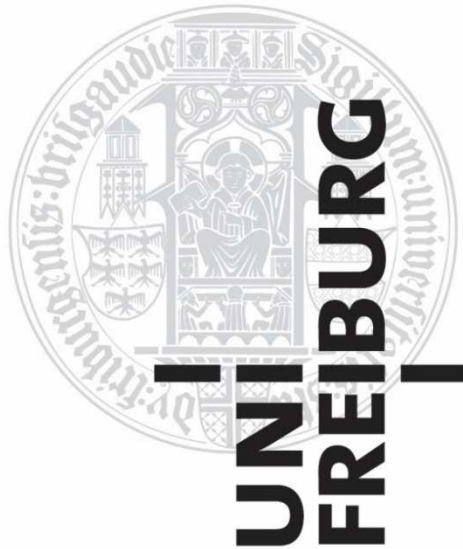


**Herstellungsoptimierung und *in-vitro*-Untersuchung
von anti-GD₂-funktionalisierten
Arsen-Liposomen für die
gezielte Neuroblastomtherapie**



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Hannah Sophia Deibel

aus Bühl

2017



Die vorliegende Dissertationsschrift wurde von Februar 2013 bis Februar 2017 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau angefertigt.

Dekan	Prof. Dr. Manfred Jung
Vorsitzender des Promotionsausschusses	Prof. Dr. Stefan Weber
Referent	Prof. Dr. Rolf Schubert
Korreferentin	Prof. Dr. Regine Süss
Drittprüfer	Prof. Dr. Norbert Klugbauer
Tag der mündlichen Prüfung	17.03.2017
Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses	27.04.2017

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Schubert, für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis, für die fachlichen Anregungen und die fortwährende Unterstützung sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Vielen Dank für ihre offene und optimistische Art, die mich in den letzten Jahren immer wieder auf's Neue motiviert hat. Darüber hinaus möchte ich mich an dieser Stelle auch ganz besonders für die familiäre und herzliche Atmosphäre im Arbeitskreis, die finanzielle Unterstützung bei Fahrten nach Oberjoch, Ameland und Reims sowie die schönen Sommerfeste bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch meiner Co-Betreuerin Frau Prof. Dr. Regine Süß. Herzlichen Dank für die fachliche Unterstützung im Bereich Zellkultur und Durchflusszytometrie, für die schnelle und sehr gründliche Korrektur meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Norbert Klugbauer danke ich für seine Bereitschaft das Amt des Drittprüfers zu übernehmen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Rupert Handgretinger für die schnelle, unkomplizierte und kostenfreie Bereitstellung der GD₂-Antikörper und verschiedener Neuroblastomzelllinien. Ein besonderer Dank gilt der Fördergesellschaft Kinderkrebs-Neuroblastom-Forschung e.V. für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts. Ich danke außerdem der Lipoid GmbH Ludwigshafen für die kostenlose Belieferung mit Phospholipiden.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sabine Barnert für die Anfertigung zahlreicher Kryo-TEM Bilder, die Hilfe bei der Interpretation der Aufnahmen und für ihr unermüdliches Engagement für die Arbeitsgruppe. Bei Nicole Specht möchte ich mich für viele praktische Ratschläge, die Durchführung des Bartlett-Assays und ihre Hilfe bei den HPTLC-Versuchen bedanken. Vielen Dank an Irmgard (Ima) Ohlhoff und Eva Dengler für zahlreiche Bestellungen und für ihre Mithilfe sowie Organisation des Laboralltags (v. a. Zelllabor). Des Weiteren möchte ich Birgit Erhard für ihre Unterstützung in allen Zellkulturangelegenheiten danken. Ein herzliches Dankeschön gilt Nuria Beltrán-Sánchez für ihr freundliches Wesen, ihre aufmunternden Worte und ihre schnelle und zuverlässige Organisation aller administrativen Aufgaben. Ich danke euch Allen für die netten Gespräche während unserer Kaffeepausen, die ich sehr vermissen werde!

Dr. Martin Holzer und Dr. Ali Al Raghban danke ich für ihren tollen Einsatz bei der Organisation und Durchführung der Studentenpraktika, wodurch wir Doktoranden stark entlastet wurden.

Bei Prof. Heiko Heerklotz, Dr. Maria Hörnke, Dr. Louma Kalie und den restlichen „Heerklotzen“ möchte ich mich für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis bedanken.

Ich bedanke mich bei den ehemaligen Studenten: Wolfgang Krämer, Anastasia Metelev, Viktor Loesch, Ivan Cvetković, Svenja Hutzler, Marleen Schulz, Sarah Kuhn und Amelie Rösner für ihre fleißige Mitarbeit im Rahmen von Bachelor- und Diplomarbeiten sowie dem Wahlpflichtfach.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an Dr. Sandra Richter und Marika Kientz, vom ZMBP der Universität Tübingen, die mir die Durchführung der konfokal-fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen ermöglicht haben!

Ich danke meinen Vorgängerinnen Dr. Ines Müller und Dr. Kathrin Züfle, die durch ihre Dissertationen die Grundlagen für meine Arbeit gelegt haben. Vielen Dank für eure liebe Einführung in die Thematik und eure Hilfsbereitschaft v. a. beim Kampf mit dem Aas 😊.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem lieben Laborkollegen Dr. Christoph Grapentin für die schöne und meistens lustige gemeinsame Laborzeit bedanken! Unsere fachlichen Diskussionen, deine Anregungen und deine Hilfestellungen (Microfluidizer, FACS usw.) haben meine Arbeit immer sehr unterstützt. Vielen Dank für die morgendlichen Kaffeepausen, die mir den Start in den Tag erleichtert haben und für die sorgfältige Korrektur diverser Abstracts, Poster und dieser Arbeit.

Meine Minions Dr. Kathrin Züfle und Carina (Ricky) Zorzin danke ich herzlich für ihre Freundschaft in den letzten Jahren. Vielen Dank für eure aufbauenden Worte, das Trocknen von Tränchen, unsere gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen und für das gemeinsame Lachen und Rumbloßeln, auch außerhalb der Uni. Ihr habt mir den Laboralltag verschönert und ich werde euch sehr vermissen! Liebe Ricky vielen Dank für deine exzellente Unterweisung in die Geheimnisse der SDS-PAGE. Liebe Kathrin herzlichen Dank für die akribische Korrektur verschiedener Abstracts, Poster und vor allem dieser Arbeit!

In diesem Zuge möchte ich auch Maximilian Wittmann für seine Hilfestellung bei allen Fragen und Problem rund ums FACS Fortessa und die Korrektur dieser Arbeit danken. Auch meinem „neuen“ Laborkollegen Wolfgang (Grammatik-Erbsenzähler) Krämer möchte ich für ein sehr lustiges letztes Jahr und das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Dr. Judith Jakoby danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung des Chol-PEG-Ankers, für die wissenschaftlichen Diskussionen und allerlei Hilfestellungen bei der liposomalen Oberflächenmodifikation. Vielen herzlichen Dank auch an Dr. Constantin Hozsa für die vielen fachlichen und nicht fachlichen Gespräche und für das Korrekturlesen meiner Abstracts.

Ich danke unseren IT-Spezialisten Dr. Michael Keller, Dr. Manuel Weinheimer, Dr. Stefan Braun, Daniel Eckhardt und Stefan Bleher für ihre schnelle Hilfe bei diversen PC-Problemen.

Ich danke allen weiteren lieben Kollegen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben und ohne die dieser Weg nicht annähernd so schön gewesen wäre: Gesche Först, Doris Zimmer, Manuel Weis, Marcus Wüller, Daniel Molnar, Shila Gurung, Nan Liu, Melanie Kolter, Martin Gotthart, Anja Stulz, Marie Markones, Lisa Dietel, Johannes Schnur und Friederike Hartwig. An unsere gemeinsamen Erlebnisse: Oberjoch, Ameland, Reims, Basel, Darmstadt, Lasertag, Herzgulasch, Sushi und viele mehr werde ich immer gerne zurück denken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: Marco, meinen Eltern und meinen Brüdern Lukas und Felix. Danke für eure großartige Unterstützung, euren uneingeschränkten Rückhalt und eure Liebe!

Für meine Familie

After climbing a great hill, one only finds that there are many more hills to climb.

(Nelson Mandela)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Posterpräsentationen

Hannah Deibel, Ines Müller und Rolf Schubert

GD₂-targeting of arsenic trioxide loaded liposomes for neuroblastoma therapy

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Freiburg, Oktober 2013

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Neuroblastoma targeting via arsenic loaded anti-GD₂-immunoliposomes

Local Chapter Meeting CRS, Basel, Februar 2015

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Arsenic loaded anti-GD₂ immunoliposomes: Design and *in vitro* targeting to neuroblastoma cells

1st European Conference on Pharmaceutics, Reims (Frankreich), April 2015

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Preparation and characterization of liposomal arsenic trioxide formulations

4th Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Heidelberg, September 2015

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Liposomal arsenic - formulation optimization and *in vitro* cytotoxicity studies

Tag der Forschung, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Freiburg, Juli 2016

Vorträge

Hannah Deibel, Ines Müller und Rolf Schubert

Arsenic trioxide (ATO) loaded liposomes for neuroblastoma therapy - an outlook

11. Pharmazie-Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2013

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Liposomal Nifurtimox - a novel approach for neuroblastoma therapy

23rd Mountain/Sea Liposome Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2014

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Formulation development and characterization of arsenic loaded liposomes

12. Pharmazie-Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2015

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Formulation optimization of liposomal arsenic for neuroblastoma treatment

24th Mountain/Sea Liposome Workshop, Ameland (Niederlande), September 2015

Hannah Deibel, Rolf Schubert

Investigation of the storage stability of arsenic loaded anti-GD₂-Immunoliposomes

13. Pharmazie-Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Liposomen	1
1.1.1	Definition und Einteilung	1
1.1.2	Bestandteile von liposomalen Membranen	2
1.1.2.1	Glycerophospholipide	2
1.1.2.2	Sphingophospholipide	3
1.1.2.3	Cholesterol	3
1.1.3	Liposomen-Herstellung	4
1.2	Liposomen als Drug Delivery Systeme	6
1.2.1	Beladungsmechanismen	7
1.2.2	Biopharmazeutische Aspekte von Liposomen	10
1.2.2.1	Passives Targeting	10
1.2.2.2	Aktives Targeting	14
1.3	Liposomale Oberflächenmodifikation	16
1.4	Neuroblastom	20
1.4.1	Tumorentstehung und Symptome	20
1.4.2	Klassifikation und Einteilung in Risikogruppen	21
1.4.2.1	Prognose	21
1.4.3	Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms	22
1.4.3.1	Klassische Behandlungsstrategie	23
1.4.3.2	Molekularbiologische Therapieansätze	23
1.4.3.3	Liposomale Neuroblastomtherapie	25
1.4.3.4	Arsentrioxid in der Neuroblastomtherapie	26
1.5	Liposomales Arsentrioxid	27
1.6	Ziele der Arbeit	29

2	Material und Geräte	31
2.1	Alphabetische Liste der Hersteller und Bezugsquellen.....	31
2.2	Material.....	33
2.2.1	Chemikalien.....	33
2.2.2	Puffer	37
2.2.3	Zellkultur	37
2.2.4	Verbrauchsmaterialien	38
2.3	Geräte	40
3	Methoden	43
3.1	Liposomenherstellung.....	43
3.1.1	Allgemeines Vorgehen bei der Filmmethode.....	43
3.1.2	Zusammensetzung der Liposomen.....	44
3.1.3	Herstellung der Liposomendispersion.....	44
3.1.3.1	Extrusion.....	45
3.1.3.2	Mikrofluidisierung.....	46
3.2	Liposomencharakterisierung	47
3.2.1	Bestimmung der Partikelgröße.....	47
3.2.1.1	Photonenkorrelationsspektroskopie	47
3.2.1.2	Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Kryo-TEM)	49
3.2.2	Bestimmung der Lipidkonzentration.....	50
3.2.2.1	Phosphatgehaltsbestimmung nach Bartlett.....	50
3.2.2.2	Bestimmung des Cholesterol-Gehalts mittels Enzym-Assay.....	52
3.3	Beladung der Liposomen mit Arsentrioxid (ATO)	53
3.3.1	Durchführung der ATO-Beladung	54
3.3.1.1	Herstellung und Lyophilisation von Ni(OAc) ₂ -Liposomen	54
3.3.1.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)	55
3.3.1.3	Aufkonzentrieren der Proben mittels Centrisart I.....	57
3.3.1.4	Beladung mit Arsen	57

3.3.2	Quantifizierung von NiAs beladenen Liposomen	57
3.3.2.1	Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) - Allgemeines	57
3.3.2.2	Messung des Ni- und As-Gehalts.....	60
3.3.2.3	Bestimmung des liposomalen Ni- und As-Gehalts.....	62
3.4	Lagerstabilitätsuntersuchungen	66
3.4.1	Lagerstabilität Ni(OAc) ₂ -beladener Liposomen im Kühlschrank.....	66
3.4.2	Einfrieruntersuchungen	66
3.4.3	Untersuchung der Autoklavierbarkeit Ni(OAc) ₂ -beladener Liposomen	67
3.5	Liposomale Oberflächenmodifikation	67
3.5.1	Durchführung der liposomalen Oberflächenmodifikation.....	69
3.5.1.1	Allgemeine Vorgehensweisen	69
3.5.1.2	Praktische Durchführung der Oberflächenfunktionalisierung.....	70
3.5.2	Charakterisierung oberflächenmodifizierter Liposomen.....	73
3.5.2.1	SDS-PAGE	73
3.5.2.2	Herstellung des SDS-PAGE Gels.....	73
3.5.2.3	Probenaufbereitung und Gelelektrophorese	74
3.5.2.4	Auswertung der SDS-PAGE.....	75
3.6	Zellversuche	78
3.6.1	Allgemeines zur Zellkultur	78
3.6.2	Durchflusszytometrie	78
3.6.2.1	Vorbereitung der Zellen	79
3.6.2.2	Praktische Durchführung der Durchflusszytometrie.....	80
3.6.2.3	Untersuchung der zellulären Assoziation von Liposomen	81
3.6.2.4	Immunhistochemische Untersuchung der GD ₂ -Expression.....	82
3.6.3	Zellvitalitätsuntersuchungen.....	83
3.6.3.1	CellTiter-Glo® (CTG) Assay	84
3.6.3.2	Resazurin-Reduktions-Assay	85
3.6.4	Konfokale Aufnahmen	86

4	Ergebnisse und Diskussion	87
4.1	<i>Upscaling</i> der Liposomenherstellung	87
4.1.1	Herstellung mittels Druckextrusion.....	87
4.1.1.1	Überarbeitung der Lipidkomposition.....	90
4.1.1.2	Einfluss der Lyophilisation auf die Charakteristik der Präparationen	92
4.1.1.3	Einfluss der Lipidkomposition auf die Ni(OAc) ₂ -Einschlusseffizienz.....	96
4.1.1.4	Einfluss der Lipidkomposition auf die verkapselte Menge Ni und As	98
4.1.1.5	Untersuchung der Vesikelmorphologie nach As-Beladung	100
4.1.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Druckextrusion	101
4.1.2	Liposomenherstellung mittels Mikrofluidisierung	102
4.1.2.1	Einflussfaktoren auf die Liposomengröße.....	103
4.1.2.2	Mikrofluidisierung der Liposomen bei reduziertem Druck.....	106
4.2	Lagerstabilitätsuntersuchungen von Ni(OAc) ₂ -Liposomen	109
4.2.1	Lagerung im Kühlschrank.....	109
4.2.2	Einfrieruntersuchungen	111
4.2.2.1	Untersuchung des Einflusses der Einfrier- und Auftautemperatur.....	112
4.2.2.2	Einfluss von Kryoprotektoren auf die Einfrierstabilität.....	116
4.2.3	Herstellung steriler Liposomen.....	119
4.2.3.1	Untersuchung der Dampfsterilisation von Liposomen	119
4.2.3.2	Entkeimungsfiltration der liposomalen Präparation.....	121
4.3	<i>In-vitro</i> -Zellvitalitätsuntersuchungen.....	124
4.3.1	Bestimmung der EC ₅₀ von liposomalem ATO.....	127
4.4	<i>In-vitro</i> -Untersuchung der anti-GD ₂ -Oberflächenmodifikation.....	128
4.4.1	Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die zelluläre Assoziation	129
4.4.2	Vergleich der Insertionstechniken SPIT und PIT	130
4.4.3	Untersuchung der zellulären Assoziation unterschiedlicher anti-GD ₂ -Varianten .	132
4.5	Untersuchung der GD ₂ -Expression auf Neuroblastomzellen	134
4.6	Optimierung der PIT-Oberflächenmodifikation	137

4.6.1	Durchflusszytometrische Untersuchung.....	137
4.6.1.1	Variation der Insertionstemperatur	137
4.6.1.2	Variation der eingesetzten Ankermenge	139
4.6.2	Quantifizierung der Oberflächenmodifikation mittels SDS-PAGE.....	141
4.6.2.1	Bestimmung des Protein/Phospholipid-Verhältnisses	141
4.6.2.2	Bestimmung der Effizienz der Oberflächenmodifikation	143
4.7	Untersuchung der zellulären Aufnahme	144
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	147
6	Literaturverzeichnis	153
7	Wissenschaftlicher Werdegang.....	177

Abkürzungen und Symbole

A	Absorption
a.u.	<i>Arbitrary units</i> (willkürliche Einheit)
A·s	Absorption·Sekunde
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Ak	Monoklonaler Antikörper
An	Membrananker
APL	Akute Promyelozytenleukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Arsen
atm	Atmosphärendruck
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i> (Peakfläche A·s)
BOC	<i>Baseline offset correction</i> (Basislinienkorrektur)
c	Molare Stoffmengenkonzentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
ch	Chimär
ch Δ C _{H2}	Chimärer Antikörper mit deletiertem C _{H2} -Teil der F _c -Region
Chol	Cholesterol
CTG	CellTiter-Glo [®] (Zellvitalitätsassay)
d	Durchmesser (auch Ø)
DAC	<i>Dual asymmetric centrifugation</i> (Duale Asymmetrische Zentrifugation)
d _h	Intensitätsgewichteter hydrodynamischer Durchmesser (nm)
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
DSPE	Distearoylphosphatidylethanolamin
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i> (mittlere effektive Konzentration)

EDL	<i>Electrodeless discharge lamp</i> (elektrodenlose Entladungslampe)
EE	Einschlusseffizienz (%)
EE _{max}	Maximale, theoretische Einschlusseffizienz (%)
ESM	Ei-Sphingomyelin
F _{ab}	<i>Fragment antigen-binding</i> (Antigen-bindender Teil des Antikörpers)
F _c	<i>Fragment crystallizable region</i> (konstanter Teil des Antikörpers)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FI	Fluoreszenzintensität (a.u.)
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
x-g	x-fache Erdbeschleunigung
GD ₂	Disialogangliosid-2-Antigen
GF-AAS	<i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
h	Höhe/Länge
HBG	Isotoner HEPES-Glycerol-Puffer
HBS	<i>Hepes buffered saline</i> (isotoner HEPES-NaCl-Puffer)
HCL	<i>Hollow-cathode lamp</i> (Hohlkathodenlampe)
His	Histidin
hPa	Hektopascal
HSPC	Hydriertes Soja-Phosphatidylcholin
hu	Human
ID	Innendurchmesser (cm)
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
L	Liter
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i> (große unilamellare Vesikel)
λ	Wellenlänge (nm)
MCE	<i>Mixed cellulose esters</i> (Zellulosemischester)

MFI	Mediane Fluoreszenzintensität (a.u.)
MLV	<i>Multilamellar large vesicles</i> (große multilamellare Vesikel)
mM	Millimolar ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
mmol	Millimol
MVV	<i>Multivesicular vesicles</i> (multivesikuläre Vesikel)
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μS	Mikrosiemens (Maßeinheit für den elektrischen Leitwert)
n	Molare Stoffmenge (mol) / Anzahl unabhängiger Versuchswiederholungen
N	Normalität (Äquivalentenkonzentration)
N.A.	<i>Not available</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni	Nickel
$\text{Ni}(\text{OAc})_2$	Nickelacetat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OLV	<i>Oligolamellar large vesicles</i> (große oligolamellare Vesikel)
p.a.	<i>Pro analysi</i> (analysenrein)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (isotoner Phosphat-NaCl-Puffer)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
Pd	Palladium
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerol
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PIT	<i>Post-insertion technique</i>

PL	Phospholipid
ppb	<i>Parts per billion</i> (10^{-9})
ppm	<i>Parts per million</i> (10^{-6})
psi	<i>Pound-force per square inch</i> (1 psi \approx 68,9 hPa)
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon®)
puriss.	Purissimum (reinst)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RES	Retikuloendotheliales System
Rh	Rhodamin
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur (20-25 °C)
ρ	Dichte ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
SD	<i>Standard diviation</i> (Standardabweichung)
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SM	Sphingomyelin
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SPIT	<i>Sterol-based post-insertion technique</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i> (kleine unilamellare Vesikel)
T	Temperatur (°C)
T_c	Phasenübergangstemperatur (°C)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THGA	<i>Transversaly heated graphite atomizer</i> (transversal beheiztes Graphitrohr)
VLE	<i>Very low endotoxin</i>
w/o	<i>Without</i> (ohne)
w/w	<i>With</i> (mit)
WS	Wirkstoff

1 Einleitung

1.1 Liposomen

Die Anfänge der Liposomenforschung gehen in die 1960er Jahre zurück, als Bangham et al. erstmals die Bildung geschlossener Phospholipidvesikel beschrieben haben (Bangham & Horne 1964, Bangham et al. 1965). Zunächst wurden diese Assoziationskolloide als „*multilamellar smectic mesophases*“ oder „*banghasomes*“ bezeichnet (Deamer 2010). Die heute geläufige Bezeichnung Liposomen (griechisch für *lipos*: Fett und *soma*: Körper) wurde wenig später von Weissmann eingeführt (Sessa & Weissmann 1968).

1.1.1 Definition und Einteilung

Liposomen sind sphärische, kolloidale Vesikel, bestehend aus einer oder mehreren Lipidbilayer-Membranen, die einen wässrigen Kern umschließen. Solche Strukturen bilden sich spontan durch Assoziation amphiphiler, wasserunlöslicher Lipidmoleküle nach Dispersion im wässrigen Medium aus. Dieses *self-assembly* der lyotropen Assoziationskolloide wird durch Wechselwirkungen der Amphiphile untereinander und dem Dispersionsmittel vorangetrieben. Es kommt dabei zu hydrophoben Interaktionen zwischen den lipophilen Bereichen der Amphiphile, wodurch diese sich gegenüberliegend anordnen. Diese Formation ermöglicht die Interaktion der hydrophilen Molekülteile mit der wässrigen Phase (Israelachvili et al. 1977). Die Größenordnung solcher Assoziationskolloide kann zwischen 20 nm und wenigen μm variieren. Ihre morphologische Einteilung erfolgt nach Größe und Lamellenzahl (Tabelle 1-1).

Aufgrund der Ähnlichkeit zu biologischen Membranen wurde das Potential von Liposomen für den Einsatz als Modellmembranen schon früh erkannt (Papahadjopoulos & Watkins 1967, Bangham et al. 1965). Die Eignung der Lipidvesikel als therapeutisches System (*drug delivery system*) wurde hingegen erst ab den 1970er-Jahren erforscht (siehe Kapitel 1.2).

Tabelle 1-1: Morphologische Einteilung der Liposomen nach Schubert (2010)

Bezeichnung	Charakteristik
<i>small unilamellar vesicles</i> (SUV)	Durchmesser \approx 20-50 nm, bestehend aus einem Membranbilayer
<i>large unilamellar vesicles</i> (LUV)	Durchmesser $>$ 50 nm, bestehend aus einem Membranbilayer
<i>oligolamellar large vesicles</i> (OLV)	0,1-1 μm , bestehend aus mehr als einem Membranbilayer

Bezeichnung	Charakteristik
<i>multilamellar large vesicles</i> (MLV)	Durchmesser > 200 nm, bestehend aus mehreren konzentrischen Bilayern
<i>multivesicular vesicles</i> (MVV)	Durchmesser oft größer als 1 µm, multivesikulär
<i>giant unilamellar vesicles</i> (GUV)	Durchmesser > 1 µm, bestehend aus einem Membranbilayer

1.1.2 Bestandteile von liposomalen Membranen

Zu den Hauptbestandteilen eukaryontischer Zellmembranen zählen Glycerophospholipide, Sphingolipide sowie Cholesterol. Vertreter dieser Klassen werden auch zum Aufbau von Liposomen verwendet.

1.1.2.1 Glycerophospholipide

Ein Hauptbestandteil von liposomalen Membranen sind Glycerophospholipide, vereinfacht häufig auch Phospholipide (PL) genannt. Ihr Aufbau leitet sich von einem 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphat ab (Abbildung 1-1 A). Der Phosphatrest des Grundgerüsts bildet zusammen mit einem veresterten Alkohol die polare Kopfgruppe. Häufig vorkommende Alkohole sind Cholin, Serin, Ethanolamin, Glycerol oder Inositol. Die Kopfgruppen können bei physiologischem pH-Wert je nach ihrer Art geladen (negativ bzw. positiv) oder neutral (zwitterionisch) vorliegen und bestimmen dadurch maßgeblich die Polarität der Phospholipide.

Der hydrophobe Teil der PL besteht in der Regel aus einer oder zwei Fettsäureketten, die je nach Herkunft (Eigelb, Sojabohnen oder tierischen Organen) unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen. Bei PL natürlichen Ursprungs ist im Gegensatz zu synthetisch und semisynthetisch hergestellten PL die genaue Fettsäurezusammensetzung nicht definiert.

Phospholipidmembranen können in mehreren Zuständen vorliegen, wobei vor allem zwei Phasenlagen beschrieben sind (Chapman 1975). In der hochgeordneten Gelphase ($L\beta$) liegen die Fettsäureketten starr und die Kopfgruppen unbeweglich vor. In der flüssigkristallinen Phase ($L\alpha$) hingegen befinden sich die Fettsäureketten in ständiger Bewegung, wodurch die Membran flexibler und ihre Permeabilität erhöht ist. Der Übergang von der $L\beta$ - in die $L\alpha$ -Phase findet bei der sogenannten Phasenübergangstemperatur T_c statt und hängt sowohl von der Länge der Acylketten, deren Sättigungsgrad als auch von der hydrophilen Kopfgruppe ab (Marsh 2013). Membranen aus PL mit langkettigen, vorwiegend gesättigten Fettsäuren sind rigider und weisen eine höhere Membrandicke auf (Rawicz et al. 2000).

1.1.2.2 Sphingophospholipide

Sphingomyelin (SM) wird sowohl der Kategorie der Phospholipide als auch der Sphingolipide zugeordnet. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Glycerophospholipiden ist SM nicht aus einem Glycerol-, sondern einem SphingosinGrundgerüst aufgebaut, an welchem eine Fettsäurekette sowie ein Cholinrest gebunden sind (Abbildung 1-1 B). SM ähnelt damit in seinem Aufbau sowie in seiner biologischen Funktion dem Phosphatidylcholin (PC). Gemeinsam stellen beide Vertreter mehr als 50 % aller in biologischen Membranen vorkommenden PL dar (Lasic 1993b, Barenholz & Thompson 1999).

Bedingt durch seine Carbonylgruppe (Wasserstoffbrücken-Akzeptor) und seine zusätzliche Hydroxylgruppe (H-Brücken-Donor) bildet SM über den sogenannten „*hydrogen bond belt*“ stabile Bilayer aus (Tirri et al. 1978, Lasic 1993b). Diese Interaktionen führen im Vergleich zu PC zu einer deutlich höheren Phasenübergangstemperatur der Sphingomyelin-Membranen ($T_c = 39-46\text{ °C}$). Für SM/Chol-Membranen sind besonders starke Interaktionen der Bestandteile untereinander beschrieben.

Es kommt dabei zur Bildung einer stabilen H-Brückenbindung zwischen der 3-OH-Gruppe des Cholesterols und der NH-Gruppe des SphingosinGrundgerüsts sowie zu van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den gesättigten SM-Fettsäureketten und Cholesterol. Zusätzlich wirkt sich die Position der C15-Doppelbindung von SM positiv auf diese Interaktion aus, wodurch SM/Chol-Membranen eine höhere Kompressibilität und eine geringere Wasserpermeabilität aufweisen (McIntosh et al. 1992). Daher eignet sich diese Lipidmischung besonders für eine stabile liposomale Verkapselung von hydrophilen Wirkstoffen wie beispielsweise Arsentrioxid.

1.1.2.3 Cholesterol

Cholesterol ist ein wichtiger Bestandteil zur Stabilisierung von biologischen Membranen und kann hierfür bis zu einem Anteil von 50 mol % eingearbeitet werden (Abbildung 1-1 C). Zustande kommt die Membranstabilisierung durch eine Interaktion des Cholesterols mit sich bewegenden Fettsäureketten in der flüssigkristallinen $L\alpha$ -Phase. In der hochgeordneten Gelphase ($L\beta$) führt Cholesterol zu einer Abnahme der Ordnung, wodurch die Phasenübergangstemperatur sinkt und die $L\alpha$ -Phase über einen weiten Temperaturbereich besteht (Lasic 1993b).

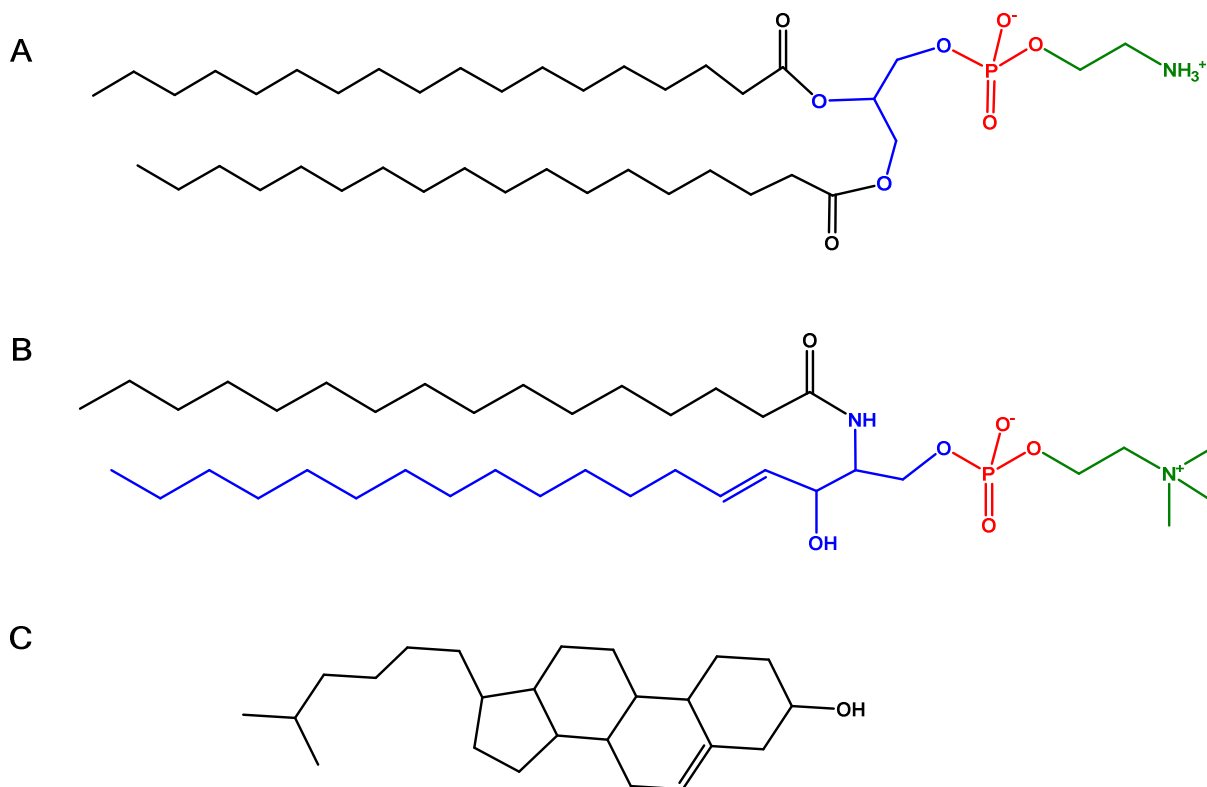


Abbildung 1-1: Strukturformeln einiger verwendeter Lipide

(A) Strukturformel des synthetischen Glycerophospholipids 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DSPE). Das Grundgerüst dieser Lipidklasse bildet das Glycerol (blau), welches mit Phosphat (rot) verestert ist und je nach PL unterschiedliche Fettsäureketten (schwarz) und hydrophile Kopfgruppen (grün) tragen kann. (B) Strukturformel eines Sphingomyelins, bestehend aus dem SphingosinGrundgerüst (blau), welches über eine Amidbindung eine Fettsäurekette (schwarz) bindet. Das in dieser Arbeit verwendete Ei-Sphingomyelin trägt vorwiegend Palmitinsäure (C16:0; 86 % aller Acylreste (<https://avantilipids.com/product/860061>)). Über die C1-Hydroxylgruppe ist eine Phosphatgruppe (rot) gebunden, über welche eine hydrophile Kopfgruppe, vor allem Cholin (grün), aber auch Ethanolamin, gebunden ist. (C) Strukturformel von Cholesterol.

1.1.3 Liposomen-Herstellung

Da sich die Art des Herstellungsverfahrens maßgeblich auf die Größe und Lamellarität der Liposomen auswirkt, wurden seit ihrer Entdeckung verschiedene Herstellungsmethoden entwickelt. Abhängig vom jeweiligen Verfahren können Liposomen mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften hergestellt werden. Die Wahl der Methode richtet sich neben der resultierenden Liposomenmorphologie auch nach der Größe der herzustellenden Charge. Die gängigsten Herstellungstechniken sind in Abbildung 1-2 zusammengefasst.

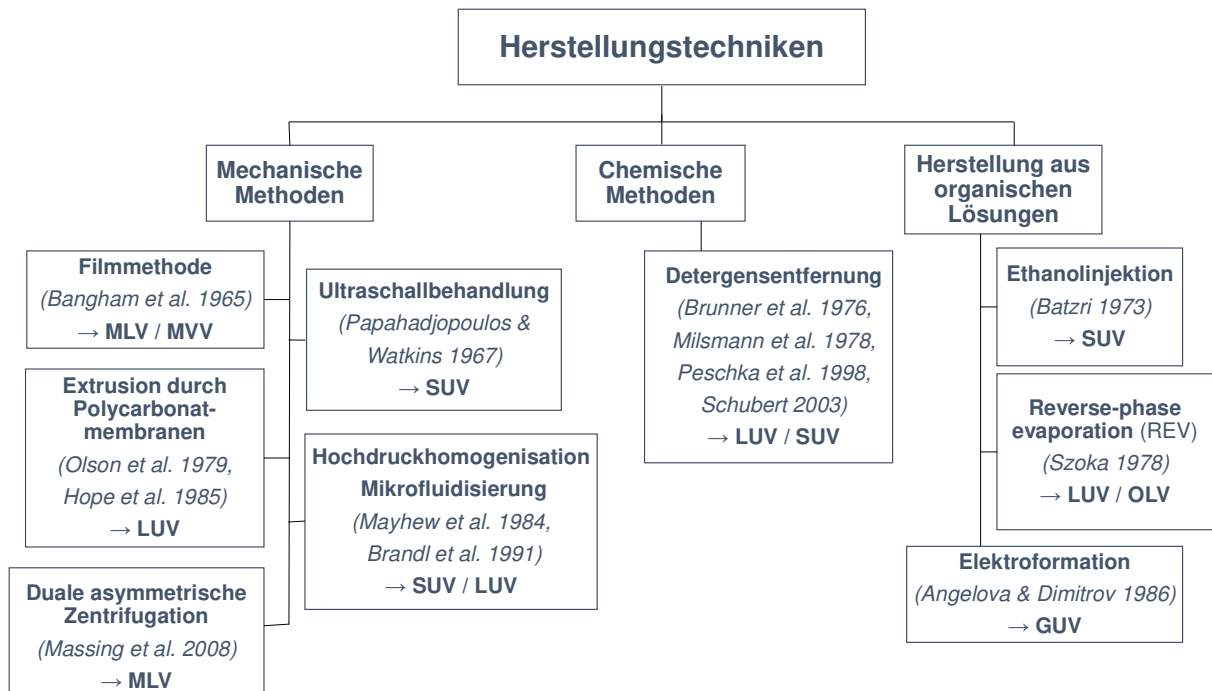


Abbildung 1-2: Übersicht über die gängigsten Liposomen-Herstellungstechniken

MLV (*multilamellar large vesicles*), MVV (*multivesicular vesicles*), OLV (*oligolamellar large vesicles*), LUV (*large unilamellar vesicles*), SUV (*small unilamellar vesicles*). Weitere Details zu den einzelnen Herstellungsverfahren können den jeweils angegebenen Literaturstellen entnommen werden. Einteilung nach Lasic (1993b).

Viele der mechanischen Methoden gehen auf die von Bangham beschriebene Filmmethode zurück (Bangham et al. 1965). Die nach Hydratation eines dünnen Lipidfilms entstehende MLV- oder MVV-Dispersion wird in einem weiteren Herstellungsschritt durch Einbringen von Energie auf die gewünschte Vesikelgröße gebracht.

Bei der Präparation durch Detergentsentfernung oder aus organischen Lösungen kann auf die vorherige Bildung eines Lipidfilms verzichtet werden. Die einzelnen Verfahren sind in den in Abbildung 1-2 angegebenen Literaturstellen detailliert beschrieben.

In dieser Arbeit erfolgte die Liposomenherstellung ausgehend von der Filmmethode durch Extrusion oder Mikrofluidisierung. Genauere Erklärungen der Prozesse sowie Angaben zur praktischen Durchführung sind in Kapitel 3.1.3.1 und 3.1.3.2 aufgeführt.

1.2 Liposomen als Drug Delivery Systeme

Die Anfänge der pharmazeutischen Anwendung von Liposomen als Wirkstoffträger gehen auf Gregory Gregoriadis zurück (Gregoriadis et al. 1971, Gregoriadis & Ryman 1972a, Gregoriadis & Ryman 1972b). Aufgrund ihres Aufbaus eignen sich Liposomen zum Einschluss hydrophiler Wirkstoffe in ihrem wässrigen Innenraum sowie gleichermaßen zur Inkorporation lipophiler Wirkstoffe in den Lipidbilayer (siehe Abbildung 1-3). Diese Variabilität in Kombination mit ihrem Aufbau aus natürlichen, biokompatiblen, bioabbaubaren sowie nicht toxischen Bestandteilen (vgl. Kapitel 1.1.2) machen Liposomen zu einem potenten therapeutischen System (*Drug Delivery System*).

Die Verabreichung von Wirkstoffen als liposomale Formulierung verändert maßgeblich deren Pharmakokinetik im Körper. Die Anwendung von liposomalen Trägersystemen richtet sich daher oft an schwer lösliche, stark toxische oder instabile Wirkstoffe. Liposomen können als zirkulierendes Wirkstoffdepot angesehen werden, da sie den Wirkstoff retiniert abgeben. Dadurch kann einer schnellen renalen Elimination vorgebeugt sowie ein vorzeitiger Abbau und ein einhergehender Wirkverlust der Arzneistoffe verhindert werden (Allen & Cullis 2004, Bozzuto & Molinari 2015). Zudem besitzen liposomal verabreichte Wirkstoffe, im Vergleich zu freien, ein geringeres Verteilungsvolumen, wodurch zur Therapie geringere Dosen der applizierten Wirkstoffe nötig werden (Juliano & Stamp 1978, Rahman et al. 1986, Gabizon et al. 1989). Durch ein gezieltes Ansteuern bestimmter Gewebe über passives oder aktives Targeting (vgl. Kapitel 1.2.2.1 und 1.2.2.2) kann die Therapiespezifität erhöht werden. Dies führt zu einer verbesserten Wirksamkeit bei gleichzeitig reduzierter applizierter Dosis und damit auch zur Reduktion schwerer systemischer Nebenwirkungen (Pattni et al. 2015).

Aufgrund dieser Eigenschaften sind Liposomen vor allem für den Einsatz von Zytostatika interessant. Da es sich bei Krebszellen um entartete, körpereigene Zellen handelt, fehlt es in der Tumorthherapie häufig an spezifischen Angriffspunkten für die Wirkstoffe. Bei der Therapie kommt es dadurch zu einer starken Beeinträchtigung von gesundem Gewebe, wovon besonders Schleimhäute und hämatopoetische Stammzellen betroffen sind. Aufgrund der oft sehr starken systemischen Nebenwirkungen müssen die verabreichten Wirkstoffdosen gesenkt werden, wodurch die Gefahr von geringeren Ansprechraten, Rezidiven, einer Metastasierung oder einer Entwicklung von Resistenzen steigt (Mayer et al. 1998, Sapro & Allen 2003). Vor diesem Hintergrund wird die Entwicklung liposomaler Wirkstoffträger für Chemotherapeutika intensiv vorangetrieben.

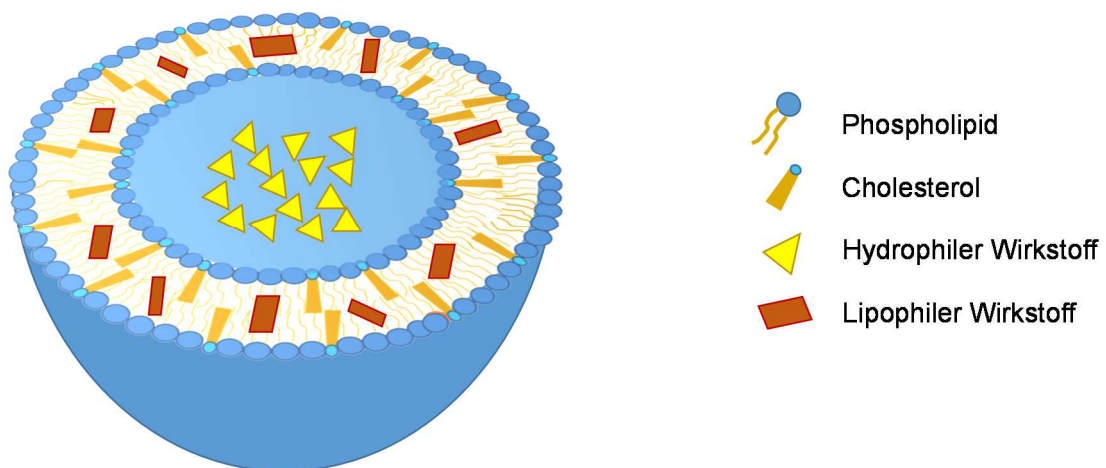


Abbildung 1-3: Liposomen als Wirkstoffvehikel (schematische Darstellung im Querschnitt)

1.2.1 Beladungsmechanismen

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung von Liposomen als Wirkstoffträger ist ihre Beladung. Um eine therapeutische Wirkung am Zielgewebe zu gewährleisten, ist es essentiell, den Wirkstoff stabil und in ausreichend hoher liposomaler Konzentration zu assoziieren. Des Weiteren ist eine effiziente liposomale Wirkstofffreisetzung in oder an der Zielzelle entscheidend.

Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, um für Wirkstoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften eine optimale Beladungseffizienz der Liposomen zu erzielen. Lipophile Arzneistoffe, wie beispielsweise Amphotericin B, werden zusammen mit den Membranlipiden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und über die Filmmethode in den Lipidfilm eingearbeitet. Während der nachfolgenden Hydratisierung des Lipidfilms reichert sich der Wirkstoff im liposomalen Bilayer an. Das Ausmaß der Wirkstoffbeladung sowie die Stabilität der Beladung werden über die Interaktion von Lipid und Wirkstoff bestimmt. Bei einer guten Löslichkeit des Wirkstoffs in der Membran kann die Effizienz der Beladung bis zu 100 % betragen (Chonn & Cullis 1995). Aufgrund der höheren Beladungskapazität für lipophile Wirkstoffe ist die Herstellung von MLVs vorteilhaft. Allerdings müssen zur Vermeidung einer Verstopfungsgefahr von kleinen Endkapillaren auch diese Systeme häufig durch Extrusion oder andere Methoden (vgl. Kapitel 1.1.3) homogenisiert werden, was wiederum zu Lipid- und Wirkstoffverlusten führen kann (Lasic 1993a, Perez-Soler & Zou 1998).

Bei der Beladung von niedermolekularen hydrophilen Arzneistoffen werden zwei Mechanismen unterschieden, das *passive loading* und das *active* oder *remote loading*. Für diese Wirkstoffe wird die Verwendung von LUVs bevorzugt, da sie sich durch eine hohe physikalische Stabilität und ein großes wässriges Innenvolumen auszeichnen. Die Verwendung von LUVs führt damit zu einem günstigen „Cargo-zu-Vehikel-Verhältnis“ (Schubert 2010).

Das *passive loading* basiert auf einem Konzentrationsausgleich des Wirkstoffs zwischen extraliposomalem Dispersionsmittel und dem hydrophilen Innenraum der Liposomen. Die Methode umfasst alle Herstellungstechniken, bei denen Lipid und Wirkstoff zusammen in wässrigem Puffer dispergiert vorliegen. Oft wird der Wirkstoff hierfür in dem für die Hydratisierung verwendeten wässrigen Medium gelöst. Die Beladung erfolgt damit synchron mit der Bildung der Liposomen (Cullis et al. 1989). Die erzielte Einschlusseffizienz ist hauptsächlich von der Vesikelgröße, der Lamellarität und der eingesetzten Lipidkonzentration abhängig und mit Werten von weniger als 30 %, häufig sogar weniger als 10 %, als niedrig einzuordnen.

Die EE von Liposomendispersionen kann über Frier-Tau-Zyklen erhöht werden. Das abwechselnde Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen führt zu Membrandestabilisierungen und einer lokalen Wirkstoffaufkonzentrierung, die eine vermehrte intraliposomale Wirkstoffaufnahme ermöglichen (Pick 1981, Mayer et al. 1985).

Ein Verfahren zur Erhöhung der Einschlusseffizienz (EE) auf bis zu 50 % ist der Einsatz hochkonzentrierter vesikulärer Phospholipidgele, die über *dual asymmetric centrifugation* (DAC) oder Hochdruckhomogenisation hergestellt werden können (Brandl et al. 1998, Brandl & Massing 2007, Massing et al. 2008). Durch den hohen Lipidgehalt der Präparation sind das intra- und extraliposomale Volumen nahezu gleich und ermöglichen das Erzielen hoher EE.

Die Bildung von *dehydration-rehydration-vesicles* (DRV) stellt eine noch effektivere Methode zu Erhöhung der EE auf über 50 % dar. Bei diesem Verfahren werden die passiv beladenen Liposomen zunächst gefriergetrocknet (*dehydration*) und im Anschluss durch Zugabe von wässriger Phase wieder hydratisiert (*rehydration*) (vgl. Kapitel 3.3.1.1). Wird zum Rehydratisieren ein kleineres als das ursprünglich eingesetzte Volumen gewählt, kommt es neben Membrandefekten zu einer Aufkonzentrierung von Wirkstoff und Lipid, wodurch vermehrt Wirkstoff liposomal eingeschlossen werden kann (Kirby & Gregoriadis 1984).

Eine weitere Verbesserung der EE wurde nach Durchführung einer 2-Schritt-Rehydratisierung beschrieben. Problematisch ist die durch *dehydration/rehydration* bedingte vermehrte Bildung von großen oligo- und multilamellaren Vesikeln, die häufig einen nachfolgenden Homogenisationsschritt erfordert und die Gefahr von vorzeitigen Wirkstoffverlusten erhöht (Lasic 1993a).

Ein anderer Ansatz zur Wirkstoffbeladung mit hohen EE ist die *reverse-phase evaporation* (REV). Bei dieser Methode wird der organischen Lösung von Membranlipiden die wirkstoffhaltige wässrige Phase zugesetzt, wodurch sich Emulsionströpfchen bilden. Das Abdampfen des organischen Lösungsmittels führt zu einer Phaseninversion und der Bildung von Liposomen mit EE über 50 % (Szoka & Papahadjopoulos 1978).

Auch die Durchführung der *detergent-induced liposome loading* (DILL)-Methode führt zu EE > 50 %, ohne die Notwendigkeit eines zusätzlichen Homogenisationsschritts. Bei dieser Beladungstechnik wird einer konzentrierten Dispersion von Liposomen so viel Tensid zugesetzt, dass sich kurzzeitig Membranporen bilden, durch die ein Konzentrationsausgleich zwischen von außen zugesetztem Wirkstoff und dem Liposomeninneren erfolgt (Schubert et al. 1991).

Beim *remote loading* wird die Beladung im Gegensatz zum *passive loading* aktiv vorangetrieben, wodurch EE von > 95 % erzielt werden können. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Beladung von Liposomen mit schwach basischen Wirkstoffen, z.B. Doxorubicin (DXR) (Mayer et al. 1986), oder schwach sauren Substanzen, z. B. Nalidixinsäure (Clerc & Barenholz 1995) über pH-Gradienten. Der pH der äußeren Phase wird so angepasst, dass die Wirkstoffe ungeladen vorliegen (Säuren protoniert, Basen deprotoniert) und so ungehindert über die liposomale Membran diffundieren können. Im hydrophilen Innenraum der Liposomen wird der pH so gewählt, dass die Wirkstoffe in geladener Form vorliegen (Säuren deprotoniert, Basen protoniert). Diese Ionenfalle ermöglicht eine hocheffiziente intraliposomale Wirkstoffretention (Madden et al. 1990, Fenske & Cullis 2007). Ein weiteres Beispiel für ein *remote loading* Verfahren ist die Beladung der liposomalen Handelspräparate Doxil® und Caelyx® mit DXR. Der dabei eingesetzte Ammoniumsulfatgradient ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) führt zu einer intraliposomalen Präzipitation des DXR, wodurch eine hohe und stabile liposomale DXR-Verkapselung (EE > 95 %) erzielt werden kann (Barenholz 2012).

Auch die Beladung über Metallionengradienten wird zu den *remote loading* Strategien gezählt (Abraham et al. 2002, Ramsay et al. 2006). Ein Beispiel hierfür ist die in Kapitel 1.5 und 3.3 beschriebene Beladung von Arsentrioxid (ATO) durch intraliposomale Präzipitation mit vorverkapseltem Nickelacetat ($\text{Ni}(\text{OAc})_2$). Der liposomale ATO-Einstrom wird bei dieser Methode über die Bildung des schwer löslichen NiAs-Präzipitats und die parallel ablaufende liposomale Essigsäurefreisetzung vorangetrieben (Chen et al. 2006).

1.2.2 Biopharmazeutische Aspekte von Liposomen

Hilfsstoffe zur Herstellung von Liposomen zur parenteralen Anwendung sollten biokompatibel sowie zur Gewährleistung einer vollständigen Elimination, bioabbaubar sein. Außerdem gelten für Liposomen mit Ziel einer parenteralen Applikation die allgemeinen Anforderungen des Arzneibuchs für Parenteralia (Ph. Eur. 2014).

Bei einer extravasalen Applikation von ausreichend kleinen Liposomen (≈ 40 nm) in das Gewebe (i.m., s.c., i.p.), kommt es zu einer Vesikelverteilung im lymphatischen System. Die genannten Applikationswege können zu diagnostischen Zwecken angewandt werden, ermöglichen aber auch die liposomale Therapie von bakteriellen oder viralen Infektionen des lymphatischen Systems sowie die Diagnostik und Behandlung von Metastasen (Hirnlé & Schubert 1991, Oussoren et al. 1997, Zhang & Lu 2014).

Nach intravenöser (i.v.) Applikation kommt es zu einer Verteilung der Liposomen mit dem Blutstrom, wodurch bei ausreichend stabiler Wirkstoffverkapselung eine systemische Wirkung erzielt werden kann. Bei diesem Applikationsweg besteht allerdings die Gefahr unerwünschter Interaktionen zwischen Liposomen und Blutbestandteilen. Bei reinen Phospholipidliposomen zeigte sich eine Destabilisierung der Membran durch einen Lipidaustausch mit Lipoproteinen, vor allem dem *high-density* Lipoprotein (HDL) (Scherphof et al. 1978).

Durch die Verwendung von Phospholipiden mit langkettigen, gesättigten Fettsäuren wie DSPC oder Sphingomyelin, welche rigide Membranen ausbilden und eine hohe Phasenübergangstemperatur besitzen, sowie durch den Zusatz von Cholesterol (30-50 mol %) konnte die Stabilität der Liposomen *in vivo* deutlich verbessert werden (Senior & Gregoriadis 1982, Lasic et al. 1991).

1.2.2.1 Passives Targeting

In den meisten Geweben sind die Blutkapillaren mit einem kontinuierlichen Endothel ausgekleidet, in dem die Zellen vorwiegend über *tight* und *adherent junctions* miteinander verbunden sind (Bazzoni & Dejana 2004). Das kontinuierliche Endothel stellt für Liposomen nach i.v. Verabreichung aufgrund ihrer Größe eine effektive Permeationsbarriere dar. Sie können dadurch im Vergleich zu niedermolekularen Wirkstoffen mit einem Molekulargewicht $< 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ nicht in das umliegende Gewebe übergehen (Abbildung 1-4 A).

Im retikuloendothelialen System (RES), auch mononukleäres Phagozytensystem (MPS) genannt, das vor allem in Leber, Milz und Knochenmark vorkommt, haben die Kapillaren hingegen ein diskontinuierliches (sinusoides) Endothel. Die zur Immunabwehr vorhandenen Endothellücken können dabei, wie in der Leber, innerhalb der Endothelzellen ($\varnothing \approx 150$ nm) oder, wie in Milz und Knochenmark, zwischen den Zellen liegen (Abbildung 1-4 B). Bedingt durch diesen speziellen Aufbau können Liposomen hier die Blutbahn verlassen und so in das umliegende Gewebe gelangen.

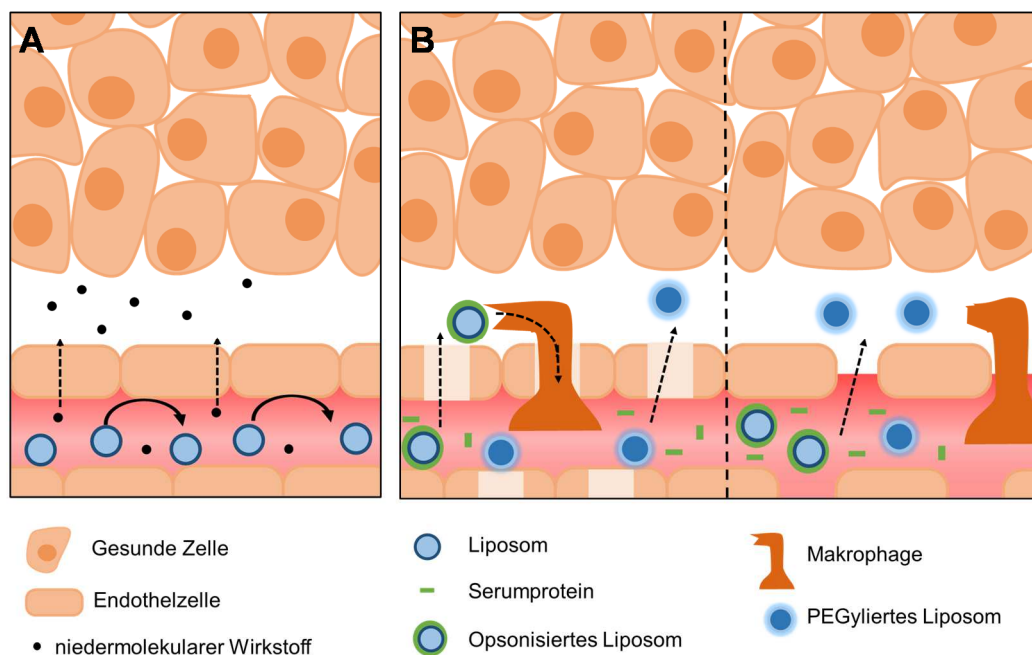


Abbildung 1-4: Verteilung der Liposomen nach i.v. Administration

(A) Das Endothel der meisten Kapillarwände hat einen dichten, kontinuierlichen Aufbau, wodurch die Passage von Liposomen in das Gewebe verhindert wird. Kleinere, niedermolekulare Stoffe können hingegen die Blutkapillaren verlassen. **(B)** Darstellung des retikuloendothelialen Systems (RES), auch mononukleäres Phagozytensystem genannt (MPS). Hier ist das Endothel diskontinuierlich (sinusoid), wodurch der Austritt der Liposomen in das Gewebe ermöglicht wird. **(B links)** Öffnungen in den Endothelzellen der Kapillaren der Leber ($\varnothing \approx 150$ nm). **(B rechts)** Öffnungen zwischen den Endothelzellen der Kapillaren, von z. B. Milz und Knochenmark. Durch die Anlagerung von Serumproteinen an konventionelle Liposomen (Oponisierung) werden diese von Makrophagen als fremd erkannt und phagozytiert. An PEGylierte Liposomen ist diese Proteinadsorption nur gering, wodurch sie vor der Elimination durch Phagozytose geschützt sind. (nach Bauer et al. (2012))

Besonders effektiv erfolgt die Aufnahme von konventionellen Liposomen in das RES. Nach Applikation werden diese als Fremdkörper erkannt, durch Opsonisierung mit Serumproteinen markiert (Bonté & Juliano 1986) und anschließend von Gewebsmakrophagen (z. B. Kupfferzellen in der Leber) oder von im Blut zirkulierenden Monozyten phagozytiert. Die Bildung dieser Proteinkorona um die Liposomen ist ein hochdynamischer Prozess aus Adsorptions- und Desorptionsvorgängen (Vroman 1962). Das Ausmaß der Interaktion hängt von der Größe, der Oberflächenladung, dem enthaltenen Cholesterolanteil und der Rigidität der Liposomen ab. Die Blutzirkulationshalbwertszeit der Liposomen kann abhängig davon zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden liegen (Juliano & Stamp 1975, Gregoriadis & Senior 1980, Patel et al. 1983, Moghimi & Patel 1989, Lasic 1993a).

Durch die Modifizierung der Oberfläche mit dem hydrophilen Glykolipid Monosialogangliosid 1 (GM1) konnte die Blutzirkulationshalbwertszeit von Liposomen erhöht werden (Allen & Chonn 1987, Gabizon & Papahadjopoulos 1988). Da dieser positive Effekt nur im Mausmodell gezeigt werden konnte (Yamauchi et al. 1995), wurden andere hydrophile Polymere, wie z. B. Polyethylenglykol (PEG), zur Verlängerung der Zirkulationszeit eingesetzt (Blume & Cevc 1990, Klibanov et al. 1990, Senior et al. 1991). Aufgrund einer verminderten Opsonisierung konnte die Zirkulationshalbwertszeit der Liposomen, abhängig vom Molekulargewicht des PEG, auf über 20 h erhöht werden (Allen et al. 1991, Maruyama et al. 1992) (siehe Abbildung 1-4 B). Der Schutz von Liposomen gegenüber einer vorzeitigen Eliminierung aus der Blutzirkulation durch sterische Stabilisierung der Vesikel ist auch unter dem Begriff *Stealth*-Effekt bekannt. Weitere Polymere, die für die Modifizierung der Liposomenoberfläche Anwendung finden, sind unter anderem: Polyoxazoline (Zalipsky et al. 1996), Polyaminosäuren (Romberg et al. 2007) und Polyglycerole (Maruyama et al. 1994).

Neben dem bereits beschriebenen RES weisen auch die Blutkapillaren von Tumoren ein diskontinuierliches Endothel auf (Abbildung 1-5). Um die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung schnell wachsender Tumoren aufrechtzuerhalten, kommt es bereits ab einer Tumorgöße von $\approx 2 \text{ mm}^3$, bedingt durch eine Überexpression von Angiogenese stimulierenden Faktoren (Bradykinin, Stickstoffmonoxid, Prostaglandine und *vascular endothelial growth factor* (VEGF), zu einer starken Neovaskularisierung. Die fehlerhafte Hypervaskularisierung führt zur Bildung eines lückenhaften Endothels ($\varnothing \approx 400\text{-}600 \text{ nm}$) mit erhöhter Permeabilität (Yuan et al. 1995, Siemann 2011, Maeda 2012).

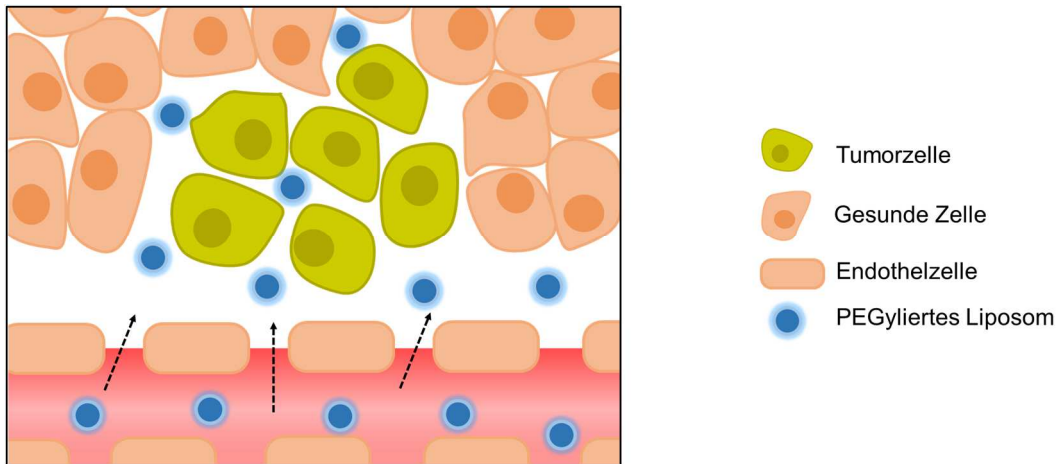


Abbildung 1-5: Darstellung des passiven Targetings von Tumoren

Auch Blutkapillaren von Tumorgeweben weisen aufgrund einer Hypervaskularisierung ein diskontinuierliches Endothel ($\varnothing = 400\text{-}600\text{ nm}$) auf und ermöglichen somit den Übergang der Liposomen in das Gewebe. Dies wird zusätzlich durch den großen Extravasalraum begünstigt. Aufgrund des dort verminderten Lymphabflusses kommt es auch zu einer erhöhten Akkumulation der Liposomen (*enhanced permeability and retention*; EPR-Effekt). (nach Bauer et al. (2012))

Der in Tumoren vergrößerte Extravasalraum, ein erhöhter interstitielle Druck sowie ein verminderter Lymphabfluss resultieren im sogenannten *enhanced permeability and retention effect* (EPR) von makromolekularen Wirkstoffen sowie von nanopartikulären Systemen z. B. Liposomen. Bedingt durch den EPR-Effekt kommt es zu einem verstärkten Übertritt der Liposomen in das Tumorgewebe und zu einer vermehrten Akkumulation sowie Retention der Vesikel (Matsumura & Maeda 1986, Jain 1987, Maeda 2001, Fang et al. 2011).

Ein besonders effektives passives Targeting findet sich bei PEGylierten Liposomen, die aufgrund der stark verminderten Opsonisierung die Aufnahme in das RES umgehen und somit den Tumor effizienter erreichen können. So konnte für PEGylierte, Zytostatika-beladene Liposomen eine im Vergleich zum freien Wirkstoff bessere Wirkung bei gleichzeitig verminderten systemischen Nebenwirkungen gezeigt werden (Gabizon 1992, Huang et al. 1992, Vaage et al. 1993). Das passive Targeting von Tumoren ist ein spontan stattfindender Prozess, der nicht aktiv gesteuert werden kann und lediglich durch die Größe der verwendeten Liposomen beeinflusst wird. Eine effektive Extravasation wurde vor allem bei Liposomen $< 200\text{ nm}$ beschrieben (Sawant & Torchilin 2012). Es ist allerdings zu beachten, dass der EPR-Effekt nicht in allen Tumoren gleich stark ausgeprägt ist. So zeigen beispielsweise Pankreas- und Prostatakarzinome eine geringere Vaskularisierung und nur kleine Endothellücken, wodurch es zu einer verminderten Therapieeffizienz beim passiven Targeting kommen kann (Maeda 2012).

1.2.2.2 Aktives Targeting

Um die Spezifität der Tumorthherapie weiter zu erhöhen, wurde neben dem in Abschnitt 1.2.2.1 beschriebenen passiven auch das aktive Targeting von Tumoren durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die liposomale Oberfläche mit Liganden (sogenannten *homing devices*) funktionalisiert, die mit spezifischen Strukturen auf der Tumoroberfläche interagieren, wodurch die modifizierten Liposomen gezielt an Tumorzellen binden können (Abbildung 1-6).

