

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Hydrolyseverhalten der synthetischen Phospholipide
DPPG_x (x=1,2,3) im Vergleich zu DPPC in
thermosensitiven Liposomen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Johannes Budweiser

aus Straubing

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Lindner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Dietrich
Priv. Doz. Dr. Andreas Herbst

Mitbetreuung durch
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Hossann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2015

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Liposomen als Transportvehikel	1
1.2 Steuerung und Freisetzung	1
1.2.1 Phospholipide als wichtiger Liposomenbestandteil	4
1.3 Chemische Reaktionen	6
1.3.1 Esterbildung	6
1.3.2 Esterhydrolyse	7
1.3.3 Hydrolyse eines Glycerophospholipids	8
1.4 Zielsetzung	10
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Materialien und Geräte zur Herstellung und Charakterisierung von Liposomen	13
2.2 Methoden	19
2.2.1 Liposomenherstellung	19
2.2.2 Charakterisierung der hergestellten Liposomen	21
2.2.3 Durchführung der Hydrolyseexperimente	23
2.2.4 Herstellung des P-Lyso-PG ₂	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Zusammenfassung aller verwendeten Liposomen	25
3.2 P-Lyso-PG₂-Detektion mittels Dünnschichtchromatographie	27
3.2.1 Laufmittelvariation und Beurteilung der DC-Banden	27
3.2.2 Densitometrische Auswertung	29
3.2.3 Retentionsfaktoren der untersuchten Lipide	30
3.3 Hydrolyse ausgewählter Lipide unter verschiedenen Versuchsbedingungen	30
3.3.1 Einfluss des pH-Wertes bei aufsteigender Inkubationszeit	31
3.3.2 Einfluss der Temperatur bei konstanter Inkubationszeit	35
3.3.3 Einfluss der Lipidphase	39
3.4 Hydrolyseverhalten verschiedener Lysolipide und Alkylphosphocholine	42
3.4.1 Hydrolysekinetik der untersuchten Lysolipide: Einfluss des pH- Wertes bei aufsteigender Inkubationszeit	43

3.4.2	Temperatureinfluss auf die Hydrolyse der Lysolipide bei konstanter Inkubationszeit	45
3.5	DOX-Einschluss bei unterschiedlichen pH-Werten und DC-Analytik zur Bestimmung der Lysolipidanteile	47
3.5.1	P-Lyso-PC-und P-Lyso-PG ₂ -Bestimmung	48
3.5.2	P-Lyso-PC-und P-Lyso-PG ₃ -Bestimmung	49
3.5.3	Bildung des Quotienten der Ausgangslipide	50
4	Diskussion	54
4.1	Weiterhydrolyse der Lysolipide	54
4.2	Effekt von pH-Wert und Temperatur auf die Hydrolyse der untersuchten Phospholipide	56
4.3	Gegenüberstellung der verwendeten Phospholipide und ihrer Hydrolyseprodukte	59
4.3.1	Vergleich des ersten und zweiten Hydrolyseschrittes von DPPC und DPPG _x (x=1,2)	59
4.3.2	Vergleich der Stabilität von DPPC und DPPG _x (x=1,2,3) anhand des ersten Hydrolyseschrittes	62
4.4	Dünnschichtchromatographie zum Lysolipid-Nachweis bei der pharmazeutischen Anwendung von Doxorubicinliposomen	64
5	Zusammenfassung und Ausblick	66
6	Literaturverzeichnis	68

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Schematischer Aufbau von Glycerophospholipiden.	4
Abb. 1.2: Spontane Zusammenlagerung von Lipidmolekülen in wässrigem Medium.	5
Abb. 1.3: Veresterung einer Carbonsäure mit Alkohol unter Wasserbildung.....	7
Abb. 1.4: Mechanismus der sauren Hydrolyse.....	7
Abb. 1.5: Mechanismus der basischen Hydrolyse.....	8
Abb. 1.6: Hydrolyse der Phospholipide DPPG ₁ , DPPG ₂ und DPPG ₃ durch Abspaltung der Fettsäure Palmitinsäure unter Bildung der Lysolipide P-Lyso-PG ₁ , P-Lyso-PG ₂ und P-Lyso-PG ₃	9
Abb. 3.1: DC-Platte mit Standard (S) und Proben von DPPG ₂ /Cholesterin-Liposomen bei pH 4,0 (2) sowie von DPPC/Cholesterin-Liposomen bei pH 1,1 (5) und pH 4,0 (6) nach einer 18-stündigen Inkubation bei 45°C.	28
Abb. 3.2: Densitometrische Auswertung zweier DC-Platten bei Detektion des Standards vor (links) und nach (rechts) Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung.	29
Abb. 3.3: Lysolipidanteile der Formulierungen DPPC/DPPG _x (x=1,2,3) 50:50 (mol/mol) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer Temperatur von 45°C und pH-Werten von 1,1, 4,0 bzw. 12,9. Das Diagramm A zeigt den P-Lyso-PC-Anteil, welcher bei der Formulierung DPPC/DPPG ₂ 50:50 (mol/mol) detektiert wurde und ist repräsentativ für die gemessenen P-Lyso-PC-Anteile bei den Formulierungen DPPC/DPPG ₁ und DPPC/DPPG ₃ (jeweils 50:50 (mol/mol)). Anzahl der Messwerte n=3.....	32
Abb. 3.4: DPPG _x (x=1,2,3)/DPPC-Verhältnis in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer Temperatur von 45°C und pH-Werten von 1,1, 4,0 und 12,9. Anzahl der Messwerte n=3.	34
Abb. 3.5: Lysolipidanteile der Formulierungen DPPC/DPPG _x (x=1,2,3) 50:50 (mol/mol) in Abhängigkeit verschiedener Inkubationstemperaturen (-20°C, 4°C, 25°C, 45°C) und pH-Werten (1,1, 4,0, 6,6, 7,4, 12,9) bei einer Inkubationszeit von 18 Stunden. . Das Diagramm A zeigt den P-Lyso-PC-Anteil, welcher bei der Formulierung DPPC/DPPG ₂ 50:50 (mol/mol) detektiert wurde und ist repräsentativ für die gemessenen P-Lyso-PC-Anteile bei den Formulierungen DPPC/DPPG ₁ und DPPC/DPPG ₃ (jeweils 50:50 (mol/mol)). Anzahl der Messwerte n=3.....	36
Abb. 3.6: DPPG _x (x=1,2,3)/DPPC-Verhältnis in Abhängigkeit verschiedener Inkubationstemperaturen (-20°C, 4°C, 25°C, 45°C) und pH-Werte (1,1, 4,0, 6,6, 7,4,	

12,9) bei einer Inkubationszeit von 18 Stunden. Die rote Nulllinie gibt das Ausgangsverhältnis der Lipide unmittelbar nach Herstellung der Liposomen wieder. Anzahl der Messwerte n=3.	38
Abb. 3.7: P-Lyso-PC-Anteil von Liposomenformulierungen mit Cholesterin (DPPC/Chol) und ohne (DPPC/DPPG2) bei einer 120-minütigen Hydrolyse bei 45 °C und pH 1,1 bzw. 12,9. Anzahl der Messwerte n=3.	40
Abb. 3.8: Prozentuale Angabe des P-Lyso-PG1 (A), P-Lyso-PG2 (B) und P-Lyso-PG3 (C) nach 120-minütiger Inkubation bei einer Temperatur von 45°C und pH Werten von 1,1 bzw. 12,9 von Liposomen mit Cholesterin (DPPGx/Chol) und ohne (DPPC/DPPGx), wobei x=1,2,3. Anzahl der Messwerte n=3.	41
Abb. 3.9: Verbleibender P-Lyso-PC-Anteil nach 30-, 60-, 90-, 120- und 300-minütiger Hydrolyse bei pH 1,1 bzw. 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C. Anzahl der Messwerte n=3.	43
Abb. 3.10: Verbleibender P-Lyso-PG1-Anteil (A) bzw. P-Lyso-PG2-Anteil (B) nach 30-, 60-, 90-, 120- und 300-minütiger Hydrolyse bei pH 1,1 bzw. 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C. Anzahl der Messwerte n=3.	44
Abb. 3.11: Verbleibender Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)-Anteil (A) bzw. Erucylphosphohomocholin (Erufosin)-Anteil (B) nach 30-, 60-, 90-, 120- und 300-minütiger Hydrolyse bei pH 1,1 bzw. 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C. Anzahl der Messwerte n=3.	45
Abb. 3.12: Verbleibender Anteil der Lysolipide P-Lyso-PC, P-Lyso-PG1, P-Lyso-PG2 und der Alkylphosphocholine Miltefosin und Erufosin nach 18-stündiger Hydrolyse bei einer Inkubationstemperatur von -20°C bzw. 45°C und einem Puffersystem mit pH 1,1 bzw. 12,9. Anzahl der Messwerte n=3.	46
Abb. 3.13: Prozentualer Lysolipidanteil während des DOX-Einschlusses in mit Citrat (pH 4,0) hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG2-Liposomen (50:20:30) nach 60 bzw. 120 Minuten in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers unter Angabe der prozentualen Einschlussmenge bei einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.	48
Abb. 3.14: Prozentualer Lysolipidanteil während des DOX-Einschlusses in mit Ammoniumsulfat (pH 5,4) hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG2-Liposomen (50:20:30) nach 60 bzw. 120 Minuten in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers unter Angabe der prozentualen Einschlussmenge bei einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.	49
Abb. 3.15: Prozentualer Lysolipidanteil während des DOX-Einschlusses in mit Citrat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG3-Liposomen (50:20:30) nach 60 bzw. 120 Minuten in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers unter Angabe	

der Einschlussmenge bei einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.....	50
Abb. 3.16: DPPG2/(DPPC+DSPC)-Verhältnis während des DOX Einschusses in mit Citrat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG2-Liposomen (50:20:30) in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte nach 60 bzw. 120 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.	51
Abb. 3.17: DPPG2/(DPPC+DSPC)-Verhältnis während des DOX Einschusses in mit Ammoniumsulfat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG2-Liposomen (50:20:30) in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers nach 60 bzw. 120 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3....	52
Abb. 3.18: DPPG3/(DPPC+DSPC)-Verhältnis während des DOX Einschusses in mit Citrat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG3-Liposomen (50:20:30) in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers nach 60 bzw. 120 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.	52
Abb. 4.1: Darstellung des natürlichen Logarithmus der entstandenen P-Lyso-PC-Konzentration bei der bei pH 4,0 für 18 Stunden stattfindenden Inkubation der Formulierung DPPC/DPPG2 50:50 (mol/mol) in Abhängigkeit des Kehrwertes der absoluten Temperatur.....	58
Abb. 4.2: Glycero-PC/-PGx (x=1,2,) in Prozent der Anfangskonzentration der Lysolipide P-Lyso-PC/-PGx (x=1,2) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.....	61
Abb. 4.3: Zusammenfassung der Quotienten der Ausgangslipide DPPGx (x=1,2,3)/DPPC unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei einem pH-Wert von 12,9 und einer Temperatur von 45°C.	63

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Lipide.....	14
Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel.....	15
Tab. 2.3: Auflistung der verwendeten Lösungen, Puffer und Reagenzien. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit Natronlauge bzw. Salzsäure (0,1/1N).....	16
Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten Geräte.....	18
Tab. 2.5: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials.....	18
Tab. 2.6: Auflistung der verwendeten Software.....	19
Tab. 3.1: Biophysikalische Parameter der verwendeten Liposomenformulierungen und Mizellen.....	26
Tab. 3.2: Lipidauflistung mit entsprechenden Retentionsfaktoren bei einem Lösungsmittelgemisch der Zusammensetzung 100ml Chloroform, 60ml Methanol, 10ml Ethansäure (Eisessig) und 5ml bidestilliertem Wasser. Der Standardfehler liegt unter 5 Prozent.....	30
Tab. 4.1: Zusammenfassung der prozentualen Anteile des detektierten P-Lyso-PC und des entstandenen Glycero-PC aus der Reaktionsfolge DPPC → P-Lyso-PC → Glycero-PC unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.....	59
Tab. 4.2: Zusammenfassung der prozentualen Anteile des detektierten P-Lyso-PG1 und des entstandenen Glycero-PG1 aus der Reaktionsfolge DPPG1 → P-Lyso-PG1 → Glycero-PG1 unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.....	60
Tab. 4.3: Zusammenfassung der prozentualen Anteile des detektierten P-Lyso-PG2 und des entstandenen Glycero-PG2 aus der Reaktionsfolge DPPG2 → P-Lyso-PG2 → Glycero-PG2 unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.....	61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Chol	Cholesterin
DC	Dünnschichtchromatographie
DOX	Doxorubicin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG ₁	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin
DPPG ₂	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerin
DPPG ₃	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphotriglycerin
Er	Erucyl
GC	Gaschromatographie
He	Hexadecyl
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
PDI	Polydispersionsindex
PEG	Polyethylenglycol
P-Lyso-PC	1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
P-Lyso-PG ₁	1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin
P-Lyso-PG ₂	1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerin
P-Lyso-PG ₃	1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphotriglycerin
sn	Stereospezifische Numerierung
TSL	Thermosensitive Liposomen
T _M	Phasenumwandlungstemperatur
ζ-Potential	Zetapotential

1 EINLEITUNG

1.1 Liposomen als Transportvehikel

Liposomen stellen ein Nano-Transportsystem dar, welches in den 1960er Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde und seit Beginn der 1990er auch zu therapeutischen Zwecken auf dem Markt verfügbar ist (Cattel, Ceruti, & Dosio, 2003). Obschon es neue Entwicklungen in diesem Bereich gibt, liegt das größte Interesse vor allem in zwei Feldern: Gentransfer und Krebstherapie (Torchilin, 2005). Gründe dafür sind die Effizienz, Biokompatibilität, fehlende Immunogenität und verbesserte Löslichkeit chemotherapeutischer Agenzien sowie die Möglichkeiten, ein großes Spektrum an Substanzen einzuschließen (Deshpande, Biswas, & Torchilin, 2013). Wasserunlösliche Stoffe werden dabei innerhalb der hydrophoben Lipiddoppelschicht und hydrophile im wässrigen inneren Kompartiment transportiert (Torchilin, 2005).

1.2 Steuerung und Freisetzung

Eine Besonderheit liposomaler Transportsysteme liegt darin, die eingeschlossenen Stoffe zum richtigen Zeitpunkt zielgenau an ihren vorgesehenen Wirkort freizugeben. Dies wird mit sogenannten thermosensitiven Liposomen (TSL) erreicht, wobei deren Eigenschaft genutzt wird, dass der Wirkstoff im Temperaturbereich der Phasenumwandlungstemperatur (T_M) der verwendeten Lipide entweichen kann (Kneidl, Peller, Winter, Lindner, & Hossann, 2014), (Ponce, Vujaskovic, Yuan, Needham, & Dewhirst, 2006). Die Zusammensetzung der Lipide spielt sowohl für die Phasenumwandlungstemperatur als auch für die Ausbildung der Lipiddoppelschicht, wie sie in Biomembranen und Liposomen vorkommt, eine entscheidende Rolle. Dabei werden drei lamelläre Zustände der Lipiddoppelschichten betrachtet. Sie unterscheiden sich unter anderem in Bezug auf Ordnung und seitlicher Diffusion und hängen von der Struktur der Lipidmoleküle ab: Die solide Gelphase (L_β) mit hohem Ordnungsgrad und geringer seitlicher Diffusion wird bei Lipiden sowohl mit gesättigten als auch ungesättigten Kohlenstoffketten gefunden; die flüssig-kristalline (L_α), auch flüssig-ungeordnete Phase genannt, weist eine geringe Ordnung bei

schneller Diffusion auf und bildet sich bei umso tieferen Temperaturen aus, je höher der Anteil an ungesättigten Fettsäuren der Lipide ist (van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008). Grund hierfür ist, dass der Übergang von L_{β} zu L_{α} im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur erfolgt, die umso niedriger ist, je weniger hydrophobe Van-der-Waals-Kräfte wirken, d. h. T_M sinkt mit zunehmender Existenz von Doppelbindungen (ungesättigten Fettsäuren) und kurzer Kettenlänge der Fettsäuren (Schagon, 1997). Durch Kombination mit Cholesterin entsteht die flüssig-geordnete Phase (L_o), welche mit hoher Ordnung und schneller Diffusion auch als Lipid Raft bezeichnet wird (van Meer et al., 2008). Durch geeignetes Mischen verschiedener Lipide, wie beispielsweise das Glycerophospholipid Phosphatidylcholin und Cholesterin, entsteht eine Membran, die gleichzeitig Bereiche in der flüssig-geordneten und flüssig-ungeordneten Phase aufweisen kann (van Meer et al., 2008), wodurch die Permeabilität für wasserlösliche Stoffe steigt (Papahadjopoulos, Jacobson, Nir, & Isac, 1973). Mittels regionaler Hyperthermie wird die notwendige Phasenumwandlungstemperatur im Zielgewebe erreicht (Lindner & Hossann, 2010), (Wang et al., 2008) und der eingeschlossene Stoff freigegeben. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund des Temperatureffekts ein Wechsel von der soliden Gelphase hin zur flüssig-kristallinen Phase stattfindet, wodurch es zur Koexistenz beider Phasen mit erhöhter Membranpermeabilität kommt, welche in einer höheren Stofffreigabe resultiert (Lindner & Hossann, 2010).

Der Effekt, der durch Kombination aus regionaler Hyperthermie und Chemotherapie erreicht werden kann, wird in einer randomisierten Phase-III-Studie zur Behandlung von Weichteilsarkomen als signifikant im Vergleich zur alleinigen Zytostatikagabe beschrieben (Issels et al., 2010). Dabei wird ausgenutzt, dass Hitze durch unmittelbare thermale Toxizität Tumorzellen abtötet, die Wirksamkeit verschiedener Zytostatika durch eine verbesserte Reaktivität mit den Zielstrukturen erhöht und zudem eine Immunantwort induzieren kann (Issels, 2008).

Über Oberflächenveränderungen am Liposom wird versucht, dessen biologische Eigenschaften derart zu modifizieren, dass auf verschiedene wichtige therapeutische und diagnostische Funktionen, wie verlängerte Halbwertszeit der Liposomen im Blutkreislauf, verbesserte Stabilität oder Freigabe des eingeschlossenen Stoffes Einfluss genommen werden kann (Torchilin, 2006).

Neben PEGylierten (Polyethylenglycol) Lipiden, die als Bestandteil der

Liposomenmembran die Dauer der Zirkulation im Blutsystem erhöhen (Allen, Hansen, Martin, Redemann, & Yau-Young, 1991) und die Aufnahme der Liposomen durch das retikuloendotheliale System vermindern (Charrois & Allen, 2004), verbessert DPPG₂ (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin) als Liposomenbestandteil zusätzlich die Abgabe der eingeschlossenen Substanz, ohne dass dabei Stabilitätsdefizite der TSL bei 37°C auftreten (Hossann et al., 2007).

Bezüglich der Stofffreigabe und anschließenden zellulären Aufnahme wird die extrazelluläre von der intrazellulären unterschieden:

Bei der extrazellulären Freisetzung erfolgt die Wirkstofffreigabe in die Blutstrombahn. Dabei können krankheitsspezifische Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise Enzymaktivität (Kaasgaard et al., 2009) oder von außen zugeführte Trigger, wie regionale Hyperthermie (Lindner et al., 2004) die Stofffreisetzung beeinflussen. Anschließend gelangt der freie Wirkstoff mittels Diffusion aus dem Blutgefäß in die Tumorzelle.

Bei der intrazellulären Freigabe kommt es nach Verlassen der Blutstrombahn über Endothelporen zu einer Bindung der Liposomen an die Oberfläche der Zielzellen. Dies kann sowohl unspezifisch als auch spezifisch, z. B. über eingebaute krebsbezogene monoklonale Antikörper (ElBayoumi & Torchilin, 2009) erfolgen, die entweder kovalent über die Kopfgruppe eines Lipids oder ein Polymer an das Liposom gebunden sind (Lindner & Hossann, 2010) und die Akkumulation der Liposomen im Krebsgewebe verbessern (Sofou & Sgouros, 2008), (Kaasgaard & Andresen, 2010). Der Transfer des im Liposom befindlichen Wirkstoffes in die Zelle hängt von seiner Wasserlöslichkeit ab: Hydrophobe Substanzen können direkt zwischen den Membranen der Liposomen und Zielzellen oder mittels eines Transportproteins (Guyard-Dangremont, Desrumaux, Gambert, Lallemand, & Lagrost, 1998) hineingelangen. Bei hydrophilen Stoffen hingegen kann dies beispielsweise über Endozytose erfolgen (Hillaireau & Couvreur, 2009), (Lindner & Hossann, 2010). Dabei nimmt die Zelle die Liposomen von außen über Vesikel auf, welche sich von der Zellmembran nach innen abschnüren. Diese sogenannten Endosomen fusionieren in der Zelle mit primären Lysosomen zum reifen sekundären Lysosom, das – mit sauren Hydrolasen ausgestattet – den Abbau aller Stoffgruppen ermöglicht (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2008). Diese Form des Liposomenabbaus kann umgangen werden, indem das Liposom frühzeitig aus dem Endosom entkommt (Varkouhi,

Schulte, Storm, & Haisma, 2011). Viren erreichen dies beispielsweise über Lyse oder Porenbildung (Meier & Greber, 2003), (Hogle, 2002), während die Destabilisierung der Endosomenmembran über Fusion mit verschiedenen Peptiden (Tu & Kim, 2008) eine andere Möglichkeit darstellt, um den Inhalt der Endosomen in die Zelle freizugeben (Varkouhi et al., 2011).

1.2.1 Phospholipide als wichtiger Liposomenbestandteil

Wie beschrieben gibt es viele Möglichkeiten, die Liposomenmembran so zu verändern, dass die Stofffreisetzung beeinflusst wird bzw. sich die Stabilität des Liposoms verändert. Dabei sind Phospholipide als Hauptbestandteil der Liposomenmembran zu verstehen und werden deshalb im Folgenden biologisch und chemisch genauer klassifiziert wird.

Phospholipide, zu denen die Glycerophospholipide und Sphingophospholipide gehören (Rassow et al., 2008), bilden eine der vier Stoffklassen, die zusammengefasst das Spektrum der Lipide ergeben. Die anderen sind nicht hydrolysierbare Lipide, Glykolipide und Ester (Latscha, Kazmaier, & Klein, 2008). Allen Lipiden ist die Wasserunlöslichkeit und gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Chloroform und Methanol gemein. Dabei sind die langkettigen, aliphatischen Reste die Ursache dieser Hydrophobie bzw. Lipophilie (Breitmeier & Jung, 2009).

Grundbaustein der Sphingophospholipide ist das sog. Ceramid, welches der Kombination aus Sphingosin und langkettiger Fettsäure entspricht (Rassow et al., 2008). Bei den Glycerophospholipiden formt Glycerin als dreiwertiger Alkohol das Grundgerüst.

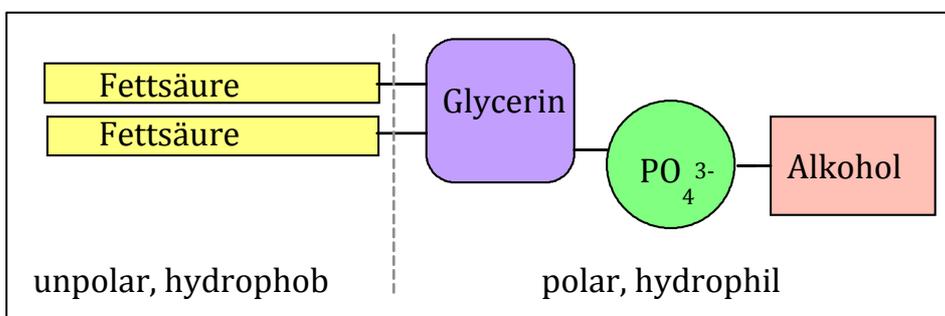


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau von Glycerophospholipiden.

Dabei findet an der OH-Gruppe des C-Atom 3 über ein Phosphorsäuremolekül (grün in Abb. 1.1) eine Verknüpfung mit einem Alkohol, wie beispielsweise Cholin, Inositol oder wiederum Glycerin statt. An den OH-Gruppen der C-Atome 1 und 2 wird je eine langkettige Fettsäure mittels einer Esterbindung angehängt (Rassow et al., 2008). Die Zahlen 1 bis 3 beziehen sich auf die C-Atome des Glycerinmoleküls und ergeben sich in diesem Zusammenhang aus der stereospezifischen Numerierung (sn): Diese bezeichnet das chirale C-Atom als C-Atom 2 und das in der Fischer-Projektion darüber liegende als C-Atom 1, sofern sich links des C-Atom 2 die Hydroxylgruppe befindet.

Biologisch gesehen liegt die größte Bedeutung der Phospholipide darin, dass sie als Hauptbestandteil maßgeblich zum Aufbau der Zellmembran, Lipiddoppelschicht, beitragen (Buddrus, 2011). Jede Art von Zellmembran hat dabei eine eigene charakteristische Zusammensetzung an Lipiden, welche wiederum Einfluss auf deren Fluidität hat (Karp, 2005). Durch Variation der Kopfgruppe und aliphatischen Kette entstehen im endoplasmatischen Retikulum als hauptsächlichem Organell der Lipidbiosynthese (Bell, Ballas, & Coleman, 1981) in jeder eukaryotischen Zelle über 1000 verschiedene Lipidarten (Sud et al., 2007).

