können.

Die Bestimmung von Paclitaxel in lyophilisierten, liposomalen Zubereitungen mittels HPLC ist nicht unproblematisch. Die Probe enthält neben einer großen Menge Trehalose auch sehr lipophile Substanzen wie Lipide und Paclitaxel. Die Lipide interagieren stark mit der stationären Phase, was die Durchführung eines Spül-Gradienten notwendig macht. Da die Substanzen im Fließmittel selbst nicht ausreichend löslich sind, ist die Verwendung von Tetrahydrofuran notwendig. Aufgrund des niedrigen Dampfdrucks dieses Lösungsmittels ist das Pipettieren mit einer laborüblichen Luftpolsterpipette problematisch. In der Pipettenspitze verdampfendes Lösungsmittel treibt die Flüssigkeit aus der Spitze aus. Nachdem

dieses Problem erkannt wurde, wurde das Tetrahydrofuran mittels einer Kolbenhubpipette abgemessen.

Da die schwankenden Gehalte in späteren, großen Ansätzen nicht mehr in großem Ausmaß zu beobachten waren, liegt auch der Verdacht nahe, dass die Rekonstitution der Proben eine Rolle spielen könnte. Bei den großen Ansätzen wurde jedes einzelne Vial vor der Lyophilisation gewogen und bei der späteren Rekonstitution auf genau diese Masse mit Reinstwasser aufgefüllt. Bei den kleineren Lyophilisaten wurde von einem Feststoffanteil von 10% (w/w) ausgegangen und dementsprechend weniger Wasser zur Rekonstitution verwendet.

Es ist keine Einzelursache auszumachen, die die aufgetretenen Schwankungen im Bereich von bis zu 20% eindeutig erklärt. Dennoch erfüllte die Analytik im Rahmen dieser Arbeit ihre Aufgabe. Die Trennung von Paclitaxel und Lipiden erfolgte sauber, Arzneistoffverluste größeren Ausmaßes konnten detektiert werden (siehe III.1.1.), das Abbauprodukt 7-Epipaclitaxel konnte miterfasst und quantifiziert werden.

3.2. Langzeitstabilität nach Lyophilisation

Die Lagerstabilität der Zubereitungen nach Lyophilisation wurde über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren belegt. Es konnten Lyophilisate hergestellt werden, die nach zwei Jahren Lagerung im Kühlschrank nach der Rekonstitution die gleichen physikalischen Eigenschaften haben wie zu Beginn der Einlagerung. Die chemische Stabilität des Wirkstoffs in den Lyophilisaten wurde nicht umfassend untersucht. Die Bildung von 7-Epipaclitaxel ist ein Beleg dafür, dass auch in den getrockneten Proben chemische Prozesse ablaufen.

3.3. Stabilität nach Rekonstitution

In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Kurzzeitstabilität von Zubereitungen mit 5mol% Paclitaxel untersucht. Es wurde unter Berücksichtigung der untersuchten Parameter im Falle lyophilisierter und dann rekonstituierter Proben mehr als 24 Stunden erreicht, wenn die Ansätze mittels Lichtblockademessungen bewertet wurden. Für die Applikation in Form einer Infusion erscheint dies ausreichend, ein großer Vorteil gegenüber Taxol® konnte aber nicht erreicht werden. Innerhalb von 48 Stunden nach der Rekonstitution konnte kein 7-Epipaclitaxel nachgewiesen werden.

Es liegen relativ wenige Daten vor zur Haltbarkeit flüssiger Zubereitungen mit niedrigerem Paclitaxelgehalt. In frühen Versuchen konnte an Formulierungen mit einem Paclitaxelgehalt von 3 mol% über einen Beobachtungszeitraum von 2 Tagen keine Kristallisation festgestellt werden.

3.4. Resümee und Ausblick

Die meisten der in Kapitel I.7. formulierten Ziele konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit erreicht werden.

Als besonders positiv möchte ich die Entwicklung eines relativ einfachen und rasch durchzuführenden Herstellungsverfahrens bezeichnen, welches sich auch zur Herstellung großer Ansätze gut eignet. Insbesondere die ansonsten aufwändige Entfernung des Ethanol durch die Lyophilisation trägt zur Qualität des Verfahrens bei.

Die Stabilität der hergestellten Lyophilisate ist als sehr gut zu bezeichnen, die in-use-Stabilität suspendierter Zubereitungen bedeutet keinen Fortschritt gegenüber Taxol®. Im Sinne der sicheren Vermeidung von Kristallisationsvorgängen während der Applikation könnte eine Reduktion des Paclitaxelgehalts auf z.B. 3 mol% in den Liposomen sinnvoll bzw. notwendig sein.

Das Problem der Einkapsulierung größerer Mengen Paclitaxel in kationische Liposomen konnte im Rahmen der Arbeit nicht zufrieden stellend gelöst werden.

Mittels Lichtblockademessungen können beginnende Instabilitätsreaktionen, v.a. die Kristallisation von Paclitaxel, einfach, sensitiv und quantifizierbar erfasst werden.

V. Literaturverzeichnis

1. *Blood Perfusion and Microenvironment of Human Tumors. Implications for Clinical Radiooncology.*, herausgegeben von Molls, M. Vaupel P. and Brown J. M.; Berlin, Springer Verlag. (1998)
2. The angiogenesis foundation. **www.angio.org** (Stand 2003)
3. Aberle, A. M. et al, The counterion influence on cationic lipid-mediated transfection of plasmid DNA. *Biochim.Biophys.Acta* 1299, 281-283. (1995)
4. Alkan-Onyuksel, H., Ramakrishnan, S., Chai, H. B., and Pezzuto, J. M., A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol. *Pharm.Res.* 11 [2], 206-212. (1994)
5. Allen, T. M., Long-circulating (Sterically Stabilized) liposomes for drug delivery. *Trends Pharmacol.Sci.* 15, 215-220. (1994)
6. Allen, T. M., Liposome targeting in animal models: Problems and opportunities. *J.Liposome Res.* 7, 315-329. (1997)
7. Allen, T. M. and Moase E. H., Therapeutic opportunities for targeted liposomal drug delivery. *Adv.Drug Delivery Rev.* 21, 117-133. (1996)
8. Alving, C. R., Immunologic aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens . *Biochim.Biophys.Acta* 1113 [3-4], 307-322. (1992)
9. Anchordoquy, T. J. et al, Physical Stability of Nonviral Plasmid-Based Therapeutics. *J.Pharm.Sci.* 89 [3], 289-296. (2000)
10. Arap, W., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279 [5349], 377-380. (1998)
11. *Arzneistoff-Profile - Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe.* herausgegeben von Dinnendahl, V. und Fricke U. [17. Ergänzungslieferung]. Eschborn, Govi-Verlag. (2002)
12. Augustin, H. G. et al, Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16 [12], 901-906. (1994)
13. Ausborn, M. et al, Stabilization of Liposomes by Freeze-Thaw- and Lyophilization Techniques: Problems and Opportunities. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 38 [4], 133-139. (1992)

-
14. Baban, D. F. and Seymour L. W., Control of tumour vascular permeability. *Adv. Drug Delivery Rev.* 34, 109-119. (1998)
 15. Bachmann, D. et al, Preparation of liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer. *Int. J. Pharm.* 91, 69-74. (1993)
 16. Bally, M. B. et al, Liposome targeting following intravenous administration: Defining expectations and a need for improved methodology. *J. Liposome Res.* 7, 331-361. (1997)
 17. Bangham, A. D. et al, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252. (1965)
 18. Bangham, A. D. et al. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: *Methods in membrane biology*. herausgegeben von Korn, E. D. [Chapter Nr. 1], 1-68. (1973)
 19. Bartoli, M. H. et al, In vitro and in vivo antitumoral activity of free and encapsulated taxol. *J. Microencapsul.* 7 [2], 191-197. (1990)
 20. Batzri, S. and Korn E. D., Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 1015-1019. (1973)
 21. Belotti, D. et al, The Microtubule-affecting Drug Paclitaxel Has Antiangiogenic Activity. *Clin Cancer Res* 2, 1843-1849. (1996)
 22. Betz, G. et al, Interaction of liposome formulations with human skin in vitro. *Int. J. Pharm.* 229, 117-129. (2001)
 23. Brat, D. J., Windebank, A. J., and Brimijoin, S., Emulsifier for intravenous cyclosporin inhibits neurite outgrowth, causes deficits in rapid axonal transport and leads to structural abnormalities in differentiating N1E.115 neuroblastoma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261 [2], 803-810. (1992)
 24. Bringi, Venkataraman and Kadkade, Prakash G. Increased yields of taxol and taxanes from cell cultures of *Taxus* species. *Phyton Catalytic, Inc., Application Nr. 93-US1576. Patent Nr. 9317121, 64. WO.* (1993)
 25. Bristol-Myers Squibb, Taxol, Fachinformation. (2002)
 26. Cabanes, A. et al, Comparative in vivo studies with paclitaxel and liposome-encapsulated paclitaxel. *Int J Oncol.* 12 [5], 1035-1040. (1998)
 27. Carmeliet, P. and Jain R. K., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257. (2000)
 28. Cavalli, R. et al, Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J Pharm Sci.* 10, 305-309. (2000)

-
29. Ceh, B. et al, Stealth liposomes: from theory to product. *Adv. Drug Delivery Rev.* 24, 165-177. (1997)
 30. Chandaroy, P. et al, Temperature-controlled release from liposomes encapsulating Pluronic F127. *J. Control. Rel.* 76, 27-37. (2001)
 31. Chen, H. X. et al, Current Clinical Trials of the Anti-VEGF Monoclonal Antibody Bevacizumab. *Oncology (Huntingt).* 15 [8], 1023-1026. (2001)
 32. Chesnoy, S. and Huang L., Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 27-47. (2000)
 33. Chonn, A. and Cullis P. R., Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 30, 73-83. (1998)
 34. Connor, J. and Huang L., pH-sensitive immunoliposomes as an efficient and target-specific carrier for antitumor drugs. *Cancer Res.* 46, 3431-3435. (1986)
 35. Constantinides, P. P. et al, Formulation Development and Antitumor Activity of a Filter-Sterilizable Emulsion of Paclitaxel. *Pharm. Res.* 17 [2], 175-182. (2000)
 36. Coukell, A. J. and Brogden R. N., Liposomal Amphotericin B. Therapeutic Use in the Management of Fungal Infections and Visceral Leishmaniasis. *Drugs* 55 [4], 585-612. (1998)
 37. Crommelin, D. J. A., Storm, G., De Jong, W. H., and Nassander, U. K. Liposomes as carriers for doxorubicin: site-avoidance drug delivery. *Proceeding on 3rd. Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokinet.* (1987)
 38. Crommelin, D. J. A. and van Bommel E. M. G., Stability of liposomes on storage: freeze dried, frozen or as an aqueous dispersion. *Pharm. Res.* 4, 159-163. (1984)
 39. Crommentuyn, K. M. L. et al, In-vitro metabolism of anti-cancer drugs, methods and applications: paclitaxel, docetaxel, tamoxifen and ifosfamide. *Cancer Treatment Reviews* 24, 345-366. (1998)
 40. Crosasso, P., Ceruti, M., Brusa, P., Arpicco, S., Dosio, F., and Cattel, L., Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J. Control. Rel.* 63 [1-2], 19-30. (2000)
 41. Crowe, J. H et al, Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1537-1540. (1987)
 42. Crowe, J. H et al, Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 947 [2], 367-384. (1988)