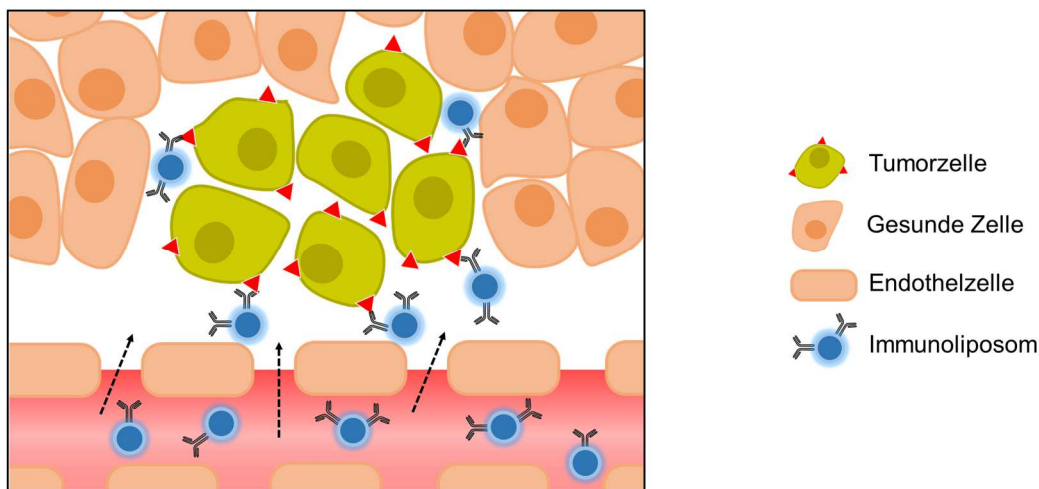


Abbildung 1-6: Darstellung des aktiven Targetings von Tumoren

Spezifische Bindung von Immunliposomen an von Tumoren exprimierten Oberflächenantigenen. (nach Bauer et al. (2012))

Die Auswahl der verwendeten Liganden richtet sich vor allem nach den auf Tumoren exprimierten Oberflächenstrukturen. Um eine spezifische Bindung zu gewährleisten und die Toxizität auf andere Gewebe zu minimieren, sollten diese Target-Struktur selektiv auf der Tumoroberfläche zu finden sein bzw. dort zumindest signifikant überexprimiert werden. Des Weiteren sollten sie in hoher Dichte und homogen auf den Zielzellen verteilt vorliegen, um eine vollständige Tumorremission zu ermöglichen und die Bildung von Resistenzen zu vermeiden. Das Epitop sollte außerdem in jedem Tumorstadium exprimiert sowie nicht in die Blutbahn abgestoßen werden (*shedding*) (Allen 2002, Höchst & Diehl 2012). Abgestoßene Antigene können die funktionalisierten Liposomen bereits in der Blutbahn abfangen, wodurch sie der Krebstherapie entzogen werden. Des Weiteren ist eine durch *shedding* verursachte Bildung von Vesikelaggregaten, die zu Gefäßverschlüssen führen können, beschrieben (Sapra & Allen 2003).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Auswahl einer geeigneten Target-Struktur ist die Option einer rezeptorvermittelten Endozytose (Abbildung 1-7; 4.). Bei hydrophilen Wirkstoffen, die keinen Abbau im Lysosom erfahren, z. B. Arsentrioxid oder Doxorubicin, ist eine rezeptorvermittelte Endozytose nach Bindung an die Zielzelle anzustreben. Die Aufnahme der Liposomen führt nach intrazellulärer Freisetzung des Wirkstoffes zu einer hohen Wirkstoffkonzentration in der Zelle und damit zu einer verbesserten Therapieeffizienz (Park et al. 2002, Kirpotin et al. 2006). Häufig hängt ein im Vergleich zum passiven Targeting erhöhter therapeutischer Effekt von der Internalisierung der Immunliposomen ab (Sapra & Allen 2002).

Bei säurelabilen, membrangängigen Wirkstoffen wie z. B. Cytarabin ist das Umgehen des lysosomalen Abbaus und damit eine extrazelluläre Wirkstofffreisetzung (Abbildung 1-7; 1.) von Vorteil (Huang et al. 1983). Bei dieser Form der Wirkstofffreisetzung kommt zusätzlich der sogenannten *Bystander*-Effekt zum Tragen, über den benachbarte Krebszellen, welche die angesteuerten Zielantigene nicht tragen, mitbehandelt werden können (Pastorino et al. 2013). Auch bei lipophilen, in die liposomale Membran eingelagerten Wirkstoffen ist eine Internalisierung aufgrund des schnellen WS-Transfers zwischen Liposom und Tumorzellmembran nicht unbedingt notwendig (Abbildung 1-7; 2.).

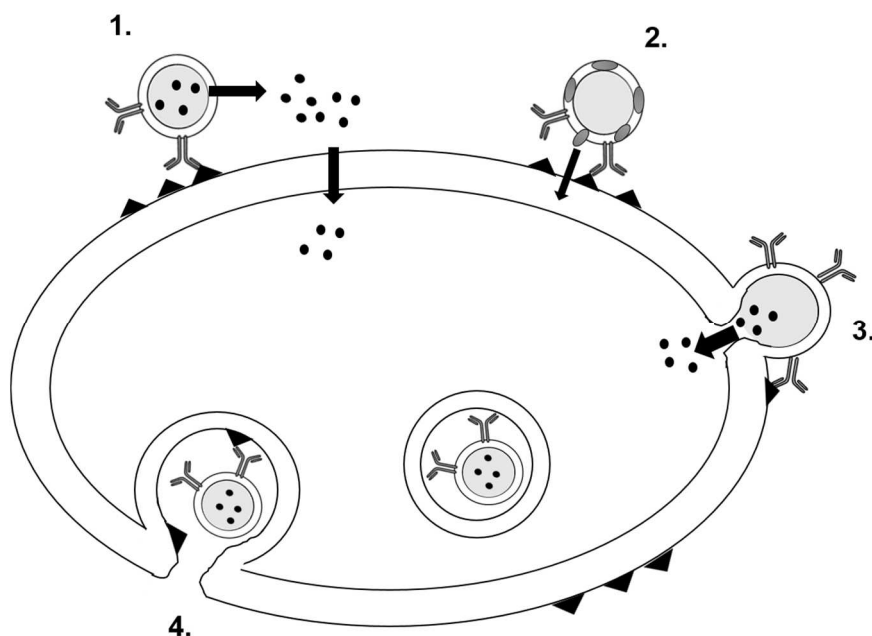


Abbildung 1-7: Darstellung der Interaktionen zwischen Zellen und Immunliposomen

(1.) Die extrazelluläre Wirkstofffreisetzung ermöglicht den *Bystander*-Effekt; (2.) Transfer von lipophilen Wirkstoffen (WS) zwischen Liposomen und Zielzelle; (3.) WS-Freisetzung über Membranfusion zwischen Liposomen und Zellmembran; (4.) Endozytose Aufnahme der Liposomen. (nach Bendas (2001)).

Für das aktive Targeting von Liposomen finden besonders häufig Immunglobulin-basierte Liganden wie monoklonale Antikörper (Cheng & Allen 2008, Hantel et al. 2010, Müller 2013, Jakoby et al. 2015, Züfle 2016), F(ab')₂- und Fab'-Fragmente (Pastorino et al. 2003a) und rekombinant hergestellte *single chain* Fragmente (*single chain variable fragments*; scF_v) (Cheng & Allen 2010) Anwendung. Zusätzlich werden auch Peptide wie RGD (Rengaswamy et al. 2016), Glykoproteine (z. B. Transferrin) und kleine Moleküle wie Folsäure (Chen et al. 2009b) eingesetzt. Tabelle 1-2 gibt eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der für das aktive Targeting eingesetzten Liganden.

Tabelle 1-2: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile von Liganden zum aktiven Targeting; reviewed in (Allen 2002)

Liganden	Vorteile	Nachteile
Ak-basiert	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Antigenspezifität • z.T. synergistische therapeutische Wirkung mit Zytostatika • viele Modifikationsmöglichkeiten 	<ul style="list-style-type: none"> • z.T. immunologische Aktivität • hohe Kosten • z.T. Lagerinstabilitäten
nicht Ak-basiert	<ul style="list-style-type: none"> • gut erhältlich • kostengünstig • einfache Handhabung • gute Lagerstabilität 	<ul style="list-style-type: none"> • z.T. nicht selektiv • z.T. Konkurrenzreaktion mit freien Molekülen im Körper (z. B. für Folsäure)

1.3 Liposomale Oberflächenmodifikation

Für eine Funktionalisierung der Vesikeloberfläche für ein aktives liposomales Targeting stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In ersten Entwicklungen wurden nicht-PEGylierte Liposomen zur Herstellung von Ak-gekoppelten Liposomen verwendet. Hierfür wurden die Liganden direkt an die hydrophilen Kopfgruppen von Phospholipiden (PL) gekoppelt (Abbildung 1-8 A). Die so hergestellten Immunliposomen zeigten wie konventionelle, nicht-PEGylierte Liposomen eine rasche Elimination aus der Blutzirkulation durch Aufnahme in das RES, v. a. in die Leber. Aufgrund ihrer sehr kurzen Zirkulationshalbwertszeit (< 30 min) eigneten sich diese Systeme nicht für eine zielgerichtete Therapie (Torchilin 1985, Derksen et al. 1988).

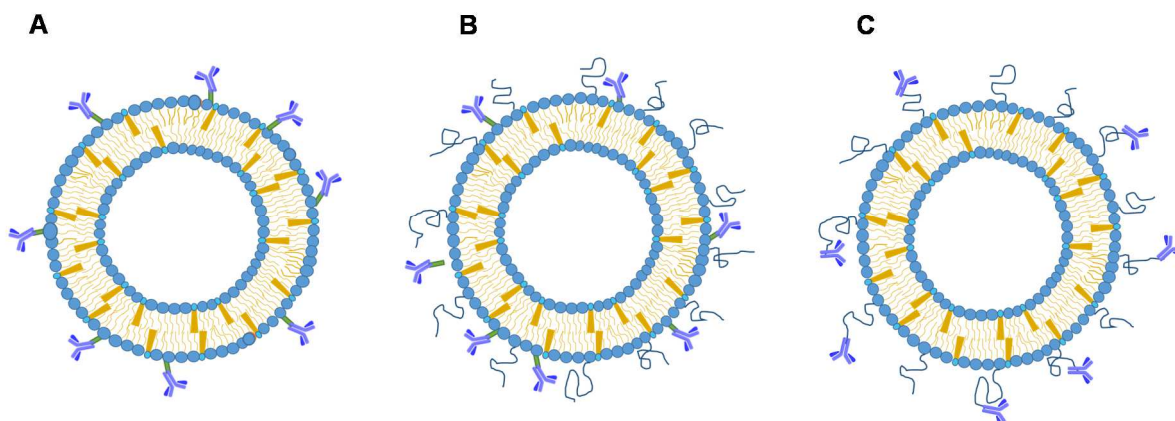


Abbildung 1-8: Ak-Konjugationsmöglichkeiten an Liposomen

(A) Direkte Bindung der Antikörper (Ak) an die Kopfgruppe von Phospholipiden (PL); (B) PEGyliertes Liposom mit direkt an PL gebundenen Ak; (C) Konjugation der Ak an das distale Ende von PEG-Ketten (nach Torchilin (2005)).

Eine Weiterentwicklung gelang durch die Kombination von PL-gebundenem Ak und *Stealth*-Effekt (Abbildung 1-8 B). Das Einbringen von PEG-Einheiten auf die liposomale Oberfläche führte zu verlängerten Bluthalbwertszeiten. Die PEG-Ketten resultierten aber gleichzeitig in einer sterischen Hinderung der Ak-Antigen-Bindung, was ein effektives Ansteuern der Zielzellen erschwerte (Klibanov et al. 1991, Torchilin et al. 1996).

Ein ausgeprägter Targeting-Effekt konnte schließlich über die Kopplung von Ak an freie Enden der PEG-Kette erreicht werden (Abbildung 1-8 C). Die frei beweglichen PEG-Ketten ermöglichen eine ungehinderte Präsentation der gekoppelten Liganden.

Die für diese Art der Oberflächenmodifikation eingesetzten Membrananker sind aus drei Komponenten aufgebaut: Ein lipophiler Teil ermöglicht die stabile Insertion in die liposomale Membran, ein hydrophiler PEG-Spacer verlängert die Blutzirkulationszeit der Immunoliposomen und eine reaktive Gruppe am distalen Ende des Anker-moleküls erlaubt die Kopplung von Liganden (vgl. Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9, Methodenteil Seite 69 und 70).

Untersuchungen zeigten, dass die Blutzirkulationshalbwertszeit dieser Liposomen stark von der gebundenen Ligandendichte sowie der Art der verwendeten Liganden abhängt. Bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern (Ak) als Targeting-Ligand wurde eine mit steigender Ak-Dichte erhöhte Elimination aus der Blutzirkulation gezeigt. Diese überstieg bei hohen Ak-Konzentrationen von $> 140 \mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ Phospholipid klar den Targeting-Effekt der Präparation. Ein optimales Gleichgewicht zwischen ausreichend langer Zirkulationszeit und hohem Targeting-Effekt konnte bei einer Ak-Konzentration zwischen $20\text{-}80 \mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ Phospholipid eingestellt werden (Allen et al. 1995).

Die beschleunigte Elimination von Immunliposomen aus der Blutzirkulation resultiert aus einer erhöhten Aufnahme durch Phagozyten. Dieser Vorgang wird hauptsächlich durch den F_c -Teil von Ak getriggert. Es kommt dabei zu einer Bindung an F_c -Rezeptoren, die vorwiegend auf Makrophagen lokalisiert sind, sowie zu einer erhöhten Komplementaktivierung. Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Blutzirkulationszeit ist daher die Herstellung von Immunliposomen mit Ak deren F_c -Teil ganz oder teilweise entfernt wurde, sogenannte Ak-Fragmente. Die Herstellung solcher Ak-Fragmente kann wahlweise über enzymatischen Verdau oder durch gezielte rekombinante Herstellung erfolgen.

Durch enzymatischen Verdau mit Pepsin wird der Ak unterhalb seiner *hinge*-Region gespalten, wodurch ein $F(ab')_2$ -Fragment erhalten wird. Das Enzym Papain spaltet hingegen oberhalb der *hinge*-Region innerhalb der *heavy chain*, wodurch zwei Fab' -Fragmente erhalten werden (siehe Abbildung 1-9) (Hermanson 2013).

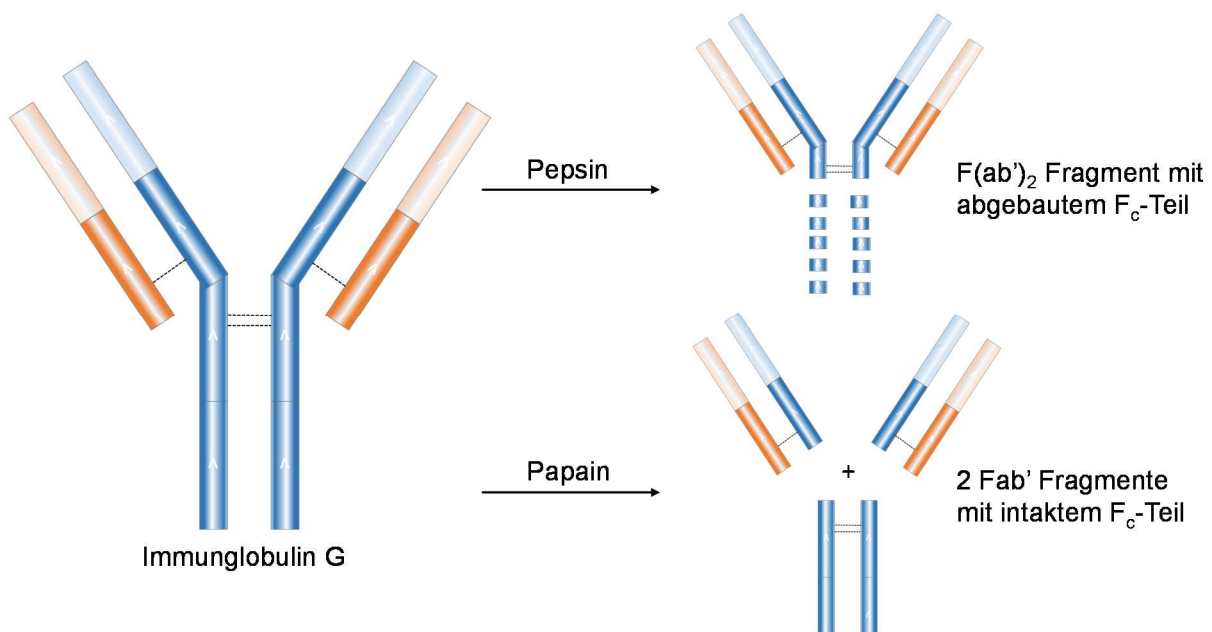


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des enzymatischen Verdau von IgG nach Hermanson (2013).

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz sogenannter scF_v -Fragmente (*single chain fragment variable*). Diese werden rekombinant hergestellt und bestehen aus der variablen Region der schweren und leichten Kette von Antikörpern. Diese beiden Domänen sind über einen kurzen Proteinlinker miteinander verbunden.

Pharmakokinetische Untersuchungen verschiedener Ak-Varianten (Ak, Fab' und scF_v) zeigten für Fab'- sowie scF_v-funktionalisierte Immunoliposomen eine im Vergleich zu Ak-modifizierten Liposomen deutlich verlängerte Zirkulationshalbwertszeit (Maruyama et al. 1997, Pastorino et al. 2003a, Cheng & Allen 2008). Auch der im Rahmen dieser Arbeit verwendete ch Δ C_{H2}-Ak dessen C_{H2}-Teil innerhalb der F_c-Region deletiert wurde, zeigte verlängerte Blutzirkulationshalbwertszeiten, die im Bereich von F(ab')₂-Fragmenten lagen (Müller et al. 1990b).

Für die Kopplung von Ligand und PEG-Spacer stehen verschiedene reaktive Gruppen zur Verfügung. Bei der Herstellung von Immunoliposomen werden hierfür häufig Maleinimide (Mal) verwendet. Diese reagieren mit freien Thiolgruppen von Liganden unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbrücke.

Da konventionelle IgG-Ak häufig nicht über freie Thiolgruppen verfügen, müssen diese über einen chemischen Modifikationsschritt (Thiolierung) mit 2-Iminoethanol (Traut's Reagenz) eingeführt werden (Ishida et al. 1999, Iden & Allen 2001). Ein Nachteil dieser Methode ist die chemische Instabilität der Thiolgruppen. Durch Oxidationen zu Disulfiden oder durch eine Recyclisierung kann es innerhalb weniger Stunden zu Reaktivitätseinbußen kommen. Eine alternative Methode ist die enzymatische Spaltung von Ak mit Papain, wodurch Fab'-Fragmente mit freier Thiolgruppe erzeugt werden. Um einer Oxidation der Thiolgruppe entgegen zu wirken, wird zur Herstellung der Fab'-Fragmente ein entgaster, EDTA-haltiger und Inertgas durchspülter Puffer verwendet (Hermanson 2013).

Der Einsatz von N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Gruppen zur Ligandenkopplung ermöglicht die Reaktion mit primären Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung. Für die Herstellung von Ak-modifizierten Liposomen ist die Verwendung von NHS-aktivierten Ankerstrukturen vorteilhaft, da keine vorherige Modifizierung der Ak nötig ist. Die Reaktion erfolgt bevorzugt an α -Aminogruppen am N-terminalen Ende von Proteinen und an ϵ -Aminogruppen von freien Lysin-Seitengruppen. Die beschriebene Technik wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt um verschiedene anti-GD₂-Varianten an Membrananker zu koppeln. Die praktische Durchführung dieser Methode ist in Kapitel 3.5 näher beschrieben.

Die Oberflächenmodifikation über reaktive PEG-Gruppen kann in Abhängigkeit vom Mechanismus der Ankereinlagerung in zwei Gruppen eingeteilt werden: Konventionelle Methode und *post-insertion technique*. Bei der konventionellen Methode werden die zur Oberflächenmodifikation eingesetzten Ankerstrukturen direkt bei der Liposomenherstellung in den Lipidfilm eingearbeitet (Hansen et al. 1995, Allen et al. 1995). Die Membrananker werden dadurch gleichmäßig in die äußere und innere Liposomenmembran integriert. Ein Nachteil der konventionellen Einlagerung ist die gleichmäßige Verteilung der reaktiven Gruppe im extra- und intraliposomalen Raum.

Durch Anwesenheit reaktiver Gruppen im Liposomeninneren besteht die Gefahr einer Interaktion mit verkapselten Wirkstoffen (Moreira et al. 2002). Auf der Innenseite des Bilayers liegende Ankerstrukturen stehen außerdem nicht zur sterischen Stabilisierung der Liposomen oder zum aktiven Targeting zur Verfügung. Bei hydrolyseempfindlichen funktionellen Gruppen wie NHS besteht zudem die Gefahr einer vorzeitigen Abreaktion (Hermanson 2013).

Bei der *post-insertion technique* werden die Membrananker alleine oder nach Kopplung mit den Liganden nachträglich, d.h. nach abgeschlossener Liposomenherstellung, selektiv in den äußeren liposomalen Bilayer eingelagert. Die Gefahr einer Interaktion mit verkapselten Wirkstoffen kann so umgangen werden. Die bei dieser Methode eingesetzten Membrananker basieren entweder auf Phospholipidstrukturen, i.d.R. Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE) (klassische *post-insertion technique*, PIT) (Ishida et al. 1999), oder auf Sterolen (*sterol-based post-insertion technique*, SPIT) (Gantert et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die nachträglichen Einlagerungsverfahren SPIT und PIT zur Herstellung von anti-GD₂-Immunoliposomen verwendet. Eine genauere Beschreibung dieser Techniken sowie die praktische Durchführung sind in Kapitel 3.5.1.2 aufgeführt.

1.4 Neuroblastom

Neuroblastome gehören zu den bösartigen soliden Tumoren, die sich vor allem im Kindes- und Jugendalter entwickeln (embryonale Tumoren). Sie bilden die am häufigsten auftretende extrakranielle solide Tumorform und umfassen ca. 7-10 % aller Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren (Luksch et al. 2016). Mit etwa 15 % aller pädiatrischen Krebstoten stellt eine erfolgreiche Behandlung von Neuroblastomen eine große Herausforderung für die Forschung dar.

1.4.1 Tumorentstehung und Symptome

Neuroblastome entstehen aus entarteten unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems. Aufgrund dieser Genese können sich die Tumoren in jedem Nervengewebe des Sympathikus entwickeln. Häufig ist das Nebennierenmark und der Grenzstrang beidseits der Wirbelsäule betroffen. In etwa 65 % der Fälle finden sich Neuroblastome im Bauchraum, bei ca. 20 % der Patienten liegen sie im Brust- und Halsbereich. Es wird vermutet, dass die Entartung der embryonalen Nervenzellen bereits vor der Geburt beginnt und eine Folge von Chromosomenveränderungen und/oder Genmutationen ist. In 40 % aller Fälle tritt der Tumor bei Patienten im ersten Lebensjahr auf (Maris et al. 2007).

Die Symptome der Erkrankung sind sehr vielfältig und hängen von der Lokalisation des Primärtumors, dem Grad der Metastasierung sowie dem Auftreten eines Paraneoplastischen Syndroms ab. Die Diagnose dieser malignen Neoplasie ist daher sehr komplex und wird häufig zusätzlich durch die Abwesenheit von Symptomen erschwert. In vielen Fällen werden Neuroblastome daher als Zufallsdiagnose bei Routineuntersuchungen durch den Kinderarzt diagnostiziert (Maris et al. 2007).

Eine Besonderheit beim Neuroblastom ist eine durch Apoptose ausgelöste, spontane Tumorrückbildung. Diese Tumorregression wurde vor allem bei Neuroblastomen beobachtet, die im frühen Säuglingsalter auftraten. Eine weitere Möglichkeit ist eine spontane oder durch milde Chemotherapie ausgelöste Differenzierung zu Ganglioneuroblastomen, die im Vergleich zu Neuroblastomen deutlich langsamer wachsen.

1.4.2 Klassifikation und Einteilung in Risikogruppen

Die Krankheitsverläufe beim Neuroblastom sind durch das Tumorstadiumsverhalten und den Grad der Metastasierung gekennzeichnet. Die Einteilung in Krankheitsstadien (1, 2a, 2b, 3, 4 und 4S) erfolgt laut dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) nach Tumorgöße sowie -ausbreitung (Beteiligung von Lymphknoten), dem Ergebnis der operativen Tumorentfernung, der Bildung von Metastasen und dem Alter der Patienten (Brodeur et al. 1993).

Des Weiteren werden Neuroblastome nach dem *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) in Risikogruppen eingeteilt: Die Klassifizierung erfolgt nach dem Krankheitsstadium vor der operativen Entfernung des Tumors sowie den Ergebnissen aus bildgebenden Untersuchungen und der Biopsie.

1.4.2.1 Prognose

Die Prognose der Erkrankung ist durch die Einteilung in Krankheitsstadien und Risikogruppen sowie zusätzlich durch sogenannte prognostische Marker gekennzeichnet. Tabelle 1-3 zeigt eine Übersicht dieser Marker.

Tabelle 1-3: Übersicht der prognostischen biologischen Marker beim Neuroblastom nach (Maris et al. 2007)

<i>Marker</i>	<i>Charakteristik</i>
Patientenalter	jüngere Patienten (12-18 Monate) → oft bessere Prognose
DNA Index	Prognostischer Marker bei Patienten < 2 Jahre, hyperdiploide Neuroblastomzellen → bessere Prognose
MYCN-Amplifikation	Überexpression des Onkogens → schlechte Prognose
Chromosomenveränderungen	Deletionen an Chromosom 1 (1p) oder 11 (11q) sowie zusätzliche Kopien von Chromosom 17 (17q gain) → schlechte Prognose
Rezeptortyrosinkinase-(Trk)-Status	Hohe TrkA-Expression → gute Prognose TrkB-Expression → schlechte Prognose

Patienten werden nach den zuvor beschriebenen Charakteristika in niedrige-, mittlere und hohe Risikogruppen eingeteilt. Weiterhin haben das Patientenalter, das Ausmaß der Erkrankung sowie die Aggressivität des Tumors großen Einfluss auf die Heilungschancen.

Bei niedriger Risikogruppe besteht eine gute Prognose mit minimaler Therapie. In aller Regel ist eine operative Entfernung des Primärtumors ausreichend. Je nach Alter der Patienten und dem jeweiligen Krankheitsstadium konnten hier Überlebensraten von 81 - 92 % erzielt werden. Auch bei der mittleren Risikogruppe hatten > 90 % der Patienten eine krankheitsfreie 11-Jahres-Überlebensrate. Trotz aller medizinischer Fortschritte bleibt die Therapie von Hochrisiko-Neuroblastomen, die sich oft durch eine Überexpression von MYCN auszeichnen, eine Herausforderung. Aufgrund einer häufig auftretenden arzneimittelresistenten Rest-erkrankung entwickeln die Patienten dieser Risikogruppe trotz aggressiver Chemotherapie in mehr als 50 % der Fälle ein Rezidiv. Die Langzeitüberlebensrate dieser Patienten liegt unter 50 % (Weinstein et al. 2003, Pinto et al. 2015).

1.4.3 Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms

Aufgrund der hohen klinischen Variabilität des Neuroblastoms werden Patienten nach angepasster Risikoeinstufung spezifisch therapiert. Durch diese individualisierte Behandlung soll ein schlechtes Therapieansprechen mit erhöhter minimaler Resterkrankung sowie die Entstehung von wirkstoffresistenten Rezidiven verhindert und toxische Nebenwirkungen minimiert werden (Luksch et al. 2016).

1.4.3.1 Klassische Behandlungsstrategie

Neben einer operativen Tumorentfernung umfasst die initiale Therapie beim Hochrisiko-Neuroblastom eine intensive Chemotherapie. Hierfür werden üblicherweise die Zytostatika Cisplatin und Etoposid alternierend mit Doxorubicin, Cyclophosphamid oder Vincristin eingesetzt. Bei refraktärem Neuroblastom konnte durch die zusätzliche Behandlung mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Topotecan der Erfolg der Initialphasentherapie verbessert werden. Auf die chemotherapeutische Behandlung folgt häufig eine szintigraphische Therapie mit radioaktiv markiertem Methyliodbenzylguanidin (MIBG). In der Konsolidierungsphase wird die Behandlung mit einer Hochdosis-Chemotherapie und einer anschließenden autologen Stammzelltransplantation weiter intensiviert. Während der Erhaltungsphase wird abschließend mit Retinsäure (v. a. Isotretinoin) therapiert, um die minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) weiter zu senken (Park et al. 2006, Maris et al. 2007, Yiallourous 2016). Trotz einer intensiven Therapie mit schwerwiegenden Nebenwirkungen (Matthay et al. 1999) entwickeln Patienten der Hochrisikogruppe in 50-60 % der Fälle ein Rezidiv. Diese Rezidive sind häufig mit der Entwicklung von Wirkstoffresistenzen durch Methylierung der Caspase 8, Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen oder einer P-Glykoprotein-(Pgp)-Überexpression, verbunden (Chan et al. 1991, Maris et al. 2007).

Neue Therapieansätze für das Hochrisiko-Neuroblastom beinhalten daher die Entwicklung von Wirkstoffen mit gezielten Angriffspunkten auf molekulare Eigenschaften von Tumoren. Zu diesen Zielstrukturen gehören für den Tumor wichtige Botenstoffe, Rezeptoren und Signalwege. Durch diese zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) sollen die Spezifität, die Effizienz sowie das Wirkungs-Nebenwirkungsprofil der Therapie verbessert werden (Brodeur 2003).

1.4.3.2 Molekularbiologische Therapieansätze

Ein wichtiges Konzept in der Neuroblastomtherapie ist die Unterdrückung biochemischer Signalkaskaden, die zu einem unkontrollierten Tumorwachstum beitragen. Ein besonders vielversprechender Ansatzpunkt ist die Hemmung der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) mit Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitoren (Mossé et al. 2009). In 6,1 % aller neu diagnostizierten Neuroblastome zeigt die ALK eine Mutation oder Amplifikation. Es wird vermutet, dass der Anteil dieser genetischen Veränderungen in rezidivierenden Neuroblastomen noch höher ist (Chen et al. 2008). Eine Überaktivierung der ALK ist ein wichtiger Faktor in der Tumorgenese. Durch den Einsatz von ALK-Rezeptor-Tyrosinkinase inhibierenden Stoffen wie z. B. dem ALK/MET Inhibitor Crizotinib konnte die Tumorgenese effektiv unterdrückt werden.

Weitere Signalwege, die als vielversprechende Ansatzpunkte in der Neuroblastomforschung gelten, sind Mutationen von MAP-Kinasen sowie Amplifikationen im Onkogen MYCN (Matthay et al. 2012, Bagatell & Cohn 2016).

Auch die Immuntherapie, bei der spezifische Oberflächenstrukturen auf Tumoren angesteuert werden, ist von großer Bedeutung in der Behandlung des Hochrisiko-Neuroblastoms. Die dabei bisher erfolgreichste Strategie ist das Ansteuern des Glykolipids Disialogangliosid 2 (GD₂). Da GD₂ fast ausschließlich auf der Oberfläche von Neuroblastomen und einigen anderen Tumoren, z. B. Gliomen, exprimiert wird und das Vorkommen in gesundem Gewebe nur gering ist, stellt es ein geeignetes Target für die Immuntherapie mit Antikörpern dar.

Die Wirkung der therapeutisch eingesetzten GD₂-Ak beruht auf einer Komplement-abhängigen (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) sowie einer Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) (Mujoo et al. 1987).

Erste Untersuchungen mit den murinen GD₂-Ak 14G2a und 3F8 führten zu Nebenwirkungen. Dazu gehörten reversible Schmerzen, die durch Bindung an GD₂-exprimierende periphere Nervenfasern hervorgerufen wurden sowie Tachykardie, Fieber, Blutdruckveränderungen, Hyponatriämie und Urtikaria (Murray et al. 1994, Cheung et al. 1998). Die Entwicklung des chimären ch14.18-Ak führte zu einer im Vergleich zu 14G2a 50- bis 100-fach effektiveren ADCC bei vergleichbarem Nebenwirkungsprofil (Müller et al. 1990a, Handgretinger et al. 1995, Yu et al. 1998).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Kombination aus ch14.18 mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), Interleukin-2 und Isotretinoin im Vergleich zur Monotherapie mit ch14.18 zu einer effektiveren Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms führte (Barker et al. 1991, Simon et al. 2004, Yu et al. 2010). Im Jahr 2015 erhielt der ch14.18-Ak Dinutuximab (Unituxin®) die Zulassung zur Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen in Kombination mit GM-CSF, Interleukin-2 und Isotretinoin (Ploessl et al. 2016).

Durch die Kombination von GD₂-Ak und Cytokinen konnten die Therapieergebnisse aufgrund einer verstärkten ADCC bei Hochrisiko-Neuroblastomen signifikant verbessert werden. Dies führte zu der Entwicklung von Fusionsproteinen aus humanisiertem anti-GD₂ und IL-2. Das hu14.18-IL2 sollte die Effizienz der Immuntherapie steigern sowie die bei IL-2 Gabe gezeigte systemische Toxizität senken. Allerdings waren die Nebenwirkungen der kombinierten Therapie mit denen nach getrennter Gabe vergleichbar (Matthay et al. 2012).

Die nach anti-GD₂-Applikation auftretenden und dosislimitierenden Schmerzen konnten durch eine Punktmutation im C_{H2}-Teil der F_c-Region an hu14.18 gesenkt werden. Die Gabe dieses hu14.18K332A führte in klinischen Studien zu einer geringeren Komplementaktivierung und zur Senkung der damit verbundenen neuropathischen Schmerzen (Navid et al. 2014).

Radioaktiv markierte GD₂-Ak können simultan zur Immuntherapie sowie zur Diagnostik eingesetzt werden (Theranostik). Aufgrund ihrer Strahlungsempfindlichkeit ist die Radioimmuntherapie vor allem bei Neuroblastomen interessant. Erste klinische Untersuchungen von ¹³¹I-markiertem 3F8 waren bereits vielversprechend (Cheung et al. 2001).

1.4.3.3 Liposomale Neuroblastomtherapie

Neben den molekularbiologischen Therapieansätzen werden mittlerweile auch vermehrt Liposomen in der Tumortherapie eingesetzt. Diese haben aufgrund ihres Aufbaus eine hohe Variabilität bezüglich der einsetzbaren Wirkstoffe (vgl. Kapitel 1.2). Außerdem besteht, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, die Möglichkeit einer liposomalen Oberflächenmodifizierung und somit einer gezielten Ansteuerung von Tumoren.

Zytostatika kommen aufgrund einer in dieser Formulierung verringerten systemischen Toxizität häufig liposomal zum Einsatz. So konnte für die Kombination von anti-GD₂-modifizierten Doxorubicin-(DXR)-Liposomen in verschiedenen Neuroblastom-Tiermodellen ein Vorteil gegenüber reinem DXR sowie liposomalem DXR ohne Oberflächenmodifikation gezeigt werden (Brignole et al. 2003a, Pastorino et al. 2003a).

Auch das aktive Targeting von DXR-Liposomen mit kleineren Peptiden wurde bereits erfolgreich im Tiermodell getestet (Pastorino et al. 2003b, Cossu et al. 2015). Abgesehen von dem Anthracyclin DXR wurde der Topoisomerase-Inhibitor Etoposid als liposomale Formulierung *in vitro* an Neuroblastomzelllinien untersucht (Brown et al. 2014).

Neben Zytostatika wurden weitere Substanzen wie das synthetische Retinoid Fenretinide (Raffaghello et al. 2003, Wei et al. 2005, Di Paolo et al. 2013), *antisense* Oligonukleotide (asONT) gegen das c-myc Proto-Onkogen (Pagnan et al. 2000, Brignole et al. 2003b, Brignole et al. 2004), siRNA gegen die anaplastische Lymphomkinase (ALK) (Di Paolo et al. 2011) sowie der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Loi et al. 2014, Zuccari et al. 2015) zur liposomalen Therapie des Neuroblastoms untersucht.

1.4.3.4 Arsenitrioxid in der Neuroblastomtherapie

Die medizinische Anwendung von Arsenitrioxid (ATO) hat eine lange Geschichte. In der traditionellen Chinesischen Medizin wird ATO seit 2 000 Jahren zur Behandlung von Rheuma, Syphilis sowie Psoriasis eingesetzt. Die Anwendung in Form von Kaliumarsenit, auch bekannt als Fowler'sche Lösung, diente im 18.-20. Jahrhundert zur Behandlung von Fieber, Asthma und Ekzemen sowie zur Therapie von hämatologischen Erkrankungen wie Anämie, Leukämie und dem Hodgkin-Lymphom. Aufgrund seiner hohen Toxizität und der Verfügbarkeit hocheffektiver Chemotherapeutika sowie der Etablierung der Strahlentherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen verlor Arsen jedoch Mitte des 20. Jahrhunderts an medizinischer Bedeutung (Dilda & Hogg 2007, Liu et al. 2012).

Die Entdeckung seiner hervorragenden antineoplastischen Eigenschaften bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL) in den 1970er Jahren führte zu einem Revival des Einsatzes von ATO in der Krebstherapie. Besonders effektiv zeigte sich ATO bei der Behandlung von malignen hämatologischen Erkrankungen. Unter dem Handelsnamen Trisenox[®] wurde ATO erstmals 2000 durch die FDA zur Behandlung der rezidivierenden und refraktären APL zugelassen ⁽¹⁾. Die Zulassung in Europa folgte 2002 und wurde 2016 auf den Anwendungsbereich zur Behandlung von Patienten mit neu diagnostizierter APL in Kombination mit Tretinoin erweitert ⁽²⁾.

Neben seiner zunehmenden Bedeutung in der Therapie von Neoplasien des hämatologischen Systems zeigte ATO auch Wirkung in verschiedenen soliden Tumorarten z. B. Prostata-, Cervix- und Ovarialkarzinom (Murgo 2001) sowie beim Neuroblastom (Akao et al. 1999, Øra et al. 2000, Pettersson et al. 2007). Auch bei wirkstoffresistenten Neuroblastomformen konnten antineoplastische Effekte durch eine ATO-Behandlung *in vitro* gezeigt werden (Karlsson et al. 2005).

Der Wirkmechanismus von ATO ist bis heute nur unvollständig geklärt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ATO auf Neuroblastomzellen proapoptotisch wirkt sowie das Tumorwachstum inhibiert. Verglichen mit dem Wirkmechanismus bei der APL führt die Behandlung mit ATO hier aber nicht zu einer Differenzierung der Neuroblastomzellen (Pettersson et al. 2007).

⁽¹⁾http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21-248_Trisenox.cfm

⁽²⁾http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion/human/000388/WC500214157.pdf

Verschiedene für ATO beobachtete Wirkmechanismen sind im Folgenden aufgeführt:

- ATO induziert Apoptose über die Aktivierung von Caspase 3 (Akao et al. 1999, Øra et al. 2000, Cheung et al. 2007)
- ATO induziert Apoptose über eine Herunterregulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Øra et al. 2000, Woo et al. 2006)
- ATO bindet an Cysteingruppen der IκB-Kinase (IKK), wodurch die Phosphorylierung des IκBα unterbunden und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB unterdrückt wird (Kapahi et al. 2000, Woo et al. 2006)
- ATO induziert Apoptose über eine proteolytische Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax ohne eine vorherige Induktion von p53 (Karlsson et al. 2004, Karlsson et al. 2007)
- ATO inhibiert den bei Tumorerkrankungen häufig überaktiven Hedgehog-Signalweg durch Hemmung der GLI 1 Proteinfunktion (Beauchamp et al. 2011)
- ATO führt zum Abbau von mutiertem p53 und hemmt dadurch das Tumorwachstum (Yan et al. 2011)
- ATO führt zur Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und induziert dadurch oxidativen Stress (Yi et al. 2004, Lu et al. 2014)
- ATO inhibiert die P-Glykoprotein (Pgp)-Expression in SK-N-SH-Zellen (Liu et al. 2016)

Durch seine vielseitigen Wirkungsmechanismen und die gezeigte Effektivität in hoch aggressiven, wirkstoffresistenten Neuroblastomzellen sowie der synergistischen Wirkung mit klassischen Zytostatika entwickelte sich ATO zu einem vielversprechenden Wirkstoff für die Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms (Pettersson et al. 2007).

1.5 Liposomales Arsentrioxid

Für die Therapie von soliden Tumoren sind im Vergleich zur Behandlung der APL (0,15 mg·kg⁻¹ pro Tag) deutlich höhere Dosen ATO nötig. Aufgrund seiner exzellenten Gewebegängigkeit (Verteilungsvolumen > 400 L) (Fachinformation, 2016) kann die Applikation von ATO zu schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen führen. Zu diesen gehören periphere Neuropathien, Arrhythmien durch QT-Zeitverlängerung, gastrointestinale Beschwerden sowie Leber- und Nierenschäden (Evens et al. 2004, Douer & Tallman 2005).

Um die systemische Toxizität von ATO zu senken, untersuchten Kallinteri et al. den Einsatz des Wirkstoffs in liposomaler Formulierung (Kallinteri et al. 2004). Untersuchungen der Verkapselungsstabilität des niedermolekularen Wirkstoffs ATO nach passiver Beladung der Liposomen waren aber aufgrund seiner schnellen Diffusion über Membranen unabhängig von der Herstellungsmethode und der verwendeten Lipidmischung nicht zufriedenstellend (Kallinteri et al. 2004, Chen et al. 2006, Züfle 2016).

Durch die Co-Verkapselung mit Übergangsmetallsalzen und die resultierende intraliposomale Präzipitation des ATO konnte die liposomale Retentionszeit deutlich verlängert werden. In Bezug auf die Menge verkapselter Substanz konnten bei der Verwendung von Nickelacetat ($\text{Ni}(\text{OAc})_2$) gegenüber den weiteren getesteten Salzen die besten Ergebnisse erzielt werden (Chen et al. 2006).

Die ATO-Beladung von Liposomen mittel $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -basiertem *remote loading* Verfahren bietet neben hoher Beladungskapazität und verlängerter intraliposomaler Retention der Substanz auch den Vorteil einer pH- und temperaturabhängigen ATO-Freisetzung. Die schnellsten Freisetzungsraten konnten bei 37 °C und sauren pH-Werten, den in Tumoren vorherrschenden Bedingungen, beobachtet werden (Chen et al. 2006).

In Vorgängerarbeiten konnte durch die Bildung sogenannter *dehydration-rehydration-vesicles* die vorverkapselte Menge an $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ und damit auch die liposomal eingeschlossene Menge ATO noch weiter gesteigert werden (Müller 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur ATO-Verkapselung das beschriebene *remote loading* mit $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Liposomen durchgeführt. Eine genaue Erläuterung dieser Methode sowie der praktischen Durchführung sind in Kapitel 3.3 aufgeführt.

Erste *in vivo* Untersuchungen einer liposomalen NiAs-Formulierung in einem Brustkrebsmodell in Mäusen zeigten eine im Vergleich zu reiner ATO-Lösung erhöhte Plasmahalbwertszeit sowie eine erhöhte Akkumulation der Substanz am Tumorgewebe mit verbesserter antitumorale Wirkung (Ahn et al. 2010). Auch *in vitro* Untersuchungen an HPV-assoziiertem Zervixkarzinom waren vielversprechend (Wang et al. 2016). Eine Weiterentwicklung des *remote loadings* von ATO war die stabile Co-Verkapselung von ATO mit dem Zytostatikum Cisplatin sowie eine erfolgreiche Oberflächenmodifikation dieser Liposomen mit Folsäure (Chen et al. 2009a, Chen et al. 2009b). Eine Erhöhung der gezielten As-Freisetzung am Tumorgewebe konnte durch die Entwicklung von thermosensitiven Liposomen umgesetzt werden (Winter et al. 2011).

1.6 Ziele der Arbeit

Mit Hinblick auf eine spätere Anwendung in der Neuroblastomtherapie sollte im Rahmen dieser Arbeit die in Vorgängerarbeiten (Müller 2013) entwickelte liposomale NiAs-Formulierung weiter optimiert werden. Ein wichtiges Kriterium hierfür ist die Möglichkeit eines *Upscalings* der Liposomenherstellung. Der Prozess sollte reproduzierbar sein und für eine spätere parenterale Applikation Liposomen in hoher Qualität, d.h. mit gleichmäßiger Größenverteilung, liefern. Des Weiteren ist eine hohe intraliposomale ATO-Konzentration sowie eine stabile Lagerung der Liposomen für eine effektive Neuroblastomtherapie unumgänglich. Um das *Upscaling* mit den erforderlichen Kriterien zu erfüllen, sollten zwei Methoden, die Druckextrusion und die Mikrofluidisierung, auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden.

Durch einen Lyophilisationsschritt konnte in früheren Arbeiten die liposomale Konzentration an Nickelacetat ($\text{Ni}(\text{OAc})_2$) und somit die resultierende intraliposomale Arsenkonzentration in nicht-PEGylierten ESM/Chol-Liposomen erhöht werden. Außerdem stellt ein Lyophilisat eine stabile Lagerform für die Liposomen dar (Müller 2013). Um eine sterische Stabilisierung und damit eine erhöhte Zirkulationszeit zu erzeugen, wurden der Lipidmischung zusätzlich 5 mol % DSPE-mPEG zugesetzt. Bei Änderung der Lipidmischung konnte durch die zeit- und kostenintensive Lyophilisation allerdings keine Erhöhung der intraliposomalen Ni-Konzentration gezeigt werden (Züfle 2016). Daher sollte eine ökonomischere Alternative zur Lagerung von $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Liposomen gefunden werden.

Eine weitere Zielsetzung war die Herstellung steriler Liposomen. Hierfür sollte die Stabilität der Liposomen beim Autoklavieren und während der anschließenden Lagerung untersucht werden.

Die in Bezug auf Herstellung, Lagerstabilität und Sterilität optimierten NiAs-Liposomen sollten im Anschluss vergleichend gegen freies ATO bezüglich ihrer Zytotoxizität in Neuroblastomzelllinien untersucht werden.

Um die Selektivität der Tumorthherapie weiter zu erhöhen und ATO-bedingte systemische Nebenwirkung weiter zu senken, sollte die Oberflächenmodifikation mit Antikörpern gegen das auf Neuroblastomzellen überexprimierte GD_2 -Antigen durchgeführt werden. Hierfür sollten drei verschiedene GD_2 -Ak-Varianten (hu14.18, ch14.18, $\text{ch}\Delta\text{C}_{\text{H}2}$) untersucht werden. Die Funktionalisierung der Liposomen sollte dabei über eine nachträgliche Oberflächenmodifikation via SPIT oder PIT erfolgen. Die Targetingeffizienz der beiden Einlagerungsmethoden sowie der unterschiedlichen GD_2 -Varianten sollte an verschiedenen Neuroblastomzelllinien vergleichend getestet werden.

Es sollte weiterhin eine schnelle und zuverlässige Methode etabliert werden, über welche die liposomal gebundene Ak-Menge quantifiziert werden kann. Um die Einlagerung bei der PIT möglichst schonend zu gestalten und einer Denaturierung der verwendeten Antikörper entgegenzuwirken, sollte außerdem der Einfluss einer Senkung der Einlagerungstemperatur untersucht werden. Außerdem sollte durch Variation der eingesetzten Menge Ak/Anker-Konjugat die Effizienz der Oberflächenmodifikation optimiert werden, um kostenintensive Ressourcen wie Ak und Membrananker einzusparen.

Da für eine effiziente Tumorthherapie häufig eine Internalisierung der Liposomen von Vorteil ist, (vgl. Kapitel 1.2.2) sollte abschließend die Fähigkeit der anti-GD₂-funktionalisierten Liposomen zur Internalisierung in Neuroblastomzelllinien konfokal-fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

2 Material und Geräte

2.1 Alphabetische Liste der Hersteller und Bezugsquellen

Tabelle 2-1: Alphabetische Liste der Hersteller und Bezugsquellen

<i>Hersteller/Bezugsquelle</i>	<i>detaillierte Angaben</i>
Agilent	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Avestin	Avestin, Inc., Ottawa, Kanada
B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bandelin	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
BD Biosciences	BD Biosciences, Becton Dickinson, Heidelberg
BDK	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnbühl-Genkingen
Berner	Berner International GmbH, Elmshorn
Berthold	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Binder	Binder GmbH, Tuttlingen
Biochrom	Biochrom GmbH, Berlin
Bioer	Bioer Technology Co., Ltd., Hanzhou, China
biomedis	biomedis Laborservice GmbH, Gießen
Biometra	Biometra GmbH, Göttingen
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
BioTek	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Brand	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Carl Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Corning	Corning Inc., Corning, USA
DiaSys	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
ETG	ETG, Entwicklungs- u. Technologiegesellschaft mbH, Ilmenau
Expedeon	Expedeon Inc., San Diego, USA
Gatan	Gatan Inc., Warrendale, USA
GE Healthcare	GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden
GFL	GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Gilson	Gilson Inc., Middleton, USA
Greiner Bio-One	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Hamilton	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Heidolph	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Hersteller/Bezugsquelle	detaillierte Angaben
Heraeus	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Hettich	Hettich GmbH, Tuttlingen
IKA	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
KNF	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Krups	Krups GmbH, Offenbach
Langenbrinck	R. Langenbrinck, Emmendingen
Life Technologies	Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipoid	Lipoid GmbH, Ludwigshafen
Malvern	Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK
Martin Christ	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Merck	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Mettler-Toledo	Mettler-Toledo International, Inc., Columbus, USA
Microfluidics	Microfluidics International Corporation, Westwood, USA
Mölnlycke	Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf
Molecular Probes	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Nanocs	Nanocs Inc., New York, USA
Northern Lipids	Northern Lipids, Vancouver, Kanada
Oxford Instruments	Oxford Instruments, Abington, UK
Perkin Elmer	Perkin Elmer, Waltham, USA
Pfeiffer Vacuum	Pfeiffer Vacuum GmbH, Aßlar
Pharmacia Biotech	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Promega	Promega Corporation, Madison, USA
Quantifoil	Quantifoil Micro Tools, Jena
Sarstedt	Sarstedt AG Co., Nümbrecht
Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Schott	Schott AG, Mainz
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Soft Imaging System	Soft Imaging System GmbH, Münster
Thermo Scientific	Thermo Scientific, Rockford, USA
UKT	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Onkologie Prof. Dr. Rupert Handgretinger, Tübingen
Vacuubrand	Vacuubrand GmbH und Co. KG, Wertheim
VWR	VWR International, Darmstadt
Whatman	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Zeiss	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zitt-Thoma	Zitt-Thoma GmbH, Freiburg

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Tabelle 2-2: Lipide und Membrankomponenten

<i>Substanz</i>	<i>Beschreibung oder Summenformel</i>	<i>M_r (g·mol⁻¹)</i>	<i>Reinheit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-ethanolamin- <i>N</i> -[methoxy-poly(ethylen-glykol)-2000]	≈ 2805	≥ 99 %	Lipoid
Cholesterol	Chol	386,7	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Chol-PEG ₂₀₀₀ -NHS	N-Hydroxysuccinimid-aktiviertes Cholesterol-PEG ₂₀₀₀	≈ 2521		Eigensynthese Dr. Judith Jakoby, Universität Freiburg
Ei-Sphingomyelin	ESM	703	≥ 98 %	Lipoid
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NHS	N-Hydroxysuccinimid-aktiviertes DSPE-PEG ₂₀₀₀	≈ 2943	N.A.	Nanocs
Rhodamin B, Lissamine™	Rhodamin-DPPE, 1,2-Dihexa-decanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-ethanolamin, Triethylammoniumsalz	1333,8	≥ 98 %	Life Technologies

Tabelle 2-3: Antikörper für die liposomale Oberflächenmodifikation

<i>Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>M_r (g·mol⁻¹)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
GD ₂ -Antikörper, chimär, Typ IgG1	ch14.18	146 000	Prof. Dr. Rupert Handgretinger, UKT
GD ₂ -Antikörper, ΔC _{H2} modifiziert, chimär, Typ IgG1	chΔC _{H2}	120 000	Prof. Dr. Rupert Handgretinger, UKT
GD ₂ -Antikörper, humanisiert, Typ IgG1	hu14.18	146 000	Prof. Dr. Rupert Handgretinger, UKT
IgG, unspezifisch, human	IgG	146 000	Sigma-Aldrich

Tabelle 2-4: Lösungsmittel, Säuren und Laugen

Substanz	Beschreibung, Synonym oder Summenformel	M_r ($g \cdot mol^{-1}$)	Reinheit	Bezugsquelle
Chloroform	Trichlormethan, $CHCl_3$	119,38	HPLC grade	Carl Roth
Isopropanol	C_3H_8O	60,1	HPLC grade	Carl Roth
Natriumhydroxid	NaOH, granuliert	40,0	p.a.	Merck
Salpetersäure	HNO_3 , Supra 69 %	63,01	ICP, AAS grade	Carl Roth
Salzsäure	HCl rauchend 37 % Rotipur [®]	36,46	p.a.	Carl Roth
Schwefelsäure	H_2SO_4 96 %, Rotipur [®]	98,08	p.a.	Carl Roth

Tabelle 2-5: Pufferbestandteile

Bezeichnung	Beschreibung, Synonym oder Summenformel	M_r ($g \cdot mol^{-1}$)	Reinheit	Bezugsquelle
Glycerol	$C_3H_8O_3$	92,09	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	238,31	> 99,5 %	Carl Roth
Natriumchlorid	NaCl	58,44	> 99 %	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	$C_{12}H_{25}NaO_4S$, SDS	288,38	≥ 99 %	Carl Roth
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	121,4	≥ 99 %	Carl Roth

Tabelle 2-6: Gase

Gas	Abkürzung	Reinheit	Bezugsquelle
Argon	Ar	99,99 %	Sauerstoffwerk, Friedrichshafen
Druckluft	-	N.A.	Kompressoranlage Silent Air System SAS-062 Dürr Technik
Stickstoff	N_2	99,99 %	Sauerstoffwerk, Friedrichshafen

Tabelle 2-7: Standardkits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Hersteller</i>
CellTiter-Glo® (CTG) Luminescent Cell Viability Assay	Kit zur Untersuchung der Zellvitalität mittels Luziferasereaktion	Promega
Cholesterol FS 10'	Kit zur Cholesterol Quantifizierung	DiaSys
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Kit zur Quantifizierung des Proteingehaltes	Thermo Scientific

Tabelle 2-8: Sonstige Chemikalien und Reagenzien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung, Synonym oder Summenformel</i>	<i>M_r (g·mol⁻¹)</i>	<i>Reinheit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Acrylamid-, Bisacrylamid- Stammlösung (29 : 1)	Rotiphorese® Gel 40	-	-	Carl Roth
Ammonium- heptamolybdat- tetrahydrat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	1235,86	≥ 99 %	Merck
Ammonium- peroxisulfat	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , APS	228,19	≥ 98 %	Merck
Arsen-Standard	H ₃ AsO ₄ in HNO ₃ 0,5 M, 1 mg·L ⁻¹ As, Certipur®	As: 74,92	ICP, AAS grade	Merck
Arsentrioxid	ATO, As ₂ O ₃	197,84	puriss. p.a.	Sigma-Aldrich
DAPI	4,6-Diamidino-2- phenylindol	277,32	-	Molecular Probes
FACS Clean	BD FACSClean™ Solution	-	-	BD Biosciences
FACS Flow	BD FACSTFlow™ Sheath Fluid	-	-	BD Biosciences
FACS Rinse	BD FACSRinse™ Solution	-	-	BD Biosciences
Fiske Subbarow Reducer	Reagenz aus 1-Amino-2- naphthol-4-sulfonsäure, Natriumsulfit und -bisulfit	-	-	Sigma-Aldrich
Goat anti-Human IgG (H+L)	Polyklonaler, sekundärer anti-Human Antikörper, Alexa Fluor® 488 gekoppelt (2 mg·mL ⁻¹)	-	-	Thermo Scientific
InstantBlue™	Reagenz aus Coomassie® zur Proteinfärbung	-	-	Expedeon

Bezeichnung	Beschreibung, Synonym oder Summenformel	M_r ($g \cdot mol^{-1}$)	Reinheit	Bezugsquelle
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	136,09	> 99 %, p.a.	Carl Roth
L-Histidin	$C_6H_9N_3O_2$, His	155,15	Ph. Eur.	Sigma-Aldrich
Magnesium-Matrixmodifizier	für Graphitofen-AAS $c(Mg) = 10,0 \pm 0,2 g \cdot L^{-1}$ ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ in HNO_3 , ca. 17 %)	-	ICP, AAS grade	Merck
Nickelacetat-tetrahydrat	$Ni(OCOCH_3)_2 \cdot 4 H_2O$	248,84	99,998 %	Sigma-Aldrich
Nickel-Standard	$Ni(NO_3)_2$ in HNO_3 0,5 M, 1000 $mg \cdot L^{-1}$ Ni Certipur®	Ni: 58,69	ICP, AAS grade	Merck
Palladium-Matrixmodifizier	für Graphitofen-AAS $c(Pd) = 10,0 \pm 0,2 g \cdot L^{-1}$ ($Pd(NO_3)_2 / HNO_3$ ca 15 %)	-	ICP, AAS grade	Merck
ProLong® Diamond	Antifade Mountant	-	-	Thermo Scientific
PageRuler™	Größenstandard für SDS-PAGE	10-180 kDA	-	Thermo Scientific
Resazurin	$C_{12}H_6NNaO_4$ 7-Hydroxy-3H- phenoxazin-3-on-10- oxid, Natriumsalz	251,17	Zellkultur- qualität	Sigma-Aldrich
Tetramethyl-ethylendiamin	$C_6H_{16}N_2$, TEMED	116,21	99 %, p.a.	Carl Roth
Triton® X-100	Alkylphenyl- polyethylenglykol, nichtionisches Detergens	576,6	reinst	Carl Roth
Wasserstoffperoxid	H_2O_2 , 30 % Lösung	34,01	ACS Qualität	Sigma-Aldrich

2.2.2 Puffer

Tabelle 2-9: Verwendete Puffer

Puffer	Abkürzung	Zusammensetzung	pH
HEPES 10 mM, isotonisiert mit Glycerol	HBG	HEPES (10 mM) Glycerol 2,5 % (m/m) HCl / NaOH	7,4
HEPES 10 mM, isotonisiert mit NaCl (HEPES buffered saline)	HBS	HEPES (10 mM) NaCl (140 mM) HCl / NaOH	6,8 und 7,4
Phosphatpuffer (phosphate buffered saline) mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Dulbecco's PBS w/w Ca ²⁺ /Mg ²⁺	NaCl (137 mM) KCl (2,68 mM) Na ₂ HPO ₄ (7,81 mM) KH ₂ PO ₄ (1,47 mM) CaCl ₂ (1 mM) MgCl ₂ · H ₂ O (0,5 mM)	7,4
Phosphatpuffer (phosphate buffered saline) ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Dulbecco's PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	NaCl (137 mM) KCl (2,68 mM) Na ₂ HPO ₄ (7,81 mM) KH ₂ PO ₄ (1,47 mM)	7,4
SDS-PAGE-Laufpuffer (Running buffer)	1x RB	Tris (25 mM) Glycin (190 mM) SDS 0,1 % (m/V)	8,3
SDS-PAGE-Probenpuffer (4x) (Reducing sample buffer)	4x RSB	Tris (125 mM) SDS 4 % (m/V) Glycerol (2,17 M) β-Mercaptoethanol 9 % (V/V) Bromphenolblau 0,05 % (m/V)	-
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	-	Tris (0,5 M) SDS 0,4 % (m/V)	6,8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	-	Tris (1,5 M) SDS 0,4 % (m/V)	8,8

2.2.3 Zellkultur

Tabelle 2-10: Verwendete Neuroblastomzelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Kulturmedien und Zusätze	Bezugsquelle
Kelly	VLE RPMI 1640 + 10 % FCS	DSMZ, Braunschweig
SK-N-AS		
SH-SY5Y		Prof. Dr. Rupert Handgretinger, UKT
LS		

Tabelle 2-11: Reagenzien zur Zellkultivierung und Aufarbeitung

Bezeichnung und Beschreibung	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO), Zellkulturqualität	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert, filtriert (< 0,22 µm)	
Gelatine, Zellkultur getestet	Sigma-Aldrich
PBS mit/ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom
Trypsin 0,5 % / EDTA 0,25 %	
Very-low-endotoxin (VLE) RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin), steril	

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-12: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Beschreibung / Produkt	Bezugsquelle
Bördelkappen	Rotilabo® Alukappen mit Septum (Silikon)	Carl Roth
Centrisart I	100 kDa cut off, aus PES	Sartorius
Deckgläschen / Objektträger	Deckgläschen Ø 12 mm	Langenbrinck
Einmalküvetten	Plastibrand PMMA makro 2,5 - 4,5 mL	Brand
Einmal-Pasteurpipetten	Transferpipette aus LD-PE 3,5 mL	Sarstedt
Einmalspritzen	Injekt® Solo 5, 10, 20 mL Luer Omnifix® Solo 1, 30, 50 mL Luer / Lock	B. Braun
	BD 10 mL Luer-Lok™	BD Biosciences
FACS Röhrchen	Falcon® 5 mL Round-Bottom Tube, PS, steril,	Corning
Filter 0,22 µm zur Partikel- und Entkeimungsfiltration	<i>Spritzenvorsatzfilter:</i> Minisart® NML Ø 28 mm, CA, (un-)steril Millex®-GV Ø 13 mm, PVDF, steril Millex®-GS Ø 25 mm, MCE, steril Rotilabo® Spritzenfilter Ø 33 mm, PES, steril	Sartorius Merck Merck Carl Roth
	<i>Membranfilter für große Volumina:</i> Sartolab-P20, Ø 64 mm, CA, steril	Sartorius
Gelmaterialien (SEC)	Sepharose™ CL-4B: Quervernetzte Agarose	GE Healthcare
Glasgefäße	Rundkolben, Bechergläser, Messzylinder, Flaschen, Reagenzgläser etc.	Brand / Schott
Glaspasteurpipetten	150 und 230 mm	Brand

Bezeichnung	Beschreibung / Produkt	Bezugsquelle
Graphitrohre für AAS	THGA graphite tubes with end cap for AAnalyst 600	Perkin Elmer
HPLC-Vials	Klarglas 1,5 mL Gewindeflasche 8 mm	Zitt-Thoma
Kanülen	Sterican® Ø 0,8 und 0,9 (mm) verschiedene Längen	B. Braun
Lyophilisationsstopfen	Stopfen aus Butylgummi, grau, 13 mm	Zitt-Thoma
Mikroreaktionsgefäße	0,5/1,5/2 mL aus PP „Safe Seal“ 1,5 und 2 mL	Greiner Bio-One Sarstedt
Mikrotiterplatten	Rotilabo® Mikrotiter-Platten, 96-well, F-Profil, transparent	Carl Roth
	BRANDplates®, pure grade, 96-well, F-Boden, schwarz / weiß	Brand
Pipettenspitzen	verschiedene Größen	Eppendorf
Polycarbonatmembranen	Nuclepore® 80 und 200 nm Porenweite	Whatman
Probengefäße für AAS	2,5 mL disposable sampling cups aus PP	Perkin Elmer
Reaktionsgefäße „Blue Cap“	aus PP 15 mL oder 50 mL, steril	Greiner Bio-One
Rollrandflaschen	Klarglas, 2,5/5/10 mL	Zitt-Thoma
Spitzen für Multipette	Combitip plus (2,5/5/10/25 mL)	Eppendorf
Vivaspin 2	10 kDa cut off, PES, 2 mL-8 µL	Sartorius
Zellkulturpipetten	CoStar® Stripette® aus PS, steril; 2, 5, 10, 25 mL	Corning
Zellkulturplatten	Falcon™ Tissue Culture Plates (24, 96-well) Flat-bottom with lid, steril	Corning
Zellkulturschalen	Cellstar® Cell Culture Dishes (Ø 100 mm x 20 mm) aus PS, steril	Greiner Bio-One
Zytostatika-Handschuhe	Berner Manu N Z+ B+	Berner
Zytostatika-Unterlage	Barrier, Adhesive OP-Towel 75x50 cm, steril	Mölnlycke

Tabelle 2-13: Wasserqualitäten

Bezeichnung	Qualität	Herstellverfahren	Bezugsquelle
Gereinigtes Wasser	Leitfähigkeit < 1 µS·cm ⁻¹	Herstellung durch Ionenaustausch (Mischbettverfahren) aus Trinkwasser	Hausanlage, Hydrotec T. Opitz, Freiburg
Reinstwasser	Leitfähigkeit < 0,055 µS·cm ⁻¹	Herstellung aus gereinigtem Wasser durch Aktivkohlebehandlung, hochreinem Ionenaustausch, UV-Bestrahlung und Filtration (0,22 µm)	arium 611VF, Sartorius, Göttingen

2.3 Geräte

Tabelle 2-14: Liposomen-Herstellung

<i>Gerät</i>	<i>Typenbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Druckextruder	Lipex™ Basic Extruder	Northern Lipids
F12Y	Interaktionskammer für LV1 75 µm, Keramik	Microfluidics
Handextruder	LiposoFast 1000 µL	Avestin
Microfluidizer LV1	Microfluidizer® LV1 Probenvolumen 1-6 mL	Microfluidics

Tabelle 2-15: Atomabsorptionsspektrometrie

<i>Gerät</i>	<i>Typenbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
AAS-Software	WinLab32 for AA	Perkin Elmer
Arsen - Elektrodenlose Entladungslampe	As - Electrodeless Discharge Lamp mit Treiber SIMAA 6000 und 4110 ZL für AAnalyst 600	
Autosampler	AS-800 Autosampler	
Graphitofen- Atomabsorptions- spektrometer (AAS)	AAnalyst 600	
Kompressor	KNF-Membrankompressor für Druckluft	KNF
Kühlung	AAccessory Cooling System	Perkin Elmer
Nickel-Hohlkathodenlampe	(Ni)-hollow-cathode lamp (HCL), Ø 50 mm	

Tabelle 2-16: Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie

<i>Gerät</i>	<i>Typenbezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Kryo-Kammer	Kryo-Box 340719	Zeiss
Kryo-Probenbehälter	Model 626-DH	Gatan
Kupfer-Grids mit Kohlefilm bedampft	Quantifoil® S7/2 holey carbon film on 400 mesh copper grid	Quantifoil Micro Tools
TEM-Hochvakuumpumpe	TMH 071 P	Pfeiffer Vacuum
TEM-Kamera	Proscan HSC 2	Oxford Instruments
TEM-Software	TEM 5.0 Build 1054	Soft Imaging System
Transmissions- elektronenmikroskop (TEM)	LEO 912 Ω-mega	Zeiss

Tabelle 2-17: SDS-PAGE

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Folienschweißgerät	Vacupack Plus F 380-70	Krups
Glasplatten (normal und ausgeschnitten)	10 x 10 x 0,24 cm	VWR
Kämme	verschiedene Größen	
Keramikplatten (ausgeschnitten)	10 x 10 x 0,1 cm	
Netzgerät	peqPOWER E250	
Spacer-Set	0,8 und 1,5 mm	
Vertikales Doppeltgelsystem mit Gießstand	PerfectBlue™ Twin S	
Wipptisch	WT17	Biometra

Tabelle 2-18: Konfokale Mikroskopie

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Detektoren	2 Kanal Gallium Arsenid Phosphid (GaAsP) System	Zeiss
Inverses Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop	LSM 800, Axio Observer Z1	
Objektiv	C-Apochromat 63x/1.2 W Corr.	
Software	ZEN blue edition 2012	

Tabelle 2-19: Sonstige Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer 3870 EL	biomedis
Durchflusszytometer	FACSCalibur™ mit Cellquest™ Pro Software	BD Biosciences
	BD LSRFortessa™ mit FACSDiva™ Software	
Evaporationszentrifuge	Vakuumkonzentrator RVC-2-18	Martin Christ
Hamiltonspritzen	10, 50, 100, 500 µL	Hamilton
Heizschrank	Binder APT.line™	Binder
Hochvakuumpumpe	RD4	Vacuubrand
Inkubator	Binder CB 150, CO ₂ Inkubator	Binder
Lyophilisator	Tischlyophilisator Alpha 2-4 Christ	Martin Christ
Magnetrührer, beheizbar	Ikamag Ret-G	IKA

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Microplate Reader zur Fluoreszenz- und Lumineszenzanalyse	Berthold Tristar LB 941 multimode microplate reader mit Software MicroWin 2000	Berthold
Microplate Reader zur Absorptionsmessung	Eon™ Microplate Spectrophotometer mit Software Gen5 2.0	BioTek
Minischüttler	Vortexer Reax Control	Heidolph
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved® Zählkammer	Carl Roth
pH-Meter	Seven Compact mit Elektroden Inlab Expert Pro und Inlab Micro Pro ISM	Mettler-Toledo
Photonenkorrelations-spektrometer	Zetasizer Nano ZS Series	Malvern
Pipetten für organische LM	Gilson Microman 10, 250, 1000 µL	Gilson
Pipetten für wässrige Systeme	Eppendorf Research® 10-5000 µL	Eppendorf
Pipetten zur Mehrfachdosierung	Multipette® plus	Eppendorf
Pumpen	Schlauchquetschpumpe Pumpdrive 5006	Heidolph
	Kolbenhubpumpe P-500 pulsationsarm	Biotech
Rotationsverdampfer	Heidolph Hei-Vap Advantage mit Vakuumpumpe SC920	Heidolph KNF
Säulen für die Größenausschluss-chromatographie	Glass Econo Column Länge 15 cm, ID 0,7 cm oder 1,5 cm	Bio-Rad
Schüttler, temperierbar	Thermomixer® Comfort	Eppendorf
	BioER Mixing Block MB-102	Bioer
Sicherheitswerkbänke	BDK S 1800 (Zellkultur)	BDK
	Herasafe (Zytostatika-Zubereitung)	Heraeus
Spektrophotometer	Ultrospec 2000	Pharmacia
Thermoblock	Metall-Block-Thermostat MBT 250-4	ETG
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 255 H	Bandelin
Waagen	Analysenwaage: AT261 Delta Range	Mettler-Toledo
	Laborwaage: Sartorius Universal PRO 32/34F	Sartorius
Wasserbäder, temperierbar	HB4 basic (Liposomenpräparation)	IKA
	GFL 1083 (Zellkultur)	GFL
Zellkultur-Mikroskop	Axiovert 25 CFL CP-Achromat 5x/0,12 LD Achromat 20x/0,3 Ph1 LD Achromat 40x/0,55 Ph2	Zeiss
Zentrifugen	Centrifuge 5804 R und 5402	Eppendorf
	Universal 320	Hettich

3 Methoden

3.1 Liposomenherstellung

3.1.1 Allgemeines Vorgehen bei der Filmmethode

Herstellungsgrundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Liposomen war die erstmals von Bangham beschriebene Bildung eines dünnen Lipidfilms in einem Rundkolben (Bangham et al. 1965). Um Diskontinuitäten bei der Einwaage vorzubeugen, wurden für kleinere Liposomenansätze und geringere Lipidkonzentrationen (*in-vitro*-Versuche 2 mL, 20 mM) Stammlösungen der einzelnen Phospholipide (PL) und Cholesterol hergestellt. Die Komponenten wurden hierfür in geeigneter Konzentration in Chloroform (CHCl_3) gelöst und anschließend in HPLC-Vials aliquotiert. Die Größe der Aliquots wurde dabei so gewählt, dass die enthaltene Lipidmenge einer 1-mL-Liposomendispersion geforderter Molarität entsprach. Das Lösungsmittel wurde anschließend in einer Evaporationszentrifuge (Vakuumpkonzentrator RVC-2-18) bei 38 °C über 40 min entfernt. Die getrockneten Lipidaliquots wurden mit Argon überschichtet, bei -26 °C gelagert und konnten so bis zu 6 Monate verwendet werden.

