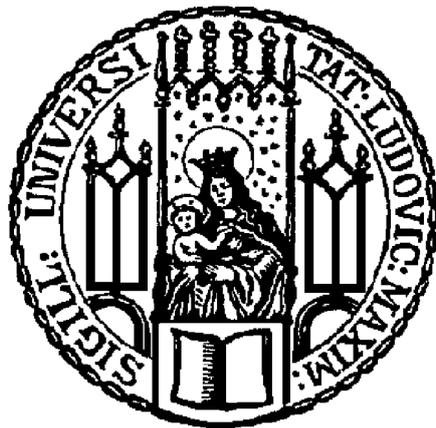

Einfluss von hydrostatischem Druck auf DPPG₂-haltige
thermosensitive Liposomen



Dissertation von Lucas Schröder-Doms

München 2022

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik III in Großhadern

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Einfluss von hydrostatischem Druck auf DPPG₂-haltige
thermosensitive Liposomen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Lucas Schröder-Doms

aus Buchholz in der Nordheide

2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lars Lindner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Rehberg

Prof. Dr. med. Franz Worek

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Hossann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der antineoplastischen Chemotherapie	1
1.2 Einsatz von Hyperthermie in der Therapie onkologischer Erkrankungen	1
1.3 Biologische Membranen	3
1.4 Einfluss von hydrostatischem Druck	6
1.5 Thermosensitive Liposomen	9
1.5.1 Cholesterin	10
1.5.2 DPPG ₂ als Membranlipid	10
1.5.3 DPPC als Membranlipid	11
2 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Lipide, Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer und hergestellte Lösungen	15
3.2 Herstellung thermosensitiver Liposomen	16
3.2.1 Herstellen des Lipidfilms	17
3.2.2 Hydratisierung	17
3.2.3 Extrusion	17
3.2.4 Carboxyfluorescein-Einschluss	18
3.2.5 Säulenchromatographie und Pufferaustausch	18
3.3 Charakterisierung und Analyse	19

3.3.1	Größen- und Zetapotentialmessung (ξ -Potential)	19
3.3.2	Ermittlung des Lipidgehalts (Phosphatbestimmung)	21
3.3.3	Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie	24
3.3.4	Temperaturprofil	26
3.3.5	Öffnungskinetik	27
3.3.6	Stabilitätsmessung	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Methodenentwicklung DLS-Messung unter Druck	31
4.1.1	Anforderung an Messverfahren	31
4.1.2	Zielfindung	31
4.1.3	Aufbau und Messablauf	32
4.2	Proof-of-Principle	34
4.3	Effekte	37
4.3.1	Formulierungen und Charakterisierung	37
4.3.2	Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die TSL-Größe	42
4.4	Passiver Carboxyfluorescein-Einschluss bei Unterdruck	47
4.4.1	Formulierungen und Charakterisierung	48
4.4.2	Temperaturprofile von bei Unterdruck mit CF beladenen PG ₂ -TSL	51
5	Diskussion	57
5.1	Methodenentwicklung DLS-Messung unter Druck	58
5.2	Herstellung und Charakterisierung von TSL	59
5.3	Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf TSL	61
5.3.1	Hydrostatischer Druck	62
5.3.2	Temperatur	65
5.3.3	Cholesterin und PEG-2000 als Membranbestandteil	65

5.3.4	Einfluss von in TSL eingeschlossenem Kristall	67
5.4	Passiver Carboxyfluorescein-Einschluss bei Unterdruck	69
5.4.1	CF-Einschluss bei 900 mbar	70
5.4.2	CF-Einschluss bei ≤ 800 mbar	72
5.4.3	Temperaturabhängige CF-Freisetzung der TSL	74
5.5	CF-Freisetzung von PG ₂ -TSL in Anwesenheit von LAV und Humanalbumin	78
6	Zusammenfassung und Ausblick	81
7	Literaturverzeichnis	87
8	Bildquellen	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Illustration der Balance lateraler Kräfte im Lipid-Monolayer	4
Abbildung 1.2 Anordnung der Kohlenstoffketten während unterschiedlicher Phasenzustände	5
Abbildung 1.3 T_m der Hauptumwandlung von DMPC-MLV in H_2O in Abhängigkeit von hydrostatischem Druck	7
Abbildung 1.4 Strukturformel DPPG ₂ (1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglycerol	11
Abbildung 1.5 Struktur von DPPC und DSPC	11
Abbildung 3.1 Säulenchromatographie	19
Abbildung 3.2 Druckexperiment-Durchführung im Zetasizer	21
Abbildung 3.3 TSL- und Referenzstandards-Inkubation im Heizblock zur Ermittlung des Lipidgehalts	23
Abbildung 3.4 Regressionsgerade aus Phosphatstandard	23
Abbildung 3.5 DC-Platte nach Lauf und Färbung unterschiedlicher TSL-Formulierungen	25
Abbildung 3.6 Densitometrische Auswertung der DC-Platte	26
Abbildung 4.1 Pascal'sches Gesetz	32
Abbildung 4.2 Aufbau / Messküvetten-Anschluss für Druckexperimente.	34
Abbildung 4.3 Intraday-Präzision der DLS-Messung bei 25°C ohne Druck (Standard)	35
Abbildung 4.4 Intraday-Präzision der DLS-Messung bei 25°C und 140 mmHg	36
Abbildung 4.5 Größenverteilung der untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C	38
Abbildung 4.6 ζ -Potential der untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C	38
Abbildung 4.7 CF-Lipid Verhältnis der untersuchten TSL-Formulierungen	39
Abbildung 4.8 PdI der untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C	39
Abbildung 4.9 Einschlusseffizienz der untersuchten TSL-Formulierungen	40
Abbildung 4.10 CF-Freisetzung cholesterinhaltiger PG ₂ -TSL bei Inkubation in FCS bei 37°C	41

Abbildung 4.11 CF-Freisetzung von PG ₂ -TSL bei Inkubation in Anwesenheit von LAV (DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol)) bzw. Humanalbumin (40g/L) in FCS bei 37°C	42
Abbildung 4.12 Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die Vesikelgröße (z- Average)	46
Abbildung 4.13 z-Average bei 25°C nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)	49
Abbildung 4.14 PDI nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)	49
Abbildung 4.15 ζ-Potential nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)	50
Abbildung 4.16 CF-Lipid Verhältnis nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)	50
Abbildung 4.17 Einschlusseffizienz nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (PG-TSL- V1)	51
Abbildung 4.18 Temperaturprofil von PG-TSL-V1 in NaCl nach passivem CF-Einschluss	52
Abbildung 4.19 Temperaturprofil von PG-TSL-V1 in FCS nach passivem CF-Einschluss	52
Abbildung 4.20 CF-Freisetzung nach passivem Einschluss für PG-TSL-V1 nach 60-minütiger Inkubation	53
Abbildung 4.21 Temperaturprofil von PG-TSL-V2 in NaCl nach passivem CF-Einschluss	54
Abbildung 4.22 Temperaturprofil von PG-TSL-V2 in FCS nach passivem CF-Einschluss	54
Abbildung 4.23 CF-Freisetzung nach passivem Einschluss für PG-TSL-V2 nach 60-minütiger Inkubation	55
Abbildung 5.1 Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die Vesikelgröße (z- Average) unterschiedlicher TSL-Formulierungen;	62
Abbildung 5.2 Relative Größenänderung unterschiedlicher TSL-Formulierungen	64
Abbildung 5.3 relative Größenänderung von cholesterinhaltiger TSL im Vergleich	66
Abbildung 5.4 relative Größenänderung von PG ₂ -TSL mit (+) und ohne (-) Doxorubicin, sowie PEG2000-TSL im Vergleich	68

Abbildung 5.5 Mittlere Einschlusseffizienz (Atmosphäre - 700 mbar) nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (PG-TSL-V1 vs. PG-TSL-V2)	72
Abbildung 5.6 z-Average im Mittel für PG-TSL-V1 (10 Min.) (Atmosphäre - 800 mbar) vs. (700 - 400 mbar)	73
Abbildung 5.7 CF-Lipid Verhältnis für PG-TSL-V1 (10 Min.) (Atmosphäre - 800 mbar) vs. (700 - 400 mbar)	73
Abbildung 5.8 CF-Freisetzung nach 60 Min. Inkubation in FCS bei 42 °C	77
Abbildung 5.9 CF-Freisetzung von PG ₂ -TSL bei Inkubation in Anwesenheit von LAV (DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol)) bzw. Humanalbumin (40g/L) in FCS bei 37°C, Grafische Darstellung der Formel zur Berechnung der CF-Freisetzung von PG ₂ -TSL+LAV	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Temperaturabhängige Phasenzustände von Doppellipidmembranen	5
Tabelle 2 Phasenumwandlungstemperatur einzelner Phospholipide	6
Tabelle 3 Intraday-Präzision DLS bei 25°C ohne Druck (Standard)	35
Tabelle 4 Intraday-Präzision DLS bei 25°C und 140 mmHg: Messergebnisse (z-Average & Pdl)	36
Tabelle 5 Hergestellte TSL-Formulierungen und ihre Eigenschaften	37
Tabelle 6 Temperatur- und Druckeinfluss auf den TSL-Durchmesser	44
Tabelle 7 Charakterisierung der TSL-Formulierungen des CF-Einschlusses bei Unterdruck	48

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest	Zweifach-destilliertes Reinstwasser
CF	Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterin
CV	Variationskoeffizient
DC	Dünnschichtchromatographie
DLS	dynamischer Lichtstreuung
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOX	Doxorubicin
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG2	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerin
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG2000	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FS	Fettsäure
GFC	Gelfiltrations-Chromatographie
GUV	Giant unilamellar vesicles
HA	Humanalbumin
HCC	hepatozelluläres Karzinom
LAV	Lipidakzeptorvesikel
Ld-Phase	Liquid disordered Phase
Lo-Phase	Liquid ordered Phase
LUV	Large unilamellar vesicles
MW	Mittelwert
MLV	Multilamellare Vesikel
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
PC	Phosphatidylcholin

Abkürzungsverzeichnis

PdI	Polydispersionsindex
P-Lyso-PC	1-Palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAXS	Small-angle X-ray scattering
SD	Standardabweichung
StSt	Steady State
SUV	Small unilamellar vesicles
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TSL	Thermosensitive Liposomen

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der antineoplastischen Chemotherapie

Im Jahre 1906 waren es der deutsche Arzt und Forscher Paul Ehrlich (* 14. März 1854 – † 20. August 1915) und sein japanischer Kollege Sahachiro Hata (* 23. März 1873 – † 22. November 1938), die mit der organischen Arsenverbindung *Arsphenamin* erstmals eine gezielte Therapie der Syphilis entdeckten und so den Begriff der Chemotherapie definierten (19, 20).

Im Rahmen der Chemotherapie werden Stoffe eingesetzt, die möglichst gezielt Bakterien (antimikrobielle Chemotherapie) oder Tumorzellen (antineoplastische Chemotherapie) abtöten bzw. deren Zellwachstum hemmen. Das Spektrum von in der onkologischen Therapie eingesetzten Zytostatika reicht von klassischen Alkylantien die durch Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA eine Hemmung der DNA-Replikation bewirken, bis hin zur zielgerichteten Therapie mit z.B. monoklonalen Antikörpern. Hierbei können zytostatische (das Wachstum der Zelle hemmende) und zytotoxische (die Zelle schädigende) Wirkungen unterschieden werden.

Der Schweregrad des Auftretens klassischer Nebenwirkungen einer antineoplastischen Chemotherapie wie Übelkeit und Erbrechen, Blutbildveränderungen, Haarausfall und Fatigue ist abhängig von der verwendeten Substanz, der individuellen Verträglichkeit, wie auch von der erreichten Plasmakonzentration des Chemotherapeutikums im Blut des Patienten. Die Reduktion schwerwiegender Nebenwirkungen wie z.B. das Auftreten einer Kardiomyopathie nach stattgehabter Anthracyclin-Therapie sind Mittelpunkt aktueller Forschung. So wird aktuell das z.B. EDTA-Analogon *Dexrazoxan* zur Risikoreduktion der Ausbildung einer irreversiblen Herzinsuffizienz nach Anthracyclin-Therapie bzw. zur Vermeidung von Nekrosen bei Anthrazyklin-Paravasation eingesetzt (83). Ähnliche Effekte verspricht man sich durch den gezielten Transport von Wirkstoffen in Nanocarriern (z.B. TSL) mit gezielter Freisetzung im Tumorgewebe.

1.2 Einsatz von Hyperthermie in der Therapie onkologischer Erkrankungen

Die heilende Wirkung von Fieber ist bereits seit der griechischen Antike bekannt. Im Jahre 1866 war es der deutsche Chirurg und Hochschullehrer Karl David Wilhelm Busch, der den Einfluss von Erysipelen auf organisierte Neubildungen beschrieb (12).

Zu einem gezielten Einsatz in der Onkologie kam die Hyperthermie allerdings erst in den 1890er Jahren. Durch das Wissen über Fallberichte von Erysipel-Infektionen bei Sarkom-Patienten und beobachteter Remission wurde im Verlauf durch William B. Coley die iatrogene Infektion mit Streptokokken in der Sarkom-Therapie eingesetzt (13, 22).

Aus dieser nebenwirkungsreichen, schlecht steuerbaren, systemischen, durch einen pyogenen Krankheitserreger induzierten Hyperthermie entwickelte sich Mitte des 20. Jahrhunderts die therapeutische Hyperthermie der Onkologie. Mittels Infrarotlicht, Mikrowellen, Radiowellen oder Ultraschall wird eine moderate Erhöhung der Körpertemperatur bzw. des Tumorgewebes auf 39-44°C induziert. In der Folge kommt es u.a. zu einer Vasodilatation, Steigerung der Gefäßwandpermeabilität / Perfusion und dadurch bedingt höherer Anreicherung von systemisch zirkulierenden Zytostatika im Hyperthermie-Gebiet. Es ist bekannt, dass bei Gewebetemperaturen zwischen 41,5°C und 43,5°C mehr Zellschaden auf Seiten der malignen Zellen als bei nicht-malignen entsteht (78).

Die verstärkte Gewebeperfusion führt zu einer verbesserten Oxygenierung, was insgesamt aufgrund der erhöhten Strahlensensibilität von oxygenierten Zellen gegenüber hypoxischen eine Radiosensibilisierung bedingt (46).

Die Ganzkörperhyperthermie wird meist bei stark metastasierten Tumorleiden eingesetzt und bedarf aufgrund der kardiozirkulatorischen Belastung häufig einer Sedierung bzw. Narkose des Patienten. Im Gegenteil hierzu kommt es bei der Teilkörperhyperthermie ausschließlich zu einer Wärmebündelung im Tumorgebiet, so dass systemische Komplikationen seltener beobachtet werden (56).

Die therapeutische Hyperthermie wird meist bei irresektablen, lokal fortgeschrittenen oder rezidivierenden Tumoren angewandt, wobei es ergänzend zu etablierten Therapien (Chemo-, Radio-, Immuntherapie, kombinierte Therapien) eingesetzt wird.

Klinische Studien haben für kombinierte Therapien von Strahlentherapie bzw. Chemotherapie mit regionaler Tiefenhypertherapie ein höheres Ansprechen, ein verlängertes schmerzfreies Intervall und ein verlängertes Gesamtüberleben nachweisen können. Für die Ganzkörperhyperthermie fehlt bislang der wissenschaftliche Nachweis der Wirksamkeit, so dass diese Methode außerhalb von klinischen Studien nicht empfohlen werden kann (2, 3, 6, 55, 48, 49, 51, 50, 52–54, 74, 96).

1.3 Biologische Membranen

Biologische Membranen bestehen aus Lipiden und Proteinen, welche überwiegend als Doppellipidschicht angeordnet eine multifunktionelle Barriere zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten bzw. Zellen bilden. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell kann die Doppellipidschicht von biologischen Membranen als eine zweidimensionale Suspension gesehen werden, in welcher sich Lipide und integrale Membranproteine nahezu frei bewegen können. Neben der für Lipide und integrale Membranproteine beschriebenen lateralen Diffusion innerhalb der eigenen Lipidschicht, ist für Phospholipide zusätzlich eine transversale Diffusion (sog. FlipFlop) von einer Seite der Doppelschicht zur anderen beschrieben (99).

Diese transversale Diffusion wird durch Phospholipidtranslokatoren, also ATP abhängige Transportproteine, ermöglicht. Je nach Transferrichtung werden Flippasen (Aminophospholipide von der extrazellulären zur cytosolischen Schicht), Floppasen (= ATP-Binding Cassette Transporter; entgegengesetzter Transport von der cytosolischen zur extrazellulären Schicht) und Scramblasen (Lipidtransport in beide Richtungen) unterschieden (14, 32).

In der letzten Zeit wurden in der Doppellipidschicht vorkommende, sich mit der übrigen Matrix nicht mischbare und in der flüssigkristallinen Phase angeordnete Bereiche (sog. lipid rafts) beschrieben. Diese Mikrodomänen sind reich an Cholesterin, Glycosphingolipid und Sphingomyelin und scheinen an der Signaltransduktion, Endo-, sowie Exozytose beteiligt zu sein (1, 15, 61, 94).

Die Phospholipide bestehen aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen. Ihre Organisation in der Doppellipidschicht geschieht durch ein Gleichgewicht zwischen anziehenden und abstoßenden Kräften. Zwischen der Kopfgruppe wie auch den Kohlenwasserstoffketten unterschiedlicher Phospholipide bestehen abstoßende Kräfte (lateraler Druck), wobei diese durch hydrophobe Wechselwirkungen am Lipid-Wasser-Übergang und bestehende Van-der-Waals-Interaktionen zwischen den Kohlenwasserstoffschwänzen ausgeglichen werden (112) (siehe Abbildung 1.1).

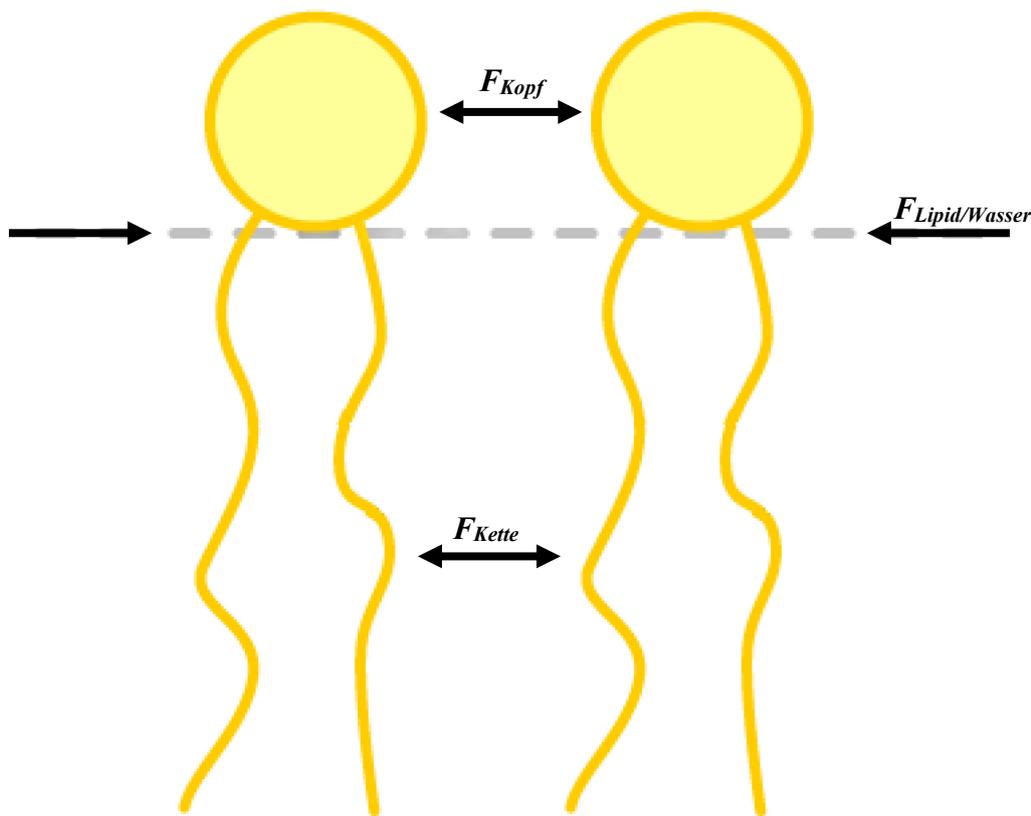


Abbildung 1.1 Illustration der Balance lateraler Kräfte im Lipid-Monolayer

Für die Kohlenwasserstoffketten der Phospholipid-Membranen sind unterschiedliche Phasenzustände beschrieben, die sich durch jeweils unterschiedliche Eigenschaften auszeichnen und mittels Phasenübergängen ineinander übergehen. Bei sehr tiefen Temperaturen zeigt sich eine nahezu kristalline Ordnung (L_c). Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit lagen die Liposomen (Nanovesikel, die aus einer Doppellipidschicht bestehen und in 1.5 eingehender beschrieben werden) bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck bekanntermaßen in der sog. gelförmigen Phase ($L_{\beta'}$) vor, einer Konformation in welcher die Kohlenwasserstoffketten verzogen jedoch geordnet in einem quasi-hexagonalem Gitter sind. Bei Überschreiten der Phasenübergangstemperatur T_m geht die geordnete Phase in eine ungeordnete sog. flüssig-kristalline Phase (L_{α}) über. In dieser kann ein lamellenartiges Bilayer mit ungeordneten Kohlenwasserstoffketten beobachtet werden. Zwischen der gelförmigen und flüssig-kristallinen Phase wird eine sog. Ripplephase ($P_{\beta'}$) mit übergeordneter, wellenförmiger Bilayer-Oberflächenstruktur beobachtet (104)(siehe Tabelle 1 und Abbildung 1.2).

Tabelle 1 Temperaturabhängige Phasenzustände von Doppellipidmembranen

Phasenzustand		
L_c	kristalline Phase	T_c Vorumwandlung 1
$L_{\beta'}$	gelförmigen Phase	
$P_{\beta'}$	Ripplephase	T_p Vorumwandlung 2
L_{α}	flüssig-kristalline Phase	T_m Hauptumwandlung

Zu einem Phasenübergang kommt es aufgrund von Änderung der trans-gauche Isomerisierung der C-Atome der Kohlenwasserstoffketten. Bei niedrigen Temperaturen liegen die C-C-Bindungen hauptsächlich in der trans-Konformation vor (Torsionswinkel 180° , minimale Enthalpie). Bei T_m kommt es zu einer Konformationsänderung der Acylketten mit Rotation der C-C-Bindung um 120° hin zur gauche-Konformation (Torsionswinkel 60° [+ gauche] bzw. 300° [-gauche], hohe Enthalpie). Durch die zunehmende Unordnung der Ketten und Volumensteigerung in der Membran kommt es zu einer Abnahme der Van-der-Waals-Kräfte mit verstärkter Wirkstofffreisetzung in thermosensitiven Liposomen.

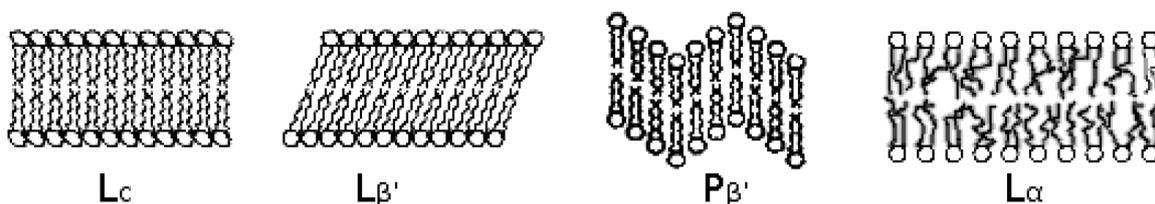


Abbildung 1.2 Anordnung der Kohlenstoffketten während unterschiedlicher Phasenzustände

Für Membranen die nur aus einem Phospholipid bestehen, können scharfe Phasenübergänge beobachten (z.B. für DPPC eine Vorumwandlung T_p bei 34°C , sowie eine Hauptumwandlung

T_m bei 41°C). Hierbei hat die Länge der Kohlenwasserstoffketten, Struktur und Ladung der polaren Kopfgruppen einen direkten Einfluss auf die Umwandlungstemperatur (57, 59, 68, 70). Für 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) bspw. ist bei T_m eine Zunahme des spezifischen Lipid-Volumens V_{L^*} von $\sim 3\%$ ($\Delta V_{L^*} = 0,028 \pm 0,001 \text{ cm}^3/\text{g} \triangleq 32 \text{ \AA}^3/\text{Molekül}$) am ehesten hervorgerufen durch die Unordnung der Ketten mit zunehmender gauche-Konformation beschrieben. Nach Überschreiten von T_m kommt es bis ca. 50 °C bei DMPC zu einer weiteren, allerdings sehr geringe Zunahme von V_{L^*} (66, 79).

Mit zunehmender Kohlenwasserstoffketten-Länge kommt es zu einem nichtlinearen Anstieg der Umwandlungstemperatur T_m (35). Exemplarisch ist in Tabelle 2 eine Übersicht über T_m für ausgewählte Lipide dargestellt.

Tabelle 2 Phasenumwandlungstemperatur einzelner Phospholipide

Lipid	Kopfgruppe	C-Atom-Kettenlänge	T_m [°C]
DMPC	Cholin	14	24
DPPC	Cholin	16	41,5
DSPC	Cholin	18	55
DPPG	Glycerin	16	40,2
DPPG ₂	Diglycerin	16	40,8

Mittlerweile sind für einige Membranlipide auch nichtlamellare flüssig-kristalline (invertierte hexagonale Q_{II}^P , Q_{II}^G , Q_{II}^D , sowie kubische H_{II}) Phasenzustände beschrieben (73, 98, 111).

Neben diesen temperaturabhängigen Phasenumwandlungen sind noch druckinduzierte Phasenumwandlungen bekannt, auf welche in 1.4 eingegangen wird.

1.4 Einfluss von hydrostatischem Druck

Mit zunehmendem hydrostatischem Druck werden die Kohlenwasserstoffketten enger aneinandergespreßt, so dass in der Folge die Anzahl der gauche-Konformation abnimmt und die Ketten gestreckter angeordnet sind. Ein Ungleichgewicht zwischen anziehenden und abstoßenden Kräften resultiert in einer spontanen Krümmung einer Lipid-Monoschicht.

Da der mittlere End-zu-End-Abstand der Kohlenwasserstoffketten in dem ungeordneten Zustand der flüssig-kristallinen Phase (L_α) geringer ist als in der trans-Konformation, kommt

es trotz Zunahme des Lipid-Volumens bei T_m zu einer Abnahme des Bilayer-Durchmessers (112).

Sowohl für die Vor-, wie auch Hauptumwandlungstemperatur kann mit steigendem Druck ein Anstieg beobachtet werden. Bei sehr hohem Druck (≥ 2.100 bar) ist für Phospholipid-Doppelmembranen mit Kohlenwasserstoffketten ≥ 16 -C-Atome das Auftreten weiterer Gelphasen (z.B. der sog. Interdigitated high pressure gel phase $L_{\beta 1}$) beschrieben (111).

Für multilamellare Vesikel (MLV) aus DMPC bedeutet ein Druckanstieg gegenüber dem atmosphärischen Druck um 40 bar ($\sim 30.002,5$ mmHg) ein Anstieg von T_m um $0,92$ °C, wobei die Profile der spezifischen Wärmekapazität unabhängig vom anliegenden Druck deckungsgleich erscheinen. Innerhalb der Messabweichungen ist $\Delta T_m/T_m$ bei einer hydrostatischen Druckänderung Δp für unterschiedliche Lipide gleich (18, 93, 100).

Trägt man T_m und den angelegten Druck graphisch auf, ergibt sich für DMPC-MLV bis 2000 bar eine lineare Abhängigkeit (siehe Abbildung 1.3). Die bekannte Zunahme des spezifischen Lipid-Volumens V_{L^*} von $\sim 3\%$ bei T_m wird durch ansteigenden Druck nur geringfügig reduziert (79).

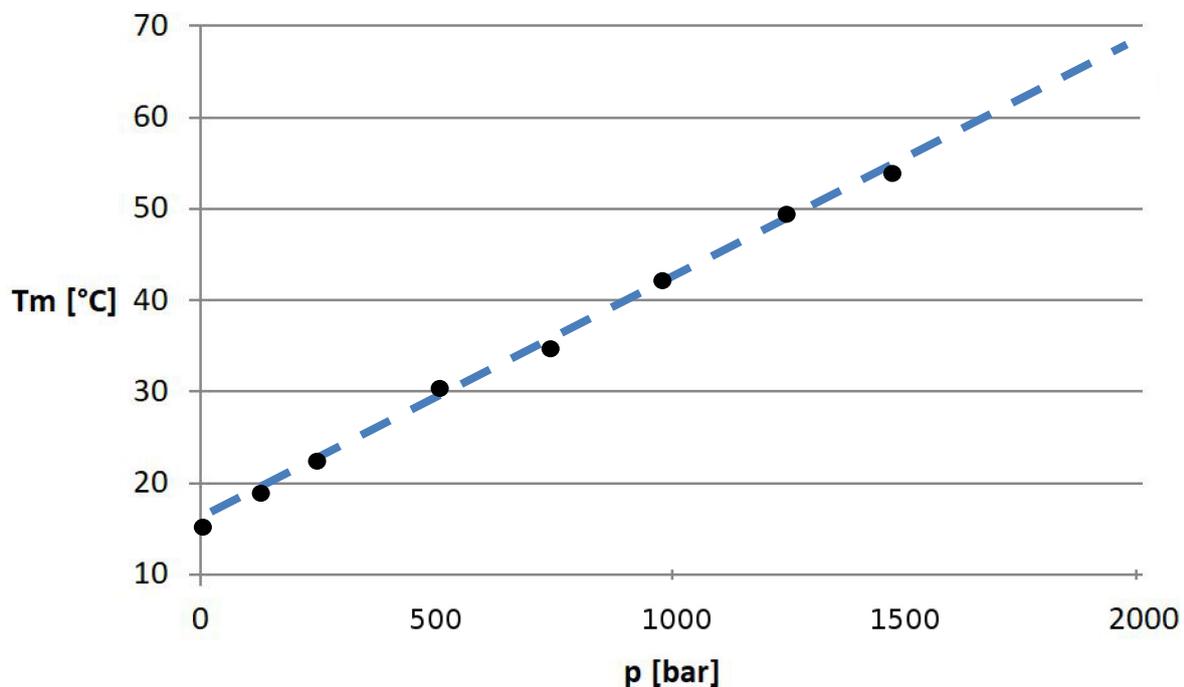


Abbildung 1.3 T_m der Hauptumwandlung von DMPC-MLV in H_2O in Abhängigkeit von hydrostatischem Druck (nach M. Böttner et al., 1994)

Für den Volumen-Ausdehnungskoeffizient der Lipidmembran (dV/dT) und die Wärmekapazität c_p ist während des Schmelzübergangs ein proportionales Verhalten nachgewiesen. Die Proportionalität dieser beiden thermodynamischen Funktionen ist für unterschiedliche Lipide, wie auch komplexe biologische Formulierungen gleich (7).

Der Anstieg von T_m durch vollzogene Änderungen des hydrostatischen Drucks lässt sich durch Gleichung (1) darstellen. Eine Druckänderung von 43,2 bar ($\sim 32.402.7$ mmHg) verschiebt dementsprechend T_m linear um 1 K ($= 1$ °C) (36).

$$\Delta T_m = \gamma_v \Delta p \quad \gamma_v = 7.8 \times 10^{-10} \frac{m^2}{N} \quad (1)$$

Für cholesterinhaltige Formulierungen führt schon eine geringe Cholesterin-Konzentration von 10mol% Cholesterin ab Eintritt in die Ripplephase zur Ausprägung zweier koexistenter Membranphasen, die sich bei steigendem Druck unabhängig voneinander verhalten (113, 113, 112).

1.5 Thermosensitive Liposomen

Liposomen sind Vesikel, die aus einer Doppellipidschicht bestehend, eine wässrige Phase einschließen und erstmalig 1963 vom britischen Hämatologen Alec Douglas Bangham beschrieben wurden. Die Doppelschicht besteht aus Molekülen deren hydrophobe Teile zueinander gerichtet sind und deren hydrophile Teile zur eingeschlossenen und umgebenden, wässrigen Phase gerichtet sind (8).

Je nach Vesikelgröße werden small unilamellar vesicles (SUV; 25 nm - 100 nm), large unilamellar vesicles (LUV; 100 nm – 1000 nm) und giant unilamellar vesicles (GUV; 1 µm – 100 µm) unterschieden. Neben diesen existieren auch multilamellare Vesikel (MLV), welche spontan durch Lösen von Lipiden in wässrigen Lösungen entstehen (101, 103).