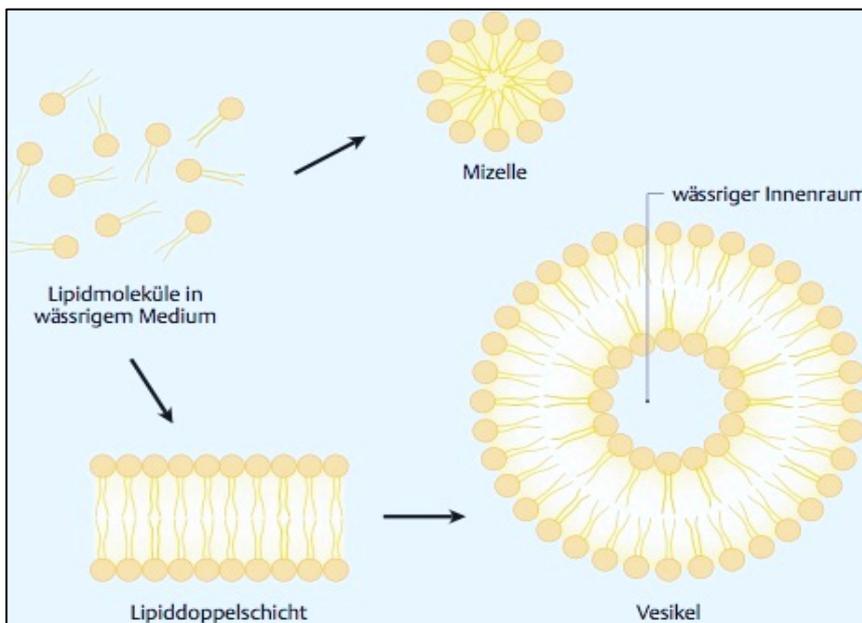


Abb. 1.2: Spontane Zusammenlagerung von Lipidmolekülen in wässrigem Medium.

(aus Rassow, 2008)

Als amphiphile Moleküle organisieren sich Lipide in wässrigem Medium spontan zu charakteristischen Strukturen, indem der hydrophile Kopf dem Wasser und der hydrophobe Schwanz dem Inneren der Struktur zugewandt wird. Resultat sind dabei je nach Oberflächenbeanspruchung des polaren bzw. unpolaren Molekülteils Mizellen oder lamellare Strukturen (z.B. Lipiddoppelschichten), die spontan in Vesikel zerfallen können und dabei einen wässrigen Innenraum nach außen durch die Lipiddoppelschicht begrenzen (Rassow et al., 2008). Geschieht die Vesikelbildung auf künstlichem Wege werden sie als Liposomen bezeichnet (Schagon, 1997).

1.3 Chemische Reaktionen

Da Liposomen als Transportvehikel fungieren, ist ihre Integrität besonders wichtig. Kommt es innerhalb der Liposomenmembran zu einer Anhäufung an Hydrolyseprodukten, wie bspw. von Lysolipiden durch Abspaltung einer Fettsäure, kann dies zu einem Zusammenschluss von Liposomen führen oder die Membranstruktur derartig verändern, dass der Inhalt vorzeitig austreten kann (Ickenstein, Sandstrom, Mayer, & Edwards, 2006). Grit und Crommelin beschreiben eine erhöhte Permeabilität ab 15% stattgefundener Hydrolyse (Grit & Crommelin, 1992), weshalb ein Verständnis in Bezug auf diese chemischen Reaktionen der Phospholipide entscheidend ist.

1.3.1 Esterbildung

Die funktionelle Gruppe des Esters ist essentiell für den Aufbau eines Phospholipids, wodurch sich die Relevanz für das nähere Betrachten des dahinterstehenden Mechanismus ergibt.

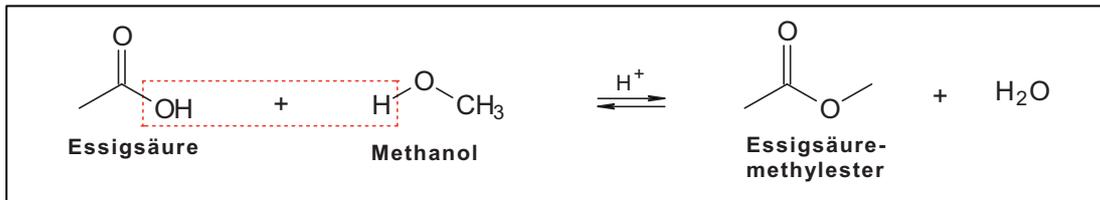


Abb. 1.3: Veresterung einer Carbonsäure mit Alkohol unter Wasserbildung.

(aus Buddrus, 2011)

Die Esterbildung erfolgt unter Wasserentstehung durch das Erhitzen einer Carbonsäure, wie Essigsäure, mit einem Alkohol, beispielsweise Methanol. Dabei erfolgt die Einstellung des dynamischen Gleichgewichts dieser Reaktion sehr langsam, was durch Zugabe geringer Mengen einer starken Säure wie Salzsäure oder Schwefelsäure beschleunigt werden kann (Buddrus, 2011). Zunächst wird die Carbonsäure protoniert, wodurch ein nukleophiler Angriff des Alkoholmoleküls erfolgen kann. Über Ausbildung einer tetraedrischen Zwischenstufe bildet sich dann mittels Wasserabspaltung der Ester (Buddrus, 2011). Die Ausbeute kann durch einen Überschuss der Ausgangskomponenten (Latscha et al., 2008) oder mittels Abdestillieren des Reaktionswassers (Breitmeier & Jung, 2009) erhöht werden.

1.3.2 Esterhydrolyse

Kehrt man die aufgezeigte Reaktion um, spricht man von säurekatalysierter Esterhydrolyse, welche von der alkalischen abgegrenzt werden muss. Beide Formen werden auch als Verseifung bezeichnet, da bei der alkalischen Hydrolyse eines Fettes Alkalicarboxylate langkettiger Carbonsäuren entstehen, welche seifenähnliche Merkmale besitzen (Buddrus, 2011).

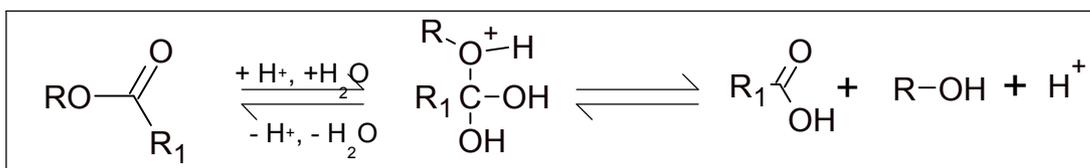


Abb. 1.4: Mechanismus der sauren Hydrolyse.

(aus Becker, 1993)

Nach Protonierung der Carbonylgruppe entsteht bei der sauren Hydrolyse – wie in

Abb. 1.4 dargestellt – durch die Reaktion mit einem Wassermolekül eine tetraedrische Zwischenstufe, welche unter Abgang des Alkohols zur Carbonsäure wird (Buddrus, 2011). Diese Reaktion ist als Rückreaktion der Esterbildung zu verstehen.

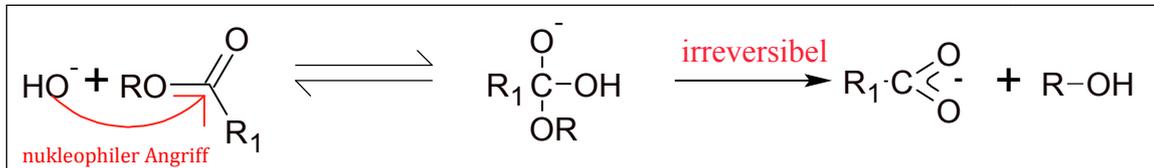


Abb. 1.5: Mechanismus der basischen Hydrolyse.

(aus Becker, 1993)

Die basenkatalysierte Verseifung verläuft als S_N2 -Substitution infolge des nukleophilen Angriffs des OH^- -Ion am Carbonyl-C (Breitmeier & Jung, 2009), wodurch es nachfolgend zur Elimination des Alkoholat-Ions ($R-O^-$) kommt und schließlich durch Protonenübertragung ein Carboxylat-Ion und neutraler Alkohol entstehen. S_N2 -Substitution bedeutet, dass es sich um eine nukleophile Substitution mit bimolekularem – beide Reaktionspartner sind beteiligt – Mechanismus handelt und Bindungsbildung und Lösen der Bindung gleichzeitig erfolgen. Dabei ist der Angriff des Nukleophils der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Latscha et al., 2008).

Beim Vergleich der beiden Hydrolysemechanismen fällt auf, dass die saure Hydrolyse ein reversibler Vorgang ist und dabei eine Carbonsäure entsteht, während die basische ein Carboxylat liefert und zudem irreversibel verläuft (Buddrus, 2011). Des Weiteren ist die Hydrolysegeschwindigkeit im Basischen schneller, was auf die hohe Nukleophilie des Hydroxidions zurückzuführen ist, da die Geschwindigkeit einer S_N2 -Reaktion mit dieser ansteigt (Latscha et al., 2008). Auch der kleinere Raumbedarf des OH^- im Vergleich zu Wasser trägt zur erleichterten Addition an das Estermolekül bei (Becker, 1993).

1.3.3 Hydrolyse eines Glycerophospholipids

Angewandt auf die in dieser Arbeit vorrangig benutzten Phospholipide stellt sich der erste Schritt der Hydrolyse wie folgt dar:

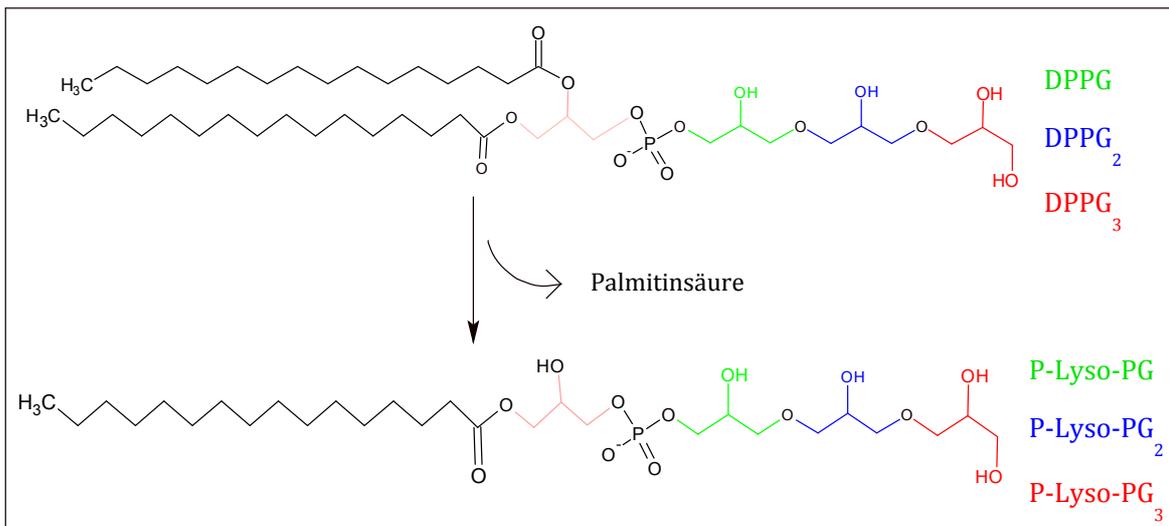


Abb. 1.6: Hydrolyse der Phospholipide DPPG₁, DPPG₂ und DPPG₃ durch Abspaltung der Fettsäure Palmitinsäure unter Bildung der Lysolipide P-Lyso-PG₁, P-Lyso-PG₂ und P-Lyso-PG₃.

Die schematische Darstellung zeigt ausgehend von Phospholipiden die Lysolipidbildung durch Abspaltung einer Fettsäure am C2-Atom des GlycerinGrundgerüsts. Die Hydrolyse – beschrieben am 1,2-Diacyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholin – kann sowohl am C1- als auch C2-Atom stattfinden, wobei 2-Acyl-Lysophospholipide mittels Fettsäuremigration schnell zu 1-Acyl-Lysophospholipiden umgewandelt werden (Grit & Crommelin, 1993).

Durch Variation der hydrophilen Kopfgruppe in Bezug auf die Anzahl der über Etherbindungen verknüpften Glycerinmoleküle erhält man die Phospholipide 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerin (DPPG₁), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG₂) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotriglycerin (DPPG₃), aus denen durch Abspaltung der Palmitinsäure die entsprechenden Lysolipide 1-Palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerin (P-Lyso-PG₁), 1-Palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin (P-Lyso-PG₂) und 1-Palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotriglycerin (P-Lyso-PG₃) entstehen.

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Hydrolyseverhalten der synthetisierten Phospholipide DPPG_x (x=1,2,3) im Vergleich zum Phosphatidylcholin DPPC, welche zunehmend Verwendung im Aufbau der Liposomenmembran finden. Der Grund dafür ist unter anderem die gezielte Beeinflussung sowohl von Pharmakokinetik als auch Biodistribution, was zu einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt (Schagon, 1997). Grit beschrieb bereits 1992, dass Lysolipide und freie Fettsäuren bis zu einem Anteil von 10% als Produkte stattgefunder Hydrolyse in der Membran zusammen einen stabilisierenden Effekt auf die Lipiddoppelschicht haben. Bei Liposomen, die beabsichtigt mit einem gewissen Lysolipidanteil hergestellt werden, steigt hingegen die Durchlässigkeit unmittelbar mit der Lysolipidkonzentration (Grit & Crommelin, 1992). Auch die Tatsache, dass der Einbau von Lysophosphatidylcholin in TSL neben einer Beschleunigung der Stoffabgabe zudem die Phasenumwandlungstemperatur im Sinne einer Reduzierung verändert (Needham, Anyarambhatla, Kong, & Dewhirst, 2000), verdeutlicht die Notwendigkeit, die Bedingungen, unter denen Phospholipid-Hydrolyse stattfindet, zu kennen.

Speziell bei den neuen Phospholipiden DPPG₂ und DPPG₃ bestehen besondere Eigenschaften beim Einsatz in TSL. So führt ein Anteil von mehr als 10 % zu einer linearen Pharmakokinetik mit deutlich verlängerter Zirkulationszeit im Blut. Zum anderen führen DPPG₂ bzw. DPPG₃ in cholesterinfreien Liposomen zu einer sehr raschen Wirkstofffreisetzung bei Erreichen von T_M

Da der Anteil von Lysolipiden in einer Liposomenmembran maßgeblichen Einfluss auf die Membranpermeabilität hat, ist das Ziel dieser Arbeit zum einen die DPPG_x (x=1,2,3)-Lipide und ihre Hydrolyseprodukte mittels Dünnschichtchromatographie durch das Erproben eines passenden Laufmittels selektiv zu detektieren. Zum anderen werden verschiedene Einflüsse, wie pH-Wert, Inkubationstemperatur und -zeit, sowie der Cholesterinanteil in der Liposomenmembran auf die Bildung von Hydrolyseprodukten der Phosphatidyloligoglycerin-basierenden, thermosensitiven Liposomen untersucht und dabei mit DPPC verglichen.

Zuletzt wird als klinisches Anwendungsbeispiel die Methode des Doxorubicin-Einschlusses in Bezug auf die möglicherweise stattfindende Lysolipidbildung beurteilt, da das DPPG₂ als neues Phospholipid möglicherweise eine besondere

Hydrolyseempfindlichkeit in DOX- TSL bei niedrigem pH-Wert zeigt.

Mittel der Wahl zur Trennung eines Lipidgemisches ist die Gaschromatographie (GC). Dabei wird eine Probe mit einem Trägergas wie Stickstoff oder Helium von einer geheizten Injektoreinheit durch eine erwärmte Chromatographiesäule gespült und die dadurch getrennten Verbindungen des austretenden Gases über einen Detektor registriert (Fox & Whitesell, 1995). Die Auswerteinheit zeigt die getrennten Substanzen als Peaks an, wobei die Retentionszeit als Zeit von der Einspritzung bis zum Substanzmaximum zu Hilfe genommen wird (Falbe & Regitz, 1990). Als anderes chromatographisches Trennverfahren bietet sich gerade für nicht flüchtige Substanzen die Hochflüssigkeitschromatographie an.

Eine Möglichkeit zur Detektion der Lipide stellt die matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) dar, die bisher vor allem in der Analytik von Proteinen eingesetzt wird (Schiller & Arnold, 2000), aber zunehmend Bedeutung bei Lipiden findet, da sie als schnelle und empfindliche Methode gilt und dabei einen relativ hohen Grad an Probenverunreinigung toleriert (Fuchs, Suss, & Schiller, 2010). Dabei wird der zu untersuchenden Probe eine Matrix zugesetzt und anschließend mittels Laser bestrahlt. Durch die Absorption der Energie des Lasers durch die Matrix kommt es zur Verdampfung, bei der die Analytmoleküle mitgerissen werden. Die Ionenbildung erfolgt durch Stöße zwischen der Matrix und der zu untersuchenden Substanz. Durch Beschleunigung im elektrischen Feld und anschließender Überführung in einen feldfreien Raum erfolgt eine Trennung, wobei leichte Ionen den Detektor schneller erreichen als schwerere (Schiller et al., 2004). Damit können neben Phospholipiden auch Lysolipide und freie Fettsäuren detektiert werden, wenngleich die Methode für letztere noch nicht vollkommen ausgereift ist (Schiller et al., 2004).

Die Kombination aus GC und MS erscheint somit als gute Möglichkeit eine genaue Auftrennung einer Lipidprobe mit anschließender Identifizierung zu erreichen (Carrasco-Pancorbo, Navas-Iglesias, & Cuadros-Rodríguez, 2009)

Dennoch erfolgte die Detektion der Lipide in der vorliegenden Arbeit mittels Dünnschichtchromatographie, da damit eine einfache und kosteneffektive Bestimmung des Lysolipidgehalts möglich war. Zudem ist diese Methode von großer

Bedeutung, weil sie eine entscheidende Rolle bei der Qualitätskontrolle und Entwicklung neuer Formulierungen spielt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien und Geräte zur Herstellung und Charakterisierung von Liposomen

2.1.1.1 Lipide

Lipid	Abkürzung	Molare Masse [g/mol]	Bezugsquelle
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DPPC	734,06	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
1,2- Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DSPC	790,17	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylen-glycol)-2000]	DSPE-PEG ₂₀₀₀	2805,54	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin	DPPG ₁	744,97	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerin	DPPG ₂	819,04	CordenPharma, Liestal, Schweiz
1,2- Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphotriglycerin	DPPG ₃	893,12	CordenPharma, Liestal, Schweiz
Cholesterin	Chol	386,66	Bereitstellung von Prof. Eibl, Göttingen
1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	P-Lyso-PC	495,64	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal

1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin	P-Lyso-PG ₁	506,54	Genzyme Pharmaceuticals, Schweiz-Liestal
1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerin	P-Lyso-PG ₂	580,62	siehe Kapitel 2.4 des Abschnitts Material und Methoden
Erucyl-phosphohomocholin (Erufosin)	ErPC	489,72	Synthese und Bereitstellung von Prof. Eibl, Göttingen
Hexadecyl-phosphocholin (Miltefosin)	HePC	407,6	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Lipide.

2.1.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmittel	Bezugsquelle	Gebrauch
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC, Lipidfilmlösung
Methanol	Roth, Buchenau, Deutschland	DC, Lipidfilmlösung
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC
Ethansäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC
Bidestilliertes Wasser aus Reinstwasseranlage	Firma Millipore, Darmstadt, Deutschland	DC, Phosphatbestimmung
α -Glycerophosphocholin	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	DC
Molybdäntrioxid MoO ₃	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	Färbemittel Molybdänspray DC
Molybdän-Pulver	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	Färbemittel Molybdänspray DC
Schwefelsäure H ₂ SO ₄ , 96%	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung, DC
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Triton X-100	Roth, Buchenau, Deutschland	Phosphatbestimmung

Perchlorsäure HClO ₄ 70%	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Phosphat-Standard, 1000mg/l Phosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Phosphor ICP Standard, 1000mg/l Phosphor	Merck, Darmstadt, Deutschland	Phosphatbestimmung
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	Doxorubicineinschluss
Diethylether	Roth, Buchenau, Deutschland	P-Lyso-PG2-Herstellung
Phospholipase A ₂	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	P-Lyso-PG2-Herstellung
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung, Liposomenherstellung und -charakterisierung
Salzsäure 0,1N bzw. 1 N	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisation
Natronlauge 0,1N	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisation
Glycin-Puffersubstanz	Merck, Darmstadt, Deutschland	Pufferherstellung,
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Pufferherstellung,
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland	Pufferherstellung
HEPES	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	Pufferherstellung
Calciumchlorid, CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	Pufferherstellung
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	Pufferherstellung
L-Histidin	Roth, Buchenau, Deutschland	Pufferherstellung
Sephadex® G-50	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland	Umpufferung der Liposomenlösung
Doxorubicin	Krankenhausapotheke, Klinikum Großhadern, Deutschland	Einschluss in Liposomen

Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel.

2.1.1.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Puffer, Lösungen und Reagenzien	Zusammensetzung	Gebrauch
Natriumchloridlösung 0,9 %	Natriumchlorid 4,5 g, bidestilliertes Wasser ad 500 ml	Phosphatbestimmung, Doxorubicineinschluss
Lösung I	H ₂ SO ₄ 35,3 g, bidestilliertes Wasser ad 100 ml	Phosphatbestimmung
Lösung II	Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat 3g, 10 % Triton X-100 120 µl, bidestilliertes Wasser ad 100 ml	Phosphatbestimmung
Puffer pH 1,13	Glycin 0,1M + NaCl 0,1M: 11,1ml, HCl 0,1M: 88,9 ml	Hydrolyseexperimente
Puffer pH 12,9	Glycin 0,1M + NaCl 0,1M: 21,4ml, NaOH 0,1M: 78,6ml	Hydrolyseexperimente
Histidin-Puffer pH 6,6	L-Histidin 6,21g (20 mM), NaCl 8,77 g (150 mM), bidestilliertes Wasser ad 1,0l	Hydrolyseexperimente
HN-Puffer 7,4/7,8	Hepes 4,8g (20mM), 8,8g NaCl (150mM), bidestilliertes Wasser ad 1,0 l	Hydrolyseexperimente, Doxorubicineinschluss
CaCl ₂ /Tris-Puffer pH 8,5	Trizma base® 6,06g (500mM) und CaCl ₂ 0,15g (10mM), bidestilliertes Wasser ad 100ml	Hydrolyseexperimente
Citrat-Puffer pH 4,0	Citronensäure 2,1g (0,1M), di-Natriumhydrogenphosphat 3,6g (0,2M), bidestilliertes Wasser ad 100ml	Doxorubicineinschluss, Hydrolyseexperimente
Ammoniumsulfat-Puffer pH 5,4	Ammoniumsulfat 7,9g (240mM) bidestilliertes Wasser ad 250ml	Doxorubicineinschluss
Sephadex Säulenmaterial	Sephadex® G-50 10g, 0,9 % NaCl-Lösung ad 150ml	Doxorubicineinschluss
Laufmittel	Chloroform 100ml, Methanol 60ml, Ethansäure 10ml, Aqua bidest 5ml	DC
Lösung I Molybdänspray	Molybdäntrioxid 40,11g ad 1,0l 25N H ₂ SO ₄	DC
Lösung II Molybdänspray	Molybdänpulver 1,78g in 500ml Lösung I	DC
Molybdänspray	150ml Lösung I, 150ml Lösung II, 600ml bidestilliertes Wasser	DC

Tab. 2.3: Auflistung der verwendeten Lösungen, Puffer und Reagenzien. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit Natronlauge bzw. Salzsäure (0,1/1N).

2.1.1.4 Geräte

Gerätebezeichnung	Bezugsquelle	Gebrauch
Feinwaage, Precisa 205A SCS	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz	Lipidfilmherstellung
Rotationsverdampfer Laborota 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Digitaler Vakuumregler Vac Control Automatic RS	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland	Lipidfilmherstellung
Vakuum-Exsikkator	Nalgene, New York, USA	Lipidfilmherstellung
Extruder Lipex	Northern Lipids Inc., Burnaby, Kanada	Extrusion
Wärmebad, Pharmacia LKB-Multitemp II	Pharmacia, Freiburg, Deutschland	Extrusion
Stickstoffflasche	Linde	Extrusion, (für DC wird Stickstoffleitung des Klinikum Großhadern verwendet)
Heizblock Typ 53 LS 6301	Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, Bielefeld, Deutschland	Phosphatbestimmung
Spectrophotometer Beckmann DU® 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Phosphatbestimmung
Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer	Varian, Palo Alto, USA	Doxorubin-Einschluss
Zentrifuge 5415D und 5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Doxorubin-Einschluss
Zentrifuge ZK 380	Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland	DC
Pierce Reacti-Therm™ Heizblock	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	DC
Pierce Reacti-Vap™ Bedampfungseinheit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	DC
Scanner: Hp Scanjet 3800	hp, Palo Alto, USA	DC
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	DC, Doxorubicin-Einschluss, Phosphatbestimmung
pH Meter inolab pH 720	WTW, Weilheim, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisation
pH-Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim, Deutschland	Pufferherstellung, Neutralisation

Zetasizer Nano series	Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien	Messung von Größe und Zetapotential der Liposomen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY	Lipidfilmherstellung, Phosphatbestimmung, Extrusion, DOX- Einschluss
Magnetrührer mit Heizplatte, Modell VMS-A	VMR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Pufferherstellung
Waage, Precisa BJ6100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz	Pufferherstellung, Neutralisation, DC

Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten Geräte.