-
43. Crowe, J. H et al, Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology* 31 [4], 355-366. (1994)
 44. Crowe, J. H., Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. Part 1. *BioPharm* 6 [3], 28-33. (1993)
 45. Crowe, J. H. et al, Stabilization of Biological Membranes at Low Water Activities. *Cryobiology* 20, 346-356. (1983)
 46. Crowe, J. H. et al, Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem.J.* 242 [1], 1-10. (1987)
 47. Crowe, L. M., Crowe, J. H., Rudolph, A., Womersley, C., and Appel, L., Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose . *Arch.Biochem.Biophys* 242 [1], 240-247. (1985)
 48. Cserhati, T., Forgacs, E., and Hollo, J., Interaction of taxol and other anticancer drugs with alpha-cyclodextrin. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 13 [4-5], 533-541. (1995)
 49. Cserhati, T. and Holló J., Interaction of taxol and other anticancer drugs with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int.J.Pharm.* 108, 69-75. (1994)
 50. Dagar, S. et al, VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies. *J.Control.Rel.* 91 [1-2], 123-133. (2003)
 51. Damen E.W.et al, Paclitaxel Esters of Malic Acid as Prodrugs with Improved Water Solubility. *Bioorg Med Chem.* 8 [2], 427-432. (2000)
 52. Dass, Crispin R. and Burton, Mark A., Lipoplexes and tumors. A review. *J.Pharm.Pharmacol.* 51 [7], 755-770. (1999)
 53. Denekamp, J., Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *Br.J.Cancer* 45 [1], 136-139. (1982)
 54. Denekamp, J. and Hobson B., Endothelial cell proliferation in experimental tumours. *Br.J.Cancer* 46 [51], 711-720. (1982)
 55. Driskell, R. A. and Engelhardt J. F., Current status of gene therapy for inherited lung diseases. *Annual Review of Physiology* 65, 585-612. (2003)
 56. Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., and Papahadjopoulos, D., Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol.Rev.* 51 [4], 691-743. (1999)
 57. Duzgunes, N. et al, Physicochemical characterization of large unilamellar phospholipid vesicles prepared by reverse-phase evaporation. *Biochim Biophys Acta* 732 [1], 289-299. (1983)

-
58. Egilmez, N. K. et al, Evaluation and optimization of different cationic liposome formulations for in vivo gene transfer. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 221, 169-173. (1996)
 59. Ellis, L. M. and Fidler I. J., Angiogenesis and Metastasis. *Eur.J.Cancer* 32A [14], 2451-2460. (1996)
 60. Fatouros, D. G. et al, Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. *Eur J Pharm Sci.* **13** [3], 287-296. (2001)
 61. Felgner, J. H. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84 [21], 7413-7417. (1987)
 62. Felgner, J. H. et al, Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations. *J.Biol.Chem.* 269 [4], 2550-2561. (1993)
 63. Fielding, R. M., Lewis, R. O., and Moon-McDermott, L., Altered tissue distribution and elimination of amikacin encapsulated in unilamellar, low-clearance liposomes (MiKasome). *Pharm.Res.* 15 [11], 1775-1781. (1998)
 64. Fillion, M. C. and Phillips N. C., Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. *Int.J.Pharm.* 162 [1-2], 159-170. (1997)
 65. Fjallskog, M. L., Frii, L., and Bergh, J., Paclitaxel-induced cytotoxicity--the effects of cremophor EL (castor oil) on two human breast cancer cell lines with acquired multidrug resistant phenotype and induced expression of the permeability glycoprotein. *Eur.J.Cancer* 30A [5], 687-690. (1994)
 66. Folkman, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285 [21], 1182-1186. (1971)
 67. Fonseca, C. et al, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J.Control.Rel.* 83 [2], 273-286. (2002)
 68. Forssen, E. and Willis M., Ligand-targeted liposomes. *Adv.Drug Delivery Rev.* 29, 249-271. (1998)
 69. Freise, J. The preparation of sterile drug-containing liposomes. *Gregoriadis, G.* 1, 131-137. *Conference on Liposome Technology.* (1984)
 70. Gabizon, A. Liposomes as a drug delivery system in cancer chemotherapy. In: *Drug carrier systems, Vol.9.* herausgegeben von Roerdink, Kroon. New York, John Wiley. (1989)

-
71. Gabizon, A. Liposomes as a drug delivery system in cancer chemotherapy. In: *Drug carrier systems*, Vol.9. herausgegeben von Roerdink, Kroon. New York, John Wiley. (1989)
 72. Garlanda, C. and Dejana E., Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 [7], 1193-1202. (1997)
 73. Gasparini, G., The Rationale and Future Potential of Angiogenesis Inhibitors in Neoplasia. *Drugs* 58 [1], 17-38. (1999)
 74. Gerasimov, O. V. et al, Cytosolic drug delivery using pH- and light-sensitive liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev.* 38, 317-338. (1999)
 75. Green, K. J. and Goldman R. D., The effect of taxol on cytoskeletal components in cultured fibroblasts and epithelial cells. *Cell Motil.* 3 [4], 283-305. (1983)
 76. Gregoriadis, G. et al, Enzyme Entrapment in Liposomes. *FEBS Letters* 14 [2], 95-99. (1971)
 77. Gregoriadis, G. et al, Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* I, 1313-1317. (1974)
 78. Handjani, R.-M. and Vanlerberghe G. Storage stability of aqueous dispersions of spherules. Application Nr. US19790008115 19790131. Patent Nr. US42447411. (1978)
 79. Harrington, K. J., Rowlinson-Busza, G., Uster, P. S., and Stewart, J. S., Pegylated liposome-encapsulated doxorubicin and cisplatin in the treatment of head and neck xenograft tumours. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 [1], 10-18. (2000)
 80. Hashizume, H. et al, Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* 156 [4], 1363-1380. (2000)
 81. Hayes, A. J. et al, Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *BMJ* 318 [7187], 853-856. (1999)
 82. Hazemoto, N. et al, pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamin and fatty acid. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 748-751. (1990)
 83. Higgins, J. et al, Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing. *J. Pharm. Pharmacol.* 38 [4], 259-263. (1986)
 84. Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., and Jain, R. K., Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 [8], 4607-4612. (1998)
 85. Hope, M. J. et al, Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem. Phys. Lipids* 40, 89-107. (1986)

-
86. Horwitz, S. B., Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann.Oncol.* 5 [6], 3-6. (1994)
 87. Huang, S. K. et al, Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res.* 54 [8], 2186-2191. (1994)
 88. Jain, R. K., Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci.Am.* 271 [1], 58-65. (1994)
 89. Jain, R. K., Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J.Control.Rel.* 53 [1-3], 49-67. (1998)
 90. Jamshaid, M. et al, Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux. *Int.J.Pharm.* 48, 125-131. (1988)
 91. Juliano, R. L. and Stamp D., The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 63 [3], 651-658. (1975)
 92. Kan, P. et al, Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J.Control.Rel.* 58 [3], 271-278. (1999)
 93. Kasahara, M. and Hinkle P. C., Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J.Biol.Chem.* 252 [20], 7384-7390. (1977)
 94. Kikuchi, H. et al, Possibility of Heat Sterilization of Liposomes. *Chem.Pharm.Bull.* 39 [4], 1018-1022. (1991)
 95. King, P. A. et al, Adaptations of plasma membrane glucose transport facilitate cryoprotectant distribution in freeze-tolerant frogs. *Am.J.Physiol.* 265 [5], R1036-R1042. (1993)
 96. Klauber, N. et al, Inhibition of Angiogenesis and Breast Cancer in Mice by the Microtubule Inhibitors 2-Methoxyestradiol and Taxol. *Cancer Res.* 57, 81-86. (1997)
 97. Klibanov, A. L., Maruyama, Kazuo, Torchilin, V. P., and Huang, Leaf, Amphipathic polyethylene glycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters* 268 [1], 235-237. (1990)
 98. Kunstfeld, R. et al, Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model. *J Invest Dermatol.* 120 [3], 476-482. (2003)
 99. Lasic, D. D., Novel applications of liposomes. *TIBTECH* 16, 307-321. (1998)

-
100. Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K., and Papahadjopoulos, D., Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim.Biophys.Acta* 1070 [1], 187-192. (1991)
 101. Lian, T. and Ho R. J., Trends and developments in Liposome Drug Delivery Systems. *J.Pharm.Sci.* 90 [6], 667-680. (2001)
 102. Loftsson, T. and Brewster M. E., Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *J.Pharm.Sci.* 85 [10], 1017-1025. (1996)
 103. Loos, W. J. et al, Preclinical evaluation of alternative pharmaceutical delivery vehicles for paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 13 [7], 767-775. (2002)
 104. Lukyanov, A. N. and Torchilin V. P., Autoclaving of liposomes. *J Microencapsul.* 11 [6], 669-672. (1994)
 105. MacEachern-Keith, G. J. et al, Paclitaxel Stability in Solution. *Anal.Chem.* 69, 72-77. (1997)
 106. Maeda, H. and Matsumura Y., Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 6 [3], 193-210. (1989)
 107. Maeda, H. et al, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J.Control.Rel.* 65 [1-2], 271-284. (2000)
 108. Magin, R. L. and Weinstein J. N. Delivery of drugs in temperature-sensitive liposomes. In: *Targeting of drugs*. herausgegeben von Gregoriadis, G. Senior J. and Trouet A. Plenum Publishing Corporation. (1982)
 109. Malingré, M. M. et al, Oral delivery of taxanes. *Invest New Drugs* 19 [2], 155-162. (2001)
 110. Manfredi, J. J. and Horwitz S. B., Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacology & Therapeutics* 25 [1], 83-125. (1984)
 111. Martin, F. J., SEQUUS Pharmaceuticals. Clinical pharmacology and antitumor efficacy of Doxil (pegylated liposomal doxorubicin). In: *Medical Applications of Liposomes*. herausgegeben von Lasic, D. D and Papahadjopoulos D. [Chapter Nr. 8.1.]. Amsterdam, Elsevier. (1998)
 112. Matsumura, Y. et al, General mechanism of intratumor accumulation of macromolecules: advantage of macromolecular therapeutics. *Gan To Kagaku Ryoho* 14, 821-829. (1989)
 113. Matter, A., Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov.Today* 6 [19], 1005-1024. (2001)

-
114. McCormack, B. and Gregoriadis G., Comparative studies of the fate of free and liposome-entrapped hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/drug complexes after intravenous injection into rats: implications in drug delivery. *Biochim.Biophys.Acta* 1291 [3], 237-244. (1996)
 115. McDonald, D. M. et al. Cationic lipid compositions targeting angiogenic endothelial cells. US-Patent, Application Nr. 820,337. Patent Nr. 5,837,283. (1998)
 116. Mezei, M. Liposomes in the topical application of drugs: a review. In: *Liposomes as Drug Carriers*. herausgegeben von Gregoriadis, G. 663-679. Chichester, John Wiley and Sons. (1988)
 117. Mu, L. and Feng S. S, Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *J.Control.Rel.* 76 [3], 239-254. (2001)
 118. Munn, L. L., Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug- based therapies. *Drug Discov.Today* 8 [9], 396-403. (2003)
 119. Murray, J. C. and Carmichael J., Targeting solid tumours: challenges, disappointments, and opportunities. *Adv.Drug Delivery Rev.* 17, 117-127. (1995)
 120. Naeff, R., Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Adv.Drug Delivery Rev.* 18, 343-347. (1996)
 121. Nagayasu, A. et al, The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv.Drug Delivery Rev.* 40, 75-87. (1999)
 122. Needham, D. and Sarpal R. S., Binding of Paclitaxel to lipid interfaces : Correlations with interface compliance. *J.Liposome Res.* 8 [2], 147-163. (1998)
 123. New, R. R. C. Detergent solubilization. In: *Liposomes. A Practical Approach*. herausgegeben von New, R. R. C. [Chapter Nr. 3.3], 76-90. Oxford, Oxford University Press. (1990)
 124. New, R. R. C. Preparation of Liposomes. In: *Liposomes. A Practical Approach*. herausgegeben von New, R. R. C. [Chapter Nr. 2.], 33-105. Oxford, Oxford University Press. (1990)
 125. Norrby, K., Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105 [6], 417-437. (1997)
 126. Nuijen, B. et al, Progress in the development of alternative pharmaceutical formulations of taxanes. *Invest New Drugs* 19 [2], 143-153. (2001)