Unter thermosensitiven Liposomen (TSL) versteht man eine durch die Lipidkomposition der Membran bestimmte, temperaturabhängige Permeabilitätssteigerung der Liposomen-Doppellipidmembran. Durch eine kurzzeitige Membraninstabilität beim Durchlaufen der Phasenumwandlungstemperatur der Phospholipide kommt es zu einer Freisetzung der in der inneren, wässrigen Phase, eingeschlossenen Wirkstoffe (63).

Entgegen der unter 1.3 beschriebenen scharfen Phasenübergänge bei Systemen die nur aus einem Lipid bestehen, können durch Formulierungen aus mehreren Lipiden Systeme mit nahezu beliebigen Phasenübergängen hergestellt werden. Die T_m dieser Formulierung liegt dann zwischen den T_m der einzelnen Lipide, wobei häufig beide Phasen gleichzeitig in sog. Domänen organisiert vorliegen.

An den Grenzflächen dieser Domänen (sog. grain boundaries) besteht maximale Unordnung in der Membranstruktur und hiermit verbunden die höchste Permeabilität. Durch Verlagerung von Membranlipiden an die grain boundaries kann die Permeabilität bei T_m wesentlich beeinflusst werden. So ist eine wesentlich beschleunigte Freisetzung bei T_m für Lyso- und PEG- haltige TSL bekannt. Dies ist durch die im Vergleich zu DPPC und DSPC niedrigere T_m der Lipide bedingt. Durch einen früher beginnenden Phasenübergang hin zur flüssig kristallinen Phase, kommt es an den grain boundaries zur Porenbildung mit schnellerer Wirkstofffreisetzung (85).

Thermolabile Liposomen mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposomeninhalt durch Modulation der Membranlipidkompositionen sind Gegenstand aktueller Forschung. Neben dem Einsatz als Arzneimittels-Transporter bestehen weitere Einsatzmöglichkeiten der TSL wie z.B.

im Rahmen des nichtinvasiven Temperatur-Monitorings während der Chemotherapie in Kombination mit Hyperthermie (33, 63, 108).

1.5.1 Cholesterin

Als ubiquitär in unserem Körper vorkommendes Sterol ist Cholesterin an vielfältigen Stoffwechselfvorgängen beteiligt und ein wichtiger u.a. stabilisierender Bestandteil von Zellmembranen. Die Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene, Östrogene und Gestagene) sind Beispiele für wichtige aus Cholesterin hervorgehende Hormone.

Cholesterin als Membranbestandteil führt zu einer Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten in der flüssig-kristallinen Phase. Bei niedrigen Cholesterinkonzentrationen ist der Einfluss auf die Phasenumwandlungstemperatur gering, wobei ab 10-15 mol% ein deutlicher Anstieg für T_m beschrieben wird (35).

In Anwesenheit von Cholesterin kommt es zu einer Vergrößerung der lamellaren Gitterkonstante. Dieser Effekt kann durch eine Abnahme der Van-der-Waals-Kräfte bzw. einer Zunahme der Doppelschichtabstoßung bedingt sein (vgl. Abb. 20 in 112).

Für mittlere Cholesterinkonzentrationen wurde unterhalb T_m das Vorliegen zweier simultaner flüssiger Phasen in der Membran nachgewiesen. Diese Phasen unterscheiden sich durch ihre Ordnung und werden aus einer Cholesterol-armen sog. flüssig-ungeordnete Phase (ld: liquid disordered) und Cholesterol-reichen sog. flüssig-geordnete Phase (lo: liquid ordered) gebildet. Ld- und lo-Phasen liegen in einer flüssig-flüssigen Koexistenz vor (38).

Ab Cholesterinkonzentrationen von etwa 30- bis 40 mol% liegt ausschließlich die flüssig-geordnete Phase vor, während dieser eine schnelle Wirkstofffreisetzung aufgrund von unterdrückter Phasenumwandlung nicht mehr möglich ist (35, 106).

1.5.2 DPPG₂ als Membranlipid

Das synthetische Phospholipid DPPG₂ (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin; Abbildung 1.4) verlängerte als Membranlipid bekanntermaßen die vaskuläre Zirkulationszeit von TSL und besitzt wie DPPG₃ (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotriglycerin) die Freisetzungsgeschwindigkeit um T_m signifikant beschleunigende Eigenschaften (44, 77).

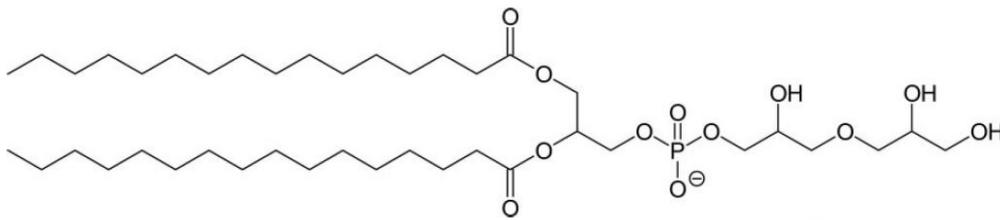


Abbildung 1.4 Strukturformel DPPG₂ (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol)

Aufgrund der durch die Hydroxygruppe bedingten polaren Eigenschaften lassen sich beide Lipide mittels Dünnschichtchromatographie auftrennen.

Werden die Formulierungen DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (m/m) und DPPC/P-lyso-PC/DSPE-PEG2000 90:10:4 (m/m) hinsichtlich ihrer Freisetzungsgeschwindigkeit mit > 70% Carboxyfluorescein-Freisetzung innerhalb von 10 Sekunden nach Erreichen von T_m verglichen, ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Jedoch zeigen DPPG₂-haltige TSL im Vergleich zu PEGylierten-TSL eine verbesserte in-vitro-Stabilität im Serum (44, 41).

1.5.3 DPPC als Membranlipid

Wie DPPG₂ wird auch das Lipid DPPC zur Modifikation der Öffnungstemperatur eingesetzt. DPPC-Doppelschichten liegen bei Temperaturen kleiner als 35°C in der sog. Gel-Phase und bei Temperaturen höher als 42°C in der sog. flüssig-kristallinen Phase vor. Dadurch bilden sie den Hauptbestandteil von TSL, da für TSL eine Freisetzung bei Hypertermie-Bedingungen gewünscht ist (34). Die Struktur von DPPC und DSPC ist in Abbildung 1.5 skizziert.

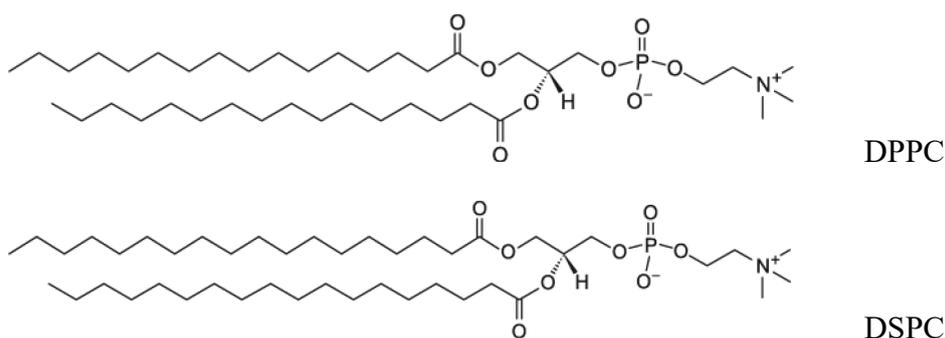


Abbildung 1.5 Struktur von DPPC und DSPC

Da die Phasenübergangstemperatur T_m von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bei 41,5°C liegt (16) und eine erhöhte Membranpermeabilität von Liposomen um T_m bekannt ist (114),

ist DPPC ein ideales Membranlipid bei der temperaturabhängigen Medikamenten-Freisetzung mittels TSL in Verbindung mit Hyperthermie.

Ausschließlich aus DPPC hergestellte Liposomen besitzen eine relativ geringe Freisetzungsgeschwindigkeit und –menge der eingeschlossenen Marker (z.B. CF). Durch eine Ergänzung der Lipiddoppelschicht mit anderen Lipiden kann die Freisetzung beschleunigt werden. Wird 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) in TSL-Formulierungen eingesetzt, kann T_m noch weiter auf bis zu 43-45°C erhöht werden (10, 25, 82, 89).

2 Zielsetzung

Thermosensitive Liposomen (TSL) sind vielversprechende Nanopartikel aus Phospholipiden für die zielgerichtete Therapie solider Tumore in Kombination mit lokaler Hyperthermie. Sie werden intravenös appliziert und kommen so in Kontakt mit den unterschiedlichen plasmatischen und zellulären Blutbestandteilen. Im Rahmen eines in-vivo-Einsatz als Arzneimitteltransporter sind sie weiteren Faktoren des vaskulären Systems ausgesetzt.

Der Einfluss des hydrostatischen Drucks auf DPPG₂-haltige TSL Formulierungen ist bis heute nicht experimentell untersucht, deswegen soll ein Messaufbau entwickelt werden, der es erlaubt die Auswirkungen von hydrostatischem Druck und Temperatur auf TSL mittels DLS zu evaluieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen unterschiedliche TSL-Formulierungen basierend u.a. auf dem neuartigen Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylglycerin (DPPG₂) hergestellt und u.a. mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und dem temperaturabhängigen Freisetzungverhalten durch Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Lipide, Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer und hergestellte Lösungen

Substanz	Hersteller
Ammoniak	Merck, Darmstadt
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Caelyx®	Essex Pharma GmbH, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
CF	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Chol	Corden Pharma, Liestal, Schweiz
DSPE-PEG2000	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
DPPC	Genzyme Pharmaceuticals, Liestal, Schweiz
DPPG ₂	PCT/WO97/30058, Prof. Eibl
DSPC	Corden Pharma, Liestal, Schweiz
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck, Darmstadt
FCS	Biochrom AG, Berlin
H ₂ SO ₄ , 95-97% p.A.	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Molybdänblauspray	150 ml MS-Lösung I: - 40,11g MoO ₃ ad 1l 25% H ₂ SO ₄ 150 ml MS-Lösung II: - 1,78g Mo-Pulver ad 500 ml - MS-Lösung I 600 ml Aqua bidest
P-Lyso-PC	Corden Pharma, Liestal, Schweiz
Perchlorsäure 70%	Merck, Darmstadt
Phosphat-Standard, 1000 mg/l Phosphat	Merck, Darmstadt
Phosphor ICP Standard, 1000 mg/l Phosphor	Merck, Darmstadt
Sephadex® G-50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton X-100 (= Octoxynol 9)	Merck, Darmstadt
0,9% NaCl/Tris-Lösung	10 mM, pH 8,0

0,9% NaCl	0,9% Natriumchlorid
-----------	---------------------

Zur Herstellung der wässrigen Lösungen wurde ausschließlich Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli Q Advantage der Fa. Millipore, Darmstadt) verwendet.

3.2 Herstellung thermosensitiver Liposomen

Geräte

- Extruder Lipex (Fa. Northern Lipids Inc., Burnaby, Canada)
- Feinwaage Precisa 205A SCS (Fa. Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH)
- Rotationsverdampfer Laborota 400 1 (Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Stickstoffflasche (Fa. Linde AG, Pullach)
- Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- VAC control automatic DC1/1H (Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Vakuumpumpe 3 EKF 65 VDE 0530 (Fa. Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz)
- Vakuum Exsikkator (Fa. Nalgene, New York, USA)
- Vortex Genie2 (Fa. Scientific Industries, Bohemia, NY)
- Wärmebad LKB MultiTemp® II (Fa. Pharmacia, Uppsala, SE)

Material

- Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten 20 µL / 100 µL / 1000 µL (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Multipette Stream (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- PD-10-Säulen (Fa. GE Healthcare Life Sciences)
- Polycarbonat Filter 200 nm (Fa. Whatman, Dassel)
- Glaswolle
- Glassäulen

Chemikalien

- Lipide je nach Formulierung

- Chloroform
- 0,9% NaCl, 100mM, pH 7,2
- Carboxyfluorescein, 100mM pH 7,2
- Sephadex® G 50

Die verwendeten TSL wurden nach der Methode der Lipidfilm-Hydratisierung und Extrusion hergestellt (67).

3.2.1 Herstellen des Lipidfilms

Die für die jeweilige Formulierung benötigten Lipide (DPPC, DSPC, DPPG₂, CHOL, DSPE-PEG2000, P-Lyso-PC) wurden nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, eingewogen und anschließend in 20 ml Chloroform gelöst. Von den so hergestellten Lipidlösungen wurde jeweils so viel Volumen in den Rundkolben überführt, dass das Stoffmengenverhältnis der Zielformulierung zustande kommt.

Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur und 375 mbar entfernt. Anschließend wurde der Lipidfilm um etwaige Lösungsmittelreste zu entfernen bei 60°C und 150 mbar für mindestens 20 Minuten getrocknet, das Destillat aus der Apparatur entfernt und der Lipidfilm erneut für mindestens 90 Minuten bei 60°C und 40 mbar getrocknet. Sofern eine Lagerung des Lipidfilms notwendig war, wurde dies im abgedunkelten Exsikkator unter Vakuum durchgeführt.

3.2.2 Hydratisierung

Der hergestellte Lipidfilm wurde in 5,0 ml 0,9% physiologischer Kochsalzlösung im Rotationsverdampfer bei 60°C und atmosphärischem Druck gelöst. Zu Beginn der Hydratisierung war sicherzustellen, dass der Extruder bereits zusammengebaut und im Vorfeld auf 60°C vorgeheizt worden war. Spätestens 30 Minuten nach Beginn der Hydratisierung wurde die Dispersion in den vorgeheizten Extruder überführt.

3.2.3 Extrusion

Die im Extruder verwendeten Filter hatten eine Porengröße von 200 nm, da für die Experimente diese Liposomengröße angestrebt wurde. Insgesamt wurde die Dispersion zehn Mal mit möglichst geringem Druck (5 bar bis max. 22 bar) extrudiert. Die Liposomen wurden nach jedem Extrusionsvorgang in einem im Wasserbad bei 60°C gelagertem Reagenzglas

aufgefangen, um ein Abkühlen unter die Phasenumwandlungstemperatur zu vermeiden. Die Liposomen-Dispersion wurde anschließend 10 Minuten bei 4°C abgekühlt.

3.2.4 Carboxyfluorescein-Einschluss

Carboxyfluorescein (CF) wird als Fluoreszenzmarker zur Kontrolle der Membranintegrität von Liposomen eingesetzt (9, 95, 109).

Der Lipidfilm wurden mit 100mM CF im Rotationsverdampfer über 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde das Wasserbad unter Zugabe von Eis auf 25°C abgekühlt und die Liposomen in einen neuen Eppendorf Gefäß überführt.

Für den unter 4.4 beschriebenen Versuch des passiven CF-Einschlusses bei Unterdruck erfolgte der o.g. Einschluss unter atmosphärischen Bedingungen, sowie jeweils unter Anlage eines Unterdrucks von 900 mbar bis 400 mbar. Der Unterdruck wurde erst aufgehoben, sobald die TSL nach erfolgter CF-Inkubation auf 25°C abgekühlt waren und so ein Vorliegen der Doppellipid-Membran in der gelförmigen Phase gewährleistet war. Durch die messtechnischen Geräte (Vacuum Controller VAC control automatic, Thermometer) ließ sich das eingesetzte Verfahren hinsichtlich etwaiger Druck- und Temperaturänderungen nahtlos überwachen.

3.2.5 Säulenchromatographie und Pufferaustausch

Zur Elimination von nicht-eingeschlossenem CF wurde das Trennverfahren der Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) eingesetzt. Hierbei wurde eine mit Glaswolle abgedichtete und mit Sephadex® G-50 befüllte Kapillare für ca. 20 min mit 0,9% NaCl equilibriert und im Anschluss die CF-TSL-Dispersion vorsichtig auf das Säulenmaterial pipettiert.

Nicht-eingeschlossenes CF kann aufgrund der geringen Molekulargröße in die stationären Phase (Dextran) eindringen. Hierdurch steht dem CF ein größeres Diffusionsvolumen zu Verfügung, so dass sich im Gegensatz zu den Liposomen die Retentionszeit verlängert (siehe Abbildung 3.1). Als alternatives Verfahren wurden PD-10-Säulen zur Trennung des freien CF und Umpufferung eingesetzt, wobei sich keine qualitativen Unterschiede zur Gelfiltrations-Chromatographie ergaben (92).

Während der GFC wurde ein Pufferaustausch gegen 0,9% NaCl durchgeführt. Die TSL wurden in einem Falcon-Gefäß gesammelt, gevortext, in Eppendorf Gefäße aliquotiert und bei 4°C gelagert.

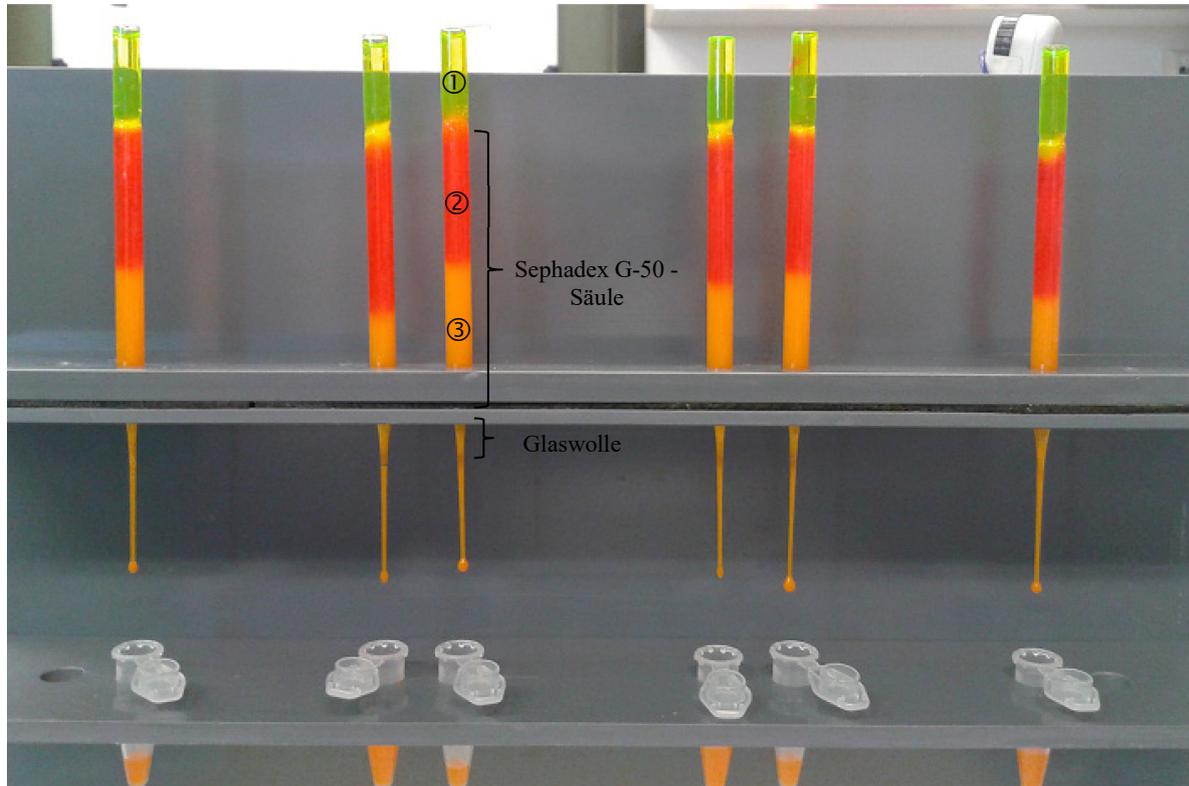


Abbildung 3.1 Säulenchromatographie 1. TSL-NaCl-Überstand; 2. In Sephadex eingelagertes, Fraktion mit freiem CF; 3. Fraktion mit TSL in Sephadex-Säule

3.3 Charakterisierung und Analyse

3.3.1 Größen- und Zetapotentialmessung (ξ -Potential)

Gerät

- Zetasizer Nano ZS (Fa. Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)

Material

- Pipette 1000 μ L (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Einweg-Kapillarzelle DTS1070 (Fa. Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)

Chemikalien

- TSL-Formulierung
- H₂O

- 0,9% NaCl-Lösung

Die Größen- und Zeta-Potenzialmessung der hergestellten TSL erfolgte durch den Zetasizer Nano ZS. Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wird das Streulicht von durch einen Laser angeregten, sich in einer Suspension durch Brownsche Molekularbewegungen frei diffundierender Liposomen, analysiert und die Größe sowie Größenverteilung errechnet (81).

Zur Vermessung im Zetasizer wurden die Liposomen 1:50 mit H₂O (Zetapotential-Messung) oder 1:50 mit 0,9% NaCl-Lösung (Größenmessung) verdünnt und sofern nicht anders angegeben 500 µl dieser Dispersion bei 25°C in Malvern-Küvetten vermessen. Alle im Rahmen dieser Arbeit gemessenen TSL-Größenwerte entstammen dem im Zetasizer als z-Average (d.nm) ermittelten Wert. z-Average (d.nm) ist der mittlere Durchmesser aller in der Probe vorkommenden Partikel und reagiert sehr empfindlich auf das Vorhandensein von Aggregaten. Auf den dimensionslosen Polydispersionsindex (Pdl), der Auskunft über die Größenverteilung der Moleküle Auskunft gibt, wird in 4.2 weiter eingegangen.

Für die durchgeführten Druckexperimente zur Evaluation des Einflusses von hydrostatischem Druck wurden die unterschiedlichen Liposomen-Formulierungen im Verhältnis 1:50 (vol:vol) mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt (VL) und jeweils 5 Minuten im Thermomixer bei der zu untersuchenden Temperatur (z.B. 25 °C, 37 °C oder 41 °C) inkubiert. 500 µl VL wurden in die vorgewärmte Malvern-Messküvette überführt. Der Testaufbau und Messablauf erfolgte jeweils wie in 4.1.3 beschrieben. Jeder Messwert wurde im Zetasizer mit Hilfe von mindestens drei unabhängiger Messabläufe ermittelt.

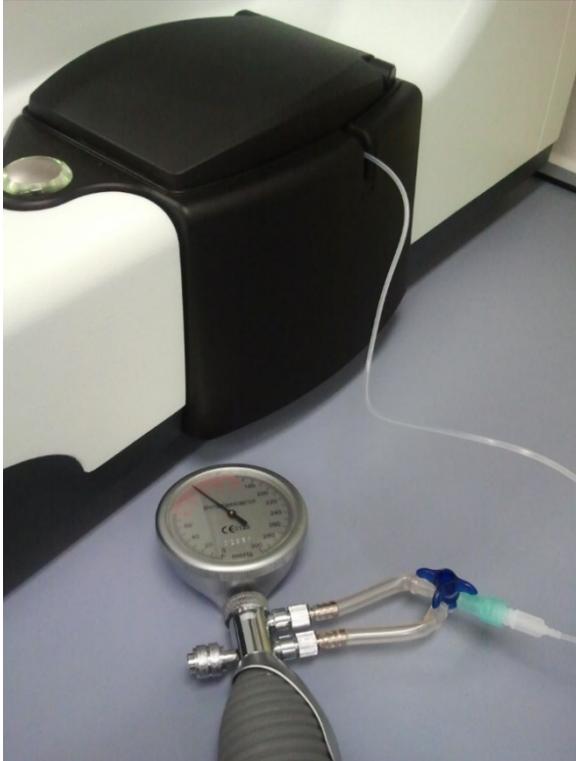


Abbildung 3.2 Druckexperiment-Durchführung im Zetasizer (120 mmHg an Küvette anliegend)

3.3.2 Ermittlung des Lipidgehalts (Phosphatbestimmung)

Geräte

- Heizblock Typ 53 LS 6301 (Fa. Liebisch)
- UV/VIS-Spektrophotometer DU 640 (Fa. Beckman)
- Vortex Genie 2 (Fa. Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

Material

- Einmal-Messküvetten PLASTIBRAND Makro PMMA (Fa. Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, USA)
- Multipette (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten 20 μL / 100 μL / 1000 μL (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Reagenzgläser, hoch

Chemikalien

- Phosphat-Standard (1000 mg/l Phosphat)

- Lösung II (= 3 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat + 120 g Triton X-100, Auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt)
- Perchlorsäure HClO₄ 70%ig

Die Gesamt-Phospholipidkonzentration der thermosensitiven Liposomen wurde nach der von H. Eibl und W.E. Lands (1969) beschriebenen Phosphatsanalyse bestimmt. Hierbei ist die gemessene Phosphatkonzentration proportional zur Phospholipidkonzentration ist, da in jedem Phospholipidmolekül nur ein Phosphoratom vorkommt (30).

Es wurde eine Regressionsgerade mit Referenzstandards (Stoffmenge gegen Absorption bei 660nm) hergestellt, indem in fünf unterschiedliche Reaktionsgefäße (1,5 ml) die jeweils angegebene Menge Phosphatsstandard gegeben wurde (1 x 20 µL = 206 µM Phosphat, 1 x 40 µL = 405 µM Phosphat, 1 x 60 µL = 596 µM Phosphat, 1 x 80 µL = 780 µM Phosphat, 1 x 100 µL = 957 µM Phosphat). Anschließend wurde in jedes Eppendorfgefäß 1 mL aqua bidest pipettiert.

Um die Lipidkonzentration der TSL-Proben in den Messbereich der hergestellten Regressionsgerade (0 bis 1000 µM Phosphat) zu bringen, wurden diese jeweils auf eine Konzentration von 1:50 (20 µL TSL + 980 µL aqua bidest) und 1:40 (20 µL TSL + 780 µL aqua bidest) verdünnt.

Anschließend wurden die verdünnten TSL-Proben und o.g. Referenzstandards unter Zugabe von 500 µl Lösung I und 100 µl Perchlorsäure (70%ig) 2,5 h im Heizblock bei 300°C inkubiert. Während dieses Vorgangs findet die Umwandlung von organischem Phosphat in anorganisches Phosphat statt.



Abbildung 3.3 TSL- und Referenzstandards-Inkubation im Heizblock zur Ermittlung des Lipidgehalts

Nach Abkühlen der Reagenzgläser wurde jeweils 5,5 ml aqua bidest und 500 μ L Lösung II hinzugefügt. Zur photometrischen Detektion von Phosphat erfolgte anschließend die Vermessung im UV/VIS-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 660 nm. Die Darstellung der Regressionsgerade und Errechnung der jeweiligen Phosphatkonzentration, welche bekanntlich proportional zum jeweiligen Lipidgehalt der TSL ist, erfolgte anschließend via Excel.

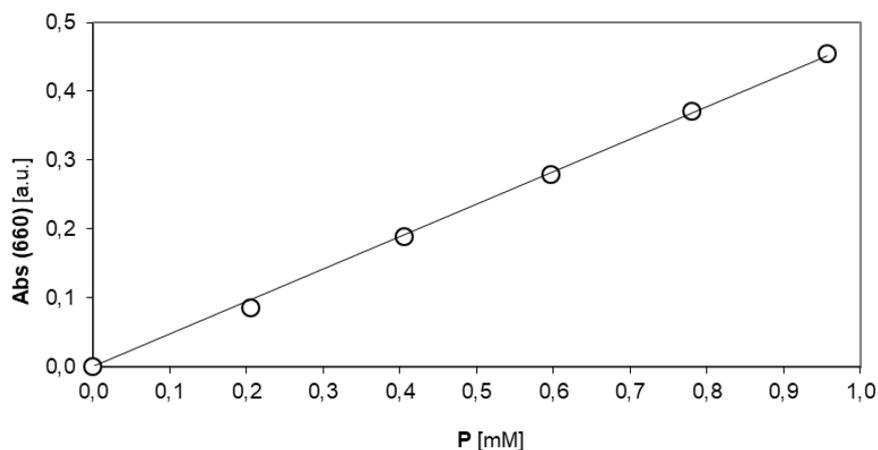


Abbildung 3.4 Regressionsgerade aus Phosphatstandard (X-Achse: Stoffmenge; Y-Achse: Lichtabsorption)

Durchführung nach der standardisierten Verfahrensanweisung „Bestimmung der Phosphorkonzentration aus anorganischen und organischen Proben“ in der Version vom 22. Februar 2012 der AG Liposomen.

3.3.3 Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie

Geräte

- Flachbettscanner BearPaw 2400TA (Fa Mustek, Oosterhout, NL)
- Heizblock, Heating Module Reacti-Therm No.18790 (Fa Pierce, Rockford, IL, USA)
- Vortex Genie 2 (Fa. Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
- Zentrifuge Hermle ZK 380 (Fa Eppendorf, Hamburg)

Material

- DC-Platten, Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt)
- Glasschneider
- Gefäß zum DC-Lauf mit Filterpapier
- Pasteurpipetten, lang
- Pipettierhilfen, Gummi
- Pipetten 0,5-10 μL / 100 μL / 1000 μL / 2000 μL (Fa.Eppendorf, Hamburg)
- Reagenzgläsern, hoch, Glas

Software

- Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

Chemikalien

- DC-Laufmittel (= 100 ml Chloroform + 30 ml Methanol + 20 ml Eisessig + 5 ml Wasser)
- Molybdänblauspray
- Lipidstandard = jeweils 20 mM P-Lyso-PC [495,64 g/mol], DPPC [734,06 g/mol], DPPG₂ [819,04 g/mol], DSPE-PEG2000 [2805,54 g/mol] ad 40 ml Chloroform/Methanol 9:1

Um die Phospholipidzusammensetzung der synthetisierten Liposomen zu bestimmen, wurde die beschriebene Dünnschichtchromatographie durchgeführt (44). Hierzu wurden die Lipide aus wässriger TSL-Lösung extrahiert und auf DC-Platten aufgetragen.

Neben den Banden mit den zu untersuchenden TSL-Formulierungen wurde jeweils einmal pro Platte der Lipidstandard zur Qualitätskontrolle aufgetragen. Aufgrund der bekannten Stoffmengenkonzentration im Lipidstandard und den bekannten Laufeigenschaften der gelösten Lipide, kann mittels einer graphischen Auswertung (Abbildung 3.5 & Abbildung 3.6) die genaue Phospholipidzusammensetzung bestimmt werden.

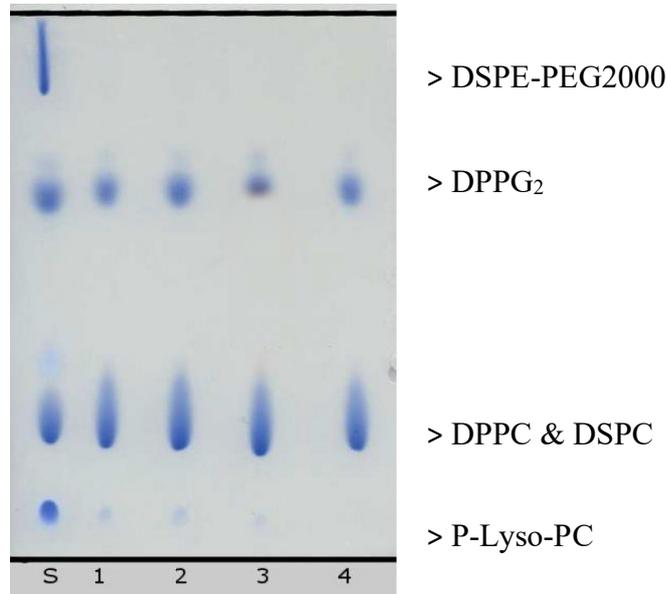


Abbildung 3.5 DC-Platte nach Lauf und Färbung unterschiedlicher TSL-Formulierungen, mit S: Lipidstandard, 1-3: DPPC/DSPC/DPPG₂-Formulierung 50/20/30 (mol/mol), 4: DPPC/DSPC/DPPG₂/Chol 47,5/19/28,5/5 (mol/mol). Cholesterin wird aufgrund einer fehlenden Phosphorsäureestergruppe nicht eingefärbt.

Nach einer ca. 5-minütigen Trockenphase und Beschriftung der Platte, wurde diese in das Laufmittel des Chromatographiegefäßes gestellt. Nach einem Lauf über ca. 4/5 der Platte wurden die Laufpunktenden markiert und die Platte über 10 Minuten getrocknet.

Anschließend wurden die Platten mit Molybdänblauspray angefärbt, erneut über 10 Minuten getrocknet, eingescannt und mithilfe der Software ImageJ densitometrisch vermessen.

