

UNTERSUCHUNGEN ZUR MISCHBARKEIT BIPOLARER AMPHIPHILE MIT
KONVENTIONELLEN PHOSPHOLIPIDEN FÜR DIE HERSTELLUNG
BOLALIPID-STABILISIERTER LIPOSOMEN

KUMULATIVE DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl. Pharm. Sindy Müller
geboren am 10. November 1991 in Chemnitz

Halle/Saale im Mai 2020

Gutachter 1: Prof. Karsten Mäder

Gutachter 2: Prof. Gert Fricker

Gutachter 3: PD habil. Dr. Simon Drescher

Verteidigung am: 30.11.2020

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Abbildungsverzeichnis | II |
| Tabellenverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1. Phospholipide und ihre Mischbarkeit in Membranen | 1 |
| 2. Liposomen – Charakterisierung und Anwendung | 6 |
| 3. Orale Anwendung von Liposomen – Hürden und Chancen | 10 |
| 3.1 Physiologische Barrieren für oral verabreichte Liposomen | 10 |
| 3.2 Konzepte für die Stabilisierung oral verabreichter Liposomen | 12 |
| 4. Bolalipide und ihre Verwendung zur Liposomenformulierung | 15 |
| 4.1 Archaeale Lipide und Archaeosomen | 15 |
| 4.2 Artificielle Bolalipide und ihre Mischbarkeit mit Phospholipiden – ein Rückblick | 18 |
| 5. Zielstellung der Arbeit | 25 |
| 6. Publikationen | 29 |
| 6.1 Publikation 1 | 30 |
| 6.2 Publikation 2 | 48 |
| 6.3 Publikation 3 | 63 |
| 6.4 Publikation 4 | 78 |
| 6.5 Publikation 5 | 89 |
| 6.6 Publikation 6 | 100 |
| 7. Diskussion | 120 |
| 7.1 Aggregationsverhalten asymmetrischer Glyceroldietherbolalipide | 120 |
| 7.2 Aggregationsverhalten einkettiger, alkylsubstituierter Bolalipide | 124 |
| 7.3 Mischbarkeit asymmetrischer Glyceroldietherbolalipide mit membranbildenden Lipiden | 126 |
| 7.4 Mischbarkeit einkettiger, alkylverzweigter Bolalipide mit membranbildenden Lipiden | 132 |
| 7.5 <i>In vitro</i> Stabilitätsuntersuchungen an Bolalipid-Liposomen | 135 |
| 8. Zusammenfassung und Ausblick | 140 |
| Literaturverzeichnis | 144 |
| Lebenslauf | 152 |
| Veröffentlichte Originalarbeiten | 153 |
| Erklärung | 156 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|----|
| Abb. 1 | Links: Chemische Struktur eines Phosphoglycerids mit hydrophobem Alkylkettenbereich (orange) und hydrophilem Kopfgruppenbereich (blau) sowie die stereospezifische <i>sn</i> -Konfiguration (rot). Mitte: Kopfgruppen verschiedener Phosphoglyceride. Rechts: Membranbildende und nicht-membranbildende Phosphoglyceride. Modifiziert nach OSMAN <i>et al.</i> ³ | 1 |
| Abb. 2 | NEWMAN-Projektion der <i>trans</i> - und einer möglichen <i>gauche</i> -Konformation eines Polymethylenkettensegments. | 2 |
| Abb. 3 | Schematische Darstellung einer Lipid-doppelschicht mit vertikaler und lateraler Phasenseparation. Modifiziert nach BINDER <i>et al.</i> ⁵⁸ | 3 |
| Abb. 4 | Phasenverhalten einer Lipidmischung, bei der Lipid A und Lipid B sowohl in der Gelphase als auch im flüssig-kristallinen Zustand in jedem Mischungsverhältnis homogen miteinander mischbar sind. | 3 |
| Abb. 5 | Schematische Darstellung von Beispielen unterschiedlich angeordneter Lipidmoleküle. (A) Nicht-interdigitierte Anordnung, (B) Anordnung mit vollständig interdigitierten Alkylketten, (C) Anordnung mit partiell interdigitierten Alkylketten. | 5 |
| Abb. 6 | Schematische Darstellung eines Phospholipid-Liposoms und dem Aufbau einer Lipiddoppelschicht sowie die Einteilung von Liposomen nach Lamellarität und Größe (Größenangabe Ø bezieht sich auf den Vesikeldurchmesser, Abbildung nicht maßstabsgetreu). | 6 |
| Abb. 7 | Schematische Darstellung der Angriffspunkte der unterschiedlichen Phospholipasen am Phospholipid-Molekül. PL = Phospholipase, R1, R2 = Fettsäurerest, R3 = Kopfgruppenrest | 11 |
| Abb. 8 | Grundstrukturen der natürlichen, archaealen Lipide. Die Variabilität der Lipide ergibt sich durch die Modifikation der Alkylketten sowie die Substitution der Kopfgruppen durch Zucker, Phosphatreste und Polyole. | 15 |
| Abb. 9 | (A) Strukturformel des Lipids PC-C32-PC. (B) Thermogramm mit DSC-Heizkurve einer wässrigen Dispersion ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) von PC-C32-PC in Phosphatpuffer mit pH 7,4. Heizrate 60 K h^{-1} . (C) Schematische Darstellung der theoretisch entstehenden Hohlräume wenn ein einkettiges Bolalipid wie PC-C32-PC in membrandurchspannender Konformation in eine Lipiddoppelschicht inkorporiert wird. | 19 |
| Abb. 10 | Beispiele für in früheren Studien synthetisierte und charakterisierte Bolalipide mit Kopfgruppenmodifikationen. | 22 |
| Abb. 11 | Beispiele für in früheren Studien synthetisierte und charakterisierte Bolalipide mit Alkylkettenmodifikation und Molekülasymmetrie. | 23 |
| Abb. 12 | Beispiele für in früheren Studien synthetisierte und charakterisierte Bolalipide, mit denen eine gegenüber PC-C32-PC verbesserte Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden erreicht werden konnte. | 24 |

- Abb. 13 Chemische Struktur der in dieser Dissertation charakterisierten asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide (links) und einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide (rechts). Kopfgruppenmodifikationen (blau und orange) und Alkylkettenmodifikationen (grün), in denen sich die Lipide innerhalb der beiden Gruppen unterscheiden, sind farblich hinterlegt. Asymmetrische Glyceroldietherbolalipide: (1) **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH**, (2) **PC-Gly(2C16Me)C32-PC**, (3) **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE**. Einkettige, alkylverzweigte Bolalipide: (4) **PC-C32(1,32C3)-PC**, (5) **PC-C32(1,32C6)-PC**, (6) **PC-C32(1,32C9)-PC**. 28
- Abb. 14 Schematische Darstellung der entstehenden Hohlräume in der Lipiddoppelschicht bei der Einlagerung von PC-C32-PC in einer membrandurchspannenden Konformation sowie der Ausfüllung dieser Hohlräume durch die chemische Struktur der asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide. 127
- Abb. 15 Beispiele für Phasenseparation und Mischbarkeit von Lipidkomponenten: DSC-Heizkurven der 1:4 (Bolalipid:Phospholipid, *n:n*) Lipidmischungen von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** mit (A) DPPC und (B) DOPC in Phosphatpuffer pH 7,6. (A) Aus der Heizkurve lässt sich entnehmen, dass sich in der Lipidmischung vermutlich unterschiedliche phospholipid- und bolalipidreiche Domänen gebildet haben, die beim Erwärmen der Probanddispersion separat schmelzen (rote Pfeile). (B) Die stark verbreiterte Phasenumwandlung (roter Pfeil) der Lipidmischung lässt auf eine Mischbarkeit der Lipidkomponenten schließen. DSC-Heizkurven der reinen Bolalipide sind zum Vergleich gezeigt. Die Heizrate bei den Messungen war 60 K h⁻¹. Die Kurven sind vertikal verschoben..... 129
- Abb. 16 cryoEM-Aufnahmen einer wässrigen Suspension einer **PC-Gly(2C16Me)C32-PC/DOPC** Lipidmischung (1:4, *n:n*). Pfeile deuten auf tubuläre Vesikel. Lipidkonzentration *c* = 3 mM in Phosphatpuffer mit pH 7,6. Entnommen aus Publikation 4. 130
- Abb. 17 Schematische Darstellung der entstehenden Hohlräume in der Lipiddoppelschicht bei der Einlagerung von PC-C32-PC in einer membrandurchspannenden Konformation sowie der Ausfüllung dieser Hohlräume durch die chemische Struktur der einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide. 132
- Abb. 18 DSC Heizkurven der **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC** Lipidmischungen (*c* = 3 mM) in Phosphatpuffer pH 7,4. Heizrate: 60 K h⁻¹. DSC Heizkurven der reinen Lipide sind zum Vergleich gezeigt. Die Kurven sind vertikal verschoben. Entnommen aus Publikation 5. 133
- Abb. 19 FFEM-Aufnahmen einer wässrigen Dispersion einer **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC** Lipidmischung (1:4, *n:n*). Die raue Oberfläche der Vesikel im Vergleich zum umgebenden Eis ist im vergrößerten Bildausschnitt deutlich zu erkennen. Lipidkonzentration *c* = 6 mM in PBS mit pH 7,4. 134

- Abb. 20 Calceinfreisetzung von konventionellen und Bolalipid-modifizierten Vesikeln während der Inkubation bei 37 °C in (A) PBS, (B) SGF und (C) SIF. Gesamtlipidkonzentration von allen Lipiddispersionen nach der Verdünnung mit den entsprechenden Inkubationsmedien: $c = 0,071$ mM. Entnommen aus Publikation 6. 137
- Abb. 21 (A) Verkapselungseffizienz (%) der konventionellen SojaPC-Liposomen (graue Balken) und modifizierten **PC-C32(1,32C9)-PC**/SojaPC-Liposomen (grüne Balken) für Calcein vor der Gefriertrocknung in PBS mit entweder Lysin (linke Seite) oder Trehalose (rechte Seite) als Kryoprotektor. (B) Calceinretention (%) nach der Gefriertrocknung und Rehydratation mit deionisiertem Wasser von konventionellen SojaPC-Liposomen (graue Balken) und modifizierten **PC-C32(1,32C9)-PC**/SojaPC-Liposomen (grüne Balken) mit der Verwendung von entweder Lysin (linke Seite) oder Trehalose (rechte Seite) als Kryoprotektor... 139

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|--------|---|-----|
| Tab. 1 | Ausgewählte, liposomale Formulierungen, die entweder bereits zugelassen sind oder sich noch in der klinischen Testung befinden. Modifiziert nach BULBAKE <i>et al.</i> ⁵⁷ i.v.= intravenös, i.m. = intramuskulär | 9 |
| Tab. 2 | Absorptionsbarrieren für oral verabreichte Triglyceride und phospholipidhaltige Nanoformulierungen. | 10 |
| Tab. 3 | Ausgewählte, experimentelle Archaeosomen-Formulierungen, hergestellt mit extrahierten, archaealen Lipiden. | 17 |
| Tab. 4 | Hauptphasenumwandlungstemperaturen und beobachtetes Aggregationsverhalten unter – und oberhalb der Phasenumwandlung der in dieser Dissertation charakterisierten, einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide. | 125 |
| Tab. 5 | Schematische Darstellung verschiedener, synthetischer Bolalipide, Beispielverbindungen mit entsprechender Referenz sowie das bevorzugte Aggregationsverhalten dieser Verbindungen in wässriger Dispersion. Die Bolalipide, deren Aggregationsverhalten im Rahmen dieser Dissertation charakterisiert wurde, sind dick gedruckt dargestellt. Modifiziert nach S. DRESCHER <i>et al.</i> ¹⁸⁹ | 125 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Begriffe und Kurzschreibweisen chemischer Substanzen

| | |
|--------------------|--|
| CMC | <i>critical micelle concentration</i> , kritische Mizellkonzentration |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor |
| EPR | <i>enhanced permeability retention</i> , Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention |
| FAE | Follikel-assoziiertes Epithel |
| FDA | <i>U.S. Food and Drug Administration</i> , Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika |
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| GUV | <i>giant unilamellar vesicle</i> , sehr großes unilamellares Vesikel |
| i.m. | intramuskulär |
| i.v. | intravenös |
| LUV | <i>large unilamellar vesicle</i> , großes unilamellares Vesikel |
| MePE | Phosphomonomethylethanolamin |
| Me ₂ PE | Phosphodimethylethanolamin |
| PA | Phosphatidsäure |
| PBS | phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PG | Phosphatidylglycerol |
| PI | Phosphatidylinositol |
| PL | Phospholipase |
| PS | Phosphatidylserin |
| RES | retikuloendotheliales System |
| SGF | <i>simulated gastric fluid</i> , künstliche, humane Magenflüssigkeit |
| SIF | <i>simulated intestinal fluid</i> , künstliche, humane Darmflüssigkeit |
| SUV | <i>small unilamellar vesicle</i> , kleines unilamellares Vesikel |
| TEL | Tetraetherlipid |
| TMC | <i>N</i> -Trimethyl-chitosan |
| TPL | <i>total polar lipids</i> , Gesamtfraktion polarer (archaealer) Lipide |

Methoden

| | |
|--------|---|
| AFM | <i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie |
| cryoEM | elektronenmikroskopische Proben mit cryo-Fixierung |
| DLS | <i>dynamic light scattering</i> , dynamische Lichtstreuung |
| DSC | <i>differential scanning calorimetry</i> , dynamische Differenzkalorimetrie |
| EM | Elektronenmikroskopie |

| | |
|------|--|
| FFEM | <i>freeze fracture EM</i> , elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proben mit Gefrierbruch-Präparation |
| FTIR | Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie |
| SANS | <i>small-angle neutron scattering</i> , Kleinwinkelneutronenstreuung |
| SAXS | <i>small-angle x-ray scattering</i> , Kleinwinkelröntgenstreuung |
| SEC | <i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie |

Lipide

| | |
|------|--|
| DHPC | 1,2-Dihexadecyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |
| DLPC | 1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |
| DMPC | 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |
| DOPC | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |
| DOPE | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin |
| DOPS | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin |
| DPPC | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |
| DPPG | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) |
| DPPS | 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin |
| DSPE | 1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin |
| HSPC | <i>hydrogenated L-α-phosphatidylcholine (soy)</i> , hydriertes Phosphatidylcholin gewonnen aus der Sojabohne |
| POPC | 1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |

1. PHOSPHOLIPIDE UND IHRE MISCHBARKEIT IN MEMBRANEN

Einer der Gründe für die stetig zunehmende Popularität von Liposomen als Arzneistoffträgersystem ist die Biokompatibilität der Lipidvesikel. Liposomen stellen ein einfaches Modell natürlicher Biomembranen dar. Essentieller Bestandteil dieser Membranen oder Lipiddoppelschichten sind die Phospholipide, die sich in Phosphoglyceride und Sphingomyeline einteilen lassen.¹ Phospholipide aggregieren in wässrigen Lösungen oberhalb einer bestimmten Konzentration (*critical micelle concentration*, CMC, kritische Mizellkonzentration) auf Grund des hydrophoben Effekts mit der Bildung zusammengelagerter Aggregate.² Die Art der gebildeten Aggregate hängt dabei von der chemischen Struktur der Lipidmoleküle ab (siehe Abb. 1). Für monopolare, amphiphile Moleküle lässt sich die Aggregatstruktur mit Hilfe der Berechnung des Packungsparameters (P) abschätzen. Für die Berechnung benötigte Größen sind der Flächenbedarfswert der Kopfgruppen (A), die Länge der Alkylketten (l_c) sowie deren Volumenbedarf (V):

$$P = \frac{V}{A * l_c}$$

Je nach Betrag des Packungsparameters P und damit der chemischen Struktur der Lipidmoleküle, kommt es zur Ausbildung von Mizellen, Wurmmizellen, Lipiddoppelschichten bzw. inversen Mizellen.

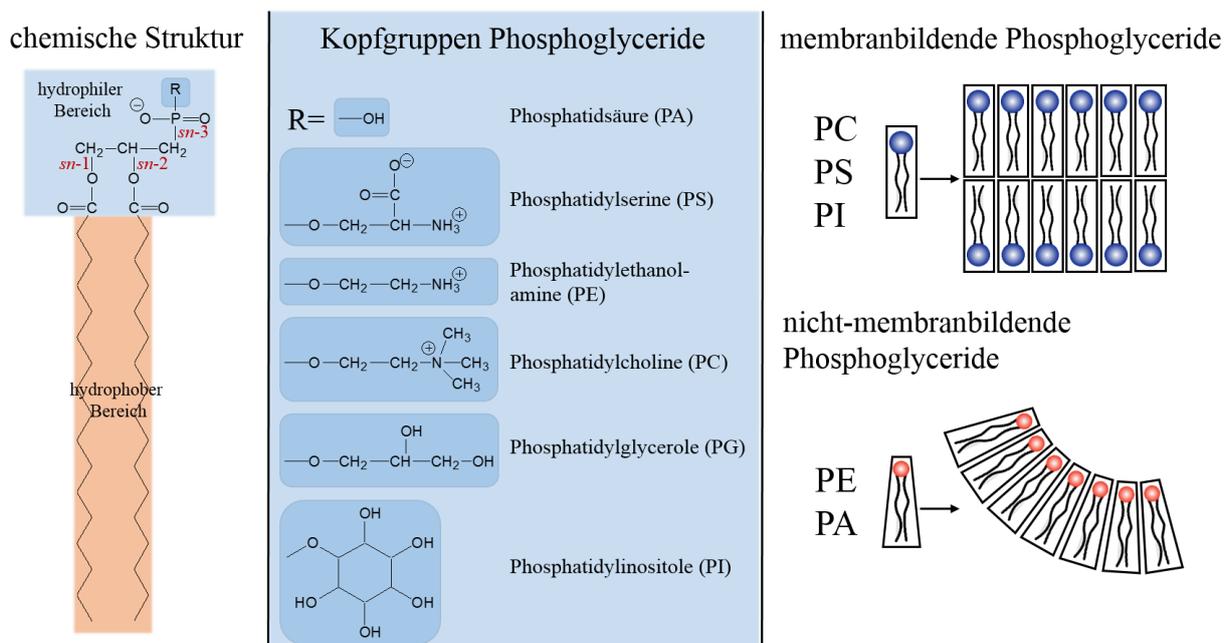


Abb. 1 Links: Chemische Struktur eines Phosphoglycerids mit hydrophobem Alkylkettenbereich (orange) und hydrophilem Kopfgruppenbereich (blau) sowie die stereospezifische sn-Konfiguration (rot). Mitte: Kopfgruppen verschiedener Phosphoglyceride. Rechts: Membranbildende und nicht-membranbildende Phosphoglyceride. Modifiziert nach OSMAN et al.³

Das Aggregationsverhalten wird dabei auch von der Konzentration der amphiphilen Moleküle, der Art sowie Ionenstärke des Lösungsmittels, dem pH-Wert und der Temperatur bestimmt. Innerhalb der Gruppe der Phospholipide neigen Phosphatidsäuren (PAs) und Phosphatidylethanolamine (PEs) auf Grund ihrer Molekülgeometrie zur Bildung mizellarer Aggregate (siehe Abb. 1). Phosphatidylcholine (PCs), Phosphatidylinositole (PIs) und Phosphatidylserine (PSSs) zeigen hingegen eine Aggregation in Lipiddoppelschichten.³ In diesen Lipiddoppelschichten sind die Alkylketten gegenüberliegender Lipide einander zugewandt; sie bilden den hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht. Die hydrophilen Kopfgruppen sind zur wässrigen, äußeren Phase gerichtet und bilden somit eine Grenzfläche. Die Lipiddoppelschicht ist kein starres Gebilde. Die einzelnen Lipidmoleküle besitzen eine hohe, laterale Beweglichkeit.⁴ Der Wechsel eines Lipidmoleküls von einer Seite der Lipiddoppelschicht zur anderen (Flip-Flop) ist im Vergleich zur lateralen Bewegung erheblich langsamer. Lipiddoppelschichten durchlaufen bei Temperaturänderungen polymorphe Phasen, die die Eigenschaften der Membranen stark beeinflussen können. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur (T_m), bei der der Übergang von der Gel- (L_β) zur flüssigkristallinen L_α -Phase stattfindet, hängt stark von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Alkylketten des Lipids ab. In der L_α -Phase kommt es zu einer hohen Beweglichkeit der Alkylketten auf Grund der Bildung von *gauche*-Konformeren in den Alkylketten der Lipide (siehe Abb. 2). Die Dicke der Lipiddoppelschicht in der L_α -Phase ist geringer als in den Gelphasen, da die Bildung von Rotationsisomeren in den Alkylketten die Kettenlänge reduziert. Für die Bestimmung von Phasenübergängen von Lipiden findet vor allem die Dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) Anwendung.

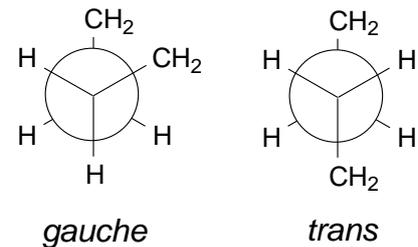


Abb. 2 NEWMAN-Projektion der *trans*- und einer möglichen *gauche*-Konformation eines Polymethylenkettensegments.

Biomembranen sind gewöhnlich aus komplexen Mischungen verschiedenster Lipide aufgebaut. Entmischungsprozesse bzw. sogenanntes *Clustering* der einzelnen Lipidkomponenten stellen einen wichtigen Aspekt beim Aufbau natürlicher Biomembranen dar – teilweise sind sie für die physiologische Funktion der Membran eine Voraussetzung.⁵⁻⁸ Trotzdem ist die Entmischung von Lipidkomponenten innerhalb der Lipidvesikel nicht immer erwünscht. So kann eine Domänenbildung innerhalb eines Liposoms zu einer erhöhten Permeabilität der Vesikel und damit einer veränderten Freisetzungskinetik verkapselter Arzneistoffe führen.⁹

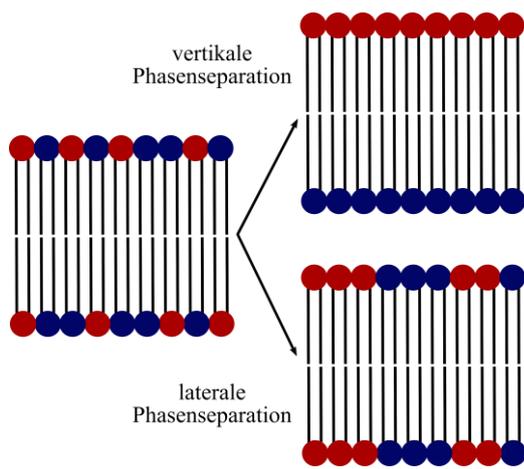


Abb. 3 Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht mit vertikaler und lateraler Phasenseparation. Modifiziert nach BINDER et al.⁵⁸

Phasenseparationen von Lipiden können in zwei Haupttypen unterschieden werden – die laterale und vertikale Phasenseparation (siehe Abb. 3). Beide Arten treten sowohl in biologischen als auch synthetischen Systemen (Vesikeln) auf. Selbst bei anfänglicher Mischbarkeit zweier Lipidkomponenten können zahlreiche äußere Faktoren wie Zugabe von Ionen, Änderung des pH-Werts und Adhäsion oder Insertion eines Polymers oder Proteins in die Lipiddoppelschicht zu einer Phasenseparation der Lipide führen.¹⁰ Die Mischbarkeit von

Lipiden innerhalb einer Lipiddoppelschicht kann in einem Phasendiagramm dargestellt werden (siehe Abb. 4). Ideale Mischbarkeit kann bei binären Mischungen von PCs beobachtet werden, die sich lediglich um zwei C-Atome in ihrer Länge unterscheiden; z.B. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC).¹⁰ Geht man von einer idealen Mischbarkeit von einer äquimolaren Mischung eines Lipids A mit niedriger Phasenumwandlungstemperatur und Lipid B mit einer höheren Phasenumwandlungstemperatur aus (siehe Abb. 4, rote Linie), liegen zunächst beide Lipide homogen in einer Gel-Phase vor. Beim Schmelzvorgang ändert sich fortwährend die Zusammensetzung von Gel- und flüssigkristalliner Phase. Oberhalb der Phasenumwandlung von Lipid B besitzt dann die flüssigkristalline Phase wieder die gleiche, äquimolare Zusammensetzung wie die Gel-Phase.

Eine ideale Mischbarkeit von Lipidkomponenten ist nicht immer der Fall. Oft kommt es zu Mischungslücken unter- und oberhalb der Phasenumwandlungen.¹⁰⁻¹³ Bei Lipiden mit gleichen Kopfgruppen und unterschiedlichen Kettenlängen kommt es auf

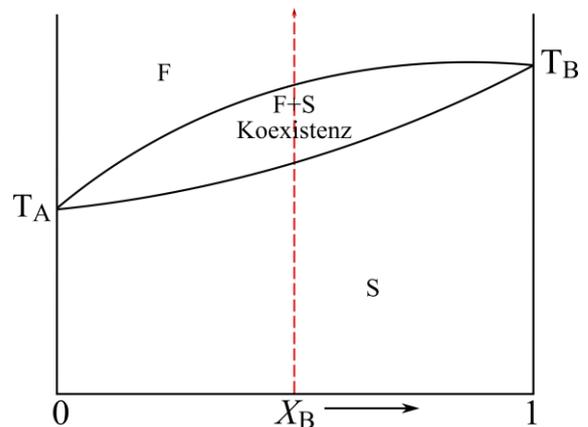


Abb. 4 Phasenverhalten einer Lipidmischung, bei der Lipid A und Lipid B sowohl in der Gelphase als auch im flüssigkristallinen Zustand in jedem Mischungsverhältnis homogen miteinander mischbar sind.

Grund der Fehlordnung ihrer Alkylketten zu Entmischungen.¹⁰ Phasenseparationen werden bei diesen Lipiden dann beobachtet, wenn sich die Kettenlängen um vier oder mehr CH₂-Gruppen

unterscheiden, z.B. bei der Mischung von 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) mit DPPC. Strukturelle Unterschiede des Lipid-Rückgrats führen ebenfalls häufig zu Entmischungen. Dies kann z.B. bei Mischungen von Ester- und Etherlipiden beobachtet werden.¹⁰ Phospholipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen zeigen untereinander ein sehr differenziertes Mischungsverhalten. Besonders schlecht mischbar sind PCs und PEs, besser mischbar sind PSs mit PEs sowie PEs mit PAs.¹⁰

Eine weit verbreitete Methode für die Charakterisierung von Lipidmischungen bezüglich Mischbarkeit ist die DSC. Bei dieser Methode wird eine Lipiddispersion in einem Kalorimeter aufgeheizt und unter anderem die Temperatur ermittelt, bei der endotherme und exotherme Prozesse stattfinden. So kann die Phasenumwandlungstemperatur und die Enthalpie der Phasenumwandlung eines Lipids oder einer Lipidmischung bestimmt werden. Die Hauptphasenumwandlungen der reinen Lipide DMPC und DPPC sind beispielsweise als endotherme Peaks bei $T_m = 24\text{ °C}$ und $T_m = 42\text{ °C}$ in einer entsprechenden Heizkurve sichtbar.¹⁴ Im Thermogram einer äquimolaren Mischung der beiden ideal mischbaren Lipide sind die Peaks der Reinsubstanzen nicht mehr detektierbar. Stattdessen ist ein breiter Peak zwischen 30-36 °C in der DSC-Heizkurve erkennbar.¹¹ Bei Entmischungen sind hingegen die Peaks der reinen Lipide im Thermogram einer Lipidmischung immer noch detektierbar – es bilden sich Domänen einer einzelnen Lipidkomponente durch Phasenseparation. Ein Beispiel hierfür sind Lipidmischungen aus DPPC und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (DPPS). Eine Mischung aus 34 mol% DPPC und 66 mol% DPPS zeigt im Thermogram einen breiten Peak zwischen 5 und 28 °C.¹⁰ Bei Zugabe von Ca^{2+} - Ionen kommt es zu einer Aufspaltung dieses Peaks in zwei separate Signale bei 29 °C und 42 °C. Auf Grund der Komplexbildung der PS-Carboxylgruppen mit den Calcium-Ionen haben sich durch Phasenseparation reine DPPC-Domänen gebildet, die bei 42 °C einen Phasenübergang zeigen.