Zur Herstellung des Lipidfilms wurden die Aliquots im Exsikkator aufgetaut, das Lipid in Chloroform gelöst und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in einen mit Ethanol gesäuberten und getrockneten Rundkolben überführt. Das HPLC-Vial wurde weitere drei Mal mit CHCl_3 nachgespült, um Lipidverluste beim Transfer zu minimieren.

Bei Ansätzen mit größeren Volumina und höheren Lipidkonzentrationen (*Upscaling*-Versuche vgl. 3.1.3.1 und 3.1.3.2) wurden die Lipidbestandteile direkt in einen 500-mL-Rundkolben eingewogen. Der Ansatz wurde mit einer dem Endvolumen der Liposomendispersion entsprechenden Menge CHCl_3 versetzt und alle Bestandteile im Wasserbad bei 40 °C vollständig gelöst.

Bei beiden Verfahren (Herstellung über Stammlösungen oder Direkteinwaage) wurde das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 350 hPa langsam eingeeengt. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels wurde der Lipidfilm für weitere 15 min am Rotationsverdampfer bei 10 hPa nachgetrocknet. Abschließend wurde der Ansatz am Hochvakuum mindestens weitere 3 h getrocknet, um restliche Lösungsmittelrückstände zu entfernen. Der fertige Lipidfilm wurde, falls nicht direkt verwendet, mit Argon überschichtet und bei -26 °C bis zur späteren Verwendung gelagert.

3.1.2 Zusammensetzung der Liposomen

Alle im Folgenden verwendeten Liposomen-Zusammensetzungen basieren auf lehrstuhlinterne Vorgängerarbeiten (Müller 2013, Züfle 2016) und sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der verwendeten Liposomen

<i>Lipidkomponenten</i>	<i>Molares Verhältnis (mol %)</i>	<i>Molarität (mM)</i>	<i>Volumen*</i>
ESM/Chol	70/30	25	10 mL
		20	10 mL
ESM/Chol/DSPE-mPEG	66,7/28,5/4,8	20	2, 6 oder 10 mL
		40	6 mL
		60	6 mL
		100	6 mL

* bezieht sich auf das bei der Hydratisierung des Lipidfilms eingesetzte Volumen der wässrigen Phase

Für durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde dem Lipidfilm bei der Herstellung zusätzlich 0,5 mol %, bezogen auf die Stoffmenge Gesamtlipid, des Fluoreszenzmarkers Rhodamin-DPPE (Rh-PE) zugesetzt. Dieses lag als methanolische Stammlösung in einer Konzentration von 1 mg·mL⁻¹ vor und wurde bei -26 °C gelagert.

3.1.3 Herstellung der Liposomendispersion

Da die Phasenübergangstemperaturen (T_c) von Lipidmischungen aus Ei-Sphingomyelin (ESM) und Cholesterol (Chol) über der Raumtemperatur liegen ($T_c \approx 40$ °C) (Mannock et al. 2003), wurden der Lipidfilm sowie die wässrige Phase (siehe Tabelle 3-2) vor und während des Hydratisierens im Wasserbad auf 70 °C temperiert (Müller 2013). Anschließend wurde der Lipidfilm für weitere 2 h im Wasserbad bei 70 °C quellen gelassen. Eventuell undispergierte Filmreste wurden mit Hilfe eines Vortexers vorsichtig von der Kolbenwand abgelöst. Die so entstandene Dispersion aus *multilamellar large vesicles* (MLV) wurde anschließend über Extrusion oder Mikrofluidisierung in eine homogene Dispersion aus *large unilamellar vesicles* (LUV) überführt (siehe 3.1.3.1 und 3.1.3.2).

Tabelle 3-2: Wässrige Phasen zur Hydratisierung

<i>Wässrige Phase</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Zusammensetzung/Konzentration</i>
<i>Hepes buffered saline</i> pH 6,8 und 7,4	HBS	HEPES (10 mM) NaCl (140 mM)
Isotoner HEPES-Glycerol-Puffer pH 7,4	HBG	HEPES (10 mM) Glycerol 2,5 % (w/w)
Nickelacetatlösung	Ni(OAc) ₂	300 oder 750* (mM)

* Bei den über Mikrofluidisierung hergestellten Liposomen wurde der Lipidfilm zuvor in 750 mM Ni(OAc)₂-Lösung hydratisiert.

3.1.3.1 Extrusion

Zur Homogenisierung der MLV-Dispersion wurde diese durch in Puffer vorgequollene Polycarbonatmembranen definierter Porengröße extrudiert (Hope et al. 1985). Zunächst wurde hierfür ein Liposofast® Handextruder mit einem maximalen Füllvolumen von 1 mL verwendet. Um ein *Upscaling* des Herstellungsverfahrens zu ermöglichen wurde für größere Ansätze ein Druckextruder (Lipex™ Basic), der über ein Füllvolumen von 10 mL verfügte, eingesetzt. Aufgrund der erhöhten Phasenübergangstemperatur (T_c) wurde auch die Extrusion bei 70 °C im Wasserbad bzw. über Beheizung der im Druckextruder enthaltenen Heizspirale durchgeführt. Die Anzahl der Extrusionsschritte wurde dabei der gewünschten Liposomengröße angepasst. Die jeweiligen Größen sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Tabelle 3-3: Parameter der Liposomenherstellung mittels Extrusion

<i>Zusammensetzung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Extrusionsschritte</i>	<i>Volumen pro Extrusionsschritt</i>
ESM/Chol 25 mM	Handextrusion	21 x 200 nm 51 x 80 nm	1 mL
ESM/Chol 20 mM	Druckextrusion	11 x 200 nm 11 x 80 nm	10 mL
ESM/Chol/DSPE-mPEG 20 mM		7 x 200 nm 2 x 80 nm	10 mL

3.1.3.2 Mikrofluidisierung

Da die Gesamtlipidkonzentration bei der Druckextrusion aufgrund starker Beanspruchung der Polycarbonatmembran bei ESM/Chol-Liposomen auf 20 mM limitiert war, wurde als alternatives *Upscaling*-Verfahren die Mikrofluidisierung mittels Microfluidizer® LV1 (Low Volume Microfluidizer®) getestet.

Die im Gerät verwendete Kammer (F12Y) verfügt über eine besondere Y-förmige Geometrie (vgl. Abbildung 3-1, rechts). Die flüssigkeitsführenden Teile der Kammer sind aus beständiger Keramik gefertigt. Nach dem Probeneinlass wird die Flüssigkeit in zwei Teile getrennt und durch enge Kanäle (75 µm Breite) gepresst. Hierbei kommt es zu einer starken Beschleunigung (hoher dynamischer Druck) und Scherung der Probe (Scherzone). An die Scherzonen schließt sich eine Impaktionszone an, in der die Flüssigkeitsstrahlen aufeinanderprallen. Durch die großen Impaktionskräfte kommt es hier zu einer weiteren Zerkleinerung der Teilchen.

Die Y-Kammer eignet sich daher besonders gut zur Herstellung von Emulsionen sowie Nanoemulsionen (Microfluidics 2014, Grapentin 2016).

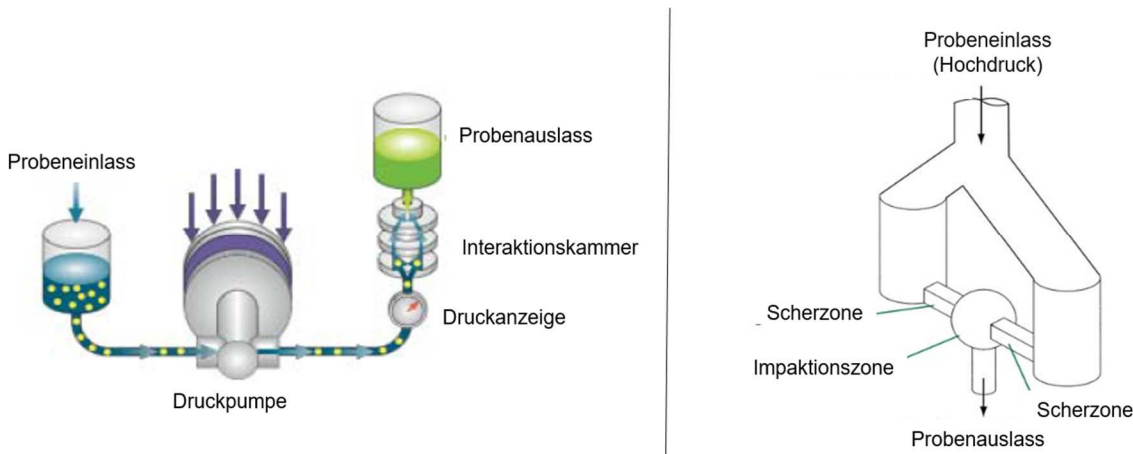


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Mikrofluidisierungs-Prozesses.

(Links) Das Produkt wird mit Hilfe einer hydraulischen Druckpumpe in die Interaktionskammer geleitet. Beim LV1 wird, abweichend zu dieser Darstellung, die Probe nicht über ein Manometer geführt, sondern nur der Kompressionsdruck der Druckpumpe angezeigt. **(Rechts)** Aufbau und Funktionsprinzip der Y-Kammer: Die Probe wird nach dem Probeneinlass in zwei Hälften unterteilt, welche schmale (75 µm) Kanäle (Scherzonen) passieren und abschließend in der Impaktionszone miteinander kollidieren. (Die Abbildungen wurden aus Microfluidizer® processor user guide 2014 übernommen und leicht modifiziert).

Durchführung

Alle Flüssigkeiten wurden vor der Verwendung entgast, um einer Schädigung der Kammer durch Kavitation entgegenzuwirken. Außerdem wurde die Kammer vor jeder Verwendung entlüftet und anschließend 10-mal mit je 6 mL entgastem Reinstwasser gespült. Während dieser Spülgänge konnte der gewünschte Prozessdruck zur Liposomenherstellung eingestellt werden.

Bei der Probenvorbereitung war darauf zu achten, dass in der mit Probe befüllten 10 mL Spritze (Luer-Lock™) keine Luftblasen enthalten waren. Die Spritze wurde auf den Probeneinlass gesetzt und die Probe über die hydraulische Pumpe in das Gerät gesaugt. Nachdem sich der Prozessdruck aufgebaut hatte, wurde die Probe über einen Kompressionshub der Pumpe in die Interaktionskammer gepresst, homogenisiert und konnte am Ende über eine Spritze am Probenauslass entnommen werden (Abbildung 3-1 links). Dieser Vorgang entsprach einem Mikrofluidisierungs-Zyklus und wurde so lange wiederholt, bis Liposomen gewünschter Größe und Polydispersität erhalten wurden (vgl. Kapitel 3.2.1.1). Wenn in den entsprechenden Kapiteln nicht anders angegeben, wurden die Liposomen bei 3 000 psi (\approx 207 bar) über 8 Zyklen hergestellt.

Da die Phasenübergangstemperatur der ESM/Chol Mischung, wie bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnt, oberhalb der Raumtemperatur liegt, hatte die mit dem Mikrofluidisierungs-Prozess einhergehende Probentemperaturerhöhung keine negativen Auswirkungen. Es konnte daher auf eine Kühlschleife am Probenauslass verzichtet werden, wodurch der prozessbedingte Probenverlust minimiert wurde.

3.2 Liposomencharakterisierung

3.2.1 Bestimmung der Partikelgröße

3.2.1.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), auch dynamische Lichtstreuung (DLS) genannt, ist eine Methode zur Bestimmung der Größe kolloidaler Teilchen. Die Messung beruht auf zwei Charakteristika kolloidaler Systeme: dem Tyndalleffekt (Lichtstreuung) und der Brown'schen Molekularbewegung.

Sie bietet somit eine Möglichkeit der Qualitätsbeurteilung liposomaler Formulierungen bezüglich Größe, Größenstabilität sowie Größenverteilung der Vesikel. Die Technik gestattet eine schnelle Bewertung der Qualität neu getesteter Liposomen-Herstellungsmethoden, wie z. B. der Mikrofluidisierung.

Zur Bestimmung der erwähnten Parameter wird die Probe in einer Messküvette mit Laserlicht ($\lambda = 633 \text{ nm}$) bestrahlt, wodurch Partikel innerhalb der Probe das eingestrahlte Licht in alle Richtungen streuen. Ein Detektor, welcher sich im 173° -Winkel zur eingestrahlichten Lichtquelle befindet, registriert die Intensität des einfallenden Streulichts (Malvern 2008). Die Brown'sche Molekularbewegung der Teilchen führt zu einer zeitabhängigen Fluktuation der Streulichtintensität am Detektor. Da sich kleine Teilchen schneller als große bewegen, führen diese zu einer schnelleren Veränderung der Streulichtintensität über die Zeit. Mit Hilfe eines Korrelators wird die Ähnlichkeit der Streulichtintensitäten in eine zeitabhängige Funktion überführt und der translationale Diffusionskoeffizient bestimmt (Hassan et al. 2015).

Die Beziehung zwischen Partikelgröße und Brown'scher Molekularbewegung ist durch die Stokes-Einstein Gleichung (siehe Formel 1) gegeben. Bei bekannter Temperatur und Viskosität des Mediums kann über sie der intensitätsgewichtete mittlere hydrodynamische Durchmesser d_h (Z-Average) berechnet werden.

$$D = \left(\frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \right)$$

Formel 1

- D Diffusionskoeffizient ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
- k Boltzmann-Konstante ($\text{N} \cdot \text{m} \cdot \text{K}^{-1}$)
- T absolute Temperatur (K)
- η dynamische Viskosität des Mediums ($\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$)
- r hydrodynamischer Radius (m)

Ein limitierender Faktor der DLS ist die eingeschränkte Anwendbarkeit bei polydispersen Systemen. Größere Partikel führen bei der Messung zu höheren Streulichtintensitäten und werden daher in der Berechnung stärker gewichtet. Dadurch ist es möglich, dass wenige sehr große Partikel den d_h hin zu größeren Werten verschieben.

Ein weiterer Parameter, der bei der PCS-Messung erhalten wird, ist der Polydispersitätsindex (PDI), welcher die Größenverteilung um den Wert des mittleren d_h beschreibt. Er kann Werte von 0 bis 1 annehmen und ist ein Maß für die Homogenität der Probe. Bei Werten von $< 0,1$ wird die Verteilung als monodispers angesehen. Die ermittelten d_h können bei monodisperser Verteilung als exakt beurteilt werden. Ein PDI zwischen 0,1-0,2 zeigt eine enge Größenverteilung. Für eine genaue Bestimmung der Partikelgröße sollten allerdings weitere Methoden z. B. die Kryotransmissions-Elektronenmikroskopie (Kryo-TEM vgl. 3.2.1.2) herangezogen werden (Hassan et al. 2015).

Durchführung

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern) vermessen. Um Messfehler durch Staub oder andere Partikel zu vermeiden, wurden alle Halbmikroküvetten (1,5 mL) PMMA vor der Verwendung mit Druckluft gereinigt und die Probe jeweils mit filtriertem ($< 0,22 \mu\text{m}$) Puffer verdünnt (Lipidkonzentrationsbereich 10-300 μM). Vor Messbeginn wurde die Probe für 120 s auf 25 °C äquilibriert.

Eine Messung bestand aus drei Durchgängen zu je 15 Einzelmessungen. Messposition des Lasers und Laserintensität (*Attenuator Level*) wurden vor der Messung vom Gerät automatisch eingestellt.

Tabelle 3-4: Parameter der PCS Messung

<i>Puffer</i>	<i>Viskosität (mPa·s)</i>	<i>Brechungsindex</i>
Hepes buffered saline HBS	0,8893	1,332
Isotoner HEPES-Glycerol-Puffer HBG	0,9333	1,333
Liposomen	Viskosität des jeweils verwendeten Messpuffers verwendet	1,480

3.2.1.2 Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

Alle in dieser Arbeit gezeigten Kryo-TEM Aufnahmen wurden von Sabine Barnert (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg), erstellt.

Die Kryo-TEM als Methode zur Charakterisierung der Liposomengröße bietet im Vergleich zur DLS den Vorteil, Aussagen über die Lamellarität und Form der in der Probe enthaltenen Liposomen treffen zu können. In dieser Arbeit wurde sie daher vor allem zur morphologischen Charakterisierung der mittels Mikrofluidisierung hergestellten Liposomen angewandt.

Um eine Überlagerung der Liposomen bei der Untersuchung zu minimieren, wurden die Proben auf eine Lipidkonzentration von 5-10 mM mit Probenpuffer verdünnt. Für ungesäulte, Nickelacetat-haltige Proben mussten die Proben stärker verdünnt werden (Endkonzentration $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ maximal 60 mM), um Bilder mit ausreichend hohem Kontrast zu erhalten.

Durchführung

Für die Probenvorbereitung wurden ungefähr 5 μL der Dispersion auf ein mit perforiertem Kohlefilm überzogenes Kupfergrid (400 mesh Quantifoil®) aufgetragen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier entfernt. Danach wurde die Probe sofort in flüssiges Ethan injiziert und dadurch vitrifiziert.

Die Aufarbeitung erfolgte in einer klimakontrollierten Umgebung durch Einsatz einer CryoBox 340719 (Bellare et al. 1988). Die Fixierung des Kupfergrids am Probenstab und das folgende Einführen in das Transmission-Elektronenmikroskop (LEO 912 Ω -mega) wurden unter Stickstoffbegasung ($-183,15\text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen entstanden bei 120 keV in 6 300- oder 12 500-facher Vergrößerung (Proscan HSC 2).

Für eine korrekte Beurteilung der Präparation mittels Kryo-TEM ist darauf zu achten Bilder von unterschiedlichen Positionen des Grids aufzunehmen. Aufgrund der unterschiedlichen Filmstärke ordnen sich Partikel entsprechend ihrer Größe an. Bei konkaver Struktur finden sich größere Partikel eher am Rand, bei konvexer Form dagegen in der Mitte des Films (siehe Abbildung 3-2). Da die maximale Schichtdicke des vitrifizierten Probenfilms bei $\approx 500\text{ nm}$ liegt, kann es zum Ausschluss sehr großer Partikel ($> 500\text{ nm}$) kommen (Almgren et al. 2000).



Abbildung 3-2: Abhängigkeit der Partikelanordnung von der Form des Probenfilms

(Links) Konkave Form des vitrifizierten Flüssigkeitsfilms mit großen Partikeln am Rand. (Rechts) Konvexe Form, Anordnung großer Partikel in der Filmmitte.

3.2.2 Bestimmung der Lipidkonzentration

3.2.2.1 Phosphatgehaltsbestimmung nach Bartlett

Die Kenntnis des Phospholipidgehalts liposomaler Formulierungen ist in dieser Arbeit vor allem für spätere Berechnungen der Oberflächenmodifikation mit GD_2 -Antikörpern und zur Einschätzung der Wirkstoff-Beladungskapazitäten über Berechnung des Wirkstoff-Lipid-Verhältnisses von Bedeutung (siehe Kapitel 3.3.2.3 und 3.5.1.2). Sie dient als Standardcharakterisierungsmethode von liposomalen Zubereitungen, um z. B. Chargengleichheit zu gewährleisten.

Der Phospholipidgehalt jeder Probe wurde nach dem von Bartlett beschriebenen Phosphat-Assay quantifiziert (Bartlett 1959). Hierbei wurde zunächst der organische Phosphor mit Hilfe von Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid oxidativ zu anorganischem Phosphat verascht. Durch Zugabe von Ammoniummolybdat und Fiske-Subarrow-Reducer (Fiske & Subbarow 1925) bildete sich ein Molybdänblaukomplex, der photometrisch ($\lambda = 830 \text{ nm}$) vermessen werden konnte.

Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Phospholipide (PL) je ein Phosphoratom pro Molekül enthalten, entsprach der ermittelte Phosphatgehalt direkt der Phospholipidkonzentration der Probe.

Andere Membranbestandteile wie z. B. Cholesterol konnten über diese Methode nicht quantifiziert werden. Hierfür standen alternative Verfahren wie z. B. ein enzymatischer Cholesterol-Assay (siehe auch Kapitel 3.2.2.2) oder *high-performance-thin-layer-chromatography* (HPTLC)-Methoden (Holzer et al. 2010) zur Verfügung. Über das bei der Herstellung eingesetzte molare Verhältnis von Phospholipid zu Cholesterol, aber auch durch Kenntnis des Gehalts einer der Komponenten, konnte die Gesamtlipidkonzentration berechnet werden.

Durchführung

Die Proben wurden in phosphatfreie Reagenzgläser auf 0,1 mg genau eingewogen. Das Probenvolumen wurde dabei so gewählt, dass die enthaltene Stoffmenge an Phosphat zwischen 100-200 nmol lag. Bei hochkonzentrierten Proben wurden die Liposomen mit phosphatfreiem Puffer verdünnt, um Wäageungenauigkeiten zu vermeiden. Aus einem 1 mM Phosphatstandard (KH_2PO_4) wurden für eine Kalibriergerade 50-350 nmol Phosphat eingewogen. Als Blindwert diente ein leeres Reagenzglas, welches im Folgenden wie die Proben behandelt wurde.

Nach Zugabe von 500 μl 10 N Schwefelsäure (H_2SO_4) wurden die organischen Bestandteile der Probe über 3 h bei 160 °C verascht. Im Anschluss wurden jeweils 200 μL H_2O_2 (30 % V/V) zugegeben, gründlich gevortext und die Ansätze für weitere 1,5 h bei 160 °C inkubiert. Die Zugabe von 4,5 mL einer 0,22 %igen Ammoniummolybdat-Lösung, 200 μl einer frisch hergestellten 14,8 %igen (m/V) Lösung des Fiske-Subarrow-Reducers und anschließende Inkubation bei 95 °C für 10 min führten zur Bildung des Molybdänblau-Komplexes. Um eine Aufkonzentrierung der Probe durch Verdampfen der Lösung zu vermeiden, wurden die Reagenzgläser während des Erhitzens mit Glasmurmeln verschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben photometrisch bei $\lambda = 830 \text{ nm}$ (Ultrospec 2000) vermessen und der Phosphatgehalt über die erstellte Kalibriergerade berechnet.

3.2.2.2 Bestimmung des Cholesterol-Gehalts mittels Enzym-Assay

Für die Bestimmung des Arsen/Lipid-Verhältnisses wurde die Gesamtlipidkonzentration über die Bestimmung des Cholesterolgehalts und das eingesetzte molare Verhältnis der Membrankomponenten berechnet. Arsen ist wie Phosphor ein Element der 5. Hauptgruppe des Periodensystems und bildet selbst Molybdänblau-Komplexe, womit eine Phospholipidbestimmung mittels Bartlett-Assay verfälscht werden würde (Bartlett 1959). Auch aus Toxizitätsgründen sollte auf das Erhitzen von Arsentrioxid mit Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid verzichtet werden.

Der kommerziell erhältliche Cholesterol FS Assay (DiaSys) basiert auf der enzymatischen Oxidation von Cholesterol zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid. Bei der anschließenden Trinder-Reaktion findet Peroxidase-katalysiert die Umsetzung von 4-Aminoantipyrin, Phenol und Wasserstoffperoxid zum photometrisch quantifizierbaren Chinonimin statt (Trinder 1969). Die dazugehörige Reaktionsgleichung ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

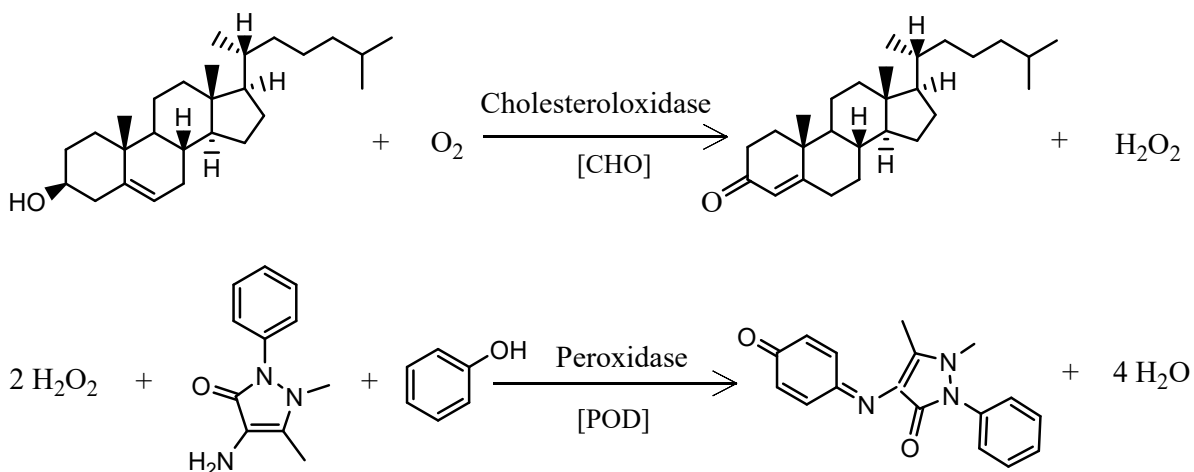


Abbildung 3-3: Reaktionsgleichung des Cholesterol FS Assays nach DiaSys (2015).

Durchführung

Abweichend zu den Herstellerangaben wurde die Messung nach Schmid (Schmid 2014) in Mikrotiterplatten durchgeführt. Aus dem vom Hersteller mitgelieferten Cholesterol-Standard ($c = 5,2 \text{ mM}$) wurden mit Reinstwasser 5 Kalibratorlösungen im Konzentrationsbereich von 0,26-3,9 mM Cholesterol, hergestellt. Liposomale Proben wurden gegebenenfalls so verdünnt, dass sie innerhalb dieses Kalibrationsbereichs lagen. Höhere Cholesterolkonzentrationen ($> 3,9 \text{ mM}$) konnten mit der Mikrotiterplatten-Methode nicht vermessen werden, da die Zugabe von 150 μL Reagenz dann nicht mehr für die vollständige Umsetzung zum Chinonimin ausgereicht hätte. Als Reagenzblindwert diente der bei der Liposomenherstellung verwendete Puffer.

Je 10 μL der Proben, Kalibratoren und des verwendeten Puffers wurden als Triplikate in die Vertiefungen einer transparenten Mikrotiterplatte (96-well) pipettiert und mit 150 μL Reagenz versetzt. Die Platte wurde mit Klebefolie abgedeckt und unter leichtem Schütteln 10 min bei 25 $^{\circ}\text{C}$ im Microplate-Reader (EonTM Microplate Spectrophotometer) inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Folie entfernt und die Platte photometrisch bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ vermessen. Der Cholesterolgehalt konnte anschließend über die erstellte Kalibriergerade berechnet werden.

3.3 Beladung der Liposomen mit Arsentrioxid (ATO)

Für eine stabile Verkapselung des bei der Neuroblastomtherapie eingesetzten Arsentrioxids (vgl. Kapitel 1.4.3.4 und 1.5) in Liposomen ist die vorherige Präzipitation mit Nickelacetat ($\text{Ni}(\text{OAc})_2$) essentiell (Züfle 2016). Hierfür wurde ein nach Chen et al. publiziertes *remote loading* Verfahren, welches durch ein vorheriges Beladen der Liposomen mit $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ gekennzeichnet ist, durchgeführt (Chen et al. 2006). Die intraliposomale Bildung des schwerlöslichen NiAs -Präzipitats sowie die einhergehende Freisetzung von Essigsäure in den extraliposomalen Raum triggern hierbei den ATO Einstrom (siehe Abbildung 3-4).

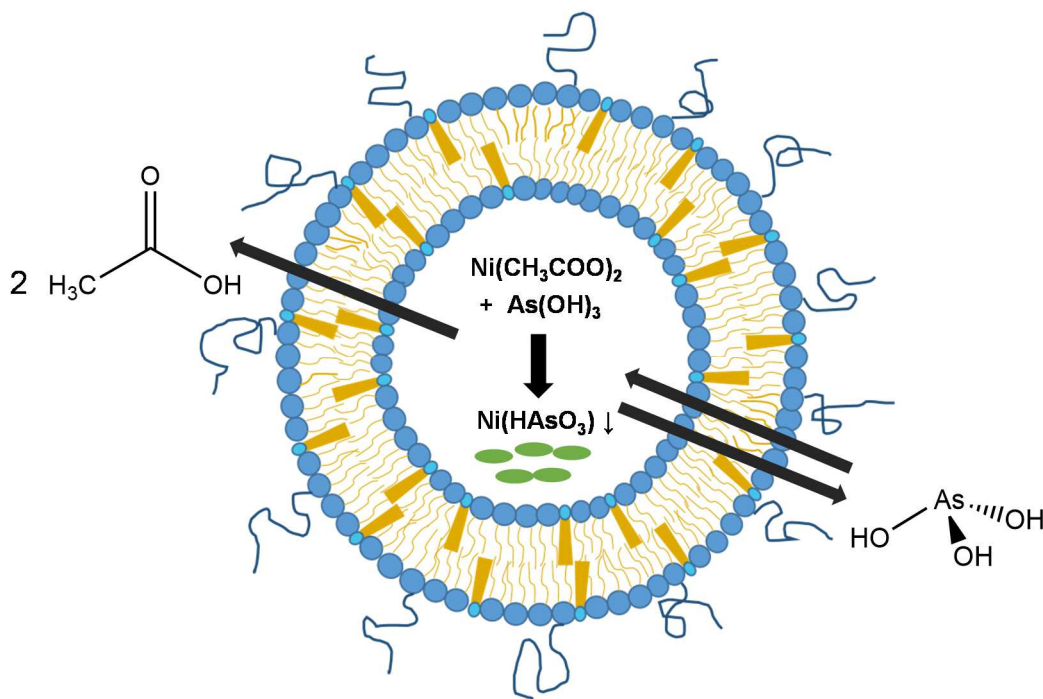


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des *remote loading* Verfahrens nach Chen et al. (2006)

3.3.1 Durchführung der ATO-Beladung

Da das molare Nickel/Arsen-Verhältnis des intraliposomalen Komplexes ungefähr 1:1 beträgt, ist die eingeschlossene Menge Arsentrioxid (ATO) direkt von der Konzentration des zuvor verkapselten $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ abhängig. In Vorgängerarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die Herstellung sogenannter *dehydration-rehydration-vesicles* (DRV) die intraliposomale $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Konzentration ($c_{\text{Ni}_{\text{Lip}}}$) bei ESM/Chol-Liposomen erhöht wurde und somit die Arsenkonzentration ($c_{\text{As}_{\text{Lip}}}$) um den Faktor 3-4 gesteigert werden konnte (Müller 2013). In nachfolgenden Untersuchungen konnte der positive Effekt der Gefriertrocknung (Lyophilisation) für ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen allerdings nicht bestätigt werden (Züfle 2016). Trotzdem ist die Bildung einer stabilen liposomalen Lagerform ein entscheidender Vorteil der Lyophilisation. Abbildung 3-6 (Seite 65) zeigt schematisch den Prozess der Liposomenherstellung, der ATO-Beladung und die dabei jeweils durchgeführte Analytik.

3.3.1.1 Herstellung und Lyophilisation von $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Liposomen

Die Herstellung der nickelhaltigen-Liposomendispersion erfolgte durch Hydratation eines dünnen Lipidfilms mit einer 300 mM $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Lösung und anschließende Extrusion analog 3.1.3. Je 500 μL dieser Liposomendispersion wurden in 2,5 mL Rollrandgläschen mit Lyophilisierstopfen überführt und gefriertrocknet (Parameter siehe Tabelle 3-5). Die Lyophilisate wurden anschließend bis zu ihrer Verwendung bei 2-6 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 3-5: Prozessschritte bei der Gefriertrocknung am Tischlyophilisator (Christ)

Programmschritt	Druck (hPa)	Temperatur (°C)	Zeit (h)
Einfrieren	1013,25 (atm)	-50	3
Primärtrocknung	0,050	-20	42
Sekundärtrocknung	0,050	30	6
Ende der Trocknung	0,050	5	0,5
Verschließen der Gefäße	400-600	5	-
Entnahme	1013,25 (atm)	5	-

Die Lyophilisate wurden zu Weiterverwendung in 100 µL HBS (pH 6,8) rehydratisiert, gevortext und mit weiteren 100 µL HBS 6,8 auf eine resultierende Endkonzentration von 50-62,5 mM Gesamtlipid eingestellt (2-Schritt-Rehydratisierung). Die Präparation wurde im Vergleich zur nicht-lyophilisierten Formulierung um Faktor 2,5 aufkonzentriert. Der *dehydration-rehydration*-Prozess führte zu einer starken Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) und des Polydispersitätsindex (PDI), wodurch weitere Extrusionsschritte durch eine 200 nm Membran erforderlich wurden (vgl. 4.1.1.2). Die Anzahl der durchgeführten Extrusionsschritte können Tabelle 3-6 entnommen werden.

Tabelle 3-6: Extrusionsschritte nach der Lyophilisation

Zusammensetzung	Lipidkonzentration nach Rehydratisierung	Herstellung	Extrusionsschritte
ESM/Chol 25 mM	62,5 mM	Handextrusion	21 x 200 nm
ESM/Chol 20 mM	50 mM	Druckextrusion	21 x 200 nm
ESM/Chol/DSPE-mPEG 20 mM	50 mM		11 x 200 nm

3.3.1.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Vor der Beladung mit Arsen wurde das freie, nicht liposomal verkapselte $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ über *size exclusion chromatography* (SEC) abgetrennt. Bei dieser Methode werden Moleküle oder Teilchen entsprechend ihres Molekulargewichts in einer Gelmatrix aufgetrennt und eluiert. Kleinere Teilchen können aufgrund ihres geringeren Durchmessers in die Poren der sphärischen Polymerpartikel der Gelmatrix hineindiffundieren und erfahren somit eine Retention auf der Säule. Größere Moleküle oder Teilchen wandern hingegen mit dem Eluentenstrom und werden somit früher eluiert (GE Healthcare 2010).

Vorbereitung der Säulen

Das eingesetzte Gelmaterial Sepharose™ CL-4B (quervernetzte Agarose) wurde vor der Verwendung mehrfach über eine Glasfritte mit zuvor entgastem Elutionspuffer (HBS pH 6,8 oder HBS/HBG pH 7,4) gespült und anschließend autoklaviert (121 °C, 15 min, 2 bar). Um die Entstehung von Lufteinschlüssen zu umgehen, wurde das Gelmaterial vor der Benutzung 30 min bei 120 hPa entgast. Anschließend wurde es in eine mit Ethanol gereinigte Säulen eingefüllt, wobei sich die eingesetzte Säulengröße nach dem aufzutrennenden Probenvolumen richtete (siehe Tabelle 3-7).

Für eine gute Trennleistung wurde das aufzutragende Probenvolumen auf maximal 3 % des Gelbettvolumens beschränkt. Vor der Säule wurde ein Membranfilter ($< 0,22 \mu\text{m}$) angebracht, um Partikelkontaminationen beim Eluieren der Probe zu vermeiden.

Lipidadsorption während der Auftrennung und der damit einhergehende Lipidverlust wurden durch 3- bis 4-maliges Absättigen der Säule mit unbeladenen Liposomen der gleichen Lipidzusammensetzung wie der aufzureinigenden Probe minimiert.

Tabelle 3-7: Abmessungen der verwendeten SEC-Säulen

Säulenhöhe	Innendurchmesser (ID)	Gelbettvolumen (bei 90 % Füllung)	Eingesetztes Probenvolumen
15 cm	0,7 cm	5,2 mL	100 μL
	1,5 cm	23,9 mL	700 μL

Durchführung der SEC

Die Säule wurde vor jeder Verwendung mit mindestens dem doppelten Gelbettvolumen an Elutionspuffer gespült. Die Probe wurde, nachdem der Pufferüberstand in das Gelbett eingesickert war, vorsichtig und gleichmäßig auf die Säule aufgebracht. Um ein vollständiges Eintreten der Probe in das Gelbett zu sichern, wurde nach deren Aufnahme weiterer Puffer ($\approx 200 \mu\text{L}$) aufgetragen und einsickern gelassen. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von $\approx 25 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Die an der Trübung des Eluats zu erkennenden Liposomenfraktionen wurden gesammelt und der Verdünnungsgrad ($\approx 1:6$) über Wägung ($\rho = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ermittelt. Für die über Lyophilisation hergestellten Ni-Liposomen wurde zur Elution HBS pH 6,8 eingesetzt. Bei späteren Untersuchungen der mikrofluidisierten Ni-Liposomen wurde hierfür HBG pH 7,4 eingesetzt. Untersuchungen zeigten, dass die pH-Änderung keinen Einfluss auf das spätere Ni/Lipid-Verhältnis hatte. Nach Abschluss der Auftrennung wurde die Säule durch Spülen mit Elutionspuffer von restlichem $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ befreit.

3.3.1.3 Aufkonzentrieren der Proben mittels Centrisart I

Um eine ausreichend hohe liposomale As-Konzentration für die *in-vitro*-Zellvitalitätsuntersuchungen (vgl. Kapitel 3.6.2.4) zu gewährleisten, wurden die mittels Mikrofluidisierung hergestellten, aufgereinigten Ni-Liposomen vor der Inkubation mit Arsen aufkonzentriert. Hierfür wurde eine Centrisart-Einheit (MWCO 100 000, Sartorius) verwendet. Es wurden 2 mL der Liposomendispersion in die Vorrichtung pipettiert und die Probe 6-mal für jeweils 5 min bei 2320 x g (RT) in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Hettich Universal 320) zentrifugiert.

Um eine effektivere Aufkonzentrierung zu erzielen, wurde nach jedem Zentrifugationsschritt der Flüssigkeitsüberstand abgenommen. Die Liposomen wurden durch diesen Schritt ungefähr auf das 3- bis 4-fache aufkonzentriert.

3.3.1.4 Beladung mit Arsen

Die über SEC aufgereinigten und gegebenenfalls aufkonzentrierten Ni-Liposomen wurden zur Beladung 1:1 (mol/mol) mit Arsentrioxid-Lösung (150 mM, pH 8,0) versetzt und inkubiert. In Vorgängerarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation bei 20 °C über 120 min bereits zu einer vollständigen Beladung mit Arsen führt (Züfle 2016). Die Inkubation erfolgte daher abweichend zum Originalprotokoll von Chen (Chen et al. 2006) nicht bei 55 °C über 3 h, sondern wurde zum Schutz thermolabiler konjugierter Liganden und Lipide bei 20 °C und 300 rpm im Thermomixer durchgeführt. Freies Arsen wurde im Anschluss analog Kapitel 3.3.1.2 über SEC entfernt. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 100-700 µL (vgl. Tabelle 3-7). Die Elution der zuvor lyophilisierten Liposomen wurde mit HBS pH 7,4 durchgeführt. Bei über Mikrofluidisierung hergestellten Liposomen wurde hierfür HBG pH 7,4 eingesetzt.

3.3.2 Quantifizierung von NiAs beladenen Liposomen

3.3.2.1 Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) - Allgemeines

Zur Quantifizierung intraliposomalen Nickels und Arsens wurde die im Rahmen von Vorgängerarbeiten etablierte Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometrie (*graphite furnace atomic absorption spectrometry*, GF-AAS) eingesetzt (Müller 2013). Die Methode ermöglicht die hochsensitive Quantifizierung im ppm ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) - ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Bereich auch in komplexen Matrices, wie sie in liposomalen Dispersionen existieren.

Aufbau und Funktionsweise des AAS

Grundlage der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ist die Fähigkeit von Atomen, eingestrahltes Licht einer bestimmten Wellenlänge, welche der Emissionswellenlänge des zu untersuchenden Elements entspricht, absorbieren zu können (Resonanzabsorption). In einer Atomisierungseinheit, welche entweder aus einer Flamme (Acetylen/Luft-Gemisch; *flame atomic absorption spectrometry*, F-AAS), einer chemischen Reduktionseinheit (Kaltdampf- oder Hydridtechnik; *cold vapour atomic absorption spectrometry*, CV-AAS) oder einem elektrisch beheizbaren Graphitrohr (*graphite furnace atomic absorption spectrometry*, GF-AAS) besteht, wird die Probe atomisiert.

Eine elementspezifische Strahlungsquelle erzeugt Emissionslinien des zu analysierenden Elements. Hierfür werden Hohlkathodenlampen (HKL), deren Kathode aus dem zu analysierenden Element besteht (Nickelbestimmung), oder elektrodenlose Entladungslampen (EDL – für die Arsenbestimmung) eingesetzt.

Beim Durchgang durch die Atomisierungseinheit wird ein Teil der Strahlung von der atomisierten Probe absorbiert. Ein Monochromator selektiert die für die Messung entscheidende Resonanzlinie der transmittierten Strahlung. Diese wird von einem Detektor registriert und das Signal an ein Anzeigeelement weitergegeben (Rücker et al. 2008). Abbildung 3-5 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Atomabsorptionsspektrometers.

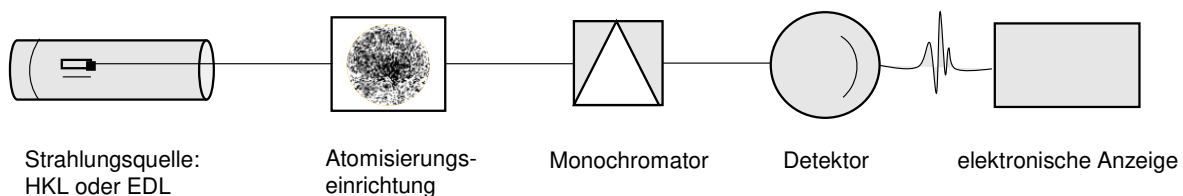


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung des AAS-Aufbaus

Schematische Darstellung eines Atomabsorptionsspektrometers. Als Lichtquelle dient entweder eine Hohlkathodenlampe (HKL) oder eine elektrodenlose Entladungslampe (EDL). Abbildung nach Rücker et al. (2008).

Besonderheiten der GF-AAS

Bei der GF-AAS findet die Atomisierung der Probe in einem Graphitrohr statt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wird das Material aufgrund seines elektrischen Widerstands erhitzt. Daher wird, anders als bei der Flammen-AAS, ein mehrstufiges Temperaturprogramm durchlaufen. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung der Probe, der Entfernung störender Bestandteile schon vor der eigentlichen Messung und somit zu einer gesteigerten Sensitivität, auch in komplexen Probenmatrices. Tabelle 3-9 (Seite 62) zeigt das für die Analyse von Nickel und Arsen gefahrene Temperaturprogramm.

Ein weiterer Vorteil der GF-AAS ist die längere Verweilzeit im Strahlengang, vor allem bei der Verwendung von Graphitrohren mit Endkappen. Dadurch wird die Empfindlichkeit der Messung erhöht und die Bestimmungsgrenze trotz kleinerer Probenvolumina herabgesetzt (Beaty & Kerber 1993). Dieser Effekt wird durch den Stopp des Gasflusses während der Atomisierungsphase zusätzlich unterstützt (siehe Tabelle 3-9). Damit es bei den hohen Temperaturen (bis 2 600 °C) nicht zu einem Verglühen des Probenrohrs kommt, wird dieses innen und außen mit einem Inertgasstrom (Argon 5.0) umspült.

STPF-Konzept

Unter dem Begriff STPF- (*stabilized temperature platform furnace*) Konzept werden alle Maßnahmen zusammengefasst, die zu einer verbesserten Analytik bei der GF-AAS führen. Ein Bestandteil davon ist die Verwendung von pyrolytisch beschichteten, querbeheizten Graphitrohren, sogenannten THGA- (*transversally heated graphite atomizer*) Rohren, mit Endkappen. Die Beschichtung der Rohre führt zu einer glatten und dichten Oberfläche, wodurch die Diffusion von Analytatomen oder Gasen in das Material verhindert wird. Außerdem dient sie als Zersetzungsschutz vor starken Oxidationsmitteln (PerkinElmer 1999).

Innerhalb des THGA-Rohres befindet sich die sogenannte integrierte Plattform, auf der die Atomisierung der Probe stattfindet. Durch die kleine Kontaktfläche zur Rohrwand wird die Probe nur durch Wärmeabstrahlung aufgeheizt. Daraus resultiert eine verzögerte Atomisierung bei bereits isothermen Bedingungen im Rohr und ermöglicht einen gleichmäßigen Atomisierungsvorgang. Die Plattform erleichtert außerdem eine reproduzierbare Platzierung der Probe und verhindert deren Verteilung im Rohr.

Die transversale Beheizung ermöglicht ein gleichmäßiges Aufheizen des Rohres und verhindert somit Kondensationseffekte an kälteren Stellen, wodurch das Verschleppen von Probe, der sogenannte Memory-Effekt, umgangen werden kann (Schlemmer & Welz 1986).

Eine weitere Komponente des STPF-Konzepts ist die Zeeman-Untergrundkorrektur. Sie ermöglicht die Differenzierung zwischen Atomabsorption und unspezifischer Absorption durch die Probenmatrix. Grundlage ist der von Zeeman 1897 publizierte Effekt der Spektrallinienaufspaltung durch Anlegen eines Magnetfeldes (Zeeman 1897). Bei der Zeeman-Untergrundkorrektur wird im Moment der Atomisierung ein starkes magnetisches Feld longitudinal zum eingestrahlten Licht angelegt (0,9 Tesla), durch welche die Energiezustände der Atome aufgespalten werden, sodass sie kein Licht der eingestrahlten Wellenlänge absorbieren. Somit wird bei angelegtem Magnetfeld nur die Untergrundabsorption detektiert (PerkinElmer 1999).

Der Einsatz von Matrixmodifiern führt zur Bildung stabiler Einschlussverbindungen mit dem Analyten, wodurch höhere Pyrolysetemperaturen erreicht werden können. Dies ermöglicht zum einen eine spätere Atomisierung bei isothermen Bedingungen (Schlemmer & Welz 1986), zum anderen die leichtere Abtrennung flüchtiger Matrixbestandteile. Dieser Effekt wird durch die Bildung flüchtiger Nitratverbindungen mit der Matrix zusätzlich verstärkt. In Tabelle 3-8 sind die für diese Arbeit verwendeten Matrixmodifizier aufgelistet.

Ein weiterer Aspekt des STPF-Konzeptes ist die Auswertung der Signalflächen mittels *baseline offset correction* (BOC). Die Integration des Absorptionssignals über die Zeit (*area under the curve*; AUC) ermöglicht im Gegensatz zur Signalthöhen-Analyse eine genauere Quantifizierung, da hier Matrixeinflüsse, z. B. auf die Peakform, weniger stören. Bei der GF-AAS liegt eine lange Zeitspanne zwischen Analysenstart und der tatsächlichen Messung, während der es zu einer Verschiebung der Basislinie kommen kann. Diese Verschiebung hätte großen Einfluss auf die Peakflächen-Auswertung, weshalb kurz vor der eigentlichen Atomisierungsphase für zwei Sekunden eine Basislinienkorrektur (BOC) durchgeführt wird.

3.3.2.2 Messung des Ni- und As-Gehalts

Alle Proben wurden am Tag der Messung mit Reinstwasser verdünnt, sodass ihre Konzentrationen im Arbeitsbereich von $4\text{-}80\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ lagen (Absorptionssignal: $0,15\text{-}0,3\ \text{A}\cdot\text{s}$). Zur Herstellung der Elementstandards (Certipur®) wurden Standardlösungen der Konzentration $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mit Reinstwasser auf eine Konzentration von $25\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ verdünnt (Verdünnung 1:40 000). Eine gute Korrelation konnte erreicht werden, wenn das Absorptionssignal der Probe im Bereich des Standards lag ($\text{Ni}_{\text{Standard}} \approx 0,13\ \text{A}\cdot\text{s}$ / $\text{As}_{\text{Standard}} \approx 0,09\ \text{A}\cdot\text{s}$).

Um die Adsorption von Analyten an das Probengefäß zu vermeiden, wurden Standard und Proben jeweils mit 1 % hochreiner Salpetersäure (Rotipuran® Supra 96 %) angesäuert. Zusätzlich wurde ein Tropfen 10 %ige Triton-X100 Lösung hinzugegeben, um das Pipettieren mittels Autosampler zu erleichtern. Die für die Quantifizierung von Nickel und Arsen entscheidenden Geräteeinstellungen sind in Tabelle 3-8 aufgelistet.

Tabelle 3-8: Messeinstellungen GF-AAS nach Müller (2013)

<i>Parameter</i>	<i>Nickel</i>	<i>Arsen</i>
Strahlungsquelle	Hohlkathodenlampe (HKL)	Elektrodenlose Entladungslampe (EDL)
Lampenstrom	30 mA	400 mA
Wellenlänge (nm)	232,0	193,7
Spaltbreite (nm)	0,2	0,7
Read Time (s)	5	4
Baseline Offset Correction (BOC) Time (s)	2	2
Matrix-Modifizier	Palladium (Pd) (10 %ig in Reinstwasser)	Palladium/Magnesiumnitrat (10 % Pd / 1% Mg(NO ₃) ₂)

Zu Beginn der Analyse wurde der *Blank*-Wert festgelegt. Hierfür wurden 40 µL Reinstwasser und 5 µL des entsprechenden Matrixmodifiziers über eine Plastikcapillare des Autosamplers auf die Plattform innerhalb des Graphitrohrs appliziert. Nach Ermittlung des *Blank*-wertes konnten nacheinander alle Proben vermessen werden. Hierbei wurden je 20 µL Diluent (Reinstwasser), 20 µL Probe und 5 µL des entsprechenden Matrixmodifiziers pipettiert und anschließend ein definiertes Temperaturprogramm (siehe Tabelle 3-9) durchlaufen.

Um die Konzentration der Probe ermitteln zu können, wurde mittels Standardadditionsmethode eine Kalibriergerade erstellt. Mit Hilfe des Autosamplers wurden der Probe dabei automatisch entsprechende Volumina des Standards (25 µg·L⁻¹), d.h. nacheinander 5, 10 und 15 µg·L⁻¹, zupipettiert. *Blank*, Probe und Standards wurden jeweils 3-mal vermessen und das Endergebnis aus den Mittelwerten der Einzelmessungen gebildet. Für die Quantifizierung einer Probe wurden daher 4 Messungen à 3 Einzelmessungen analysiert.

Die AUC von Probe und Standard ergaben sich jeweils aus der Differenz der Gesamt-AUC und der AUC des *Blank*-wertes. Durch Extrapolation der Standardkalibriergerade auf die Abszisse konnte die Analytkonzentration ermittelt werden. Lag der Korrelationskoeffizient unter 0,99 wurde die Messung wiederholt.

Tabelle 3-9: Temperaturprogramme für die Quantifizierung von Ni und As nach Müller (2013)

<i>Programmschritt</i>	<i>Funktion</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Element</i>	<i>Ramp time (s)</i>	<i>Hold time (s)</i>	<i>Gastyp</i>
Trocknung 1 (Verdunstung)	Entfernung aller Flüssigkeit	110	Ni	1	30	Argon
			As		15	
Trocknung 2 (Nach Trocknung)		130	Ni	15	30	Argon
			As		60	
Luftveraschung	Entfernung organischer Probenmatrix	500	Ni	15	35	Pressluft
			As		25	
Spülphase		5000	Ni	1	20	Argon
			As		15	
Pyrolyse	Entfernung anorganischer Matrix	1300	Ni	10	20	Argon
		1400	As		15	
Atomisierung	Vermessung	2300	Ni	0	5	-
		2400	As		4	
Clean-Out	Entfernung von Probenresten	2600	Ni	3	3	Argon
			As			

3.3.2.3 Bestimmung des liposomalen Ni- und As-Gehalts

Entscheidend für den Erfolg der Neuroblastomtherapie ist eine ausreichend hohe intraliposomale As-Konzentration. Durch die angewandte Herstellungsmethode ist diese wiederum direkt von der zuvor eingeschlossenen Nickelmenge abhängig (siehe Kapitel 3.3.1.4). Für die Einschätzung der Qualität der liposomalen Präparation ist somit die Kenntnis des intraliposomalen Ni- und As-Gehalts essentiell.

Zu deren Bestimmung wurde der freie Anteil an Nickel und Arsen analog Kapitel 3.3.1.2 via SEC abgetrennt. Die eingesetzten Auftragevolumina und verwendete Elutionspuffer können Tabelle 3-10 entnommen werden. Die Liposomen wurden mit dem entsprechenden Puffer eluiert und die trüben, liposomalen Fraktionen in einem zuvor tarierten Mikroreaktionsgefäß gesammelt. Das Volumen wurde nach Auswaage berechnet ($\rho = 1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Intraliposomales Nickel und Arsen wurden im Anschluss per GF-AAS analog Kapitel 3.3.2.2 quantifiziert.

Da die Volumina der aufgefangenen Liposomenfraktionen schwankten, wurde zum besseren Vergleich der Präparationen zusätzlich deren Lipidgehalt über Bartlett- oder Cholesterolassay bestimmt und daraus das Ni/Lipid- bzw. As/Lipid-Verhältnis berechnet.

Tabelle 3-10: Bei der SEC eingesetzte Auftragevolumina

Abzutrennende Substanz	Versuch	Auftragevolumen	Puffer
Ni(OAc) ₂	Charakterisierung Liposomen unterschiedlicher Herstellungsmethoden	100 µL	HBS pH 6,8
	<i>in-vitro</i> -Zellvitalitätsuntersuchungen	700 µL	HBG pH 7,4
ATO	Charakterisierung Liposomen unterschiedlicher Herstellungsmethoden	150 µL	HBS pH 7,4
	<i>in-vitro</i> -Zellvitalitätsuntersuchungen	700 µL	HBG pH 7,4

Bestimmung der relativen liposomalen Ni-Einschlusseffizienz

Die Einschlusseffizienz (EE) wurde als das prozentuale Verhältnis von liposomal verkapselter Substanz zur ursprünglich eingesetzten Menge definiert und konnte nach Formel 2 berechnet werden. Sie ist ein wichtiger Index zur Charakterisierung von *Drug Delivery Systemen*, vor allem bei der Verwendung von teuren oder hochpotenten Arzneistoffen.

In dieser Arbeit diente die EE der Beurteilung des Einflusses der Liposomenherstellungsmethode (Extrusion, Mikrofluidisierung vgl. Kapitel 3.1.3) auf die Effizienz der Ni(OAc)₂-Beladung. Mittels GF-AAS (vgl. Kapitel 3.3.2.2) wurden sowohl die Ni-Gesamtkonzentration als auch die Konzentration nach der größenausschlusschromatographischen Aufreinigung quantifiziert. Über das mittels Wägung ermittelte Volumen konnte jeweils die Stoffmenge und daraus die EE berechnet werden.

$$EE = \frac{n_{liposomal}}{n_{gesamt}} \cdot 100 \%$$

Formel 2

- EE relative Einschlusseffizienz (%)
n_{liposomal} Stoffmenge des verkapselten Ni (mol)
n_{gesamt} eingesetzte Stoffmenge an Ni (mol)

Bestimmung der maximalen, theoretischen Beladung von Ni(OAc)₂

Zum besseren Vergleich der Ni-haltigen Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzungen und Herstellungstechniken wurde die maximale theoretische Einschlusseffizienz (EE_{\max}) nach Formel 3 berechnet (Schubert et al. 1991). Sie gilt für runde, unilamellare Liposomen homogener Größe bei gleichmäßiger Verteilung der Substanz im intra- und extraliposomalen Volumen.

$$EE_{\max} = \frac{(R - D)^3}{\left(R - \frac{D}{2}\right)^2} \cdot \frac{1}{\left(\frac{6 \cdot 10^{22}}{N \cdot L \cdot A} - 0,03 \cdot D\right)} \quad \text{Formel 3}$$

EE_{\max}	berechnete maximale, relative Einschlusseffizienz (%)
R	mittlerer hydrodynamischer Radius (nm)
D	Membrandicke (nm)
N	Avogadro-Konstante ($6,02214 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
L	Lipidkonzentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
A	mittlere Querschnittsfläche eines Lipidmoleküls in der Membran (nm)

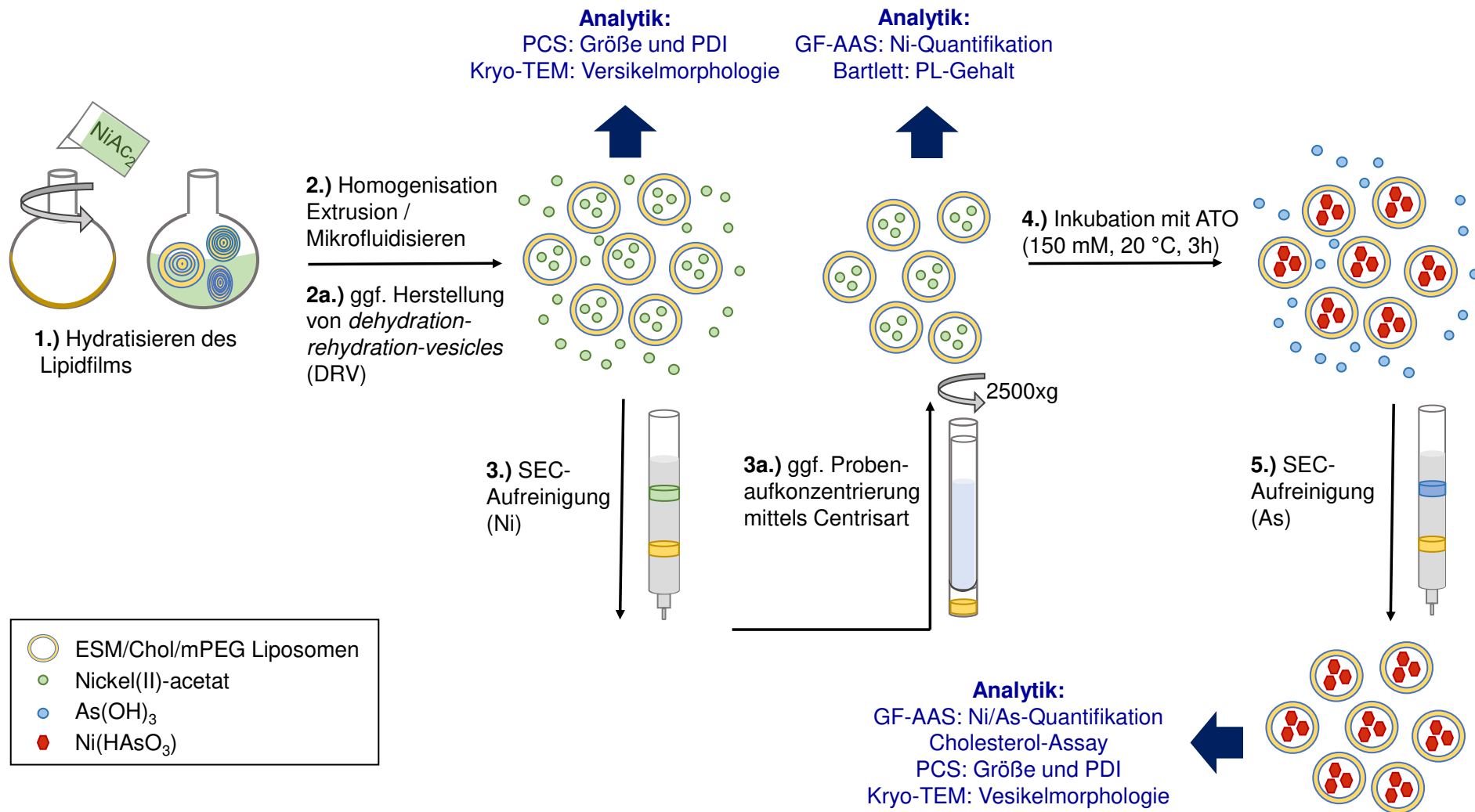


Abbildung 3-6: Fließschema zum *remote loading* Verfahren

Schematische Darstellung der in Kapitel 3.1, 3.2 und 3.3 beschriebenen Vorgänge zur Herstellung und Analytik von NiAs-beladener Liposomen.

3.4 Lagerstabilitätsuntersuchungen

Das *Upscaling* der Ni(OAc)₂-Liposomenherstellung mittels Mikrofluidisierung (vgl Kapitel 3.1.3.2) bietet zum einen den Vorteil schneller größere Chargen von As-Liposomen herzustellen. Zum anderen ist es bei gegebener Stabilität der Ni-Liposomen während der Lagerung möglich, die As-Beladung bei Bedarf vorzunehmen. In Vorgängerarbeiten wurde bereits gezeigt, dass ATO-beladenen Liposomen nach Abtrennung des freien Arsens nur begrenzt lagerstabil sind (Müller 2013, Züfle 2016). Es ist somit essentiell, die Beladung mit As im Bedarfsfall schnell umsetzen zu können und nicht erst die aufwendige Herstellung von Ni-Liposomen durchführen zu müssen. Da die Lyophilisation ohne zusätzlichen Extrusionsschritt nach der Rehydratisierung keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte (siehe 4.1.1.2), sollte eine schnellere und kostengünstigere Alternative zur stabilen Lagerung der Liposomen gefunden werden.

3.4.1 Lagerstabilität Ni(OAc)₂-beladener Liposomen im Kühlschrank

Mittels Mikrofluidisierung hergestellte (vgl Kapitel 3.1.3.2) Ni-Liposomen (60 mM, 3 000 psi) wurden auf ihre Größenstabilität bei Lagerung im Kühlschrank (2-6 °C) untersucht. Hierfür wurden je 100 µL der Präparationen in Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und über mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert. Analog Kapitel 3.2.1.1 wurden wöchentlich der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) und der Polydispersitätsindex (PDI) gemessen. Um eine Aussage über die Vesikelmorphologie treffen zu können, wurden nach 2 und 6 Wochen jeweils Kryo-TEM Aufnahmen analog Kapitel 3.2.1.2 angefertigt.

3.4.2 Einfrieruntersuchungen

60 und 100 mM Ni(OAc)₂-Liposomen wurden zu je 200 µL in Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und bei verschiedenen Temperaturen eingefroren, gelagert und aufgetaut (siehe Tabelle 3-11). Die Bestimmung der Vesikelgröße und -verteilung wurde analog Kapitel 3.2.1.1 durchgeführt. Zur Bestimmung der Vesikelmorphologie einiger Proben wurden, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, von Sabine Barnert kryo-transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Tabelle 3-11: Bei den Einfrieruntersuchungen getestete Bedingungen

<i>Einfrieren</i>		<i>Lagerung</i>		<i>Auftauen</i>	
<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
-26 °C	24 h	-26 °C	24 h	RT	1 h
-80 °C	24 h	-80 °C	24 h	37 °C	10 min
-196 °C	≈ 2 min				

3.4.3 Untersuchung der Autoklavierbarkeit Ni(OAc)₂-beladener Liposomen

Für die Herstellung einer sterilen liposomalen Präparation wurde die Größenstabilität autoklavierter Liposomen untersucht. Hierfür wurden 100 µL der mittels Mikrofluidisierung hergestellten Liposomen in 1 mL Glasvials aliquotiert. Die Gefäße wurden verbördelt und anschließend bei 121 °C und 2 bar über 15 min autoklaviert (Overkill-Verfahren). Vor und nach dem Sterilisations-schritt wurden der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) und der Polydispersitätsindex (PDI) analog Kapitel 3.2.1.1 gemessen. Die Liposomen wurden anschließend bei 2-6 °C über 3 Wochen im Kühlschrank gelagert und wöchentlich mittels PCS-Messung analysiert.