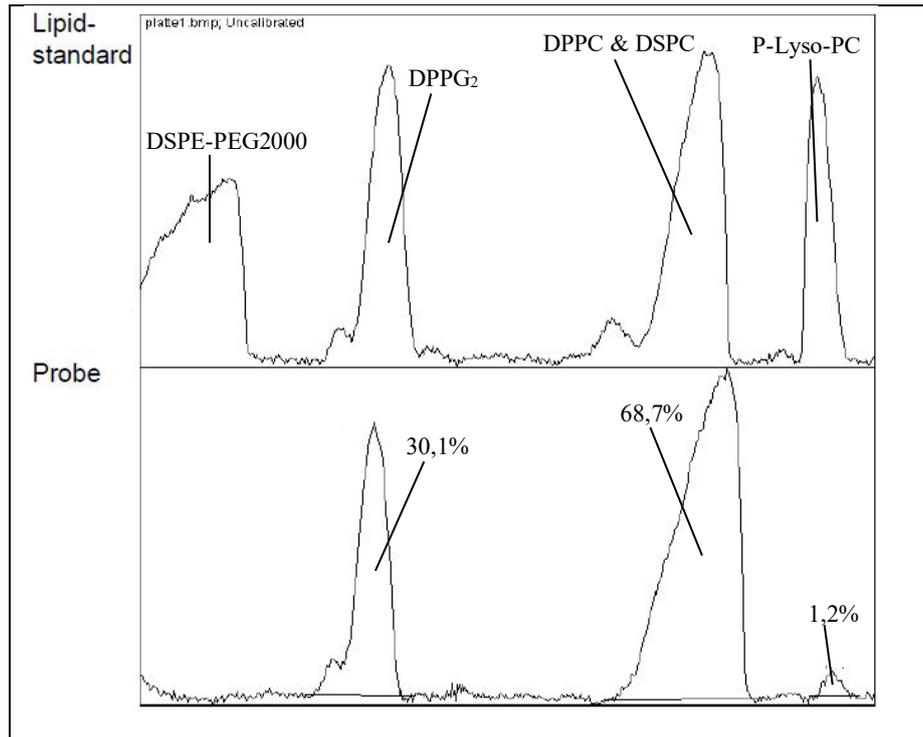


Abbildung 3.6 Densitometrische Auswertung der DC-Platte (Bande 3)

Eine genaue Differenzierung von DPPC und DSPC ist aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens und Abbild in einer Bande mit dieser Methode nicht möglich (17, 44).

3.3.4 Temperaturprofil

Geräte

- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY)
- Spectrofluorophotometer RF-450 (Shimadzu, Columbia, USA)
- Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Material

- Pipetten 0,5-10 μL / 100 μL / 1000 μL / 2000 μL (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Chemikalien

- 10% Triton X-100
- 0,9% NaCl
- NaCl/Tris-Lösung

Zur Bestimmung der temperaturabhängigen CF-Freisetzung wurden die hergestellten TSL im Verhältnis 1:50 (vol:vol) in 0,9% NaCl verdünnt (VL). 100 µl dieser hergestellten Dispersion (VL) wurden mit 100 µl 10% Triton X-100 in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, gevortext und für 15 Minuten in einen bereits auf 45 °C temperierten Thermomixer gegeben (750 rpm). Die Zugabe der Detergenz Triton X-100 führt ab einem Molekularverhältnis um 0,65 (Phospholipid/Detergenz) zur Durchlässigkeit der Membran und Freisetzung von CF (29).

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 µl, 2-8 °C kaltem 0,9% NaCl beendet. Es wurden jeweils 20 µl dieser Lösung in vier unterschiedliche Eppendorf-Gefäße überführt und nach Hinzugabe von 1000 µl NaCl/Tris-Lösung bei 493 nm / 513 nm (Ex/Em) im Spectrofluorophotometer vermessen. Der gemittelte Wert wurde als 100% CF-Freisetzung übernommen.

Zur Erstellung des eigentlichen Temperaturprofils wurden zwei unterschiedliche Messlösungen aus jeweils 100 µl VL und 1000 µl eines Puffers (NaCl oder FCS) hergestellt. 20 µl der jeweiligen Messlösung wurden für 5 Minuten in einem vortemperierten Thermoshaker inkubiert (RT = Raumtemperatur, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C). Anschließend wurden 1000 µl NaCl/Tris-Lösung hinzu pipettiert und der Anteil an freiem CF durch Vermessung im Fluorimeter mit oben genannten Einstellungen ermittelt. Die Berechnung der CF-Freisetzung erfolgte mit Gleichung 2 nach Hossann et. al (44).

$$\text{CF release (\%)} = (I(t) - I_0) * 100 / (I_\infty - I_0) \quad (2)$$

mit $I(t)$ der Fluoreszenz-Intensität nach Inkubation über den Zeitraum t , I_0 der Fluoreszenz-Intensität nach Inkubation bei Raumtemperatur, I_∞ der Fluoreszenz-Intensität nach 15 min Inkubation mit 10% Triton X-100 und 45 °C zur kompletten Freisetzung des eingeschlossenen CF.

3.3.5 Öffnungskinetik

Geräte

- Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektrophotometer (Varian, Palo Alto, CA, USA)

Material

- Pipetten 0,5-10µL / 100 µL / 1000 µL / 2000 µL (Fa.Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Chemikalien

- 10% Triton X-100
- 0,9% NaCl
- NaCl/Tris-Lösung

Zur Evaluation der zeitabhängigen Freisetzungsraten der angefertigten TSL-Formulierungen wurde die Öffnungskinetik bestimmt. Das Fluoreszenzsignal von in Liposomen eingeschlossenem Carboxyfluorescein ist „gequencht“. Hier drunter versteht man eine Abnahme der Intensität der Fluoreszenz (= Fluoreszenzlöschung) bei hohen Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen. Kommt es zu einer CF-Freisetzung und somit Verdünnung in Puffer bzw. Serum, vollzieht sich das sog. „Dequenching“, detektierbar durch einen messbaren Anstieg der Fluoreszenzintensität (90).

Die TSL-Formulierungen wurden im Verhältnis 1:50 (vol:vol) mit NaCl 0,9% verdünnt (= Verdünnungslösung VL). Zur Ermittlung des 100%-Referenzwertes wurde die VL im Verhältnis 1:1 (vol:vol) mit Triton X-100 (10%) gemischt, für 15 Minuten bei 45 °C im Thermomixer vorinkubiert und anschließend im Verhältnis 1:10 (vol:vol) mit NaCl 0,9% verdünnt. 20 µl dieser Tritonlösung (TL) wurden dann nach Zugabe von 1000µL NaCl/Tris-Puffer im Fluoreszenz-Spektrophotometer vermessen.

Es wurden zwei unterschiedliche Messlösungen (ML) im Verhältnis 1:10 (vol:vol) und (VL:NaCl und VL:FCS) hergestellt, jeweils 20 µl dieser bei entsprechender Temperatur 20 Minuten vorinkubiert und dann nach Zugabe von 1000µL NaCl/Tris im Spektrofluorometer vermessen.

Pro Messvorgang wurde eine Messprobe in zwei unterschiedlichen Küvetten zusammen mit dem 100% Referenzwert doppelt bestimmt. Durch Zugabe von Magnetührstäbchen wurde eine gleichmäßige Temperaturverteilung / Vermischung der Probe in den Küvetten gewährleistet. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte über einen Zeitraum von 20 Minuten alle 20 Sekunden bei Temperaturen von 37 – 45 °C (Extinktion 493 nm, Emission 513 nm).

Da dieser Temperaturbereich die Phasenübergangstemperatur (T_m) mit einschließt, war ein Vermessen der CF-Freisetzung sowohl in der sog. Gel-Phase (beschreiben), wie auch bei Überschreiten von T_m in der flüssig-kristallinen Phase möglich (57).

3.3.6 Stabilitätsmessung

Geräte

- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY)
- Spectrofluorophotometer RF-450 (Shimadzu, Columbia , USA)
- Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Material

- Pipetten 0,5-10µL /100 µL / 1000 µL / 2000 µL (Fa.Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Chemikalien

- 10% Triton X-100
- 0,9% NaCl
- NaCl/Tris-Lösung

Zur Bestimmung der Membranstabilität bei 37 °C wurden die hergestellten TSL im Verhältnis 1:50 (vol:vol) in 0,9% NaCl verdünnt (VL). 100 µl dieser hergestellten Dispersion (VL) wurden mit 100 µl 10% Triton X-100 in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, gevortext und für 15 Minuten in einen bereits auf 45 °C temperierten Thermoshacker (750 rpm) gegeben. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 µl, 7 °C kaltem 0,9% NaCl beendet.

Es wurden jeweils 20 µl dieser Lösung in vier unterschiedliche Eppendorf-Gefäße überführt, 1000 µl NaCl/Tris-Lösung hinzu pipettiert, gevortext und bei 493 nm/ 513 nm (Ex/Em) im Fluoreszenz-Spektrophotometer vermessen. Der gemittelte Wert dieser vier Proben wurde als 100% CF-Freisetzung übernommen.

Die eigentliche zeitabhängige Membranstabilität der hergestellten TSL wurde wie folgt ermittelt. 100 µl der VL wurden jeweils mit 1 ml FCS in einen bereits auf 37 °C vortemperierten Thermoshacker (750 rpm) gegeben. Zur Evaluation der CF-Freisetzung in Anwesenheit von Humanalbum bzw. des Lipidakzeptorvesikels (LAV) DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol) erfolgte in diesem Schritt ergänzend eine Stabilitätsmessung mit 40g/L Humanalbumin (100 µL VL + 700 µl 0,9% NaCl + 200 µl Alburnorm 20%) bzw. (100 µL VL + 964 µl 0,9% NaCl + 36 µl LAV).

Nach vordefinierten Zeitabständen ($t = 0$ min., 5 min., 1 h., 2 h., 3 h., 4 h., 6 h., 8 h., 10 h., 12 h., 14 h., 18 h., 24 h.) wurden jeweils 20 μl entnommen, mit 1000 μl NaCl/Tris-Lösung in einen Eppendorf-Gefäß überführt, gevortext und mit o.g. bekannten Einstellungen im Flourimeter vermessen. Die Berechnung der Freisetzung erfolgte analog zu dem in 3.3.4 beschrieben Vorgehen.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung DLS-Messung unter Druck

Zur Evaluation des Einflusses von hydrostatischem Druck auf TSL wurde ein Messverfahren entwickelt, die Messgenauigkeit bestimmt und unterschiedliche TSL-Formulierungen untersucht.

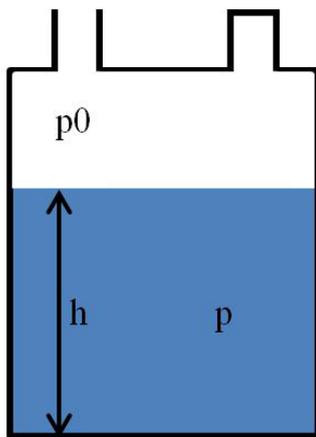
4.1.1 Anforderung an Messverfahren

Das gesuchte Messverfahren sollte im Aufbau einfach und mit im Fachhandel für Laborbedarf geführten Materialien realisieren zu sein. Da ein zukünftiger Transfer des Versuchsaufbaus auf andere Analysemethoden angedacht war und z.B. zur Ermittlung der TSL-Temperaturprofile bzw. Öffnungskinetiken ebenfalls im Spectrofluorophotometer ein 1 cm Standardküvettenhalter genutzt wurde, fiel die Wahl auf die 1 cm Standardküvette mit Luer-Lock-System. Eine weitere Anforderung war, dass die Fehleranfälligkeit des Systems leicht zu überprüfen sein sollte. Durch das verwendete Verschlusssystem (Luer-Lock) war eine sichere Konnektierung gewährleistet, die Leckagefreiheit wurde wie in 4.1.3 beschrieben vor jedem Messversuch getestet.

4.1.2 Zielfindung

Für den Aufbau wurde ein System gesucht, welches ein Ablesen des in der ruhenden Flüssigkeitssäule aufgebauten hydrostatischen Druck ermöglicht.

Der hydrostatische Druck von Flüssigkeiten lässt sich nach dem Pascal'schen Gesetz (nach Blaise Pascal) berechnen und ist ausschließlich von der Höhe der Flüssigkeitssäule und dessen Dichte abhängig (hydrostatisches Paradox).



$$p(h) = pgh + p_0$$

p = Dichte

g = Erdbeschleunigung

h = Höhe des Flüssigkeitsspiegels über dem betrachteten Punkt

p_0 = Luftdruck auf Flüssigkeitsoberfläche

$p(h)$ = hydrostatischer Druck in Abhängigkeit von der Höhe des Flüssigkeitsspiegel

Abbildung 4.1 Pascal'sches Gesetz (65)

Zur vollständigen Beschreibung des in einer Flüssigkeitssäule vorherrschenden Drucks ist dem hydrostatischen Druck noch der Umgebungsdruck zu addieren.

Statt den für Druck gebräuchlichen SI-Einheiten Pascal (Pa) und Bar (bar) wurde sich im Rahmen dieser Arbeit auf die in der Human- und Veterinärmedizin verbreitete Einheit zum Messen des Blutdruck Millimeter-Quecksilbersäule (mmHg) geeinigt (1 mmHg = 133,322 Pa = 1,33322 mbar).

4.1.3 Aufbau und Messablauf

Bei den durchgeführten Druckexperimenten wurde an die Messküvette ein handelsübliches der EN 1060 entsprechendes Blutdruckmessgerät angeschlossen. Die Luftauslässe wurden über einen Dreiwegehahn auf eine Heidelberger-Verlängerung geleitet und an die einseitig verschlossene Küvette angeschlossen (siehe Abbildung 4.2).

Da im Messaufbau mehrere Bauteile mechanisch miteinander verbunden wurden, erfolgte vor jedem Experiment ein Test auf Druckbeständigkeit und somit Leckagefreiheit des Systems über eine Dauer von 15 Minuten. Bei beobachtetem Druckabfall erfolgte ein erneutes Konnektieren der Bauteile mit erneuter Testung. Als Fehlerträchtig stellten sich die Verbindungen zwischen Dreiwegehahn (4) und Heidelberger-Verlängerung (3), sowie Heidelberger-Verlängerung (3) und Malvern-Messküvette (1) dar. Leckagen waren jedoch insgesamt selten zu beobachten (siehe Abbildung 4.2). Bei fehlendem Druckabfall innerhalb

des o.g. Tests auf Druckbeständigkeit war das System über mind. 12 h nachweislich leakagefrei, der Aufbau wurde für Messungen bis 180 mmHg eingesetzt.

Sollte ein Versuch nicht bei Raumtemperatur stattfinden, wurde die Messküvette bei entsprechender Temperatur im Zetasizer ohne Probenmaterial für 5 Minuten vorgewärmt, sowie die TSL-Probe entsprechend im Thermomixer erwärmt. Die unterschiedlichen Liposomen-Formulierungen wurden im Verhältnis 1:50 (vol:vol) mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt, sowie 500 µl dieser Verdünnungslösung in die einseitig offene Messküvette pipettiert (Heidelberger-Verlängerung angeschlossen, Verschlussstopfen (2) nicht aufgesteckt). Die Probeneingabe in die Messküvette, sowie der anschließende Verschluss durch Aufstecken des Verschlussstopfens (2) erfolgten jeweils unter Betätigung des Druckablassventils (6), sodass die TSL zu jedem Zeitpunkt atmosphärischem Druck ausgesetzt waren.

Im Verlauf wurde durch mehrmaliges, langsames Betätigen des Blutdruckmessgerätes der gewollte hydrostatische Druck der Probe angelegt und im Zetasizer über einen Zeitraum von ~ 60 s vermessen.



Abbildung 4.2 Aufbau / Messküvetten-Anschluss für Druckexperimente. 1. Malvern-Messküvette; 2. Verschlussstopfen; 3. Heidelberger-Verlängerung; 4. Dreiwegehahn; 5. Blutdruckmessgerät; 6. Druckablassventil

4.2 Proof-of-Principle

Zur Evaluation der Messgenauigkeit der in 4.1.3 beschriebenen Apparatur wurde nach beschriebem Vorgehen die Messgenauigkeit für die liposomale Standard-Formulierung der Arbeitsgruppe DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) bei atmosphärischem Druck und unter 140 mmHg bei 25°C ermittelt.

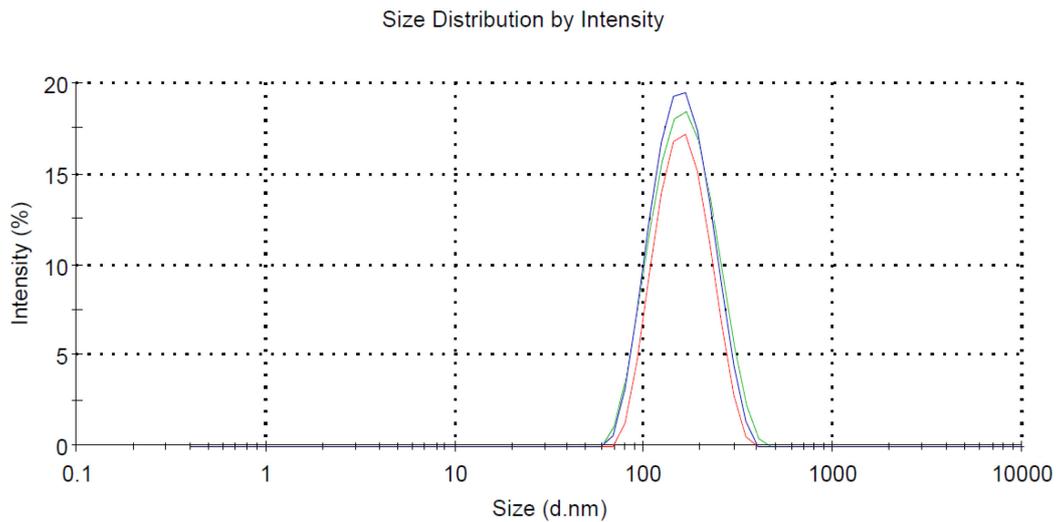


Abbildung 4.3 Intraday-Präzision der DLS-Messung bei 25°C ohne Druck (Standard): Repräsentative Intensitätsprofile für DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) TSL

Tabelle 3 Intraday-Präzision DLS bei 25°C ohne Druck (Standard): Messergebnisse (z-Average & Pdl) von drei repräsentativen, unabhängigen Messungen von DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) TSL

Messung	z-Average (nm)	PdI
I	151,1	0,079
II	148,4	0,111
III	147,5	0,101
MW ± SA	149,0 ± 1,9	0,097 ± 0,020

Die untersuchten TSL hatten bei 25°C und atmosphärischen Bedingungen einen z-Average von 149,0±1,9 nm (CV = 1,28 %), sowie einen PdI von 0,097±0,020 (CV = 16,88 %).

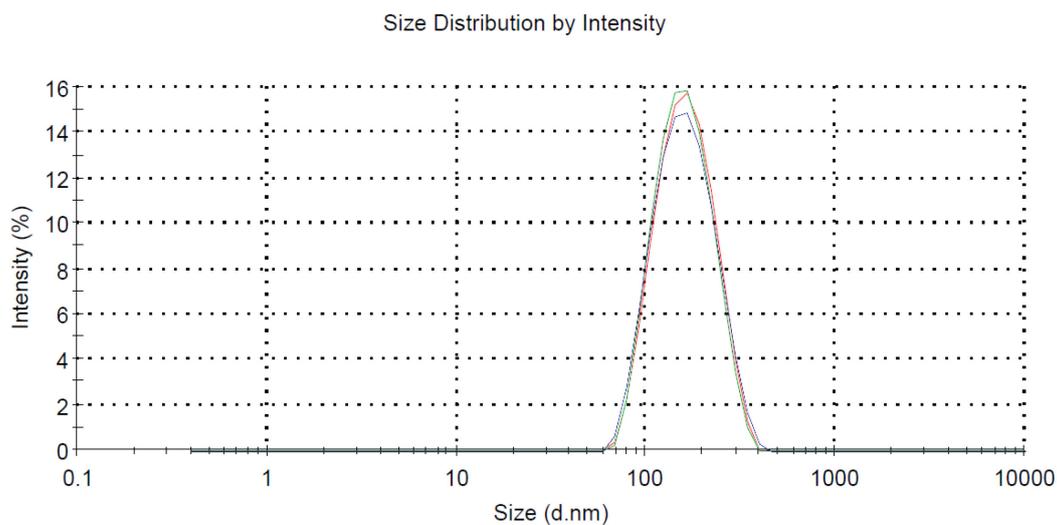


Abbildung 4.4 Intraday-Präzision der DLS-Messung bei 25°C und 140 mmHg: Repräsentative Intensitätsprofile für DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) TSL

Tabelle 4 Intraday-Präzision DLS bei 25°C und 140 mmHg: Messergebnisse (z-Average & Pdl) von drei repräsentativen, unabhängigen Messungen von DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) TSL

Messung	z-Average (nm)	PdI
I	148,5	0,108
II	148,5	0,090
III	150,2	0,100
MW ± SA	149,1 ± 1,0	0,100 ± 0,01

Die untersuchten TSL hatten bei 25°C und 140 mmHg einen z-Average von 149,1±1,0 nm (CV = 0,66 %), sowie einen PdI von 0,1±0,01 (CV = 9,08 %).

Der Polydispersionsindex (PdI) ist dimensionslos und gibt Auskunft über die Größenverteilung der Moleküle einer Probe. Je kleiner der PdI, desto einheitlicher ist die Größenverteilung der Partikel in der zu untersuchenden Probe (Monodispersität). Laut des Herstellers des verwendeten Zetasizer (Fa. Malvern) sind Proben mit einem PdI von 0,0 - 0,1 als monodispers und mit einem PdI > 0,1 als polydispers anzusehen. Proben mit einem PdI > 0,7 (= sehr breite Größenverteilung) sind wahrscheinlich nicht für die Technik der

dynamische Lichtstreuung (DLS) geeignet (47, 102). Insgesamt sind somit die TSL als monodispers zu bewerten und als für das verwendete Verfahren der DLS geeignet anzusehen.

Mit einem CV von 1,28 % für DLS unter atmosphärischen Bedingungen und 0,66 % bei einem angelegten Druck von 140 mmHg konnte insgesamt für das Messverfahren eine geringe Streuung bezogen auf den Mittelwert nachgewiesen werden. Der Messaufbau ist somit für DLS-Messungen geeignet, da der angelegte hydrostatische Druck keine Auswirkung auf Intraday-Präzision hat.

4.3 Effekte

4.3.1 Formulierungen und Charakterisierung

Es wurden insgesamt fünf Formulierungen unterschiedlicher Lipidzusammensetzungen hergestellt. Alle TSL-Chargen wurden hinsichtlich ihrer Vesikelgröße, ihres ζ -Potential, CF-zu-Lipid Verhältnis, Polydispersionsindex (PDI) und der Einschlusseffizienz charakterisiert. Die Zusammensetzungen und Charakterisierungsergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Hergestellte TSL-Formulierungen und ihre Eigenschaften

Formulierung (mol/mol)	Abkürzung	z-Average (nm)	ζ -Potential (mV)	PDI	Lipid ¹ (mM)	EE ² (%)	CF:lipid (mol/mol)	T _m ³ (°C)
DPPC/DSPC/DPPG ₂ /Chol (45:18:27:10)	C ₁ PG ₂ -TSL	154	-25,3	0,09	39,0	4,4	0,11	
DPPC/DSPC/DPPG ₂ /Chol (40:16:24:20)	C ₂ PG ₂ -TSL	157	-28,6	0,07	32,7	3,5	0,11	
DPPC/DSPC/DPPG ₂ /Chol (35:14:21:30)	C ₃ PG ₂ -TSL	160	-28,6	0,05	22,8	3,1	0,13	
DPPC/DSPC/DPPG ₂ (50:20:30)	PG ₂ -TSL	159	-24,3	0,10	47,6	4,4	0,09	42,4 ± 0,1
DPPC/DSPC/DPPG ₂ (50:20:30)	PG ₂ -TSL mit eingeschlossenem Doxorubicin = PG ₂ -TSL+DOX	126	-24,0	0,09	32,3		0,15	42,4 ± 0,1
DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG2000 (90:10:4)	PEG2000-TSL	126	-1,9	0,08	45,8	7,6	0,18	40,9 ± 0,1

¹ Gehalt an Phospholipiden, ² Einschlusseffizienz, ³ (44)

Mit einem Durchmesser von mindestens 125,8±5,1 nm (PEG2000-TSL) und maximal 160,2±1,7 nm (C₃PG₂-TSL) lagen alle Liposomenchargen im durch die Extrusion (Filter-Porengröße 200 nm) bestimmten und erwarteten Größenbereich (43). Der eingesetzte Zetasizer besitzt einen Messbereich von 0,3 nm bis 10 μ m, so dass alle Liposomenchargen für das verwendete Messverfahren geeignet waren (siehe Abbildung 4.5).

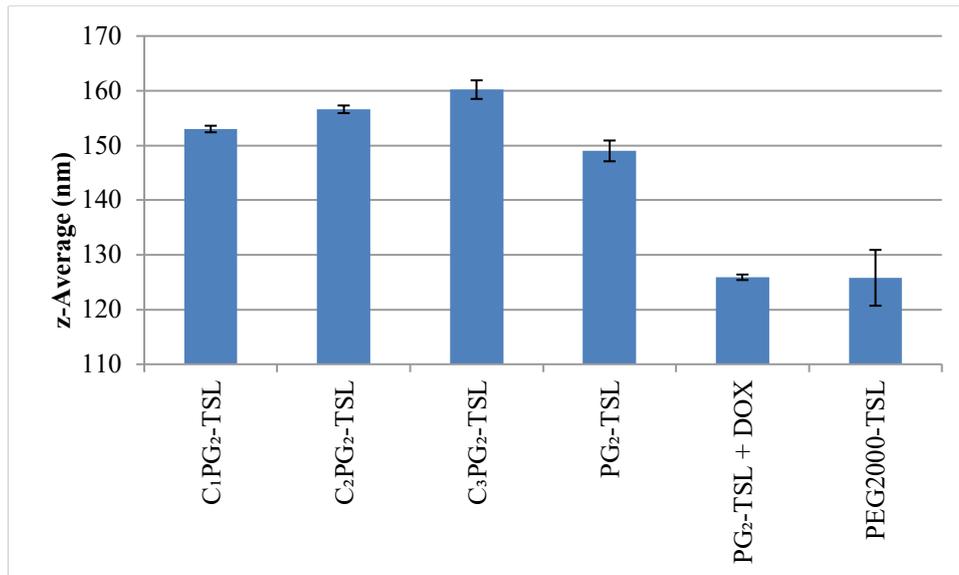


Abbildung 4.5 Größenverteilung der untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C

Das ζ -Potential der untersuchten TSL-Chargen lag sich zwischen - 28,6 mV (C₂PG₂-TSL und C₃PG₂-TSL) und -1,9 mV (PEG2000-TSL). Für die unterschiedlichen TSL-Formulierungen wurden anionische Lipide verwendet (DPPG₂ & DSPE-PEG2000), welche ein negatives ζ -Potential aufweisen. PEG2000 ist weiterhin dafür bekannt, Oberflächenladungen von Nanopartikeln abzuschirmen (31). Somit hatten die pegylierten TSL (PEG2000-TSL) ein annähernd neutrales ζ -Potential, während PG₂-haltige TSL ein negatives Potential aufwiesen (s. Abbildung 4.6). Alle erhobenen Oberflächenpotentiale befanden sich in dem vom Zetasizer Hersteller (Malvern Panalytical) angegebenen Messbereich von +/-500 mV.

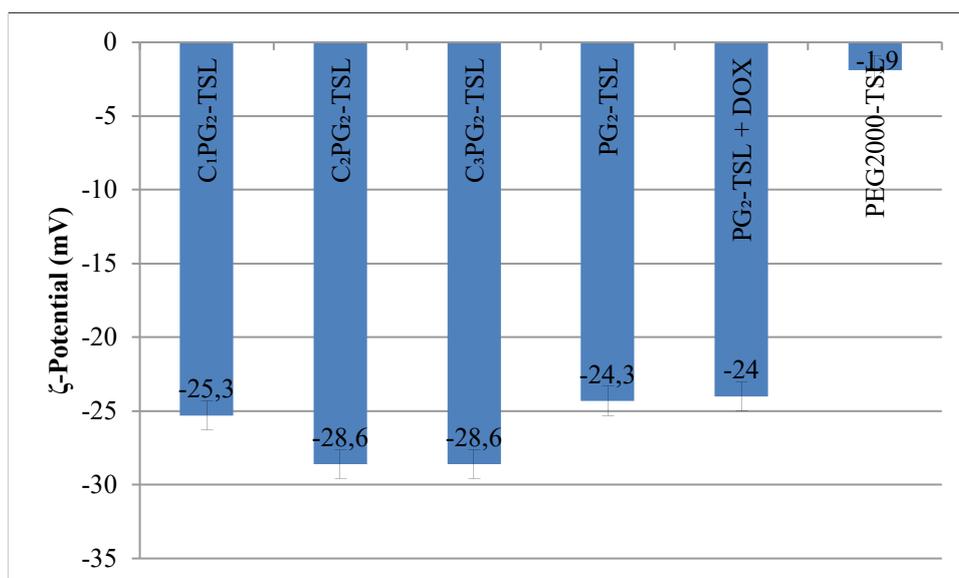


Abbildung 4.6 ζ -Potential der untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C

Die PG₂-TSL besaßen ein niedriges, molares CF-Lipid Verhältnis von 0,09, während die cholesterinhaltigen Formulierungen im Mittel ein CF-Lipid Verhältnis von $0,12 \pm 0,01$ mol/mol aufwiesen (s. Abbildung 4.7).

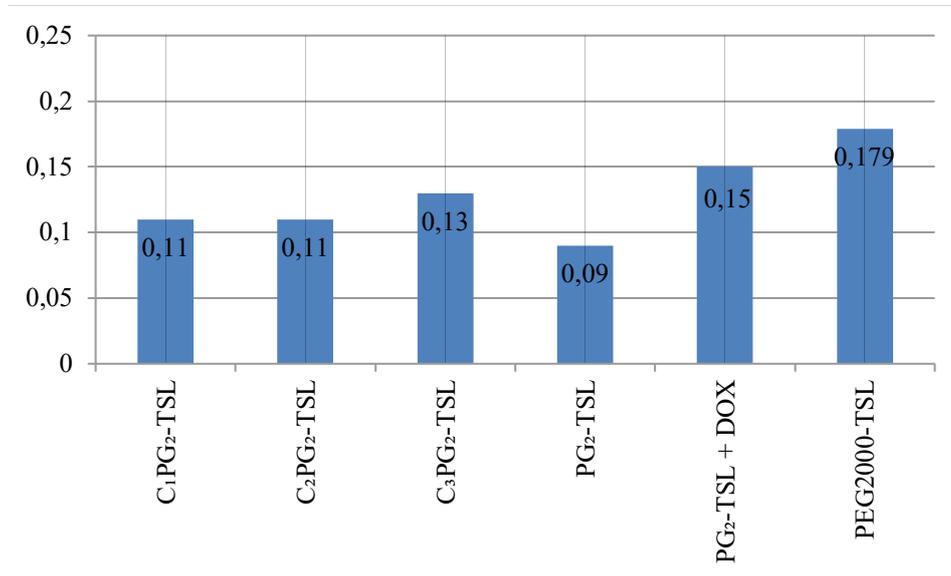


Abbildung 4.7 CF-Lipid Verhältnis der untersuchten TSL-Formulierungen

Die untersuchten TSL-Formulierungen besaßen einen PDI zwischen $0,053 \pm 0,014$ (C₃PG₂-TSL) und $0,097 \pm 0,016$ (PG₂-TSL) und sind somit als monodispers zu bewerten (s. Abbildung 4.8).

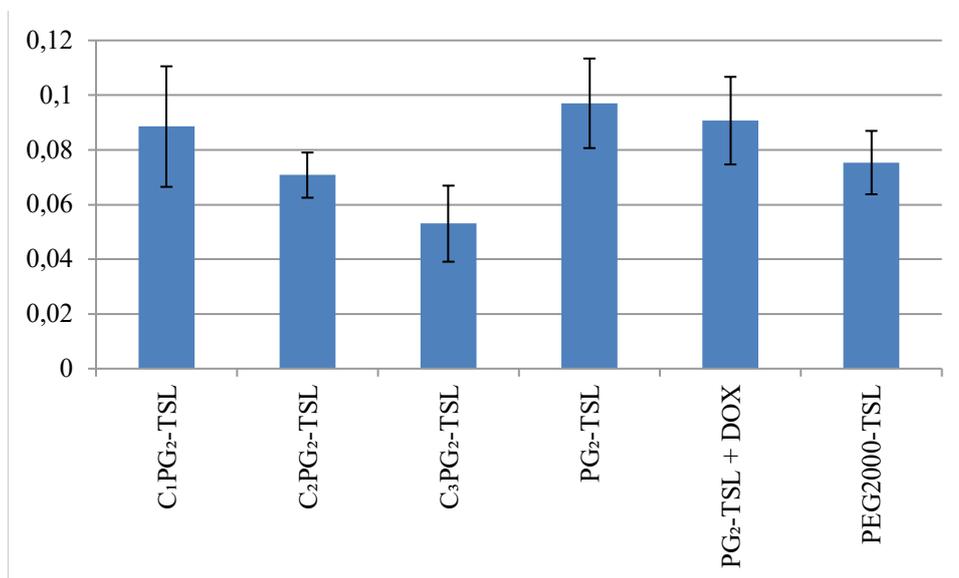


Abbildung 4.8 PDI der untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C

Die Einschlusseffizienz der untersuchten TSL-Formulierungen lag zwischen 3,05% (C₃PG₂-TSL) und 7,6% (PEG2000-TSL) (Abbildung 4.9). Diese Werte sind für die Herstellungsmethode zu erwarten und entsprechen publizierten PG₂-TSL-Präparationen (44, 41, 43).