-
127. Oja, C. D., Semple, S. C., Chonn, A., and Cullis, P. R., Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1281 [1], 31-37. (1996)
 128. Papahadjopoulos, D., Fate of liposomes in vivo: A brief introductory review. *J.Liposome Res.* 6, 3-17. (1996)
 129. Park, E. S. et al, Biodegradable polyanhydride devices of cefazolin sodium, bupivacaine, and taxol for local drug delivery: preparation, and kinetics and mechanism of in vitro release. *J.Control.Rel.* 52 [1-2], 179-189. (1998)
 130. Park, Seung Jung et al, A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med* 348 [16], 1537-1545. (2003)
 131. Patel, H. M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 9 [1], 39-90. (1992)
 132. Petrak, K. and Goddard P., Transport of macromolecules across the capillary walls. *Adv.Drug Delivery Rev.* 3 [2], 191-214. (1989)
 133. Phillips, W. T., Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Adv.Drug Delivery Rev.* 37 [1-3], 13-32. (1999)
 134. Pons, M. et al, Liposomes obtained by the ethanol injection method. *Int.J.Pharm.* 95, 51-56. (1993)
 135. Presser, I. Innovative Online Messverfahren zur Optimierung von Gefriertrocknungsprozessen. Dissertation, LMU München, Fakultät für Chemie und Pharmazie. (2003)
 136. Ramaswamy, M. et al, Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers. *J.Pharm.Sci.* 86 [4], 460-464. (1997)
 137. Ringel, I. and Horwitz S. B., Taxol is converted to 7-epitaxol, a biologically active isomer, in cell culture medium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 242 [2], 692-698. (1987)
 138. Riondel, J. et al, Effects of free and liposome-encapsulated taxol on two brain tumors xenografted into nude mice. *In Vivo.* 6 [1], 23-27. (1992)
 139. Rodi, D. J. et al, Screening of a library of phage-displayed peptides identifies Human Bcl-2 as a Taxol-binding Protein. *J.Mol.Biol.* 285, 197-203. (1999)
 140. Rose, W. C. et al, Preclinical antitumor activity of water-soluble paclitaxel derivatives. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 39, 486-492. (1997)
 141. Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M., and Arbuck, S. G., Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin.Oncol.* 19 [6], 646-662. (1992)

-
142. Scherphof, G., Roerdink, F., Waite, M., and Parks, J., Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 542 [2], 296-307. (1978)
 143. Schmitt-Sody, M. et al, Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin Cancer Res* 9 [6], 2335-2341. (2003)
 144. Schroer, Ch. In vitro-Untersuchungen zum Einsatz von DOTAP in der Gentherapie der Cystischen Fibrose. Dissertation ,(1999) Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
 145. Sessa, G. and Weissmann G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J.Lipid Res.* 9, 310-318. (1968)
 146. Sessa, G. and Weissmann G., Incorporation of lysozyme into liposomes. *J.Biol.Chem.* 245, 3295-3301. (1970)
 147. Sharma, A. and Straubinger R. M., Novel Taxol formulations: Preparation and characterization of Taxol containing liposomes. *Pharm.Res.* 11 [6], 889-896. (1994)
 148. Sharma, A. et al, Antitumor efficacy of taxane liposomes on a human ovarian tumour xenograft in nude athymic mice. *J.Pharm.Sci.* 84, 1400-1404. (1995)
 149. Sharma, U. S. et al, Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. *J.Pharm.Sci.* 84 [10], 1223-1230. (1995)
 150. Shew, R. L. and Deamer D. W., A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 816 [1], 1-8. (1985)
 151. Shieh, M.-F. et al, Liposomal Delivery System for Taxol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 [1], 87-90. (1997)
 152. Singla, A. K. et al, Paclitaxel and its formulations. *Int.J.Pharm.* 235 [1-2], 179-192. (2002)
 153. Song, D. et al, Binding of Taxol to Plastic and Glass Containers and Protein under in Vitro Conditions. *J.Pharm.Sci.* 85 [1], 29-31. (1996)
 154. Sonnichsen, D. S. and Relling M. V., Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin.Pharmacokinet.* 27 [4], 256-269. (1994)
 155. Sternberg, B. et al, New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Letters* 356 [2-3], 361-366. (1994)
 156. Straubinger, R. M. et al, Novel Taxol Formulations: Taxol-Containing Liposomes. *J.Natl.Cancer Inst.monographs* 15, 69-78. (1993)

-
157. Sun, W. Q., Leopold, A. C., Crowe, L. M., and Crowe, J. H., Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys J.* 70 [4], 1769-1776. (1996)
 158. Talsma, H. et al, Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying. *Int.J.Pharm.* 157 [2], 233-238. (1997)
 159. Tanaka, K. et al, Cryoprotective Mechanism of Saccharides on Freeze-Drying of Liposome. *Chem.Pharm.Bull.* 40 [1], 1-5. (1992)
 160. Thurston, G. et al, Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J.Clin.Invest* 101 [7], 1401-1413. (1998)
 161. Vaishampayan, U., Parchment, R. E., Jasti, B. R., and Hussain, M., Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology* 54 [6A Suppl], 22-29. (1999)
 162. Van Bommel, E. M. G. and Crommelin D. J. A, Stability of doxorubicin-liposomes on storage: as an aqueous dispersion, frozen or freeze-dried. *Int.J.Pharm.* 22, 299-310. (1984)
 163. van Winden, E. Freeze-drying of liposomes. Dissertation, Universiteit Utrecht. (1996)
 164. van Winden, E. and Crommelin D. J. A., Long term stability of freeze-dried, lyoprotected doxorubicin liposomes. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 43, 295-307. (1997)
 165. van Winden, E. C. A. et al, Effect of Freezing Rate on the Stability of Liposomes During Freeze-Drying and Rehydration. *Pharm.Res.* 14 [9], 1151-1160. (1997)
 166. van Winden, E. C. A. et al. Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use .In: *Medical Applications of Liposomes*. herausgegeben von Lasic and Papahadjopoulos. [Chapter Nr. 7.2], 567-604. Amsterdam, Elsevier Science B.V. (1998)
 167. van Zuylen, L. et al, Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs* 19 [2], 125-141. (2001)
 168. various. Infectious diseases.In: *Medical applications of liposomes*. herausgegeben von Lasic, D. D and Papahadjopoulos D. [Chapter Nr. III], 165-188. Amsterdam, Elsevier. (1998)
 169. various. Stimulation of immune response and vaccination.In: *Medical Applications of Liposomes*. herausgegeben von Lasic, D. D and Papahadjopoulos D. [Chapter Nr. II], 15-163. Amsterdam, Elsevier. (1998)
 170. Vemuri, S. and Rhodes C. T., Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70, 95-111. (1995)

-
171. verschiedene. *Taxol-Fortschritte in der Therapie*, Bronchialkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom. herausgegeben von Kühnle, H. Lück H. J. Bokemeyer C. Schröder R. München, Zuckschwerdt. Aktuelle Onkologie 98. (1998)
 172. Walter, K. A. et al, Interstitial taxol delivered from a biodegradable polymer implant against experimental malignant glioma. *Cancer Res.* 54 [8], 2207-2212. (1994)
 173. Wang, J. et al, Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anti-Cancer Drugs* 14, 13-19. (2003)
 174. Wani, Mansukhlal C., Taylor, Harold Lawrence, Wall, Monroe E., Coggon, Philip, and McPhail, Andrew T., Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93 [9], 2325-2327. (1971)
 175. Weinstein, J. N. and van Osdol, W., Early intervention in cancer using monoclonal antibodies and other biological ligands: micropharmacology and the "binding site barrier". *Cancer Res.* 52 [9 Suppl], 2747s-2751s. (1992)
 176. Weinstein, J. N. et al. Antibody-mediated targeting of liposomes. In: *Targeting of drugs*. herausgegeben von Gregoriadis, G. Senior J. and Trouet A. Plenum Publishing Corporation. (1982)
 177. Wenk, M. R. et al, Paclitaxel partitioning into Lipid Bilayers. *J.Pharm.Sci.* 85 [2], 228-231. (1995)
 178. Wolfe, J. and Bryant G., Freezing, Drying and/or Vitrification of Membrane-Solute-Water Systems. *Cryobiology* 39 [2], 103-129. (1999)
 179. Woodle, M. C. and Papahadjopoulos D., Liposome Preparation and Size Characterization. *Methods in Enzymology* 171, 193-217. (1989)
 180. Xiong, Y. Q., Kupferwasser, L. I., Zack, P. M., and Bayer, A. S., Comparative efficacies of liposomal amikacin (MiKasome) plus oxacillin versus conventional amikacin plus oxacillin in experimental endocarditis induced by *Staphylococcus aureus*: microbiological and echocardiographic analyses. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43 [7], 1737-1742. (1999)
 181. Yamori, T. et al, Anti-tumor Efficacy of Paclitaxel against Human Lung Cancer Xenografts. *Jpn.J.Cancer Res.* 88, 1205-1210. (1997)
 182. Yatvin, M. B. et al, pH-Sensitive Liposomes: Possible Clinical Implications. *Science* 210, 1253-1255. (1980)
 183. Ye, Q. et al, DepoFoam technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs. *J.Control.Rel.* 64, 155-166. (2000)

-
184. Zentner G.M. et al and Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs., Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *J.Control.Rel.* 72 [1-3], 203-215. (2001)
 185. Zhang, X. et al, Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 8 [7], 696-701. (1997)
 186. Zhong, J.-J., Plant Cell Culture for Production of Paclitaxel and Other Taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 [6], 591-599. (2002)
 187. Zuidam, N. J. et al, Sterilization of liposomes by heat treatment. *Pharm.Res.* 10 [11], 1591-1596. (1993)

Teil 2:

**Thermoanalytische Messungen zur
Formulierungsoptimierung arzneistoffhaltiger
Liposomenzubereitungen**

Inhaltsverzeichnis

Teil 2: Thermoanalytische Messungen zur Formulierungsoptimierung arzneistoffhaltiger Liposomenzubereitungen

I. Einleitung.....	133
1. DSC als pharmazeutische Analysenmethode	133
2. Lipid-Membranen in wässrigen Systemen	134
3. Wechselwirkungen von Paclitaxel mit Lipidmembranen	136
4. Camptothecin.....	138
5. Zielsetzung der Arbeit.....	139
II. Experimenteller Teil.....	141
1. Materialien	141
1.1. Lipide und Lösungsmittel.....	141
1.2. Arzneistoffe.....	141
1.3. Dispersionsmedien	141
2. Herstellung der Proben.....	142
3. Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	142
III. Ergebnisse.....	144
1. Vorversuche.....	144
2. DMTAP und Paclitaxel	147
3. DMTAP und Camptothecin	151
IV. Zusammenfassung und Diskussion	155
V. Literaturverzeichnis	157

Teil 2: Thermoanalytische Messungen zur Formulierungsoptimierung arzneistoffhaltiger Liposomenzubereitungen

I. Einleitung

1. DSC als pharmazeutische Analysenmethode

Die Dynamische Differenzkalorimetrie, engl. differential scanning calorimetry (DSC), ist eine in den pharmazeutischen Wissenschaften häufig verwendete Analysenmethode. Die Vorteile sind der geringe Probenbedarf, geringer apparativer Aufwand und damit verbunden geringe Kosten bei einer Vielzahl an erhaltenen Informationen, sowie einem breitem Anwendungsspektrum.

Die folgende Liste zeigt eine Auswahl an Einsatzmöglichkeiten für thermoanalytische Verfahren in Entwicklung und Routineanalytik von Arzneistoffen und Arzneiformen, sowie in der Grundlagenforschung:

- Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen DNA und kationischen Lipiden [190, 212]
- Erforschung von Struktur-Wirkungsbeziehungen in biologischen Systemen [207]
- Bestimmung von Glasübergängen in Polymeren [204]
- Thermische Charakterisierung von Denaturierungsvorgängen in Proteinen [196]
- Reinheitsprüfung von Arznei- oder Hilfsstoffen [210]
- Arzneistoff-Hilfsstoff-Inkompatibilitäten [205]
- Modifikationsbestimmungen in Arznei- oder Hilfsstoffen [202, 208]
- Bestimmung der Thermostabilität von Arznei-/Hilfsstoffen [209]

Eine ausführliche Übersicht über aktuelle Anwendungsmöglichkeiten findet sich bei Dullimore und Phang [195], sowie bei Clas et al [194].

Bei der DSC werden ein mit Probe gefüllter und ein leerer Aluminiumtiegel individuell beheizt, sodass beide Tiegel zu jedem Zeitpunkt der Messung dieselbe Temperatur besitzen. Die hierzu jeweils individuell benötigten Heizleistungen weichen

voneinander ab, sobald in der Probe chemische oder physikalische Prozesse ablaufen. Die Differenz der Wärmeströme bzw. Heizleistungen wird als Funktion gegen die Temperatur bzw. gegen die Zeit aufgetragen.