3.5 Liposomale Oberflächenmodifikation

Für eine gezielte Adressierung von Arsen-beladenen Liposomen an das Neuroblastom-Tumorgewebe wurde die Liposomenoberfläche nachträglich mit Antikörpern gegen das Disialogangliosid-2 (GD₂)-Antigen, welches auf Neuroblastomzellen verstärkt exprimiert wird (vgl. Kapitel 1.4.3.2), funktionalisiert. Getestet wurden ein humanisierter anti-GD₂ (hu14.18), ein chimärer anti-GD₂ (ch14.18, muriner variabler Teil) und ein chimärer anti-GD₂ dessen C_H2-Region deletiert wurde (chΔC_H2) (vgl. Tabelle 3-12). Bei allen Antikörpern handelt es sich um Proteine der Klasse IgG (Isotyp 1), deren schematischer Aufbau in Abbildung 3-7 gezeigt ist.

Tabelle 3-12: Spezifikation der untersuchten GD₂-Antikörper

<i>Anti-GD₂</i>	<i>Eigenschaften</i>
hu14.18	humanisiert, Antigenbindungsstelle murinen Ursprungs
ch14.18	chimär, variable Region murinen Ursprungs
chΔC _H 2	chimär, variable Region murinen Ursprungs; C _H 2 Region des F _c -Teils deletiert

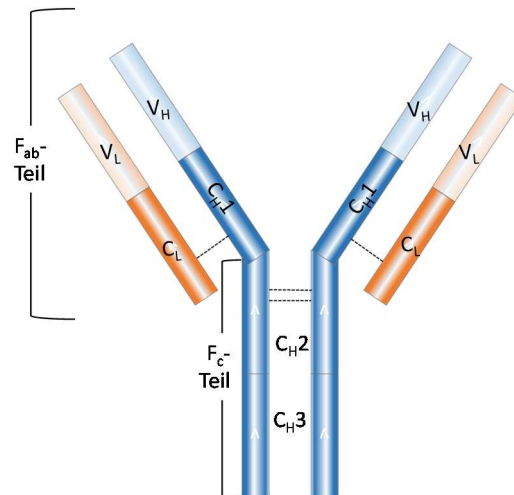


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers

Das Immunglobulin G (IgG \approx 150 kDa) ist aus zwei identischen schweren (*heavy chain* (H) blau, je \approx 50 kDa) und leichten (*light chain* (L) orange, je \approx 25 kDa) Proteinketten aufgebaut. Die schweren Ketten sind miteinander über Disulfidbrücken verbunden, die leichten Ketten sind ebenfalls über Disulfidbrücken an die schweren Ketten gebunden. Sowohl leichte (V_L ; *light chain variable region*) als auch schwere Kette (V_H ; *heavy chain variable region*) bestehen aus jeweils einer variablen Region, die zusammen die Antigenbindungsstelle bilden. Die schwere Kette besitzt drei konstante Domänen (C_{H1-3} ; *heavy chain constant region*), während die leichte Kette (C_L ; *light chain constant region*) nur eine besitzt. Abbildung nach Hermanson (2013).

Bei der Funktionalisierung von Liposomen können Liganden direkt auf der Vesikeloberfläche oder am distalen Ende von z. B. Polyethylenglykol (PEG)-Ketten (*Spacer*) lokalisiert werden (vgl. Kapitel 1.3). Die Kopplung über solche *Spacer* bietet zusätzlich den Vorteil des *Stealth*-Effektes (vgl. Kapitel 1.2.2.1). Das Einbringen der Liganden in die äußere Liposomenmembran erfolgt über einen membranintegrierenden Teil, den sogenannten Anker. Hierfür wurden entweder ein Phospholipid (PIT; *lipid-based post-insertion technique*) (Ishida et al. 1999) oder ein Sterol z. B. Cholesterol (SPIT; *sterol-based post-insertion technique*) (Gantert et al. 2009) eingesetzt. Das Prinzip beider Methoden beruht auf der nachträglichen Oberflächenmodifikation der fertig hergestellten Liposomen, sodass membranverankernde Strukturen nur in die äußere Liposomenmembran eingelagert werden. Dies verhindert die Interaktion von Liganden mit liposomal verkapselten Wirkstoffen (vgl. Kapitel 1.3). Beide Methoden werden im Folgenden genauer erklärt.

3.5.1 Durchführung der liposomalen Oberflächenmodifikation

3.5.1.1 Allgemeine Vorgehensweisen

Arbeitsschritte, die bei beiden Methoden, der *lipid-based post-insertion technique* (PIT) und der *sterol-based post-insertion technique* (SPIT) gleichermaßen durchgeführt worden sind, werden im Folgenden vorgehend beschrieben.

Herstellung und Lagerung der Ankerstammlösungen

Da die eingesetzte Ankermenge pro Versuch nur einige hundert μg betrug, wurden um Wägefehler zu vermeiden Stammlösungen der Anker hergestellt und die Anker anschließend volumetrisch dosiert. In dieser Arbeit verwendete Anker hatten zur Ankopplung der Antikörper ein N-Hydroxysuccinimid (NHS) als reaktive Gruppe. Um eine vorzeitige Hydrolyse der reaktiven NHS-Gruppe zu vermeiden, wurden die Anker unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit 30 min im Exsikkator aufgetaut und anschließend in einem nicht-protischen Lösungsmittel, hier Chloroform (CHCl_3), gelöst. Die Konzentration der Stammlösungen betrug dabei $1\text{-}2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Lagerung erfolgte, nach Überschichtung mit Argon, bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in Glasvials mit Bördelkappe für bis zu 6 Monate.

Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9 zeigen die Strukturformeln der in dieser Arbeit eingesetzten Ankerstrukturen.

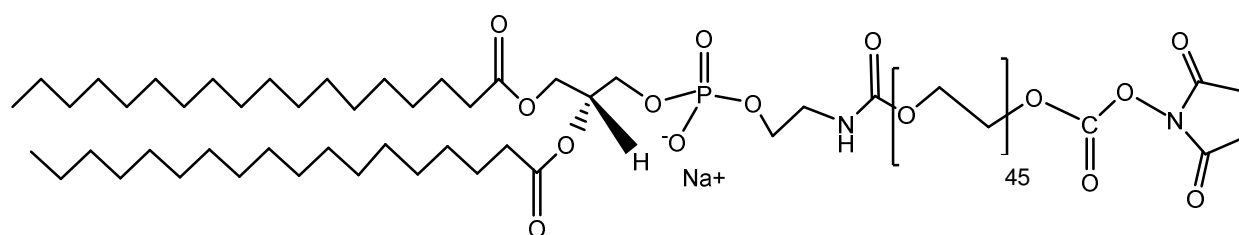


Abbildung 3-8: Strukturformel des DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS Ankers

Der Anker ist aus drei Hauptkomponenten aufgebaut: dem membranverankernden Teil, der hier von einem Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE) gebildet wird, einem ≈ 45 Einheiten umfassenden Polyethylenglykol- (PEG)-Spacer und der reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Gruppe, die am distalen Ende des Spacers lokalisiert ist.

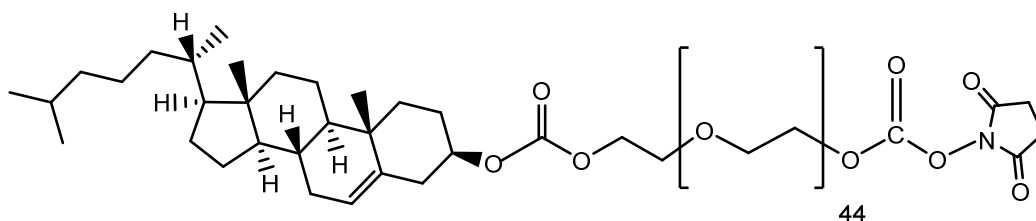


Abbildung 3-9: Strukturformel des Chol-PEG₂₀₀₀-NHS Ankers

Synthese durch Judith Jakoby, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. NHS ist am distalen Ende eines Polyethylenglykol (PEG)-spacers (≈ 45 Einheiten) lokalisiert. Der membranverankernde Teil wird von einer Cholesteroleinheit gebildet.

Aliquotieren der Anker

Aus den Ankerstammlösungen wurden bei Bedarf Aliquots von 100-800 μg Anker unter Verwendung einer Hamiltonspritze in Mikroreaktionsgefäßen hergestellt. Chloroform wurde mittels Evaporationszentrifuge (38 °C, 40 min) entfernt, sodass sich ein dünner Ankerfilm an der Innenseite der Reaktionsgefäße ausbildete. Die getrockneten Ankeraliquots wurden mit Argon überschichtet und bei -80 °C bis zu 6 Monate gelagert.

3.5.1.2 Praktische Durchführung der Oberflächenfunktionalisierung

Der grundsätzliche Ablauf der nachträglichen Oberflächenmodifikation ist für SPIT und PIT gleich und schematisch in Abbildung 3-10 gezeigt.

Zunächst erfolgt die Kopplung der Liganden, hier der GD₂-Antikörper (vgl. Kapitel 3.5), an den Anker. Hierfür wird der als dünner Lipidfilm vorliegende Anker mit einem entsprechenden Volumen an Antikörperlösung versetzt, kurz gevortext und 30 s im Ultraschallbad dispergiert. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min bei 17 °C und 700 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert. In diesem Ligand-Anker-Konjugationsschritt (Schritt 1, Abbildung 3-10) binden freie Amingruppen der Antikörper kovalent an die NHS-Gruppe des Ankers unter Ausbildung einer Amidbindung. Die Reaktion erfolgt dabei bevorzugt an α -Aminogruppen am N-terminalen Ende von Proteinen und an ϵ -Aminogruppen von Lysin-Seitengruppen (Hermanson 2013). Untersuchungen zur eingesetzten Menge anti-GD₂ zeigten, dass die zelluläre Assoziation durch Erhöhung der Ak-Konzentration im Ansatz gesteigert werden konnte (Müller 2013, Jakoby 2014).

Um Ressourcen zu sparen und eine erhöhte Immunogenität und die damit einhergehende vorzeitige Elimination der Immunoliposomen aus der Blutzirkulation (vgl. Kapitel 1.3) zu umgehen, wurde die eingesetzte Antikörpermenge angepasst. Sofern an anderer Stelle nicht gesondert angegeben, betrug das molare Verhältnis von Antikörper zu Anker (Ak/An) 1:25 (mol/mol).

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit einem 50-fachen molaren Überschuss an Histidinlösung ($c = 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in PBS w/o pH 7,4) abgestoppt. Der Ansatz wurde dafür 10 min, bei 17 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert (Schritt 2, Abbildung 3-10). Die Termination der Ligand-Anker-Konjugation ist essentiell, da noch aktive NHS-Gruppen unspezifische Bindungen mit anderen Protein, z. B. Serumproteinen, eingehen könnten. Außerdem könnten mehrere Anker an einem Antikörper binden und so zu einer Quervernetzung der Liposomen (*crosslinking*) führen.

Im Anschluss an den Terminationsschritt wurden unmodifizierte, gegebenenfalls As-beladene, Liposomen zu dem Reaktionsansatz gegeben. Wenn nicht explizit angegeben, betrug das Anker/Lipid-Verhältnis (An/Lip) 5 mol %. Der Insertionsschritt (Schritt 3, Abbildung 3-10) erfolgte bei Durchführung der PIT, wenn an anderer Stelle nicht ausdrücklich erwähnt, bei 60 °C über 1 h. Für die SPIT hat sich zur Modifizierung eine Insertionstemperatur von 17 °C über 30 min als ausreichend erwiesen (Gantert et al. 2009).

In dieser Arbeit sollte die Oberflächenmodifikation von ESM/Chol/DSPE-mPEG Liposomen mit anti-GD₂ optimiert werden. Hierfür wurde zum einen die Insertionstemperatur (SPIT und PIT) modifiziert, sowie das eingesetzte An/Lipid-Verhältnis (PIT) variiert. Die getesteten Parameter sind in Tabelle 3-13 aufgeführt.

Tabelle 3-13: Spezifikation der getesteten Funktionalisierungsbedingungen

<i>Insertionstechnik</i>	<i>Versuchsreihe</i>	<i>Ankermenge (mol %)</i>	<i>Insertionstemperatur (°C)</i>
SPIT	Variation der Insertionstemperatur	5	40
		5	17
PIT	Variation der Insertionstemperatur	5	60
		5	55
		5	50
		5	40
PIT	Variation der Ankermenge	5	60
		3,5	60
		1,25	60

Zum Abschluss wurde ein Aufreinigungsschritt via SEC analog Kapitel 3.3.1.2 durchgeführt, um oberflächenmodifizierte Liposomen von nicht inserierten Ankerstrukturen sowie überschüssigem Histidin und freien Liganden abzutrennen (Schritt 4, Abbildung 3-10). Das Probevolumen bei der SEC betrug, wenn nicht anders angegeben, 150 μL .

Der Lipidgehalt der gesäulten Präparationen wurde mittels Bartlett- oder Cholesterol-Assay (vgl. Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2) bestimmt.

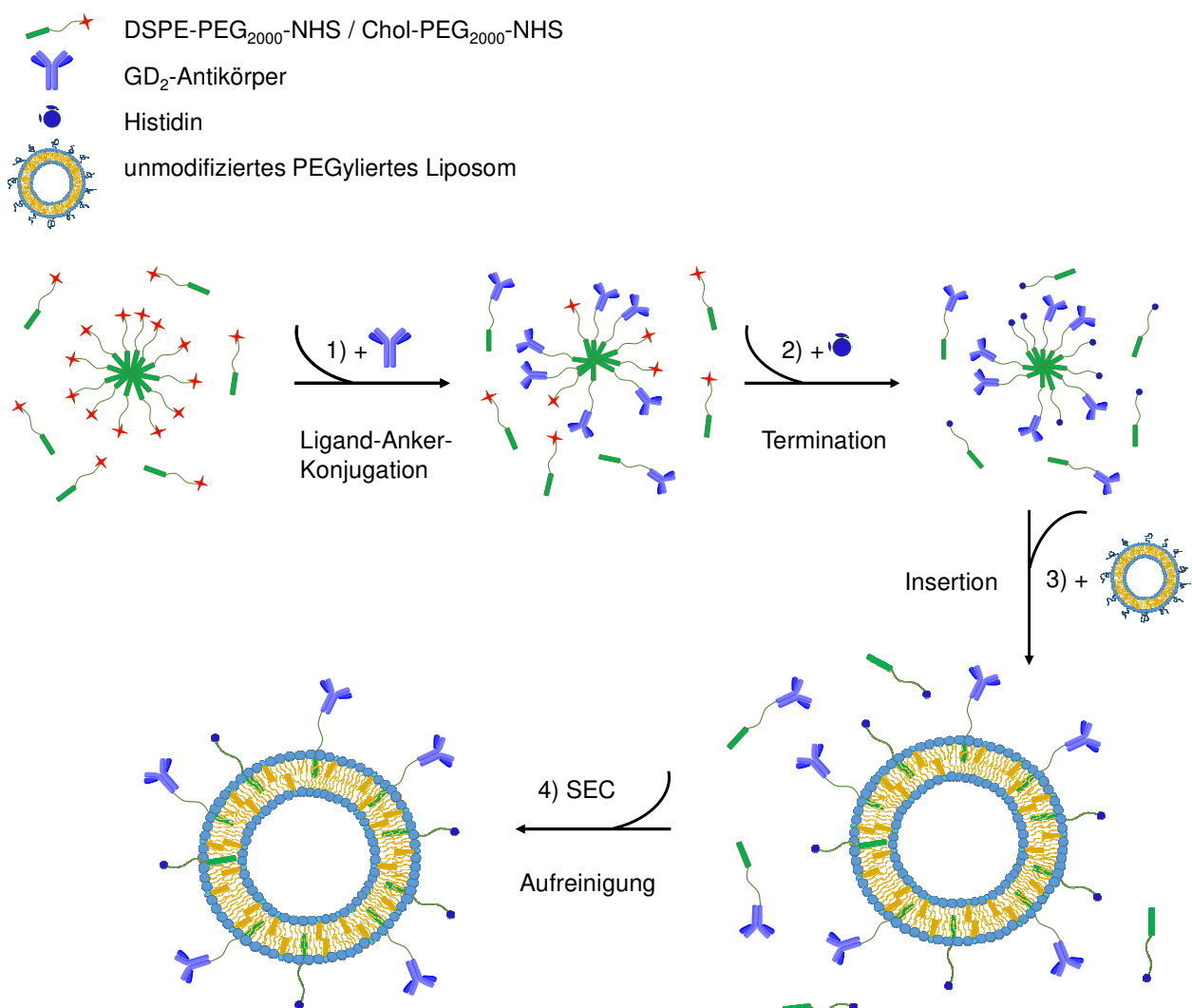


Abbildung 3-10: Nachträgliche Oberflächenmodifikation von Liposomen

Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der nachträglichen Oberflächenmodifikation von Liposomen (SPIT und PIT). Im 1. Schritt wird der Ligand, z. B. Antikörper, an die Ankerstruktur gekoppelt. Übrige reaktive NHS-Gruppen werden im Terminationsschritt mit Histidin abgestoppt (Schritt 2). Liposomen werden hinzugefügt und der Ansatz inkubiert (Insertion; Schritt 3). Zum Abschluss findet ein Aufreinigungsschritt der Immunoliposomen via SEC statt (Schritt 4).

3.5.2 Charakterisierung oberflächenmodifizierter Liposomen

3.5.2.1 SDS-PAGE

Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Insertionstemperatur und die eingesetzte Menge an Ak/An-Konjugat (mol %) auf die resultierende Proteinkonzentration der via PIT funktionalisierten Immunliposomen hatte. Die untersuchten Parameter sind in Tabelle 3-13 aufgeführt. Die Funktionalisierung wurde im Übrigen analog Kapitel 3.5.1.2 durchgeführt. Zur Quantifizierung wurden die gebundenen Proteine mittels *sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) von anderen Liposomenbestandteilen (Phospholipide, Cholesterol usw.) getrennt und mit Coomassie[®] (InstantBlue[™], Expedeon) angefärbt.

3.5.2.2 Herstellung des SDS-PAGE Gels

Das Gel bestand aus einem Sammelgel mit 15 Probestaschen zum Einpipettieren und Aufkonzentrieren der Probe, sowie dem Trenngel zur Auftrennung der Proteine. Die Herstellung sowie die Entwicklung der Gele erfolgten in einem vertikalen Doppelgelsystem (PerfectBlue[™] Twin S). Die Zusammensetzungen der dabei verwendeten SDS-PAGE-Gele sind in Tabelle 3-14 aufgelistet.

Die Gießplatten mit *Spacern* wurden in das vertikale Doppelgelsystem eingespannt und vor Verwendung gründlich mit Wasser ausgespült. Zur Herstellung des Trenngels wurden alle Komponenten gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von APS (Ammoniumperoxodisulfat) 10 % und TEMED (Tetramethylethylendiamin) gestartet. Der Ansatz wurde deshalb unverzüglich in den ≈ 1 mm großen Spalt zwischen den vorbereiteten Gießplatten pipettiert.

Um einen glatten Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten, wurde das Trenngel nach dem Einfüllen mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisation wurde dieses durch mehrmaliges Spülen mit Wasser entfernt.

Im Anschluss wurde das Sammelgel analog Tabelle 3-14 hergestellt und ebenfalls zwischen die Glasplatten pipettiert. Zur Ausbildung der Geltaschen wurde ein 15-zahniger Kamm zwischen die Platten geschoben und bis zum Ende der Polymerisation dort belassen. Nicht benötigte Gele konnten bei feuchter Lagerung in Trenngelpuffer-getränkten Tüchern im Kühlschrank (2-6 °C) bis zu zwei Wochen nach Herstellung verwendet werden.

Tabelle 3-14: Zusammensetzung des Ansatzes zur Herstellung von 2 SDS-PAGE-Gelen

Substanz	Sammelgel 4,8 %	Trenngel 12 %
Reinstwasser	2,3 mL	5,3 mL
Acrylamid 40 % (V/V)	480 µL	3,6 mL
Sammelgelpuffer	1 mL	-
Trenngelpuffer	-	3 mL
APS 10 % (m/V)	40 µL	80 µL
TEMED	4 µL	12 µL

3.5.2.3 Probenaufbereitung und Gelelektrophorese

Um ein ausreichend hohes Signal der Proteine bei der Coomassie-Färbung zu erhalten, wurden die mittels SEC aufgereinigten Immunoliposomen (vgl. Kapitel 3.5.1.2) aufkonzentriert. Die Proben wurden hierfür in eine Centrisart-Einheit (MWCO 100 000 Da) einpipettiert und 10 min bei 2320 x g an einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Universal 320) zentrifugiert.

Die so aufkonzentrierten Proben wurden im Anschluss in *Multi-Safe-Seal*-Reaktionsgefäße pipettiert und im Verhältnis 3:1 mit 4 x RSB (*reducing sample buffer*) versetzt. Für eine vollständige Denaturierung wurden die Ansätze 5 min bei 98 °C und 60 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -26 °C gelagert.

Das Gel wurde mit dem vertikalen Doppelgelsystem in einem mit Elektrophoresepuffer (*running buffer*, RB) befüllten Tank fixiert. 3 µL des Molmassenstandards und bis zu 20 µL der Proben wurden unter Zuhilfenahme einer Hamiltonspritze in die Geltaschen pipettiert. Zur Proteinquantifizierung wurde zusätzlich eine Kalibriergerade aus Proteinstandards (anti-GD₂) aufgetragen die, wie zuvor die Proben, mit 4 x RSB versetzt und aufgekocht wurden.

Während der Gelelektrophorese wurden die Proben zunächst für 30 min bei 100 Volt aufkonzentriert, um möglichst schmale Banden zu erhalten. Im Anschluss wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese für ca. 2 h fortgeführt. Nachdem die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Spannung abgestellt und die Gele vorsichtig entnommen.

Die Entwicklung der Gele erfolgte in einem Coomassie®-Bad über 45-60 min. Im Anschluss wurde das Gel ca. 15 min mit Wasser gewaschen.

3.5.2.4 Auswertung der SDS-PAGE

Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte über die Auswertung der Signalflächen von *heavy* (H) und *light chain* (L) über die Software Image Studio™ Lite version 5.2 (siehe Abbildung 3-11 B). Über die erstellte Kalibriergerade konnte im Anschluss die liposomal gebundene Proteinmenge bestimmt werden (Abbildung 3-11 C).

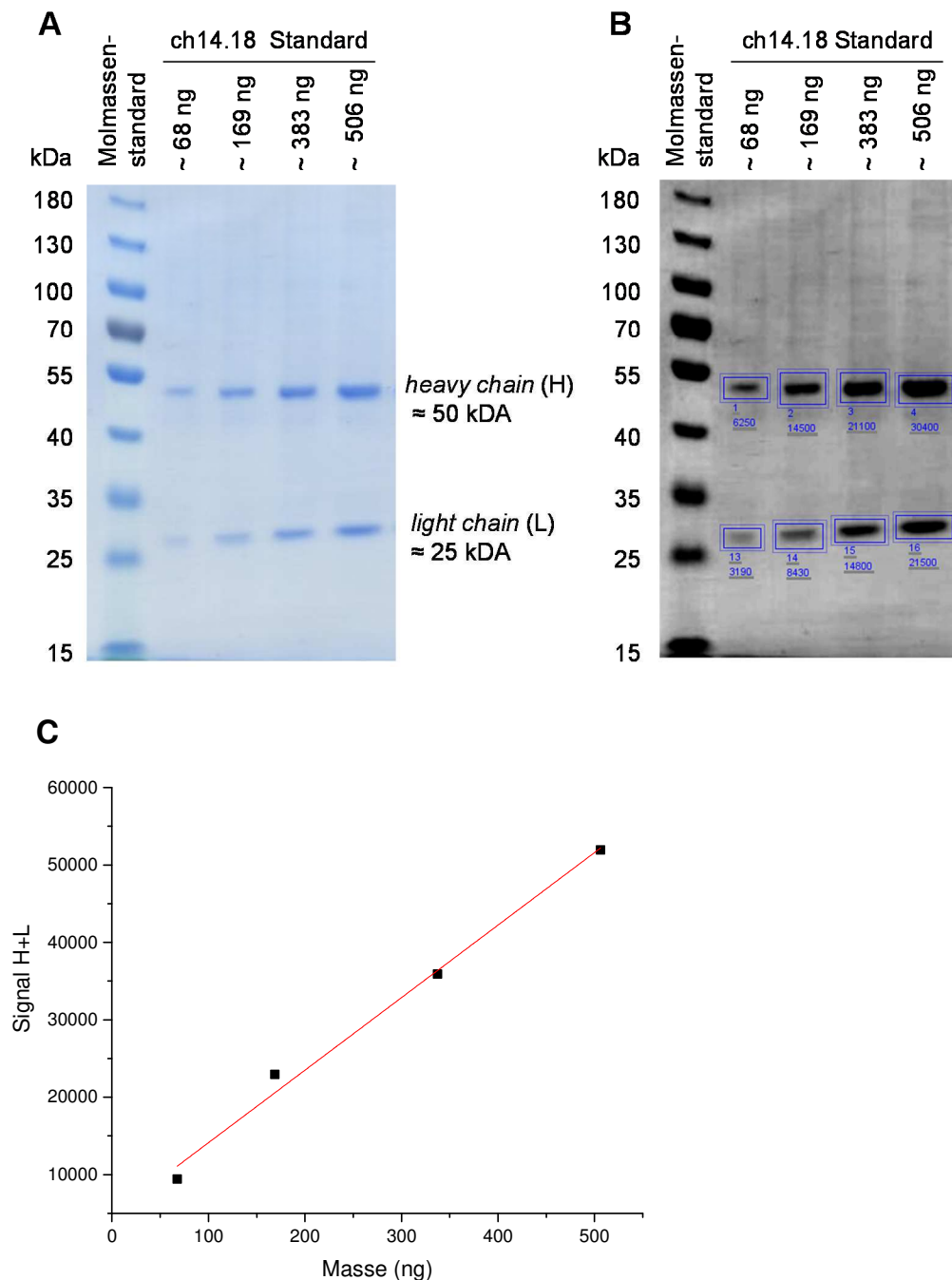


Abbildung 3-11: Auswertungsbeispiel SDS-PAGE

(A) ch14.18 Standards nach Elektrophorese mittels SDS-PAGE und anschließender Proteinfärbung mittels Coomassie®. Die Auftrennung in *heavy* (H ≈ 50 kDa) und *light chain* (L ≈ 25 kDa) ist deutlich zu erkennen. **(B)** Gel nach Auswertung der Signalflächen mittels Image Studio™ Lite version 5.2. **(C)** Exemplarische Kalibriergerade aus ch14.18 Standards.

Nach Ermittlung des Lipidgehalts mittels Cholesterol-Assay (siehe Kapitel 3.2.2.2) konnte das entsprechende Antikörper zu Phospholipid-Verhältnis (Ak/PL $\mu\text{g}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) berechnet werden. Über das ursprünglich eingesetzte Ak/PL-Verhältnis wurde nach Formel 4 die Effizienz der Oberflächenmodifizierung (E_{OM} %) berechnet.

$$E_{OM} = \left(\frac{Ak/PL_{ermittelt}}{Ak/PL_{eingesetzt}} \right) \cdot 100 \% \quad \text{Formel 4}$$

E_{OM} Effizienz der Oberflächenmodifikation
 Ak/PL_{ermittelt} mittels SDS-PAGE und Cholesterol-Assay ermitteltes Ak/PL Verhältnis ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$)
 Ak/PL_{eingesetzt} zur Oberflächenmodifikation eingesetztes Ak/PL Verhältnis ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$)

Berechnung der gekoppelten Antikörper pro Liposom

Die Gesamtanzahl gekoppelter GD₂-Antikörper konnte über die mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinmasse mit Formel 5 berechnet werden.

$$N_{Ak} = \frac{m_{Ak}}{Mr_{Ak}} \cdot N \quad \text{Formel 5}$$

N_{Ak} Anzahl an Antikörpern
 m_{Ak} mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinmasse (g)
 Mr_{Ak} Molekulargewicht der Antikörper ($ch14.18 = 146\,000 / ch\Delta C_{H2} = 120\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
 N Avogadrozahl ($6,02214\cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

Die Gesamtfläche eines Membranbilayers (A_t) wurde unter Annahme von unilamellaren Vesikeln homogener Größe nach Formel 6 berechnet (Schubert et al. 1991).

$$A_t = N \cdot L \cdot V_t \cdot A \cdot 0,5 \quad \text{Formel 6}$$

A_t Gesamtfläche eines Membranbilayers (nm^2)
 L Lipidkonzentration der Probe ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
 V_t Probenvolumen (L)
 A Durchschnittsfläche eines Lipids in der Membran ($0,43 \text{ nm}^2$ nach Züfle (2016))

Die mittlere Bilayerfläche (A_v) pro Vesikel wurde nach Formel 7 berechnet (Schubert et al. 1991).

$$A_v = 4 \pi \cdot \left(R - \frac{D}{2} \right)^2 \quad \text{Formel 7}$$

A_v	Bilayerfläche eines Vesikels (nm^2)
R	mittlerer hydrodynamischer Radius eines Vesikels (nm)
D	Membrandicke (≈ 14 nm; Dicke der PEG-Schichten $\approx 8,6$ nm (Schilt et al. 2016))

Bei bekannter A_t und A_v konnte die Anzahl der Liposomen (N_{Lip}), unter der Voraussetzung von Unilamellarität und homogener Größe der Vesikel über Formel 8 berechnet werden (Schubert et al. 1991).

$$N_{Lip} = \frac{A_t}{A_v} \quad \text{Formel 8}$$

A_t	Gesamtfläche eines Membranbilayers (nm^2)
A_v	Bilayerfläche eines Vesikels (nm^2)

Die durchschnittliche Antikörperzahl pro Liposom (N_{AkLip}) errechnete sich nach Formel 9 (Gantert et al. 2009).

$$N_{AkLip} = \frac{N_{Ak}}{N_{Lip}} \quad \text{Formel 9}$$

N_{Ak}	Anzahl an Antikörpern
N_{Lip}	Anzahl der Liposomen

3.6 Zellversuche

3.6.1 Allgemeines zur Zellkultur

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien sind adhärenente Zellen verschiedener humaner Neuroblastome. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen (Ø 100 mm) oder Zellkulturflaschen (75 cm²) im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80 %, passagiert. Angaben zum Passagierverhältnis und zu verwendeten Kulturmedien können Tabelle 3-15 entnommen werden.

Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit 6 mL 37 °C warmem PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und anschließend 1 mL Trypsin/EDTA (0,25 %/0,02 %) hinzugegeben. Zum Ablösen der Zellen wurde der Ansatz im Brutschrank bei 37 °C für 3-5 min inkubiert. Durch Zugabe von 4 mL 37 °C warmen Mediums wurde die Peptidasereaktion des Trypsins gestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. In einer Zellkulturschale wurden 14 mL frisches Medium vorgelegt und ein entsprechender Anteil der Zellsuspension zugegeben.

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte durch Kryo-Konservierung in flüssigem Stickstoff.

Tabelle 3-15: Subkultivierung der Zelllinien (<https://www.dsmz.de>)

<i>Zell-Linie</i>	<i>Ursprung/Charakteristik</i>	<i>Passagier-verhältnis</i>	<i>Kulturmedium</i>
Kelly	100-fache MYCN Amplifikation	1:10	VLE RPMI + 10 % FCS
LS	Abdominal, Stadium 3 Neuroblastom (INSS) / MYCN Amplifikation	1:15	
SK-N-AS	Knochenmarksmetastase	1:15	
SH-SY5Y	Knochenmark	1:15	

3.6.2 Durchflusszytometrie

Die Zell-Interaktion der in Kapitel 3.5 beschriebenen Immunoliposomen und das Ausmaß der GD₂-Expression der verwendeten Zellen (siehe Kapitel 3.6.2.4) wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei dieser Methode werden die Zellen in einem speziell aufgebauten Fluidiksystem in einen Strom aus Einzelzellen angeordnet und an unterschiedlichen Lasern vorbeigeleitet. Die Fluoreszenz- und Streulichtsignale werden von Detektoren registriert und ermöglichen den Erhalt von Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen sowie spezifischer Charakteristika über den Einsatz von Fluoreszenzmarkern. Abbildung 3-12 zeigt den schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers.

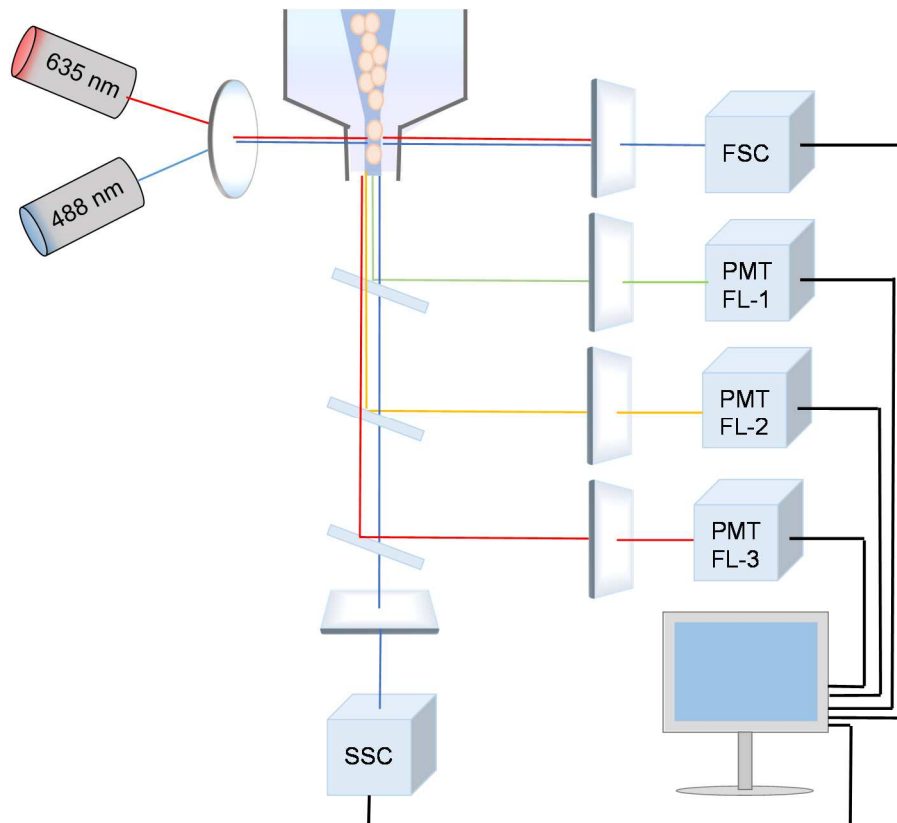


Abbildung 3-12: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Zellen werden im Fluidiksystem zu einem Strom aus Einzelzellen fokussiert und an Laserstrahlen verschiedener Wellenlänge vorbeigeführt. Die dabei entstehenden Lichtstreuungen (*sideward scatter* SSC und *forward scatter* FSC) sowie die emittierte Fluoreszenz werden von entsprechenden Detektoren (Photomultiplier, PMT) registriert und an eine Auswerteeinheit weitergeleitet (nach Rahman (2014)).

3.6.2.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Untersuchung der Liposomen-Zell-Interaktion mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn in eine 24-well Platte ausplattiert. Die Ausgangszellzahl richtete sich dabei nach der Proliferationsrate der Zellen. Für Untersuchungen mit Kelly-Zellen wurden 150 000 Zellen in 1 mL Medium pro well plattiert. Bei Verwendung von SK-N-AS Zellen war eine Ausgangszellzahl von 100 000/mL ausreichend. Da die Messung in Triplikaten erfolgte, wurden für jede Probe jeweils 3 wells angesetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem altes Medium entfernt und je 500 µL frisches Medium auf die Kontrollzellen bzw. 400 µL in jedes Probenwell gegeben wurden.

3.6.2.2 Praktische Durchführung der Durchflusszytometrie

Die zu untersuchenden Liposomendispersionen wurden auf eine Lipidkonzentration von 0,75 mM mit PBS w/o eingestellt und in Triplikaten zu je 100 µL auf die Zellen gegeben. Dies entsprach einer Lipidmenge von 75 nmol pro *well*. Die Zellen wurden anschließend für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach Ende der Inkubation erfolgte die Aufarbeitung der Zellen. Um weitere Stoffwechselprozesse zu unterbinden, wurden alle verwendeten Puffer und Medien sowie die Polystyrolröhrchen für die Durchflusszytometrie (*FACS-Tube*) in Eiswasser gekühlt. Da die Adhärenz der Zellen durch GD₂-Antikörper abgeschwächt wird, wurde das gesamte Medium eines *wells* in einem *FACS-Tube* gesammelt. Jedes *well* wurde im Anschluss mit 1 mL PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und der gesamte Puffer wiederum in das dazugehörige *FACS-Tube* überführt. Zum vollständigen Ablösen des Zelllayers wurden 200 µL Trypsin/EDTA pro *well* zugegeben und der Ansatz für 4 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 800 µL Medium wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und wiederum in das jeweilige *FACS-Röhrchen* überführt.

Der Ansatz wurde bei 4 °C, 259 x g über 4 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit 1 mL PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Zur durchflusszytometrischen Vermessung wurde das Zellpellet in 200 µL PBS w/w Ca²⁺/Mg²⁺ aufgenommen und direkt vor der Vermessung kurz gevortext.

3.6.2.3 Untersuchung der zellulären Assoziation von Liposomen

Diese Untersuchungen wurden am Durchflusszytometer FACSCalibur™ (BD Bioscience) durchgeführt. Zu Beginn jeder Messung wurde für jede der zu untersuchenden Zelllinien anhand von unbehandelten Kontrollzellen die Einstellung des spezifischen Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulichtes (*sideward scatter*, SSC) vorgenommen. Hierfür wurde in einem Dot-Plot der SSC gegen den FSC aufgetragen und durch Markierung der intakten Zellen (Analysengate) Zelltrümmer von der Messung ausgeschlossen. Die jeweilige Auto-Fluoreszenzintensität der Zelllinie in den Fluoreszenz-Kanälen (FL) FL-1, FL-2 und FL-3 wurde über den logarithmisch dargestellten Histogramm-Plot so eingestellt, dass die Zellen größtenteils innerhalb der ersten Fluoreszenzdekade lagen. Alle Proben wurden anschließend bei festgelegten Messeinstellungen analysiert. Zur Detektion der Liposomen wurden diese wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben mit 0,5 mol % Rh-DPPE markiert, welches bei Einstrahlung von Laserlicht der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm im FL-2-Kanal bei $\lambda = 580$ nm detektiert werden konnte.

Die zelluläre Assoziation der Rh-markierten Liposomen wurde über das Histogramm des FL-2-Kanals bestimmt, in welchem Rhodamin detektiert wird (siehe Abbildung 3-13). Hierbei wurde zum einen durch Setzen eines *gates*, Kontrollzellen < 0,5 % (Rh-positiv), bestimmt wie viel Prozent der Zellen innerhalb dessen lagen. Zum anderen wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) analysiert, welche als Maß für die Menge gebundener Liposomen gesehen werden kann.

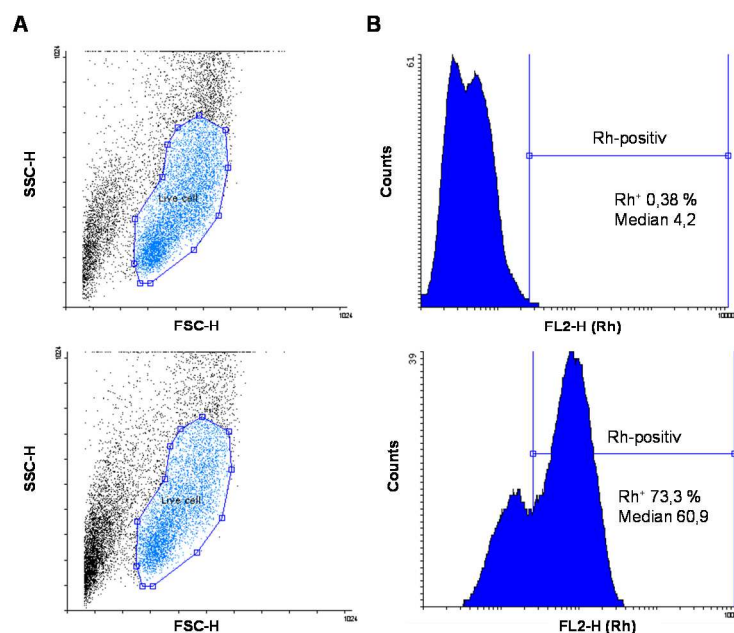


Abbildung 3-13: Durchflusszytometrische Analyse von Kelly-Zellen

Obere Reihe: Messeinstellungen und Gates für den Dot-Plot (A) und das Histogramm (B) wurden anhand von unbehandelten Kontrollzellen definiert. **Untere Reihe:** mit $\text{ch}\Delta\text{C}_{\text{H}2}$ oberflächenmodifizierte, Rh-markierte Liposomen resultieren in einer gesteigerten Fluoreszenzintensität. Datenauswertung mittels Flowing Software.

3.6.2.4 Immunhistochemische Untersuchung der GD₂-Expression

Die GD₂-Expression auf Neuroblastomzellen (Kelly, LS, SK-N-AS und SH-SY5Y) wurde mittels Alexa Fluor 488 markiertem sekundären Antikörper, der sowohl an die *heavy* als auch an die *light chain* des primären GD₂-Ak bindet, untersucht. Die Zellen wurden hierfür wie beim Passagieren (Kapitel 3.6.1) beschrieben von der Kulturplatte gelöst und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-improved[®]-Zählkammer ermittelt. Im Anschluss wurden pro Ansatz 500 000 Zellen in ein *FACS-Tube* überführt, wobei jede Probe in Triplikaten vermessen wurde.

Die Zellen wurden zweimal mit je 2 mL PBS w/o Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen, indem die Ansätze jeweils 4 min bei 259 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand abdekantiert wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit primärem Antikörper (anti-GD₂: hu14.18, ch14.18 oder chΔC_{H2}) in einer Konzentration von 1 µg/100 µL versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifisches IgG verwendet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze wiederum mit je 2 mL Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Als sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor 488 markierter *goat anti-Human IgG* (H+L) in einer Konzentration von 1 µg /100 µL verwendet. Alle Ansätze, mit Ausnahme der Kontrollzellen, wurden für 40 min bei 4 °C mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Um eine unspezifische Bindung an die Zellen ausschließen zu können, wurde auch ein Teil der Kontrollzellen (ohne primären Antikörper) mit sekundärem Antikörper versetzt.

Im letzten Waschschrift wurden die Zellen erneut zweimal mit 2 mL PBS w/o Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde für die durchflusszytometrische Untersuchung in 300 µL PBS w/w Mg²⁺/Ca²⁺ aufgenommen.

Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchung

Die durchflusszytometrische Vermessung erfolgte am BDLSR Fortessa[™]. Das Gerät bietet im Vergleich zum FACSCalibur[™] zusätzlich die Möglichkeit die Weite der Seitwärtsstreulichtintensität (SSC-W) auszuwerten. Durch dieses Verfahren können Dubletten und größere Zellzusammenschlüsse, die ein höheres Fluoreszenzsignal und somit eine ungleichmäßige Verschiebung der Zellpopulation verursachen, aus der Vermessung ausgeschlossen werden (Lopez-Sanchez & Frade 2013). Ein Beispiel für die Einstellung des Analysengates (rot markierte Zellen) von SK-N-AS-Zellen ist in Abbildung 3-14 gezeigt.

Die GD₂-Expression wurde über die Verschiebung der Fluoreszenzintensität im logarithmisch aufgetragenen Histogramm des FL-1 bei 488 nm detektiert (vgl. Abbildung 3-13).

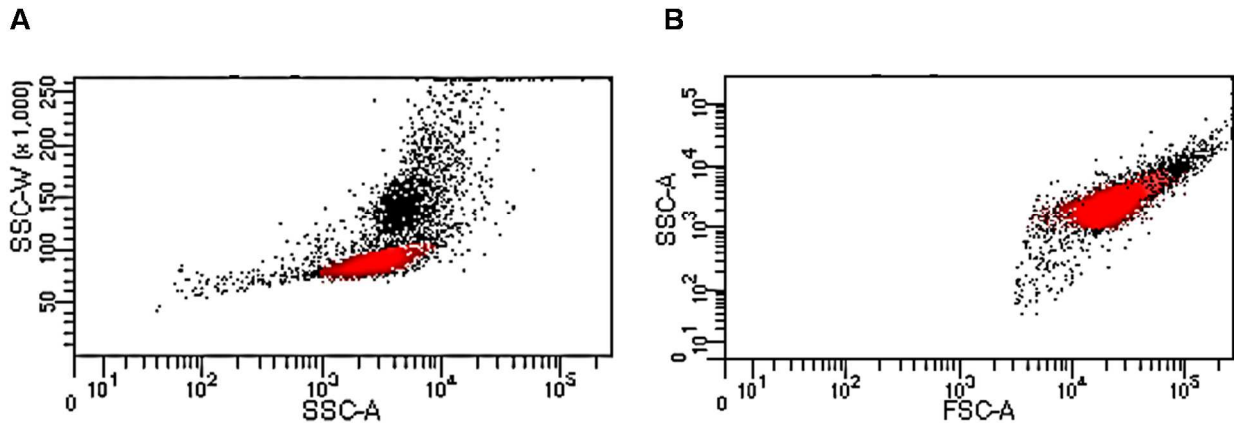


Abbildung 3-14: Einstellung des Analysengates an SK-N-AS-Zellen

(A) Auftragung von SSC-W gegen SSC-A und Setzen des Analysengates anhand von unbehandelten Kontrollzellen. (B) Graphische Darstellung von SSC-A gegen FSC-A mit Analysengate. Auswertung mittels FACSDiva™ Software.

3.6.3 Zellvitalitätsuntersuchungen

Um die Wirksamkeit von As-beladenen Liposomen mit reiner ATO-Lösung zu vergleichen, wurden zwei im Folgenden näher beschriebene Zellvitalitäts-Assays durchgeführt. Grundlage dieser Untersuchungen ist die Bestimmung der beim Zellmetabolismus entstehenden Coenzyme ATP oder NADH_2 , die als quantitatives Maß für die Vitalität der Zellen dienen. In Abbildung 3-15 ist die Funktionsweise dieser Assays schematisch dargestellt.

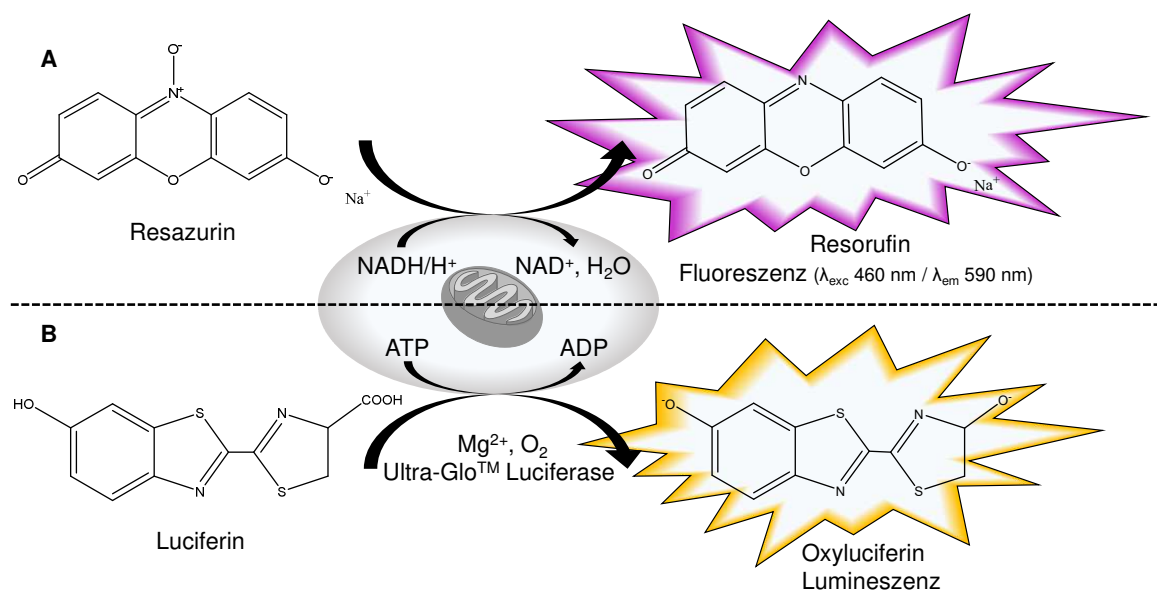


Abbildung 3-15: Funktionsweise der Zellvitalitäts-Assays

(A) Resazurin-Reduktions-Assay (nach Riss et al. (2013)). (B) CellTiter-Glo® (CTG) Assay (nach Promega Corporation (2011)).

3.6.3.1 CellTiter-Glo® (CTG) Assay

Beim CTG-Assay wird der ATP-Gehalt im Zelllysat indirekt durch eine enzymatische Reaktion bestimmt. Dabei reagiert Luciferin in Anwesenheit von Mg^{2+} und molekularem Sauerstoff sowie unter Luciferase-Katalyse zu dem lumineszenten Oxyluciferin (vgl. Abbildung 3-15 B). Das Lumineszenzsignal, welches ein Maß für die Vitalität der Zellen ist, wurde am Berthold Tristar LB 941 Microplate Reader gemessen.

Praktische Durchführung

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in weiße, opake 96-well Platten plattiert. Die dabei eingesetzten Zellzahlen können Tabelle 3-16 entnommen werden. Die Arsen-Lösung wurde so mit VLE-RPMI Medium verdünnt, dass der untersuchte Konzentrationsbereich zwischen 0,1-100 μM ATO lag. Das alte Medium wurde abgenommen und durch 100 μL der verdünnten Arsenlösungen ersetzt, wobei die Proben als Triplikate zugegeben wurden. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C für 72 h im Brutschrank inkubiert. Nachdem das CTG-Reagenz und die Platten auf Raumtemperatur gebracht wurden, erfolgte die Zugabe von je 100 μL des Reagenz pro well. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden die Platten 2 min auf einem Laborschüttler (Thermomixer® Comfort) bei 700 rpm geschüttelt und anschließend für weitere 10 min unter Lichtausschluss inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde 3-mal vermessen und der Mittelwert der Messungen gebildet.

Datenauswertung

Für die Auswertung wurde die Vitalität unbehandelter Kontrollzellen 100 % gesetzt und die Vitalität der ATO-behandelten Zellen in Relation dazu angegeben. Die Abnahme der Zellvitalität wurde in Abhängigkeit von der logarithmisch aufgetragenen ATO-Konzentration (μM) dargestellt. Die sigmoidal verlaufende Kurve konnte anschließend mit Hilfe von Formel 10 gefittet werden, sodass die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) berechnet werden konnte.

$$y = y_0 + \frac{y_{100} - y_0}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x}\right)^{-p}}$$

Formel 10

y_{100}	obere Asymptote (%)
y_0	untere Asymptote (%)
x	Konzentration (μM)
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration (μM)
p	Hill Koeffizient (Steilheit des sigmoidalen Kurvenverlaufs)

Tabelle 3-16: Übersicht der plattierten Zellzahlen

<i>Inkubationszeit (h)</i>	<i>Kelly-Zellen / well</i>		<i>LS-Zellen / well</i>	
	<i>CTG</i>	<i>Resazurin</i>	<i>CTG</i>	<i>Resazurin</i>
24	-	30 000	-	10 000
48	-	20 000	-	5 000
72	10 000	10 000	2 000	2 000

Die angegebenen Zellzahlen wurden in Vorversuchen getestet und lagen dort im linearen Bereich des jeweiligen Assays.

3.6.3.2 Resazurin-Reduktions-Assay

Resazurin ist ein Zellmembran-permeabler Redoxindikator, der in metabolismusaktiven Zellen zu fluoreszierendem Resorufin reduziert werden kann (vgl. Abbildung 3-15 A). Die Menge an produziertem Resorufin ist dabei proportional zur Anzahl lebender Zellen (Riss et al. 2013).

Praktische Durchführung

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen gemäß Tabelle 3-16 in schwarze, opake 96-well-Platten plattiert. ATO-Lösung oder ATO-beladene Liposomen wurden mit VLE RPMI Medium verdünnt ($c_{\text{ATO}_{\text{Lip}}} = 0,4\text{-}500 \mu\text{M}$, $c_{\text{ATO}} = 0,1\text{-}100 \mu\text{M}$) und nach Abnahme des alten Mediums in Triplikaten zu je 100 μL /well auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden anschließend für 24, 48 oder 72 h im Brutschrank bei 37 °C weiter inkubiert. Nach Inkubationsende wurden 20 μL Resazurin-Reagenz ($c = 0,15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS w/o $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ pH 7,4) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Diese verlängerte Inkubationszeit wurde gewählt, da hierdurch eine bessere Sensitivität der Methode erzielt werden konnte. Die Fluoreszenz wurde 3-mal vermessen ($\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) und der Mittelwert gebildet. Die Datenauswertung erfolgte analog Kapitel 3.6.3.1.

3.6.4 Konfokale Aufnahmen

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden autoklavierte Deckgläschen (\varnothing 12 mm) in 24 well-Platten gelegt und mit je 1 mL filtrierter ($< 0,22 \mu\text{m}$) Gelatinelösung (0,2 % in PBS w/o $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) über 10 min bei 37°C und 5 % CO_2 beschichtet. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit je 1 mL PBS w/o $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$. Im Anschluss wurden 500 000 Zellen (Kelly und LS) pro well ausplattiert. Nach Ende der 24-stündigen Anwachsphase erfolgte 1 h vor Versuchsbeginn ein Mediumwechsel. Die mit Rhodamin markierten (0,5 mol %), oberflächenmodifizierten Liposomen (vgl. Kapitel 3.5.1 und 3.5.1.2) wurden mit Puffer verdünnt und je 100 μL der 0,75 mM Proben zugegeben.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit je 1 mL 37°C warmem PBS w/o $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ gewaschen. Die Zellen wurden mit 4 %iger (V/V) Paraformaldehyd- (PFA) Lösung für 20 min bei 37°C und 5 % CO_2 fixiert und anschließend weitere zweimal mit je 1 mL Puffer gewaschen.

Die Zellkerne wurden mit DAPI-Lösung (150 nM in PBS w/o $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) angefärbt. Hierfür wurden 300 μL der Lösung je well zugesetzt und der Ansatz 5 min unter Lichtausschluss inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit je 1 mL Puffer wurden die Deckgläschen aus den Platten genommen, getrocknet und mittels *ProLong[®] Diamond Antifade Mountant* (ThermoFisher) auf die Objektträger eingebettet. Die Proben wurden 24 h im Dunkeln getrocknet und anschließend im Kühlschrank bis zur Analyse gelagert.

Die Präparationen wurden am LSM 880, Axio Observer (Zeiss) mit einem C-Apochromat 63x / 1.2 W Korr. Objektiv am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) der Universität Tübingen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Rh-Fluoreszenzsignal wurde dabei bei $\lambda_{\text{exc}} = 561 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 609 \text{ nm}$, die DAPI-Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$ detektiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 *Upscaling* der Liposomenherstellung

Für die parenterale Anwendung der liposomalen Dispersion als Wirkstoffträger für die Neuroblastomtherapie muss die Herstellung großer Ansätze (mehrere Milliliter) mit hoher Qualität gewährleistet werden. Die drei Säulen des therapeutischen Einsatzes von Liposomen sind: *Upscaling*, Stabilität und Sterilität (Lasic 1993c).

In diesem Teil der Arbeit wurde daher die Herstellung Ni(OAc)₂-beladener Liposomen in größerem Maßstab (bis zu 10 mL) untersucht. Getestet wurden zwei verschiedene Methoden: die Druckextrusion und die Mikrofluidisierung. Die Methoden hierzu sind in Kapitel 3.1.3 eingehend beschrieben.

Das Ziel der Untersuchungen war zum einen, die Liposomen schnell und in ausreichender Menge herzustellen. Zum anderen sollte die Herstellungsmethode die Präparation von Liposomen einer durchschnittlichen Größe von 130-180 nm mit gleichmäßiger Größenverteilung ($PDI \leq 0,1$) ermöglichen. Die Größe der Liposomen wird so gewählt, dass ein möglichst großer hydrophiler Innenraum zum Einschluss hoher Wirkstoffmengen zur Verfügung steht. Gleichzeitig ist die Aufnahme größerer Liposomen ins retikuloendotheliale System (RES) und damit die Elimination aus der Blutzirkulation *in vivo* beschleunigt (vgl. Kapitel 1.2.2.1). Für ein gezieltes und effektives Ansteuern von Neuroblastomzellen muss bezüglich der Vesikelgröße daher ein Kompromiss aus hohem Wirkstoff-Einschluss und langer Zirkulationszeit eingegangen werden (Abra & Hunt 1981).

Da die Konzentration von Arsen direkt mit der zuvor verkapselten Menge an Nickel korreliert, (vgl. Kapitel 3.3.1) wurde zudem untersucht, wie sich die Herstellungsmethode auf die intraliposomale Nickelkonzentration (cNi_{Lip}) auswirkte.

4.1.1 Herstellung mittels Druckextrusion

Bei der Druckextrusion wird die MLV- (*multilamellar large vesicles*) Dispersion durch Polycarbonatmembranen mit definierter Porengröße extrudiert. Dieses Verfahren wurde erstmals von Olson et al. beschrieben und bietet die Möglichkeit einer Größenreduktion unter reproduzierbaren und relativ schonenden Bedingungen (Olson et al. 1979).

Mithilfe der Druckextrusionssysteme der Firma Lipex Biomembranes Inc., (heute Transferra Nanoscience Inc.) ist es möglich Liposomenchargen im Bereich von 10 bis 800 mL herzustellen.

Der Druckextruder ist zusätzlich mit einem temperierbaren Heizmantel ausgestattet, sodass die Extrusion der ESM/Chol-Präparationen oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur (T_c) möglich war. In dieser Arbeit wurde mit dem Lipex™ Basicextruder gearbeitet, der ein maximales Fassungsvermögen von 10 mL besitzt.

Zunächst wurde die aus Vorgängerarbeiten bekannte ESM/Chol-Mischung (70/30 mol %) auf ihre Tauglichkeit zur Druckextrusion untersucht. Hierfür wurden die Lipidfilme in 300 mM Ni(OAc)₂-Lösung hydratisiert und die Ansätze wie in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben extrudiert. Die Anzahl der angewandten Extrusionsschritte können Tabelle 3-3 (Seite 45) entnommen werden.

Bei der Druckextrusion musste aufgrund des höheren Herstellungsdrucks und der damit verbundenen starken Beanspruchung der Polycarbonatmembran die ursprünglich bei der Handextrusion eingesetzte Lipidkonzentration von 25 mM auf 20 mM verringert werden. Da die Vesikelgröße stark vom Extrusionsdruck abhängt (Hunter & Frisken 1998), konnte die Anzahl der Extrusionsschritte von ursprünglich 21 x 200 nm und 51 x 80 nm bei der Handextrusion auf 11 x 200 nm und 11 x 80 nm bei der Druckextrusion reduziert werden. Die Liposomengrößen und Größenverteilungen wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS vgl. Kapitel 3.2.1.1) bestimmt. Die PCS-Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Tabelle 4-1: PCS-Untersuchung der extrudierten ESM/Chol-Liposomen.

<i>Präparation</i>	<i>Herstellungsmethode</i>	<i>Konzentration (mM)</i>	<i>$d_h \pm SD$ (nm)</i>	<i>$PDI \pm SD$</i>
ESM/Chol (70/30 mol %)	Handextrusion	25	171,6 ± 23,6	0,214 ± 0,09
	Druckextrusion	20	187,2 ± 12,7	0,205 ± 0,02

Dargestellt sind der intensitätsgewichtete hydrodynamische Durchmesser (d_h) und der Polydispersitätsindex (PDI) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD). ($n = 2-9$)

Auffallend ist, dass beide Herstellungsmethoden von einer schlechten Vesikelgrößenverteilung ($PDI > 0,2$) gekennzeichnet waren. Um genauere Aussagen über die Morphologie der enthaltenen Liposomen treffen zu können, wurden diese zusätzlich kryo-transmissionselektronenmikroskopisch (Kryo-TEM) analysiert (siehe Abbildung 4-1).

Bei den mittels Handextrusion hergestellten Liposomen sind deutliche Größenunterschiede innerhalb der Präparation zu erkennen (Abbildung 4-1 A). Die hier beobachteten großen Vesikel konnten bei den durch Druckextrusion hergestellten Liposomen nicht gefunden werden (Abbildung 4-1 B).

Es ist allerdings zu beachten, dass die Kryo-TEM Aufnahmen nur einen Ausschnitt der sich in der Probe befindenden Vesikel zeigen. Außerdem kann es bei der Herstellung der Kryo-TEM Proben zum Ausschluss von sehr großen Vesikeln (> 500 nm) kommen (Almgren et al. 2000).

Sowohl bei den mittels Handextrusion als auch bei den durch Druckextrusion hergestellten Liposomen ist eine deutliche Abflachung der Vesikelform zu erkennen. Dieses Phänomen der Abflachung und das resultierende kettenförmige Zusammenlagern der Liposomen wurde auch schon für SPC/Chol/ESM-Liposomen (40/30/30 mol %) beschrieben (Holzer 2009).

Die Agglomeration (reversibel) oder Aggregation (irreversibel) kann die Anwesenheit sehr großer Vesikel in der PCS-Messung vortäuschen, wodurch der hohe PDI der Präparationen zusätzlich erklärt werden kann. Da eine Unterscheidung zwischen Vesikel-Agglomeration und -Aggregation mit PCS-Messungen oder Kryo-TEM Untersuchungen nicht möglich war, wird diese Vesikelzusammenlagerung im Folgenden als Agglomeration/Aggregation bezeichnet. Die Agglomeration/Aggregation der Liposomen konnte auch visuell durch eine Sedimentation der Vesikel während der Lagerung beobachtet werden.

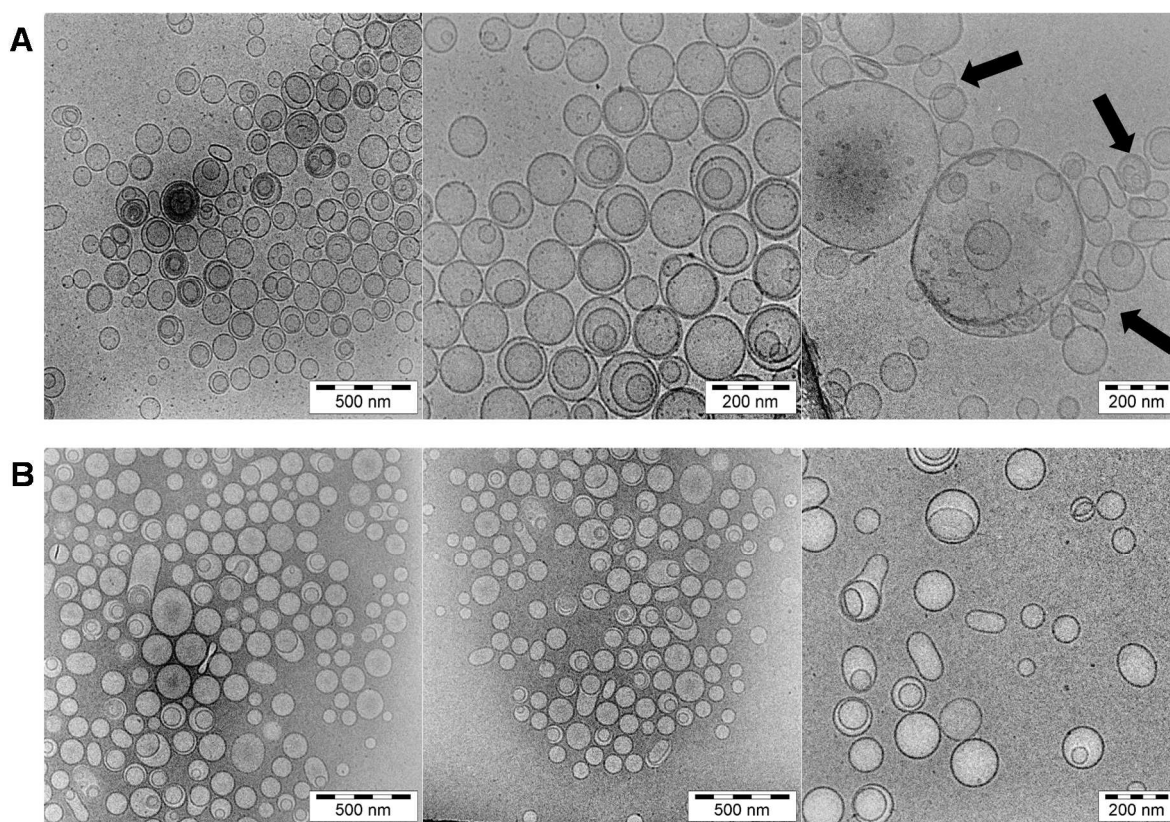


Abbildung 4-1: Kryo-TEM Aufnahme von $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -beladenen ESM/Chol-Liposomen

(A) Herstellung mittels Handextrusion 21×200 nm und 51×80 nm. Kettenförmige Zusammenlagerung der Liposomen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **(B)** Herstellung mittels Druckextrusion 11×200 nm und 11×80 nm.

4.1.1.1 Überarbeitung der Lipidkomposition

Die Tendenz zur Liposomenagglomeration bzw. -aggregation hängt stark von der gewählten Lipidkomposition, der Temperatur, dem pH und der Ionenstärke (mehrwertige Kationen, Ni^{2+}) des Hydratisierungsmediums ab (Lichtenberg & Barenholz 1988, Zuidam et al. 2003).