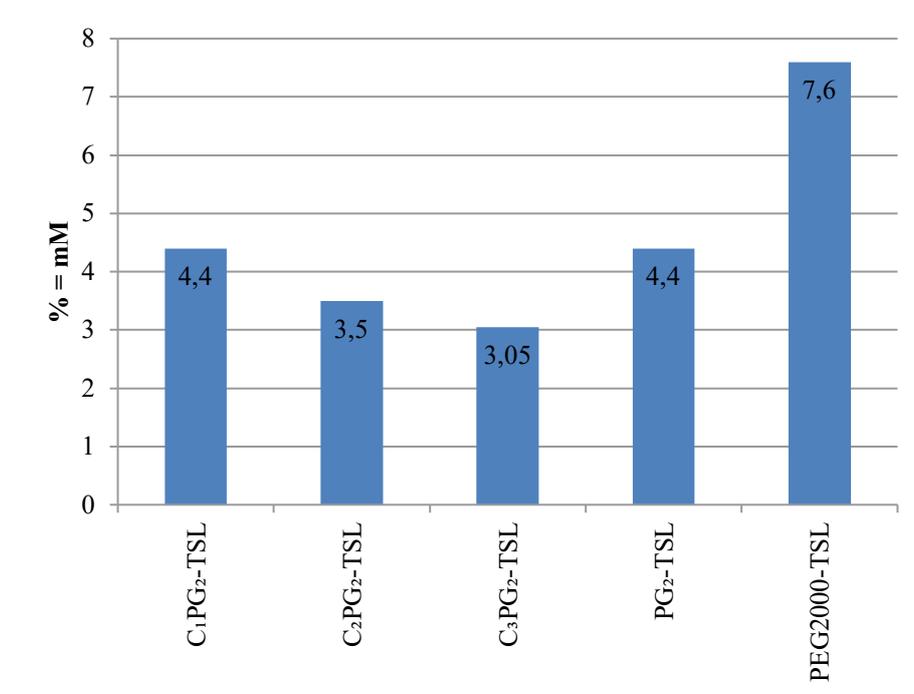


Abbildung 4.9 Einschlusseffizienz der untersuchten TSL-Formulierungen

Zur Evaluation der Stabilität der TSL hinsichtlich CF-Einschluss bei Körpertemperatur (37°C) wurde für PG₂-TSL und cholesterinhaltigen PG₂-TSL die in 3.3.6 beschriebene TSL-Stabilitätsmessung durchgeführt. Hierbei konnte gegenüber der cholesterinfreien PG₂-TSL, welche eine zeitabhängige CF-Freisetzung mit 48,5±1,9% CF-Freisetzung nach 24 h Inkubation aufwies, für die cholesterinhaltigen PG₂-TSL eine mit steigendem Cholesteringehalt abnehmende CF-Freisetzung nachgewiesen werden. Die Doppellipidmembran der C₃PG₂-TSL zeigte sich mit einer CF-Freisetzung von nur 3,4±0,7% nach 24 h Inkubation am stabilsten.

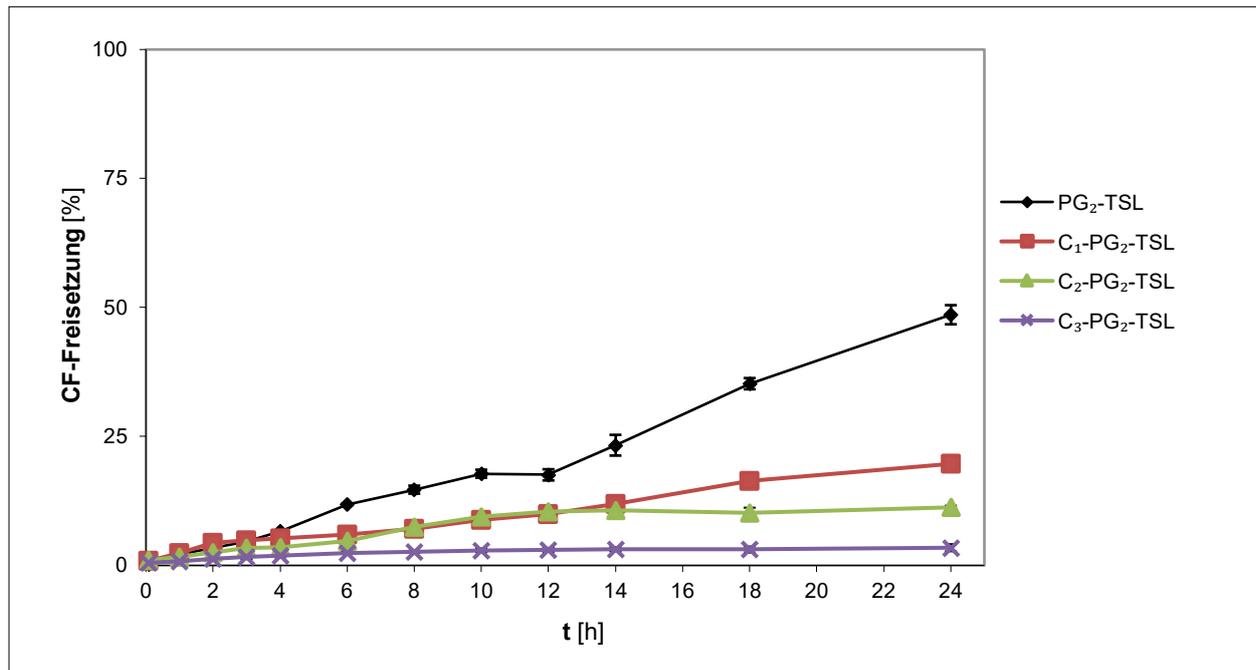


Abbildung 4.10 CF-Freisetzung cholesterinhaltiger PG₂-TSL bei Inkubation in FCS bei 37°C

PG₂-TSL zeigten die höchste - und eine im Zeitverlauf kontinuierlich ansteigende CF-Freisetzung mit einem Maximum von 48,5±1,9% nach 24 h. C₁PG₂-TSL und C₂PG₂-TSL zeigen bis 14 Stunden Inkubation ein ähnliches Freisetzungsverhalten mit im weiteren Verlauf gesteigerter CF-Freisetzung für die cholesterinärmere Charge. C₃PG₂-TSL zeigen durchgehend eine sehr geringe CF-Freisetzung von maximal 3,4±0,7% nach 24 h Inkubation. (1h: PG₂-TSL 2,2±0,0%, C₁PG₂-TSL 2,4±0,4%, C₂PG₂-TSL 1,6±0,4%, C₃PG₂-TSL 0,8±0,4%; 6h: PG₂-TSL 11,8±0,2%, C₁PG₂-TSL 6,0±0,1%, C₂PG₂-TSL 4,7±0,4%, C₃PG₂-TSL 2,5±0,2%; 12h: PG₂-TSL 17,6±1,1%, C₁PG₂-TSL 9,9±0,1%, C₂PG₂-TSL 10,5±0,3%, C₃PG₂-TSL 3,0±0,4%; 24h: PG₂-TSL 48,6±1,9%, C₁PG₂-TSL 19,7±1,4%, C₂PG₂-TSL 11,3±0,3%, C₃PG₂-TSL 3,4±0,7%)

Wie in 1.5.1 beschrieben stabilisiert Cholesterin als Bestandteil die liposomale Membran, so dass in die wässrige Phase eingeschlossene Wirkstoffe bzw. Fluoreszenzfarbstoffe erschwert die Membran überwinden können.

Im Folgenden wurde der Einfluss einer gemeinsamen Inkubation von PG₂-TSL mit Humanalbumin (40g/L), sowie dem Lipidakzeptorvesikel (LAV) DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol) in FCS evaluiert.

In Anwesenheit von HA kann eine deutliche Reduktion der CF-Freisetzung mit einer maximalen Freisetzung von 7,3±0,9% nach 24 h beobachtet werden. Führt man eine gemeinsame Inkubation mit LAV durch, kann eine deutlich gesteigerte CF-Freisetzung mit Abflachung der Freisetzungskurve nach 6 h (46,1±0,2%) und einer maximalen Freisetzung von 74,9±1,4% nach 24 h beobachtet werden.

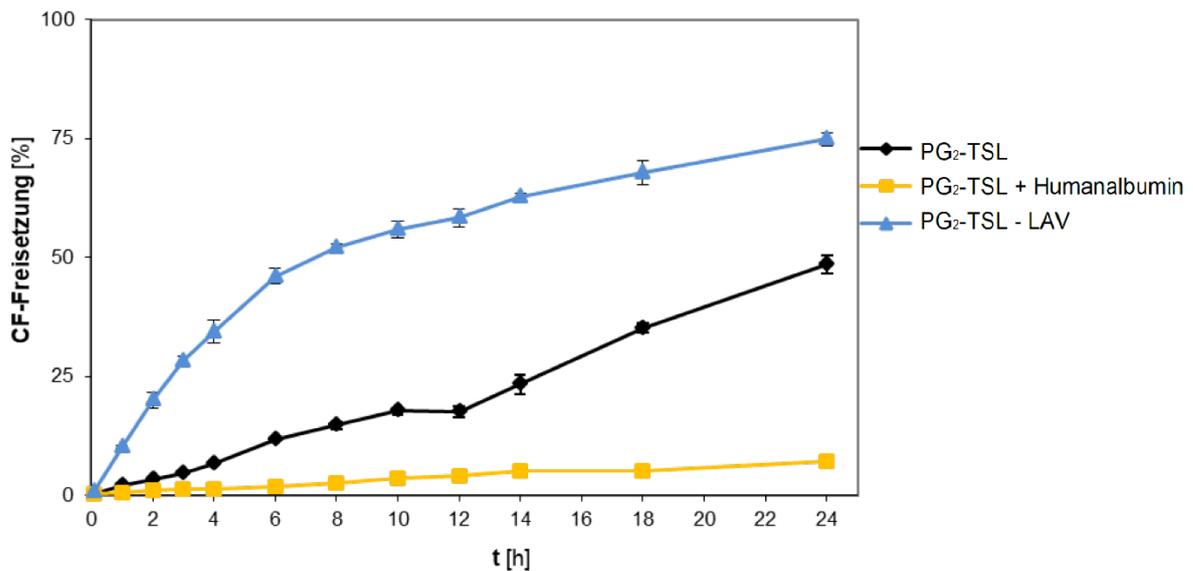


Abbildung 4.11 CF-Freisetzung von PG₂-TSL bei Inkubation in Anwesenheit von LAV (DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol)) bzw. Humanalbumin (40g/L) in FCS bei 37°C

In Anwesenheit von Humanalbumin (40g/L) kommt es zu einer deutlichen Reduktion der CF-Freisetzung von 48,6±1,9% (PG₂-TSL) auf 7,3±0,9% (PG₂-TSL + Humanalbumin). Die Inkubation von PG₂-TSL mit LAV führt zu einer gesteigerten CF-Freisetzung mit Abflachung der Freisetzungskurve nach 6 h (46,1±0,2%) und einer maximalen Freisetzung von 74,9±1,4% nach 24 h.

(1h: PG₂-TSL 2,2±0,0%, PG₂-TSL + Humanalbumin 0,6±0,2%, PG₂-TSL + LAV 10,2±0,3%; 6h: PG₂-TSL 11,8±0,2%, PG₂-TSL + Humanalbumin 2,0±0,2%, PG₂-TSL + LAV 46,1±1,6%; 12h: PG₂-TSL 4,0±0,3%, PG₂-TSL + Humanalbumin 4,0±0,3%, PG₂-TSL + LAV 58,4±1,9%; 24h: PG₂-TSL 48,6±1,9%, PG₂-TSL + Humanalbumin 7,3±0,9%, PG₂-TSL + LAV 74,9±1,4%,

Die hergestellten TSL-Formulierungen sind in ihren Eigenschaften mit bereits publizierten TSL vergleichbar (44, 43) und somit sind die erhobenen Daten relevant für die derzeit laufende (prä-) klinische Entwicklung der PG₂-TSL durch die Thermosome GmbH.

4.3.2 Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die TSL-Größe

Zur Evaluation des Einflusses von hydrostatischem Druck und Temperatur auf das Größenverhalten der unterschiedlichen TSL-Formulierungen erfolgten wie in 4.1.3 beschrieben mindestens jeweils drei unabhängige Messläufe der TSL bei entsprechenden physikalischen Bedingungen.

Für jede Charge wurden mindestens drei Temperaturbereiche (25 °C, 37 °C, 41 °C), sowie ein Druckbereich von 0 mmHg (= atmosphärischer Druck) bis 140 mmHg untersucht. Die Formulierungen PG₂-TSL und PG₂-TSL+DOX wurden ergänzend bei 45 °C vermessen.

Da unter diesen Bedingungen T_m der jeweiligen Formulierung deutlich überschritten wird (T_m PG₂-TSL $42,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ 44), ist davon auszugehen, dass die Doppellipidmembran in der flüssig-kristallinen Phase vorliegt. Diese Messreihen sollten ergänzend den Einfluss von hydrostatischem Druck in der $L\alpha$ -Phase abbilden und somit untersucht werden, ob die Lipidphase die Ergebnisse beeinflusst.

Zur besseren Vergleichbarkeit des Temperatur- und Druckeinflusses auf die unterschiedlichen TSL-Formulierungen wurden folgende Messerwerte ausgewählt (siehe Tabelle 6):

- Durchmesser unter atmosphärischen Bedingungen = $z\text{-Average}_{0\text{mmHg}} [nm]$
- Durchmesser im Mittel über einen Messbereich von 10 mmHg bis 140 mmHg
= $MW_{10-140\text{mmHg}} [nm]$
- Absolute Größenänderung des $z\text{-Average}$ zwischen 0 mmHg und StSt.
= $\Delta 0\text{mmHg}/\text{StSt.} [nm]$
- Relative Größenänderung des $z\text{-Average}$ zwischen 0 mmHg und StSt.
= $\Delta 0\text{mmHg}/\text{StSt. rel.} [\%]$
- Absolute Größenänderung des $z\text{-Average}$ zwischen 25°C und 41°C
= $\Delta z\text{-Average} [nm]$
- Relative Größenänderung des $z\text{-Average}$ zwischen 25°C und 41°C
= $\Delta z\text{-Average rel.} [\%]$

Tabelle 6 Temperatur- und Druckeinfluss auf den TSL-Durchmesser

Formulierung	Temperatur (°C)	z-Average 0mmHg (nm)	MW 10-140 mmHg (nm) = StSt	Δ 0mmHg/ StSt (nm)	Δ 0mmHg/ StSt rel. (%)	Δ z-Average (nm)	Δ z-Average rel. (%)
C ₁ PG ₂ -TSL	25	153,8±0,6	153,6±0,5	-0,18	-0,1	11,38	7,4
	37	165,8±4,5	157,6±2,7	-8,27	-5,0		
	41	165,2±3,9	159,3±1,9	-5,91	-3,6		
C2PG ₂ -TSL	25	156,6±0,7	155,4±0,6	-1,22	-0,8	8,73	5,58
	37	164,6±0,9	159,8±0,7	-4,78	-2,9		
	41	165,3±3,4	158,8±0,9	-6,53	-4,0		
C3PG ₂ -TSL	25	160,2±1,7	159,7±0,6	-0,43	-0,3	12,89	8,05
	37	171,7±6,14	165,3±0,9	-6,47	-3,8		
	41	173,1±0,4	167,2±2	-5,89	-3,4		
PG ₂ -TSL	25	149±1,9	149,7±0,6	0,66	0,4	14,70	9,87
	37	156,3±3,2	153,4±0,6	-2,93	-1,9		
	41	163,7±2,6	155±2,9	-8,66	-5,3		
	45	161,3±1,7	158,1±1,4	-3,16	-2,0		
PG ₂ -TSL+ DOX	25	125,9±0,5	124±0,4	-1,89	-1,5	5,57	4,42
	37	129,6±3,8	123,6±0,5	-6,03	-4,7		
	41	131,5±4,5	126,1±0,7	-5,42	-4,1		
	45	133±3,5	129±0,5	-4,01	-3,0		
PEG2000-TSL	25	125,8±5,1	128,7±0,4	2,88	2,3	8,20	6,52
	37	134,7±1,9	131,6±0,6	-3,09	-2,3		
	41	134±2,2	130,6±0,5	-3,47	-2,6		

Bei 25°C konnte für alle Chargen mit steigendem hydrostatischem Druck keine relevante Größenänderung beobachtet werden. Für höhere Temperaturen (37°C, 41°C bzw. 45°C) konnte insbesondere im niedrigen Druckbereich (≤ 30 mmHg) der größte Einfluss auf den TSL-Durchmesser beobachtet werden.

Bei weiter steigendem hydrostatischem Druck kommt es zur Ausprägung eines sog. Steady State (StSt) in dem trotz steigendem Druck keine eindeutige Größenänderung der TSL mehr dokumentiert werden kann. *MW 10-140mmHg [nm]* spiegelt somit das StSt wieder und soll eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen TSL in diesem Zustand ermöglichen.

z-Average 0mmHg [nm] und Δ *z-Average rel. [%]* wurden gewählt um den Temperatureinfluss auf die mittlere Vesikelgröße der TSL im StSt zu verdeutlichen.

- C₁PG₂-TSL (Abbildung 4.12 A): Bei 37°C konnte eine Abnahme des z-Average von 165,8±4,5 nm auf 157,6±2,7 nm nachgewiesen werden, wenn der Druck von 0 mmHg auf 140 mmHg erhöht wurde. Bei 41°C konnte im selbigen Druckbereich eine Abnahme des Vesikeldurchmessers von 165,2±3,9 nm auf 159,3±1,9 nm nachgewiesen werden.
- C₂PG₂-TSL (Abbildung 4.12 B): Bei 37°C konnte eine Abnahme des z-Average von 164,6±0,9 nm auf 159,8±0,7 nm nachgewiesen werden, wenn der Druck von 0 mmHg auf 140 mmHg erhöht wurde. Bei 41°C konnte im selben Druckbereich eine Abnahme des Vesikeldurchmessers von 165,3±3,4 nm auf 158,8±0,9 nm nachgewiesen werden.
- C₃PG₂-TSL (Abbildung 4.12 C): Bei 37°C konnte eine Abnahme des z-Average von 171,7±6,1 nm auf 164,4±1,0 nm nachgewiesen werden, wenn der Druck von 0 mmHg auf 140 mmHg erhöht wurde. Bei 41°C konnte im selbigen Druckbereich eine Abnahme des Vesikeldurchmessers von 173,1±0,4 nm auf 166,0±0,8 nm nachgewiesen werden.
- PG₂-TSL (Abbildung 4.12 D): Bei 37°C konnte eine Abnahme des z-Average von 156,3±3,2 nm auf 154,4±0,9 nm nachgewiesen werden, wenn der Druck von 0 mmHg auf 140 mmHg erhöht wurde. Bei 41°C konnte im selbigen Druckbereich eine Abnahme des Vesikeldurchmessers von 163,7±2,6 nm auf 153,6±0,8 nm nachgewiesen werden.
- PG₂-TSL + DOX (Abbildung 4.12 E): Bei 37°C konnte eine Abnahme des z-Average von 129,6±3,8 nm auf 123,4±0,2 nm nachgewiesen werden, wenn der Druck von 0 mmHg auf 140 mmHg erhöht wurde. Bei 41°C konnte im selbigen Druckbereich eine Abnahme des Vesikeldurchmessers von 131,5±4,5 nm auf 125,6±0,9 nm nachgewiesen werden. Wurden die TSL auf 45°C erwärmt, kam es zu einer entsprechend zu einer Abnahme des Durchmesser von 133,0±3,5 nm auf 128,9±0,5 nm.

- PEG2000-TSL (Abbildung 4.12 F): Bei 37°C konnte eine Abnahme des z-Average von 134,7±1,9 nm auf 131,1±0,3 nm nachgewiesen werden, wenn der Druck von 0 mmHg auf 140 mmHg erhöht wurde. Bei 41°C konnte im selbigen Druckbereich eine Abnahme des Vesikeldurchmessers von 134,0±2,2 nm auf 130,4±0,4 nm nachgewiesen werden.

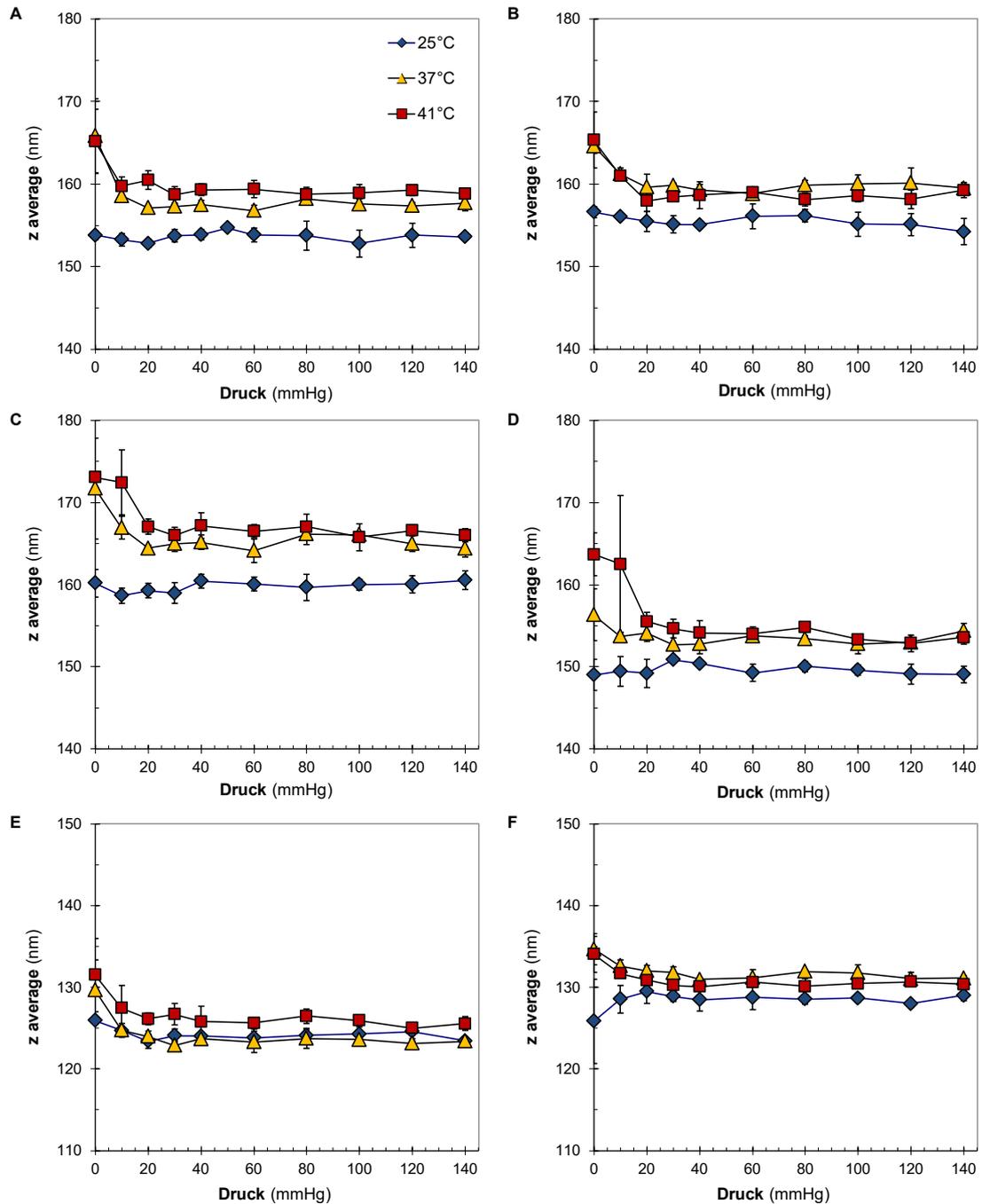


Abbildung 4.12 Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die Vesikelgröße (z-Average) von A) DPPC/DSPC/DPPG₂/Chol 45:18:27:10 (mol/mol) (C₁PG₂-TSL), B) DPPC/DSPC/DPPG₂/Chol 40:16:24:20 (mol/mol) (C₂PG₂-TSL), C) DPPC/DSPC/DPPG₂/Chol 35:14:21:30 (mol/mol) (C₃PG₂-TSL), D) DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30

(mol/mol) (PG₂-TSL). E) DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) mit eingeschlossenem DOX (PG₂-TSL + DOX), F) DPPC/P-Lyso-PC (DSPE-PEG2000 90:10:4 (mol/mol) (PEG2000-TSL). MW±SA von drei unabhängigen Messungen.)

Hydrostatischer Druck und Temperaturen von 37°C und 41°C beeinflussen den Durchmesser von Liposomen unabhängig von der verwendeten TSL-Formulierung.

Mit Zunahme des hydrostatischen Drucks ist eine Erhöhung von T_m sowie die unter 1.4 beschriebenen Veränderungen der Lipidmembran mit Abnahme des Bilayer-Durchmessers durch Reduktion des End-zu-End-Abstandes der Kohlenwasserstoffketten in dem ungeordneten Zustand der flüssig-kristallinen Phase (L_α) trotz Zunahme des Lipid-Volumens um T_m bekannt (112). Es stellte sich die Frage, ob durch Unterdruck die Packungsdichte der Lipidmembran abnimmt und damit der Transfer von geladenen hydrophilen Molekülen über den lipophilen Bereich der Membran leichter erfolgen kann, was durch einen schnelleren und effizienteren CF-Einschluss in PG₂-TSL nachgewiesen werden könnte.

4.4 Passiver Carboxyfluorescein-Einschluss bei Unterdruck

Häufig werden Liposomen durch gemeinsame Hydratisierung von Lipiden und einzuschließender, hydrophiler Substanz (z.B. CF), sowie anschließende Extrusion hergestellt. Entgegen diesem Vorgehen wurden die TSL unserer Arbeitsgruppe zunächst hergestellt (3.2.1 - 3.2.3), anschließend passiv durch Inkubation der intakten TSL mit der einzuschließenden Substanz beladen (3.2.4). Abschließend wurde zur Entfernung des nicht-eingeschlossenen CF das Trennverfahren der GFC eingesetzt (3.2.5). Vorangegangene Publikationen unserer Arbeitsgruppe haben mittels dieses passiven Einschlussverfahrens an vorgefertigten PG₂-TSL bereits erfolgreich den Wirkstoff Gemcitabin in TSL eingeschlossen, welche in Kombination mit lokaler Hyperthermie vielversprechende Ergebnisse in ersten veterinärmedizinischen Studien zur Therapie von Weichteilsarkomen zeigten (40, 72).

Zur Klärung der Frage, ob subatmosphärische Bedingungen die Effektivität einer CF-Beladung beeinflussen, fand der passive Einschluss von CF wie in 3.2.4 beschrieben nach Erhitzen der TSL-Formulierungen über T_m bei gleichzeitigem Anlegen von Unterdruck statt. Als Kontrolle erfolge auch der Einschluss unter atmosphärischen Bedingungen. So wurde die Möglichkeit und Effektivität einer passiven Beladung bei Unterdruck evaluiert.

Hierzu wurden zwei Liposomenchargen (PG₂-TSL) hergestellt (siehe Tabelle 7) und anschließend 1:1 (vol/vol) mit 100 mM CF pH 7,2 verdünnt. Experimente zum CF-

Einschluss erfolgten dann unter atmosphärischen Bedingungen, sowie bei 900 mbar, 800 mbar, 700 mbar, 600 mbar, 500 mbar, 400 mbar. Für die Charge PG-TSL-V1 erfolgte der CF-Einschluss über einen Zeitraum von 10 Minuten, für PG-TSL-V2 erfolgte der CF-Einschluss über insgesamt 60 Minuten. Somit wurde neben dem Einfluss des Drucks auch der Einfluss der Inkubationszeit auf die Einschlusseffizienz untersucht (siehe Tabelle 7).

4.4.1 Formulierungen und Charakterisierung

Die Charakterisierung der hergestellten TSL ist im Folgenden in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Charakterisierung der TSL-Formulierungen des CF-Einschlusses bei Unterdruck

Formulierung (mol/mol)	Abkürzung	CF-Einschlussdruck	z-Average (nm)	ζ -Potential (mV)	PDI	Lipid ¹ (mM)	EE ² (%)	CF:lipid (mol/mol)
DPPC/DSPC/DPPG2 (50:20:30)	PG-TSL-V1 (10 Min.)	Atmosphäre	144,00	-27,5	0,12	35,4	0,28	0,008
		900 mbar	145,00	-26,2	0,13	36,4	0,31	0,009
		800 mbar	145,00	-26,1	0,09	33	0,22	0,007
		700 mbar	143,00	-28,5	0,11	28,5	0,1	0,003
		600 mbar	142,00	-27,2	0,08	24,5	0,06	0,003
		400 mbar	142,00	-27,5	0,11	34,5	0,15	0,004
DPPC/DSPC/DPPG2 (50:20:30)	PG-TSL-V2 (60 Min.)	Atmosphäre	148,00	-26	0,09	31,6	0,65	0,02
		900 mbar	154,00	-28,1	0,09	29,9	0,61	0,02
		800 mbar	148,00	-26,8	0,07	31,8	0,62	0,02
		700 mbar	148,00	-26,9	0,11	28,9	0,54	0,02

¹ Gehalt an Phospholipiden, ² Einschlusseffizienz

Für PG-TSL-V1 lag der z-Average zwischen mindestens 141,9 nm (CF-Einschluss \leq 600 mbar) und maximal 145,4 nm (CF-Einschluss 900 mbar). Nach 60-minütigem Einschluss hatten die PG-TSL-V2 einen z-Average zwischen mindestens 147,6 nm (800 mbar) und maximal 153,9 nm (900 mbar). Der eingesetzte Zetasizer besaß einen Messbereich von 0,3 nm bis 10 μ m, so dass alle Liposomenchargen für das verwendete Messverfahren geeignet waren.

Im Mittel ergab sich für PG-TSL-V1 über alle Chargen ein z-Average von $143,5 \pm 1,7$ nm (CV = 0,01 %) und für PG-TSL-V2 $149,5 \pm 3,0$ nm (CV = 0,02 %). Aufgrund des kleinen CV kann davon ausgegangen werden, dass die Beladungsmethode keinen Einfluss auf die Vesikelgröße und somit die Dispersionsstabilität der TSL hat.

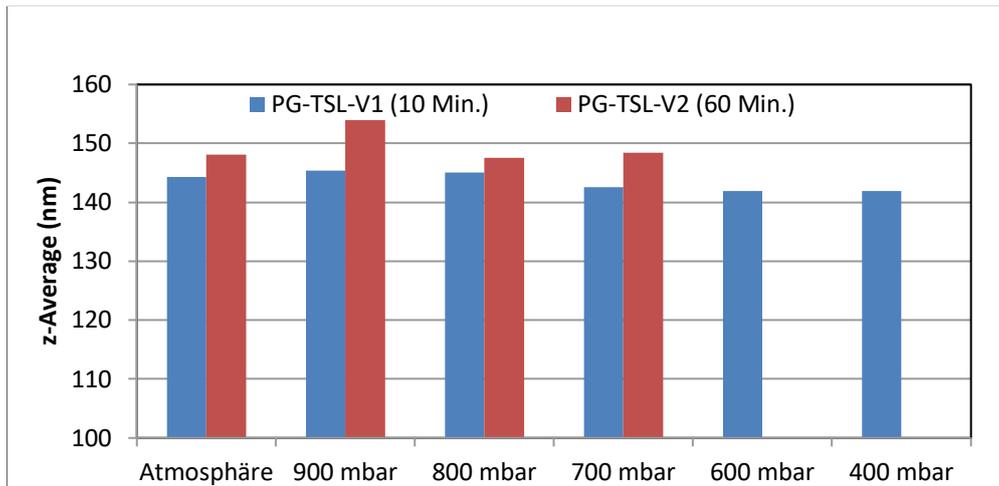


Abbildung 4.13 z-Average bei 25°C nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)

Die untersuchten TSL-Formulierungen besaßen einen PDI zwischen 0,065 (PG-TSL-V2 600 mbar) und 0,125 (PG-TSL-V1 900 mbar). Im Mittel ergab sich PG-TSL-V1 über alle Chargen ein PDI von $0,10 \pm 0,02$ (CV = 0,18 %) und für PG-TSL-V2 $0,09 \pm 0,02$ (CV = 0,2 %). Aufgrund des kleinen CV kann davon ausgegangen werden, dass die Beladungsmethode keinen Einfluss auf den PDI hat.