Wie im nächsten Abschnitt beschrieben wird, können auf diese Art und Weise temperaturabhängige Phasenübergänge in Lipid/Wasser-Systemen induziert und analysiert werden. Die Beobachtung dieser Phasenübergänge ist sehr gut geeignet, um Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen aus physiko-chemischer Sicht zu analysieren.

2. Lipid-Membranen in wässrigen Systemen

Phospholipide weisen in wässrigen Dispersionen einen so genannten thermotropen Polymorphismus auf. In Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur liegen die Lipid-Doppelschichten in unterschiedlicher räumlicher Anordnung vor. Welche lamellare Phase bei einer bestimmten Temperatur vorliegt, wird von Eigenschaften der membranbildenden Lipide bestimmt, wie z.B. Sättigungsgrad und Länge der Acylketten, Größe der Kopfgruppe und Ionisierungsgrad. Als Hauptphasenübergang („main phase transition“) bezeichnet man den Übergang einer Lipidmembran von einer festen, gelartigen Struktur („ β -Phase“) in den flüssig-kristallinen Zustand („ α -Phase“). Im Gel-Zustand bei niedrigeren Temperaturen liegen die Lipidmoleküle aufgrund starker van der Waals Kräfte dicht gepackt und geordnet vor. Bei höheren Temperaturen im flüssigkristallinen Zustand geht diese Ordnung verloren, sowohl die van der Waals Kräfte zwischen den Kohlenstoffketten, als auch die polaren Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen nehmen ab. Es findet eine laterale Expansion der Acylketten statt. Bei weiterem Heizen würde man schließlich in den flüssigen Zustand kommen, in dem die Wechselwirkungen zwischen den Lipid-Molekülen weiter zurückgehen und sich oftmals eine invers-hexagonale Struktur ergibt.

Auch innerhalb der gelartigen Phase kann es bereits zu verschiedenen strukturellen Veränderungen kommen. Diese Phasenübergänge nennt man Vorumwandlung („pretransition“) bei einem Übergang $L_{\beta'}$ nach $P_{\beta'}$, oder Subumwandlung („subtransition“) bei einem Übergang L_C' nach $L_{\beta'}$.

Abbildung 50 zeigt zur Verdeutlichung schematisch die angesprochenen Phasenzustände, sowie die im Thermogramm zu beobachtenden Phasenübergänge:

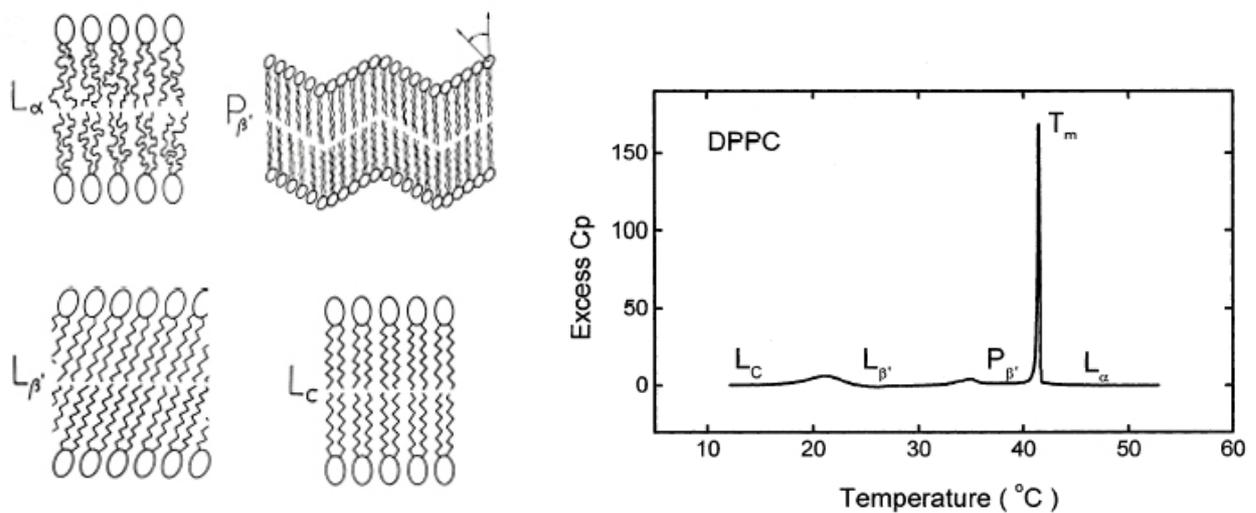


Abbildung 50: Thermotrope Phasenübergänge; schematische Anordnung der Lipidmoleküle (links, aus [206]) und entsprechende Phasenübergänge im Thermogramm (rechts, aus [200])

Mittels DSC kann man nun die Temperaturen, bei denen diese Phasenübergänge stattfinden, bestimmen. Wir haben uns in den Versuchen auf die Auswertung des Haupt-Phasenübergangs vom Gel- in den flüssigkristallinen Zustand konzentriert. Die Temperatur am Maximum des Peaks ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Moleküle in den flüssigkristallinen Zustand übergegangen ist und wird als Phasenübergangstemperatur (T_m) dargestellt. Die Fläche dieses Peaks ist direkt proportional zur Übergangsenthalpie ΔH , die mit der Wärmeenergie zum Überwinden der intermolekularen Kräfte zwischen Lipidmolekülen im Gel-Zustand korreliert.

Die Breite des Peaks des Haupt-Phasenübergangs, ausgedrückt durch die Breite in halber Peakhöhe, gibt Auskünfte über die Kooperativität des Übergangs. Je schmaler der Peak, desto größer die Kooperativität, desto schneller tritt der Großteil der Lipidmoleküle vom Gel- in den flüssigkristallinen Zustand über.

In Abbildung 51 sind die oben angesprochenen Messwerte anhand eines von uns erstellten Thermogramms eines kationischen Lipids, 1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DMTAP), in Wasser verdeutlicht. Diese Abbildung wird durch das Auswerteprogramm Proteus Analysis (Fa. Netzsch) dargestellt. Mithilfe der so genannten komplexen Peakauswertung lassen sich die Daten zur Übergangsenthalpie (Fläche des Peaks), als auch zur Breite des Peaks in halber Höhe anzeigen.

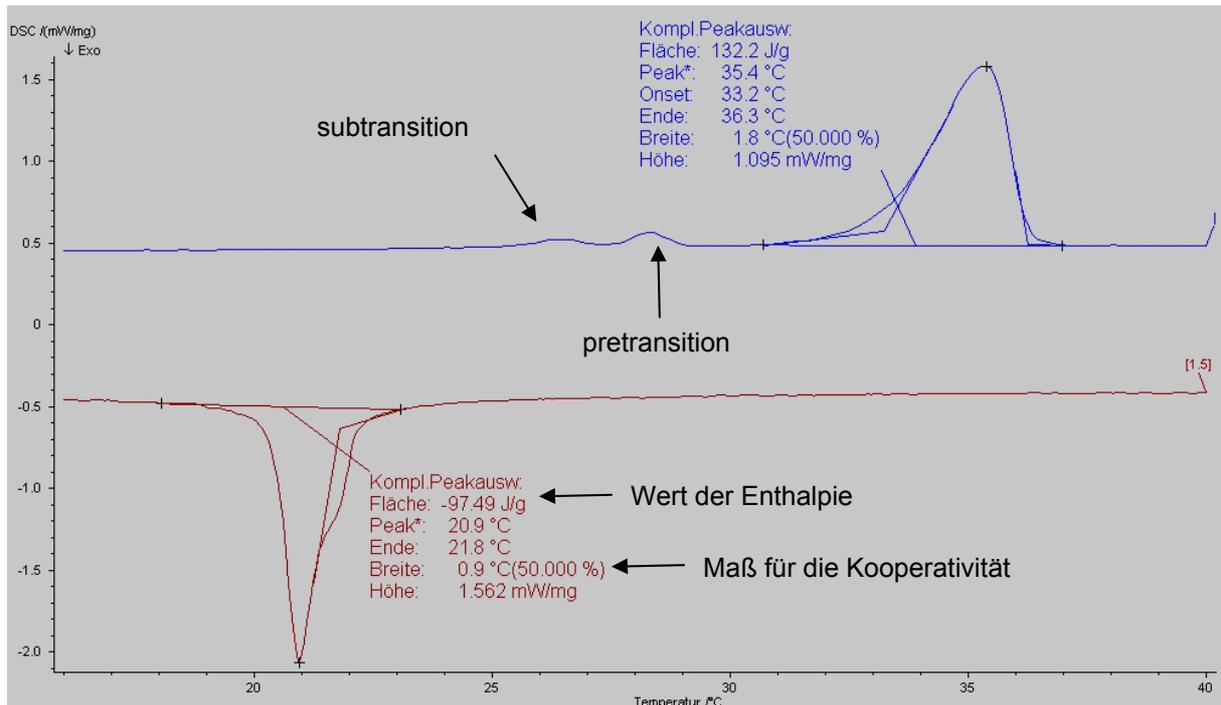


Abbildung 51: Thermogramm von DMTAP in Wasser, Heizkurve (blau) und Kühlkurve (schwarz)

An diesem Beispiel kann man auch eine stark ausgeprägte Hysterese, d.h. einen Temperatur-Unterschied zwischen den Haupt-Phasenübergängen in Heiz- bzw. Kühlzyklus erkennen (35,4 °C bzw. 20,9 °C). Dieses Phänomen wurde bereits von verschiedenen Autoren in der Literatur insbesondere für ladungsinduzierte Phasenübergänge beschrieben [206].

Bei einem Einbau eines lipophilen Arzneistoffs wie Paclitaxel in eine Lipid-Membran wird dieser die Strukturmerkmale der Membran verändern. Je nach Art und Umfang der Wechselwirkungen zwischen Membrandomänen und Arzneistoffmolekülen, sollte sich dies in Änderungen der oben beschriebenen Parameter widerspiegeln. Durch Beobachtung dieser Änderungen sollten sich Aussagen über praxisrelevante Eigenschaften der arzneistoffhaltigen Liposomen treffen lassen.

3. Wechselwirkungen von Paclitaxel mit Lipidmembranen

Wie in Kapitel 6.3.4. bereits beschrieben wurde, stellen Liposomen ein vorteilhaftes Drug-Delivery-System für Paclitaxel dar. Daher wurden auch auf dem Gebiet der Paclitaxel-Lipid-Wechselwirkungen zahlreiche Untersuchungen vorgenommen, mit dem Ziel diese Zubereitungen physikochemisch näher zu charakterisieren. Balasubramanian und Straubinger [189] untersuchten die Interaktionen von

Paclitaxel mit Liposomen aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) mittels Circular-Dichroismus, DSC, Fluoreszenz-Polarisation und Röntgendiffraktometrie. Nach ihren Untersuchungen verteilt sich Paclitaxel in der Membran und stört dabei die Konformation der Kohlenwasserstoff-Ketten, was sich in den Thermogrammen in einer Verbreiterung der Peaks zeigte. Sie stellten fest, dass die Lokalisation von Paclitaxel in der Membran konzentrationsabhängig war. Bei niedrigen Paclitaxel-DPPC-Verhältnissen hält sich das Paclitaxel in äußeren Membranschichten auf, bei höheren Verhältnissen dringt es dagegen in hydrophobe, tiefere Membranschichten vor. Dabei ist auch die Ausbildung von paclitaxelreicheren Domänen möglich.

Bernsdorff et al. [191] untersuchten die Interaktionen von Paclitaxel mit Liposomen aus verschiedenen gesättigten bzw. ungesättigten Lipiden, sowie aus einer Mischung von Phosphatidylcholin mit Dimyristoyl-glycero-phosphatidylserin (DMPS), einem anionischen Phospholipid. Als Methoden verwendeten sie dabei DSC, FT-IR-Spektroskopie und Fluoreszenz-Polarisations-Messungen. Sie stellten fest, dass die Veränderungen der Membran-Eigenschaften durch den Einbau von Paclitaxel bei den untersuchten Lipid-Typen unterschiedlich ausgeprägt waren. Während Paclitaxel Membranen aus gesättigten Lipiden mehr Fluidität verlieh, wurden solche aus ungesättigten Lipiden eher rigider. Liposomen aus DPPC und dem Gemisch aus DMPC/DMPS hatten die größte Einschluss-Effizienz für Paclitaxel. Anhand von DSC-Messungen belegten sie, dass bei Überschreiten einer bestimmten Paclitaxel-Menge nicht mehr aller Arzneistoff in die Membran aufgenommen wird. Die erhaltenen Thermogramme unterschieden sich dann selbst bei steigenden Arzneistoff-Anteilen kaum mehr.