Die Stabilität von kolloidalen Systemen kann mit der DLVO-Theorie beschrieben werden. Sie basiert auf dem Wechselspiel von anziehenden van-der-Waals-Kräften und abstoßenden elektrostatischen Kräften zwischen den Vesikeln (Verwey & Overbeek 1948, Derjaguin & Landau 1993). Bei geringem Abstand zwischen ungeladenen Liposomen kommt es durch die vorherrschenden anziehenden van-der-Waals-Kräfte der Lipidbilayer zur Adhäsion. Das Erzeugen einer negativen Oberflächenladung auf den Liposomen, beispielsweise durch den Zusatz negativ geladener Phospholipide wie Phosphatidylglycerol (PG), kann diese Tendenz durch eine verstärkte elektrostatische Abstoßung (erhöhtes Zeta-Potential) zwischen den Vesikeln kompensieren.

Auch durch das Aufbringen hydrophiler Polymere auf die Vesikeloberfläche können liposomale Dispersionen sterisch stabilisiert werden. Am häufigsten werden dafür Polyethylenglykole (PEG) eingesetzt, welche über kovalent gebundene Phospholipide (i.d.R. Phosphatidylethanolamin; DSPE-PEG) in der Liposomen-Membran verankert werden. Die Modifikation der liposomalen Oberfläche mit hydrophilen Gruppen führt zu einem erhöhten Abstoßungsdruck zwischen liposomalen Bilayern und wirkt somit den anziehenden van-der-Waals-Kräften entgegen (Needham et al. 1992, Lasic 1993a). Die sterische Stabilisierung der Liposomen führt nicht nur zu einer verminderten Agglomerations- und Aggregations-tendenz der Liposomen sondern, durch den sogenannten *Stealth*-Effekt (vgl. 1.2.2.1), auch zu verlängerten Blutzirkulationshalbwertszeiten (Woodle & Lasic 1992). Ahl et al. konnten in ihren Studien einen direkten Zusammenhang zwischen reduzierter Agglomeration bzw. Aggregation sowie verminderter Opsonisierung durch das Komplementsystem und der damit verbundenen längeren Blutzirkulationshalbwertszeit herstellen (Ahl et al. 1997).

Um sowohl den Effekt der verminderten Tendenz zur Agglomeration/Aggregation als auch die verlängerte Blutzirkulationshalbwertszeit der Liposomen nutzen zu können, wurden der ESM/Chol-Mischung 5 mol % DSPE-mPEG₂₀₀₀ zugesetzt. Laut Literatur wird PEG in Konzentrationen von 5-10 mol % eingesetzt, um einen *Stealth*-Effekt *in vivo* zu erzielen. Ab 5 mol % inkorporierten DSPE-PEGs beginnen die Ketten mit durchschnittlichem Molekulargewicht von 2 000 Da sich gegenseitig abzustoßen. Die PEG-Ketten gehen dabei von einer *mushroom* in eine *brush* Anordnung über (Kenworthy et al. 1995).

Da bei der Oberflächenmodifikation der Liposomen mit anti-GD₂ zusätzlich PEG-Ketten in die äußere Schicht des liposomalen Bilayers inkorporiert werden (vgl. Kapitel 3.5.1.2), wurde hier zunächst mit einer vergleichsweise geringen Konzentration von 4,8 mol % DSPE-mPEG gestartet.

Der ESM/Chol/DSPE-mPEG-Lipidfilm (66,7/28,5/4,8 mol %) wurde gemäß Kapitel 3.1.1 in 300 mM Ni(OAc)₂-Lösung hydratisiert und die MLV-Dispersion anschließend im Druckextruder homogenisiert (siehe Tabelle 3-3). Größe und Größenverteilung der veränderten Lipidkomposition wurde mit ursprünglich eingesetzter ESM/Chol-Mischung verglichen. Außerdem wurde der Einfluss der Hand- bzw. Druckextrusion auf die ESM/Chol-Mischung untersucht. Der intensitätsgewichtete hydrodynamische Durchmesser und die Größenverteilung der Liposomen wurde mittels PCS nach Kapitel 3.2.1.1 bestimmt. Die Daten hierzu sind in Abbildung 4-2 als kombiniertes Punkt-Säulen-Diagramm dargestellt.

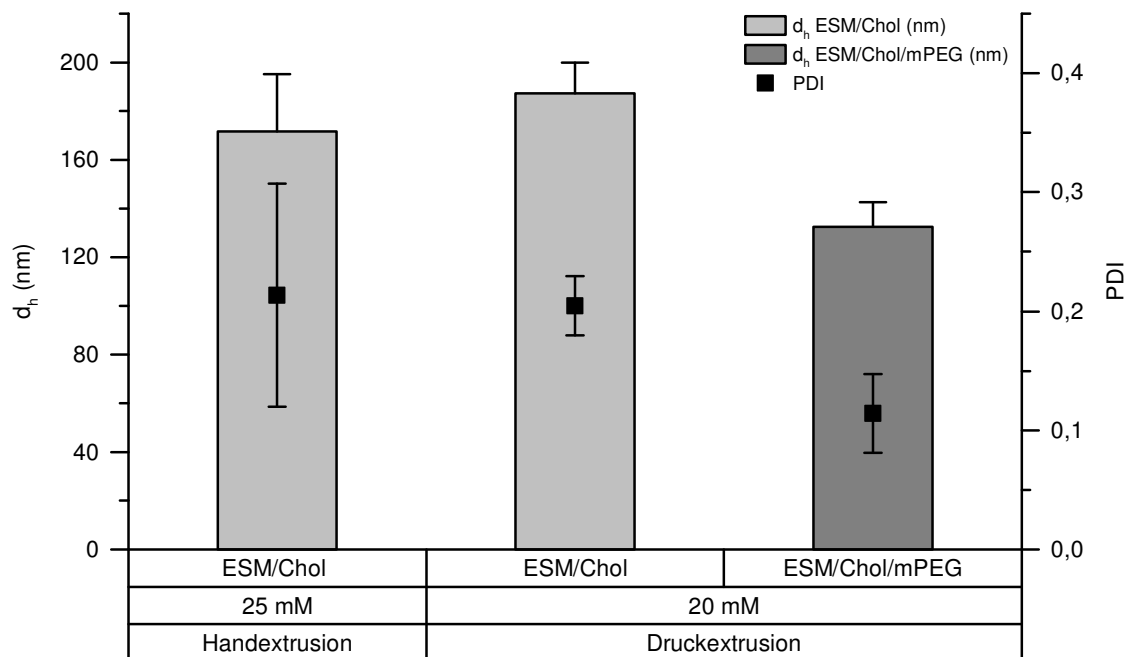


Abbildung 4-2: PCS-Untersuchung extrudierter Liposomen

Vergleich des hydrodynamischen Durchmessers (d_h) und des Polydispersitätsindex (PDI) von ESM/Chol-Liposomen (70/30 mol %) hergestellt mittels Hand- oder Druckextrusion sowie ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (66,7/28,5/4,8 mol %). Die für die ESM/Chol-Präparationen dargestellten Balken entsprechen den Werten aus Tabelle 4-1. ($n = 2-9 \pm SD$)

Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl der hydrodynamische Durchmesser der PEGylierten Vesikel ($d_h = 132,5 \pm 10,1$ nm) als auch der PDI ($0,114 \pm 0,033$ nm) im Vergleich zu nicht PEGylierten Liposomen (siehe Tabelle 4-1), trotz verringerter Extrusionsschritte (7×200 nm und 2×80 nm), sinkt. Durch die Einarbeitung von DSPE-PEG wird die zuvor breite Größenverteilung mit einem PDI $> 0,2$ zu einer monomodalen Dispersion mit enger Größenverteilung. Dies kann mit einer durch die PEG-Ketten induzierten Verstärkung der abstoßenden Kräfte (sterische, elektrostatische und Hydratationskräfte) zwischen den Vesikeln und der daraus resultierenden verringerten Agglomeration/Aggregation der Liposomen erklärt werden (Garbuzenko et al. 2005).

4.1.1.2 Einfluss der Lyophilisation auf die Charakteristik der Präparationen

Da in Vorgängerarbeiten die intraliposomale Konzentration von $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ in ESM/Chol-Präparationen (70/30 mol %) durch einen Lyophilisationsschritt um das Dreifache gesteigert werden konnte (Müller 2013), wurde dieser auch für die druckextrudierten Liposomen beibehalten.

Die nach Hand- bzw. Druckextrusion hergestellten Lyophilisate wurden gemäß Kapitel 3.3.1.1 in HBS pH 6,8 rehydratisiert und mittels Handextrusion homogenisiert, wobei für die Homogenisation der PEGylierten Präparation wieder weniger Extrusionsschritte nötig waren. Durch die De- und Rehydratisierung wurde die Probe ca. um den Faktor 2,5 aufkonzentriert. Die Liposomengröße und die Größenverteilung wurden mittels PCS vermessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4-2 gezeigt.

Tabelle 4-2: PCS-Messung der Präparationen nach Lyophilisation, Rehydratisierung und erneuter Handextrusion (n = 10-13)

<i>Präparation</i>	<i>c (mM)</i>	<i>Extrusion</i>	<i>$d_h \pm SD$ (nm)</i>	<i>$PDI \pm SD$</i>
ESM/Chol (70/30 mol %)	25	21 x 200 nm	$163,2 \pm 16,2$	$0,272 \pm 0,068$
	20	21 x 200 nm	$149,8 \pm 13,6$	$0,261 \pm 0,077$
ESM/Chol/DSPE-mPEG (66,7/28,5/4,8 mol %)	20	11 x 200 nm	$138,9 \pm 5,7$	$0,076 \pm 0,014$

Auch nach der Lyophilisation mit anschließender Extrusion ist der positive Effekt des eingelagerten DSPE-PEG₂₀₀₀ zu erkennen. Sowohl der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) als auch der PDI sinken im Vergleich zu reinen ESM/Chol Präparationen. Die sterische Stabilisierung führt zu einer monomodalen Verteilung der Liposomen ($PDI < 0,1$).

Die verbesserte Größenverteilung kann auch hier zum Teil auf die herabgesetzte Aggregationstendenz der Liposomen zurückgeführt werden. Da für DSPE-PEG₂₀₀₀ zusätzlich ein positiver Effekt während der Lyophilisation beschrieben wurde (Stark et al. 2010), wurde im Folgenden untersucht, ob für PEGylierte Liposomen auf zusätzliche Extrusionsschritte nach der Lyophilisation verzichtet werden kann. Die ermittelten PCS-Daten zeigten aber deutlich, dass dies auch bei PEGylierten Liposomen aufgrund des hohen PDI nicht möglich war (gemessene Werte ohne zusätzlich durchgeführte Extrusion: $d_h = 157,5 \pm 3,0$ nm; $PDI = 0,154 \pm 0,009$).

Um eine statistische Aussage über die Verteilung der gemessenen PCS-Daten treffen zu können, wurde ein Boxplot-Diagramm aus den ermittelten d_h und PDI erstellt (siehe Abbildung 4-3 A und B). Betrachtet man den hydrodynamischen Durchmesser der drei Präparationen (Abbildung 4-3 A) fällt auf, dass für PEGylierte Liposomen der Bereich, der 90 % der Werte einschließt (Box mit oberem und unterem Whisker), schmaler als bei reinen ESM/Chol-Liposomen ist. Die Größenverteilung ist somit enger als bei nicht-PEGylierten Präparationen. Außerdem sind die gemessenen Größen insgesamt kleiner als für die nicht-PEGylierten Formulierungen.

Noch stärker ausgeprägt zeigt sich der Einfluss der PEGylierung bei Betrachtung der Polydispersitätsindices (Abbildung 4-3 B). Zum einen liegen die PDI-Werte PEGylierter Liposomen deutlich niedriger, zum anderen ist der Bereich der Verteilung viel enger als bei Präparationen ohne DSPE-mPEG-Zusatz.

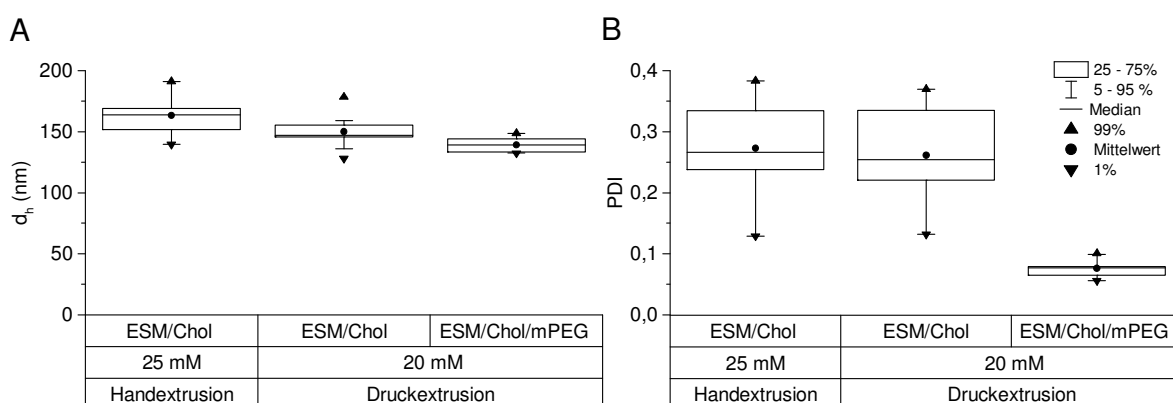


Abbildung 4-3: Boxplot-Diagramm der Ni(OAc)₂-Liposomen nach Lyophilisation und erneuter Handextrusion

Die Boxen repräsentieren den Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen (oberes und unteres Quantil 25-75 %). Die Linie zeigt den Median der Verteilung. Der Mittelwert der Messung ist durch einen Punkt gekennzeichnet (●). Innerhalb der Whiskergrenzen (⊤ und ⊥) liegen 90 % aller Messwerte. **(A)** zeigt den hydrodynamischen Durchmesser (d_h) von ESM/Chol-Liposomen (70/30 mol %) und ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen, die mittels Hand- oder Druckextrusion hergestellt wurden. **(B)** zeigt die Verteilung der Polydispersitätsindices ($n = 10-13$).

Die Morphologie der Präparationen wurde kryo-transmissions-elektronenmikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 4-4). Sowohl bei hand- als auch druckextrudierten Präparationen ohne DSPE-mPEG-Zusatz wurde eine kettenförmige Aneinanderreihung der Liposomen beobachtet (Abbildung 4-4 A und B). Des Weiteren waren eine inhomogene Größenverteilung sowie das vermehrte Auftreten multivesikulärer Strukturen zu erkennen. Diese Aufnahmen bestätigten die bei PCS-Messungen erhaltenen Werte für reine ESM/Chol-Präparationen.

Die ESM/Chol/DSPE-mPEG-Präparationen zeigten einen deutlich homogeneren Charakter mit vielen *large unilamellar vesicles* (LUV) und weniger multivesikulären Strukturen (Abbildung 4-4 C). Es ist allerdings das vermehrte Auftreten von Scheibenmizellen zu erkennen, welches bereits bei der Herstellung von PEGylierten Liposomen mittels Handextrusion beschrieben wurde (Züfle 2016).

Auch bei Kryo-TEM Untersuchungen von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)- und Distearoylphosphatidylcholin (DSPC)-Liposomen war die Bildung solcher Scheibenmizellen mit DSPE-PEG₂₀₀₀ bei vergleichbar geringen Konzentrationen (< 5 mol %) beobachtet worden. Höhere PEG-Konzentrationen hatten sogar zur Bildung von Kugelmizellen geführt (Johnsson & Edwards 2003).

Untersuchungen mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie zeigten anhand von DPPC-Liposomen, dass die Formierung solcher Strukturen nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Kettenlänge der verwendeten PEGs abhängt. Dabei sinkt die zur Mizellenbildung benötigte PEG-Konzentration mit steigender Kettenlänge (Belsito et al. 2000).

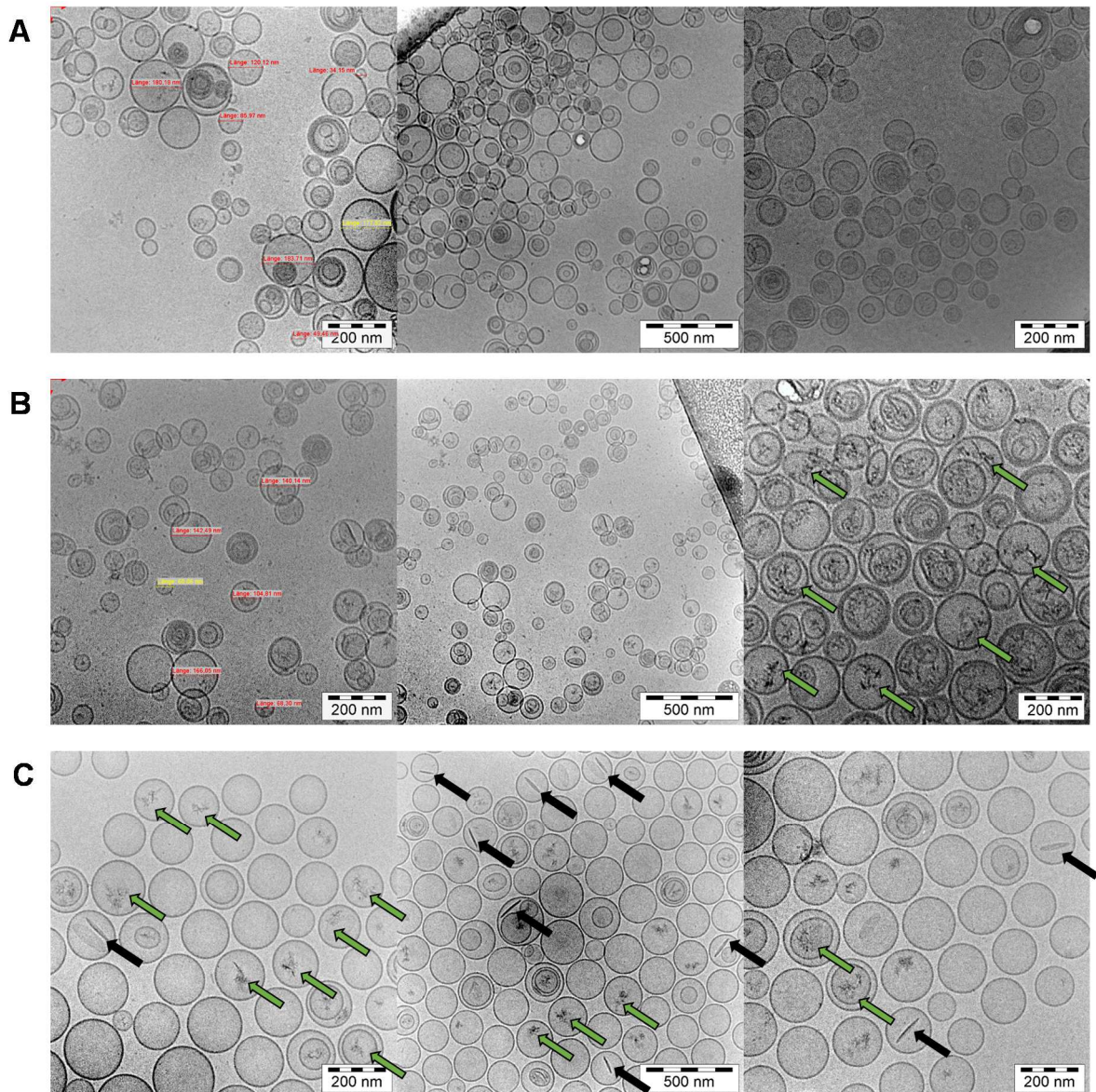


Abbildung 4-4: Kryo-TEM Aufnahmen von lyophilisierten und handextrudierten Ni(OAc)₂-Liposomen

(A) ESM/Chol-Liposomen nach Handextrusion, Lyophilisation, Rehydratisierung und erneuter Handextrusion (21 x 200 nm). Die Präparation ist durch eine inhomogene Größenverteilung der Liposomen und das vermehrte Auftreten multivesikulärer Strukturen gekennzeichnet. Die ausgemessenen Vesikeldurchmesser lagen zwischen 34 und 180 nm. Auch die kettenförmige Agglomeration/Aggregation der Liposomen ist zu erkennen. (B) ESM/Chol-Liposomen nach Druckextrusion, Lyophilisation, Rehydratisierung und Handextrusion (21 x 200 nm). Wie bei (A) ist eine inhomogene Vesikelgrößenverteilung und Agglomeration/Aggregation der Vesikel deutlich zu sehen. Die vermessenen Vesikeldurchmesser lagen im Bereich zwischen 60 und 166 nm. Nach der Rehydratisierung nicht vollständig gelöstes Ni(OAc)₂ ist durch Pfeile gekennzeichnet \Rightarrow . (C) ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen nach Druckextrusion, Lyophilisation, Rehydratisierung und Handextrusion (11 x 200 nm). Die Präparation zeigt eine deutlich homogenere Größenverteilung und eine verminderte Agglomeration/Aggregation der Liposomen. Auch hier ist präzipitiertes Ni(OAc)₂ zu erkennen. Die sterisch stabilisierte Präparation zeigt weniger multivesikuläre Strukturen, allerdings ist das vermehrte Auftreten von Scheibenmizellen zu erkennen, welche mit \Rightarrow gekennzeichnet wurden.

4.1.1.3 Einfluss der Lipidkomposition auf die Ni(OAc)₂-Einschlusseffizienz

Wie bereits erwähnt (vgl. 3.3.1), hängt die am Ende eingeschlossene As-Menge direkt von der zuvor verkapselten Ni-Konzentration ab. Es wurde daher untersucht, wie sich die veränderte Herstellungstechnik und Lipidkomposition auf die Einschlusseffizienz von Ni(OAc)₂ auswirkte.

Die Einschlusseffizienz (EE) wurde nach Ni-Quantifizierung der Gesamtstoffmenge Ni(OAc)₂ sowie der intraliposomal verkapselten Stoffmenge via GF-AAS (vgl. Kapitel 3.3.2.3) über Formel 2 berechnet. Um die erzielte EE beurteilen zu können, wurde diese mit der maximal erreichbaren, theoretischen EE (EE_{max}), welche nach Formel 3 berechnet wurde, verglichen. Die zur Berechnung eingesetzten Parameter sind in Tabelle 4-3 aufgeführt.

Tabelle 4-3: Parameter zur Berechnung der maximalen, theoretischen Einschlusseffizienz

<i>Präparation</i>	<i>Theoretische Konzentration nach der Lyophilisation</i>	<i>Membrandicke (nm)</i>	<i>d_h (nm)</i>	<i>Querschnittsfläche pro Lipidmolekül (nm²)</i>
ESM/Chol	62,5 mM	5,4	163,2	0,40
	50 mM	5,4	149,8	
ESM/Chol/DSPE-mPEG	50 mM	14	138,9	0,43 (Züfle 2016)

Abbildung 4-5 zeigt die graphische Auswertung der beschriebenen Untersuchungen. Für beide ESM/Chol-Präparationen wurde eine Einschlusseffizienz von 5,2 % berechnet. Aufgrund der höheren Lipidausgangskonzentration und ihres größeren hydrodynamischen Durchmessers (d_h) weisen die zu Beginn mittels Handextrusion hergestellten Liposomen ein größeres intraliposomales Gesamtvolumen auf. Dies resultiert in einer höheren theoretischen EE. Die EE_{max} der Präparation lag bei 18,6 %. Die mittels Druckextrusion hergestellten Liposomen, welche nach Lyophilisation eine Lipidkonzentration von nur 50 mM aufwiesen, erreichten bei reduzierter EE_{max} von 13,4 % eine zur handextrudierten Präparation identische tatsächliche EE von 5,2 %.

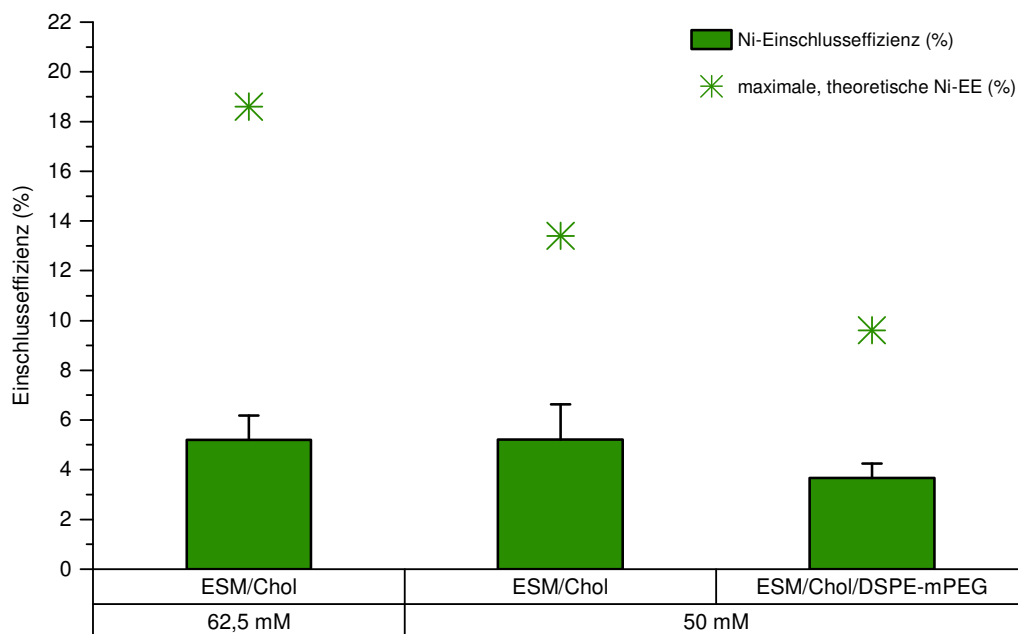


Abbildung 4-5: Ermittelte Ni-Einschlusseffizienz im Vergleich zur berechneten EE_{max} (*)

Die Präparationen wurden mittels Hand- oder Druckextrusion hergestellt, lyophilisiert, rehydratisiert und erneut extrudiert. Die Gesamtmenge an Nickel sowie der verkapselte Ni-Anteil nach SEC-Aufreinigung wurden mittels GF-AAS quantifiziert. ($n = 6-9 \pm SD$)

Neben d_h und Lipidkonzentration der Formulierung haben auch die Dicke des Membranbilayers und die durchschnittliche Querschnittsfläche der einzelnen Lipidmoleküle einen Einfluss auf die EE_{max} . Durch die Einarbeitung von DSPE-mPEG₂₀₀₀ in den Lipidfilm werden diese Parameter verändert, wodurch sich das zur Verfügung stehende intraliposomale Volumen verkleinert und die EE_{max} auf 9,6 % reduziert wird. Dieser Effekt wird zusätzlich durch den geringeren d_h der Präparation verstärkt (siehe Tabelle 4-3). Die ermittelte EE von $3,7 \pm 0,58$ % liegt damit bei 38,5 % der maximal erreichbaren EE und somit im Bereich der druckextrudierten ESM/Chol Liposomen, deren erzielte EE bei 38,8 % der EE_{max} liegt.

Ein Grund für die verminderte EE der handextrudierten ESM/Chol-Liposomen könnte in der verstärkten Ausbildung multivesikulärer und multilamellarer Strukturen (siehe Abbildung 4-4) liegen, wodurch der hydrophile Innenraum der Liposomen verkleinert wird. Da diese Strukturen allerdings auch bei druckextrudierten ESM/Chol-Liposomen aufgetreten sind, kann eine mögliche Ursache für diese Abweichung die zuvor beschriebene Agglomeration/Aggregation der Vesikel (vgl. Kapitel 4.1.1.1 und 4.1.1.2) sein.

Da die PCS-Messung große Vesikel stärker gewichtet, resultiert dies trotz tatsächlich kleiner Vesikelgrößen in einem erhöhten gemessenen d_h (vgl. Kapitel 3.2.1.1). Die Berechnung der EE_{max} gilt daher auch streng genommen nur für runde, unilamellare Liposomen homogener Größe. Die Aussagekraft der EE zur Bewertung der ESM/Chol-Präparationen ist somit nur begrenzt.

4.1.1.4 Einfluss der Lipidkomposition auf die verkapselte Menge Ni und As

Die Zubereitungen wurden daher im Folgenden über ihr Wirkstoff/Lipid-Verhältnis charakterisiert. Hierfür wurde zum einen intraliposomales Ni nach dem ersten SEC-Aufreinigungsschritt bestimmt. Zum anderen wurden sowohl Ni als auch As nach *remote loading* und erneuter SEC-Aufreinigung (2. SEC-Aufreinigungsschritt) mittels GF-AAS quantifiziert (vgl. Kapitel 3.3.1.4 und 3.3.2.3). Die Bestimmung des Lipidgehalts erfolgte mittels Bartlett-Assay (siehe 3.2.2.1) oder, nach der Arsenbeladung, mittels Cholesterol-Enzym-Assay (3.2.2.2).

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 4-6 dargestellt. Für die mittels Handextrusion hergestellten ESM/Chol-Liposomen ergab sich vor der Arsenbeladung ein Ni/Lipid-Verhältnis von $0,81 \pm 0,11$ (mol/mol). Auch nach der Beladung mit As blieb dieses mit $0,75 \pm 0,05$ (mol/mol) annähernd konstant. Ein hoher initialer Nickelverlust während der Beladung mit As konnte somit ausgeschlossen werden. Diese Resultate entsprachen den von Chen et al. veröffentlichten Daten zum *remote loading* von Arsen in DPPC/DOPG/Chol (51,4/3,6/45 mol %) Liposomen (Chen et al. 2006).

Auch druckextrudierte Liposomen zeigten ein während der Beladung annähernd konstantes Ni/Lipid-Verhältnis. Bei nicht-PEGylierten ESM/Chol-Liposomen lag dieses dabei vor As-Beladung bei $0,89 \pm 0,08$ (mol/mol) und danach bei $0,93 \pm 0,14$ (mol/mol). Bei ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen blieb das Verhältnis konstant bei $\approx 0,63$ (mol/mol).

Das As/Lipid-Verhältnis lag bei reinen ESM/Chol-Liposomen mit $0,62 \pm 0,14$ und $0,67 \pm 0,19$ (mol/mol) höher als bei sterisch stabilisierten Liposomen ($0,42 \pm 0,05$ mol/mol). Dies liegt, wie bereits in Kapitel 4.1.1.3 beschrieben, zum einen an der durch die Einarbeitung von DSPE-PEG₂₀₀₀ bedingten Änderung der mittleren Querschnittsfläche eines Lipidmoleküls. Zum anderen kommt der kleinere d_h , zum Tragen. Beide Faktoren führen zu einem kleineren intraliposomalen Volumen.

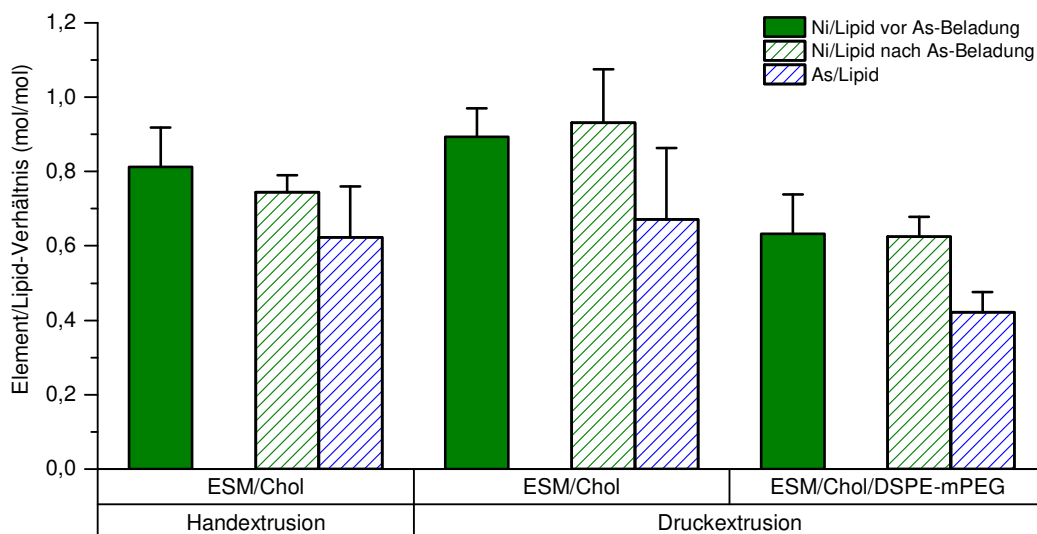


Abbildung 4-6: Molares Ni/Lipid- und As/Lipid-Verhältnis verschiedener Präparationen

Vergleich des molaren Ni/- und As/Lipid-Verhältnisses bei ESM/Chol-Liposomen, die mittels Hand- oder Druckextrusion hergestellt wurden, und ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen. Das Ni/Lipid-Verhältnis wurde vor und nach der Beladung mit Arsen untersucht. ($n = 3-7 \pm SD$)

Auch bei diesen Untersuchungen hatten die druckextrudierten ESM/Chol-Liposomen im Vergleich zur handextrudierten Formulierung, trotz ihrer geringeren Lipidausgangskonzentration und ihres dadurch geringeren intraliposomalen Volumens, größere Mengen Ni und As eingeschlossen.

Die erzielten As/Lipid-Verhältnisse der PEGylierten Formulierung sind im Vergleich zu reinen ESM/Chol-Präparationen zwar niedriger, verglichen mit Literaturwerten liegen sie aber trotzdem in einem akzeptablen Bereich. Bei der Entwicklung des *remote loading* Verfahrens wurde ein As/-Lipid-Verhältnis von $0,5 \pm 0,1$ (mol/mol) in DPPC/DOPG/Chol-Liposomen (51,4/3,6/45 mol/mol) erreicht (Chen et al. 2006). Kallinteri et al. erzielten mit DSPC *dehydration-rehydration-vesicles* (DRV) ein As/Lipid-Verhältnis von $0,479 \pm 0,071$ (Kallinteri et al. 2004). Auch Wang et al. setzten sterisch stabilisierte Liposomen (PC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ 54,7/45/0,3 mol %) bei ihren Versuchen ein und erreichten damit ein As/PL-Verhältnis von 0,33 mol/mol (Wang et al. 2016).

Das ermittelte As/Ni-Verhältnis war in allen getesteten Formulierungen ähnlich und lag im Durchschnitt bei $0,74 \pm 0,05$ mol/mol. In der Literatur wird eine pH-Abhängigkeit der Arsenpräzipitation mit zweiwertigen Metallkationen (z. B. Ni^{2+}) beschrieben. Bei pH-Werten von 5,5-6 waren Komplexe der Zusammensetzung $\text{Ni}(\text{HAsO}_3)$ und $\text{Ni}(\text{H}_2\text{AsO}_3)_2$ oder $\text{Ni}(\text{AsO}_2)_2$ vorherrschend, welche ein As/Ni-Verhältnis von ungefähr 1 aufwiesen. Bei pH-Werten > 7 formte sich vor allem $\text{Ni}_3(\text{AsO}_3)_2$ -Komplexe mit einem As/Ni-Verhältnis von 0,66-0,8 (Chen et al. 2006). Bei den gegebenen Bedingungen bildete sich somit vor allem der $\text{Ni}_3(\text{AsO}_3)_2$ -Komplex.

4.1.1.5 Untersuchung der Vesikelmorphologie nach As-Beladung

Für eine abschließende morphologische Beurteilung der fertig hergestellten As-Liposomen wurden kryo-transmissions-elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen (Abbildung 4-7 A und B). Nicht verkapseltes ATO wurde dafür zuvor gemäß Kapitel 3.3.1.4 säulenchromatographisch entfernt.

In beiden Präparationen ist deutlich der intraliposomal ausgefallene Ni-As-Komplex (schwarz) zu erkennen. Die nicht-PEGylierte ESM/Chol-Präparation (Handextrusion) weist einen stark inhomogenen Charakter mit breiter Größenverteilung auf. Die ausgemessenen Durchmesser der Liposomen lagen zwischen 54,9-503,5 nm. Zudem waren viele multivesikuläre Liposomen und nur wenige LUVs zu finden.

Die PEGylierte Formulierung zeigte eine sehr viel homogenere Größenverteilung (95,6-249,6 nm). Es waren außerdem vor allem LUVs und weniger multivesikuläre Strukturen zu finden. Dadurch eignet sich die Präparation gut zur angestrebten Oberflächenmodifikation mittels GD_2 -Antikörpern.

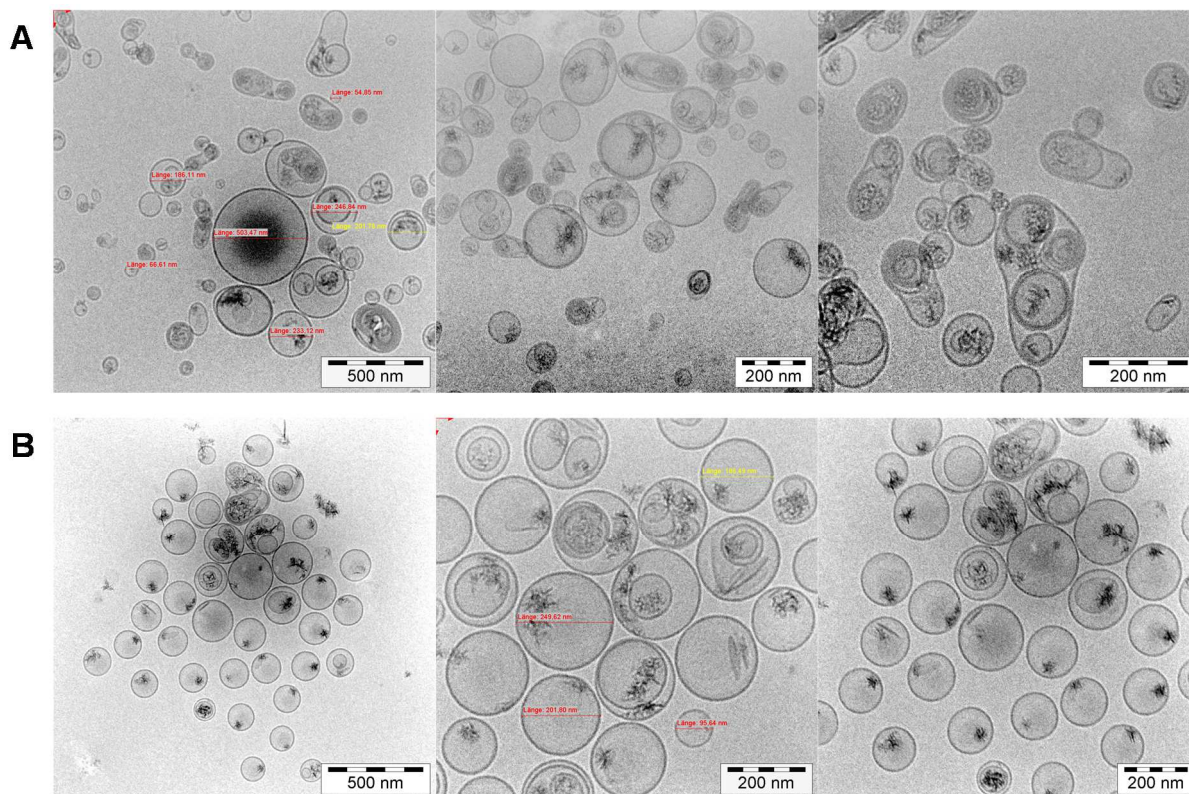


Abbildung 4-7: Kryo-TEM Aufnahmen von As-beladenen Liposomen

(A) ESM/Chol-Liposomen (Handextrusion) nach Arsen-Beladung und anschließender Aufreinigung über SEC. (B) ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen nach As-Beladung. Das intra-liposomal gebildete Ni-As-Präzipitat (schwarz) ist bei beiden Präparationen deutlich zu erkennen.

4.1.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Druckextrusion

Das *Upscaling* der Liposomen mittels Druckextrusion war bis zu einer Lipidkonzentration von 20 mM möglich. Höhere Konzentrationen führten zu einer starken Beanspruchung bis hin zum Reißen der Polycarbonatmembran. Die Druckextrusion bietet neben der Herstellung größerer Liposomen-Chargen auch die Möglichkeit, diese unter aseptischen Bedingungen herzustellen. Alle Teile des Druckextruders können vor Verwendung autoklaviert und die Extrusion anschließend unter einer Sterilwerkbank durchgeführt werden. Die zuvor routinemäßig eingesetzte Handextrusion musste hingegen bei erhöhter Temperatur im Wasserbad (siehe Kapitel 3.1.3.1) durchgeführt werden, womit die Gefahr von Kontaminationen steigt. Da der nach Druckextrusion und Lyophilisation folgende Handextrusionsschritt ebenfalls im Wasserbad durchgeführt wurde, war eine aseptische Liposomenherstellung ohne größeren technischen Aufwand allerdings nicht möglich.

Die Änderung der Lipidmischung von ESM/Chol (70/30 mol/mol) auf ESM/Chol/DSPE-mPEG (66,7/28,5/4,8 mol %) führte zu einer homogenen monodispersen Liposomendispersion mit vorwiegend LUVs, die sich für eine spätere Oberflächenmodifikation mit GD₂-Antikörpern gut eignet.

Die Einarbeitung von DSPE-mPEG in den liposomalen Bilayer führte jedoch zu einer geringeren Einschlusseffizienz des zum stabilen Arsen-Einschluss notwendigen Nickels. Auch das Ni/Lipid- bzw. As/Lipid-Verhältnis wurde, bedingt durch das kleinere intraliposomale Volumen, im Vergleich zu reinen ESM/Chol-Liposomen verringert. Allerdings lagen die erzielten As/Lipid-Verhältnisse im Vergleich zu Literaturwerten auf einem akzeptablen Niveau.

Im Hinblick auf den späteren Einsatz zur Neuroblastomtherapie wurde daher an der Entwicklung der Präparation mit veränderter Lipidmischung (ESM/Chol/DSPE-mPEG 66,7/28,5/4,8 mol %) weitergearbeitet.

4.1.2 Liposomenherstellung mittels Mikrofluidisierung

Das *Upscaling* der Liposomenherstellung mittels Druckextrusion war zwar prinzipiell möglich, die maximal einsetzbare Lipidkonzentration von 20 mM lag jedoch niedriger als gewünscht. Durch die Herstellung der *dehydration-rehydration-vesicles* (DRV) konnte die Liposomendispersion durch Rehydratisierung in verringertem Puffervolumen um den Faktor 2,5 aufkonzentriert werden, wodurch die niedrige Lipidausgangskonzentration kompensiert werden konnte. Allerdings konnte durch die Lyophilisation bei PEGylierten ESM/Chol-Liposomen keine Erhöhung des Ni/Lipid-Verhältnisses gezeigt werden (Züfle 2016). Die Lyophilisation bietet somit zwar den Vorteil einer stabilen Lagerform und der Aufkonzentrierung der Liposomendispersion, allerdings ist der Prozess durch die fehlende Erhöhung des Ni/Lipid-Verhältnisses, den bei der Lyophilisation entstehenden Kosten sowie den Zeitaufwand ökonomisch nicht vertretbar.

Im Folgenden wurde daher die Herstellung Ni(OAc)₂-beladener ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen mittels Mikrofluidisierung an einem Low Volume Microfluidizer® (LV1 Microfluidics) untersucht (vgl. Kapitel 3.1.3.2). Diese Herstellungsmethode wurde bereits zur Homogenisation von MLV-Dispersionen in Konzentrationen von bis zu 300 mM Lipid und unter sterilen Bedingungen beschrieben (Lasic 1993c, Wagner & Vorauer-Uhl 2011).

Die Mikrofluidisierung wurde erstmals 1984 zur Herstellung von Liposomen genutzt (Mayhew et al. 1984, Gregoriadis et al. 1990). Seitdem wurde diese Methode zur Herstellung von Liposomen mit hohen Wirkstoff-Einschlusseffizienzen weiterentwickelt (Gregoriadis et al. 1990).

Microfluidizer® sind in verschiedenen Größen erhältlich und die Übertragung der Herstellung vom Labor- auf den Produktionsmaßstab wurde bereits für Liposomen sowie für Nanoemulsionen gezeigt (Vemuri et al. 1990, Sorgi & Huang 1996, Grapentin 2016).

In den folgenden Kapiteln wurden geeignete Prozessparameter für die Herstellung der ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen am LV1 identifiziert. Die dafür verwendeten MLV-Dispersionen wurde jeweils durch Hydratisierung eines Lipidfilms in 750 mM Ni(OAc)₂-Lösung analog Kapitel 3.1.3 hergestellt. Für diese Versuche wurde eine im Vergleich zur Druckextrusion höhere Ni(OAc)₂-Konzentration gewählt, um die ohne Lyophilisation fehlende Aufkonzentrierung zu kompensieren.

4.1.2.1 Einflussfaktoren auf die Liposomengröße

Zu Beginn der Untersuchungen wurde evaluiert, inwieweit sich der Prozessdruck und die eingesetzte Lipidkonzentration auf den resultierenden hydrodynamischen Durchmesser (d_h) der ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen auswirken. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass sich die erwähnten Parameter wie auch die Anzahl der Homogenisationszyklen auf die Liposomengröße auswirken (Barnadas-Rodríguez & Sabés 2001, Lajunen et al. 2014)

Da auch das zu homogenisierende Probenvolumen die nach der Homogenisation erhaltene Liposomengröße beeinflusst, wurden um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, für alle in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen 6 mL der MLV-Dispersion zur Mikrofluidisierung eingesetzt.

Zunächst wurde der Einfluss der eingesetzten Lipidkonzentration auf die Liposomengröße getestet. Hierfür wurden MLV-Dispersionen, in den Konzentrationen 20, 40 und 60 mM gemäß Kapitel 3.1.1 hergestellt und diese bei einem eingestellten Druck von 8 000 psi (\approx 550 bar) über 10 Zyklen homogenisiert. Es ist dabei zu beachten, dass die Druckangabe beim LV1 einen berechneten Prozessdruck darstellt, der auf Basis des gemessenen hydraulischen Drucks des Kolbens kalkuliert wird (vgl. Kapitel 3.1.3.2). Nach 1, 5 und 10 Zyklen wurden jeweils Proben entnommen und der d_h mittels Photonenkorrelationspektroskopie analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4-8 A dargestellt.

Bei allen getesteten Konzentrationen war erwartungsgemäß eine Abnahme der Liposomengröße mit steigender Zykluszahl festzustellen. Diese ist zwischen dem 1. und 5. Zyklus deutlich stärker ausgeprägt, als zwischen dem 5. und 10. Zyklus. Das Ergebnis entspricht den Erkenntnissen vorheriger Untersuchungen, bei denen die stärkste Größenreduktion während den ersten Homogenisationszyklen erzielt wurde (Barnadas-Rodríguez & Sabés 2001, Lajunen et al. 2014).

Die in der Literatur beschriebene Konzentrationsabhängigkeit des d_h konnte dahingegen bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Konzentrationen nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 4-8 A) (Bachmann et al. 1993). Vermutlich tritt dieser Effekt erst bei größeren Lipidkonzentrationsunterschieden auf.

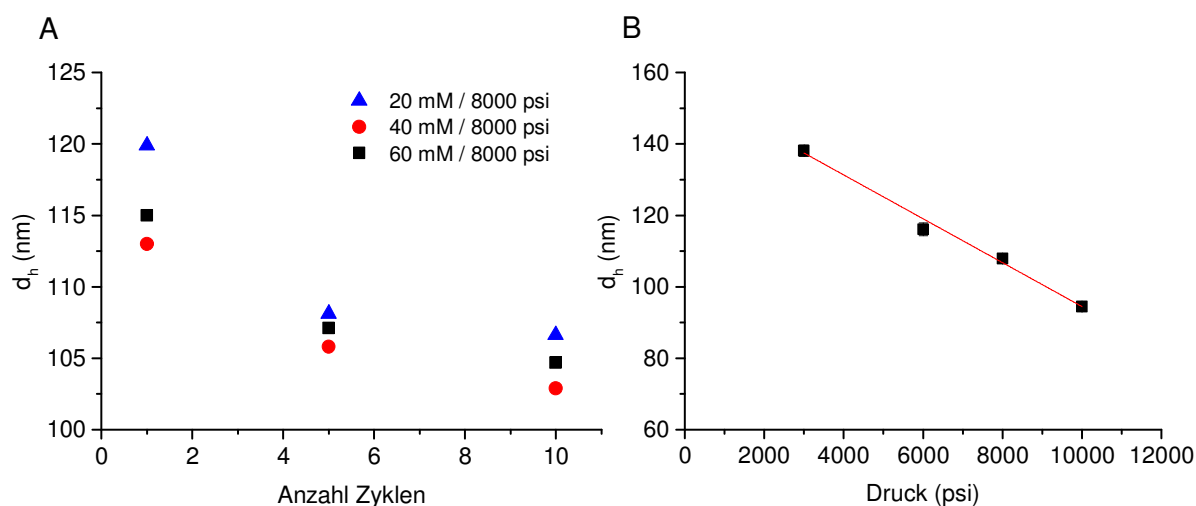


Abbildung 4-8: Einfluss von Lipidkonzentration und Druck bei der Mikrofluidisierung

(A) ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen unterschiedlicher Konzentration (20, 40 und 60 mM) wurden bei 8 000 psi (\approx 550 bar) über 10 Zyklen im Low Volume Microfluidizer® (LV1) homogenisiert. Nach 1, 5 und 10 Zyklen wurden Proben entnommen und mittels PCS der hydrodynamische Durchmesser (d_h) analysiert. **(B)** 60 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen wurden bei verschiedenen Drücken im LV1 über 5 Zyklen homogenisiert und im Anschluss der d_h vermessen ($R^2 = 0,993$; $n = 2-3$).

Die Variation des Druckes ergab für 60 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen eine lineare Abhängigkeit der resultierenden Vesikelgröße vom Prozessdruck (Abbildung 4-8 B). Die Erhöhung des Drucks von 3 000 auf 10 000 psi resultierte in einer Reduktion der Liposomengröße von $d_h = 138,1 \pm 3,8$ nm auf ca. 94 nm. Wurde der Druck weiter auf 16 000 psi (≈ 1103 bar) erhöht, konnte nach dem ersten Homogenisationsschritt keine weitere Größenreduktion erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Nach Brandl et al. hängt der kleinste produzierbare Vesikeldurchmesser von der gewählten Lipidmischung ab (Brandl et al. 1990). Dies kann mit der Theorie von Israelachvili et al. erklärt werden, nach der Vesikel unterhalb ihres kritischen Durchmessers nicht stabil sind (Israelachvili et al. 1977). Die minimale Vesikelgröße ist durch die Geometrie der verwendeten Phospholipide vorgegeben und kann durch weitere Energiezufuhr nicht weiter reduziert werden.

Liposomen, die bei diesem Druck produziert wurden, wiesen eine sehr inhomogene Größenverteilung mit einem Polydispersitätsindex (PDI) von $\approx 0,2$ auf. Kryo-transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen der bei 8 000 psi hergestellten Liposomen zeigten sehr viele Scheibenmizellen, planare Bilayerfragmente und verhältnismäßig wenige Liposomen (Abbildung 4-9).

Die Anwendung hoher Prozessdrücke war daher für die Herstellung der zur effektiven Beladung mit Arsen erwünschten LUVs nicht möglich. Im Folgenden wurde daher untersucht, wie sich niedrigere Prozessdrücke auf den Herstellungsprozess auswirkten.

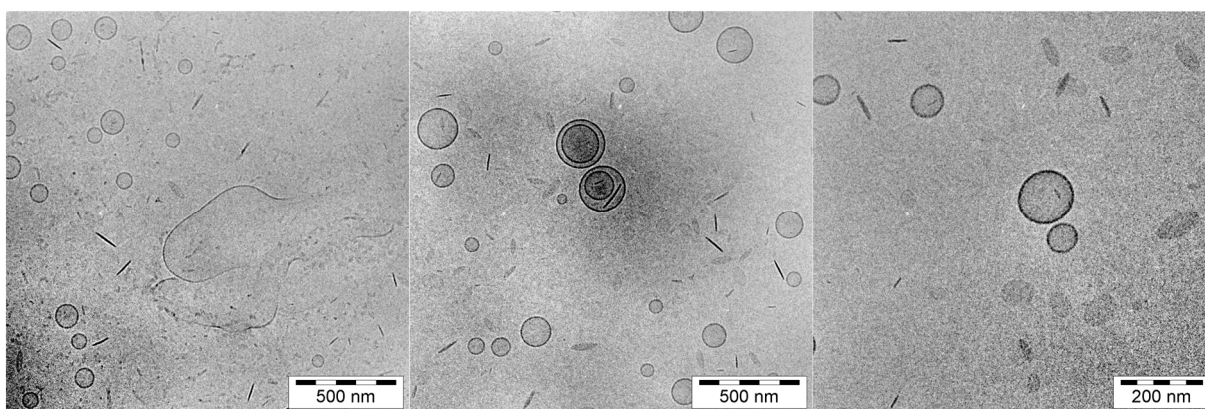


Abbildung 4-9: Kryo-TEM Aufnahme mikrofluidisierter $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Liposomen bei Anwendung eines hohen Prozessdrucks

ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (60 mM) nach 10 Zyklen bei 8 000 psi. Die Präparation enthält viele Scheibenmizellen, planare Bilayerfragmente und nur wenige LUVs.

4.1.2.2 Mikrofluidisierung der Liposomen bei reduziertem Druck

Bei diesen Untersuchungen wurden 60 und 100 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG MLV-Dispersionen bei 3 000 psi (≈ 207 bar) über 8 bzw. 10 Zyklen homogenisiert und nach jedem Zyklus mittels PCS der hydrodynamische Durchmesser (d_h) sowie der Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

Sowohl bei 60 mM als auch bei 100 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen ist ab 5 Homogenisationszyklen keine ausgeprägte Änderung des d_h bei steigender Zyklenzahl mehr zu erkennen. Der erzielte Durchmesser nach 5 Zyklen lag bei ungefähr 140 nm und konnte durch weitere Homogenisationsschritte lediglich auf ein Minimum von ≈ 133 nm reduziert werden. Diese Ergebnisse entsprechen den von Talsma et al. publizierten Daten, die zeigten, dass bei gegebenem Druck ab einer gewissen Zykluszahl durch weitere Homogenisationsschritte keine Reduktion der Liposomengröße mehr erzielt werden kann (Talsma et al. 2008).

Der in der Literatur und in Kapitel 4.1.2.1 beschriebene Konzentrationseffekt kam bei dem eingesetzten, reduzierten Druck zu Beginn der Mikrofluidisierung zum Tragen. So sind die 100 mM Liposomen nach 1-4 Zyklen im Durchschnitt ca. 5 nm größer als 60 mM Vesikel. Nach 5 Zyklen lag der d_h aber auf dem selben Niveau. Bachmann et al. erzielten ähnliche Ergebnisse für SPC-Liposomen (10 bzw. 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) nach Homogenisation über 10 Zyklen an einem Mini-Lab 8.30 H (Bachmann et al. 1993).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die erzielte Liposomengröße bei gleichbleibenden Herstellungsparametern hauptsächlich von der eingesetzten Lipidmischung determiniert wird. Lajunen et al. zeigten, dass neben den bei der Mikrofluidisierung gewählten Prozessparametern auch die Wahl der eingesetzten Phospholipide einen entscheidenden Einfluss auf die resultierenden Vesikelgrößen hat (Lajunen et al. 2014).

Betrachtet man den Verlauf der Polydispersitätsindices der getesteten Konzentrationen, so fallen Unterschiede auf. Die 60 mM Liposomen zeigen bereits nach einem Zyklus einen $\text{PDI} < 0,2$ und eine deutlich geringere Streuung der gemessenen PDI im Vergleich zu 100 mM Liposomen. Außerdem liegt der mittlere PDI für 60 mM Liposomen nach 6 Mikrofluidisierungsschritten $< 0,13$. Bei höher konzentrierten Liposomen wurden vergleichbare Werte erst nach 8 Zyklen erreicht ($\text{PDI} = 0,128 \pm 0,02$).

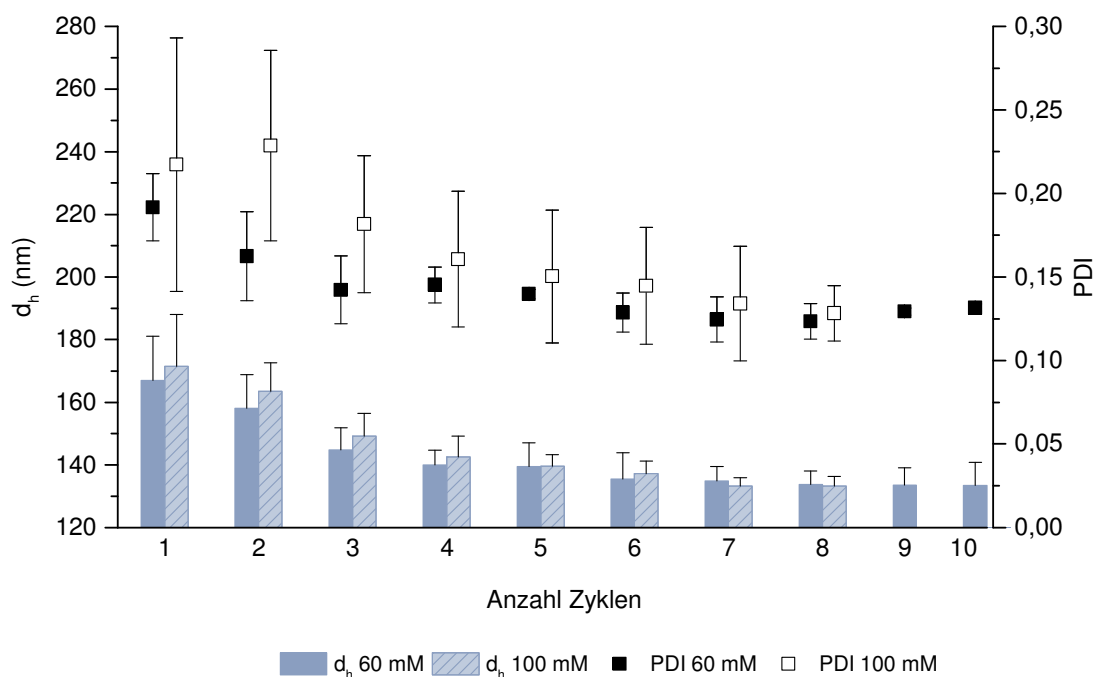


Abbildung 4-10: Untersuchung der Liposomengröße während der Mikrofluidisierung

Kombiniertes Punkt-Säulen-Diagramm aus d_h und PDI von 60 bzw. 100 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Ni(OAc)₂-Liposomen nach jeweiligem Homogenisationsschritt (Zyklus) im LV1 bei 3 000 psi (≈ 207 bar). ($n = 3-4 \pm SD$)

Da die Phasenübergangstemperatur (T_c) der gewählten Lipidmischung über der Raumtemperatur lag, wurde zudem der Einfluss der Herstellungstemperatur auf die resultierenden Vesikeldurchmesser untersucht. Hierfür wurde die 60 mM MLV-Dispersion vor der Mikrofluidisierung im Wasserbad auf 70 °C erwärmt, homogenisiert und der d_h mittels PCS vermessen. Nach dem ersten Zyklus konnte bei dieser Probe bereits eine starke Abnahme des d_h auf ≈ 148 nm erzielt werden. Im weiteren Verlauf der Homogenisation zeigte sich hier bezüglich des d_h , aber kein zusätzlicher Vorteil (d_h nach 8 Zyklen = 134,1 nm). Laut Hersteller erhöht sich die Produkttemperatur in der Interaktionskammer pro 1 000 psi Druckanstieg durch die herrschenden Scher- und Prallkräfte um bis zu 1,7 °C und kann dabei auf maximal 75 °C steigen (Microfluidics 2014). Es wurde daher für die folgenden Präparationschritte auf ein vorheriges Erwärmen der MLV-Dispersion vor der Mikrofluidisierung verzichtet.

Morphologische Charakterisierung mittels Kryo-TEM

Zur morphologischen Beurteilung der mikrofluidisierten Liposomen wurden wie zuvor Kryo-TEM Aufnahmen der 60 und 100 mM Liposomen nach 8 Zyklen angefertigt (siehe Abbildung 4-11). Bei beiden Konzentrationen sind vor allem LUVs mit homogener Größenverteilung zu erkennen. Die Ergebnisse sind mit den mittels PCS gemessenen Werten vergleichbar.

Auch bei der Herstellung mittels Mikrofluidisierung sind, wie bereits bei der Druckextrusion von ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen beobachtet, Scheibenmizellen zu erkennen (vgl. Abbildung 4-11). Diese werden, wie bereits in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben, durch das eingearbeitete DSPE-mPEG₂₀₀₀ gebildet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen hoher Konzentration mittels Mikrofluidisierung innerhalb von 8 Zyklen bei 3 000 psi möglich war. Die Mikrofluidisierung bietet somit im Vergleich zur Druckextrusion mit anschließender Lyophilisation und Handextrusion eine gute Alternative zur Herstellung homogener Liposomendispersionen.

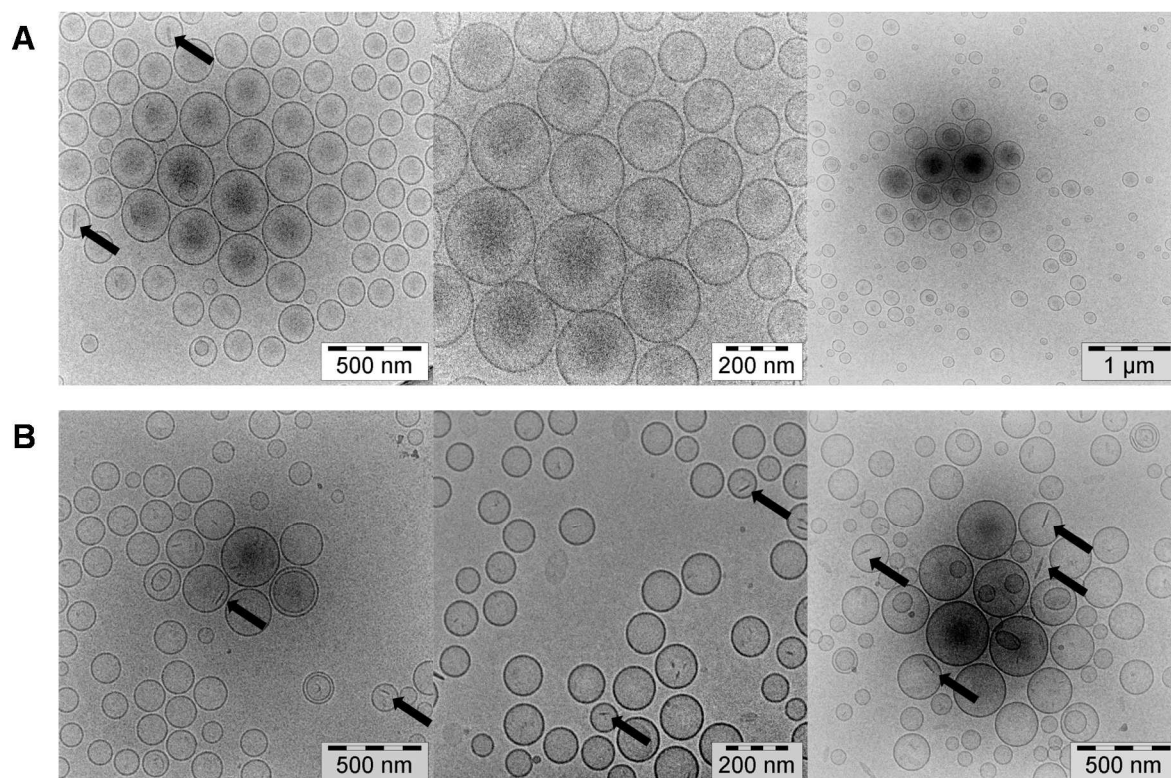


Abbildung 4-11: Kryo-TEM Aufnahme von mikrofluidisierten ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen

Ni(OAc)₂-beladene ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen nach 8 Homogenisationszyklen bei 3 000 psi im LV1. **(A)** 60 mM **(B)** 100 mM. Die Anzahl der Liposomen von A und B variiert aufgrund der unterschiedlich starken Probenverdünnungen. Scheibenmizellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

4.2 Lagerstabilitätsuntersuchungen von Ni(OAc)₂-Liposomen

Außer einer Zersetzung der eingesetzten Lipide durch Hydrolyse oder Oxidation und einem Verlust intraliposomal verkapselten Wirkstoffs sind Veränderungen in der Vesikelgröße durch Fusion, Agglomeration oder Aggregation die Hauptprobleme bei der Langzeitlagerung von Liposomen (Crommelin et al. 1986, Nakhla et al. 2002).

Da, wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben auf die Lyophilisation der ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen verzichtet werden sollte, wurde die Lagerstabilität der Ni(OAc)₂-beladenen Liposomen genauer untersucht. Die Liposomen wurden dafür, wie in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben, mittels Mikrofluidisierung hergestellt. Um einer vorzeitigen Ni-Freisetzung und der damit verbundenen niedrigeren liposomalen As-Konzentration vorzubeugen, wurden die Liposomen ohne vorherige Abtrennung freien Ni(OAc)₂ gelagert. Die Diffusion von Ni²⁺ über Membranen sollte aufgrund seiner 2-fach positiven Ladung prinzipiell gering sein. Literaturwerte zeigen allerdings eine Ni-Freisetzung von 10 % nach 5 h und mehr als 40 % nach 2 Tagen bei einer Temperatur von 50 °C (Chen et al. 2006).

4.2.1 Lagerung im Kühlschrank

Die mittels Microfluidizer[®] LV1 hergestellten ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen wurden zunächst bezüglich ihrer Stabilität bei Lagerung im Kühlschrank (2-6 °C) untersucht. Analog Kapitel 3.4.1 wurden dazu Veränderungen der Vesikelgröße und des PDI über drei Wochen verfolgt.

Um eine durch den Herstellungsprozess bedingte Instabilität der Liposomen ausschließen zu können, wurden zusätzlich mittels Druckextrusion (vgl. Kapitel 4.1.1) hergestellte Liposomen auf ihre Größenstabilität untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 4-12 dargestellt.

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) beider Präparationen blieb über einen Lagerzeitraum von 1 Woche relativ konstant und lag für mikrofluidisierte (MF)-Liposomen (helle Balken) mit ca. 137 nm geringfügig niedriger als für druckextrudierte (DE)-Liposomen (dunkle Balken, d_h ca. 151 nm). Auch bei weiterer Lagerung über 2-3 Wochen kam es nur zu einer minimalen Erhöhung des d_h von maximal 5-10 nm. Betrachtet man allerdings die Polydispersitätsindices der Präparationen, konnte ein kontinuierlicher Anstieg des PDI um ungefähr 0,02 pro Woche beobachtet werden.