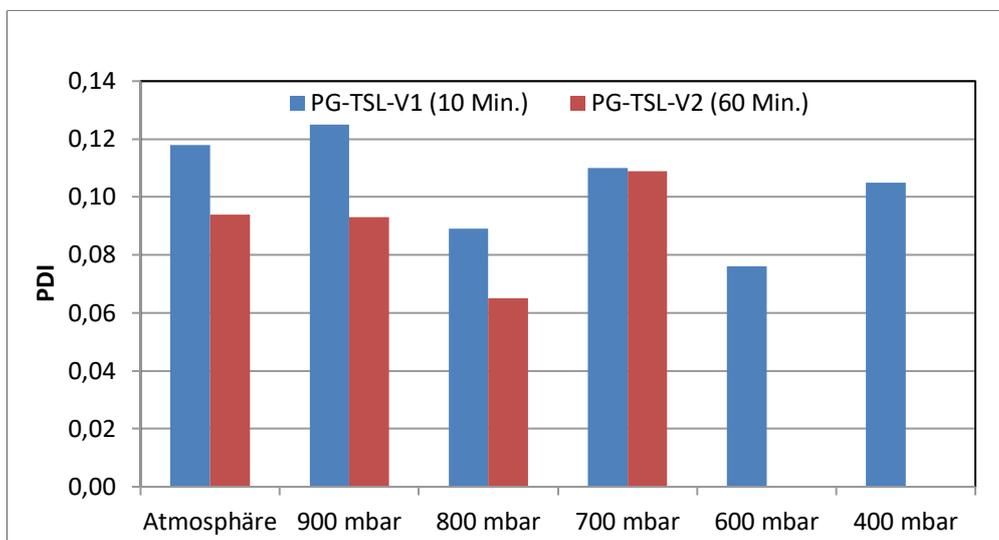


Abbildung 4.14 PDI nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)

Das ζ -Potential befand sich zwischen -28,5 mV (700 mbar) und -26,1 mV (800 mbar) für PG-TSL-V1 (10 Min.) und zwischen -28,1 mV (900 mbar) und -26 mV (Atmosphäre) für PG-TSL-V2 (60 Min.) und befand sich somit im Zetasizer Hersteller (Malvern Panalytical) angegebenen Messbereich von ± 500 mV.

Im Mittel ergab sich für PG-TSL-V1 über alle Chargen ein ζ -Potential von $-27,2 \pm 0,9$ (CV = 0,03 %) und für PG-TSL-V2 $-26,95 \pm 0,9$ (CV = 0,03 %). Aufgrund des kleinen CV kann davon ausgegangen werden, dass die Beladungsmethode keinen Einfluss auf das ζ -Potential hat.

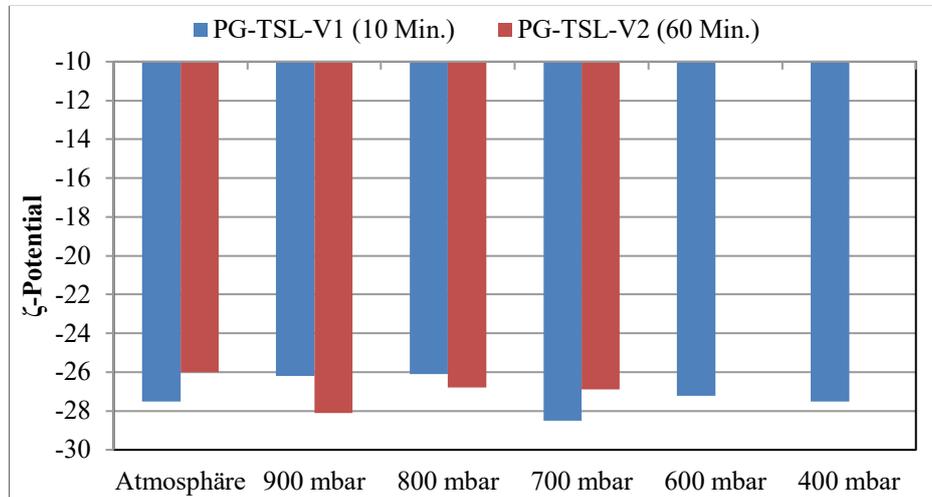


Abbildung 4.15 ζ -Potential nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)

Nach 10 Min. Einschluss besaßen die PG₂-TSL bei 900 mbar mit 0,009 das höchste, sowie bei 700 mbar bzw. 600 mbar mit 0,003 das niedrigste molare CF-Lipid Verhältnis. Nach 60 Min. Einschluss besaßen die PG₂-TSL unabhängig vom inkubierten Druckbereich (Atmosphäre bis 700 mbar) ein molares CF-Lipid Verhältnis von 0,02.

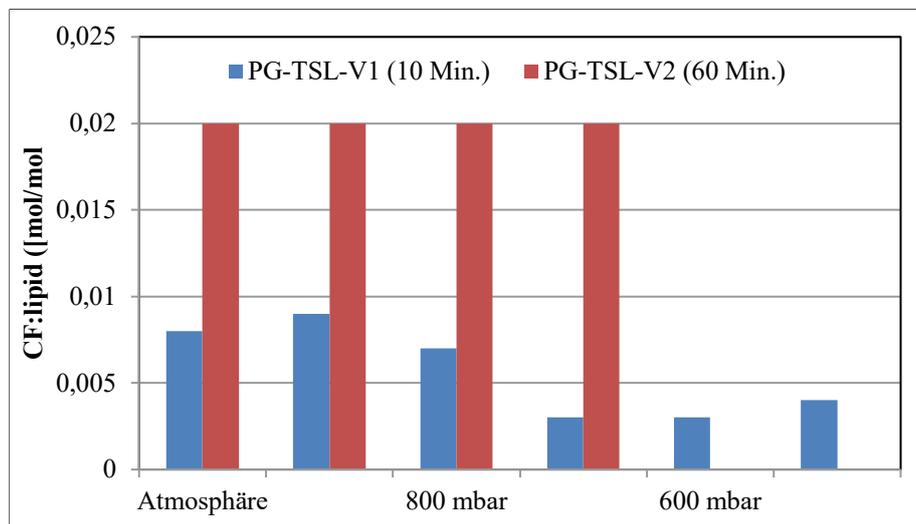


Abbildung 4.16 CF-Lipid Verhältnis nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (10 Min. vs. 60 Min.)

Die Einschlusseffizienz lag für PG-TSL-V1 (10 Min.) zwischen 0,06% (600 mbar) und 0,31% (900 mbar), sowie für PG-TSL-V2 (60 Min.) zwischen 0,54% (700 mbar) und 0,65% (Atmosphäre).

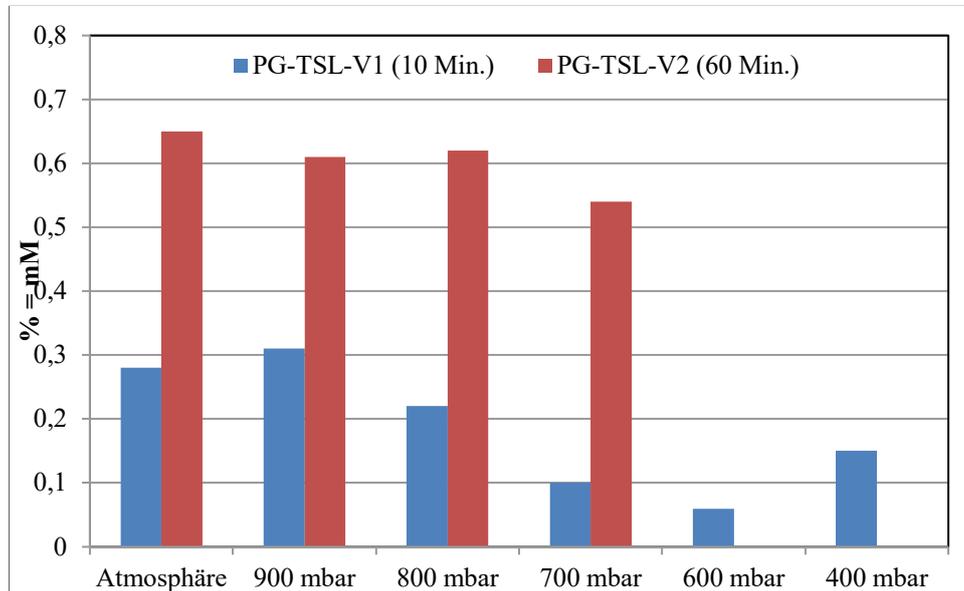


Abbildung 4.17 Einschlusseffizienz nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (PG-TSL-V1)

4.4.2 Temperaturprofile von bei Unterdruck mit CF beladenen PG₂-TSL

Wie in 3.3.4 beschrieben wurden die TSL-Chargen hinsichtlich ihrer temperaturabhängigen CF-Freisetzung in NaCl (Abbildung 4.18) und FCS (Abbildung 4.19) untersucht. Ergänzend erfolgte eine Inkubation über insgesamt 60 Minuten bei 37°C (Membran in gelförmiger Phase) und 42°C (flüssig-kristallinen Phase).

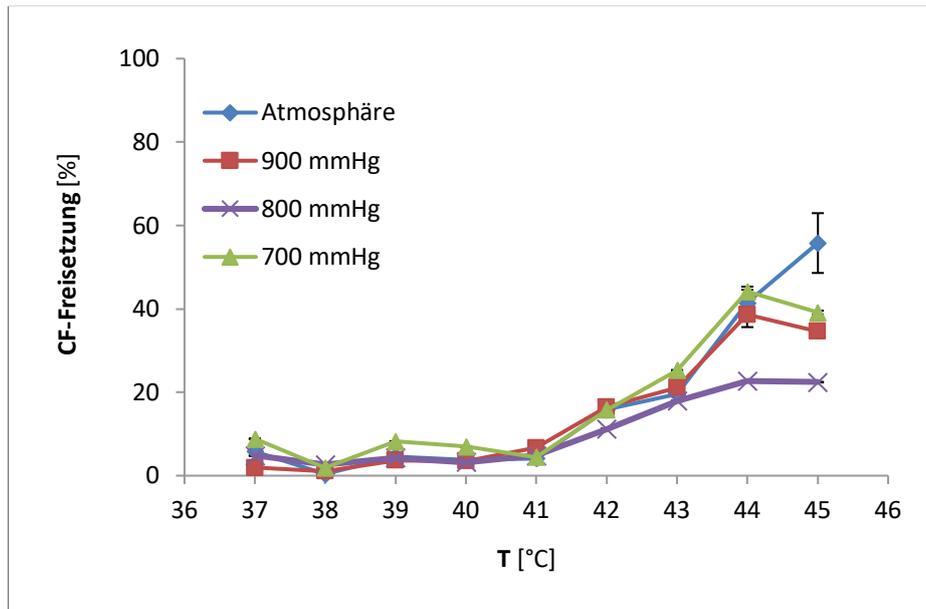


Abbildung 4.18 Temperaturprofil von PG-TSL-V1 in NaCl nach passivem CF-Einschluss

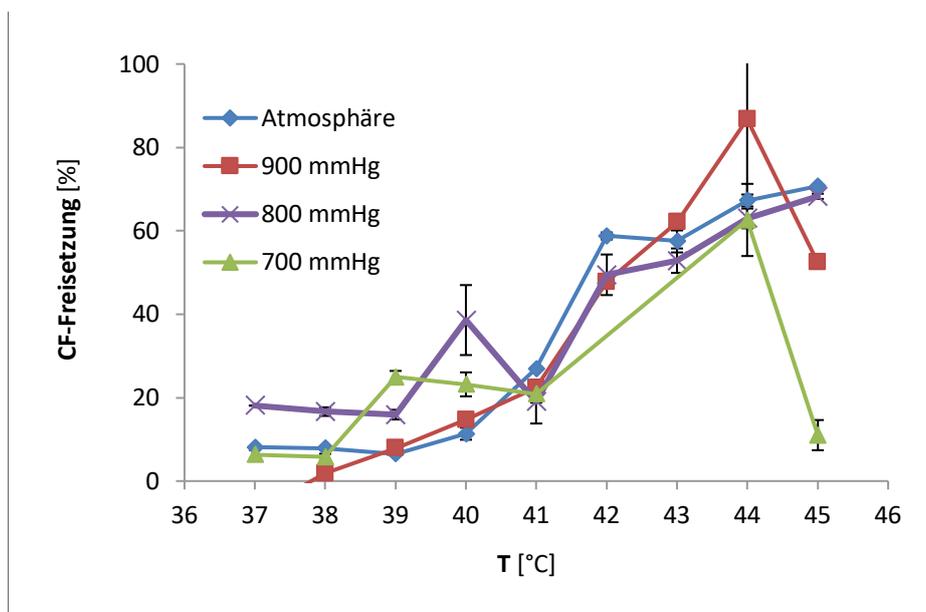


Abbildung 4.19 Temperaturprofil von PG-TSL-V1 in FCS nach passivem CF-Einschluss
 Die beiden Messwerte der 700 mmHg-TSL bei 42°C und 43°C wurden nicht berücksichtigt, da der Fluoreszenzwert durch einen möglichen Pipettierfehler im Vergleich zu den 41°C und 44°C Werten zu niedrig war.

Die CF-Freisetzung nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C war in NaCl nicht nachweisbar, unter Inkubation in FCS konnte eine maximale Freisetzung von $6,0 \pm 0,1\%$ (TSL mit atmosphärischem CF-Einschluss) gemessen werden. Bei 42°C konnte für die Inkubation in

NaCl eine maximale CF-Freisetzung von 100% (700 mmHg TSL), sowie in FCS eine maximale von $81,2 \pm 4,1\%$ (700 mmHg TSL) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.20).

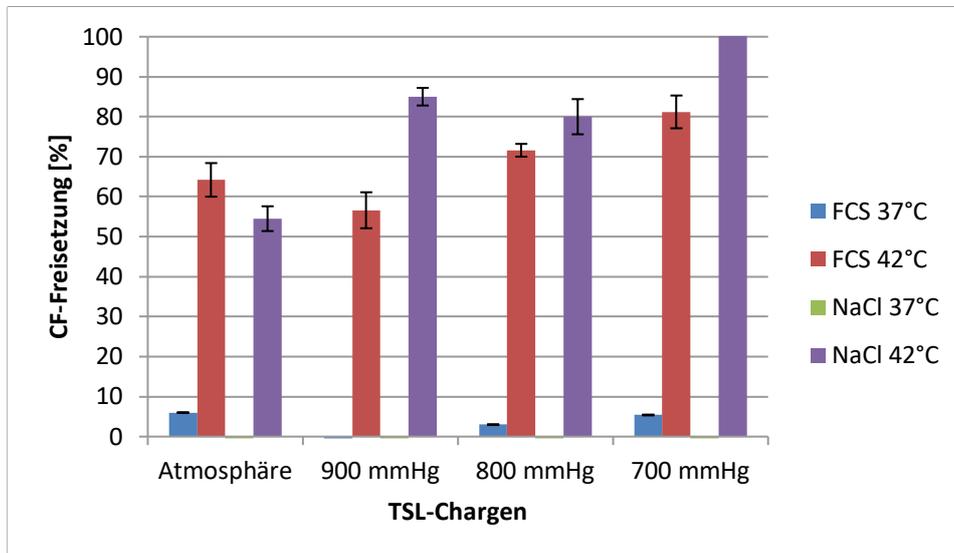


Abbildung 4.20 CF-Freisetzung nach passivem Einschluss für PG-TSL-V1 nach 60-minütiger Inkubation

Für PG-TSL-V2 konnte in Anwesenheit von FCS eine deutlich gesteigerte CF-Freisetzung von maximal $89,6 \pm 1,1\%$ (700 mmHg TSL bei 43°C) nachgewiesen werden. Insgesamt kam es zwischen 41°C und 42°C zum größten Anstieg der CF-Freisetzung über alle TSL-Formulierungen hinweg. Dies lässt sich durch die gesteigerte Permeabilität der Doppellipidmembran um T_m begründen (T_m für $\text{PG}_2\text{-TSL} = 42,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ 44). Gegenüber der Formulierung welche den CF-Einschluss unter atmosphärischen Bedingungen vollzogen hatte, zeigten die 700 mmHg TSL über den gesamten Temperaturbereich in NaCl (Abbildung 4.21) und FCS (Abbildung 4.22) die höchste CF-Freisetzung.

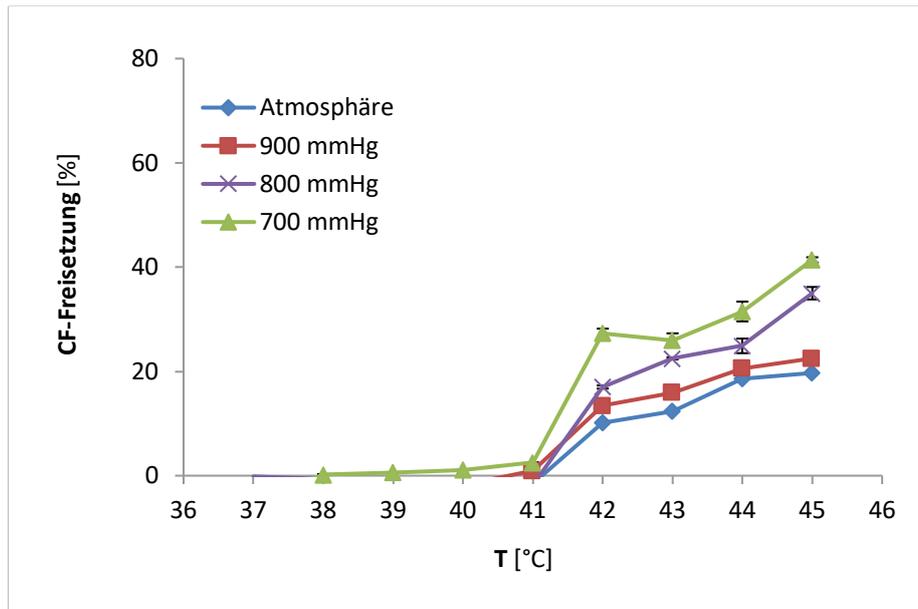


Abbildung 4.21 Temperaturprofil von PG-TSL-V2 in NaCl nach passivem CF-Einschluss

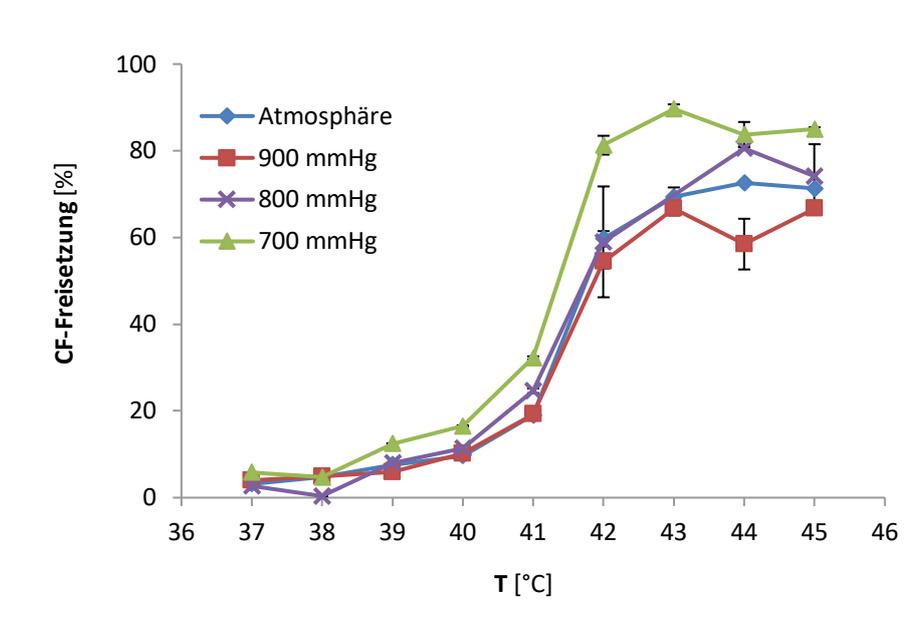


Abbildung 4.22 Temperaturprofil von PG-TSL-V2 in FCS nach passivem CF-Einschluss

Der Messwert der 800 mmHg-TSL bei 43°C wurden nicht berücksichtigt, da der Fluoreszenzwert durch einen möglichen Pipettierfehler im Vergleich zu den 42°C und 44°C Werten zu niedrig war.

Für keine TSL- Formulierungen konnte nach 60 Minuten Inkubation in NaCl bei 37°C eine relevante CF-Freisetzung nachgewiesen werden. Bei 37°C und Inkubation in FCS konnte eine maximale Freisetzung von $16,8 \pm 0,4\%$ (700 mmHg TSL) gemessen werden. Für die TSL-

Inkubation bei 42°C zeigten die 700 mmHg TSL in NaCl und FCS eine maximale CF-Freisetzung von nahezu 100% (siehe Abbildung 4.23).

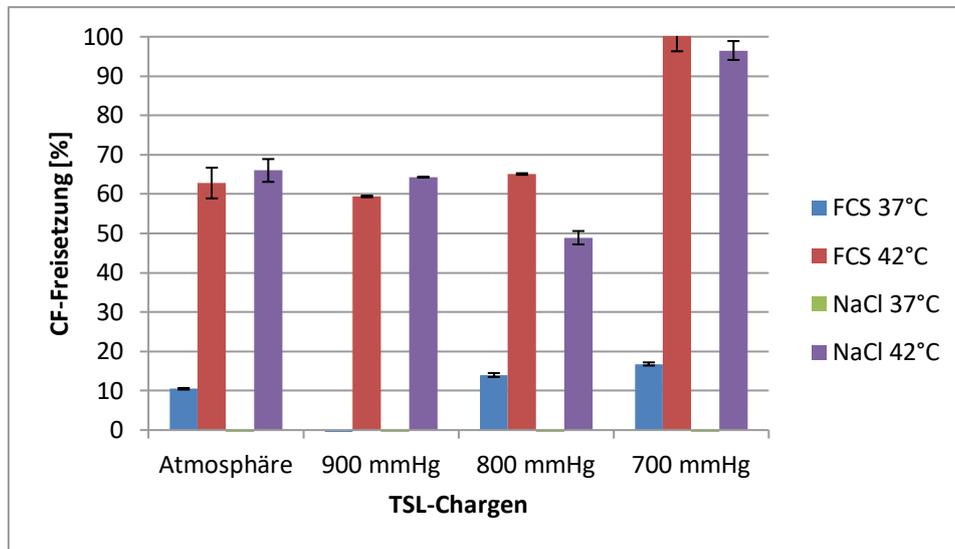


Abbildung 4.23 CF-Freisetzung nach passivem Einschluss für PG-TSL-V2 nach 60-minütiger Inkubation

5 Diskussion

TSL stellen als Nanotransporter in der onkologischen Systemtherapie einen vielversprechenden Therapieansatz dar (63). Neben dem gezielten Einschluss von potentiell organotoxischen Zytostatika in diese Transportvesikel, lässt sich durch die Lipidkomposition der TSL-Doppellipidmembran unter Verwendung des synthetischen Phospholipids DPPG₂ eine nahezu beliebige, temperaturselektive Wirkstofffreisetzung erreichen (33). In Kombination mit lokaler Hyperthermie konnten erste veterinärmedizinische Studien zum Einsatz von mit Gemcitabin (72) bzw. Doxorubicin (40, 110, 115) beladener DPPG₂-TSL vielversprechende Ergebnisse in der Therapie von Weichteilsarkomen verzeichnen.

Sowohl im Prozess der Herstellung, wie auch im in-vivo-Einsatz in der Medizin werden TSL unterschiedlichen Temperatur- und Druckbereichen ausgesetzt. Als intravasaler Arzneistofftransporter im humanen Organismus sind TSL je nach Gefäßtypus einem Druck zwischen 2 - 4 mmHg (zentralvenöser Druck) und 100 - 140 mmHg (systolischer Blutdruck) ausgesetzt (91). Mit zunehmender weltweiter Prävalenz für arterielle Hypertonie sind häufig deutlich höhere Blutdruckwerte zu erwarten (23, 24). Neben diesen physiologischen Bedingungen variieren je nach Tumorlokalisation, Vaskularisierungsstruktur, eingesetzter Medikation bzw. genutzten interventionellen Verfahren, wie bspw. der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) beim hepatozellulären Karzinom (HCC), die intravasalen (140 mmHg in arterieller Strombahn bis 12-15 mmHg am venösen Ende des Kapillarsystems) – und interstitiellen Druckverhältnisse (10 mmHg in Lungentumoren bis 50 mmHg in Melanomen) von Tumoren (11, 60, 69, 107).

Ergänzend hierzu unterliegen TSL jedoch auch vielfältigen thermischen Einflüssen. Bei der Herstellung, im Rahmen der Lagerung, nach intravenöser Applikation oder bei Eintritt in das Hyperthermie-Gebiet wirken auf TSL unterschiedliche Temperaturen ein.

Seit der erstmaligen Beschreibung von Liposomen durch Alec Douglas Bangham im Jahre 1964 (8, 86) gab es nur vereinzelte Studien, welche den Einfluss von hydrostatischem Druck auf Liposomen erforscht haben. Früh war bekannt, dass in Anwesenheit von gasförmigen Narkotika eine hydrostatische Druckerhöhung zu einem Anstieg der Phasenübergangstemperatur führt (58, 88).

Umfangreiche Kenntnisse über den Einfluss z.B. von Temperatur und Druck auf die biophysikalischen Eigenschaften sind jedoch für einen erfolgreichen Einsatz als effektiver

Nanotransporter in der Medizin wichtig. Während die Membranpermeabilität, das Wirkstoff-Freisetzungsverhalten, Stabilität oder Größenverhalten von DPPG₂-TSL unter dem Einfluss der Temperatur und der Gegenwart von Serumkomponenten bereits untersucht wurden (41, 43), erfolgte dies für den hydrostatischen Druck auf DPPG₂-TSL bisher nicht, wie es im Rahmen eines in-vivo-Einsatzes der Fall wäre. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in-vitro-Versuche sollen dem weiteren Verständnis der Membraneigenschaften DPPG₂-haltiger TSL dienen.

Da bisher kein Messaufbau zur Erfassung von TSL-Membranveränderungen unter hydrostatischem Druck etabliert war, wurde ein entsprechendes Verfahren entwickelt. Ziel war es u.a. einen für den Einsatz im Rahmen der DLS geeigneten Aufbau zu entwerfen.

5.1 Methodenentwicklung DLS-Messung unter Druck

Das entwickelte Messverfahren sollte mit handelsüblichen für den Laborbedarf bestimmten Materialien zu realisieren sein. Dazu wurde ein der EN 1060 entsprechendes Blutdruckmessgerät mittels Heidelberger-Verlängerung an eine einseitig verschlossene Messküvette angeschlossen (Abbildung 4.2, Seite 34). Da eine stabile Aufrechterhaltung des hydrostatischen Druckes während der Messreihen für die Validität der Ergebnisse existenziell ist, wurde vor jedem Experiment über die Dauer von 15 Minuten ein Test auf Druckbeständigkeit und somit Leckage-Freiheit durchgeführt. Nach dieser Überprüfung kam es im Rahmen der Messungen zu keinen Druckverlusten.

Als mögliche Fehlerquellen des Messverfahrens konnten primär vier Situationen identifiziert werden:

1. **Konnektierung:** Durch zu viel Kraftaufwand bei der Konnektierung der Heidelberger-Verlängerung mit dem Dreiwegehahn oder der Malvern-Messküvette kommt es zu einer Beschädigung des im Material weicheren Luer-Lock-Verschlusses an der Heidelberger-Verlängerung. In der Folge ist das System nicht mehr druckbeständig, wobei im Rahmen des 15-minütigen Tests auf Leckage-Freiheit ein Druckabfall auf dem Manometer zu beobachten ist. Das Schlauchsystem der Verlängerungen ist seitens des Herstellers bis zu 1500 mmHg (= 2 bar) druckbeständig.
2. **Verschlussstopfen:** Durch Verunreinigungen oder zu geringen Anpressdruck ist der Verschlussstopfen der Malvern-Messküvette, nachdem die Proben hinein pipettiert

wurde, zu locker und löst sich unter Druck. In der Folge fällt der Druck im System ab und das Probenmaterial tritt aus.

3. **Temperierung:** Für Messungen die nicht bei Raumtemperatur stattfanden, mussten die TSL-Proben im Thermomixer, sowie die leere Malvern-Messküvette im Zetasizer über fünf Minuten auf die entsprechende Temperatur vorgewärmt werden. Bei unvollständiger Erwärmung bzw. falschen Einstellung sind die Messergebnisse beeinflusst.
4. Ungeeignetes **Probenmaterial:** Proben mit einem $PdI > 0,7$ (sehr breite Größenverteilung, multidisperse Partikel) sind für die dynamische Lichtstreuung ungeeignet (Kapitel 4.2, Seite 34). Die im Rahmen der Druckversuche untersuchten TSL-Formulierungen besaßen einen PdI zwischen $0,053 \pm 0,014$ (C_3PG_2 -TSL) und $0,097 \pm 0,016$ (PG_2 -TSL). Sie sind somit als monodispers und für die Zeta- und Größenmessungen mittels DLS geeignet anzusehen.

Ein Einsatz des entwickelten Systems in anderen messtechnischen Geräten wie z.B. MRT oder Fluoreszenzspektrometer wurde im Rahmen der Arbeit nicht untersucht, scheint aber durchaus erdenklich.

5.2 Herstellung und Charakterisierung von TSL

Zur Evaluation des Einflusses von auf TSL ausgeübten hydrostatischen Druck bei Temperaturen ober- und unterhalb von T_m musste zunächst eine geeignete liposomale Formulierung gefunden werden. Da das synthetische Phospholipid $DPPG_2$ je nach molarem Verhältnis in der Doppellipidmembran von TSL eine ideale temperaturelektive Wirkstofffreisetzung hat, sowie sich durch weitere nützliche Eigenschaften wie eine Verlängerung der vaskuläre Zirkulationszeit von TSL und signifikant beschleunigte Freisetzungsgeschwindigkeit um T_m auszeichnet, wurden primär auf diesem Lipid basierende Formulierungen hergestellt, auch da es ermöglichte die bereits publizierten Ergebnisse wie z.B. Einfluss der Temperatur (44, 77) oder die Liposomengröße (43) auf die Freisetzung eingeschlossener Wirkstoffe um den Faktor Druck zu ergänzen.

Als weitere Membranbestandteile waren Cholesterin und DSPE-PEG2000 von Interesse, um z.B. der Einfluss des Drucks auf TSL-Doppellipidmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung und Fluidität zu untersuchen. Cholesterin kann als ubiquitär im Körper vorkommendes Lipid von einer Zellmembran zur Anderen übertreten werden (28) und führt zu

einer Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten in der flüssig-kristallinen Phase mit Anstieg von T_m ab Cholesterinkonzentrationen von 10-15 mol% (35)(Kapitel 1.5.1). Ab 30 mol% geht die Lipidmembranen mit DPPC als Hauptkomponente von einer kristallinen Phase in eine flüssig-ungeordnete Phase über (45). Durch die Verwendung von DSPE-PEG2000 als Bestandteil in TSL kann die Halbwertszeit von cholesterinhaltigen (5, 62) und cholesterinfreien Liposomen (4) nach intravenöser Applikation deutlich verlängert werden, so dass es ebenfalls als Membrankomponente nützlich scheint.

Es wurden nach der Methode der Lipidfilm-Hydratisierung und Extrusion (67) insgesamt fünf unterschiedliche Formulierungen hergestellt. Drei cholesterinhaltige Formulierungen (10-, 20-, 30 mol% Cholesterin, zur Untersuchung des Einflusses der Membranfluidität), PG₂-TSL mit und ohne eingeschlossenem Doxorubicin (um den Einfluss des festen und starren Wirkstoffkristalls (71) zu untersuchen), sowie PEG2000-haltige TSL um den Einfluss der großen Oberflächenmodifizierung durch PEG zu untersuchen.