Die Mischbarkeit von einzelnen Lipidkomponenten hat einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der aus der Lipidmischung hergestellten Liposomen. Eine ideale Mischbarkeit der Lipidkomponenten bei allen Temperaturen und in allen Mischungsverhältnissen führt zu stabilen Liposomen.¹⁶ Phasenseparationen der Lipidkomponenten führen hingegen zur Domänenbildung, abhängig davon in welchen Phasenlagen Entmischungen auftreten. Durch diese Phasenseparationen werden die physikochemischen Eigenschaften der Vesikel (Liposomen) wie Permeabilität und Größe beeinflusst.^{9, 16, 17}

Wenn beide Lipidkomponenten jedoch keinerlei Mischbarkeit zeigen, ist die Herstellung von stabilen Liposomen aus einer entsprechenden Lipidmischung nicht möglich. Dann kommt es

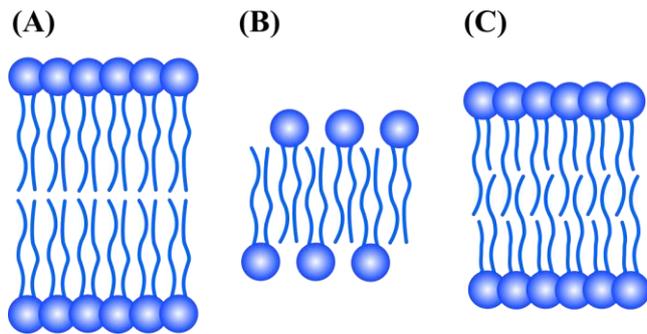


Abb. 5 Schematische Darstellung von Beispielen unterschiedlich angeordneter Lipidmoleküle. (A) Nicht-interdigitierte Anordnung, (B) Anordnung mit vollständig interdigitierten Alkylketten, (C) Anordnung mit partiell interdigitierten Alkylketten.

zur Bildung separater Aggregatformen. Ein Beispiel hierfür sind Lipidmischungen des Esterlipids DPPC und des analogen Etherlipids 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DHPC). Während DPPC in Lipiddoppelschichten aggregiert, kann im Falle des DHPC die Aggregation in lamellare Schichten mit interdigitierten Alkylketten beobachtet werden.¹⁰ Bei diesem Aggregationsverhalten schieben

sich die Alkylketten gegenüberliegender Lipidmoleküle ineinander (siehe Abb. 5B). Nicht nur Etherlipide zeigen auf Grund ihrer chemischen Struktur dieses Aggregationsverhalten. Interdigitation wird auch oft bei Lipiden mit unterschiedlichen Kettenlängen beobachtet. Die Einlagerung von Molekülen wie Lysolecithin, Ethanol oder Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht kann in der Entstehung von energetisch ungünstigen Hohlräumen in einer der Monoschichten resultieren, welche dann durch Lipidmoleküle der gegenüberliegenden Monoschicht ausgefüllt werden.^{18, 19} Somit entsteht auch durch äußere Faktoren eine interdigitierte Anordnung von Lipidmolekülen.

Die Betrachtungen in diesem Kapitel zeigen deutlich, welchen erheblichen Einfluss die Mischbarkeit von Lipidkomponenten in Liposomen auf die physikochemischen Eigenschaften und Stabilität der Vesikel hat. Weiterhin ist eine gewisse Mischbarkeit der einzelnen Lipidkomponenten eine Voraussetzung, um überhaupt stabile Liposomen herstellen zu können. Die Untersuchung der Mischbarkeit artifizieller Bolalipide mit konventionellen Phospholipiden ist daher ein essentieller Bestandteil dieser Dissertation.

2. LIPOSOMEN – CHARAKTERISIERUNG UND ANWENDUNG

Seit ihrer Entdeckung in den 1960er Jahren durch ALEC BANGHAM,²⁰ sind Liposomen intensiv untersucht und charakterisiert worden und gelten heute als das erfolgreichste Arzneistoffträgersystem weltweit.²¹ Liposomen bestehen aus einer oder mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten, die eine wässrige Phase einschließen (siehe Abb. 6). Sie können neben ihrer Lipidzusammensetzung, Oberflächenladung und Herstellungsmethode bezüglich ihrer Größe und Lamellarität klassifiziert werden (siehe Abb. 6). Liposomen für die pharmazeutische Anwendung besitzen meist einen Durchmesser von 50 bis 450 nm.²² Unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUVs) werden bevorzugt für die Verkapselung von hydrophilen Arzneistoffen verwendet, da sie ein großes Volumen für den Wirkstoff bereitstellen. Für lipophile Arzneistoffe eignen sich hingegen multilamellare Vesikel, da sich der Wirkstoff hier vor allem in die Lipiddoppelschichten einlagert.²³ Unilamellare und multilamellare Vesikel unterscheiden sich zudem in ihren Freisetzungskinetiken. Auf Grund der geringeren Lamellarität setzen unilamellare Vesikel verkapselte Substanzen schneller frei als Vesikel mit mehreren Lipiddoppelschichten.^{24,25} Für die Herstellung von Liposomen finden vor allem Phospholipide Anwendung.

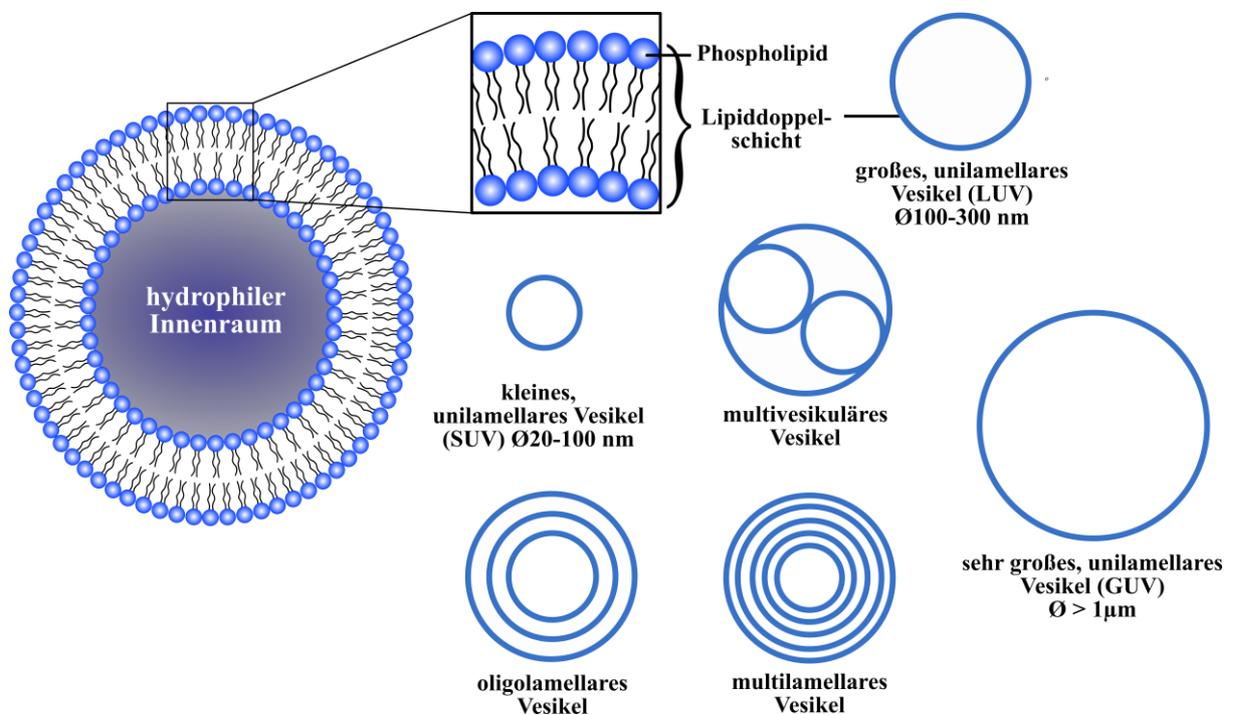


Abb. 6 Schematische Darstellung eines Phospholipid-Liposoms und dem Aufbau einer Lipiddoppelschicht sowie die Einteilung von Liposomen nach Lamellarität und Größe (Größenangabe Ø bezieht sich auf den Vesikeldurchmesser, Abbildung nicht maßstabsgetreu).

Die Anordnung bestimmter amphiphiler Phospholipide auf Grund des hydrophoben Effekts in wässrigen Lösungen führt zur spontanen Aggregation in vesikulären Strukturen (siehe auch Kapitel 1).² Die Struktur des Liposoms wird zudem über die VAN-DER-WAALS-Kräfte zwischen den Alkylketten der einzelnen Lipide und den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen des Dispersionsmittels und den polaren Kopfgruppen der Lipide stabilisiert.

Die Größe des Liposoms und die Organisation der Lipidmoleküle in der Lipiddoppelschicht wird von vielen weiteren Faktoren wie der Art der Herstellung oder der Temperatur während der Präparation der Liposomen bestimmt. Mittlerweile gibt es zahlreiche Verfahren und Protokolle zur Herstellung von Liposomen. Eine der gebräuchlichsten Techniken ist die Filmbildemethode nach BANGHAM,²⁰ bei der zu Beginn die entsprechenden Lipide in einem organischen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch dispergiert werden. Nach Entfernung des Lösungsmittels durch ein Inertgas entsteht ein Lipidfilm an der Innenseite des Probengefäßes. Bei der anschließenden Hydratisierung dieses Lipidfilms kommt es zur spontanen Ausbildung unterschiedlich großer Vesikel. Durch weitere Prozesse wie Extrusion, Ultraschall oder Hochdruckhomogenisation kann die Größe und die Größenverteilung der Liposomen an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden.

Die Eigenschaften der hergestellten Liposomen wie Größe, Oberflächenladung, Lamellarität oder Permeabilität können mittels zahlreicher Analyseverfahren untersucht werden. So kann die Form und Größe der Liposomen durch elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen visualisiert werden. Eine Kryo-Fixierung der Liposomen (cryoEM) erlaubt zudem eine Aussage über die Lamellarität der Liposomen, die bei Aufnahmen nach Präparation mit Negativ-Kontrastierung nicht möglich ist.²⁶ EM-Aufnahmen, die unter Zuhilfenahme der Gefrierbruch-Technik angefertigt werden (*freeze fracture* EM, FFEM), geben durch Begutachtung des Verlaufs der Bruchlinie zudem Aufschluss über die vertikale Stabilität der Lipiddoppelschichten.²⁷ Partikelgrößenmessungen von Liposomen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) nutzen die BROWNSche Molekularbewegung der Vesikel in der Probedispersion aus, welche Intensitätsfluktuationen des eingestrahnten Laserlichts verursacht. Aus diesen Fluktuationen wird der Diffusionskoeffizient der Partikel ermittelt, mit dem wiederum über die STOKES-EINSTEIN-Gleichung die Partikelgröße der Liposomen bestimmt werden kann.²⁸ Liposomen unterschiedlicher Partikelgröße können neben der Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung²⁹ über die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) voneinander getrennt werden.³⁰ Bei der SEC penetrieren die Partikel je

nach Größe unterschiedlich tief in die Poren eines Säulenmaterials – große Partikel eluieren somit früher als kleinere Teilchen.

Liposomen ähneln in ihrem Aufbau und ihren physikochemischen Eigenschaften biologischen Membranen.³¹ Dies macht sie als galenische Formulierung äußerst verträglich und physiologisch gut abbaubar. Neben ihrer guten Biokompatibilität weisen Liposomen eine hohe Verkapselungseffizienz für lipophile und hydrophile Substanzen auf; gleichzeitig schützen sie ihren Inhalt vor äußeren Einflüssen wie enzymatischem Abbau oder vorzeitigem Metabolismus im Organismus.^{32, 33, 34} Liposomale Formulierungen zeigen im Vergleich zum unverkapselten Arzneistoff eine höhere Bioverfügbarkeit sowie weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen.³⁵⁻⁴¹

Bis verkapselte Arzneistoffe aus den Liposomen freigesetzt werden, besitzt die Formulierung die pharmakokinetischen Eigenschaften der Nanopartikel und unterliegt somit auch dem EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*). Liposomen bis zu einer Größe von 500 nm können sich auf Grund der Fenestrierungen der Endothelzellen in Kapillargefäßen maligner Tumore in das Gewebe diffundieren und sich dort anreichern.⁴²⁻⁴⁵ Diese passive, gezielte Wirkstofffreisetzung ist das Prinzip der meisten intravenös verabreichten liposomalen Formulierungen.³¹

Die Größe der Liposomen ist nicht nur entscheidend für die Effizienz des EPR-Effekts, sondern auch für die Interaktionen mit dem körpereigenen Immunsystem. Je größer die Liposomen sind, desto schneller werden phagozytische Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) aktiviert und desto mehr Interaktionen mit Plasmaproteinen finden statt.^{39, 46-48}

Die Modifizierung von Liposomen mit Polyethylenglykolen (PEGs), welche erstmals in den frühen 90er Jahren durchgeführt wurde, erhöht die Blutzirkulation intravenös verabreichter Liposomen erheblich, indem sie die Liposomen unkenntlich für Makrophagen macht.⁴⁹⁻⁵² Doxil[®] ist ein Beispiel für eine PEGylierte, liposomale Formulierung, die seit mehr als 20 Jahren erfolgreich für die Behandlung von z.B. Brustkrebs zugelassen ist.⁵³

Neben der Größe der Vesikel beeinflusst auch die Oberflächenladung der Liposomen ihre Pharmakokinetik. Während eine negative Ladung der Liposomen zu einem schnellen Abbau und zu einer Opsonierung durch das Immunsystem bis hin zu pseudoallergischen Reaktionen führt, interagieren positiv geladene Liposomen mit Zellen und werden auf Grund der elektrostatischen Interaktionen zwischen kationischen Lipiden und negativ geladenen Nukleinsäuren für den Gentransfer genutzt.⁵⁴⁻⁵⁶ Zudem verhindert eine einheitlich positive oder negative Oberflächenladung der Liposomen durch elektrostatische Abstoßung eine

Aggregation der Vesikel innerhalb der Vesikelsuspension und führt damit zu einer erhöhten Lagerstabilität der liposomalen Formulierung.

Nachdem Doxil® 1995 als erste liposomale Formulierung die Zulassung durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) erhalten hatte, kam es in der Folge zur Entwicklung weiterer, liposomaler Formulierungen, die sich bis in die Gegenwart fortsetzt. Einige Beispiele für liposomale Formulierungen in der klinischen Anwendung sowie in klinischen Testphasen sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die Applikation liposomaler Formulierungen auf intravenösem (i.v.) Weg steht hierbei nach wie vor im Vordergrund. Auch Formulierungen für die intramuskuläre (i.m.) Anwendung wie Epaxal® sind bereits zugelassen. Weiterhin macht sich die Firma AGI Dermatics Inc. bei ihrer experimentellen, liposomalen T4N5 Lotion die ausgezeichnete Penetration von Vesikeln durch die oberste Hautschicht zu Nutze. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass bisher noch keine liposomale Formulierung für die orale Anwendung den Weg in die klinische Testung gefunden hat. Die Gründe hierfür liegen vor allem in der geringen Stabilität der Liposomen im Gastrointestinaltrakt (GIT).

Tab. 1 Ausgewählte, liposomale Formulierungen, die entweder bereits zugelassen sind oder sich noch in der klinischen Testung befinden. Modifiziert nach BULBAKE et al.⁵⁷ i.v.= intravenös, i.m. = intramuskulär

| Applikation | Produktname, Firma | Arzneistoff | Lipidzusammensetzung | Indikation | Referenz |
|--------------------------|---|---------------------------------------|---|--|----------|
| zugelassen | | | | | |
| i.v. | Vyxeos® (2017), Jazz Pharmaceuticals | Dauno- rubicin/Cyta- barin | DSPC, DSPG, cholesterol | Sekundäre, akute myeloische Leukämie | 58, 59 |
| epidural | DepoDur™ (2004), Skypharma Inc | Morphin | DOPC, DPPG, Cholesterol und Triolein | Schmerztherapie | 60 |
| i.v. | Doxil® (1995), Sequus Pharmaceuticals | Doxorubicin | HSPC, Cholesterol, PEG-2000-DSPE | Brustkrebs Kaposi-Sarkom | 53, 61 |
| i.m. | Epaxal® (2006), Crucell, Berna Biotech | inaktiviertes Hepatitis A Virus | DOPC, DOPE | Hepatitis A | 62, 63 |
| klinische Testung | | | | | |
| pulmonal | Arikace , Transave Inc. | Amikacin | DPPC, Cholesterol | Lungen- infektionen | 64 |
| topisch | T4N5 liposomale Lotion , AGI Dermatics Inc. | T4 Endo- nuclease V | Ei-Lecithin | Xeroderma pigmentosum | 65 |
| i.v. | SPI-077 , Alza Corporation | Cisplatin | Sojabohnen- Phosphatidylcholin, Cholesterol | Lungenkrebs, Kopf – und Halskrebs | 66 |
| i.v. | Endotag , Medigene | Paclitaxel | DOTAP, DOPC | Brustkrebs | 57, 67 |

3. ORALE ANWENDUNG VON LIPOSOMEN – HÜRDEN UND CHANCEN

3.1 PHYSIOLOGISCHE BARRIEREN FÜR ORAL VERABREICHTE LIPOSOMEN

Die orale Applikation von Arzneistoffen ist komfortabel, schmerzfrei, limitiert die Übertragung von Infektionskrankheiten und kann durch den Patienten selber durchgeführt werden.⁶⁸⁻⁷⁰ Dies führt zu einer besonders hohen Zuverlässigkeit der Einnahme und damit zu einem höheren Therapieerfolg. Trotz dieser Vorteile und der zahlreichen liposomalen Formulierungen, die sich derzeit auf dem Markt oder in der klinischen Testung befinden (siehe Tab. 1, Kapitel 2), ist derzeit noch kein Produkt für die orale Anwendung zugelassen. Grund hierfür sind die zahlreichen physikalischen und biologischen Barrieren des GIT für den Transport und die Absorption der lipidhaltigen Nanoformulierungen (siehe Tab. 2).

Die Verdauung von Lipiden beginnt bereits in der Mundhöhle durch sogenannte unspezifische Zungengrundlipasen.⁷¹⁻⁷³ Durch diese Lipasen wird die anschließende Fettverdauung im Magen unterstützt. Diese Verdauung erfolgt neben der lingualen und gastrischen Lipase durch die Peristaltik und einem pH-Wert von 1-3 – je nach vorher erfolgter Nahrungsaufnahme. Die lingualen und gastrischen Lipasen besitzen eine hohe Affinität zu Triglyceriden wohingegen Phospholipide kein Substrat dieser Enzyme sind.⁷⁴

Tab. 2 Absorptionsbarrieren für oral verabreichte Triglyceride und phospholipidhaltige Nanoformulierungen.

| Lokalisation der Barriere | Spezifikation der Absorptionsbarriere | Einfluss auf Triglyceride | Einfluss auf Phospholipide und entsprechende Nanoformulierungen |
|---------------------------|---------------------------------------|--|--|
| Mund | Zungengrundlipase | enzymatische Hydrolyse an <i>sn</i> -3 | - |
| Magen | pH 1 - 3 | saure Hydrolyse | saure Hydrolyse, Destabilisierung von Nanopartikeln |
| | gastrische Lipase | enzymatische Hydrolyse an <i>sn</i> -3 | - |
| | Magenperistaltik | Emulgieren zu Lipidtröpfchen | Anordnung um Lipidtröpfchen |
| Darm | pankreatische Lipase und Colipase | enzymatische Hydrolyse an <i>sn</i> -1 und <i>sn</i> -3 | - |
| | Phospholipasen | - | enzymatische Hydrolyse an <i>sn</i> -1 (PLA1) und <i>sn</i> -2 (PLA2) |
| | Gallensalze | Solubilisierung von Monoacyllipiden und freien Fettsäuren zu Mischmizellen | Solubilisierung von Monoacyllipiden und freien Fettsäuren zu Mischmizellen, Solubilisierung von Nanopartikeln |
| | Mucus | Penetrationsbarriere, Aufnahme von Monomeren freier Fettsäuren und Monoacylglycerole über aktive und passive Mechanismen | Penetrationsbarriere, Aufnahme von Monomeren freier Fettsäuren und Lyso-PC über aktive und passive Mechanismen |
| | Epithelschicht | Penetrationsbarriere, Aufnahme Monomere freier Fettsäuren und Monoacylglycerole über aktive und passive Mechanismen | Penetrationsbarriere, unklarer Absorptionsmechanismus lipidhaltiger Nanoformulierungen |
| | transmembranärer Efflux | - | Ausschleusen verkapselter Arzneistoffe zurück in das Darmlumen |

In Folge des niedrigen pH-Werts im Magen werden die Ester der Lipide durch saure Hydrolyse gespalten. Durch die hohe Protonenkonzentration im sauren Milieu des Magens kommt es außerdem zu einer Destabilisierung der Lipidmembran liposomaler Formulierungen.^{75, 76} Im Magen entsteht zudem durch die vorhandene, ausgeprägte Peristaltik eine Emulsion der Lipide. So verlassen die Nahrungsfette die Magenpassage als fein verteilte Lipidtröpfchen und gelangen in den Dünndarm.

Die Absorption oral verabreichter Substanzen findet hauptsächlich im Dünndarm statt.⁷⁷⁻⁸⁰ Durch die Anwesenheit von freien Fettsäuren kommt es im Darmlumen zur Freisetzung des Gewebehormons Cholecystokin. Dieses stimuliert wiederum die Bauchspeicheldrüse und die Gallenblase, welche daraufhin Lipasen und Gallensalze in den Dünndarm sekretieren. Der amphiphile Charakter der Gallensalze ermöglicht es diesen Substanzen, Nahrungsfette zu emulgieren. Dieses Emulgieren erleichtert den enzymatischen Verdau der Lipide erheblich.

Die pankreatische Lipase katalysiert die enzymatische Hydrolyse des größten Teils oral aufgenommener Triglyceride. Die Triglyceride werden durch die Lipase vorzugsweise in *sn*-1 und *sn*-3 Position gespalten und es entstehen freie Fettsäuren und 2-Monoacylglycerole; Phospholipide sind resistent gegenüber dem enzymatischen Verdau durch die pankreatische Lipase. Die Verdauung der

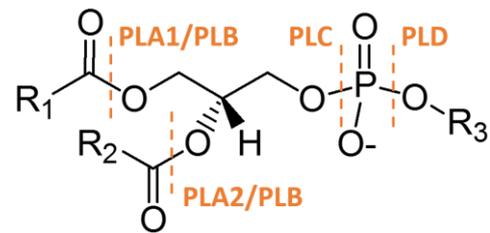


Abb. 7 Schematische Darstellung der Angriffspunkte der unterschiedlichen Phospholipasen am Phospholipid-Molekül. PL = Phospholipase, R1, R2 = Fettsäurerest, R3 = Kopfgruppenrest

Phospholipide im Darmlumen findet hauptsächlich durch die Phospholipasen (PL) statt (siehe Abb. 7). Die PLA besitzt je nach Art und Lokalisation im Organismus unterschiedliche Aufgaben. Die PLA1 hydrolysiert die Esterbindung einer Fettsäure an *sn*-1, PLA2 spaltet die Bindung an *sn*-2. Die PLB kann die Esterbindung sowohl an *sn*-1- als auch an *sn*-2-Position spalten und spielt wie die PLA1 und PLA2 eine wichtige Rolle bei der Verwertung von Nahrungsfetten. Die PLC spaltet die Bindung zwischen dem Glycerolsauerstoff und dem Phosphoratom der Phospholipide und spielt keine Rolle bei dem Verdau von Lipiden, sondern bei der Signaltransduktion.⁸¹ Durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat mittels PLC entstehen Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin, welche beide als Botenstoffe fungieren. Auch die PLD, die PC zu PA und Cholin spaltet, ist an der Signaltransduktion im Organismus beteiligt.⁸²

Eine weitere physiologische Barriere für oral verabreichte, liposomale Formulierungen ist der Mukus und das darunterliegende Epithel des Dünndarms. Der sich schnell regenerierende

Mucus besitzt eine komplexe Hydrogel-Struktur, bestehend aus Proteinen und Kohlenhydraten, und hat eine negative Oberflächenladung.⁸³ Bisher ist nicht klar, ob Arzneistoffe vor der Absorption durch die Epithelbarriere aus den Liposomen freigesetzt werden oder ob sie gemeinsam mit den Liposomen resorbiert werden.⁸⁴ Nanoformulierungen sollten somit nicht nur eine gute Adhärenz zum Mucus aufweisen, sondern auch schnell durch sie hindurchgelangen, um das darunterliegende Epithel zu erreichen.⁸⁵⁻⁸⁷ Die Epithelschicht stellt nach wie vor eine der anspruchsvollsten Barrieren für Nanoformulierungen dar.

Auch Metabolismus und Efflux beeinflussen die Absorptionsrate von oral verabreichten Liposomen. Effluxpumpen wie P-Glykoprotein schleusen bereits absorbierte Arzneistoffe wieder in das intestinale Lumen zurück und können somit die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen stark herabsetzen.⁸⁸

3.2 KONZEPTE FÜR DIE STABILISIERUNG ORAL VERABREICHTER LIPOSOMEN

Wie im vorangegangenen Kapitel deutlich geworden ist, sind bei der Applikation oral verabreichter Liposomen vor allem zwei Hürden zu überwinden: die geringe Stabilität konventioneller Phospholipide im GIT und die geringe Absorption der Liposomen aus dem Darmlumen. In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen auf unterschiedliche Weise mit diesen beiden Aspekten auseinandergesetzt und vielfältige Ansätze für die Stabilisierung von Liposomen entwickelt.