2.1.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle	Gebrauch
DC-Kieselgel 60 (10x20cm-Platten)	Merck, Darmstadt, Deutschland	DC
Pasteurpipetten aus Glas (230mm)	Brand, Wertheim, Deutschland	DC, Extrusion
Nitril-Schutzhandschuhe	Berner, Elmshorn, Deutschland	Doxorubicineinschluss
pH-Indikatorstäbchen	Merck, Darmstadt, Deutschland	Hydrolyseexperimente
Polycarbonatfilter (100nm, 200nm)	Whatman, Dassel, Deutschland	Extrusion
Glaswolle	Assistent, Sondheim, Deutschland	Doxorubicineinschluss
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Bei allen Experimenten
Reaktionsgefäße mit Deckel "Eppis", 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Bei allen Experimenten
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Bei Experimenten mit Volumen größer 1,5ml
Falcon Reaktionsgefäß, 50ml	BD, Erembodegem, Belgien	P-Lyso-PG2- Herstellung

Tab. 2.5: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials.

2.1.1.6 Software

Software	Anwendung
MS Office 2011	Text- und Datenverarbeitung
Pubmed	Literaturrecherche
ImageJ 1.47 Image Processing and Analysis in Java	Densitometrische Analyse der DC-Platten
ChemSketch 12.0 Rel. 2	Zeichnen chemischer Strukturformeln
EndNote X6	Literaturverwaltung
Zetasizer Nano series software	Größen- und ζ -Potentialberechnung der Liposomen

Tab. 2.6: Auflistung der verwendeten Software.

2.2 Methoden

2.2.1 Liposomenherstellung

2.2.1.1 Lipidfilm

Die bei -20°C oder 4°C gelagerten Lipide bleiben vor dem Einwiegen mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur geschlossen, um zu vermeiden, dass durch das Eindringen von Feuchtigkeit fälschlicherweise zu wenig Lipid abgewogen wird. Nach der Einwaage werden die Lipide getrennt in Chloroform oder einem Gemisch aus Chloroform und Methanol 9:1 (v/v) gelöst und die jeweils benötigten Volumina an Lipidlösung mittels Glaspipette in einen Rundkolben transferiert, welcher an den Rotationsverdampfer gehängt wird. Zuerst findet bei einer Rotationsgeschwindigkeit von ungefähr 100 Umdrehungen pro Minute, einer Temperatur von 40°C und einem durch die Vakuumpumpe erzeugten Unterdruck von 375mbar unter stetiger Wasserkühlung die Abdestillation statt. Anschließend wird der Druck auf 150mbar gesenkt, die Temperatur auf 60°C erhöht und die Rotationsgeschwindigkeit maximiert, bis nach etwa 15-20 Minuten ein Lipidfilm sichtbar wird. Nach Entsorgung des sich im Auffangkolben befindlichen Lösungsmittels wird der Lipidfilm für mindestens 1h bei 40mbar und 60°C getrocknet. Im Anschluss muss der homogene Film unter Vakuum im Exsikkator unter Lichtausschluss gelagert werden, sofern keine unmittelbare Weiterverarbeitung stattfindet.

2.2.1.2 Hydratisierung und Extrusion

Je nach Verwendungszweck der Liposomen erfolgt die Hydratisierung mit 0,9% NaCl-Lösung, Citrat- bzw. Ammoniumsulfat- oder HN-Puffer. Durch das Inkubieren innerhalb des auf 60°C temperierten Wasserbades kommt es zur Ausbildung multilamellärer Vesikel, welche als milchig-trübe Dispersion durch die sich unmittelbar anschließende Extrusion zu unilamellären Vesikeln werden. Dies erfolgt in 10 Zyklen durch 100 bzw. 200nm große Polycarbonatfilter, wobei Stickstoff mit 4-40 bar Druck auf den Extruder gegeben wird. Bei der Herstellung von Liposomen für den Einschluss von Doxorubicin kommt zuerst das 200nm große, danach das 100nm große Filter zum Einsatz. Beim gesamten Vorgang gilt es einen Temperaturabfall unter die Phasenumwandlungstemperatur zu vermeiden, um eine Bildung unerwünschter Strukturen zu verhindern, weshalb bei der Extrusion ein Wärmebad mit der Temperatur 60°C verwendet wird.

2.2.1.3 Säulenchromatographische Umpufferung

Dieser Schritt wird nur für solche Liposomen durchgeführt, welche zuvor mit Citrat-Puffer bzw. Ammoniumsulfat-Puffer hydratisiert wurden und für die Beladung mit Doxorubicin vorgesehen sind.

Dazu werden die Liposomen in mit Sephadex befüllte und mit HN-Puffer (pH 7,8) equilibrierte Säulen aus Glas-Pasteurpipetten gegeben. Liegt das Säulenmaterial (Sephadex) nach gewisser Zeit frei, wird mit HN-Puffer aufgefüllt, bis weißliche Flüssigkeit aus den Säulen tropft, welche die vom nicht eingeschlossenen Citrat bzw. Ammoniumsulfat abgetrennten Liposomen enthalten. Aufgefangen und aliquotiert können sie bei -20°C gelagert werden. Resultat sind Liposomen mit einem transmembranen pH-Gradienten, der zur aktiven Beladung der Liposomen mit Doxorubicin verwendet werden kann.

2.2.1.4 Beladung mit Doxorubicin

Nach Bestimmung des Phosphatwertes¹ der Liposomen, um entsprechend die benötigten Volumina von Doxorubicin, Liposomen und HN-Puffer pH 7,8 berechnen

¹ Im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

zu können, werden die thermosensitiven Liposomen bei 38°C gemeinsam mit dem Zytostatikum inkubiert. Um die Qualität des Einschlusses zu beurteilen, wird nach bestimmten Zeitmarken (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min) die Fluoreszenz von 20µl Einschlusslösung zusammen mit 3 ml HN-Puffer, pH 7,4, mit dem Fluoreszenzspektrometer von Varian gemessen und mit dem Ausgangswert bei 0 Minuten verglichen. Die Einstellung des Gerätes ist wie folgt: Anregungswellenlänge 470nm und Emissionswellenlänge 555nm bei einer Spannung von 800 Volt. Regelmäßig ist ein Absinken auf 10-15% der Ausgangsfluoreszenz erkennbar, was einem erfolgreichen Doxorubicin-Einschluss entspricht.

Auf die Beschreibung der Aufkonzentration und Umpufferung, die beim Doxorubicineinschluss folgen würde, wird in dieser Arbeit verzichtet, da sie für den Versuchsaufbau irrelevant ist und daher nicht durchgeführt wurde.

2.2.2 Charakterisierung der hergestellten Liposomen

Die alleinige Beurteilung des Herstellungsprozesses der Liposomen ist nicht ausreichend, um Aussagen über die Qualität der entstandenen Liposomen treffen zu können oder Unterschiede zu bereits früher produzierten Chargen zu erkennen. Daher wird ein kleiner Teil der Liposomen für die nachfolgend beschriebenen Versuche verwendet, um deren Güte zu objektivieren.

2.2.2.1 Bestimmung der Phosphorkonzentration

Die Methode zur Messung des Phosphatgehalts, welche auf einer von Eibl und Lands 1969 publizierten Vorschrift beruht, wird angewandt, um den Phospholipidgehalt zu ermitteln (Eibl & Lands, 1969). Es wird dabei die Tatsache genutzt, dass diese beiden Werte korrelieren, da ein Phospholipidmolekül genau ein Phosphoratom aufweist. Methodisch wird eine Eichgerade über eine Verdünnungsreihe mit einer Standardphosphatlösung erstellt, die als Referenz für die durch Schwefelsäure und Perchlorsäure bei 300°C zu anorganischem Phosphat überführten Phospholipide dient. Durch Zugabe von Ammoniumheptamolybdat entsteht ein Phosphomolybdatkomplex, der proportional zur Trübung der Lösung ist, die sich durch Einsatz von Triton X-100 ausbildet. Über die Quantifizierung der Trübung mittels eines Spektrophotometers bei 660nm kann indirekt über den anorganischen

Phosphatgehalt auf die Phospholipidkonzentration geschlossen werden.

2.2.2.2 Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie

Mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wird die prozentuale Phospholipidzusammensetzung der Liposomenmembran kontrolliert. Dazu wird das physikalisch-chemische Trennverfahren der Extraktion durchgeführt: 1 μ mol Liposomen in 1ml 0,9% NaCl-Lösung werden in drei Schritten mit Lösungsmitteln versetzt, wobei zuerst 2ml Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 bzw. anschließend 3:1 zugegeben werden und zuletzt 1ml Chloroform. Dazwischen findet jeweils eine 10-minütige Zentrifugation bei 4200 Umdrehungen pro Minute statt, wodurch sich zwei Phasen ausbilden. Die untere, organische Phase, in der sich das Lipid befindet, wird in ein neues Reagenzglas mittels Pasteurpipetten gegeben und die obere wiederum mit Lösungsmitteln versetzt. Diese abgetrennten organischen Phasen werden – zusammengeführt – bei 40°C und einem leichten Stickstofffluss eingedampft, wodurch das restliche Lösungsmittel entweicht. Der Rückstand wird folgend mit 100 μ l eines Chloroform-Methanol-Gemisches im Verhältnis 9:1 aufgenommen und auf die eingezeichnete Startlinie der DC-Platte mit jeweils drei dicht nebeneinanderliegenden kleinen Tropfen pro Probe gegeben. Anschließend wird die DC-Kieselgel-60-Platte, die mit einem Glasschneider vorab verkleinert wird, in eine mit Laufmittel equilibrierte abgeschlossene Kammer gestellt, sodass die Entwicklung stattfinden kann. Die Zusammensetzung des Laufmittels richtet sich dabei nach den verwendeten Phospholipiden und wurde durch Variation für die in dieser Arbeit vorwiegend verwendeten DPPG_x (x=1,2,3) neu konzipiert². Nach Markierung des Laufmitteldes (mind. 2/3 der Plattenlänge) wird die Platte herausgenommen, unter dem Abzug getrocknet und mit Molybdänspray angefärbt, indem sie in der Lösung ca. zehn Mal hin- und hergeführt wird. Direkt im Anschluss wird die Platte auf beiden Seiten mit Zellstofftuch abgewischt und für 10-15 Minuten zum Trocknen aufgestellt, ehe sie innerhalb einer Klarsichtfolie eingescannt und am PC densitometrisch analysiert wird. Durch Markieren und Flächenberechnung der Peaks, die jeweils einer blauen Bande oder auch Unreinheiten auf der DC-Platte entsprechen, und dem Vergleich mit den entstandenen Peaks eines mitgelaufenen Standards, können die Phospholipide identifiziert und in ihrem prozentualen Anteil bestimmt werden.

² Im Kapitel 3.2.1 (Ergebnisteil) wird näher auf die Laufmittelzusammensetzung eingegangen.

2.2.2.3 Bestimmung von Größe, Polydispersionsindex und Zetapotential

Der Zetasizer Nano von Malvern Instruments ermöglicht durch das Verfahren der dynamischen Lichtstreuung die Erfassung der Liposomengröße, des Polydispersionsindex (PDI) und des Zetapotentials (ζ -Potential).

Die Größe wird dabei durch Bestrahlung der Probe mit einem Laser ermittelt, wobei die Brown'sche Molekularbewegung der Liposomen in Relation zu deren Größe gesetzt wird, indem die Lichtstreuung, welche ein Interferenzmuster aus hellen und dunklen Punkten auf einem Detektorfenster entstehen lässt, verrechnet wird (Keck & Müller, 2009). Daraus wird mit Hilfe der Zetasizer Nano Series Software die mittlere Größe (Z-Average) und der PDI, ein Maß für die Größenverteilung der Liposomenlösung, bestimmt.

Während für die Ermittlung dieser beiden Werte eine Verdünnung der Liposomen in bidestilliertem Wasser vorgenommen wird, werden die Liposomen für die Bestimmung des Zetapotentials mit 0,9% NaCl verdünnt. Das Zetapotential wird an der Grenzschicht zwischen Liposomen und Umgebung als Potentialdifferenz aufgebaut und ist ein Indikator für die Stabilität von Dispersionen (Bergmann & Schäfer, 2006) Es wird durch Anlegen einer definierten Spannung an zwei Elektroden in der Messzelle gemessen, wobei sich Partikel mit einem höheren Potential in diesem erzeugten Feld schneller bewegen.

2.2.3 Durchführung der Hydrolyseexperimente

Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, werden mithilfe des Phosphatwertes 1 μ mol Liposomen verwendet, wobei für die Inkubation Puffervolumina unterschiedlicher pH-Werte hinzugegeben werden, sodass insgesamt 1ml erreicht wird. Die Inkubation findet für -20°C im Gefrierschrank, für 4°C im Kühlschrank und für 25°C bzw. 45°C im Thermomixer statt, wobei die Proben bei den letzten beiden Temperaturen ein kontinuierliches, leichtes Schütteln erfahren. Nach einer zuvor definierten Zeit³ werden die Proben in ein Reagenzglas überführt (die Probe aus dem Gefrierschrank wird 5 min bei 25°C aufgetaut) und mittels 0,1M HCl bzw. NaOH neutralisiert. Die Überprüfung des korrekten pH-Wertes um 7 findet mit

³ Variiert je nach Versuchsaufbau.

pH-Indikatorstäbchen statt, welche die gesamte Skala abdecken. Danach findet die in Kapitel 2.2.2.2 beschriebene Dünnschichtchromatographie mit sich anschließender densitometrischer Auswertung statt.

2.2.4 Herstellung des P-Lyso-PG₂

Für die Hydrolyseversuche des P-Lyso-PG₂ wird dieses mithilfe des Enzyms Phospholipase A₂ aus DPPG₂ gewonnen. Dafür wird das Protokoll Enzymatic Assay of Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4) in Zügen verwendet (Sigma-Aldrich, 1994). Aus Vorversuchen hat sich die Kombination aus PLA₂, Ether, Puffer und Lipid im Verhältnis 0,1:1:2 (vol/vol) bewährt. Der Puffer mit pH-Wert 8,5 wird aus Trizma Base und Calciumchlorid hergestellt. Nach dem Pipettieren in der Reihenfolge Puffer und Lipid, PLA₂ und zuletzt Ether wird der Rundkolben drei- bis viermal geschwenkt und für 60 Minuten – umgefüllt in 50ml Falcon Reaktionsgefäße – bei 38°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend werden die Flüssigkeiten in einen 1l-Erlenmeyerkolben gegeben und mit dem doppelten Volumen an Chloroform/Methanol (1:1) im Vergleich zum Puffer- und Lipidvolumen versetzt, geschwenkt und für 15 Minuten stehen gelassen, ehe die lipidhaltige untere Phase analog wie bei der DC in ein Becherglas überführt wird. Selbiges findet zusätzlich mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch im Verhältnis 3:1 statt. Die beiden Lipidhaltigen, organischen Phasen werden daraufhin im Rundkolben innerhalb eines auf 40°C vorerwärmten Wasserbades an den Rotationsverdampfer gehängt, wobei schrittweise Unterdruck erzeugt wird, sodass eine zunehmende Verdampfung des Lösungsmittels stattfindet. Gegen Ende, nach ca. zwei Stunden, liegen der Druck und die Temperatur bei 40 mbar bzw. 70°C.

Nach der Hydratisierung mit 0,9% NaCl, Phosphatwertbestimmung, DC, Größen-, PDI- und Zetapotentialmessung ist die Herstellung des P-Lyso-PG₂ beendet, sodass die Hydrolyseversuche durchgeführt werden können.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zusammenfassung aller verwendeten Liposomen

Um die folgenden Kapitel zum Ergebnis- und Diskussionsteil besser nachvollziehen zu können, werden die wichtigsten Daten der in dieser Arbeit verwendeten Liposomenformulierungen in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Die Liposomen, die 0,9% NaCl einschließen, werden hinter der Chargennummer mit dem Buchstaben „N“ gekennzeichnet. Hierbei gibt es Liposomen im molaren Verhältnis 60:40 aus DPPC, DPPG₁, DPPG₂, oder DPPG₃ und Cholesterin und solche, die im gleichen molaren Verhältnis aus DPPC und einem der Phospholipide DPPG_x (x=1,2,3) aufgebaut sind. Damit werden Hydrolyseversuche bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt.

Für die Versuchsreihe zum Doxorubicin-Einschluss wurden Liposomen hergestellt, die entweder 300mM Citrat vom pH 4 oder 240mM Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄ vom pH 5,4 einschließen. Die Buchstaben hinter der Chargennummer sind entsprechend „C“ bzw. „A“. Die Liposomenmembran wird dabei von den Phospholipiden DPPC, DSPC und DPPG₂ oder DPPG₃ im molaren Verhältnis 50:20:30 gebildet.

Als Formulierungen zur Untersuchung des Hydrolyseverhaltens von Lysolipiden bzw. Alkylphosphocholinen werden P-Lyso-PC-, P-Lyso-PG₁, P-Lyso-PG₂, He-PC-, und Er-PC- Mizellen gebildet, welche in 0,9% NaCl hergestellt werden. „He“ steht dabei für Hexadecyl und „Er“ für Erucyl.

Chargennummer	Formulierung (mol/mol)	Einschluss	Extrusion/Membrangröße [nm]	Größe (z-average) [nm] (in Wasser)	PDI	ζ-Potential [mV] in 0,9% NaCl	Phosphatgehalt [mM]	DOX:lipid (mol/mol)	Lipidzusammensetzung nach Herstellung	DPPG _x (x=1,2,3)/DPPC(+DSPC)-Verhältnis
21/09N	DPPC/Chol (60/40)	0,9% NaCl	200	133	0,1	-2	31,0 (ohne Chol)	/	Kein Lysolipid	/
21/25N	DPPG ₁ /Chol (60/40)	0,9% NaCl	200	127	0,1	-39	31,8 (ohne Chol)	/	Kein Lysolipid	/
21/08N	DPPG ₂ /Chol (60/40)	0,9% NaCl	200	112	0,1	-27	19,1 (ohne Chol)	/	Kein Lysolipid	/
21/20N	DPPG ₃ /Chol (60/40)	0,9% NaCl	200	73	0,2	-4	30,9 (ohne Chol)	/	Kein Lysolipid	/
21/15N	DPPC/DPPG ₁ (50/50)	0,9% NaCl	200	125	0,1	-42	50,2	/	P-Lyso-PC: 2,1%; P-Lyso-PG ₁ : 0,7%; DPPC: 48,2%; DPPG ₁ : 49,0%	1,02
21/12N	DPPC/DPPG ₂ (50/50)	0,9% NaCl	200	134	0,1	-30	48,1	/	P-Lyso-PC: 0,7%; P-Lyso-PG ₂ : 0,0%; DPPC: 47,7%; DPPG ₂ : 51,6%	1,08
21/21N	DPPC/DPPG ₃ (50/50)	0,9% NaCl	200	107	0,1	-15	49,8	/	P-Lyso-PC: 0,7%; P-Lyso-PG ₃ : 0,1%; DPPC: 50,3%; DPPG ₃ : 48,9%	0,97
22/10C	DPPC/DSPC/DPPG ₂ (50/20/30)	300mM Cirat pH 4	100	102	0,1	-26	49,4	0,13	P-Lyso-PC: 0,9%; P-Lyso-PG ₂ : 0,0%; DPPC+DSPC: 71,5%; DPPG ₂ : 27,6%	0,39
22/12C	DPPC/DSPC/DPPG ₃ (50/20/30)	300mM Cirat pH 4	100	105	0,1	-23	33,3	0,13	P-Lyso-PC: 0,0%; P-Lyso-PG ₃ : 0,0%; DPPC+DSPC: 71,5%; DPPG ₃ : 28,5%	0,40
22/11A	DPPC/DSPC/DPPG ₂ (50/20/30)	240mM Ammonium-sulfat pH 5,4	100	95	0,1	-19	43,9	0,13	P-Lyso-PC: 0,0%; P-Lyso-PG ₂ : 0,0%; DPPC+DSPC: 72,5%; DPPG ₂ : 27,5%	0,38
21/28N	P-Lyso-PC Mizellen	0,9% NaCl	/	196	0,2	6	48,5	/	/	/
21/31N	P-Lyso-PG ₁ Mizellen	0,9% NaCl	/	72	0,5	-21	46,2	/	/	/
22/21N	P-Lyso-PG ₂ Mizellen	0,9% NaCl	/	538	0,5	-26	18,7	/	/	/
21/30N	He-PC Mizellen	0,9% NaCl	/	21	0,3	-1	54,5	/	/	/
22/01N	Er-PC Mizellen	0,9% NaCl	/	81	0,4	-1	56,2	/	/	/

Tab. 3.1: Biophysikalische Parameter der verwendeten Liposomenformulierungen und Mizellen.

3.2 P-Lyso-PG₂-Detektion mittels Dünnschichtchromatographie

Bei der Hydrolyse von DPPC/DPPG₂-Liposomen entstehen die entsprechenden P-Lysolipide. Damit alle Lipide innerhalb eines Laufes auf der Dünnschichtchromatographie-Platte getrennt und quantifiziert werden können, soll ein optimales Laufmittel gefunden werden, welches eben diese Differenzierung ermöglicht.

3.2.1 Laufmittelvariation und Beurteilung der DC-Banden

Dazu werden Proben der Chargen 21/08N und 21/09N, welche aus DPPC bzw. DPPG₂ und Cholesterin bestehen, 18 Stunden bei 45°C und einem pH-Wert von 1,1 bzw. 4,0 inkubiert, anschließend extrahiert, mittels DC aufgetrennt und danach mit einem Molybdän-Spray angefärbt, welches ein Sichtbarmachen der Phospholipide in blauer Farbe erlaubt. Dabei werden diverse Laufmittel getestet, welche zu unterschiedlichen Anteilen aus Chloroform, Methanol, Ethansäure, bidestilliertem Wasser und teilweise Propanol bestehen. Die Polarität des Laufmittels steigt mit dem Methanol- bzw. Wasseranteil und sinkt mit dem Chloroformanteil, wodurch die Banden jeweils individuell weit vom Startpunkt und von anderen Spots entfernt zu liegen kommen, da das Laufmittel mit zunehmender Polarität aufgrund der Wechselwirkungen mit der ebenfalls polaren Kieselgelplatte langsamer bzw. weniger weit wandert. Zusätzlich bewirkt eine Erhöhung des Wasseranteils eine Abschwächung der Banden, weil weniger Probe aufgenommen wird.

Auf jede DC-Platte wird darüberhinaus ein Standard aufgetragen, der aus P-Lyso-PC, DPPC, DPPG₂ und DSPE-PEG 2000 besteht und dessen Banden als Vergleich zu den der Proben dienen und somit eine Zuordnung ermöglichen.

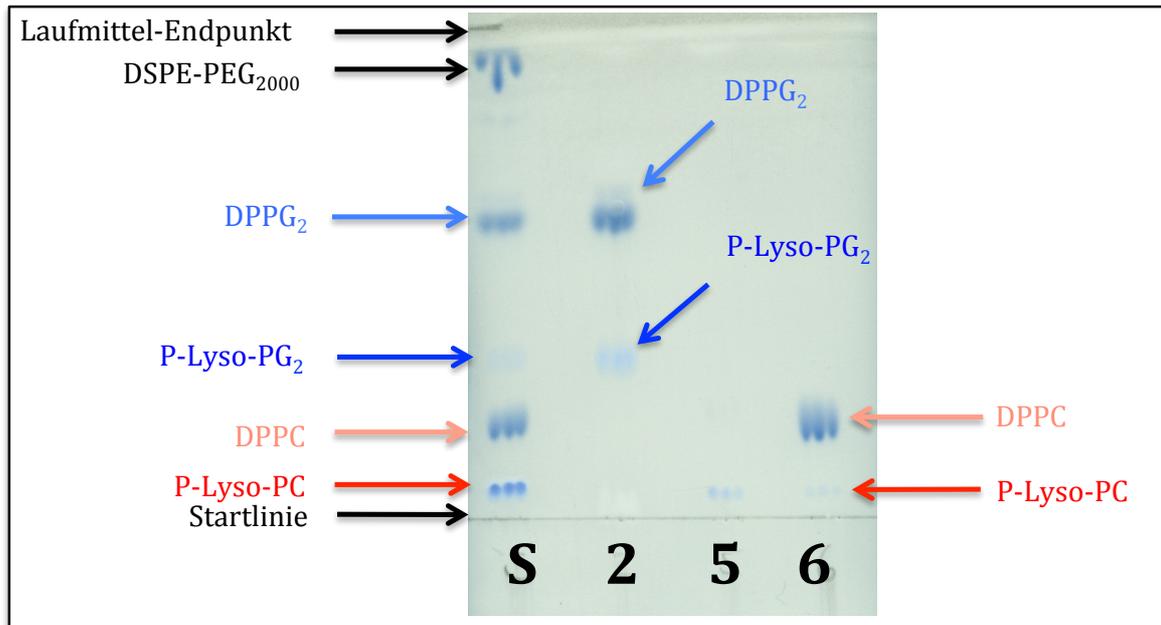


Abb. 3.1: DC-Platte mit Standard (S) und Proben von DPPG₂/Cholesterin-Liposomen bei pH 4,0 (2) sowie von DPPC/Cholesterin-Liposomen bei pH 1,1 (5) und pH 4,0 (6) nach einer 18-stündigen Inkubation bei 45°C.