Alle Liposomenchargen besaßen unabhängig von der Lipidzusammensetzung die notwendige Qualität für DLS-Messungen (Tabelle 5, Seite 37), die biophysikalischen Daten der TSL sind analog zu bereits publizierten DPPG₂-TSL (44, 43), so dass ein Vergleich möglich ist.

Die endgültige TSL-Größe wurde durch die Porengröße des eingesetzten Filters (200 nm) bestimmt. Für eine homogene Größenverteilung und erfolgreiche Liposomen-Bildung erfolgte zehnmals die Extrusion der Dispersion bei möglichst geringem Druck (5 bar - max. 22 bar). In Kombination mit der Charakterisierung via DLS ließ sich zeitnah und valide die Qualität der hergestellten Nanovesikel beurteilen. Die ermittelten PDI-Werte (zwischen minimal $0,053 \pm 0,014$ bei C₃PG₂-TSL und maximal $0,097 \pm 0,016$ bei PG₂-TSL) bestätigen, dass die gewünschte monodisperse Größenverteilung vorlag. Ebenfalls ergaben sich keine Hinweise auf druckinduzierten Größenänderungen, somit handelt es sich um das optimale Verfahren zur Synthese von TSL als Nanotransporter.

Für Phosphatidylcholin-haltige Liposomen ist bekannt, dass selbst bei Temperaturen deutlich unter T_m und einem Vorliegen der Lipid-Doppelmembran in der sog. gelförmigen Phase, diese in geringem Umfang durchlässig für Wassermoleküle ist. Für andere Moleküle scheint diese Permeabilität nicht ebenfalls zwangsläufig vorzuliegen, da z.B. Glukose die Membran in diesem Zustand nicht überwinden kann. Um T_m liegt eine Koexistenz flüssiger und gelförmiger Domänen vor und die Permeabilität steigt dramatisch an (105). Zur Vermeidung von relevanten

Diffusionsvorgängen wurden die hergestellten Liposomen bei 2 bis 8 °C gelagert. Die TSL-Stabilität unter diesen Bedingungen wurde bereits bewiesen (44). Somit waren die TSL unabhängig vom Zeitpunkt der Extrusion beim jeweiligen Versuch von gleichbleibender Qualität.

Die synthetisierten TSL wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben vollständig charakterisiert und analysiert. Für die cholesterinhaltigen Chargen mit mittleren Cholesterin-Konzentrationen zeigte sich gegenüber den cholesterin-freien PG₂-TSL eine abnehmende Einschlusseffizienz für CF (PG₂-TSL 4,4 mM, C₁PG₂-TSL 4,4 mM, C₂PG₂-TSL 3,5 mM, C₃PG₂-TSL 3,05 mM; vgl. Abbildung 4.9). Dies kann u.a. durch die erschwerte Permeabilität aufgrund der Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten (35) bedingt sein. Geringe Cholesterin-Konzentrationen (10%) scheinen den CF-Einschluss bei der untersuchten Formulierung (C₁PG₂-TSL) gegenüber der cholesterinfreien Charge nicht relevant zu beeinflussen.

Da TSL nach intravasaler Applikation im menschlichen Organismus frei zirkulieren, war auch das zeitabhängige CF-Freisetzungsverhalten der hergestellten TSL-Formulierungen von Interesse. Im Rahmen der durchgeführten 24h-Stabilitätsmessungen bei Inkubation der TSL in FCS (37°C) konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Membrananteil von Chol in DPPG₂-TSL die Stabilität der Liposomen drastisch zunimmt (CF-Freisetzung maximal 48,5±1,9% bei PG₂-TSL, - minimal 3,4±0,7% bei C₃PG₂-TSL; Abbildung 4.10, Seite 41).

Damit sind die TSL geeignet, um den Einfluss von hydrostatischem Druck (wie er in vivo ausgeübt wird) auf Liposomen unterschiedlicher Membranfluidität und -zusammensetzung zu untersuchen.

5.3 Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf TSL

Die TSL wurden im entwickelten Versuchsaufbau (Kapitel 4.1, Seite 31) bei drei unterschiedlichen Temperaturen (25 °C, 37 °C und 41 °C), sowie über einen Druckbereich von 0 mmHg (= atmosphärischer Druck) bis 140 mmHg mittels DLS vermessen. Für den untersuchten Druckbereich kann T_m in allen Messungen und Formulierungen als stabil, also unabhängig vom ausgeübten Druck, angenommen werden (Gleichung 1, Seite 7)(36).

Die unterschiedlichen Temperaturen wurden gewählt, um den Einfluss des Drucks bei steigender Fluidität der Doppellipidmembranen zu erfassen. Es stellte sich die Frage, ob hydrostatischer Druck bereits in der kristallinen Phase Auswirkungen auf die

Doppellipidmembran hat oder ob erst bei steigender Fluidität unter zunehmender Unordnung der Kohlenwasserstoffketten mit Volumensteigerung in der Lipiddoppelmembran und Abnahme der Van-der-Waals-Kräfte mit maximaler Wirkstofffreisetzung bei Temperaturen um T_m (Kapitel 1.3) druckassoziierte Größenänderungen mittels DLS nachzuweisen sind.

Zur besseren Übersicht der Vesikelgröße unter hydrostatischem Druck erfolgt in Abbildung 5.1 eine Darstellung von z-Average der unterschiedlichen TSL-Formulierungen in den Temperaturbereichen 25 °C (A), 37 °C (B) und 41 °C (C).

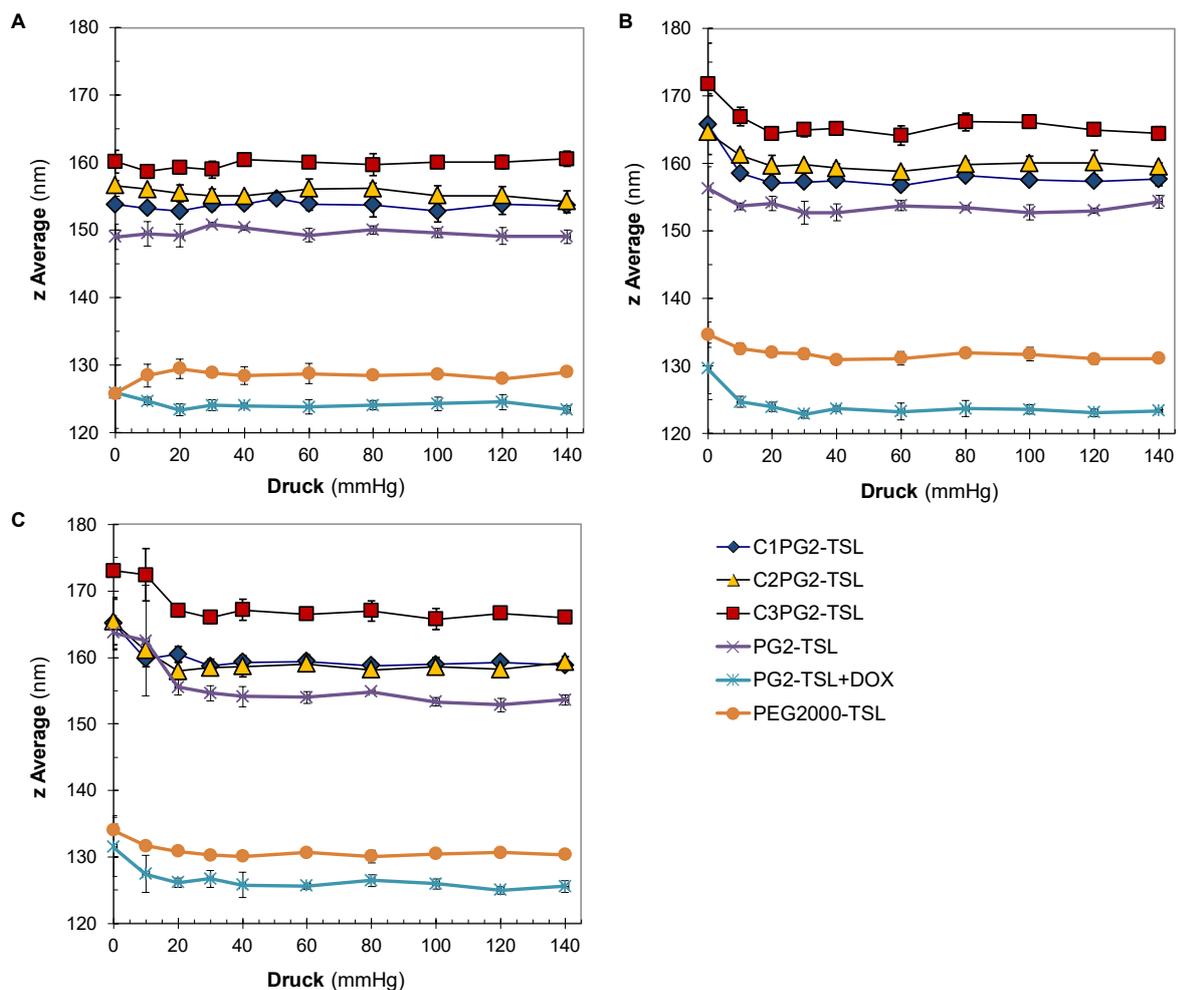


Abbildung 5.1 Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die Vesikelgröße (z-Average) unterschiedlicher TSL-Formulierungen; A) 25°C, B) 37°C und C) 41°C. MW±SA von drei unabhängigen Messungen.

5.3.1 Hydrostatischer Druck

Unter atmosphärischen Bedingungen zeigt sich bei den PG₂-TSL, C₂PG₂-TSL und C₃PG₂-TSL ein direkt zur Temperatur proportionaler atmosphärische Liposomen-Durchmesser (z-Average_{0mmHg} 25 °C < 37 °C < 41 °C). Für die C₁PG₂-TSL scheint dieser Zusammenhang

anhand der erhobenen Daten mit erhöhter Standardabweichung aktuell messtechnisch nicht nachzuweisen sein (vgl. Tabelle 6, Abbildung 4.12 und Abbildung 5.4). Wird ein hydrostatischer Druck ≥ 30 mmHg auf die TSL ausgeübt, bildet sich unabhängig von der Temperatur ein sog. Steady State (StSt) aus, wobei es bis zu 140 mmHg zu keiner weiteren Änderung vom z-Average kommt (Abbildung 5.1).

Da ein Vergleich der absoluten Veränderungen vom z-Average bei bereits unter atmosphärischen Bedingungen unterschiedlich großen TSL nicht aussagekräftig ist, erfolgt in Abbildung 5.2 die Darstellung der TSL hinsichtlich ihrer relativen Vesikelgröße bei atmosphärischen Bedingungen und im StSt bei 100 mmHg.

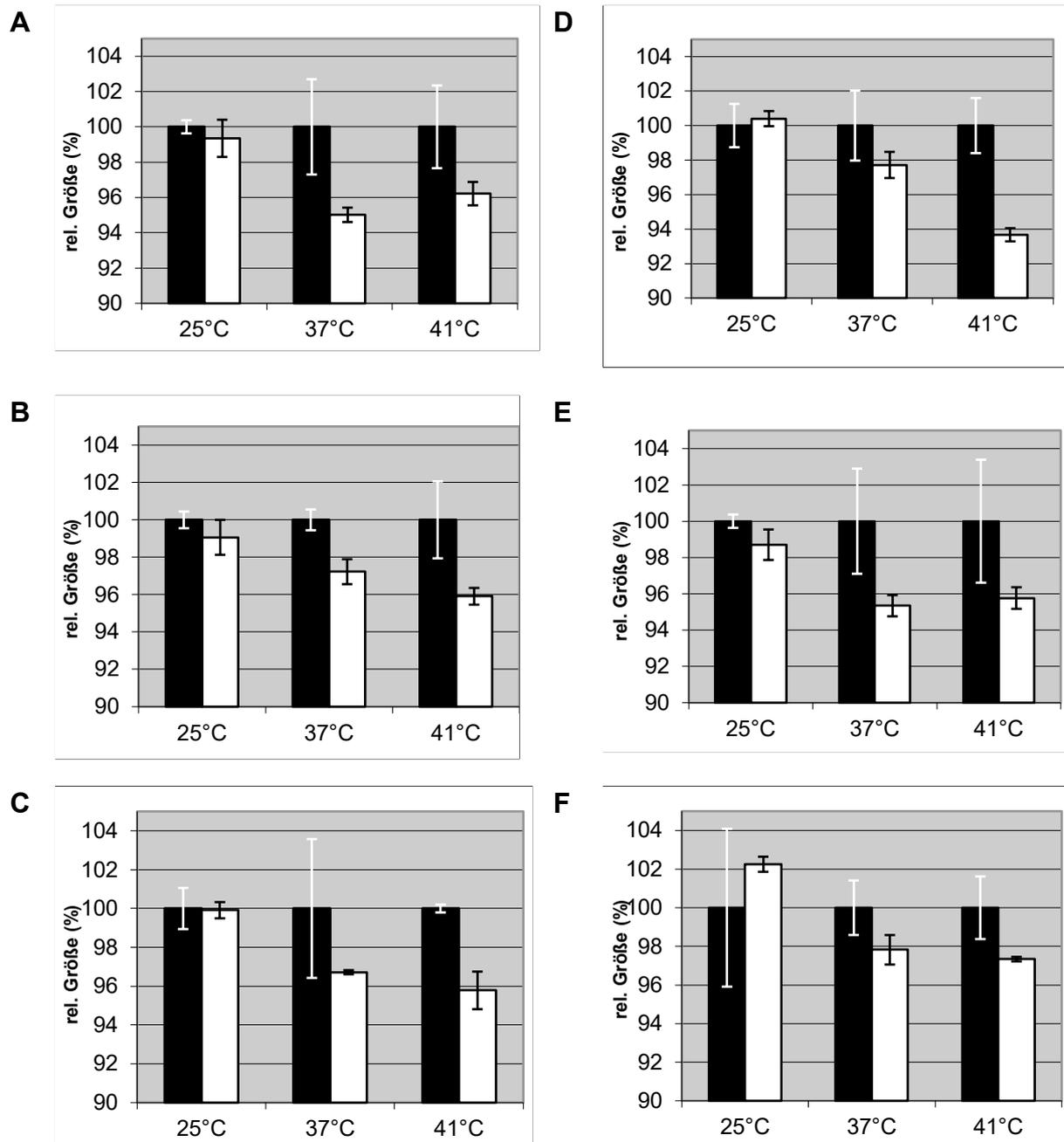


Abbildung 5.2 Relative Größenänderung unterschiedlicher TSL-Formulierungen – atmosphärische Bedingungen (schwarze Säulen) vs. StSt bei 100 mmHg (weiße Säulen); A) C₁PG₂-TSL, B) C₂PG₂-TSL, C) C₃PG₂-TSL, D) PG₂-TSL, E) PG₂-TSL + DOX, F) PEG-2000-TSL.

Die untersuchten TSL zeigten bei 25°C keine druckinduzierte relative Größenänderung in der soliden Phase (Atmosphäre vs. StSt bei 100 mmHg = $\Delta 0\text{mmHg/StSt. rel.}$). Die SA der Formulierungen war bei 25°C unter atmosphärischen Bedingungen zwischen 0,4% (C₁PG₂-TSL und PG₂-TSL + DOX) und 4,1% (PEG-2000-TSL) (Abbildung 5.2).

5.3.2 Temperatur

Zeigt sich für die untersuchten TSL-Formulierungen bei 25°C unabhängig vom einwirkenden hydrostatischen Druck eine stabile TSL-Größe ($\Delta 0\text{mmHg/StSt. rel.}$ zwischen -0,1 % (C₁PG₂-TSL) und 2,3 % (PEG2000-TSL)), so kann bei 37°C mit einem $\Delta 0\text{mmHg/StSt. rel.}$ zwischen -1,9 % (PG₂-TSL) und -4,7 % (PG₂-TSL+DOX), sowie bei 41°C einem $\Delta 0\text{mmHg/StSt. rel.}$ zwischen -2,6 % (PEG2000-TSL) und -5,3 % (PG₂-TSL) ein zunehmender Druckeinfluss auf die Vesikelgröße bereits bei einem geringen hydrostatischen Druck (10-20 mmHg) beobachtet werden (Tabelle 6; Abbildung 5.1). Da die Lipid-Doppelmembran bei $T < T_m$ noch rigide (kristalline bzw. gelförmige Phase) ist und es erst bei steigenden Temperaturen mit Übergang in die flüssig-kristalline Phase zu einer zunehmenden Fluidität der Doppelmembran kommt (104), kann die Membranfluidität den temperaturabhängigen Einfluss des hydrostatischen Druckes auf z-Average erklären. Interessanterweise liegen im venösen Kapillargebiet mit 12-15 mmHg sehr ähnliche hydrostatische Druckbedingungen vor (69), so dass die druckassoziierten TSL-Größenänderungen hier gerade in Kombination mit Hyperthermie zur Ausprägung kommen sollten.

5.3.3 Cholesterin und PEG-2000 als Membranbestandteil

Da TSL bei einem in-vivo-Einsatz im Rahmen der onkologischen Therapie mit einer Vielzahl von anderen Doppellipidmembranen interagieren und es für Membranbestandteile wie z.B. Cholesterin bekanntermaßen einen intermembranösen Übertritt gibt (28), stellte sich die Frage, ob eine gesteigerte Fluidität der Doppellipidmembran (Chol-Anteil in der Membran) den Einfluss des hydrostatischen Druckes auf die TSL-Größe beeinflusst.

Wird das Größenverhalten der cholesterinhaltigen Formulierungen im direkten Vergleich betrachtet, so konnte bei 37°C und einem hydrostatischen Druck von 100 mmHg für C₁PG₂-TSL eine Größenreduktion um $5,0 \pm 0,4\%$ beobachtet werden. Für die C₂PG₂-TSL fiel unter dem gleichen Druckeinfluss bei 37°C die Größenreduktion mit $2,8 \pm 0,7\%$ und bei C₃PG₂-TSL mit $3,8 \pm 0,1\%$ geringer aus. Bei 41°C zeigten alle Cholesterin-TSL eine Reduktion des TSL-Durchmessers um durchschnittlich $\sim 4\%$ (vgl. Abbildung 5.3).

Die mit steigendem Cholesteringehalt abnehmende Größenreduktion kann durch die Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten in der flüssig-kristallinen Phase bedingt sein, welche sich auch in einem deutlichen Anstieg von T_m bei Cholesterinkonzentrationen ab 10-15 mol% bemerkbar macht (35).

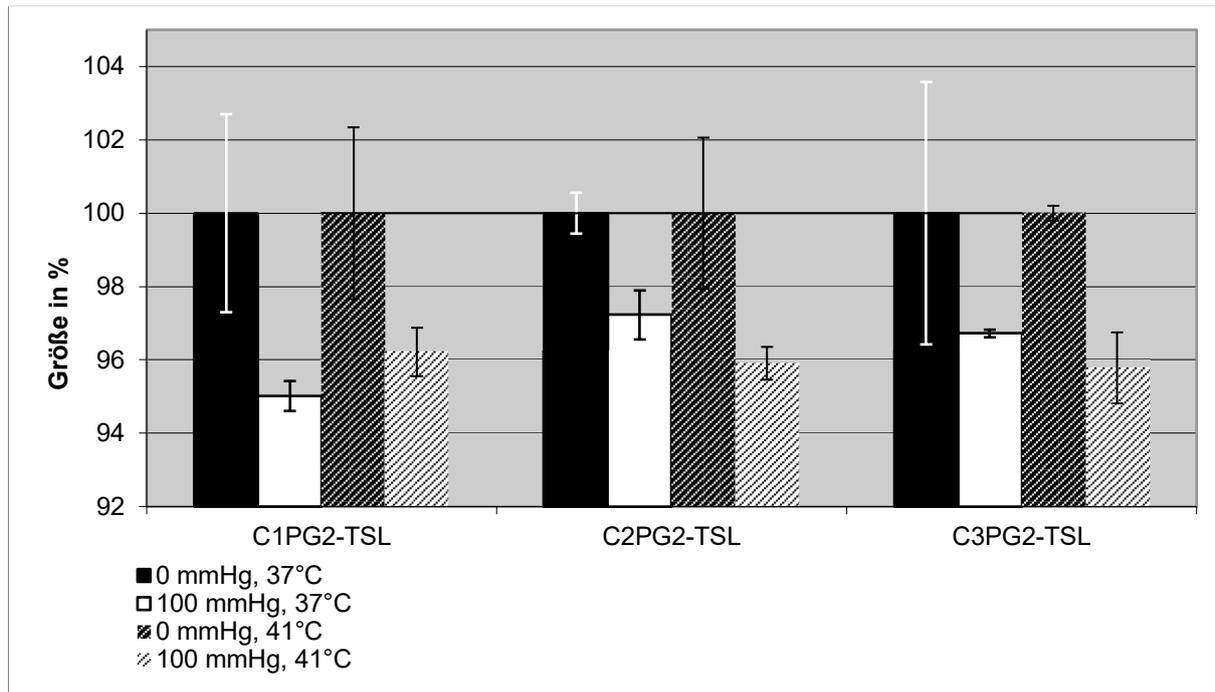


Abbildung 5.3 relative Größenänderung von cholesterinhaltiger TSL im Vergleich – Atmosphäre vs. 100 mmHg

Die geringste druckinduzierte Größenänderung unter alle untersuchten Formulierungen ergibt sich bei den PEG2000-haltigen TSL mit einem relativen Größenverlust von $2,2 \pm 0,8\%$ bei 37°C und mit $2,7 \pm 0,1\%$ bei 41°C bei Anstieg des hydrostatischen Drucks auf 100 mmHg (Abbildung 5.4, Seite 68). Dies kann durch die Fähigkeit von PEG2000 eine sterische Barriere auszubilden bedingt sein (26). Eine weitere Erklärung könnte die Struktur von PEG2000 an der Oberfläche der Membran sein. Je nach Stoffmengenanteil sind zwei Strukturvarianten bekannt (Pilzkonfiguration bis 4 mol% und Bürstenkonfiguration ab 4 mol%) die die Liposomengröße beeinflussen. Mit steigender Temperatur und Zunahme der PEG-Konzentration kommt es zu einer Abnahme der Liposomengröße (27).

In der Literatur ist für HSPC/DSPE-PEG2000/Cholesterin-Liposomen eine im Vergleich zu reinen Phospholipid- bzw. Phospholipid/Cholesterin-Liposomen deutlich reduzierte Wasserpermeabilität beschrieben (105), so dass der geringe Druckeinfluss auf PEG2000-haltige TSL auch durch den geringen Messzeitraum im Zetasizer von ~ 60 s bedingt sein kann. Gegen diese Hypothese spricht, dass Varga et al. einen osmotisch induzierten Wasserausstrom und lineare Abnahme des Liposomen-Durchmessers innerhalb von vier Sekunden nach Induktion (Liposomen-Inkubation in gepufferter Salzlösung [0.3M NaCl]) von im Mittel 117 nm auf 110,8 nm (relativer Größenverlust 5,3%) beschrieb. Eine Versuchswiederholung der DLS-Messungen nach längerem Druckeinfluss könnte hier die Frage beantworten, ob PEG2000

die Auswirkungen des hydrostatischen Druckes auf die Doppellipidmembran hinsichtlich einer Größenabnahme der TSL reduziert oder ob die o.g. Ergebnisse eine reduzierte Wasserpermeabilität auch für DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG2000-TSL bestätigen.

5.3.4 Einfluss von in TSL eingeschlossenem Kristall

Durch Verwendung von DPPG₂-TSL mit unterschiedlicher Beladung wurde untersucht, ob ein eingeschlossener starrer Kristall (DOX in fester Phase) im Vergleich zur homogen in der wässrigen Phase gelösten CF eine Auswirkung auf die druckassoziierte TSL-Größe hat.

Die Zusammensetzung der inneren TSL-Phase scheint z-Average unter atmosphärischen Bedingungen bzw. die Verformbarkeit unter Druck zu beeinflussen. Trotz gleicher Extrusion (Filter-Porengröße 200 nm) zeigt sich zwischen mit DOX und CF beladenen PG₂-TSL bereits unter atmosphärischen Bedingungen bei 25°C ein absoluter Größenunterschied von 23,1 nm zu Gunsten der mit CF beladenen Liposomen (PG₂-TSL 149,0±1,9 nm, PG₂-TSL+DOX 125,9±0,5 nm). Diese Eigenschaft kann u.a. mit der kristallinen Ringstruktur von Doxorubicin zusammenhängen (84).

Unter einem hydrostatischen Druck von 100 mmHg ergibt sich für die mit CF beladenen PG₂-TSL bei 37°C eine relative Größenabnahme um 2,3±0,8%, sowie bei 41°C eine Abnahme um 6,3±0,4% gegenüber dem atmosphärischen Diameter. Für mit DOX beladenen PG₂-TSL kann unter gleicher Druckeinwirkung eine stabile Größenabnahme von 4,7±0,6% (37°C) bzw. 4,2±0,6% (41°C) dokumentiert werden (Abbildung 5.4). Während hydrostatischer Druck bei Überschreiten von T_m und zunehmendem Eintritt in die flüssig-kristallinen Phase bei PG₂-TSL zu einer weiteren Abnahme des z-Average führt, so kommt es bei TSL mit starrem Kristall (Beladung mit DOX) bereits bei einem geringen Temperaturanstieg auf 37°C zu einer relativen Größenreduktion um 4,7±0,6%, wobei bei weiterer Überschreitung von T_m (bis 41°C) keine weitere Größenreduktion beobachtet werden kann (vgl. Abbildung 5.4). Der starre Kristall verhindert so sterisch eine weitere Verkleinerung (z.B. als Stützgerüst) der TSL (97).

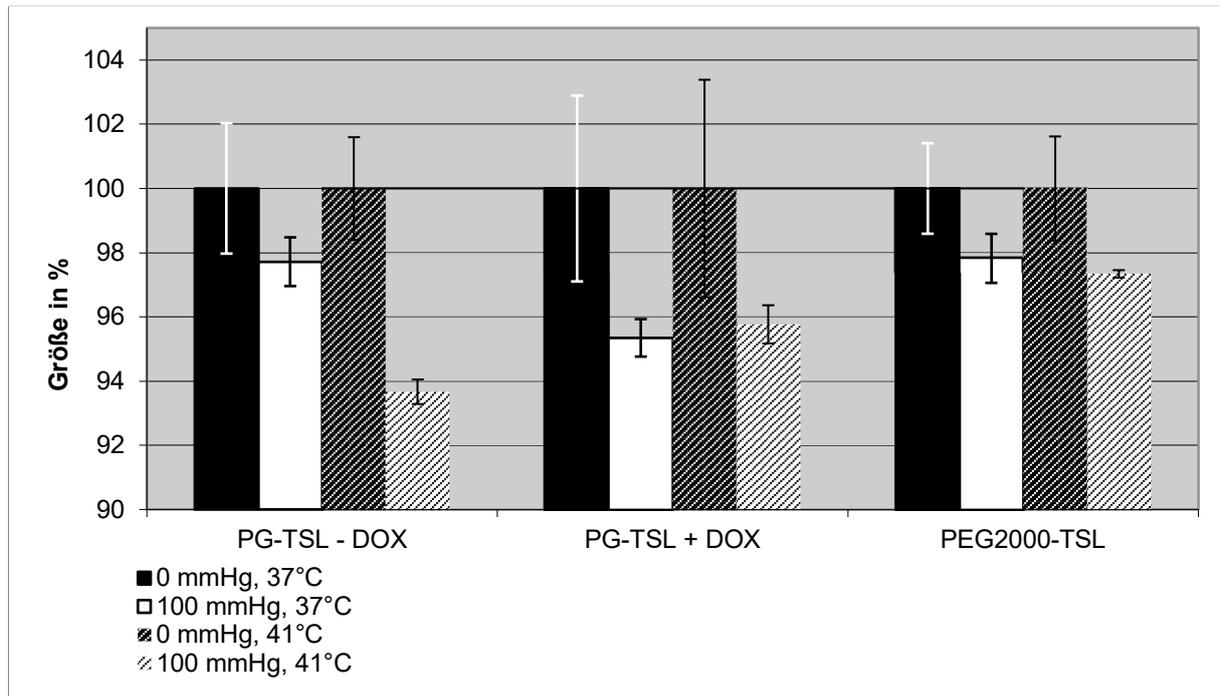


Abbildung 5.4 relative Größenänderung von PG₂-TSL mit (+) und ohne (-) Doxorubicin, sowie PEG2000-TSL im Vergleich– Atmosphäre vs. 100 mmHg

5.4 Passiver Carboxyfluorescein-Einschluss bei Unterdruck

Der passive Einschluss von CF bei Unterdruck wurde unter der Hypothese durchgeführt, dass aufgrund von durch geringeren hydrostatischen Druck induzierte Änderungen der Membraneigenschaften (Erhöhung der Permeabilität durch geringe Packung der Lipide) und eine Erniedrigung von T_m CF schneller und effizienter in PG₂-TSL eingeschlossen werden kann.

Für sehr hohen hydrostatischen Druck (> 500 bar) ist die unter 1.4 beschriebene Zunahme des interlamellaren Abstandes bekannt, welche bei Eintritt in die druckinduzierte $L_{\beta 1}$ Phase rapide abnimmt. Ergänzend erhöht anliegender Druck jedoch auch T_m (43,2 bar führen zu einem Anstieg von T_m um $1\text{ }^\circ\text{C}$) (36). Über das Membranverhalten unter subatmosphärischen Bedingungen (ausgeübter hydrostatischer Druck $<$ atmosphärischer Druck) ist hingegen bisher noch nicht viel bekannt. Bisher konnten nur mittels der Theorie des Fluktuations-Dissipations-Theorems theoretische Erkenntnisse, sowie mittels von durch die Mikropipetten-Manipulationstechnik ausgeübten partiellen Unterdruck an der Lipid-Doppelmembran messtechnisch Informationen (Veränderung der Biegesteifigkeit) gewonnen werden (37).

Der durchgeführte passive CF-Einschluss nach Erhitzen der TSL-Formulierungen über T_m und gleichzeitigem Anlegen von Unterdruck führt hingegen zu einer Unterdruckapplikation bei vorliegender flüssig-kristalliner Phase an der gesamten Lipid-Doppelmembran und nicht wie bei der Mikropipetten-Manipulationstechnik ausschließlich auf einzelne Membranabschnitte. Es wurden zwei Liposomenchargen (PG-TSL) hergestellt und sowohl ein CF-Einschluss über einen Zeitraum von 10 Minuten (PG-TSL-V1), wie auch über 60 Minuten (PG-TSL-V2) evaluiert. Neben einer Kontrolle unter atmosphärischen Bedingungen erfolgte der CF-Einschluss bei 900 mbar, 800 mbar, 700 mbar, 600 mbar, 500 mbar, 400 mbar. Somit wurde neben dem Einfluss der Inkubationszeit auch der Einfluss des Drucks auf die Einschlusseffizienz untersucht (Kapitel 4.4, Seite 47).

Der im Rahmen des CF-Einschlusses angelegte Unterdruck wurde aufrechterhalten, bis die hergestellten TSL wieder eine Temperatur von 25°C erreicht hatten und die Lipid-Doppelschichten erneut in der sog. gelförmigen Phase (L_{β^*}) vorlagen. Das phasenübergreifende Aufrechterhalten des Unterdrucks war notwendig, da bekanntermaßen die Membraneigenschaften der Gel-Phase durch ausgeprägte Van-der-Waals-Kräfte der Kohlenwasserstoffatome, sowie eine geringe Permeabilität geprägt sind und es der Hypothese

entsprach, dass eingeschlossenes CF nach Erreichen von atmosphärischen Bedingungen bei Temperaturen unterhalb T_m in der inneren wässrigen Phase eingeschlossen blieb. Für PG₂-TSL ist die nahezu vollständige Impermeabilität der Lipid-Doppelmembran für CF bei Temperaturen die deutlich unter T_m liegen in wässrigen Lösungen beschrieben (44, 87).

Alle Liposomenchargen wurden vollständig charakterisiert und besaßen die notwendige Qualität für DLS-Messungen (Tabelle 7, Seite 48). Die biophysikalischen Daten der TSL sind analog zu bereits publizierten DPPG₂-TSL (44, 43), so dass ein Vergleich möglich ist.

Zunächst war von Interesse, ob sich die Vesikelgröße der in Unterdruck beladenen TSL von denen unter atmosphärischen Bedingungen beladenen unterscheidet. Da Flüssigkeiten praktisch inkompressibel sind und ausschließlich der Einschluss von CF bei Unterdruck stattfand, sind die gemessenen Größenänderung der TSL maßgeblich auf eine Änderung der Dicke der Lipid-Doppelschicht bzw. einem vollzogenen Flüssigkeitstransfer über die Membran zurückzuführen.