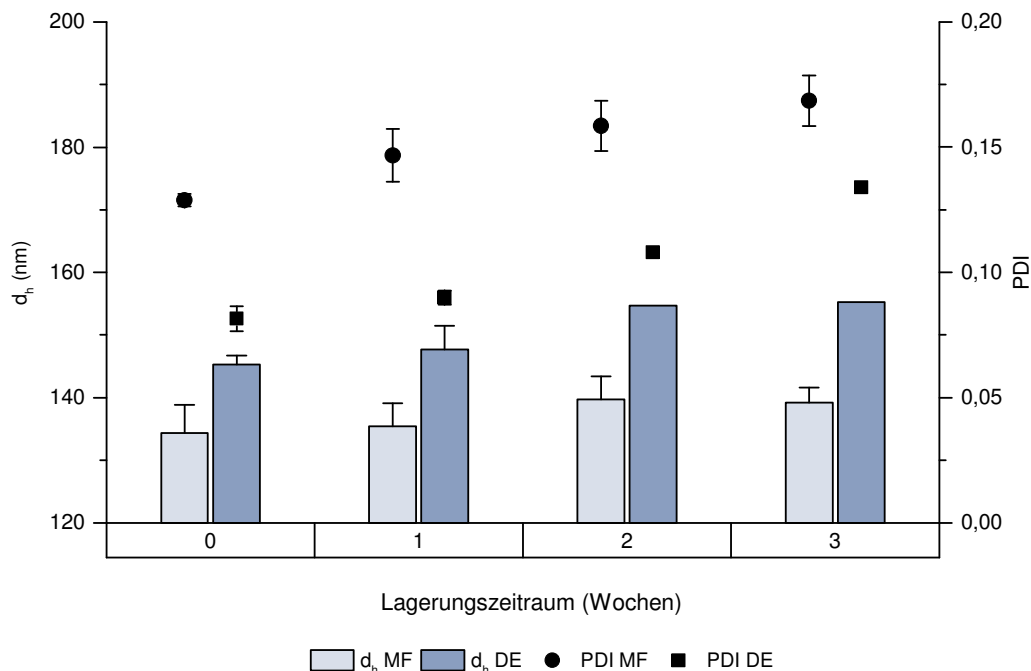


Abbildung 4-12: Größenstabilität von Ni(OAc)₂-Liposomen bei Lagerung im Kühlschrank

PCS-Untersuchungen von ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen, die mittels Mikrofluidisierung (MF) oder durch Druckextrusion mit anschließender Lyophilisation und erneuter Handextrusion (DE) hergestellt wurden, während 3-wöchiger Lagerung bei 2-6 °C. (n = 1-4 ± SD)

Um die Ursache der steigenden Polydispersitätsindices zu untersuchen, wurden Kryo-TEM Aufnahmen der mikrofluidisierten Liposomen nach 2- und 6-wöchiger Lagerung im Kühlschrank angefertigt (Abbildung 4-13 A und B). Bereits nach einem Lagerungszeitraum von 2 Wochen wiesen die Präparationen einen PDI von $0,159 \pm 0,01$ auf (Abbildung 4-12). Die dazugehörigen Kryo-TEM Bilder zeigten sowohl eine vermehrte Agglomeration/Aggregation als auch Fusion der Liposomen, was in der Bildung sehr großer Vesikel resultierte (Abbildung 4-13 A). Nach einem 6-wöchigen Lagerungszeitraum waren solche Fusionsvesikel vermehrt zu finden (Abbildung 4-13 B). Die Erhöhung des PDI während der Lagerung im Kühlschrank war somit durch eine Liposomenagglomeration/ -aggregation und -fusion bedingt.

Die Ursache der physikalischen Instabilität lag vermutlich an der hohen Ionenstärke des Dispersionsmediums (750 mM Ni(OAc)₂), durch welches das Zetapotential der Vesikel herabgesetzt wird. Steigende Ionenkonzentration und -stärken führen zu einer Abnahme der Ausdehnung der diffusen Schicht um die Vesikel, wodurch das abstoßende Überlappungspotential zwischen Partikeln erst bei kleinem Teilchenabstand erreicht wird. Durch die Annäherung der Partikel können dabei die über kurze Distanzen wirkenden anziehenden van-der-Waals Kräfte zu einer Agglomeratiobn/Aggregation bzw. Fusion der Liposomen führen (Crommelin 1984, Müller et al. 1996, Malvern 2008).

Eine stabile Lagerung bei 2-6 °C ohne vorheriges Entfernen von freiem Ni(OAc)₂ ist daher nicht möglich.

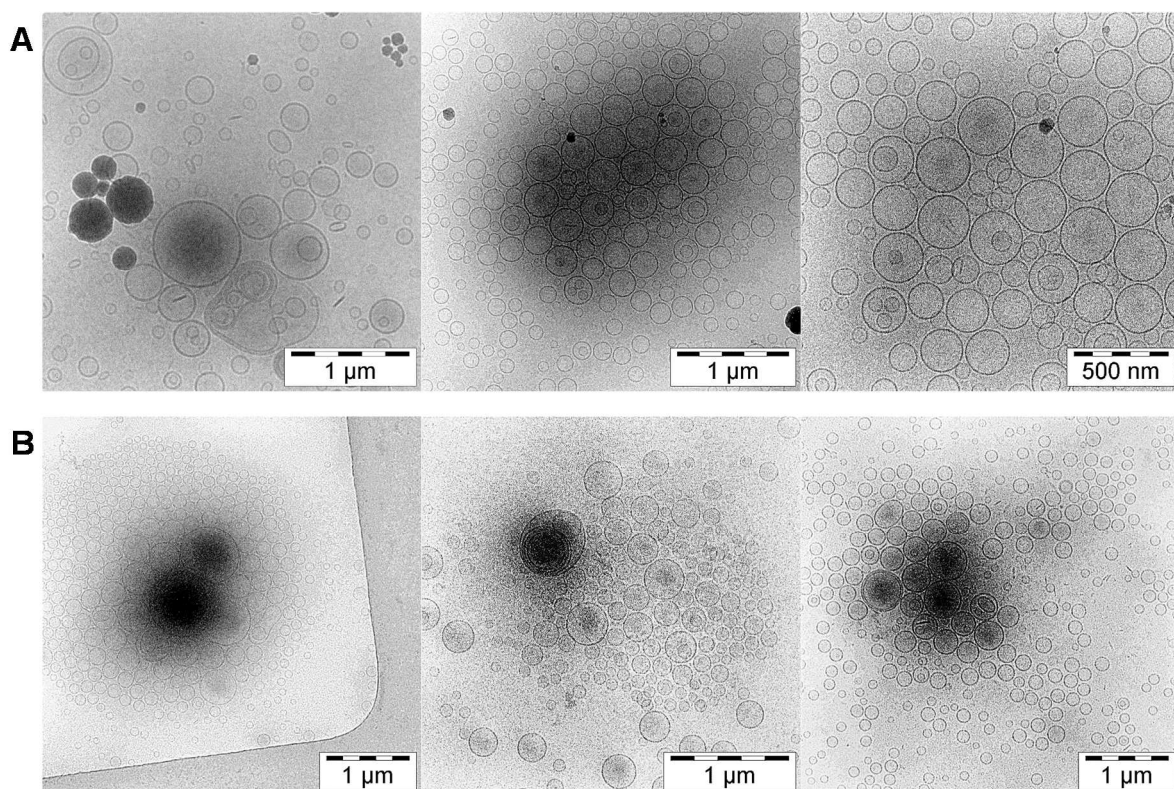


Abbildung 4-13: Kryo-TEM Aufnahmen von Ni(OAc)₂-Liposomen nach Lagerung im Kühlschrank

ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen nach Hydratisierung in 750 mM Ni(OAc)₂-Lösung, Mikrofluidisierung (3 000 psi, 8 Zyklen) und anschließender Lagerung im Kühlschrank bei 2-6 °C. **(A)** Nach 2 Wochen und **(B)** 6 Wochen Lagerung.

4.2.2 Einfrieruntersuchungen

Das Einfrieren ist eine neben der Lyophilisation angewandte Methode, um die Lagerstabilität liposomaler Präparationen zu erhöhen (van Bommel & Crommelin 1984, Özer et al. 1988, Stark et al. 2010).

Um die zuvor erwähnten chemischen und physikalischen Instabilitäten zu umgehen, wurde untersucht, ob sich die mittels Mikrofluidisierung hergestellten Ni(OAc)₂-Liposomen zur Lagerung im gefrorenen Zustand eignen. Probleme, welche beim Einfrierprozess auftreten können, sind zum einen die mechanische Beanspruchung oder sogar Beschädigung der Membran durch Bildung von Eiskristallen. Zum anderen kann die Stabilität der Liposomen durch Aufkonzentration der Umgebung während des Einfriervorgangs beeinflusst werden (Nakhla et al. 2002).

Faktoren, die häufig Einfluss auf ein erfolgreiches Einfrieren der Präparationen haben, sind die Temperatur und die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses. Bei schnellen Einfrierraten von $> 10\text{ °C pro min}$ ist die Bildung von intraliposomalen Eiskristallen beschrieben. Langsames Einfrieren ($< 2\text{ °C pro min}$) kann hingegen bedingt durch osmotische Effekte zu einem Schrumpfen der Liposomen führen. Des Weiteren spielen die Auftautemperatur, das Probenvolumen und die eingesetzte Lipidkonzentration eine entscheidende Rolle für die Qualität der "kryogelagerten" Formulierung (Özer et al. 1988).

4.2.2.1 Untersuchung des Einflusses der Einfrier- und Auftautemperatur

Im Folgenden wurde die Auswirkung der Einfriergeschwindigkeit auf den mittleren hydrodynamischen Durchmesser (d_h) von 60 und 100 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen untersucht. Die Präparationen wurden hierfür, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, zu je 100 μL in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und bei verschiedenen Temperaturen eingefroren, gelagert und aufgetaut (siehe Tabelle 3-11, Seite 67). Die Lagerung im gefrorenen Zustand erfolgte bei entsprechender Temperatur für mindestens 24 h. Nach dem Auftauen der Proben wurden die Liposomengröße und Größenverteilung mittels PCS analog Kapitel 3.2.1.1 vermessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4-14 graphisch dargestellt. Der d_h und PDI der Vesikel vor Start des Einfrierprozesses sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

Tabelle 4-4: PCS-Daten von ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen vor Start des Einfrierprozesses

Konzentration (mM)	$d_h \pm SD$ (nm)	$PDI \pm SD$
60	$136,0 \pm 0,985$	$0,123 \pm 0,02$
100	$134,5 \pm 2,413$	$0,117 \pm 0,01$

Bei Betrachtung der 60 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen schienen weder Einfrier-, Lagerungs- noch Auftautemperatur einen Einfluss auf den mittleren hydrodynamischen Durchmesser (dunkle Balken) und den PDI (■) zu haben. Der d_h lag bei allen getesteten Bedingungen bei durchschnittlich $140,2 \pm 1,55\text{ nm}$, der PDI bei $0,128 \pm 0,01$. Auch im Vergleich zu den Werten vor dem Einfrieren sind die Veränderungen nur minimal.

Im Gegensatz dazu zeigten 100 mM Liposomen deutliche Unterschiede in den gemessenen d_h und PDI (□), abhängig von der Einfrier- und Lagerungstemperatur. Die Auftautemperatur schien dahingegen keinen Einfluss zu haben (siehe Abbildung 4-14 A und B).

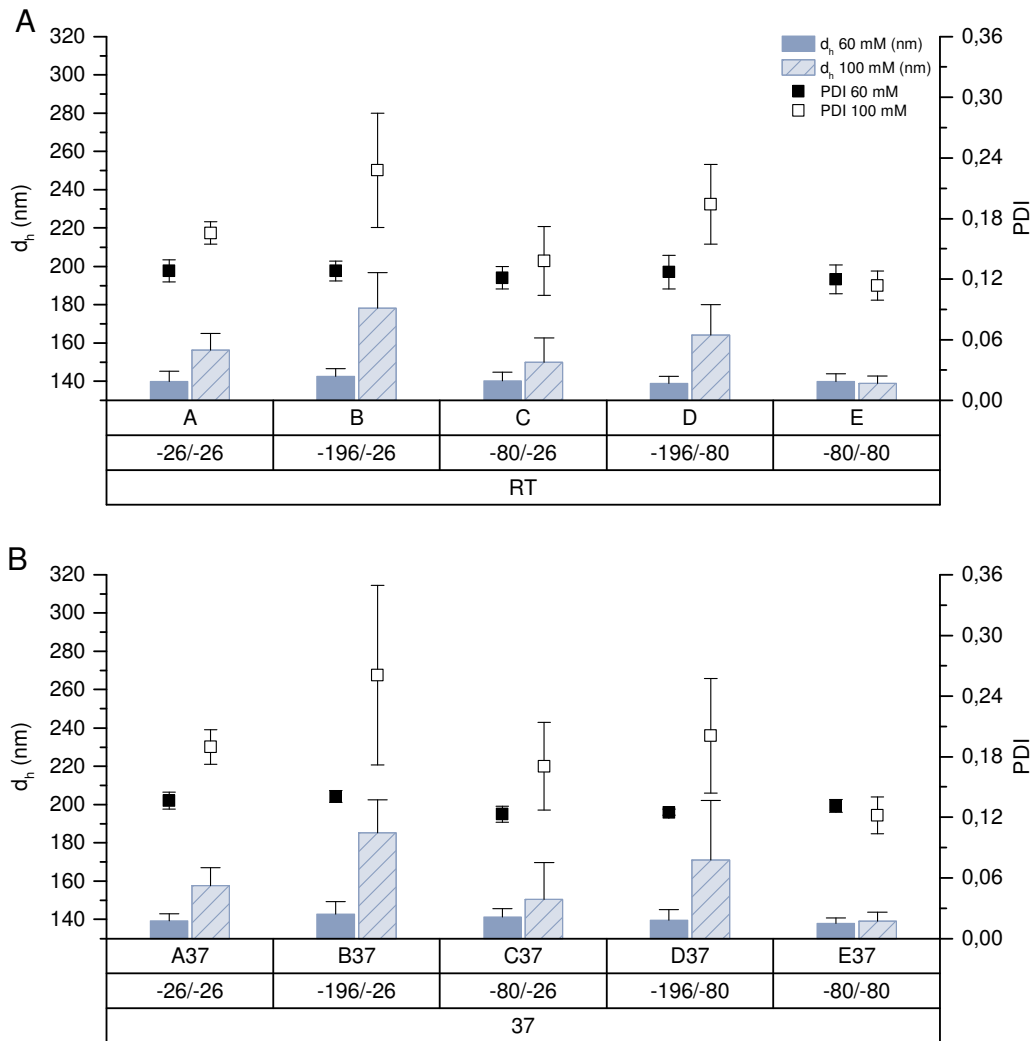


Abbildung 4-14: Einfluss des Einfrier- und Auftauprozesses auf die Liposomengröße

Gezeigt sind der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) und der Polydispersitätsindex (PDI) von 60 und 100 mM $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -beladenen ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen. Die Präparationen wurden bei drei unterschiedlichen Temperaturen (-26/-80/-196 °C) eingefroren (durch den ersten Zahlenwert gekennzeichnet). Anschließend wurden sie bei -26 oder -80 °C (durch den zweiten Zahlenwert gekennzeichnet) für mindestens 24 h gelagert und bei **(A)** Raumtemperatur (RT) oder **(B)** 37 °C aufgetaut. ($n = 3 \pm \text{SD}$)

Die stärkste Größenzunahme wurde beim schnellen Einfrieren der Liposomen bei -196 °C (flüssiger N_2) und anschließender Lagerung bei -26 °C festgestellt. Hier stieg unabhängig von der Auftautemperatur der d_h auf $181,7 \pm 16,5$ nm (Balken B bzw. B37). Auch der PDI der Präparationen erhöhte sich drastisch auf $0,244 \pm 0,06$. Die Lagerung der schnell eingefrorenen Proben bei -80 °C konnte ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen ($d_h = 167,7 \pm 22,3$ nm; $\text{PDI} = 0,197 \pm 0,04$) (Balken D bzw. D37).

Lediglich die 100 mM Präparation, bei welcher sowohl das Einfrieren als auch die Lagerung bei -80 °C ($-80/-80$) erfolgt war, wies nach Auftauen zufriedenstellende Größenparameter auf. Der durchschnittliche d_h lag hier bei $139,1 \pm 3,8\text{ nm}$ und der PDI bei $0,118 \pm 0,02$.

Da bei der 60 mM Präparation über PCS-Messungen keine Unterschiede beim Einfrierprozess gesehen werden konnten, wurde zur genaueren morphologischen Untersuchung von drei der in Abbildung 4-14 gezeigten Präparationen (A, B und E) kryo-transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, welche in Abbildung 4-15 gezeigt sind.

Abbildung 4-15 A zeigt die Präparation, die sowohl bei -26 °C eingefroren als auch gelagert und bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut wurde. Es sind hauptsächlich unilamellare Liposomen mit einer durchschnittlichen Größe von $\approx 70\text{ nm}$ zu erkennen. Auffallend ist allerdings, dass innerhalb der Liposomen vermehrt dunklere Kreise auftraten (in Abbildung 4-14 A mit weißen Pfeilen gekennzeichnet), welche sich aber von multivesikulären (rote Pfeile) und multilamellaren (grüne Pfeile) Liposomen unterschieden. Es wird vermutet, dass es sich dabei um Membraneindellungen handelt, die zu einer bikonkaven Verformung der Liposomen führt. Bei Betrachtung von oben erscheinen diese als scheinbar bilamellar.

Dieses Phänomen kann durch ein beim langsamen Einfrieren verstärktes Auftreten lokaler Aufkonzentrierungen im Dispersionsmedium zustande kommen. Aufgrund eines osmotischen Druckgradienten strömt vermehrt Wasser aus den Liposomen in das äußere Medium, wodurch die Liposomen schrumpfen (Özer et al. 1988).

Bei niedrigeren Einfriertemperaturen (Abbildung 4-15 B und C) war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Die Ursache dieses Phänomens konnte nicht abschließend aufgeklärt werden, da der Übergang von runden hin zu eher konkaven Liposomenformen auch bei zuvor nicht eingefrorenen Liposomen beobachtet werden konnte. Um eine genaue Aussage über die Strukturen treffen zu können, müssten 3D-Aufnahmen der Präparationen angefertigt werden.

Die Präparation $-80/-80/RT$ (Abbildung 4-14 A, Balken E) zeigte vor allem LUVs mit einer durchschnittlichen Größe von $100-200\text{ nm}$. Zum Teil waren auch hier multivesikuläre Strukturen sowie Eindellungen zu erkennen, die allerdings deutlich weniger stark ausgebildet waren als bei der Präparation $-26/-26/RT$ (Balken A).

Die mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen und bei -26 °C gelagerten Liposomen (Abbildung 4-15 C) zeigten eine sehr inhomogene Größenverteilung. Es waren außerdem vermehrt multivesikuläre (rote Pfeile) und multilamellare (grüne Pfeile) Liposomen zu erkennen. Die Aufnahmen ließen vermuten, dass bei diesen Prozessparametern bevorzugt Fusionsvorgänge stattfinden.

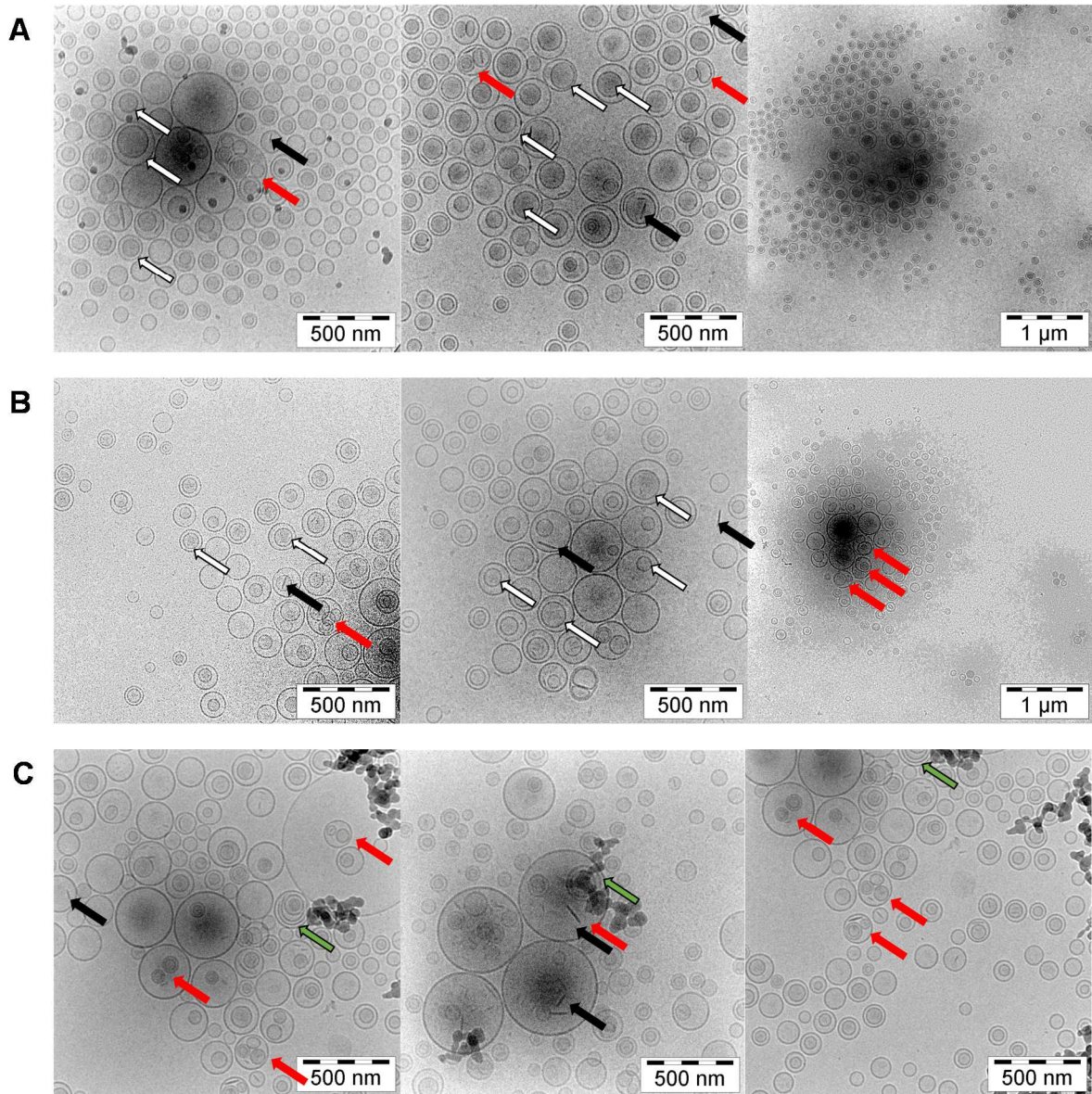


Abbildung 4-15: Untersuchung des Einfrierprozesses von Liposomen

Kryo-TEM Aufnahmen von ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (60 mM) nach Einfrieren, Lagerung und Auftauen **(A)** -26/-26/RT; **(B)** -80/-80/RT, **(C)** -196/-26/RT; mit Ethanrückständen (schwarze Artefakte). \Rightarrow Membraneindellungen, \rightarrow multivesikulären Strukturen, \rightarrow Stäbchenmizellen und \rightarrow multilamellare Vesikel.

Die Kryo-TEM Aufnahmen der 60 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen zeigten, wie bereits zuvor die PCS-Messungen der 100 mM Liposomen, dass sich eine Einfrier- und Lagerungstemperatur von -80 °C zur Stabilisierung der Präparation am besten eignet.

4.2.2.2 Einfluss von Kryoprotektoren auf die Einfrierstabilität

Unter dem Begriff Kryoprotektoren werden Stoffe zusammengefasst, die sich positiv auf die Stabilität des einzufrierenden Gutes auswirken. Beim Einfrieren von liposomalen Zubereitungen werden sie eingesetzt, um einer Membranschädigung durch Eiskristallbildung oder osmotische Effekte entgegenzuwirken (Özer et al. 1988). Substanzen, die hierfür häufig eingesetzt werden, sind Disaccharide wie Trehalose, Saccharose usw. Die Stabilisierung erfolgt dabei durch direkte Interaktion der Zuckermoleküle (Hydroxylgruppen) mit den Kopfgruppen der Phospholipide, wodurch Fusionen und Membrandefekte verhindert werden (Strauss et al. 1986, Crowe et al. 1997). Auch für Aminosäuren (z. B. Prolin) sowie für Elektrolyte und Polyethylenglykol (PEG) wurden kryoprotektive Eigenschaften beschrieben (Ohsawa et al. 1985, Rudolph & Crowe 1985, Fransen et al. 1986).

Im Folgenden wurde der Zusatz von Glycerol auf die Liposomencharakteristik beim Einfrieren untersucht. Fransen et al. hatten in ihren Untersuchungen für dieses sehr gute kryoprotektive Eigenschaften gezeigt, da es über seine OH-Gruppen direkt mit dem liposomalen Bilayer interagieren kann und somit dessen Dehydratation verhindert. Des Weiteren vermindert Glycerol die Eiskristallbildung durch Viskositätserhöhung der Formulierung (Fransen et al. 1986, Özer et al. 1988, Stark et al. 2010).

Durch das Einfrieren und Lagern bei -80 °C konnten bereits gute Ergebnisse bezüglich Liposomengröße und Vesikelgrößenverteilung bei 60 und 100 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen gezeigt werden (vgl. 4.2.2.1). Kryo-TEM Aufnahmen der 60 mM Liposomen zeigten allerdings auch nach Einfrieren bei -80 °C leichte, durch osmotische Effekte hervorgerufene Membraneindellungen. Es sollte daher im Folgenden untersucht werden ob der Zusatz des Kryoprotektors Glycerol die Dehydratation des liposomalen Bilayers der 60 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG-Formulierung während des Einfrierens verhindern bzw. reduzieren kann.

Die Präparation wurde hierfür vor dem Einfrieren mit 2,5 % (V/V) Glycerol versetzt, bei -80 °C eingefroren und über 7 Wochen bei -80 °C gelagert. Direkt nach der Herstellung und in wöchentlichem Abstand wurden der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) sowie der Polydispersitätsindex (PDI) der Präparation nach Auftauen bei Raumtemperatur gemessen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5: Einfluss von 2,5 % (V/V) Glycerol auf die Größenstabilität

<i>Lagerzeitraum (bei -80 °C)</i>	<i>ESM/Chol/DSPE-mPEG 60 mM</i>		<i>ESM/Chol/DSPE-mPEG 60 mM +2,5 % (V/V) Glycerol</i>	
	<i>d_h (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>d_h (nm)</i>	<i>PDI</i>
nach Herstellung	132,7	0,121	136,0	0,147
1 Woche	130,0	0,118	129,9	0,115
2 Wochen	130,0	0,137	128,5	0,128
3 Wochen	129,5	0,096	128,2	0,138
5 Wochen	131,6	0,114	130,1	0,128
7 Wochen	129,8	0,112	131,8	0,125

Bei ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen ohne Zusatz von Glycerol veränderten sich sowohl der d_h als auch der PDI über einen Lagerzeitraum von 7 Wochen kaum. Dies entspricht den in Kapitel 4.2.2.1 gezeigten Ergebnissen, bei denen das Einfrieren unter gleichen Bedingungen ebenfalls keine Änderungen des d_h und PDI herbeigeführt hatte. Die durchschnittlichen Werte lagen über den gesamten Lagerzeitraum bei $d_h = 130 \pm 0,82$ nm und $PDI = 0,115 \pm 0,01$.

Der Zusatz von 2,5 % (V/V) Glycerol führt zunächst zu einem Anstieg des PDI von 0,121 auf 0,147. Nach Einfrieren und folgender Lagerung sank dieser allerdings wieder und lag bei durchschnittlich $0,126 \pm 0,01$. Der d_h betrug $129,7 \pm 1,44$ nm.

Beide Präparationen wurden nach 2-wöchiger Lagerung (-80 °C) zusätzlich kryotransmissions-elektronenmikroskopisch analog Kapitel 3.2.1.2 untersucht. Die Aufnahmen sind in Abbildung 4-16 A und B gezeigt.

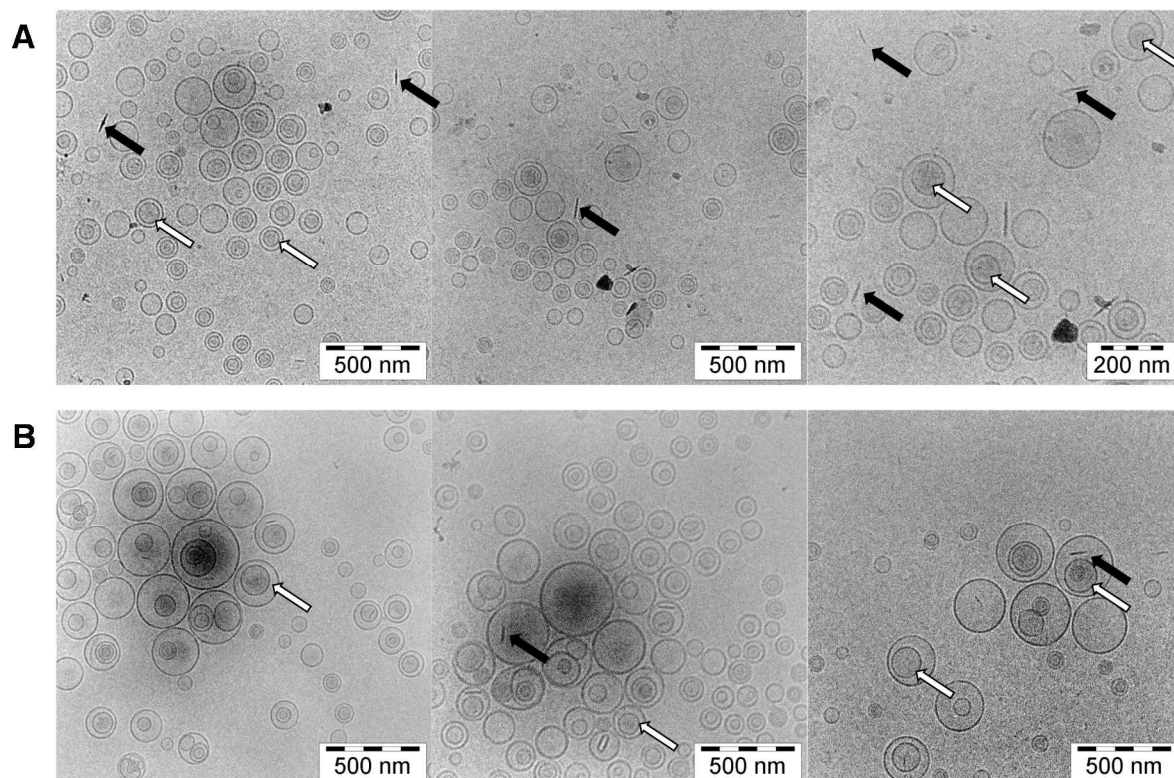


Abbildung 4-16: Kryo-TEM Aufnahmen - Einfluss von Glycerol auf die Einfrierstabilität von Ni(OAc)₂-Liposomen

Gezeigt sind ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (60 mM) nach 2-wöchiger Lagerung bei -80 °C. **(A)** ohne Zusatz, **(B)** mit Zusatz von 2,5 % (V/V) Glycerol: \Rightarrow Membraneindellungen und \blackrightarrow Scheibenmizellen.

Auch die morphologischen Untersuchungen mittels Kryo-TEM zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen. Die in vorherigen Untersuchungen beschriebene konkave Verformung wurde auch bei Zusatz von 2,5 % (V/V) Glycerol beobachtet (Abbildung 4-16 B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Einfrieren der Liposomen mit und ohne Glycerol bei -80 °C und deren anschließende Lagerung über einen Zeitraum von 7 Wochen möglich ist. Die Liposomen haben nach diesem Zeitraum sowohl einen akzeptablen mittleren hydrodynamischen Durchmesser als auch PDI. Die Vesikelmorphologie zeigte zwar leichte Membraneindellungen und vermehrt multivesikuläre Strukturen, aber ein Brechen des liposomalen Bilayers konnte nicht festgestellt werden.

4.2.3 Herstellung steriler Liposomen

Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, ist neben der Stabilität und des *Upscalings*, die Sterilität ein weiterer wichtiger Aspekt liposomaler Präparationen für die parenterale Anwendung. Um dies zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden, das Autoklavieren sowie die Entkeimungsfiltration ($< 0,22 \mu\text{m}$), auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Eine geeignete Methode sollte dabei alle Mikroorganismen entfernen aber gleichzeitig die liposomale Präparation in Bezug auf ihre chemische und physikalische Charakteristik nicht beeinflussen (Barenholz & Lasic 1996).

4.2.3.1 Untersuchung der Dampfsterilisation von Liposomen

Nach Lasic ist das Autoklavieren von Liposomen aufgrund irreversibler Größenveränderungen und chemischer Zersetzung der Lipide oft nicht möglich (Lasic 1993c). Einige Präparationen zeigten sich allerdings unter Anwendung geeigneter Parameter stabil gegenüber der Dampfsterilisation (Kikuchi et al. 1991, Zuidam et al. 1993). Im Folgenden wurde daher das Autoklavieren von $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Liposomen (60 mM ESM/Chol/DSPE-mPEG) direkt nach der Mikrofluidisierung (vgl. Kapitel 3.1.3.2), ohne vorherige säulenchromatographische Aufreinigung, getestet. Sowohl der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_h) als auch der Polydispersitätsindex (PDI) wurden hierfür vor und nach dem Autoklavieren analog Kapitel 3.2.1.1 vermessen. Die Präparationen wurden anschließend über 3 Wochen im Kühlschrank bei 2-6 °C gelagert und wöchentlich der d_h und PDI bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4-6 dargestellt.

Es konnte festgestellt werden, dass das Autoklavieren zu einem starken Anstieg des PDI, von 0,136 vor dem Autoklavieren auf 0,206 nach dem Autoklavieren, führte. Während der folgenden Lagerung kam es zu keiner weiteren Erhöhung. Der d_h der Präparationen blieb dahingegen nach dem Autoklavieren konstant bei $\approx 135 \text{ nm}$.

Bereits bei den Lagerstabilitätsuntersuchungen im Kühlschrank (siehe Kapitel 4.2.1) hatte sich gezeigt, dass sich trotz fusionierender Liposomen der d_h der Präparation nicht änderte, der gemessene PDI aber stark anstieg. Es wurde daher vermutet, dass auch hier, bedingt durch die hohe Ionenstärke des Mediums und dem resultierenden erniedrigten Zetapotential, Fusions- und Agglomerations-/Aggregationsvorgänge stattfanden. Stabilitätsuntersuchungen von perfluorcarbonhaltigen Nanoemulsionen mittels DLS hatten vergleichbare Ergebnisse gezeigt. Auch dort war eine durch Ostwaldreifung bedingte Größenzunahme der Emulsionströpfchen nicht durch einen Anstieg des d_h , sondern nur durch einen erhöhten PDI gekennzeichnet (Grapentin et al. 2015).

Tabelle 4-6: Untersuchung der Autoklavierbarkeit der Liposomen (n = 3 ± SD)

<i>Lagerzeitraum (bei 2-6 °C)</i>	<i>ESM/Chol/DSPE-mPEG 60 mM</i>	
	<i>d_h ± SD (nm)</i>	<i>PDI ± SD</i>
vor dem Autoklavieren	133,4 ± 4,49	0,136 ± 0,01
nach dem Autoklavieren	134,3 ± 7,94	0,206 ± 0,01
1 Woche	132,4 ± 6,81	0,200 ± 0,01
2 Wochen	140,4 ± 8,85	0,195 ± 0,01
3 Wochen	133,9 ± 6,94	0,203 ± 0,01

Kikuchi et al. zeigten, dass die Agglomerations-/Aggregationstendenz der Liposomen stark vom Elektrolytgehalt des verwendeten Dispersionsmediums abhängt. Eine Agglomeration bzw. Aggregation trat dort auch bei negativ geladenen DPPC/Chol/EPG-(40/50/10 mol %)-Liposomen in 0,9 %iger NaCl-Lösung auf. Wurde stattdessen eine 5 %ige Glucoselösung bzw. eine 2 %ige Propylenglykollösung verwendet, fand keine Agglomeration/Aggregation statt. Auch ungeladene DPPC und DPPC/Chol-(50/50 mol %)-Liposomen zeigten hier keine Agglomerations- bzw. Aggregationstendenzen (Kikuchi et al. 1991).

Auf dieser Stufe der Liposomenherstellung ist das Autoklavieren der Liposomen nicht möglich. Ersatzweise müsste das Autoklavieren nach der größenausschlusschromatographischen Aufreinigung der Arsen-beladenen Liposomen untersucht werden. Für die Elution der Liposomen müsste der elektrolytfreie Hepes-Glycerol-Puffer pH 7,4 (siehe Tabelle 2-9) verwendet werden.

Da die Tendenz, intraliposomale Wirkstoffe vorzeitig freizusetzen, vor allem bei hydrophilen Substanzen erhöht ist, bestünde in diesem Fall aber die Gefahr eines prozessbedingten erhöhten Verlusts an Arsen. Für Doxorubicin, das wie Arsen präzipitiert im hydrophilen Innenraum von Liposomen vorliegt, wurden nach dem Autoklavieren von beladenen DPPC/DPPG/Chol-Liposomen (10/1/4mol %) Verluste von 20 % gemessen. Bei in Lösung vorliegendem Calcein lagen diese sogar bei bis zu 44 % (Zuidam et al. 1993).

4.2.3.2 Entkeimungsfiltration der liposomalen Präparation

Für Zubereitungen, die nicht im Endbehältnis sterilisiert werden können, erlaubt das Europäische Arzneibuch (Ph.Eur.) die Durchführung eines Filtrationsverfahrens zum Erhalt eines sterilen Produkts. Lösungen werden dabei unter aseptischen Bedingungen durch Bakterien-zurückhaltende Membranen mit einer nominalen Porenweite von 0,22 µm filtriert (Ph. Eur. 2014). Der große Vorteil der Entkeimungsfiltration ist der nicht destruktive Einfluss auf kleine Liposomen (< 200 nm) (van Winden et al. 1998). Allerdings kann durch ihre Anwendung ein *sterility assurance level* (SAL) von maximal 10^{-3} erreicht werden (ASHP, 2013). Der geforderte SAL-Wert nach Sterilisation im Endbehältnis liegt hingegen bei 10^{-6} . Die Entkeimungsfiltration ist deshalb nicht Methode der Wahl zur Herstellung steriler Präparationen und darf nur unter bestimmten Voraussetzungen angewandt werden.

Die Entkeimungsfiltration der Liposomen fand am Ende des Herstellungsprozesses nach Beladung mit Arsen sowie der abschließenden gelchromatographischen Aufreinigung statt (vgl. Kapitel 3.3.1.4). Es wurden dabei zwei unterschiedliche bakterienzurückhaltende Membranen auf ihre Eignung getestet. Der Millex[®]-GV-Filter mit einem Durchmesser von 13 mm besitzt eine Membran aus hydrophilem Polyvinylidenfluorid (PVDF, Durapore[®]), welches sich durch eine geringe Proteinbindung auszeichnet. Millex[®]-GS-Membranen (Ø = 25 mm) sind hingegen aus hydrophilem Zellulosemischester (MCE) aufgebaut und weisen eine deutlich höhere Proteinbindungstendenz auf (Millipore Corp. 2009).

Zunächst wurde der Einfluss der Filtration auf den mittleren hydrodynamischen Durchmesser (d_h), den Polydispersitätsindex (PDI) und die Lipidwiederfindung getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-7 dargestellt. Die Messungen zeigten keine Änderung des durchschnittlichen d_h nach Filtration mit Millex[®]-GV-Filtereinheiten. Der PDI wurde durch den Filtrations-schritt aber deutlich von zuvor $0,136 \pm 0,01$ auf $0,102 \pm 0,02$ gesenkt. Beim Vergleich der Lipidwiederfindungsrate der beiden Filtermembranen wird der Vorteil des Millex[®]-GV Filters deutlich. Hier liegt die Lipidwiederfindungsrate nach Filtration mit 97,6 % deutlich höher als bei der MCE-Membran (58,1 %). Untersuchungen von Sorgi und Huang zeigten, dass ein Lipidverlust während der Filtration wahrscheinlich durch eine unterschiedlich starke Lipidadsorption an verschiedenen Membranen variiert (Sorgi & Huang 1996).

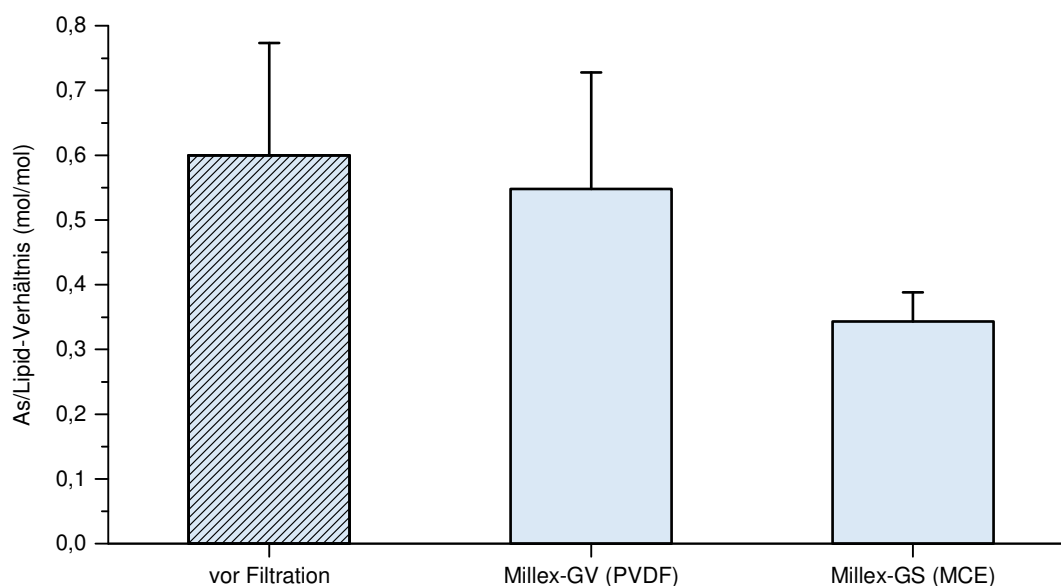
Tabelle 4-7: Einfluss der Entkeimungsfiltration auf Vesikelgröße und Lipidwiederfindung

<i>Probe</i>	<i>d_h ± SD (nm)</i>	<i>PDI ± SD</i>	<i>Lipidwiederfindung (%) ± SD</i>
nicht filtriert	133,7 ± 8,7	0,136 ± 0,01	-
Millex®-GV (PVDF)	133,9 ± 7,9	0,102 ± 0,02	97,6 ± 12,2
Millex®-GS (MCE)	n.d.*	n.d.*	58,1 ± 23,8

*nicht durchgeführt

In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie sich der Filtrationsprozess auf das As/Lipid-Verhältnis auswirkte. Der As-Gehalt wurde mittels GF-AAS nach Kapitel 3.3.2.3 bestimmt. Der Gesamtlipidgehalt wurde durch Quantifizierung von Cholesterin mittels Enzym-Assay gemäß Kapitel 3.2.2.2 über das eingesetzte PL/Chol-Verhältnis berechnet. Abbildung 4-17 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Auch in diesen Untersuchungen zeigte die PVDF-Membran Vorteile gegenüber der MCE-Membran. Das initiale As/Lipid-Verhältnis vor der Filtration betrug $0,6 \pm 0,17$ (mol/mol) und wurde nach Filtration durch die PVDF-Membran nur minimal auf $0,55 \pm 0,18$ (mol/mol) reduziert. Bei Verwendung der Zellulosemischester-Membran wurde das As/Lipid-Verhältnis hingegen um fast 50 % gesenkt ($0,34 \pm 0,05$). Auch Goldbach et al. hatten den Einfluss der Filtermembranen auf den liposomalen Wirkstoff-Gehalt vor und nach der Filtration untersucht. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde eine Carboxyfluorescein-Freisetzung aus SPC-Liposomen von weniger als 1 % gemessen (Goldbach et al. 1995).

**Abbildung 4-17: Einfluss der Entkeimungsfiltration auf das As/Lipid-Verhältnis**

Gezeigt ist das As/Lipid-Verhältnis vor und nach der Entkeimungsfiltration ($< 0,22 \mu\text{m}$). Für die Filtration wurden zwei unterschiedliche Bakterien-zurückhaltende Membranen, bestehend aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Zellulosemischester (MCE), eingesetzt. ($n = 3-11 \pm \text{SD}$)

Zur morphologischen Charakterisierung der Liposomen vor und nach Filtration durch die PVDF-Membran ($< 0,22 \mu\text{m}$) wurden Kryo-TEM Aufnahmen analog Kapitel 3.2.1.2 durchgeführt, welche in Abbildung 4-18 dargestellt sind.

Die Aufnahmen der filtrierten Präparation (B) zeigen eine sehr homogene Größenverteilung mit einer durchschnittlichen Vesikelgröße von $\approx 70\text{-}200 \text{ nm}$. Im Vergleich zu der Präparation vor Filtration (A) sind weniger sehr große Vesikel zu beobachten. Wahrscheinlich wurden größere Vesikel ($> 200 \text{ nm}$) durch die Filtration aus der Präparation entfernt. Es waren außerdem nur wenige durch den Filtrationsprozess bedingte Schädigungen des liposomalen Bilayers zu erkennen (Pfeile). Auch ein evtl. resultierendes vermehrtes Auftreten von extraliposomalem Ni-As-Komplex war nicht zu beobachten.

Beide Präparationen hatten viele multivesikuläre Strukturen sowie Liposomen mit den in Kapitel 4.2.2.1. bereits beschriebenen Membraneindellungen. Auch der intraliposomal kristallartig präzipitierte Ni-As-Komplex war bei beiden gut zu erkennen.

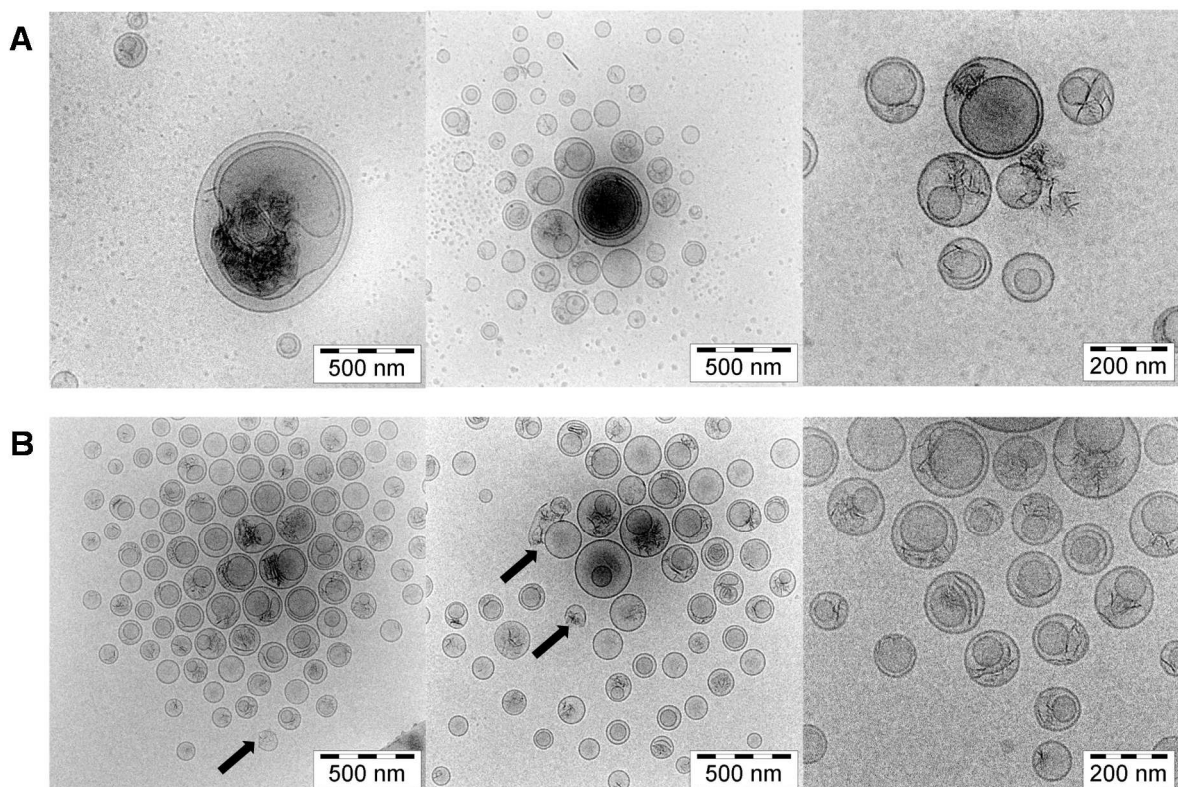


Abbildung 4-18: Kryo-TEM Aufnahmen von Liposomen vor und nach der Entkeimungsfiltration

Gezeigt sind Arsen-beladene ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (A) vor der Filtration und (B) nach Filtration durch eine PVDF-Membran (Porenweite $< 0,22 \mu\text{m}$, Millex®-GV). Der intraliposomal kristallartig präzipitierte Ni-As-Komplex ist bei beiden Präparationen deutlich zu erkennen. Zum Teil sind Membrandefekte (mit Pfeilen gekennzeichnet) zu beobachten, die wahrscheinlich durch die Filtration bedingt waren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Entkeimungsfiltration mit Millex®-GV-Filtern (Porengröße 0,22 µm, Ø 13 mm) zu einer homogenen liposomalen Präparation mit nur wenig Lipid- und Arsen-Verlusten führte. Sie stellt damit eine gute Alternative zur Sterilisierung durch Autoklavieren dar und wurde zur Herstellung der für die *in-vitro*-Vitalitätsuntersuchungen (vgl. Kapitel 4.3) benötigten aseptischen Präparationen angewandt.

4.3 *In-vitro*-Zellvitalitätsuntersuchungen

Zytotoxizitätsuntersuchungen NiAs-beladener ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (vgl. 3.3.1.4) wurden mittels Resazurin-Reduktions-Assay analog Kapitel 3.6.3.2 an Kelly- und LS-Zellen durchgeführt. Die Zellvitalität wurde dabei vergleichend zwischen As-beladenen Liposomen (ATO_{Lip}) und nicht liposomaler ATO-Lösung (ATO) nach Inkubation über 24, 48 und 72 h bestimmt. Um einen toxischen Einfluss liposomalen Nickels auf die Vitalität auszuschließen, wurden zudem Zellen über 72 h mit dieser Kontrollpräparation inkubiert. Der getestete Konzentrationsbereich lag zwischen 40 nM und 500 µM As. Die Zellvitalität wurde prozentual im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Vitalität 100 %) angegeben (Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20).

In beiden Neuroblastomzelllinien zeigten NiAs-beladene Liposomen eine im Vergleich zu ATO-Lösung abgeschwächte Zytotoxizität. Dies kann durch eine verzögerte Freisetzung von Arsen aus den Liposomen erklärt werden. *In-vitro*-Untersuchungen an humanen HPV-assoziierten Zervixkarzinom-, B-Zell-Lymphom- und Brustkrebs-Zelllinien zeigten bereits ähnliche zytotoxische Effekte bei der Inkubation mit liposomal verkapseltem Arsen (Chen et al. 2006, Ahn et al. 2010, Wang et al. 2016).

Ausschließlich Ni-beladene Liposomen wiesen auch nach 72-stündiger Inkubation keinen zytotoxischen Effekt auf. Die Wirkung der NiAs-Liposomen kann somit auf das verkapselte As zurückgeführt werden.

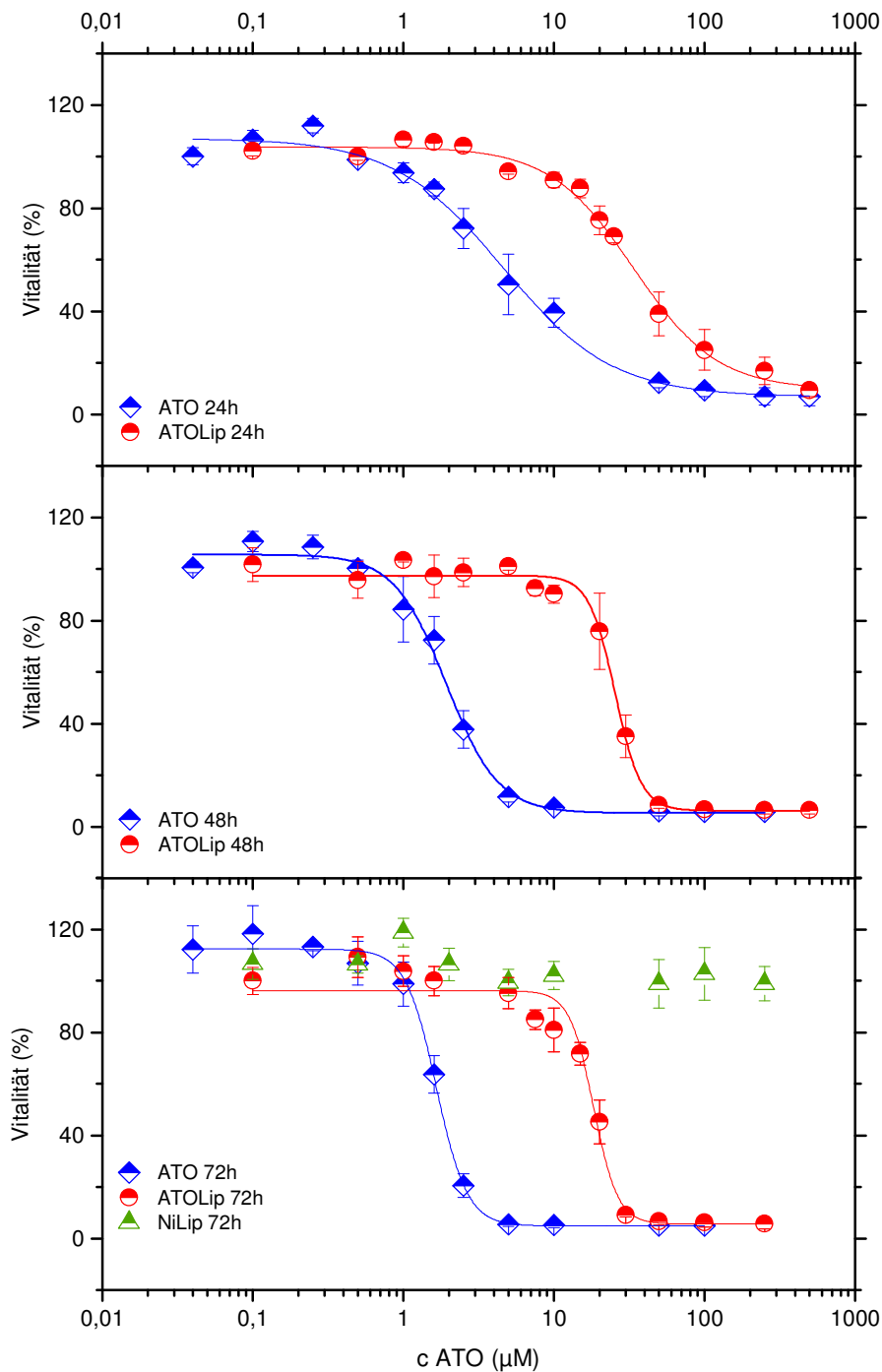


Abbildung 4-19: *In-vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen liposomalen Arsens an LS-Zellen

Zellvitalität nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation (37°C) mit ATO-Lösung (ATO, blau), NiAs-beladenen ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (ATO_{Lip}, rot) und liposomal verkapseltem Ni (Ni_{Lip}, grün). Die Bestimmung erfolgte fluorimetrisch ($\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) mittels Resazurin-Reduktions-Assay nach 4-stündiger Inkubation (37 °C). Die Vitalität wurde dabei in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen (100 %) angegeben. ($n = 3 \pm \text{SD}$)

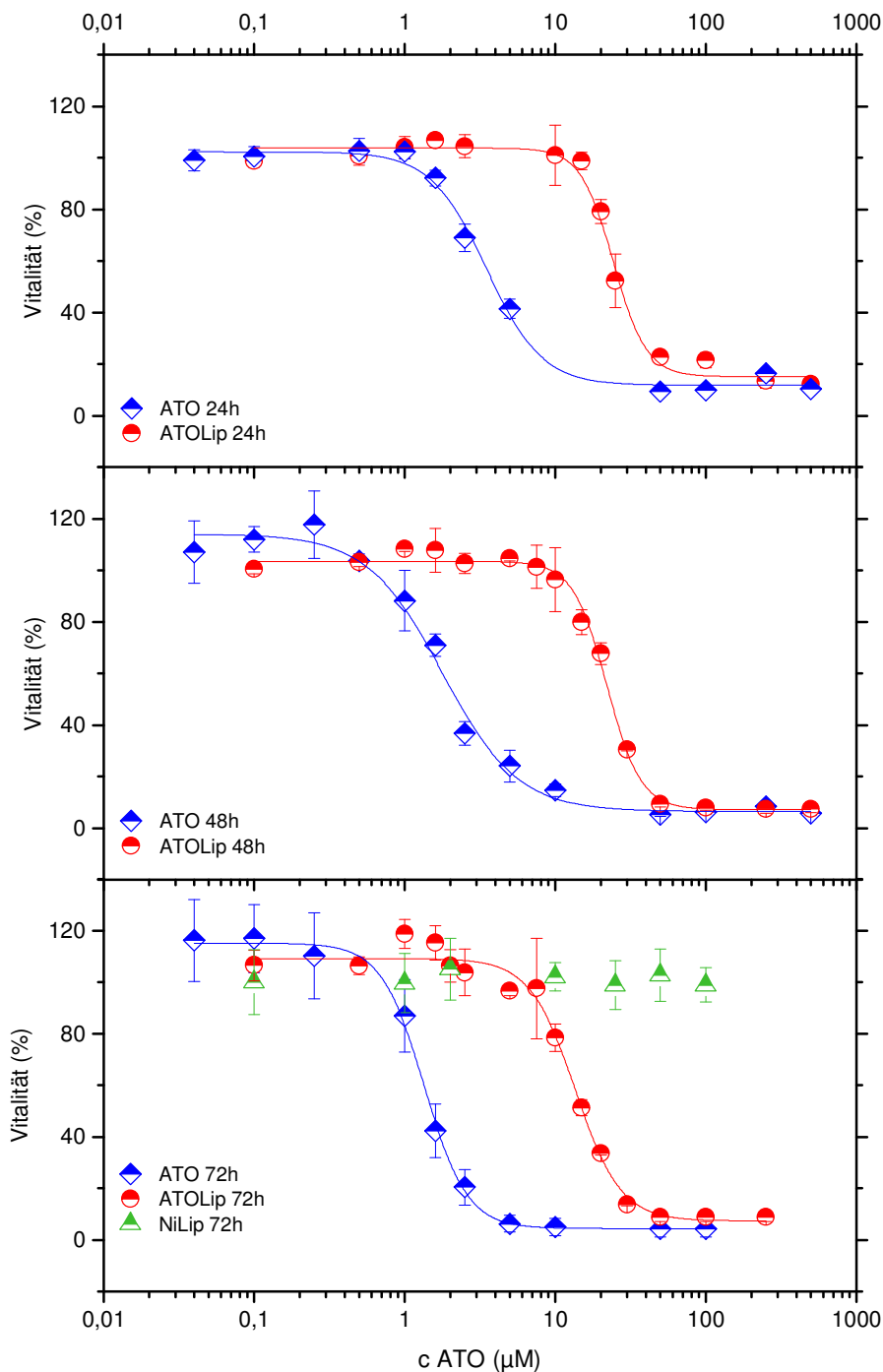


Abbildung 4-20: *In-vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen liposomalen Arsens an Kelly-Zellen

Zellvitalität nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation (37°C) mit ATO-Lösung (ATO, blau), NiAs-beladenen ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (ATO_{Lip} , rot) und liposomal verkapseltem Ni (Ni_{Lip} , grün). Die Bestimmung erfolgte fluorimetrisch mittels Resazurin-Reduktions-Assay ($\lambda_{\text{exc}} = 460\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 590\text{ nm}$). Die Vitalität wurde dabei in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen (100 %) angegeben. ($n = 3 \pm \text{SD}$)

4.3.1 Bestimmung der EC_{50} von liposomalem ATO

Der beim logarithmischen Auftragen der As-Konzentration entstehende sigmoidale Kurvenverlauf wurde mit Hilfe von Formel 10 (Seite 84) gefittet und gemäß Kapitel 3.6.3.1 die EC_{50} -Werte der Präparationen berechnet. Die mittels Resazurin-Reduktions-Assay ermittelten Werte sind in Tabelle 4-8 aufgeführt. Um die ermittelten Werte einordnen und vergleichen zu können, wurde außerdem die Zellvitalität nach 72-stündiger Inkubation mit ATO-Lösung mittels kommerziell erhältlichem CellTiter-Glo[®]-Assay (CTG; Promega) analog 3.6.3.1 bestimmt (Tabelle 4-9). Beide Assays ergaben EC_{50} -Werte in einem vergleichbaren Größenbereich. Der kostengünstigere Resazurin-Reduktions-Assay eignet sich somit zur Bestimmung von EC_{50} -Werten und ermöglicht außerdem den Vergleich mit Werten, die mittels CTG-Assay bestimmt wurden.

Tabelle 4-8: Mittels Resazurin-Reduktions-Assay bestimmte EC_{50} -Werte für ATO und ATO_{Lip}

<i>Inkubationszeit</i>	<i>LS (n = 3 ± SD)</i>		<i>Kelly (n = 3 ± SD)</i>	
	<i>EC_{50} ATO (μM)</i>	<i>EC_{50} ATO_{Lip} (μM)</i>	<i>EC_{50} ATO (μM)</i>	<i>EC_{50} ATO_{Lip} (μM)</i>
24 h	4,57 ± 3,87	33,78 ± 2,37	3,49 ± 2,17	24,32 ± 1,24
48 h	1,93 ± 0,87	25,45 ± 0,60	1,78 ± 0,77	21,99 ± 0,55
72 h	1,66 ± 0,39	18,33 ± 0,84	1,35 ± 0,43	13,56 ± 0,70

Tabelle 4-9: Mittels CTG-Assay bestimmte EC_{50} -Werte für ATO (n = 3 ± SD)

<i>Zelllinie</i>	<i>EC_{50} ATO (μM) nach 72 h</i>
LS	1,94 ± 0,42
Kelly	1,82 ± 0,45

Die EC_{50} -Werte von sowohl reiner ATO-Lösung als auch liposomalem As liegen nach 48-stündiger Inkubation deutlich niedriger im Vergleich zur 24-stündigen Inkubation. Bei ATO-Lösung ändert sich der EC_{50} -Wert auch bei längerer Inkubation (72 h) nur leicht. Diese Ergebnisse sind mit den von Karlsson et al. mittels MTT-Assay durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen von ATO an SK-N-BE(2)-Zellen vergleichbar. Auch hier zeigten sich wesentliche Effekte auf die Zellvitalität erst nach 48-stündiger Inkubation (Karlsson et al. 2004). Es wird daher vermutet, dass die durch ATO induzierte Apoptose (vgl. Kapitel 1.4.3.4) ein verzögert auftretendes Ereignis ist.

Bei liposomalem ATO konnte hingegen auch noch nach 72-stündiger Inkubation eine Abnahme des EC_{50} um ca. 7-8 μM festgestellt werden. Da bei Zytotoxizitätsuntersuchungen von Chen et al. nach 92-stündiger Inkubation abschließend vergleichbare Zytotoxizitätswerte für ATO und ATO_{Lip} erzielt wurden, konnte die kontinuierliche Abnahme der EC_{50} -Werte mit einer verzögerten liposomalen ATO-Freisetzung erklärt werden (Chen et al. 2006).

Durch die Anwendung als liposomale Formulierung kann somit die generelle ATO-Toxizität und damit einhergehende Nebenwirkungen reduziert werden. Für eine effiziente Neuroblastomtherapie sollte die Präparation auf die Krebszellen aber toxischer wirken, als bisher gezeigt wurde. Dies könnte durch liposomale Oberflächenmodifikation mit anti- GD_2 realisiert werden.

Chen et al. zeigten bereits eine Erhöhung der Zytotoxizität von Folat-funktionalisierten NiAs-Liposomen auf HeLa-Zellen. Nach einer Inkubation von 24 h lag die dabei ermittelte EC_{50} mit $5,5 \pm 2,2 \mu\text{M}$ sogar unter der EC_{50} von reiner ATO-Lösung ($6,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Aufgrund der fehlenden Internalisierung von nicht funktionalisierten NiAs-Liposomen lag deren EC_{50} hingegen bei $16,6 \pm 9,1 \mu\text{M}$ (Chen et al. 2009b).

4.4 *In-vitro*-Untersuchung der anti- GD_2 -Oberflächenmodifikation

Um eine zielgerichtete Neuroblastomtherapie mit Arsen beladenen und Disialogangliosid-2- (GD_2)-Antikörpern modifizierten Liposomen zu ermöglichen (vgl. Kapitel 1.2.2), muss eine funktionelle und stabile Oberflächenmodifikation gewährleistet sein. Die Untersuchung der zellulären Assoziation an Neuroblastomzelllinien wurde dabei, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, durchflusszytometrisch über Rhodamin-markierte (0,5 mol %), wirkstofffreie Modell-Liposomen durchgeführt. Die für diese Untersuchungen eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 3-12 (Seite 67) aufgelistet. Ihre Spezifität für das GD_2 -Epitop konnte bereits in Vorgängerarbeiten gezeigt werden (Lewrick 2008, Müller 2013).

Die Oberflächenmodifikation der Liposomen erfolgte mittels PIT oder SPIT gemäß Kapitel 3.5.1.2. Dabei wurden die Antikörper (Ak) über freiliegende Amingruppen an N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-aktivierte PEG-Membrananker (An) gekoppelt. Das eingesetzte Kopplungsverhältnis von Ak zu An betrug stets 1/25 (mol/mol). Im Anschluss wurden diese Antikörper/Anker-Konjugate (Ak/An), wenn nicht anders angegeben, in einem Verhältnis von 5 mol % zum Gesamtlipid selektiv in die äußere liposomale Membran einlagert (vgl. Kapitel 3.5.1.2). Die zelluläre Assoziation der resultierenden Immunliposomen wurde durchflusszytometrisch am FACSCaliburTM vermessen.