Um das Dünndarmepithel überhaupt zu erreichen, ist die Stabilität oral verabreichter Liposomen gegen die unterschiedlichen Verdauemedien im GIT eine Voraussetzung. Um den Verdau der Lipide im GIT zu verhindern oder zumindest zu minimieren, kann die Zusammensetzung der Liposomen variiert werden. Liposomen, welche aus Phospholipiden mit hoher Phasenumwandlungstemperatur (z.B. DPPC) hergestellt wurden, zeigten in zahlreichen Studien eine höhere Stabilität gegenüber Gallensalzen im Vergleich zu Liposomen aus Lipiden mit niedriger Phasenumwandlungstemperatur.⁸⁹⁻⁹³ Auch der Zusatz von Cholesterol erhöht die Stabilität von Liposomen für die orale Anwendung.⁹⁴⁻⁹⁶ Weiterhin kann durch das Zumischen von Stearylaminen in die Liposomenmembran und der daraus resultierenden positiven Ladung der Vesikel der enzymatische Verdau von verkapseltem Insulin unterbunden und damit die Senkung des Blutzuckerspiegels erhöht werden.^{97, 98}

Die Solubilisierung von Lipiden durch Gallensalze wird als größter Faktor für die Instabilität von Phospholipid-Liposomen im GIT betrachtet.^{89, 99-101} Umso paradoxer erscheint es, dass die Inkorporation von Gallensalzen in die Liposomenmembran zu einer Stabilisierung der Vesikel

führt.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Gallensalze führen im GIT zu einer Solubilisierung von Lipiden in Form von Mischmizellen. Die Tendenz der im GIT sezernierten Gallensalze mit Phospholipiden zu interagieren und damit die Integrität der Liposomenmembran zu zerstören, wird durch die bereits erfolgte Inkorporation von Gallensalze in die Lipidmembran verhindert.^{104, 105} Auf diese Weise sind zahlreiche, gallensalzhaltige Liposomen (sogenannte *Bilosomen*) für die orale Immunisierung und die Verkapselung schwerlöslicher Arzneistoffe und Biomakromoleküle hergestellt und untersucht worden.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Es konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise verkapseltes Insulin vor dem Abbau diverser Enzyme geschützt wird, was wiederum in einer erhöhten Bioverfügbarkeit des Peptidarzneistoffs resultiert.¹⁰⁹

Die PEGylierung der Liposomenoberfläche bewahrt die Vesikel nicht nur vor einem Abbau durch Immunzellen im Blutkreislauf, sondern erhöht auch deren Stabilität im GIT gegenüber Gallensalzen.¹¹⁰ Ursache hierfür ist die ausgeprägte Hydrathülle, die sich auf Grund der Polymere um das Liposom aufbaut und die Interaktion der Gallensalze mit der Liposomenmembran verhindert.¹¹¹ Dies wiederum verlängert die Verweildauer der Liposomen im Dünndarm und erhöht damit auch die Wahrscheinlichkeit für eine Resorption. Studien mit verkapseltem Insulin oder rekombinantem, humanem EGF (*epidermal growth factor*, epidermaler Wachstumsfaktor) zeigten vielversprechende Ergebnisse.^{33, 112-115}

Andere Materialien zur Oberflächenmodifikation liposomaler Formulierungen sind Alginate¹¹⁶ und Pektine,¹¹⁷ die gleichzeitig mukoadhäsive Eigenschaften aufweisen. Auch Eudragite wurden bereits zur Stabilisierung liposomaler Formulierungen eingesetzt.¹¹⁸ Das Polysaccharid Chitosan ist eines der am häufigsten verwendeten Polymere für die Modifikation liposomaler Formulierungen.⁷⁵ Chitosan ist positiv geladen und wird in den meisten Fällen über elektrostatische Bindungen an negativ geladenen Liposomen fixiert. Auf Grund der positiven Ladung kann Chitosan an dem negativ geladenen Mukus im Dünndarm binden. Da Chitosan eine schwache Base ist, besteht die Möglichkeit, dass es im neutral und schwach basischen Milieu, wie den oberen Darmabschnitten vorliegend, seine positive Ladung verliert. *N*-Trimethyl-Chitosane (TMC) sind dreifach methylierte Chitosane mit einer vom pH unabhängigen, positiven Ladung. Mit TMC-überzogenen Liposomen konnten bereits einige sehr vielversprechende Resultate generiert werden.¹¹⁹⁻¹²²

Ein weiterer, vielversprechender Ansatz ist die Beladung der Liposomenoberfläche mit Liganden, die an Epithelzellen binden. Da viele Lipide und Proteine im GIT glykosyliert sind, werden oft Lectine verwendet, um Liposomenoberfläche zu modifizieren: Lectine binden spezifisch an Glykanen,^{123, 124} Mannose-Liganden binden an die entsprechenden Rezeptoren

auf antigenpräsentierenden Zellen.^{125, 126} Auch Antikörper werden verwendet, um die Resorption von Liposomen aus dem GIT zu erhöhen.¹²⁷

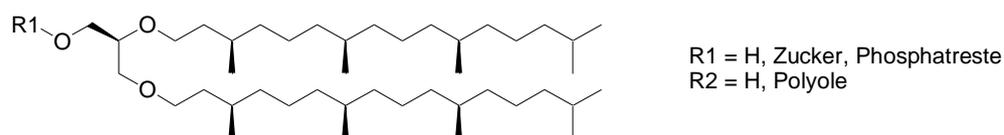
Ein weiterer, sehr vielversprechender Ansatz für die Stabilisierung liposomaler Formulierungen ist die Inkorporation von extrahierten oder synthetisch hergestellten, archaealen Lipiden (siehe auch Kapitel 4.1). Die außerordentliche Stabilität der entstehenden Archaeosomen macht diese Vesikel zu einem vielversprechenden Arzneistoffträger für die orale Anwendung. LI *et al.* zeigten mit Insulin-haltigen Vesikeln bestehend aus extrahierten, archaealen Lipiden eine signifikante Reduzierung des Blutzuckerspiegels im Vergleich zu unmodifizierten Phospholipid-Vesikeln.¹²⁸ PARMENTIER *et al.* konnten eine vierfach höhere Bioverfügbarkeit von Octreotid durch dessen Verkapselung in Liposomen mit extrahierten Tetraetherlipiden (TELs) erreichen.⁹⁰ Die Arbeitsgruppe von YANG zeigte zudem vielversprechende Resultate für die Verkapselung von drei unterschiedlichen Arzneistoffen in Liposomen mit synthetisch hergestellten TELs vor allem bezüglich der Dauer der Retention der Arzneistoffe in den Vesikeln und der Zytotoxizität der artifiziellen Lipide.¹²⁹ Im folgenden Kapitel sollen nun die archaealen Lipide, die auch als Bolalipide bezeichnet werden, näher erläutert werden.

4. BOLALIPIDE UND IHRE VERWENDUNG ZUR LIPOSOMENFORMULIERUNG

4.1 ARCHAEALE LIPIDE UND ARCHAEOSOMEN

Archaeale Lipide unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur von denen der Eukaryonten und begründen somit unter anderem die Zugehörigkeit der Archaeen zu einer dritten Domäne des Lebens.¹³⁰ Die archaealen Lipide zeichnen sich durch gesättigte, isoprenoide Ketten aus, die über Etherbindungen an Glycerol-1-phosphat gebunden sind (siehe Abb. 8). Eukaryotische Lipide besitzen hingegen überwiegend unverzweigte Fettsäureketten, die mit Glycerol-3-phosphat verestert sind.

Archeaeol (Dietherlipide)



Caldarcheaeol (Tetraetherlipide)

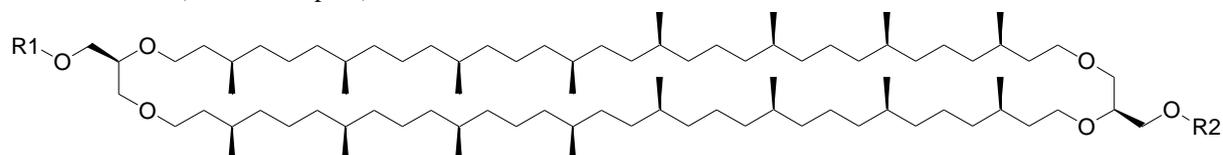


Abb. 8 Grundstrukturen der natürlichen, archaealen Lipide. Die Variabilität der Lipide ergibt sich durch die Modifikation der Alkylketten sowie die Substitution der Kopfgruppen durch Zucker, Phosphatreste und Polyole.

Auf Grund einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Hydrolyse und enzymatischer Spaltung tragen die Etherbindungen der archaealen Lipide zur Stabilität der Zellmembranen dieser Mikroorganismen bei.¹³⁰⁻¹³² Ausgehend von dieser Grundstruktur existieren abhängig von Art und Lebensraum der Archaeen zahlreiche Modifikationen und Abwandlungen der archaealen Membranlipide. Üblich ist dabei die Einteilung in die Dietherlipide (Archeaeol) und deren Dimere, die TELs (Caldarchaeol, siehe Abb. 8). Ungesättigte Dietherlipide konnten in Zellmembranen kryophiler Archaeen gefunden werden, die bei Temperaturen bis -20 °C überleben können.¹³³ Größere Variationen findet man in der Gruppe der membrandurchspannenden TELs. Neben zahlreichen Modifikationen der Lipidkopfgruppen mit Polyolen oder Zuckern, ist die Einführung von Cyclopentanringen in die Alkylketten ein Merkmal für Archaeen, die bei besonders hohen Temperaturen gedeihen.^{134, 135} Dabei werden

umso mehr Ringe in die Ketten eingebaut, je höher die Temperatur während des Wachstums der Mikroorganismen ist. Beobachtet wurde ein Maximum von 8 Ringen bei einer Wachstumstemperatur von 121 °C.¹³¹ Diese Modifikation führt zu einer Rigidität und hohen Stabilität der Zellmembran.¹³⁶ Es konnte gezeigt werden, dass die bevorzugte Aggregation der TELs in Monoschichten¹³⁷ einen erheblichen Beitrag zur Resistenz der archaealen Zellmembranen gegen äußeren, mechanischen Stress leistet.¹³⁶ Diese Eigenschaften archaealer Lipide bewirken nicht nur eine thermische Stabilität der Zellmembranen, sondern auch eine geringere Protonenpermeabilität.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Dies ist besonders wichtig für acidophile Archaeen, die bei niedrigen pH-Werten gedeihen. Die Biosynthese der Membranlipide in den Archaeen ist in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht und zum größten Teil aufgeklärt worden. Einige Abschnitte der Synthese, so auch die Herstellung der zyklischen TELs, sind jedoch nach wie vor noch unklar.¹³¹

Auf Grund ihrer stabilisierenden Eigenschaften sind gerade die TELs in den letzten Jahren interessant für die biotechnologische und biomedizinische Forschung geworden.^{95, 129, 141-144} Dies betrifft vor allem die Entwicklung liposomaler Formulierungen, die durch TELs stabilisiert sind. Liposomen, die aus extrahierten, archaealen Lipiden hergestellt wurden, werden als Archaeosomen bezeichnet. Teilweise umfasst diese Bezeichnung auch Vesikel, die artifizielle Lipide enthalten, welche die Charakteristika archaealer Lipide wie Etherbindungen und die *sn*-2,3-Konfiguration aufweisen.^{145, 146} Die Gewinnung natürlicher, archaealer Lipide erfolgt auch heute noch über die Extraktion mittels organischer Lösungsmittel aus dem Zellmaterial. Die gewonnenen Gesamtlipide machen dabei nur 4 % der Zellmasse aus und werden noch einmal in die neutrale Lipidfraktion und die polare Lipidfraktion (*total polar lipids*, TPL) eingeteilt.¹⁴⁷ Je nach Typ der Archaeen, aus denen die Lipidfraktion extrahiert wurde, kann die TPL verschiedene Lipide in unterschiedlichen Anteilen umfassen. Diese Zusammensetzung bestimmt dabei die physikochemischen Eigenschaften des Lipidextraktes und damit auch die Eigenschaften der anschließend hergestellten Archaeosomen.

In zahlreichen Studien zur Stabilität von Archaeosomen aus natürlichen, archaealen Lipiden konnte gezeigt werden, dass ein höherer Anteil an Caldarchaeol der TPL zu einer höheren thermischen Stabilität,^{148, 149} einer geringeren Protonen-Permeabilität^{140, 148} und einer höheren Serumstabilität¹⁵⁰ der hergestellten Archaeosomen führt. Dies ist auf die stabilisierenden Eigenschaften der membrandurchspannenden TELs zurückzuführen. Archaeosomen aus Lipidextrakten von Archaeen mit besonders hohem Gehalt an Caldarchaeol (z.B. *Thermoplasma acidophilum*, 90 % Standard Caldarchaeol¹⁵¹) zeigten zudem im Vergleich zu

unmodifizierten Phospholipid-Liposomen eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Verdau¹⁵⁰ und Gallensalzen.¹⁵² Archaeale Lipide zeigten im Tierversuch weder bei i.v.-Gabe noch bei oraler Applikation Zelltoxizität.¹⁵³ Auf Grund der erhöhten thermischen Stabilität von Archaeosomen gegenüber konventionellen Liposomen besteht zudem die Möglichkeit, liposomale Formulierungen aus TELs nach der Herstellung mittels eines Autoklaven zu sterilisieren, ohne dass Fusion oder Aggregation der Vesikel auftreten.¹⁵⁴

Diese Eigenschaften der Archaeosomen führten in den letzten Jahren zu einer Reihe experimenteller, liposomaler Formulierungen mit extrahierten, archaealen Lipiden für unterschiedliche Indikationen. Arbeitsgruppen wie XU *et al.* sowie FRICKER *et al.* verwendeten extrahierte Lipidfraktionen für die Entwicklung von experimentellen, oralen, liposomalen Formulierungen und haben bereits erfolgreich Arzneistoffe wie Insulin, Octreotid und Myrcludex B in diese Vesikel verkapselt.^{90, 128, 144, 155, 156}

Weitere Beispiele für experimentelle, liposomale Formulierungen mit extrahierten, archaealen Lipiden sind in Tab. 3 aufgeführt. Trotz der vielversprechenden Resultate von Archaeosomen in der Verwendung als Arzneistoffträgersystem, ist die Gewinnung der archaealen Lipide ein kritischer Punkt. Auf Grund der geringen Ausbeute der Lipide im Vergleich zum Zellmaterial sowie den anspruchsvollen Wachstumsbedingungen der Archaeen ist die Extraktion archaealer Lipide äußerst kostenintensiv. Dieser Aspekt führte in den vergangenen Jahrzehnten zur Entwicklung von Strategien für die vollsynthetische Herstellung der TELs.^{139, 157-162}

Tab. 3 Ausgewählte, experimentelle Archaeosomen-Formulierungen, hergestellt mit extrahierten, archaealen Lipiden.

| Arzneistoff | Indikation | Effekt | Referenz |
|--------------------------|-------------------|--|--|
| Ovalbumin | Krebstherapie | Modulation der primären bzw. angeborenen Immunantwort | KRISHNAN <i>et al.</i> (2003) ¹⁶³ |
| Betamethason | Entzündung | erhöhte Anreicherung und Penetration des Wirkstoffs in die Haut, v.a. Epidermis | GONZÁLEZ-PAREDES <i>et al.</i> (2010) ¹⁶⁴ |
| Insulin | Diabetes mellitus | Stabilität bei oraler Anwendung im GIT, geringe Permeabilität durch das Darmepithel | LI <i>et al.</i> (2010) ¹²⁸ |
| Concanavalin A | Entzündung | gezielter Transport und Anreicherung von Concanavalin im entzündeten Gewebe oder in Tumoren | OZCETIN <i>et al.</i> (2011) ¹⁶⁵ |
| Paclitaxel | Brustkrebs | Reduzierung der Nebenwirkungen und Erhöhung des therapeutischen Index | ALAVI <i>et al.</i> (2014) ¹⁶⁶ |
| Somatotropin | Kleinwuchs | erhöhte Bioverfügbarkeit im Vergleich zu konventionellen, liposomalen Formulierungen | PARMENTIER <i>et al.</i> (2014) ¹⁴⁴ |
| Myrcludex B | Hepatitis B | erhöhte, orale Bioverfügbarkeit im Vergleich zum freien Peptid und konventionellen, liposomalen Formulierungen | UHL <i>et al.</i> (2016) ¹⁴¹ |
| Rifampicin/ Isoniazid | Tuberkulose | höhere Verkapselungseffizienz der beiden Arzneistoffe im Vergleich zu konventionellen Liposomen | ATTAR <i>et al.</i> (2018) ¹⁶⁷ |

BENVEGNE *et al.* beschäftigen sich seit Jahren mit der Synthese von TELs und deren Verwendung zur Modifikation von Liposomen hinsichtlich der Stabilisierung für die orale Anwendung.^{157, 158} Auch LERICHE *et al.* verkapselten bereits erfolgreich Arzneistoffe wie Vincristin und Methotrexat in Liposomen, die synthetisch hergestellte TELs enthalten und für die i.v.-Applikation gedacht sind.¹⁵⁹ Auf Grund der strukturellen Komplexität dieser Lipide ist jedoch ihre Synthese sehr zeitaufwändig und damit ebenfalls mit hohen Kosten verbunden. Die Synthese strukturell vereinfachter Analoga der TELs ist somit ein vielversprechender Ansatz. Die Herausforderung dabei ist, dass die artifiziellen Bolalipide trotz ihrer vereinfachten chemischen Struktur weiterhin die stabilisierenden Eigenschaften der natürlichen, archaealen Lipide aufweisen sollten. Im folgenden Kapitel soll ein kurzer Abriss der artifiziellen Bolalipide, die in der Arbeitsgruppe DOBNER/DRESCHER (Biochemische Pharmazie/Biophysikalische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bereits synthetisiert und charakterisiert wurden, gegeben werden. Der Fokus soll dabei auf deren Mischbarkeit mit klassischen Phospholipiden liegen.

4.2 ARTIFIZIELLE BOLALIPIDE UND IHRE MISCHBARKEIT MIT PHOSPHOLIPIDEN – EIN RÜCKBLICK

Wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, ist die Synthese vereinfachter Analoga archaealer Lipide für den Einsatz in der pharmazeutischen Technologie ein vielversprechender Ansatz. Diese Dissertationsschrift knüpft an die zahlreichen Studien über das Aggregationsverhalten synthetisierter Bolalipide sowie deren Mischungsverhalten mit konventionellen Lipiden an. Das artifizielle Bolalipid PC-C32-PC, erstmals 1996 durch HEISER *et al.* synthetisiert, stellt dabei eines der einfachsten Modelllipide dar.¹⁶⁸ Es besteht aus zwei PC-Kopfgruppen, die über eine C32-Alkylkette miteinander verbunden sind (siehe Abb. 9A). Dieses Lipidmolekül aggregiert bei Raumtemperatur in wässriger Dispersion in Netzwerken aus helikal aufgebauten Nanofasern, was die Gelierung der Probenlösung zur Folge hat. Bei der Erwärmung der Probenlösung über 50 °C findet eine Phasenumwandlung statt, bei der sich die Aggregation des Lipids PC-C32-PC von Fasern zu Mizellen ändert (siehe Abb. 9B). Dies hat zur Folge, dass auch der Gelcharakter der Probenlösung verloren geht. Zwischen 65 °C und 85 °C ist eine weitere, breite Phasenumwandlung des Lipids detektierbar (siehe Abb. 9B). Sowohl unterhalb als auch oberhalb dieser zweiten Phasenumwandlung sind mizellare Aggregate vorhanden, was durch EM-Aufnahmen und Messungen mittels Kleinwinkelneutronenstreuung (*small-angle neutron scattering*, SANS) einer wässrigen Dispersion des Lipids belegt werden konnte.^{169, 170}

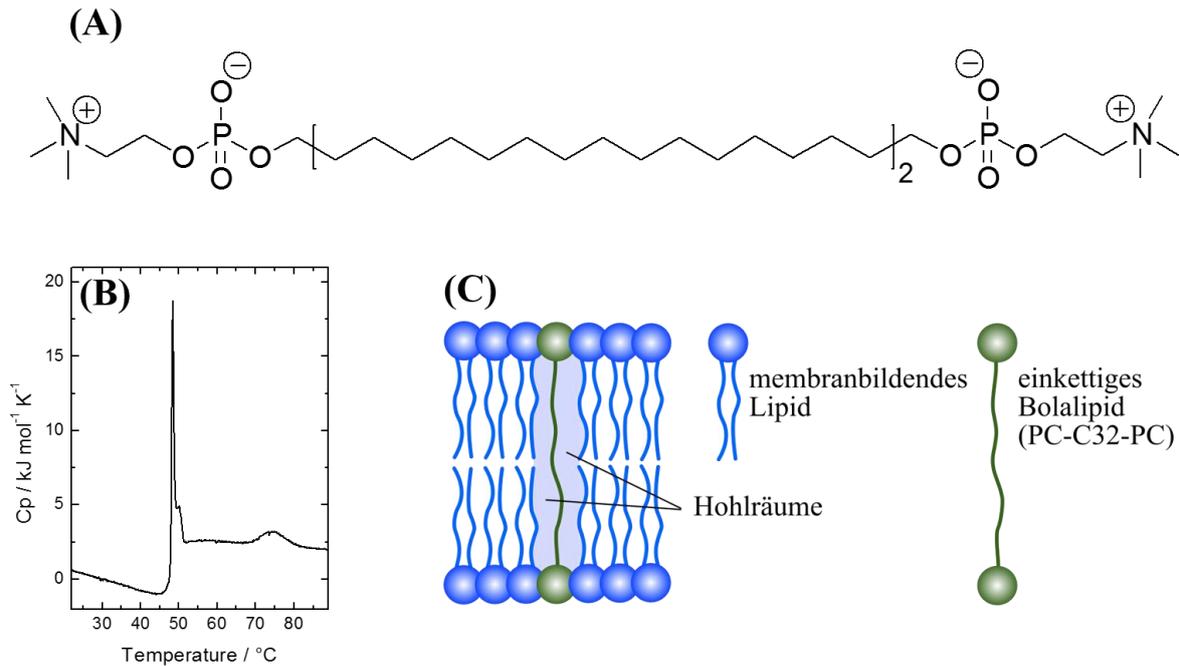


Abb. 9 (A) Strukturformel des Lipids PC-C32-PC. (B) Thermogram mit DSC-Heizkurve einer wässrigen Dispersion ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) von PC-C32-PC in Phosphatpuffer mit pH 7,4. Heizrate 60 K h^{-1} . (C) Schematische Darstellung der theoretisch entstehenden Hohlräume wenn ein einkettiges Bolalipid wie PC-C32-PC in membrandurchspannender Konformation in eine Lipiddoppelschicht inkorporiert wird.

In Mischung mit konventionellen Phospholipiden zeigte sich, dass PC-C32-PC sich nicht in den Lipidbilayer der Phospholipide einbaut, sondern separat in Nanofasern aggregiert.¹⁷¹ Dies ist mit dem Missverhältnis zwischen der Größe der PC-Kopfgruppe und dem vergleichsweise kleinen Querschnitt der Alkylkette des Bolalipidmoleküls zu begründen. Die Einlagerung von PC-C32-PC in einen konventionellen Lipidbilayer in einer membrandurchspannenden Konformation würde in der Entstehung energetisch ungünstiger Hohlräume resultieren (siehe Abb. 9C). In Folge dessen aggregiert das Bolalipid separat als auch in Mischung mit konventionellen Phospholipiden in wässrigen Dispersionen in Form von Nanofasern, in denen die einzelnen Lipidmoleküle verdreht zueinander vorliegen. Es kommt zudem zur Ausbildung von hydrophoben Taschen innerhalb dieser Nanofasern, in denen konventionelle Lipide in geringem Maße eingelagert werden können. DSC-Heizkurven von Lipidmischungen klassischer Phospholipide (DMPC, DPPC) mit PC-C32-PC zeigten in jedem Mischungsverhältnis den Umwandelungspeak des reinen Phospholipids und mit zunehmendem Bolalipidanteil einen oder mehrere, zusätzliche Peaks.^{171, 172} Dies belegt die Phasenseparation der Lipidkomponenten. Die Ausbildung stabilisierter, bolalipidhaltiger, vesikulärer Strukturen in Mischung mit konventionellen Phospholipiden konnte bisher nicht beobachtet werden.¹⁷¹⁻¹⁷³

Um diese Packungsproblematik zu umgehen und die Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden zu verbessern, sind verschiedene Ansatzpunkte denkbar:

- (i) Verwendung von konventionellen Phospholipiden mit kleinerer Kopfgruppe als Mischungspartner für die artifiziellen Bolalipide;
- (ii) Zumischung eines weiteren Mischungspartners wie Cholesterol;
- (iii) Modifikation der Bolalipide durch Verkleinerung der Kopfgruppe oder durch die Einführung raumfüllender Substituenten im Bereich der Alkylketten.

Durch die Verwendung konventioneller Phospholipide mit kleinerer Kopfgruppe, wie den PEs (z.B. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, DOPE), konnte keine bessere Mischbarkeit von PC-C32-PC mit diesen konventionellen Lipiden erreicht werden. In Untersuchungen des Mischungsverhaltens einer molaren 1:4 und 1:1 Mischung von PC-C32-PC mit DOPE konnte zwar gezeigt werden, dass es zu einer Verschiebung der Hauptphasenumwandlung zu höheren Temperaturen der Lipidmischungen im Vergleich zur Phasenumwandlung des reinen Bolalipids kommt. Die Ursache hierfür liegt aber vermutlich in der Stabilisierung der Nanofasern durch die Einlagerung von DOPE-Molekülen in hydrophoben Taschen. Ein vergleichbares Phänomen wurde bereits bei Mischungen mit anderen, konventionellen Phospholipiden in früheren Untersuchungen gezeigt.¹⁷¹ In den EM-Aufnahmen der Lipidmischungen von PC-C32-PC mit DOPE konnte allerdings schon ab einem molaren Mischungsverhältnis von 1:4 (PC-C32-PC:DOPE) das Vorhandensein faserige Aggregate belegt werden. Dies zeigte, dass bereits bei einem Anteil von 20 mol% PC-C32-PC in der Lipidmischung das Bolalipid sich nicht in die Lipiddoppelschichten einbaut, sondern separat in Fasern aggregiert (MÜLLER/DRESCHER, nicht publizierte Ergebnisse).

Ein weiterer, möglicher Ansatzpunkt für die Verbesserung der Mischbarkeit von artifiziellen Bolalipiden mit konventionellen Phospholipiden ist das Zumischen von Cholesterol. Cholesterol dient in vielen, liposomalen Formulierungen zur Stabilisierung der Membran auf Grund seiner molekularen Struktur. Es ist kleiner im Vergleich zu konventionellen Lipidmolekülen und kann die Fluidität der Lipiddoppelschicht am Ende der Alkylketten erhöhen während die Alkylketten nahe der Kopfgruppen nahezu in *all-trans* Konformation vorliegen.^{172, 174} In der Theorie eignet sich Cholesterol somit um die Hohlräume im Lipidbilayer auszufüllen, die durch die Zumischung von symmetrischen, einkettigen Bolalipiden bei einer Einlagerung in membrandurchspannender Konformation entstehen würden. Frühere Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass sich Cholesterol wahrscheinlich in die hydrophoben Taschen des PC-C32-PC einlagert und DPPC-Lipidbilayer stabilisiert, allerdings zu keiner besseren Mischbarkeit von Phospholipiden und Bolalipiden beiträgt.¹⁷²

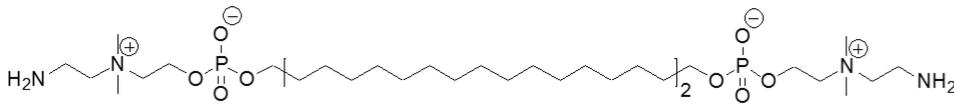
Somit kann eine bessere Mischbarkeit von Bolalipiden mit konventionellen Lipiden nur über die Modifikation der Kopfgruppen oder der Alkylkettenbereiche der Bolalipid-Moleküle realisiert werden. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Modifikation der chemischen Struktur artifizierender Bolalipide nicht nur Einfluss auf die Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden hat. Zunächst soll daher kurz betrachtet werden, wie das Aggregationsverhalten der Bolalipide selbst durch die Modifikation ihrer chemischen Struktur beeinflusst wird.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Variation der Kopfgruppengröße einen entscheidenden Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Bolalipide hat. Die Amin-modifizierten Bolalipide AEPC-C32-AEPC und AETPC-C32-AETPC (siehe Abb. 10) zeigten auf Grund der Protonierbarkeit ihrer Kopfgruppen ein pH-abhängiges Aggregationsverhalten in kurze Faserstücke und Nanofasern.¹⁷⁵ Die Synthese und physikochemische Charakterisierung der einkettigen Bolalipide Me₂PE-C_n-Me₂PE und MePE-C32-MePE (siehe Abb. 10) mit Phosphodimethylethanolamin- (Me₂PE) bzw. Phosphomonomethylethanolamin-Kopfgruppe (MePE) konnten zeigen, dass die Art der in wässriger Dispersion gebildeten Aggregate nicht nur stark vom Größenverhältnis der Kopfgruppe zum Alkylkettenquerschnitt abhängt, sondern dass auch elektrostatische Interaktionen und die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Kopfgruppen Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten haben.^{170, 176, 177}

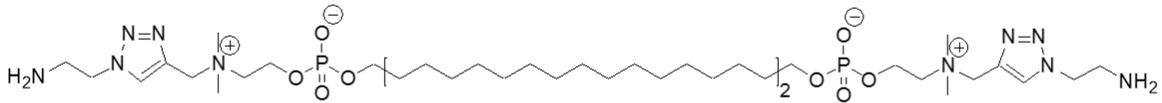
Für die Bolalipide Me₂PE-C34-Me₂PE und Me₂PE-C36-Me₂PE konnte die Bildung von drachenförmigen, lamellaren Aggregaten aus Nanofasern beobachtet werden.¹⁷⁸ Ein Verhalten, welches die PC-Analoga dieser Lipide nicht zeigen. PC-C34-PC und PC-36-PC aggregieren je nach Temperatur in vernetzten Nanofasern oder Mizellen.^{173, 178} MePE-C32-MePE (siehe Abb. 10) aggregiert hingegen unabhängig von der Temperatur in lamellare Aggregaten.¹⁷⁰ Dies zeigt deutlich, wie groß der Einfluss der Kopfgruppen auf das Aggregationsverhalten der Bolalipide ist.