Die linke Spalte in Abbildung 3.1 zeigt die Auftrennung des Standards, wobei neben den erwarteten Stoffen P-Lyso-PC, DPPC, DPPG₂ und DSPE-PEG 2000 noch eine fünfte Bande (dritte von unten) auftritt, die dem P-Lyso-PG₂ entspricht, da der verwendete Standard bereits längere Zeit aufbewahrt worden ist, was mit einer DPPG₂-Hydrolyse einhergehen kann. Daneben zeigt sich die Auftrennung des Liposoms aus DPPG₂ und Cholesterin, wobei die höher liegende Bande mit Zuhilfenahme des Standards dem DPPG₂ entspricht. Die andere Bande, das Hydrolyseprodukt P-Lyso-PG₂, verifiziert die oben angesprochene Annahme bezüglich den Standard betreffenden fünften Bande, da beide exakt auf der selben Höhe zu liegen kommen. Cholesterin wird aufgrund des fehlenden Phosphats mit dem Molybdänspray nicht sichtbar gemacht. Beim DPPC/Cholesterin-Liposom findet sich bei pH 1,1 nur noch das P-Lyso-PC (5), hingegen bei pH 4,0 sowohl das Lysolipid als auch überwiegend DPPC (6).

Als optimales Laufmittel hat sich die Kombination mit der Zusammensetzung 100ml Chloroform, 60ml Methanol, 10ml Ethansäure (Eisessig) und 5ml bidestilliertes Wasser herausgestellt, welche eine geeignete Auftrennung der Lipide ermöglicht: Das P-Lyso-PG₂ kann abgegrenzt zu den Lipiden DPPG₂, DPPC und P-Lyso-PC als einzelner Spot detektiert werden. Dies wird durch den Vergleich der Retentionsfaktoren (R_f -Werte), die sich als Quotient aus Strecke zwischen Startlinie und Substanzzone

und Startlinie und Fließmittelfront (Laufmittelendpunkt) berechnen, zusätzlich bestätigt. Die zwischen 0 und 1 liegenden R_f -Werte sind speziell bei diesem Laufmittel für P-Lyso-PC 0,1, DPPC 0,2, P-Lyso-PG₂ 0,4 und DPPG₂ 0,7.

3.2.2 Densitometrische Auswertung

Die Auftrennung des Lipidgemisches mittels DC ist die Grundvoraussetzung für die quantitative Betrachtung der Proben, welche mittels Densitometrie, also Messung der Farbmenge pro Flächeneinheit, erfolgt.

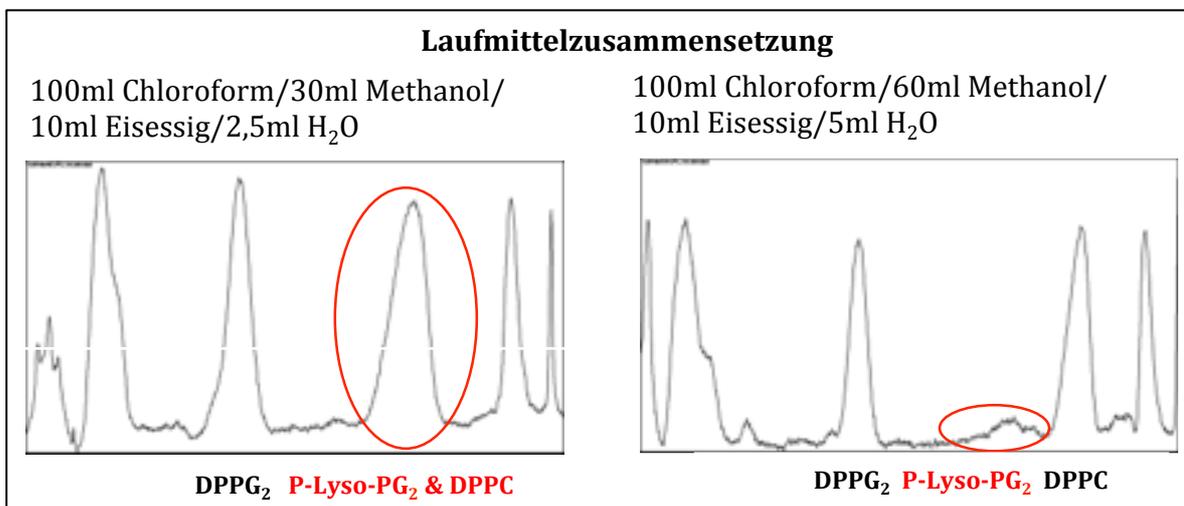


Abb. 3.2: Densitometrische Auswertung zweier DC-Platten bei Detektion des Standards vor (links) und nach (rechts) Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung.⁴

Das rechte Bild in Abbildung 3.2 zeigt, dass die neue Zusammensetzung des Laufmittels eine Auftrennung der Lipide erreicht, welche eine densitometrische Betrachtung auf sinnvolle Art und Weise möglich macht. Aus dem Peak, welcher aufgrund des gemeinsamen Spots auf der DC-Platte sowohl das DPPC als auch das P-Lyso-PG₂ beinhaltete (links), sind zwei voneinander unterscheidbare Banden entstanden (rechts), die eine getrennte Flächenberechnung erlauben.

⁴ Beim linken Bild sind das P-Lyso-PG₂ und DPPC gemeinsam innerhalb eines Peaks, während das rechte Bild die Auftrennung in zwei einzelne Peaks zeigt.

3.2.3 Retentionsfaktoren der untersuchten Lipide

Werden Liposomen mit DPPG₁ bzw. DPPG₃ für ähnliche Inkubationsversuche verwendet, so kommt es ebenfalls zur Lysolipidbildung. Auch für diese Lipide kann ein R_f-Wert berechnet werden.

Lipid	Retentionsfaktor Mittelwert
P-Lyso-PC	0,1
P-Lyso-PG ₁	0,4
P-Lyso-PG ₂	0,4
P-Lyso-PG ₃	0,4
DPPC	0,2
DPPG ₁	0,7
DPPG ₂	0,7
DPPG ₃	0,7

Tab. 3.2: Lipidauflistung mit entsprechenden Retentionsfaktoren bei einem Lösungsmittelgemisch der Zusammensetzung 100ml Chloroform, 60ml Methanol, 10ml Ethansäure (Eisessig) und 5ml bidestilliertem Wasser. Der Standardfehler liegt unter 5 Prozent.

Die in Tabelle 3.2 aufgelisteten Retentionsfaktoren können miteinander verglichen werden, da bei den Versuchen das gleiche Laufmittel verwendet wird. Mit steigender Anzahl an Glycerinmolekülen bleibt der R_f-Wert, gerundet auf eine Nachkommastelle, beim Ausgangslipid mit 0,7 und Lysolipid mit 0,4 gleich. Das P-Lyso-PC und DPPC haben mit 0,1 und 0,2 die kleinsten Werte.

3.3 Hydrolyse ausgewählter Lipide unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Für die Hydrolyse werden Liposomenformulierungen verwendet, welche zu gleichen Anteilen aus DPPC und einem der Lipide DPPG₁, DPPG₂ oder DPPG₃ bestehen. Lediglich bei den Liposomen mit Cholesterinanteil wird ein molares Verhältnis von 40:60 in Bezug auf Cholesterin und der anderen Substanz (DPPC, DPPG₁, DPPG₂, DPPG₃) gewählt.

Als Einflussfaktoren auf die Fettspaltung werden dabei pH-Wert, Inkubationstemperatur und -zeit sowie Lipidphase untersucht.

3.3.1 Einfluss des pH-Wertes bei aufsteigender Inkubationszeit

Bei der Auswahl der pH-Werte wird darauf geachtet, möglichst das gesamte Spektrum der pH-Skala abzudecken, wodurch die Puffer Werte von 1,1, 4,0 und 12,9 aufweisen. Die Relevanz des Puffers mit dem pH-Wert 4,0 liegt darin, dass dieser beim Einschluss des Zytostatikums Doxorubicin im Inneren der Lipidhülle vorliegt.

Die Abbildung 3.3 zeigt den prozentualen Anteil der entstandenen Lysolipide bei unterschiedlichen Inkubationszeiten, nämlich 0, 30, 60, 90, 120 und 300 Minuten und einer konstanten Temperatur von 45°C.

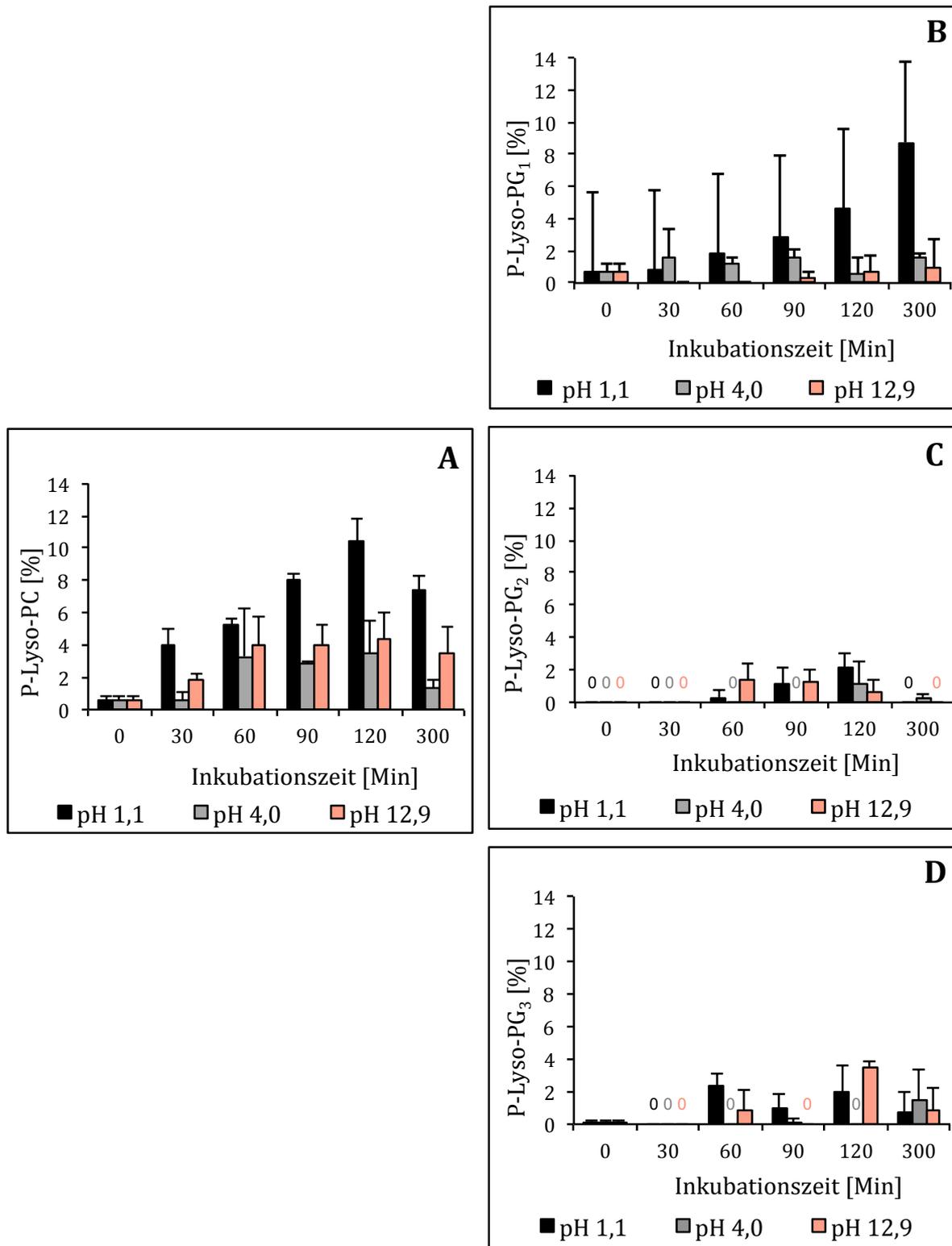


Abb. 3.3: Lyso lipidanteile der Formulierungen DPPC/DPPG_x (x=1,2,3) 50:50 (mol/mol) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer Temperatur von 45°C und pH-Werten von 1,1, 4,0 bzw. 12,9. Das Diagramm A zeigt den P-Lyso-PC-Anteil, welcher bei der Formulierung DPPC/DPPG₂ 50:50 (mol/mol) detektiert wurde und ist repräsentativ für die gemessenen P-Lyso-PC-Anteile bei den Formulierungen DPPC/DPPG₁ und DPPC/DPPG₃ (jeweils 50:50 (mol/mol)). Anzahl der Messwerte n=3.

Bei der Betrachtung des P-Lyso-PC-Gehalts fällt auf, dass der Lysolipidgehalt bei allen drei pH-Werten bis zu einer Inkubationszeit von 120 Minuten steigt und danach zur 300-Minuten-Marke hin fällt. Dabei werden die höchsten Werte bei dem stark sauren bzw. alkalischen Puffersystem mit 10,5% bzw. 4,4% erreicht, wohingegen sich bei einer Umgebung mit pH 4,0 Werte kleiner 4,0% ergeben.

Der Anteil des P-Lyso-PG₁ nimmt im stark sauren Milieu kontinuierlich zu und erreicht bei 300 Minuten den Höchstwert mit 8,8%; demgegenüber bleibt dieser bei pH 4,0 über die gesamte Inkubationszeit hinweg kleiner 2,0% bzw. im stark Alkalischen unter 1,0%.

Der P-Lyso-PG₂-Anteil steigt im stark Sauren bis 120 Minuten auf 2,2%, wobei es nach 300 Minuten nicht mehr nachweisbar ist. Bei den Proben im alkalischen Puffersystem wird das Zersetzungsprodukt nach einer Stunde zum ersten Mal mit 1,4% detektiert und sinkt im Folgenden stetig. Interessant sind dabei, ähnlich wie beim P-Lyso-PG₃, die wesentlich geringeren Lyso-Anteile bei pH 1,1 im Vergleich zu den Hydrolyseprodukten des DPPC und DPPG₁.

Um die Hydrolyse von DPPG₁, DPPG₂ und DPPG₃ besser mit der des DPPC vergleichen zu können, wird der Quotient aus den ursprünglich liposomenbildenden Lipiden berechnet und wie Abbildung 3.4 zeigt unter Berücksichtigung des pH-Wertes und der Inkubationszeit aufgetragen. Dadurch kann bei den ausgewählten Inkubationszeiten beurteilt werden, welches der beiden Lipide bereits stärker zersetzt worden ist – ohne mögliche Fortreaktionen der Zersetzungsprodukte, die den tatsächlichen Anteil der Lysolipide isoliert betrachtet verschleiern können, berücksichtigen zu müssen.

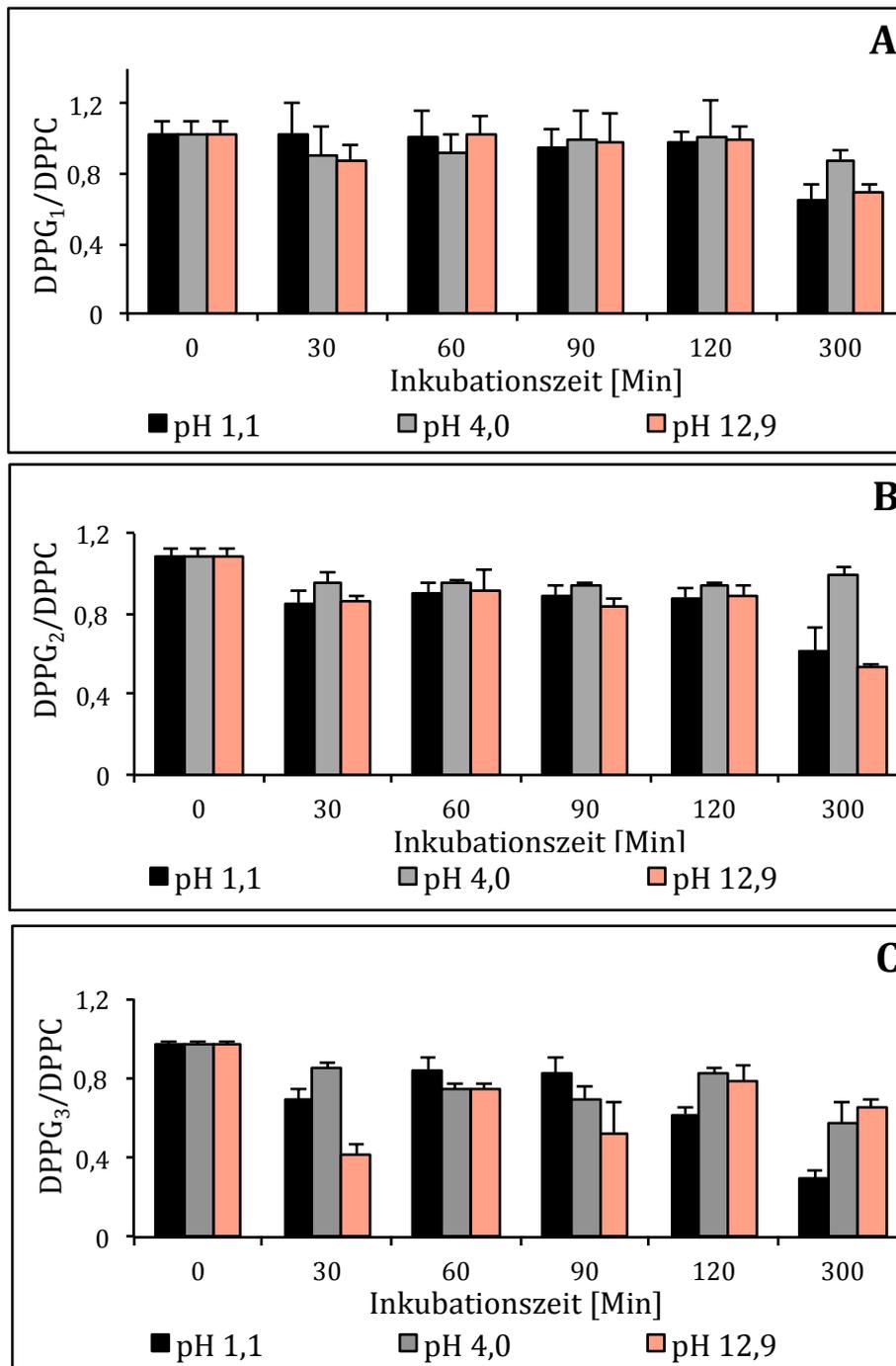


Abb. 3.4: $DPPG_x$ ($x=1,2,3$)/DPPC-Verhältnis in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer Temperatur von 45°C und pH-Werten von 1,1, 4,0 und 12,9. Anzahl der Messwerte $n=3$.

Die Hydrolyse von $DPPG_x$ ($x=1,2,3$) verläuft schneller als für DPPC, da die gebildeten Quotienten zu jedem Zeitpunkt über die drei untersuchten pH-Werte hinweg im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangswerten abnehmen. Dabei ist ein Unterschied in Bezug auf das umgebende Milieu bemerkbar: Bei pH 4,0 ist die Veränderung im Vergleich zum Nullwert auch bei langer Inkubationszeit zumeist

schwächer ausgeprägt als dies bei den stark sauren und alkalischen Verhältnissen der Fall ist. Innerhalb der Fette mit zusätzlicher Glycerinveresterung zeigt sich beim DPPG₃ der schnellste Abfall, was bedeutet, dass hier die Hydrolyse des Lipids besonders zügig vonstatten geht. Ein fragliches Ergebnis stellt der DPPG₃/DPPC-Quotient bei pH 12,9 nach 30-minütiger Inkubationszeit mit noch 0,42 dar, da unter gleichen Bedingungen der Wert für das DPPG₁ bzw. DPPG₂ 0,91 bzw. 0,86 zeigt.

3.3.2 Einfluss der Temperatur bei konstanter Inkubationszeit

Neben dem pH-Wert wird in diesem Versuchsaufbau auch die Inkubationstemperatur variiert, um mögliche Auswirkungen auf die Lipidhydrolyse zu erkennen. Dabei liegt die Inkubationszeit bei 18 Stunden und das pH-Milieu umfasst neben den Werten 1,1, 4,0 und 12,9 nun auch nahe am Neutralpunkt befindliche - nämlich 6,60 und 7,40. Die weite Bandbreite der Temperaturen von -20°C über 4°C und 25°C hin zu 45°C hat das Ziel ein möglichst großes Spektrum an Umgebungsbedingungen abzudecken, wie es auch bei unterschiedlichen Lagerungsverhältnissen der Fall ist. Eine Temperatur von -20°C entspricht dabei der Aufbewahrung der Liposomen im Gefrierschrank, wohingegen 4°C als Richttemperatur für das Lagern im Kühlschrank anzusetzen ist. Gemäß der Richtlinien für das Testen der Stabilität neuer Substanzen ist dabei eine Temperaturerhöhung auf 25°C gleichzusetzen mit einer Lagerung bei 4°C bei halbiertes Inkubationszeit (ICH, 2003). Ähnlich ist dies bei den Temperaturen 25°C und 45°C für den Fall der Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Die Liposomenchargen sind denen identisch, welche zur Beurteilung des Einflusses des pH-Wertes auf die Fetthydrolyse verwendet wurden. Die Abbildung 3.5 fasst die Lysolipidanteile der Ausgangslipide DPPC und DPPG_x (x=1,2,3) in 4 Unterdiagrammen in Abhängigkeit der untersuchten Temperaturen und pH-Werte zusammen.

Dabei nimmt Abbildung 3.5 A eine Sonderstellung in der Diagrammformation ein, da einerseits ein Hydrolyseprodukt abgebildet wird, welches mit Cholin anstatt Glycerin am Phosphat verestert ist und andererseits die Skalierung der y-Achse im Vergleich zu den Abbildungen 3.5 B, C und D weitfassender gewählt ist.

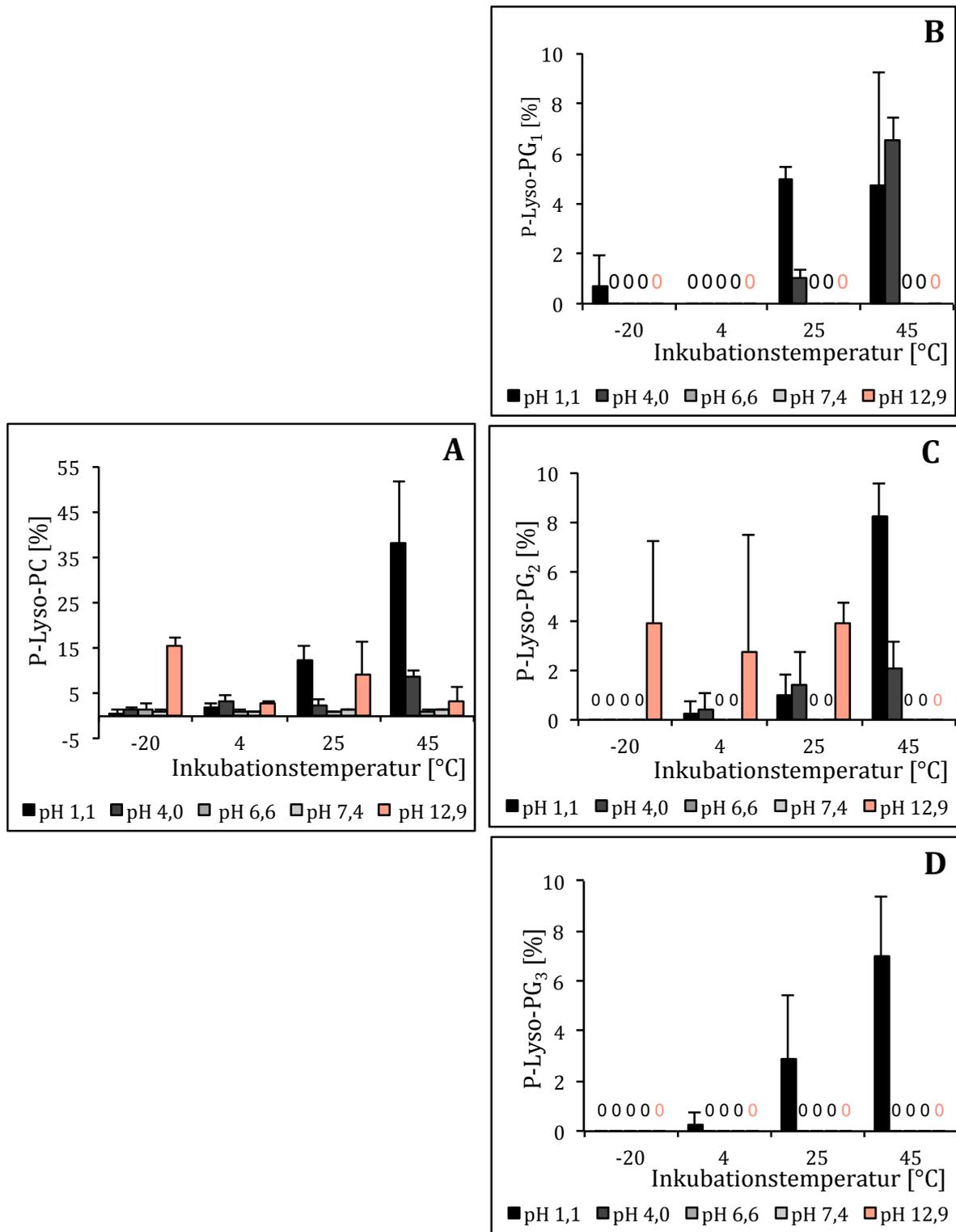


Abb. 3.5: Lysolipidanteile der Formulierungen DPPC/DPPG_x ($x=1,2,3$) 50:50 (mol/mol) in Abhängigkeit verschiedener Inkubationstemperaturen (-20°C, 4°C, 25°C, 45°C) und pH-Werten (1,1, 4,0, 6,6, 7,4, 12,9) bei einer Inkubationszeit von 18 Stunden. . Das Diagramm A zeigt den P-Lyso-PC-Anteil, welcher bei der Formulierung DPPC/DPPG₂ 50:50 (mol/mol) detektiert wurde und ist repräsentativ für die gemessenen P-Lyso-PC-Anteile bei den Formulierungen DPPC/DPPG₁ und DPPC/DPPG₃ (jeweils 50:50 (mol/mol)). Anzahl der Messwerte $n=3$.