5.4.1 CF-Einschluss bei 900 mbar

Für PG-TSL-V1 zeigte sich nach 10-minütiger Inkubation bei einem Unterdruck von 900 mbar eine Zunahme des TSL-Durchmessers von 144,3 nm (Atmosphäre) auf 145,4 nm (900 mbar) [1,1 nm abs. = + 0,8%]. Für die TSL-Formulierung PG-TSL-V2 zeigt sich nach 60-minütiger Inkubation eine Zunahme des TSL-Durchmessers von 148,1 nm (Atmosphäre) auf 153,9 nm (900 mbar) [6 nm abs. = + 3,9%].

Varga et al. beschrieb 2014 einen osmotisch induzierter Wasserausstrom aus HSPC/DSPE-PEG2000/Cholesterol 3:1:1 (m/m) Liposomen mit linearer Abnahme des Liposomendurchmessers binnen 4 Sekunden nach Induktion (105). Im Rahmen des CF-Einschlusses bei Unterdruck wurde hingegen ein hydrostatischer Druckunterschied als Kraft aufgebaut. Vor CF-Einschluss entsprachen die TSL der gleichen Charge, so dass der erniedrigte extravasikulären Druck und hiermit assoziierte hydrostatische Druckunterschied zu einer Permeabilitätssteigerung der Lipid-Doppelmembran mit Wassereinstrom für den Anstieg des TSL-Durchmessers verantwortlich gewesen sein kann (vgl. Abbildung 4.13, Seite 49).

Betrachtet man die Einschlusseffizienz der beiden TSL-Formulierungen, so kann trotz Größenzunahme der Liposomen bei 900 mbar keine deutliche Verbesserung des CF-Einschlusses bei Unterdruck beobachtet werden (Abbildung 4.17, Seite 51). Allenfalls bei

PG-TSL-V1 mit CF-Einschluss bei 900mbar zeigt sich geringfügiger Anstieg von 0,28% (Atmosphäre) auf 0,31%.

Somit bilden sich bei geringem Unterdruck zwar größere TSL, der absolute CF-Einschluss scheint hiervon jedoch nicht zu profitieren. Dies führt unweigerlich zu der Frage, ob die vollzogene Größenänderung bei erfolgtem CF-Übertritt auf eine Änderung der Membrankonfiguration zurückzuführen ist. Bisher sind für sehr hohen hydrostatische Druck ($> 500 \text{ bar} = 375.031 \text{ mmHg}$) eine Zunahme der Dichte der Kohlenwasserstoffketten (lamellare Gitterkonstante d) beschrieben (36, 112), Veränderungen der Membrankonfiguration nach Beladung in mildem Unterdruck sind hingegen noch nicht bekannt und könnten durch weiterführende Experimente bspw. mittels Small-angle X-ray scattering (SAXS) evaluiert werden.

Wird die Größenzunahme beider Chargen bei mildem Unterdruck (900 mbar), wie auch der geringe Anstieg der Einschlusseffizienz nach 10-minütiger Inkubation (PG-TSL-V1) betrachtet, so muss die Hypothese aufgestellt werden, dass es bei 900 mbar Unterdruck zu einem gesteigerten Wassereinstrom in die TSL kommt. Wird dieser Vorgang nach 10-minütiger Inkubation durch Abkühlen der TSL unterhalb von T_m und das Vorliegen der gelförmigen Phase beendet, kann das gesteigert eingeschlossene CF nachgewiesen werden (Anstieg der Einschlusseffizienz). Bei 60-minütiger Inkubation (PG-TSL-V2) kann dieser Effekt jedoch nicht mehr nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.17).

Zumindest bei kurzer Inkubation und einem moderaten Unterdruck von 900 mbar konnte für PG-TSL-V1 ein gesteigerter CF-Einschluss von 0,28% auf 0,31% nachgewiesen werden. Da sich im Chargenvergleich hinsichtlich der Inkubationsdauer jedoch für PG-TSL-V2 eine deutlich höhere Einschlusseffizienz bestätigt (maximal 0,65% unter atmosphärischen Bedingungen), ist dieser Effekt hinsichtlich des Ziels eines erhöhten Fluoreszenzmarker-Einschlusses bei der untersuchten TSL-Formulierung vernachlässigbar (mittlere Einschlusseffizienz (Atmosphäre - 700 mbar): PG-TSL-V1 $0,228 \pm 0,093 \text{ mM}$, PG-TSL-V2 $0,605 \pm 0,047 \text{ mM}$; siehe Abbildung 5.5). Da es noch keine Studien hinsichtlich einer Unterdruckexposition an DPPG₂-haltigen Lipidmembranen gibt, können die erhobenen Daten als Indiz gewertet werden, dass ein geringer Unterdruck von 900 mbar zumindest bei notwendiger kurzer Inkubation die Permeabilität der Membran steigert und so einen verbesserten Stofftransport ermöglicht.

Ob diese subatmosphärischen Bedingungen die Fluidität der Membran verändern bzw. Einfluss auf die Hauptumwandlungstemperatur T_m nehmen, kann anhand der erhobenen Daten nicht beantwortet werden. Mittels eines Experimentes zum TSL-Temperaturprofil bei Unterdruck (Ermittlung der temperaturabhängigen CF-Freisetzung bei Unterdruck bspw. mittels Fluoreszenz-Spektrophotometer) könnten hier weitere Erkenntnisse gewonnen werden.

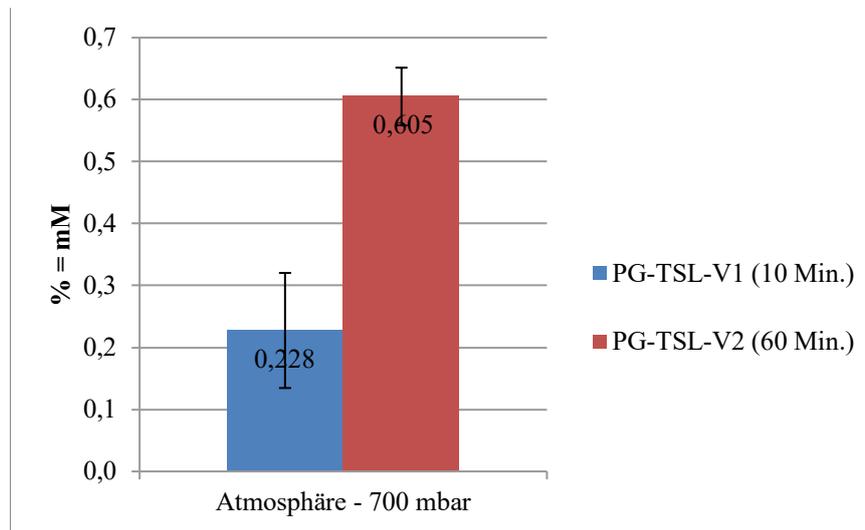


Abbildung 5.5 Mittlere Einschlusseffizienz (Atmosphäre - 700 mbar) nach passivem CF-Einschluss im Unterdruck (PG-TSL-V1 vs. PG-TSL-V2)

Zur Forcierung der Unterdruckexposition erfolgte der CF-Einschluss ebenfalls bei einem hydrostatischen Druck ≤ 800 mbar.

5.4.2 CF-Einschluss bei ≤ 800 mbar

Bei 10-minütiger Inkubation (PG-TSL-V1) und einem hydrostatischen Druck unterhalb von 800 mbar zeigt sich eine weitere Reduktion der Einschlusseffizienz (Tabelle 7, Seite 48 und Abbildung 5.7, Seite 73). Dies kann durch einen (zumindest partiellen) Kollaps der Doppellipidmembran bedingt sein, welcher sich in dem nachgewiesenen Größenverlust der TSL bemerkbar macht.

Für PG-TSL-V2 lässt sich dieser Effekt nach 60-minütiger Inkubation nicht mehr nachweisen. Da sich beide TSL-Chargen ausschließlich in der Dauer des CF-Einschlusses unterschieden, kommt als Zeitpunkt einer möglichen Ruptur der Membran der Wechsel von flüssig-kristalliner - zu gelförmiger Phase durch das aktive Herunterkühlen und Überwinden

von T_m bei noch bestehendem unterdruckbedingtem Stress in der Lipidmembran nach unvollständiger Inkubation (intraliposomaler Volumenstrom) in Frage.

Deutlich wird der Unterschied, wenn man PG-TSL-V1 in zwei Messbereiche unterteilt. Einen Bereich für TSL mit CF-Einschluss bei Atmosphäre bzw. geringem Unterdruck (M1: Atmosphäre bis 800 mbar), sowie einen weiteren für TSL mit CF-Einschluss bei Unterdruck \leq 700 mbar (M2: 700 mbar bis 400 mbar). Für M2 kann eine Abnahme der TSL-Größe (MW_{nm} M1 = $144,9 \pm 0,6$ nm, MW_{nm} M2 = $142,1 \pm 0,4$ nm; Abbildung 5.6), sowie Abnahme des CF-Lipid-Verhältnis um ca. 60% ($MW_{c:l}$ M1 = $0,008 \pm 0,001$, $MW_{c:l}$ M2 = $0,003 \pm 0,001$; Abbildung 5.7) beobachtet werden.

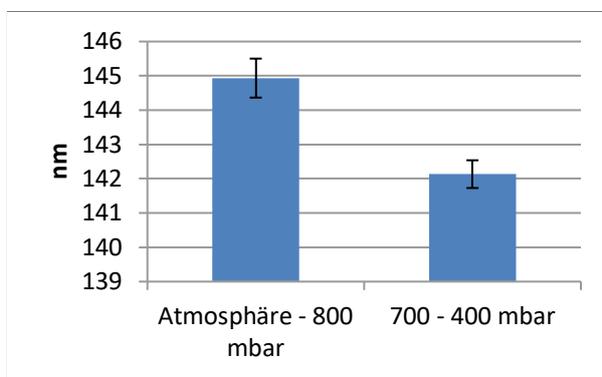


Abbildung 5.6 z-Average im Mittel für PG-TSL-V1 (10 Min.) (Atmosphäre - 800 mbar) vs. (700 - 400 mbar)

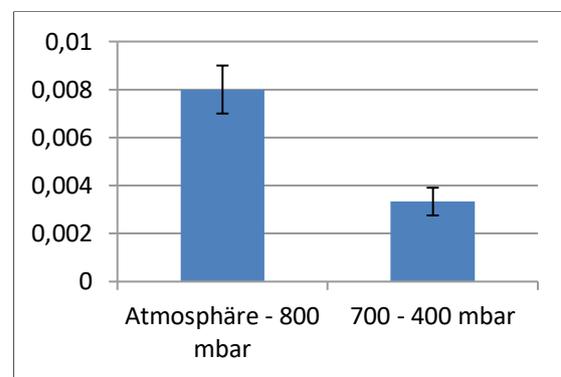


Abbildung 5.7 CF-Lipid Verhältnis für PG-TSL-V1 (10 Min.) (Atmosphäre - 800 mbar) vs. (700 - 400 mbar)

Als weitere Erklärung der reduzierten Einschlusseffizienz bei Unterdruck \leq 700 mbar muss ein Membranschaden durch zu schnell induzierte Druckdifferenz zwischen intra- und extravasikulärem Milieu diskutiert werden. Durch den im Vergleich zum extravasikulären Raum bestehenden deutlich erhöhten intravesikulären Druck kann es zu einem Ausstrom der wässrigen CF-reichen Phase mit Störung der Membranstruktur kommen.

In Vitro-Versuche an Phospholipid-Doppelmembranen (64) haben gezeigt, dass mechanischer Stress (Dehnung der Membran) zu einer Abnahme der Doppelmembrandicke führt und Wasser-Moleküle in die hydrophobe Region der lipidhaltigen Kopfgruppen eindringen. In der Folge kommt es zur Ausbildung wassergefüllter und die komplette Doppellipidmembran durchspannender Poren, deren Größe mit stetigem Wassereinstrom zunimmt, wobei es bei anhaltender Dehnung im Verlauf zur Ruptur der Membran kommt. Während der Ruptur der Membran ist zunächst eine Einzel-Pore, gefolgt von einer multiporen Formation beschrieben,

wobei das Auftreten der multiporen Formation umso häufiger auftrat, je schneller die Membran gedehnt wurde ($0,1 \text{ m/s} < 0,3 \text{ m/s} < 1,0 \text{ m/s}$). Die prozentuale Abnahme des Bilayer-Durchmessers verringerte sich mit steigender Dehnung, wobei die Doppelmembran am Punkt des Wassereinstroms durch die stressbedingten Poren ihren geringsten Durchmesser erreicht. Ab einer Dehnungsgeschwindigkeit der Membran von $\geq 0,3 \text{ m/s}$, ist die Geschwindigkeit der Oberflächenzunahme und Abnahme des Bilayer-Durchmessers größer als die Diffusion der Wassermoleküle in die Membran, so dass aufgrund der insuffizienten Verteilung der Wassermoleküle in der gedehnten Region eine verspätete Poren-Ausbildung resultiert und die für eine Ruptur der Membran notwendigen Kräfte steigen. In der Folge kommt es zur Ruptur der Membran.

Für langsamere Dehnungsraten (bis ca. 2 mN/m) ist aus Unterdruckexperimenten mit Mikropipetten an unterschiedlichen Phosphatidylcholin-Vesikeln (21) beschrieben, dass die Membranspannung linear ansteigt, bei höheren Raten kommt es jedoch zu einem scheinbar exponentiellen Wachstum, welches auf das Versagen der Lipiddoppelmembran hindeutet. Dies konnte durch die o.g. Studie von Koshiyama et al. (64) bestätigt werden.

Zur Klärung der Frage, ob die Geschwindigkeit des aufgebauten Unterdrucks die Einschlusseffizienz beeinflusst, wäre eine Wiederholung des passiven CF-Einschlusses mit langsam aufgebautem Unterdruck (z.B. Reduktion des Unterdruckes um 50 mbar je 2 Min. bis zum entsprechenden Unterdruck) ein sinnvolles Folgeexperiment. Sollte es hier nicht zu den o.g. Größenänderungen mit Absinken der Einschlusseffizienz bei einem hydrostatischen Druck unterhalb von 800 mbar kommen, wäre dies ein Hinweis auf einen durch zu hohe Dehnungsgeschwindigkeit induzierten Anstieg der Membranspannung mit Ruptur der Doppellipidmembran.

Es stellte sich die Frage, ob sich die temperaturabhängige CF-Freisetzung dieser erstmalig bei Unterdruck beladenen DPPG₂-TSL von herkömmlich beladenen Liposomen unterscheidet.

5.4.3 Temperaturabhängige CF-Freisetzung der TSL

Zur Evaluation der temperaturabhängigen CF-Freisetzung wurde das Temperaturprofil der TSL-Chargen in NaCl, wie auch zur Simulation von in vivo-Bedingungen in FCS, bestimmt. Insgesamt ergab sich über den gesamten Temperaturbereich für alle untersuchten Chargen in FCS gegenüber NaCl eine erhöhte CF-Freisetzungsrate (Abbildung 4.18, Seite 52). Dies kann

durch den gesteigerten onkotischen Druck des proteinreichen FCS bzw. die auftretenden Protein-Liposomen-Bindungen bedingt sein.

Erstaunlicherweise zeigten die PG-TSL-V1 in NaCl auch bei Temperaturen unterhalb von T_m , bei welchen die Doppelmembran in der gelförmigen Phase vorliegt und eigentlich keine relevante Permeabilität aufweist, eine geringe CF-Freisetzung von im Mittel $4,3 \pm 2,2\%$. Dies kann als Indiz für den nach unzureichender CF-Inkubationsdauer fortbestehenden Membranschaden gesehen werden. Wobei der fehlende Nachweis von freiem CF für die Formulierungen PG-TSL-V1 600 mmHg und - 400 mmHg a.e. aufgrund der geringen Einschlusseffizienz unterhalb der messtechnischen Nachweisgrenze liegt. PG-TSL-V2 zeigte in NaCl unterhalb von T_m keine relevante CF-Freisetzung (Abbildung 4.21, Seite 54).

Aus kürzlich veröffentlichten Studien (42, 87) ist für DPPG₂-TSL bekannt, dass FCS keinen signifikanten Effekt auf die Vesikelgröße hat. Ebenso wird T_m (~ 43 °C) durch die Anwesenheit von Plasma oder Proteinen wie Apolipoprotein A1 (ApoA1), Fibrinogen (Fib), Transferrin (Tf) oder Serum-Albumin (SA) nicht beeinflusst. Unterhalb von 40 °C zeigten DPPG₂-TSL eine kaum nachweisbare CF-Freisetzung, was auf eine praktisch undurchlässige Lipid-Doppelmembran in diesem Temperaturbereich hinweist. In Anwesenheit von Mäuse-Plasma zeigten die TSL auch bei niedrigeren Temperaturen (ab 37 °C) eine signifikante Fluorescein-Freisetzung, wobei dieser Effekt in FCS, Menschen- oder Ratten-Serum nicht beobachtet werden konnte. Als möglichen Grund wird der gesteigerte Lysolipid-Gehalt in Mäuse-Plasma diskutiert, wobei für Lyso-PC-haltige TSL eine geringe Verschiebung der temperaturabhängigen Öffnungskinetik hin zu niedrigeren Temperaturen nachgewiesen werden konnte. Die Anwesenheit von SA und Fib führte bei niedrigeren Temperaturen zu einer gesteigerten Fluorescein-Freisetzung, wohingegen ApoA1 die Freisetzung zu behindern schien. Da für ApoA1 eine hohe Protein-Bindungskonstante nachgewiesen werden konnte und es Hinweise darauf gibt, dass SA mit einer schwachen Bindungskonstante die Permeabilität der Lipid-Doppelmembran erhöht, scheint die Proteinbindung einzelner Plasmaproteine die Wirkstofffreisetzung direkt zu beeinflussen. Die Wirkung der einzelnen Proteine scheint sich im Plasma größtenteils gegenseitig zu kompensieren. Interessanterweise waren die singulären Protein-Liposomen-Bindungen für SA, Fib und Tf nach Hinzugabe von FCS sofort reversibel, während die ApoA1-Bindung über eine Zeitspanne von 60 Min. abnahm. Als Gründe hierfür wurde eine höhere Affinität für Liposomen anderer in FCS enthaltener

Proteine gesehen, die o.g. markierte Proteine von der TSL-Oberfläche verdrängten, bzw. eine anziehendere Bindungspartner in FCS für SA, Fib, Tf bzw. ApoA1.

Zur Evaluation des Freisetzungsverhaltens von applizierten und intravasal verbleibenden, zirkulierenden TSL wurden die die Liposomenchargen über 60 Minuten in NaCl und FCS inkubiert.

In NaCl konnte bei keiner der untersuchten Formulierung (PG-TSL-V1 & PG-TSL-V2-Chargen) bei 37°C über den Zeitraum eine CF-Freisetzung beobachtet werden. Dies bestätigt die o.g. Ergebnisse, dass DPPG₂-TSL bei $T < T_m$ keine relevante CF-Freisetzung besitzen. Für TSL mit erfolgtem CF-Einschluss bei Unterdruck konnte diese Eigenschaft erstmalig bestätigt werden.

Erstaunlicherweise zeigten die PG-TSL-V1 und PG-TSL-V2 mit CF-Einschluss bei 900 mmHg ebenfalls nach 60 Min. Inkubation bei 37 °C in FCS keine relevante CF-Freisetzung. Die unter atmosphärischen Druck hergestellten TSL hatten unter gleichen Bedingungen eine CF-Freisetzung von $6,0 \pm 0,1\%$ (PG-TSL-V1) und $10,5 \pm 0,2\%$ (PG-TSL-V2) (Abbildung 4.20 und Abbildung 4.23, Seite 53). Dies kann darauf hinweisen, dass die Doppellipidmembran von bei mildem Unterdruck beladenen TSL in der gelförmigen Phase eine gesteigerte Stabilität aufweist, was sich hinsichtlich des Wirkstofftransports positiv auf die Einschlussstabilität der TSL auswirkt.

Nach einstündiger Inkubation bei 42 °C in FCS kann für mit sinkendem Einschlussdruck hergestellte PG-TSL-V1 wie auch PG-TSL-V2 eine stetig ansteigende CF-Freisetzung nachgewiesen werden (CF-Freisetzung 900 mmHg TSL < 800 mmHg TSL < 700 mmHg TSL) (siehe Abbildung 5.8).

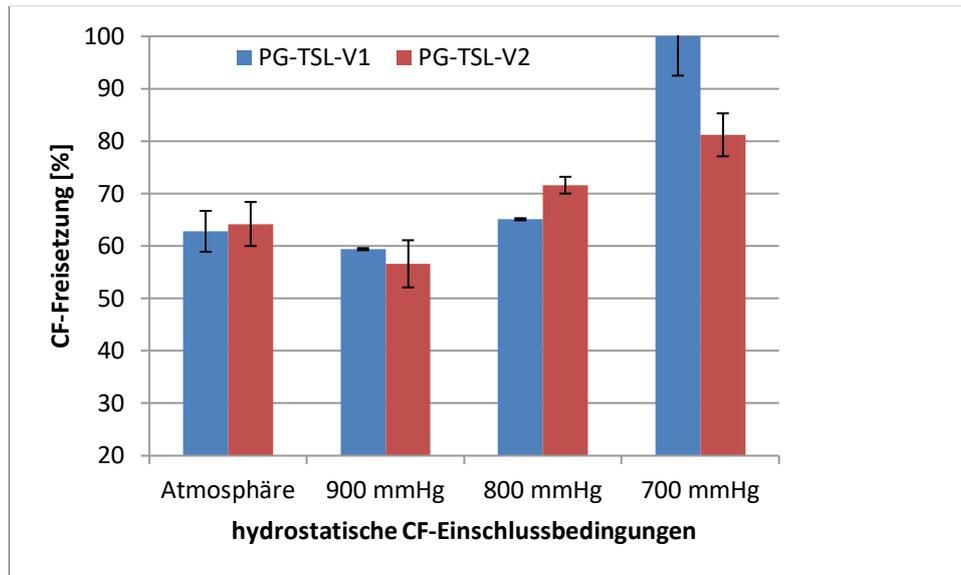


Abbildung 5.8 CF-Freisetzung nach 60 Min. Inkubation in FCS bei 42 °C

Zusammenfassend kann anhand der erhobenen Daten der Temperaturprofile für PG-TSL-V1 und PG-TSL-V2 gezeigt werden, dass T_m für alle Formulierungen und evaluierten Druckbereiche bei ~ 42 °C liegt und sich nach erfolgter Unterdruckexposition nicht verändert. T_m wird ebenfalls nicht durch die Anwesenheit von Plasma oder einzelnen Proteinen beeinflusst (87). Wird das Freisetzungsverhalten für Temperaturen über T_m betrachtet, so kann sowohl in NaCl wie auch in Anwesenheit von FCS eine mit steigendem Unterdruck korrelierende, gesteigerte CF-Freisetzung nachgewiesen werden. Unter FCS-Exposition ergibt sich ebenfalls eine gegenüber NaCl gesteigerte CF-Freisetzung. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Veröffentlichungen herkömmlich beladener DPPG₂-TSL (44, 43).

Da TSL bei einem in-vivo-Einsatz im Rahmen der onkologischen Therapie mit einer Vielzahl von anderen Doppellipidmembranen interagieren und es für Membranbestandteile wie z.B. Cholesterin bekanntermaßen einen intermembranösen Übertritt gibt (28), wäre eine Wiederholung des passiven CF-Einschlusses im Unterdruck mit cholesterinhaltigen TSL durchaus von Interesse. Hierbei könnten Erkenntnisse gewonnen werden, ob Cholesterin als Membranbestandteil auch bei Unterdruck zu einer Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten führt und die passive CF-Beladung im Unterdruck beeinflusst. Da niedrige Cholesterinkonzentrationen nur einen geringen Einfluss auf die Phasenumwandlungstemperatur haben (35), sind cholesterinhaltige TSL als Nanotransporter im Rahmen der onkologischen Therapie geeignet.

Aufgrund einer Publikation zur Protein-Interaktion (42) wurde sich ergänzend dazu entschieden zu evaluieren, wie sich die hergestellten TSL in Kombination mit Akzeptorvesikeln verhielten.

5.5 CF-Freisetzung von PG₂-TSL in Anwesenheit von LAV und Humanalbumin

Im vaskulären System zirkulierende TSL kommen mit unterschiedlichen Molekülen in Kontakt, so dass zur Evaluation der zeitabhängigen CF-Freisetzung TSL in 37°C warmem FCS inkubiert wurden. Hierbei konnte für die DPPG₂-haltigen TSL mit steigendem Cholesteringehalt eine Stabilisierung der Doppellipidmembran mit erschwertem Übertritt von Fluoreszenzfarbstoffen aus der wässrigen inneren Phase nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.10, Seite 41). Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Veröffentlichungen, in welchen eine Membranstabilisierung durch Cholesterin beschrieben wurde (35, 106).

In Anwesenheit der Serumkomponente Humanalbumin (40g/L) konnte nach 24 h Inkubation bei 37°C eine Reduktion der CF-Freisetzung von 48,5±1,9% (PG₂-TSL + FCS) auf 7,3±0,9% (PG₂-TSL + Humanalbumin) beobachtet werden (siehe Abbildung 5.9, Seite 79).

Für Albumin ist ein Einfluss auf die temperaturabhängige TSL-Freisetzungsrates für cholesterinfreie DPPG₂-TSL bekannt (41). So wurde gezeigt, dass Albumin die Membranpermeabilität insbesondere bei Temperaturen unter T_m senkt und erst bei Temperaturen um T_m durch gesteigerte Interaktion mit der Lipidmembran steigert (39). Durch die in der kristallinen Phase vorliegende schwache Protein-Doppellipidmembran-Bindung scheint ein umfassender Oberflächenkontakt verhindert zu werden, so dass dieser Effekt bei 37°C möglicherweise reduziert wird (87). Die beobachtete Reduktion der CF-Freisetzungsrates für PG₂-TSL + HA in FCS bei Temperaturen unterhalb von T_m bestätigt einen membranstabilisierenden Effekt für DPPG₂-haltige Doppellipidmembran in der gelförmigen Phase ($T < T_m$).

Zur Evaluation des Einflusses von cholesterinreichen Vesikeln auf TSL, wurde der LAV DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol) hergestellt und zusammen mit den TSL bei 37°C inkubiert. In Anwesenheit des LAV konnte bis ca. 6 h nach Beginn der Inkubation eine deutliche Steigerung der CF-Freisetzung (6 h: PG₂-TSL 11,8±0,2%, PG₂-TSL + LAV 46,1±1,6%) mit anschließender Abflachung der Freisetzungskurve beobachtet werden.

Da Liposomen im Blut mit einer Vielzahl von anderen Doppellipidmembranen interagieren, Cholesterin als Membranbestandteil ab 10-15 mol% zu einer zunehmenden Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten führt (35) und für Membranbestandteile ein intermembranöser Übertritt beschrieben ist (28), verwundert die im Rahmen der Stabilitätsmessungen von DPPG₂-haltigen TSL nachgewiesene und mit mutmaßlich steigendem Cholesteringehalt abnehmende CF-Freisetzung nicht (siehe Kapitel 4.3.1, Abbildung 4.10). So kann die Abflachung der Freisetzungskurve ab 6 h nach Inkubation mit einem intermembranösen Cholesterinübertritt begründet werden, wobei ein entsprechender Beweis noch erbracht werden muss. Die CF-Freisetzung in Anwesenheit von LAV kann nach folgender Formel bestimmt werden.

$$0 \text{ bis } 6 \text{ h: CF-Freisetzung [\%]} = 7,6167 \times t[\text{h}] + 2,8829$$

$$6 \text{ bis } 24 \text{ h: CF-Freisetzung [\%]} = 1,542 \times t[\text{h}] + 39,466$$

Formel 1 Berechnung der zeitabhängigen CF-Freisetzung von PG₂-TSL in Anwesenheit von LAV bei 37°C

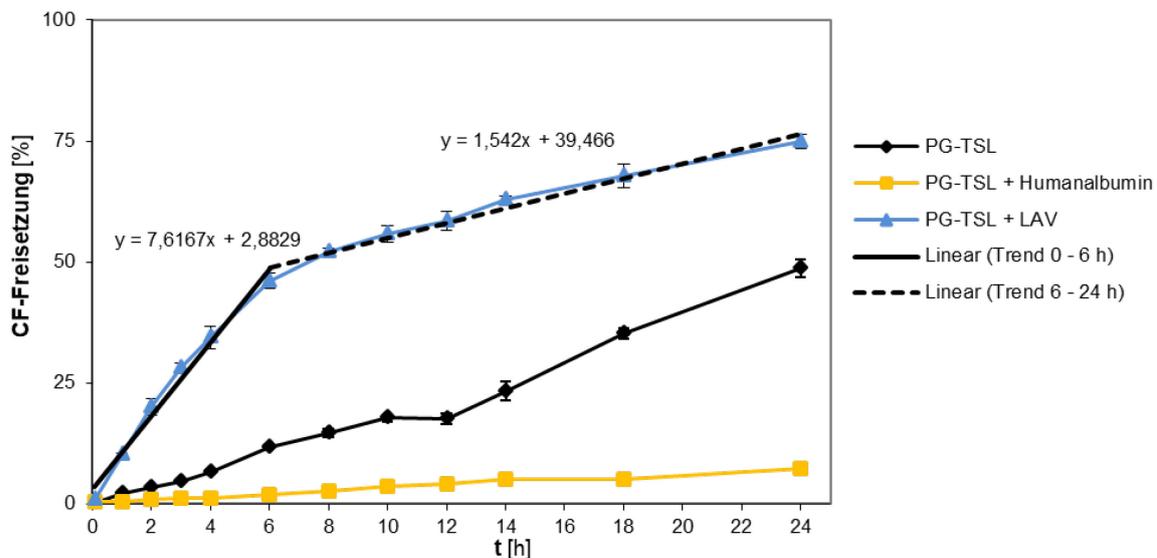


Abbildung 5.9 CF-Freisetzung von PG₂-TSL bei Inkubation in Anwesenheit von LAV (DPPC/Cholesterin 60:40 (mol/mol)) bzw. Humanalbumin (40g/L) in FCS bei 37°C, Grafische Darstellung der Formel zur Berechnung der CF-Freisetzung von PG₂-TSL+LAV

Die durchgeführte Inkubationsexperimente belegen den Einfluss von Cholesterin und Humanalbumin auf die zeitabhängige CF-Freisetzung von PG₂-TSL in FCS bei 37°C. Die Abflachung der CF-Freisetzungskurve in Anwesenheit von LAV kann durch einen erfolgten intermembranösen Cholesterinübertritt begründet werden, wobei weitere Versuche (z.B. eine

Diskussion

Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie der PG₂-TSL nach LAV-Exposition) dies noch zu beweisen haben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Regionale Hyperthermie in Kombination mit Zytostatika-beladenen, thermosensitiven Liposomen (TSL) stellt in der onkologischen Therapie von soliden Tumoren ein vielversprechendes Therapiekonzept dar (2, 3, 6, 55, 48, 49, 51, 50, 52–54, 74, 96).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur DLS-Messung von TSL unter Druck entwickelt (Kapitel 4.1, Seite 31). Zur Evaluation der in-vitro-Auswirkungen von hydrostatischem Druck und Temperatur auf insbesondere DPPG₂-haltige Liposomen wurden mehrere TSL aus unterschiedlichen Formulierungen hergestellt und anschließend hinsichtlich ihrer Vesikelgröße, ihres ζ -Potential, CF zu Lipid Verhältnis, Polydispersionsindex (PDI) und der Einschlusseffizienz vollständig charakterisiert (Kapitel 4.3.1, Seite 37).

Das synthetische Phospholipid DPPG₂ wurde eingesetzt, da es je nach molarem Verhältnis in der Doppellipidmembran von TSL zu einer idealen temperaturselektiven Wirkstofffreisetzung führt (75). DPPG₂ zeichnet sich durch weitere nützliche Eigenschaften wie eine Verlängerung der vaskulären Zirkulationszeit von TSL und eine signifikant beschleunigte Freisetzungsgeschwindigkeit um T_m aus (44, 43, 77).

Als Formulierungen wurden drei Liposomenchargen (DPPC/DSPC/DPPG₂/Chol) die sich hinsichtlich ihres Cholesteringehaltes unterschieden (10% -, 20% -, 30%-Cholesterin), ein TSL-Standard (DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 mol/mol), eine mit Doxorubicin beladene Charge des TSL-Standards und eine PEG2000-haltige TSL-Charge (DPPC/P-Lyso-PC/DSPE-PEG2000) gewählt. Alle Liposomenchargen besaßen unabhängig von der Lipidzusammensetzung die notwendige Qualität für DLS-Messungen (Tabelle 5, Seite 37). Die biophysikalischen Daten der TSL sind analog zu bereits publizierten DPPG₂-TSL (44, 43), so dass ein Vergleich möglich ist.