Auch die Alkylkettenlänge hat Einfluss auf das Aggregationsverhalten in wässriger Volumenphase. Die Phasenumwandlung von Fasern zu Mizellen des Bolalipidtyps PC-C_n-PC verschiebt sich mit abnehmender Kettenlänge zu niedrigeren Temperaturen.¹⁷⁹ Während PC-C32-PC bei 20 °C als Fasern aggregiert, sind in der Probedispersion von PC-C22-PC bei gleicher Temperatur nur mizellare Aggregate zu finden.

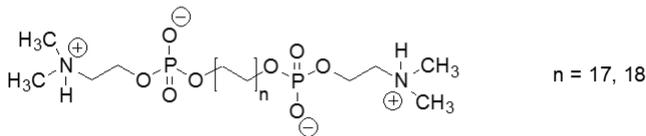
AEPC-C32-AEPC



AETPC-C32-AETPC



Me₂PE-C_n-Me₂PE



MePE-C32-MePE

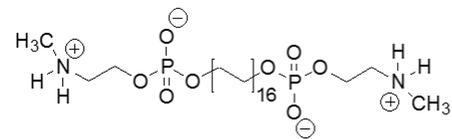
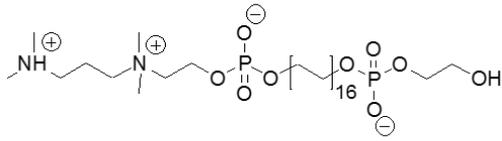


Abb. 10 Beispiele für in früheren Studien synthetisierte und charakterisierte Bolalipide mit Kopfgruppenmodifikationen.

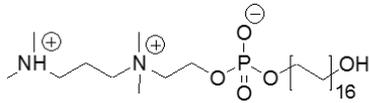
Das Aggregationsverhalten der Bolalipide wird zudem durch die Molekülasymmetrie beeinflusst. Das asymmetrische Bolalipid DMAPPC-C32-POH (siehe Abb. 11) aggregiert in Fasern, was wie im Falle des Lipids PC-C32-PC zu einer Gelierung der Probenlösung führte. DMAPPC-C32-OH (siehe Abb. 11) zeigt auf Grund seiner ausgeprägteren Molekülasymmetrie ein anderes Aggregationsverhalten. In EM-Aufnahmen einer Proben dispersion mit pH 5 konnte sowohl das Vorhandensein von lamellaren Aggregaten als auch Mizellen nachgewiesen werden – ein Aggregationsverhalten, das sich im alkalischen Medium zu lamellaren Aggregaten und vesikulären Strukturen änderte.¹⁸⁰ In den lamellaren Aggregaten konnte eine interdigitierte Anordnung der Bolalipidmoleküle nachgewiesen werden. Diese dichte Packung der Moleküle mit ineinander geschobenen Alkylketten und die Aggregation in lamellare Schichten konnte auch für die Bolalipide PC-C17pPhC17-OH und PC-Gly(2C16)C32-OH bewiesen werden – Moleküle mit Molekülasymmetrie und Alkylkettenmodifikation (siehe Abb. 11).^{181, 182}

Wie wirkt sich nun die Modifikation der chemischen Struktur der Bolalipide auf ihre Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden aus? Durch Alkylkettenmodifikation artifizierender Bolalipide konnte in früheren Untersuchungen bereits eine verbesserte Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden erreicht werden. In Mischung mit dem konventionellen, gesättigten Phospholipid DPPC suggerierten die physikochemischen

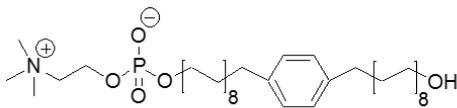
DMAPPC-C32-POH



DMAPPC-C32-OH



PC-C17pPh-C17-OH



PC-Gly(2C16)C32-OH

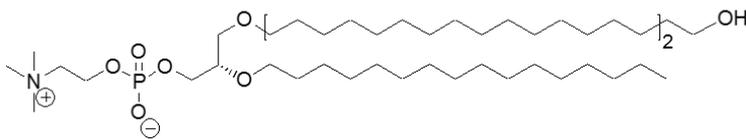
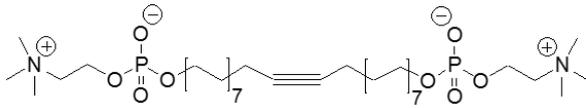


Abb. 11 Beispiele für in früheren Studien synthetisierte und charakterisierte Bolalipide mit Alkylkettenmodifikation und Molekülsymmetrie.

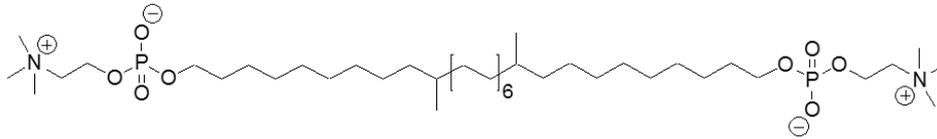
Untersuchungen der Bolalipide PC-C15AcC15-PC, PC-C32-10,23Me-PC und der phenylsubstituierten Bolalipide PC-C17pPhC17-PC, PC-C17mPhC17-PC und PC-C17oPhC17-PC (siehe Abb. 12) eine gewisse Mischbarkeit der Lipidkomponenten.^{172, 181, 183}

Allerdings wurden in keinem der Fälle die Bildung geschlossener, vesikulärer Strukturen beobachtet. Viel mehr kam es zur Bildung scheinbar flacher, runder Lipidaggregate. Vermutlich bestehen diese flachen, runden Lipidaggregate sowohl aus konventionellem Phospholipid als auch aus Bolalipid, wobei sich das Bolaamphiphil vermutlich am Rand der Scheiben anreichert. Somit kommt es auf Grund der nicht idealen Mischbarkeit von Bolalipid und Phospholipid auch innerhalb dieser Aggregate zu einer Phasenseparation zwischen den Lipidkomponenten. Mischungsstudien des membranbildenden Bolalipids PC-C17pPhC17-OH (siehe Abb. 11) und DPPC zeigten ebenfalls eine Entmischung.¹⁸¹ Dies entsprach zunächst nicht den Erwartungen, da beide Lipide in wässrigen Medien lamellar aggregieren. Anscheinend sind die von PC-C17pPhC17-OH gebildeten, interdigitierten und damit sehr stabilen Monoschichten energetisch immer noch günstiger, als die Anordnung in der DPPC-Lipiddoppelschicht. Die Resultate dieser Studien zeigen, dass die Mischbarkeit von artifiziellen, einkettigen Bolalipiden mit konventionellen Bolalipiden durch die Modifikation der chemischen Struktur der Bolaamphiphile gesteigert werden kann.

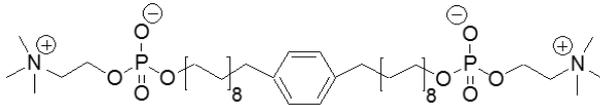
PC-C15AcC15-PC



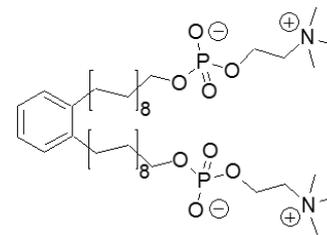
PC-C32-10,23Me-PC



PC-C17pPhC17-PC



PC-C17oPhC17-PC



PC-C17mPhC17-PC

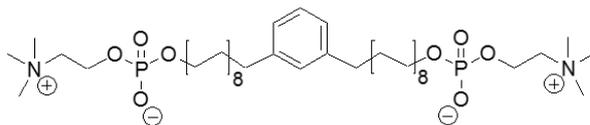


Abb. 12 Beispiele für in früheren Studien synthetisierte und charakterisierte Bolalipide, mit denen eine gegenüber PC-C32-PC verbesserte Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden erreicht werden konnte.

Besonders vielversprechend erscheint hierbei die Einführung von raumfüllenden Substituenten im Alkylkettenbereich wie im Falle der phenylsubstituierten Bolalipide PC-C17pPhC17-PC, PC-C17mPhC17-PC und PC-C17oPhC17-PC. Eine ideale Mischbarkeit von Bolalipiden und Phospholipiden, die zur Bildung bolalipidhaltiger Liposomen führt, konnte trotzdem bisher nicht erreicht werden. Auch das Aggregationsverhalten der synthetisierten Bolalipide auf Grund ihrer chemischen Struktur kann nach heutigem Wissenstand nicht sicher vorhergesagt werden. Physikochemische Untersuchungen des Aggregationsverhaltens der Reinsubstanzen sind somit unabdinglich und ein Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

5. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Trotz der Synthese zahlreicher bolaamphiphiler Lipide sowie deren umfassender, physikochemischer Charakterisierung ist es bis jetzt noch nicht gelungen, ein vereinfachtes Analogon archaealer Lipide zu entwickeln, welches eine hinreichende Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden zeigt um für die Herstellung einer liposomalen Formulierung geeignet zu sein. Zudem ist es nach wie vor schwierig, die physikochemischen Eigenschaften neuer Bolaamphiphile sowie ihre Mischbarkeit mit klassischen Phospholipiden anhand der chemischen Struktur vorherzusagen zu können.

Die vorliegende Dissertation hat – in Anknüpfung an frühere Arbeiten – zum Ziel, durch artifizielle Bolalipide stabilisierte Phospholipid-Liposomen herzustellen, die sich für die orale Anwendung eignen. Folgende Punkte wurden hierbei bearbeitet:

- 1.) Das Aggregationsverhalten neuer Bolaamphiphile in Reinform wurde zunächst mit physikochemischen Methoden in wässriger Volumenphase untersucht. Ziel war es, über die chemische Struktur der Bolaamphiphile deren Aggregationsverhalten in wässrigen Medien besser voraussagen zu können.
- 2.) Die Mischbarkeit der Bolalipide mit konventionellen, gesättigten und ungesättigten Phospholipiden wurde eingehend untersucht. Wurde eine Mischbarkeit der Lipide und die Ausbildung vesikulärer Aggregate festgestellt, wurde die Lipidmischung durch eine Polycarbonatmembran extrudiert um bolalipidhaltige Liposomen (Bolasomen) einheitlicher Größe herzustellen.
- 3.) Anschließend erfolgte eine eingehende Charakterisierung der hergestellten Liposomen bezüglich Morphologie, Lagerstabilität und Permeabilität gegenüber kleinen Ionen.
- 4.) Um eine erste Aussage über die Stabilität der Liposomen im GIT zu treffen, wurden die Liposomen in künstlichen Verdaumedien bei 37 °C inkubiert und sowohl die Änderung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung als auch die Freisetzung eines wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffes über einen festgelegten Zeitraum untersucht. Die Stabilität der modifizierten Liposomen während der Gefriertrocknung wurde durch die Untersuchung der Retention eines Fluoreszenzmarkers beurteilt.

Um die genannten Ziele zu erreichen, wurden zahlreiche physikochemische Methoden zur Charakterisierung des Aggregationsverhaltens der neuen bipolaren Amphiphile in wässriger Suspension als auch deren Mischbarkeit mit verschiedenen membranbildenden Phospholipiden eingesetzt:

ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

- DSC diente zur Ermittlung von Phasenübergangstemperaturen der reinen Bolalipide als auch der Phasenübergangstemperaturen von Lipidmischungen und diente damit zu einer initialen Aussage über die Mischbarkeit der Lipidkomponenten.
- TEM wurde für die Visualisierung von Aggregatstrukturen der reinen Lipide und Lipidmischungen genutzt. Für genauere Aussagen über die Lamellarität und Morphologie von Liposomen wurden außerdem Aufnahmen cryo-fixierter Proben und Proben, die mittels Gefrierbruchtechnik (FFEM) angefertigt wurden, verwendet.
- Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) wurde ebenfalls für die Untersuchung der Phasenübergänge der reinen Bolalipide genutzt. Die ermittelten Wellenzahlen geben Aufschluss über die Anordnung der Lipide in ihren unterschiedlichen polymorphen Phasen.
- Sowohl SANS als auch die Kleinwinkelröntgenstreuung (*small-angle X-ray scattering*, SAXS) wurden für die Untersuchung der Lipidanordnung innerhalb gebildeter Aggregate verwendet.
- Mittels DLS wurden Partikelgrößen von Liposomen/Bolasomen ermittelt. Durch Partikelgrößenmessungen über einen längeren Zeitraum wurde die Lagerstabilität der Vesikel charakterisiert. Durch Partikelgrößenmessungen während der *in vitro* Inkubation konnte die Stabilität von Liposomen/Bolasomen in verschiedenen Verdaumedien charakterisiert werden.
- Für die Permeabilitätsuntersuchungen an Liposomen/Bolasomen wurde die fluoreszenzspektroskopische Dithionitmethode, entwickelt von MCINTYRE *et al.*,¹⁸⁴ verwendet.
- Für die *in vitro* Stabilitätstests wurde neben DLS ebenfalls die Fluoreszenzspektroskopie genutzt. In die Liposomen/Bolasomen wurde der wasserlösliche Fluoreszenzmarker Calcein verkapselt. Unverkapseltes Calcein wurde mittels SEC abgetrennt. Die Liposomen/Bolasomen wurden dann in künstliche Verdaumedien bei 37 °C inkubiert und die Freisetzung von Calcein über einen festgelegten Zeitraum gemessen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte somit zum einen der Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und dem Aggregationsverhalten reiner Bolalipide in wässriger Volumenphase untersucht werden. Dies könnte es zukünftig möglich machen, Bolalipide zu synthetisieren, die ein vorhersehbares, gewünschtes Aggregationsverhalten aufweisen.

Zentraler Inhalt dieser Dissertation ist die Charakterisierung der Mischbarkeit von artifiziellen Bolalipiden mit konventionellen Phospholipiden mit dem Ziel, eine

Bolalipid-stabilisierte, liposomale Formulierung für eine zukünftige, orale Anwendung herzustellen. Hierfür musste zunächst ein Bolalipid identifiziert werden, das eine hinreichende Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden unter Beibehaltung der liposomalen Struktur zeigt. Diese Mischbarkeit ist eine Voraussetzung für die Bildung stabiler Bolasomen.

Alle weiteren Arbeitspunkte dieser Dissertationen haben zum Ziel, erste Aussagen über die Eignung der liposomalen Formulierung für die orale Applikation zu treffen. Hierzu zählen zum einen die Permeabilitätstestungen um zu überprüfen, ob die Vesikel, wie bereits früher für Archaeosomen aus extrahierten TELs gezeigt,¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ eine geringere Protonenpermeabilität aufweisen. Dies könnte ein erstes Indiz für die erhöhte Stabilität im sauren Milieu des Magens sein. Mittels *in vitro* Stabilitätsuntersuchungen in künstlichen Verdaumedien können dann Aussagen über die Stabilität der modifizierten Vesikel in den verschiedenen Abschnitten des GIT und damit gegenüber unterschiedlichen pH-Werten, enzymatischen Verdau und Gallensalzen getroffen werden. Sollten die Resultate dieser Untersuchungen vielversprechend ausfallen, könnte dies ein erster Schritt zur Entwicklung eines neuen, bolalipidhaltigen Arzneistoffträgersystems für die orale Anwendung sein.

Für diese Dissertation wurden zwei unterschiedliche Arten von Bolalipiden verwendet:

- a) asymmetrische Glyceroldietherbolalipide sowie
- b) einkettige, alkylverzweigte Bolalipide.

Die asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide wurden von Dr. THOMAS MARKOWSKI (Biochemische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide wurden von Dipl.-Pharm. KAI GRUHLE (Biophysikalische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die chemische Struktur dieser Bolalipide ist in Abb. 13 dargestellt.

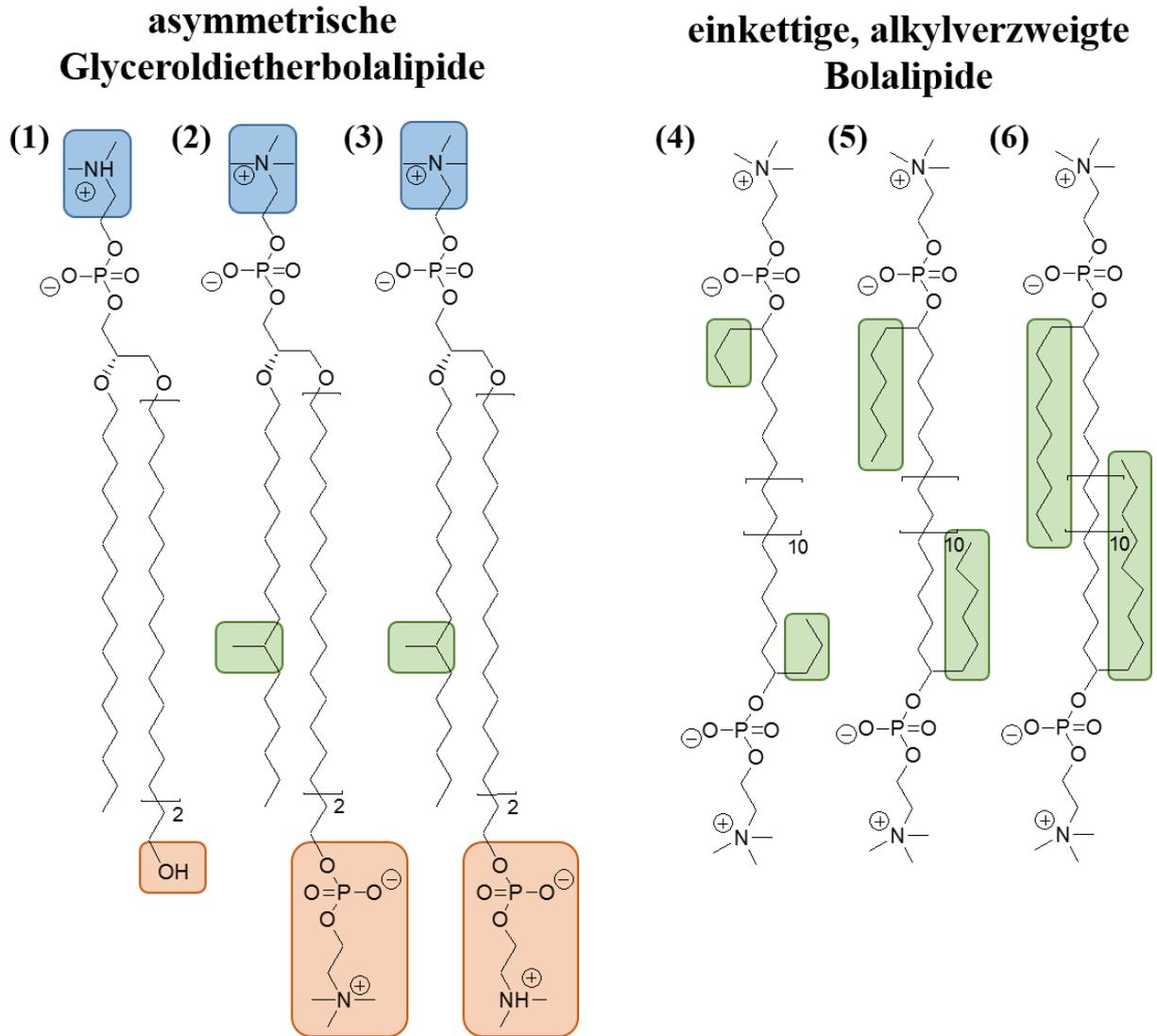


Abb. 13 Chemische Struktur der in dieser Dissertation charakterisierten asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide (links) und einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide (rechts). Kopfgruppenmodifikationen (blau und orange) und Alkylkettenmodifikationen (grün), in denen sich die Lipide innerhalb der beiden Gruppen unterscheiden, sind farblich hinterlegt. Asymmetrische Glyceroldietherbolalipide: (1) **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH**, (2) **PC-Gly(2C16Me)C32-PC**, (3) **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE**. Einkettige, alkylverzweigte Bolalipide: (4) **PC-C32(1,32C3)-PC**, (5) **PC-C32(1,32C6)-PC**, (6) **PC-C32(1,32C9)-PC**.

6. PUBLIKATIONEN

Im Folgenden sind sechs Publikationen, die die Grundlage für diese Dissertation sind, durch die Auflistung des Originaltitels, der Autoren, des Fachjournals mit Erscheinungsjahr, Ausgabe und Seitenzahlen zusammengefasst. Weiterhin sind die prozentualen Eigenanteile an Design, Durchführung der Experimente, Auswertung der Messergebnisse und Verfassen der Publikation tabellarisch aufgeführt.

6.1 PUBLIKATION 1

An Asymmetrical Glycerol Diether Bolalipid with Protonable Phosphodimethylethanolamine Headgroup: The Impact of pH on Aggregation Behavior and Miscibility with DPPC

Thomas Markowski*, Sindy Müller*, Bodo Dobner, Annette Meister, Alfred Blume und Simon Drescher

**Thomas Markowski and Sindy Müller teilen sich die Erstautorenschaft für diese Publikation.*

Polymers, 2017, **9**, 573

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30965876

| | Design | Durchführung der Experimente | Auswertung der Experiment | Verfassen der Publikation |
|-------------|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Eigenanteil | 20% | 30% | 30% | 30% |

6.2 PUBLIKATION 2

Impact of Headgroup Asymmetry and Protonation State on the Aggregation Behavior of a New Type of Glycerol Diether Bolalipids

Simon Drescher, Christian Otto, Sindy Müller, Vasil M. Garmaus, Christopher J. Garvey, Susanne Grünert, Anke Lischka, Annette Meister, Alfred Blume und Bodo Dobner

Langmuir, 2018, **34**, 4360-4373

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29557659

| | Design | Durchführung der Experimente | Auswertung der Experiment | Verfassen der Publikation |
|-------------|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Eigenanteil | 20% | 30% | 30% | 30% |

6.3 PUBLIKATION 3

Synthesis and aggregation behaviour of single-chain, 1,32-alkyl branched bis(phosphocholines): effect of lateral chain length

Kai Gruhle, Sindy Müller, Annette Meister und Simon Drescher

Organic & Biomolecular Chemistry, 2018, **16**, 2711-2724

pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/ob/c8ob00424b

| | Design | Durchführung der Experimente | Auswertung der Experiment | Verfassen der Publikation |
|--------------------|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Eigenanteil | 20% | 30% | 30% | 20% |

6.4 PUBLIKATION 4

Mixing behaviour of asymmetrical glycerol diether bolalipids with saturated and unsaturated phosphatidylcholines

Sindy Müller, Annette Meister, Christian Otto, Gerd Hause und Simon Drescher

Biophysical Chemistry, 2018, **238**, 39-48

www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301462218300905?via%3Dihub

| | Design | Durchführung der Experimente | Auswertung der Experiment | Verfassen der Publikation |
|-------------|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Eigenanteil | 50% | 90% | 70% | 70% |

6.5 PUBLIKATION 5

Mixing behaviour of bilayer-forming phosphatidylcholines with single-chain alkyl-branched bolalipids: effect of lateral chain length

Sindy Müller, Maximilian Kind, Kai Gruhle, Gerd Hause, Annette Meister und Simon Drescher

Biophysical Chemistry, 2019, **244**, 1-10

pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2007/sm/b703152a

| | Design | Durchführung der Experimente | Auswertung der Experiment | Verfassen der Publikation |
|-------------|--------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Eigenanteil | 50% | 80% | 80% | 80% |

PUBLIKATION 6

Bolalipid-Doped Liposomes: Can Bolalipids Increase the Integrity of Liposomes Exposed to Gastrointestinal Fluids?

Sindy Müller, Kai Gruhle, Annette Meister, Gerd Hause und Simon Drescher

Pharmaceutics, 2019, **11**, 646

www.mdpi.com/1999-4923/11/12/646/htm

| | Design | Durchführung der Experimente | Auswertung der Experiment | Verfassen der Publikation |
|-------------|---------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Eigenanteil | 75% | 90% | 90% | 85% |

7. DISKUSSION

7.1 AGGREGATIONSVERHALTEN ASYMMETRISCHER GLYCEROLDIETHERBOLALIPIDE

Da das Aggregationsverhalten bolaamphiphiler Moleküle in wässriger Lösung nicht mit Hilfe der Berechnung des Packungsparameters (P) vorhergesagt werden kann, ist die physikochemische Untersuchung synthetisierter Bolalipide in wässrigen Dispersionen unerlässlich. Zum einen kann so das Aggregationsverhalten in Mischung mit konventionellen Phospholipiden besser eingeschätzt werden und zum anderen erhält man so ein besseres Verständnis für den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur der Bolalipide und ihrem Aggregationsverhalten.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Aggregationsverhalten der asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH**, **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** im wässrigen Milieu charakterisiert. Auf Grund der Protonierbarkeit der Me₂PE-Kopfgruppe des Bolalipids **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH**, wurde das Aggregationsverhalten dieses Bolalipids in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht (Publikation 1, T. MARKOWSKI, S. MUELLER, B. DOBNER, A. MEISTER, A. BLUME und S. DRESCHER, *Polymers*, 2017, **9**, 573).¹⁸⁸ Untersuchungen mittels DSC, FTIR und EM-Aufnahmen negativ kontrastierter Proben zeigten bei pH 5,0 die Bildung von kondensierten, lamellaren Schichten. Mit zunehmendem pH-Wert konnte in den EM-Aufnahmen eine leichte Veränderung der Aggregatstruktur beobachtet werden. Bei pH 7,7 aggregierte **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** in größere lamellare Aggregate, bei pH 10,0 konnten zudem kleinere, scheinbar fächerförmige Aggregate in den EM-Aufnahmen detektiert werden.

