Katharina Bettina Böhm

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

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

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

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

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

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Katharina Bettina Böhm

aus Heidelberg

2012

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2012
Zugl.: Freiburg, Univ., Diss., 2012

978-3-95404-203-6

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2012
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2012
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-203-6

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Die praktischen Arbeiten zur Erstellung dieser Dissertationsschrift wurden im Zeitraum von Februar 2008 bis Dezember 2011 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau durchgeführt.

Dekan:	Prof. Dr. Andreas Bechthold
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. Thorsten Koslowski
Referentin	Prof. Dr. Regine Süss
Korreferent:	Prof. Dr. Rolf Schubert
Drittprüfer:	Prof. Dr. Norbert Klugbauer
Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:	5. Juli 2012
Datum der Promotion:	3. Juli 2012

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Danksagungen

Ich möchte mich zuerst ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Regine Süss und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, für die kontinuierliche Betreuung und die konstruktive Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank auch für die zahlreichen Ratschläge und Freiräume, die ich während meiner wissenschaftlichen Arbeit erhalten habe und die kollegiale, familiäre Atmosphäre am Lehrstuhl.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Norbert Klugbauer bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Amts als Drittprüfer.

Mein besonderer Dank gilt auch:

Frau Ina Stumpf für die praktische Unterstützung und Frau Dr. Felicitas Lewrick für gute Tipps bei der Arbeit mit Idarubicin-beladenen Liposomen,

Frau Birgit Erhardt für die Hilfe bei der Zellarbeit,

Herrn Pfeiffer und Frau Nicole Specht für die Durchführung des Bartlett-Assays,

Herrn Wolf Ulrich Michaelis für die Unterstützung bei der Durchführung der DSC-Experimente,

Frau Sabine Barnert für die Erstellung der Cryo-TEM Bilder,

Herrn Alexander Burghardt für die Mithilfe bei der Durchführung der HPTLC-Versuche,

Frau Nuria Beltran-Sanchez für die problemlose Durchführung und Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bedanken bei:

Meiner Kollegin Friederike Mayenfels für so viele lustige Zeiten, die wir hatten mit Skifahrten, MTB-Touren, vielen chaotischen Situationen und kurzen Nächten-schön, dass du da warst.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Monika Cwik, Michael Drechsler, Gesche Först und Silke Simon und für eine tolle gemeinsame Zeit im Arbeitskreis, aber auch für jede Menge schöne Aktivitäten außerhalb der Uni. Ohne euch wäre der Urlaub in Darry nie so unterhaltsam gewesen und ich wüsste bis heute nicht, wie die Streusel an den Kuchen kommen.

Meinen ehemaligen Bürokolleginnen Dr. Stefanie Striepe und Ina Stumpf für unsere gemeinsame Zeit im „Spaßbüro“.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Meinen aktuellen Bürokolleginnen Doris Zimmer, Dr. Ying Zhou und Dr. Felicitas Lewrick für schöne Stunden mit vielen interessanten und sehr unterhaltsamen Gesprächen.

Allen meinen Mit-Doktoranden und Post-Docs: vielen Dank euch für ein angenehmes Arbeitsklima, die unzähligen Aktivitäten in und auch außerhalb der Uni und die wirklich schöne Zeit hier.

Ganz besonders möchte ich mich aber noch bei meiner Familie herzlich bedanken. Vielen lieben Dank euch für eure Hilfe und die viele Unterstützung. Ohne euch, wäre das hier nicht möglich gewesen!

Katharina Böhm

Im Juni 2012

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Für meine Familie

Der menschlichen Erkenntnis sind Grenzen gesetzt, aber wir wissen nicht, wo diese liegen

Konrad Lorenz

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht

Vorträge

Katharina Böhm, Ina Stumpf, Felicitas Lewrick, Regine Peschka-Süss, Ute Steinfeld, Anja Philippi
Development of appropriate Idarubicin and Doxorubicin loaded liposomes for targeting with T-cells
7. Pharmazie-Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2009

Katharina Böhm, Ina Stumpf, Felicitas Lewrick, Regine Süss, Ute Steinfeld, Anja Philippi
The establishment of Idarubicin loaded liposomes for tumor-targeting with T-cells
20th Mountain/ Sea Liposome Workshop, Ameland (Holland), September 2009

