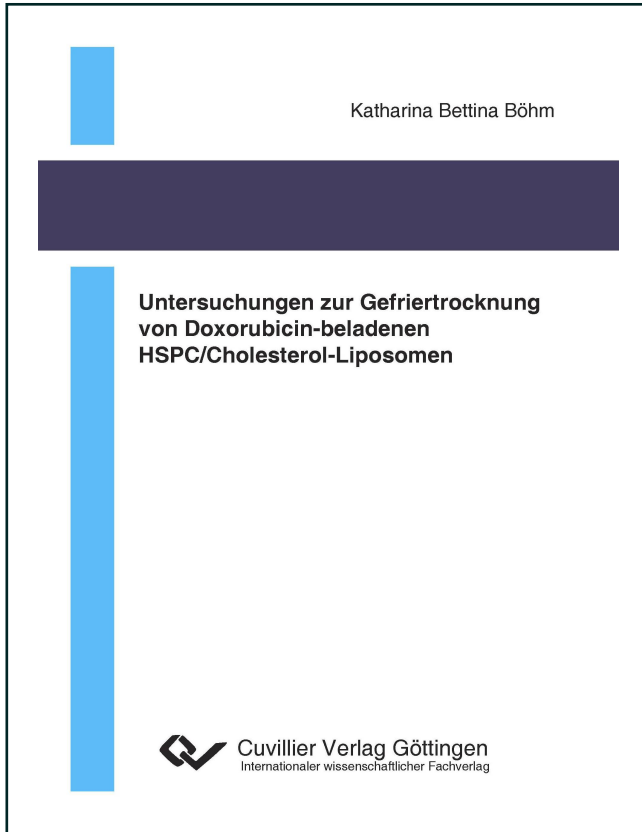




Katharina Bettina Böhm (Autor)

# **Untersuchungen zur Gefriertrocknung von Doxorubicin-beladenen HSPC/Cholesterol- Liposomen**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6159>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Liposomen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Liposomale Membranbestandteile</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. HSPC (hydriertes Sojaphosphatidylcholin).....	3
1.2.2. Cholesterol.....	3
1.2.3. CHEMS (Cholesterolhemisuccinat).....	4
<b>1.3. Eingesetzte Zytostatika</b> .....	<b>5</b>
1.3.1. Doxorubicin (C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>11</sub> ).....	5
1.3.2. Idarubicin (C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>9</sub> ).....	7
<b>1.4. CAELYX®</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5. Targeting</b> .....	<b>10</b>
1.5.1. Passives Targeting.....	11
1.5.2. Aktives Targeting.....	14
<b>1.6. Lyophilisation</b> .....	<b>15</b>
1.6.1. Ablauf der Lyophilisation.....	16
1.6.1.1. Einfrieren.....	18
1.6.1.2. Primärtrocknung.....	19
1.6.1.3. Sekundärtrocknung.....	20
1.6.2. Einsatz von Lyo-/ Kryoprotektoren.....	21
1.6.2.1. Saccharose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ).....	22
1.6.2.2. Trehalose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ).....	25
1.6.2.3. Mannitol (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ).....	26
1.6.3. Lyophilisation von funktionalisierten Liposomen.....	27
<b>1.7. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Material und Geräte</b> .....	<b>29</b>



<b>2.1. Lipide und Membranbestandteile .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>30</b>
<b>2.3. Puffer .....</b>	<b>33</b>
<b>2.4. Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5. Geräte .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6. Wasser .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7. Zellversuche .....</b>	<b>39</b>
2.7.1. Zelllinie und deren Kultivierung .....	39
2.7.2. Reagenzien zur Kultivierung der Zellen.....	40
<b>2.8. Antikörper.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Liposomenherstellung.....</b>	<b>41</b>
3.1.1. Filmmethode .....	41
3.1.2. Extrusion .....	43
3.1.2.1. Extrudieren mit dem Druckextruder .....	43
3.1.2.2. Extrudieren mit dem Handextruder .....	44
<b>3.2. Charakterisierung der Liposomen .....</b>	<b>44</b>
3.2.1. Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....	44
3.2.2. Bestimmung des Phospholipidgehalts nach Bartlett .....	45
3.2.3. Bestimmung des Cholesterolgehalts .....	47
3.2.4. Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC).....	48
3.2.5. Bestimmung der Isotonie.....	51
<b>3.3. Beladung der Liposomen mit DXR oder IDA.....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Remote loading .....	51
<b>3.4. Charakterisierung der mit DXR- oder IDA-beladenen Liposomenpräparationen .....</b>	<b>54</b>