Auch Ali et al. [188] beschäftigten sich mit Paclitaxel und Liposomen aus gesättigten Lipiden. Sie beobachteten ebenfalls die konzentrationsabhängige Orientierung des Paclitaxels in der Membran, ihr Hauptaugenmerk lag aber auf der Verwendung von Paclitaxel-Prodrugs mit unterschiedlich langen Fettsäure-Ketten zum Einbau in Liposomen. Sie stellten mittels DSC-Messungen fest, dass sich Paclitaxel-Prodrugs mit längererkettigen Fettsäure-Resten prinzipiell besser enkapsulieren ließen.

Campbell, Balasubramanian und Straubinger [193] untersuchten mittels Circular-Dichroismus, Fluoreszenz-Spektroskopie und Differential Interference Contrast (DIC) Mikroskopie die Wechselwirkungen von Paclitaxel mit Liposomen aus gesättigten Lipiden, wie DMPC, DPPC und DSPC jeweils in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit dem kationischen Lipid DOTAP. Sie fanden heraus,

dass die Stabilität dieser paclitaxelhaltigen Liposomen proportional mit dem DOTAP-Anteil anstieg. Von den Mischungen erwies sich DPPC/DOTAP als überlegen hinsichtlich Enkapsulierungseffizienz und Stabilität. Sie diskutierten in ihrer Arbeit aber auch, dass die Stabilität von Paclitaxel-Liposomen wohl aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren resultiere.

Nicholov und Mitarbeiter [203] benutzten Methoden wie DSC und Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen, um den Einbau von Paclitaxel in DPPC-Liposomen zu untersuchen. Sie fanden Zusammenhänge entsprechend den Arbeiten von Balasubramanian und Straubinger [189] und betonten erneut den Einfluss der Lokalisation von Paclitaxel in der Membran auf die physiko-chemischen Veränderungen.

Zhao et al. [213] untersuchten mithilfe der DSC und Messungen an Lipid-Wasser-Monoschichten mittels Filmwaage die Interaktionen zwischen DPPC und Paclitaxel. Dabei quantifizierten sie die Penetration von Paclitaxel aus der wässrigen Subphase in die DPPC-Monoschicht und stellten fest, dass die Aufnahme ab einer bestimmten Paclitaxel-Konzentration nicht mehr gesteigert werden konnte. Auch bei den DSC-Messungen stellten sie eine solche Grenzkonzentration von ca. 5 mol% fest.

4. Camptothecin

Camptothecin ist ein zytostatisch wirksames Alkaloid, welches aus einem chinesischen Baum, *Camptotheca accuminata*, gewonnen wird [211]. Camptothecin selbst ist kaum wasserlöslich, in die Therapie Eingang gefunden haben besser lösliche Derivate wie Irinotecan und Topotecan. Ihre zytostatische Wirkung gegenüber einer Vielzahl an Tumoren üben sie durch Hemmung der DNA-Topoisomerase I aus [199].

Camptothecin liegt in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen einer Lacton-Form und einer ringoffenen Carboxylat-Form vor (siehe Abbildung 52), wobei bei einem pH-Wert kleiner 7 das Lacton überwiegt.

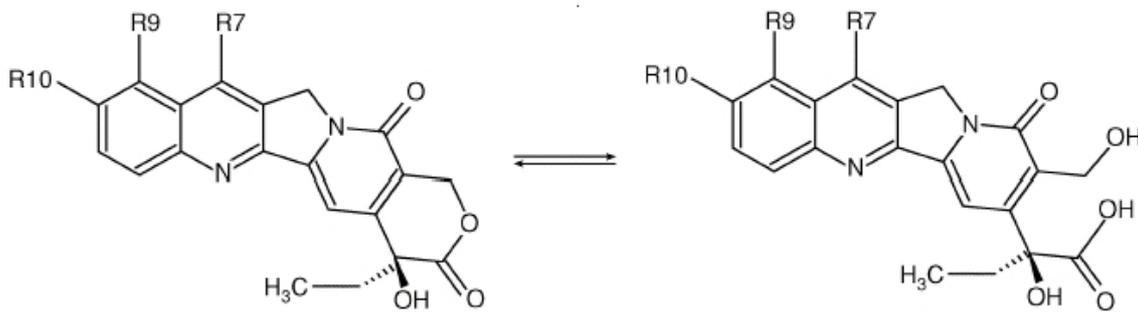


Abbildung 52: Gleichgewicht zwischen Lacton- und Carboxylatform des Camptothecins (R7=R9=R10=H); aus [201]

Die Lacton-Form wird in der Literatur als die pharmakodynamisch aktive Form angesehen [197, 198]. Oberhalb von pH 7 geht das Lacton in das ringoffene Carboxylat über. Wie bei Paclitaxel verspricht man sich auch bei Camptothecin viele Vorteile von einer liposomalen Formulierung, da neben der Löslichkeit auch die Stabilität des Lactons in physiologischem pH-Wert durch einen liposomalen Einschluss verbessert werden kann [192]. Allerdings zeigten auch Liposomen aus CPT-Carboxylat und kationischen Lipiden in Tierversuchen starke anti-tumorale Wirksamkeit (Munich Biotech AG, unveröffentlichte Ergebnisse). Zudem wird die Bildung von Liposomen aus diesen Komponenten aufgrund molekularer Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und Lipiden begünstigt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit dem CPT-Carboxylat besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

5. Zielsetzung der Arbeit

- Das thermotrope Verhalten von reinem DMTAP in wässriger Dispersion sollte untersucht werden.
- Die Veränderungen in diesem Verhalten nach Zugabe von verschiedenen Mengen an Arzneistoffen sollten beobachtet werden. Insbesondere Parameter wie die Temperatur des Hauptphasenübergangs, sowie dessen Enthalpie und Kooperativität sollten erfasst werden. Hierzu verwendeten wir als Arzneistoff zum einen Paclitaxel, zu dessen Einbau in kationische Liposomen im ersten Abschnitt dieser Arbeit praktische Versuche durchgeführt wurden. Zum anderen sollte mit Camptothecin, einem Arzneistoff, der theoretisch stärker und in größerem Ausmaß mit Membranen aus kationischen Lipiden interagieren sollte, ein Vergleich gezogen werden.

- Es sollte überprüft werden, ob mittels DSC-Messungen Aussagen über die Eignung bestimmter Lipid - Arzneistoff-Kombinationen zur Erhaltung stabiler liposomaler Systeme abgeleitet werden können

II. Experimenteller Teil

1. Materialien

1.1. Lipide und Lösungsmittel

- DMTAP = 1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propan (als Chlorid), MW 590,37, als Lyophilisat (Avanti Polar-Lipids Inc., Alabaster, AL, USA)
- Chloroform p.a. (Fa. Merck KGA, Darmstadt)

1.2. Arzneistoffe

- Paclitaxel aus *Taxus yunnanensis*, MW 853,9, Gehalt min. 97% (Fa. Sigma-Aldrich, Seelze)
- Camptothecin, MW 348,4, (Fa. Boehringer-Ingelheim, Ingelheim)

1.3. Dispersionsmedien

- Reinstwasser, entnommen einer Purelab Plus®-Anlage (USF Elga, Siershahn)
- α - α -Trehalose-Dihydrat, (Pfanstiehl Lab., IL, USA) in 10%iger Lösung in Reinstwasser
- TRIS-Puffer, hergestellt aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan, p.a. (syn. Trometamol, Fa. Merck KGA, Darmstadt) in Reinstwasser, Konzentrationen von 10 mM bis 100 mM, mit 2N HCl auf pH 7,5 eingestellt.
- Mischungen aus Trehaloselösung und TRIS-Puffer, sodass die Konzentrationen 10% bzw. 10-100 mM betragen; mit 2N HCl auf pH 7,5 eingestellt.
- Citrat-Puffer, hergestellt aus Tri-Natrium-Citrat Dihydrat, p.a. (Fa. Sigma-Aldrich, Seelze) in Reinstwasser, Konzentration 100 mM, mit 2N HCl auf pH 6,0 eingestellt.

2. Herstellung der Proben

Es wurden Stammlösungen von DMTAP und Arzneistoff in Chloroform hergestellt. Von diesen Lösungen wurden die entsprechenden Mengen in 10 ml Glas-Vials pipettiert. Das Chloroform wurde durch Begasen mit Stickstoff abgezogen und der gebildete Lipidfilm noch ca. weitere 15 Minuten getrocknet. Es wurden 200 µl des Dispersionsmediums hinzugegeben und für 10 Minuten in einem auf 40 °C temperierten Ultraschallbad homogenisiert. Von diesen Dispersionen wurden 20 µl abgenommen und in einen DSC-Tiegel eingefüllt. Dieser Tiegel wurde versiegelt und anschließend vermessen.

Bei Vermessung einer einzelnen Substanz wurde diese direkt in das Glas-Vial eingewogen. Die weitere Verarbeitung entsprach der obigen Vorgehensweise.

3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die verwendete DSC-Anlage war vom Typ DSC 204 Phoenix, mit Controllern CC200L und TASC 414/3 A und Autosampler ASC 204 (Fa. Netzsch GmbH, Selb). Bei den DSC-Tiegeln handelte es sich um Aluminium-Tiegel mit einem Fassungsvermögen von ca. 40 µl. Die Proben wurden folgendem Temperaturprogramm unterworfen:

- Start und Einsetzen der Probe bei 20 °C
- Abkühlen auf 10 °C und Halten der Temperatur für 10 Minuten
- Aufheizen auf 50 °C, Halten der Temperatur für 2 Minuten
- Erneutes Abkühlen auf 10 °C, Halten der Temperatur für 2 Minuten
- Erneutes Aufheizen auf 50 °C, Halten der Temperatur für 2 Minuten
- Abkühlen auf 20 °C
- Entnehmen der Probe und Einsetzen des nächsten Tiegels.

Zur Kühlung des Ofens wurde Flüssigstickstoff benutzt. Zur Dokumentation und Auswertung wurde die Software Proteus Analysis, Version 4.1.2 der Fa. Netzsch verwendet. Einige Thermogramme wurden in Origin-Software (Fa. MicroCal, Massachusetts, USA) zur besseren graphischen Darstellung mehrerer Messungen transferiert. Zur Auswertung herangezogen wurden sowohl die Werte der jeweiligen Phasenübergangstemperaturen, als auch der Vergleich der Thermogramme über

einen bestimmten Temperaturbereich. Für einige Versuchsreihen wurden auch die Umwandlungsenthalpien und die Peakbreiten in halber Höhe ermittelt.

III. Ergebnisse

1. Vorversuche

DOTAP, ein kationisches Lipid, das in Teil 1 dieser Arbeit zur Herstellung von paclitaxelhaltigen Liposomen verwendet wurde, zeigt einen Haupt-Phasenübergang im Bereich von unter 0 °C. Da wir wässrige Dispersionen analysierten, war zu erwarten, dass die Detektion des Phasenübergangs durch das Signal des gefrierenden Wassers erschwert wird. Dies wurde auch in den Vorversuchen so beobachtet, sodass als Modellsubstanz für ein kationisches Lipid in allen Versuchen DMTAP verwendet wurde. Es zeigt einen Haupt-Phasenübergang bei ca. 38 °C.

In zahlreichen Vorversuchen wurden unterschiedliche Parameter untersucht, die Einfluss auf die Messergebnisse nehmen könnten. So wurde in unserem Fall eine Heizrate von 1 K/min als optimal ermittelt. Diese Heizrate stellte einen guten Kompromiss zwischen erwünschter Präzision und akzeptabler Dauer der Messungen dar. Als geeignete Lipid-Menge zur Durchführung der Messungen wurden 2 mg bestimmt. Hierzu wurden zur Probenvorbereitung ca. 20 mg Lipid in 200 µl wässrigem Medium dispergiert und davon 20 µl in die DSC-Tiegel eingebracht. Die Reproduzierbarkeit der Messungen war größer, wenn die Tiegel vor der Messung nicht gelocht wurden. Eine Vermessung reiner Lipide in pulverförmiger, nicht dispergierter Form war aufgrund zu geringer Sensitivität der Anlage nicht möglich. Aufgrund der begrenzten Größe der verfügbaren Tiegel war auch eine Erhöhung der Einwaage nicht praktikierbar.