Katharina Böhm, Regine Süss
Herstellung Doxorubicin-beladener Liposomen mit Hilfe der Gefriertrocknung
Förderverein für Arzneimittelforschung (FAF), Jahrestreffen, Freiburg, Januar 2010

Katharina Böhm, Regine Süss
Development of a freeze drying method for doxorubicin loaded liposomes
8. Pharmazie-Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2010

Katharina Böhm, Regine Süss
Effects of Freeze Drying on HSPC/Chol Liposomes
21st Mountain/ Sea Liposome Workshop, Oberjoch (Allgäu), März 2011

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Posterpräsentationen

K. Böhm, R. Süss
Development of a stable formulation of doxorubicin loaded liposomes
7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Malta, März 2010

Katharina Böhm, Regine Süss
Freeze drying of lyoprotected doxorubicin loaded liposomes
Tag der Forschung und Graduierung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Freiburg, Juli 2010

Böhm, K., Süss, R.
Optimizing shelf life of doxorubicin loaded liposomes by lyophilization
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010, Braunschweig, Oktober 2010

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Liposomen 1

1.2. Liposomale Membranbestandteile 2

1.2.1. HSPC (hydriertes Sojaphosphatidylcholin) 3
1.2.2. Cholesterol 3
1.2.3. CHEMS (Cholesterolhemisuccinat) 4

1.3. Eingesetzte Zytostatika 5

1.3.1. Doxorubicin ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) 5
1.3.2. Idarubicin ($C_{26}H_{27}NO_9$) 7

1.4. CAELYX® 9

1.5. Targeting 10

1.5.1. Passives Targeting 11
1.5.2. Aktives Targeting 14

1.6. Lyophilisation 15

1.6.1. Ablauf der Lyophilisation 16
1.6.1.1. Einfrieren 18
1.6.1.2. Primärtrocknung 19
1.6.1.3. Sekundärtrocknung 20
1.6.2. Einsatz von Lyo-/ Kryoprotektoren 21
1.6.2.1. Saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 22
1.6.2.2. Trehalose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 25
1.6.2.3. Mannitol ($C_6H_{14}O_6$) 26
1.6.3. Lyophilisation von funktionalisierten Liposomen 27

1.7. Ziel der Arbeit 28

2. Material und Geräte 29

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2.1. Lipide und Membranbestandteile 29

2.2. Chemikalien und Reagenzien..... 30

2.3. Puffer 33

2.4. Verbrauchsmaterialien 35

2.5. Geräte 36

2.6. Wasser..... 39

2.7. Zellversuche..... 39

2.7.1. Zelllinie und deren Kultivierung 39

2.7.2. Reagenzien zur Kultivierung der Zellen.....40

2.8. Antikörper..... 40

3. Methoden.....41

3.1. Liposomenherstellung..... 41

3.1.1. Filmmethode 41

3.1.2. Extrusion 43

3.1.2.1. Extrudieren mit dem Druckextruder 43

3.1.2.2. Extrudieren mit dem Handextruder 44

3.2. Charakterisierung der Liposomen 44

3.2.1. Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).....44

3.2.2. Bestimmung des Phospholipidgehalts nach Bartlett 45

3.2.3. Bestimmung des Cholesterolgehalts.....47

3.2.4. Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC).....48

3.2.5. Bestimmung der Isotonie.....51

3.3. Beladung der Liposomen mit DXR oder IDA..... 51

3.3.1. Remote loading 51

3.4. Charakterisierung der mit DXR- oder IDA-beladenen Liposomenpräparationen 54

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

3.4.1. Solubilisierung der HSPC/Chol-Liposomen mit Triton X-100 54
3.4.2. Fluorimetrische Kalibriergerade zur Bestimmung von DXR und IDA 55
3.4.3. Bestimmung der liposomalen Einschlusseffizienz von DXR und IDA 58
3.4.4. Bestimmung des Freisetzungsverhaltens von DXR und IDA 59
3.4.5. Differenz Scanning Calorimetrie (DSC) 60

3.5. Lyophilisation 62

3.6. Präparation von Liposomen zum aktivem Targeting 64

3.6.1. Kopplung des Liganden durch SPIT-Methode (sterol based post insertion technique) 64

3.7. Durchführung des Zellexperiments 66

3.7.1. Passagieren der Zellen 66
3.7.2. Ausplattieren der Zellen 66
3.7.3. Durchflusszytometrie 66

4. Ergebnisse und Diskussion 69

4.1. Charakterisierung der Verkapselung von DXR und IDA 69

4.1.1. Bestimmung der prozentualen Einschlusseffizienz 69
4.1.2. Vergleich der Stabilität bei ≤ 8 °C 70
4.1.3. Bestimmung des Freisetzungsverhaltens DXR- und IDA-beladener Liposomen 73
4.1.4. Einfluss von Cholesterolhemisuccinat (CHEMS) 78