3.4.1. Solubilisierung der HSPC/Chol-Liposomen mit Triton X-100.....	54
3.4.2. Fluorimetrische Kalibriergerade zur Bestimmung von DXR und IDA.....	55
3.4.3. Bestimmung der liposomalen Einschlusseffizienz von DXR und IDA ....	58
3.4.4. Bestimmung des Freisetzungsverhaltens von DXR und IDA.....	59
3.4.5. Differenz Scanning Calorimetrie (DSC) .....	60
<b>3.5. Lyophilisation .....</b>	<b>62</b>
<b>3.6. Präparation von Liposomen zum aktivem Targeting .....</b>	<b>64</b>
3.6.1. Kopplung des Liganden durch SPIT-Methode (sterol based post insertion technique).....	64
<b>3.7. Durchführung des Zellexperiments .....</b>	<b>66</b>
3.7.1. Passagieren der Zellen.....	66
3.7.2. Ausplattieren der Zellen.....	66
3.7.3. Durchflusszytometrie .....	66
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1. Charakterisierung der Verkapselung von DXR und IDA.....</b>	<b>69</b>
4.1.1. Bestimmung der prozentualen Einschlusseffizienz.....	69
4.1.2. Vergleich der Stabilität bei $\leq 8$ °C .....	70
4.1.3. Bestimmung des Freisetzungsverhaltens DXR- und IDA-beladener Liposomen .....	73
4.1.4. Einfluss von Cholesterolhemisuccinat (CHEMS) .....	78
<b>4.2. Lyophilisation .....</b>	<b>82</b>
4.2.1. Optimierung der bestehenden Lyophilisationsbedingungen .....	82
4.2.2. Lyophilisation mit bestehendem Lyophilisationsprotokoll.....	82
4.2.3. Optimierung der Primärtrocknungs-Temperatur .....	86
4.2.4. Lyophilisation mit veränderter Primärtrocknungs-Temperatur .....	93
<b>4.3. Untersuchung des Einflusses von Saccharose auf Einschlusseffizienz und Größe der DXR-beladenen HSPC/Chol-Liposomen .....</b>	<b>97</b>



---

4.3.1. Einfluss von Saccharose auf die Größe von HSPC/Chol-Liposomen ....	97
4.3.2. Einfluss verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf die Lyophilisation DXR-beladener HSPC/Chol-Liposomen.....	114
<b>4.4. Untersuchungen der Lagerstabilität DXR-beladener HSPC/Chol-Liposomen .....</b>	<b>120</b>
<b>4.5. Einfluss der Sterilfiltration .....</b>	<b>126</b>
<b>4.6. Möglichkeiten zu Optimierung der Lyophilisation.....</b>	<b>128</b>
4.6.1. Überprüfung einer weiteren Einfriermethode.....	128
4.6.2. Vergleich von Saccharose und Trehalose als Lyo-/ Kryoprotektoren...	132
4.6.3. Überprüfung verschiedener Rehydrierungsmodelle .....	138
4.6.4. Einfluss von PEG auf die Lyophilisation.....	144
<b>4.7. Cryo-TEM.....</b>	<b>148</b>
<b>4.8. Lyophilisation funktionalisierter HSPC/Chol-Liposomen ...</b>	<b>152</b>
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>157</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>163</b>