Ausführliche Versuche befassten sich mit dem Einfluss des verwendeten Dispersionsmediums. Wir änderten dabei sowohl den pH-Wert des Mediums, als auch die Konzentration des verwendeten Puffers. Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse für Heizzyklen mit diesen Dispersionen:

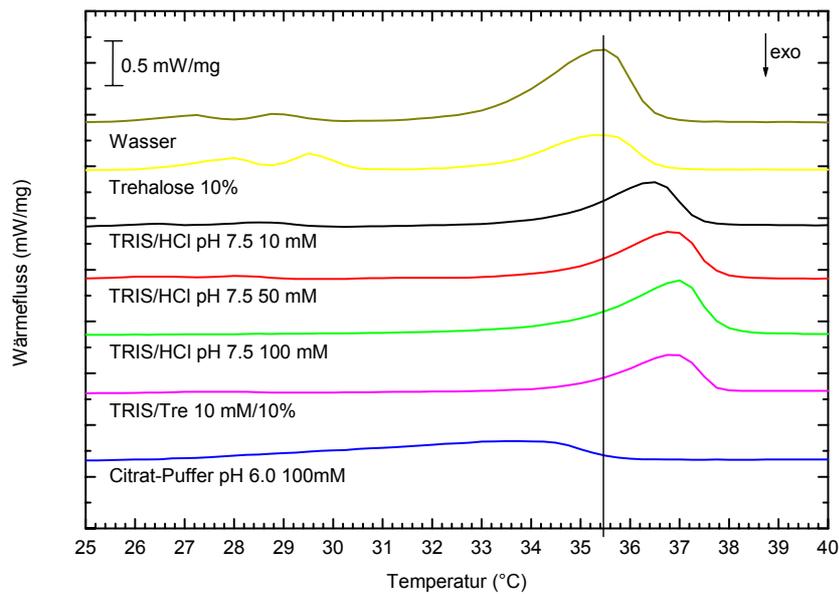


Abbildung 53: Thermogramme der Heizzyklen von DMTAP in verschiedenen Medien; die senkrechte Linie verdeutlicht den Phasenübergang in reinem Wasser;

Beim Aufheizen einer wässrigen Dispersion von DMTAP erkennt man einen endothermen Phasenübergang, dessen Temperaturmaximum abhängig vom Medium bei ca. 35 – 38 °C liegt. Bei reinem Wasser als Dispersionsmedium erkennt man zwei kleinere Peaks zwischen 27 und 29 °C (sub- bzw. pretransition) und einen Hauptphasenübergang bei 35.4 °C. Bei Zugabe von Trehalose ändert sich das Thermogramm nicht wesentlich, der Peak des Hauptphasenübergangs wird allerdings breiter und niedriger. Bei Verwendung von TRIS-gepufferten Dispersionsmedien steigt die Temperatur des Hauptphasenübergangs an, bei einer Konzentration von 100 mM TRIS sind die Peaks der anderen Phasenübergänge verschwunden. Zugabe von Trehalose zu einem TRIS-gepufferten Medium ändert das Thermogramm nicht. In Citrat-Puffer mit pH 6,0 erhält man lediglich einen sehr breiten Peak zwischen 26 und 36 °C ohne ein klares Temperaturmaximum.

Die Ergebnisse der entsprechenden Kühlzyklen sind in Abbildung 54 dargestellt:

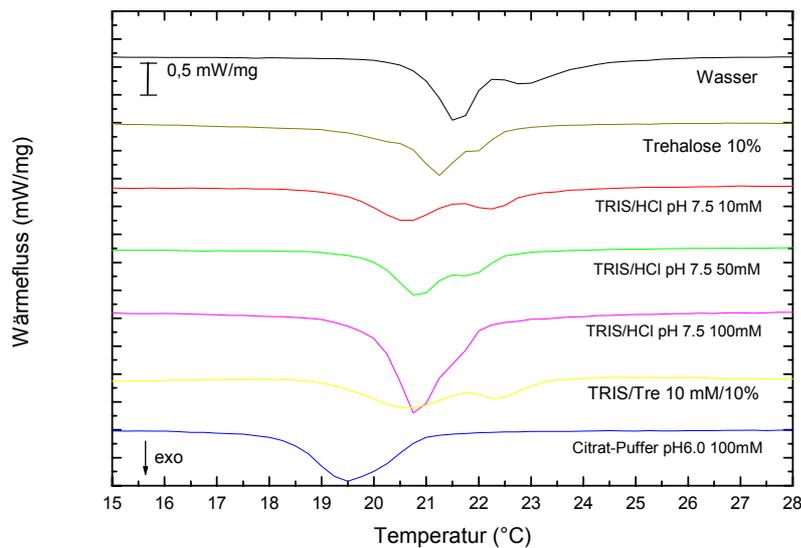


Abbildung 54: Thermogramme von DMTAP in verschiedenen Medien; Kühlzyklen

Auffallend hier ist die starke Verschiebung der Lage der jetzt exothermen Phasenübergänge. Diese liegen bei ca. 19 – 23 °C. Zwei Peaks sind in Wasser, sowie in Medien mit geringer Elektrolytkonzentration am deutlichsten zu beobachten. Sie nehmen mit steigender Pufferkonzentration an Schärfe ab, um schließlich bei 100 mM TRIS/HCl-Puffer zu einem breiten Peak bei ca. 21 °C zu verschmelzen. Auch hier ist bei pH 6,0 in Citrat-Puffer ein einzelner, breiter Peak bei niedrigeren Temperaturen zu beobachten.

Diese Messungen zeigen deutlich, dass die Ergebnisse der DSC-Messungen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber dem verwendeten Dispersionsmedium aufweisen.

Daher wurden alle weiteren Messungen in einer Mischung aus 10%iger Trehalose mit 10 mM TRIS/HCl-Puffer, die auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt wurde, durchgeführt. Zum einen sollte dadurch die Beeinflussung der Thermogramme durch die Ionenstärke des verwendeten Puffers so gering wie möglich gehalten werden, zum anderen sollte durch den Zusatz von Trehalose die Zusammensetzung den Formulierungen aus Teil 1 dieser Arbeit angenähert werden.

2. DMTAP und Paclitaxel

Es wurden Mischungen aus DMTAP und Paclitaxel in Anteilen von 0 bis 4 mol% hergestellt. Diese wurden mittels DSC vermessen und die erhaltenen Thermogramme der Heiz- bzw. Kühlzyklen in einem Diagramm abgebildet. Zur Verdeutlichung wurden die Graphen gegeneinander um einen bestimmten Betrag verschoben. Abbildung 55 zeigt die Ergebnisse der Heizzyklen in einem Bereich von 24 bis 42 °C.

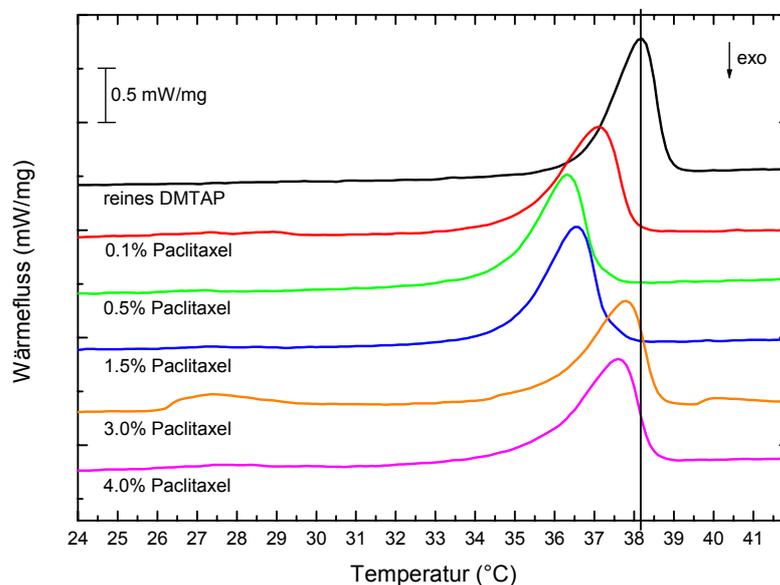


Abbildung 55: Thermogramme von DMTAP-Paclitaxel Mischungen; Heizzyklen; die vertikale Linie verdeutlicht den Phasenübergang von reinem DMTAP

Man erkennt einen deutlichen Hauptphasenübergang von reinem DMTAP bei einer Temperatur von ca. 38 °C. Bereits durch Zugabe von 0,1 mol% Paclitaxel erhält man eine Verschiebung der Übergangstemperatur um ca. 1 °C hin zu niedrigeren Temperaturen. Durch Zugabe von 0,5 mol% Paclitaxel erreicht man eine Verschiebung um ca. 2 °C. Ab einer Paclitaxelkonzentration von 3 mol% steigen die Übergangstemperaturen wieder fast auf den Wert des reinen Lipids an. Die Löslichkeit von Paclitaxel in Membranen aus DMTAP scheint im Bereich zwischen 1,5 und 3 mol% zu liegen. Danach kommt es vermutlich zu Kristallisationsvorgängen, ausgehend von reinen Arzneistoff-Domänen in der Membran.

Abbildung 56 zeigt zur Verdeutlichung die Phasenübergangstemperaturen in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Paclitaxel:

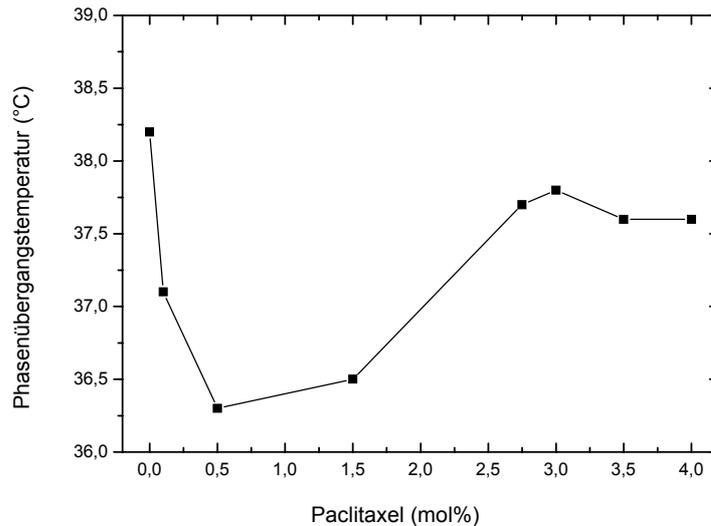


Abbildung 56: Temperaturen des Haupt-Phasenübergangs in DMTAP-Paclitaxel-Mischungen in Abhängigkeit von der Menge an Arzneistoff im Bereich von 0 bis 4 mol%

Die Kurven, die man durch Abkühlen der Proben erhielt, zeigen einen wesentlich weniger konzentrationsabhängigen Verlauf (siehe Abbildung 57).

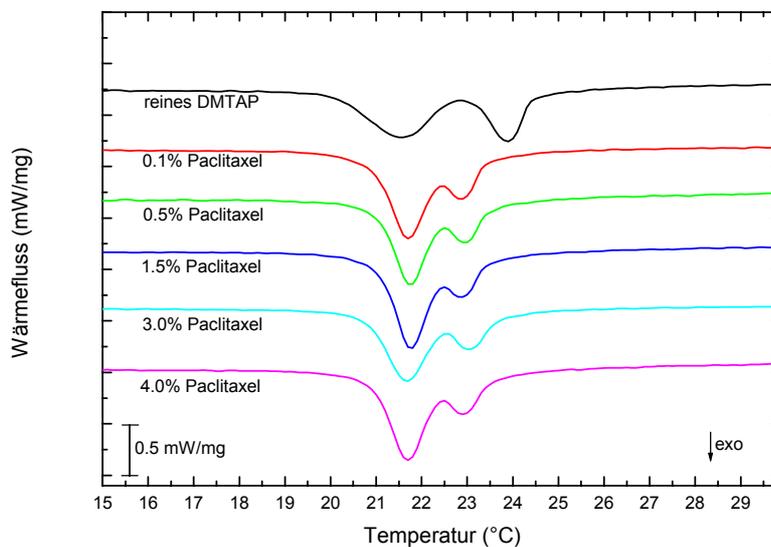


Abbildung 57: Thermogramme von DMTAP-Paclitaxel Mischungen; Kühlzyklen;

Am deutlichsten auch hier wieder der bereits durch 0,1 mol% Paclitaxel hervorgerufene Effekt. Danach ändern sich die Thermogramme kaum noch. Die Proben wurden in diesen Versuchen zunächst geheizt und anschließend gekühlt, durch dieses Vorgehen kann es natürlich bereits zu irreversiblen, strukturellen Veränderungen in den Proben gekommen sein.