Das Thermogramm von **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** zeigt eine erste Umwandlung zur Gelphase zwischen $T = 27-35$ °C und eine zweite Umwandlung bei $T > 80$ °C, bei der die Umwandlung zur flüssig-kristallinen Phase stattfindet. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Existenz beider Phasenumwandlungen von **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** unabhängig vom pH-Wert des Dispersionsmediums ist. Mit zunehmendem pH-Wert zeigte sich in den DSC-Daten des Bolalipids nur eine geringfügige Verschiebung beider Phasenumwandlungen zu niedrigeren Temperaturwerten. Der Grund hierfür ist die zunehmende Deprotonierung der Kopfgruppen bei höheren pH-Werten, welche zu einer Abstoßung der Kopfgruppen und damit zu einer leichten Destabilisierung der Lipidaggregate

führt. Diese pH-abhängige Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen wurde bereits in früheren Studien für das Bolalipid **Me₂PE-C32-Me₂PE** beobachtet und ebenfalls auf den unterschiedlichen Grad der Protonierung der Kopfgruppen der Lipide zurückgeführt.^{176, 177}

Das Aggregationsverhalten von **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** ähnelt bei physiologischen pH-Werten seinem PC-Analogon **PC-Gly(2C16)C32-OH**.¹⁸² Die Bildung lamellarer Aggregate in wässriger Volumenphase konnte auch für **PC-Gly(2C16)C32-OH** mittels EM-Aufnahmen nachgewiesen werden.¹⁸² Sowohl die DSC-Heizkurven des Lipids **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** als auch **PC-Gly(2C16)C32-OH** zeigen bei physiologischem pH zwei Phasen-umwandlungen im Temperaturbereich zwischen 5-90 °C. Die Phasenumwandlungen von **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** sind im Vergleich zu den Phasenumwandlung des Bolalipids **PC-Gly(2C16)C32-OH** auf Grund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den protonierten Me₂PE-Kopfgruppen der **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH**-Moleküle zu höheren Temperaturen verschoben. FTIR-Messungen von **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** ergaben, analog zu **PC-Gly(2C16)C32-OH**, eine sehr dichte Packung der Alkylketten des Lipids innerhalb der Aggregate. Der Vergleich der physikochemischen Daten von **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** und dem PC-Analogon **PC-Gly(2C16)C32-OH** führte zu der Erkenntnis, dass der Austausch einer PC-Kopfgruppe gegen eine Me₂PE-Kopfgruppe in diesem Fall keine entscheidenden Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Lipide hat. Der unterschiedliche Protonierungsgrad der Me₂PE-Kopfgruppe beeinflusst nicht das Aggregationsverhalten zwischen pH 5-10, sondern lediglich die Temperaturwerte, bei denen die Phasenumwandlungen stattfinden.

Die Verschiebung der Phasenumwandlung auf Grund des unterschiedlichen Protonierungsgrades der Me₂PE-Kopfgruppe konnte auch bei dem asymmetrischen Glyceroldietherbolalipid **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** festgestellt werden (Publikation 2, S. DRESCHER, C. OTTO, S. MUELLER, V. M. GARAMUS, C. J. GARVEY, S. GRUENERT, A. LISCHKA, A. MEISTER, A. BLUME und B. DOBNER, *Langmuir*, 2018, **34**, 4360-4373).¹⁸⁹ Mit zunehmendem pH-Wert des Dispersionsmedium konnte in den DSC-Thermogrammen des Bolalipids **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** eine Verschiebung der Hauptphasenumwandlung zu niedrigeren Temperaturen beobachtet werden, was wiederum auf eine zunehmende Deprotonierung der Me₂PE-Kopfgruppe und die damit einhergehende, stärkere Abstoßung zurückzuführen ist.

Im Vergleich zur Hauptphasenumwandlung des PC-Analogon **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** ist die Umwandlung von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** zu höheren Temperaturen verschoben.¹⁸⁹ Dies beweist, dass es analog zu **Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH** und anderer

Bolalipide bei dem Austausch einer PC-Kopfgruppe gegen eine Me₂PE-Kopfgruppe von ansonsten strukturell identischen Bolalipiden zu einer Stabilisierung der Lipidaggregate durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kopfgruppen kommt.

FTIR-Messungen ergaben, dass die Wellenzahlen sowohl der symmetrischen ($\nu_s(\text{CH}_2)$) als auch asymmetrischen CH₂-Streckschwingung ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$) von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** im Vergleich zu den entsprechenden Messwerten des Bolalipids PC-Gly(2C16Me)C32-OH höher sind.¹⁸² Dies spricht dafür, dass der größere, sterische Anspruch der zweiten PC-Kopfgruppe von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** im Vergleich zur kleinen Hydroxyl-Kopfgruppe von PC-Gly(2C16Me)C32-OH eine ähnliche dichte Packung der Alkylketten in den Lipidaggregaten verhindert.

EM-Aufnahmen der Lipidaggregate von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** zeigten sowohl unter- als auch oberhalb der Phasenumwandlung die Bildung lamellarer Aggregate und weniger kollabierter Vesikel. Ein ähnliches Aggregationsverhalten konnte auch für **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** bei pH 5,0 und pH 7,6 in den EM-Aufnahmen beobachtet werden. Messungen mittels SAXS zeigten sowohl im Falle des Lipids **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** als auch **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** eine interdigitierte Anordnung der Lipidmoleküle in lamellaren Aggregaten. Dies bestätigt erneut die Annahme, dass der Austausch der PC-Kopfgruppe gegen eine Me₂PE-Kopfgruppe nur eine geringe Auswirkung auf das Aggregationsverhalten bei physiologischen pH-Werten hat.

Das Aggregationsverhalten von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** änderte sich jedoch bei höheren pH-Werten. Ab pH 10,0 kam es zur Ausbildung von kleineren, runden, lamellaren Aggregaten. Mit zunehmendem pH konnte eine Strukturierung der Oberfläche dieser kleinen lamellaren Aggregate beobachtet werden und ab pH 11 konnten in EM-Aufnahmen der Probe Fasern detektiert werden, die sich wahrscheinlich aus den lamellaren Strukturen bildeten. Bei pH 12 waren in den EM-Aufnahmen des Bolalipids ausschließlich Fasern und Faserbündel mit einer Dicke von 7-24 nm erkennbar. Diese Änderung des Aggregationsverhaltens war auch makroskopisch durch die Aufklärung der Probendispersion erkennbar. Die Anordnung der Bolalipidmoleküle von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** in den Fasern ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich sind die Lipidmoleküle eng nebeneinander und gegeneinander verdreht angeordnet. Mittels SANS-Messungen konnte ein Faserdurchmesser von 7,3 nm ermittelt werden. Da dies die Länge eines **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE**-Moleküls von 6 nm übersteigt, ist eine Neigung der einzelnen Lipide gegenüber der Faserachse, wie sie für PC-C32-PC und Me₂PE-C32-Me₂PE gezeigt werden konnte, eher unwahrscheinlich.¹⁹⁰

Der molekulare Mechanismus hinter der Entstehung der Fasern aus lamellaren Aggregaten ist bisher ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Für einkettige, unmodifizierte Bolalipide mit Me₂PE-Kopfgruppe (Me₂PE-C_n-Me₂PE, $n = 34, 36$) wurde ein ähnliches Aggregationsverhalten bereits in früheren Studien beobachtet.¹⁷⁸ Allerdings bildeten sich im Falle dieser Bolalipide nach kurzer Lagerungszeit lamellare Aggregate aus Fasern und dies bei Raumtemperatur und ohne pH-Änderung. Dieser Prozess fand solange statt, bis alle Fasern in lamellare Aggregate umgewandelt waren. Die Änderung des Aggregationsverhaltens wurde damit erklärt, dass mit zunehmender Länge der Alkylketten die Anordnung in lamellaren Aggregaten energetisch günstiger ist, als die Aggregation in Fasern. Bezogen auf die **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** würde dies bedeuten, dass mit zunehmendem pH-Wert die Anordnung in Fasern die energetisch günstigere Aggregationsform ist. Dies könnte mit der Abstoßung der benachbarten Me₂PE-Kopfgruppen erklärt werden, da diese mit zunehmendem pH-Wert deprotoniert werden und somit eine negative Ladung aufweisen. Die Konsequenz wäre dann die Anordnung in Fasern, in denen die Kopfgruppen sich auf Grund der Drehung der Bolalipidmoleküle gegeneinander nicht mehr direkt nebeneinander befinden. Die Änderung des Aggregationsverhaltens von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** bei hohen pH-Werten scheint kein kinetischer Effekt zu sein wie im Falle der Me₂PE-C_n-Me₂PE Bolalipide – während der Lagerung veränderten sich die lamellaren Aggregate von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** nicht.

Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse über das Aggregationsverhalten asymmetrischer Glyceroldietherbolalipide ergänzen und bestätigen das Wissen über den Zusammenhang der chemischen Struktur synthetisierter Bolalipide und ihrem Aggregationsverhalten in wässrigen Lösungen:

- i. die Einführung einer Me₂PE-Kopfgruppe führt im Vergleich zu einer PC-Kopfgruppe zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Kopfgruppenbereiche der bolaamphiphilen Lipide auf Grund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen;
- ii. diese Stabilisierung führt wiederum zur Verschiebung der Phasenumwandlung zu höheren Temperaturen im Vergleich zu dem entsprechenden PC-Analogon;
- iii. durch die zunehmende Deprotonierung der Me₂PE-Kopfgruppe mit steigendem pH-Wert der Dispersion kommt es zu einer Verschiebung der Phasenumwandlung des Bolalipids zu niedrigeren Temperaturen;
- iv. mit steigendem pH-Wert kommt es im Falle von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** zur Umwandlung lamellarer Aggregate zu Fasern;

- v. asymmetrische Glyceroldietherbolalipide mit PC/OH-Kopfgruppen besitzen auf Grund der geringen Größe der Hydroxylgruppe in der Gelphase dichter gepackter Alkylketten als die entsprechenden Lipide mit PC/PC-Kopfgruppe;
- vi. alle untersuchten Glyceroldietherbolalipide aggregieren auf Grund ihrer asymmetrischen, chemischen Struktur in interdigitierte, lamellare und vorzugsweise planare Schichten – die Ausbildung von vesikulären Strukturen ist auf Grund der dichten Packung der Alkylketten und der hohen Biegesteifigkeit der lamellaren Aggregate erschwert.

7.2 AGGREGATIONSVERHALTEN EINKETTIGER, ALKYLSTABILISIERTER BOLALIPIDE

Neben dem Aggregationsverhalten von asymmetrischen Glyceroldietherbolalipiden wurden im Rahmen dieser Dissertation auch die physikochemischen Eigenschaften einkettiger, alkylsubstituierter Bolalipide untersucht (Publikation 3, K. GRUHLE, S. MUELLER, A. MEISTER und S. DRESCHER, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 2711-2724).¹⁹¹

Die unterschiedlich langen Alkylsubstituenten dieser Gruppe von synthetischen Bolalipiden sollen eine bessere Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden im Vergleich zum symmetrischen, einkettigen PC-C32-PC bewirken. Obwohl sich die drei untersuchten Bolalipide **PC-C32(1,32C3)-PC**, **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** nur in der Länge ihrer Alkylsubstituenten unterscheiden, weisen sie untereinander ein sehr unterschiedliches Aggregationsverhalten auf. Mit zunehmender Länge der Alkylsubstituenten kommt es demnach zu einer Verschiebung der Phasenumwandlung zu niedrigeren Temperaturen. Dies ist vermutlich bedingt durch die gegenseitige Störung der Anordnung der Lipidmoleküle auf Grund des zunehmenden, sterischen Anspruchs der Alkylseitenketten. Sowohl die Anordnung der Lipidmoleküle in Monoschichten als auch die Aggregation in Fasern wurde beobachtet. Das Aggregationsverhalten der einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide ist zusammenfassend in Tab. 4 dargestellt. Die neu gewonnenen Erkenntnisse über das Aggregationsverhalten einkettiger, alkylverzweigter als auch asymmetrischer Glyceroldietherbolalipide ergänzen und bestätigen das Wissen aus früheren Untersuchungen über das Aggregationsverhalten verschiedenster, artifizierender Bolalipide. Ausgewählte, artifizierende Bolalipide und ihre bevorzugte Aggregationsform in wässrigen Lösungen sind zur Übersicht in Tab. 5 dargestellt.

DISKUSSION

Tab. 4 Hauptphasenumwandlungstemperaturen und beobachtetes Aggregationsverhalten unter – und oberhalb der Phasenumwandlung der in dieser Dissertation charakterisierten, einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide.

| Bolalipide | T_m [°C] | Aggregatform unterhalb T_m | Aggregatform oberhalb T_m |
|--------------------------|------------|------------------------------|-----------------------------------|
| PC-C32(1,32C3)-PC | 63,2 | lamellar | (vermutlich Mizellen oder Fasern) |
| PC-C32(1,32C6)-PC | 20,7 | Fasern | Fasern (zirkulär) |
| PC-C32(1,32C9)-PC | 20,8 | Fasern | lamellar |

Vergleicht man das Aggregationsverhalten dieser synthetischen Bolalipide mit dem natürlicher, archaealer Lipide, wird deutlich, dass nur geringe Abwandlungen der ursprünglichen, chemischen Struktur zu einem deutlich anderen Aggregationsverhalten führen. Natürliche TELs aggregieren auf Grund ihrer membrandurchspannenden, ringförmigen Struktur bevorzugt in Monoschichten.¹³¹ Dieses Aggregationsverhalten in Kombination mit der Ausbildung zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kopfgruppen ist neben weiteren Faktoren verantwortlich für den membranstabilisierenden Effekt der TELs.

Tab. 5 Schematische Darstellung verschiedener, synthetischer Bolalipide, Beispielverbindungen mit entsprechender Referenz sowie das bevorzugte Aggregationsverhalten dieser Verbindungen in wässriger Dispersion. Die Bolalipide, deren Aggregationsverhalten im Rahmen dieser Dissertation charakterisiert wurde, sind dick gedruckt dargestellt. Modifiziert nach S. DRESCHER et al.¹⁸⁹

| schematische Darstellung | Beispiele | bevorzugte Aggregationsform in wässriger Lösung | Referenz |
|--|---|---|-------------------|
|  Diglyceroltetraetherlipide | | Liposomen, schichtförmige Aggregate | 192, 193 |
|  einkettige Bolalipide | PC-C32-PC, Me ₂ PE-C32-Me ₂ PE, PC-C17pPhC17-PC | Fasern, Mizellen, lamellare Aggregate | 169, 176-179, 194 |
|  einkettige, alkylverzweigte Bolalipide | PC-C32(1,32C3)-PC, PC-C32(1,32C6)-PC, PC-C32(1,32C9)-PC | Fasern, lamellare Aggregate | 191, 195 |
|  einkettige, asymmetrische Bolalipide | DMAPPC-C32-OH, PC-C32-OH, PC-C22-OH, PC-C17pPhC17-OH | Monoschichten mit interdigitiert angeordneten Molekülen, Fasern | 181, 194, 196 |
|  stark asymmetrische Glyceroldietherbolalipide | PC-Gly(2C16)C32-OH, PC-Gly(2C16Me)C32-OH, Me₂PE-Gly(2C16)C32-OH | große, schichtförmige Aggregate mit interdigitiert angeordneten Molekülen | 182, 188 |
|  asymmetrische Glyceroldietherbolalipide | PC-Gly(2C16Me)C32-PC, PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE | lamellare Aggregate mit interdigitiert angeordneten Molekülen | 189 |

Die artifiziellen Diglyceroltetraetherlipide ähneln strukturell stark den natürlichen TELs und aggregieren bereits ohne Zumischung anderer Lipide in Liposomen.¹⁹³ Allerdings sind diese Lipide synthetisch sehr aufwendig herzustellen und damit für eine spätere Herstellung im industriellen Maßstab nicht geeignet. Die Aggregation in Monoschichten analog zu natürlichen TELs konnte auch für die asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide und für die einkettigen, asymmetrischen Bolalipide beobachtet werden.^{181, 182, 188, 189, 194, 196} Allerdings kommt es bei diesen artifiziellen Lipiden zu einer Aggregation in interdigitierten Schichten mit dichter Packung der Lipidmoleküle und Alkylketten. Diese hohe Biegesteifigkeit der entstandenen, lamellaren Aggregate und die hohe Stabilität dieser Schichten erschwert die Bildung einer Krümmung und damit die Ausbildung von Vesikeln – dies macht perspektivisch die Zumischung monopolarer Lipide zu den asymmetrischen Glyceroldietherbolalipiden **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** für die Herstellung von Liposomen unabdinglich. Die Mischbarkeitsstudien von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit konventionellen, monopolaren Phospholipiden sind Bestandteil dieser Dissertation und werden im nachfolgenden Kapitel eingehender beschrieben. Einkettige, unverzweigte Bolalipide zeigten je nach Kopfgruppe und Molekülsymmetrie die Aggregation in Flächen, Mizellen, Wurmmizellen und auch Fasern. Die Aggregation von Fasern konnte für natürliche, archaeale Lipide bisher nicht beobachtet werden. Bei den einkettigen, verzweigten Bolalipiden **PC-C32(1,32C3)-PC**, **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** konnte die Bildung sowohl von Fasern als auch die Bildung lamellarer Aggregate bewiesen werden.¹⁹¹ Daraus ergab sich die Fragestellung, ob durch die Zumischung membranbildender Lipide Liposomen hergestellt werden können, welche die Bolalipide **PC-C32(1,32C3)-PC**, **PC-C32(1,32C6)-PC** oder **PC-C32(1,32C9)-PC** enthalten. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Mischbarkeit dieser Bolalipiden mit konventionellen Lipiden eingehend untersucht und ist in Kapitel 7.4 beschrieben.

7.3 MISCHBARKEIT ASYMMETRISCHER GLYCEROLDIETHERBOLALIPIDE MIT MEMBRANBILDENDEN LIPIDEN

Wie bereits in dieser Dissertationsschrift ausgeführt, zeigt das einkettige, symmetrische Bolalipid **PC-C32-PC** keine ideale Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden.

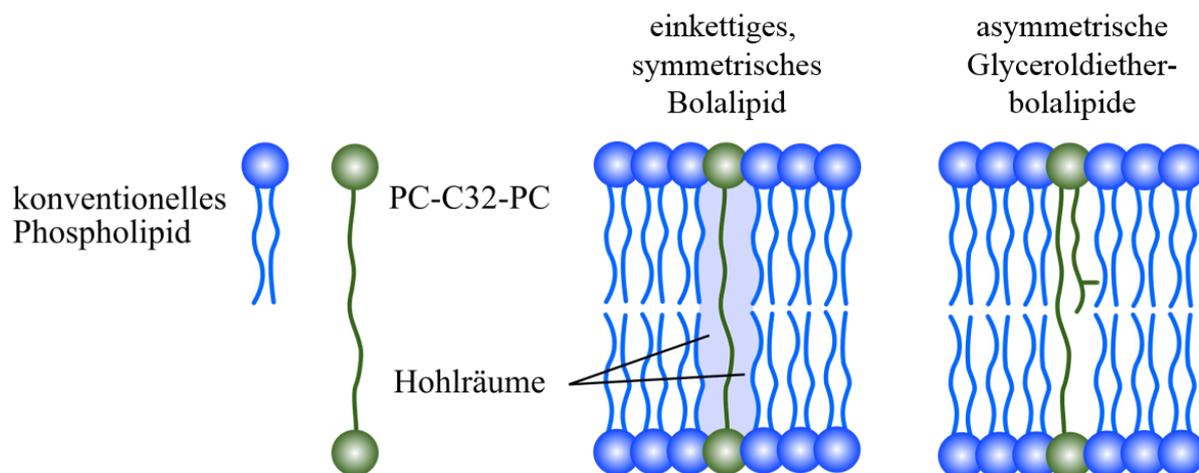


Abb. 14 Schematische Darstellung der entstehenden Hohlräume in der Lipiddoppelschicht bei der Einlagerung von PC-C32-PC in einer membrandurchspannenden Konformation sowie der Ausfüllung dieser Hohlräume durch die chemische Struktur der asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide.

Der Grund dafür sind energetisch ungünstige Hohlräume, die entstehen, wenn das einkettige Bolalipid in einer membrandurchspannenden Konformation in eine Lipiddoppelschicht eingelagert wird (siehe Abb. 14). Durch die methylysubstituierte C16-Alkylkette in *sn*-2 Position der asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide sollen diese Hohlräume in den Lipiddoppelschichten ausgefüllt werden (siehe Abb. 14). Dies sollte wiederum zu einer besseren Mischbarkeit von Bolalipiden mit konventionellen Phospholipiden führen.

Durch die Verwendung der Bolalipide **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** konnte außerdem der Einfluss unterschiedlicher Kopfgruppen auf die Mischbarkeit mit konventionellen Phospholipiden untersucht werden (Publikation 4, S. MUELLER, A. MEISTER, C. OTTO, G. HAUSE und S. DRESCHER, *Biophys. Chem.*, 2018, **238**, 39-48).¹⁹⁷ Als konventionelle Phospholipide wurden das gesättigte Phospholipid DPPC und das ungesättigte Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) genutzt.

Für die physikochemischen Untersuchungen wurden Lipidmischungen mit Überschuss an Phospholipid (molares Verhältnis 1:4, Bolalipid:Phospholipid) und Mischungen mit Überschuss an Bolalipid (molares Verhältnis 4:1, Bolalipid:Phospholipid) hergestellt. Da die Me₂PE-Kopfgruppe von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** pH-abhängig unterschiedlich protoniert ist, wurde zudem das Mischungsverhalten dieses Lipids mit DPPC und DOPC bei den pH-Werten 5,0, 7,6 und 10,0 untersucht.

Sowohl für **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** als auch für **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** wurde unabhängig vom pH-Wert der Proben dispersion in Mischung mit DPPC mit einem Bolalipidanteil von 20 mol% mittels DSC-Messungen und EM-Aufnahmen der

Probendispersionen eine Phasenseparation der Lipidkomponenten festgestellt (siehe Abb. 15). Die Mischbarkeit der beiden Bolalipide **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DPPC unterschied sich bei physiologischen pH-Wert nicht und somit kann davon ausgegangen werden, dass weder die unterschiedliche Kopfgruppe der Lipide noch der Protonierungsgrad der Me₂PE-Kopfgruppe von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** in diesem Fall einen Einfluss auf die Mischbarkeit mit DPPC hat.

Bei einem Bolalipidanteil von 80 mol% zeigen die DSC-Daten aller untersuchter Lipidmischungen eine gewisse Mischbarkeit der Lipidkomponenten. Der Phasenumwandelungspeak des Phospholipids DPPC war nicht mehr im Thermogramm sichtbar, was auf eine Mischbarkeit schließen ließ. Trotzdem war der Peak des jeweiligen Bolalipids im Thermogramm aller untersuchten Lipidmischungen nach wie vor detektierbar, was gegen eine ideale Mischbarkeit der Lipidkomponenten spricht. Der Peak war dabei im Vergleich zum Peak des reinen Bolalipids in allen Fällen zu niedrigeren Temperaturen verschoben, was auf eine Destabilisierung der Bolalipidaggregate schließen lässt. Dies ist vermutlich auf die Einlagerung von DPPC-Molekülen in die Lipidaggregate zurückzuführen. Die Entmischung innerhalb der Lipidaggregate und damit die Bildung von Lipiddomänen aus DPPC und Bolalipid ist wahrscheinlich. Durch die Bildung großer, lamellarer Aggregate in den 4:1 Lipidmischungen der beiden Bolalipide **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DPPC, welche durch EM-Aufnahmen der Lipidproben visualisiert wurden, konnte keine Extrusion durchgeführt werden.¹⁹⁷ Der Grund für die begrenzte Mischbarkeit der beiden untersuchten Bolalipide mit DPPC kann erneut mit der Ausbildung energetisch ungünstiger Hohlräume im Lipidbilayer erklärt werden. Auf Grund dessen, dass DPPC bei Raumtemperatur in der Gelphase vorliegt, befinden sich die Alkylketten des Phospholipids in einer *all-trans* Konformation und sind damit steif und dicht gepackt. Somit können die Fettsäureketten des konventionellen Lipids noch vorhandene Hohlräume in der Lipiddoppelschicht nicht hinreichend ausfüllen. Aus diesem Grund wurde DPPC als Mischungspartner für **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** und **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** in einer weiteren Serie an Mischungsversuchen gegen DOPC ausgetauscht. Im Gegensatz zu DPPC ($T_m = 42\text{ °C}$), befindet sich DOPC ($T_m = -17\text{ °C}$) bei Raumtemperatur in einer flüssig-kristallinen Phase mit fluiden Alkylketten. Die Vermutung lag nahe, dass durch die fluiden Alkylketten des Phospholipids DOPC die theoretischen Hohlräume in der Lipiddoppelschicht besser ausgefüllt und die Mischbarkeit von Bolalipid und Phospholipid weiter verbessert werden könnte. Tatsächlich

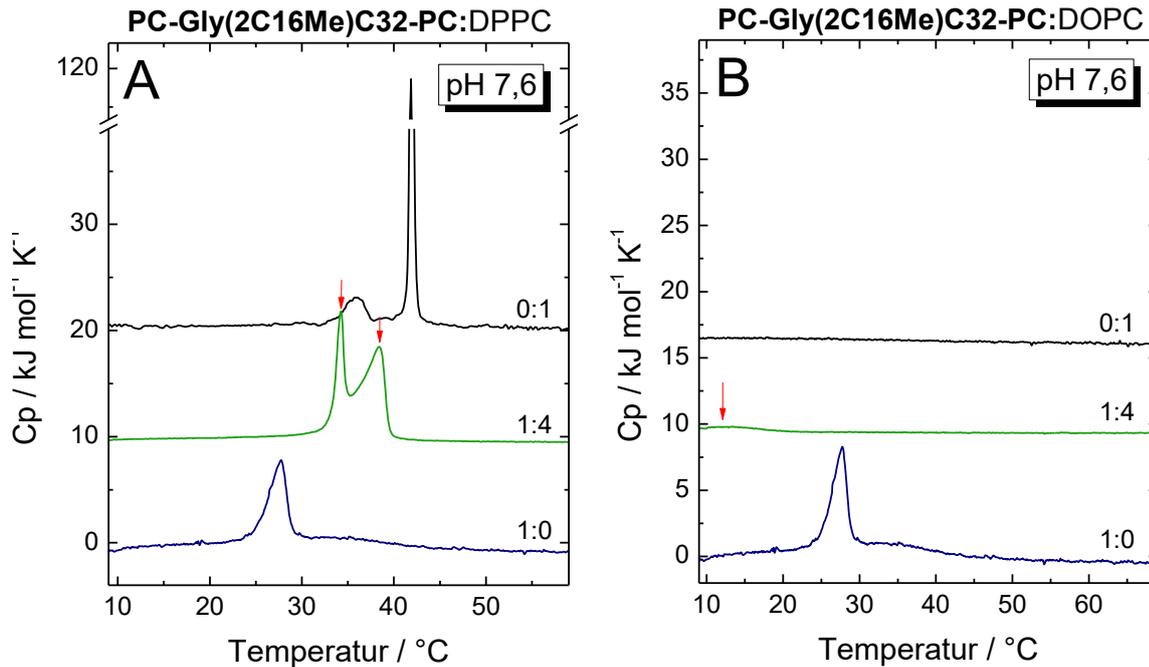


Abb. 15 Beispiele für Phasenseparation und Mischbarkeit von Lipidkomponenten: DSC-Heizkurven der 1:4 (Bolalipid:Phospholipid, $n:n$) Lipidmischungen von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** mit (A) DPPC und (B) DOPC in Phosphatpuffer pH 7,6. (A) Aus der Heizkurve lässt sich entnehmen, dass sich in der Lipidmischung vermutlich unterschiedliche phospholipid- und bolalipidreiche Domänen gebildet haben, die beim Erwärmen der Probedispersion separat schmelzen (rote Pfeile). (B) Die stark verbreiterte Phasenumwandlung (roter Pfeil) der Lipidmischung lässt auf eine Mischbarkeit der Lipidkomponenten schließen. DSC-Heizkurven der reinen Bolalipide sind zum Vergleich gezeigt. Die Heizrate bei den Messungen war 60 K h^{-1} . Die Kurven sind vertikal verschoben.

zeigten die DSC-Messungen der 1:4 (Bolalipid:Phospholipid, $n:n$) Lipidmischungen von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DOPC eine gewisse Mischbarkeit; innerhalb des Messbereichs konnten keine bzw. nur eine sehr breite Phasenumwandlung beobachtet werden (siehe Abb. 15). Die DSC-Kurven der entsprechenden Lipidmischungen von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** wiesen bei pH 7,6 keine Unterscheide auf. Somit hatten die unterschiedlichen Kopfgruppen auch in Kombination mit DOPC keinen Einfluss auf die Mischbarkeit. Auch mit unterschiedlichem Protonierungsgrad der Me₂PE-Kopfgruppe änderte sich das Mischungsverhalten von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DOPC nicht.