4.4.1 Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die zelluläre Assoziation

Durch die Änderung der Lipidzusammensetzung von ESM/Chol (70/30 mol %) auf ESM/Chol/DSPE-mPEG (66,7/28,5/4,8 mol %) kann deren zelluläre Assoziation beeinflusst werden. Es wurde daher zunächst untersucht, wie die zelluläre Assoziation nicht-funktionalisierter Liposomen an Kelly-Zellen ausgeprägt war. Der Einfluss der Einlagerung zusätzlicher PEG-Strukturen in die Liposomen wurde durch die Modifizierung der Liposomen mittels SPIT unter Verwendung eines unspezifischen IgG-Antikörper analog 3.5.1.2 durchflusszytometrisch (vgl. 3.6.2.3) überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4-10 gezeigt.

Tabelle 4-10: Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die zelluläre Assoziation von Liposomen an Kelly-Zellen (n = 2-3 ± SEM)

<i>Lipidzusammensetzung</i>	<i>Probe</i>	<i>Fluoreszierende Zellen (%) ± SEM</i>	<i>MFI (a.u.) ± SEM</i>
ESM/Chol	unmodifiziert	2,45 ± 0,02	5,09 ± 0,68
	SPIT/IgG	0,24 ± 0,02	3,99 ± 0,16
ESM/Chol/DSPE-mPEG	unmodifiziert	0,22 ± 0,05	2,06 ± 0,42

Wie bereits vermutet, wiesen alle Präparationen aufgrund des fehlenden spezifischen GD₂-Antikörpers keine nennenswerte zelluläre Assoziation auf. Aber sowohl die Anzahl fluoreszierender Zellen (2,45 ± 0,02 %) als auch die mediane Fluoreszenzintensität (MFI = 5,09 ± 0,68) der ESM/Chol-Präparation war im Vergleich zur PEGylierten Formulierung leicht erhöht. Dies resultiert wahrscheinlich aus einer fehlenden sterischen Abschirmung reiner ESM/Chol-Liposomen.

Die Vermutung konnte bestätigt werden, da durch die Insertion von IgG/An-Konjugaten und dem damit verbundenen Einbringen von PEG in die Vesikelmembran auch bei ESM/Chol-Liposomen die unspezifische Zellbindung (0,24 ± 0,02 %) auf das Niveau von ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen gesenkt werden konnte.

Der Einsatz der PEGylierten Präparation eignet sich daher gut zur Untersuchung der spezifischen zellulären Assoziation nach Oberflächenmodifikation mit GD₂-Ak, da sie selbst praktisch keine unspezifische Zellbindung aufweist.

4.4.2 Vergleich der Insertionstechniken SPIT und PIT

Ein wichtiger Aspekt bei der Insertion von Ak/An-Konjugaten ist die Rigidität des liposomalen Bilayers. Diese wird durch Faktoren wie den Sättigungsgrad und die Fettsäurekettenlänge der eingesetzten Lipide, aber auch durch den Cholesterolanteil der Membran beeinflusst. Bei ESM/Chol-Liposomen (70/30 mol %) wurde eine im Vergleich zu EPC/Chol (70/30 mol %) stark verminderte Insertion des Chol-PEG₂₀₀₀-Ankers gezeigt (Molnar 2015). Bei durchflusszytometrischer Untersuchung der zellulären Assoziation funktionalisierter ESM/Chol-Liposomen an GD₂-exprimierenden Neuroblastomzellen konnte aber trotzdem ein effektives Targeting gezeigt werden (Müller 2013).

Ein weiterer Faktor, der die Insertion von Ak/An-Konjugaten beeinträchtigen kann, ist die sterische Stabilisierung der Liposomen mittels DSPE-mPEG. Ishida et al. beschrieben eine verminderte Zellbindung bei anti-CD19 modifizierten HSPC/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (2/1/0,08 mol %) im Vergleich zu nicht-PEGylierten HSPC/Chol-Liposomen (Ishida et al. 1999).

Im Folgenden wurden daher die Insertionstechniken SPIT und PIT auf ihr Potential, ESM/Chol/DSPE-mPEG-Immunoliposomen mit hoher Targeting-Effizienz herzustellen, untersucht.

Jakoby et al. konnten bei Erhöhung der SPIT-Insertionstemperatur auf 60 °C eine verstärkte zelluläre Assoziation von anti-GD₂-Immunoliposomen im Vergleich zur Standard-Insertionstemperatur von 17 °C zeigen (Jakoby et al. 2015). Da bei diesen Temperaturen bereits Aggregations- und Denaturierungsprozesse bei IgG Ak einsetzen können (Vermeer & Norde 2000), wurde untersucht, ob bei einer moderateren Insertionstemperatur von 40 °C (SPIT40) vergleichbare Effekte erzielt werden können. Bei der PIT erfolgte der Insertionsschritt aufgrund der erhöhten Phasenübergangstemperatur der ESM/Chol-Mischung und der Verwendung der DSPE-Anker zunächst bei 60 °C. Die Untersuchungen wurden mit dem ch14.18 GD₂-Ak analog Kapitel 3.5.1.2 und 0 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-21 dargestellt.

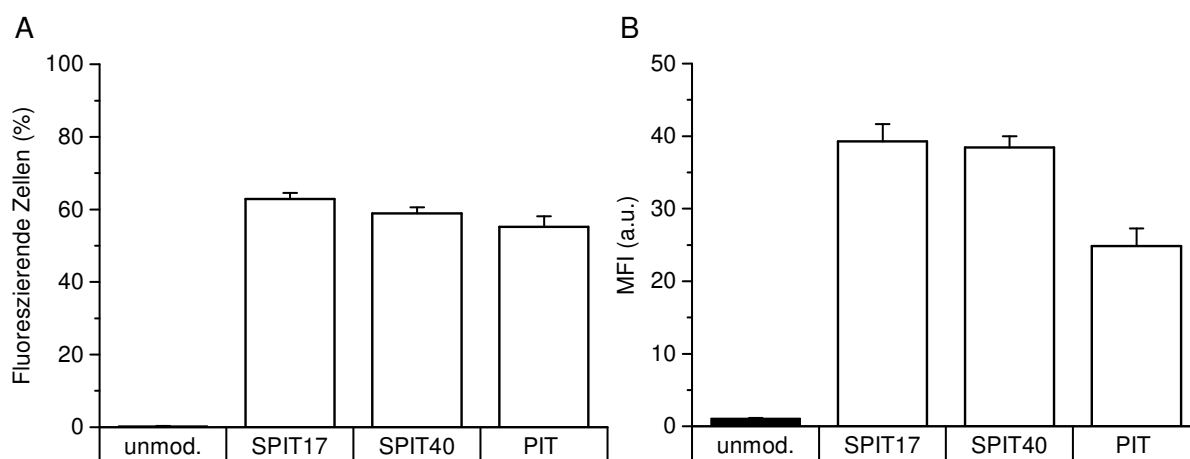


Abbildung 4-21: Zelluläre Assoziation anti-GD2-funktionalisierter Liposomen nach Modifikation mittels SPIT und PIT

Gezeigt ist die zelluläre Assoziation unmodifizierter ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (schwarze Balken) im Vergleich zu ch14.18-funktionalisierten Liposomen (weiße Balken) an Kelly-Zellen (Inkubation 2 h, 37 °C). 5 mol % des Ak/An-Konjugats wurden mittels SPIT bei 17 °C (SPIT17) oder 40 °C (SPIT40) oder mittels PIT bei 60 °C eingelagert und die zelluläre Assoziation durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** Anteil fluoreszierender Zellen (%); **(B)** mediane Fluoreszenzintensität der untersuchten Zellen (MFI). ($n \geq 2 \pm \text{SEM}$)

Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, zeigten unmodifizierte ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen keine zelluläre Assoziation. Die mittels SPIT17 und SPIT40 oberflächenmodifizierten Präparationen zeigten vergleichbar hohe zelluläre Assoziationen. Der Anteil fluoreszierender Zellen lag bei SPIT17 mit $62,9 \pm 1,7$ % sogar geringfügig über den Werten für SPIT40 ($58,9 \pm 1,7$ %). Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) beider Ansätze lag bei ca. 39. Die Erhöhung der Insertionstemperatur auf 40 °C brachte somit keinen Vorteil für die Spezifität der Immunliposomen.

Der Anteil fluoreszierender Zellen lag nach Funktionalisierung mittels PIT mit $55,3 \pm 2,9$ % im Bereich der SPIT-Modifizierung. Bei Betrachtung der MFI konnten aber signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, One-way ANOVA in Kombination mit Turkey-Test) festgestellt werden. Die MFI lag hier nur bei ca. 25, woraus eine geringere Anzahl gebundener Liposomen pro Zelle abgeleitet werden konnte.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen zur zellulären Assoziation eine Überlegenheit der SPIT gegenüber der PIT. In früheren Arbeiten zeigte sich jedoch eine deutlich bessere Lagerstabilität der Oberflächenmodifikation für DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS (PIT) funktionalisierte Immunliposomen (Parr et al. 1994, Uster et al. 1996, Molnar et al. 2016, Züfle 2016). Da sich die Funktionalisierung mittels SPIT in ESM/Chol-Liposomen zusätzlich negativ auf die Verkapselungsstabilität des Arsens auswirkte (Müller 2013), wurde für die weiteren *in-vitro*-Untersuchungen die PIT als Standardmethode zur liposomalen Oberflächenmodifikation eingesetzt.

4.4.3 Untersuchung der zellulären Assoziation unterschiedlicher anti-GD₂-Varianten

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, wie sich die Kopplung verschiedener GD₂-AK über DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS Membrananker auf die zelluläre Assoziation an zwei verschiedene Neuroblastomzelllinien (Kelly und SK-N-AS) auswirkte. In Untersuchungen aus Vorgängerarbeiten wurden zur Ak-Kopplung an ESM/Chol-Liposomen bisher die Membrananker DSPE-PEG₂₅₀₀-Maleinimid (Mal) sowie Chol-PEG₂₀₀₀-NHS eingesetzt (Müller 2013).

Da sowohl unterschiedliche PEG-Kettenlängen, die chemische Modifikation der Ak (Thiolierung) und auch die unterschiedliche Ak/An-Reaktion in Abhängigkeit der eingesetzten reaktiven Gruppe (NHS oder Mal) Einfluss auf die zelluläre Assoziation der Immunoliposomen an GD₂-positive Zellen haben könnten, wurden einige Versuche mit dem DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS Anker wiederholt. Die zelluläre Assoziation von HSPC/Chol/DSPE-mPEG-(56/38/5 mol %)-Liposomen an Kelly-Zellen nach Modifikation mit DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS-gekoppeltem hu14.18 war bereits erfolgreich getestet worden (Jakoby 2014).

Die Untersuchungen erfolgten an oberflächenmodifizierten, Rh-markierten (0,5 mol %) ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen. Es wurden dabei sowohl spezifische GD₂-Ak (hu14.18, ch14.18 und ch Δ C_{H2}) als auch unspezifisches IgG im Verhältnis 1:25 (Ak/An) eingesetzt. Die Kopplung erfolge analog 3.5.1.2. Da die Ak, wie in Tabelle 4-11 (Seite 134) gezeigt, in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen wurden, um eine vergleichende Aussage treffen zu können, alle Ak vor der Kopplung mit PBS-Puffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von 4,5 mg·mL⁻¹ eingestellt. Die zelluläre Assoziation der Präparationen wurde wie in Kapitel 3.6.2.3 beschrieben bestimmt (Abbildung 4-22).

Sowohl bei Kelly als auch bei SK-N-AS-Zellen resultierte die Kopplung von ch Δ C_{H2} im direkten Vergleich mit anderen spezifischen anti-GD₂ in den höchsten zellulären Assoziationen. Beide Kontrollpräparationen (unmodifiziert und IgG-modifiziert) führten zu keiner Zellbindung. Beim Vergleich der beiden Neuroblastomzelllinien untereinander fielen große Unterschiede auf. Der Anteil fluoreszierender Zellen (Abbildung 4-22 A) lag für Kelly-Zellen mit ch Δ C_{H2}-funktionalisierten Liposomen bei 79,4 ± 3,7 %, bei SK-N-AS hingegen nur bei 0,6 ± 0,1 %. Auch die mediane Fluoreszenzintensität (Abbildung 4-22 B), die als Maß für die Anzahl gebundener Liposomen pro Zelle gesehen werden kann, lag für SK-N-AS mit 1,8 ± 0,1 nur minimal über der Negativkontrolle mit unspezifischem IgG (MFI = 0,6 ± 0,1). ch14.18-funktionalisierte Liposomen zeigten bei SK-N-AS Zellen im Vergleich zur Kontrollpräparation überhaupt keine zusätzlichen Effekte.

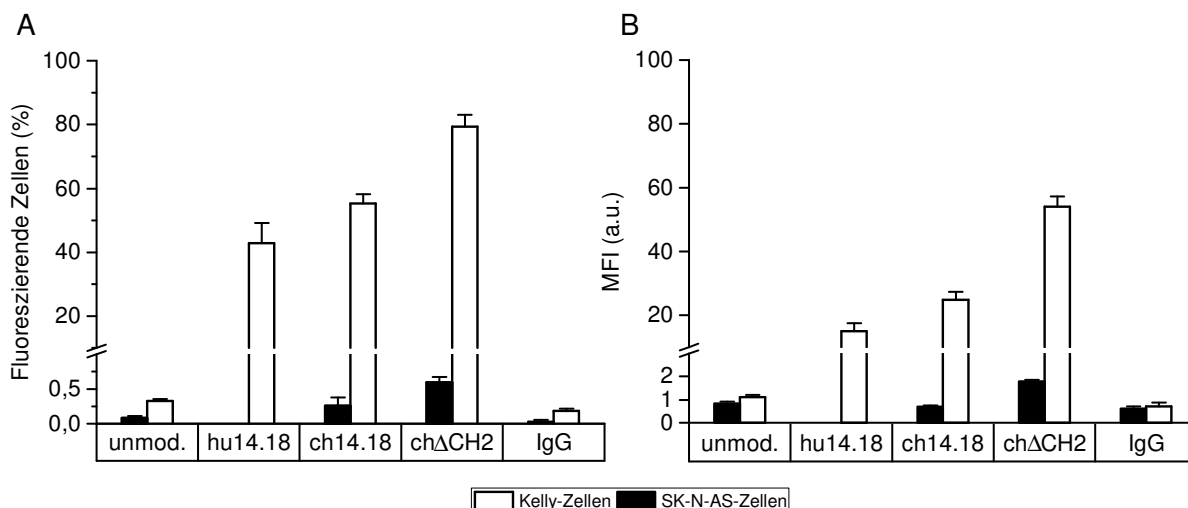


Abbildung 4-22: Durchflusszytometrische Untersuchung der zellulären Assoziation

Gezeigt ist die zelluläre Assoziation unmodifizierter ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (unmod.) im Vergleich zu anti-GD₂- (hu14.18, ch14.18 und ch Δ C_{H2}) funktionalisierten und mit unspezifischem IgG oberflächenmodifizierten Liposomen an Kelly- (weiße Balken) und SK-N-AS-Zellen (schwarze Balken). 5 mol % des Ak/An-Konjugates wurden mittels PIT in Rh-markierte (0,5 mol %) Liposomen eingelagert und die Zellbindung nach 2 h Inkubation bei 37 °C durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** Anteil fluoreszierender Zellen (%); **(B)** mediane Fluoreszenzintensität der Zellen (MFI). (n = 3-6 \pm SEM)

Auf Kelly-Zellen zeigten neben ch Δ C_{H2} auch hu14.18 (42,9 \pm 6,2 %, MFI 14,9 \pm 2,6) und ch14.18 (55,3 \pm 2,9 %, MFI 24,8 \pm 2,5) modifizierte Liposomen eine Assoziation. Der Anteil fluoreszierender Zellen lag aber signifikant (p < 0,05, One-way ANOVA in Kombination mit Turkey-Test) unter den mit ch Δ C_{H2} gemessenen Werten.

Die Ergebnisse überraschten, da es sich laut Literatur bei SK-N-AS um eine GD₂-positive Zelllinie handelt (Cheresh et al. 1986, Riemer et al. 2006, Craddock et al. 2010). Die GD₂-Expression der getesteten Zelllinien wurde deshalb in weiteren Versuchen immunhistochemisch untersucht (siehe Kapitel 4.5).

Die unterschiedlich starke zelluläre Assoziation von hu14.18 und ch14.18 im Vergleich zu ch Δ C_{H2} könnte mit deren unterschiedlichen Molmassen zusammenhängen (vgl. Tabelle 4-11). Durch die Deletion des C_{H2}-Teils hat der ch Δ C_{H2}-Ak ein um \approx 26 kDa kleineres Molekulargewicht. Bei der Untersuchung des apparenten Diffusionskoeffizienten anti-GD₂-gekoppelter Chol-PEG-Anker (\approx 146 kDa) zeigte sich im Vergleich zu Glycin-gekoppelten Ankern (\approx 75,1 Da) eine Abnahme von diesem (Molnar 2015). Ein größerer Diffusionskoeffizient des ch Δ C_{H2}/An-Konjugates könnte zu einer verbesserten Insertion in die äußere liposomale Membran führen und somit die höhere zelluläre Assoziation erklären.

Eine abschließende Klärung der verbesserten zellulären Assoziation der ch Δ C_{H2}-Immunoliposomen ist durch diese Untersuchungen nicht möglich. Deshalb wurde in weiteren Untersuchungen die pro Liposomen gebundene Ak-Menge mittels SDS-PAGE quantifiziert (siehe Kapitel 4.6.2).

Die stärkere Zellbindung der ch14.18-Immunoliposomen im Vergleich zu hu14.18-modifizierten Vesikeln liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung der Ak (siehe Tabelle 4-11). Der Puffer des hu14.18 enthält zur Isotonisierung und Stabilisierung zusätzlich 100 mM Arginin, welches durch die enthaltene primäre Amingruppe auch mit reaktiven NHS-Gruppen der Membrananker reagieren kann. Diese stehen folglich nicht mehr für die Kopplung des hu14.18 zur Verfügung.

Tabelle 4-11: Pufferzusammensetzung der getesteten GD₂-Antikörper

<i>anti-GD₂</i>	<i>M_r (kDa)</i>	<i>Pufferzusammensetzung</i>
hu14.18	146	8,6 mg·mL ⁻¹ in PBS, 100 mM Arginin, 0,03 % Tween-80 pH 6,0
ch14.18	146	4,5 mg·mL ⁻¹ in PBS pH 7,0-7,4
ch Δ C _{H2}	120	4,5 mg·mL ⁻¹ N.A.

4.5 Untersuchung der GD₂-Expression auf Neuroblastomzellen

Da für SK-N-AS-Zellen durchflusszytometrisch keine Interaktion mit GD₂-oberflächenmodifizierten Liposomen gezeigt werden konnte, wurde die GD₂-Expression dieser Zelllinie analysiert. Die Untersuchung wurde zusätzlich für drei weitere Neuroblastomzelllinien (Kelly, LS und SH-SY5Y) durchgeführt. Das GD₂-Antigen wurde hierfür wie in Kapitel 3.6.2.4 beschrieben immunhistochemisch angefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch am BD LSRFortessa™ analysiert.

Neben der GD₂-Expression wurde zudem die Affinität der drei zur Funktionalisierung von Liposomen eingesetzten anti-GD₂-Varianten (hu14.18, ch14.18 und ch Δ C_{H2}) zum GD₂-Epitop untereinander verglichen. Hierfür wurden die getesteten Zelllinien mit jeweils einem der spezifischen GD₂-Ak inkubiert. Nach abschließender Inkubation mit einem Alexa Fluor 488 markiertem goat anti-Human IgG erfolgte die Detektion im FL-1 Kanal. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit unspezifischem IgG behandelte Zellen.

Um eine unspezifische Bindung des goat anti-Human IgG auszuschließen, wurden als zusätzliche Kontrollen jeweils Zellen mitgeführt, die nur mit dem sekundären Ak inkubiert wurden. Die Resultate der Untersuchungen sind in Abbildung 4-23 dargestellt.

Die Kontrollpräparation mit IgG wie auch Zellen, die nur mit sekundärem Ak behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine gesteigerte Fluoreszenz. Eine unspezifische Bindung des sekundären Ak an die Zellen konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Versuche zeigten deutlich, dass sowohl Kelly- als auch LS-Zellen in hohem Ausmaß GD₂ exprimieren, welches die spezifische Bindung von Ak erlaubt. Laut Literatur werden Kelly-Zellen zu den stark GD₂ exprimierenden Zellen gezählt (Esser et al. 2012, Fisher et al. 2016).

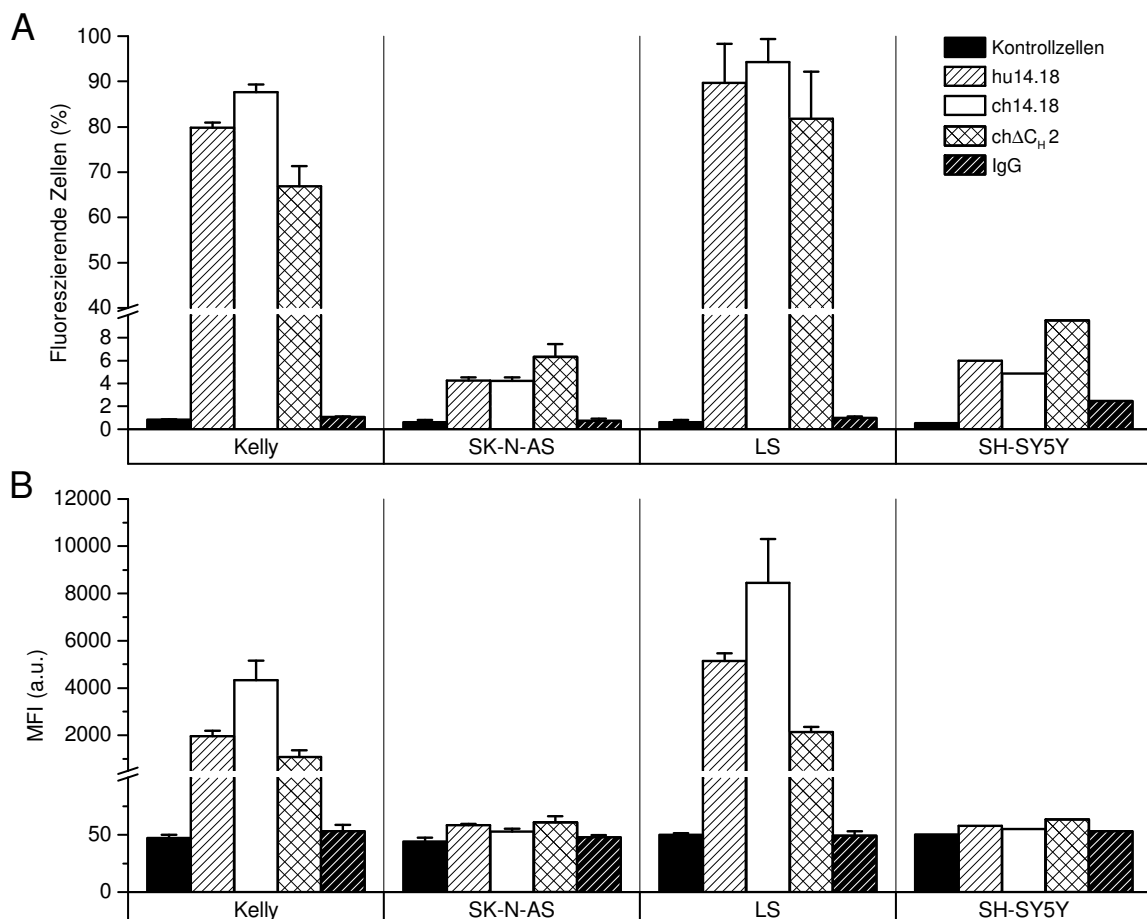


Abbildung 4-23: Durchflusszytometrische Untersuchung der GD₂-Expression auf verschiedenen Neuroblastomzelllinien

Gezeigt sind der Anteil fluoreszierender Zellen (%) (**A**) und die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) (**B**) von Kelly-, SK-N-AS-, LS- und SH-SY5Y-Zellen nach Inkubation mit anti-GD₂ (hu14.18, ch14.18 und ch Δ C_H2) oder unspezifischem IgG sowie anschließendem *Immunostaining* mittels Alexa Fluor 488 markiertem *goat anti-Human* IgG (H+L). (n = 1-2 \pm SEM)

SH-SY5Y- und SK-N-AS-Zellen zeigten dagegen keine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit dem sekundären, Alexa Fluor 488 markierten Antikörper. Sowohl der Anteil fluoreszierender Zellen (Abbildung 4-23 A) als auch die MFI (Abbildung 4-23 B) der mit anti-GD₂ inkubierten Zellen stieg im Vergleich zu IgG inkubierten Zellen nur leicht an.

Angaben zur GD₂-Expression von SH-SY5Y- und SK-N-AS-Zellen sind oft widersprüchlich. In einigen Literaturstellen wurden SH-SY5Y analog zu den Ergebnissen in vorliegender Arbeit als GD₂-negativ beschrieben (Ruan et al. 1999, Hettmer et al. 2005, Peng & Wang 2011). Acosta et al konnten für diese Zelllinie allerdings eine starke GD₂-Oberflächenexpression zeigen. Die GD₂-Expression auf SK-N-AS-Zellen war in dieser Publikation schwach ausgeprägt (Acosta et al. 2009). Im Gegensatz dazu wurden SK-N-AS Zellen in weiteren Veröffentlichungen als GD₂-positiv beschrieben (Adrian et al. 2011, Tivnan et al. 2012).

Die niedrige GD₂-Expression der SK-NAS-Zellen erklärt die in Kapitel 4.4.3 gezeigte niedrige zelluläre Assoziation der anti-GD₂-Immunoliposomen an dieser Zelllinie. Die Ergebnisse bestätigen, dass sowohl SH-SY5Y- als auch SK-N-AS-Zellen eine zu niedrige GD₂-Expression aufweisen, um sie als Modellzelllinien für die Testung GD₂-oberflächenmodifizierter Liposomen einzusetzen. Im Folgenden wurde daher ausschließlich auf Kelly- und LS- Zellen zurückgegriffen.

Beim Vergleich der verschiedenen anti-GD₂ zeigte der ch14.18-Ak die größte Verschiebung im FL-1 Kanal, ch Δ C_H2 zeigte hingegen die geringste Fluoreszenzintensität. Eine quantitative Aussage über die Bindungsstärke der Ak kann durch diese Versuche allerdings nicht getroffen werden, da die gemessene Fluoreszenzintensität auch vom Ausmaß der Bindung des sekundären Ak an den primären Ak abhängt. Da ch Δ C_H2 einen verkürzten F_c-Teil aufweist, kann die verminderte Bindung des sekundären Ak und damit die resultierende Fluoreszenzintensität verringert sein. Um die Bindungsstärke der Ak untereinander vergleichen zu können, müssten daher die primären Ak selbst fluoreszenzmarkiert sein.

4.6 Optimierung der PIT-Oberflächenmodifikation

In Kapitel 4.4.2 wurden bereits die Insertionstechniken SPIT und PIT verglichen. Die Untersuchungen zur zellulären Assoziation zeigten eine Überlegenheit der SPIT (SPIT17 und SPIT40) gegenüber der PIT. Aufgrund ihrer besseren Lagerstabilität wurde für weitere Untersuchungen jedoch die PIT als Standardmethode zur liposomalen Oberflächenmodifikation eingesetzt. Um die Effektivität der PIT-Funktionalisierung zu erhöhen, sollte diese im Folgenden weiter optimiert werden.

In Vorgängerarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung des Ak/An-Verhältnisses bei der Kopplung mittels PIT die zelluläre Assoziation von anti-GD₂-Immuno-liposomen an Neuroblastomzellen erhöht werden kann (Müller 2013, Jakoby 2014). In diesem Kapitel wurden daher ergänzend der Einfluss der Insertionstemperatur und der eingesetzten Menge Ak/An-Konjugat auf die Oberflächenmodifikation der Liposomen mittels PIT untersucht. Zum einen wurden hierfür die zelluläre Assoziation der funktionalisierten Liposomen am FACSCalibur™ analog 3.6.2.3 ausgewertet, zum anderen wurde der Anteil liposomal gebundener Antikörper mittels SDS-PAGE gemäß Kapitel 3.5.2.3 und 3.5.2.4 quantifiziert.

4.6.1 Durchflusszytometrische Untersuchung

4.6.1.1 Variation der Insertionstemperatur

Vermeer et al. hatten bei Untersuchungen der thermischen Stabilität von IgG1-Antikörpern mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) eine Denaturierungstemperatur der Probe von 74 °C ermittelt (Vermeer et al. 1998). Bei DSC-Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten GD₂-Ak waren allerdings zwei Enthalpiepeaks bei ≈ 61 °C (F_{ab}-Fragment) und ≈ 71 °C (F_c-Teil) gefunden worden (Kuhn 2015). Die Ak gehören zwar prinzipiell der Klasse des IgG Isotyp 1 an (Zeng et al. 2005), die erhaltenen Thermogramme zeigen aber niedrigere Denaturierungstemperaturen, wie sie in der Literatur für IgG Isotyp 2b beschrieben wurden (T_dF_{ab} = 61 °C und T_dF_c = 71 °C) (Vermeer & Norde 2000).

Da die bei der PIT bisher gewählte Insertionstemperatur von 60 °C sehr dicht an der Denaturierungstemperatur des F_{ab}-Teils der GD₂-Ak lag, wurde im Folgenden die zelluläre Assoziation der anti-GD₂-Immuno-liposomen an Kelly-Zellen nach Herstellung bei niedrigeren Insertionstemperaturen (40 und 50 °C) untersucht. Die Oberflächenmodifikation erfolgte dabei, mit Ausnahme der gewählten Insertionstemperatur, wie in Kapitel 3.5.1.2 beschrieben.

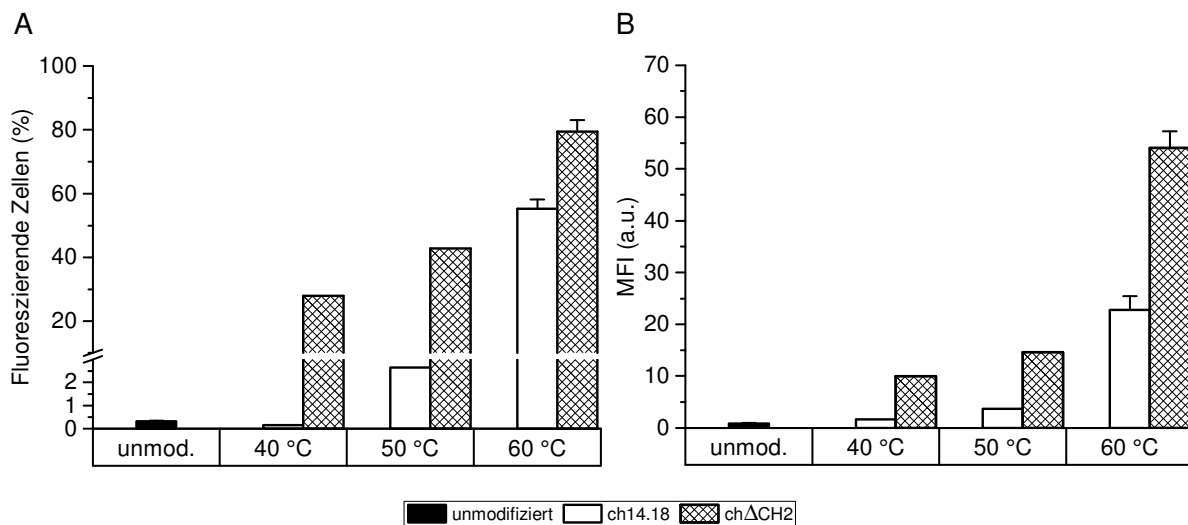


Abbildung 4-24: Einfluss der Insertionstemperatur bei der PIT

Zelluläre Assoziation anti-GD₂-konjugierter (ch14.18 oder chΔCH₂) ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (Rh-DPPE 0,5 mol % markiert) an Kelly-Zellen in Abhängigkeit von der bei der PIT eingesetzten Insertionstemperatur. Inkubation 2 h, 37 °C (A) Anteil fluoreszierender Zellen (%); (B) mediane Fluoreszenzintensität (MFI). (n = 1-3 ± SEM)

Wie in Abbildung 4-24 A und B zu sehen, sank die zelluläre Assoziation bei verringerter Insertionstemperatur ab. Da analog zu vorhergehenden Versuchen (Kapitel 4.4.3), ch14.18-funktionalisierte Liposomen eine im Vergleich zu chΔCH₂ modifizierten Vesikeln verminderte zelluläre Assoziation aufwiesen, wirkte sich die Absenkung der Insertionstemperatur für erstgenannte besonders drastisch aus. Hier sank der Anteil fluoreszierender Zellen von 55,2 % bei 60 °C Insertionstemperatur auf 2,6 % bei 50 °C. Bei chΔCH₂ waren hingegen noch 28 % der Zellen Rh-positiv, wenn die Insertionstemperatur auf 40 °C abgesenkt wurde. Der Anteil fluoreszierender Zellen lag aber auch hier signifikant niedriger als nach Insertion bei 60 °C.

Die verbesserte zelluläre Assoziation bei höherer Insertionstemperatur kann prinzipiell mit hohen Phasenübergangstemperaturen (T_c) der eingesetzten Lipidmischungen erklärt werden. Da die T_c für ESM aber bei verhältnismäßig niedrigen 40,8 °C liegt und durch den Zusatz von Cholesterin sogar noch weiter abgesenkt wird, liegen alle drei eingesetzten Insertionstemperaturen über der T_c (Nyholm et al. 2003). Das Vorliegen der Lipidmischung in der Gelphase als Erklärungsansatz für diese niedrige zelluläre Assoziation ist somit nicht wahrscheinlich, zumal Uster et al. sogar eine Insertion von DSPE-mPEG₁₉₀₀ in HSPC-Liposomen ($T_c \approx 58$ °C) bei 20 °C, also deutlich unterhalb der T_c der Lipidmischung, zeigen konnten (Uster et al. 1996).

Auch Insertionsuntersuchungen von Ishida et al. zeigten einen Transfer von IgG-DSPE-PEG-Konjugaten in den liposomalen Bilayer bei 37 °C innerhalb von 1 h. Die insertierte Menge betrug dabei allerdings nur 10,4 % der Menge, die bei 60 °C erreicht wurde. Durch eine verlängerte Inkubationszeit von 24 h konnte der Anteil aber weiter gesteigert werden (Ishida et al. 1999).

Die Ergebnisse von Ishida et al. lassen vermuten, dass die Hauptursache für die gesteigerte zelluläre Assoziation bei erhöhter Insertionstemperatur eine beschleunigte Gleichgewichtseinstellung der Ankerinsertion ist. Diese kann wiederum durch den mit steigender Temperatur erhöhten Diffusionskoeffizienten der Ak/An-Konjugate begründet werden. Eine effiziente Oberflächenmodifikation der Liposomen via PIT unterhalb einer Insertionstemperatur von 60 °C innerhalb von 1 h ist somit nicht möglich.

4.6.1.2 Variation der eingesetzten Ankermenge

Folgende Untersuchungen dienten der Bestimmung des Einflusses der zur Insertion in Liposomen eingesetzten Menge Ak/An-Konjugat (1,25, 3,5 und 5 mol %) auf die zelluläre Assoziation der anti-GD₂-Immunliposomen. Die Liposomen wurden dabei wahlweise mit ch14.18 oder ch Δ C_H2 funktionalisiert.

Abbildung 4-25 A und B zeigen, dass die zelluläre Assoziation, anders als erwartet, nicht mit zunehmender Konjugatmenge anstieg, sondern die höchsten Werte für die mittlere Ankerkonzentrationen von 3,5 mol % erreicht werden konnten. Der Unterschied war bei der ch14.18-funktionalisierten Präparation etwas stärker ausgeprägt. Hier betrug der Anteil fluoreszierender Zellen nach Zusatz von Liposomen mit 3,5 mol % Konjugat 64,1 %, bei 5 mol % eingesetztem Konjugat lag dieser hingegen bei nur 55 %. Die Verwendung des ch Δ C_H2-Ak resultierte bei beiden Ansätzen in ungefähr 83 % fluoreszierenden Zellen.

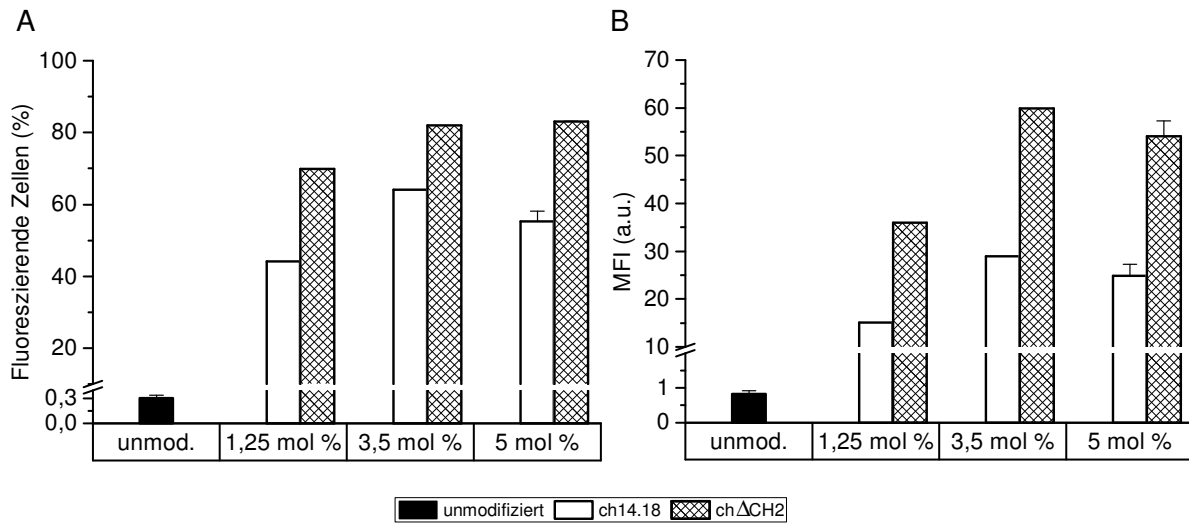


Abbildung 4-25: Einfluss der bei der PIT eingesetzten Menge Ak/An-Konjugat

Zelluläre Assoziation anti-GD₂-konjugierter (ch14.18 oder ch Δ CH₂) ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (Rh-DPPE 0,5 mol % markiert) an Kelly-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Ankermenge in mol % bezogen auf das Gesamtlipid. 2 h Inkubation, 37 °C **(A)** Anteil fluoreszierender Zellen (%); **(B)** mediane Fluoreszenzintensität (MFI). (n = 1-3 \pm SEM)

Die Untersuchungen von anti-CD19-modifizierten HSPC/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen (56,8/38,1/5,1 mol %) und EPC/Chol-Liposomen (55/45 mol %) zeigten einen ähnlichen Sachverhalt. Auch hier lag die ermittelte Targeting-Effizienz bei Einsatz von 3 mol % Ak/An-Konjugat höher als bei 5 mol % (Züfle 2016). Da der Rückgang der zellulären Assoziation mit dem Einsatz steigender Konjugatmengen bei den größeren Ak ch14.18 bzw. CD19 (\approx 146 kDa) stärker auftrat, wurde vermutet, dass möglicherweise eine sterische Hinderung der Antikörper-Antigen-Bindung stattfindet. Diese könne durch eine große Anzahl gebundener Ak auf der Vesikeloberfläche bedingt sein. Andererseits könnte die Ursache aber auch in einer bereits einsetzenden Sättigung der Membran mit Ak/An-Konjugaten liegen.

4.6.2 Quantifizierung der Oberflächenmodifikation mittels SDS-PAGE

Da über die durchflusszytometrischen Untersuchungen der zellulären Assoziation von Immunliposomen keine quantitative Aussage über die gebundene Antikörpermenge möglich war, wurde diese mittels SDS-PAGE analog Kapitel 3.5.2.4 bestimmt. Die Oberflächenmodifikation der Liposomen wurde zuvor wie in 3.5.1.2 beschrieben durchgeführt. Um das Protein/Phospholipid-Verhältnis berechnen zu können, wurde Cholesterol mittels enzymatischem Assay (vgl. 3.2.2.2) quantifiziert und der PL-Anteil über das eingesetzte molare Verhältnis von PL und Chol berechnet.

4.6.2.1 Bestimmung des Protein/Phospholipid-Verhältnisses

Betrachtet man das Protein/PL-Verhältnis in Abhängigkeit von der Insertionstemperatur (Abbildung 4-26 A), ist ab einer Temperatur von 55 °C eine deutliche Zunahme sowohl für ch14.18- als auch für ch Δ C_H2-Ak zu erkennen. Zwischen 40 und 50 °C zeigten sich hingegen keine Unterschiede im ermittelten Protein/PL-Verhältnis.

Die beiden eingesetzten anti-GD₂ Varianten unterscheiden sich deutlich bezüglich des gemessenen Proteingehalts. Bei ch Δ C_H2 konnte bei einer Insertionstemperatur von 60 °C ein Protein/PL-Verhältnis von $72,4 \pm 7,6$ ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) erzielt werden. Für ch14.18-Ak lag dieses mit $10,9 \pm 0,9$ ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) deutlich niedriger.

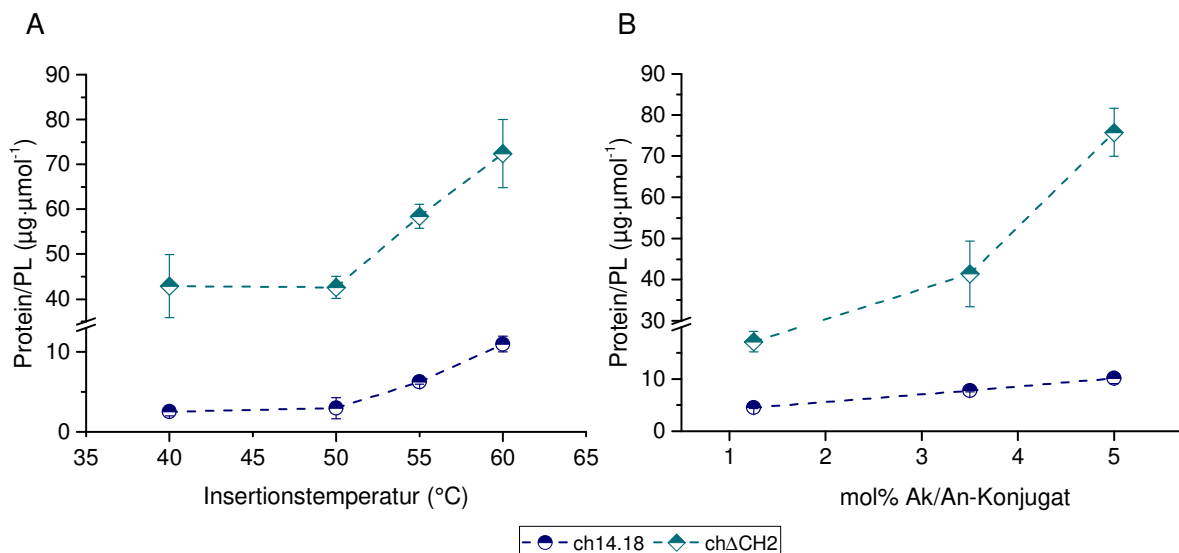


Abbildung 4-26: Ermittelter Protein/PL-Verhältnis nach Oberflächenmodifikation

Protein/PL-Verhältnis ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) anti-GD₂ (ch14.18 oder ch Δ C_H2) modifizierter ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen nach Quantifizierung mittels SDS-PAGE und Lipidbestimmung mittels Chol-Assay. **(A)** Einfluss der Insertionstemperatur; **(B)** Variation der eingesetzten Ankermenge (1,25, 3,5 und 5 mol %), Insertionstemperatur 60 °C. (n = 2 \pm SD)

Mit Hilfe dieser Werte lassen sich die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen, bei denen anti-GD₂-Immunoliposomen erst bei Funktionalisierung mit einer Insertionstemperatur von 60 °C in einer deutlichen Steigerung der zellulären Assoziation an Kelly-Zellen resultierten, gut erklären (vgl. 4.6.1.1 Abbildung 4-24). Auch das größere Protein/PL-Verhältnis bei Verwendung des ch Δ C_H2-Ak bestätigt die bessere zelluläre Assoziation der damit funktionalisierten Liposomen im Vergleich zu ch14.18-modifizierten Immunoliposomen.

Da die Präsentation von Ak an der Liposomenoberfläche zu einer erhöhten Blut-*Clearance* führt (vgl. Kapitel 1.2.2.1), ist es wichtig, ein Optimum zwischen beschleunigter Elimination und Erhöhung der *Targeting*-Effizienz durch größere Mengen oberflächengebundenem Ak zu finden. Allen et al. hatten *in vivo* einen Zusammenhang zwischen Ak-Dichte und resultierender Bluthalbwertszeit IgG-modifizierter Immunoliposomen gezeigt. In einem Bereich von 20-80 µg Protein pro µmol PL erzielten sie Halbwertszeiten von 7-9 h (Allen et al. 1995). Die gebundene Ak-Menge der getesteten Präparationen lag somit in dem Bereich, in dem ein effizientes *in-vivo*-Targeting ohne zu schnelle *Clearance* zu erwarten ist.

Auch die Erhöhung der bei der Insertion eingesetzten Menge Ak/An-Konjugat führte zu einer Zunahme des Protein/PL-Verhältnisses (Abbildung 4-26 B). Die Zugabe von 5 mol % Konjugat resultiert in der höchsten Menge liposomal gebundenen Antikörpers (ch14.18 = 10,2 ± 0,9 µg·µmol⁻¹; ch Δ C_H2 = 75,8 ± 5,9 µg·µmol⁻¹). Die Ergebnisse untermauern die Theorie, dass die bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen gefundene reduzierte zelluläre Assoziation von 5 mol % gegenüber 3,5 mol % ch14.18/An-Konjugat durch eine sterische Hinderung der Ak-Antigen-Bindung verursacht werden könnte (vgl. 4.6.1.2.) Bei Einsatz des kleineren ch Δ C_H2 scheint sich dieser Effekt nicht so stark auszuwirken.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch Wahl einer höheren Insertionstemperatur und einer Steigerung der eingesetzten Menge Ak/An-Konjugat vermehrt Ak in die Liposomenmembran inseriert werden können. Dies resultierte, mit Ausnahme der Versuche mit 5 mol % bei ch14.18-funktionalisierten Immunoliposomen, in einer verbesserten *in-vitro*-Targeting-Effizienz.

4.6.2.2 Bestimmung der Effizienz der Oberflächenmodifikation

Zur genaueren Beschreibung der getesteten Bedingungen wurden die Effizienz der Oberflächenmodifikation (E_{OM}) ausgehend von der initial eingesetzten Ak-Menge nach Formel 4 (Seite 76) berechnet. Des Weiteren wurde die pro Liposomen gebundene Anzahl Ak gemäß Kapitel 3.5.2.4 berechnet. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst.

Tabelle 4-12: Charakterisierung der Oberflächenmodifikation (n = 2-4)

Ansatz	$E_{OM} (\%) \pm SD$		\approx Anzahl gebundener Ak pro Liposom	
	ch14.18	chΔC_{H2}	ch14.18	chΔC_{H2}
5 mol % / 40 °C	0,7 \pm 0,2	12,8 \pm 2,1	2	39
5 mol % / 50 °C	0,9 \pm 0,4	13,8 \pm 2,1	2	42
5 mol % / 55 °C	1,8 \pm 0,1	17,4 \pm 0,8	5	52
5 mol % / 60 °C	2,8 \pm 0,5	22,0 \pm 1,9	8	68
3,5 mol % / 60 °C	2,7 \pm 0,1	19,5 \pm 0,9	6	37
1,25 mol % / 60 °C	4,4 \pm 0,1	20,5 \pm 2,3	3	15

Beim Vergleich der E_{OM} verschiedener Insertionstemperaturen fällt auf, dass diese mit steigender Temperatur zunimmt. Auch die Anzahl pro Liposomen gebundener Ak erhöht sich. Bei Variation der eingesetzten Ankermenge steigt hingegen zwar die Anzahl gebundener Ak pro Liposomen, die E_{OM} allerdings sinkt (ch14.18) bzw. bleibt in etwa konstant (ch Δ C_{H2}).

Die höhere gebundene Antikörpermenge bei Verwendung des ch Δ C_{H2} könnte zum einen an der verbesserten Insertion des Ak/An-Konjugats aufgrund des kleineren Molekulargewichts (\approx 126 kDa) des Ak liegen. Zum anderen könnte auch eine effektivere Kopplung der F_c-modifizierten Ak mit dem Membrananker stattgefunden haben. Da aufgrund der geringen Größenunterschiede zwischen reinem An und Ak/An-Konjugat ($\Delta \approx$ 2,9 kDa) die Auftrennung mittels SDS-PAGE nicht möglich war, konnte abschließend allerdings keine Aussage über die Kopplungseffizienz der beiden Ak mit dem DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS getroffen werden.

Insgesamt bestätigten die Untersuchungen mittels SDS-PAGE die bereits durchflusszytometrisch identifizierten deutlichen Vorteile der Funktionalisierung von Liposomen mit ch Δ C_{H2} gegenüber ch14.18. Sowohl die E_{OM} mit > 20 % als auch die Anzahl der gebundenen Ak pro Liposomen (\approx 70) lagen bei ch Δ C_{H2}-funktionalisierten Liposomen deutlich höher als bei der Modifikation mit ch14.18.

4.7 Untersuchung der zellulären Aufnahme

In durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte bereits die verstärkte zelluläre Assoziation von anti-GD₂-Immunoliposomen gezeigt werden (vgl. 4.4.3). Der zytotoxische Effekt der Präparation könnte durch eine GD₂-rezeptorvermittelte Internalisierung der gebundenen As-Liposomen in die Zellen noch verstärkt werden.

Eine Methode, die Internalisierung von Liposomen durchflusszytometrisch zu untersuchen, ist die Inkubation der Zellen mit funktionalisierten Liposomen bei 37 °C und 4 °C. Da fast alle endozytotischen Aufnahmewege energieabhängige Prozesse sind und somit bei 4 °C nicht ablaufen können, kann unter diesen Bedingungen eine Aufnahme der Immunoliposomen ausgeschlossen werden (Kou et al. 2013). Das Ausmaß der Internalisierung kann somit aus der Differenz der zellulären Assoziation bei 37 °C und 4 °C ermittelt werden.

In Vorgängerarbeiten wurde über die beschriebene Methode eine Internalisierung von anti-GD₂-modifizierten ESM/Chol-Liposomen in Kelly-Zellen gezeigt (Müller 2013). In weiteren Arbeiten konnte dagegen mit diesen temperaturabhängigen Assoziationsuntersuchungen keine signifikanten Internalisierungsraten in Kelly- und SK-N-AS-Zellen gezeigt werden (Lewrick 2008). Auch Hanai et al. konnten keine Aufnahme von anti-GD₂-Immunoliposomen in GD₂-positive IMR-32 Zellen feststellen (Hanai et al. 2000). Bei Internalisierungsuntersuchungen von Alvarez-Rueda et al. wurde hingegen eine starke Anreicherung des GD₂-Ak im Zytoplasma von GD₂-positiven Zellen beschrieben (Alvarez-Rueda et al. 2007).

Aufgrund dieser abweichenden Literaturangaben wurden zur Klärung, ob eine Internalisierung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten anti-GD₂-Immunoliposomen in Zellen stattfindet, konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analog Kapitel 3.6.4 angefertigt.

Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28 zeigen die jeweiligen Aufnahmen von LS- und Kelly-Zellen. Die Bilder der linken Spalte zeigen die rote Fluoreszenz der Rh-DPPE markierten Liposomen. In der mittleren Spalte sind *overlays* der Rh-Fluoreszenz mit dem durch DAPI (blau) gefärbten Zellkern, in der rechten Spalte die *overlays* der beiden Fluoreszenzsignale mit dem Durchlichtbild gezeigt.

Alle anti-GD₂-modifizierten Liposomen waren im Zytoplasma von LS- wie auch von Kelly-Zellen zu finden (Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28 jeweils B und C). Bei unmodifizierten Liposomen zeigte sich hingegen keine Internalisierung (Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28 A). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich beim Mechanismus der Internalisierung um eine rezeptorvermittelte Endozytose handelt. Da GD₂ von der Zelloberfläche über Endozytose internalisiert wird (Tettamanti 2004) wird vermutet, dass die Aufnahme der Liposomen nach Bindung an den Rezeptor über den gleichen Weg erfolgt.

Die Ergebnisse sind mit bereits veröffentlichten Daten vergleichbar, bei denen ebenfalls eine Internalisierung von GD₂-modifizierten Nanopartikeln in Kelly-, SH-SY5Y und SK-N-AS-Zellen gezeigt wurde (Adrian et al. 2011, Di Paolo et al. 2011, Tivnan et al. 2012). Eine genaue Aussage über den endozytotischen Aufnahmemechanismus konnte durch Endozytoseinhibitorstudien allerdings nicht abschließend geklärt werden (Adrian et al. 2011).

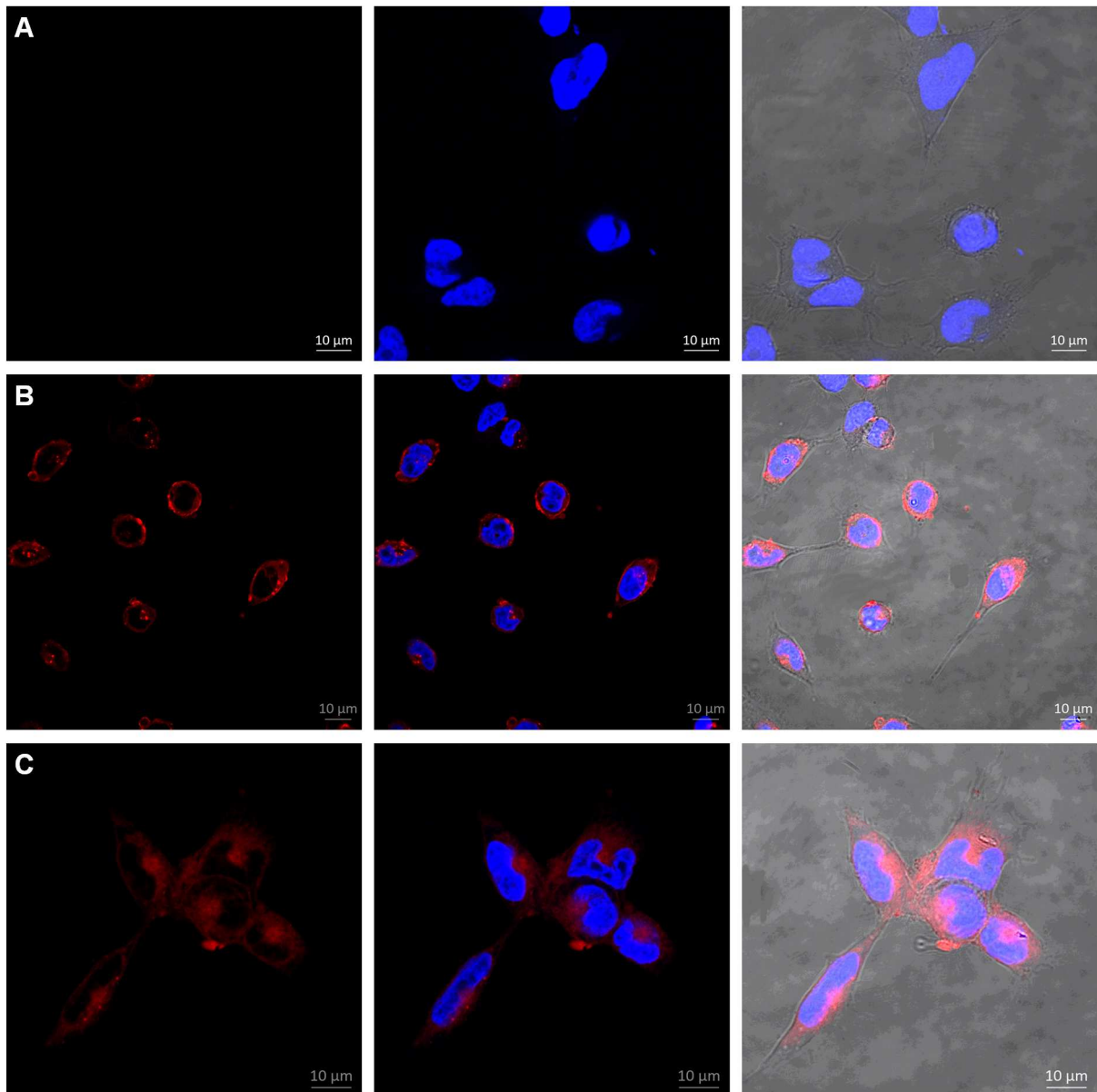


Abbildung 4-27: Aufnahmen anti-GD₂-funktionalisierter Liposomen in LS-Zellen

Konfokale fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen nach 2-stündiger Inkubation mit Rh-DPPE (0,5 mol %) markierten, unmodifizierten ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen **(A)**, ch Δ C_H2-modifizierten **(B)**, ch14.18-modifizierten Liposomen **(C)**. **Links:** Detektion der liposomalen Rh-DPPE Färbung; **Mitte:** *Overlay* von Rh-DPPE-Liposomen und Zellkern (DAPI-gefärbt blau); **Rechts** *Overlay* mit Durchlichtbild.

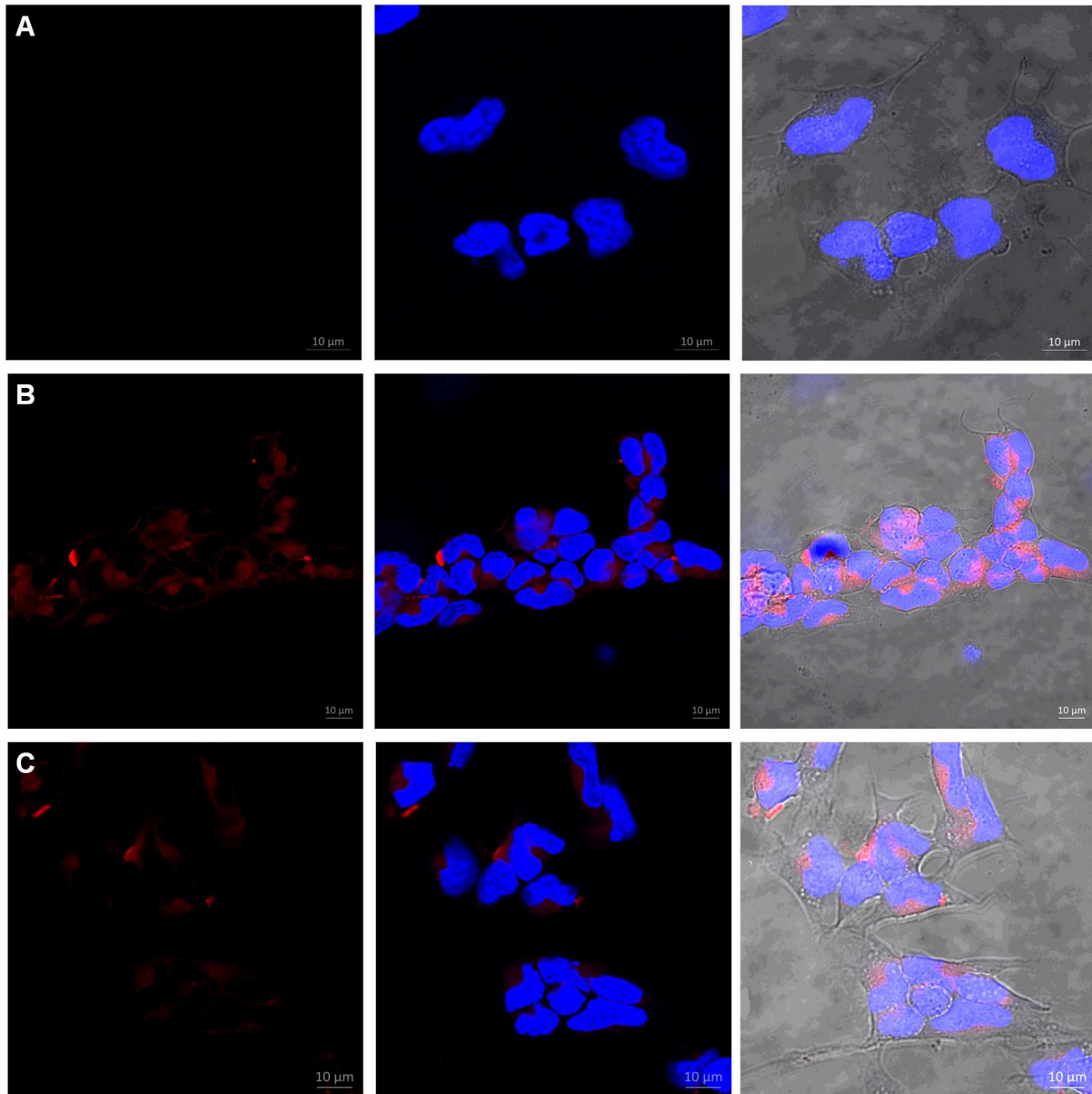


Abbildung 4-28: Aufnahmen anti-GD₂-funktionalisierter Liposomen in Kelly-Zellen

Konfokale fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen nach 2-stündiger Inkubation mit Rh-DPPE (0,5 mol %) markierten unmodifizierten ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen **(A)**, ch Δ CH₂-modifizierten **(B)**, ch14.18-modifizierten Liposomen **(C)**. **Links**: Detektion der liposomalen Rh-DPPE Färbung; **Mitte**: *Overlay* von Rh-DPPE-Liposomen und Zellkern (DAPI-gefärbt blau); **Rechts** *Overlay* mit Durchlichtbild.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dem therapeutischen Einsatz von Liposomen als *Drug Delivery System* sind einige technologische Herausforderungen verbunden. Zu diesen gehören vor allem das *Upscaling*, die Stabilität und die Sterilität der liposomalen Präparation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch Vorgängerarbeiten (Müller 2013, Züfle 2016) entwickelte liposomale Arsen-Formulierung mit Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz weiter optimiert. Die Basis für die As-Beladung bildete ein von Chen et al. publiziertes *remote loading* Verfahren mittels vorverkapseltem Ni(OAc)₂ (Chen et al. 2006).

Für das *Upscaling* der Herstellung Ni(OAc)₂-beladener Liposomen wurden die Druckextrusion sowie die Mikrofluidisierung umfangreich untersucht.

Die Druckextrusion bietet neben der Herstellung größerer Chargen auch die Möglichkeit der aseptischen Liposomenpräparation. Bei Verwendung der ursprünglich eingesetzten ESM/Chol-Lipidmischung (70/30 mol %) konnten aber weder mit der Druckextrusion noch mit der bis dato eingesetzten Handextrusion zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Vesikelgröße und -größenverteilung ($d_h > 170\text{nm}$ und $\text{PDI} > 0,2$) erzielt werden. In kryotransmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten die Liposomen eine starke Agglomeration/Aggregation mit kettenförmiger Zusammenlagerung.

In Vorgängerarbeiten wurde gezeigt, dass der Zusatz von DSPE-mPEG₂₀₀₀ in die Lipidmischung zu einer Stabilisierung der mittels Handextrusion hergestellten ESM/Chol-Liposomen führte (Züfle 2016). Im Folgenden wurde daher die Lipidmischung ESM/Chol/DSPE-mPEG (66,7/28,5/4,8 mol %) zur Druckextrusion eingesetzt. Neben einer sterischen Stabilisierung der liposomalen Dispersion während der Herstellung und Lagerung bietet die PEGylierung der Liposomen zusätzlich den Vorteil einer verlängerten Blutzirkulationshalbwertszeit *in vivo*. Aufgrund einer starken Druckbelastung der Polycarbonatmembran war die einsetzbare Lipidkonzentration bei der Druckextrusion auf 20 mM begrenzt.

Die PEGylierte Präparation zeigte im Vergleich zu reinen ESM/Chol-Liposomen trotz verminderter Anzahl Extrusionsschritte einen deutlich homogeneren Charakter mit enger Partikelgrößenverteilung und vorwiegend *large unilamellar vesicles* (LUV) ($d_h \approx 130\text{ nm}$; $\text{PDI} \approx 0,11$). Allerdings zeigt sich bei der PEGylierten-Formulierung vor allem nach der Durchführung der *dehydration/rehydration* und erneuter Extrusion eine vermehrte Bildung von mizellaren Strukturen. Dieses Phänomen wurde von Züfle bereits für handextrudierte Liposomen dieser Zusammensetzung beschrieben. Auch hier war die Bildung dieser Mizellen vorwiegend nach Lyophilisation der Liposomen aufgetreten (Züfle 2016).

Bei Untersuchungen der Ni/Lipid-Verhältnisse von druckextrudierten Liposomen als Maß der Beladung wies die PEGylierte Formulierung mit $\approx 0,4$ (mol/mol) einen im Vergleich zu nicht-PEGylierten Liposomen ($\approx 0,9$ mol/mol) deutlich niedrigeren Wert auf. Auch die ermittelten As/Lipid-Verhältnisse waren durch den Zusatz von DSPE-PEG₂₀₀₀ und das damit verbundene, kleinere intraliposomale Volumen verringert. Im Vergleich zu Literaturwerten lag das As/Lipid-Verhältnis der PEGylierten Formulierung aber auf einem akzeptablen Niveau.

Ein Vorteil der Lyophilisation ist, neben der Bereitstellung einer stabilen Lagerform, die Erhöhung des Ni/Lipid-Verhältnisses in ESM/Chol-Liposomen (Müller 2013). Bei der Herstellung von *dehydration-rehydration-vesicles* (DRV) aus PEGylierten Liposomen konnte dieser Effekt allerdings nicht gezeigt werden (Züfle 2016). Des Weiteren war eine aseptische Herstellung der Liposomen aufgrund des nach Lyophilisation notwendigen Hand-Extrusionsschritts im Wasserbad (70 °C) schwierig umzusetzen.