Bei weiteren Versuchsreihen, die die Veränderung der Phasenübergangstemperatur über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mol% Paclitaxel verfolgten, wurden diese Ergebnisse bestätigt. Für bessere Übersichtlichkeit sind in Abbildung 58 die Übergangstemperaturen gegen die zugegebene Menge an Paclitaxel aufgetragen.

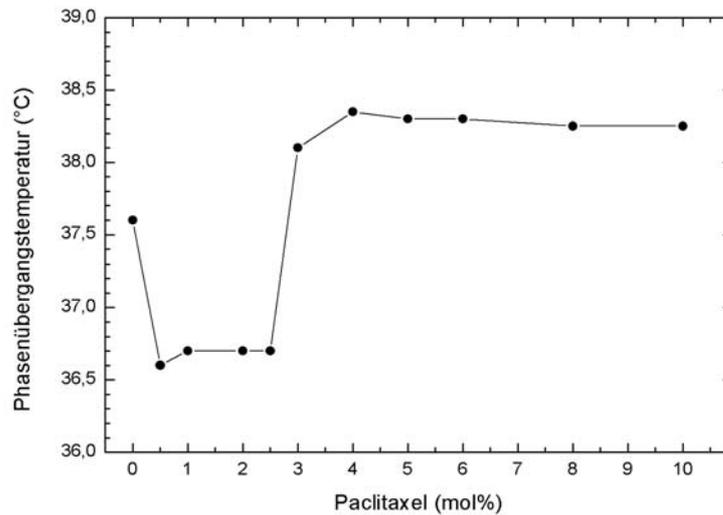


Abbildung 58: Temperaturen des Haupt-Phasenübergangs in DMTAP-Paclitaxel-Mischungen in Abhängigkeit von der Menge an Arzneistoff im Bereich von 0 bis 10 mol%

Deutlich zu sehen ist der starke Effekt auf die Übergangstemperatur hervorgerufen bereits durch kleine Einwaagen Paclitaxel. Danach ändert sich, abgesehen von einem Sprung zwischen 2,5 und 3 mol% Paclitaxel, die Temperatur kaum. Oberhalb von 3 mol% steigen die Temperaturen im Gegensatz zur vorangegangenen Versuchsreihe über den Wert des reinen Lipids und bleiben von da ab auf einem konstanten Niveau.

In Abbildung 59 sind die Übergangsenthalpien und die Peakbreiten in halber Höhe aus den in Abbildung 58 gezeigten Messungen aufgetragen. Obwohl die erhaltenen Werte stark schwanken, lassen sich folgende Informationen entnehmen:

Die Werte für die Enthalpie steigen für Ansätze mit einem Gehalt zwischen 2 und 3 mol% an, um dann auf diesem Niveau zu bleiben. Die Peakbreite in halber Höhe steigt zunächst geringfügig an und erreicht für Ansätze mit 2 mol% Paclitaxel ein Maximum. Sie sinkt danach wieder ab, um bei Ansätzen mit mehr als 2 mol% auf dem Ausgangswert von reinem DMTAP zu verbleiben.

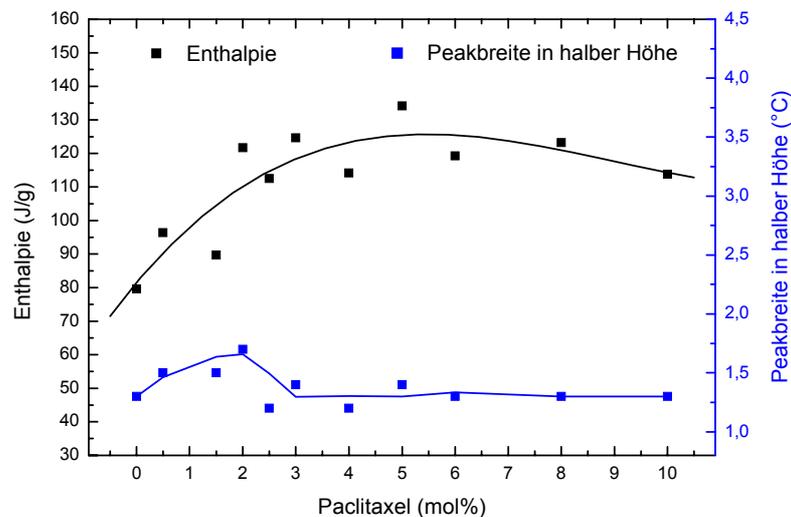


Abbildung 59: Enthalpie (schwarze Kurve) und Peakbreite in halber Höhe (blaue Kurve) für reines DMTAP bzw. Mischungen mit Paclitaxel im Bereich von 0 bis 10 mol%

Auch bei diesen Parametern sind die Veränderungen in einem Bereich geringer Arzneistoffmengen zu beobachten, Belege für ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen DMTAP und größeren Anteilen an Paclitaxel sind nicht zu erbringen.

Zusammenfassung

Bei allen Messungen mit DMTAP-Paclitaxel-Mischungen wurden signifikante Auswirkungen des Arzneistoffs auf die Thermogramme nur bei Konzentrationen kleiner 3 mol% gefunden. Eine kontinuierliche Abnahme der Phasenübergangstemperatur mit steigendem Paclitaxel-Anteil wird nicht beobachtet. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass für Paclitaxel nur eine geringe Löslichkeit, sowohl in der flüssig-kristallinen, als auch in der Gelphase, besteht.

3. DMTAP und Camptothecin

In Analogie zu obigen Versuchen wurden Mischungen aus DMTAP und Camptothecin in Anteilen von 0 bis 30 mol% hergestellt. Wir erwarteten aufgrund der entgegengesetzten Ladungsverhältnisse und des kleineren Moleküls eine stärkere Interaktion zwischen Lipid und Arzneistoff verglichen mit Paclitaxel. Abbildung 60 zeigt die Ergebnisse der Heizzyklen in einem Bereich von 23 bis 40 °C. Auch hier wurden die Thermogramme zur Verdeutlichung vertikal gegeneinander verschoben.

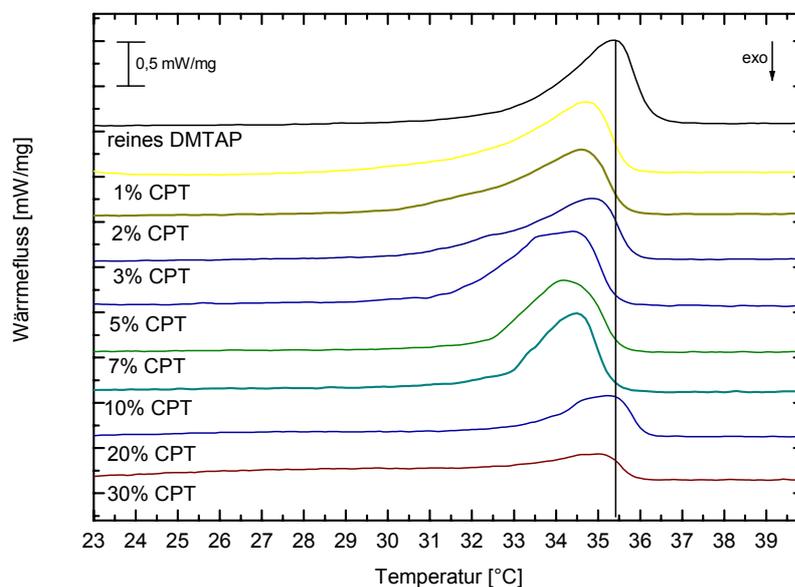


Abbildung 60: Thermogramme von DMTAP-CPT Mischungen; Heizzyklen; die senkrechte Linie verdeutlicht den Phasenübergang von reinem DMTAP

Zu beobachten ist eine Abnahme der Phasenübergangstemperatur um ca. 1 bis 2 °C bei Zugabe von Camptothecin in Mengen von 1 bis 10 mol%. Bei Camptothecin-Anteilen von 20 und 30 mol% beobachtet man einen Anstieg der Temperaturmaxima. Die Peakform wird mit zunehmender Arzneistoffmenge breiter und niedriger. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 61 die Übergangstemperaturen gegen die Molfraktion an Camptothecin aufgetragen:

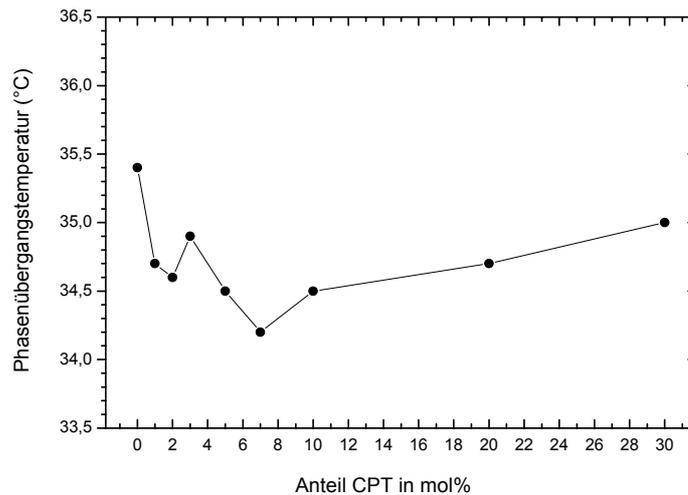


Abbildung 61: Temperaturen des Haupt-Phasenübergangs von DMTAP-CPT-Mischungen

Im Vergleich zu den Ergebnissen mit Paclitaxel fällt auf, dass hier die Phasenübergangstemperaturen mit steigender Arzneistoffkonzentration kontinuierlich sinken und ein Minimum der Übergangstemperaturen erst bei einer Einwaage von 7 mol% Camptothecin erreicht wird. Bei größeren Anteilen steigen die Temperaturwerte an, aber im Vergleich zu Paclitaxel-Formulierungen nicht so abrupt, ein Plateau wird dabei bei den untersuchten Verhältnissen nicht erreicht. Dies sind Indizien dafür, dass die Löslichkeit von Camptothecin in DMTAP-Liposomen größer ist, als die von Paclitaxel.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Kühlzyklen ist eine Veränderung der Thermogramme sogar über einen noch größeren Konzentrationsbereich zu beobachten (siehe Abbildung 62).

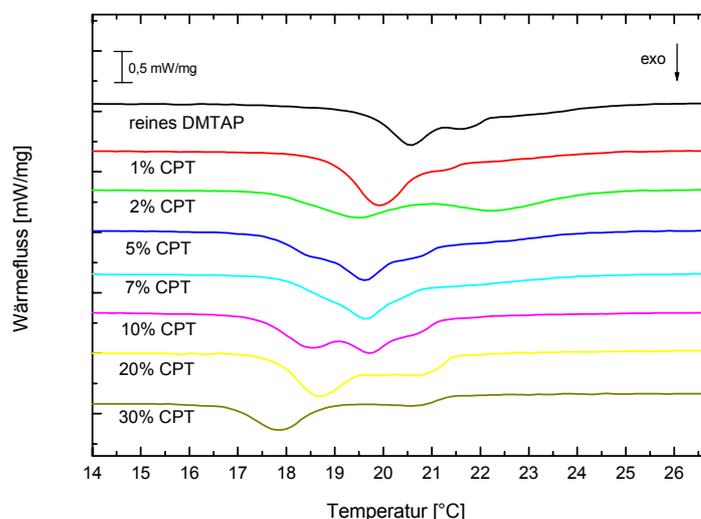


Abbildung 62: Thermogramme der Kühlzyklen von DMTAP-CPT Mischungen;

Die zwei Peaks, die im Thermogramm des reinen DMTAP zu sehen sind, werden zwar mit zunehmendem Camptothecin-Gehalt unschärfer und verschmelzen teilweise sogar zu einem einzigen Signal, die Übergangstemperaturen hingegen verschieben sich über den gesamten Bereich annähernd linear hin zu niedrigeren Werten.