Die DSC-Heizkurven der entsprechenden 4:1 Mischungen suggerierten ein ähnliches Mischungsverhalten wie mit DPPC. EM Bilder der 4:1 Mischungen zeigten die Bildung großer, lamellarer Aggregate. EM Bilder der 1:4 Lipidmischungen von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** bzw. **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DOPC zeigten kleinere, lamellare Aggregate und kollabierte, vesikuläre Strukturen. Auf Grund dieser Aufnahmen und der durch die DSC-Daten suggerierten Mischbarkeit, erfolgte eine Extrusion (100 nm) der 1:4 Lipidmischung von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** mit DOPC bei physiologischem pH-Wert als auch der 1:4 Mischung

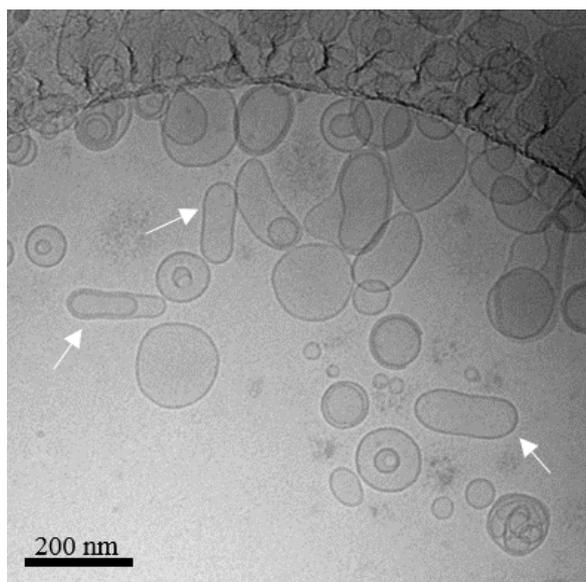


Abb. 16 cryoEM-Aufnahmen einer wässrigen Suspension einer **PC-Gly(2C16Me)C32-PC/DOPC** Lipidmischung (1:4, n:n). Pfeile deuten auf tubuläre Vesikel. Lipid-konzentration $c = 3 \text{ mM}$ in Phosphatpuffer mit $\text{pH } 7,6$. Entnommen aus Publikation 4.

von **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DOPC bei physiologischem pH sowie pH 5,0 und 10,0. EM-Aufnahmen negativ kontrastierter Proben zeigten in allen Lipidmischungen nach der Extrusion runde, lamellare Aggregate mit einem Durchmesser zwischen 100-200 nm. Um die Bildung von Liposomen in diesen Proben zu bestätigen, wurden von den 1:4 Lipidmischungen von **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** mit DOPC und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** mit DOPC (pH 7,6) zusätzlich EM Proben mit cryo-Fixierung angefertigt. Die entsprechenden EM-Aufnahmen bestätigten die Bildung von Vesikel mit einer Größe von 100-200 nm (siehe Abb. 16). Zusätzlich konnten auch einige längliche Vesikel in den Aufnahmen der cryo-Proben detektiert werden (siehe Abb. 16, weiße Pfeile). Dieser Effekt wurde bereits in Studien anderer Arbeitsgruppen bei Vesikeln mit unterschiedlichen Lipidkomponenten beobachtet. XU *et al.* begründeten die Form ihrer länglichen Vesikel mit der unterschiedlichen Phasenlage der einzelnen Lipidkomponenten im Vesikel.¹⁹⁸ Eine weitere Erklärung für die Form der Liposomen ist das Auftreten von Packungsdefekten in den Liposomen. Packungsdefekte bezeichnet hierbei Lücken in der Anordnung der Lipide in einer Lipiddoppelschicht auf Grund der chemischen Struktur und Geometrie der Lipide. Packungsdefekte werden besonders häufig in Zusammenhang mit ungesättigten Lipiden beobachtet.¹⁹⁹ Grund hierfür sind ihre Alkylketten mit Doppelbindungen. Diese führen zu sogenannten *kinks* (Knicke), die eine besonders große sterische Raumforderung aufweisen.

Partikelgrößenmessungen mittels DLS bewiesen die Stabilität der hergestellten **PC-Gly(2C16Me)C32-PC/DOPC**- und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE/DOPC**-Liposomen bei physiologischem pH sowie pH 5,0 und 10,0 bezüglich Partikelgröße (*z-average*) und Partikelgrößenverteilung (*poly dispersity index*, PDI) über 21 Tage mit zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C.

Insgesamt kann aus diesen Resultaten abgeleitet werden, dass

- i. die Mischbarkeit der Glyceroldietherbolalipide mit konventionellen Phospholipiden weder von der Art der Kopfgruppe (PC- oder Me₂PE-Kopfgruppe) noch vom Grad der Protonierung der Kopfgruppe beeinflusst wird;
- ii. asymmetrische Glyceroldietherbolalipide auf Grund ihrer chemischen Struktur in Kombination mit den steifen Alkylketten des konventionellen Phospholipids keine ideale Mischbarkeit mit DPPC zeigen;
- iii. im Falle der Bolalipide **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** und **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** in einem molaren Verhältnis von 1:4 (*n:n*, Bolalipid:Phospholipid) mit dem ungesättigten Phospholipid DOPC eine gewisse Mischbarkeit erreicht werden kann, welche nach der Extrusion der Lipidmischungen in Bolasomen mit einheitlicher Partikelgröße resultiert;
- iv. die hergestellten Bolasomen lagerstabil über mindestens 21 Tage sind;
- v. im Zuge dieser Untersuchungen erstmalig die Herstellung von Liposomen gelungen ist, die artifizielle Glyceroldietherbolalipiden enthalten.

Weiterhin bestätigten diese Resultate auch die Annahme, dass eine Entmischung von artifiziellen Bolalipiden und konventionellen Phospholipiden auf Grund von energetisch ungünstigen Hohlräumen in der Lipiddoppelschicht entsteht. Während die steifen, gesättigten Alkylketten des DPPC nicht in der Lage sind, diese Hohlräume auszufüllen, führte die Verwendung des ungesättigten DOPC zu einer Mischbarkeit von Bolalipiden und Phospholipiden.

7.4 MISCHBARKEIT EINKETTIGER, ALKYLVERZWEIGTER BOLALIPIDE MIT MEMBRANBILDENDEN LIPIDEN

Im Vergleich zum einkettigen Bolalipid PC-C32-PC tragen die Bolalipide **PC-C32(1,32C3)-PC**, **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** C3-, C6- oder C9-Alkyl-substituenten in 1- und 32-Position der membrandurchspannenden Alkylketten. Diese Substituenten sollen in Mischung mit membranbildenden Lipiden Hohlräume in der Lipiddoppelschicht ausfüllen und somit zu einer besseren Mischbarkeit von Phospholipiden und Bolalipiden führen (siehe Abb. 17).

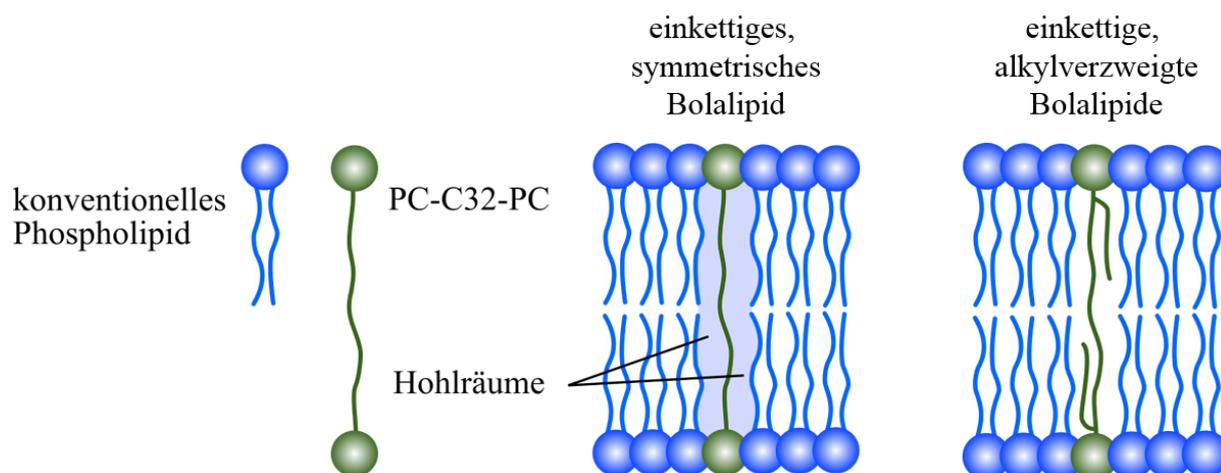


Abb. 17 Schematische Darstellung der entstehenden Hohlräume in der Lipiddoppelschicht bei der Einlagerung von PC-C32-PC in einer membrandurchspannenden Konformation sowie der Ausfüllung dieser Hohlräume durch die chemische Struktur der einkettigen, alkylverzweigten Bolalipide.

Die Mischungsexperimente mit den Glyceroldietherbolalipiden resultierten in der Erkenntnis, dass membranbildende Lipide mit fluiden Alkylketten gegenüber gesättigten Phospholipiden eine bessere Mischbarkeit mit artifiziellen Bolalipiden zeigen (siehe auch Kapitel 7.3). Aus diesem Grund wurden in den Mischungsexperimenten mit den einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipiden neben DPPC auch 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) und DOPC als Mischungspartner verwendet (Publikation 5, S. MUELLER, M. KIND, K. GRUHLE, G. HAUSE, A. MEISTER und S. DRESCHER, *Biophys. Chem.*, 2019, **244**, 1-10).¹⁹⁵ Mit den Bolalipiden **PC-C32(1,32C3)-PC**, **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** und den Phospholipiden DPPC, POPC und DOPC wurden Lipidmischungen mit einem molaren Verhältnis von jeweils 1:4 (Bolalipid:Phospholipid), 1:1 und 4:1 hergestellt. Durch die Verwendung von DPPC, POPC und DOPC konnte zudem auch der Einfluss des Sättigungsgrads der konventionellen Phospholipide auf die Mischbarkeit der Lipidkomponenten untersucht werden. In Mischung mit DPPC konnte für keines der

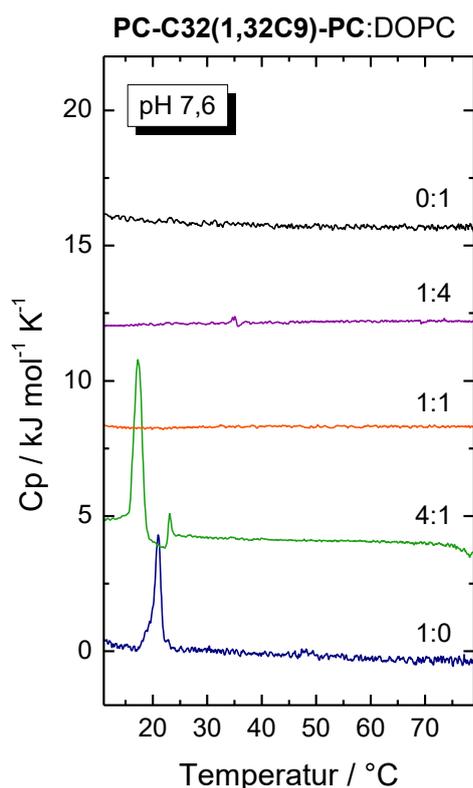


Abb. 18 DSC Heizkurven der **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC** Lipidmischungen ($c = 3 \text{ mM}$) in Phosphatpuffer pH 7,4. Heizrate: 60 K h^{-1} . DSC Heizkurven der reinen Lipide sind zum Vergleich gezeigt. Die Kurven sind vertikal verschoben. Entnommen aus Publikation 5.

C32(1,32C9)-PC mit POPC oder DOPC in den molaren Verhältnissen von 1:4 (und 1:1 im Falle der Lipidmischungen mit **PC-C32(1,32C9)-PC**, siehe Abb. 18) keine oder nur noch sehr breite Umwandlungen innerhalb des Messbereichs beobachtet werden. Da auch die Phasenumwandlung des reinen Bolalipids in den Thermogrammen dieser Lipidmischungen nicht mehr detektierbar war, wurde eine Mischbarkeit der Lipidkomponenten angenommen. Hierbei ist zu beachten, dass zusätzliche Phasenumwandlungen unterhalb des Messbereichs ($5\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$) nicht ausgeschlossen werden können. Nach der Extrusion der 1:4 ($n:n$, Bolalipid:Phospholipid) Lipidmischungen von **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** mit POPC und DOPC konnte mittels EM-Aufnahmen die Bildung von Liposomen mit einer Größe von 100-200 nm bestätigt werden. Im Falle cryo-fixierter EM Proben konnten, wie bereits für Liposomen mit asymmetrischen Glyceroldietherbolalipiden, einige längliche Liposomen in den EM-Aufnahmen detektiert werden.

Auch in diesem Fall ist das Auftreten von Packungsdefekten oder die unterschiedliche Phasenlage der Lipidkomponenten eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung. In den

einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipide in den untersuchten Mischungsverhältnissen eine Mischbarkeit festgestellt werden. Durch diese Resultate wurde deutlich, dass mit DPPC als Mischungspartner die Länge der Alkylsubstituenten bis C9 unerheblich für die Mischbarkeit zu sein scheint und auch eine C9-Alkylkette die Hohlräume in der DPPC-Lipiddoppelschicht nicht ausreichend ausfüllen kann, um eine Mischbarkeit der Lipidkomponenten zu bewirken.

Durch die Mischungsexperimente mit POPC und DOPC wurde deutlich, dass die zunehmende Länge des Alkylsubstituenten des Bolalipids eine bessere Mischbarkeit mit ungesättigten, konventionellen Phospholipiden bedingt. Während die Thermogramme von **PC-C32(1,32C3)-PC** mit allen drei verwendeten Phospholipiden in allen drei untersuchten, molaren Verhältnissen Entmischungstendenzen zeigten, konnte in den DSC-Kurven von **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-**

FFEM-Aufnahmen der 1:4 Lipidmischungen von **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** mit DOPC konnte zudem eine raue Oberfläche der Vesikel im Vergleich zum umliegenden Eis beobachtet werden (siehe Abb. 19). BEVERIDGE *et al.* machten in den FFEM-Aufnahmen ihrer Archaeosomen mit membrandurchspannenden TELs eine ähnliche Beobachtung. Die Arbeitsgruppe vermutete die Bildung von TEL-Komplexen als die Ursache für dieses Phänomen.²⁷ Im Falle der **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC**- und **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC**-Vesikel könnte die raue Oberfläche somit auf die Bildung von Bolalipid-Komplexen zurückzuführen sein. Dies bedeutet, dass die FFEM-Aufnahmen die Einlagerung der Bolalipide **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** in die Vesikelmembran bestätigten.

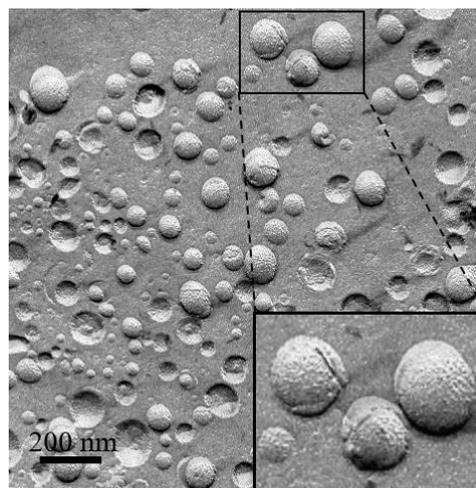


Abb. 19 FFEM-Aufnahmen einer wässrigen Dispersion einer **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC** Lipidmischung (1:4, n:n). Die raue Oberfläche der Vesikel im Vergleich zum umgebenden Eis ist im vergrößerten Bildausschnitt deutlich zu erkennen. Lipidkonzentration $c = 6 \text{ mM}$ in PBS mit pH 7,4.

Partikelgrößenmessungen mittels DLS bewiesen weiterhin die Stabilität der hergestellten Bolasomen bezüglich Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung über 21 Tage mit zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C.

Aus diesen Resultaten kann zusammengefasst werden, dass:

- i. die Mischbarkeit der einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipide mit ungesättigten Phospholipiden mit zunehmender Länge des Alkylsubstituenten zunimmt;
- ii. einkettige, alkylsubstituierte Bolalipide auf Grund der steifen Alkylketten des konventionellen Phospholipids auch unabhängig von der Länge des Alkylsubstituenten keine ideale Mischbarkeit mit DPPC zeigen;
- iii. im Falle der Bolalipide **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** in einem molaren Verhältnis von 1:4 und 1:1 (Bolalipid:Phospholipid) mit den ungesättigten Phospholipiden POPC und DOPC eine Mischbarkeit erreicht werden kann, welche im Falle der 1:4 Mischungen nach der Extrusion der Lipidmischungen bewiesenermaßen in Bolasomen mit einheitlicher Partikelgröße resultiert;
- iv. die hergestellten Bolasomen lagerstabil über mindestens 21 Tage sind;
- v. im Zuge dieser Untersuchungen erstmalig die Herstellung von Liposomen gelungen ist, die artifizielle, alkylsubstituierte, einkettige Bolalipide enthalten.

7.5 *IN VITRO* STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN AN BOLALIPID-LIPOSOMEN

Die Mischungsexperimente mit asymmetrischen Glyceroldietherbolalipiden und einkettigen, alkylverzweigten Bolalipiden haben in Kombination mit ungesättigten Phospholipiden vielversprechende Resultate geliefert. Auf Grund der guten Mischbarkeit von artifiziellen Bolalipiden mit den membranbildenden Phospholipiden POPC und DOPC, war es erstmals möglich, modifizierte Vesikel herzustellen, die die Bolalipide **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** oder **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** bzw. **PC-C32(1,32C6)-PC** oder **PC-C32(1,32C9)-PC** enthalten. Dies ist ein erster erfolgreicher Schritt in Richtung des Ziels, eine Bolalipid-stabilisierte, liposomale Formulierung herzustellen, die für die orale Gabe geeignet ist. Auf Grund dieses Anwendungsziels war der logische, nächste Schritt *in vitro* Untersuchungen der hergestellten Bolasomen bezüglich ihrer Stabilität im GIT durchzuführen.

Da die Synthese der einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipide gegenüber der Synthese der asymmetrischen Glyceroldietherbolalipiden weniger zeitaufwändig und kostenintensiv (vgl. GRUHLE *et al.* und DRESCHER *et al.*)^{189, 191} und damit perspektivisch ökonomischer ist, wurden die Bolalipid-Liposomen mit **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** für die Stabilitätsuntersuchungen ausgewählt.

Neben Liposomen, hergestellt aus den 1:4 Lipidmischungen **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC** und **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC**, wurde auch eine 1:4 Lipidmischung von **PC-C32(1,32C9)-PC** mit Sojalecithin (SojaPC) für weiterführende Untersuchungen verwendet (Publikation 6, S. MUELLER, K. GRUHLE, A. MEISTER, G. HAUSE und S. DRESCHER, *Pharmaceutics*, 2019, **11**, 646).²⁰⁰ Da in den letzten Jahren in der pharmazeutischen Industrie ein Trend zu Verwendung von Lipiden aus natürlichen Ressourcen entstand, wurde mit Hinblick auf eine spätere, industrielle Herstellung von Bolasomen das natürliche Sojalecithin (SojaPC) als Mischungspartner des Bolalipids **PC-C32(1,32C9)-PC** ausgewählt.^{71, 201}

Sowohl DSC-Thermogram als auch EM-Aufnahmen der extrudierten 1:4 Lipidmischung von **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC** waren vergleichbar zu den entsprechenden Daten der Lipidmischung **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC**.²⁰⁰ Im Gegensatz zu den **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC**-Vesikeln zeigten Messungen mittels DLS der **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC**-Liposomen an Tag 7 nach der Extrusion und Lagerung bei 4 °C Instabilitäten bezüglich Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung. Die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung suggerierte eine bimodale Größenverteilung in der Probedispersion, was auf Fusion oder Aggregation der Liposomen in der Probe auf Grund der Oxidationsanfälligkeit des Sojalecithins schließen ließ.

Die Stabilität archaealer Zellmembranen bei niedrigen pH-Werten lässt sich unter anderem mit der geringeren Permeabilität der Lipidschichten gegen Protonen begründen.^{202, 203} Diese verminderte Permeabilität wäre eine wünschenswerte Eigenschaft oral verabreichter, bolalipidhaltiger Liposomen. Für die Testung der Permeabilität der modifizierten Liposomen wurde die Dithionitmethode von McINTYRE *et al.* verwendet.¹⁸⁴ Es wurde die Permeabilität von **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC** und **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC** Liposomen im Vergleich zu konventionellen DOPC-Vesikeln charakterisiert und festgestellt, dass die Permeation zugesetzter Dithionitionen durch die Bolalipid-modifizierte Membran fast zweimal so schnell erfolgt, wie im Fall der unmodifizierten Vesikel. Dieses Ergebnis entsprach zunächst nicht den Erwartungen, dass die inkorporierten Bolalipide die Permeabilität der Membran herabsetzen. Allerdings war in den FFEM-Aufnahmen der modifizierten Bolalipid-Liposomen eine raue Oberfläche der Vesikel beobachtet worden (siehe Abb. 19), die einer Domänenbildung der Bolalipide zugeschrieben wurde. Es ist daher naheliegend, die erhöhte Permeabilität der bolalipidhaltigen Liposomen auch auf diese intravesikuläre Phasenseparation zurückzuführen. Die Membranen der modifizierten Vesikel zeigten vermutlich auf Grund von Membrandefekten eine höhere Permeabilität gegenüber den Dithionitionen. Auch wenn diese Beobachtung nicht den anfänglichen Erwartungen entsprach, war dies trotzdem ein weiterer Beweis für die erfolgreiche Einlagerung von Bolalipidmolekülen in eine konventionelle Liposomenmembran. Zur Testung der *in vitro* Stabilität der Bolasomen, hergestellt aus den Lipidmischungen **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC**, **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC** sowie **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC**, wurden die Bolalipid-Liposomen und entsprechenden, unmodifizierte Liposomen als Vergleich in künstliche Verdaumedien bei 37 °C inkubiert. Sowohl die Messung der Partikelgröße als auch die Bestimmung der Freisetzung eines wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffes, der zuvor in die Vesikel verkapselt wurde, sollten eine Aussage über die Stabilität der modifizierten Vesikel in den unterschiedlichen Verdaumedien liefern.

Während der Inkubation in PBS (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) setzten alle Bolalipid-Liposomen über die Inkubationszeit von drei Stunden deutlich weniger Calcein frei als konventionelle Liposomen (Abb. 20A) Dies suggeriert die Bildung einer Diffusionsbarriere für das hydrophile Calcein durch die Modifikation der Liposomenmembran mit artifiziellen Bolalipiden. Für alle untersuchten Bolalipid-Liposomen als auch die konventionellen, unmodifizierten Vesikel, konnte während der Inkubation in PBS über den Messzeitraum von vier Stunden keine Änderung der Partikelgröße festgestellt werden.

DISKUSSION

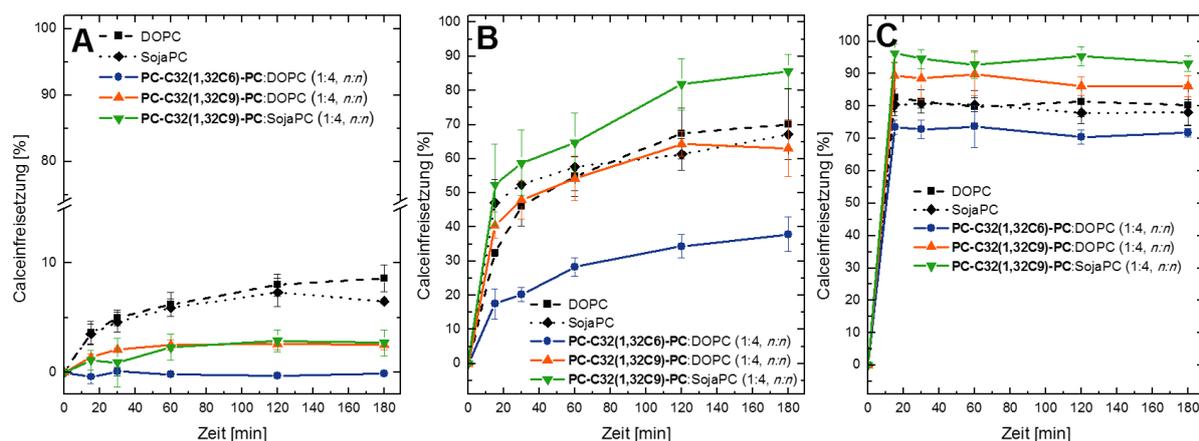


Abb. 20 Calceinfreisetzung von konventionellen und Bolalipid-modifizierten Vesikeln während der Inkubation bei 37 °C in (A) PBS, (B) SGF und (C) SIF. Gesamtlipidkonzentration von allen Lipiddispersionen nach der Verdünnung mit den entsprechenden Inkubationsmedien: $c = 0,071$ mM. Entnommen aus [Publikation 6](#).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Diffusion des Calceins bei allen Vesikeln in diesem Dispersionsmedium durch eine intakte Liposomenmembran erfolgte.

Während der Inkubation der Vesikel in künstlichem Magensaft (*simulated gastric fluid*, SGF) zeigten alle Vesikel keine Veränderung in der Partikelgröße oder deren Verteilung. Somit kann erneut davon ausgegangen werden, dass das freigesetzte Calcein durch eine intakte Liposomenmembran diffundiert. **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC** Liposomen zeigten im Vergleich zu unmodifizierten Liposomen eine fast 50 % geringere Freisetzung an Calcein (siehe Abb. 20B). Auch **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC** Liposomen setzten weniger Fluoreszenzmarker frei als die entsprechenden konventionellen Vesikel. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch artifizielle Bolalipide eine verbesserte Stabilität von Phospholipid-Liposomen unter bestimmten physiologischen Bedingungen erreicht werden kann. Der molekulare Mechanismus der Stabilisierung der Liposomenmembran ist bisher noch nicht geklärt. Möglich wäre die Bildung einer Diffusionsbarriere auf Grund der sterischen Hinderung durch die Alkylsubstituenten der Bolalipide. Da die Liposomen vor dem Versuch nicht extrudiert wurden, ist auch ein Einfluss der unterschiedlichen Lamellarität der modifizierten Liposomen denkbar. Je mehr Lipiddoppelschichten ein Liposom aufweist, desto weniger im Inneren verkapseltes Calcein wird über einen bestimmten Zeitraum freigesetzt.

Durch die Messergebnisse der Calceinfreisetzung der **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC**-Liposomen in SGF konnte gezeigt werden, dass der membranstabilisierende Effekt der Bolalipide auch durch die verwendete, konventionelle Lipidkomponente beeinflusst wird. Die modifizierten **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC**-Liposomen setzten im Vergleich zu den konventionellen SojaPC-Vesikeln ca. 15 % mehr Calcein nach drei Stunden Inkubationszeit frei (siehe Abb. 20B). Der Grund hierfür kann derzeit nur vermutet werden. Möglicherweise

erzeugen die Bolalipide in der Liposomenmembran in diesem Fall eine Störung der Packungsdichte der Lipide, welche die Diffusion von Calcein durch die Membran erleichtert. Auch ein Einfluss auf die Lamellarität der Liposomen ist in diesem Fall denkbar.