Im stark sauren Bereich steigt bei allen untersuchten Phospholipiden mit zunehmender Temperatur der Lysolipidanteil. Das P-Lyso-PC erreicht bei 45°C mit 38,0% das Maximum. Bei den P-Lyso-PG_x (x=1,2,3) zeigt unter den selben Bedingungen das P-Lyso-PG₂ mit 8,3% den höchsten Anteil an.

Bei pH 4 verhält es sich sehr ähnlich, wenngleich die Lysolipidanteile geringer (8,7% P-Lyso-PC bei 45°C) sind und mit 6,6% der höchste Wert der P-Lyso-PG_x (x=1,2,3) beim P-Lyso-PG₁ bei 45°C entsteht.

Hydrolyseprodukte im pH-Bereich von 6,6-7,4 werden nur beim P-Lyso-PC detektiert und zeigen stets Werte unter 1,5%.

Im stark Basischen liegen nur beim DPPC und DPPG₂ messbare Lysolipidanteile vor. Das P-Lyso-PC fällt vom Maximalwert 15,6% bei -20°C auf 3,0% bei 4°C bzw. 3,3% bei 45°C, während das P-Lyso-PG₂ Werte von 3,9% bei -20°C bzw. 25°C und 2,8% bei 4°C aufweist. Folglich kann gesagt werden, dass die Werte umso höher sind je weiter das Puffersystem vom Neutralpunkt entfernt ist.

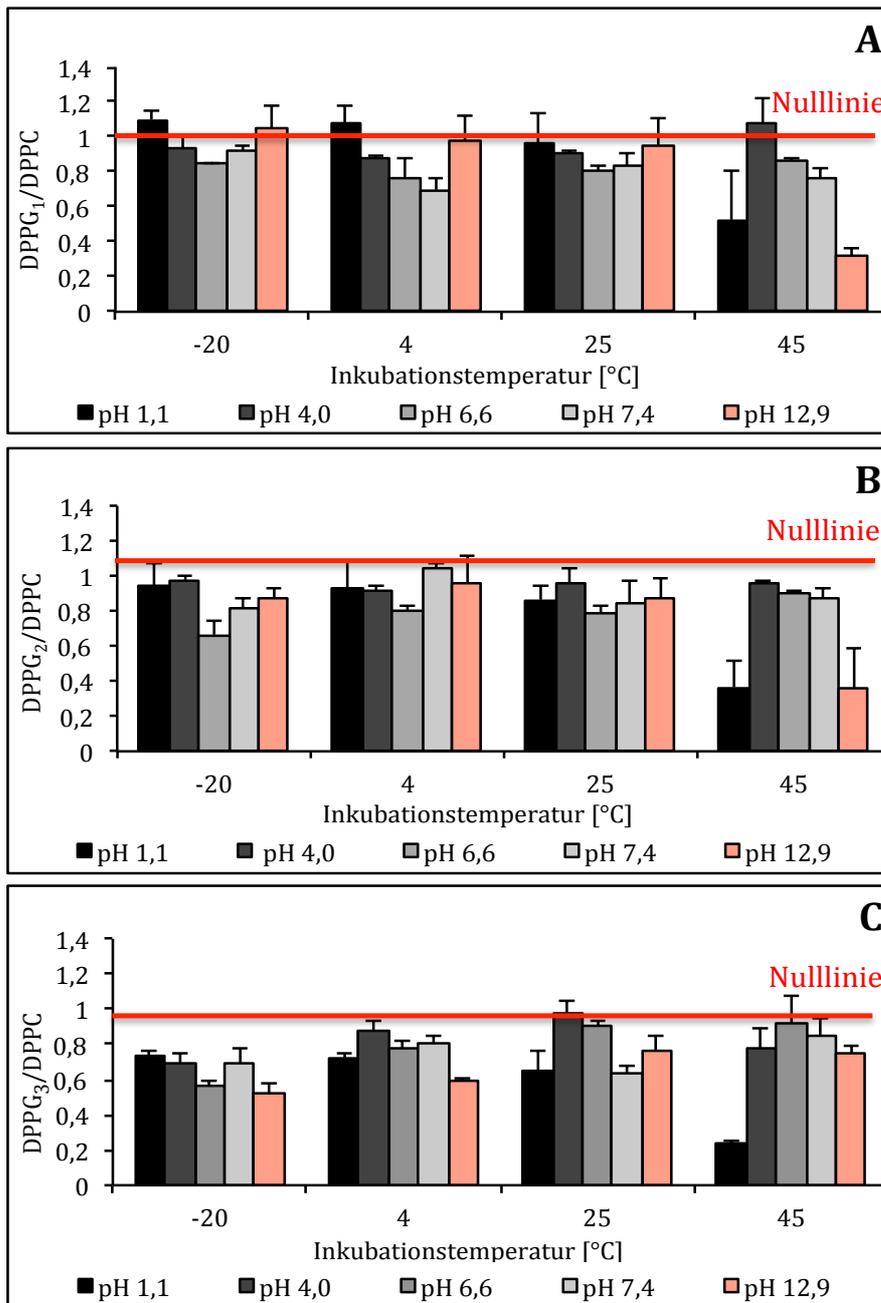


Abb. 3.6: $DPPG_x$ ($x=1,2,3$)/DPPC-Verhältnis in Abhängigkeit verschiedener Inkubationstemperaturen (-20°C , 4°C , 25°C , 45°C) und pH-Werte (1,1, 4,0, 6,6, 7,4, 12,9) bei einer Inkubationszeit von 18 Stunden. Die rote Nulllinie gibt das Ausgangsverhältnis der Lipide unmittelbar nach Herstellung der Liposomen wieder. Anzahl der Messwerte $n=3$.

Die Verhältnisse der Ausgangslipide weisen in allen drei Teildiagrammen A, B und C der Abbildung 3.6 ein ähnliches Muster auf. So erkennt man beim Vergleich mit dem Ausgangsverhältnis vor den Hydrolyseexperimenten (rote Linie) bei den Temperaturen -20°C , 4°C und 25°C , dass über alle Puffersysteme hinweg ein nahezu konstanter Quotient vorherrscht, bei dem vor allem für das $DPPG_x$ ($x=1,2$)/DPPC

Verhältnis (Abbildung 3.6 A/B) die tiefsten Werte für die pH-Werte 4,0 bis 7,4 zu finden sind. Bei 45°C zeigt sich ein umgekehrtes Bild, nämlich ein abrupter Abfall des Quotienten im stark sauren und alkalischen Bereich, was die stärkere Hydrolyse der Lipide DPPG_x (x=1,2,3) im Vergleich zum DPPC zeigt. Die drei Puffersysteme am nächsten zum Neutralpunkt hin zeigen dagegen Werte, die alle größer als 0,75 sind.

Beim Vergleich der DPPG_x untereinander ist die Hydrolyse des DPPG₁ und DPPG₂ in den stark sauren bzw. basischen Umgebungsverhältnissen bei den Temperaturen bis 25°C wertemäßig schwächer ausgeprägt als dies beim DPPG₃ der Fall ist. Dasselbe gilt auch bei 45°C und pH 1,1. Bei pH 12,9 hingegen liegt der DPPG₃/DPPC-Quotient bei 0,74, während die Verhältnisse DPPG₂/DPPC und DPPG₁/DPPC bei 0,36 bzw. 0,32 liegen.

3.3.3 Einfluss der Lipidphase

Um herauszufinden inwieweit die Lipidphase die Hydrolyse der Phospholipide beeinflusst, werden Liposomen hergestellt, welche zu 40% aus Cholesterin und zu 60% aus DPPG₁, DPPG₂ oder DPPG₃ bestehen. Der Grund für die Auswahl des Cholesterinanteils von 40% liegt darin, dass für Liposomen mit mehr als 30-40 mol% Cholesterin gezeigt wurde, dass kein Übergang mehr von der soliden Gelphase hin zur flüssig-ungeordneten Phase stattfindet (McMullen, Lewis, & McElhaney, 1993),(Huang, Jaafari, & Szoka, 2009). Damit werden die Lipide der Cholesterinhaltigen Liposomen im Unterschied zu den vorangegangenen Experimenten in der flüssig-geordneten Phase untersucht, die bei allen verwendeten Temperaturen -20°C, 4°C, 25°C und 45°C besteht, sodass kein Phaseneffekt mehr vorliegt.

Die Liposomen werden für 120 Minuten bei 45°C und einem Puffersystem mit pH 1,1 bzw. 12,9 inkubiert und so aufbereitet, dass wiederum eine densitometrische Analyse der Lysolipide möglich ist. Der Vergleich mit den Hydrolyseprodukten von Liposomenformulierungen, die äquimolare Mengen an DPPC bzw. DPPG_x (x=1,2,3) beinhalten, erlaubt unter sonst identischen Versuchsbedingungen eine Aussage über mögliche Unterschiede. Komplettiert werden die Beobachtungen durch die zusätzliche Hydrolyse einer Charge mit der Zusammensetzung DPPC und Cholesterin im Verhältnis 60:40 (mol/mol).

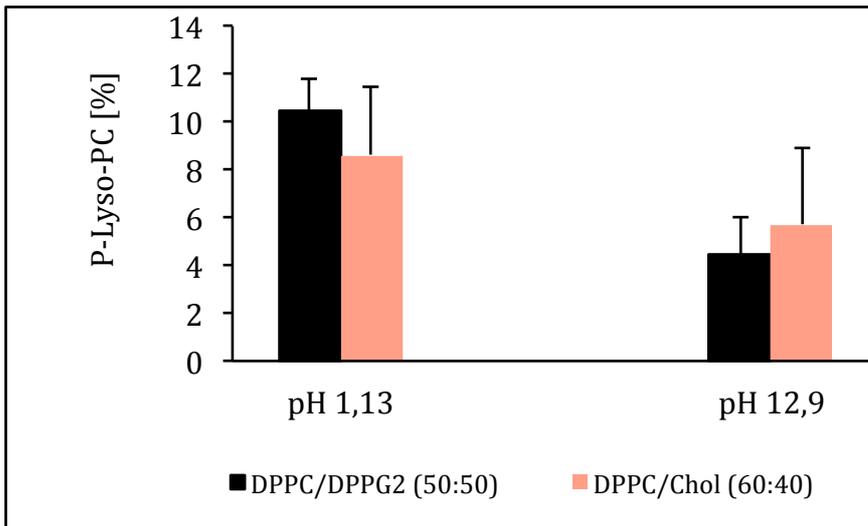


Abb. 3.7: P-Lyso-PC-Anteil von Liposomenformulierungen mit Cholesterin (DPPC/Chol) und ohne (DPPC/DPPG₂) bei einer 120-minütigen Hydrolyse bei 45 °C und pH 1,1 bzw. 12,9. Anzahl der Messwerte n=3.

Das Cholesterin kann bei der Dünnschichtchromatographie bzw. der nachfolgenden Flächenauswertung nicht adäquat berücksichtigt werden. Daher beziehen sich die prozentualen Werte bei Liposomenformulierungen mit Cholesterin auf die aus Ausgangslipid und Lysolipid gebildete Summe, welche 100 Prozent entspricht.

Die Abbildung 3.7 lässt erkennen, dass die P-Lyso-PC-Anteile sowohl im sauren als auch basischen Milieu beinahe unabhängig davon, ob DPPG₂ oder Cholesterin als Zweitstoff das Liposom bilden, sehr ähnlich sind: Bei pH 1,1 liegen die P-Lyso-PC Anteile bei 10,5% bzw. 8,6%, während sie sich im Basischen bei 4,4% bzw. 5,7% befinden.

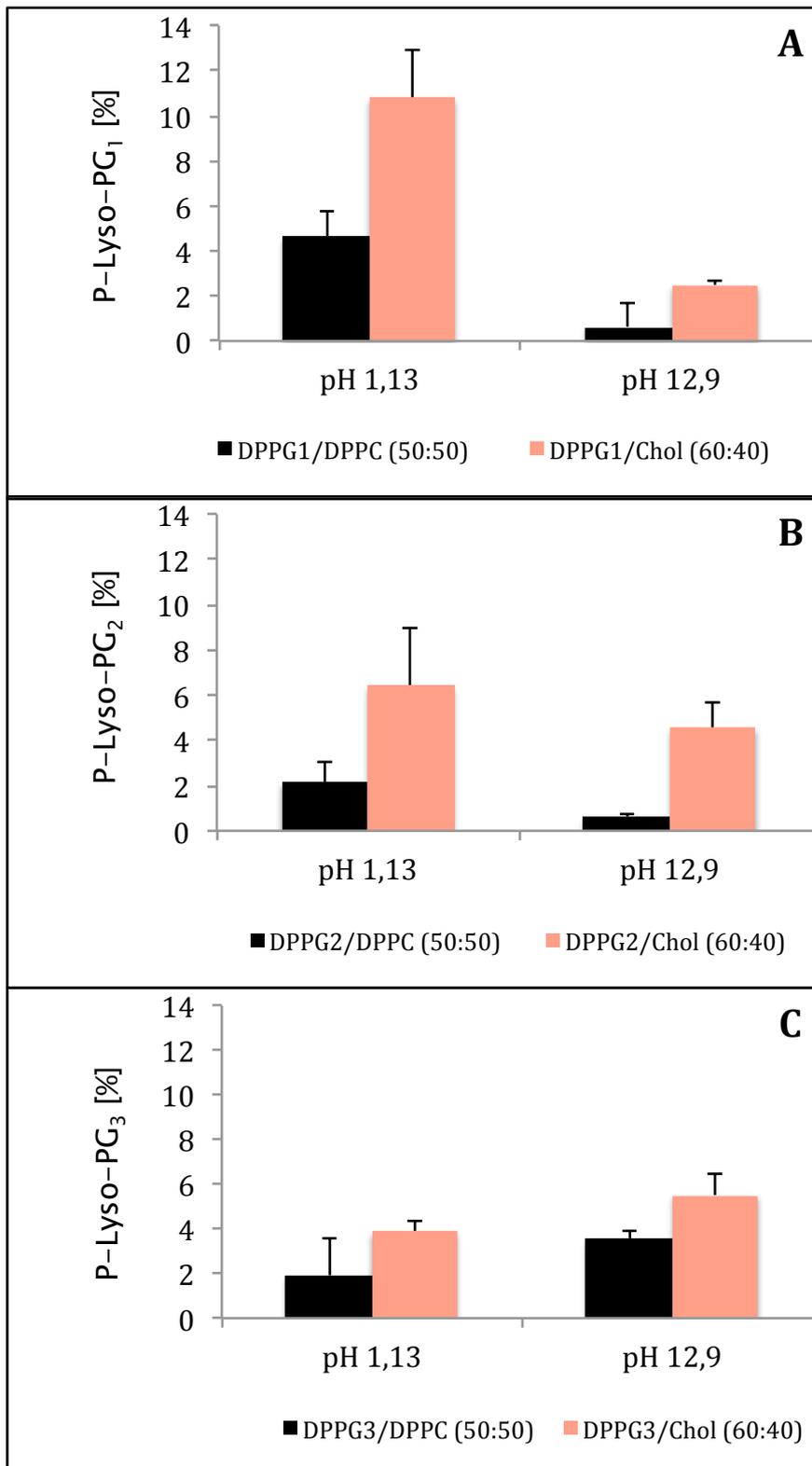


Abb. 3.8: Prozentuale Angabe des P-Lyso-PG₁ (A), P-Lyso-PG₂ (B) und P-Lyso-PG₃ (C) nach 120-minütiger Inkubation bei einer Temperatur von 45°C und pH Werten von 1,1 bzw. 12,9 von Liposomen mit Cholesterin (DPPG_x/Chol) und ohne (DPPC/DPPG_x), wobei x=1,2,3. Anzahl der Messwerte n=3.

Anders ist dies bei Liposomenzusammensetzungen mit DPPG_x (x=1,2,3) und

Cholesterin im Vergleich zu DPPG_x (x=1,2,3) und DPPC, wie Abbildung 3.8 zeigt. Hierbei unterscheiden sich die Werte des P-Lyso-PG_x (x=1,2,3) in Abhängigkeit davon, ob das Liposom Cholesterin enthält oder nicht, deutlich. Im Sauren liegen die prozentualen Werte beim P-Lyso-PG₁ ohne Cholesterin bei 4,8% bzw. mit Cholesterin bei 10,8%. Das P-Lyso-PG₂ zeigt Werte von 2,2% (ohne Chol) bzw. 6,4% (mit Chol) an, während das P-Lyso-PG₃ Anteile von 1,9% (ohne Chol) bzw. 3,9% (mit Chol) aufweist. Im Basischen steigen die Werte vom P-Lyso-PG₁ hin zum P-Lyso-PG₃, welches 3,5% Lysoanteil bei Liposomen ohne und 5,5% bei Liposomen mit Cholesterin zeigt.

3.4 Hydrolyseverhalten verschiedener Lysolipide und Alkylphosphocholine

Wie in Abschnitt 2 des Ergebnisteils bereits erklärt, kann durch die Bildung des Quotienten der beiden Ausgangslipide der verwendeten Liposomen abgeschätzt werden, welches der Lipide unter verschiedenen Bedingungen eine stärkere Hydrolyse zeigt. Trotzdem muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass das gebildete Lysolipid zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die Extraktion bereits die verbliebene Fettsäure abgespalten haben könnte und deshalb mittels Dünnschichtchromatographie nicht mehr detektiert werden kann.

Um dies besser nachzuvollziehen wird zusätzlich die Hydrolyse diverser Lysolipide experimentell untersucht. Zum Einsatz kommen dabei P-Lyso-PC, P-Lyso-PG₁, P-Lyso-PG₂ und als Negativkontrollen die Alkylphosphocholine Hexadecylphosphocholin (He-PC, Miltefosin) und Erucylphosphocholin (Erufosin), welche als metabolisch besonders stabil gelten (persönliche Mitteilung Prof. Hansjörg Eibl, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen). Dabei werden die Lipide jeweils in 0,9% NaCl-Lösung gelöst und entsprechend dem ausgerechneten Phosphatwert, wie im Teil Material und Methoden beschrieben, mit Puffer verschiedener pH-Werte inkubiert.

Im Wesentlichen sind es zwei Versuchsreihen, welche fast identisch mit den im Kapitel zuvor beschriebenen sind. Zum Einen wird untersucht wie hoch der Anteil des Lysolipids nach 0, 30, 60, 90, 120 und 300 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 45°C bei pH 1,1 bzw. 12,9 ist und zum Anderen werden die Proben bei den gleichen pH-Werten für 18 Stunden bei Temperaturen von -20°C bzw. 45°C inkubiert.

Die Auswahl dieser Temperaturen und pH-Werte liegt daran, dass besonders solche extreme Bedingungen von Interesse sind, da vermutet wird, dass die Hydrolyse besonders stark (45°C, pH 1,1 und 12,9) bzw. sehr schwach (-20°C) abläuft. Somit kann von diesen Ergebnissen auf die Hydrolyseprodukte bei Bedingungen zwischen den erprobten geschlossen werden.

Die aufgrund densitometrischer Berechnungen ermittelten Werte der Lysolipide geben an, wie viel Prozent an Lysolipid noch vorhanden sind, wobei die entsprechenden y-Werte mit 100 multipliziert werden müssen, um eine prozentuale Angabe zu erhalten. Das bedeutet die Differenz hin zu 100 Prozent, die dem Ausgangswert entsprechen, gibt an wieviel von der betrachteten Substanz hydrolysiert wurde.

3.4.1 Hydrolysekinetik der untersuchten Lysolipide: Einfluss des pH- Wertes bei aufsteigender Inkubationszeit

Im Folgenden werden die Lysolipid- bzw. Alkylphosphocholinanteile in Form einer Kinetik aufgeführt. Damit ist erkennbar, wieviel Lysolipid bzw. Alkylphosphocholin nach verschiedenen Inkubationszeiten bei einer Temperatur von 45°C und einem Puffermilieu mit pH 1,1 bzw. 12,9 reagiert haben, was bedeutet, dass die veresterte Fettsäure am Glycerinmolekül bzw. Phosphorsäuremolekül abgespalten wurde.

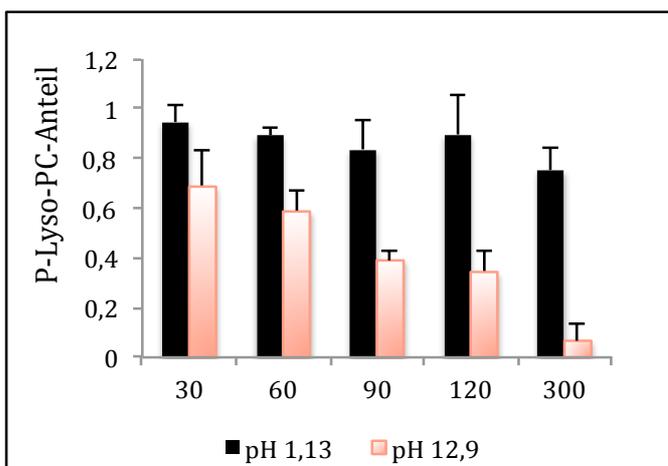


Abb. 3.9: Verbleibender P-Lyso-PC-Anteil nach 30-, 60-, 90-, 120- und 300-minütiger Hydrolyse bei pH 1,1 bzw. 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C. Anzahl der Messwerte $n=3$.

Sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu nimmt der P-Lyso-PC-Anteil, wie in Abb. 3.9 aufgeführt, mit steigender Inkubationszeit ab, obschon bei pH 12,9 bereits nach 30 Minuten mit 69% ein tieferer Wert erreicht ist als nach 300 Minuten bei pH 1,1 mit 75%. Der Lysolipidanteil im stark Basischen fällt bis zum Versuchsende auf 7%.

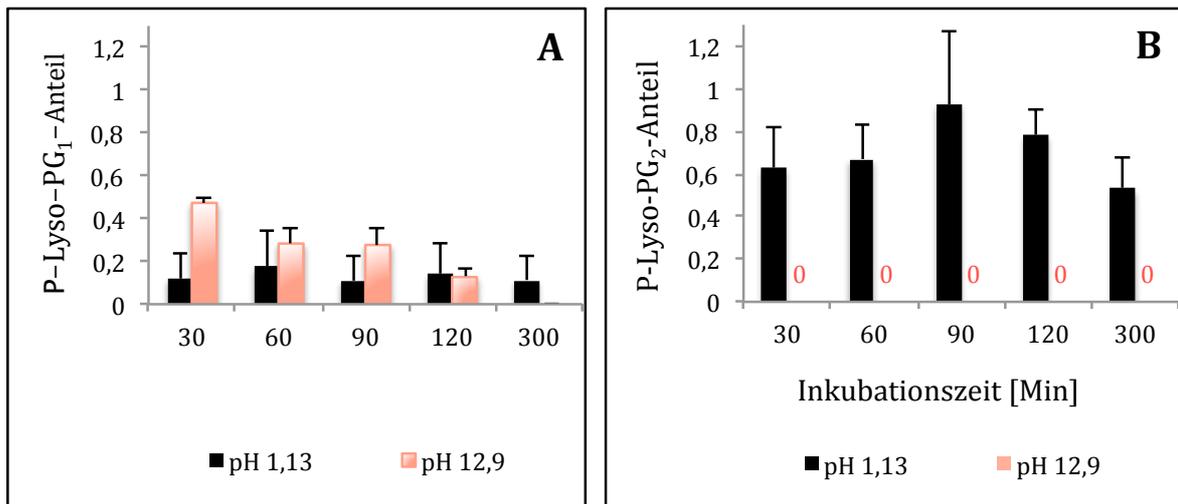


Abb. 3.10: Verbleibender P-Lyso-PG₁-Anteil (A) bzw. P-Lyso-PG₂-Anteil (B) nach 30-, 60-, 90-, 120- und 300-minütiger Hydrolyse bei pH 1,1 bzw. 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C. Anzahl der Messwerte n=3.

Diagramm A der Abbildung 3.10 lässt erkennen, dass bei pH 1,1 bereits nach 30 Minuten nur noch 12% des P-Lyso-PG₁ vorliegen, wobei dieser Wert bis zum Versuchsende auf diesem Niveau bleibt. Im alkalischen Milieu hingegen findet man nach einer halben Stunde noch circa 50% des Lysolipids, das aber mit zunehmender Inkubationszeit vollständig hydrolysiert wird.

Ähnlich dem P-Lyso-PC sind im Sauren stets über 50% des P-Lyso-PG₂ (Abb.3.10 B) zu finden. Im alkalischen Milieu ist dagegen bereits nach 30 Minuten das P-Lyso-PG₂ vollständig hydrolysiert worden.

Insgesamt entsteht der Eindruck, dass es bei den Lysolipiden P-Lyso-PC und P-Lyso-PG₂ im Basischen schneller zur Hydrolyse kommt, wohingegen dies beim P-Lyso-PG₁ im Sauren der Fall ist.