Aus oben genannten Gründen wurde daher auf die Lyophilisation verzichtet und die Mikrofluidisierung zur Liposomenherstellung höherer Lipidkonzentrationen getestet. Die Präparation im Microfluidizer® LV1 zeigte eine starke Abhängigkeit der Vesikelgröße vom Prozessdruck sowie von den durchgeführten Homogenisationszyklen. Bei hohen Drücken ($> 3\,000$ psi) konnten keine homogenen Liposomendispersionen hergestellt werden. Morphologische Untersuchungen zeigten viele mizellare Strukturen sowie Bilayerfragmente und nur wenige LUVs. Eine Reduktion des Drucks auf 3 000 psi ermöglichte die Herstellung von 60 und 100 mM Liposomendispersionen mit vorwiegend LUVs innerhalb von 8 Homogenisationszyklen. Der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser beider getesteter Konzentrationen lag bei ≈ 133 nm und wies eine enge Größenverteilung auf (PDI $< 0,13$).

Ein weiter wichtiger Aspekt der Herstellungsoptimierung war die Lagerstabilität der Ni(OAc)₂-Liposomen. Hierfür wurden verschiedene Lagerungsbedingungen getestet. Die Aufbewahrung im Kühlschrank (2-6 °C) führte, bedingt durch Agglomerations-/Aggregations- und Fusionsvorgänge, zu einem starken Anstieg der Polydispersitätsindices von mikrofluidisierten sowie druckextrudierten Ni(OAc)₂-Liposomen und eignete sich daher nicht für deren Langzeitlagerung.

In weiteren Stabilitätsstudien wurden deshalb die Vesikelgröße sowie die Morphologie der Liposomen während des Einfrierens untersucht. Als geeignete Methode erwies sich das Einfrieren und Lagern bei -80 °C unabhängig vom Zusatz des Kryoprotektors Glycerol (2,5 % V/V). Der durchschnittliche d_h der so behandelten Präparationen lag bei ≈ 140 nm, der PDI bei $< 0,12$.

Ein Einfrieren bei $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ führte durch die sich aufkonzentrierende Umgebung zu osmotischen Effekten und resultierte in einer bikonkaven Verformung der Liposomen. Bei schnellen Einfrierraten in flüssigem Stickstoff traten vermehrt Fusionsvorgänge auf. Im Gegensatz zum Einfriervorgang hatte die Geschwindigkeit des Auftauprozesses bei keiner der getesteten Präparationen einen Einfluss auf die resultierenden Vesikelgrößen.

Um die bei parenteraler Anwendung der Liposomen geforderte Sterilität der Präparation zu gewährleisten, wurde die Sterilisation im Endbehältnis durch Autoklavieren untersucht. Die resultierende Liposomengröße und Größenverteilung der Vesikel war allerdings nicht zufriedenstellend ($\text{PDI} > 0,2$). Vermutlich kam es während des Autoklavierens, bedingt durch das bei hoher Ionenstärke erniedrigte Zetapotential der Vesikel, zu Fusions- und Agglomerations-/Aggregationsvorgängen.

Als alternatives Verfahren wurde die Entkeimungsfiltration durch bakterienzurückhaltende Membranen (Porenweite $< 0,22\text{ }\mu\text{m}$) getestet. Bei Verwendung des Millex[®]-GV-Filters mit hydrophiler PVDF-Membran konnten gute Lipidwiederfindungsraten ($> 97\%$) und nur minimal reduzierte As/Lipid-Verhältnisse erzielt werden. Die Verwendung des Millex[®]-GS Filters mit Zellulosemischester-Membran eignete sich hingegen aufgrund starker Lipidadsorption und dem daraus resultierenden niedrigen As/Lipid-Verhältnis nach Filtration nicht.

Im ersten Abschnitt der Arbeit konnte die Eignung der Mikrofluidisierung zum *Upscaling* der Liposomenherstellung gezeigt werden. Des Weiteren wurde durch das Einfrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine stabile Lagerform für $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ -Liposomen gefunden. Die Sterilität der Präparation wurde durch eine abschließende Filtration durch bakterienzurückhaltende-PVDF-Membranen (Millex[®]-GV) gewährleistet.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der *in-vitro*-Untersuchung der optimierten liposomalen NiAs-Präparationen. Die mittels Resazurin-Reduktions-Assay durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigten eine im Vergleich zu freiem Arsen abgeschwächte Toxizität von liposomalem Arsen auf den Neuroblastomzelllinien Kelly- sowie LS. Das coverkapselte Nickel führte auch nach 72-stündiger Inkubation mit Kelly- sowie LS-Zellen zu keinen toxischen Effekten. Die höheren EC_{50} -Werte des liposomalen ATOs im Vergleich zu freiem Wirkstoff konnten mit einer verzögerten As-Freisetzung aus Liposomen erklärt werden. Die verzögerte Freisetzung führt zu einer abgeschwächten generellen ATO-Toxizität, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden können.

Die für eine effiziente Neuroblastomtherapie notwendige höhere Toxizität auf Krebszellen kann durch ein gezieltes Ansteuern dieser Zellen über anti-GD₂-funktionalisierte NiAs-Liposomen erreicht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die liposomale Oberflächenmodifikation mit drei verschiedenen anti-GD₂-Varianten (hu14.18, ch14.18 und ch Δ C_{H2}) *in vitro* an den Neuroblastommodellzelllinien Kelly und SK-N-AS untersucht.

Vergleichende Untersuchungen der Kopplungsprotokolle SPIT und PIT wurden durchgeführt. Hierfür wurden die Liposomen mit ch14.18-Ak nach dem jeweiligen Protokoll funktionalisiert und die zelluläre Assoziation der Immunliposomen an Kelly-Zellen durchflusszytometrisch getestet. Es zeigte sich eine bessere Zell-Bindung für SPIT-modifizierte Immunliposomen im Vergleich zu PIT-modifizierten. Eine Erhöhung der Insertionstemperatur bei der SPIT auf 40 °C (SPIT40) brachte keinen zusätzlichen Vorteil. Unter Berücksichtigung der limitierten Anwendbarkeit und Wirtschaftlichkeit SPIT-modifizierter Liposomen (eingeschränkte Lagerstabilität (Molnar et al. 2016) und Verkapselungsstabilität des Arsens (Müller 2013)), wurde jedoch in Folgeuntersuchungen die PIT als Methode der Wahl zur Funktionalisierung der Liposomen eingesetzt.

Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen der drei verschiedenen anti-GD₂-Varianten an Kelly- und SK-N-AS-Zellen wurde die höchste zelluläre Assoziation nach Funktionalisierung der Liposomen mit ch Δ C_{H2}-Ak gefunden. Die mittels SDS-PAGE durchgeführte Quantifizierung der pro Liposom gebundenen Ak-Menge bestätigte die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen. Bei Verwendung des ch Δ C_{H2} lagen die Werte mit 68 gebundenen Ak-Molekülen pro Liposom deutlich höher als beim Einsatz des ch14.18-Ak (8 Ak pro Liposom). Die erhöhte zelluläre Assoziation von ch Δ C_{H2}-funktionalisierten Liposomen konnte somit auf die höhere Menge liposomal gebundenen Ak zurückgeführt werden.

SK-N-AS-Zellen, die zuvor als Modellzelllinie eingesetzt wurden, wiesen im Vergleich zu Kelly-Zellen auch mit ch Δ C_{H2}-funktionalisierten Liposomen nur eine minimale zelluläre Assoziation auf. Die immunhistochemische Untersuchung der GD₂-Expression zeigte für SK-N-AS und die ebenfalls getestete Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y keine bzw. eine nur sehr geringe GD₂-Expression. Eine starke Expression konnte hingegen für Kelly- und LS-Zellen nachgewiesen werden.

Für die weitere Optimierung der Oberflächenmodifikation wurde die PIT-Insertionstemperatur (40, 50, 55 und 60 °C) und die zur Insertion eingesetzte Menge Ak/An-Konjugat (1,25, 3,5 und 5 mol %, bezogen auf die Menge Gesamtlipid) variiert. Die so hergestellten Systeme wurden mittels durchflusszytometrischer Untersuchung der zellulären Assoziation an Kelly-Zellen und durch Quantifizierung der liposomal gebundenen Antikörpermenge charakterisiert.

Es zeigte sich, dass eine Reduktion der Insertionstemperatur bei der Liposomen-Funktionalisierung via PIT mit einem starken Rückgang der zellulären Assoziation sowie der pro Liposom gebundenen Ak-Menge einherging.

Die höchste zelluläre Assoziation wurde für die Funktionalisierung mit 3,5 mol % Ak/An-Konjugat bei einer Insertionstemperatur von 60 °C beobachtet. Der Einsatz höherer Mengen Ak/An-Konjugat (5 mol %) führte zwar zu einer Steigerung der gebundenen Ak-Menge, die zelluläre Assoziation konnte allerdings im Vergleich zu Versuchen mit 3,5 mol % Konjugat nicht weiter erhöht werden. Es wurde vermutet, dass die niedrigere zelluläre Assoziation trotz höherer gebundener Ak-Menge in einer möglichen sterischen Hinderung der Ak-Antigen-Bindung gründet.

Abschließend wurde die Internalisierung von ch Δ C_H2- und ch14.18-Immunoliposomen in Kelly- sowie LS-Zellen konfokal-fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Es konnte eine Internalisierung der anti-GD₂-Immunoliposomen in beiden Zelllinien gezeigt werden. Unmodifizierte Liposomen waren hingegen nicht im Zytoplasma lokalisiert. Die Internalisierung der Vesikel konnte daher auf eine rezeptorvermittelte Endozytose zurückgeführt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die Herstellung sowie die Lagerung der Ni-beladenen ESM/Chol/DSPE-mPEG-Liposomen optimiert werden. Durch die Etablierung der SDS-PAGE konnte eine Methode zur Quantifizierung der liposomal gebundenen Ak-Menge entwickelt werden. Eine optimierte Funktionalisierung via PIT konnte bei der Verwendung des ch Δ C_H2-Ak, unter Einsatz von 3,5 mol % Ak/An-Konjugat und einer Insertionstemperatur von 60 °C gezeigt werden. Als ideale Modellzelllinien zur Testung der Oberflächenmodifikation erwiesen sich Kelly- und LS-Zellen, aufgrund ihrer hohen GD₂-Expression.

Mit Hinblick auf eine spätere *in-vivo*-Applikation sollte die Herstellung und Lagerung der NiAs-Liposomen weiter optimiert werden. Ein wichtiger Ansatz hierfür wäre die Untersuchung der Einfrierstabilität anwendungsbereiter anti-GD₂-oberflächenmodifizierter NiAs-Liposomen. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Einfrierstabilität der Ni(OAc)₂-Liposomen bei -80 °C sowie das bereits erfolgreich getestete Einfrieren von Ak/An-Konjugat (Jakoby 2014) sind dafür vielversprechend. Des Weiteren sollte in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss des Einfrier- und Auftauvorgangs auf die Verkapselungsstabilität von liposomal verkapseltem Nickel und Arsen untersucht werden.

Einen weiteren wichtigen Aspekt bildet die vergleichende Testung der *in-vitro*-Zytotoxizität von anti-GD₂-funktionalisierten und unmodifizierten NiAs-Liposomen auf Neuroblastomzellen. Aufgrund der Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Assoziation von GD₂-modifizierten Immunoliposomen eignet sich hierfür besonders die Anwendung des chΔC_{H2}-Ak.

Für weitere *in-vitro*-Zytotoxizitätsstudien empfiehlt sich die Etablierung eines Assays auf durchflusszytometrischer Basis, um unabhängig von der eingesetzten Zellzahl die toxische Auswirkung einer zellulären Bindung bzw. Internalisierung von As-beladenen Immunoliposomen zu zeigen. Die hier verwendeten adhärennten Zellen müssen vor der durchflusszytometrischen Vermessung von der Zellkulturplatte abgelöst werden. Dazu wird Trypsin/EDTA-Lösung verwendet, welche die Zellen durch eine enzymatische Reaktion von der Platte ablöst. Hierbei kann es zu Veränderungen der Plasmamembran kommen, weshalb auf ApoptoseAssays, die Veränderungen in der Plasmamembran detektieren (Permeabilitätserhöhung oder Aufhebung der PS-Asymmetrie), verzichtet werden muss. Besser eignen sich Caspase-Assays und Assays, welche Veränderungen in der Mitochondrienmembran (frühe Apoptose, z. B. Verlust des Membranpotentials oder Permeabilitätserhöhung) oder im Zellkern (späte Apoptose, z. B. DNA-Fragmentierung oder Chromatinkondensation) detektieren.

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Neuroblastomtherapie mit Immunoliposomen wäre das kombinierte Ansteuern mehrerer Tumoroberflächenantigene. Hierfür würde sich neben dem Oberflächenantigen GD₂ das integrale Membranprotein CD276 (B7-H3) eignen. In unterschiedlichen Publikationen konnte eine Überexpression dieses Markers auf verschiedenen Tumoren, wie Neoplasien in Brust, Darm und Lunge aber auch auf Glioblastomen und Neuroblastomzellen, gezeigt werden (Bottino et al. 2014, Kraan et al. 2014, Picarda et al. 2016)

Zudem ist aufgrund vieler Interaktionsmöglichkeiten von Immunoliposomen mit Plasmabestandteilen und Blutzellen nach parenteraler Applikation eine abschließende Untersuchung der Effektivität und Spezifität von chΔC_{H2}-Immunoliposomen in einem *in-vivo*-Neuroblastommodell unumgänglich.

6 Literaturverzeichnis

Abraham S.A., Edwards K., Karlsson G., MacIntosh S., Mayer L.D., McKenzie C., Bally M.B.; *Formation of transition metal-doxorubicin complexes inside liposomes*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1565, 41-54 (2002).

Abra R.M., Hunt A.C.; *Liposome disposition in vivo*; *Biochim. Biophys. Acta*; 666, 493–503 (1981).

Acosta S., Lavarino C., Paris R., Garcia I., de Torres C., Rodriguez E., Beleta H., Mora J.; *Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells*; *BMC Dev. Biol.*; 9, 1–14 (2009).

Adrian J.E., Wolf A., Steinbach A., Rössler J., Süss R.; *Targeted delivery to neuroblastoma of novel siRNA-anti-GD2-liposomes prepared by dual asymmetric centrifugation and sterol-based post-insertion method*; *Pharm. Res.*; 28, 2261–2272 (2011).

Ahl P.L., Bhatia S. K., Meers P, Roberts P., Stevens, R.: Dause, R., Perkins W.R., Janoff A.S.; *Enhancement of the in vivo circulation lifetime of L- α -distearoylphosphatidylcholine liposomes: importance of liposomal aggregation versus complement opsonization*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1329, 370–382 (1997).

Ahn R.W., Chen F., Chen H., Stern S.T., Clogston J.D., Patri A.K., Raja M.R., Swindell E.P., Parimi V., Cryns V.L., O'Halloran T.V.; *A novel nanoparticulate formulation of arsenic trioxide with enhanced therapeutic efficacy in a murine model of breast cancer*; *Clin. Cancer Res.*; 16, 3607–3617 (2010).

Akao Y., Nakagawa Y., Akiyama K.; *Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro*; *FEBS Lett.*; 455, 59–62 (1999).

Allen T.M., Chonn A.; *Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system*; *FEBS Lett.*; 223, 42–46 (1987).

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

Allen T.M., Brandeis E., Hansen C.B., Kao G.Y., Zalipsky S.; *A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1237, 99–108 (1995).

Allen T.M.; *Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy*; *Nat. Rev. Cancer*; 2, 750–763 (2002).

Allen T.M., Cullis P.R.; *Drug delivery systems: entering the mainstream*; Science; 303, 1818–1822 (2004).

Almgren M., Edwards K., Karlsson G.; *Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures*; Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.; 174, 3–21 (2000).

Alvarez-Rueda N., Leprieur S., Clemenceau B., Supiot S., Sebille-Rivain V., Faivre-Chauvet A., Davodeau F., Paris F., Barbet J., Aubry J., Birkle S.; *Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen*; Clin. Cancer Res.; 13, 5613–5620 (2007).

Angelova M.I., Dimitrov D.S.; *Liposome electroformation*; Faraday Discuss. Chem. Soc.; 81, 303–311 (1986).

ASHP; *Guidelines on compounding sterile preparations* (2013).

Bachmann D., Brandl M., Gregoriadis G.; *Preparation of liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer*; Int. J. Pharm.; 91, 69–74 (1993).

Bagatell R., Cohn S.L.; *Genetic discoveries and treatment advances in neuroblastoma*; Curr. Opin. Pediatr.; 28, 19–25 (2016).

Bangham A.D., Horne R.W.; *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*; J. Mol. Biol.; 8, 660–668 (1964).

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C.; *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*; J. Mol. Biol.; 13, 238–252 (1965).

Barenholz Y., Lasic D.D.; *Handbook of nonmedical applications of liposomes*; 3. Aufl., CRC Press, New York (1996).

Barenholz Y., Thompson T.E.; *Sphingomyelin: biophysical aspects*; Chem. Phys. Lipids; 102, 29–34 (1999).

Barenholz Y.; *Doxil - the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*; J. Control. Release; 160, 117–134 (2012).

Barker E., Mueller B.M., Handgretinger R., Herter M.; *Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of neuroblastoma*; Cancer Res., 144–149 (1991).

Barnadas-Rodríguez R., Sabés M.; *Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer*; Int. J. Pharm.; 213, 175–186 (2001).

- Bartlett G.R.;** *Phosphorus assay in column chromatography*; J. Biol. Chem.; 234, 466–468 (1959).
- Batzri S.,** Korn E.D.; *Single bilayer liposomes prepared without sonication*; Biochim. Biophys. Acta; 298, 1015–1019 (1973).
- Bauer K.H.,** Frömring K.-H., Führer C.; *Pharmazeutische Technologie - Mit Einführung in die Biopharmazie*; 9. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2012).
- Bazzoni G.,** Dejana E.; *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*; Physiol. Rev.; 84, 869–901 (2004).
- Beaty R.D.,** Kerber J.D.; *Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry*; 2. Aufl., Perkin-Elmer Corporation, Norwalk (1993).
- Beauchamp E.M.,** Ringer L., Bulut G., Sajwan K.P., Hall M.D., Lee Y.-C., Peaceman D., Ozdemirli M., Rodriguez O., Macdonald T.J., Albanese C., Toretsky J.A., Uren A.; *Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway*; J. Clin. Invest.; 121, 148–160 (2011).
- Bellare J.R.,** Davis H.T., Scriven L.E., Talmon Y.; *Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique*; J. Electron. Microsc. Tech.; 10, 87–111 (1988).
- Belsito S.,** Bartucci R., Montesano G., Marsh D., Sportelli L.; *Molecular and mesoscopic properties of hydrophilic polymer-grafted phospholipids mixed with phosphatidylcholine in aqueous dispersion: interaction of dipalmitoyl N-poly(ethylene glycol)phosphatidylethanolamine with dipalmitoylphosphatidylcholine studied by spectrophotometry and spin-label electron spin resonance*; Biophys. J.; 78, 1420–1430 (2000).
- Bendas G.;** *Immunoliposomes - a promising approach to targeting cancer therapy*; BioDrugs; 15, 215–224 (2001).
- Blume G.,** Cevc G.; *Liposomes for the sustained drug release in vivo*; Biochim. Biophys. Acta; 1029, 91–97 (1990).
- Bonté F.,** Juliano R.L.; *Interactions of liposomes with serum proteins*; Chem. Phys. Lipids; 40, 359–372 (1986).
- Bottino C.,** Dondero A., Bellora F., Moretta L., Locatelli F., Pistoia V., Moretta A., Castriconi R.; *Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches*; Front. Immunol.; 5, 56 (2014).
- Bozzuto G.,** Molinari A.; *Liposomes as nanomedical devices*; Int. J. Nanomedicine; 10, 975–999 (2015).

Brandl M., Bachmann D., Drechsler M., Bauer K.H.; *Liposome preparation by a new high pressure homogenizer Gaulin Micron Lab 40*; Drug Dev. Ind. Pharm.; 16, 2167–2191 (1990).

Brandl M., Drechsler M., Bachmann D., Tardi C., Schmidtgen M., Bauer K.-H.; *Preparation and characterization of semi-solid phospholipid dispersions and dilutions thereof*; Int. J. Pharm.; 170, 187–199 (1998).

Brandl M., Massing U.; *Vesicular phospholipid gels*; In: Gregoriadis G. eds. *Liposomes Technology Volume I: Liposome preparation and related techniques*; 3. Aufl., Informa Healthcare, New York, 241–260 (2007).

Brignole C., Marimpietri D., Gambini C., Allen T.M., Ponzoni M., Pastorino F.; *Development of Fab' fragments of anti-GD2 immunoliposomes entrapping doxorubicin for experimental therapy of human neuroblastoma*; Cancer Lett.; 197, 199–204 (2003a).

Brignole C., Pagnan G., Marimpietri D., Cosimo E., Allen T.M., Ponzoni M., Pastorino F.; *Targeted delivery system for antisense oligonucleotides: a novel experimental strategy for neuroblastoma treatment*; Cancer Lett.; 197, 231–235 (2003b).

Brignole C., Pastorino F., Marimpietri D., Pagnan G., Pistorio A., Allen T.M., Pistoia V., Ponzoni M.; *Immune cell-mediated antitumor activities of GD2-targeted liposomal c-myc antisense oligonucleotides containing CpG motifs*; J. Natl. Cancer Inst.; 96, 1171–1180 (2004).

Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N.L., Castel V., Castelberry R.P., De Bernardi B., Evans A.E., Favrot M., Hedborg F.; *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*; J. Clin. Oncol.; 11, 1466–1477 (1993).

Brodeur G.M.; *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*; Nat. Rev. Cancer; 3, 203–216 (2003).

Brown B.S., Patanam T., Mobli K., Celia C., Zage P.E., Bean A.J., Tasciotti E.; *Etoposide-loaded immunoliposomes as active targeting agents for GD2-positive malignancies*; Cancer Biol. Ther.; 15, 851–861 (2014).

Brunner J., Skrabal P., Hauser H.; *Single bilayer vesicles prepared without sonication physico-chemical properties*; Biochim. Biophys. Acta; 455, 322–331 (1976).

Chan H.S., Haddad G., Thorner P.S., DeBoer G., Lin Y.P., Ondrusek N., Yeger H., Ling V.; *P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma*; N. Engl. J. Med.; 325, 1608–1614 (1991).

- Chapman D.**; *Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes*; Q. Rev. Biophys.; 8, 185–235 (1975).
- Cheng W.W.**, Allen T.M.; *Targeted delivery of anti-CD19 liposomal doxorubicin in B-cell lymphoma: a comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv*; J. Control. Release; 126, 50–58 (2008).
- Cheng W.W.**, Allen T.M.; *The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: an update on immunoliposomal drugs for cancer treatment*; Expert Opin. Drug Deliv.; 7, 461–478 (2010).
- Chen H.**, Pazicni S., Krett N.L., Ahn R.W., Penner-Hahn J.E., Rosen S.T., O'Halloran T.V.; *Coencapsulation of arsenic- and platinum-based drugs for targeted cancer treatment*; Angew. Chem. Int. Ed. Engl.; 48, 9295–9299 (2009a).
- Chen H.**, Ahn R., Van den Bossche, J., Thompson D.H., O'Halloran T.V.; *Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide*; Mol. Cancer Ther.; 8, 1955–1963 (2009b).
- Chen H.**, MacDonald R.C., Li S., Krett N.L., Rosen S.T., O'Halloran T.V.; *Lipid encapsulation of arsenic trioxide attenuates cytotoxicity and allows for controlled anticancer drug release*; J. Am. Chem. Soc.; 128, 13348–13349 (2006).
- Chen Y.**, Takita J., Choi Y.L., Kato M., Ohira M., Sanada M., Wang L., Soda M., Kikuchi A., Igarashi T., Nakagawara A., Hayashi Y., Mano H., Ogawa S.; *Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma*; Nature; 455, 971–974 (2008).
- Cheresh D.A.**, Pierschbacher M.D., Herzig M.A., Mujoo K.; *Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins*; J. Cell Biol.; 102, 688–696 (1986).
- Cheung N.-K.V.**, Kushner B.H., Cheung I.Y., Kramer K., Canete A., Gerald W., Bonilla M.A., Finn R., Yeh S.J., Larson S.M.; *Anti-GD2 antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age*; J. Clin. Oncol.; 16, 3053–3060 (1998).
- Cheung N.-K.V.**, Kushner B.H., LaQuaglia M., Kramer K., Gollamudi S., Heller G., Gerald W., Yeh S., Finn R., Larson S.M., Wuest D., Byrnes M., Dantis E., Mora J., Cheung I.Y., Rosenfield N., Abramson S., O'Reilly R.J.; *N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age*; Med. Pediatr. Oncol.; 36, 227–230 (2001).
- Cheung W.M.W.**, Chu P.W.K., Kwong Y.L.; *Effects of arsenic trioxide on the cellular proliferation, apoptosis and differentiation of human neuroblastoma cells*; Cancer Lett.; 246, 122–128 (2007).

Chonn A., Cullis P.R.; *Recent advances in liposomal drug-delivery systems*; Curr. Opin. Biotechnol.; 6, 698–708 (1995).

Clerc S., Barenholz Y.; *Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients*; Biochim. Biophys. Acta; 1240, 257–265 (1995).

Cossu I., Bottoni G., Loi M., Emionite L., Bartolini A., Di Paolo D., Brignole C., Piaggio F., Perri P., Sacchi A., Curnis F., Gagliani M.C., Bruno S., Marini C., Gori A., Longhi R., Murgia D., Sementa A.R., Cilli M., Tacchetti C., Corti A., Sambuceti G., Marchiò S., Ponzoni M., Pastorino F.; *Neuroblastoma-targeted nanocarriers improve drug delivery and penetration, delay tumor growth and abrogate metastatic diffusion*; Biomaterials; 68, 89–99 (2015).

Craddock J.A., Lu A., Bear A., Pule M., Brenner M.K., Rooney C.M., Foster A.E.; *Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b*; J. Immunother.; 33, 780–788 (2010).

Crommelin D.J.A.; *Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes*; J. Pharm. Sci.; 73, 1559–1563 (1984).

Crommelin D.J.A., Fransen G.J., Salemink P.J.M.; *Stability of liposomes on storage*; In: Gregoriadis G., Senior J., Poste G. eds. Targeting in drugs with synthetic systems; 1. Aufl., Plenum Press, New York, 277–287 (1986).

Crowe J.H., Oliver A.E., Hoekstra F.A., Crowe L.M.; *Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification*; Cryobiology; 35, 20–30 (1997).

Cullis P.R., Mayer L.D., Bally M.B., Madden T.D., Hope M.J.; *Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications*; Adv. Drug Deliv. Rev.; 3, 267–282 (1989).

Deamer D.W.; *From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010*; FASEB J.; 24, 1308–1310 (2010).

Derjaguin B., Landau L.; *Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes*; Prog. Surf. Sci.; 43, 30–59 (1993).

Derksen J., Morselt H., Scherphof G.L.; *Uptake and processing of immunoglobulin-coated liposomes by subpopulations of rat liver macrophages*; Biochim. Biophys. Acta; 971, 127–136 (1988).

Di Paolo D., Brignole C., Pastorino F., Carosio R., Zorzoli A., Rossi M., Loi M., Pagnan G., Emionite L., Cilli M., Bruno S., Chiarle R., Allen T.M., Ponzoni M., Perri P.; *Neuroblastoma-targeted nanoparticles entrapping siRNA specifically knockdown ALK*; Mol. Ther.; 19, 1131–1140 (2011).

Di Paolo D., Pastorino F., Zuccari G., Caffa I., Loi M., Marimpietri D., Brignole C., Perri P., Cilli M., Nico B., Ribatti D., Pistoia V., Ponzoni M., Pagnan G.; *Enhanced anti-tumor and anti-angiogenic efficacy of a novel liposomal fenretinide on human neuroblastoma*; J. Control. Release; 170, 445–451 (2013).

DiaSys; *Cholesterol FS - user manual* (2015).

Dilda P.J., Hogg P.J.; *Arsenical-based cancer drugs*; Cancer Treat. Rev.; 33, 542–564 (2007).

Douer D., Tallman M.S.; *Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies*; J. Clin. Oncol.; 23, 2396–2410 (2005).

Esser R., Muller T., Stefes D., Kloess S., Seidel D., Gillies S.D., Aperlo-Iffland C., Huston J.S., Uherek C., Schonfeld K., Tonn T., Huebener N., Lode H.N., Koehl U., Wels W.S.; *NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin*; J. Cell. Mol. Med.; 16, 569–581 (2012).

Evens A.M., Tallman M.S., Gartenhaus R.B.; *The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future*; Leuk. Res.; 28, 891–900 (2004).

Fachinformation; *Trisenox 1 mg/ml, TEVA B.V.* (2016).

Fang J., Nakamura H., Maeda H.; *The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*; Adv. Drug Deliv. Rev.; 63, 136–151 (2011).

Fenske D.B., Cullis P.R.; *Encapsulation of drugs within liposomes by pH-gradient techniques*; In: Gregoriadis G. eds. Liposomes Technology Volume II: Entrapment of drugs and other materials into liposomes; 2. Aufl., Informa Healthcare, New York (2007).

Fisher J.P.H., Flutter B., Wesemann F., Frosch J., Rossig C., Gustafsson K., Anderson J.; *Effective combination treatment of GD2-expressing neuroblastoma and Ewing's sarcoma using anti-GD2 ch14.18/CHO antibody with V γ 9V δ 2+ γ δ T cells*; Oncoimmunology; 5, 1–9 (2016).

Fiske C.H., Subbarow Y.; *The colorimetric determination of phosphorus*; J. Biol. Chem.; 66, 375–400 (1925).

Fransen G.J., Salemink P., Crommelin D.; *Critical parameters in freezing of liposomes*; Int. J. Pharm.; 33, 27–35 (1986).

Gabizon A., Papahadjopoulos D.; *Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 85, 1091–6490 (1988).

Gabizon A., Shiota R., Papahadjopoulos D.; *Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times*; J. Natl. Cancer Inst.; 81, 1484–1488 (1989).

Gabizon A.; *Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes*; Cancer Res.; 52, 891–896 (1992).

Gantert M., Lewrick F., Adrian J.E., Rössler J., Steenpass T., Schubert R., Peschka-Süss R.; *Receptor-specific targeting with liposomes in vitro based on sterol-PEG(1300) anchors*; Pharm. Res.; 26, 529–538 (2009).

Garbuzenko O., Barenholz Y., Prieve A.; *Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer*; Chem. Phys. Lipids; 135, 117–129 (2005).

GE Healthcare; *Gel filtration - principles and methods* (2010).

Goldbach P., Brochart H., Wehrle P., Stamm A.; *Sterile filtration of liposomes: retention of encapsulated carboxyfluorescein*; Int. J. Pharm.; 117, 225–230 (1995).

Grapentin C., Barnert S., Schubert R.; *Monitoring the stability of perfluorocarbon nanoemulsions by Cryo-TEM image analysis and dynamic light scattering*; PLoS ONE; 10, 1–12 (2015).

Grapentin C.; *Development and in vitro as well as in vivo characterization of perfluorocarbon nanoemulsions for passive or site-specific targeting applications in ¹⁹F magnetic resonance imaging*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2016).

Gregoriadis G., Leathwood P.D., Ryman B.E.; *Enzyme entrapment in liposomes*; FEBS Lett.; 14, 95–99 (1971).

Gregoriadis G., Ryman B.E.; *Fate of protein-containing liposomes injected into rats*; Eur. J. Biochem.; 24, 485–491 (1972a).

Gregoriadis G., Ryman B.E.; *Lysosomal localization of β -fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats*; Biochem. J.; 129, 123–133 (1972b).

Gregoriadis G., Senior J.; *The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation*; FEBS Lett.; 119, 43–46 (1980).

- Gregoriadis G.**, da Silva H., Florence A.T.; *A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVs)*; *Int. J. Pharm.*; 65, 235–242 (1990).
- Hanai N.**, Nakamura K., Shitara K.; *Recombinant antibodies against ganglioside expressed on tumor cells*; *Cancer Chemother. Pharmacol.*; 46, 13–17 (2000).
- Handgretinger R.**, Anderson K., Lang P., Dopfer R., Klingebiel T., Schrappe M., Reuland P., Gillies S.D., Reisfeld R.A., Neithammer D.; *A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma*; *Eur. J. Cancer*; 31A, 261–267 (1995).
- Hansen C.B.**, Kao G.Y., Moase E.H., Zalipsky S., Allen T.M.; *Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1239, 133–144 (1995).
- Hantel C.**, Lewrick F., Schneider S., Zwermann O., Perren A., Reincke M., Süss R., Beuschlein F.; *Anti insulin-like growth factor I receptor immunoliposomes: a single formulation combining two anticancer treatments with enhanced therapeutic efficiency*; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 95, 943–952 (2010).
- Hassan P.A.**, Rana S., Verma G.; *Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering*; *Langmuir*; 31, 3–12 (2015).
- Hermanson G.T.**; *Bioconjugate Techniques*; 3. Aufl., Elsevier, Amsterdam (2013).
- Hettmer S.**, Ladisch S., Kaucic K.; *Low complex ganglioside expression characterizes human neuroblastoma cell lines*; *Cancer Lett.*; 225, 141–149 (2005).
- Hirnlé P.**, Schubert R.; *Liposomes containing blue dye for preoperative lymph node staining: distribution and stability in dogs after endolymphatic injection*; *Int. J. Pharm.*; 72, 259–269 (1991).
- Höchst B.**, Diehl L.; *Antigen shedding into the circulation contributes to tumor immune escape*; *Oncoimmunology*; 1, 1620–1622 (2012).
- Holzer M.**; *Proteinvermittelter Lipidtransfer zwischen Liposomen zur Herstellung asymmetrischer Modellmembranen und die Rolle der Membranlipide bei der Organisation des T-Zellrezeptors*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2009).
- Holzer M.**, Burghardt A., Schubert R.; *Quantitative high-performance thin-layer chromatography determination of common liposome components and critical parameters influencing the analysis results*; *J. Liposome Res.*; 20, 124–133 (2010).

Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R.; *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*; *Biochim. Biophys. Acta*; 812, 55–65 (1985).

Huang A., Kennel S.J., Huang L.; *Interactions of immunoliposomes with target cells*; *J. Biol. Chem.*; 258, 14034–14040 (1983).

Huang S.K., Mayhew E., Gilani S., Lasic D.D., Martin F.J., Papahadjopoulos D.; *Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma*; *Cancer Res.*; 52, 6774–6781 (1992).

Hunter D.G., Frisken B.J.; *Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles*; *Biophys. J.*; 74, 2996–3002 (1998).

Iden D.L., Allen T.M.; *In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1513, 207–216 (2001).

Ishida T., Iden D.L., Allen T.M.; *A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs*; *FEBS Lett.*; 460, 129–133 (1999).

Israelachvili J.N., Mitchell D., Ninham B.W.; *Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles*; *Biochim. Biophys. Acta*; 470, 185–201 (1977).

Jain R.K.; *Transport of molecules across tumor vasculature*; *Cancer Metast. Rev.*; 6, 559–593 (1987).

Jakoby J.; *Aktives liposomales Targeting IGF1-exprimierender Tumoren*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2014).

Jakoby J., Beuschlein F., Mentz S., Hantel C., Süss R.; *Liposomal doxorubicin for active targeting: surface modification of the nanocarrier evaluated in vitro and in vivo: challenges and prospects*; *Oncotarget*; 6, 43698–43711 (2015).

Johnsson M., Edwards K.; *Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids*; *Biophys. J.*; 85, 3839–3847 (2003).

Juliano R.L., Stamp D.; *The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 63, 651–658 (1975).

- Juliano R.L.**, Stamp D.; *Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs: studies with vinblastine, actinomycin D, cytosine arabinoside, and daunomycin*; *Biochem. Pharmacol.*; 27, 21–27 (1978).
- Kallinteri P.**, Fatouros D., Klepetsanis P., Antimisiaris S.G.; *Arsenic trioxide liposomes: encapsulation efficiency and in vitro stability*; *J. Liposome Res.*; 14, 27–38 (2004).
- Kapahi P.**, Takahashi T., Natoli G., Adams S.R., Chen Y., Tsien R.Y., Karin M.; *Inhibition of NF- κ B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I κ B kinase*; *J. Biol. Chem.*; 275, 36062–36066 (2000).
- Karlsson J.**, Øra I., Pörn-Ares I.; *Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of bax and does not require p53*; *Clin. Cancer Res.*; 10, 3179–3188 (2004).
- Karlsson J.**, Edsjo A., Pahlman S.; *Multidrug-resistant neuroblastoma cells are responsive to arsenic trioxide at both normoxia and hypoxia*; *Mol. Cancer Ther.*; 4, 1128–1135 (2005).
- Karlsson J.**, Pietras A., Beckman S., Pettersson H.M., Larsson C.; *Arsenic trioxide-induced neuroblastoma cell death is accompanied by proteolytic activation of nuclear Bax*; *Oncogene*, 6150–6159 (2007).
- Kenworthy A.K.**, Hristova K., Needham D., McIntosh T. J.; *Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylen glycol)*; *Biophys. J.*; 68, 1921–1936 (1995).
- Kikuchi H.**, Carlsson A., Yachi K., Hirota S.; *Possibility of heat sterilization of liposomes*; *Chem. Pharm. Bull.*; 39, 1018–1022 (1991).
- Kirby C.**, Gregoriadis G.; *Dehydration-rehydration vesicles - a simple method for high yield drug entrapment in liposomes*; *Nat. Biotechnol.*; 2, 979–984 (1984).
- Kirpotin D.B.**, Drummond D.C., Shao Y., Shalaby M.R., Hong K., Nielsen U.B., Marks J.D., Benz C.C., Park J.W.; *Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models*; *Cancer Res.*; 66, 6732–6740 (2006).
- Klibanov A.L.**, Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L.; *Amphiphilic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes*; *FEBS Lett.*; 268, 235–237 (1990).

Klibanov A.L., Maruyama K., Beckerleg A.M., Torchilin V.P., Leaf H.; *Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1062, 142–148 (1991).

Kou L., Sun J., Zhai Y., He Z.; *The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: implication for rational design*; *Asian J. Pharm. Sci.*; 8, 1–10 (2013).

Kraan J., van den Broek P., Verhoef C., Grunhagen D.J., Taal W., Gratama J.W., Sleijfer S.; *Endothelial CD276 (B7-H3) expression is increased in human malignancies and distinguishes between normal and tumour-derived circulating endothelial cells*; *Br. J. Cancer*; 111, 149–156 (2014).

Kuhn S.M.; *Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Immunliposomen*; Diplomarbeit Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2015).

Lajunen T., Hisazumi K., Kanazawa T., Okada H., Seta Y., Yliperttula M., Urtti A., Takashima Y.; *Topical drug delivery to retinal pigment epithelium with microfluidizer produced small liposomes*; *Eur. J. Pharm. Sci.*; 62, 23–32 (2014).

Lasic D.D., Martin F.J., Gabizon A., Huang S.K., Papahadjopoulos D.; *Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1070, 187–192 (1991).

Lasic D.D.; *Application of liposomes in pharmacology and medicine*; In: Lasic D.D. eds. *Liposomes - from physics to applications*; 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam, 261–471 (1993a).

Lasic D.D.; *General introduction to liposomes*; In: Lasic D.D. eds. *Liposomes - from physics to applications*; 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam, 1–171 (1993b).

Lasic D.D.; *Other applications of liposomes*; In: Lasic D.D. eds. *Liposomes - from physics to applications*; 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam, 473–546 (1993c).

Lewrick F.; *Aktives liposomales Targeting endokriner Tumore*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2008).

Lichtenberg D., Barenholz Y.; *Liposomes: preparation, characterization and preservation*; In: Glick D, eds. *Methods of biochemical analysis*; 33. Aufl., John Wiley & Sons, New York, 337–461 (1988).

Liu J.-X., Zhou G.-B., Chen S.-J., Chen Z.; *Arsenic compounds: revived ancient remedies in the fight against human malignancies*; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; 16, 92–98 (2012).

- Liu L.**, Li Y., Xiong X., Qi K., Zhang C., Fang J., Guo H.; *Low dose of arsenic trioxide inhibits multidrug resistant-related P-glycoprotein expression in human neuroblastoma cell line*; *Int. J. Oncol.*; 49, 2319–2330 (2016).
- Loi M.**, Becherini P., Emionite L., Giacomini A., Cossu I., Destefanis E., Brignole C., Di Paolo D., Piaggio F., Perri P., Cilli M., Pastorino F., Ponzoni M.; *sTRAIL coupled to liposomes improves its pharmacokinetic profile and overcomes neuroblastoma tumour resistance in combination with Bortezomib*; *J. Control. Release*; 192, 157–166 (2014).
- Lopez-Sanchez N.**, Frade J.M.; *Genetic evidence for p75NTR-dependent tetraploidy in cortical projection neurons from adult mice*; *J. Neurosci.*; 33, 7488–7500 (2013).
- Luksch R.**, Castellani M.R., Collini P., Bernardi B. de, Conte M., Gambini C., Gandola L., Garaventa A., Biondi D., Podda M., Sementa A.R., Gatta G., Tonini G.P.; *Neuroblastoma (peripheral neuroblastic tumours)*; *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*; 107, 163–181 (2016).
- Lu T.-H.**, Tseng T.-J., Su C.-C., Tang F.-C., Yen C.-C., Liu Y.-Y., Yang C.-Y., Wu C.-C., Chen K.-L., Hung D.-Z., Chen Y.-W.; *Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways*; *Toxicol. Lett.*; 224, 130–140 (2014).
- Madden T.D.**, Harrigan P., Tai L.C., Bally M.B., Mayer L.D., Redelmeier T.E., Loughrey H.C., Tilcock C.P., Reinish L.W., Cullis P.R.; *The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey*; *Chem. Phys. Lipids*; 53, 37–46 (1990).
- Maeda H.**; *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*; *Adv. Enzyme Regul.*; 41, 189–207 (2001).
- Maeda H.**; *Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting*; *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*; 88, 53–71 (2012).
- Malvern**; *Zetasizer nano series user manual* (2008).
- Mannock D.A.**, McIntosh T.J., Jiang X., Covey D.F., McElhaney R.N.; *Effects of natural and enantiomeric cholesterol on the thermotropic phase behavior and structure of egg sphingomyelin bilayer membranes*; *Biophys. J.*; 84, 1038–1046 (2003).
- Maris J.M.**, Hogarty M.D., Bagatell R., Cohn S.L.; *Neuroblastoma*; *Lancet*; 369, 2106–2120 (2007).
- Marsh D.**; *Handbook of lipid bilayers*; 2. Aufl., CRC Press, Hoboken (2013).

Maruyama K., Yuda T., Okamoto A., Kojima S., Suginaka A., Iwatsuru M.; *Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol)*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1128, 44–49 (1992).

Maruyama K., Okuizumi S., Yamauchi h., Kikuchi H., Iwatsuru M.; *Phosphatidyl polyglycerols prolong liposome circulation in vivo*; *Int. J. Pharm.*; 111, 103–107 (1994).

Maruyama K., Takahashi N., Tagawa T., Nagaike K., Iwatsuru M.; *Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo*; *FEBS Lett.*; 413, 177–180 (1997).

Massing U., Cicko S., Ziroli V.; *Dual asymmetric centrifugation (DAC) - a new technique for liposome preparation*; *J. Control. Release*; 125, 16–24 (2008).

Matsumura Y., Maeda H.; *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*; *Cancer Res.*; 46, 6387–6392 (1986).

Matthay K.K., Villablanca J.G., Seeger R.C., Stram D.O., Harris R.E., Ramsay N.K., Swift P., Shimada H., Black C.T., Brodeur G.M., Gerbing R.B., Reynolds C.P.; *Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group*; *N. Engl. J. Med.*; 341, 1165–1173 (1999).

Matthay K.K., George R.E., Yu A.L.; *Promising therapeutic targets in neuroblastoma*; *Clin. Cancer Res.*; 18, 2740–2753 (2012).

Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R., Janoff A.S.; *Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles*; *Biochim. Biophys. Acta*; 817, 193–196 (1985).

Mayer L.D., Bally M.B., Cullis P.R.; *Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient*; *Biochim. Biophys. Acta*; 857, 123–126 (1986).

Mayer L.D., Cullis P.R., Bally M.B.; *Designing therapeutically optimized liposomal anticancer delivery systems: lessons from conventional liposomes*; In: Lasic D.D. and Papahadjopoulos D. eds. *Medical applications of liposomes*; 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam (1998).

Mayhew E., Lazo R., Vail W.J., King J., Green A.M.; *Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier*; *Biochim. Biophys. Acta*; 775, 167–174 (1984).

McIntosh T.J., Simon S.A., Needham D., Huang C.; *Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayers*; *Biochemistry*; 31, 2012–2020 (1992).

Microfluidics; *Microfluidizer processor user guide* (2014).

Millipore Corp.; *Millex syringe filters - quick reference guide* (2009).

Milsmann M.H., Schwendener R.A., Weder H.-G.; *The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis*; *Biochim. Biophys. Acta*; 512, 147–155 (1978).

Moghimi M.S., Patel H.M.; *Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes*; *Biochim. Biophys. Acta*; 984, 384–387 (1989).

Molnar D.; *Insertionsstabilität Cholesteroler basierter PEG-Anker in Liposomen*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2015).

Molnar D., Linders J., Mayer C., Schubert R.; *Insertion stability of poly(ethylene glycol)-cholesteryl-based lipid anchors in liposome membranes*; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; 103, 51–61 (2016).

Moreira J.N., Ishida T., Gaspar R., Allen T.M.; *Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity*; *Pharm. Res.*; 19, 265–269 (2002).

Mossé Y.P., Wood A., Maris J.M.; *Inhibition of ALK signaling for cancer therapy*; *Clin. Cancer Res.*; 15, 5609–5614 (2009).

Mujoo K., Cheresch D.A., Yang H.M., Reisfeld R.A.; *Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth*; *Cancer Res.*; 47, 1098–1104 (1987).

Müller B.M., Romerdahl C.A., Gillies S.D., Reisfeld R.A.; *Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody*; *J. Immunol.*; 144, 1382–1386 (1990a).

Müller B.M., Reisfeld R.A., Gillies S.D.; *Serum half-life and tumor localization of a chimeric antibody deleted of CH2 region*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 87, 5702–5705 (1990b).

Müller I.; *Oberflächenmodifizierte Arsentrioxid-Liposomen für die Neuroblastom-Therapie*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2013).

Müller R.H., Nitzsche R., Paulke B.R.; *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*; 1. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1996).

Murgo A.J.; *Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the National Cancer Institute Cooperative Research and Development Studies*; *Oncologist*; 6, 22–28 (2001).

Murray J.L., Cunningham J.E., Brewer H., Mujoo K., Zukiwski A.A., Podoloff D.A., Kasi L.P., Bhadkamkar V., Fritsche H.A., Benjamin R.S.; *Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors*; *J. Clin. Oncol.*; 12, 184–193 (1994).

Nakhla T., Marek M., Kovalcik T.; *Issues associated with large-scale production of liposomal formulations*; *Drug Deliv. Technol.*; 2, 1–6 (2002).

Navid F., Sondel P.M., Barfield R., Shulkin B.L., Kaufman R.A., Allay J.A., Gan J., Hutson P., Seo S., Kim K., Goldberg J., Hank J.A., Billups C.A., Wu J., Furman W.L., McGregor L.M., Otto M., Gillies S.D., Handgretinger R., Santana V.M.; *Phase I trial of a novel anti-GD2 monoclonal antibody, Hu14.18K322A, designed to decrease toxicity in children with refractory or recurrent neuroblastoma*; *J. Clin. Oncol.*; 32, 1445–1452 (2014).

Needham D., McIntosh T. J., Lasic D.D.; *Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid bilayers*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1108, 40–48 (1992).

Nyholm T.K., Nylund M., Peter Slotte J.; *A calorimetric study of binary mixtures of dihydrosphingomyelin and sterols, sphingomyelin, or phosphatidylcholine*; *Biophys. J.*; 84, 3138–3146 (2003).

Ohsawa T., Miura H., Harada K.; *Studies on the effect of water-soluble additives and on the encapsulation mechanism in liposome preparation by the freeze-thawing method*; *Chem. Pharm. Bull.*; 33, 5474–5483 (1985).

Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D.; *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*; *Biochim. Biophys. Acta*; 557, 9–23 (1979).

Øra I., Bondesson L., Jönsson C., Ljungberg J., Pörn-Ares I., Garwicz S., Pählman S.; *Arsenic trioxide inhibits neuroblastoma growth in vivo and promotes apoptotic cell death in vitro*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 277, 179–185 (2000).

Oussoren C., Zuidam N.J., Crommelin D.J.A., Strom G.; *Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1328, 261–272 (1997).

- Özer A.Y.**, Talsma H., Crommelin D.J.A., Hincal A.A.; *Influence of freezing and freeze-drying on the stability of liposomes dispersed in aqueous media*; Acta Pharm. Technol.; 34, 129–139 (1988).
- Pagnan G.**, Stuart D.D., Pastorino F., Raffaghello L., Montaldo P.G., Allen T.M., Calabretta B., Ponzoni M.; *Delivery of c-myc antisense oligodeoxynucleotides to human neuroblastoma cells via disialoganglioside GD(2)-targeted immunoliposomes: antitumor effects*; J. Natl. Cancer Inst.; 92, 253–261 (2000).
- Papahadjopoulos D.**, Watkins J.C.; *Phospholipid model membranes - II. Permeability properties of hydrated liquid crystals*; Biochim. Biophys. Acta; 135, 639–652 (1967).
- Park J.R.**, Stewart C.F., London W.B., Santana V.M., Shaw P.J., Cohn S.L., Matthay K.K.; *A topotecan-containing induction regimen for treatment of high risk neuroblastoma*; J. Clin. Oncol.; 24, 9013 (2006).
- Park J.W.**, Hong K., Kirpotin D., Colbern G., Shalaby R., Baselga J., Shao Y., Nielsen U.B., Marks J.D., Moore D., Papahadjopoulos D., Benz C.C.; *Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery*; Clin. Cancer Res.; 8, 1172–1181 (2002).
- Parr M.J.**, Ansell S.M., Choi L.S., Cullis P.R.; *Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles*; Biochim. Biophys. Acta; 1195, 21–30 (1994).
- Pastorino F.**, Brignole C., Marimpietri D., Saprà P., Moase E.H., Allen T.M., Ponzoni M.; *Doxorubicin-loaded Fab'- fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice*; Cancer Res.; 63, 86–92 (2003a).
- Pastorino F.**, Brignole C., Marimpietri D., Cilli M., Gambini C., Ribatti D., Longhi R., Allen T.M., Corti A., Ponzoni M.; *Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy*; Cancer Res.; 63, 7400–7409 (2003b).
- Pastorino F.**, Brignole C., Loi M., Di Paolo D., Di Fiore A., Perri P., Pagnan G., Ponzoni M.; *Nanocarrier-mediated targeting of tumor and tumor vascular cells improves uptake and penetration of drugs into neuroblastoma*; Front. Oncol.; 3, 190 (2013).
- Patel H.M.**, Tuzel N.S., Ryman B.E.; *Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen*; Biochim. Biophys. Acta; 761, 142–151 (1983).
- Pattni B.S.**, Chupin V.V., Torchilin V.P.; *New developments in liposomal drug delivery*; Chem. Rev.; 115, 10938–10966 (2015).

Peng C.-A., Wang C.-H.; *Anti-neuroblastoma activity of gold nanorods bound with GD2 monoclonal antibody under near-infrared laser irradiation*; *Cancers*; 3, 227–240 (2011).

Perez-Soler R., Zou Y.; *Liposomes as carriers of lipophilic antitumor agents*; In: Lasic D.D and Papahadjopoulos D. eds. *Medical applications of liposomes*; Elsevier, Amsterdam (1998).

PerkinElmer; *The THGA graphite furnace - techniques and recommended conditions* (1999).

Peschka R., Purmann T., Schubert R.; *Cross-flow filtration - an improved detergent removal technique for the preparation of liposomes*; *Int. J. Pharm.*; 162, 177–183 (1998).

Pettersson H.M., Karlsson J., Pietras A., Øra I., Pålman S.; *Arsenic trioxide and neuroblastoma cytotoxicity*; *J. Bioenerg. Biomembr.*; 39, 35–41 (2007).

Ph. Eur.; *Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe 7. Nachtrag* (2014).

Picarda E., Ohaegbulam K.C., Zang X.; *Molecular pathways: targeting B7-H3 (CD276) for human cancer immunotherapy*; *Clin. Cancer Res.*; 22, 3425–3431 (2016).

Pick U.; *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*; *Arch. Biochem. Biophys.*; 212, 186–194 (1981).

Pinto N.R., Applebaum M.A., Volchenboum S.L., Matthey K.K., London W.B., Ambros P.F., Nakagawara A., Berthold F., Schleiermacher G., Park J.R., Valteau-Couanet D., Pearson A.D.J., Cohn S.L.; *Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma*; *J. Clin. Oncol.*; 33, 3008–3017 (2015).

Ploessl C., Pan A., Maples K.T., Lowe D.K.; *Dinutuximab: an anti-GD2 monoclonal antibody for high-risk neuroblastoma*; *Ann. Pharmacother.*; 50, 416–422 (2016).

Promega Corporation; *Zellbasierte und biochemische Assays* (2011).

Raffaghello L., Pagnan G., Pastorino F., Cosimo E., Brignole C., Marimpietri D., Bogenmann E., Ponzoni M., Montaldo P.G.; *Immunoliposomal fenretinide: a novel antitumoral drug for human neuroblastoma*; *Cancer Lett.*; 197, 151–155 (2003).

Rahman A., Carmichael D., Harris M., Roh J.K.; *Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes*; *Cancer Res.*; 46, 2295–2299 (1986).

Rahman M.; *Introduction to flow cytometry*; AbD Serotec (2014).

- Ramsay E.**, Alnajim J., Anantha M., Taggar A., Thomas A., Edwards K., Karlsson G., Webb M., Bally M.; *Transition metal-mediated liposomal encapsulation of irinotecan (CPT-11) stabilizes the drug in the therapeutically active lactone conformation*; *Pharm. Res.*; 23, 2799–2808 (2006).
- Rawicz W.**, Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E.; *Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers*; *Biophys. J.*; 79, 328–339 (2000).
- Rengaswamy V.**, Zimmer D., Süß R., Rössler J.; *RGD liposome-protamine-siRNA (LPR) nanoparticles targeting PAX3-FOXO1 for alveolar rhabdomyosarcoma therapy*; *J. Control. Release*; 235, 319–327 (2016).
- Riemer A.B.**, Forster-Waldl E., Bramswig K.H., Pollak A., Zielinski C.C., Pehamberger H., Lode H.N., Scheiner O., Jensen-Jarolim E.; *Induction of IgG antibodies against the GD2 carbohydrate tumor antigen by vaccination with peptide mimotopes*; *Eur. J. Immunol.*; 36, 1267–1274 (2006).
- Riss T.L.**, Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L.; *Cell viability assay*; In: Sittampalam G.S. et al. eds. *Assay guidance manual*, 1–30 (2013).
- Romberg B.**, Oussoren C., Snel C.J., Carstens M.G., Hennink W.E., Storm G.; *Pharmacokinetics of poly(hydroxyethyl-L-asparagine)-coated liposomes is superior over that of PEG-coated liposomes at low lipid dose and upon repeated administration*; *Biochim. Biophys. Acta*; 1768, 737–743 (2007).
- Ruan S.**, Raj M., Lloyd K.; *Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells*; *J. Neurochem.*; 72, 514–521 (1999).
- Rücker G.**, Neugebauer M., Willems G.G.; *Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten*; 4. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2008).
- Rudolph A.S.**, Crowe J.H.; *Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline*; *Cryobiology*; 22, 367–377 (1985).
- Sapra P.**, Allen T.M.; *Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs*; *Cancer Res.*; 62, 7190–7194 (2002).
- Sapra P.**, Allen T.M.; *Ligand-targeted liposomal anticancer drugs*; *Prog. Lipid Res.*; 42, 439–462 (2003).
- Sawant R.R.**, Torchilin V.P.; *Challenges in development of targeted liposomal therapeutics*; *AAPS J.*; 14, 303–315 (2012).

Scherphof G., Roerdink F., Waite M., Parks J.; *Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins*; Biochim. Biophys. Acta; 542, 296–307 (1978).

Schilt Y., Berman T., Wei X., Barenholz Y., Raviv U.; *Using solution X-ray scattering to determine the high-resolution structure and morphology of PEGylated liposomal doxorubicin nanodrugs*; Biochim. Biophys. Acta; 1860, 108–119 (2016).

Schlemmer G., Welz B.; *Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry*; Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.; 41, 1157–1165 (1986).

Schmid F.; *Untersuchung des Einflusses verschiedener Assoziationsformen von P-gp hemmenden Phospholipiden auf den Wirkstofftransport und die Hydrolysestabilität in vitro*; Diplomarbeit Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2014).

Schubert R., Wolburg H., Schmidt K.-H., Roth H.J.; *Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes*; Chem. Phys. Lipids; 58, 121–129 (1991).

Schubert R.; *Liposome preparation by detergent removal*; Meth. Enzymol.; 367, 46–70 (2003).

Schubert R.; *Liposomen*; In: Mäder K., Weidenauer U. und Allhenn D. eds; Innovative Arzneiformen; 1. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 149–163 (2010).

Senior J., Gregoriadis G.; *Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability?*; FEBS Lett.; 145, 109–114 (1982).

Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G.; *Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles*; Biochim. Biophys. Acta; 1062 (1991).

Sessa G., Weissmann G.; *Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes*; J. Lipid Res.; 9, 310–318 (1968).

Siemann D.W.; *The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by tumor-vascular disrupting agents*; Cancer Treat. Rev.; 37, 63–74 (2011).

Simon T., Hero B., Faldum A., Handgretinger R., Schrappe M., Niethammer D., Berthold F.; *Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma*; J. Clin. Oncol.; 22, 3549–3557 (2004).

- Sorgi F.L.**, Huang L.; *Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization*; Int. J. Pharm.; 144, 131–139 (1996).
- Stark B.**, Pabst G., Prassl R.; *Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: effects of cryoprotectants on structure*; Eur. J. Pharm. Sci.; 41, 546–555 (2010).
- Strauss G.**, Schurtenberger P., Hauser H.; *The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying*; Biochim. Biophys. Acta; 858, 169–180 (1986).
- Szoka F.**, Papahadjopoulos D.; *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 75, 4194–4198 (1978).
- Talsma H.**, Özer A.Y., van Bloois L., Crommelin D.J.A.; *The size reduction of liposomes with a high pressure homogenizer (Microfluidizer™). Characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods*; Drug Dev. Ind. Pharm.; 15, 197–207 (2008).
- Tettamanti G.**; *Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts*; Glycoconj. J.; 20, 301–317 (2004).
- Tirri L.J.**, Ayengar N.K.N., Lipton L.C., Chatterjee N., Brockerhoff H.; *Studies on the hydrogen belts of membranes: III. Glycerol permeability of dihydrosphingomyelin-cholesterol membranes*; Lipids; 13, 267–269 (1978).
- Tivnan A.**, Orr W.S., Gubala V., Nooney R., Williams D.E., McDonagh C., Prenter S., Harvey H., Domingo-Fernández R., Bray I.M., Piskareva O., Ng C.Y., Lode H.N., Davidoff A.M., Stallings R.L., Chesler L.; *Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles*; PLoS ONE; 7, 1–12 (2012).
- Torchilin V.**; *Liposomes as targetable drug carriers*; Crit. Rev. Drug Carrier Syst.; 2, 65–115 (1985).
- Torchilin V.P.**, Narula J., Halpern E., Khaw B.A.; *Poly(ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes: factors influencing targeted accumulation in the infarcted myocardium*; Biochim. Biophys. Acta; 1297, 75–83 (1996).
- Torchilin V.P.**; *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*; Nat. Rev. Drug Discov.; 4, 145–160 (2005).
- Trinder P.**; *Determination of blood glucose using an oxidaseperoxidase system with a non-carcinogenic chromogen*; J. Clin. Path.; 22, 158–161 (1969).

Uster P.S., Allen T.M., Daniel B.E., Mendez C.J., Newman M.S., Zhu G.Z.; *Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time*; FEBS Lett.; 386, 243–246 (1996).

Vaage J., Donovan D., Mayhew E., Uster P., Woodle M.; *Therapy of mouse mammary carcinomas with vincristine and doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes*; Int. J. Cancer; 54, 959–964 (1993).

van Bommel E.M., Crommelin D.J.A.; *Stability of doxorubicin-liposomes on storage: as an aqueous dispersion, frozen or freeze-dried*; Int. J. Pharm.; 22 (1984).

van Winden E.C., Zuidam N.J., Crommelin D.J.A.; *Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parental use*; In: Lasic D.D and Papahadjopoulos D. eds. Medical applications of liposomes; Elsevier, Amsterdam (1998).

Vemuri S., Yu C.-D., Wangsatorntanakun V., Roosdorp N.; *Large-scale production of liposomes by a microfluidizer*; Drug Dev. Ind. Pharm.; 16, 2243–2256 (1990).

Vermeer A.W., Bremer M.G., Norde W.; *Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy*; Biochim. Biophys. Acta; 1425, 1–12 (1998).

Vermeer A.W., Norde W.; *The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein*; Biophys. J.; 78, 394–404 (2000).

Verwey E.J.W., Overbeek J.T.G.; *Theory on the stability of lyophobic colloids*; 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam (1948).

Vroman L.; *Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids*; Nature; 196, 476–477 (1962).

Wagner A., Vorauer-Uhl K.; *Liposome technology for industrial purposes*; J. Drug. Deliv.; 2011, 1–9 (2011).

Wang X., Li D., Ghali L., Xia R., Munoz L.P., Garelick H., Bell C., Wen X.; *Therapeutic potential of delivering arsenic trioxide into HPV-infected cervical cancer cells using liposomal nanotechnology*; Nanoscale Res. Lett.; 11, 94 (2016).

Wei J.S., Whiteford C.C., Cenacchi N., Son C.G., Khan J.; *BBC3 mediates fenretinide-induced cell death in neuroblastoma*; Oncogene; 24, 7976–7983 (2005).

Weinstein J.L., Katzenstein H.M., Cohn S.L.; *Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma*; Oncologist; 8, 278–292 (2003).

- Winter N.D.**, Murphy R.K., O'Halloran T.V., Schatz G.C.; *Development and modeling of arsenic-trioxide-loaded thermosensitive liposomes for anticancer drug delivery*; J. Liposome Res.; 21, 106–115 (2011).
- Woodle M.C.**, Lasic D.D.; *Sterically stabilized liposomes*; Biochim. Biophys. Acta; 1113, 171–199 (1992).
- Woo S.-Y.**, Lee M.-Y., Jung Y.-J., Yoo E.-S., Seoh J.-Y., Shin H.-Y., Ahn H.-S., Ryu K.-H.; *Arsenic trioxide inhibits cell growth in SH-SY5Y and SK-N-AS neuroblastoma cell lines by a different mechanism*; Pediatr. Hematol. Oncol.; 23, 231–243 (2006).
- Yamauchi H.**, Yano T., Kato T., Tanaka I., Nakabayashi S., Higashi K., Miyoshi S., Yamada H.; *Effects of sialic acid derivative on long circulation time and tumor concentration of liposomes*; Int. J. Pharm.; 113, 141–148 (1995).
- Yan W.**, Zhang Y., Zhang J., Liu S., Cho S.J., Chen X.; *Mutant p53 protein is targeted by arsenic for degradation and plays a role in arsenic-mediated growth suppression*; J. Biol. Chem.; 286, 17478–17486 (2011).
- Yiallourous M.**; *Neuroblastom*; www.kinderkrebsinfo.de (2016).
- Yi J.**, Yang J., He R., Gao F., Sang H., Tang X., Ye R.D.; *Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling*; Cancer Res.; 64, 108–116 (2004).
- Yu A.L.**, Uttenreuther-Fischer M.M., Huang C.S., Tsui C.C., Gillies S.D., Reisfeld R.A., Kung F.H.; *Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma*; J. Clin. Oncol.; 16, 2169–2180 (1998).
- Yu A.L.**, Gilman A.L., Ozkaynak M.F., London W.B., Kreissman S.G., Chen H.X., Smith M., Anderson B., Villablanca J.G., Matthay K.K., Shimada H., Grupp S.A., Seeger R., Reynolds C.P., Buxton A., Reisfeld R.A., Gillies S.D., Cohn S.L., Maris J.M., Sondel P.M.; *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*; N. Engl. J. Med.; 363, 1324–1334 (2010).
- Yuan F.**, Dellian M., Fukumura D., Leunig M., Berk, D.A., Torchilin V.P., Jain R.K.; *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*; Cancer Res.; 55, 3752–3756 (1995).
- Zalipsky S.**, Hansen C.B., Oaks J.M., Allen T.M.; *Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes*; J. Pharm. Sci.; 85, 133–137 (1996).

Zeeman P.; *The effect of magnetisation on the nature of light emitted by a substance*; Nature; 1424, 347 (1897).

Zeng Y., Fest S., Kunert R., Katinger H., Pistoia V., Michon J., Lewis G., Ladenstein R., Lode H.N.; *Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice*; Mol. Immunol.; 42, 1311–1319 (2005).

Zhang X.-Y., Lu W.-Y.; *Recent advances in lymphatic targeted drug delivery system for tumor metastasis*; Cancer Biol. Med.; 11, 247–254 (2014).

Zuccari G., Milelli A., Pastorino F., Loi M., Petretto A., Parise A., Marchetti C., Minarini A., Cilli M., Emionite L., Di Paolo D., Brignole C., Piaggio F., Perri P., Tumiatti V., Pistoia V., Pagnan G., Ponzoni M.; *Tumor vascular targeted liposomal-bortezomib minimizes side effects and increases therapeutic activity in human neuroblastoma*; J. Control. Release; 211, 44–52 (2015).

Züfle K.; *Anti-CD19-konjugierte Zytostatika-Liposomen zur gezielten Therapie der pädiatrischen B-Zell-Leukämie*; Dissertation Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (2016).

Zuidam N.J., Lee S.S.L., Crommelin D.J.A.; *Sterilization of liposomes by heat treatment*; Pharm. Res.; 10, 1591–1596 (1993).

Zuidam N.J., de Vruh R., Crommelin D.J.A.; *Stability, storage and sterilization of liposomes*; In: Torchilin, V., P.; Weissig, V. eds. Liposomes: a practical approach; 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford (2003).

7 Wissenschaftlicher Werdegang

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.