Die Daten zur Übergangsenthalpie und zur Peakbreite in halber Höhe der Haupt-Phasenübergänge zeigt Abbildung 63.

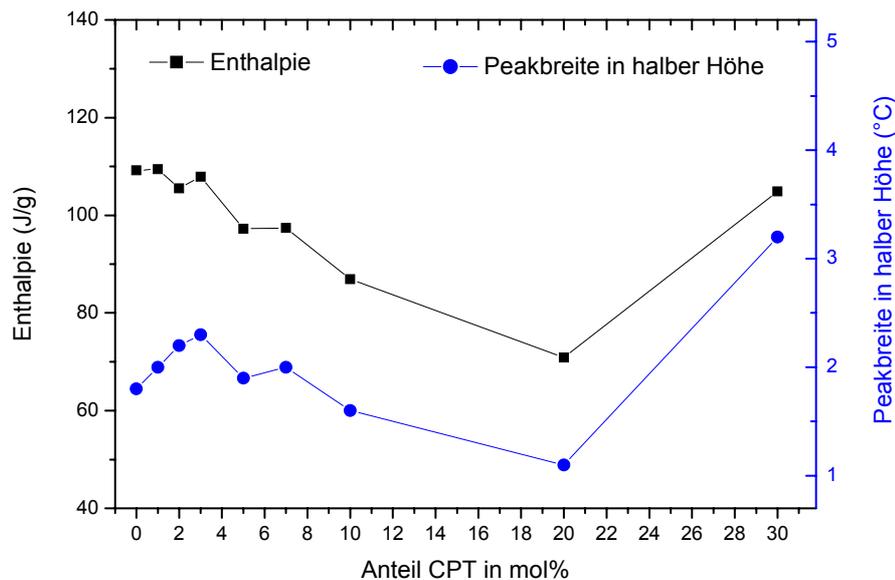


Abbildung 63: Enthalpie (schwarze Kurve) und Peakbreite in halber Höhe (blaue Kurve) für reines DMTAP bzw. Mischungen mit Camptothecin im Bereich von 0 bis 30 mol%

Die Enthalpie bleibt im Bereich bis zu 3 mol% annähernd unverändert, um danach bis zu einem Anteil von 20 mol% linear abzufallen. Auch dies ist ein Anzeichen dafür, dass bis zu diesem Anteil an Arzneistoff noch Mischbarkeit mit der Lipidmembran besteht. Erst der letzte gemessene Wert bei 30 mol% Camptothecin liegt deutlich höher. Die Kurve für die Halbwertsbreite steigt bei niedrigen Konzentrationen an Arzneistoff zunächst an, um ab 4 mol% parallel zu den Werten für die Enthalpie zu verlaufen.

Zusammenfassung

Bei Messungen von DMTAP-Camptothecin-Mischungen konnten anhand der kontinuierlichen Verschiebung der Lage des Haupt-Phasenübergangs Hinweise für Wechselwirkungen über einen Konzentrationsbereich bis 7 mol% gefunden werden.

Die entsprechenden Daten zur Enthalpie und Peakbreite in halber Höhe lassen ebenso wie die Thermogramme bei Abkühlung der Proben Rückschlüsse auf Wechselwirkungen zwischen Camptothecin und DMTAP über einen noch größeren Konzentrationsbereich zu.

IV. Zusammenfassung und Diskussion

Mittels DSC-Messungen lassen sich Wechselwirkungen zwischen einem kationischem Lipid und Arzneistoffen erfassen. Aus dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass nur Liposomendispersionen mit einem geringen Anteil Paclitaxel über längere Zeit stabil bleiben. Die geringe Mischbarkeit von Paclitaxel mit kationischen Lipiden spiegelt sich in den geringen Effekten wider, die Paclitaxel auf das thermotrope Verhalten von DMTAP-Dispersionen in wässrigen Medien ausübt. Der Konzentrationsbereich, in dem Paclitaxel tatsächlich Wechselwirkungen zeigt, ist sehr gering. Die größten Veränderungen bewirken bereits geringe Mengen an Paclitaxel, über einen Bereich von ca. 2 bis 3 mol% hinaus sind wenig Unterschiede im Vergleich zu Thermogrammen reinen Lipids festzustellen. Entsprechende DSC-Thermogramme erhielten auch Ali et al. [188], die z. B. Wechselwirkungen zwischen Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Paclitaxel bis zu 3 mol% Arzneistoffanteil feststellten. Zhao et al. [213] fanden Hinweise für stabile Liposomen aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) mit Paclitaxel-Anteilen bis zu 5 mol%.

DSC-Messungen an Mischungen aus kationischen Lipiden und Paclitaxel in den von uns untersuchten kleinen Inkrementen mit dem Ziel der Rezepturoptimierung wurden bis dato nicht veröffentlicht.

In den Untersuchungen von DMTAP-Camptothecin-Systemen konnten die erwarteten stärkeren Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Die Veränderung aller untersuchten Parameter war über einen weitaus größeren Konzentrationsbereich zu beobachten. Die Daten deuten darauf hin, dass erst oberhalb einer Fraktion von 7 mol% damit gerechnet werden muss, dass nicht das gesamte CPT in einem einheitlichen Bindungszustand vorliegt.

Mittels DSC-Messungen können mit geringem apparativem und zeitlichem Aufwand Aussagen über die Stabilität von arzneistoffhaltigen Liposomenformulierungen getroffen werden. Anhand der bestimmten thermodynamischen Parameter der Wirkstoff-Lipidmischungen können wertvolle Informationen über die Formulierbarkeit und die thermodynamische Stabilität der Formulierungen gewonnen werden.

Angesichts dieser Beobachtungen sollte es mittels DSC-Messungen möglich sein, Wechselwirkungen zwischen lipophilen Arzneistoffen und Lipid-Bilayern zu evaluieren. Es sollte möglich sein, geeignete Mischungsverhältnisse zu bestimmen, bzw. Veränderungen der Eigenschaften arzneistoffhaltiger Liposomen aufgrund struktureller Modifikationen am Arzneistoffmolekül bzw. Variationen in der Lipidkomposition zu prognostizieren.

V. Literaturverzeichnis

188. Ali, S. et al, A differential scanning calorimetry study of phosphocholines mixed with paclitaxel and its bromoacylated taxanes. *Biophys.J.* 78 [1], 246-256. (2000)
189. Balasubramanian S.V., Straubinger R. M., Taxol-lipid interactions: taxol-dependent effects on the physical properties of model membranes. *Biochemistry* 33, 8941-8947. (1994)
190. Barreleiro, P. C. A. et al, Interaction of DNA with cationic Vesicles: A Calorimetric Study. *J.Phys.Chem.B* 104, 7795-7802. (2000)
191. Bernsdorff, C. et al, Interaction of the anticancer agent Taxol (paclitaxel) with phospholipid bilayers. *J.Biomed.Mater.Res* 46, 141-149. (1999)
192. Burke, T. G. et al, Lipid Bilayer Partitioning and Stability of Camptothecin Drugs. *Biochemistry* 32, 5352-5364. (1993)
193. Campbell.R.B.et al, Influence of Cationic Lipids on the Stability and Membrane Properties of Paclitaxel-Containing Liposomes. *J.Pharm.Sci.* 90 [8], 1091-1105. (2000)
194. Clas, S.-D. et al, Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharm.Sci.Technol.Today* 2 [8], 311-320. (1999)
195. Dollimore, D. and Phang P., Thermal Analysis. *Anal Chem.* 72 [12], 27R-36R. (2000)
196. Friess, W. et al, Bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) using absorbable collagen sponges (ACS): influence of processing on ACS characteristics and formulation . *Pharm Dev Technol.* 4 [3], 387-396. (1999)
197. Giovanella, B. C. et al, Dependence of anticancer activity of camptothecins on maintaining their lactone function. *Ann N Y Acad Sci.* 922, 27-35. (2000)
198. Hertzberg, R. P. et al, Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem.* 32 [3], 715-720. (1989)
199. Hsiang, Y. H. and Liu L. F., Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 48 [7], 1722-1726. (1988)
200. Huang, C.-h. and Li S., Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1422 [3], 273-307. (1999)
201. Jung, L. L. and Zamboni W. C., Cellular, pharmacokinetic, and pharmacodynamic aspects of response to camptothecins: can we improve it? *Drug Resistance Updates* 4, 273-288. (2001)

-
202. Kodali, D. R. et al, Structure and polymorphism of 18-carbon fatty acyl triacylglycerols: effect of unsaturation and substitution in the 2-position. *J Lipid Res.* 28 [4], 403-413. (1987)
 203. Nicholov, R. et al, Interaction of Paclitaxel with Phospholipid Bilayers. *J.Liposome Res.* 5 [3], 503-522. (1995)
 204. Pannu R.K.et al, A DSC study of the miscibility of poly(ethylene oxide)-block-poly(DL-lactide) copolymers with poly(DL-lactide). *Biomaterials* 20 [15], 1381-1387. (1999)
 205. Rao, N. Rama and Rao, G. Sudhakar, Compatibility study between pregelatinized starch as excipient and various commonly used drugs using differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutical Excipients* [Oct.-Dec.], 103-106. (2002)
 206. Sackmann, E. Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. In: *Handbook of Biological Physics*. herausgegeben von Lipowsky, R. and Sackmann E. [Chapter Nr. 5], 213-298. Amsterdam, Elsevier Science B.V. (1995)
 207. Shaikh, S. R. et al, Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1512 [2], 317-328. (2001)
 208. Tong H.H.et al, Thermal analysis of trace levels of polymorphic impurity in salmeterol xinafoate samples. *Pharm Res.* 20 [9], 1423-1429. (2003)
 209. Townsend, Ian, A basic strategy for the thermal stability assessment of pharmaceutical synthetic intermediates and products. *Journal of Thermal Analysis* 37 [9], 2031-2066. (1991)
 210. Van Dooren, A. A. and Mueller, B. W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC) - a critical review. *International Journal of Pharmaceutics* 20[3], 217-233. (1984)
 211. Wall, M. E. et al, Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J.Am.Chem.Soc.* 88 [16], 3888-3890. (1966)
 212. Zantl, R. et al, Thermotropic Phase Behavior of Cationic-Lipid-DNA Complexes Compared to Binary Lipid Mixtures. *J.Phys.Chem.B* 103, 10300-10310. (1999)
 213. Zhao, L. et al, Investigation of molecular interactions between paclitaxel and DPPC by langmuir film balance and differential scanning calorimetry. *J.Pharm.Sci.* 93 [1], 86-98. (2004)

Lebenslauf

Persönliche Angaben	Friedrich Gruber Geboren am 17. Februar 1968 in München verheiratet Staatsangehörigkeit: deutsch
Schulische Ausbildung	1974-1976 Grundschule an der Grafinger Strasse in München 1976-1978 Grundschule an der Tumblinger Strasse in München 1978-1987 Erwerb der Allg. Hochschulreife am Klenze-Gymnasium in München
Berufliche Ausbildung	September 1989 – Juli 1991 Ausbildung zum Chemielaboranten am Zentralinstitut des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr in München
Berufliche Tätigkeit	Oktober 1987 – Februar 1989 Stabsdienstsoldat an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München März 1989 – April 1994 Laborfeldwebel am Zentralinstitut des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr in München
Studium	April 1994 – April 1998 Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin August 1999 Approbation als Apotheker
Praktikum	Mai 1998 – Oktober 1998 Praktikum in der Augusten-Apotheke in München November 1998 – April 1999 Praktikum bei Fa. Haupt-Pharma GmbH in Wolfratshausen in der Abteilung „Galenische Entwicklung und Verfahrenstechnik“
Wissenschaftliche Tätigkeit	August 1999 –März 2004 Promotion im Fach Pharmazeutische Technologie am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in München, Lehrstuhlinhaber Prof. Winter Thema: „Untersuchungen zur Encapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen“ in Kooperation mit Fa. Munich Biotech AG in Neuried