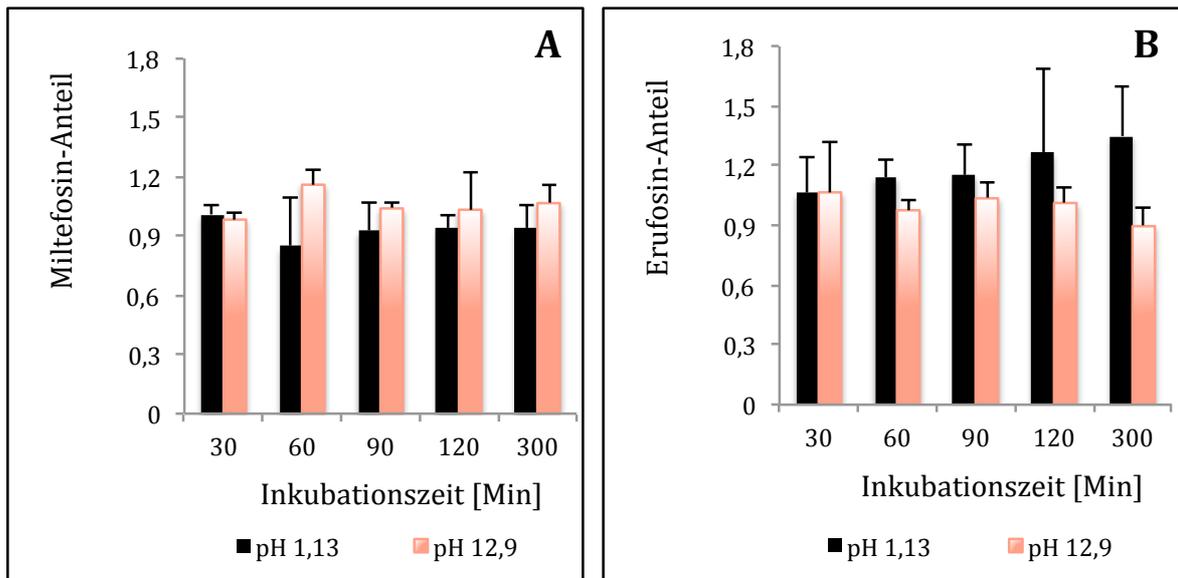


Abb. 3.11: Verbleibender Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)-Anteil (A) bzw. Erucylphosphohomocholin (Erufosin)-Anteil (B) nach 30-, 60-, 90-, 120- und 300-minütiger Hydrolyse bei pH 1,1 bzw. 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C. Anzahl der Messwerte $n=3$.

Demgegenüber stehen die in Abbildung 3.11 dargestellten Alkylphosphocholine Hexadecylphosphocholin und Erucylphosphohomocholin. Beide Stoffe zeigen sowohl im sauren als auch alkalischen Puffersystem über die gesamte Inkubationszeit hinweg konstant hohe Werte. Dies bedeutet, dass insgesamt wenig Hydrolyse stattfindet.

Der Hydrolyseversuch der beiden Alkylphosphocholine kann als Negativkontrolle angesehen werden, da es sich hierbei um sehr stabile Moleküle handelt. Dies wird gerade im Vergleich zu den untersuchten Lysolipiden bestätigt.

3.4.2 Temperatureinfluss auf die Hydrolyse der Lysolipide bei konstanter Inkubationszeit

Neben der Hydrolysekinetik interessiert zusätzlich, wie viel des Lysolipids bzw. Alkylphosphocholins nach einer 18-stündigen Inkubationszeit bei einer Temperatur von -20°C bzw. 45°C und einem pH-Wert von 1,1 bzw. 12,9 hydrolysiert worden ist.

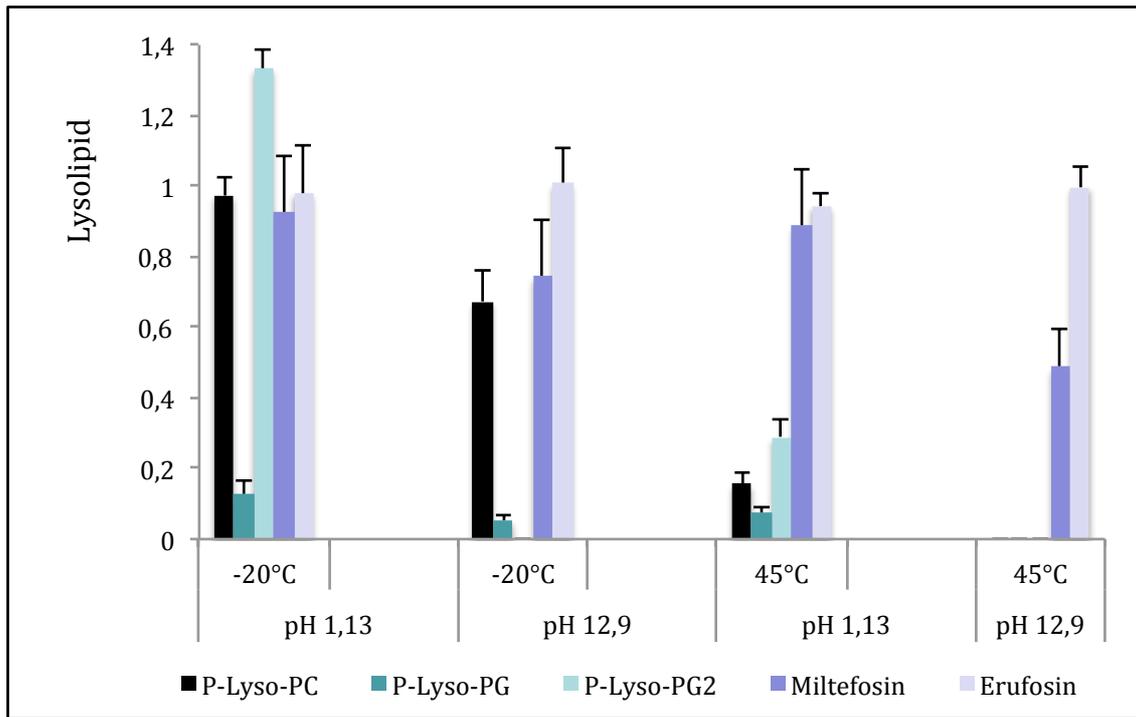


Abb. 3.12: Verbleibender Anteil der Lysolipide P-Lyso-PC, P-Lyso-PG₁, P-Lyso-PG₂ und der Alkylphosphocholine Miltefosin und Erufosin nach 18-stündiger Hydrolyse bei einer Inkubationstemperatur von -20°C bzw. 45°C und einem Puffersystem mit pH 1,1 bzw. 12,9. Anzahl der Messwerte n=3.

Die Abbildung 3.12 verdeutlicht, dass die beiden Alkylphosphocholine Erufosin und Miltefosin innerhalb 18 Stunden Inkubationszeit weniger Hydrolyse zeigen, als das P-Lyso-PC, P-Lyso-PG₁ und P-Lyso-PG₂, was die hohen Werte des Erufosin mit minimal 94% bei pH 1,1 und 45°C erklären. Miltefosin wird im Sauren kaum (92% bei -20°C und 89% bei 45°C Inkubationstemperatur), im stark Basischen mit 74% bei -20°C und 49% bei 45°C etwas stärker hydrolysiert. Die Prozentangaben sind – wie in den Abbildungen 3.9-3.11 – als der Anteil der Alkylphosphocholine bzw. Lysolipide zu verstehen, der nicht abgebaut wurde.

Die drei Lysolipide sind weitaus weniger stabil: Das P-Lyso-PC zeigt zwar im gefrorenen Zustand mit 97% bei pH 1,1 und 67% bei pH 12,9 noch hohe Werte, doch ändert sich dies bei einer Temperatur von 45°C dahingehend, dass im sauren Milieu nur noch 16% detektiert werden und im Basischen eine vollständige Hydrolyse abgelaufen ist. Bei den Lysolipiden mit zusätzlicher Glycerinveresterung fällt auf, dass sie sich bei hohen Temperaturen genauso verhalten wie das P-Lyso-PC, hingegen es bei -20°C Unterschiede gibt. Hierbei zeigt das P-Lyso-PG₁ im Sauren und Basischen Werte von unter 20%. Das P-Lyso-PG₂ wird bei pH 1,1 hingegen gar nicht, bei pH 12,9

aber vollständig hydrolysiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit zunehmender Temperatur die Hydrolyserate steigt, wenngleich diese im Alkalischen höher zu sein scheint als im Sauren.

3.5 DOX-Einschluss bei unterschiedlichen pH-Werten und DC-Analytik zur Bestimmung der Lysolipidanteile

Wie die bisherigen Versuche des Ergebnisteils zeigen, haben Parameter wie Temperatur oder pH-Wert einen Einfluss auf die Hydrolyse von Phospholipiden, welche die Liposomenmembran aufbauen. Der Einschluss des Zytostatikums Doxorubicin findet bei 38,0°C statt und bedarf einer Dauer von ca. 2h, wobei der pH-Wert außerhalb der Liposomen bei pH 7,8 und im Inneren bei pH 4,0 liegt. Als chemische Substanz könnte das Doxorubicin Wechselwirkungen mit den Phospholipiden zeigen. Daher ist interessant zu sehen, ob der Einschlussvorgang an sich und das Doxorubicin unter den beschriebenen Bedingungen ebenso Auswirkungen auf die Lysolipidbildung haben.

Dazu werden drei verschiedene Liposomenformulierungen untersucht: Zwei davon bestehen im molaren Verhältnis 50:20:30 aus DPPC, DSPC und DPPG₂ und unterscheiden sich darin, dass für die Hydratisierung 300mM Citrat (pH 4,0) bzw. 240mM Ammoniumsulfat (pH 5,4) verwendet werden. Die aus DPPC, DSPC, DPPG₃ (50:20:30) gebildeten Liposomen werden mit 300mM Citrat (pH 4,0) hydratisiert. Ein unmittelbarer Pufferaustausch gegen HN-Puffer (pH 7,8) durch Chromatographie über Sephadex-Säulen findet bei allen drei statt.

Zur Beurteilung des Lysolipidanteils der Phospholipide DPPC, DPPG₂ und DPPG₃ werden jeweils Proben während der Einschlussphase zum Zeitpunkt 60 bzw. 120 Minuten entnommen und nach entsprechender Aufbereitung mittels DC analysiert. Die Beurteilung des Einschlussgrades von Doxorubicin erfolgt über Fluoreszenzspektroskopie, wobei der erste Wert bei 0 Minuten als Referenz zu verstehen ist und alle folgenden dazu ins Verhältnis gesetzt werden und durch Differenzbildung den prozentualen Doxorubicineinschluss zeigen.

Bezüglich der Einschlussbedingungen ist zu sagen, dass neben der

Inkubationstemperatur von 38°C eine Lipidkonzentration von 3,0mM mit einem Verhältnis von Doxorubicins zu Lipid von 0,13 (mol/mol) vorliegt. Der pH-Wert des externen Puffers wird im 0,2-Intervall von 7,0 bis hin zu 8,2 variiert.

3.5.1 P-Lyso-PC-und P-Lyso-PG₂-Bestimmung

Die Bildung der Lysolipidanteile wird durch Verwendung zweier Liposomenchargen mit unterschiedlichen Hydratisierungspuffern, nämlich Citrat bzw. Ammoniumsulfat beurteilt, wodurch der pH-Wert im Inneren der Liposomen bei 4,0 bzw. 5,4 liegt.

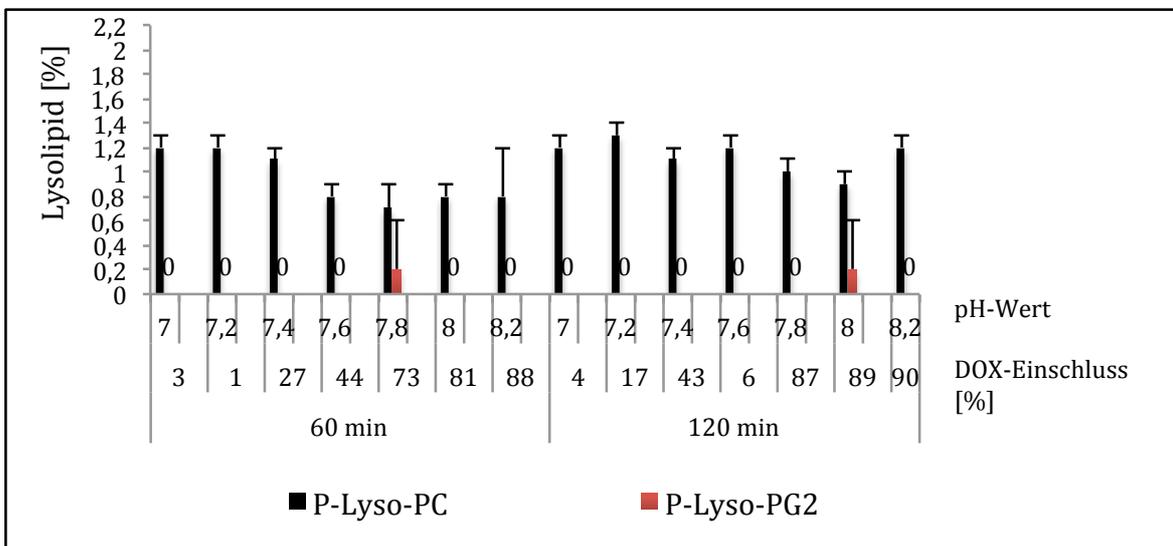


Abb. 3.13: Prozentualer Lysolipidanteil während des DOX-Einschlusses in mit Citrat (pH 4,0) hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG₂-Liposomen (50:20:30) nach 60 bzw. 120 Minuten in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers unter Angabe der prozentualen Einschlussmenge bei einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.

Wie die Abbildung 3.13 zu erkennen gibt, finden sich sowohl nach einstündigem als auch zweistündigem DOX-Einschluss in die mit Citrat hydratisierten Liposomen der Formulierung DPPC/DSPC/DPPG₂ (50:20:30) nur sehr geringe Mengen an Lysolipiden in den untersuchten Proben.

Das P-Lyso-PC liegt im untersuchten pH-Bereich von 7,0 bis 8,2 stets unter 1,5%, während das P-Lyso-PG₂ nach 60 Minuten und pH 7,8 bzw. 120 Minuten und pH 8,0 jeweils mit 0,2% zu tragen kommt. Anhand des prozentualen DOX-Einschlusses ist

erkennbar, dass dieser bei pH 8,2 am besten möglich war.

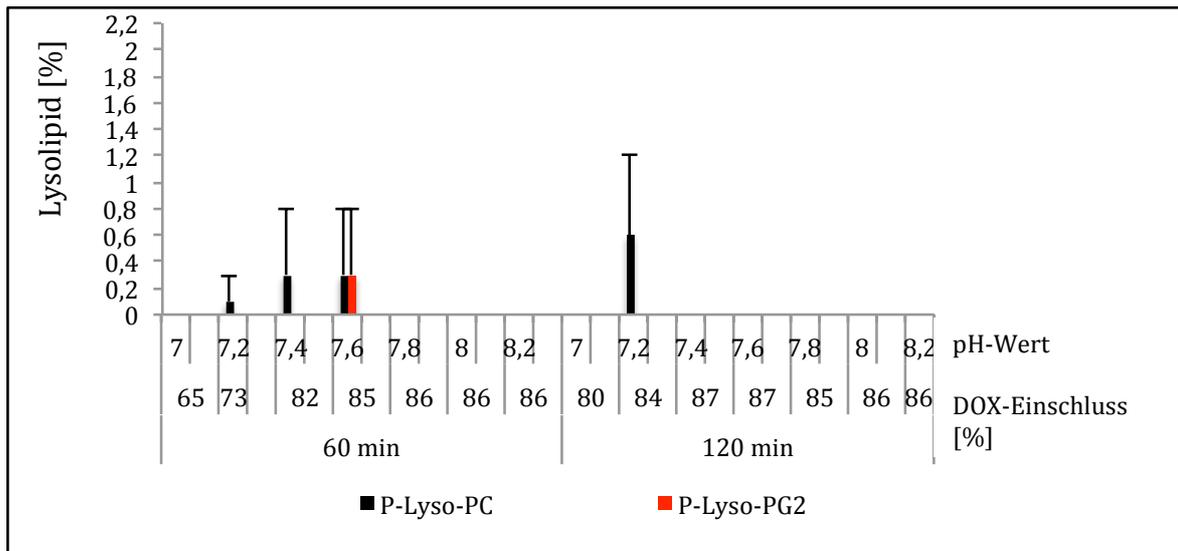


Abb. 3.14: Prozentualer Lysolipidanteil während des DOX-Einschlusses in mit Ammoniumsulfat (pH 5,4) hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG₂-Liposomen (50:20:30) nach 60 bzw. 120 Minuten in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers unter Angabe der prozentualen Einschlussmenge bei einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.

Auch beim DOX-Einschluss in Liposomen mit der Zusammensetzung DPPC/DSPC/DPPG₂ (50:20:30), welche mit Ammoniumsulfat hydratisiert wurden, werden nur geringe Lysolipidanteile detektiert. Gemäß Abb. 3.14 findet sich nach 60 Minuten beim P-Lyso-PC mit 0,3% der höchste Wert sowohl bei pH 7,4 als auch pH 7,6. Das P-Lyso-PG₂ wird bei der 60-Minuten-Probe lediglich bei pH 7,6 mit 0,3% gemessen. Bei der Zeitmarke 120 Minuten ist nur das P-Lyso-PC bei pH 7,2 mit 0,6% vorhanden. Der DOX-Einschluss funktionierte prozentual gesehen sowohl nach 60 als auch 120 Minuten im Bereich pH 7,4 bis 8,2 mit über 80% am besten.

3.5.2 P-Lyso-PC-und P-Lyso-PG₃-Bestimmung

Der Unterschied dieser Formulierung zu den vorangehenden liegt darin, dass anstatt von DPPG₂ DPPG₃ verwendet wird. Die Hydratisierung erfolgt mit Citrat, wodurch der pH-Wert im Liposomeninneren bei 4,0 liegt. Da bei den pH-Werten 7,0 bis einschließlich 7,6 des umgebenden Puffers der Einschluss des Zytostatikums nur sehr gering war, wurde bei den restlichen die Lipidkonzentration im Sinne eines erhöhten Liposomenvolumens um fast 40% erhöht. Damit verändert sich das DOX/Lipid-

Verhältnis von 0,13 mol/mol hin zu 0,095.

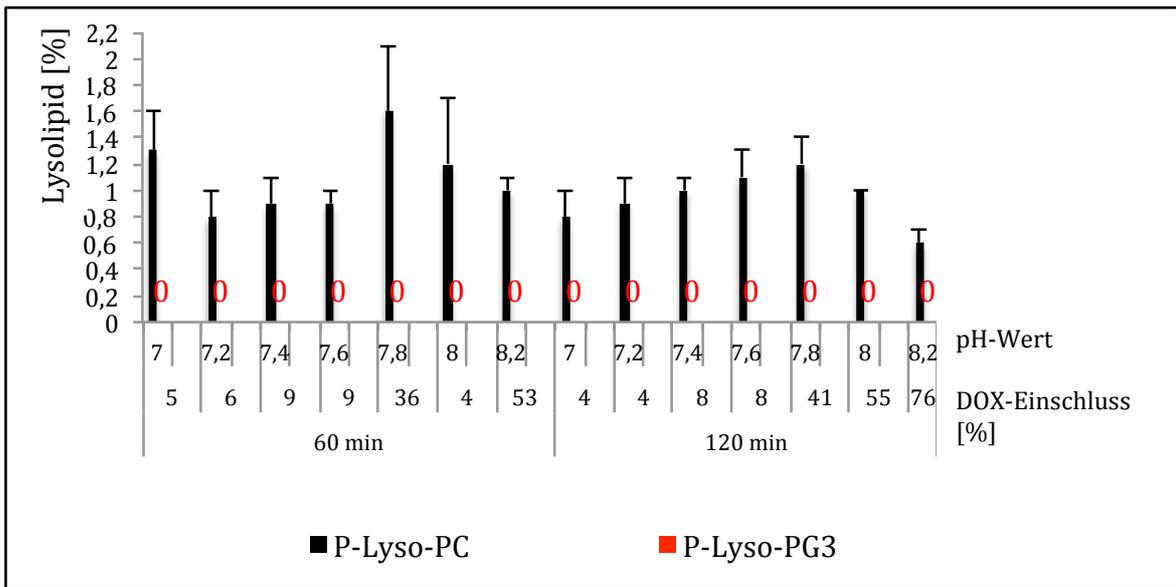


Abb. 3.15: Prozentualer Lysolipidanteil während des DOX-Einschlusses in mit Citrat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG₃-Liposomen (50:20:30) nach 60 bzw. 120 Minuten in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers unter Angabe der Einschlussmenge bei einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.

Die Abb. 3.15 zeigt auf, dass das P-Lyso-PC bei der Liposomenformulierung mit DPPG₃ anstelle des DPPG₂ stets unter 2,0% liegt, während das P-Lyso-PG₃ zu keinem Zeitpunkt und pH-Wert detektiert wird.

3.5.3 Bildung des Quotienten der Ausgangslipide

Um mögliche Weiterreaktionen der Zersetzungsprodukte herauszurechnen, wird der Quotient aus DPPG₂ bzw. DPPG₃ und der Summe aus DPPC und DSPC (=DXPC) gebildet. Damit kann beurteilt werden, ob das DPPG₂ bzw. DPPG₃ oder das DXPC stärker hydrolysiert worden ist.

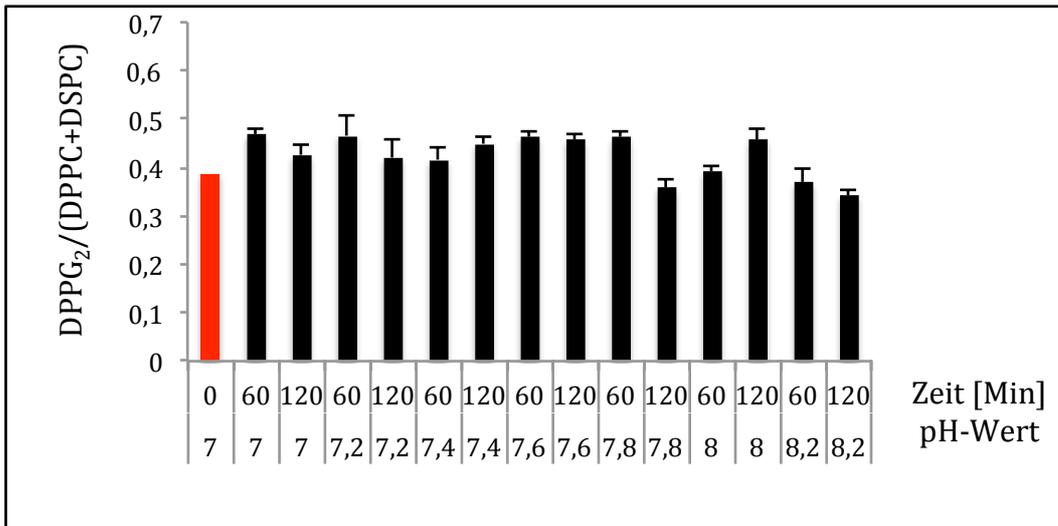


Abb. 3.16: $DPPG_2/(DPPC+DSPC)$ -Verhältnis während des DOX Einschusses in mit Citrat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG₂-Liposomen (50:20:30) in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte nach 60 bzw. 120 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte $n=3$.

Der in Abbildung 3.16 dargestellte rote Balken gibt das Lipidverhältnis von DPPG₂ zur Summe aus DPPC und DSPC direkt nach der Herstellung der Liposomen wieder, welches bei 0,39 liegt. Davon ausgehend bleibt der Quotient bis zum pH-Wert 7,8 (60 Minuten) auf einem höheren Niveau über 0,42 relativ konstant und fällt dann auf 0,34 bei pH 8,2 und 120 Minuten. Nur der 120-Minuten-Wert bei pH 8,0 fällt bei diesem Abwärtstrend mit 0,46 aus der Reihe.

Die kleiner werdenden Werte zeigen, dass die Menge an DPPG₂ im Vergleich zur Summe aus DPPC und DSPC stärker abnimmt, was bedeutet, dass auch beim DPPG₂ Hydrolyse stattfindet. Umgekehrt verhält es sich bei den ersten Werten, die größer als der Ausgangswert sind

In der folgenden Abbildung 3.17 ist zur vorangehenden lediglich ein anderer Hydratisierungspuffer verwendet worden, Ammoniumsulfat anstatt Citrat. Die Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran ist gleich.

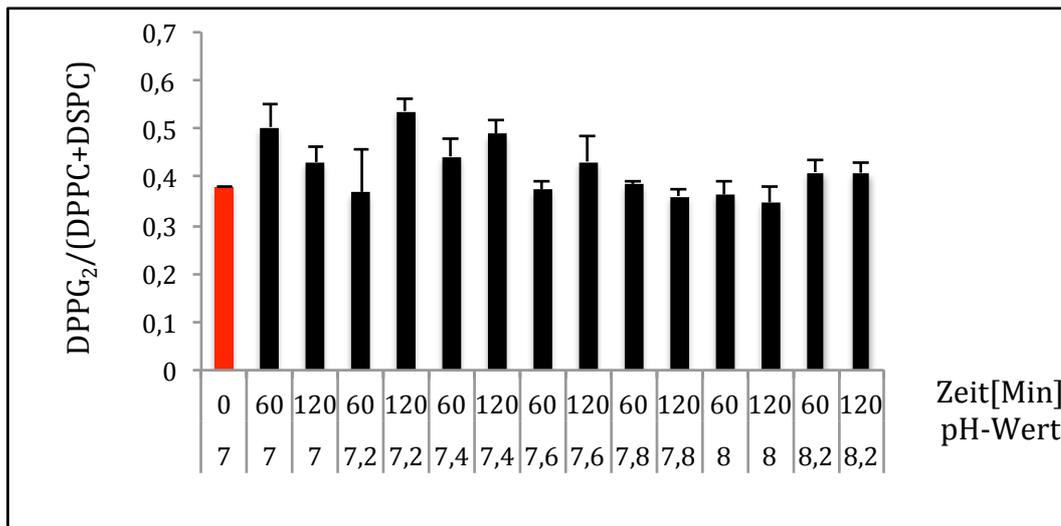


Abb. 3.17: $DPPG_2/(DPPC+DSPC)$ -Verhältnis während des DOX Einschusses in mit Ammoniumsulfat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG₂-Liposomen (50:20:30) in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers nach 60 bzw. 120 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.