4.2. Lyophilisation 82

4.2.1. Optimierung der bestehenden Lyophilisationsbedingungen 82
4.2.2. Lyophilisation mit bestehendem Lyophilisationsprotokoll 82
4.2.3. Optimierung der Primärtrocknungs-Temperatur 86
4.2.4. Lyophilisation mit veränderter Primärtrocknungs-Temperatur 93

4.3. Untersuchung des Einflusses von Saccharose auf Einschlusseffizienz und Größe der DXR-beladenen HSPC/Chol-Liposomen 97

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

4.3.1. Einfluss von Saccharose auf die Größe von HSPC/Chol-Liposomen 97
4.3.2. Einfluss verschiedener Saccharose-Konzentrationen auf die Lyophilisation DXR-beladener HSPC/Chol-Liposomen 114

4.4. Untersuchungen der Lagerstabilität DXR-beladener HSPC/Chol-Liposomen 120

4.5. Einfluss der Sterilfiltration 126

4.6. Möglichkeiten zu Optimierung der Lyophilisation..... 128

4.6.1. Überprüfung einer weiteren Einfriermethode.....128
4.6.2. Vergleich von Saccharose und Trehalose als Lyo-/ Kryoprotektoren...132
4.6.3. Überprüfung verschiedener Rehydrierungsmodelle 138
4.6.4. Einfluss von PEG auf die Lyophilisation 144

4.7. Cryo-TEM 148

4.8. Lyophilisation funktionalisierter HSPC/Chol-Liposomen ... 152

5. Zusammenfassung und Ausblick 157

6. Literaturverzeichnis.....163

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Chol	Cholesterol
CHEMS	Cholesterolhemisuccinat
DC	Dünnschichtchromatographie
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidylcholin
DSPC	1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin
DSPE	1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phophatidylethanolamin
DXR	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Einschlusseffizienz
EPR	*enhanced permeability and retention*
ESM	Ei-Sphingomyelin
FCS	*fetal calf serum,* fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HBS	*HEPES buffered saline*
HEPES	[N-(2-Hydroxyethylen)-piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure)]
HNS	HEPES-Natriumchlorid-Saccharose Puffer
HS	HEPES-Saccharose Puffer
HPTLC	*high performance thin layer chromatography;* Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
HSPC	hydriertes Sojaphosphatidylcholin
IDA	Idarubicin
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Exzitationswellenlänge, Anregungswellenlänge
LUV	*large unilamellar vesicle* große unilamellare Vesikel
M	molar
mbar	Millibar

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

min	Minute
MLV	*multilamellar vesicle,* multilamellare Vesikel
mM	Millimolar
mol	Mol
mol%	Molprozent
M_r	relative Molmasse
MVV	*multivesicular vesicle,* multivesikuläre Vesikel
$mPEG_{2000}$-DSPE	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-poly(ethylenglykol)]-2000
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
µl	mikroliter
µm	mikrometer
µM	mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NPS	Nanopartikuläre Systeme
OLV	*oligolamellar vesicle,* oligolamellare Vesikel
PBS	*phosphate buffered saline*
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex, Polyindex
PEG	Polyethylenglykol
Ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
RES	retikuloendotheliales System
Rh-PE	Rhodamin-Phosphatidylethanolamin
RPMI	Kulturmedium
SEC	*size exclusion chromatography* Größenausschlusschromatographie
sek	Sekunde
SPIT	sterol-based post-insertion technique; Sterol-basiertes nachträgliches Einlagerungsverfahren
STABW	Standardabweichung
Sterol-PEG_{1300}-NHS	Sterol-PEG_{1300}-N-Hydroxysuccinimid

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

SUV	*small unilamellar vesicle* kleine unilamellare Vesikel
T_e	eutektische Temperatur
T_g	Phasenübergangstemperatur
TX-100	Triton® X-100
UV/VIS	ultraviolette/visuelle Strahlung
ZAve	*Z-Average;* (mittlerer) hydrodynamischer Durchmesser

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.