Die erhöhte Freisetzung von Calcein aller Liposomen in SGF im Vergleich zu der Freisetzung in PBS ist vermutlich auf die hohe Protonenkonzentration im Verdaumedium und daraus resultierend einer leichten Destabilisierung der Liposomenmembran zurückzuführen ohne dass dabei die Integrität der Liposomen zerstört wurde.²⁰⁴ Auch die Unterschiede im osmotischen Druck zwischen dem wässrigen Innenraum des Liposoms und dem umgebenden Dispersionsmediums auf Grund der hohen Protonenkonzentration können die Freisetzung des Calceins fördern.²⁰⁵

Archaeosomen mit TELs zeigen eine erhöhte Stabilität bei niedrigen pH-Werten auf Grund ihrer geringeren Permeabilität gegenüber kleinen Molekülen. Methylverzweigungen in den Alkylketten der Lipide scheinen die Permeabilität dabei besonders stark herabzusetzen.^{185, 206} Dieser stabilisierende Effekt bei der Inkubation in SGF konnte vor allem für **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC**-Liposomen nachgewiesen werden während **PC-C32(1,32C9)-PC/DOPC**-Liposomen gegenüber **PC-C32(1,32C6)-PC/DOPC**-Liposomen eine höhere Freisetzung von Calcein in SGF zeigten. Somit scheinen C6-Alkylsubstituenten einen stabilisierenden Effekt auf die Liposomenmembran in SGF zu haben, wohingegen längere, C9-Alkylsubstituenten die Permeabilität gegenüber Calcein wieder erhöhen.

Während die modifizierten und konventionelle Liposomen in PBS und SGF sehr unterschiedliche Stabilitäten zeigten, wurden alle inkubierten Vesikel kurze Zeit nach Beginn der Inkubation in künstlichem Darmsaft (*simulated intestinal fluid*, SIF) zu Mischmizellen solubilisiert. Dies äußerte sich in einer Änderung der Partikelgröße auf 2-12 nm sowie der Freisetzung von 70-95 % des verkapselten Calceins innerhalb der ersten 15 Minuten nach Beginn der Inkubation (siehe Abb. 20C). Die Stabilität der untersuchten Bolasomen in SIF entsprach nicht den Erwartungen. Es erfolgte eine rasche Solubilisierung durch die im Verdaumedium enthaltenen Gallensalze. Gallensalze stellen für lipidhaltige Arzneistoffträger vermutlich die anspruchsvollste Hürde im GIT dar.²⁰⁷ Es konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass Archaeosomen mit natürlichen TELs eine gegenüber konventionellen Liposomen erhöhte Stabilität gegen Gallensalze aufweisen.^{145, 147, 157} Diese Eigenschaft konnte für die in der vorliegenden Dissertationsschrift charakterisierten Bolasomen nicht nachgewiesen werden – die verwendeten Bolalipide **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-**

C32(1,32C9)-PC scheinen die Liposomenmembran nicht gegen die Einlagerung von Gallensalzen stabilisieren zu können.

Mit Hinblick auf eine spätere, industrielle Fertigung von Bolalipid-haltigen Liposomen für die orale Anwendung wurde eine Gefriertrocknung von **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC-Liposomen** sowie konventionellen SojaPC-Liposomen zum Vergleich durchgeführt. Hierfür wurde entweder Trehalose oder Lysin als Kryoprotektor der wässrigen Phase der Lipiddispersion zugesetzt. Vor der Gefriertrocknung wurde zunächst die Verkapselungseffizienz der **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC-Liposomen** und SojaPC-Liposomen für Calcein ermittelt. Bolalipidhaltige Liposomen zeigten vor der Gefriertrocknung sowohl bei der Verwendung von Lysin als auch Trehalose als Kryoprotektor eine höhere Verkapselungseffizienz für Calcein gegenüber konventionellen SojaPC-Liposomen (siehe Abb. 21A). Da die Liposomen in allen Fällen nicht extrudiert waren, ist es möglich, dass auch eine unterschiedliche Lamellarität dieses Ergebnis beeinflusst. Um eine Aussage über die Stabilität der Bolalipid-Liposomen während der Gefriertrocknung treffen zu können, wurde die Retention des verkapselten Fluoreszenzmarkers Calceins während der Gefriertrocknung und anschließenden Rekonstitution der Vesikel bestimmt. Sowohl bei der Verwendung des Kryoprotektors Lysin als auch Trehalose, zeigten bolalipidhaltige Liposomen vergleichbare Retentionen gegenüber konventionellen Vesikeln (siehe Abb. 21B).

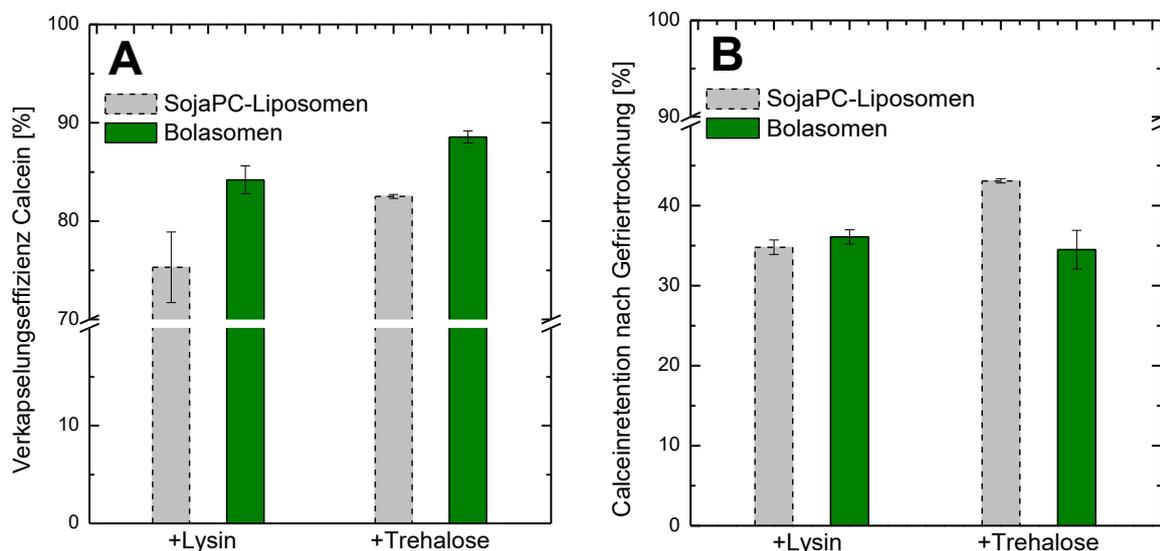


Abb. 21 (A) Verkapselungseffizienz (%) der konventionellen SojaPC-Liposomen (graue Balken) und modifizierten **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC-Liposomen** (grüne Balken) für Calcein vor der Gefriertrocknung in PBS mit entweder Lysin (linke Seite) oder Trehalose (rechte Seite) als Kryoprotektor. (B) Calceinretention (%) nach der Gefriertrocknung und Rehydratation mit deionisiertem Wasser von konventionellen SojaPC-Liposomen (graue Balken) und modifizierten **PC-C32(1,32C9)-PC/SojaPC-Liposomen** (grüne Balken) mit der Verwendung von entweder Lysin (linke Seite) oder Trehalose (rechte Seite) als Kryoprotektor.

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei zentrale Fragestellungen bezüglich asymmetrischer Glyceroldietherbolalipide und einkettiger, alkylsubstituierter Bolalipide umfassend bearbeitet. Zum einen wurde das Aggregationsverhalten der reinen Bolalipide in wässrigen Lösungen eingehend charakterisiert. Zum anderen wurde die Mischbarkeit der Bolalipide mit membranbildenden Phospholipiden untersucht und geeignete Lipidmischungen für die Herstellung modifizierter, bolalipidhaltiger Liposomen evaluiert. Darauf aufbauend erfolgte eine eingehende Charakterisierung der hergestellten Bolalipid-Liposomen. Mittels Untersuchungen der modifizierten Liposomen bezüglich der Stabilität im GIT konnte eine erste Aussage über die Eignung als zukünftiges, orales Arzneistoffträgersystem getroffen werden.

Das Aggregationsverhalten der reinen Bolalipide wurde mit unterschiedlichen Methoden wie DSC, TEM, FTIR, SANS, SAXS und DLS in wässriger Volumenphase charakterisiert. Zudem wurde der Einfluss der Molekülstruktur wie der Molekülasymmetrie, die Protonierbarkeit der Kopfgruppen sowie die Länge von Alkylsubstituenten auf das Aggregationsverhalten in wässrigen Dispersionen untersucht und diskutiert. Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen und ergänzen das Wissen über das Aggregationsverhalten von artifiziellen Bolalipiden und bilden die Basis für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Nach wie vor ist das Aggregationsverhalten artifizieller Bolalipide nicht über die chemische Struktur der Moleküle eindeutig vorhersagbar. In dieser Dissertation konnte die bevorzugte Aggregation der asymmetrischen Glyceroldietherbolalipide in lamellare, interdigitierte Schichten bestätigt werden. Parameter wie Phasenumwandlungen, Stabilität der lamellaren Schichten oder Neigungswinkel der Moleküle im Lipidbilayer sind trotzdem noch immer nur experimentell ermittelbar. Nicht vollständig geklärt ist auch das sich ändernde Aggregationsverhalten von Bolalipiden mit Me₂PE-Kopfgruppen in Dispersionen mit unterschiedlichen pH-Werten. Durch weitere experimentelle Untersuchungen und die Synthese neuer, asymmetrischer Bolalipide und Bolalipide mit protonierbaren Kopfgruppen könnten weitere Erkenntnisse über das Aggregationsverhalten dieser Lipide erlangt werden.

Die einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipide, die im Rahmen dieser Dissertationsschrift physikochemisch charakterisiert wurden, sind eine völlig neue Gruppe artifizieller Bolalipide. Die Änderung der Länge der Alkylsubstituenten führte zu einem sehr unterschiedlichen Aggregationsverhalten der drei untersuchten Bolalipide **PC-C32(1,32C3)-PC**, **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC**. Sowohl die Anordnung der Lipidmoleküle in den

beobachteten Aggregaten als auch die Triebkraft hinter der Änderung des Aggregationsverhaltens sind nach wie vor noch unklar und sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Geeignete Methoden für die Bestimmung der Anordnung der Moleküle in den Lipidaggregaten sind hierbei SANS und SAXS.

Auch Messungen mittels FTIR könnte das Aggregationsverhalten der Bolalipide während der Phasenumwandlungen eingehender charakterisieren. Die Synthese weiterer, alkylverzweigter Bolalipide könnte zu einem besseren Verständnis für das Aggregationsverhalten dieser Gruppe artifizierender Bolalipide beitragen.

Eine weitere Fragestellung dieser Dissertation war die Mischbarkeit artifizierender Bolalipide mit konventionellen Phospholipiden. Sowohl die asymmetrische Glyceroldietherbolalipide **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** und **PC-Gly(2C16Me)C32-PC** als auch die einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipide **PC-C32(1,32C6)-PC** und **PC-C32(1,32C9)-PC** zeigten eine Mischbarkeit mit ungesättigten Phospholipiden. Auf Grund dieser Mischbarkeit gelang es, Phospholipid-Liposomen herzustellen, die entweder asymmetrische Glyceroldietherbolalipide oder einkettige, alkylsubstituierte Bolalipide enthielten.

Bolasomen, hergestellt mit den asymmetrischen Glyceroldietherbolalipiden **PC-Gly(2C16Me)C32-Me₂PE** und **PC-Gly(2C16Me)C32-PC**, wurden im Rahmen dieser Dissertation lediglich bezüglich ihrer Lagerstabilität und mittels EM-Aufnahmen charakterisiert. Zukünftige Arbeiten könnten weitere Daten bezüglich Permeabilität der modifizierten Liposomen sowie *in vitro* Stabilität generieren. Da allerdings die Synthese der Glyceroldietherbolalipide im Vergleich zu der Herstellung einkettiger, alkylsubstituierter Bolalipide sehr zeitaufwändig ist, ist eine zukünftige Verwendung dieser Bolalipide im industriellen Maßstab sehr unwahrscheinlich. Trotzdem könnten weitere Daten zur Stabilisierung von Liposomen mittels asymmetrischer Glyceroldietherbolalipide zu einem besseren Verständnis über bolalipidhaltige Liposomen führen.

Die Stabilisierung von Liposomen mittels einkettiger, alkylsubstituierter Bolalipide erscheint vielversprechend. Die modifizierten Vesikel zeigen bei der Verwendung eines synthetischen Lipids als Mischungspartner (POPC, DOPC) eine gute Lagerstabilität sowie eine Stabilisierung konventioneller Liposomen bei physiologischem pH sowie in künstlichem Magensaft.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden Liposomen mit einem Bolalipidanteil von 20 mol% hergestellt und eingehend charakterisiert. Die Variation des Bolalipidanteils sollte Gegenstand zukünftiger Arbeiten auf diesem Gebiet sein. Dies könnte den Einfluss des

Bolalipids auf die Morphologie, Permeabilität und Stabilität modifizierter Liposomen in künstlichen Verdaumedien genauer charakterisieren.

Es konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass die Variation der konventionellen Lipidkomponente erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften bolalipidhaltiger Liposomen hat. So zeigten DOPC-Bolasomen mit einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipiden eine höhere Stabilität in SGF als konventionelle DOPC-Vesikel. Hingegen setzten SojaPC-Bolasomen mit dem gleichen molaren Anteil desselben Bolalipids im gleichen Verdaumedium deutlich mehr Calcein frei als unmodifizierte SojaPC-Liposomen. Dies sollte zukünftig weiter untersucht werden. Denkbar wäre neben der Verwendung von anderen, mehrfach ungesättigten, synthetischen Phosphocholinen wie 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC), der Zusatz natürlicher Lipid wie Eilecithin oder auch die Verwendung ungesättigter zwitterionischer Lipide wie DOPE. Die Einführung einer Ladung in die Bolasomen könnte zu einer zusätzlichen Stabilisierung gegen Aggregation und Fusion auf Grund der elektrostatischen Abstoßung führen.

Neben der Variation des Bolalipidanteils und des konventionellen Lipids sind nun zahlreiche weiterführende Untersuchungen in diesem Bereich denkbar. Die Variation der künstlichen Verdaumedien für die *in vitro* Stabilitätsuntersuchungen ist ein möglicher, nächster Schritt. Oft finden hierfür Medien Anwendung, die sowohl den nüchternen Zustand des GITs simulieren, als auch die physiologischen Bedingungen kurz nach der Nahrungsaufnahme. Dabei unterscheiden sich die Medien in Salzkonzentrationen, pH und Gallensalzkonzentrationen. Die Verwendung solcher Medien könnte Aufschluss über den optimalen Zeitpunkt einer oralen Gabe bolalipidhaltiger Formulierungen geben. Durch die schnelle Solubilisierung der untersuchten Bolasomen in SIF wurde auf die Zugabe von Lipasen zu den künstlichen Verdaumedien bisher verzichtet. Eine separate Betrachtung der Stabilität Bolalipid-modifizierter Liposomen gegenüber z.B. Phospholipasen wäre ein wichtiger Ansatzpunkt.

Um die Stabilität von Liposomen mit den alkylsubstituierten Bolalipiden in SIF zu erhöhen, wäre die Inkorporation von Gallensalzen ein vielversprechender Ansatz. Auch die PEGylierung der Liposomenoberfläche oder die Verwendung von Bolalipiden mit PEGylierten Kopfgruppen ist ein denkbarer Ansatz. Zusätzlich zur Stabilisierung gegen Gallensalze auf Grund einer großen Hydrathülle der PEG-Ketten, würde diese Modifizierung zusätzlich die Mukoadhäsivität der Vesikel verbessern – ein wichtiger Aspekt für die spätere, orale Anwendung. Wichtig ist dabei zu bedenken, dass trotz einer ausreichenden Stabilisierung der

Nanoformulierungen im GIT der später verkapselte Arzneistoff im Darmlumen resorbiert werden soll.

Hier gilt es einen Kompromiss zwischen Stabilität und rechtzeitiger Freisetzung des Arzneistoffs aus den Liposomen zu finden.

Die Variation der chemischen Struktur der einkettigen, alkylsubstituierten Bolalipide ist einer der wichtigsten Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten. Die physikochemische Charakterisierung von Bolalipiden mit unterschiedlich langen Alkylsubstituenten könnte nicht nur zu einem besseren Verständnis für das Aggregationsverhalten dieser Bolalipide führen, sondern womöglich auch zu einer noch besseren Mischbarkeit mit konventionellen Lipiden und damit zu einer effektiveren Stabilisierung von Phospholipid-Liposomen für die orale Anwendung.

Nach der erfolgreichen Entwicklung einer durch artifizielle Bolalipide stabilisierte, liposomale Formulierung, die eine ausreichende Stabilität und entsprechender Freisetzung im GIT aufweist, können Arzneistoffe verkapselt werden. Sehr vielversprechend erscheint hier die Verwendung von Insulin. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Bolalipid-Liposomen eine gute Verkapselungseffizienz für hydrophile Stoffe (Calcein) aufweisen. Die Verkapselung von Insulin in Bolasomen könnte zudem den Peptidarzneistoff im Magensaft vor Denaturierung schützen und damit perspektivisch die orale Bioverfügbarkeit steigern.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bolalipid-Vesikel konventionellen Liposomen bezüglich der Calceinretention während der Gefriertrocknung weder über- noch unterlegen sind. Gegenstand zukünftiger Arbeiten auf diesem Gebiet sollte die Verwendung unterschiedlicher Kryoprotektoren sowie die Variation von Prozess-parametern wie Temperatur während des Einfrierens, Trocknungszeit und Druck sein.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte ein Meilenstein in der Arbeit mit artifiziellen Bolalipide erreicht werden – die Herstellung von stabilen, bolalipidhaltigen Liposomen. Dies und die zahlreichen Erkenntnisse, die durch die Charakterisierung dieser neuartigen Vesikel gewonnen wurden, bilden eine Grundlage für viele weitere Arbeiten auf diesem Gebiet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. T. H. M. Da Costa and M. K. Ito, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, ed. B. Caballero, Academic Press, Oxford, 2003, DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00917-2>, pp. 4523-4531.
2. J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press Limited, 3rd edn., 2011.
3. C. Osman, D. R. Voelker and T. Langer, *The Journal of Cell Biology*, 2011, **192**, 7-16.
4. T. J. O'Leary, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 429-433.
5. P. Dupree, R. G. Parton, G. Raposo, T. V. Kurzchalia and K. Simons, *EMBO J.*, 1993, **12**, 1597-1605.
6. K. Simons and E. Ikonen, *Nature (London)*, 1997, **387**, 569-572.
7. K. Iwabuchi, *Methods Mol. Biol. (N. Y., NY, U. S.)*, 2018, **1804**, 83-95.
8. K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. Fujiwara, M. Kiso and A. Kusumi, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, **1104**, 41-58.
9. R. H. Gensure, M. L. Zeidel and W. G. Hill, *Biochem. J.*, 2006, **398**, 485-495.
10. W. H. Binder, V. Barragan and F. M. Menger, *Angewandte Chemie*, 2003, **115**, 5980-6007.
11. P. Garidel and A. Blume, *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1371**, 83-95.
12. P. Garidel and A. Blume, *Eur. Biophys. J.*, 2000, **28**, 629-638.
13. P. Garidel, C. Johann and A. Blume, *Biophys J*, 1997, **72**, 2196-2210.
14. W. Chen, F. Duša, J. Witos, S.-K. Ruokonen and S. K. Wiedmer, *Scientific Reports*, 2018, **8**, 14815.
15. Z. V. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. E. S. Dahms and D. T. Cramb, *Biophysical Journal*, 2004, **86**, 3783-3793.
16. S. Massari and R. Colonna, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1986, **863**, 264-276.
17. P. Garidel, C. Johann and A. Blume, *J. Liposome Res.*, 2000, **10**, 131-158.
18. T. Devanand, S. Krishnaswamy and S. Vemparala, *The Journal of Membrane Biology*, 2019, **252**, 331-342.
19. S. T. Reddy, S. Shrivastava and A. Chattopadhyay, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2018, **210**, 22-27.
20. A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 238-252.
21. B. Felice, M. P. Prabhakaran, A. P. Rodríguez and S. Ramakrishna, *Materials Science and Engineering: C*, 2014, **41**, 178-195.
22. M. L. Etheridge, S. A. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes, S. M. Wolf and J. McCullough, *Nanomedicine (New York, NY, U. S.)*, 2013, **9**, 1-14.
23. M. L. Immordino, F. Dosio and L. Cattell, *Int. J. Nanomed.*, 2006, **1**, 297-315.
24. G. V. Betageri and D. L. Parsons, *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, **81**, 235-241.
25. R. W. Niven, M. Speer and H. Schreier, *Pharm. Res.*, 1991, **8**, 217-221.
26. M. Almgren, K. Edwards and G. Karlsson, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000, **174**, 3-21.
27. T. J. Beveridge, C. G. Choquet, G. B. Patel and G. D. Sprott, *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 1191-1197.
28. P. A. Hassan, S. Rana and G. Verma, *Langmuir*, 2015, **31**, 3-12.
29. J. Kuntsche, C. Decker and A. Fahr, *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 1993-2001.
30. C. Grabielle-Madelmont, S. Lesieur and M. Ollivon, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2003, **56**, 189-217.
31. G. Bozzuto and A. Molinari, *Int. J. Nanomed.*, 2015, **10**, 975-999.

32. C. Dwivedi, P. L. Sivna, S. Rane, R. Yadav, S. P. Rao, B. Kumar, M. K. Dewangan and D. Sinha, *World J. Pharm. Res.*, 2015, **4**, 1110-1141.
33. A. Mohan, S. Narayanan, S. Sethuraman and U. M. Krishnan, *BioMed Res. Int.*, 2014, DOI: 10.1155/2014/424239, 424239/424231-424239/424215.
34. L. A. S. Abu and T. Ishida, *Biol Pharm Bull*, 2017, **40**, 1-10.
35. W. C. Zamboni, *Oncologist*, 2008, **13**, 248-260.
36. D. D. Lasic, *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**, 307-321.
37. J. A. Silverman, L. Reynolds and S. R. Deitcher, *J. Clin. Pharmacol.*, 2013, **53**, 1139-1145.
38. M. D. Moen, K. A. Lyseng-Williamson and L. J. Scott, *Drugs*, 2009, **69**, 361-392.
39. D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin and D. Papahadjopoulos, *Pharmacol. Rev.*, 1999, **51**, 691-743.
40. J. Lao, J. Madani, T. Puertolas, M. Alvarez, A. Hernandez, R. Pazo-Cid, A. Artal and A. Anton Torres, *J. Drug Delivery*, 2013, DOI: 10.1155/2013/456409, 456409, 456412 pp.
41. S. M. Rafiyath, M. Rasul, B. Lee, G. Wei, G. Lamba and D. Liu, *Exp. Hematol. Oncol.*, 2012, **1**, 10.
42. T. L. Andresen, S. S. Jensen and K. Jorgensen, *Prog. Lipid Res.*, 2005, **44**, 68-97.
43. S. Bandak, D. Goren, A. Horowitz, D. Tzemach and A. Gabizon, *Anti-Cancer Drugs*, 1999, **10**, 911-920.
44. Y. Barenholz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2001, **6**, 66-77.
45. H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J. W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain and D. M. McDonald, *The American journal of pathology*, 2000, **156**, 1363-1380.
46. R. Fanciullino and J. Ciccolini, *Curr. Med. Chem.*, 2009, **16**, 4361-4373.
47. D. P. O'Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne and J. L. West, *Cancer Lett. (Amsterdam, Neth.)*, 2004, **209**, 171-176.
48. M. C. Woodle, K. K. Matthay, M. S. Newman, J. E. Hidayat, L. R. Collins, C. Redemann, F. J. Martin and D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1992, **1105**, 193-200.
49. R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Mueller, J. M. Verbavatz and R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1995, **16**, 215-233.
50. F. K. Bedu-Addo, P. Tang, Y. Xu and L. Huang, *Pharm. Res.*, 1996, **13**, 710-717.
51. A. A. Gabizon, *Clin. Cancer Res.*, 2001, **7**, 223-225.
52. B. A. Korgel, J. H. Van Zanten and H. G. Monbouquette, *Biophys. J.*, 1998, **74**, 3264-3272.
53. Y. Barenholz, *Journal of Controlled Release*, 2012, **160**, 117-134.
54. R. B. Campbell, D. Fukumura, E. B. Brown, L. M. Mazzola, Y. Izumi, R. K. Jain, V. P. Torchilin and L. L. Munn, *Cancer Res.*, 2002, **62**, 6831-6836.
55. C. Bombelli, G. Caracciolo, P. Di Profio, M. Diociaiuti, P. Luciani, G. Mancini, C. Mazzuca, M. Marra, A. Molinari, D. Monti, L. Toccaceli and M. Venanzi, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4882-4891.
56. P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 7413-7417.
57. U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni and W. Khan, *Pharmaceutics*, 2017, **9**, 12/11-12/33.
58. C. L. Ventola, *P T*, 2017, **42**, 742-755.
59. P. M. Anderson, P. Meyers, E. Kleinerman, K. Venkatakrishnan, D. P. Hughes, C. Herzog, W. Huh, R. Sutphin, Y. M. Vyas, V. Shen, A. Warwick, N. Yeager, C. Oliva, B. Wang, Y. Liu and A. Chou, *Pediatr. Blood Cancer*, 2014, **61**, 238-244.