Ausgehend vom roten Balken mit dem Wert 0,38 ist mit zunehmendem pH-Wert keine wirkliche Tendenz ablesbar. Die Werte bei pH 7,0 60 Minuten mit 0,50, bei pH 7,2, 120 Minuten mit 0,54 und bei pH 7,4, 120 Minuten mit 0,49 sind sehr hoch, wohingegen die Werte ab pH 7,8 nach 60-minütiger Inkubation mit 0,38 bis maximal 0,41 bei pH 8,2, 60 Minuten recht konstant bleiben.

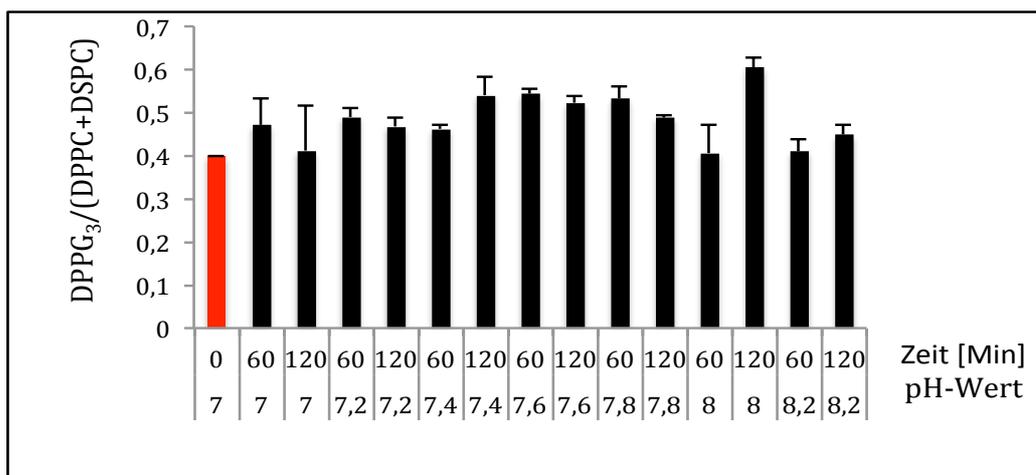


Abb. 3.18: $DPPG_3/(DPPC+DSPC)$ -Verhältnis während des DOX Einschusses in mit Citrat hydratisierten DPPC/DSPC/DPPG₃-Liposomen (50:20:30) in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte des äußeren Puffers nach 60 bzw. 120 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 38°C. Anzahl der Messwerte n=3.

Von der Versuchsaufbereitung her unterscheidet sich die Abbildung 3.18 im Vergleich zur Abbildung 3.16 nur darin, dass DPPG₂ durch DPPG₃ ersetzt wird. Damit wird der Quotient als DPPG₃ durch die Summe aus DPPC und DSPC gebildet.

Der Nullwert, welcher durch den roten Balken repräsentiert wird, liegt bei 0,40. Über die verschiedenen pH- und Zeitwerte hinweg ist ein Trend des Werteanstiegs erkennbar, wenngleich dieser bei pH 8,0 und pH 8,2 nach 60 Minuten und pH 7,0 nach 120 Minuten mit jeweils 0,41 nur marginal ist. Der höchste Wert wird bei pH 8,0 nach 120 Minuten mit 0,60 erreicht.

Das Absinken des Quotienten, vor allem in Abb. 3.16 und 3.17 im Vergleich zum Nullwert zeigt, dass unter den untersuchten Bedingungen neben der Bildung von P-Lyso-PC auch die Hydrolyse von DPPG_x (x=2,3) zu P-Lyso-PG_x (x=2,3) stattfindet, obwohl die Detektion der P-Lyso-PG_x (x=2,3) nur selten möglich war.

4 DISKUSSION

4.1 Weiterhydrolyse der Lysolipide

Die Weiterhydrolyse der Lysolipide ist für die quantitative Beurteilung der Phospholipidhydrolyse von entscheidender Bedeutung, so dass diese in den folgenden Kapiteln der Diskussion nochmals zur Sprache kommt.

Die Zusammenschau aus Abb. 3.5 C und Abb. 3.6 B verdeutlicht die Notwendigkeit, die Weiterhydrolyse der Lysolipide zu berücksichtigen: Der P-Lyso-PG₂-Anteil ist bei 45°C, pH 12,9 und 18-stündiger Inkubationszeit nicht nachweisbar, obwohl der Quotient aus DPPG₂ und DPPC durch das Absinken von 1,08 auf 0,36 bestätigt, dass bereits Hydrolyse des DPPG₂ stattgefunden hat. Abb. 3.10 B erklärt den Zusammenhang der beiden Werte, denn das P-Lyso-PG₂ ist unter diesen Bedingungen (pH 12,9, 45°C) bereits nach 30 Minuten vollständig zu Glycero-PG₂ weiterhydrolysiert worden und mittels DC in der durchgeführten Form nicht mehr detektierbar.

Die Versuche zur Weiterhydrolyse der Lysolipide (Abb. 3.9 und 3.10) zeigen, dass bei P-Lyso-PC und P-Lyso-PG₂ im stark Sauren wesentlich weniger Hydrolyse stattfindet als im stark Basischen. Der verbleibende P-Lyso-PC-Anteil ist nach 300 Minuten bei pH 1,1 um 69% höher als bei pH 12,9. Analog beträgt der Unterschied bei P-Lyso-PG₂ 53%. Das P-Lyso-PG₁ (Abb. 3.10 A) wird dagegen bei pH 1,1 anfangs wesentlich schneller abgebaut: Nach 30 Minuten liegen nur noch 12% Lysolipid vor, wobei dies bis 300 Minuten konstant bleibt, während bei pH 12,9 nach 30 Minuten noch 47% vorliegen bzw. nach 300 Minuten die Nachweisgrenze unterschritten wird.

Der Grund für die prozentualen Unterschiede liegt im Reaktionsmechanismus. Die saure Hydrolyse stellt eine reversible Reaktion dar, während die alkalische irreversibel abläuft (Falbe & Regitz, 1990). Das heißt, dass bei pH 12,9, nachdem sich aus dem Lysolipid das entsprechende Glycero-Analog gebildet hat, keine Rückreaktion im Sinne einer Lysolipidbildung stattfinden kann. Die Werte von P-Lyso-PC und P-Lyso-PG₁ in Abb. 3.9 und 3.10A bestätigen dies, da mit zunehmender Inkubationszeit der Lysolipidanteil stetig sinkt. Im Gegensatz dazu wird bei pH 1,1 ein Gleichgewichtszustand erreicht; Hin- und Rückreaktion, also Lysolipidhydrolyse und -bildung, laufen gleichermaßen ab ohne das Gleichgewicht zu verschieben,

solange der Druck, die Temperatur und die Konzentrationen der beteiligten Komponenten nicht verändert werden, die alle Einfluss auf die Lage des Gleichgewichts haben (Dickerson & Sighting, 1988). Abb. 3.9 und 3.10 zeigen, dass der Gleichgewichtszustand bereits nach 30 Minuten erreicht ist, da ab diesem Zeitpunkt der verbleibende Lysolipidanteil bis hin zu 300 Minuten Inkubationszeit nur noch geringfügig schwankt. Das stark saure Umgebungsmilieu (pH 1,1) beschleunigt dabei die Rückreaktion, die Esterbildung, und somit die Einstellung des Gleichgewichts (Buddrus, 2011).

Generell werden bei allen Versuchen Bedingungen mit ausreichend Protonen bzw. Hydroxid-Ionen gewählt. Die Konzentration des Lipids beträgt 1mmol/l, da 1 μ mol Lipid auf 1 ml Puffer gegeben wird. Weil die verwendeten Basen bzw. Säuren höher konzentriert sind, kann der äquimolare Umsatz bei der Verseifung erfolgen. Dies ist vor allem bei der basischen Hydrolyse, welche irreversibel in eine Richtung abläuft, bedeutend.

Beim Vergleich des P-Lyso-PC-Anteils (Abb. 3.9) mit dem P-Lyso-PG_x (x=1,2)-Anteil (Abb. 3.10) sind die höheren Werte des P-Lyso-PC sowohl im Säuren als auch Basischen auffällig, was für dessen höhere Stabilität spricht.

Bezüglich der Qualitätskontrolle klinisch relevanter DOX-Liposomen ist die Charakterisierung der Zersetzungsprodukte der Liposomen, welche von der Zulassungsbehörde gefordert wird, ein wichtiger Punkt (CHMP, 2013). Die oben beschriebenen Ergebnisse zur Weiterhydrolyse der Lysolipide beziehen sich auf die pH-Werte 1,1 und 12,9. Beurteilt man den ersten Hydrolyseschritt der Phospholipide DPPC und DPPG_x (x=1,2,3) für die pH-Werte 4,0, 6,6 und 7,4 anhand der Daten zur jeweiligen Lysolipid-Konzentration in Abb. 3.5 und Abb. 3.6, fällt auf, dass auch für diesen pH-Bereich die Weiterhydrolyse der Lysolipide relevant ist. Die geringe Detektion der Lysolipide (Abb. 3.5) in Kombination mit den sinkenden Quotientenwerte im Vergleich zur Nulllinie (Abb. 3.6) geben zu erkennen, dass die alleinige Bewertung des Lysolipid-Anteils nicht ausreicht, um die Hydrolyse der Liposomen adäquat abzubilden.

4.2 Effekt von pH-Wert und Temperatur auf die Hydrolyse der untersuchten Phospholipide

Die Hydrolyse der untersuchten Phospholipide zeigt eine pH-Abhängigkeit, was Grit und Crommelin 1993 für das gesättigte Phosphatidylcholin aus Sojabohnen beschrieben. Dabei wurde festgestellt, dass über den pH-Bereich von 4,0-9,0 eine v-förmige Hydrolyserate aufgezeichnet werden kann, welche bei pH 6,5 ein Minimum hat (Grit & Crommelin, 1993).

Die Versuche dieser Arbeit bestätigen, dass der Anteil der Lysolipide ansteigt, sobald das umgebende Milieu stärker sauer bzw. alkalisch wird. Abb. 3.3 A zeigt bei allen Messpunkten ab der 30. Minute, dass der P-Lyso-PC-Anteil bei pH 4,0 am geringsten ist und bei pH 1,1 und pH 12,9 entsprechend höher liegt. Selbiges zeigt Abb. 3.5 A bei 25°C, wo der geringste Wert mit 1,0% bei pH 6,6 zu finden ist, der über pH 7,4 bzw. 4,0 hin zu den pH-Werten 1,1 bzw. 12,9 stark zunimmt. Wie Abb. 3.6 darstellt, nehmen die Quotienten, je weiter das pH-Milieu vom Neutralpunkt entfernt ist, sowohl bei Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur (-20°C, 4°C, 25°C) (vor allem bei DPPG₃/DPPC) als auch oberhalb (45°C) tendenziell ab, was einer vermehrten Hydrolyse der DPPG_x (x=1,2,3) entspricht. Damit kann gesagt werden, dass der pH-Einfluss vermutlich unabhängig von der L_α-oder L_β-Lipidphase ist.

Bei den DPPG_x (x=1,2,3) trifft der Einfluss des pH-Wertes auch zu, wenngleich die Weiterhydrolyse der entstehenden Lysolipide stärker berücksichtigt werden muss als beim P-Lyso-PC, was Abb. 3.9 und Abb. 3.10 verdeutlichen, da diese beim P-Lyso-PG_x (x=1,2) im stark Sauren und Alkalischen verglichen mit P-Lyso-PC stärker abläuft. Das heißt, dass die Lysolipide der DPPG_x (x=1,2,3) in Abb. 3.3 und 3.5 vor allem bei pH 1,1 und pH 12,9 nicht die exakt stattgefunden Hydrolyse sondern teils kleinere Werte darstellen, da bereits der nächste Hydrolyseschritt – in Form der Abspaltung der zweiten Fettsäure – stattgefunden hat. Werden nur die Lysolipidanteile bei pH 6,6 und pH 7,4 in Abb. 3.5 B, C, D betrachtet, die allesamt im nicht nachweisbaren Bereich liegen, wird bestätigt, dass um den Neutralpunkt im Vergleich zu den anderen aufgeführten pH-Werten (1,1, 4,0, 12,9) weniger Hydrolyse stattfindet. Die entsprechenden Quotienten in Abb. 3.6 bestätigen dies, da die Werte im stark sauren bzw. basischen Milieu über die Temperatur hinweg stärker schwanken, als dies bei pH 6,6 und pH 7,4 der Fall ist.

Bezüglich des Temperatureinflusses zeigten Grit und Crommelin 1993, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Phospholipid-Hydrolyse synthetischer und natürlicher DPPC mit der Arrhenius-Gleichung beschrieben werden kann, da bei halb-logarithmischer Auftragung ein linearer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstante der beobachteten Hydrolyserate und dem reziproken Wert der absoluten Temperatur besteht (Grit & Crommelin, 1993).

Betrachtet man die Lysolipidanteile des DPPC und DPPG_x (x=1,2,3) der Abb. 3.5 vergleichend bei 4°C und 25°C, bestätigt sich, dass der Lysolipidanteil mit steigender Temperatur bei allen untersuchten Phospholipiden zunimmt. Der Grund liegt darin, dass eine Temperatursteigerung einer erhöhten Energiezufuhr entspricht. Da die Esterhydrolyse als exothermer Prozess Aktivierungsenergie benötigt, läuft sie bei 25°C stärker ab als bei 4°C.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Unterschied der Lysolipidanteile bei den Temperaturen -20°C, 4°C und 25°C im Vergleich zu 45°C: Sowohl die steigenden P-Lyso-PC/-PG_x (x=1,2,3)-Werte in Abb. 3.5 hin zu 45°C, als auch der Abfall der DPPG_x (x=1,2,3)/DPPC-Quotienten in Abb. 3.6 bei 45°C zeigen vermehrte Hydrolyse an. Die ersten drei Temperaturen liegen unter der Phasenumwandlungstemperatur, wodurch die Lipide eine solide Gelphase ausbilden. Bei 45°C liegt eine flüssig-kristalline Phase vor, da sich die Phasenumwandlungstemperaturen der DPPG_x (x=1,2,3) bei 40,2°C, 39,7°C bzw. 40,8°C (Schagon, 1997) und des DPPC bei 41°C befinden (Lindner & Hossann, 2010). Dabei kommt es zu einer Zunahme der gauche-Konformationen der C-C-Einzelbindungen in den Alkylketten der Phospholipide im Vergleich zur all trans-Konformation in der soliden Gelphase (Lindner & Hossann, 2010), (Mendelsohn, Davies, Brauner, Schuster, & Dluhy, 1989). Dies bewirkt weniger dicht gepackte Kohlenwasserstoffketten, wodurch die Permeabilität der Lipiddoppelschicht steigt (Lindner & Hossann, 2010). Die trans-Konformation, die energetisch gesehen stabiler als die gauche-Konformation ist (Lechner, Gehrke, & Nordmeier, 2010), zeigt somit eine geringere Phospholipid-Hydrolyse.

Somit kann gesagt werden, dass sowohl der Temperaturanstieg als auch der damit bedingte Wechsel der Lipidphase von der soliden Gelphase hin zur flüssig-kristallinen Phase eine Rolle bei der Phospholipid-Hydrolyse spielen. Beide Effekte führen zu einer erhöhten Bildung von Lysolipid.

Hierzu wird versucht, mithilfe der Arrhenius-Gleichung unter Annahme einer

Reaktion erster Ordnung die Lysolipide P-Lyso-PC/-PG_x (x=1,2,3), welche durch eine 18-stündige Inkubation der Formulierungen DPPC/DPPG_x (x=1,2,3) entstanden (vgl. Abb. 3.5), auszuwerten. Exemplarisch wird die Auftragung des P-Lyso-PC bei pH 4,0 gezeigt, da bei diesem pH-Wert einerseits Lysolipide detektiert werden und andererseits die Weiterhydrolyse derselben im Vergleich zu pH 1,1 oder 12,9 als geringer eingeschätzt wird.

Durch Auflösen der Arrhenius-Gleichung nach der logarithmierten Geschwindigkeitskonstante, die hier durch die Lysolipidkonzentration ersetzt wird, entspricht die Steigung der Geradengleichung dem Quotienten aus Aktivierungsenergie E_A und universeller Gaskonstante R .

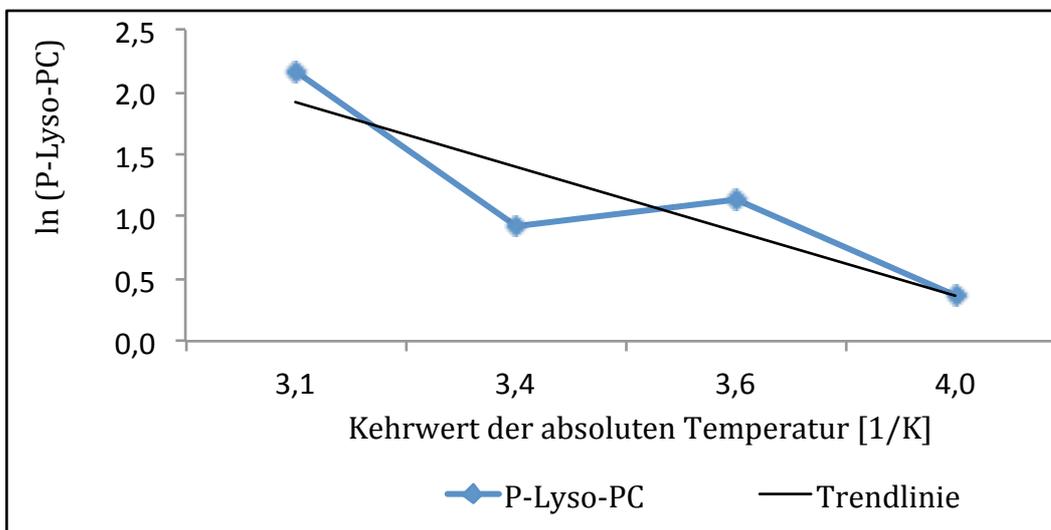


Abb. 4.1: Darstellung des natürlichen Logarithmus der entstandenen P-Lyso-PC-Konzentration bei der bei pH 4,0 für 18 Stunden stattfindenden Inkubation der Formulierung DPPC/DPPG₂ 50:50 (mol/mol) in Abhängigkeit des Kehrwertes der absoluten Temperatur.

Die in Abb. 4.1 gezeigte Auftragung der logarithmierten Lysolipidkonzentration in Abhängigkeit vom Kehrwert der absoluten Temperatur erlaubt eine lineare Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,79 und einer Steigung von -0,52. Nach der Theorie müsste sich die Steigung über der Phasenumwandlungstemperatur ändern, da sich die Aktivierungsenergie unter Umständen in der soliden Gelphase von der der flüssig-kristallinen Phase unterscheidet, was in einem Knick in der Geraden resultierte. Allerdings kann hierzu keine definitive Aussage getroffen werden, da zum

einen die Anzahl der Messungen nicht ausreicht und zum anderen der Temperaturbereich zu klein gewählt wurde, da nur eine Temperatur (45°C) über der Phasenumwandlungstemperatur liegt, so dass dies nicht weiterverfolgt wurde.

4.3 Gegenüberstellung der verwendeten Phospholipide und ihrer Hydrolyseprodukte

4.3.1 Vergleich des ersten und zweiten Hydrolyseschrittes von DPPC und DPPG_x (x=1,2)

Inkubationszeit [Min]	Detektiertes P-Lyso-PC [%] (DPPC → P-Lyso-PC)	Entstandenes Glycerol-PC [%] (P-Lyso-PC → Glycerol-PC)
30	2	31
60	4	41
90	4	51
120	4	66
300	3	93

Tab. 4.1: Zusammenfassung der prozentualen Anteile des detektierten P-Lyso-PC und des entstandenen Glycerol-PC aus der Reaktionsfolge DPPC → P-Lyso-PC → Glycerol-PC unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.⁵

Tab. 4.1 fasst den Abbau des DPPC bei einem pH-Wert des Puffers von 12,9, bei dem die Hydrolyse irreversibel abläuft, zusammen. Der erste Hydrolyseschritt, der an der sn-1 und sn-2 Position stattfinden kann, führt zum P-Lyso-PC, welches als 1-Acyl-Lysophospholipid aufgrund der höheren Stabilität gegenüber 2-Acyl-Lysophospholipid (Plueckthun & Dennis, 1982) durch Abspaltung der zweiten Fettsäure zum Glycerol-PC weiterreagiert. Auf der DC-Platte werden nach 30 Minuten bei der Inkubation von Liposomen der Formulierung DPPC/DPPG₂ 50:50 (mol/mol) bei pH 12,9 2% P-Lyso-PC detektiert, wobei nach dieser Zeit unter gleichen

⁵ Daten aus Abb. 3.3 A und 3.9.

Bedingungen bei P-Lyso-PC-Mizellen bereits 31% P-Lyso-PC zum Glycerol-PC weiterreagiert haben. Damit wird deutlich, dass der Wert 2% nicht die tatsächlich stattgefundenen Hydrolyse wiedergibt. Er müsste höher sein, da er das entstandene P-Lyso-PC, welches bereits weiterreagiert hat, nicht beinhaltet.

Desweiteren zeigen die Daten, dass aufgrund der wesentlich höheren Werte des entstandenen Glycerol-PC dieser zweite Hydrolyseschritt schneller abläuft als der erste, was auch von Kensil festgestellt wurde (Kensil & Dennis, 1981): Beim Übergang von 120 Minuten auf 300 Minuten sinkt das P-Lyso-PC von 4% auf 3%, während das Glycerol-PC von 66% auf 93% ansteigt. Dies verdeutlicht, dass nach 300 Minuten kaum noch P-Lyso-PC entsteht und zugleich das gebildete sofort weiterreagiert, was in Abb. 3.3 als Knick von 120 Minuten auf 300 Minuten erkennbar ist.

Inkubationszeit [Min]	Detektiertes P-Lyso-PG ₁ [%] (DPPG ₁ → P-Lyso-PG ₁)	Entstandenes Glycerol-PG ₁ [%] (P-Lyso-PG ₁ → Glycerol-PG ₁)
30	0	53
60	0	72
90	0,3	72
120	0,6	87
300	1	100

Tab. 4.2: Zusammenfassung der prozentualen Anteile des detektierten P-Lyso-PG₁ und des entstandenen Glycerol-PG₁ aus der Reaktionsfolge DPPG₁ → P-Lyso-PG₁ → Glycerol-PG₁ unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.⁶

Die zu Tab. 4.1 analoge Tabelle 4.2 zeigt die Reaktionsfolge von DPPG₁ über P-Lyso-PG₁ hin zum Glycerol-PG₁ bei pH 12,9 und verdeutlicht, dass der zweite Hydrolyseschritt dieses Phospholipids ebenso schneller abläuft als der erste.

⁶ Daten aus Abb. 3.3 B und 3.10 A.

Inkubationszeit [min]	Detektiertes P-Lyso-PG ₂ [%] (DPPG ₂ → P-Lyso-PG ₂)	Entstandenes Glycero-PG ₂ [%] (P-Lyso-PG ₂ → Glycero-PG ₂)
30	0	100
60	1,4	100
90	1,2	100
120	0,6	100
300	0	100

Tab. 4.3: Zusammenfassung der prozentualen Anteile des detektierten P-Lyso-PG₂ und des entstandenen Glycero-PG₂ aus der Reaktionsfolge DPPG₂ → P-Lyso-PG₂ → Glycero-PG₂ unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.⁷

Selbiges gilt für die Hydrolyse des DPPG₂, welche Tab. 4.3 darstellt. Dabei läuft der zweite und schnellere Hydrolyseschritt bereits nach 30 Minuten vollständig ab.

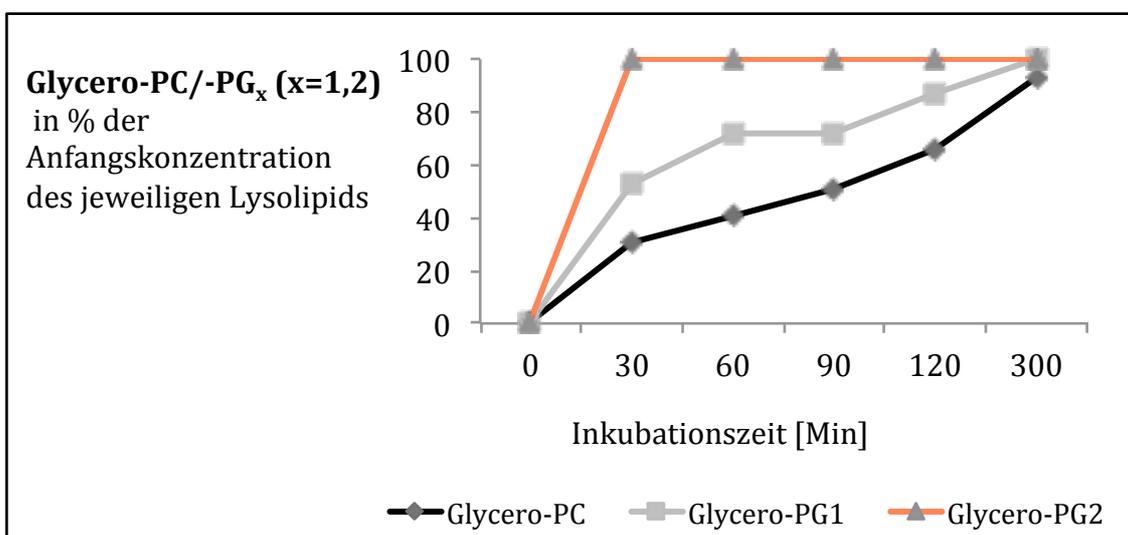


Abb. 4.2: Glycero-PC/-PG_x (x=1,2,) in Prozent der Anfangskonzentration der Lysolipide P-Lyso-PC/-PG_x (x=1,2) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei pH 12,9 und einer Inkubationstemperatur von 45°C.