Die unterschiedlichen TSL-Formulierungen wurden bei 25 °C, 37 °C und 41 °C einem hydrostatischen Druck von bis zu 140 mmHg ausgesetzt, wobei mit steigender Temperatur und gleichem Druck der Einfluss auf die TSL-Größe zunahm. Dies kann durch die Fluidität der Lipid-Doppelmembran begründet werden, die bei $T < T_m$ noch rigide ist (kristalline bzw. gelförmige Phase) und erst mit Übergang in die flüssig-kristalline Phase eine zunehmende Fluidität aufweist (104). Ab einem hydrostatischen Druck von ≥ 30 mmHg stellte sich ein sog. Steady State (StSt) ein, wobei mit steigendem Druck bei stabiler Temperatur keine weitere, relevante Größenänderung der TSL beobachtet werden konnte (Kapitel 4.3.2, Seite 42). Neben

den physikalischen Bedingungen hat auch die Komposition der Lipidmembran, sowie die Beladung der TSL einen Einfluss auf das Membranverhalten (35, 44).

Von besonderem Interesse war das ubiquitär vorkommende Cholesterin, welches ein wichtiger u.a. stabilisierender Bestandteil von Zellmembranen ist. Für die cholesterinhaltigen TSL konnte bei 37 °C eine mit steigendem Cholesteringehalt abnehmende relative Größenreduktion nachgewiesen werden, welche durch die cholesterinbedingte Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten in der flüssig-kristallinen Phase begründet werden kann. Bei sich weiter T_m annähernden Bedingungen (41°C) zeigten alle Cholesterin-TSL eine Reduktion des TSL-Durchmessers (Atmosphäre vs. StSt bei 100 mmHg) um durchschnittlich ~ 4% (Kapitel 4.3.2). Die geringste druckinduzierte Größenänderung unter allen Formulierungen konnte in den PEG2000-haltigen TSL beobachtet werden, welche durch die Fähigkeit von PEG2000 eine sterische Barriere auszubilden (26) bzw. die Oberflächenstruktur von PEG2000 bedingt sein kann (27) (Kapitel 4.3.2, Seite 42).

Für die mit Doxorubicin beladenen PG₂-TSL ergab sich ein gegenüber unbeladenen PG₂-TSL abweichendes druckinduziertes Größenverhalten (Atmosphäre vs. StSt). Unbeladen zeigten die PG₂-TSL insgesamt eine ausgeprägtere und mit zunehmender Temperatur weiter ansteigende relative Größenabnahme ($2,3 \pm 0,8\%$ bei 37°C; $6,3 \pm 0,4\%$ bei 41°C). Die mit Doxorubicin beladenen PG₂-TSL reagierten bereits bei einem geringen Temperaturanstieg von 25°C auf 37°C auf den hydrostatischen Druck ($4,7 \pm 0,6\%$ bei 37°C), wobei eine weitere Annäherung der Temperaturen an T_m zu keiner weiteren Größenreduktion führte ($4,2 \pm 0,6\%$ bei 41°C). Der starre Doxorubicin-Kristall verhindert mutmaßlich sterisch eine weitere Verkleinerung (z.B. als Stützgerüst) der TSL (97).

Zur Evaluation der Relevanz von subatmosphärischen Bedingungen auf DPPG₂-haltige Doppelmembranen erfolgte erstmalig ein passiver Carboxyfluorescein-Einschluss bei Unterdruck. Es entsprach der Hypothese, dass ein geringer hydrostatischer Druck zu Änderungen der Membraneigenschaften (z.B. Erhöhung der Permeabilität durch geringe Packung der Lipide bzw. Erniedrigung von T_m) und somit zu einem schnelleren und effizienteren Einschluss von CF in PG₂-TSL führt. Gegenüber dem Einsatz der Mikropipetten-Manipulationstechnik (37), welche nur einen partiellen Membranbestandteil erfasst, konnte durch das entwickelte Verfahren die vollständige Lipid-Doppelmembran einem Unterdruck ausgesetzt werden (Kapitel 4.4, Seite 47).

Es wurden zwei TSL-Formulierungen DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (mol/mol) hergestellt, die über 10 Minuten (PG-TSL-V1) bzw. über 60 Minuten (PG-TSL-V2) mit CF inkubiert wurden. Nach erfolgtem passivem CF-Einschluss wurde der Unterdruck aufrechterhalten, bis die hergestellten TSL wieder eine Temperatur von 25°C erreicht hatten und die Lipid-Doppelschichten in der sog. gelförmigen, nahezu CF-undurchlässigen Phase ($L_{\beta'}$) vorlagen.

Da Flüssigkeiten praktisch inkompressibel sind und ausschließlich der Einschluss von CF bei Unterdruck stattfand, sind die gemessenen Größenänderung der TSL maßgeblich auf eine Änderung der Dicke der Lipid-Doppelschicht bzw. einen vollzogenen Flüssigkeitstransfer über die Membran zurückzuführen.

Nach Inkubation bei 900 mbar konnte eine Größenzunahme von 1,1 nm abs. (= + 0,8%) für PG-TSL-V1 bzw. 6 nm abs. (= + 3,9%) für PG-TSL-V2 nachgewiesen werden (Abbildung 4.17, Seite 51). Da der absolute Fluoreszenzmarker-Einschluss bei PG-TSL-V2 jedoch nicht zunahm, musste die vollzogene Größenänderung bei erfolgtem CF-Übertritt auf eine Änderung der Membrankonfiguration zurückgeführt werden. Für einen sehr hohen hydrostatischen Druck (> 500 bar) wurde bereits eine Zunahme der Dichte der Kohlenwasserstoffketten beschrieben (36, 112), Veränderungen an DPPG₂-haltigen Doppellipidmembranen bei Unterdruck sind bisher noch nicht bekannt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der CF-Einschluss bei Unterdruck mit steigender Inkubationsdauer zunahm.

Für PG-TSL-V1 konnte ein gesteigerter Einschluss von CF (Atmosphäre 0,28 mM vs. 900 mbar 0,31 mM) nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten können als Indiz gewertet werden, dass ein geringer Unterdruck (900 mbar) zumindest bei kurzer Inkubation die Permeabilität der Membran steigert und so einen verbesserten Stofftransport ermöglicht.

Sowohl PG-TSL-V1 wie auch PG-TSL-V2 mit erfolgtem CF-Einschluss bei 900 mmHg nach 60-minütiger Inkubation in FCS zeigten bei 37 °C keine relevante CF-Freisetzung (Abbildung 4.20, Seite 53; Abbildung 4.23, Seite 55). Die unter atmosphärischem Druck (mittlerer Luftdruck auf Meereshöhe $p = 1013,2 \text{ hPa} = 760,0 \text{ mmHg} = 1$ „Atmosphäre“ (atm) ≈ 1 bar; mittlerer Luftdruck auf 515 m (München) 952,3 hPa (80)) hergestellten TSL wiesen unter gleichen Bedingungen eine CF-Freisetzung von $6,0 \pm 0,1\%$ (PG-TSL-V1), sowie $10,5 \pm 0,2\%$ (PG-TSL-V2) auf. Dies zeigt, dass es keinen Hinweis auf einen fortbestehenden Membranschaden nach erfolgter Unterdruckexposition gibt. Ergänzend können die Daten darauf hinweisen, dass die Doppellipidmembran von bei geringem Unterdruck (900 mmHg)

beladenen DPPG₂-TSL in der gelförmigen Phase eine gesteigerte Stabilität aufweist, was sich hinsichtlich des Wirkstofftransports positiv auf die Einschlussstabilität der TSL und höchstmögliche Freisetzung im Hyperthermie-Gebiet auswirkt.

Die fehlende CF-Freisetzung aller TSL-Chargen nach 60 Min. Inkubation in NaCl bei 37°C bestätigt Ergebnisse vorangegangener Veröffentlichungen (44, 43, 76) für TSL mit erfolgtem CF-Einschluss bei Unterdruck, welche nachweisen konnten, dass DPPG₂-TSL bei $T < T_m$ keine relevante CF-Freisetzung besitzen.

Nach erfolgtem CF-Einschluss bei ≤ 700 mbar konnte für PG-TSL-V1 eine Abnahme der Vesikel-Größe und des CF-Lipid-Verhältnis nachgewiesen werden (Abbildung 5.6 und Abbildung 5.7, Seite 73). Die Reduktion der Einschlusseffizienz kann durch einen (zumindest partiellen) Kollaps der Doppellipidmembran bedingt sein, welcher sich auch in dem nachgewiesenen Größenverlust der TSL bemerkbar macht. In-vitro-Versuche an Phospholipid-Doppellmembranen konnten zeigen, dass mechanischer Stress zur Bildung von Poren in der Doppellipidmembran mit plötzlicher Membranruptur bei anhaltender Dehnung führt (64). Für PG-TSL-V2 lässt sich dieser Effekt nicht mehr nachweisen, so dass für den Zeitpunkt der Membranruptur, der Wechsel von flüssig-kristalliner - zu gelförmiger Phase durch das aktive Herunterkühlen und Überwinden von T_m , bei nach unvollständiger Inkubation (fortbestehender intraliposomaler Volumenstrom) noch bestehendem Unterdruck-assoziiertem Stress in der Lipidmembran in Frage kommt. Weiterführende Experimente bspw. mittels Small-angle X-ray scattering (SAXS) wären zur Evaluation der Unterdruck-assoziierten Änderungen der Membranstruktur sinnvoll.

Da zirkulierende TSL im vaskulären System mit unterschiedlichen Molekülen in Kontakt kommen und Protein-Interaktionen (42) beschrieben sind, wurde sich zu einer Inkubation der hergestellten TSL mit Lipidakzeptorvesikeln (LAV) bzw. Humanalbumin (HA) entschieden. Es sollte evaluiert werden, ob durch Anwesenheit von LAV oder HA die zeitabhängige CF-Freisetzung beeinflusst wird.

Wie bereits zuvor berichtet, konnte für DPPG₂-haltige TSL eine mit steigendem Cholesteringehalt zunehmende Stabilisierung der Doppellipidmembran mit erschwertem Übertritt von Fluoreszenzfarbstoffen aus der wässrigen inneren Phase nachgewiesen werden (Abbildung 4.10, Seite 41). In Anwesenheit der Serumkomponente HA konnte nach 24 h Inkubation bei 37°C in FCS eine Reduktion der CF-Freisetzung von $48,5 \pm 1,9\%$ (PG₂-TSL) auf

7,3±0,9% (PG₂-TSL + Humanalbumin) beobachtet werden (siehe Abbildung 5.9, Seite 79). Für Albumin ist eine Reduktion der Membranpermeabilität bei Temperaturen unterhalb von T_m für cholesterinfreie DPPG₂-TSL bekannt (41), so dass diese Erkenntnisse für die hergestellten TSL bestätigt werden konnten.

In Anwesenheit von LAV bis ca. 6 h nach Beginn der Inkubation konnte eine deutliche Steigerung der CF-Freisetzung (6 h: PG₂-TSL 11,8±0,2%, PG₂-TSL + LAV 46,1±1,6%) mit anschließender Abflachung der Freisetzungskurve beobachtet werden. Da TSL im Blut mit einer Vielzahl von anderen Doppellipidmembranen interagieren und Cholesterin ab 10-15 mol% zu einer zunehmenden Stabilisierung der Kohlenwasserstoffketten führt (35), sowie für Membranbestandteile ein intermembranöser Übertritt beschrieben ist (28), könnte die Abflachung der Freisetzungskurve ab 6 h nach Inkubation mit einem intermembranösen Cholesterinübertritt begründet werden. Weitere Versuche (z.B. eine Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie der PG₂-TSL nach LAV-Exposition) müssen dies jedoch noch beweisen. Die CF-Freisetzung in Anwesenheit von LAV kann nach der veröffentlichten Formel 1 (S. 79) berechnet werden.

Die vorliegende Arbeit kann nicht alle Fragen zur Auswirkung von physiologischen Faktoren wie dem hydrostatischen Druck und der Temperatur auf DPPG₂-haltige-Doppelmembranen beantworten, soll jedoch behilflich sein neue Forschungsansätze zu schaffen und das Interesse an weiterführender, zwingend notwendiger Grundlagenforschung zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

1. A. Stüer ES. Spin labels as enzyme substrates Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1973; 311(3):400–8.
2. Albertsmeier M, Lindner LH, Werner J, Angele MK. Wann Biopsie, wann primäre Resektion? *MMW Fortschritte der Medizin* 2017; 159(18):60–4.
3. Albertsmeier M, Rauch A, Roeder F, Hasenhütl S, Pratschke S, Kirschneck M et al. External Beam Radiation Therapy for Resectable Soft Tissue Sarcoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of surgical oncology* 2018; 25(3):754–67.
4. Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, Chiu G, Shu Y, Li WM et al. Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations Through Use of Surface Grafted Poly(ethylene Glycol). *Bioscience reports* 2002; 22(2):225–50.
5. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1066(1):29–36.
6. Angele MK, Albertsmeier M, Prix NJ, Hohenberger P, Abdel-Rahman S, Dieterle N et al. Effectiveness of regional hyperthermia with chemotherapy for high-risk retroperitoneal and abdominal soft-tissue sarcoma after complete surgical resection: A subgroup analysis of a randomized phase-III multicenter study. *Annals of surgery* 2014; 260(5):749-54; discussion 754-6.
7. Anthony FH, Biltonen RL, Freire E. Modification of a vibrating-tube density meter for precise temperature scanning. *Analytical biochemistry* 1981; 116(1):161–7.
8. Bangham AD, HORNE RW, Whittaker VP. Negatively Stained Lipoprotein Membranes. *Nature* 1963; 200(4913):1340.
9. Barbet J, Machy P, Truneh A, Leserman LD. Weak acid-induced release of liposome-encapsulated carboxyfluorescein. *Biochim. Biophys. Acta* 1984; 772(3):347–56.
10. Bassett JB, Anderson RU, Tacker JR. Use of temperature-sensitive liposomes in the selective delivery of methotrexate and cis-platinum analogues to murine bladder tumor. *The Journal of urology* 1986; 135(3):612–5.

11. Baxter LT, Jain RK. Transport of fluid and macromolecules in tumors. II. Role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvascular Research* 1990; 40(2):246–63.
Abrufbar unter der
URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002628629090023K>.
12. Busch Karl David Wilhelm. Über die Wirkung, welche heftige Erysipel auf bösartige Neubildungen haben. *Berliner klinische Wochenschrift* Juni 1866 [zuletzt geprüft am 10.12.2017]; 1866(23):245–6. Abrufbar unter der
URL:<https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015079976141;view=1up;seq=253>.
13. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *The American Journal of the Medical Science*. 1893; (Vol. 105, No. 5):487–511.
14. Dean M. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily: National Center for Biotechnology Information (US); 2002.
15. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: Signalling through lipid rafts. *Immunology* 2002; 107(2):176–82.
16. Demel RA, Kruyff B de. The function of sterols in membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1976; 457(2):109–32.
17. Dittmer J. C., LESTER RL. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms CHROMATOGRAMS. *Journal of Lipid Research* 1964; 5:126–7.
18. Ebel H, Grabitz P, Heimburg T. Enthalpy and Volume Changes in Lipid Membranes. I. The Proportionality of Heat and Volume Changes in the Lipid Melting Transition and Its Implication for the Elastic Constants \ddagger . *J. Phys. Chem. B* 2001; 105(30):7353–60.
19. Ehrlich P, Bertheim A. Über das salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten Verwandten. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1912; 45(1):756–66.
20. Ehrlich P, Hata S. Die experimentelle Chemotherapie der Spirillosen: (Syphilis, Rückfallfieber, Hühnerspirillose, Frambösie). Berlin: Springer; 1910.
21. Evans E, Heinrich V, Ludwig F, Rawicz W. Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes. *Biophysical journal* 2003; 85(4):2342–50.

22. Fehleisen F. Die Aetiologie des Erysipels: Verlag von Theodor Fischer's medizinischer Buchhandlung; 1883.
23. FKearney PM, Kearney PM, FWhelton M, Whelton M, FREynolds K, Reynolds K et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* (London, England) 2005; 365(9455):217–23.
24. FMancia G, Mancia G, FFagard R, Fagard R, FNarkiewicz K, Narkiewicz K et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2013; 34(28):2159–219.
25. Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos D. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharmaceutical research* 1995; 12(10):1407–16.
26. Gang W, Jie WJ, Ping ZL, Du Ming S, Ying LJ, Lei W et al. Liposomal quercetin: Evaluating drug delivery in vitro and biodistribution in vivo. *Expert opinion on drug delivery* 2012; 9(6):599–613.
27. Garbuzenko O, Barenholz Y, Priev A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids* 2005; 135(2):117–29.
28. Garg S, Porcar L, Woodka AC, Butler PD, Perez-Salas U. Noninvasive neutron scattering measurements reveal slower cholesterol transport in model lipid membranes. *Biophysical journal* 2011; 101(2):370–7.
29. GOÑI FM, Urbaneja M-A, ARRONDO JLR, ALONSO A, DURRANI AA, CHAPMAN D. The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100. *European Journal of Biochemistry* 1986; 160(3):659–65. Abrufbar unter der URL:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1986.tb10088.x/full>.
30. H.Eibl W. A new, sensitive determination of phosphate. In: *Anal.Biochem.* S. 51–7 .
31. Halstenberg S, Heimburg T, Hianik T, Kaatz U, Krivanek R. Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers. *Biophysical journal* 1998; 75(1):264–71.

32. Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 2015; 16(1):35–47.
33. Hansjörg EIBL, Lars H. Lindner, Erfinder. THERMOLABILES LIPOSOM MIT GEREGLTER FREIGABETEMPERATUR.
34. Hatziantoniou S., Demetzos C., Wagner M. Phasenübergänge von Lipiden und Liposomen. *UserCom 2005* [zuletzt geprüft am 31.05.2016]; (01).
35. Heimburg T. *Thermal Biophysics of Membranes*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007.
36. Heimburg T. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1998; 1415(1):147–62.
37. Henriksen JR, Ipsen JH. Measurement of membrane elasticity by micro-pipette aspiration. *The European physical journal. E, Soft matter* 2004; 14(2):149–67.
38. Hjort Ipsen J, Karlström G, Mourtisen OG, Wennerström H, Zuckermann MJ. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1987; 905(1):162–72.
39. Hosokawa T. Alteration in the temperature- dependent content release property of thermosensitive liposomes in plasma. *Pharm Bull (Tokyo)* 2003; (Nov., 51(11)):1227–32.
40. Hossann M, Hirschberger J, Schmidt R, Baumgartner C, Zimmermann K, Baer S et al. A Heat-Activated Drug-Delivery Platform Based on Phosphatidyl-(oligo)-glycerol Nanocarrier for Effective Cancer Treatment. *Adv NanoBio Res* 2021 [zuletzt geprüft am 01.05.2021]:2000089.
41. Hossann M, Syunyaeva Z, Schmidt R, Zengerle A, Eibl H, Issels RD et al. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *J Control Release* 2012; 162(2):400–6.
42. Hossann M, Syunyaeva Z, Schmidt R, Zengerle A, Eibl H, Issels RD et al. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012; 162(2):400–6.

43. Hossann M, Wang T, Wiggenhorn M, Schmidt R, Zengerle A, Winter G et al. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release* 2010; 147(3):436–43.
44. Hossann M, Wiggenhorn M, Schwerdt A, Wachholz K, Teichert N, Eibl H et al. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 2007; 1768(10):2491–9. Abrufbar unter der URL:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.021>.
45. Huang Z, Szoka FC. Sterol-modified phospholipids: Cholesterol and phospholipid chimeras with improved biomembrane properties. *Journal of the American Chemical Society* 2008; 130(46):15702–12.
46. Hyperthermia: A Potent Enhancer of Radiotherapy. *Clinical Oncology* 2007; 19(6):418–26.
47. Instruments M. Dynamic light scattering common terms defined.
48. Issels R, Kampmann E, Kanaar R, Lindner LH. Hallmarks of hyperthermia in driving the future of clinical hyperthermia as targeted therapy: Translation into clinical application. *Int J Hyperthermia* 2016; 32(1):89–95.
49. Issels R, Lindner LH. Regional hyperthermia for high-risk soft tissue sarcoma treatment: Present status and next questions. *Current opinion in oncology* 2016; 28(5):447–52.
50. Issels RD. Regional hyperthermia in high-risk soft tissue sarcomas. *Current opinion in oncology* 2008; 20(4):438–43.
51. Issels RD. High-risk soft tissue sarcoma: Clinical trial and hyperthermia combined chemotherapy. *Int J Hyperthermia* 2006; 22(3):235–9.
52. Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wessalowski R, Reichardt P, Wust P et al. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology* 2018; 4(4):483–92.
53. Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem B-C et al. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: A randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 2010; 11(6):561–70.

54. Issels RD, Lindner LH, Wessalowski R, Mansmann U. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for soft-tissue sarcoma - Authors' reply. *Lancet Oncol* 2017; 18(11):e630.
55. Issels RD, Lindner, L. H. et al. 13LBA Improved overall survival by adding regional hyperthermia to neo-adjuvant chemotherapy in patients with localized high-risk soft tissue sarcoma (HR-STs): Long-term outcomes of the EORTC 62961/ESHO randomized phase III study. *European Journal of Cancer* 2015; 51:S716. Abrufbar unter der URL:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095980491530071X/pdf?md5=a919125b61e04069757ceda8138da1dc&pid=1-s2.0-S095980491530071X-main.pdf>.
56. Issels RD, Wilmanns W. Application of hyperthermia in the treatment of cancer. Berlin, New York: Springer-Verlag; 1988. (Recent results in cancer research; Bd. 107).
57. Janiak MJ, Small DM, Shipley GG. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *The Journal of biological chemistry* 1979; 254(13):6068–78.
58. Johnson SM, Miller KW, Bangham AD. The opposing effects of pressure and general anaesthetics on the cation permeability of liposomes of varying lipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1973; 307(1):42–57.
59. Kaasgaard T, Leidy C, Crowe JH, Mouritsen OG, Jørgensen K. Temperature-Controlled Structure and Kinetics of Ripple Phases in One- and Two-Component Supported Lipid Bilayers. *Biophysical journal* 2003; 85(1):350–60.
60. Kao Y-C, Jheng J-R, Pan H-J, Liao W-Y, Lee C-H, Kuo P-L. Elevated hydrostatic pressure enhances the motility and enlarges the size of the lung cancer cells through aquaporin upregulation mediated by caveolin-1 and ERK1/2 signaling. *Oncogene* 2017; 36(6):863–74.
61. Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Klausner RD. The concept of lipid domains in membranes. *The Journal of cell biology* 1982; 94(1):1–6.
62. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS letters* 1990; 268(1):235–7.
63. Kneidl B, Peller M, Winter G, Lindner LH, Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: State of the art review. *International journal of nanomedicine* 2014; 9:4387–98.

64. Koshiyama K, Wada S. Molecular dynamics simulations of pore formation dynamics during the rupture process of a phospholipid bilayer caused by high-speed equibiaxial stretching. *Journal of biomechanics* 2011; 44(11):2053–8.
65. Landau LD, Lifschitz J.M. *Lehrbuch der theoretischen Physik*. 8., berichtigte und ergänzte Aufl. Berlin: Akademie-Verlag; 1987.
66. Landwehr A, Winter R. High-pressure differential thermal analysis of lamellar to lamellar and lamellar to non-lamellar lipid phase transitions. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1994; 98(2):214–8.
67. Lasic DD. Preparation of liposomes. *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science 1993:63–107.
68. Leirer CT. *Dynamik und Struktur in der Phasenkoexistenz von Lipidmembranen.*: Universität Augsburg; 2008.
69. Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovascular research* 2010; 87(2):198–210.
70. Lewis RNAH, McElhaney RN. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1828(10):2347–58.
71. Li X, Hirsh DJ, Cabral-Lilly D, Zirkel A, Gruner SM, Janoff AS et al. Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1415(1):23–40.
72. Limmer S, Hahn J, Schmidt R, Wachholz K, Zengerle A, Lechner K et al. Gemcitabine Treatment of Rat Soft Tissue Sarcoma with Phosphatidylglycerol-Based Thermosensitive Liposomes. *Pharm. Res.* 2014.
73. Lindblom G., Rilfors L. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance. *Biochimica et biophysica acta* 1989; 1989(988):221–56.
74. Lindner LH. *Neuartige thermosensitive Liposomen für die Tumorthherapie*; 2009.
75. Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, Teichert N, Schmitt-Sody M, Issels RD et al. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(6):2168–78.

76. Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010; 13(1):111–23.
77. Lindner LH, Reinl HM, Schlemmer M, Stahl R, Peller M. Paramagnetic thermosensitive liposomes for MR-thermometry. *Int J Hyperthermia* 2005; 21(6):575–88.
78. Long SAT, El-Mahdi AM, Shaeffer J, Herausgeber. Hyperthermia as an antineoplastic treatment modality. Washington: National Aeronautics and Space Administration Scientific and Technical Information Office; 1978. (NASA conference publication; Bd. 2051).
79. M. Böttner, D. Ceh, U. Jacobs, R. Winter. High Pressure Volumetric Measurements on Phospholipid Bilayers. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1994; (Band 184, Heft 1-2):205–18.
80. Malberg H. *Meteorologie und Klimatologie: Eine Einführung*. Fünfte, erweiterte und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2007.
81. Malvern Instruments Ltd. DLS technical note: Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes MRK656-01.
82. Maruyama K, Unezaki S, Takahashi N, Iwatsuru M. Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1149(2):209–16.
83. Marwick TH. Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction: Unresolved Issues. *The Canadian journal of cardiology* 2016; 32(7):842–6. Abrufbar unter der URL:[http://www.onlinecjc.ca/article/S0828-282X\(16\)30083-6/pdf](http://www.onlinecjc.ca/article/S0828-282X(16)30083-6/pdf).
84. Mathivathanan L, Yang G, Leng F, Raptis RG. Crystal structure and conformational analysis of doxorubicin nitrate. *Acta crystallographica. Section E, Crystallographic communications* 2018; 74(Pt 3):400–5.
85. Mills JK, Needham D. Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1716(2):77–96.
86. Milosevic MF, Fyles AW, Hill RP. The relationship between elevated interstitial fluid pressure and blood flow in tumors: A bioengineering analysis. *International journal of radiation*

oncology, biology, physics 1999; 43(5). Abrufbar unter der URL:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10192363/>.

87. Mittag JJ, Kneidl B, Preiß T, Hossann M, Winter G, Wuttke S et al. Impact of plasma protein binding on cargo release by thermosensitive liposomes probed by fluorescence correlation spectroscopy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2017; 119:215–23.

88. Mountcastle DB, Biltonen RL, Halsey MJ. Effect of anesthetics and pressure on the thermotropic behavior of multilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *PNAS* 1978; 75(10):4906–10. Abrufbar unter der URL:<http://www.pnas.org/content/75/10/4906.full.pdf>.

89. Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Advanced drug delivery reviews* 2001; 53(3):285–305.

90. O'Reilly JE. Fluorescence experiments with quinine. *J. Chem. Educ.* 1975; 52(9):610.

91. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage; 2019.

92. PORATH J, FLODIN P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* 1959; 183(4676):1657–9.

93. Potekhin SA, Senin AA, Abdurakhmanov NN, Khusainova RS. High pressure effect on the main transition from the ripple gel P'beta phase to the liquid crystal (Lalpha) phase in dipalmitoylphosphatidylcholine. Microcalorimetric study. *Biochimica et biophysica acta* 2008; 1778(11):2588–93.

94. Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Hörber JK. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of cell biology* 2000; 148(5):997–1008.

95. Ralston E, Hjelmeland LM, Klausner RD, Weinstein JN, Blumenthal R. Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions effect of impurities, and purification of the dye. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1981; 649(1):133–7.

96. Rolf D Issels, Lars H Lindner, Jaap Verweij, Peter Wust, Peter Reichardt, Baard-Christian Schem et al. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study.
97. Ruiz A, Ma G, Seitsonen J, Pereira SGT, Ruokolainen J, Al-Jamal WT. Encapsulated doxorubicin crystals influence lysolipid temperature-sensitive liposomes release and therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2020; 328:665–78.
98. Seddon JM, Templer RH. Cubic Phases of Self-Assembled Amphiphilic Aggregates. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 1993; 344(1672):377–401.
99. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)* 1972; 175(4023):720–31.
100. Tada K, Miyazaki E, Goto M, Tamai N, Matsuki H, Kaneshina S. Barotropic and thermotropic bilayer phase behavior of positional isomers of unsaturated mixed-chain phosphatidylcholines. *Biochimica et biophysica acta* 2009; 1788(5):1056–63.
101. Torchilin VP, Weissig V. *Liposomes: A practical approach*. Oxford [u.a.]: IRL Press; 1990. (The Practical Approach Series).
102. Ulf Nobbmann. Dispersity or Polydispersity is a key parameter for GPC SEC: Fa Malvern; 2014 [zuletzt geprüft am 28.05.2016]. Abrufbar unter der URL:<http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>.
103. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience reports* 2002; 22(2):129–50.
104. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2008; 9(2):112–24.
105. Varga Z, Wacha A, Bóta A. Osmotic shrinkage of sterically stabilized liposomes as revealed by time-resolved small-angle X-ray scattering. *J Appl Crystallogr* 2014; 47(1):35–40.
106. Veatch SL, Keller SL. Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Physical review letters* 2002; 89(26):268101.

107. Vogl TJ, Zangos S, Balzer JO, Nabil M, Rao P, Eichler K et al. Transarterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma: technique, indication and results. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2007; 179(11):1113–26.
108. Wang T, Hossann M, Reinl HM, Peller M, Eibl H, Reiser MF et al. In vitro characterization of phosphatidylglycerol-based thermosensitive liposomes with encapsulated ¹H MR T1-shortening gadodiamide. *Contrast media & molecular imaging* 2008; 3(1):19–26.
109. Weinstein JN, Yoshikami S, Henkart P, Blumenthal R, Hagens WA. Liposome - cell interaction: Transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science* 1977; 195:489–92.
110. Willerding L, Limmer S, Hossann M, Zengerle A, Wachholz K, Hagen TLM ten et al. Method of hyperthermia and tumor size influence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors. *J Control Release* 2016; 222:47–55.
111. Winter R. Effects of hydrostatic pressure on lipid and surfactant phases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2001; 6(3):303–12.
112. Winter R, Czeslik C. Pressure effects on the structure of lyotropic lipid mesophases and model biomembrane systems. *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials* 2000; 215(8):7198.
113. Winter R, Erbes J, Czeslik C, Gabke A. Effect of pressure on the stability, phase behaviour and transformation kinetics between structures of lyotropic lipid mesophases and model membrane systems. *J. Phys.: Condens. Matter* 1998; 10(49):11499–518. Abrufbar unter der URL:<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/10/49/036/pdf>.
114. Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science (New York, N.Y.)* 1978; 202(4374):1290–3.
115. Zimmermann K, Hossann M, Hirschberger J, Troedson K, Peller M, Schneider M et al. A pilot trial of doxorubicin containing phosphatidylglycerol based thermosensitive liposomes in spontaneous feline soft tissue sarcoma. *Int J Hyperthermia* 2016:1–13.

8 Bildquellen

Abbildung 1.5 Struktur von DPPC und DSPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA

<https://avantilipids.com/images/structures/850355s.gif>

<https://avantilipids.com/images/structures/850365s.gif> (Stand: 04.06.2017)

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Lars Lindner für die Ermöglichung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe im Universitätsklinikum Großhadern. Ohne seine Unterstützung und Investitionen in junge Kollegen, sowie den Optimismus eines sinnvollen Einsatzes akquirierter Mittel, wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Hossann, auf dessen fachliche Expertise ich mich zu jeder Zeit verlassen konnte und der mir bis zum Abschluss der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Martin, vielen Dank dass du mich ermutigt hast eigene Ideen zu verfolgen und im Labor umzusetzen!

Meinen Eltern Dagmar und Kersten, sowie Geschwistern Flora und Jonas, möchte ich außerdem für die jahrelange Unterstützung und Bestärkung in die eigenen Interessen sehr danken! Ebenso danke ich meiner Frau Franziska und Tochter Louisa von ganzem Herzen für das Korrekturlesen und die notwendige Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

Affidavit

	<p>LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN</p>	<p>Promotionsbüro Medizinische Fakultät</p>		
Eidesstattliche Versicherung				

Schröder-Doms, Lucas

Name, Vorname

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

Einfluss von hydrostatischem Druck auf DPPG2-haltige thermosensitive 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.

Stade, 25.11.2022

Ort, Datum

Lucas Schröder-Doms

Unterschrift des Doktoranden