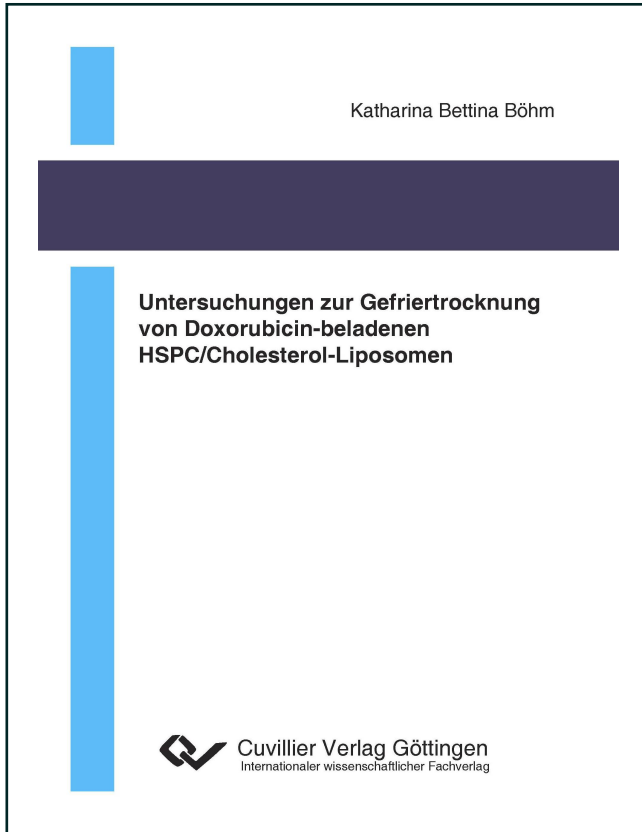




Katharina Bettina Böhm (Autor)

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



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

Copyright:

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

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



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 ₆ H ₁₄ O ₆).....	26
1.6.3. Lyophilisation von funktionalisierten Liposomen.....	27
1.7. Ziel der Arbeit	28
2. Material und Geräte	29



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



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



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