60. B. Carvalho, E. Riley, S. E. Cohen, D. Gambling, C. Palmer, H. J. Huffnagle, L. Polley, H. Muir, S. Segal, C. Lihou and G. Manvelian, *Anesth. Analg. (Hagerstown, MD, U. S.)*, 2005, **100**, 1150-1158.
61. A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang and Y. Barenholz, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 987-992.
62. P. D. Clarke, P. Adams, R. Ibanez and C. Herzog, *Travel Med Infect Dis*, 2006, **4**, 313-318.
63. R. Gluck, R. Mischler, B. Finkel, J. U. Que, B. Scarpa and S. J. Cryz, Jr., *Lancet*, 1994, **344**, 160-163.
64. J. P. Clancy, L. Dupont, M. W. Konstan, J. Billings, S. Fustik, C. H. Goss, J. Lymp, P. Minic, A. L. Quittner, R. C. Rubenstein, K. R. Young, L. Saiman, J. L. Burns, J. R. W. Govan, B. Ramsey and R. Gupta, *Thorax*, 2013, **68**, 818-825.
65. P. Wolf, H. Maier, R. R. Mullegger, C. A. Chadwick, R. Hofmann-Wellenhof, H. P. Soyer, A. Hofer, J. Smolle, M. Horn, L. Cerroni, D. Yarosh, J. Klein, C. Bucana, K. Dunner, Jr., C. S. Potten, H. Honigsmann, H. Kerl and M. L. Kripke, *J. Invest. Dermatol.*, 2000, **114**, 149-156.
66. W. C. Zamboni, A. C. Gervais, M. J. Egorin, J. H. M. Schellens, E. G. Zuhowski, D. Pluim, E. Joseph, D. R. Hamburger, P. K. Working, G. Colbern, M. E. Tonda, D. M. Potter and J. L. Eiseman, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2004, **53**, 329-336.
67. J. A. Zhang, T. Xuan, M. Parmar, L. Ma, S. Ugwu, S. Ali and I. Ahmad, *Int. J. Pharm.*, 2004, **270**, 93-107.
68. A. Bernkop-Schnurch, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, **49**, 272-277.
69. S. Mazzaferro, K. Bouchemal and G. Ponchel, *Drug Discovery Today*, 2013, **18**, 99-104.
70. K. Thanki, R. P. Gangwal, A. T. Sangamwar and S. Jain, *J. Controlled Release*, 2013, **170**, 15-40.
71. P. van Hoogevest, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, **108**, 1-12.
72. B. V. Kulkarni and R. D. Mattes, *Am. J. Physiol.*, 2014, **306**, R879-R885.
73. T. Kawai and T. Fushiki, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, **285**, R447-454.
74. C. T. Phan and P. Tso, *Front. Biosci.*, 2001, **6**, D299-D319.
75. H. He, Y. Lu, J. Qi, W. Wu, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen and W. Wu, *Acta Pharm Sin B*, 2019, **9**, 36-48.
76. M. Daeihamed, S. Dadashzadeh, A. Haeri and M. F. Akhlaghi, *Curr. Drug Delivery*, 2017, **14**, 289-303.
77. C. Mendes, G. C. Meirelles, M. A. S. Silva and G. Ponchel, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2018, **121**, 236-242.
78. T. Murakami, *Expert Opin. Drug Discovery*, 2017, **12**, 1219-1232.
79. K. Noh, Y. R. Kang, M. R. Nepal, R. Shakya, M. J. Kang, W. Kang, S. Lee, H. G. Jeong and T. C. Jeong, *Arch. Pharmacol Res.*, 2017, **40**, 1345-1355.
80. J. Rubbens, R. Mols, J. Brouwers and P. Augustijns, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, 2018, **548**, 636-641.
81. J. Yan, C. Wang, R. Du, P. Liu and G. Chen, *Chem.-Biol. Interact.*, 2009, **180**, 460-464.
82. J. Li, F. Yu, H. Guo, R. Xiong, W. Zhang, F. He, M. Zhang and P. Zhang, *Cell Res.*, 2019, DOI: 10.1038/s41422-019-0244-6, Ahead of Print.
83. L. M. Ensign, R. Cone and J. Hanes, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 557-570.
84. W. Wu, Y. Lu and J. Qi, *Ther. Delivery*, 2015, **6**, 1239-1241.
85. P. R. Karn, Z. Vanicc, I. Pepicc and N. Sskalko-Basnet, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2011, **37**, 482-488.
86. S. K. Lai, Y.-Y. Wang and J. Hanes, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 158-171.

87. L. Mei, Z. Zhang, L. Zhao, L. Huang, X.-L. Yang, J. Tang and S.-S. Feng, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 880-890.
88. M. V. S. Varma, K. Sateesh and R. Panchagnula, *Mol. Pharm.*, 2005, **2**, 12-21.
89. M. H. Richards and C. R. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1978, **543**, 508-522.
90. J. Parmentier, B. Thewes, F. Gropp and G. Fricker, *Int. J. Pharm.*, 2011, **415**, 150-157.
91. K. Muramatsu, Y. Maitani and T. Nagai, *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, **19**, 1055-1058.
92. I. T. Degim, B. Gumusel, Z. Degim, T. Ozcelikay, A. Tay and S. Guner, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, **6**, 2945-2949.
93. M. A. Al-Meshal, S. H. Khidr, M. A. Bayomi and A. A. Al-Angary, *Int. J. Pharm.*, 1998, **168**, 163-168.
94. P. Sanitt, N. Apiratikul, N. Niyomtham, B.-e. Yingyongnarongkul, W. Assavalapsakul, S. Panyim and A. Udomkit, *J. Biotechnol.*, 2016, **228**, 95-102.
95. S. M. Jensen, C. J. Christensen, J. M. Petersen, A. H. Treusch and M. Brandl, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, 2015, **493**, 63-69.
96. G. R. Negrete and A. M. Mfuh, 2012.
97. Y. Kato, T. Hosokawa, E. Hayakawa and K. Ito, *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, **16**, 740-744.
98. Y. Kato, T. Hosokawa, E. Hayakawa and K. Ito, *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, **16**, 457-461.
99. W. A. Birru, D. B. Warren, A. Ibrahim, H. D. Williams, H. Benameur, C. J. H. Porter, D. K. Chalmers and C. W. Pouton, *Mol. Pharmaceutics*, 2014, **11**, 2825-2834.
100. R. N. Rowland and J. F. Woodley, *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, 1980, **620**, 400-409.
101. K. Andrieux, L. Forte, S. Lesieur, M. Paternostre, M. Ollivon and C. Grabielle-Madelmont, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **71**, 346-355.
102. M. Conacher, J. Alexander and J. M. Brewer, *Vaccine*, 2001, **19**, 2965-2974.
103. A. Shukla, K. Khatri, P. N. Gupta, A. K. Goyal, A. Mehta and S. P. Vyas, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2008, **11**, 59-66.
104. S. Hu, M. Niu, F. Hu, Y. Lu, J. Qi, Z. Yin and W. Wu, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*, 2013, **441**, 693-700.
105. M. Niu, Y. Lu, L. Hovgaard, P. Guan, Y. Tan, R. Lian, J. Qi and W. Wu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **81**, 265-272.
106. P. Guan, Y. Lu, J. Qi, M. Niu, R. Lian, F. Hu and W. Wu, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 965-974.
107. K.-H. Song, S.-J. Chung and C.-K. Shim, *J. Controlled Release*, 2005, **106**, 298-308.
108. I. J. Ayogu, O. Ogbonna, C. I. Ayolugbe and A. A. Attama, *Curr. Drug Delivery*, 2009, **6**, 415-418.
109. M. Niu, Y. Lu, L. Hovgaard and W. Wu, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 1155-1166.
110. H. M. Patel and B. E. Ryman, *FEBS Lett.*, 1976, **62**, 60-63.
111. K. Iwanaga, S. Ono, K. Narioka, K. Morimoto, M. Kakemi, S. Yamashita, M. Nango and N. Oku, *Int. J. Pharm.*, 1997, **157**, 73-80.
112. S. Minato, K. Iwanaga, M. Kakemi, S. Yamashita and N. Oku, *J. Controlled Release*, 2003, **89**, 189-197.
113. Q. Ma, Y. Han, C. Chen, Y. Cao, S. Wang, W. Shen, H. Zhang, Y. Li, M. A. van Dongen, B. He, M. Yu, L. Xu, M. M. Banaszak Holl, G. Liu, Q. Zhang and R. Qi, *Mol. Pharmaceutics*, 2015, **12**, 665-674.
114. Y. Zhang, E. Mintzer and K. E. Uhrich, *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, **482**, 19-26.
115. H. Li, J.-H. Song, J.-S. Park and K. Han, *Int. J. Pharm.*, 2003, **258**, 11-19.
116. Z. Wu, Q. Ping, J. Lai and Y. Wei, *Yaoxue Xuebao*, 2003, **38**, 138-142.
117. N. Thirawong, J. Thongborisute, H. Takeuchi and P. Sriamornsak, *J. Controlled Release*, 2008, **125**, 236-245.

118. K. M. Hosny, O. A. A. Ahmed and R. T. Al-Abdali, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2013, **10**, 741-746.
119. M. Al-Remawi, A. Elsayed, I. Maghrabi, M. Hamaidi and N. Jaber, *Pharm. Dev. Technol.*, 2017, **22**, 390-398.
120. J. Cao, J. Sun, X. Wang, X. Li and Y. Deng, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2009, **35**, 1339-1347.
121. A. Huang, A. Makhlof, Q. Ping, Y. Tozuka and H. Takeuchi, *Drug Delivery*, 2011, **18**, 562-569.
122. H. Chen, J. Wu, M. Sun, C. Guo, A. Yu, F. Cao, L. Zhao, Q. Tan and G. Zhai, *J. Liposome Res.*, 2012, **22**, 100-109.
123. H. Cheng, V. Torchilin and R. Langer, *Pharm. Res.*, 1996, **13**, 1378-1383.
124. P. N. Gupta and S. P. Vyas, *Colloids Surf., B*, 2011, **82**, 118-125.
125. N. Wang, T. Wang, M. Zhang, R. Chen, R. Niu and Y. Deng, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2014, **88**, 194-206.
126. T. Wang, Y. Zhen, X. Ma, B. Wei, S. Li and N. Wang, *Colloids Surf., B*, 2015, **126**, 520-530.
127. F. Zhou, J.-P. Kraehenbuhl and M. R. Neutra, *Vaccine*, 1995, **13**, 637-644.
128. Z. Li, J. Chen, W. Sun and Y. Xu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **394**, 412-417.
129. G. Leriche, J. L. Cifelli, K. C. Sibucão, J. P. Patterson, T. Koyanagi, N. C. Gianneschi and J. Yang, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, DOI: 10.1039/C6OB02832B, Ahead of Print.
130. A. Gambacorta, A. Gliozzi and M. D. Rosa, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **11**, 115-131.
131. A. Caforio and A. J. M. Driessen, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, 2016, DOI: 10.1016/j.bbali.2016.12.006, Ahead of Print.
132. Y.-M. Zhang and C. O. Rock, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, **6**, 222-233.
133. D. S. Nichols, M. R. Miller, N. W. Davies, A. Goodchild, M. Raftery and R. Cavicchioli, *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 8508-8515.
134. M. De Rosa, A. Gambacorta and A. Gliozzi, *Microbiol. Rev.*, 1986, **50**, 70-80.
135. J. S. Sinninghe Damste, S. Schouten, E. C. Hopmans, A. C. T. Van Duin and J. A. J. Geenevasen, *J. Lipid Res.*, 2002, **43**, 1641-1651.
136. J. L. Gabriel and P. L. G. Chong, *Chem. Phys. Lipids*, 2000, **105**, 193-200.
137. M. J. Hanford and T. L. Peoples, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, **97**, 45-62.
138. L. F. Pineda De Castro, M. Dopson and R. Friedman, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 10628-10634.
139. T. Koyanagi, G. Leriche, M. Mayer and J. Yang, 2016.
140. J. L. C. M. van de Vossenbergh, T. Ubbink-Kok, M. G. L. Elferink, A. J. M. Driessen and W. N. Konings, *Mol. Microbiol.*, 1995, **18**, 925-932.
141. P. Uhl, F. Helm, G. Hofhaus, S. Brings, C. Kaufman, K. Leotta, S. Urban, U. Haberkorn, W. Mier and G. Fricker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2016, **103**, 159-166.
142. G. Mahmoud, J. Jedelska, B. Strehlow and U. Bakowsky, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **95**, 88-98.
143. J. Barbeau, N. Belmadi, T. Montier, T. Le Gall, S. Dalencon, L. Lemiegre and T. Benvegnu, *Tetrahedron Lett.*, 2016, **57**, 2976-2980.
144. J. Parmentier, G. Hofhaus, S. Thomas, L. C. Cuesta, F. Gropp, R. Schroeder, K. Hartmann and G. Fricker, *J. Pharm. Sci.*, 2014, **103**, 3985-3993.
145. G. B. Patel and G. D. Sprott, *Crit Rev Biotechnol*, 1999, **19**, 317-357.
146. G. Kaur, T. Garg, G. Rath and A. K. Goyal, *Drug Delivery*, 2016, **23**, 2497-2512.
147. P. L.-G. Chong, *Chem. Phys. Lipids*, 2010, **163**, 253-265.

148. K. Yamauchi, K. Doi, M. Kinoshita, F. Kii and H. Fukuda, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1992, **1110**, 171-177.
149. C. G. Choquet, G. B. Patel and G. D. Sprott, *Can. J. Microbiol.*, 1996, **42**, 183-186.
150. C. G. Choquet, G. B. Patel, T. J. Beveridge and G. D. Sprott, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **42**, 375-384.
151. M. Swain, J. R. Brisson, G. D. Sprott, F. P. Cooper and G. B. Patel, *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1345**, 56-64.
152. G. D. Sprott, C. J. Dicaire, L. P. Fleming and G. B. Patel, *Cells Mater.*, 1996, **6**, 143-155.
153. A. Omri, B. J. Agnew and G. B. Patel, *Int. J. Toxicol.*, 2003, **22**, 9-23.
154. D. A. Brown, B. Venegas, P. H. Cooke, V. English and P. L.-G. Chong, *Chem. Phys. Lipids*, 2009, **159**, 95-103.
155. J. Parmentier, F. J. Hartmann and G. Fricker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2010, **76**, 394-403.
156. WO2017067640A1, 2017.
157. T. Benvegna, G. Rethore, M. Brard, W. Richter and D. Plusquellec, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, 2005, DOI: 10.1039/b511440c, 5536-5538.
158. T. Benvegna, G. Lecollinet, J. Guilbot, M. Roussel, M. Brard and D. Plusquellec, *Polym. Int.*, 2003, **52**, 500-506.
159. G. Leriche, J. L. Cifelli, K. C. Sibucão, J. P. Patterson, T. Koyanagi, N. C. Gianneschi and J. Yang, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 2157-2162.
160. T. Koyanagi, Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., 2017.
161. G. Leriche, T. Koyanagi, Y. H. Kim, K. Gao, D. Onofrei, O. Eggenberger, N. Gianneschi, G. Holland, M. Gilson, D. Sept, M. Mayer and J. Yang, 2018.
162. T. Koyanagi, J. L. Cifelli, G. Leriche, D. Onofrei, G. P. Holland and J. Yang, *Bioconjugate Chem.*, 2017, **28**, 2041-2045.
163. L. Krishnan and G. D. Sprott, *J. Drug Targeting*, 2003, **11**, 515-524.
164. A. Gonzalez-Paredes, M. Manconi, C. Caddeo, A. Ramos-Cormenzana, M. Monteoliva-Sanchez and A. M. Fadda, *J. Liposome Res.*, 2010, **20**, 269-276.
165. A. Ozcetin, E. Dayyoub, C. Hobler, M. Keusgen and U. Bakowsky, *Phys. Status Solidi C*, 2011, **8**, 1985-1989.
166. S. E. Alavi, H. Mansouri, M. K. M. Esfahani, F. Movahedi, A. Akbarzadeh and M. Chiani, *Indian J. Clin. Biochem.*, 2014, **29**, 150-153.
167. A. Attar, C. Bakir, B. Yuce-Dursun, S. Demir, E. Cakmakci, O. Danis, M. Birbir and A. Ogan, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2018, **91**, 153-161.
168. U. F. Heiser and B. Dobner, *Chem. Commun. (Cambridge)*, 1996, DOI: 10.1039/cc9960002025, 2025-2026.
169. K. Koehler, G. Foerster, A. Hauser, B. Dobner, U. F. Heiser, F. Ziethe, W. Richter, F. Steiniger, M. Drechsler, H. Stettin and A. Blume, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 16804-16813.
170. A. Meister, S. Drescher, V. M. Garamus, G. Karlsson, G. Graf, B. Dobner and A. Blume, *Langmuir*, 2008, **24**, 6238-6246.
171. A. Meister, K. Koehler, S. Drescher, B. Dobner, G. Karlsson, K. Edwards, G. Hause and A. Blume, *Soft Matter*, 2007, **3**, 1025-1031.
172. A. Blume, S. Drescher, G. Graf, K. Koehler and A. Meister, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, **208**, 264-278.
173. A. Meister and A. Blume, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, 2012, **16**, 93-128.
174. A. Blume, *Biochemistry*, 1980, **19**, 4908-4913.

175. S. Drescher, G. Graf, G. Hause, B. Dobner and A. Meister, *Biophys. Chem.*, 2010, **150**, 136-143.
176. G. Graf, S. Drescher, A. Meister, B. Dobner and A. Blume, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 10478-10487.
177. K. Koehler, A. Meister, G. Foerster, B. Dobner, S. Drescher, F. Ziethe, W. Richter, F. Steiniger, M. Drechsler, G. Hause and A. Blume, *Soft Matter*, 2006, **2**, 77-86.
178. A. Meister, S. Drescher, G. Karlsson, G. Hause, U. Baumeister, G. Hempel, V. M. Garamus, B. Dobner and A. Blume, *Soft Matter*, 2010, **6**, 1317-1324.
179. S. Drescher, A. Meister, A. Blume, G. Karlsson, M. Almgren and B. Dobner, *Chemistry*, 2007, **13**, 5300-5307.
180. G. Graf, S. Drescher, A. Meister, V. M. Garamus, B. Dobner and A. Blume, *Soft Matter*, 2013, **9**, 9562-9571.
181. S. Drescher, B.-D. Lechner, V. M. Garamus, L. Almasy, A. Meister and A. Blume, *Langmuir*, 2014, **30**, 9273-9284.
182. T. Markowski, S. Drescher, G. Foerster, B.-D. Lechner, A. Meister, A. Blume and B. Dobner, *Langmuir*, 2015, **31**, 10683-10692.
183. S. Drescher, A. Meister, V. M. Garamus, G. Hause, C. J. Garvey, B. Dobner and A. Blume, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2014, **116**, 1205-1216.
184. J. C. McIntyre and R. G. Sleight, *Biochemistry*, 1991, **30**, 11819-11827.
185. M. G. L. Elferink, J. G. de Wit, A. J. M. Driessen and W. N. Konings, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1994, **1193**, 247-254.
186. H. Komatsu and P. L.-G. Chong, *Biochemistry*, 1998, **37**, 107-115.
187. K. Ring, B. Henkel, A. Valenteijn and R. Gutermann, 1986.
188. T. Markowski, S. Muller, B. Dobner, A. Meister, A. Blume and S. Drescher, *Polymers (Basel)*, 2017, **9**.
189. S. Drescher, C. Otto, S. Mueller, V. M. Garamus, C. J. Garvey, S. Gruenert, A. Lischka, A. Meister, A. Blume and B. Dobner, *Langmuir*, 2018, **34**, 4360-4373.
190. A. Meister, M. Bastrop, S. Koschoreck, V. M. Garamus, T. Sinemus, G. Hempel, S. Drescher, B. Dobner, W. Richtering, K. Huber and A. Blume, *Langmuir*, 2007, **23**, 7715-7723.
191. K. Gruhle, S. Mueller, A. Meister and S. Drescher, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 2711-2724.
192. T. Markowski, S. Drescher, A. Meister, G. Hause, A. Blume and B. Dobner, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, **2011**, 5894-5904.
193. T. Markowski, S. Drescher, A. Meister, A. Blume and B. Dobner, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 3649-3662.
194. A. Blume, S. Drescher, A. Meister, G. Graf and B. Dobner, *Faraday Discuss.*, 2013, **161**, 193-213.
195. S. Müller, M. Kind, K. Gruhle, G. Hause, A. Meister and S. Drescher, *Biophysical Chemistry*, 2019, **244**, 1-10.
196. W. Pohle, C. Selle, W. Rettig, U. Heiser, B. Dobner and S. Wartewig, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **396**, 151-161.
197. S. Mueller, A. Meister, C. Otto, G. Hause and S. Drescher, *Biophys. Chem.*, 2018, **238**, 39-48.
198. P. Xu, G. Tan, J. Zhou, J. He, L. B. Lawson, G. L. McPherson and V. T. John, *Langmuir*, 2009, **25**, 10422-10425.
199. J. Bigay and B. Antonny, *Developmental Cell*, 2012, **23**, 886-895.
200. S. Müller, K. Gruhle, A. Meister, G. Hause and S. Drescher, *Pharmaceutics*, 2019, **11**.
201. P. van Hoogevest and A. Wendel, *European journal of lipid science and technology : EJLST*, 2014, **116**, 1088-1107.

LITERATURVERZEICHNIS

202. T. Koyanagi, G. Leriche, A. Yep, D. Onofrei, G. P. Holland, M. Mayer and J. Yang, *Chem. - Eur. J.*, 2016, **22**, 8074-8077.
203. T. Koyanagi, G. Leriche, D. Onofrei, G. P. Holland, M. Mayer and J. Yang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**, 1890-1893.
204. J. Parmentier, M. M. M. Becker, U. Heintz and G. Fricker, *Int. J. Pharm.*, 2011, **405**, 210-217.
205. W. Liu, A. Ye, W. Liu, C. Liu, J. Han and H. Singh, *Food Chem.*, 2015, **175**, 16-24.
206. Q. Fan, A. Relini, D. Cassinadri, A. Gambacorta and A. Gliozzi, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1995, **1240**, 83-88.
207. G. B. Patel, B. J. Agnew, L. Deschatelets, L. P. Fleming and G. D. Sprott, *Int. J. Pharm.*, 2000, **194**, 39-49.

LEBENS LAUF

| | |
|--------------------|--|
| Name | Dipl.-Pharm. Sindy Müller (geb. Lindner) |
| Geburtsdatum, -ort | 10. November 1991 in Chemnitz |
| Familienstand | verheiratet |
| Adresse | Am Kirchberg 16, 79539 Lörrach |

- 05/2020 Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften
- seit 01/2020 Regulatory Affairs Specialist für dentale Medizinprodukte, VITA Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co. KG, Bad Säckingen
- 01/2017 – 12/2019 Promotion (Phospholipid Forschungszentrum Heidelberg) an der MLU Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie
- 12/2016 Approbation als Apothekerin
- 05/2016 – 10/2016 Praktische Ausbildung im Rahmen des Dritten Abschnitts – St. Georg Apotheke Halle (Saale)
- 11/2015 – 04/2016 Diplomarbeit an der MLU Halle-Wittenberg Fachbereich Pharmazie
Thema: Evaluierung von Peptid-Lipid-Interaktionen mittels photochemischen Crosslinking/MS
- 10/2011 – 10/2015 Studium der Pharmazie an der MLU Halle-Wittenberg

VERÖFFENTLICHTE ORIGINALARBEITEN

Publikationen in Fachjournalen

1. S. Lindner, K. Gruhle, R. Schmidt, V. M. Garamus, D. Ramsbeck, G. Hause, A. Meister, A. Sinz, S. Drescher, Azide-Modified Membrane Lipids: Synthesis, Properties, and Reactivity, *Langmuir*, **33** (2017) 4960-4973
2. T. Markowski, S. Müller, B. Dobner, A. Meister, A. Blume, S. Drescher, An Asymmetrical Glycerol Diether Bolalipid with Protonable Phosphodimethylethanolamine Headgroup: The Impact of pH on Aggregation Behavior and Miscibility with DPPC, *Polymers*, **9** (2017)
3. S. Drescher, C. Otto, S. Müller, V. M. Garamus, C.J. Garvey, S. Gruenert, A. Lischka, A. Meister, A. Blume, B. Dobner, Impact of headgroup asymmetry and protonation state on aggregation behavior of new type of glycerol diether bolalipid, *Langmuir*, **34** (2018) 4360-4373
4. K. Gruhle, S. Müller, A. Meister, S. Drescher, Synthesis and aggregation behaviour of single-chain, 1,32-alkyl branched bis(phosphocholines): effect of lateral chain length, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **16** (2018) 2711-2724
5. S. Müller, A. Meister, C. Otto, G. Hause, S. Drescher, Mixing behaviour of asymmetrical glycerol diether bolalipids with saturated and unsaturated phosphatidylcholines, *Biophysical Chemistry*, **238** (2018) 39-48
6. S. Müller, M. Kind, K. Gruhle, G. Hause, A. Meister, S. Drescher, Mixing behaviour of bilayer-forming phosphatidylcholines with single-chain alkyl-branched bolalipids: effect of lateral chain length, *Biophysical Chemistry*, **244** (2019) 1-10
7. S. Müller, C. Schwieger, K. Gruhle, V. M. Garamus, G. Hause, A. Meister, S. Drescher, Azide-Modified Membrane Lipids: Miscibility with Saturated Phosphatidylcholines, *Langmuir*, **35** (2019) 12439-12440
8. S. Müller, K. Gruhle, A. Meister, G. Hause, S. Drescher, Bolalipid-Doped Liposomes: Can Bolalipids Increase the Integrity of Liposomes Exposed to Gastrointestinal Fluids? *Pharmaceutics*, **11**, (2019)
9. K. Gruhle, M. Tuchtenhagen, S. Müller, G. Hause, A. Meister, S. Drescher, Synthesis and aggregation behaviour of single-chain, 1,32-alkyl-branched bis(phosphocholines) – Part 2: lateral chain length triggers self-assembling from sheets to fibres to vesicles, *Organic & Biomolecular Chemistry* (2020)

Poster

1. S. Lindner, K. Gruhle, V.M. Garamus, A. Meister, and S. Drescher: *Synthesis and Physicochemical Characterization of Azido-modified Membrane Lipids – a Toolbox to Study Lipid-Peptide-Interactions.*
Biomembrane Days - Berlin 2016
2. S. Lindner, R. Schmidt, A. Meister, A. Sinz, and S. Drescher: *Azido-modified Lipids: Miscibility with Phospholipids and the Use to Study Peptide-Lipid-Interactions.*
DGfB-Jahrestagung - Erlangen 2016
3. S. Lindner, T. Markowski, C. Otto, A. Meister, and S. Drescher: *Miscibility of Glycerol Diether Bolalipids with Phospholipids for the Application as Oral Drug Delivery Systems.*
5. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2017
4. S. Müller, M. Kind, K. Gruhle, C. Otto, A. Meister, and S. Drescher: *Mixing Behavior of Symmetrical and Asymmetrical Bolalipids with Classical Phospholipids - on the Way to Stabilized Liposomes.*
22th CRS Annual Meeting - Halle 2018
5. K. Gruhle, S. Müller, B. Dobner, A. Meister, and S. Drescher: *Synthesis and Aggregation Behavior of Alkyl-Branched Bolalipids.*
22th CRS Annual Meeting - Halle 2018
6. S. Müller, K. Gruhle, M. Kind, A. Meister, and S. Drescher: *Mixing Behavior of Single-Chain Alkyl-Branched Bolalipids with Classical Phospholipids.*
Tagung der Sektion Membranen, Zellen, Netzwerke der Deutschen Gesellschaft für Biophysik (DGfB) "Membrane Models for Biophysics" - Drübeck 2018
7. K. Gruhle, S. Müller, B. Dobner, A. Meister, and S. Drescher: *Synthesis and Aggregation Behavior of a Series of Single-Chain Alkyl-Branched Bolalipids: The Effect of Lateral Chain Length.*
Tagung der Sektion Membranen, Zellen, Netzwerke der Deutschen Gesellschaft für Biophysik (DGfB) "Membrane Models for Biophysics" - Drübeck 2018
8. S. Müller, K. Gruhle, A. Meister, and S. Drescher: *Mixing Behavior of Bilayer-Forming Phosphatidylcholines with Single-Chain Alkyl-Branched Bolalipids.*
Membrane Biophysics of Exo-Endocytosis: From Model Systems to Cells - Mandelieu la Napoule, Frankreich 2019
9. K. Gruhle, S. Müller, A. Meister, and S. Drescher: *Synthesis and Aggregation Behavior of a Series of Single-Chain Alkyl-Branched Bolalipids: Effect of Lateral Chain Length.*
Membrane Biophysics of Exo-Endocytosis: From Model Systems to Cells - Mandelieu la Napoule, Frankreich 2019
10. S. Müller, K. Gruhle, A. Meister, and S. Drescher: *Mixing Behavior of Bilayer-Forming Phosphatidylcholines with Single-Chain Alkyl-Branched Bolalipids.*
6. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2019

11. K. Gruhle, S. Müller, A. Meister, and S. Drescher: *Synthesis and Aggregation Behavior of a Series of Single-Chain Alkyl-Branched Bolalipids: The Effect of Lateral Chain Length*.
6. Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research - Heidelberg 2019
12. J. Dorner, S. Müller, K. Gruhle, A. Meister, A. Sinz, and S. Drescher: *Photoreactive membrane lipids: a tool to study lipid/peptide interactions?*
EMBO Workshop: Tools for Structural Biology of Membrane Proteins - Hamburg 2019

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Dipl.-Pharm. Sindy Müller, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Dipl.-Pharm. Sindy Müller
Halle (Saale) im Mai 2020