Durch Vergleich der in Tab. 4.1 bis 4.3 aufgeführten Werte der Glycero-PC und Glycero-PG_x (x=1,2) ist – wie Abb. 4.2 verdeutlicht – erkennbar, dass mit steigender

⁷ Daten aus Abb. 3.3 C und 3.10 B.

Anzahl Glycerinmoleküle die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse der Lysolipide zunimmt. Die prozentualen Werte des Glycero-PG₂ ergeben zu allen Messzeitpunkten, angefangen bei 30 Minuten, eine vollständig stattgefundenen Umsetzung von P-Lyso-PG₂, wohingegen dies beim Glycero-PG₁ nach 300 Minuten der Fall ist. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die Detektion der Lysolipide mit steigender Glycerinanzahl zunehmend problematisch wird, da die Reaktionsgeschwindigkeit der sich anschließenden Weiterhydrolyse stetig zunimmt.

Desweiteren zeigt Abb. 4.2 graphisch, dass die Hydrolyse vom P-Lyso-PC zum Glycero-PC langsamer verläuft als dies für die P-Lyso-PG_x (x=1,2) der Fall ist.

4.3.2 Vergleich der Stabilität von DPPC und DPPG_x (x=1,2,3) anhand des ersten Hydrolyseschrittes

Die Quotientenbildung der Ausgangslipide, wie in Abb. 3.4 und 3.6 dargestellt, ist eine Möglichkeit, um den Abbau der Phospholipide hin zum Lysolipid nachzuvollziehen, ohne dabei die Weiterhydrolyse des Lysolipids berücksichtigen zu müssen. Die von Grit und Crommelin 1993 beschriebene schnellere Hydrolyse des natürlich vorkommenden DPPG₁ im Vergleich zum partiell hydrogenierten DPPC (Grit & Crommelin, 1993) wird durch die Versuche in dieser Arbeit mit den DPPG_x (x=1,2,3) bestätigt. Abb. 3.4 zeigt, dass der Quotient DPPG_x (x=1,2,3)/DPPC ausgehend vom Nullwert für alle drei DPPG_x (x=1,2,3) bei den pH-Werten 1,1, 4,0 und 12,9 über die zunehmende Inkubationszeit hin zu 300 Minuten bei 45°C sinkt, was bedeutet, dass der Anteil des DPPC im Vergleich zu DPPG_x (x=1,2,3) höher und das DPPC somit stabiler ist. Nimmt man den Temperatureinfluss hinzu, zeigt Abb. 3.6, dass DPPG₂ und DPPG₃ zudem bei -20°C, 4°C und 25°C instabiler sind als DPPC.

Ein Stabilitätsvergleich der DPPG_x (x=1,2,3) untereinander kann ebenso mittels Betrachtung der gebildeten Quotienten durchgeführt werden.

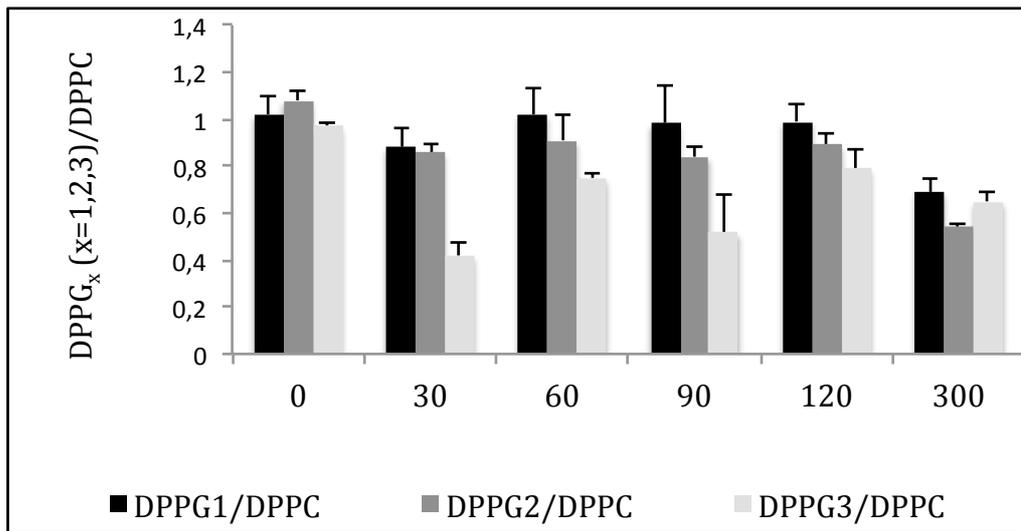


Abb. 4.3: Zusammenfassung der Quotienten der Ausgangslipide $DPPG_x$ ($x=1,2,3$)/DPPC unter Berücksichtigung der Inkubationszeit bei einem pH-Wert von 12,9 und einer Temperatur von 45°C.⁸

Definiert man k_1 als Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion des $DPPG_1$ zum P-Lyso-PG₁ und ebenso k_2 und k_3 entsprechend für die Reaktionen von $DPPG_2$ und $DPPG_3$ kann mithilfe der Abb. 4.3 gesagt werden, dass $k_1 < k_2 < k_3$. Denn mit Ausnahme des $DPPG_3$ /DPPC-Wertes nach 300 Minuten Inkubationszeit, nimmt der Wert des Quotienten zu allen aufgelisteten Zeitpunkten vom $DPPG_1$ hin zum $DPPG_3$ ab. Dabei fällt auf, dass der Unterschied zwischen den Werten von $DPPG_1$ und $DPPG_2$ bis zur 90. Minute geringer ist, als der Unterschied zwischen $DPPG_2$ und $DPPG_3$, sodass das $DPPG_3$ sogar wesentlich schneller abgebaut wird als das $DPPG_1$ bzw. $DPPG_2$. Mithilfe der Geschwindigkeitskonstanten lässt sich das wie folgt beschreiben: $k_1 < k_2 < k_3$.

Führt man diese Analyse ebenso für die Quotienten bei pH 1,1 durch, bestätigt sich, dass $DPPG_1$ stabiler als $DPPG_2$ ist und dieses sehr viel stabiler als $DPPG_3$. Auch bei pH 4,0 gibt es Unterschiede zwischen den $DPPG_x$ ($x=1,2,3$), wenngleich der Unterschied zwischen $DPPG_1$ und $DPPG_2$ sehr gering ausfällt, sodass gilt: $k_1 = k_2 < k_3$.

Betrachtet man Abb. 3.6 C, fällt auf, dass verglichen mit den Teilabbildungen A bzw. B bei pH 12,9 und 45°C der $DPPG_3$ /DPPC-Quotient verhältnismäßig hoch bei 0,74 liegt. Beim Analysieren der zugehörigen DC-Platte ist zu erkennen, dass die Banden relativ schwach gefärbt sind, was einer geringen Menge Lipid gleichkommt, wodurch die anschließende densitometrische Auswertung stärker fehlerbehaftet ist. Je nach Wahl

⁸ Daten aus Abb. 3.4.

der Baseline zur Berechnung der Flächen, welche als Äquivalent für die prozentuale Zusammensetzung der Liposomen gelten, können die Werte stark variieren, da der Auswertefehler umso höher ist, je näher der zu bestimmende Stoff an der Nachweisgrenze liegt. Somit ist dieser Quotient aus der Bewertung der Ergebnisse auszuschließen.

Ein weiteres Beispiel, welches zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstanten vom DPPG₁ zum DPPG₃ hin zunehmen, was einem schnelleren Abbau der Moleküle entspricht, ist in Abb. 3.6 bei -20°C und pH 6,6 zu finden. Grit und Crommelin, wie auch diese Arbeit in Abb. 3.5A, zeigen, dass im Bereich des Neutralpunktes die Hydrolyse des DPPC am geringsten ist. Damit kann davon ausgegangen werden, dass eine Veränderung des Balkens im Diagramm in Abb. 3.6 verglichen zur Nulllinie nahezu alleine auf die Hydrolyse der DPPG_x (x=1,2,3) zurückzuführen ist. Die Quotienten nehmen vom DPPG₁/DPPC mit 0,84 über 0,67 bei DPPG₂/DPPC hin zu 0,56 bei DPPG₃/DPPC kontinuierlich ab, sodass die zusätzlichen Glycerinmoleküle der Grund für den schnelleren Abbau des DPPG₂ und DPPG₃ im Vergleich zum DPPG₁ sein müssen. Dies kann damit erklärt werden, dass mit jedem weiteren Glycerinmolekül, welche aufgrund der zusätzlichen OH-Gruppen die Kopfgruppe hydrophiler machen, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erhöht wird. Die Folge ist, dass Wasser als polarer Dipol näher an das Molekül gelangt, wodurch die Hydrolyse beschleunigt wird.

4.4 Dünnschichtchromatographie zum Lysolipid-Nachweis bei der pharmazeutischen Anwendung von Doxorubicinliposomen

Beim Einschluss von Doxorubicin in DPPC/DSPC/DPPG_x (x=2,3) Liposomen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (60. bzw. 120. Minute) Proben entnommen, um den Lysolipidanteil der verwendeten Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie zu quantifizieren. Die Abb. 3.13-3.15 zeigen, dass P-Lyso-PC bei mit Citrat hydratisierten Liposomen um ca. 0,6% höhere Werte zeigt, als bei Hydratisierung mit Ammoniumsulfat. Auffällig ist, dass weder P-Lyso-PG₂ noch P-Lyso-PG₃ regelhaft auftraten, sondern sehr selten detektiert wurden. Durch zusätzliche Analyse der gebildeten Quotienten DPPG_x (x=2,3)/(DPPC+DSPC) kann, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, unabhängig von möglichen Weiterreaktionen der Lysolipide,

die tatsächliche Hydrolyse der Phospholipide hin zum Lysolipid besser beurteilt werden. Dabei fällt in den Abb. 3.16-3.18 auf, dass bei den drei untersuchten Liposomenformulierungen Quotientenwerte auftreten, wie beispielsweise in Abb. 3.16 bei pH 7,8 120 Minuten und pH 8,2 120 Minuten, die kleiner sind als der Nullwert, der vor der Beladung mit Doxorubicin gemessen wurde. Damit kann rückgeschlossen werden, dass auch bei den DPPG_x (x=2,3) Hydrolyse stattgefunden hat. Die P-Lyso-PG_x (x=2,3) wurden deshalb nicht mittels Dünnschichtchromatographie vollständig detektiert, weil zu diesem Zeitpunkt bereits die Weiterhydrolyse zum Glycerol-PG_x (x=2,3) stattgefunden hat. Dass die Weiterhydrolyse der P-Lyso-PG_x (x=1,2) schneller verläuft als des P-Lyso-PC, wurde in den Versuchen, die in Abb. 3.9 und 3.10 zusammengefasst sind, gezeigt.

Somit kann zwar mittels DC und der Quotientenbildung der Ausgangslipide eine Aussage getroffen werden, ob Hydrolyse stattgefunden hat, aber keine Quantifizierung vorgenommen werden, da die Weiterhydrolyse der Lysolipide mit der durchgeführten DC nicht detektiert werden kann. Der Versuch das käuflich zu erwerbende Glycerophosphocholin mittels DC zu detektieren war nicht möglich, da es aufgrund seiner Wasserlöslichkeit nicht extrahiert werden konnte. Zur genauen Beurteilung des entstehenden Lysolipidanteils bei der Beladung der Liposomen mit Doxorubicin ist die DC mit dem Molybdän-Spray als Färbemittel ungeeignet, da es zudem nur Moleküle mit einer Phosphatgruppe anfärbt. Alternativ könnte als Färbemittel Kupfersulfat eingesetzt werden, welches unspezifisch Kohlenstoffe und damit auch Moleküle ohne Phosphatgruppe anfärbt, sodass über die Quantifizierung der Fettsäuren Rückschlüsse auf die stattgefundenene Hydrolyse getroffen werden könnten. Für die Auftrennung mittels DC ist dabei ein anderes als hier verwendetes Laufmittel erforderlich.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es, das Hydrolyseverhalten der DPPG_x (x=1,2,3) untereinander und im Vergleich zu DPPC zu analysieren, wobei als klinische Anwendung der Doxorubicin-Einschluss näher betrachtet wurde, da bereits ein Liposom mit Doxorubicin zugelassen ist (Caelyx®), sich ein weiteres (ThermoDox®) in der klinischen Prüfung befindet (May & Li, 2013), (Harris, 2013) und eigene DOX-DPPG₂-TSL im Labor der Arbeitsgruppe entwickelt werden. Beiden gemeinsam ist die Beladung mittels eines pH-Gradienten, der sich aus den unterschiedlichen pH-Werten der Puffer im Liposomeninneren bzw. im Liposomen umgebenden Milieu ergibt.

Als Methode zur Beurteilung der stattgefundenen Hydrolyse wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt, für welche ein passendes Laufmittel erprobt wurde, um die einzelnen Lipide und ihre Lysolipide getrennt detektieren zu können.

Es hat sich gezeigt, dass die Hydrolyse des DPPG_x (x=1,2,3) ebenso wie des DPPC von pH-Wert und Temperatur abhängen, wobei DPPG_x (x=1,2,3) die Fettsäure schneller abspalten und somit instabiler sind als DPPC. Innerhalb der DPPG_x (x=1,2,3) nimmt die Stabilität vom DPPG₁ zum DPPG₃ hin ab, wenngleich dies vor allem auf die pH-Werte im stark Sauren bzw. stark Basischen zutrifft. Um den Neutralpunkt ist eine derartige Aussage schwer zu treffen, da die Inkubationszeiten hierfür zu kurz gewählt wurden.

Die Reaktion vom Lysolipid zum entsprechenden Glycero-Analogen läuft als zweiter Hydrolyseschritt schneller als der erste ab und zeigt sich bei den P-Lyso-PG_x (x=1,2) stärker als beim P-Lyso-PC. Da das zweite Hydrolyseprodukt mittels DC nicht erfasst werden konnte, kann keine genaue Aussage über die tatsächlich stattgefundenen Hydrolyse getroffen werden. Dies ist für die klinische Anwendung des Doxorubicin-Einschlusses problematisch, da aus pharmazeutischer Sicht sämtliche Bestandteile genau quantifiziert aufgeführt werden müssen, wofür die DC in der durchgeführten Form mit dem Molybdänspray als Anfärbemittel ungeeignet ist.

Bezüglich der Lagerung der Liposomen kann gesagt werden, dass diese bei leicht saurem pH-Wert stattfinden sollte. Einerseits zeigen die Ergebnisse bei pH 6,6 den geringsten Lysolipidanteil der DPPG_x (x=1,2,3) und DPPC und darüber hinaus eine

geringere Weiterhydrolyse der Lysolipide verglichen mit pH-Werten im leicht Alkalischen. Andererseits ist der Reaktionsmechanismus entscheidend: Die im sauren pH-Milieu reversibel stattfindende Hydrolyse steht im Gegensatz zur Irreversibilität im basischen Milieu, wodurch sich im Sauren ein Reaktionsgleichgewicht aus Hydrolyse und Veresterung einstellen kann, was den geringeren Lysolipidanteil mit erklärt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., & Yau-Young, A. 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1066(1): 29-36.

Becker, H. 1993. *Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum*. Leipzig: Deutscher Verlag der Wissenschaften.

Bell, R. M., Ballas, L. M., & Coleman, R. A. 1981. Lipid topogenesis. *J Lipid Res*, 22(3): 391-403.

Bergmann, & Schäfer. 2006. *Lehrbuch der Experimentalphysik Band 5 Gase Nanosysteme Flüssigkeiten*: Kleinermanns Karl.

Breitmeier, E., & Jung, G. 2009. Organische Chemie. Stuttgart: Thieme.

Buddrus, J. 2011. Grundlagen der Organischen Chemie. Berlin: De Gruyter.

Carrasco-Pancorbo, A., Navas-Iglesias, N., & Cuadros-Rodríguez, L. 2009. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(3): 263--278.

Cattel, L., Ceruti, M., & Dosio, F. 2003. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *Tumori*, 89(3): 237-249.

Charrois, G. J., & Allen, T. M. 2004. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1663(1-2): 167-177.

CHMP. 2013. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. London:

European Medicines Agency.

Deshpande, P. P., Biswas, S., & Torchilin, V. P. 2013. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond)*, 8(8): 1323-1342.

Dickerson, R. E., & Slichting, H.-W. 1988. Prinzipien der Chemie. Berlin, New York: Walter de Gruyter.

Eibl, H., & Lands, W. E. M. 1969. A New, Sensitive Determination of Phosphate. *Analytical Biochemistry*, 30: 51-57.

ElBayoumi, T. A., & Torchilin, V. P. 2009. Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res*, 15(6): 1973-1980.

Falbe, J., & Regitz, M. 1990. *Römpp Chemie Lexikon*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Fox, M. A., & Whitesell, J. K. 1995. *Organische Chemie: Grundlagen, Mechanismen, bioorganische Anwendungen*. New York: Spektrum Akademischer Verlag.

Fuchs, B., Suss, R., & Schiller, J. 2010. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res*, 49(4): 450-475.

Grit, M., & Crommelin, D. J. 1992. The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chem Phys Lipids*, 62(2): 113-122.

Grit, M., & Crommelin, D. J. 1993. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids*, 64(1-3): 3-18.

Guyard-Dangremont, V., Desrumaux, C., Gambert, P., Lallemand, C., & Lagrost, L. 1998. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comp Biochem Physiol B Biochem*

Mol Biol, 120(3): 517-525.

Harris, E. 2013. Industry Update: The latest developments in therapeutic delivery. **Ther Deliv**, 4(10): 1229-1234.

Hillaireau, H., & Couvreur, P. 2009. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cell Mol Life Sci**, 66(17): 2873-2896.

Hogle, J. M. 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. **Annu Rev Microbiol**, 56: 677-702.

Hossann, M., Wiggenghorn, M., Schwerdt, A., Wachholz, K., Teichert, N., Eibl, H., Issels, R. D., & Lindner, L. H. 2007. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. **Biochim Biophys Acta**, 1768(10): 2491-2499.

Huang, Z., Jaafari, M. R., & Szoka, F. C., Jr. 2009. Disterolphospholipids: nonexchangeable lipids and their application to liposomal drug delivery. **Angew Chem Int Ed Engl**, 48(23): 4146-4149.

ICH, Expert Working Group. 2003. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), **International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**.

Ickenstein, L. M., Sandstrom, M. C., Mayer, L. D., & Edwards, K. 2006. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG2000 liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. **Biochim Biophys Acta**, 1758(2): 171-180.

Issels, R. D. 2008. Hyperthermia adds to chemotherapy. **Eur J Cancer**, 44(17): 2546-2554.

Issels, R. D., Lindner, L. H., Verweij, J., Wust, P., Reichardt, P., Schem, B. C., Abdel-

Rahman, S., Daugaard, S., Salat, C., Wendtner, C. M., Vujaskovic, Z., Wessalowski, R., Jauch, K. W., Durr, H. R., Ploner, F., Baur-Melnyk, A., Mansmann, U., Hiddemann, W., Blay, J. Y., & Hohenberger, P. 2010. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol*, 11(6): 561-570.

Kaasgaard, T., & Andresen, T. 2010. Liposomal cancer therapy: exploiting tumor characteristics. *Expert Opin Drug Deliv*, 7: 225-243.

Kaasgaard, T., Andresen, T. L., Jensen, S. S., Holte, R. O., Jensen, L. T., & Jorgensen, K. 2009. Liposomes containing alkylated methotrexate analogues for phospholipase A(2) mediated tumor targeted drug delivery. *Chem Phys Lipids*, 157(2): 94-103.

Karp, G. 2005. Molekulare Zellbiologie. Berlin: Springer.

Keck, C. M., & Müller, R. H. 2009, *Moderne Pharmazeutische Technologie*. Berlin.

Kensil, C. R., & Dennis, E. A. 1981. Alkaline hydrolysis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biochemistry*, 20(21): 6079-6085.

Kneidl, B., Peller, M., Winter, G., Lindner, L. H., & Hossann, M. 2014. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 4387-4398.

Latscha, H. P., Kazmaier, U., & Klein, H. A. 2008. Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II. In Springer-Verlag (Ed.), Sechste, vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin.

Lechner, M. D., Gehrke, K., & Nordmeier, E. H. 2010. Makromolekulare Chemie. Basel: Birkhäuser.

Lindner, L. H., Eichhorn, M. E., Eibl, H., Teichert, N., Schmitt-Sody, M., Issels, R. D., &

Dellian, M. 2004. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res*, 10(6): 2168-2178.

Lindner, L. H., & Hossann, M. 2010. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13(1): 111-123.

May, J. P., & Li, S. D. 2013. Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv*, 10(4): 511-527.

McMullen, T. P., Lewis, R. N., & McElhaney, R. N. 1993. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry*, 32(2): 516-522.

Meier, O., & Greber, U. F. 2003. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*, 5(6): 451-462.

Mendelsohn, R., Davies, M. A., Brauner, J. W., Schuster, H. F., & Dluhy, R. A. 1989. Quantitative determination of conformational disorder in the acyl chains of phospholipid bilayers by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 28(22): 8934-8939.

Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., & Dewhirst, M. W. 2000. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res*, 60(5): 1197-1201.

Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., & Isac, T. 1973. Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochem.Biophys.Acta*, 311: 330-348.

Plueckthun, A., & Dennis, E. A. 1982. Acyl and phosphoryl migration in lysophospholipids: importance in phospholipid synthesis and phospholipase specificity. *Biochemistry*, 21(8): 1743-1750.

Ponce, A. M., Vujaskovic, Z., Yuan, F., Needham, D., & Dewhirst, M. W. 2006. Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. *Int J Hyperthermia*, 22(3): 205-213.

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. 2008. *Biochemie*. Stuttgart: Thieme.

Schagon, O. 1997. *Liposomen als potentielle Arzneistoffträger: Variation der biopharmazeutischen Eigenschaften durch 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-oligo-glycerine* Aachen: Shaker Verlag.

Schiller, J., & Arnold, K. 2000. Mass spectrometry in structural biology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: 559-585.

Schiller, J., Suss, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Lessig, J., Muller, M., Petkovic, M., Spalteholz, H., Zschornig, O., & Arnold, K. 2004. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res*, 43(5): 449-488.

Sigma-Aldrich. 1994. Enzymatic Assay of Phospholipase A2 (EC 3.1.1.4).

Sofou, S., & Sgouros, G. 2008. Antibody-targeted liposomes in cancer therapy and imaging. *Expert Opin Drug Deliv*, 5: 189-204.

Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., & Subramaniam, S. 2007. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res*, 35(Database issue): D527-532.

Torchilin, V. P. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4(2): 145-160.

Torchilin, V. P. 2006. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(14): 1532-1555.

Tu, Y., & Kim, J. 2008. A fusogenic segment of glycoprotein H from herpes simplex virus enhances transfection efficiency of cationic liposomes. *The Journal of Gene Medicine*, 10: 646-654.

van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2): 112-124.

Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151: 220-228.

Wang, T., Hossann, M., Reinl, H. M., Peller, M., Eibl, H., Reiser, M., Issels, R. D., & Lindner, L. H. 2008. In vitro characterization of phosphatidylglycerol-based thermosensitive liposomes with encapsulated ¹H MR T1-shortening gadodiamide. *Contrast Media Mol Imaging*, 3(1): 19-26.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Lars Lindner und Herrn Dr. Martin Hossann, welche mir die Aufnahme in die AG Liposomen ermöglichten.

Durch die überaus spannende Aufgabenstellung und ihr breites Fachwissen im Bereich der Liposomenforschung wurde mein Interesse zusätzlich geweckt und erweitert.

Die lückenlose Betreuung durch Herrn Dr. Hossann in Form zahlreicher produktiver Diskussionen, Empfehlungen und Hilfestellungen sowohl in der theoretischen Konzeption als auch in der praktischen Ausführung der Versuche, war zu jedem Zeitpunkt herausragend.

Ich danke darüber hinaus Anja Zengerle, MTA, welche gerade zu Beginn viel Zeit opferte, um mir die im Labor etablierten Methoden anzulernen. Während der gesamten Zeit stand sie mir bereitwillig mit großer Unterstützung zur Seite.

Ein weiteres „Danke“ möchte ich den Mitdotorandinnen Annabel Alig und Simone Limmer aussprechen, welche mich einerseits fachlich, andererseits aber auch freundschaftlich Tag für Tag begleiteten und dadurch eine bereichernde Atmosphäre im Labor schafften.

Eidesstattliche Versicherung

Budweiser, Johannes

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Hydrolyseverhalten der synthetischen Phospholipide DPPG_x (x=1,2,3) im Vergleich zu DPPC in thermosensitiven Liposomen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15. Juli 2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand