

**Phosphatidylserin- (PS) und Phosphatidylglycerol- (PG)
angereicherte nanoskalige Formulierungen als
antiinflammatorische Agentien:
Herstellung und umfassende Charakterisierung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Pharm. Miriam Elisabeth Klein

geb. am 17.07.1989 in Friedrichroda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Mäder
2. PD Dr. Annette Meister
3. Prof. Dr. Heiko Heerklotz

Datum der öffentlichen Verteidigung: 08.04.2021

Sapere aude! Habe Mut, Dich Deines eigenen Verstandes zu bedienen!

Immanuel Kant, Philosoph der Aufklärung

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Entzündung	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Ablauf der Entzündungsreaktion	1
1.1.3 Therapie der Entzündung	2
1.1.4 Monozyten/Makrophagen als Therapie-Target	3
1.2 Akuter Myokardinfarkt	4
1.3 Phosphatidylserin	5
1.4 Phosphatidylglycerol	7
1.5 Nanoskalige Formulierungen	8
1.5.1 Allgemeines	8
1.5.2 Liposomen	8
1.5.3 Mischmizellen	9
1.6 Zielstellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Allgemeines	13
2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden	13
2.3 Herstellung nanoskaliger Formulierungen	14
2.3.1 Herstellung der Liposomen	14
2.3.2 Herstellung der Mischmizellen	15
2.4 <i>In vitro</i> Charakterisierung	16
2.4.1 Chemische Analytik	16
2.4.2 Physikochemische Analytik	17
2.4.3 Biologische Analytik	20
2.4.4 Biochemische und immunologische Analytik	24
2.5 <i>In vivo</i> und <i>ex vivo</i> Charakterisierung	27
2.5.1 Allgemeines	27
2.5.2 Mäuse	27
2.5.3 Experimentelles Versuchsdesign	27
2.5.4 <i>In vivo</i> und <i>ex vivo</i> Analytik	29
2.6 Statistik	32
3 Ergebnisse und Diskussion	33
3.1 Etablierung der Zellkulturmethoden	33
3.1.1 Hämolysen	33

Inhaltsverzeichnis

3.1.2 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen	34
3.2 Liposomen.....	40
3.2.1 Allgemeines	40
3.2.2 Physikochemische Charakterisierung	41
3.2.3 Stabilitätsuntersuchungen	47
3.2.4 Biologische Charakterisierung <i>in vitro</i>	52
3.2.5 Biologische Charakterisierung <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i>	63
3.3 Mischmizellen.....	74
3.3.1 Allgemeines	74
3.3.2 Physikochemische Charakterisierung	75
3.3.3 Stabilitätsuntersuchungen	84
3.3.4 Biologische Charakterisierung <i>in vitro</i>	86
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	95
5 Summary and Outlook.....	97
6 Literaturverzeichnis	99
7 Anhang	111
II Selbständigkeitserklärung	XIII
III Danksagung.....	XIV
IV Lebenslauf	XVI
V Veröffentlichungen.....	XVIII

I Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
μ	mikro = 10^{-6}
3T3	murine Fibroblasten-Zelllinie
Å	Angström = 10^{-10} m
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (multifaktorielle Varianzanalyse)
APC	Allophycocyanin
APZ	apoptotische Zelle
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Schmalband
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6J WT	Mausstamm, Inzucht, immunkompetent
c	centi = 10^{-2}
ca.	circa
CD14	Glykoprotein CD14
CD4+	Glykoprotein CD4 positiv (exprimierend)
CD8+	Glykoprotein CD8 positiv (exprimierend)
CMC	<i>Critical Micelle Concentration</i> (kritische Mizellbildungskonzentration)
CMT	<i>Critical Micellization Temperature</i> (kritische Mizellbildungstemperatur)
COX-2	Cyclooxygenase 2
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat
DiR	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin-Iodid
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMARD	<i>Disease Modifying Anti-rheumatic Drug</i> (Basistherapeutikum)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) Natrium
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho- <i>L</i> -serin Natrium
DPCC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) Natrium

Abkürzungsverzeichnis

DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (differentielle Leistungskalorimetrie)
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPG	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) Natrium
DSPE-PEG-2000, PEG	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy (polyethylenglycerol)-2000] Natrium
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELS	Elektrophoretische Lichtstreuung
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> (Lichtstredetektor)
EM	Elektronenmikroskopie
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMI	Experimenteller Myokardinfarkt
EPG	Phosphatidylglycerol, natürlich, aus Ei
EPR	<i>Enhanced Permeation and Retention</i>
ESR	Elektron-Spin-Resonanz
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FI	<i>Fluorescence Imaging</i> (Fluoreszenzbildgebung)
FOV	<i>Field of View</i> (Sichtfeld)
g	Gramm, Einheit der Masse m
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPC	Glycerophosphocholin
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I.E.	Internationale Einheiten
<i>i.v.</i>	intravenös
ICH	<i>International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Inferferon gamma
IK	Immunkomplex
IL-1 α	Interleukin 1 alpha

Abkürzungsverzeichnis

IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-12p70	Interleukin 12 p70
IL-13	Interleukin 13
IL-17A	Interleukin 17A
IL-2	Interleukin 2
IL-23	Interleukin 23
IL-27	Interleukin 27
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
K	Kelvin
kryo-TEM	kryo-Transmissionselektronenmikroskopie
l	Liter, Einheit des Volumens V
L	Liposomen
LBP	LPS-Bindeprotein
LDH	Laktatdehydrogenase
LP	Langband
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	<i>Least Significant Difference</i> (kleinster signifikanter Unterschied)
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i> (große unilamellare Vesikel)
M	Molarität, Stoffmengenkonzentration
m	Meter, Einheit der Länge s
m	milli = 10 ⁻³
m/V	Masse pro Volumen
M1	Makrophagen-Typ 1, proinflammatorisch
M2	Makrophagen-Typ 2, antiinflammatorisch
M2a	Makrophagen-Typ 2, Subtyp a
M2b	Makrophagen-Typ 2, Subtyp b
M2c	Makrophagen-Typ 2, Subtyp c
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MD2	Lymphozyten Antigen 96
MerTK	Protoonkogen, Tyrosinproteinkinase MER
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex I
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minute
MLV	Multilamellare Vesikel

Abkürzungsverzeichnis

MM	Mischmizellen
mol	Mol, Einheit der Stoffmenge n
MPM	<i>Mouse peritoneal Macrophages</i> (Peritoneale Mausmakrophagen)
MPS	Mononukleäres Phagozyten-System
n	nano = 10^{-9}
n. Chr.	nach Christus
NADP/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i> (humane Fibroblasten-Zelllinie)
NP	Normalphase
NSAID	<i>Non-steroidal Anti-inflammatory Drug</i> (Nichtsteroidales Antirheumatikum)
Osm/l	Osmolarität, Anzahl osmotisch aktiver Bestandteile pro Volumeneinheit
PA	Phosphatsäure
PAMP	<i>Pathogen associated Molecular Pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PDI	Polydispersitätsindex
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
POPC	1--Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) Natrium
PRR	<i>Pathogen Recognition Receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
PS	Phosphatidylserin
PSS	Phosphatidylserin-Synthase
RAW 264.7	Makrophagen-Zelllinie
RBC	<i>Red Blood Cells</i> (Erythrozyten)
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i> (rotes Fluoreszenzprotein)
ROI	<i>Region of Interest</i> (Bereiche des Interesses)
S100	Phosphatidylcholin, natürlich, ungesättigt, aus Soja
SANS	Kleinwinkel-Neutronenstreuung
SA-PE	Konjugat aus Streptavidin Phycoerythrin
S/m	Siemens, Einheit der Leitfähigkeit σ
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKH1	Mausstamm, Auszucht, immunkompetent
S L PC 80	Lysophosphatidylcholin
SPC-3	Phosphatidylcholin, natürlich, gesättigt, aus Soja
SPS	Phosphatidylserin, natürlich, aus Soja

Abkürzungsverzeichnis

ssp.	Subspezies
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> (kleine unilamellare Vesikel)
TGF- β	<i>Transforming Growth Faktor 1</i> (Transformierender Wachstumsfaktor 1)
TH1	T-Helferzelle Typ 1
TH2	T-Helferzelle Typ 2
TierSchG	Tierschutzgesetz
TIM	T-Zell Immunoglobulin und Mucin Domain 1
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRE	<i>Total Radiant Efficiency</i> (Gesamtfluoreszenzintensität)
Treg	T-Helferzelle, regulatorisch
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i> (Einheiten)
U937	Makrophagen-Zelllinie
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV/VIS	UV/VIS Spektroskopie
v. Chr.	vor Christus
V/V	Volumen pro Volumen
Xkr8	Xk abhängiges Protein 8
z.B.	zum Beispiel
ZMG	Zentrum für medizinische Grundlagenforschung Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1 Einleitung

1.1 Entzündung

1.1.1 Allgemeines

Unter einer Entzündung versteht man eine komplexe, physiologische Antwort des Organismus auf schädliche Reize, wie z.B. Infektionen oder chemische bzw. physikalische Noxen.¹ Das primäre Ziel der Entzündung ist hierbei die Beseitigung und nachfolgende Reparatur des entstandenen Schadens. Das lokale Entzündungsgeschehen ist allgemein durch die durch Celsus (25 v.Chr. bis 50 n. Chr.) beschriebenen fünf Kardinalsymptome gekennzeichnet:²

- Schwellung (*Tumor*)
- Rötung (*Rubor*)
- Erwärmung (*Calor*)
- Schmerz (*Dolor*)
- Funktionseinschränkung (*Functio laesa*)

1.1.2 Ablauf der Entzündungsreaktion

Der Ablauf einer Entzündungsreaktion ist sehr komplex. Es sind sowohl humorale als auch zelluläre Bestandteile beteiligt.¹ Nach schädlicher Reizung wird zuerst die angeborene, jedoch unspezifische, Immunabwehr aktiv. Deren humorale Bestandteile umfassen das Komplementsystem, Lysozym sowie Akute-Phase-Proteine.³ Zusammen mit den zellulären Bestandteilen, zu welchen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen gehören, erfolgt eine erste Erregerabwehr und das Auslösen einer lokalen Entzündungsreaktion.³ Die zellulären Bestandteile sind hierbei befähigt, Pathogene über *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien, Mikroorganismen oder endogene Zelltrümmer, mittels spezifischer Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* [PPR, z.B. *Toll like receptors* (TLR)] zu erkennen und zu phagozytieren.³ Die Bindung von z.B. LPS an TLR-4-Rezeptoren löst eine transembrane Signalkaskade aus, welche die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) oder Interleukin-6 (IL-6), fördert und die Entzündungsreaktion positiv verstärkt.⁴⁻⁶ Die Einleitung der adaptierten, hochspezifischen Immunantwort erfolgt anschließend.⁷ Hierbei präsentieren Phagozyten Antigene der Pathogene mit Hilfe humaner Leukozytenantigene (HLA) auf ihrer Oberfläche (Antigen-präsentierende Zellen).⁸ Es wird zwischen HLA-Molekülen der Klassen I (MHC I) und II (MHC II) unterschieden.⁷ Die Antigenpräsentation erleichtert das Erkennen durch T- und B-Lymphozyten, die Zellen der adaptiven Immunabwehr.⁹ T-Lymphozyten können sich anschließend in verschiedene Subtypen differenzieren, z.B. MHC II vermittelt zu CD4+ T-Zellen (u.a. TH1- und TH2--Zellen) sowie MHC I vermittelt zu CD8+ (zytotoxische) T-Zellen.⁹ TH1-Zellen differenzieren sich nach Stimulation durch Interferon-gamma (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12). Sie setzen vorwiegend IFN- γ und Interleukin-2 (IL-2) frei und aktivieren dadurch weitere Makrophagen.⁷

TH2--Zellen hingegen können durch Interleukin-4 (IL-4) und IL-6 differenziert werden. Sie setzen nachfolgend IL-4, Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) frei und führen dadurch zu einer B--Lymphozytenaktivierung.¹⁰ Die Aktivierung von B-Lymphozyten führt zur Bildung und Sezernierung von Immunglobulinen (Antikörpern), welche spezifisch und effektiv gegen das Pathogen wirken. Darüber hinaus sind die B-Lymphozyten befähigt, Gedächtniszellen auszubilden, die bei erneuter Infektion eine schnellere Mobilisierung der zellulären und humoralen Abwehr ermöglichen. CD8+ T-Zellen hingegen erkennen körpereigene virusinfizierte oder entartete Zellen und initiieren apoptotische Prozesse (programmierter Zelltod).¹⁰ Eine Unterbrechung der zellulären immunologischen Prozesse erfolgt durch eine dritte Gruppe der CD4+ T-Zellen, den regulatorischen T-Zellen (Treg), die sowohl Antigenpräsentierende Zellen als auch autoreaktive T-Zellen hemmen können. Ihre Differenzierung ist Interleukin-10 (IL-10) und IL-2 vermittelt. Sie selbst produzieren *Transforming Growth Factor*-beta (TGF- β) und IL-10, die beide antiinflammatorisch wirken.¹⁰

1.1.3 Therapie der Entzündung

Aufgrund der Komplexität der Entzündungsreaktion gibt es verschiedene *Targets* und Therapieoptionen. Im Rahmen akuter Entzündungen werden nichtsteroidale Antiphlogistika (*Non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs), selektive COX-2-Hemmer sowie Glucocorticoide angewendet.^{11,12} Im chronischen Entzündungsgeschehen kommen darüber hinaus auch Basistherapeutika (*disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARDs) zum Einsatz.¹⁰ NSAIDs sowie selektive COX-2-Hemmer hemmen die Prostaglandinbiosynthese, indem sie den Arachidonsäureabbau durch Cyclooxygenasen unterdrücken.¹¹ Es resultieren analgetische, antipyretische sowie antiphlogistische Effekte. Bei Glucocorticoiden hingegen wird die immunsupprimierende und antiinflammatorische Wirkung vor allem auf einen Eingriff in die T-Zell-Aktivierungskaskade zurückgeführt.¹² Hierbei soll die Synthese von Zytokinen [z.B. Interleukin-1(IL-1), IL-2, IL-6, TNF- α] unterdrückt und daraus eine Hemmung der Lymphozytenaktivierung resultieren. Weiterhin ist die Hemmung der Phagozytoseaktivität von Monozyten und Makrophagen beschrieben. Basistherapeutika hingegen reduzieren die Entzündungsaktivität, wirken jedoch nicht analgetisch.¹⁰ Sie werden vor allem für chronisch entzündliche Prozesse, wie z.B. bei der rheumatoiden Arthritis, eingesetzt. Man kann sie in synthetische und biologische Therapeutika unterteilen.¹⁰ Synthetische DMARD gehören zu den Immunsuppressiva und besitzen verschiedene *Targets*, wie z.B. die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase (Metotrexat), die Hemmung von Calcineurin (Ciclosporin) oder die Hemmung von Januskinasen (Baricitinib, Tofacitinib).^{10,13} Biologische DMARD hingegen haben als *Targets* vorwiegend Zytokine, wie z.B. TNF- α (Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Glimumab, Certolizumab), IL-1 (Anakinra) oder IL-6 (Tocilizumab, Sarilumab).^{10,13,14} Außerdem können auch T-Zellen (Abatacept) oder B-Zellen (Rituximab) beeinflusst werden.^{10,13,14}

1.1.4 Monozyten/Makrophagen als Therapie-Target

Ein weiteres Therapie-Target in der Behandlung von Entzündungen sind Monozyten bzw. Makrophagen.^{8,15} Sie sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und zur Phagozytose von Pathogenen und apoptotischen Zellen befähigt. Je nach Stimulus bilden vor allem Makrophagen unterschiedliche Phänotypen aus, klassisch aktivierte M1- und alternativ aktivierte M2-Makrophagen (Abbildung 1).^{16,17}

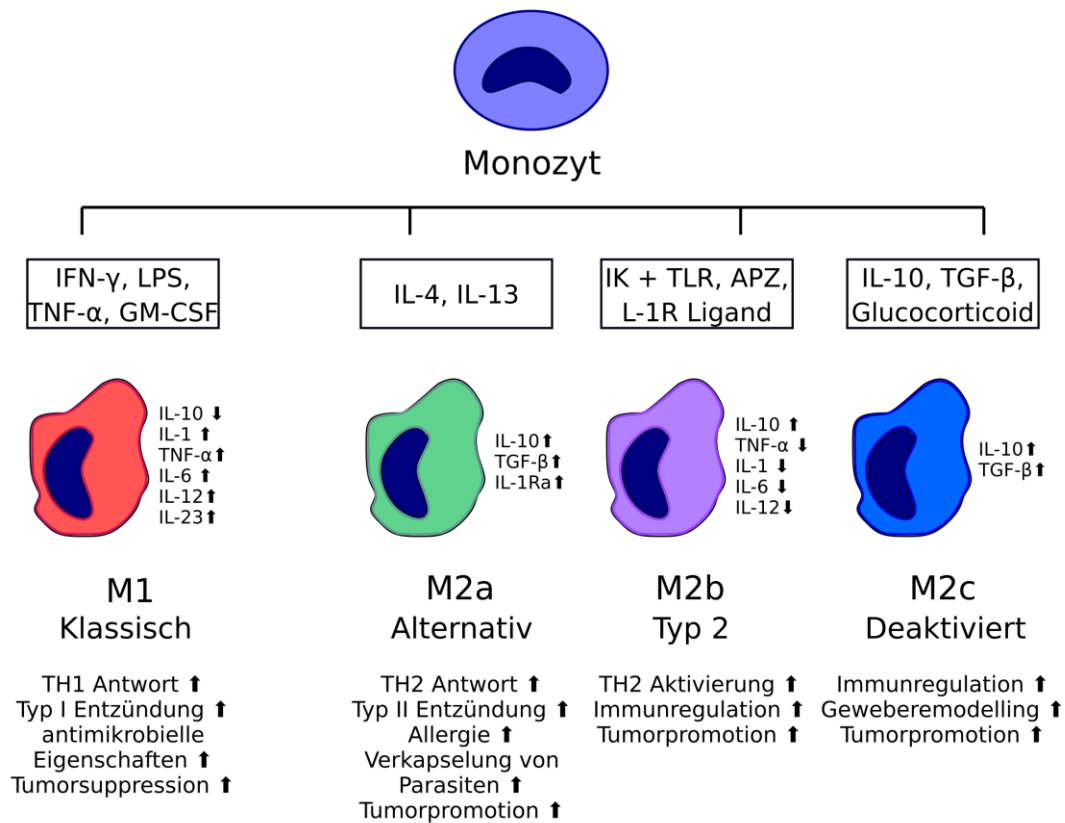


Abbildung 1: Übersicht der Makrophagen-Phänotypen.

Die verschiedenen Makrophagen-Phänotypen werden im Text beschrieben.

Die Abbildung ist modifiziert nach ⁸ und ¹⁷.

M1-Makrophagen werden durch IFN- γ und LPS oder TNF- α stimuliert und sind durch Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1, TNF- α oder IL-6 charakterisiert.^{8,17} Sie führen zur TH1-Zell-Aktivierung und fördern die Tumorsuppression. Alternativ aktivierte M2-Makrophagen werden in drei Subgruppen unterteilt.^{8,17} M2a-Makrophagen werden durch IL-4 oder IL-13 stimuliert. Sie sezernieren IL-10 und TGF- β und führen zur TH2-Zell-Aktivierung. M2b-Makrophagen werden u.a. durch Immunkomplexe (IK), TLR-Liganden sowie apoptotische Zellen (APZ) stimuliert. Sie sezernieren vermehrt IL-10, wohingegen die Produktion proinflammatorischer Zytokine reduziert ist. Sie regulieren dadurch die Immunreaktion. M2c-Makrophagen werden durch IL-10, TGF- β oder Glucocorticoid-Einfluss stimuliert. Auch sie bilden vermehrt IL-10 und TGF- β . Neben der Immunregulation fördern sie die Wundheilung. Allen M2-Makrophagen ist die Tumorpromotion eigen.¹⁸

Die Polarisation der Makrophagen in Richtung eines speziellen Phänotyps ist ein vielversprechender Therapieansatz.¹⁹ Im Falle von malignen Tumoren, kann eine Polarisation in Richtung eines M1-Makrophagen erfolgen, um die Tumorzellen zu zerstören. Dies entspricht dem Wirkungsmechanismus von MEPACT[®], einer liposomalen Zubereitung von Mifamurtide, welche für die Behandlung von Osteosarkomen zugelassen ist.²⁰⁻²³ Bei entzündlichen Erkrankungen hingegen erscheint eine Polarisation in Richtung eines M2-Makrophagen sinnvoll.²⁴ Ein Anwendungsbeispiel hierfür ist der akute Myokardinfarkt.^{25,26}

1.2 Akuter Myokardinfarkt

Mit 46.207 Todesfällen im Jahr 2018 ist der akute Myokardinfarkt eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland.²⁷ Therapieansätze umfassen intensivmedizinische und medikamentöse Maßnahmen sowie interventionelle Gefäßeröffnungen durch chirurgische Eingriffe.²⁸ Medikamentöse Therapien zielen einmal direkt während des akuten Myokardinfarktes auf die Reperfusion und Fibrinolyse sowie zum anderen in der Langzeittherapie auf die Reduktion von Blutdruck und Herzfrequenz ab.²⁸ Die Reperfusion wird durch Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien-Gabe versucht, eine Fibrinolyse erfolgt durch Fibrinolytika. Mit dem Ziel der Reduktion von Blutdruck und Herzfrequenz erfolgt die Langzeittherapie mit Betablocker, ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptorblocker, Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten und durch Lipidsenker. Ein Nachteil bei der Akut- und Langzeit-Therapie des akuten Myokardinfarktes ist, dass keine Reparatur des geschädigten Myokards erfolgt. Stattdessen wird nur das Risiko neuer ischämischer Ereignisse reduziert.

Ein neuer, darüber hinaus ergänzender Ansatz in der Behandlung des akuten Myokardinfarktes betrachtet, neben der schnellen Reperfusion des betroffenen Infarktgebietes, auch die sich daran anschließende Heilungsphase.^{29,30} Diese ist durch eine inflammatorische, gefolgt von einer proliferativen und einer Ausreifungsphase gekennzeichnet.³¹ Während der als steril zu charakterisierenden inflammatorischen Phase, direkt nach dem ischämischen Ereignis, steigt zuerst die Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Monozyten.³¹ Die Monozyten werden hierbei vorwiegend aus der Peripherie, vor allem aus der Milz, rekrutiert.³² Im Entzündungsgebiet differenzieren sie sich zuerst in M1-Makrophagen, die ihrerseits die Entzündung fördern und zum Abbau des Zelldébris beitragen.³² Zeitlich folgend differenzieren sich weitere Monozyten in M2-Makrophagen.³² Ca. 5 Tage *post*-Myokardinfarkt dominieren M2-Makrophagen, die Entzündung wird gehemmt und die Heilung gefördert. Es schließt sich der Übergang in die proliferative Phase an, in welcher das nekrotische Myokard und das Granulationsgewebe in Narbengewebe umgebaut werden.³¹ Mit Abschluss der Ausreifungsphase liegt zellarmes Narbengewebe vor.³¹

Die frühe Modulation von Monozyten hin zu M2-Makrophagen könnte die inflammatorische Phase nach Myokardinfarkt verkürzen und das Risiko für erhöhtes ventrikuläres Remodeling verringern.²⁶ Erste Studien, in welchen das Schlüsselmolekül apoptotischer Zellen, Phosphatidylserin (PS), in Hinblick auf seine Makrophagenmodulationsfähigkeit untersucht wurde, sind vielversprechend.³³

1.3 Phosphatidylserin

PS gehört zur Gruppe der Phospholipide. Es besteht aus einem Glycerophosphoskelett, welches mit *L*-Serin verestert ist (Abbildung 2).

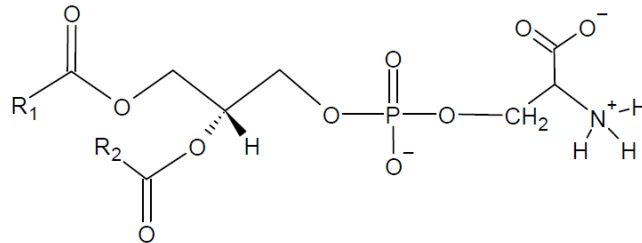


Abbildung 2: Chemische Struktur des Phosphatidylserins.

R1 und R2 stellen Alkylketten unterschiedlicher Kettenlänge und -sättigung dar.

Aufgrund seiner chemischen Struktur hat PS 3 ladungstragende Gruppen: die Carboxylgruppe und die Aminogruppe des *L*-Serins sowie die Phosphatgruppe des Glycerophosphoskeletts. Bei physiologischem pH-Wert resultiert somit netto eine negative Ladung. PS ist ein endogener Bestandteil der Zellmembranen von Pflanzen und Tieren. Es wurde erstmals 1941 aus Rinderhirn gewonnen.³⁴ In den Hirn-Zellen ist es in einem Anteil von ca. 15 % am Gesamtphospholipid vertreten.³⁴ In allen anderen Zellen ist PS mit einem geringeren Anteil (2 - 15 %) vorhanden. Es wird daher als ‚*minor*‘ Phospholipid bezeichnet. In Pflanzen und Tieren liegt PS mit unterschiedlich veresterten Acylketten vor. Pflanzlich, aus Soja gewonnen, dominiert die Linolsäure, wohingegen aus dem Rinderhirn gewonnenes PS an R1 meistens Stearinsäure und an R2 vorwiegend Ölsäure substituiert hat.³⁵

PS wird unter physiologischen Bedingungen in Mitochondrienmembranen synthetisiert.³⁶ Die Synthese erfolgt durch die Phosphatidylserin-Synthasen (PSS) 1 oder 2, entweder aus Phosphatidylcholin (PC) oder Phosphatidylethanolamin (PE).³⁶ Ein Abbau zu PE kann durch die Phosphatidylserin-Decarboxylase erfolgen. Im Anschluss an die Synthese wird PS von den Mitochondrienmembranen intrazellulär durch Transportproteine zur Lipiddoppelschicht transportiert.³⁶ Dort ist es im physiologischen Zustand intrazellulär lokalisiert und somit u.a. mit PE für die Membranasymmetrie und negative Ladungsverteilung verantwortlich.³⁷ Die Aufrechterhaltung des Membranpotentials wird durch ATP-abhängige Flippasen, welche Phospholipide von außen nach innen und ATP-abhängige Floppasen, welche Phospholipide in umgekehrter Richtung transportieren, gewährleistet.³⁸ Kommt es zur Apoptose, werden Scramblasen, wie Xkr8 (Caspase-vermittelt) aktiv.^{36,39} Sie bewegen PS aktiv nach außen. Es kommt zum Kollaps der Membranasymmetrie, das Membranpotential bricht zusammen. Auf der extrazellulären Seite dient PS als ‚*eat me*‘ Signal für Makrophagen.⁴⁰ Sie erkennen das präsentierte PS auf apoptotischen Zellen über PS-Rezeptoren (heterogene Gruppe, z.B. TIM- oder MerTK-Rezeptoren), was ein Signal für die Phagozytose darstellt.^{2,41–43} Parallel zur Phagozytose der

apoptotischen Zellen differenzieren sich die Makrophagen zu M2-Makrophagen mit anti-inflammatorischem Charakter.^{8,17} Das Abklingen der Entzündung ist Resultat dieser Prozesse.^{43,44} Weitere PS-abhängige physiologische Prozesse umfassen die Katalyse der Thrombozytenaggregation, die Förderung der Osteoklastogenese, Einflüsse auf Parasit-Host-Reaktionen, auf die Bildung von Muskelfasern, auf die Spermiendifferenzierung, Wirkungen auf die Erythropoese und Erythrozyten~~clearance~~, die Entfernung von seneszenten Stäbchen-Zellen durch retinale Pigmentepithelzellen sowie das Kappen von leichten bzw. nicht-funktionalen Synapsenverbindungen durch Astrozyten und Mikrogliazellen.

PS hat sowohl antiinflammatorische wie auch immunsupprimierende Wirkung und ist somit potentiell ein interessantes Therapeutikum. Sein immunmodulierendes Potential, insbesondere die Fähigkeit der Makrophagenpolarisation zu M2-Makrophagen, wurde bereits *in vitro* getestet.^{40,43,45,46} Eine Reduktion der Konzentration proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-6, wurde beschrieben.¹⁵ Darüber hinaus konnte ein Anstieg der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β nachgewiesen werden.^{36,47-49} *In vivo* wurde PS bereits bei systemischer und lokaler Entzündung untersucht.^{33,50-58} Systemisch führte die Phagozytose PS-haltiger Formulierungen zur Produktion antiinflammatorischer Zytokine, welche zu einer Antigenpräsentation dendritischer Zellen und zur Hemmung der Proliferation von TH1-Zellen beitrugen. Lokale kurative Effekte wurden u.a. bei akutem Myokardinfarkt, bei Osteoporose, bei bakteriellen Infektionen mit dem *Mycobacterium tuberculosis*, bei Alzheimer und bei retinaler Ischämie beobachtet. Neben den physiologischen Prozessen wird PS pathophysiologisch vermehrt in Tumoren exprimiert, was u.a. die Tumorsuppression durch M1-Makrophagen reduziert und die Tumorpromotion fördert.^{36,59} PS ist daher außerdem ein *Target* in der Tumorthherapie. U.a. ist der Antikörper Bavituximab gegen PS gerichtet. Seine Wirkung wird aktuell in klinischen Studien untersucht.^{36,59}

Pharmazeutisch technologisch wird PS u.a. als Hilfsstoff für liposomale Formulierungen eingesetzt. MEPACT[®], welches für die Behandlung des Osteosarkoms zugelassen ist, enthält PC und PS in einem molaren Verhältnis von 7:3.²⁰ Die als multilamellare Vesikel (MLV) formulierten Phospholipide schließen Mifamurtide ein, ein synthetisches Analogon von *Mycobacterium ssp.*, welches *in vivo* immunstimulierend wirkt.²¹ Durch den Anteil an PS in der liposomalen Formulierung wird sichergestellt, dass die Liposomen gezielt von Makrophagen phagozytiert werden, dem Wirkort des Mifamurtides.²² Es aktiviert die Makrophagen, sodass sie proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12, freisetzen und eine Entzündungsreaktion verursachen.^{21,60} Durch diesen Mechanismus ist es möglich, allogene und autologe Tumorzellen abzutöten, was u.a. für Melanom-, Ovarial- sowie Kolonkarzinom-Zellen beschrieben ist.^{22,23,61}

1.4 Phosphatidylglycerol

Neben PS ist auch Phosphatidylglycerol (PG) ein endogener Immunmodulator. Es gehört ebenfalls zur Gruppe der Phospholipide und besteht aus einem Glycerophosphoskelett, welches mit Glycerol verestert ist (Abbildung 3).

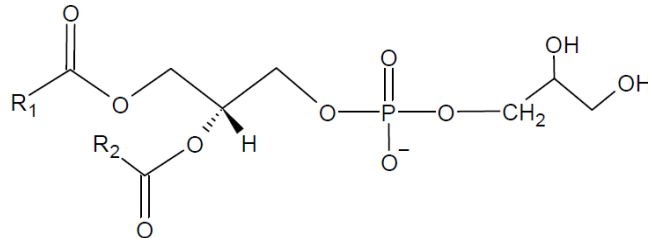


Abbildung 3: Chemische Struktur des Phosphatidylglycerols.

R1 und R2 stellen Alkylketten unterschiedlicher Kettenlänge und -sättigung dar.

Aufgrund seiner chemischen Struktur besitzt PG eine ladungstragende Gruppe, die Phosphatgruppe des Glycerophosphoskeletts. Es ist somit ebenfalls ein anionisches Phospholipid. PG ist endogen und ein Bestandteil des Lungen-*Surfactant*.⁶² Dort ist es als ‚*minor*‘ Phospholipid mit 2 - 10 % vorhanden.⁶³ In der alveolaren Hypophase ist es jedoch stark angereichert (5-10 mg/ml).⁶³

Dort dient es der Reduktion der Grenzflächenspannung zwischen Luft und Mukus auf der einen, sowie der Immunmodulation auf der anderen Seite.⁶⁴ PG interagiert ebenfalls mit Makrophagen. Es dient jedoch nicht als ‚*eat me*‘ Signal während der Phagozytose apoptotischer Zellen, sondern wirkt extrazellulär am TLR4-Rezeptor.⁶³ PG soll hier am Komplex von LPS-Bindeprotein (LBP), MD2 und CD14 angreifen und somit die LPS-vermittelte Entzündungsreaktion hemmen.⁶³ Die Arbeitsgruppe um Voelker *et al.* untersuchte anhand verschiedener Virustypen (z.B. respiratorisches Syncytial Virus⁶⁵, Influenza Typ A Virus⁶⁶) und Bakterien (*Mycoplasma pneumoniae*⁶⁷) wie PG bei Infektionen die Entzündung regulieren und zur Bekämpfung der Pathogene beitragen kann. Sie konnten zeigen, dass Makrophagen, die mit PG stimuliert waren, weniger mit den Viren interagierten, da PG die Bindungsstellen am TLR4-Rezeptor besetzte. Es resultierte eine geringere Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wodurch eine Entzündungsreaktion vermindert wurde.⁶³ Zusätzlich war eine Reduktion der Viruslast zu verzeichnen.⁶³ Bollag *et al.* führten darüber hinaus erste *in vivo* Studien durch. Sie konnten positive Einflüsse auf die Wundheilung der Kornea und der Haut beschreiben.^{68,69} Die Ergebnisse von Voelker *et al.* und Bollag *et al.* verdeutlichen die wichtige physiologische und immunmodulierende Rolle von PG.

Auch PG wird pharmazeutisch technologisch als Hilfsstoff für liposomale Formulierungen verwendet. Es ist u.a. ein Bestandteil von AMBISOME[®], welches aus gesättigtem PC, Cholesterol und 1,2-Distearyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) Natrium (DSPG), in einem molaren Verhältnis von 2:1:0.8, besteht und als kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV)

formuliert ist.^{70,71} AMBISOME® enthält den Wirkstoff Amphotericin B und ist für die antimikrobielle Therapie, z.B. von Infektionen durch *Aspergillus* ssp., *Candida* ssp., *Cryptococcus* ssp. oder für die Behandlung der viszeralen Leishmaniose zugelassen.^{70,71} Aufgrund des Gehalts an PG ist eine starke Anreicherung der Liposomen in Makrophagen zu verzeichnen.⁷² Diese sollen als Reservoir für Amphotericin B dienen, um sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Pathogene über längere Zeit abzutöten.⁷²

1.5 Nanoskalige Formulierungen

1.5.1 Allgemeines

Mit der Entwicklung nanoskaliger Arzneiformen seit den 1990er Jahren ist man Ehrlichs Konzept der ‚Zauberkegel‘, bzw. ‚*Magic Bullet*‘^{73,74}, eines Arzneistoffes, der zielgerichtet am Pathogen angreift ohne gesunde Zellen zu beeinflussen oder zu beeinträchtigen, sehr nah gekommen. Es werden passive und aktive *Targeting*-Mechanismen unterschieden.⁷³ Passiv können sich nanoskalige Formulierungen aufgrund des durch Maeda erstmals beschriebenen ‚*enhanced permeation and retention effect*‘ (EPR-Effekt) in pathologisch veränderten, durchlässigen Organen bzw. Geweben anreichern.^{75,76} Eine aktiv vermittelte Wirkung hingegen kann durch Binden von Liganden an Zielzellen erfolgen.⁷³ Erste nanoskalige Arzneimittel erhielten Mitte der 1990er Jahren ihre Marktzulassung.⁷⁷ Unter diesen stellen Liposomen die erfolgreichsten galenischen Formulierungen dar.⁷⁷ Sie bestehen aus Phospholipiden und weisen eine geringe Toxizität sowie hohe Biokompatibilität auf.⁷⁸ Alternative Formulierungen für Phospholipide umfassen parenterale Fettemulsionen, Mischmizellen und Suspensionen.⁷⁸ Im Rahmen der galenischen Formulierung von PS und PG lag der Fokus auf Liposomen (1.5.2 Liposomen) und Mischmizellen (1.5.3 Mischmizellen), da beide hohe Phospholipidmengen enthalten.

1.5.2 Liposomen

Liposomen sind durch Selbstaggregation von Phospholipiden gebildete Assoziationskolloide.⁷⁹ In Kontakt mit Wasser lagern sich die polaren Kopfgruppen der gequollenen Phospholipide zum Wasser, wohingegen die lipophilen Schwänze versuchen, die Kontaktfläche mit Wasser zu verkleinern. Es resultieren Aggregate, die Phospholipiddoppelschichten. Diese tendieren dazu, sphärische Vesikel zu bilden, konzentrisch angeordnete Phospholipiddoppelschichten, die einen wässrigen Kern umschließen.^{80–82} Ihre Größe variiert von etwa 20 nm bis 50 nm (SUV) bis hin zu mehreren µm Durchmesser (große unilamellare, LUV, bzw. MLV) (Abbildung 4).^{83–85} Liposomen werden pharmazeutisch technologisch für die Verkapselung hydrophiler Wirkstoffe (Wirkstoff befindet sich in der wässrigen Phase) genutzt.⁸⁶ Darüber hinaus dienen sie auch als Lösungsvermittler für lipophile Wirkstoffe (Wirkstoff befindet sich in der Phospholipiddoppelschicht).⁸⁶ Man unterscheidet konventionelle von ‚*stealth*‘ Liposomen.⁸⁷ Die konventionellen Liposomen enthalten ungesättigte oder gesättigte Phospholipide und können mit Cholesterol angereichert sein.⁸⁷ Der Cholesterolzusatz stabilisiert hierbei die Phospholipiddoppelschicht.^{87,88}

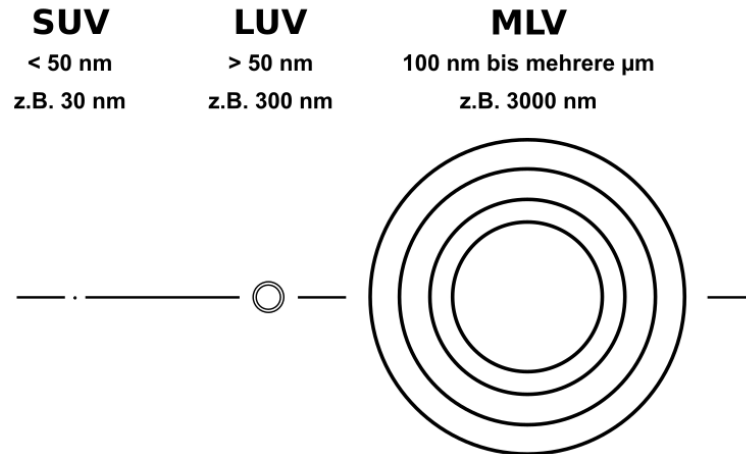


Abbildung 4: Klassifizierung der Liposomen mit Größenangaben.

SUV = kleine unilamellare Vesikel, LUV = große unilamellare Vesikel, MLV = multilamellare Vesikel.

Die Abbildung ist modifiziert nach ⁸⁴.

Die ‚*stealth*‘ Liposomen hingegen enthalten zusätzlich polymermodifizierte Phospholipide, wie z.B. Polyethylenglycol-haltige Phospholipide (DSPE-PEG-2000, PEG).⁸⁹ Der Zusatz von DSPE-PEG-2000 schirmt die Phospholipidkopfgruppen ab und erhöht die Zirkulationszeit der Liposomen *in vivo*.⁸⁹ Erste Wirkstoff-haltige Liposomen wurden in den 1990er Jahren durch die FDA und die EMA zugelassen.⁹⁰ Aktuell haben mehr als 10 Liposomen eine Marktreife.⁹⁰ Unter diesen sind auch Formulierungen, die mit PS (MEPACT®)²⁰ oder PG (AMBISOME®)^{70,71} angereichert sind.

1.5.3 Mischmizellen

Neben Liposomen werden auch Mischmizellen mit hohen Anteilen an Phospholipiden formuliert. Sie enthalten neben den Phospholipiden Detergenzien, z.B. Gallensalze, die die Phospholipide solubilisieren. Aufgrund der Solubilisierung resultieren optisch isotrope, klare Lösungen, die thermodynamisch stabil sind.⁹¹ Gallensalze sind endogen und haben physiologisch eine große Bedeutung bei der Aufnahme und dem Verdau von Nahrungsfetten. Sie können große Mengen Phospholipide und andere Stoffe, wie Cholesterol oder freie Fettsäuren, solubilisieren.⁹² Mischmizellen wurden erstmals 1909 durch Moore beschrieben.⁹³ In den 1960er Jahren gewannen sie vermehrt an Bedeutung. Erste Charakterisierungen von Lecithin-Gallensalz-Wasser-Systemen wurden von Small und Carey vorgenommen.^{94,95} Sie erstellten ternäre Phasendiagramme und konnten Regionen herausarbeiten, in welchen optisch isotrope, klare Lösungen vorhanden waren.^{94,95} Morphologisch postulierten sie scheibenförmige („*disc*“) Strukturen einer Größe von ca. 10 nm.⁹⁵ Die Phospholipidmoleküle sollten in diesen Scheiben mit den Alkylketten zueinander orientiert, im Inneren, vorliegen und von einem äußeren Ring aus Gallensalz-Molekülen umschlossen sein. Im Laufe der 1970er bis 1990er Jahre wurde diese Modellvorstellung um die Modelle der Mischscheiben („*mixed disc*“)⁹⁶, bei welcher sich die Gallensalze auch im Inneren der Scheiben befinden und Stäbchen („*radial shell*“)⁹⁷ erweitert (Abbildung 5).

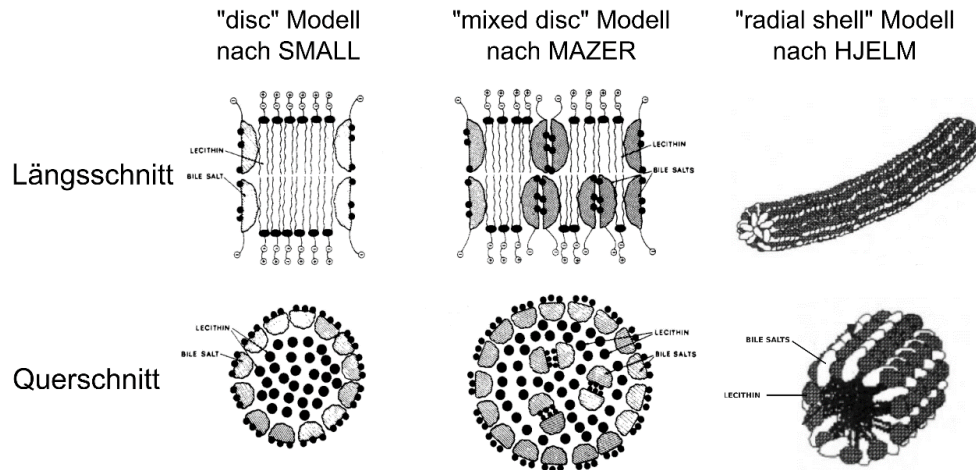


Abbildung 5: Modellvorstellungen der Struktur von Phospholipid-Gallensalz-Mischmizellen.

Dargestellt sind die Längs- und Querschnitte durch Mischmizellen.

Die Abbildungen sind modifiziert nach ⁹⁶ und ⁹⁷.

Das Modell der Stäbchen-Mischmizelle zeigt Mischmizellen einer Größe von bis zu 100 nm. Es ist das aktuell durch Röntgenstreuung⁹⁸, NMR⁹⁹ und Neutronenstreuung (SANS)^{97,100} am besten belegte Modell.

Mischmizellen sind eingehend biologisch, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, charakterisiert. Sie besitzen eine hohe Kapazität, lipophile Wirkstoffe zu solubilisieren^{101,102} und dabei biologisch weder embryotoxisch noch terato- oder mutagen zu wirken.¹⁰³ Das stark lytische Verhalten der Gallensalze wird durch den Zusatz von Phospholipiden reduziert.⁹³ Pharmazeutisch technologisch werden Mischmizellen u.a. für die Solubilisierung schlecht löslicher Wirkstoffe eingesetzt. Einige Mischmizellen, wie z.B. KONAKION® MM (Phytomenadion, Vitamin K) können hierbei parenteral intravenös und intramuskulär sowie oral appliziert werden.¹⁰⁴ Mischmizellen sind leicht herzustellen. Aufgrund ihrer vielseitigen Applikationsformen stellen sie eine interessante Alternative zu Liposomen für die galenische Formulierung von Phospholipiden dar.

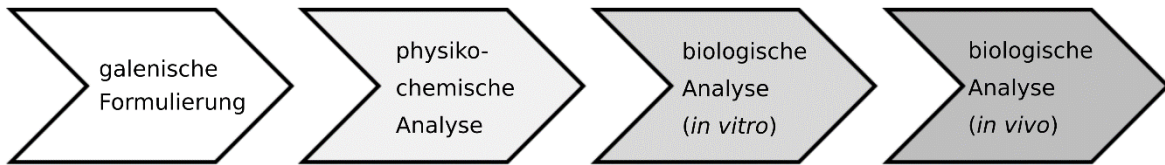
1.6 Zielstellung

Die Therapie der Entzündung mit dem Ziel einer schnellen Reparatur sowie geringen Narbenbildung ist auch im 21. Jahrhundert eine Herausforderung. Die Modulation von Makrophagen hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp und einer damit verbundenen zeitlich früher einsetzenden Heilungsphase ist ein vielversprechender Behandlungsansatz, z.B. in der Therapie des akuten Myokardinfarkts. Eine solche Immunmodulation kann mit Hilfe der endogenen Phospholipide Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG) erfolgen. PS wird von Makrophagen phagozytiert, wohingegen für PG eine Wirkung in der LPS-Bindungskaskade beschrieben ist. Beide haben somit intrinsische immunmodulierende Eigenschaften und könnten in der Therapie der Entzündung Einsatz finden. Trotz dieser vielversprechenden Qualitäten ist ihre pharmazeutisch technologische Anwendung aktuell auf ihre Funktion als Hilfsstoff beschränkt.

Aufgrund dieser Diskrepanz und ihres Potentials als endogene, wenig toxische und biokompatible Immunmodulatoren war es erklärtes Ziel dieser Arbeit, PS- und PG-angereicherte Formulierungen für die parenterale Applikation zu entwickeln und physikochemisch und biologisch zu charakterisieren. Als Kontrolle wurde Phosphatidylcholin (PC) verwendet, welches für einen direkten Vergleich mit PS und PG diente. Die galenische Basis bildeten nanoskalige Formulierungen als Liposomen und Mischmizellen, für die *Quality Target Product Profile* gemäß ICH *Guideline* Q8R2 vordefiniert wurden.^{105–107} Folgende Aspekte wurden in dieser Arbeit untersucht:

- Galenische Formulierung von PS- und PG-angereicherten konventionellen und ‚stealth‘ Liposomen sowie Gallensalz-haltigen Mischmizellen unter Verwendung natürlicher und synthetischer Phospholipidderivate.
- Physikochemische Charakterisierung der nanoskaligen Formulierungen sowie Untersuchung der Lagerstabilität.
- Biologische Charakterisierung der Zelltoxizität, der Hämolyseeigenschaften, der Phagozytoseaktivität sowie der immunmodulierenden Aktivität mittels repräsentativer Zellkulturmodelle *in vitro*.
- Biologische Charakterisierung der Biodistribution ausgewählter nanoskaliger Formulierungen im gesunden und myokardial infarktierten Mausmodell *in vivo*.

Abbildung 6 illustriert die Struktur der Arbeit und gibt eine Zuordnung der verwendeten Analysemethoden zum jeweiligen Abschnitt der Arbeit.



Liposomen

- konventionell
- 'stealth'

- DSC
- DLS
- Lichtmikroskopie
- kryo-TEM
- ELS
- NP-HPLC-ELSD

- Resazurin-Assay
- Hämolyse-Assay
- TNF- α -ELISA
- Zytokin-Bead-Assay
- Multispektrale Fluoreszenz-Mikroskopie

- *in vivo* FI
- *ex vivo* FI
- Immunhistologie

Mischmizellen

- Tensiometrie
- UV/VIS
- DLS
- Lichtmikroskopie
- negativ-kontrastierte EM
- ELS
- NP-HPLC-ELSD

- Resazurin-Assay
- Hämolyse-Assay
- TNF- α -ELISA
- Zytokin-Bead-Assay

Abbildung 6: Struktur der experimentellen Arbeiten mit Zuordnung der jeweiligen Analytik.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt und die verwendeten Methoden erläutert. Verbrauchsmaterialien wie Zentrifugenröhrchen, Lochplatten, Einmalpipetten, u.a. wurden von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Weitere, nicht methodenspezifische Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprachen gängigen Laborstandards und werden nicht gesondert aufgeführt.

2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden

Die in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide wurden durch den Hersteller Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Phospholipide der Lipoid GmbH.

Bezeichnung	Hauptbestandteil	Quelle	Sättigungsgrad der Acylketten	Reinheit
S100	Phosphatidylcholin	Soja	ungesättigt	mind. 94,0 %
SPC-3	Phosphatidylcholin	Soja	gesättigt	mind. 95,0 %
DOPS	Phosphatidylserin (1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho- <i>L</i> -serin)	synthetisch	ungesättigt	mind. 90,0 %
SPS	Phosphatidylserin	Soja	ungesättigt	mind. 94,0 %
DOPG	Phosphatidylglycerol (1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-1'- <i>rac</i> -glycerol)	synthetisch	ungesättigt	mind. 98,5 %
EPG	Phosphatidylglycerol	Ei	ungesättigt	mind. 98,0 %
DSPE-PEG-2000, PEG	Pegyliertes Phosphatidylethanolamin (1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylenglycerol)-2000])	synthetisch	gesättigt	95,0 – 105,0 %
S LPC 80	Lysophosphatidylcholin	Soja	ungesättigt	mind. 80,0 %

Die Phospholipide wurden bei -20 °C gemäß Herstellerangaben gelagert. Vor Gebrauch wurden sie aliquotiert. Hierfür wurden je 1 g Phospholipid auf Raumtemperatur temperiert, abgewogen und in 10 ml Chloroform:Methanol (4:1, V/V) gelöst (Chloroform: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Methanol: VWR International S.A.S., Fontenay-Sous-Bois, Frankreich). Aus diesen Stammlösungen wurden Phospholipidaliquote hergestellt und das Lösungsmittel verdampft. Lösungsmittelspuren wurden über Nacht im Hochvakuum (0 mbar, 25 °C) entfernt. Anschließend wurden die Phospholipide mit Argon überschichtet, dicht verschlossen und bei -20 °C gelagert.

2.3 Herstellung nanoskaliger Formulierungen

2.3.1 Herstellung der Liposomen

2.3.1.1 Allgemeines Vorgehen

Für die Herstellung der Liposomen fand die Filmmethode Anwendung. Ein entsprechendes Fließschema zeigt Abbildung 7.

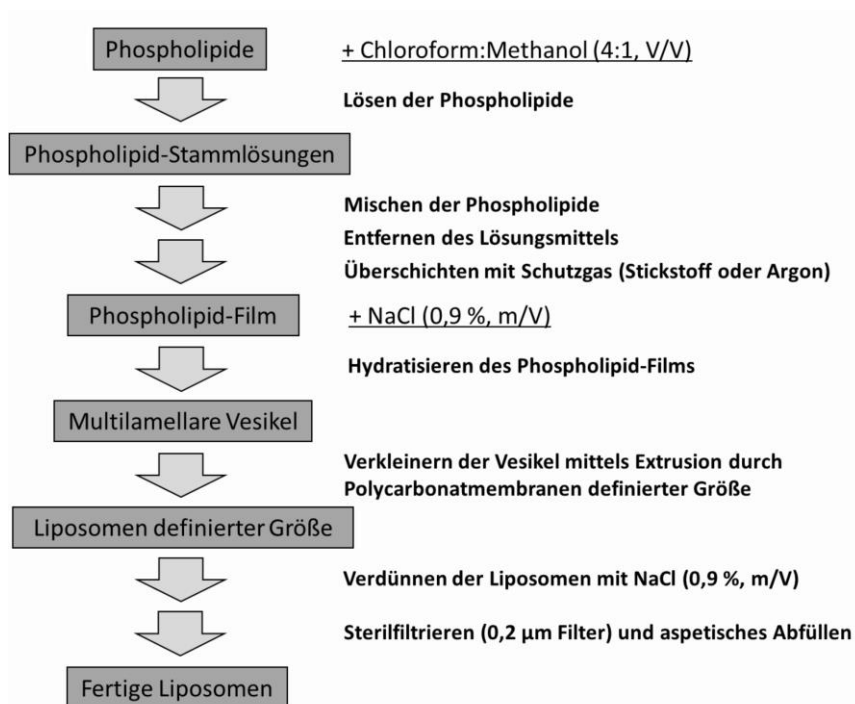


Abbildung 7: Fließschema für die Herstellung von Liposomen.

Aus den einzelnen Phospholipidaliquoten wurden Stammlösungen in Chloroform:Methanol (4:1, V/V) hergestellt. Diese wurden nachfolgend entsprechend der gewünschten Liposomenformulierung zusammen pipettiert (3.2.1 Allgemeines). Von diesen Phospholipidmischungen wurde anschließend das Lösungsmittel verdampft. Weiterhin wurden sie über Nacht unter Hochvakuum (0 mbar, 25 °C) gelagert, bevor sie mit Schutzgas überschichtet und dicht verschlossen bei -20 °C gelagert wurden. Am Tag der Weiterverarbeitung wurden die Phospholipidfilme in frisch hergestellter isotoner Kochsalzlösung (0,9 %, m/V, pH = 6,5, osmotischer Druck = 308 mOsm/l) suspendiert (10 mg/ml) und für ca. 15 Minuten im Thermoschüttler (Torrey Pines Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) bei 45 °C temperiert (Schüttler Stufe 3 bis 4). Die Dispersion wurde anschließend für 30 Sekunden gevortext. Die nachfolgende Extrusion erfolgte durch Polycarbonatmembranen definierter Porengröße (100 nm, Whatman™ Nucleopore™ Polycarbonatmembran, 19 mm, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mittels Handextruder (Avestin LiposoFast, Avestin Europe GmbH, Mannheim, Deutschland oder Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA). Die Extrusion (21-mal) fand hierbei immer bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur der jeweiligen

Phospholipidmischung, meist jedoch bei Raumtemperatur, statt (3.2.2.1 Lipidfluidität). Im Anschluss daran wurden die Liposomen auf eine Konzentration von 2,5 mg/ml eingestellt (verdünnt) und sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser der Spritzenaufsatzfiltermembran, wässrig). Die Lagerung der fertigen Liposomen erfolgte bei 8 °C und vor Licht geschützt in Braunglasvials.

2.3.1.2 Markierung der Liposomen

Für einige biologische *in vitro* und alle *in vivo* Versuche wurden die Liposomen mit einem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff (1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin-Iodid, DiR, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) markiert. Hierfür wurde zuerst eine Fluoreszenzfarbstoffstammlösung in Methanol hergestellt (Konzentration: 2,5 mg/ml). Diese wurde nachfolgend zu den Phospholipidmischungen in Chloroform:Methanol (4:1, V/V) zugegeben, sodass pro 5 mg Phospholipid 10 µg DiR vorlagen. Die weitere Herstellung der Liposomen erfolgte analog 2.3.1.1 Allgemeines Vorgehen. Für *in vivo* Versuche wurde abweichend davon die Konzentration der Liposomen auf 5 mg/ml eingestellt.

2.3.2 Herstellung der Mischmizellen

Die Mischmizellen wurden ebenfalls mittels Filmmethode hergestellt. Ein entsprechendes Fließschema zeigt Abbildung 8.

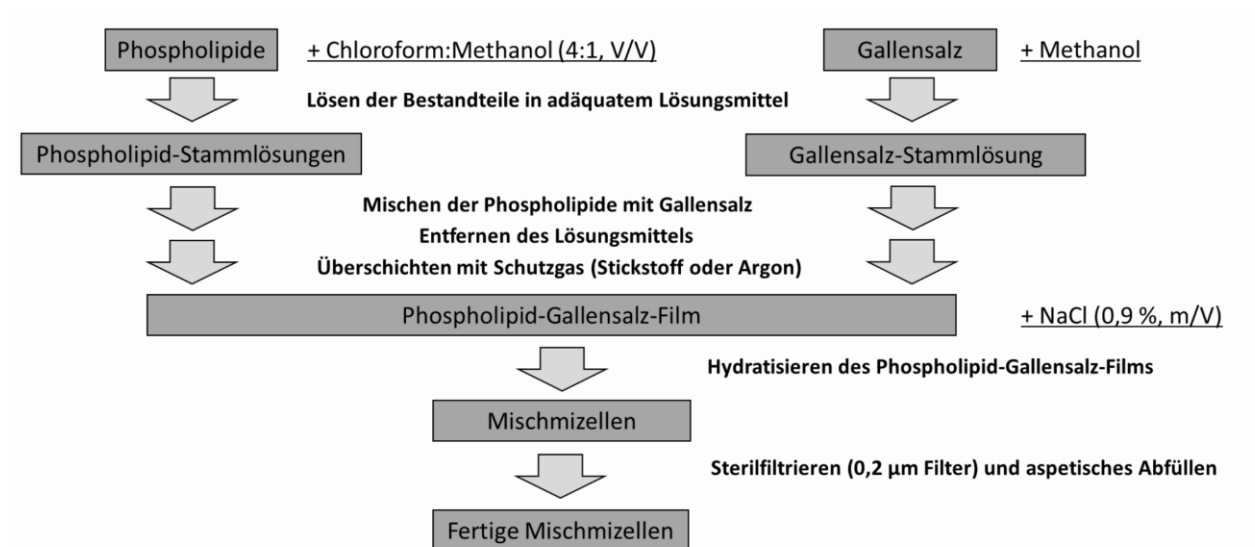


Abbildung 8: Fließschema für die Herstellung von Mischmizellen.

Aus den einzelnen Phospholipidaliquoten wurden Stammlösungen in Chloroform:Methanol (4:1, V/V) hergestellt und nachfolgend die gewünschte Mischmizellenformulierung zusammen pipettiert (3.3.1 Allgemeines). Zu diesen Phospholipidmischungen wurden definierte Mengen an Natriumcholat (Stammlösung in Methanol) gegeben und die Formulierungen gemischt. Anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft und die Phospholipid-Gallensalz-Filme im Hochvakuum (0 mbar, 25 °C) über Nacht gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die

entstandenen Phospholipid-Gallensalz-Filme mit Schutzgas überschichtet, dicht verschlossen und bei -20 °C gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurden die Phospholipid-Gallensalz-Filme in frisch hergestellter isotoner Kochsalzlösung (0,9 %, m/V, pH = 6,5, osmotischer Druck = 308 mOsm/l) suspendiert und für ca. 15 Minuten im Thermoschüttler (Torrey Pines Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) bei 45 °C temperiert (Schüttler Stufe 3 bis 4). Das Entstehen einer isotropen klaren Lösung diente hierbei als Indikator für die Bildung der Mischmizellen. Für die anschließende Lagerung wurden die Mischmizellen sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser der Spritzenaufsatzfiltermembran, wässrig). Die Lagerung erfolgte bei 8 °C und vor Licht geschützt in Braunglasvials.

2.4 *In vitro* Charakterisierung

2.4.1 Chemische Analytik

2.4.1.1 Allgemeines

Die verwendeten Phospholipide besaßen Pharmaqualität. Dies wurde durch die Analysenzertifikate des Herstellers Lipoid GmbH bestätigt. Um die hohe Qualität der Phospholipide über die Lagerung zu gewährleisten, wurden diese entsprechend der Herstellerangaben prozessiert (2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden). Die chemische Charakterisierung erfolgte im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

2.4.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für Stabilitätsuntersuchungen fand eine Normalphasen (NP)-HPLC-Methode Anwendung. Hierbei wurde im basischen Milieu gearbeitet. Die Phospholipide wurden qualitativ und quantitativ charakterisiert. Zuerst erfolgte eine Extraktion der Phospholipide aus den wässrigen nanoskaligen Formulierungen. 100 µl (2,5 mg/ml) Liposomen bzw. 25 µl Mischmizellen, versetzt mit 75 µl isotoner Kochsalzlösung, wurden hierfür mit 100 µl Methanol und 500 µl Chloroform vermischt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt extrahiert. Im Anschluss daran wurde die jeweilige Chloroform-Phase per HPLC analysiert. Die Chromatographiebedingungen sind nachfolgend in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Phospholipide eluierten wie beispielhaft im Anhang (Abbildung A 1) dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Standards, den reinen Phospholipiden. Entsprechende Kalibriergeraden dienten der Berechnung der Phospholipidkonzentrationen in den jeweiligen nanoskaligen Formulierungen. Für die Berechnung von relativen Werten wurde der Sollgehalt des jeweiligen Phospholipids in der jeweiligen nanoskaligen Formulierung verwendet.

Tabelle 2: Chromatographiemethode für die NP-HPLC.

Parameter	Bedingung		
HPLC-Anlage	Merck Hitachi		
Säulen	1: Nucleodur HILIC 5 µm 125 x 2, Macherey-Nagel 2: Zorbax RX-SIL 5 µm 150x2,1, Agilent		
Mobile Phase	A: Chloroform/Methanol/Ammoniak 90/9,5/0,5 B: Chloroform/Methanol/Ammoniak 60/39,5/0,5		
	DOPS/S100 bzw. SPS/S100: Gradient: 0 – 10 Minuten 80 % A auf 55 % B (Säulen 1 und 2)		
	S100 allein, DOPG/S100 bzw. EPG/S100: Gradient: 0 – 10 Minuten 100 % A auf 55 % B (Säule 1) Gradient: 0 – 10 Minuten 90 % A auf 55 % B (Säule 2)		
Flussrate	1,0 ml/Minute	Druck	110 bar (Start)
Injektionsprobe	50 – 500 µg/ml in Chloroform/Methanol 95/5		
Injektionsvolumen	20 µl		
Standard	50 – 600 µg/ml in Chloroform		
Säulentemperatur	40 °C		
Detektion	ELSD Sedex 90, ERC GmbH		UV
	Trägergas: Stickstoff Temperatur: 45 °C Druck: 3,7 bar Verstärkung: 5		Wellenlänge 1: 250 nm

2.4.2 Physikochemische Analytik

2.4.2.1 Differenzielle Leistungskalorimetrie (DSC)

Die kalorische Charakterisierung der Liposomen erfolgte mittels differenzieller Leistungskalorimetrie (DSC). Hierfür wurde das MicroCal VP-DSC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) verwendet. Vor den Messungen wurden die Proben ($c = 1 \text{ mg/ml}$) sowie die Referenz (isotone Kochsalzlösung) unter Vakuum entgast. Die Proben wurden in einem Temperaturintervall von 5 bis 70 °C mit einer Heizrate von 60 °K pro Stunde untersucht. Die Messungen erfolgten dreifach konsekutiv. Für die Auswertung der Messdaten wurde das Referenzthermogramm (isotone Kochsalzlösung) vom jeweiligen Proben thermogramm subtrahiert. Die weitere Auswertung erfolgte mit der MicroCal Origin 8.0 Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.4.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser (*Z-Average*) sowie der Polydispersitätsindex (PDI) der nanoskaligen Formulierungen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Die Messungen erfolgten mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) im *Backscattering*-Modus, in einem Winkel von 173 °. Für die Phospholipide wurde ein Brechungsindex von $n = 1,48$ verwendet. Die nanoskaligen Formulierungen wurden in

isotoner Kochsalzlösung verdünnt ($c = 0,25 \text{ mg/ml}$) und bis zum Messbeginn bei 25 °C temperiert. Jede Probe wurde fünffach vermessen. Aus den Ergebnissen wurde nachfolgend das jeweilige arithmetische Mittel berechnet. Für die Histogrammdarstellungen wurde die intensitätsgewichtete Größenverteilung gewählt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Zetasizer Software 6.30 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Worcestershire, UK).

2.4.2.3 Mikroskopie

Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Lichtmikroskop Axio Lab (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Das Mikroskop war hierbei mit der Digitalkamera OLYMPUS UC 30 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgestattet. Die Auswertung erfolgte mittels OLYMPUS Software Stream motion 1.7 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

Transmissionselektronenmikroskopie negativ-kontrastierter Proben (*negative-stain-EM*)

Negativ-kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen (*negative-stain-EM*) wurden in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Meister, ZIK HALOmem und Institut für Biochemie und Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, angefertigt.

Die Proben wurden bei Raumtemperatur präpariert. Hierfür wurden $10 \mu\text{l}$ der Dispersion ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$) auf ein mit Formvar-Film beschichtetes Kupfernetz (*Grid*) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die überschüssige Dispersion mit einem Filterpapier entfernt. Im Anschluss daran wurden $10 \mu\text{l}$ einer 1% (m/V) Uranylacetat-Lösung (wässrig) auf das *Grid* gegeben, für 30 Sekunden inkubiert und nachfolgend ebenfalls mittels Filterpapier entfernt. Aufnahmen der getrockneten Proben wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops EM 900 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Die Auswertung erfolgte mittels OLYMPUS Software Soft Imaging Viewer 5.1 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

Transmissionselektronenmikroskopie kryopräparierter Proben (kryo-TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie kryopräparierter Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Meister, ZIK HALOmem und Institut für Biochemie und Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, und Herrn Dr. Hause, Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Proben wurden mit Hilfe des Kryopräparationssystems Leica EM GP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei Raumtemperatur präpariert. Hierfür wurden $6 \mu\text{l}$ der Probenlösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$) auf einem EM-Netz, welches mit einem perforierten Polymerfilm beschichtet ist, platziert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde nachfolgend mit Hilfe eines

Filterpapiers entfernt. Anschließend wurde der dünne Probenfilm auf dem EM-Netz durch schnelles Einschließen in flüssigem Ethan (ca. $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$) verglast. Die fertig präparierten Proben wurden über die Dauer der Lagerung bis hin zur mikroskopischen Untersuchung bei einer Temperatur unter $-165\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aufnahmen wurden bei 120 kV mit einem Libra 120 Plus Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Das Mikroskop war hierbei mit einem Gatan 626 Cryo-Transfersystem (Gatan GmbH, München, Deutschland) sowie einer Dual-Speed Kamera BM-2k-120 (Tröndle Restlichtverstärker Systeme, Moorenweis, Deutschland) ausgestattet. Die Auswertung erfolgte mittels OLYMPUS Software Soft Imaging Viewer 5.1 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

2.4.2.4 Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)

Das Zetapotential nanoskaliger Formulierungen wurde mit Hilfe der elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS) bestimmt. Die Messungen erfolgten mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) im *Forwardscattering*-Modus, in einem Winkel von 13° . Die Proben wurden hierfür in isoosmotischen Medien (jeweils isoton) verdünnt ($c = 0,25\text{ mg/ml}$). Sowohl 5 % (m/V) Glucoselösung (Leitfähigkeit: $1,7 - 2,1\text{ mS/cm}$) als auch isotone Kochsalzlösung (Leitfähigkeit: $16 - 20\text{ mS/cm}$) wurden verwendet. Jede Probe wurde fünffach vermessen. Aus den Ergebnissen wurde nachfolgend das jeweilige arithmetische Mittel berechnet. Die Datenauswertung erfolgte mit der Zetasizer Software 6.30 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Worcestershire, UK).

2.4.2.5 Ring Methode nach Du Noüy

Die Ring Methode nach Du Noüy diente der Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Natriumcholat. Es wurde das Tensiometer K8 mit einem Du Noüy Ring (Krüss, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Hierfür wurde eine Natriumcholat-Stammlösung in isotoner Kochsalzlösung hergestellt und nachfolgend geometrisch verdünnt. Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte dreifach. Aus den Ergebnissen wurde nachfolgend das jeweilige arithmetische Mittel berechnet. Durch Auftragen der Oberflächenspannungen gegen die Natriumcholat-Konzentration wurde die CMC graphisch ermittelt.

2.4.2.6 Trübungsmessung

Durch Bestimmung der Trübung konnte die Menge an Natriumcholat ermittelt werden, die notwendig ist, um ein Phospholipid vollständig zu solubilisieren. Die Trübung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda 660\text{ nm}$ spektralphotometrisch mit dem Spektralphotometer Spekol 1200 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) gemessen. Die Null-Wert-Bestimmung erfolgte mit isotoner Kochsalzlösung. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde nachfolgend das jeweilige arithmetische Mittel berechnet.

2.4.3 Biologische Analytik

2.4.3.1 Zellviabilität

Die Etablierung und Optimierung des Zellviabilitäts-Assays sowie die Bestimmung der Zelltoxizität einiger Liposomenformulierungen erfolgte im Rahmen der Masterarbeit „Untersuchung der *in vitro* Toxizität nanoskaliger Arzneistoffformulierungen“¹⁰⁸, welche Frau M.Sc. Martínez (Biochemie) in der Arbeitsgruppe von Prof. Mäder, Institut für Pharmazie, Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, anfertigte.

Es wurden zwei Fibroblasten-Zelllinien, eine murine (3T3) sowie eine humane Zelllinie (*normal human dermal fibroblasts*, NHDF), verwendet. Die Lebensfähigkeit (bzw. metabolische Aktivität) beider Zelllinien wurde mittels Resazurin-Assay bestimmt (Resazurin Natrium, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Die Fluoreszenzintensität des Produktes Resorufin wurde mittels des Cytation™ 5 *Cell Imaging Multi-Mode* Lesers (Winooski, Vermont, USA), ausgestattet mit einem RFP Filtersatz (λ_{Ex} 531 nm, λ_{Em} 593 nm), quantifiziert.

Die Zellen wurden in den nachfolgend aufgeführten Zellkulturmedien kultiviert (gesättigte Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂):

- 3T3: *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) [Lonza GmbH, Köln, Deutschland, hoher Glucosegehalt (ohne Phenolrot), ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, bzw. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, hoher Glucosegehalt. Beide zusätzlich ergänzt mit 10 % (V/V) fetalem Kälberserum (FBS), 4 mM Natrium-Pyruvat sowie 100 I.E. Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, alles Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland]
- NHDF: *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) [Lonza GmbH, Köln, Deutschland, hoher Glucosegehalt (ohne Phenolrot), ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, bzw. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, hoher Glucosegehalt. Beide zusätzlich ergänzt mit 10 % (V/V) FBS, sowie 100 I.E. Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, alles Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland].

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von mind. 90 % mittels Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Die Zell-Passagen 12 bis 21 fanden für die Charakterisierung der Zellviabilität Verwendung. Hierfür wurden beide Zelllinien jeweils in 96-Lochplatten mit definierter Zellzahl ausgesät und für 24 Stunden vorinkubiert. Die jeweilige Zellzahl richtete sich hierbei nach Zelllinie und Inkubationszeit. Die verwendeten Zellzahlen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zelldichten je Fibroblasten-Zelllinie.

Zelllinie	Zelldichte (Zellen/Loch)		
	4 Stunden Inkubation	24 Stunden Inkubation	48 Stunden Inkubation
NHDF	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$
3T3	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$

Am darauffolgenden Tag wurden die nanoskaligen Formulierungen vorverdünnt und in definierten Konzentrationen zu den Zellen zugegeben. Nachfolgend wurden diese für die entsprechenden Inkubationszeiten (4, 24, 96 Stunden) inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Zugabe der Resazurin-Lösung [0.025 mg/ml in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland] und eine Inkubation für weitere 2 Stunden. Die Fluoreszenzintensität des Produktes Resorufin wurde nachfolgend quantitativ bestimmt. Neben Leerwerten (reines Medium ohne Zellen) wurden Positiv- [Triton X-100, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, $c = 0,025 \%$ (m/V)] sowie Negativkontrollen (Medium) mitgeführt. Jede Probenbedingung wurde hierbei in 8 Replikaten inkubiert. Im Rahmen der Datenanalyse wurde das Leerwertsignal von den Fluoreszenzsignalen der Negativkontrolle und Proben subtrahiert. Weiterhin wurde das arithmetische Mittel der Negativkontrolle als 100 % definiert und nachfolgend die relativen Fluoreszenzintensitäten der Proben berechnet. Aus den 8 Replikaten wurde ebenfalls das arithmetische Mittel gebildet. Um die Qualität der Untersuchung der Zellviabilität zu gewährleisten, wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der Negativkontrolle $\leq 15 \%$ war.

2.4.3.2 Hämolyse

Die Etablierung und Optimierung des Hämolyse-Assays erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Loppnow, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Halle (Saale). Die humanen Erythrozyten (RBC) wurden aus dem Vollblut gesunder Spender gewonnen. Das Vollblut stammte aus der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) und war entsprechend des dort bestehenden Qualitätsmanagementsystems getestet und freigegeben. Das Arbeiten mit humanen RBC war durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Halle (Saale) bewertet und genehmigt.

Die RBC wurden durch Dichtegradientenzentrifugation von heparinisierem Vollblut (Biocoll-Trennlösung, 1,077 g/ml, isotonisch, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) erhalten. Sie waren das Nebenprodukt bei der Gewinnung humaner mononukleärer Zellen. Die RBC wurden nach Separierung dreimal mit PBS (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen. Nach Zentrifugation (Tischkühlzentrifuge 3-18 K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode im Harz, Deutschland, $2.660 \times g$; 7 Minuten) wurde die Zellzahl bestimmt (Trypanblau-Färbung, Neubauer-Zählkammer improved, C-Chip Zählkammer, NanoEnTek Inc., Waltham, USA) und die RBC-Stammlösung in PBS eingestellt (8×10^9 Zellen/ml). 0,5 ml dieser RBC-Stammlösung wurden

nachfolgend vorsichtig mit 0,5 ml vorverdünnter nanoskaliger Formulierungen gemischt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daran anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, 2.300 x g; 5 Minuten) und je 10 µl des Probenüberstandes in mit 90 µl PBS gefüllten 96-Lochplatten transferiert und gemischt. Das freigesetzte Hämoglobin wurde mittels des Plattenlesegeräts Infinite® 200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) spektralphotometrisch quantifiziert (Absorbanzmessung bei λ 540 nm). Reines PBS wurde für den Leerwert verwendet, isotone Kochsalzlösung diente als Negativ-, 2 % (m/V) Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) als Positivkontrolle. Jede Probenbedingung wurde in 3 Replikaten erstellt. Für die Datenanalyse wurde das Leerwertsignal von den Probensignalen subtrahiert. Das arithmetische Mittel der Positivkontrolle wurde als 100 % definiert und die dazu relativen Probenwerte berechnet. Aus den 3 Replikaten wurde ebenfalls das arithmetische Mittel gebildet. Um die Qualität der Untersuchung der Hämolyseeigenschaften zu gewährleisten, wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der Positivkontrolle ≤ 25 % war.

Die Hämolyseeigenschaften wurde gemäß des Standards F756 -*Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials* der *American Society for Testing and Materials* (ASTM) ausgewertet.¹⁰⁹ Sie wurde wie folgt klassifiziert:

- 0 % - 2 %: nicht hämolytisch
- 2 % - 5 %: leicht hämolytisch
- 5 %: hämolytisch

2.4.3.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen

Die Etablierung des Assays zur Bestimmung der Aktivität peritonealer Mausmakrophagen (MPM) (direkte Stimulation) erfolgte durch Frau Dr. Mauch im Rahmen ihrer Dissertation „Der Einfluss von PS-Liposomen auf die Makrophagenaktivität im Kontext vom Myokardinfarkt“¹¹⁰ in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Hofmann und Dr. Ramos, vormals Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Halle (Saale), aktuell Medizinische Klinik und Poliklinik I, bzw. Deutsches Zentrum für Herzinsuffizienz (DZHI) Würzburg, beide Universitätsklinikum Würzburg.

MPM wurden aus dem Peritoneum männlicher Mäuse [C57BL/6J WT bzw. SKH1, Alter: zwei bis drei Monate, Charles River Laboratories, Wilmington, USA bzw. hausinterne Zucht im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG), Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg] gewonnen. Die Mäuse wurden zuerst durch zervikale Dislokation getötet (hausinterne Anzeigennummer des ZMG für die Meldung der Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken gemäß §4 Abs. 3 TierSchG: K6IIIM9). Anschließend wurde jedes Peritoneum mit je 8 ml gekühltem und heparinisiertem PBS (10 I.E. in PBS, Heparin-Natrium, Injektionslösung,

25.000 I.E / 5 ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) gespült. Nachfolgend wurden die gesammelten Peritonealfüssigkeiten vereinigt und bis zur Aufreinigung auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (Tischkühlzentrifuge 3-18K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode im Harz, Deutschland, 400 x g, 10 Minuten, 4 °C) wurde die Zellsuspension in Lysepuffer (1 ml RBC Lysis Buffer, Biolegend, San Diego, CA, USA) resuspendiert. Dies diente der Lyse eventuell vorhandener RBC. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml gekühlter Hank's Salzlösung (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, gepuffert) mit einem Zusatz von 1 % bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V, proteasefrei, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in Medium (DMEM, beinhaltet bzw. versetzt mit 3,7 g/l NaHCO₃, 1,0 g/l D-Glucose; 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 I.E. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, alles Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) resuspendiert. Die Qualität der Zellen wurde durch Zellzählung in Trypanblau (Bestimmung der Zellviabilität) und Türk'scher Lösung (Erythrolyse, Anfärben der Leukozytenkerne) ermittelt (Neubauer-Zählkammer improved, C-Chip Zählkammer, NanoEnTek Inc., Waltham, USA). Anschließend wurden die Zellen mit Medium verdünnt und in 48-Lochplatten ausgesät (100.000 Zellen/Loch). Nach 2 Stunden Inkubation (37 °C, 7,5 % CO₂) wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen, um nicht an der Lochplatte anhaftende Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurde neues Medium zugesetzt. Im Anschluss daran wurden die in Medium vorverdünnten nanoskaligen Formulierungen zugegeben und die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Die anschließende Zellstimulation erfolgte durch Zugabe einer Mischung aus murinem IFN-γ (mIFN-γ, 10 U/ml, Peprotech, Hamburg, Deutschland) und LPS aus *E.coli* (1 ng/ml; aufgereinigt durch Ionenaustauschchromatographie, TLR-Ligand getestet, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Es wurden zwei Stimulationsprotokolle angewandt (Abbildung 9).

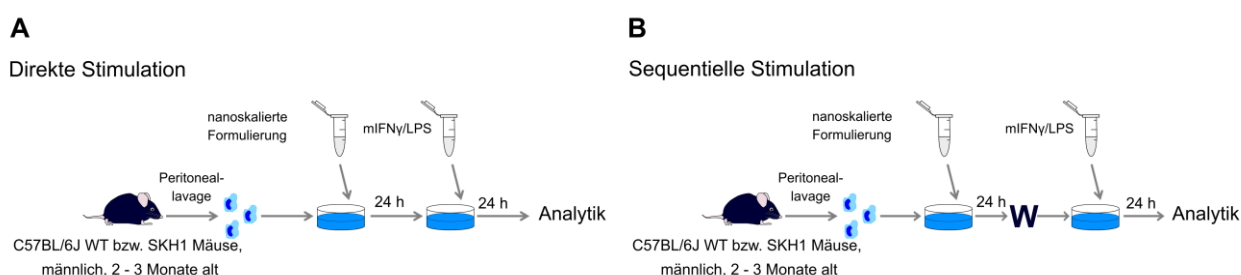


Abbildung 9: Stimulationsprotokolle für die Bestimmung der immunmodulierenden Aktivität nanoskaliger Formulierungen auf MPM.

In A) ist die direkte Stimulation in B) die sequentielle Stimulation inklusive Waschschrift (W) dargestellt.

Bei der direkten Stimulation (Abbildung 9A) erfolgte die Zugabe von mIFN- γ /LPS direkt auf die Zellen, wobei die nanoskalige Formulierung vorhanden war. Für die sequentielle Stimulation (Abbildung 9B) hingegen wurde die nanoskalige Formulierung durch einen Waschschrift entfernt,

bevor mIFN- γ /LPS zugegeben wurde. Unstimulierte Zellen dienten als Negativ-, stimulierte Zellen ohne Zugabe von Probe als Positivkontrolle. Nach einer weiteren Inkubation über 24 Stunden wurden die 48-Lochplatten zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge 3-18K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode im Harz, Deutschland, 400 x g, 3 Minuten, 4 °C), die Zellkulturüberstände abgenommen und bis zur biochemischen und immunologischen Analytik (2.4.4 Biochemische und immunologische Analytik) bei -20 °C eingefroren.

2.4.4 Biochemische und immunologische Analytik

2.4.4.1 *Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA)*

Das ELISA MAX™ Standard Set Mouse TNF- α (Biolegend, San Diego, CA, USA) wurde gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Absorbanz des farbigen Endproduktes wurde bei einer Wellenlänge von λ 450 nm mittels Plattenlesegerät Infinite® 200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt. Für die Datenanalyse wurde das Leerwertsignal von den Probensignalen subtrahiert und anhand der Standardkurve die Probenkonzentration ermittelt. Nachfolgend wurde das arithmetische Mittel der Positivkontrolle als 100 % definiert und die dazu relativen Probenwerte berechnet. Um die Qualität der Experimente zu gewährleisten, wurden nur solche berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der Positivkontrolle ≤ 25 % war.

2.4.4.2 Multiplex-Assay

Für die detailliertere Analytik ausgewählter Proben fand der Multiplex-Assay LEGENDplex™ *Mouse Inflammation Bead-based Immunoassay* (Biolegend, San Diego, CA, USA) Anwendung. Er wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die nachfolgend aufgelisteten Zytokine wurden parallel bestimmt. Ihre wichtigsten biologischen Eigenschaften fast Tabelle A 1 im Anhang zusammen.

IL-23, IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-12p70, IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-27, IL-17A, IFN- β , GM-CSF

Die Auswertung des Multiplex-Assays erfolgte mittels des Durchflusszytometers LSR II Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Geräteeinstellungen fasst Tabelle 4 zusammen.

Tabelle 4: Geräteeinstellungen für die Multiplex-Analytik mittels Durchflusszytometer LSR II Fortessa.

Parameter	Bedingung
Exzitation	
Partikeleigenfluoreszenz (APC)	639 nm
Antigen-Antikörper-Komplex (SA-PE)	561 nm
Emission	
Partikeleigenfluoreszenz (APC)	660 nm
Antigen-Antikörper-Komplex (SA-PE)	575 – 585 nm

Die Daten des Durchflusszytometers wurden mit der Software LEGENDplex v8.0 (Biolegend, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Für jedes einzelne Zytokin wurde eine Standardkurve erstellt und daraus die Probenkonzentration berechnet. Die Basislinienkorrektur erfolgte automatisch. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der Positivkontrolle als 100 % definiert und die dazu relativen Probenwerte berechnet.

2.4.4.3 Multispektrale Fluoreszenzmikroskopie

Der qualitative Nachweis der Phagozytose von Liposomen durch MPM erfolgte mittels multispektraler Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür wurden neben den DiR-markierten Liposomen (2.3.1.2 Markierung der Liposomen) auch die Zellmembran (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat, Dil, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) und der Zellkern (DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) angefärbt.

Die Zellen (100.000 Zellen/Loch) wurden in 8-Loch-Kammer-Objektträgern (Nunc™ Lab-Tec™ II Chamber Slide™ System, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) mit phenolrotfreiem Medium (DMEM, Lonza GmbH, Köln, Deutschland, beinhaltet bzw. ergänzt mit 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose; 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 I.E. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, alles Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) kultiviert. Nach Zugabe der Liposomen und anschließender Stimulation (direkt bzw. sequentiell, Abbildung 9) wurde das Medium entfernt und die Zellen in 4 % Formalin (in PBS) für 10 Minuten fixiert. Überschüssiges Formalin wurde durch Waschen (dreimal, PBS, für je 5 Minuten) entfernt. Die Zellmembran wurde nachfolgend mit 5 µg/ml Dil (in PBS) für 10 Minuten angefärbt. Überschüssiges Dil wurde durch Waschen (dreimal, PBS, für je 5 Minuten) entfernt. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch Inkubation mit 1 mg/ml Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in PBS (10 Minuten). Nach dem Waschen (dreimal, PBS, für je 5 Minuten) wurde der Zellkern mit 300 nM DAPI (in PBS) angefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten unter Lichtschutz wurde überschüssiges DAPI durch Waschen entfernt (dreimal, PBS, für je 5 Minuten). Die 8-Loch-Kammer-Objektträger wurden anschließend mit *ProLong™ Diamond Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) eingebettet, 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend mittels des Leica DM 4000 B Fluoreszenzdurchlichtmikroskops, ausgestattet mit einem *Nuance® Ex multispectral Imagingsystem* (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) mikroskopiert. Das Mikroskop ist mit einer 200 W Halogen-Metaldampf-Lampe ausgestattet. Graustufen- und Fluoreszenzbilder wurden mit einer 1,4 MP CCD Kamera aufgenommen (Arbeitstemperatur des CCD Sensors: 8 °C). Die wichtigsten Einstellungen sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 5).

Tabelle 5: Geräteeinstellungen für die multispektrale Fluoreszenzmikroskopie am *Nuance*[®] *Ex multispectral Imagingsystem*.

Parameter	Bedingung
Exzitation (Schmalband-Filter, BP) DAPI Dil DiR	340 – 380 nm 515 – 560 nm 710 – 775 nm
Emission (Langpass-Filter, LP) + Bedingungen DAPI Dil DiR	470 nm (450 – 650 nm; 10 nm Schritte) 590 nm (595 – 800 nm; 10 nm Schritte) 780 nm (785 – 950 nm; 10 nm Schritte)
Vergrößerung Okular Objektiv	10 x 40 x
Belichtung Belichtungszeit Binning	Automatischer Modus optimal für jeweiligen Fluorophor, 1 - 5000 ms 2 x 2

Die Auswertung erfolgte mit der Software *Nuance*[®] (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Für jeden BP-Filter wurden Dateien, sogenannte *Cubes*, erstellt, welche für die untersuchten Wellenlängen (LP-Filter-Messbereich) die spektralen Informationen enthalten. Mit Hilfe einer vorher eingepflegten Spektrenbibliothek, welche die spektralen Informationen für den Hintergrund (Objektträger), DiR (Liposomen), Dil (Makrophagenzellmembran) und DAPI (Zellkern) enthielt, wurde jeder *Cube* des jeweiligen Fluorophors in entsprechende 12-bit Graustufenbilder zerlegt. Für die qualitative Auswertung wurden die 12-bit Graustufenbilder selektiert, welche die Fluoreszenzinformationen des jeweiligen Fluorophors bei optimaler BP- und LP-Filter-Kombination enthielten. Für den jeweiligen Fluorophor wurde eine definierte Farbe festgelegt (DAPI = blau, Dil = rot, DiR = grün). Nachfolgend wurde mittels der Bildbearbeitungssoftware GNU Image Manipulation Program (GIMP, Version 2.8.22, <https://www.gimp.org/>), der Hintergrund der jeweiligen Fluorophorbilder als transparent gesetzt und die Einzelbilder als Ebenen in einem Bild übereinandergelegt und als Gesamtdarstellung zusammengefügt.

2.5 *In vivo* und *ex vivo* Charakterisierung

2.5.1 Allgemeines

In vivo Biodistributionsstudien und *ex vivo* Charakterisierungen am gesunden und myokardial infarktierten Tier wurden im Rahmen des Versuchsvorhabens „Modulation der Inflammationsreaktion nach Myokardinfarkt mit den Phospholipiden Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol in nano-skaligen Formulierungen“ (Anzeigennummer für die Genehmigung von Versuchen am lebenden Tier: 42502-2-1500 Martin-Luther-Universität, erteilt durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten) durchgeführt. Leiterin des Versuchsvorhabens ist Frau Dr. Lucas, Institut für Pharmazie, Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Sie und Dr. Rieckmann, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, nahmen die Manipulationen am Tier vor.

2.5.2 Mäuse

Es wurden haarlose, immunkompetente Mäuse mit Albinohintergrund (SKH1) verwendet. Diese stammten aus der hausinternen Zucht des ZMG, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und wurden zu maximal fünf Tieren je Käfig in geschlossenen, vollklimatisierten Käfigsystemen gehalten. Ihr Tag/Nacht-Rhythmus war einem vollautomatischen Lichtregime unterworfen. Sie erhielten Wasser und Futter *ad libitum*.

2.5.3 Experimentelles Versuchsdesign

2.5.3.1 Untersuchung der *in vivo* und *ex vivo* Biodistribution am gesunden Tier

Die Charakterisierung der Biodistribution der Liposomen im gesunden Tier erfolgte mittels *in vivo* und *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung (*fluorescence imaging*, FI). Sowohl 6 weibliche wie auch 6 männliche Mäuse wurden untersucht. Ein entsprechendes Versuchsablaufprotokoll zeigt Abbildung 10.

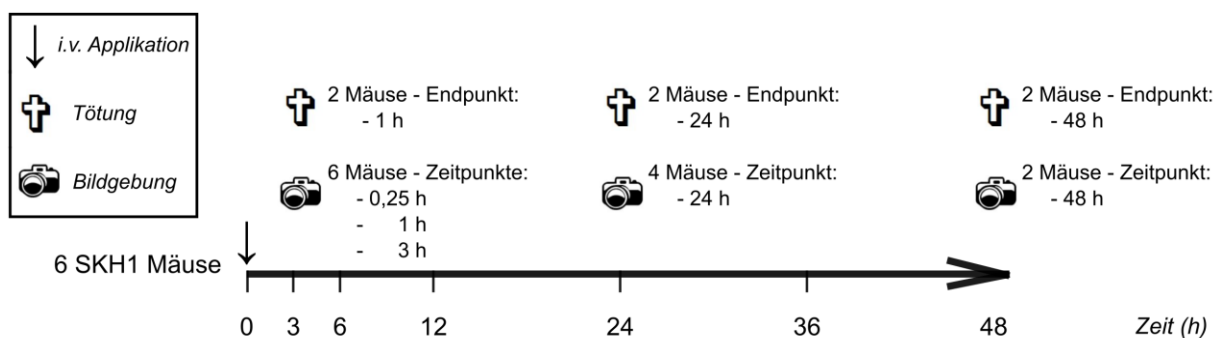


Abbildung 10: Versuchsablaufschema für die *in vivo* und *ex vivo* Biodistributionsuntersuchung am gesunden Tier.

Für jedes Geschlecht wurden jeweils 6 Mäuse untersucht.

Jede Liposomenformulierung wurde somit in 12 Mäusen getestet. Dies entspricht vier Tieren pro Endpunkt (Abbildung 10). Zu Beginn wurden jeder Maus 100 µl Liposomen (5 mg/ml) *i.v.* in die Schwanzvene appliziert. Anschließend wurden die Mäuse für das *in vivo* FI narkotisiert. Im Anschluss an den jeweils letzten Zeitpunkt der Bildgebung (Endpunkte: 1, 24 oder 48 Stunden, Abbildung 10) wurden die Mäuse noch in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Nachfolgend wurden die inneren Organe entfernt, in PBS gespült und auf 12-Lochplatten für das *ex vivo* FI platziert (Tabelle 7, Tabelle 8).

2.5.3.2 Untersuchung der *in vivo* und *ex vivo* Biodistribution am infarktierten Tier

Die Charakterisierung der Biodistribution der Liposomen in der myokardial infarktierten Maus erfolgte mittels *in vivo* und *ex vivo* FI sowie Immunhistologie. Ein entsprechendes Versuchsablaufprotokoll zeigt Abbildung 11.

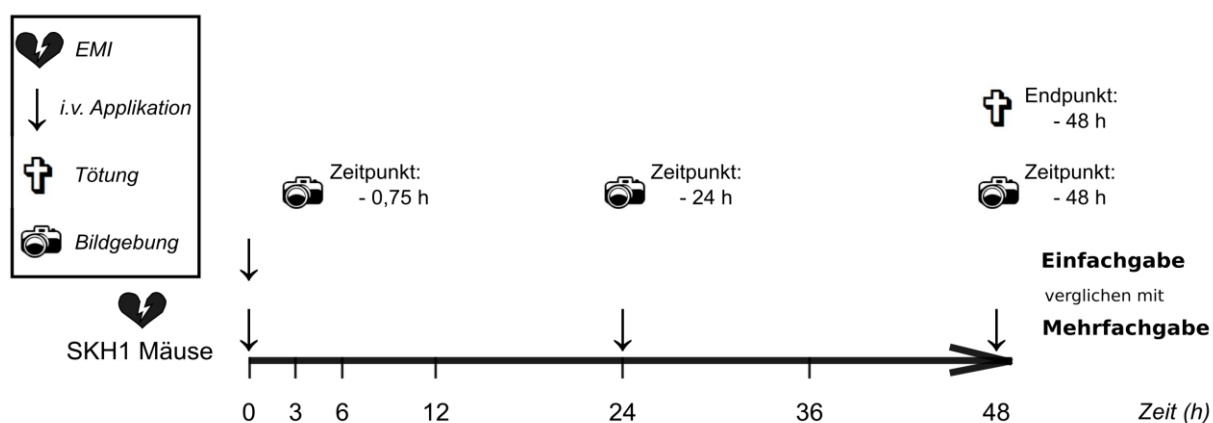


Abbildung 11: Versuchsablaufschema für die *in vivo* und *ex vivo* Biodistributionsuntersuchung am myokardial infarktierten Tier.

Die Mäuse erhielten Liposomen entweder einfach oder mehrfach (dreifach).

Jede Liposomenformulierung wurde in zwei Applikationsschemata untersucht. Es wurde zwischen Einfach- und Mehrfachgabe (dreifach) unterschieden (Abbildung 11). Initial, vor dem Setzen des Herzinfarktes (experimenteller Myokardinfarkt, EMI), erhielt jede Maus 100 µl Liposomen (5 mg/ml) *i.v.* in die Schwanzvene appliziert. Die Mäuse der Mehrfachgabe erhielten zusätzlich 24 und 48 Stunden nach EMI nochmals jeweils 100 µl Liposomen *i.v.* appliziert. Sofort nach dem Setzen des EMI, noch in Narkose, erfolgte eine erste Bildgebung. Im Anschluss an den jeweils letzten Zeitpunkt der Bildgebung (Endpunkt: 48 Stunden, Abbildung 11) wurden die Mäuse noch in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Nachfolgend wurden die inneren Organe entfernt, in PBS gespült und auf 12-Lochplatten für das *ex vivo* FI platziert (Tabelle 7, Tabelle 8).

2.5.3.3 Experimenteller Myokardinfarkt (EMI)

Das Setzen des experimentellen Myokardinfarktes wurde durch den Tierarzt Herr Dr. Rieckmann, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Halle (Saale), Martin-

Luther-Universität Halle-Wittenberg, vorgenommen. Unter strengen aspektischen Bedingungen führte er eine permanente Ligation der linken Koronararterie durch.^{111,112} Für eine detaillierte Beschreibung der Durchführung wird auf seine Dissertation verwiesen.¹¹²

2.5.4 *In vivo* und *ex vivo* Analytik

2.5.4.1 *In vivo* und *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung (FI)

Die *in vivo* und *ex vivo* Bildgebung erfolgte mit dem IVIS Spektrum FI system (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Hierfür wurden die Mäuse mittels Isofluran (Initial: 2,5 % Isofluran in Sauerstoff bei 3 l/Minute, Erhaltung: 2,5 % Isofluran in Sauerstoff bei 0,3 l/Minute) narkotisiert (Narkosesystem XGI-8, Caliper LifeSciences, Runcorn, Cheshire, Großbritannien) und im auf 37 °C temperierten IVIS Spectrum platziert. Das Gerät ist mit einer 150 W Quartz Wolfram Halogen Lampe ausgestattet. Graustufen- und Fluoreszenzbilder wurden mit einer 4,1 MP (2048 x 2048) CCD Kamera aufgenommen (Arbeitstemperatur des CCD Sensors: -90 °C). Die wichtigsten Einstellungen sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 6).

Tabelle 6: Geräteeinstellungen für die Fluoreszenzbildgebung am IVIS Spectrum.

Parameter	Bedingung
Exzitation (DiR)	745 nm (30 nm Bandbreite)
Emission (DiR)	800 nm (20 nm Bandbreite)
Aufnahmefeld Maus Organ	D (FOV 22,5 cm) C (FOV 13,0 cm)
Belichtungseinstellungen Belichtungszeit Binning F/Stop Ziel-Zahl Photonen	automatischer Modus 0,5 - 60 Sekunden 1 - 8 1 - 8 6000

Die Bildgebung erfolgte zu den in Abbildung 10 und Abbildung 11 definierten Zeitpunkten von je vier Seiten:

- dorsal (Rückenansicht)
- lateral rechts (Seitenansicht, rechts)
- ventral (Bauchansicht)
- lateral links (Seitenansicht, links)

Hierbei wurde darauf geachtet die Injektionsstelle abzudecken, um Verfälschungen während des *in vivo* FI zu vermeiden. *Ex vivo* wurden die in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgelisteten Organe in zwei 12-Lochplatten platziert und analysiert.

Tabelle 7: Auftragungsschema Platte 1 für das ex vivo FI.

	1	2	3	4
A	Blut (Röhrchen)	Leber	Milz	Zwölffingerdarm
B	Herz	Niere, Nebenniere	Pankreas	Blinddarm
C	Lunge	Harnblase	Magen	Kolon

Tabelle 8: Auftragungsschema Platte 2 für das ex vivo FI.

	1	2	3	4
A	Hirn	Femur, Knie, Tibia	<i>Besonderheiten</i>	Hautnarbe
B	Haut	Oberschenkelmuskel	<i>Besonderheiten</i>	Thoraxnarbe
C	subkutanes Fettgewebe	Uterus, Eierstöcke	<i>Besonderheiten</i>	Lymphknoten

Die Auswertung der *in vivo* und *ex vivo* Bilder erfolgte mit der Software *Living Image*[®] (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Der Parameter (*Total*) *Radiant Efficiency* (TRE) wurde ausgewertet. Er berücksichtigt neben der Zahl der detektierten Photonen, der Belichtungszeit und –fläche, sowie einem festen Raumwinkel (Steradian) auch die Belichtungsintensität und ermöglicht somit einen quantitativen Vergleich zwischen verschiedenen Proben und Aufnahmezeitpunkten. Für die Quantifizierung wurden „Bereiche von Interesse“ (*Region of Interest*, ROI) definiert. *In vivo* Studien wurden mit einer ellipsoiden ROI (Hauptachse: 9,7 cm; Nebenachse: 4,47 cm), *ex vivo* Studien mit einem 4 x 3 Gitternetz (je Gitterfeld: Längsachse: 2,65 cm, Querachse: 2,65 cm) festgelegt und die TRE bestimmt. Anschließend wurde das Leerwertsignal (Kontroll-Maus) von den Probensignalen subtrahiert. Die Fluoreszenzintensität des Zeitpunktes 15 Minuten nach Applikation wurde für die *in vivo* Studien als 100 % definiert und nachfolgend die dazu relativen Fluoreszenzintensitäten berechnet. *Ex vivo* diente die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Leber als Referenz.

2.5.4.2 Immunhistologie

Die Etablierung und Durchführung der immunhistologischen Färbungen oblag Dr. Rieckmann, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Halle (Saale), Martin-Luther-Universität.

Repräsentative *ex vivo* Organe der infarktierten Mäuse wurden immunhistologisch gefärbt. Hierfür wurden die Organe in *Tissue Tec*[®] *O.C.T.*[™] *Compound* (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) schockgefroren. Anschließend wurden die Organe in 5 µm dicke Tranchen (Leber, Milz) oder 8 µm dicke Tranchen (Herz, infarktiertes Gebiet) geschnitten und auf Objektträger getrocknet und nachfolgend bei -20 °C gelagert. Vor der immunhistologischen Färbung wurden die Proben mittels *Cytofix* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) fixiert, gewaschen (dreimal, PBS, für je 5 Minuten) und mit Superblock (ScyTek LABORATORIES Inc., Logan, UT, USA) für ca. 30 Minuten geblockt. Monozyten und Makrophagen wurden anschließend mit 2,5 µg/ml

ALEXA Fluor® 594 nm Anti-Maus CD68 Antikörper (in PBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben gewaschen (dreimal, PBS, für je 5 Minuten) und anschließend jede Probe mit einem Tropfen DAPI enthaltendes *Immunoselect Antifading Mounting Medium* (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet. Das Mikroskopieren der Proben erfolgte mit dem Leica DM 4000 B Fluoreszenzdurchlichtmikroskop, welches mit einem *Nuance® Ex multispectral Imagingsystem* (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) ausgestattet ist. Nachfolgend sind die wichtigsten Einstellungen tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 9).

Tabelle 9: Geräteeinstellungen für die multispektrale Immunfluoreszenzmikroskopie am Nuance® Ex multispectral Imagingsystem.

Parameter	Bedingung
Exzitation (Schmalband-Filter, BP)	
DAPI	340 – 380 nm
Gewebeautofluoreszenz	450 – 490 nm
Alexa Fluor 594 nm CD 68 Antikörper	515 – 560 nm
DiR	710 – 775 nm
Emission (Langpass-Filter, LP) + Bedingungen	
DAPI	470 nm (450 – 650 nm; 10 nm Schritte)
Gewebeautofluoreszenz	515 nm (520 – 720 nm; 10 nm Schritte)
ALEXA Fluor 594 nm CD68 Antikörper	590 nm (595 – 800 nm; 10 nm Schritte)
DiR	780 nm (785 – 950 nm; 10 nm Schritte)
Vergrößerung	
Okular	10 x
Objektiv	40 x
Belichtung	Automatischer Modus
Belichtungszeit	optimal für jeweiligen Fluorophor, 1 - 5000 ms
Binning	2 x 2

Die Auswertung erfolgte mit der Software *Nuance®* (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Für jeden BP-Filter wurden *Cubes* erstellt, welche für die untersuchten Wellenlängen (LP-Filter-Messbereich) die spektralen Informationen enthalten. Mit Hilfe einer vorher eingepflegten Spektrenbibliothek, welche die spektralen Informationen für den Hintergrund (Objektträger), DiR (Liposomen), ALEXA Fluor 594 nm CD68 Antikörper (Makrophagenzellmembran), Gewebeautofluoreszenz und DAPI (Zellkern) enthielt, wurde jeder *Cube* des jeweiligen Fluorophors in entsprechende 12-bit Graustufenbilder zerlegt. Für die qualitative Auswertung wurden die 12-bit Graustufenbilder selektiert, welche die Fluoreszenzinformationen des jeweiligen Fluorophors bei optimaler BP- und LP-Filter-Kombination enthielten. Für den jeweiligen Fluorophor wurde eine definierte Farbe festgelegt (DAPI = blau, Gewebeautofluoreszenz = weiß, ALEXA Fluor 594 nm CD68 Antikörper = rot, DiR = grün). Nachfolgend wurde mittels der Bildbearbeitungssoftware GNU

Image Manipulation Program (GIMP, Version 2.8.22, <https://www.gimp.org/>), der Hintergrund der jeweiligen Fluorophorbilder als transparent gesetzt und die Einzelbilder als Ebenen in einem Bild übereinandergelegt und als Gesamtdarstellung zusammengefügt.

2.6 Statistik

Die Berechnung von absoluten und relativen Werten, arithmetischen Mitteln, absoluten und relativen Standardabweichungen sowie die lineare Regression von Standardkurven mit der Ermittlung von Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß R^2 erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

Für die weiterführende statistische Auswertung wurde Statgraphics® Centurion 17.2.07, (Statpoint Technologies, Inc., The Plains, VA, USA) genutzt. Wo möglich, wurde eine einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt (Signifikanzlevel: $p \leq 0,05$).

Hierfür wurde zu Beginn das Folgende geprüft:

- Prüfung auf Normalverteilung:
Beurteilung der Asymmetrie (Schiefe) sowie der Verteilungskonzentration der Messwerte um den Mittelwert (Excess). Beide Parameter sollten in einem Bereich von -2,0 bis 2,0 liegen, dann ist es wahrscheinlich, dass eine Normalverteilung vorliegt.
- Prüfung auf Gleichheit der Varianzen (Homoskedastizität):
Die Prüfung der Homoskedastizität erfolgte mit dem Levene-Test. Wird dieser abgelehnt ($p > 0.05$), so kann die Gleichheit der Varianzen angenommen werden.

Waren beide Prüfungen erfolgreich, wurde nachfolgend die ANOVA berechnet. Unter Verwendung des Tests auf den kleinsten signifikanten Unterschied (LSD-Post-hoc-Test) wurden anschließend paarweise Mittelwertvergleiche durchgeführt, die darüber Auskunft gaben, welche Mittelwerte sich signifikant unterscheiden. Graphisch wurde dies durch Buchstaben über den Säulen dargestellt. Hierbei zeigen gleiche Buchstaben, dass sich die Mittelwerte der Säulen nicht signifikant unterscheiden. Ungleiche Buchstaben hingegen verdeutlichen signifikant unterschiedliche arithmetische Mittel.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung der Zellkulturmethoden

3.1.1 Hämolyse

Für die Bestimmung der hämolytischen Eigenschaften dienten die Arbeiten von Fischer *et al.*^{113,114} und die standardisierte ASTM-Vorschrift¹⁰⁹ als Referenzen. Hierbei wurde nach einer Inkubation von 60 Minuten das freigesetzte Hämoglobin aus RBC spektralphotometrisch bestimmt. Im Rahmen der Optimierung lag ein besonderes Augenmerk auf der Analytik der unterschiedlichen Hämoglobinformen, die während der Lyse der RBC frei werden. Man unterscheidet 4 verschieden substituierte Hämoglobine: Oxyhämoglobin, Desoxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin und Methämoglobin.¹¹⁵ Je nach Substituenten absorbiert das Hämoglobin anders, was eine vollständige bzw. quantitative Analytik erschwert. Zwei Lösungsansätze wurden hierbei verfolgt. Zum einen bestand die Möglichkeit, die unterschiedlichen Hämoglobinformen in Methämoglobin umzuwandeln, wie es z.B. durch Inkubation mit Drabkins Reagenz (Na_2CO_3 , KCN, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) möglich ist.¹⁰⁹ Zum anderen war es möglich die Absorbanz der Mischhämoglobine bei unterschiedlichen Wellenlängen zu bestimmen. Traten hier Unterschiede in der Quantifizierung auf, war davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Hämoglobinformen sich gegenseitig negativ beeinflussen. Waren hingegen alle Werte vergleichbar, ist ein Einfluss der unterschiedlichen Hämoglobinformen wenig wahrscheinlich. Erste Untersuchungen der nanoskaligen Formulierungen zeigten für die Wellenlängen λ 380, 415 und 540 nm keine Unterschiede in der Quantifizierung (Abbildung 12).^{113,114,116}

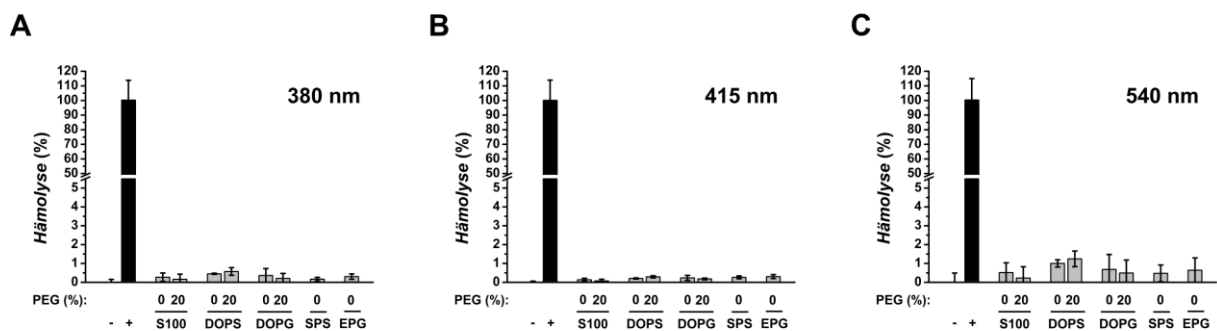


Abbildung 12: Optimierung Hämolyse-Assay, Untersuchung verschiedener Wellenlängen, bestimmt auf RBC.

A) zeigt die Hämolyseaktivität bei 380 nm, B) bei 415 nm und C) bei 540 nm Wellenlänge.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einem natürlichen Replikat.

Eine weiterführende Inkubation und Umwandlung der verschiedenen Hämoglobinformen in Methämoglobin mittels Drabkins Reagenz war möglich, bedurfte jedoch eines zusätzlichen Inkubationsschrittes, der zeitaufwendig war. Diese Option war daher Proben vorbehalten, bei denen die quantitative Aussage bei den drei unterschiedlichen Wellenlängen differierte.

Die Optimierung des Hämolyse-Assays umfasste weiterhin die Untersuchung der Zellzahl und die Definition der optimalen Zellzahl. Neben 4×10^7 Zellen/ml (Abbildung 12) wurden Zellzahlen von 4×10^6 , 4×10^8 und 4×10^9 Zellen/ml untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

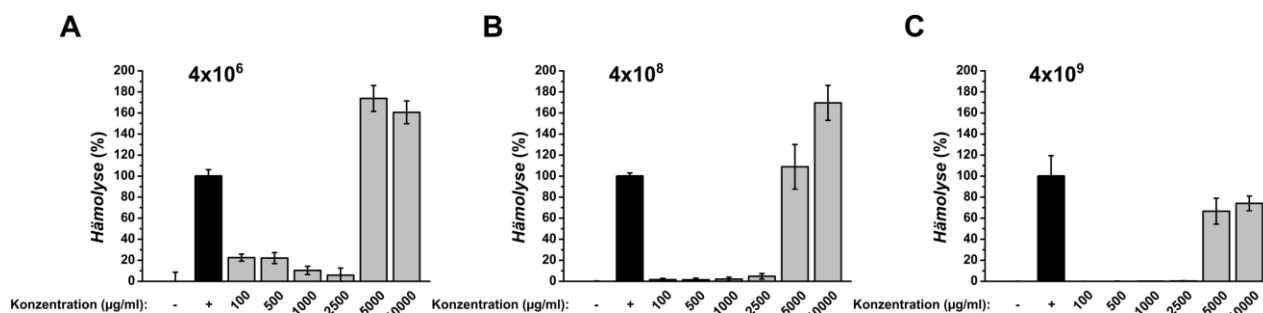


Abbildung 13: Optimierung Hämolyse-Assay, Untersuchung verschiedener Zellzahlen, bestimmt auf RBC.

A) zeigt 4×10^6 Zellen, B) 4×10^8 Zellen und C) 4×10^9 Zellen je Probe.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einem natürlichen Replikat.

Bei einer Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml wurde ein hohes Hintergrundrauschen detektiert. Darüber hinaus waren hier, ebenso wie bei einer Zellzahl von 4×10^8 Zellen/ml, die lytischen Eigenschaften des Natriumcholats stärker ausgeprägt, als von der Positivkontrolle SDS. Für 4×10^9 Zellen/ml wurden für hohe Konzentrationen an Natriumcholat vergleichbare lytische Effekte ermittelt, wie für die Positivkontrolle SDS. Da 4×10^9 Zellen/ml darüber hinaus auch den physiologischen Zustand am besten imitieren, wurde diese Zellzahl für alle weiteren Untersuchungen, analog Fischer *et al.*, verwendet.^{113,114}

3.1.2 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen

Im Rahmen der Untersuchung von MPM erfolgte die Bestimmung der optimalen PS-Konzentration für die Herstellung nanoskaliger Formulierungen. Es wurden DOPS-Konzentrationen von 10 %, 30 % und 50 % untersucht. Tabelle 10 präsentiert die physikochemischen Daten.

Tabelle 10: Größe, Größenverteilung und Zetapotential der DOPS Liposomen, bestimmt mittels DLS bzw. ELS.

Liposomenformulierung	Z-Average (nm)	PDI	Zetapotential (mV) Kochsalz	Zetapotential (mV) Glucose
10 % DOPS 90 % S100	152	0,07	-15	-49
30 % DOPS 70 % S100	149	0,08	-32	-70
50 % DOPS 50 % S100	150	0,09	-44	-73

Die Stimulation der MPM erfolgte direkt (2.4.3.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen). Es konnte eine TNF- α -Reduktion in Abhängigkeit von der DOPS- und Liposomenkonzentration ermittelt werden (Abbildung 14).

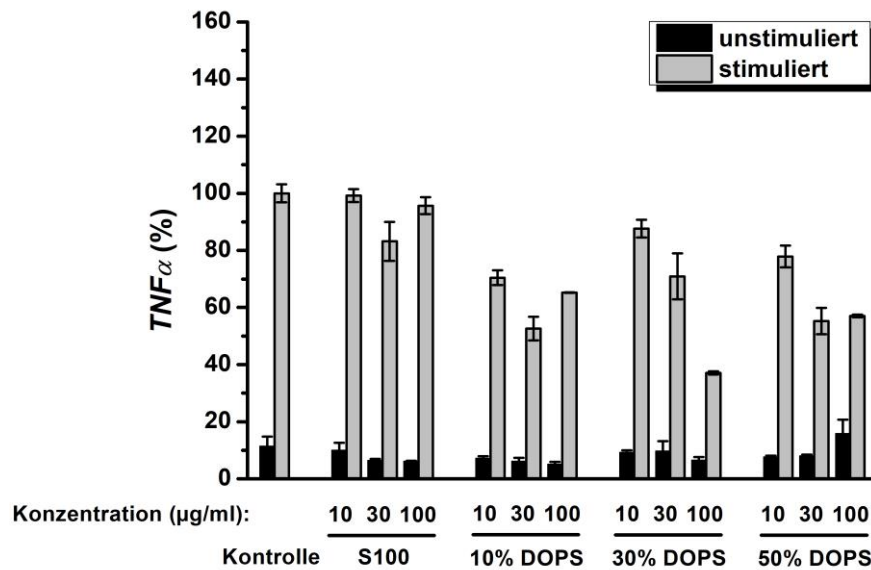


Abbildung 14: Optimierung MPM-Assay, Untersuchung des Einflusses der DOPS-Konzentration in konventionellen Liposomen (direkte Stimulation) auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einem natürlichen Replikat.

Für 30 % DOPS war eine klare dosisabhängige Reduktion des TNF- α erkennbar. 50 % DOPS sowie 10 % DOPS hingegen reduzierten TNF- α weniger potent. Aus diesem Grund wurden 30 % DOPS für alle weiteren Studien verwendet.

Im Laufe der Arbeit wurden neben C57BL/6J WT Mäusen (Inzuchtstamm, immunkompetent) auch SKH1 Mäuse (Auszuchtstamm, immunkompetent) für die Gewinnung der MPM verwendet.¹¹⁷ Dies ist damit zu begründen, dass die SKH1 Mäuse kein Fell besitzen, haarlos sind und sich daher gut für spätere *in vivo* Versuche mittels *in vivo* FI eignen. Um die Vergleichbarkeit der Zellkulturversuche zu gewährleisten, wurden die Makrophagen beider Mausstämmen in einem parallelen Versuch in Gegenwart von konventionellen Liposomen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Auch für SKH1 MPM wurde eine dosisabhängige Reduktion von TNF- α festgestellt. Im Vergleich zu den C57BL/6J WT MPM war dieser immunmodulierende Effekt jedoch etwas vermindert ausgeprägt. Dies ist wahrscheinlich auf die höhere genetische Variabilität der Auszucht SKH1 Mäuse im Vergleich zu den Inzucht C57BL/6J WT Mäusen zurückzuführen.¹¹⁷ Für die *in vitro* Untersuchungen erschien dieses reduzierte Ansprechen etwas nachteilig, da weniger eindeutig zu differenzierende TNF- α -Effekte für die einzelnen nanoskaligen Formulierungen zu erkennen waren. Im Kontext späterer *in vivo* Untersuchungen wurde dies jedoch akzeptiert.

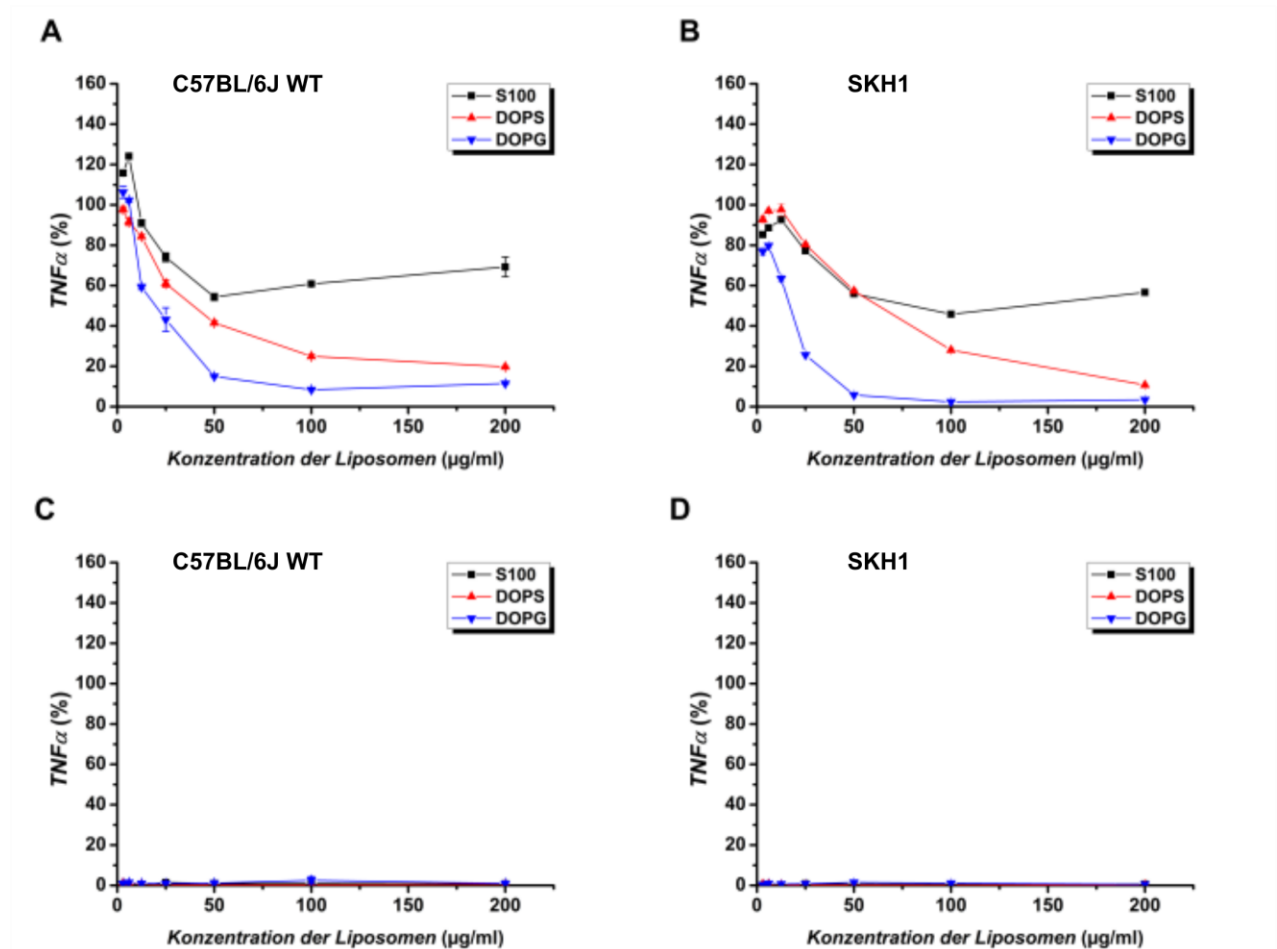


Abbildung 15: Optimierung MPM-Assay, Vergleich MPM Aktivität von C57BL/6J WT und SKH1 Mäuse (direkte Stimulation) auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

A) zeigt mit IFN γ /LPS stimulierte C57BL/6J WT MPM, B) mit IFN γ /LPS stimulierte SKH1 MPM, C) unstimulierte C57BL/6J WT MPM, D) unstimulierte SKH1 MPM.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von einem natürlichen Replikat.

Weiterhin galt es die Reihenfolge der Stimulation tiefgreifender zu untersuchen sowie einen alternativen Stimulus zu testen. Die Reihenfolge der Stimulation ist in der Literatur in Form von unterschiedlichen Protokollen angegeben. So untersuchten die Arbeiten von Aramaki *et al.*¹¹⁸, Matsuno *et al.*⁴⁷ und Gauthier *et al.*¹¹⁹ die Aktivität PS-haltiger Liposomen im Makrophagen-Assay analog des hier etablierten Protokolls. Ma *et al.*⁵³ hingegen gaben Liposomen und mIFN- γ /LPS simultan, Urbano *et al.*⁵⁵ und Quan *et al.*¹²⁰ sogar in umgekehrter Reihenfolge, also zuerst mIFN- γ /LPS und danach die Liposomen. Interessant war hierbei, dass im Grunde alle Autoren zu dem Schluss kamen, dass PS immunmodulierende Eigenschaften aufweist. Um dies detailliert zu untersuchen, wurden die nachfolgend aufgelisteten Zellkulturprotokolle in der direkten und sequentiellen Stimulation (Abbildung 9) angewandt:

- etablierten Reihenfolge = 1. nanoskalierte Formulierung, 2. mIFN- γ /LPS
- geänderte Reihenfolge = 1. mIFN- γ /LPS, 2. nanoskalierte Formulierung

Für einen besseren Vergleich sind die Ergebnisse der etablierten und geänderten Reihenfolge in einer Abbildung (Abbildung 16A, B) dargestellt.

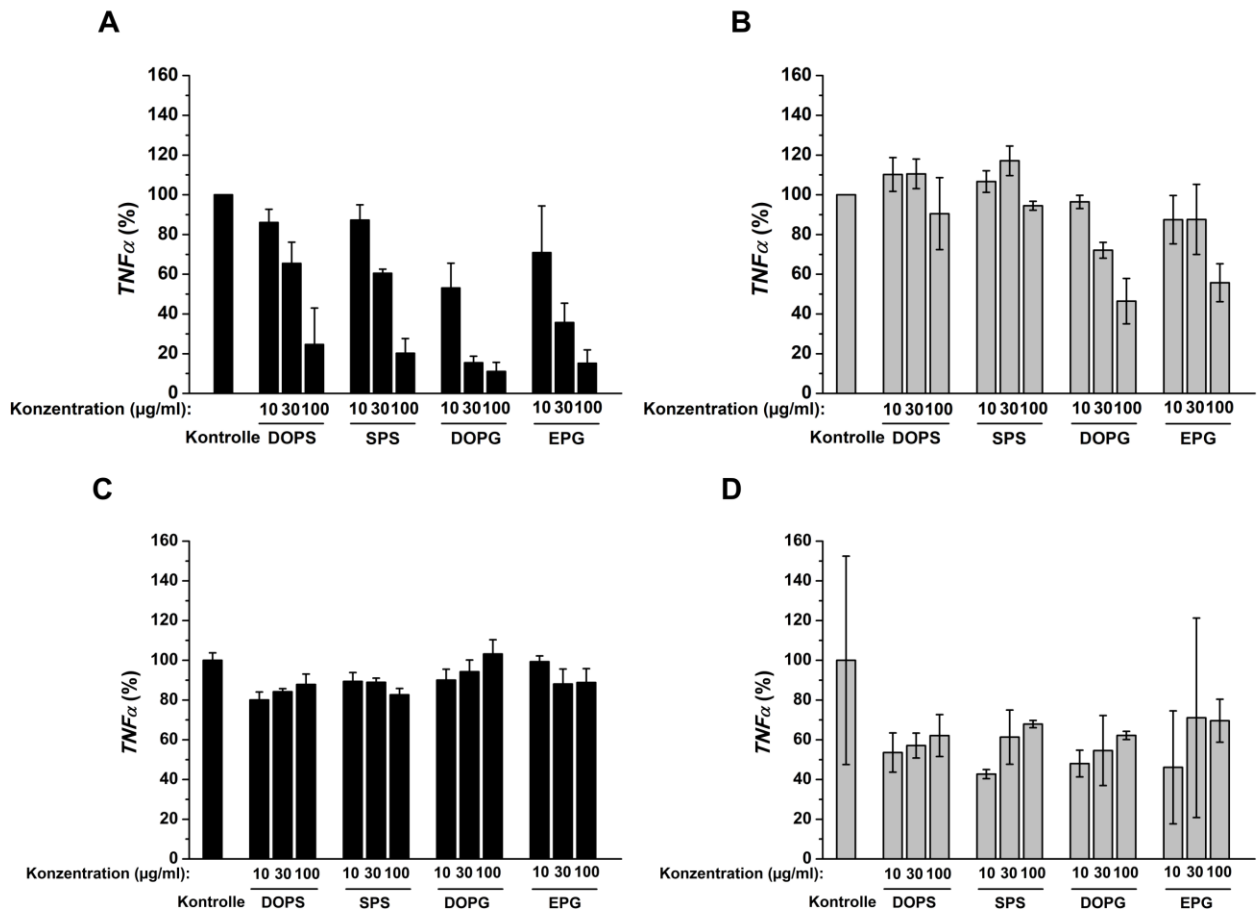


Abbildung 16: Optimierung MPM-Assay, Untersuchung der Reihenfolge der Liposomenzugabe und Zellstimulation (direkte und sequentielle Stimulation) auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

A) und B) zeigen die etablierte Reihenfolge. A) präsentiert die direkte und B) die sequentielle Stimulation. C) und D) zeigen die geänderte Reihenfolge. C) präsentiert die direkte und D) die sequentielle Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 natürlichen Replikaten (etablierte Reihenfolge), bzw. einem natürlichen Replikate (geänderte Reihenfolge).

Die Ergebnisse der etablierten Reihenfolge, es ist eine dosisabhängige Reduktion von TNF- α in Gegenwart von PS und PG zu erkennen, werden ausführlich unter 3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausemakrophagen diskutiert. Bei der geänderten Reihenfolge (Abbildung 16C, D) hingegen trat dieser Effekt nicht auf. Hier wurde in allen Zellkulturbedingungen eine vergleichbare Menge an TNF- α wiedergefunden. Die Ergebnisse entsprechen den Vorstellungen des physiologischen Hintergrundes *in vivo*. Szondy *et al.* beschrieben, dass die Polarisation von Monozyten in Makrophagen eines antiinflammatorischen Phänotyps zwei Stimuli benötigt, zuerst die apoptotische Zelle, dann einen TLR-4-Liganden, wie LPS.¹⁵ Mosser *et al.* bestätigten dies.^{16,121} Daher erfolgten alle weiteren Studien mit dem Zellkulturprotokoll der etablierten Reihenfolge.

Als alternativer Stimulus wurde Zymosan ausgewählt. Zymosan ist ein Homoglykan aus sich wiederholenden β -1,3-glykosidisch verknüpften Glucose-Einheiten, welches aus Hefe gewonnen wird.⁴ Für Zymosan ist beschrieben, dass es TLR-2 aktiviert und somit Makrophagen stimuliert, die anschließend proinflammatorische Zytokine freisetzen. Es wird ebenfalls in der Zellkultur für die Induktion einer Entzündung eingesetzt. Für den Vergleich mit mIFN- γ /LPS wurde eine Konzentration von 1 μ g/ml Zymosan verwendet. Die Stimulation erfolgte sowohl direkt als auch sequentiell (Abbildung 9). Die Ergebnisse der mIFN- γ /LPS-Stimulation (3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen) sind für Vergleichszwecke zusammen mit den Ergebnissen der mIFN- γ /Zymosan-Stimulation in Abbildung 17 dargestellt.

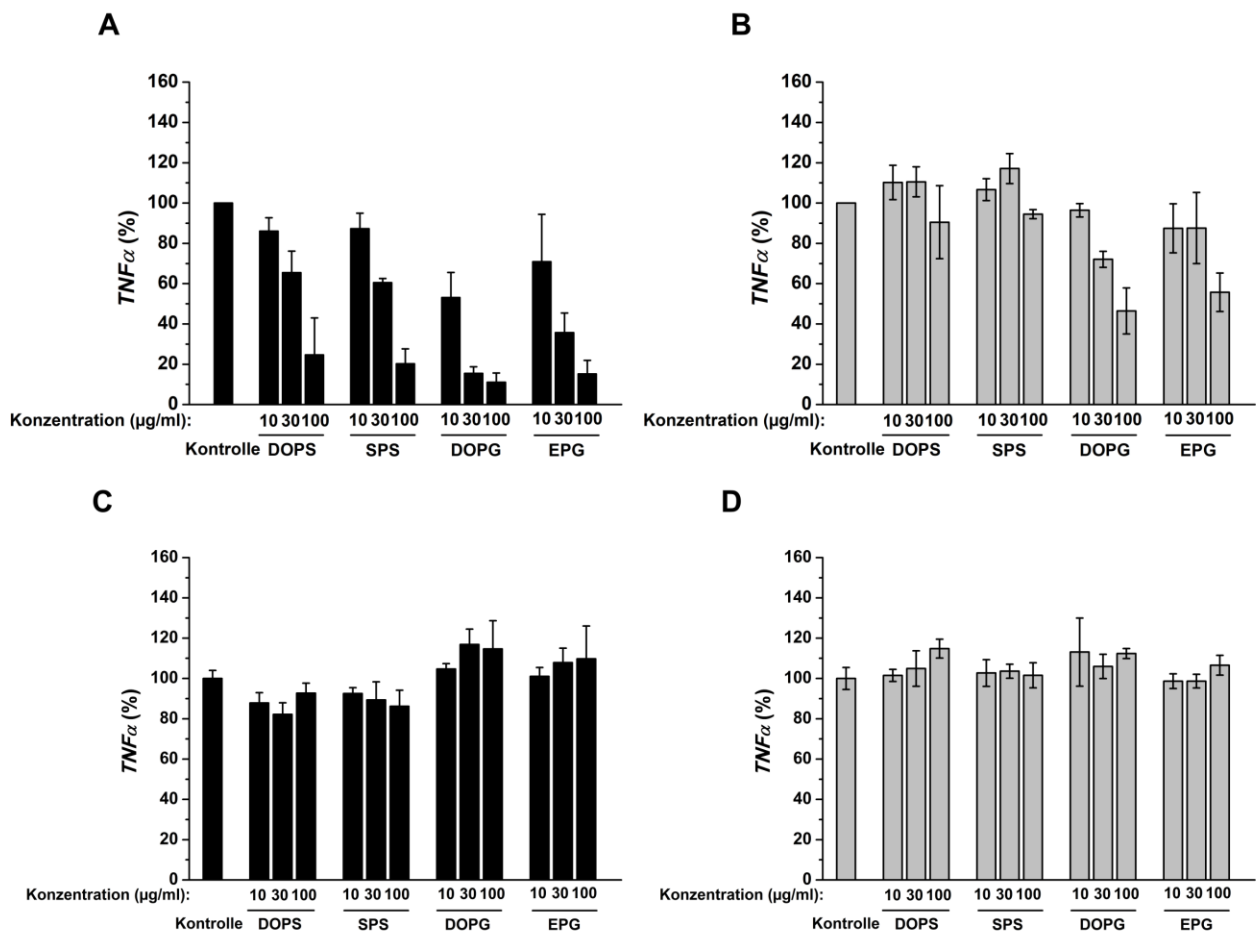


Abbildung 17: Optimierung MPM-Assay, Untersuchung des etablierten Stimulus LPS und des alternativen Stimulus Zymosan auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

A) und B) zeigen die MPM Stimulation mit mIFN- γ /LPS. A) präsentiert die direkte und B) die sequentielle Stimulation. C) und D) zeigen die MPM Stimulation mit mIFN- γ /Zymosan. C) präsentiert die direkte und D) die sequentielle Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 natürlichen Replikaten (mIFN- γ /LPS) bzw. einem natürlichen Replikat (mIFN- γ /Zymosan).

Für mIFN- γ /LPS war eine dosisabhängige Reduktion der TNF- α -Produktion in Gegenwart von Liposomen zu erkennen (Abbildung 17A, B). Für mIFN- γ /Zymosan hingegen zeigte sich keine TNF- α -Reduktion (Abbildung 17C, D). Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass PS und PG einen Einfluss auf den TLR-4-Rezeptor (LPS-vermittelt) haben und nicht auf den TLR-2-Rezeptor (Zymosan-vermittelt). Diese Ergebnisse stehen etwas in Kontrast zu den Ergebnissen von Fadok *et al.*, die den Einfluss apoptotischer Zellen auf mit LPS bzw. Zymosan stimulierte Makrophagen untersuchten.¹²² Sie konnten zeigen, dass apoptotische Zellen die TNF- α -Produktion sowohl in LPS-stimulierten als auch Zymosan-stimulierten Zellkulturen reduzierten. Hierbei ist jedoch zu bemerken, dass neben PS als Erkennungsmerkmal für Makrophagen auch andere Bestandteile der apoptotischen Zelle einen Einfluss auf die TLR-2 Aktivität haben könnten. Eine alleinige Untersuchung von PS in Form von Liposomen oder anderen nanoskaligen Formulierungen wurde hier nicht durchgeführt. Lediglich Serinkan *et al.* zeigten in einem *Letter to the Editor*, dass PS allein in Gegenwart von Zymosan nicht in der Lage ist, die TNF- α -Produktion zu senken.¹²³ Somit sind die hier erhaltenen Ergebnisse plausibel. PS und PG scheinen vermehrt über den TLR-4 Signalweg zu wirken.

3.2 Liposomen¹

3.2.1 Allgemeines

Das *Quality Target Product Profile* für nanoskalige Liposomenformulierungen ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Es diente der Vordefinition wichtiger physikochemischer Parameter, die für die Herstellung der Liposomen einzuhalten waren.

Tabelle 11: *Quality Target Product Profile* für Liposomenformulierungen.

Parameter	Wert
Lipidfluidität	flüssigkristalline Phase L α
Größe	< 1 μ m
Größenverteilung	eng (PDI < 0,1)
Morphologie	runde Form, vorwiegend unilamellar
Oberflächenladung	negativ bis neutral geladen

Neben den synthetischen anionischen Phospholipiden DOPS und DOPG wurden auch die natürlichen Phospholipide SPS und EPG für die Herstellung der Liposomen verwendet. Es wurden sowohl konventionelle als auch ‚*stealth*‘ Liposomen formuliert und systematisch und vergleichend untersucht. Nachfolgend ist die Zusammensetzung und Nomenklatur der untersuchten Liposomen dargestellt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammensetzung der Liposomenformulierungen.

Liposomenformulierung	S100 (mg)	DOPS (mg)	DOPG (mg)	DSPE-PEG-2000 (PEG) (mg)	SPS (mg)	EPG (mg)
S100	10					
S100 20 % PEG	8			2		
DOPS	7	3				
DOPS 10 % PEG	6	3		1		
DOPS 20 % PEG	5	3		2		
DOPG	7		3			
DOPG 20 % PEG	5		3	2		
SPS	7				3	
EPG	7					3

¹ Ergebnisse dieses Kapitels wurden publiziert in:

Klein, M.E., *et al.* Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) nanodispersions as potential anti-inflammatory therapeutics: Comparison of *in vitro* activity and impact of pegylation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 23, (2020)

Klein, M.E., *et al.* Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) enriched mixed micelles (MM): A new nano-drug delivery system with anti-inflammatory potential?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 152 (2020)

3.2.2 Physikochemische Charakterisierung

3.2.2.1 Lipidfluidität

Phospholipide können in unterschiedlichen lamellaren Phasen vorliegen, zum einen der flüssigkristallinen Phase $L\alpha$, zum anderen der Gel-Phase $L\beta$.¹²⁴ Die Lipidfluidität der Phospholipide ist u.a. abhängig von deren chemischer Struktur und der Umgebungstemperatur. Ungesättigte Phospholipide liegen bei Raumtemperatur in der Phase $L\alpha$ vor. Ihr Phasenübergang ist bei Temperaturen kleiner $0\text{ }^\circ\text{C}$.⁸⁵ Gesättigte Phospholipide hingegen liegen bei Raumtemperatur in der Phase $L\beta$ vor.⁸⁵ Ihr Phasenübergang ist oberhalb $0\text{ }^\circ\text{C}$ und primär abhängig von der Länge der veresterten Acylketten. Für eine mechanische Verkleinerung vesikulärer Strukturen, z.B. mittels Extrusion durch Polycarbonatmembranen definierter Größe, ist es essentiell zu wissen, in welcher lamellaren Phase sich die Phospholipidaggregate befinden, da eine Extrusion nur in der flüssigkristallinen Phase $L\alpha$ möglich ist.^{125–127} Aus diesem Grund wurden die Phasenübergangstemperaturen aller Liposomenformulierungen mittels DSC bestimmt. Die Ergebnisse präsentiert Abbildung 18.

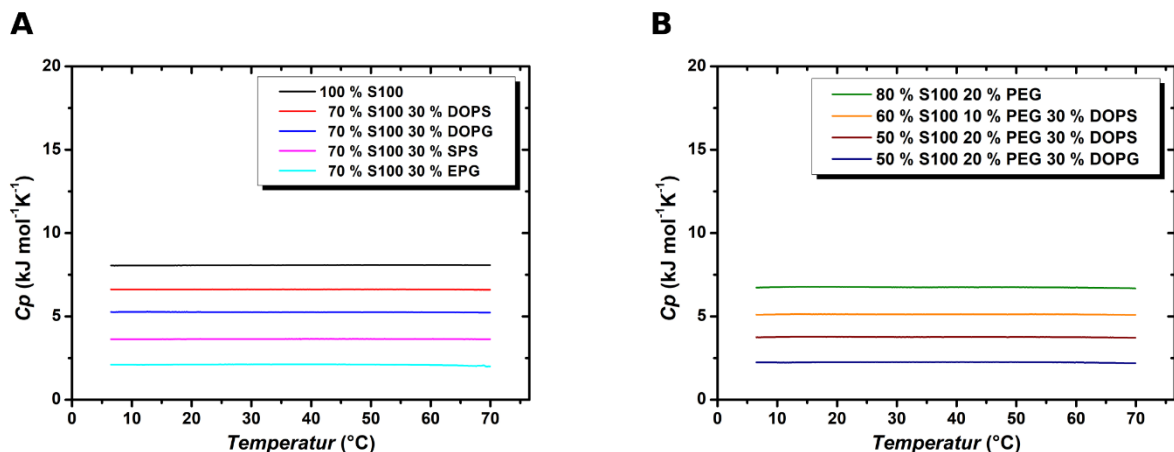


Abbildung 18: Heizkurven der Liposomen, bestimmt mittels DSC.

A) zeigt die konventionellen und B) die ‚stealth‘ Liposomenformulierungen.

Die Kurven sind vertikal verschoben.

In Abbildung 18A sind die DSC-Heizkurven konventioneller Liposomen dargestellt. Im untersuchten Temperaturintervall war kein Phasenübergang zu erkennen, was mit dem ungesättigten Charakter der verwendeten Phospholipide (2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden) zu begründen ist. Die für die konventionellen Liposomen verwendeten Phospholipide befinden sich somit in der flüssigkristallinen Phase $L\alpha$, was eine Extrusion bei Raumtemperatur ermöglicht. In Abbildung 18B sind die DSC-Heizkurven der ‚stealth‘ Liposomen visualisiert. Trotz des Zusatzes von bis zu 20 % gesättigtem DSPE-PEG-2000 (2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden) war auch hier kein Phasenübergang erkennbar. Es ist daher zu vermuten, dass sich die ‚stealth‘ Liposomen ebenfalls vorwiegend in der flüssigkristallinen Phase $L\alpha$ befinden. Eine

Extrusion der ‚*stealth*‘ Liposomen war daher ebenfalls bei Raumtemperatur möglich. Als *Proof-of-Principle* und um festzustellen, ab welcher Konzentration an gesättigtem Phospholipid ein Phasenübergang erkennbar wird, wurden weiterhin Phospholipidmischungen aus DOPS und gesättigtem SPC-3 (2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden) hergestellt und ebenfalls mittels DSC charakterisiert. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (Abbildung A 2). Ab einem Gehalt von 50 % SPC-3 war hier ein Phasenübergang bei 35 °C erkennbar.

Bereits 1990 berichteten Lang *et al.*, dass Phospholipide mit unterschiedlichen Iodzahlen – eine hohe Iodzahl entspricht hierbei einem hohen Gehalt und eine niedrige Iodzahl einem niedrigen Gehalt an Doppelbindungen – in deren Abhängigkeit unterschiedliche Phasenumwandlungen zeigen.¹²⁸ Bei einer hohen Iodzahl war hierbei keine, bei einer niedrigen Iodzahl hingegen war eine klare Phasenumwandlung sichtbar.¹²⁸ Die in Abbildung 18A untersuchten Liposomen enthalten ausschließlich ungesättigte Phospholipide. Dass sie keine Phasenumwandlungen zeigen, stimmt somit mit Lang *et al.* überein. Durch Veränderung des Phospholipid-Mischungsverhältnisses zwischen mischbaren ungesättigten und gesättigten Phospholipiden kann gemäß Vemuri *et al.* gezielt eine spezielle Phasenübergangstemperatur festgelegt werden.⁸⁵ Eine systematische Studie hierzu wurde durch Svetlovics *et al.* 2012 veröffentlicht.¹²⁹ Sie untersuchten die synthetischen Phospholipide 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC, gesättigt) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin (POPC, teilweise ungesättigt) in unterschiedlichen Phospholipid-Mischungsverhältnissen.¹²⁹ Bei einem Mischungsverhältnis von DPPC:POPC (25:75) war kaum ein dem DPPC zuzuordnender Phasenübergang ersichtlich, wohingegen der dem POPC zuzuordnende Phasenübergang ausgeprägt war. Erst bei einem Mischungsverhältnis von DPPC:POPC (50:50) wurde auch der dem DPPC zuzuordnende Phasenübergang erkennbar, wohingegen der für POPC kleiner wurde. Diese Studie bestätigt die Ergebnisse des *Proof-of-Principle* Versuches. Erst ab einem Mischungsverhältnis von 50 % SPC-3 erscheint ein dem SPC-3 zuzuordnender Phasenübergang. Für die ‚*stealth*‘ Liposomen (Abbildung 18B) mit 20 % DSPE-PEG-2000 hingegen konnte kein klarer Phasenübergang im Temperaturintervall von 5 bis 70 °C ermittelt werden. Zusammenfassend liegen alle Liposomen in der flüssigkristallinen Phase L_{α} vor. Dies entspricht dem vordefinierten *Quality Target Product Profile*. Eine Extrusion der Liposomen war daher bei Raumtemperatur möglich.^{125–127}

3.2.2.2 Größe und Größenverteilung

Die Größe und Größenverteilung von Liposomen ist von großer Bedeutung. Einerseits können aufgrund von heterogenen Größenverteilungen Stabilitätsprobleme, z.B. aufgrund von Ostwald-Reifung, auftreten.¹⁰⁶ Zum anderen können Größenschwankungen auch Einflüsse auf biologische Assays *in vitro*¹³⁰ (Phagozytoseaktivität), sowie auf die Biodistribution *in vivo*^{131–133} haben. Viele Studien, die PS-angereicherte Formulierungen untersuchten, haben keine Größe^{45,47–52,54,58,134,135} bzw. breite Größenverteilungen^{33,55–57,119} angegeben. Es war daher unklar, welchen Einfluss die Liposomengröße auf die biologische Aktivität und die *in vivo* Pharmakokinetik hat. Im Kontext einer

späteren parenteralen Applikation war jedoch eine Größe kleiner 1 μm mit enger Größenverteilung wünschenswert, um das Risiko für embolische Ereignisse zu reduzieren.¹³⁶ Alle Liposomen wurden durch Polycarbonatmembranen einer Größe von 100 nm Porendurchmesser extrudiert. Ihre Charakterisierung erfolgte mittels DLS. Die Ergebnisse präsentiert Abbildung 19.

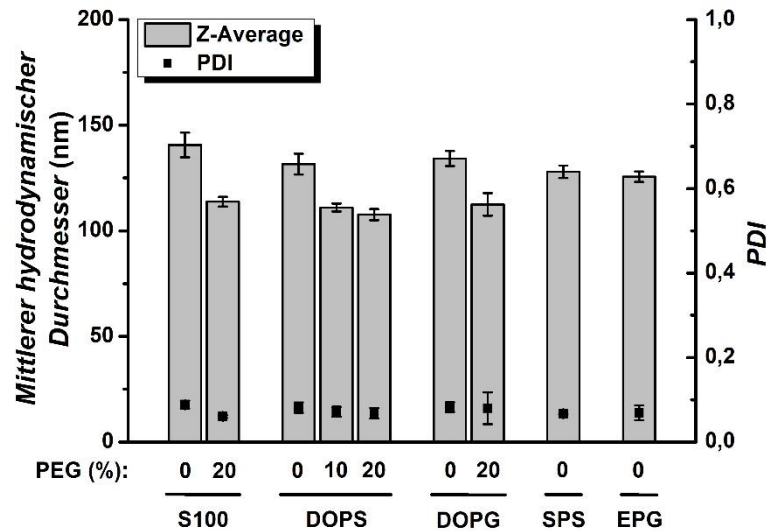


Abbildung 19: Größe und Größenverteilung der Liposomen, bestimmt mittels DLS.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Alle Liposomen besaßen mittlere hydrodynamische Durchmesser von 100 bis 150 nm mit Polydispersitätsindizes von maximal 0,1, was gemäß Bhattacharjee *et al.* einer engen Partikelgrößenverteilung entspricht.¹³⁷ Die Darstellungen intensitätsgewichteter Größenverteilungen repräsentativer Beispiele (Abbildung A 3) sowie Z-Average und PDI DiR-markierter Liposomen (Abbildung A 4) sind im Anhang zu finden. Es zeigten sich monomodale und enge Größenverteilungen. Liposomen im Mikrometerbereich wurden nicht detektiert, was auch die lichtmikroskopische Analytik bestätigt. Das *Quality Target Product Profile* war somit erfüllt.

3.2.2.3 Morphologie

Für die Bestätigung der Größe und Größenverteilung sowie für eine detaillierte Charakterisierung der Morphologie der Liposomen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen kryopräparierter Proben (kryo-TEM) angefertigt. Die (kryo)-TEM bietet hierbei den Vorteil sowohl Größe, Größenverteilung, Morphologie als auch Lamellarität der Liposomen bestimmen zu können.¹³⁸ Trotz des großen präparativen Aufwands wird die kryo-TEM u.a. auch in der Routine für die Freigabe von Liposomenchargen verwendet. Einerseits werden hier besondere Morphologien, wie z.B. oligolamellare Strukturen untersucht, die einen Einfluss auf die Wirkstofffreigabe haben können.¹³⁹ Zum Anderen wird die kryo-TEM auch für das Visualisieren von Wirkstoffkristallen im Rahmen der Freigabe genutzt.^{89,140} Nachfolgend wurden die Liposomen mittels kryo-TEM untersucht. Entsprechende Darstellungen sind in Abbildung 20 zusammengefasst.

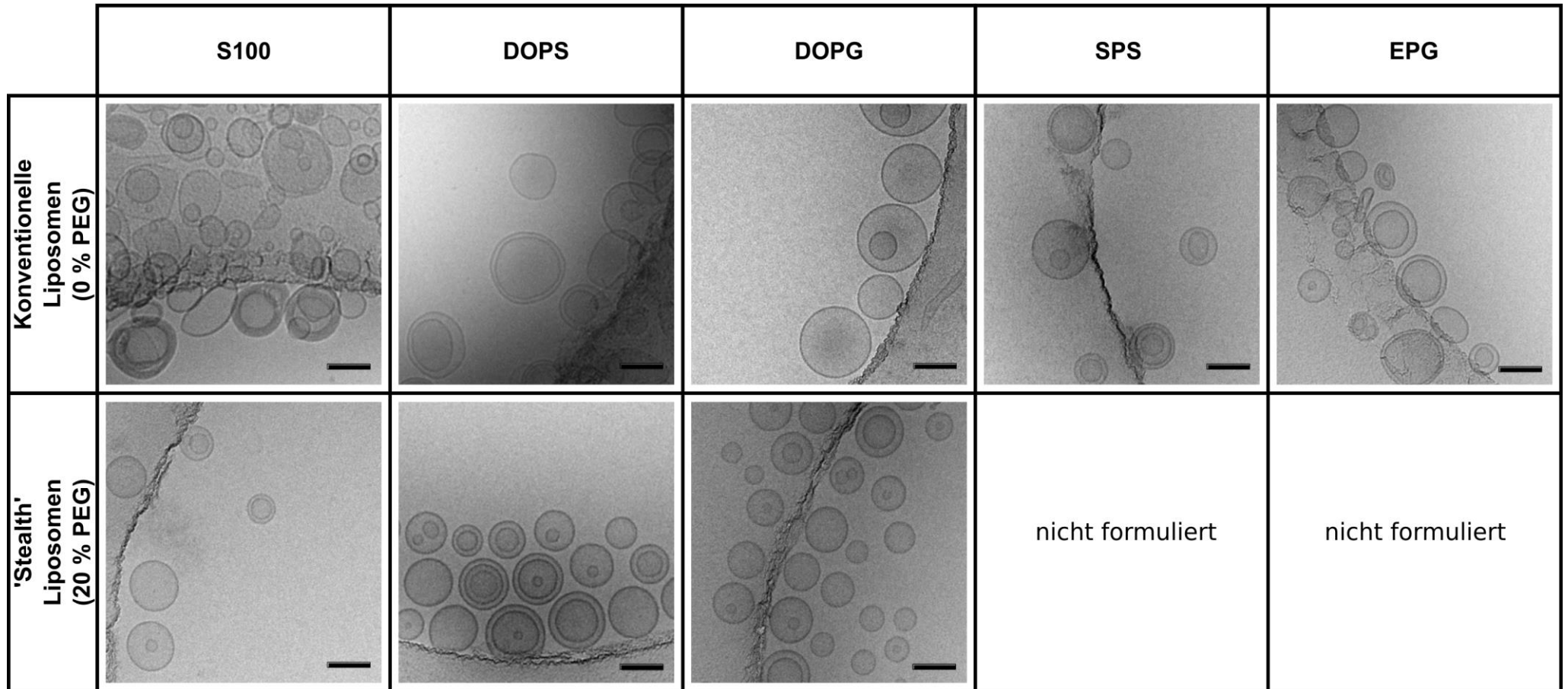


Abbildung 20: Morphologie, Größe und Größenverteilung der Liposomen, bestimmt mittels kryo-TEM.

Die Maßstabsskala zeigt eine Länge von 100 nm.

Für DOPS und DOPG konnte eine hohe Anzahl an uni- sowie wenige bi- und oligolamellare Vesikel mit runder Form dargestellt werden (Abbildung 20). Die Vesikel der natürlichen Phospholipide S100, SPS und EPG zeigten hingegen eine heterogenere Größe und Form (Abbildung 20). Dies ist wahrscheinlich auf den hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den natürlichen Phospholipiden (2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden) zurückzuführen. Im Vergleich zu den synthetischen Phospholipiden enthalten S100, SPS und EPG hohe Anteile mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure, die dazu führen, dass die Phospholipide gemäß Evans *et al.* „schlaffe“ vesikuläre Strukturen bilden.¹⁴¹ Hingegen zeigt der Zusatz von DSPE-PEG-2000 in den ‚stealth‘ Liposomen vorwiegend homogene Vesikel mit vergleichbarer Größe, Größenverteilung und Morphologie. Der Zusatz gesättigter Fettsäuren, wie sie im DSPE-PEG-2000 vorkommen, scheint hier die Phospholipiddoppelschicht zu stabilisieren und zu „starreren“ vesikulären Strukturen zu führen.¹⁴¹ Die Größen und Größenverteilungen der untersuchten Liposomen waren mit den Daten der DLS (3.2.2.2 Größe und Größenverteilung) vergleichbar. Es wurden Liposomen definierter Größe, enger Größenverteilung und homogener Morphologie hergestellt, die eine Größe kleiner 1 µm besitzen. Sie sind somit für die parenterale Applikation geeignet und entsprechen dem *Quality Target Product Profile*.

3.2.2.4 Oberflächenladung

Die Oberflächenladung der Liposomen wurde als weiterer Parameter des *Quality Target Product Profiles* untersucht. Sie ist ein kritischer Parameter u.a. bei Stabilitätsuntersuchungen, da in Abhängigkeit des Oberflächenpotentials Aggregation und Fusion der Liposomen zu Stabilitätsproblemen führen können.¹⁰⁶ Darüber hinaus besteht ein Einfluss auf biologische Charakteristika. Je nach Ladung und Chemie der Kopfgruppe kann die Aufnahme der Liposomen durch Zellen variieren und somit u.a. auch die Biodistribution beeinflussen.^{89,90,142} Darüber hinaus bietet die Bestimmung des Oberflächenpotentials auch die Möglichkeit der Identifizierung der Liposomen. Es gibt sowohl qualitativ als auch quantitativ einen Anhaltspunkt, welche Phospholipide (neutral, positiv, negativ) in welcher Konzentration in der Phospholipiddoppelschicht enthalten sind.¹⁴³ Die Bestimmung des Zetapotentials erfolgte in zwei unterschiedlichen isoosmotischen Dispersionsmedien (isotone Kochsalzlösung und Glucoselösung). Dies diente dazu, auch den Einfluss der Ionenstärke, z.B. im Rahmen der Verdünnung der Liposomen während der Applikation, zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. In Abhängigkeit des Dispersionsmediums wurden unterschiedliche Zetapotenziale erhalten. In isotoner Kochsalzlösung waren sie weniger negativ als in Glucoselösung. Dies ist auf die unterschiedliche Ionenleitfähigkeit der Dispersionsmedien zurückzuführen. Isotone Kochsalzlösung besitzt eine hohe Ionenleitfähigkeit (gemessen: 16 – 20 mS/cm), Glucoselösung hingegen eine niedrige Ionenleitfähigkeit (gemessen: 1,7 – 2,1 mS/cm). Daraus schlussfolgernd sind Unterschiede in der Dicke der elektrischen Doppelschicht der Liposomen zu erwarten.

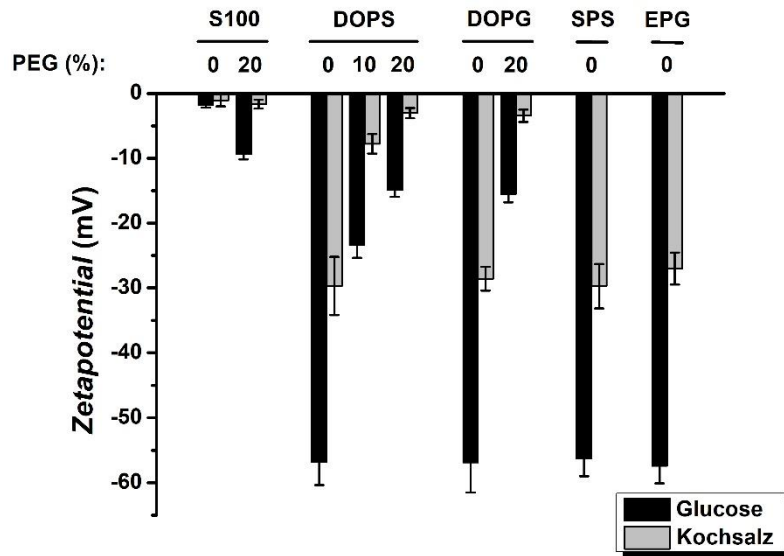


Abbildung 21: Zetapotential der Liposomen, bestimmt mittels ELS.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

In Dispersionsmedien mit hoher Ionenleitfähigkeit ist die diffuse Doppelschicht dünner als in Dispersionsmedien mit niedriger Ionenleitfähigkeit, wo sie dicker ist. Daraus resultiert, dass der Betrag des Zetapotentials bei hoher Leitfähigkeit geringer ist als bei niedriger Ionenleitfähigkeit. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es essentiell, die Zetapotentiale immer im Kontext ihrer Dispersionsmedien zu betrachten. Eine detaillierte Beschreibung dieses Phänomens erfolgte u.a. durch Grit und Crommelin, welche teilweise gesättigtes EPC mit EPG verglichen.¹⁴⁴ In Abhängigkeit der Ionenstärke des Dispersionsmediums veränderte sich das Zetapotential analog der auch hier erhaltenen Ergebnisse.

Weiterhin zeigten die einzelnen Liposomenformulierungen in Abhängigkeit der verwendeten Phospholipide unterschiedliche Zetapotentiale. Für S100 wurden Werte nahe 0 mV gemessen (Abbildung 21). Der Zusatz von anionischem Phospholipid (PS, PG) führte zu einem betragsmäßigen Anstieg des Zetapotentials. Es wurden negative Zetapotentiale bestimmt (Abbildung 21). Da der Anteil beider anionischer Phospholipide gleich war – er betrug jeweils 30 % (m/V) – waren auch die Zetapotentiale miteinander vergleichbar. Ebenfalls gab es keine Unterschiede zwischen den Zetapotentialen von DOPS, DOPG, SPS und EPG. Die Zetapotentiale waren vergleichbar, ein Einfluss der Phospholipidderivate besteht somit nicht (Abbildung 21). Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Markones *et al.*¹⁴³ und Rahnfeld *et al.*¹⁴⁵ überein. Beide veranschaulichten, dass ein Zusatz von negativ geladenem Phospholipid bei physiologischem pH-Wert zu negativen Zetapotentialen führt und dass es eine Abhängigkeit des gemessenen Zetapotentials vom Dispersionsmedium gibt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Literaturdaten Zetapotentiale anionischer Liposomen.

Quelle	Molare Anteil an negativ geladenem Phospholipid (%)	Zetapotential (mV)	Dispersionsmedium
Markones ¹⁴³	25	-25 bis -27	10 mM TRIS Puffer, pH = 7,4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA
Rahnfeld ¹⁴⁵	25	-40 bis -50	20 mM HEPES Puffer, pH = 7,4

Der Unterschied in den Absolutwerten der Zetapotentiale beider Arbeitsgruppen ist auf das verwendete Dispersionsmedium zurückzuführen (Tabelle 13). Sowohl HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure] als auch TRIS [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] sind Puffersubstanzen in der Zellkultur. Der Zusatz von 100 mM Kochsalz bei Markones *et al.*¹⁴³ allerdings lässt schließen, dass in diesem Dispersionsmedium im Vergleich zu Rahnfeld *et al.*¹⁴⁵ eine höhere Ionenleitfähigkeit vorhanden war, was das vom Betrag her kleinere Zetapotential erklärt.

Der Zusatz von DSPE-PEG-2000 in den ‚*stealth*‘ Liposomen mit anionischen Phospholipiden führte zu einem betragsmäßigen Abfall des Zetapotentials (Abbildung 21). Für DOPS 10 % PEG war das Zetapotential vom Betrag her größer als für DOPS 20 % PEG. Eine Konzentrationsabhängigkeit zwischen DSPE-PEG-2000-Gehalt und Zetapotential konnte hier am Beispiel von DOPS nachgewiesen werden. Zwischen DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG waren die Zetapotentiale vergleichbar. Dass der Zusatz von DSPE-PEG-2000 einen Einfluss auf das Zetapotential hat, erklärt Barenholz durch den Abschirmungseffekt der PEG-Ketten.⁸⁹ So formuliert er, dass ein Zusatz von DSPE-PEG-2000 zu konventionellen Liposomen die Phospholipid-doppelschicht überzieht und dass sich deswegen sowohl das Stern-Potential als auch die diffuse Doppelschicht von der Phospholipidkopfgruppe entfernen und daraus resultierend das Zetapotential vom Betrag her kleiner wird.⁸⁹ Er betont jedoch, dass die PEG-Ketten mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf das Oberflächen- oder Nernst-Potential haben und dass dieses somit vermutlich vergleichbar dem konventioneller Liposomen ist.⁸⁹ Es handelt sich also lediglich um eine Abschirmung der Ladung, sie ist trotzdem weiterhin existent. Für S100 20 % PEG stieg das Zetapotential vom Betrag im Vergleich zu den S100 Liposomen leicht. Dies kann gemäß Barenholz z.B. durch den Phospholipidrest im PEG verursacht sein.⁸⁹ Alle Liposomen wiesen negative bis neutrale Zetapotentiale auf. Sie entsprechen somit dem *Quality Target Product Profile*.

3.2.3 Stabilitätsuntersuchungen

3.2.3.1 Chemische Stabilität

Im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen wurden die Stabilität der Liposomen bei einer Lagerung bei 8 °C und vor Licht geschützt über 28 Tage untersucht. Speziell für die konventionellen Liposomen erfolgte sowohl eine chemische (NP-HPLC) als auch physikochemische (DLS, ELS) Analytik. Für die ‚*stealth*‘ Liposomen wurde nur die physikochemische Charakterisierung (DLS, ELS) durchgeführt. Aufgrund des höheren Anteils ungesättigter Fettsäuren waren die

konventionellen Liposomen gegenüber chemischem Abbau als anfälliger bewertet, als die, auch gesättigte Phospholipide enthaltenden, ‚stealth‘ Liposomen. Die chemischen Stabilitätsdaten der konventionellen Liposomen präsentiert Abbildung 22.

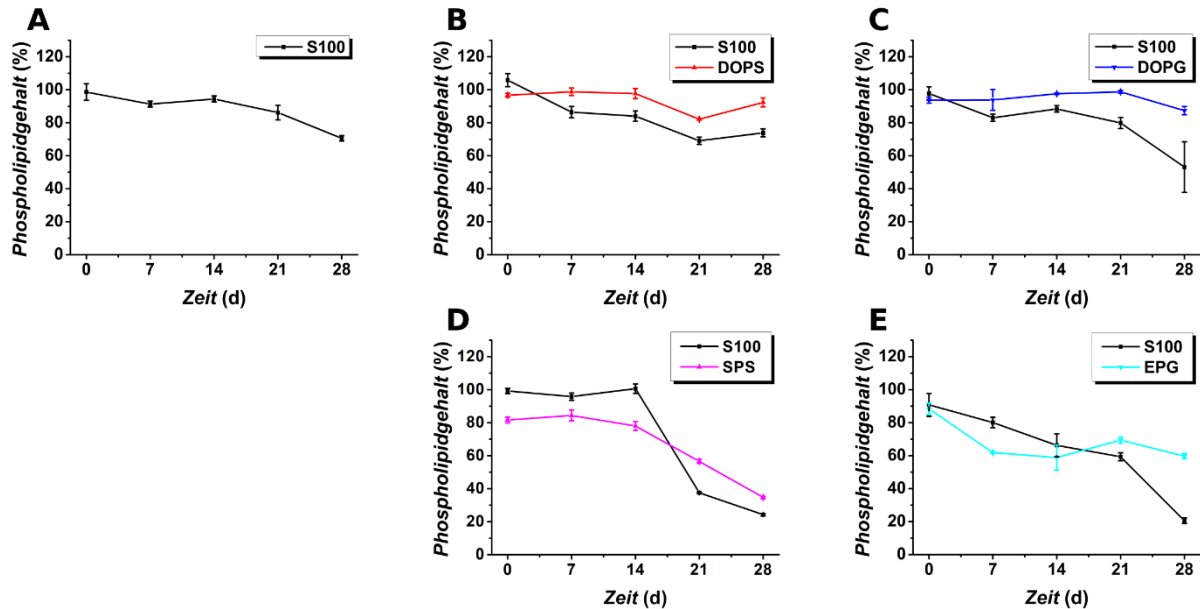


Abbildung 22: Chemische Stabilität konventioneller Liposomen, bestimmt mittels NP-HPLC.

Die Dauer der Stabilitätsuntersuchung betrug 28 Tage, die Lagerung erfolgte bei 8 °C vor Licht geschützt. A) zeigt S100, B) DOPS, C) DOPG, D) SPS und E) EPG Liposomen. Die Relativwerte sind bezogen auf den Sollgehalt des jeweiligen Phospholipids.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

S100 zeigte über den Untersuchungszeitraum von 28 Tagen eine Reduktion des Gehalts von anfänglich 100 % auf 70 % (Abbildung 22A). Hingegen wurde für DOPS (Abbildung 22B) und DOPG (Abbildung 22C) lediglich eine Reduktion der Gehalte um ca. 10 % festgestellt. SPS (Abbildung 22D) und EPG (Abbildung 22E) zeigten analog dem S100 einen schnelleren Abbau. Hier sind nach Beendigung der Stabilitätsuntersuchungen noch ca. 40-60 % vorhanden. Mit anderen Phospholipiden kombiniert wurde auch für S100 ein schnellerer Abbau ermittelt (Abbildung 22B, C, D, E). So war in den Formulierungen mit SPS bzw. EPG nach Beendigung der Stabilitätsuntersuchung lediglich noch ca. 30 % S100 detektierbar.

Als chemische Abbauprozesse sind Oxidation und Hydrolyse in Betracht zu ziehen. Bereits 1990 untersuchten Lang und Martin das Oxidationsverhalten von partiell gesättigten Phosphatidylcholinen.¹²⁸ Sie veranschaulichten eindrücklich, dass mit steigender Anzahl und steigendem Grad an ungesättigten Fettsäuren das Risiko für eine Oxidation zunimmt. Auch Grit und Crommelin untersuchten Oxidationsprozesse an Phospholipiden und schlussfolgerten, dass eine Oxidation vorwiegend an ungesättigten Phospholipiden stattfindet.¹⁴⁶ Weiterhin beschrieben sie sehr ausführlich Einflussfaktoren auf die Hydrolyse von Phosphatidylcholinen.¹⁴⁶ Sie gingen hierbei auf Parameter wie den pH-Wert, die Temperatur, die Ionenstärke, die

Liposomenformulierung (Sättigungsgrad der Fettsäuren, Art der Kopfgruppe) sowie das Aggregationsverhalten der Liposomen ein.¹⁴⁶ Hierbei erstellten sie potentielle Abbauschemata für Phosphatidylcholin und identifizierten Lyso-Phosphatidylcholin als Reaktionszwischenprodukt, welches weiter zu Glycerophosphocholin (GPC) und Glycerophosphorsäure abgebaut werden kann. Eine Spaltung der Phospholipidkopfgruppe und das Entstehen von Phosphorsäure (PA) bewerteten sie als einen sehr langsamen Hydrolyseprozess, welcher unter entsprechend pharmazeutisch relevanten Lagerungsbedingungen zu vernachlässigen ist.

Sie veranschaulichten eindrücklich, dass die Hydrolyserate von gesättigtem Soja-Phosphatidylcholin einen V-förmigen Verlauf mit einem Minimum bei pH 6,5 hat.¹⁴⁶ Weitere Phospholipide, wie das synthetische 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC), natürliches Soja-Phosphatidylcholin sowie teilweise gesättigtes Ei-Phosphatidylcholin zeigten vergleichbare Ergebnisse. Hingegen diskutierten die Autoren im Rahmen einer weiteren Veröffentlichung, dass der Zusatz von geladenem Phospholipid, in dem Fall EPG, zu einer Verschiebung der V-förmigen Kurve in den alkalischen Bereich führte, das Minimum der Hydrolyserate hier also in Abhängigkeit der Konzentration des EPG $>$ pH 6,5 war.¹⁴⁴ Die Autoren begründeten dies damit, dass aufgrund der Ladung der EPG-haltigen Liposomen der Oberflächen-pH-Wert der Vesikel ein anderer ist, als im Dispersionsmedium, da u.a. Protonen mit den anionischen Phospholipiden in Wechselwirkung treten.¹⁴⁴ Die Autoren schlussfolgerten, dass aufgrund der Verschiebung der V-förmigen Kurve zu höheren pH-Werten ein Zusatz von geladenem Phospholipid für Wirkstoffe sinnvoll ist, deren Stabilitätsmaximum im leicht alkalischen Bereich liegt.¹⁴⁴ Im Säuren hingegen erwarteten sie, dass die Hydrolyserate EPG-haltiger Liposomen höher ist als für EPC-haltige Liposomen. Dies konnten sie experimentell bestätigen.^{144,146} Bei den hier vorliegenden Stabilitätsdaten konventioneller Liposomen, die in isotoner Kochsalzlösung mit pH 6,5 hergestellt waren, war der Abbau von S100 dominant. Vor allem DOPS und DOPG zeigten Stabilität. SPS und EPG hingegen wurden ebenfalls schnell abgebaut. Die Ergebnisse von Grit und Crommelin wurden somit nicht vollständig bestätigt.

Weiterhin diskutierten die Autoren den Einfluss des Sättigungsgrades der Phospholipide auf die Hydrolyseraten und identifizierten diese als mögliche Ursache für verschiedenen Werte.¹⁴⁴ Im Rahmen der eigenen Stabilitätsuntersuchungen konnte besonders für SPS und EPG ein höherer Abbau als für DOPS und DOPG ermittelt werden. Ein Einfluss des Sättigungsgrades der Phospholipide erscheint hier wahrscheinlich.

Außerdem diskutierten Grit und Crommelin den Parameter Temperatur. Sie stellten fest, dass die Hydrolyserate von Phospholipiden einer Arrhenius-Kinetik unterliegt.¹⁴⁷ Bei einer Erhöhung der Temperatur stieg auch die Hydrolyserate der Phospholipide an, einer halblogarithmisch linearen Gesetzmäßigkeit folgend.¹⁴⁷ Im Falle der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurde die Lagerungstemperatur mit 8 °C konstant gewählt, sodass die Temperatur als möglicher Einflussfaktor für chemische Abbauprozesse als vernachlässigbar anzusehen ist. Bei dieser

niedrigen Temperatur ist eine geringere Hydrolyserate zu erwarten, als bei den unter Stressbedingungen (70 °C) aufgenommenen Daten von Grit und Crommelin.^{147,148}

Weiterführend untersuchten die Autoren die Ionenstärke des Dispersionsmediums. Sie veranschaulichten, dass für PC-haltige Liposomen, aufgrund der neutralen Oberflächenladung, kein nennenswerter Einfluss auf die chemische Stabilität besteht.^{146,148} Für geladene Oberflächen hingegen, wie sie in den EPG-haltigen Liposomen vorliegen, war ein Einfluss der Ionenstärke auf die Hydrolyserate erkennbar.¹⁴⁴ Hier zeigte sich, dass die Hydrolyserate für EPG-haltige Liposomen in einem Dispersionsmedium niedriger Ionenstärke im Vergleich zu EPC-haltigen Liposomen zunahm.¹⁴⁴ Grit und Crommelin erklären dieses Phänomen ebenfalls mit der bereits erwähnten Oberflächen-pH-Wert-Verschiebung EPG-haltiger Liposomen.¹⁴⁴ Diese ist ihrer Meinung nach in Dispersionsmedien niedrigerer Ionenstärke größer, als in Dispersionsmedien hoher Ionenstärke, sodass hier ein Einfluss des Dispersionsmediums vorhanden ist.¹⁴⁴ Die im Rahmen eigener Stabilitätsstudien untersuchten Liposomenformulierungen wurden alle in isotoner Kochsalzlösung, einem Dispersionsmedium hoher Ionenstärke, hergestellt und gelagert. Eine beschleunigte Hydrolyse geladener Phospholipide wurde nicht festgestellt und ist im Kontext der Ergebnisse von Grit und Crommelin als wenig wahrscheinlich zu betrachten.¹⁴⁴

Als letzten potentiellen Einflussfaktor diskutierten Grit und Crommelin das Aggregationsverhalten der Phospholipide.¹⁴⁶ Sie analysierten hierbei eine Studie von Kepsil und Dennis, welche das Hydrolyseverhalten von Phospholipiden im basischen Milieu in Abhängigkeit vom Aggregationsverhalten untersuchte.¹⁴⁹ Kepsil und Dennis konnten zeigen, dass Liposomenformulierungen eine 10- bis 20-fach geringere Hydrolyserate aufweisen, als die entsprechenden Mischmizellenformulierungen. Ein Vergleich zu in dieser Arbeit hergestellten Mischmizellen erfolgt im Kapitel Mischmizellen (3.3.3.1 Chemische Stabilität).

Zusammenfassend lässt sich die Abnahme des Phospholipidgehaltes durch Oxidation und Hydrolyse erklären. Gemäß Samuni und Barenholz tritt zuerst die Oxidation ein, hier vor allem von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wohingegen eine Hydrolyse zu einem späteren Zeitpunkt beginnt.¹⁵⁰ Die Einflussfaktoren pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, Liposomenzusammensetzung (Sättigungsgrad der Fettsäuren, Art der Kopfgruppe) sowie Aggregationsverhalten auf hydrolytische Prozesse wurden diskutiert. Zu vermuten ist, dass der Sättigungsgrad der Fettsäuren, die Art der Kopfgruppe sowie der pH-Wert die größten Einflüsse auf die Hydrolyserate haben. Temperatur und Ionenstärke waren über die Zeit konstant. Aggregationen sind nicht aufgetreten. Für eine weiterführende Charakterisierung wären z.B. Elektron-Spin-Resonanz-(ESR)-Studien denkbar. Hier können z.B. Sauerstoffverbrauch¹⁵¹ sowie Mikro-pH-Werte¹⁵² der Phospholipiddoppelschichten untersucht werden. Erste eigene Vorstudien bestätigen, dass bereits nach wenigen Tagen Oxidationsprozesse beginnen. Ausführliche Untersuchungen sind jedoch ausstehend. Eine Hydrolyse hingegen lässt sich in der NP-HPLC nachvollziehen, da Lyso-Phospholipide mit anderen Retentionszeiten eluieren, als deren Phospholipidanaloga.

Signifikante Peaks waren für S100 nach 28 Tagen Lagerung zu erkennen. Es war daher zu vermuten, dass das S100 zu einem großen Teil zu Lyso-Phosphatidylcholin abgebaut wird. Jedoch wurde auf eine Quantifizierung des Lyso-Phosphatidylcholins aufgrund seines Charakters als Reaktionszwischenprodukt verzichtet.

3.2.3.2 Physikochemische Stabilität

Die physikochemische Analytik aller Liposomen zeigte über den Untersuchungszeitraum weder eine Veränderung in der Größe oder Größenverteilung (Tabelle A 2), noch im Zetapotential (Tabelle A 3). Ein etwaiger Anteil an Oxidations- bzw. Hydrolyseprodukten erscheint über die Dauer von 28 Tagen noch nicht so groß zu sein, als dass die Integrität der Liposomen beeinflusst wäre. Grit und Crommelin unterteilten die physikochemischen Instabilitäten in a) eine Änderung der Größe und Größenverteilung z.B. durch Aggregation oder Fusion, sowie in b) den Verlust eingeschlossenen Wirkstoffs aufgrund von Undichtigkeiten der Liposomen.¹⁴⁶ Eine Veränderung der Größe oder Größenverteilung, z.B. aufgrund von Ostwald-Reifung, wurde über den Untersuchungszeitraum nicht festgestellt.^{106,153} Darüber hinaus konnte keine Erhöhung der Permeabilität der liposomalen Strukturen aufgrund des chemischen Abbaus der Phospholipide verzeichnet werden. Sowohl eine Oxidation ungesättigter Fettsäuren im Phospholipid als auch die Hydrolyse von Phospholipiden zu Lyso-Phospholipiden und freien Fettsäuren können die Permeabilität der Liposomenmembranen erhöhen.¹⁴⁶ Hohe Konzentrationen an Lyso-Produkten können, in der Theorie, sogar zu einer Umwandlung in mischmizellare Systeme führen.¹⁴⁶ Wobei hier, gemäß eigener Studien, für die Solubilisierung von ungesättigten Phospholipiden Konzentrationen von über 80 % Lyso-Phosphatidylcholin notwendig waren (Abbildung A 5). Gemäß Grit und Crommelin scheinen sich die Eigenschaften der Lyso-Produkte und freien Fettsäuren bis zu einer Hydrolyse von 10 % aufzuheben, sodass keine erhöhte Permeabilität der Phospholipiddoppelschicht zu detektieren ist.¹⁴⁶ Erst bei höheren Konzentrationen können Permeabilitätssteigerungen verzeichnet werden.

Potentielle Einflüsse auf das Zetapotential sind durch chemischen Abbau von Phospholipiden gemäß Grit und Crommelin gering.¹⁴⁶ Weder Oxidation noch hydrolytische Spaltung von Fettsäureestern beeinflussen die Phospholipidkopfgruppe, deren Ladung für das Entstehen einer Oberflächenladung bzw. eines Zetapotentials verantwortlich ist. Eine Spaltung der Phospholipidkopfgruppe und das Entstehen von PA bewerteten Grit und Crommelin als einen sehr langsamen Hydrolyseprozess, welcher unter entsprechend pharmazeutisch relevanten Lagerungsbedingungen zu vernachlässigen ist.¹⁴⁶ Potentielle Zetapotentialänderungen sind eher auf pH-Wert-Änderungen bzw. Änderungen der Ionenstärke des Dispersionsmediums zurückzuführen. Durch Hydrolyse entstandene freie Fettsäuren könnten bei nicht physiologischen pH-Werten, wenn sie also vorwiegend protoniert (saurer Bereich) oder deprotoniert (basischer Bereich) vorliegen, Einfluss auf das Zetapotential nehmen. Da der pK_s-Wert langkettiger Fettsäuren in Dispersionsmedium höherer Ionenstärke (z. B. Zusatz von 0,1 M monovalenter Salzlösung) bei ca.

7,3 liegt¹⁵⁴, ist gemäß der Gleichung nach Henderson-Hasselbalch bei pH 6,5 lediglich ein ca. 6-facher Überschuss protonierter Fettsäuren zu erwarten. Ein Einfluss der freien Fettsäuren auf das Zetapotential scheint daher gering. Er kann aber dominant werden, wenn der pH-Wert des Dispersionsmediums über die Lagerzeit sinkt und somit die saure Hydrolyse fördert. Dann kann ein starker Überschuss protonierter Fettsäuren vorliegen, welcher einen Einfluss auf das Zetapotential hat. Die hier untersuchten Liposomen zeigten jedoch keine Änderung des Zetapotentials über die Lagerzeit von 28 Tagen (Tabelle A 3), sodass eine vermehrte Hydrolyse wenig wahrscheinlich ist.

Zusammenfassend sind alle untersuchten Liposomen als physikochemisch stabil zu bewerten, wobei erste chemische Abbauprozesse in den Liposomen, vor allem bestehend aus natürlichen, mehrfach ungesättigten Phospholipiden, zu verzeichnen waren. Für eine weitere Optimierung der Liposomen sind umfassende Stabilitätsuntersuchungen, z.B. mittels ESR, sinnvoll. Für biologische Untersuchungen wurden nur frisch hergestellte Liposomen verwendet.

3.2.4 Biologische Charakterisierung *in vitro*

3.2.4.1 Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität wurde zu großen Teilen durch Frau M.Sc. Martínez (Biochemie) durchgeführt. Die Ergebnisse der synthetischen konventionellen und ‚stealth‘ Liposomen sind mit ihrer Genehmigung in dieser Arbeit abgebildet.¹⁰⁸ Die Untersuchung der natürlichen konventionellen Liposomen wurde in eigenen Studien durchgeführt.

Die Bestimmung der Zellviabilität gibt Auskunft, wie metabolisch aktiv Zellen nach Zusatz von nanoskaligen Formulierungen sind.¹⁵⁵ Hierbei können u.a. die mitochondriale Aktivität¹⁵⁵, die LDH-Freisetzung¹⁵⁵, oder durch NADP bzw. NADPH vermittelte Redoxreaktionen¹⁵⁶ als Surrogat Anwendung finden. Für die Untersuchung der Zellviabilität im Rahmen dieser Arbeit wurde das Resazurin-Assay angewandt. Dieses beruht auf einer NADP bzw. NADPH vermittelten Redoxreaktion des Resazurin in das fluoreszierende Produkt Resorufin. Die Fluoreszenz des Resorufins wurde hierbei spektralfluorometrisch quantifiziert.¹⁵⁶ Als Zelllinien fanden nicht artifizielle Fibroblasten-Zelllinien, die murine 3T3 und die humane NHDF Zelllinie, Verwendung. Dies hatte den Vorteil, die Zellviabilität für zwei Spezies testen zu können. Fibroblasten eigneten sich als Zelltyp, da sie ein Hauptbestandteil des Bindegewebes sind, bei parenteraler Applikation mit den nanoskaligen Formulierungen in Kontakt kommen und sensitiv auf Toxizität reagieren.¹¹⁹ Für beide Zelllinien wurde die Lebensfähigkeit der Zellen nach Zugabe der Liposomen für drei unterschiedliche Inkubationszeiten (4, 24, 96 Stunden) bestimmt. Für die Auswahl der Maximalkonzentration von 100 µg/ml Liposomen diente die Arbeit von Harel-Adar *et al.* als Referenz.³³ Die Ergebnisse für die 24 Stunden Inkubation sind in Abbildung 23 dargestellt.

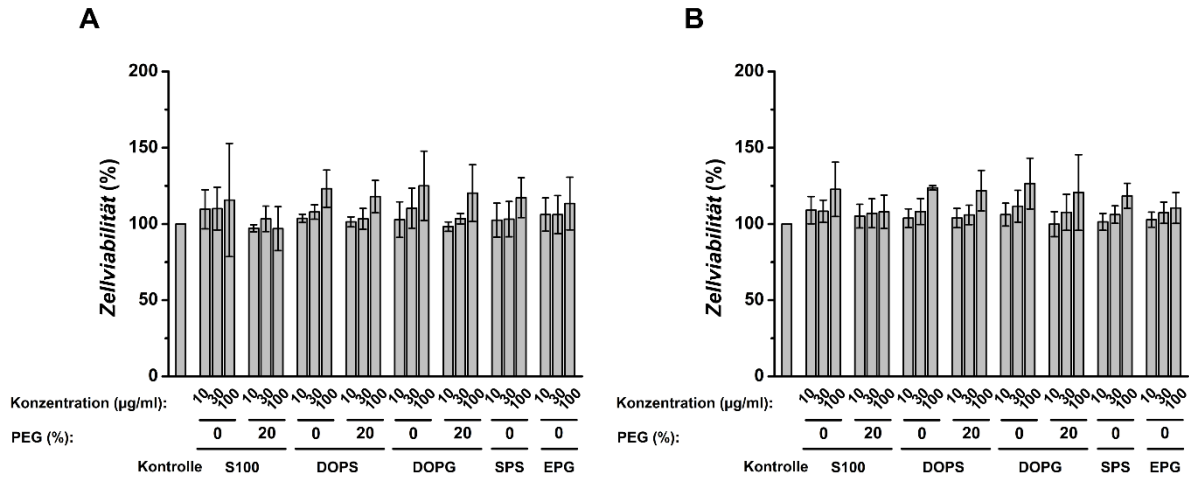


Abbildung 23: Zellviabilität der Liposomen auf Fibroblasten-Zelllinien, bestimmt mittels Resazurin-Assay.

Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. A) zeigt die Zellviabilität von murinen 3T3 und B) die von humanen NHDF Zellen. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der unbehandelten Kontrolle $\leq 15\%$ war.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen Zellviabilitäten, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Für keine der untersuchten Liposomenformulierung wurde eine Reduktion der Zellviabilität festgestellt (Abbildung 23). Hingegen zeigte sich eine leichte Zunahme des Fluoreszenzsignals über das der unbehandelten Kontrolle. Eine mögliche Ursache kann eine leichte Phagozytoseaktivität der Fibroblasten sein, wie sie bei Gauthier *et al.* beschrieben ist.¹¹⁹ Eine Zytotoxizität ist hingegen bei den hier untersuchten Liposomenkonzentrationen wenig wahrscheinlich. Auch für die weiteren Inkubationszeitpunkte 4 und 96 Stunden konnten vergleichbare Ergebnisse erhalten werden (Abbildung A 6). Reine Phospholipidformulierungen, hier in Form von Liposomen, besitzen allgemein eine geringe Zelltoxizität. Aufgrund ihres endogenen Charakters werden Phospholipide als biokompatibel und bioabbaubar, mit geringer Toxizität, angesehen.¹⁵⁷ Jedoch sind Studien, die reine Phospholipidformulierungen ohne Wirkstoff betrachten, selten.¹⁵⁷ Parnham und Wetzig beschrieben die große Sicherheit reiner Phospholipidformulierungen für die parenterale Applikation.¹⁵⁸ Jedoch wiesen sie gleichzeitig darauf hin, dass nach Modifikation (z.B. als ‚stealth‘ Liposomen) weitere Toxizitätsstudien durchzuführen sind, da hier ein Risiko gesteigerter Toxizität besteht.¹⁵⁸ Ein aktueller Vergleich von Phospholipidformulierungen (Liposomen, Emulsionen und wässrige Lecithindispersionen) aus 2019 bestätigt die hohe Sicherheit.¹⁵⁹ In den untersuchten Konzentrationen wies keine der konventionellen und ‚stealth‘ Liposomenformulierungen Zelltoxizität auf.

3.2.4.2 Hämolyse

Die Bestimmung der Hämolyseeigenschaften diente dazu, das Risiko einer Erythrolyse nach Kontakt mit nanoskaligen Formulierungen abzuschätzen.¹⁶⁰ Der Vorteil hierbei ist, dass die Probe direkt in Kontakt mit den RBC kommt und somit eine Lyse durch Freiwerden von Hämoglobin erkennbar wird.¹⁶⁰

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane RBC mit Liposomen einer Konzentration von 100 µg/ml (3.2.4.1 Zellviabilität) untersucht. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

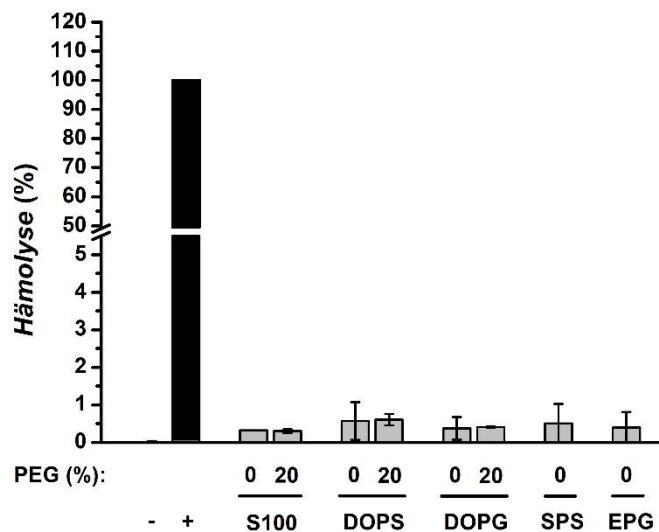


Abbildung 24: Hämolyseaktivität der Liposomen, bestimmt auf RBC.

Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Für die Negativkontrolle (-) wurde PBS, für die Positivkontrolle (2 % SDS) verwendet. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der Positivkontrolle ≤ 25 % war.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Hämolyse in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Alle Formulierungen konnten als nicht hämolytisch (< 2 % Hämolyse, gemäß ASTM F756¹⁰⁹) klassifiziert werden.^{113,114} Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Wang *et al.*, die bei der Untersuchung Curcumin-beladener, PS-haltiger *Nano Lipid Carrier* ebenfalls keine hämolytische Aktivität feststellen konnten.¹⁶¹ Es ist zu vermuten, dass Phospholipide, als endogene Substanzen, nicht hämolytisch wirken. In der Literatur ist sogar das Gegenteil beschrieben, dass Phospholipide in der Lage sind, das hämolytische Potential von Gallensalzen zu reduzieren, also protektiv zu wirken.¹⁵⁷ Eine entsprechende Studie dazu wurde im Rahmen der Charakterisierung der Misch Mizellen durchgeführt (3.3.4.2 Hämolyse). Für eine *i.v.* Applikation in der Maus liegen keine Hämolyse Daten vor. Da jedoch bereits PS-haltige Liposomen in dieser Konzentration *in vivo* in der Ratte getestet waren³³ und Ratten RBC darüber hinaus ähnliche Hämolyseeigenschaften aufweisen wie Maus RBC,¹⁶² wird das Hämolyserisiko auch für die Maus als gering bewertet.

3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen

Weitere *in vitro* Zellkulturen untersuchten die Phagozytoseaktivität sowie die immunmodulierenden Eigenschaften der Liposomen an mIFN- γ /LPS stimulierten MPM. Die MPM wurden aus dem Peritoneum gesunder Mäuse gewonnen. Anders als bei Harel-Adar *et al.* waren die Mäuse hierbei nicht mit Natriumthioglycolat vorbehandelt.³³ Natriumthioglycolat- oder LPS-Gaben in das Mausperitoneum führen zu einer lokalen Entzündungsreaktion, wodurch Monozyten bzw. Makrophagen *in vivo* in das Peritoneum einwandern und sich bereits in Richtung eines proinflammatorischen Phänotypes differenzieren.¹⁶³ Mit dem Ziel, naive Makrophagen zu isolieren, wurde das Peritoneum daher lediglich mit heparinisiertem PBS gespült. Nach Zugabe der Liposomen und 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit mIFN- γ /LPS stimuliert und nochmals für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Phagozytoseaktivität charakterisiert und die Zellkulturüberstände abgenommen. Die Zellkulturüberstände wurden auf proinflammatorische Zytokine untersucht. TNF- α wurde hierbei im ELISA, weitere für die Entzündung relevante Zytokine, wie IL-1 α oder IL-6, wurden mittels Multiplex-Assay charakterisiert.

Die Charakterisierung der Phagozytoseaktivität wurde mit synthetischen konventionellen und ‚stealth‘ Liposomen durchgeführt, da SPS und EPG eine höhere Anfälligkeit gegenüber Oxidation und Hydrolyse aufwiesen (3.2.3.1 Chemische Stabilität). Die multispektrale Fluoreszenzmikroskopie diente der Untersuchung der Phagozytoseaktivität der MPM in Gegenwart von DOPS, DOPG und S100. Hierfür wurden die MPM mit DiR-markierten Liposomen inkubiert und gemäß der direkten und sequentiellen Stimulationsprotokolle mit IFN- γ /LPS stimuliert. Die MPM wurden anschließend mit Formalin fixiert. Der Zellkern wurde mit DAPI, die Zellmembran mit Dil gefärbt. Entsprechende qualitative Gesamtdarstellungen sind in Abbildung 25 zu finden. Vor allem für DOPS konnte ein DiR-Fluoreszenzsignal in den MPM nachgewiesen werden. Für DOPG und S100 hingegen wurden kaum bzw. keine DiR-Fluoreszenzsignale in den MPM wiedergefunden. Es scheint daher wahrscheinlich, dass vor allem DOPS und nur zu kleinen Anteilen DOPG und S100 phagozytiert werden. Dies entspricht den Angaben der Literatur. Für PS ist eine rezeptorvermittelte Phagozytose (heterogene Gruppe, z.B. TIM- oder MerTK-Rezeptoren) beschrieben.^{2,41–43} Dass der Zusatz von DSPE-PEG-2000 zu DOPS keinen abschirmenden Effekt zeigte, wurde darüber hinaus bereits durch Allen *et al.* und Boerman *et al.* publiziert.^{133,164} Beide erklären, dass der sterische Effekt des PEG dem starken PS-Signal unterlegen ist.^{133,164} Für PG⁶³ und PC (S100)^{165–167} hingegen ist eine extrazelluläre Wirkung am TLR-4-Rezeptor beschrieben. Leichte Phagozytoseaktivitäten für PG werden jedoch durch Lee *et al.* und Quintero *et al.* bestätigt.^{168,169} Vor allem Lee *et al.* veranschaulichten an Fibroblasten und Makrophagen, dass neben PS auch PG phagozytiert wird.¹⁶⁸ Allerdings wurde für PC nur eine sehr leichte Phagozytoserate ermittelt.¹⁶⁹ Außerdem ist ein schneller Abbau von PC und PG beschrieben.¹⁶⁹ Aufgrund der langen Inkubationszeit von 48 Stunden in dieser Arbeit ist zu vermuten, dass S100 und DOPG bereits zu Großteilen abgebaut waren, wodurch kaum Fluoreszenz in den MPM wiedergefunden wurde.

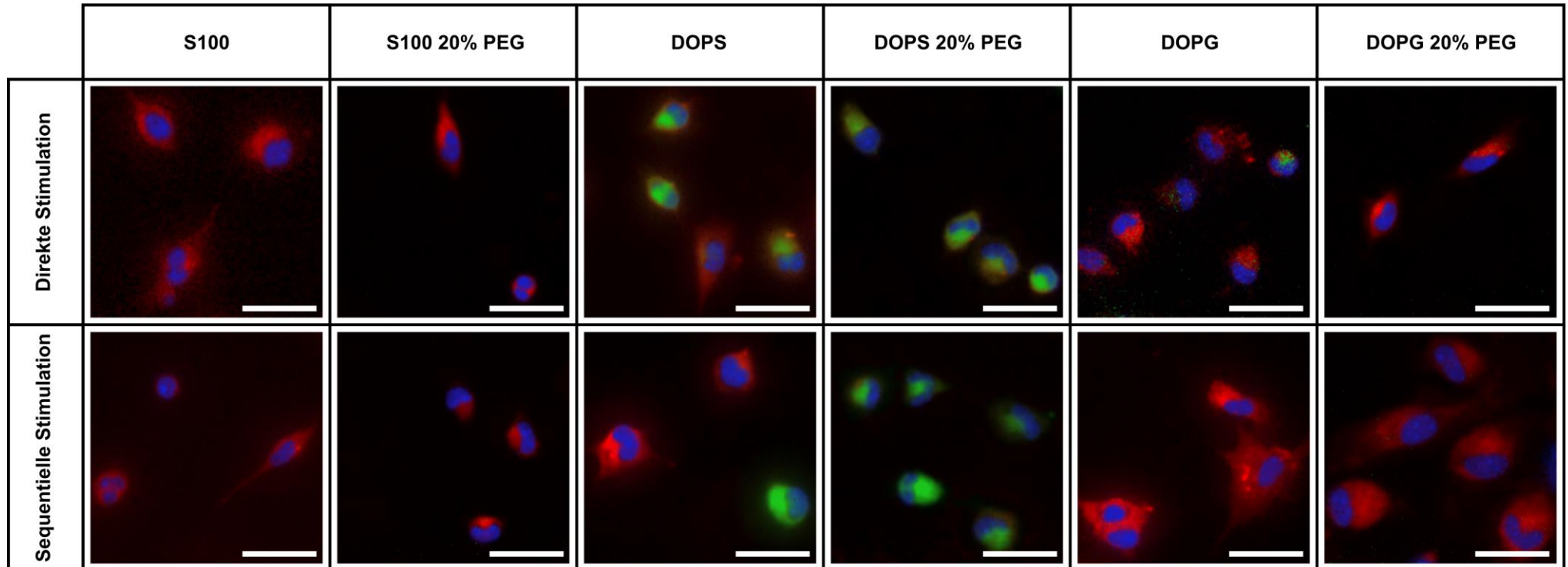


Abbildung 25: Phagozytoseaktivität von MPM nach Inkubation mit konventionellen und ‚stealth‘ DiR-markierten Liposomen, bestimmt mittels multispektraler Fluoreszenzmikroskopie.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. Die Makrophagenzellmembran ist mit Dil (rot), der Nukleus mit DAPI (blau) und die Liposomen mit DiR (grün) gefärbt.

Die Maßstabsskala zeigt eine Länge von 25 µm.

Eine Quantifizierung der DiR-Fluoreszenzsignale war aufgrund unterschiedlicher Belichtungszeiten nicht möglich. Sie könnte in Zukunft z.B. mittels FACS-Analysen erfolgen. Da die Quantifizierung jedoch nicht primär Ziel dieser Arbeit war, wurde hierauf verzichtet. Qualitativ legen die Ergebnisse jedoch nahe, dass die jeweiligen Phospholipide zu einem unterschiedlichen Maße phagozytiert werden und somit unterschiedliche Wirkmechanismen vorliegen. Die immunmodulierenden Eigenschaften wurden nachfolgend charakterisiert.

Initial wurden die immunmodulierenden Eigenschaften von S100, DOPS und DOPG formuliert als konventionelle Liposomen in Konzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml im direkten (Abbildung 26A) und sequentiellen (Abbildung 26B) Stimulationsprotokoll untersucht.

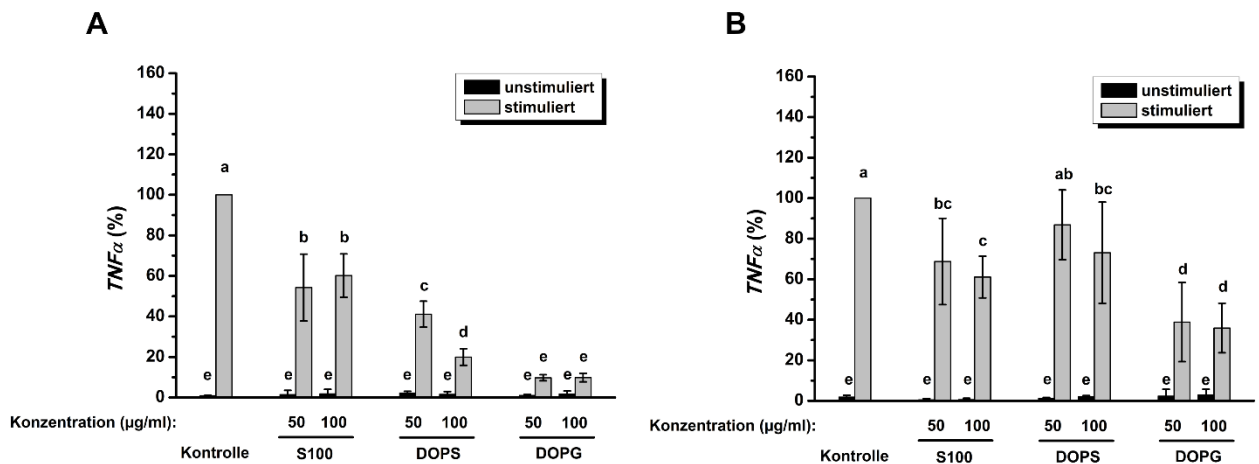


Abbildung 26: Immunmodulierende Eigenschaften von Liposomen auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Es wurden C57BL/6J WT MPM verwendet. A) zeigt die direkte und B) die sequentielle Stimulation. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der stimulierten Kontrolle $\leq 25\%$ war. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen TNF- α -Werte (bezogen auf die stimulierte Kontrolle) von jeweils 3 natürlichen Replikaten. Alle Mittelwerte wurden statistisch gegeneinander analysiert (ANOVA, LSD-Post-hoc-Test, $p < 0,05$). Gleiche Buchstaben über den Balken veranschaulichen, dass diese Werte nicht statistisch signifikant unterschiedlich sind. Alle anderen Vergleiche sind statistisch signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$).

Unstimulierte Zellen (Abbildung 26, schwarz dargestellte Balken) zeigten hierbei in beiden Stimulationsprotokollen für alle konventionellen Liposomen keine TNF- α -Freisetzung. Bei den mit mIFN- γ /LPS stimulierten Zellen (Abbildung 26, grau dargestellte Balken) konnten Unterschiede in Abhängigkeit der Stimulationsprotokolle und der Art der Liposomenformulierung festgestellt werden. In der direkten Stimulation (Abbildung 26A) reduzierte S100 die TNF- α -Produktion um ca. 40 %. DOPS und DOPG hingegen zeigten stärkere Effekte, das proinflammatorische Zytokin zu senken. Mit 90 % Reduktion war DOPG effektiver als DOPS. DOPS konnte TNF- α lediglich um maximal 80 % reduzierten. In der sequentiellen Stimulation (Abbildung 26B) hingegen waren die Effekte auf TNF- α nicht so stark ausgeprägt. S100 zeigte eine maximale Reduktion um 30 bis 40 %,

wohingegen der Effekt für DOPS lediglich bei 30 % lag. DOPG war auch hier am effektivsten mit einer maximalen Reduktion um 60 %. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivität der Liposomen in beiden Stimulationsprotokollen vorhanden, jedoch unterschiedlich ausgeprägt ist.

Für eine weitere Charakterisierung wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Einfluss verschiedener DSPE-PEG-2000 Konzentrationen in DOPS auf MPM
- Einfluss der DSPE-PEG-2000 Konzentration in DOPG und S100 auf MPM
- Einfluss verschiedener Phospholipidderivate der anionischen Phospholipide (synthetisch vs. natürlich) auf MPM

Hierfür wurde neben der Routineanalytik mittels TNF- α -ELISA für ausgewählte Proben auch die Multiplex-Analytik (2.4.4.2 Multiplex-Assay) verwendet. Diese hat den Vorteil mehrere Zytokine gleichzeitig analysieren zu können.¹⁷⁰

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener DSPE-PEG-2000 Konzentrationen in DOPS wurden zwei DSPE-PEG-2000 Konzentrationen, einmal 10 %, zum anderen 20 %, ausgewählt. Die Ergebnisse des TNF- α -ELISA sind in Abbildung 27, die Resultate der Multiplex-Analytik sind als *Heatmap* in Tabelle A 4 dargestellt.

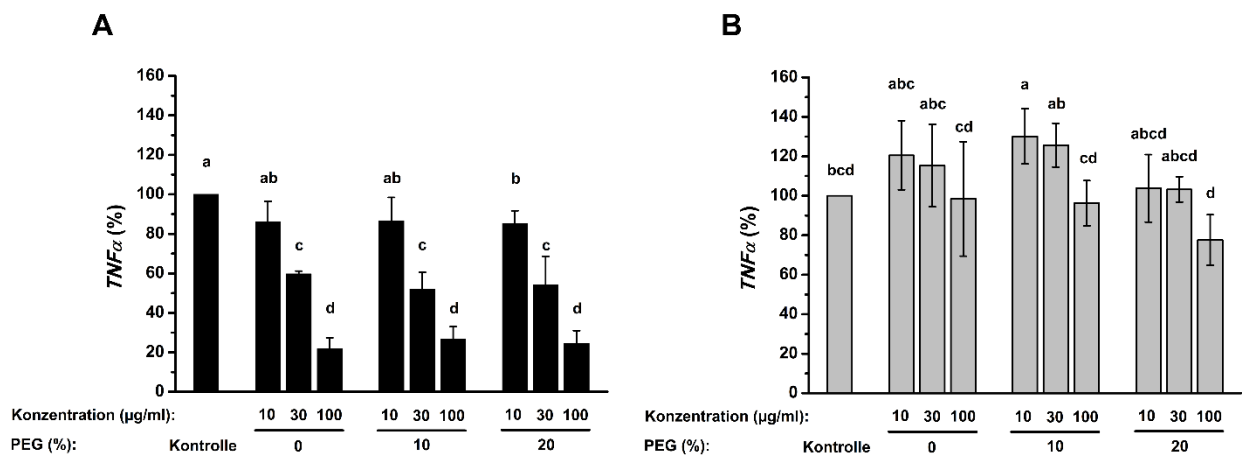


Abbildung 27: Immunmodulierende Eigenschaften PEG-haltiger DOPS Liposomen auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Es wurden C57BL/6J WT MPM verwendet. A) zeigt die direkte und B) die sequentielle Stimulation. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der stimulierten Kontrolle ≤ 25 % war. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen TNF- α -Werte (bezogen auf die stimulierte Kontrolle) von jeweils 3 natürlichen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 26.

Besonders in der direkten Stimulation (Abbildung 27A) konnte eine dosisabhängige Reduktion der TNF- α -Produktion für DOPS 10 % PEG und DOPS 20 % PEG ermittelt werden. Hierbei war die TNF- α -Reduktion unabhängig von der zugesetzten Konzentration des DSPE-PEG-2000. Zwischen

den 0%, 10 % und 20 % PEG-Zusatz gab es keine Unterschiede. Auch in der sequentiellen Stimulation (Abbildung 27B) waren die TNF- α -Effekte für alle Liposomen vergleichbar. Jedoch war die TNF α -Reduktion insgesamt geringer als in der direkten Stimulation.

Die Analytik mittels Multiplex-Assay (Tabelle A 4) zeigte speziell für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 mit dem TNF- α -ELISA vergleichbare starke Effekte. Beide Zytokine wurden in Gegenwart von DOPS sowohl in der direkten als auch sequentiellen Stimulation reduziert. Unterschiede zwischen konventioneller und ‚*stealth*‘ Liposomenformulierungen waren nicht vorhanden. In der direkten Stimulation waren weiterhin leichte Effekte für die proinflammatorischen Zytokine IL-12p70 und IL-1 α nachweisbar. Beide Zytokine wurden nach INF- γ /LPS Stimulation in geringen Konzentrationen freigesetzt. Alle anderen untersuchten Zytokine, auch in der sequentiellen Stimulation, besaßen Werte an der Nachweisgrenze, sodass hier keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Ein Einfluss der DSPE-PEG-2000 Konzentration auf die immunmodulierenden Eigenschaften von DOPS war als gering zu bewerten. Da 20% DSPE-PEG-2000 Zusatz dem Marktpräparat DOXIL[®]/CAELYX[®] entspricht, wurde nachfolgend für S100- und DOPG-haltige Liposomen ausschließlich dieser Gehalt untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchung von S100- und DOPG-haltigen konventionellen und ‚*stealth*‘ Liposomen (20 % DSPE-PEG-2000) sind in Abbildung 28 und Tabelle A 5 dargestellt.

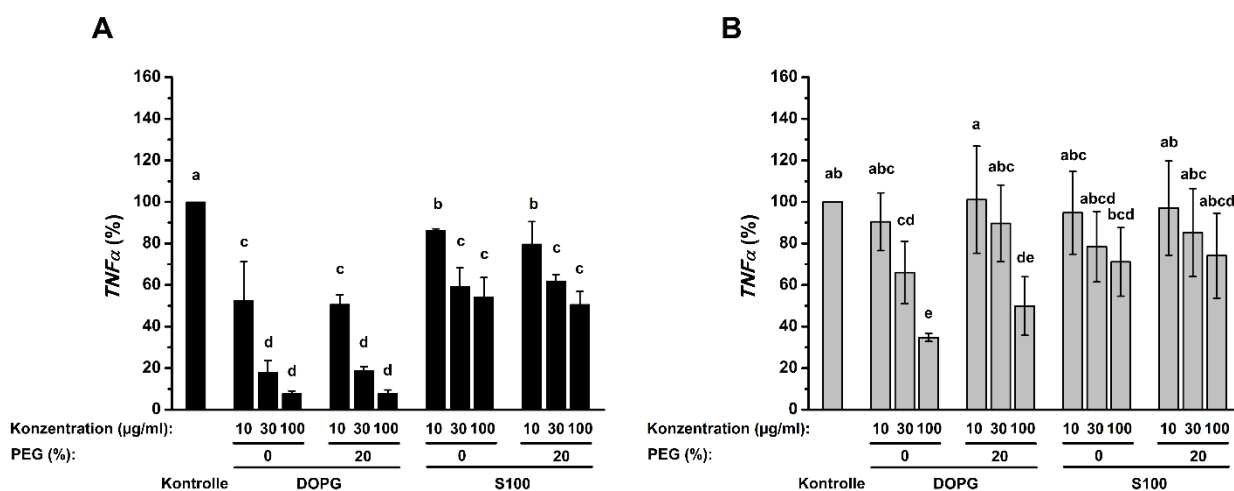


Abbildung 28: Immunmodulierende Eigenschaften PEG-haltiger DOPG und S100 Liposomen auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Es wurden C57BL/6J WT MPM verwendet. A) zeigt die direkte und B) die sequentielle Stimulation. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der stimulierten Kontrolle ≤ 25 % war. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen TNF- α -Werte (bezogen auf die stimulierte Kontrolle) von jeweils 3 natürlichen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 26.

In der direkten Stimulation (Abbildung 28A) konnte ebenfalls eine dosisabhängige TNF- α -Reduktion für konventionelle und ‚*stealth*‘ Liposomen festgestellt werden. Der Zusatz von DSPE-

PEG-2000 hatte keinen Einfluss auf die TNF- α -Reduktion. Zwischen 0 % PEG und 20 % PEG gab es keine Unterschiede. In der sequentiellen Stimulation wurde ebenfalls unabhängig von der Konzentration an DSPE-PEG-2000 eine dosisabhängige TNF- α -Reduktion, besonders für DOPG, verzeichnet. Insgesamt war die TNF- α -Reduktion hier geringer als in der direkten Stimulation.

In der Multiplex-Analytik (Tabelle A 5) waren für TNF- α und IL-6 mit dem TNF- α -ELISA vergleichbare starke Effekte zu erkennen. Beide Zytokine wurden in Gegenwart der Liposomen in der direkten und sequentiellen Stimulation reduziert. In der direkten Stimulation waren auch für IL-1 α , MCP-1 und IL-27 leichte Effekte erkennbar. Diese Zytokine wurden in Gegenwart der Liposomen und nach INF- γ /LPS Stimulation in geringen Konzentrationen freigesetzt. Alle anderen untersuchten Zytokine besaßen Werte an der Nachweisgrenze, sodass hier keine Unterschiede ermittelt wurden. Ähnliches war in der sequentiellen Stimulation zu detektieren. Ein Einfluss der DSPE-PEG-2000-Konzentration auf die immunmodulierenden Eigenschaften von DOPG und S100 war als gering zu bewerten.

Die Untersuchung des Einflusses anionischer Phospholipidderivate (synthetisch vs. natürlich) auf die biologische Aktivität der MPM zeigt Abbildung 29 und Tabelle A 6.

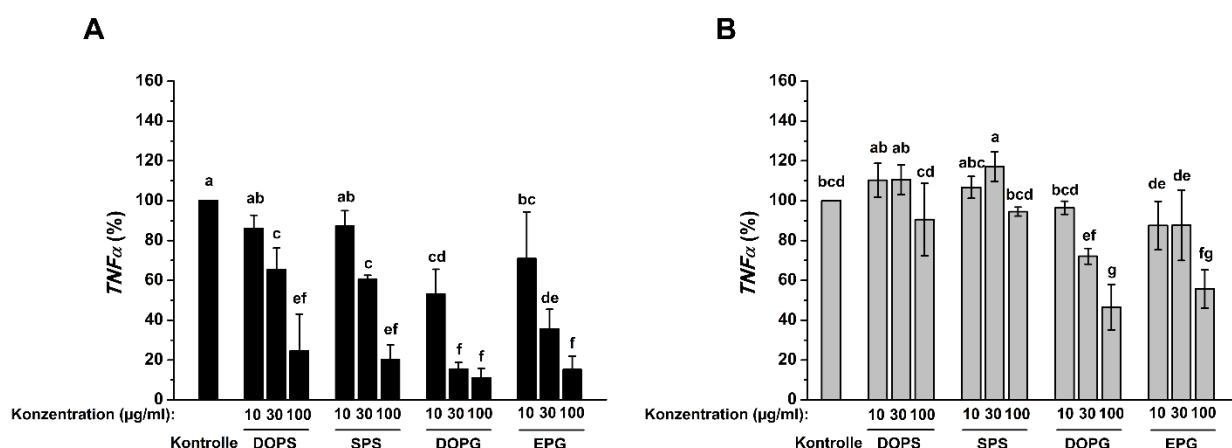


Abbildung 29: Immunmodulierende Eigenschaften natürlicher (SPS, EPG) und synthetischer (DOPS, DOPG) konventioneller Liposomen auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. A) zeigt die direkte und B) die sequentielle Stimulation. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der stimulierten Kontrolle ≤ 25 % war.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen TNF- α -Werte (bezogen auf die stimulierte Kontrolle) von jeweils 3 natürlichen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 26.

DOPS und SPS konnten TNF- α in gleichem Ausmaß dosisabhängig reduzieren. Es gab weder in der direkten (Abbildung 29A) noch in der sequentiellen (Abbildung 29B) Stimulation Unterschiede. Hingegen zeigte EPG in der direkten Stimulation (Abbildung 29A) eine etwas schwächere Tendenz TNF- α zu reduzieren, als DOPG. In der sequentiellen Stimulation (Abbildung 29B) war dies nicht

so stark ausgeprägt. Insgesamt war die TNF- α -Reduktion hier geringer als in der direkten Stimulation.

Die Analytik mittels Multiplex-Assay (Tabelle A 6) zeigte auch hier starke Effekte für TNF- α und IL-6. Beide Zytokine wurden in der direkten und sequentiellen Stimulation reduziert. Für IL-1 α und IL-27 waren nach direkter IFN- γ /LPS Stimulation in Gegenwart von Liposomen leicht reduzierte Messwerte erkennbar. Alle anderen Zytokine besaßen Werte an der Nachweisgrenze, sodass hier keine Unterschiede ermittelt wurden. Ein Einfluss der anionischen Phospholipidderivate auf die immunmodulierenden Eigenschaften war als gering zu bewerten.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchung der Aktivität von MPM in Gegenwart von Liposomen ausführlich diskutiert. PS, PG und S100 zeigen Potential proinflammatorische Zytokine, besonders TNF- α , dosisabhängig zu reduzieren. Hierbei fällt ins Auge, dass auch weitere makrophagenabhängige proinflammatorische Zytokine wie IL-1 α , IL-6, IL-12p70 und IL-27 beeinflusst werden. Die dosisabhängige Reduktion erfolgt abhängig von der Art der Phospholipide in unterschiedlichem Ausmaß. PG zeigte die stärkste Reduktion. PS folgte und S100 reduzierte am schwächsten.

Eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse ist, dass in Abhängigkeit des jeweiligen Phospholipids unterschiedliche zelluläre Prozesse, u.a. Phagozytose- oder TLR-4-vermittelt, stattfinden. In den 1990er Jahren wurde für PS die biologische Aktivität bestimmt. Besonders aktiv war hierbei die Gruppe um Valerie A. Fadok. Sie zeigte, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen PS-abhängig ist.⁴⁵ Andere negativ geladene Phospholipide wurden ebenfalls untersucht. Ein Einfluss der negativen Ladung konnte speziell für PG ausgeschlossen werden.⁴⁵ Die Apoptose war gemäß der Autoren PS-abhängig und führte zur Immunmodulation, PG zeigte keine Aktivität.⁴⁵ Erst 10 Jahre später wurde veröffentlicht, dass auch PG in der Lage ist, immunmodulierend zu wirken.^{64,171,172} Hierbei wurde statt einer Phagozytoseaktivität eine Interaktion im LPS-Binde-Prozess beschrieben. Sowohl eine Reduktion der Synthese der Typ IIA Phospholipase A2¹⁷¹ als auch die Möglichkeit der Bindung an LPS-Binde-Proteine wie MD-2 oder CD-14¹⁷² sind beschrieben. Aktuell wird eine TLR-4 und damit LPS-spezifische Reaktion postuliert, welche zu einer TNF- α -Reduktion führt.⁶³ Vergleichende Studien zwischen PS und PG sind selten. Lediglich Voelker *et al.* veröffentlichten eine Studie, in welcher sie 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) Natrium (POPG), PS und DPPC auf mit LPS stimulierten U937 Zellen untersuchten.¹⁷² Sie konnten zeigen, dass POPG TNF- α effektiver reduziert als PS.¹⁷² Dies stimmt mit den hier erhaltenen Daten überein. Weiterhin zeigte DPPC keine merkliche TNF- α -Reduktion.¹⁷² Der Unterschied zwischen dem durch Voelker *et al.* verwendeten DPPC und dem hier verwendeten S100 liegt im Sättigungsgrad der am PC veresterten Fettsäuren. Dass das S100 hier eine leichte Reduktion der TNF- α -Produktion zeigte, ist vermutlich auf eine partielle Oxidation der ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen. So sind für die immunmodulierenden Effekte oxidierter PCs dosisabhängige Effekte beschrieben.^{165–167} Niedrige Konzentrationen oxidierter PCs

scheinen *in vitro* die TLR-4-abhängige LPS-Wirkung zu stören und somit protektiv zu wirken, wohingegen höhere Konzentrationen proinflammatorische Eigenschaften besitzen sollen.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Da in dieser Arbeit vorwiegend natürliches S100 verwendet wurde, kann dieser Einfluss nicht ausgeschlossen werden. Er wird, trotz sachgemäßer Lagerung und Handhabung (2.2 Handhabung und Lagerung von Phospholipiden), als Grund für die TNF- α -Reduktion durch S100 angesehen. Eine weitere Möglichkeit, warum S100 TNF- α dosisabhängig reduziert, könnten Interkalationsphänomene des LPS in die Phospholipiddoppelschicht der Liposomen sein. LPS ist ein amphiphiles Molekül. Es bestehend sowohl aus Zucker als auch aus Fettsäuren. Es besitzt somit das Potential, sich in die Phospholipiddoppelschichten einzulagern. Hierfür sind jedoch gemäß Schromm *et al.* höhere Temperaturen notwendig.¹⁷³ Durch Interkalation in die Liposomen könnte eine geringere Konzentration an aktivem LPS vorliegen, was die MPM-Stimulation reduziert und somit zu einer geringeren TNF- α -Freisetzung führt.¹⁷³ Da jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Phospholipiden S100, PS und PG zu erkennen sind, scheint ein Interkalationsphänomen des LPS eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassend ist der größte Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch die Art der Phospholipide verursacht, was sich in den Unterschieden zwischen S100, PS und PG widerspiegelt. Hingegen zeigen weder der Zusatz von DSPE-PEG-2000 noch der Vergleich verschiedener anionischer Phospholipidderivate (synthetisch vs. natürlich) Unterschiede in der Reduktion von TNF- α . Da SPS und EPG jedoch im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen einen höheren chemischen Abbau zeigten (3.2.3.1 Chemische Stabilität) wurden für die nachfolgenden *in vivo* Studien im Mausmodell ' DOPS und DOPG Liposomen verwendet. Sie wurden sowohl konventionell als auch mit 20 % DSPE-PEG-2000 formuliert.

3.2.5 Biologische Charakterisierung *in vivo* und *ex vivo*

3.2.5.1 Allgemeines

Für die *in vivo* Charakterisierung wurden die mit synthetischen Phospholipiden hergestellten konventionellen und ‚*stealth*‘ Liposomen mittels DiR fluoreszenzmarkiert (2.3.1.2 Markierung der Liposomen). Die physikochemische Charakterisierung dieser Liposomen umfasste die Bestimmung der Größe und Größenverteilung sowie die Ermittlung der Oberflächenladung. Die Ergebnisse entsprechen denen der Liposomen ohne Fluoreszenzmarkierung (3.2.2.2 Größe und Größenverteilung) und sind im Anhang dargestellt (Abbildung A 4). Nachfolgend sind die Biodistributionsstudien am gesunden (3.2.5.2 Untersuchung der *in vivo* und *ex vivo* Biodistribution am gesunden Tier) und myokardial infarktierten (3.2.5.3 Untersuchung der *in vivo* und *ex vivo* Biodistribution am myokardial infarktierten Tier) Tier präsentiert.

3.2.5.2 Untersuchung der *in vivo* und *ex vivo* Biodistribution am gesunden Tier

Die systemische Biodistribution der Liposomen wurde an gesunden Mäusen mittels *in vivo* und *ex vivo* FI untersucht. Das Versuchablaufschemata zeigt Abbildung 10. Qualitative Bilder der ventralen Position sind in Abbildung 30 dargestellt. Eine quantitative Auswertung veranschaulicht Abbildung 31. Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungspositionen (2.5.4.1 *In vivo* und *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung (FI)) sind im Anhang zu finden (Abbildung A 8 bis Abbildung A 13).

Es wurde eine konstante Dosis an Liposomen verabreicht (0,5 mg Liposomen/Maus). Da die Männchen (Abbildung 30B) jedoch deutlich schwerer waren als die Weibchen (Abbildung 30A), sind die Ergebnisse der FI nach Geschlechtern getrennt dargestellt. Die Gesamtfluoreszenzintensitäten der DiR-markierten Liposomen in der Maus zeigten qualitativ eine Abhängigkeit von der Art der Liposomenformulierung. Konventionelle Liposomenformulierungen zeigten eine höhere Clearance als ‚*stealth*‘ Liposomen, außerdem waren kopfgruppenabhängige Unterschiede festzustellen. S100 verteilte sich homogen im gesamten Mäusekörper. Nur eine leichte Anreicherung im oberen mittleren Abdomen war erkennbar (Abbildung 30A, B). Für DOPS hingegen wurde ein Maximum der Fluoreszenzintensität 0,25 h nach Injektion mit einer Anreicherung im oberen mittleren Abdomen festgestellt (Abbildung 30A, B). DOPG konnte nur zu einem geringen Maß im Mäusekörper wiedergefunden werden (Abbildung 30A, B). Es zeigte sowohl eine Anreicherung im oberen mittleren Abdomen und als auch einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität über den Untersuchungszeitraum. Im Gegensatz dazu war für die ‚*stealth*‘ Liposomen S100 20 % PEG eine stärkere Anreicherung und längere Zirkulation im Mäusekörper feststellbar (Abbildung 30A, B). Hier wurden deutliche Unterschiede zu den konventionellen Liposomen ersichtlich. Das Fluoreszenzsignal nahm über den Untersuchungszeitraum nur zu einem geringen Maß ab. Für DOPS 20 % PEG hingegen wurde, ebenso wie für die konventionellen Liposomen, eine starke Anreicherung im oberen mittleren Abdomen ermittelt (Abbildung 30A, B). Jedoch war hier die Biodistribution zu frühen Untersuchungszeitpunkten auch im Gesamtkörper der Maus gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

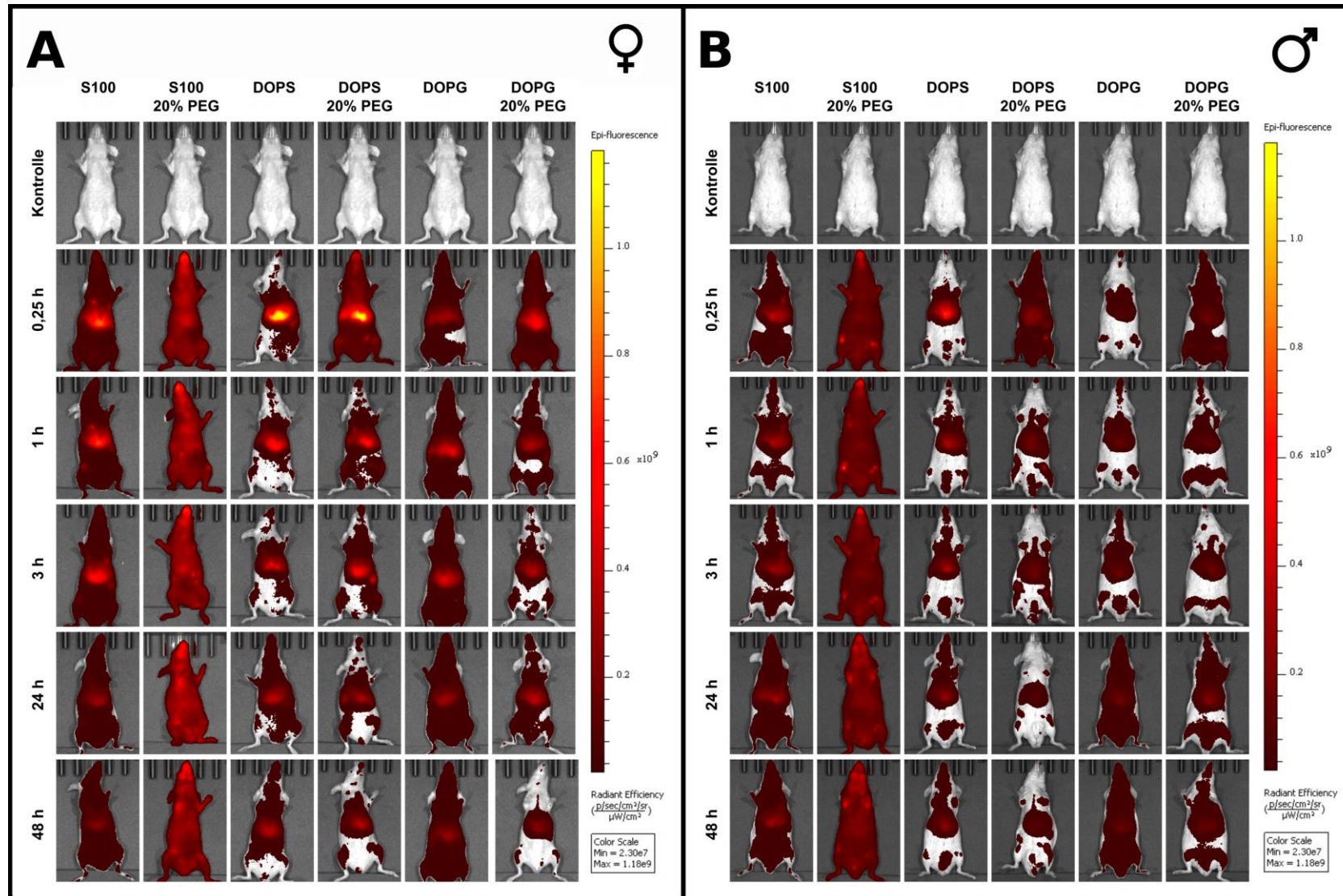


Abbildung 30: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, ventrale Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

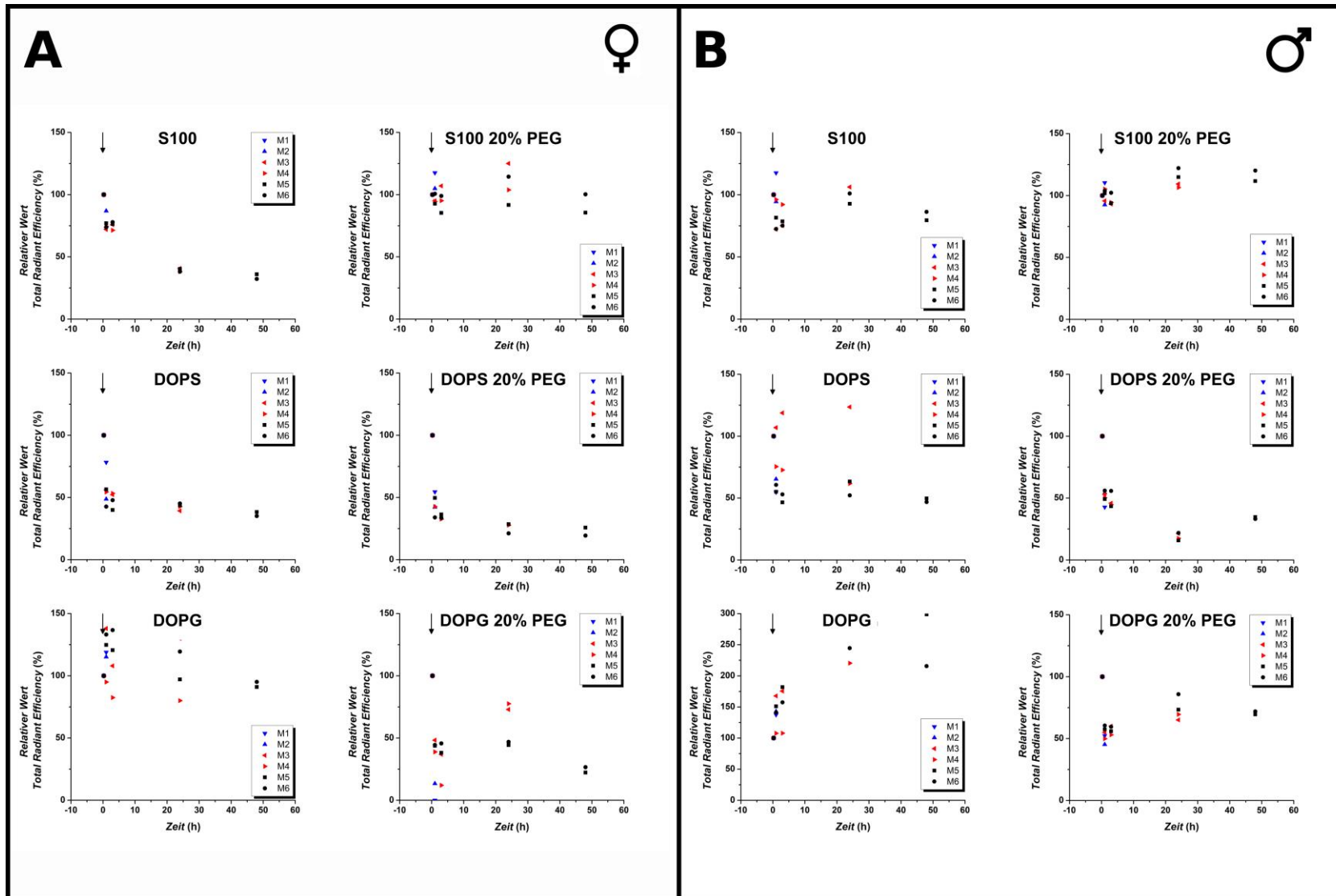


Abbildung 31: TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, ventrale Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Dargestellt sind relative TRE bezogen auf den Zeitpunkt 0,25 Stunden post Injektion. M1 und M2 entsprechen Mäusen, die nach einer Stunde, M3 und M4 Mäusen, die nach 24 Stunden und M5 und M6 Mäusen, die nach 48 Stunden getötet wurden.

DOPG 20 % PEG war zu frühen Zeitpunkten ebenfalls im gesamten Mäusekörper verteilt (Abbildung 30A, B). Im Vergleich zu den konventionellen Liposomen war eine etwas stärkere Anreicherung im mittleren oberen Abdomen zu erkennen, die über die Zeit abnahm.

Für einen quantitativen Vergleich der Unterschiede in der Biodistribution und Pharmakokinetik der Liposomen wurden vordefinierte ROI mit dem Parameter TRE ausgewertet. Die TRE war hierbei auf den jeweiligen Wert bei 0,25 Stunden normalisiert. Abbildung 31 veranschaulicht die quantitativen Ergebnisse für die ventrale Position. Für die konventionellen Liposomen wurde eine schnellere Reduktion der TRE festgestellt. Besonders hervorzuheben sind hier die Ergebnisse der weiblichen SKH1 Mäuse. Hier wurde ersichtlich, dass DOPS schneller als S100 eliminiert wird. In männlichen Mäusen war dieser Effekt weniger deutlich. Im Gegensatz dazu stieg die TRE von DOPG initial an und nahm über die Zeit langsam wieder ab. Dieses Pharmakokinetikprofil war in beiden Geschlechtern erkennbar. Die ‚*stealth*‘ Liposomen hingegen präsentierten andere Pharmakokinetiken. Für S100 20 % PEG wurden in beiden Geschlechtern über den Untersuchungszeitraum von 48 Stunden ca. 80 % der relativen TREs wiedergefunden, wohingegen S100 schnell eliminiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde DOPS 20 % PEG ebenfalls ähnlich schnell eliminiert wie das konventionelle DOPS. DOPG 20 % PEG hingegen zeigte schnellere Elimination als DOPG.

Die nachfolgende *ex vivo* FI einzelner Organe diente der genaueren Bestimmung der systemischen Biodistribution der Liposomen. Repräsentative qualitative Darstellungen für weibliche und männliche SKH1 Mäuse sind im Anhang (Abbildung A 13 bis Abbildung A 16) zu finden. Die jeweilige Organposition ist Tabelle 7 und Tabelle 8 zu entnehmen. Quantitative Biodistributionsergebnisse zeigt Abbildung 32. Hierbei sind Relativwerte der TREs, welche auf die jeweilige Leber (höchste Fluoreszenzintensität) bezogen sind, dargestellt. Hohe TREs wurden für alle Liposomenformulierungen in den jeweiligen Lebern detektiert. Zwischen weiblichen und männlichen SKH1 Mäusen zeigten sich kaum Unterschiede in der *ex vivo* Biodistribution. Neben hohen TREs in den jeweiligen Lebern zeigten konventionelle Liposomen über alle Endpunkte moderate TREs in der jeweiligen Milz. In einigen Fällen wurden leicht erhöhte Fluoreszenzintensitäten in Uterus und Eierstöcken wiedergefunden. Gegensätzlich dazu zeigten die ‚*stealth*‘ Liposomen eine andere *ex vivo* Biodistribution. Besonders S100 20 % PEG verteilte sich am Endpunkt 1 Stunde in der Leber, in der Milz, im Blut, im Herz, der Lunge, den Nieren und den Geschlechtsorganen. Diese Fluoreszenzintensitäten nahmen über die Zeit ab, wobei am Endpunkt 48 Stunden weiterhin höhere TREs wiedergefunden wurden, als in S100. Im Vergleich dazu zeigten DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG höhere TREs in der jeweiligen Milz, auch verglichen mit den konventionellen Liposomen. Für diese ‚*stealth*‘ Formulierungen waren jedoch keine hohen TREs in anderen Organen zu verzeichnen. Sie reichert sich vorwiegend in Organen an, die reich an Zellen des mononuklearen Phagozytensystems (MPS) sind.

Ergebnisse und Diskussion

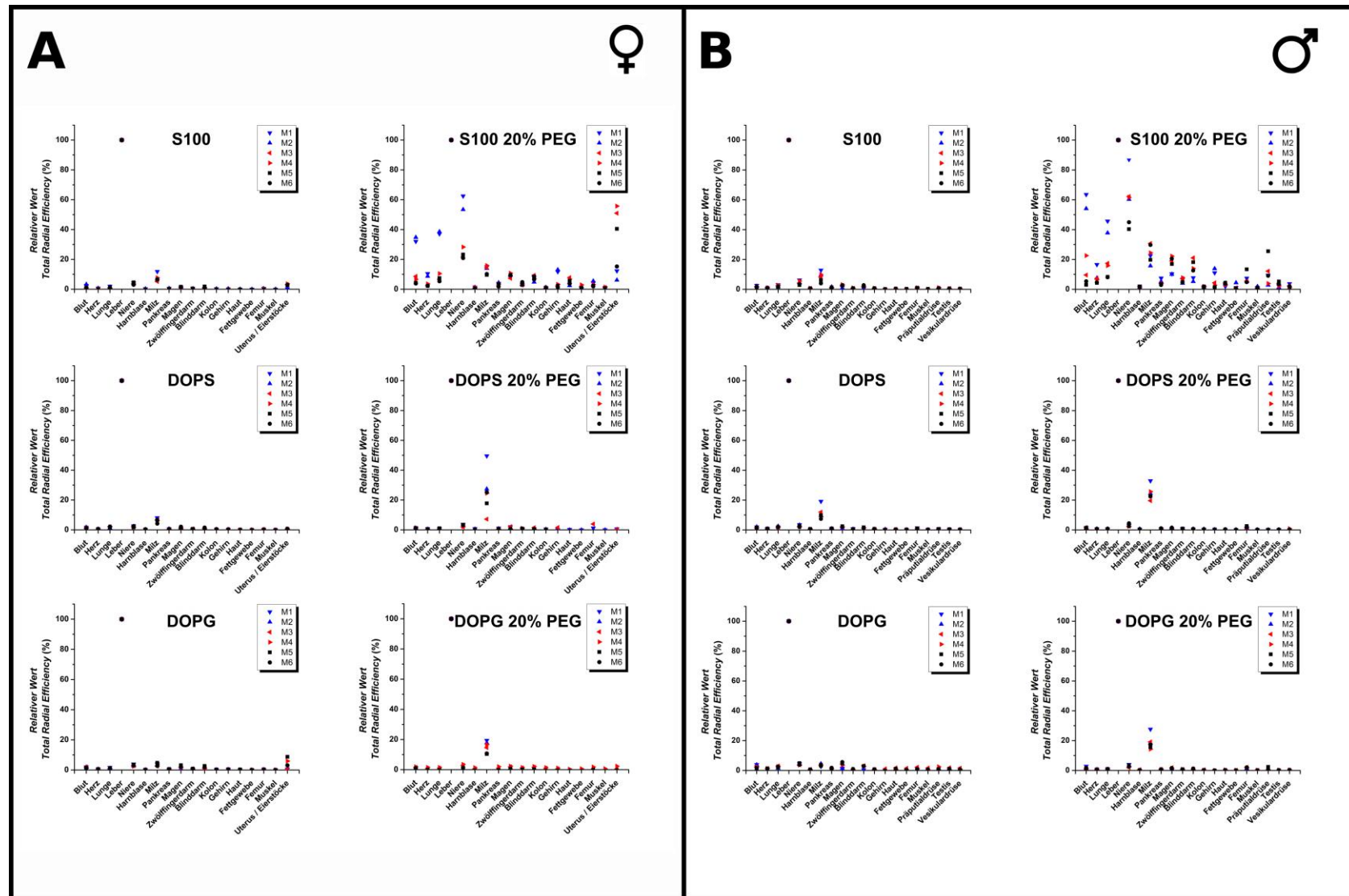


Abbildung 32: Quantifizierung der TRE für definierte ROI der DiR-markierten Liposomen in gesunden Mäusen, ex vivo, bestimmt mittels ex vivo FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Dargestellt sind relative TRE bezogen auf die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Leber. M1 und M2 entsprechen Mäusen, die nach einer Stunde, M3 und M4 Mäusen, die nach 24 Stunden und M5 und M6 Mäusen, die nach 48 Stunden getötet wurden.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der *in vivo* und *ex vivo* Biodistributionsstudie in der gesunden Maus diskutiert. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Liposomen, hier besonders aufgrund ihrer definierten Größe und Größenverteilung, wurde eine langanhaltende *in vivo* Zirkulation sowie eine langsame Elimination über Leber und Milz erwartet. Überraschender Weise zeigten sowohl die konventionellen als auch die ‚*stealth*‘ Liposomen verschiedenartige Biodistributionsprofile. Höchst wahrscheinlich sind diese durch Unterschiede in den jeweiligen Oberflächeneigenschaften, wie Ladung und Kopfgruppe der Liposomen, begründet.

Für S100, das nur PC enthält, ist eine schnelle Elimination bekannt. Jedoch beschreibt die Literatur kleinere Unterschiede in den Eliminationsraten in Abhängigkeit des Sättigungsgrades der veresterten Acylketten der PCs. Für PCs mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen (ungesättigt), wie dem hier verwendeten S100, werden etwas längere Eliminationszeiten diskutiert, als für PCs mit hohen Phasenübergangstemperaturen (gesättigt).^{174,175} Nach einer Stunde konnte besonders in den weiblichen SKH1 Mäusen noch ca. 75 % der Fluoreszenzintensität des S100 wiedergefunden werden, was in Einklang mit den Ergebnissen von Semple *et al.* steht.¹⁷⁴ Die hydrophile Oberflächenmodifikation durch Zusatz von DSPE-PEG-2000 hingegen führte für S100 20 % PEG zu einer Verlängerung der *in vivo* Biodistribution und *ex vivo* zu einer homogeneren Verteilung der Liposomen im gesamten Mäusekörper. Dies war mit dem Marktprodukt DOXIL[®]/CAELYX[®] vergleichbar.^{89,176}

Der Zusatz von anionischen Phospholipiden wie DOPS oder DOPG resultierte in einer schnellen Elimination und stärkerer Anreicherung in Organen, die reich an Zellen des MPS sind, also Leber und Milz. Höchst wahrscheinlich ist dies durch die PS- und PG-vermittelte Erkennung und Phagozytose durch Zellen des MPS zu begründen, da diese Zellen vorwiegend in der Leber und der Milz vorkommen.^{177,178} Vergleichende *in vivo* Studien, die sowohl PS als auch PG untersuchen, sind selten. 1992 veröffentlichten Gabizon und Papahadjopoulos eine Studie, in welcher sie systematisch Phospholipidoberflächenladungen und ihren Einfluss auf die jeweilige Liposomen*clearance* beschrieben.¹⁷⁹ In dieser Studie untersuchten sie u.a. ungesättigtes PS und ungesättigtes PG, beide in vergleichbaren molaren Verhältnissen, die mit ungesättigtem PC und Cholesterol formuliert und mit Gallium 67 (⁶⁷Ga) radiomarkiert waren. Diese Liposomen wurden extrudiert und anschließend weiblichen Mäusen *i.v.* appliziert. 4 bzw. 24 Stunden nach Injektion wurden die Mäuse getötet und die Radioaktivität des ⁶⁷Ga in den einzelnen Organen mit einem γ -Zähler bestimmt. Sie konnten zeigen, dass sowohl PS als auch PG Liposomen schnell aus der Blutzirkulation entfernt wurden und sich in der Leber und zu gewissem Grad in der Milz anreicherten. Weiterhin berichteten sie, dass es leichte Unterschiede zwischen der *ex vivo* Biodistribution von PS und PG gibt. PS reichte sich vorwiegend in der Leber (75 % RD/Organ) und der Milz (10 % RD/Organ) an, wohingegen PG niedrigere Radioaktivität in der Leber (43 % RD/Organ) und geringe Radioaktivität in der Milz (1 % RD/Organ) präsentierte. Die *ex vivo* Darstellung der Biodistribution DiR-markierter Liposomen (Abbildung A 13 bis Abbildung A 16)

bestätigt dies. Auch hier wurden Unterschiede der TREs von DOPS und DOPG festgestellt. Besonders zeigte DOPS eine Anreicherung in Leber und Milz, wohingegen DOPG hier niedrigere maximale Fluoreszenzintensitäten aufwies. Wahrscheinlich sind diese Unterschiede mit den jeweiligen Phagozytoseraten und -mechanismen zu begründen. PS wird primär von Zellen des MPS sowie von Hepatozyten¹⁸⁰ und Fibroblasten¹¹⁹ aufgenommen, wohingegen PG wohl eher von Monozyten und Makrophagen¹⁸⁰ phagozytiert wird. Weiterhin könnten Unterschiede in der Phagozytoseaktivität von DOPS und DOPG, wie sie *in vitro* bereits festgestellt wurden (3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen), ebenfalls einen Einfluss auf die unterschiedliche *in vivo* Biodistribution haben. Für DOPG erscheint es, dass zeitabhängig eine Umverteilung der Liposomen im Mäusekörper stattfindet, was höchst wahrscheinlich zu einer langsameren Anreicherung der Liposomen in der Leber führt. Der Zusatz von 20 % DSPE-PEG-2000 zu DOPS oder DOPG hatte geringe Einflüsse auf die Biodistribution *in vivo*. Eine Verlängerung der Biodistribution wurde nicht festgestellt, obwohl *ex vivo* eine stärkere Anreicherung in der jeweiligen Milz ersichtlich wurde. Die hydrophile Oberflächenmodifikation von PS- und PG-haltigen Liposomen wurde bis dato selten untersucht. Lediglich eine Studie von Levchenko *et al.* charakterisierte systematisch PS-haltige Liposomen, die mit verschiedenen PEG formuliert waren, entweder DSPE-PEG-750 oder DSPE-PEG-5000.¹⁸¹ Der Zusatz von DSPE-PEG-750 führte nicht zu einer längeren Zirkulationszeit der Liposomen, wohingegen DSPE-PEG-5000 eine Pharmakokinetik analog PC Liposomen und somit eine leichte Verlängerung der Zirkulationszeit zeigte.¹⁸¹ Das in dieser Arbeit verwendete DSPE-PEG-2000 wurde auch durch Boerman *et al.* für PS Liposomen verwendet.¹³³ Dort konnte kein Einfluss des PEG-Zusatzes auf die *in vivo* Biodistribution PS-haltiger Liposomen festgestellt werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass der abschirmende Effekt des DSPE-PEG-2000, mit einer mittleren Kettenlänge, zwischen dem von DSPE-PEG-750 und DSPE-PEG-5000 liegt. Daher scheint *in vivo* noch kein Einfluss auf die Pharmakokinetik zu bestehen, obwohl *ex vivo* eine stärkere Anreicherung in der Milz zu verzeichnen war. Dies wird durch Quan *et al.* für PS bestätigt.¹⁸² Aufgrund der Resultate der Biodistributionsstudie im gesunden Tier wurden die ‚stealth‘ Liposomen für die nachfolgende Untersuchung der Biodistribution im myokardial infarktierten Tier ausgewählt.

3.2.5.3 Untersuchung der *in vivo* und *ex vivo* Biodistribution am myokardial infarktierten Tier

Um das optimale Therapieschema für die Behandlung myokardial infarktierter Mäuse zu bestimmen, wurden sowohl einfache wie auch dreifache Injektionen mittels *in vivo* und *ex vivo* FI untersucht. Das Versuchablaufschemata zeigt Abbildung 11. Qualitative und quantitative Bilder der ventralen Position präsentiert Abbildung 33. Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungspositionen (2.5.4.1 *In vivo* und *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung (FI)) sind im Anhang zu finden (Abbildung A 17 bis Abbildung A 19).

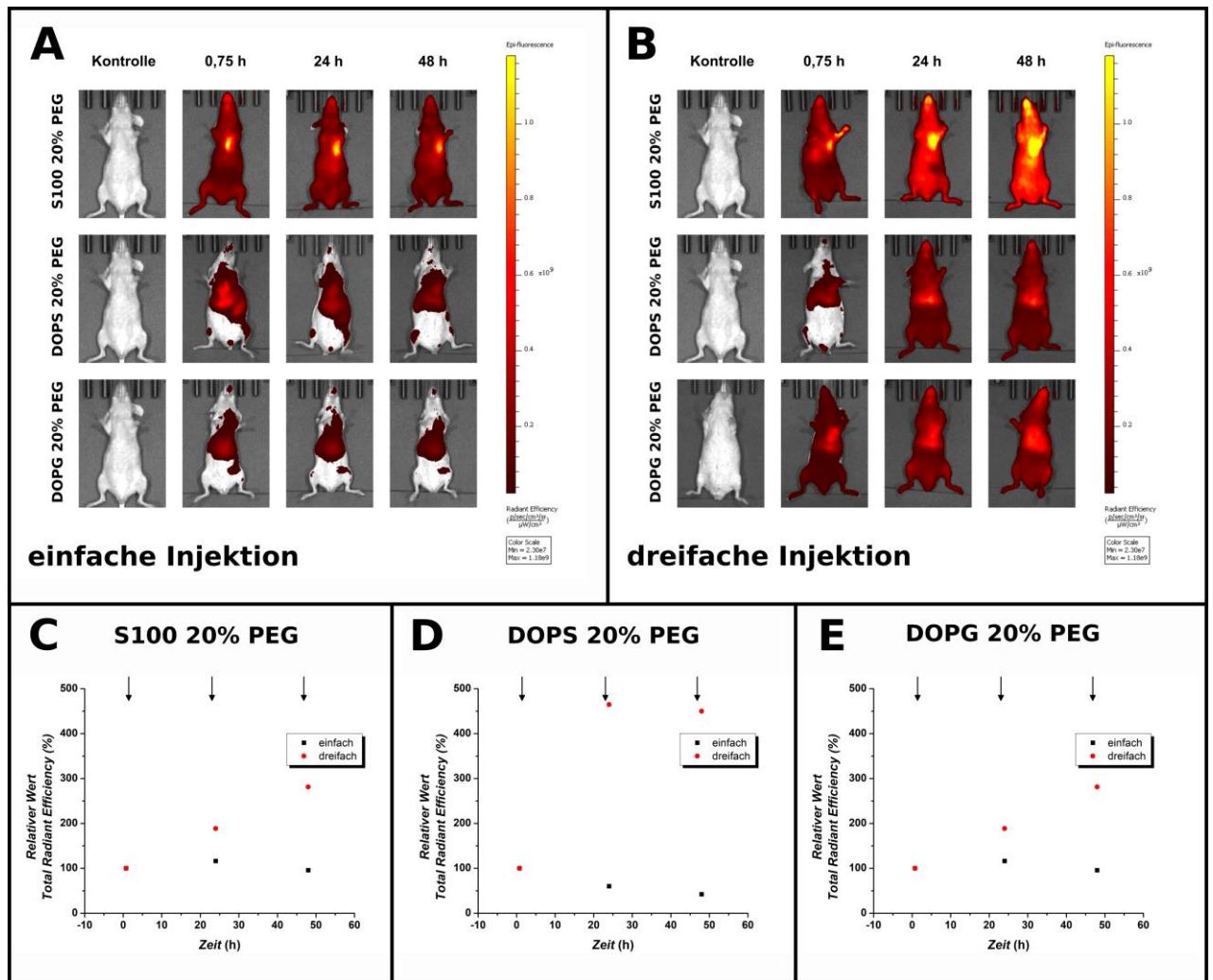


Abbildung 33: Gesamtfloreszenzintensitäten sowie TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in EMI Mäusen, ventrale Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt Gesamtfloreszenzintensitäten der einfachen und B) die der dreifachen Injektion. In C) ist die TRE-Quantifizierung für S100 20 % PEG, in D) für DOPS 20 % PEG und in E) für DOPG 20 % PEG dargestellt. Exemplarisch wurde je eine SKH1 Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

Die einfache Injektion führte für S100 20 % PEG zu einer homogenen Verteilung im gesamten Mauskörper mit Anreicherung der Liposomen in der operierten Thoraxregion (Abbildung 33A). Dazu im Gegensatz reichert sich sowohl DOPS 20 % PEG als auch DOPG 20 % PEG im oberen mittleren Abdomen an (Abbildung 33A). Im Infarktgebiet konnte hier keine Erhöhung des Fluoreszenzsignals festgestellt werden. Für S100 20 % PEG war auch nach dreifacher Injektion eine Anreicherung des Fluoreszenzsignals im Infarktgebiet nachweisbar (Abbildung 33B). Hierbei stieg die TRE nach jeder Injektion an (Abbildung 33C). DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG hingegen zeigten auch nach dreifacher Injektion keine Anreicherung im Infarktgebiet (Abbildung 33B). Stattdessen stiegen die TREs nach jeder Injektion an (Abbildung 33D, E).

Die *ex vivo* Untersuchung der einzelnen Organe erfolgte nach dem Endpunkt 48 Stunden. Qualitative Darstellungen ausgewählter Organe zeigt Abbildung 34. Qualitative und quantitative Gesamtdarstellungen sind in Abbildung A 20 zu finden.

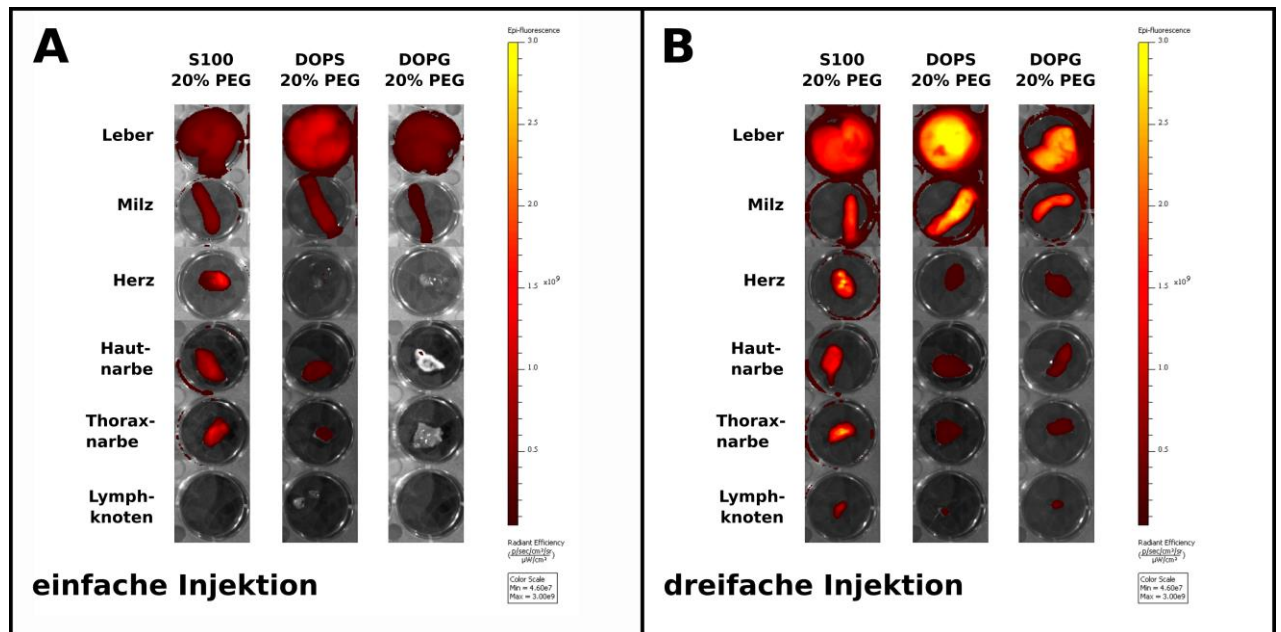


Abbildung 34: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in EMI Mäusen, *ex vivo* Darstellung ausgewählter Organe, bestimmt mittels *ex vivo* FI.

A) zeigt die einfache und B) die dreifache Injektion.

Nach einfacher Injektion (Abbildung 34A) war besonders S100 20 % PEG im gesamten Mausekörper verteilt (Abbildung A 20). Fluoreszenzsignale wurden u.a. im Blut, dem Herzen, der Lunge, der Leber, der Milz, dem Thorax und dem mediastinalen Lymphknoten gefunden. Für DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG war eine Anreicherung der Liposomen in der Leber und Milz zu verzeichnen (Abbildung 34A). Im Infarktgebiet war kein Anstieg des Fluoreszenzsignals sichtbar. Auch das dreifache Injektionsschema (Abbildung 34B) führte für S100 20 % PEG Liposomen zu einer Anreicherung der Liposomen im gesamten Mausekörper. *Ex vivo* zeigten das Blut, das Herz, die Lunge, die Geschlechtsorgane, die Nieren, die Leber, die Milz und das Infarktgebiet (Haut, Thorax, mediastinale Lymphknoten) jeweils einen Anstieg in den Fluoreszenzintensitäten (Abbildung A 20). Quantitativ war eine Kumulation über die Zeit erkennbar. DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG hingegen reicherten sich lediglich in Leber und Milz an (Abbildung 34B). Im Herz bzw. der Infarktregion wurden nur sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten detektiert.

Für eine immunhistologische Untersuchung von Leber, Milz und Myokardinfarktgebiet wurde je ein repräsentatives Organ des dreifachen Injektionsschemas ausgewählt, immunhistologisch angefärbt und mittels multispektraler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gesunde, unbehandelte Mausorgane dienen als Referenz. Entsprechende Darstellungen zeigt Abbildung 35.

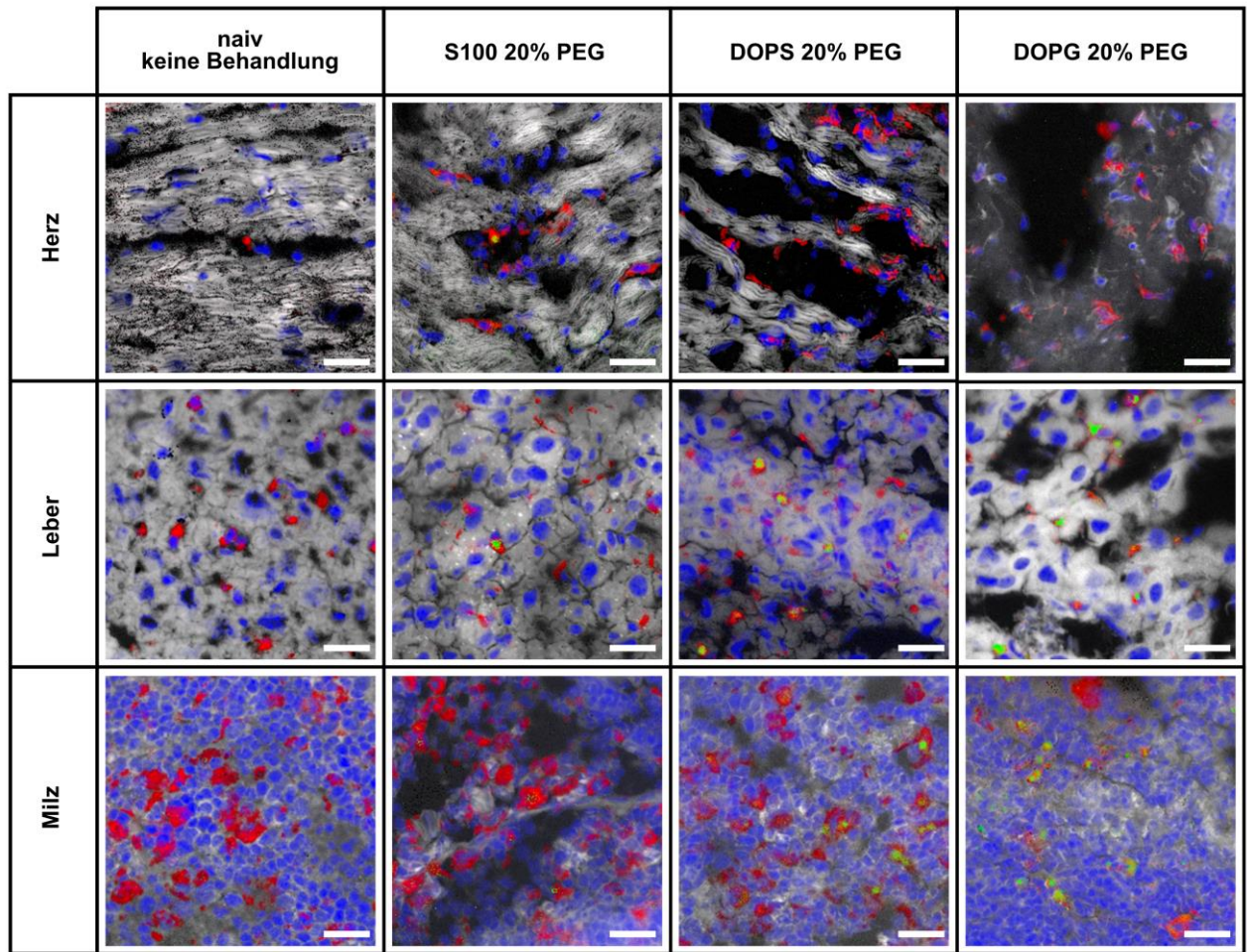


Abbildung 35: Ex vivo Lokalisation DiR-markierter Liposomen in immunhistologisch gefärbten Organen der EMI Mäuse, analysiert mittels multispektraler Fluoreszenzmikroskopie.

Es wurden SKH1 Mäuse der dreifachen Injektion verwendet. Die Gewebeautofluoreszenz ist in weiß, der Nukleus, angefärbt mit DAPI, ist in blau, Zellen des MPS, angefärbt mit ALEXA Fluor 594 nm CD68 Antikörper, sind in rot und DiR-markierter Liposomen sind in grün dargestellt.

Die Maßstabsskala zeigt eine Länge von 50 µm.

In den Geweben der Myokardinfarktregion konnte eine Anreicherung von CD68+ Zellen, bzw. Zellen des MPS, festgestellt werden. Hingegen konnte ein dem DiR zuzuordnendes Fluoreszenzsignal nur für S100 20 % PEG nachgewiesen werden. Für DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG war dies nicht erkennbar. Stattdessen zeigten beide Liposomenformulierungen DiR-Fluoreszenzsignale in Leber und Milz. Für S100 20 % PEG war dies in Leber und Milz eher reduziert. Es erscheint, dass DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG sich vorwiegend in Leber und Milz angereichert haben, wohingegen S100 20 % PEG wohl stärker im gesamten Mauskörper verteilt war. Auffällig war, dass das DiR-Fluoreszenzsignal vorwiegend mit dem Fluoreszenzsignal der CD68+ Zellen zusammenfiel. Dies untermauert die Hypothese, dass die Liposomen von Zellen des MPS phagozytiert und verstoffwechselt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse werden durch die Literatur gestützt. Für PC PEG Liposomen (S100 20 % PEG) ist aufgrund einer höheren Fenestrierung des infarktierten und entzündeten Herzes und eines damit verbundenen *Enhanced Permeation and Retention Effects* (EPR-Effekt) eine passive Anreicherung der Liposomen wahrscheinlich.^{90,133,183} Im Vergleich dazu zeigten DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG eine Anreicherung in Leber und Milz. In der Myokardinfarktregion hingegen konnten keine Liposomen nachgewiesen werden. Harel-Adar *et al.* veröffentlichten 2011 eine Studie über die Modulation kardialer Makrophagen durch Injektion PS-haltiger Liposomen in myokardial infarktierten Ratten.³³ Dort zeigten sie, dass sich die 48 Stunden nach Myokardinfarkt injizierten PS Liposomen im Herzinfarktgebiet anreicherten. Diese Studie war die Erste, die das Potential PS-haltiger Liposomen als Behandlungsoption für den Myokardinfarkt beschrieb. Im Vergleich zu der hier durchgeführten Studie bestehen einige Unterschiede. Besonders hervorzuheben sind physikochemische Unterschiede der Liposomen. Harel-Adar *et al.* verwendeten PS-Liposomen eines mittleren hydrodynamischen Durchmessers von 1,2 µm mit einem PDI von 0,2³³, was eher auf multilamellare Vesikel mit einer breiten Partikelgrößenverteilung schließen lässt. Im Gegensatz dazu wurden hier umfassend charakterisierte nanoskalige Liposomen mit enger Partikelgrößenverteilung verwendet. Diese Liposomen wurden bereits vor dem Setzen der EMI *i.v.* injiziert bzw. anschließend insgesamt dreifach gegeben. Die Mäuse wurden nach 48 Stunden nach Setzen der EMI getötet, wohingegen die Ratten bei Harel-Adar *et al.* erst 48 Stunden nach Setzen des Myokardinfarktes PS Liposomen *i.v.* erhielten und nachfolgend nach insgesamt 6 Tagen nach Setzen des Herzinfarktes getötet wurden. Behält man pathophysiologische Mechanismen des infarktierten Herzes, wie z.B. die sequentielle Einwanderung von Makrophagen während der ersten Tage nach Myokardinfarkt^{184,185} im Hinterkopf (1.2 Akuter Myokardinfarkt), ist zu vermuten, dass 48 Stunden nach EMI die Mobilisierung der Makrophagen aus Leber und Milz noch nicht ihr Maximum erreicht hat. Dies ist ein wahrscheinlicher Grund, warum weder DOPS 20 % PEG noch DOPG 20 % PEG im infarktierten Herzen wiedergefunden werden konnten. Für zukünftige Versuche ist es daher unerlässlich die Untersuchungszeitspanne zu vergrößern, um sicherzustellen, dass eine Monozyten- und Makrophagenmobilisierung eingesetzt hat. Nichts desto weniger ist jedoch der Ansatz eines passiven *Targeting* durch S100 20 % PEG und das aktive *Targeting* mittels DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG durch Makrophagenphagozytose mit anschließender -mobilisierung ein interessanter Ansatz für die Behandlung der Entzündung nach Myokardinfarkt. Es ist anzuraten, diese Behandlungsoption in einer nachfolgenden Therapiestudie detailliert zu betrachten.

3.3 Mischmizellen²

3.3.1 Allgemeines

Das *Quality Target Product Profile* für nanoskalige Mischmizellenformulierungen ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Es diente der Vordefinition wichtiger physikochemischer Parameter, die für die Herstellung der Mischmizellen einzuhalten waren.

Tabelle 14: *Quality Target Product Profile* für Mischmizellenformulierungen.

Parameter	Wert
Optische Eigenschaften	isotrop, klar
Größe	< 1 µm
Größenverteilung	Definiert (PDI < 0,3)

Neben den synthetischen anionischen Phospholipiden DOPS und DOPG wurden auch die natürlichen Phospholipide SPS und EPG für die Herstellung von Mischmizellen verwendet. Gallensalz-Mischmizellen wurden systematisch und vergleichend untersucht. Nachfolgend ist die Zusammensetzung und Nomenklatur der untersuchten Mischmizellen dargestellt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammensetzung der Mischmizellenformulierungen.

Mischmizellenformulierung	S100 (mg)	DOPS (mg)	DOPG (mg)	SPS (mg)	EPG (mg)	Natriumcholat (mg)
S100	10					10
DOPS	4	6				10
DOPG	4		6			10
SPS	4			6		10
EPG	4				6	10

² Ergebnisse dieses Kapitels wurden publiziert in:
Klein, M.E., *et al.* Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) enriched mixed micelles (MM): A new nano-drug delivery system with anti-inflammatory potential?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 152 (2020)

3.3.2 Physikochemische Charakterisierung

3.3.2.1 Kritische Mizellbildungskonzentration

Zu Beginn wurde das Selbstaggregationsverhalten des amphiphilen Trihydroxygallensalzes Natriumcholol untersucht. Eine Selbstaggregation erfolgt erst oberhalb der CMC und oberhalb der kritischen Mizellbildungstemperatur (CMT).⁹⁵ Die Bildung der kolloidalen Mizellenaggregate verläuft spontan und ohne Energieaufwand.¹⁸⁶ Die Mizellen sind thermodynamisch stabil.¹⁸⁶ Die CMT für Natriumcholol liegt gemäß Hofmann und Small unterhalb 0 °C.¹⁸⁶ Die Herstellung der Mischmizellen erfolgte bei Raumtemperatur, sodass die CMT von Natriumcholol bereits überschritten war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher nur die CMC experimentell ermittelt. Das Erreichen der CMC ist allgemein durch eine Änderung von physikalischen Eigenschaften gekennzeichnet. Hierzu zählen u.a. Änderungen der Leitfähigkeit, des osmotischen Drucks, der Grenzflächenspannung sowie der Trübung.¹⁸⁷ Die CMC wurde als Änderung der Grenzflächenspannung/Oberflächenspannung nach der Ring Methode nach Du Noüy ermittelt.¹⁸⁸ Hierbei wurde die Oberflächenspannung gegen die Konzentration an Natriumcholol aufgetragen. Graphisch ist dies in Abbildung 36 dargestellt.

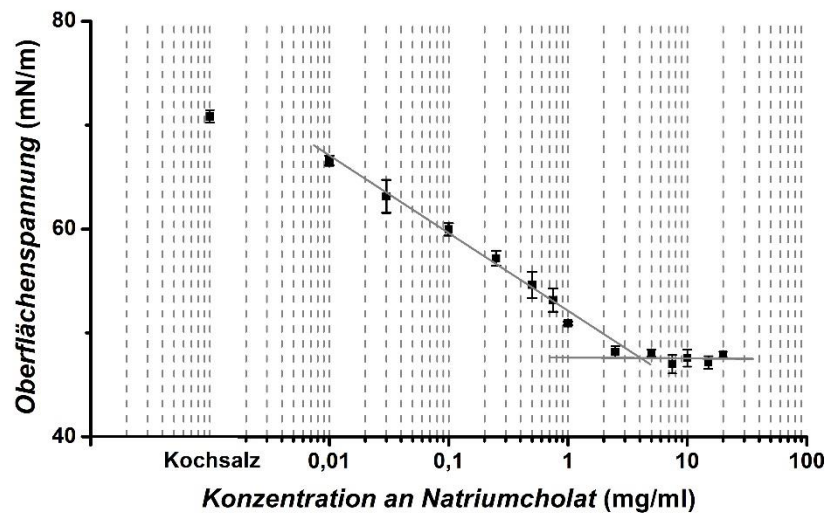


Abbildung 36: Oberflächenspannung von Natriumcholol in isotoner Kochsalzlösung, bestimmt mittels Ring Methode nach Du Noüy.

Der Schnittpunkt beider Geraden liegt bei 4,3 mg/ml.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Die bei Raumtemperatur experimentell bestimmte CMC von Natriumcholol in isotoner Kochsalzlösung betrug 4,3 mg/ml. Dieser Wert stimmt mit dem durch Garidel *et al.* bestimmten CMC-Wert für Natriumcholol in 0,1 M Kochsalzlösung (297,3 K), welcher durch isothermale Titrationskalorimetrie ermittelt wurde, überein.¹⁸⁹ Ab einer Konzentration von 4,3 mg/ml Natriumcholol ist es daher wahrscheinlich, dass sich Natriumchololmizellen bilden. Weiterhin gibt

die CMC Auskunft, ab welcher Konzentration Natriumchololat in der Lage ist, z.B. Phospholipide zu solubilisieren und Mischmizellen zu bilden.¹⁹⁰ Es ist anzunehmen, dass bei Überschreiten der CMC eine Bildung von Mischmizellen erfolgt. Dies wurde nachfolgend durch Trübungsmessungen charakterisiert.

3.3.2.2 Trübungsmessung

Die Trübungsmessungen fanden an Mischungen aus Phospholipid und Natriumchololat (Gesamtkonzentration: 10 mg/ml), hergestellt in isotoner Kochsalzlösung, statt. Eine vollständige Solubilisierung der Phospholipide wurde durch das Entstehen einer optisch isotropen, klaren Lösung charakterisiert.⁹¹ Hierfür wurde die Trübung der Mischungen analog Rupp *et al.* spektral-photometrisch bei einer Wellenlänge von λ 660 nm gegen reine Kochsalzlösung bestimmt.¹⁹¹ Als Phospholipide wurden das natürliche, ungesättigte S100 sowie das natürliche, gesättigte SPC-3, untersucht. Die prozentuale Transmission in Abhängigkeit der Art und des Massenanteils der Phospholipide sind in Abbildung 37A graphisch und in Abbildung 37B für S100 und in Abbildung 37C für SPC-3 visuell dargestellt.

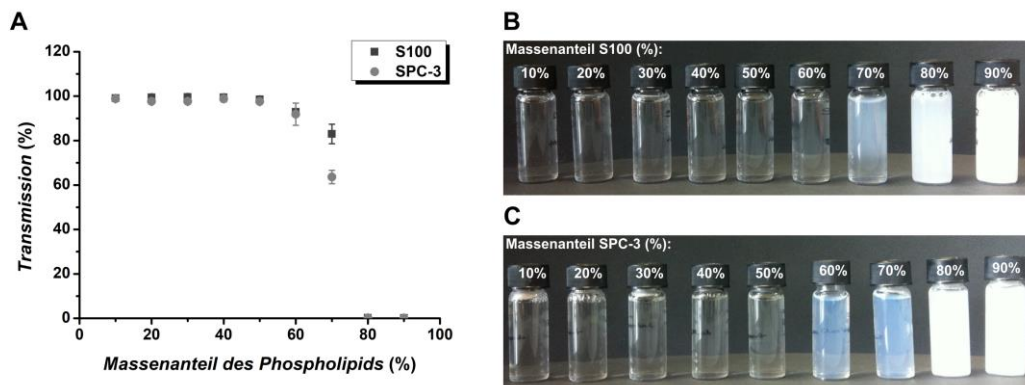


Abbildung 37: Trübungsmessungen an Phospholipid-Natriumchololat-Mischungen, bestimmt mittels Spektralphotometer.

A) zeigt die prozentuale Transmission in Abhängigkeit von der Art und des Massenanteils des jeweiligen Phospholipids. B) und C) veranschaulichen makroskopische Aufnahmen für S100 für SPC-3.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 2 natürlichen Replikaten.

Primär war ein Einfluss der Art des Phospholipids zu erkennen (Abbildung 37). Das ungesättigte S100 wurde bis zu einem Prozentsatz von 60 % Phospholipid solubilisiert (Abbildung 37A, B), wohingegen das gesättigte SPC-3 bereits bei 60 % Phospholipid eine sichtbare Trübung zeigte (Abbildung 37A, C). Es waren also 4 mg (S100) bzw. 5 mg (SPC-3) Natriumchololat notwendig, um für eine Gesamtkonzentration von 10 mg optisch isotrope, klare Lösungen aus Phospholipid und Gallensalz herzustellen. Diese Konzentration entspricht grob der CMC (Abbildung 36). Neben der Bildung reiner Gallensalmizellen ist es daher wahrscheinlich, dass sich ab dieser Konzentration auch Mischmizellen aus Phospholipid und Gallensalz formen, wie es bereits durch Schubert

beschrieben ist.¹⁹⁰ Dass das S100 leichter zu solubilisieren war als das SPC-3 erklären Cohen und Carey über die unterschiedliche Packung der Acylketten in den jeweiligen Phospholipiden.¹⁹² Sie untersuchten hierbei systematisch den Einfluss der Sättigung der Acylketten in Phospholipid-Gallensalz-Mischungen und beobachteten, dass ungesättigte Phospholipide vermehrt Mischmizellen bilden, wohingegen gesättigte Phospholipide dazu tendieren, eher vesikuläre Systeme zu bilden.¹⁹² Sie schlussfolgern, dass der Einsatz gesättigter Phospholipide in Mischmizellen eher limitiert ist.¹⁹² Nichts desto trotz ist jedoch auch die Bildung von Mischmizellen mit gesättigten Phospholipiden möglich, wie Hildebrand *et al.* am Beispiel von DPPC/DPPG [1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) Natrium] Vesikeln veranschaulichten.¹⁹³ Aufgrund der ausschließlichen Verwendung von ungesättigten Phospholipiden in den konventionellen Liposomen (3.2.1 Allgemeines) und der einfacheren Herstellung der Mischmizellen mit ungesättigten Phospholipiden wurde in dieser Arbeit mit S100, DOPS, DOPG, SPS und EPG als Bestandteile der Mischmizellen gearbeitet. Es wurde ein Mischungsverhältnis von 50 % Phospholipid zu 50 % Gallensalz gewählt, bei welchem optisch isotrope, klare Lösungen entstehen (Abbildung 37). Das *Quality Target Product Profile* wurde somit in diesem Punkt erfüllt.

3.3.2.3 Größe und Größenverteilung

Die Größe und Größenverteilung der Mischmizellen wurde unverdünnt mittels DLS bestimmt. Das Ziel war es, Mischmizellen definierter Größenverteilung zu formulieren. Eine Größe kleiner 1 μm war erwünscht, um das Risiko embolischer Ereignisse nach parenteraler Applikation zu reduzieren (3.2.2.2 Größe und Größenverteilung).¹³⁶ Die Ergebnisse der DLS sind in Abbildung 38 dargestellt.

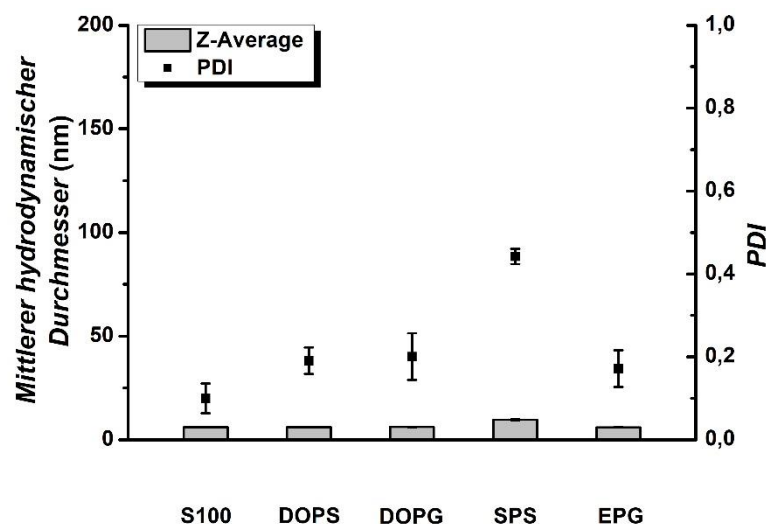


Abbildung 38: Größe und Größenverteilung der Mischmizellen, bestimmt mittels DLS.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

S100, DOPS, DOPG und EPG besaßen mittlere hydrodynamische Durchmesser von ca. 10 nm mit Polydispersitätsindizes von maximal 0,2. Dies entspricht einer definierten Größenverteilung.¹³⁷ Die Ergebnisse entsprechen denen von Schurtenberger *et al.*¹⁹⁴ Für Mischmizellen ermittelten sie hydrodynamische Radien von ca. 50 Å (= 5 nm) mit Polydispersitätsindizes von 0,3.¹⁹⁴ SPS hingegen zeigten einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ca. 20 nm und einen Polydispersitätsindex von 0,4. Dies entspricht keiner definierten Verteilung¹³⁷, verschiedene Kolloide, z.B. Mischmizellen, Mizellen, Mischvesikel und Vesikel scheinen hier nebeneinander vorzuliegen.¹⁹⁵ Die Darstellungen der intensitätsgewichteten Größenverteilungen bestätigen dies (Abbildung A 21). Das unterschiedliche Verhalten von SPS und DOPS ist wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Gehalt an Ca²⁺-Ionen in den Ausgangsprodukten des Herstellers Lipoid GmbH zurückzuführen. SPS enthält im Vergleich zu DOPS eine 10-fach höhere Konzentration an Ca²⁺-Ionen (Tabelle A 7), was eine Aggregation des negativ geladenen PS zu Phospholipid-doppelschichten realistisch erscheinen lässt.⁷⁹

Eine detaillierte Arbeit über das Aggregationsverhalten anionischer Phospholipide in großen unilamellaren Vesikeln wurde 2018 von Rahnfeld *et al.* publiziert.¹⁴⁵ Sie untersuchten u.a. PA, PS und PG für eine potentielle Nutzung als *in situ* aggregierendes Arzneiträgersystem.¹⁴⁵ Sie variierten neben der Fettsäurezusammensetzung (Vergleich ungesättigter mit gesättigten Phospholipiden) auch die Art des divalenten Kations (Ca²⁺ und Mg²⁺) und konnten verdeutlichen, dass eine Aggregation anionischer Phospholipide durch divalente Kationen möglich ist.¹⁴⁵ Die gesättigten PS und PG zeigten hierbei leichte Aggregationstendenzen in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen, wohingegen die ungesättigten PS und PG kaum zur Aggregation neigten.¹⁴⁵

Nachfolgend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Studie mit künstlich zugesetzten Ca²⁺-Ionen und einer anschließenden Komplexierung der Ca²⁺-Ionen mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) am Beispiel von PS durchgeführt. Die Aggregation wurde makroskopisch visuell sowie mittels DLS untersucht. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (Abbildung A 22). Eine künstliche Erhöhung der Ca²⁺-Ionen-Konzentration in DOPS auf die Ca²⁺-Ionen-Konzentration in SPS führte zu einer Erhöhung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers und zu einem Anstieg des Polydispersitätsindex der Mischmizellen (Abbildung A 22A). Eine Ca²⁺-Ionen-abhängige Aggregation kann hier vermutet werden. Die nachfolgende Zugabe von EDTA reduzierte sowohl den mittleren hydrodynamischen Durchmesser als auch den Polydispersitätsindex von DOPS und SPS. Diese mittleren hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindizes waren mit denen anderer Mischmizellenformulierungen vergleichbar. Makroskopisch visualisiert ist dies für SPS (ohne EDTA = trüb, mit EDTA = optisch klar) ebenfalls im Anhang dargestellt (Abbildung A 22B). Für PG wurde dieser Versuch nicht durchgeführt, da hier die Ca²⁺-Ionen-Konzentration in den Ausgangsprodukten des Herstellers Lipoid GmbH sowohl für DOPG als auch EPG so niedrig war (Tabelle A 7), dass kaum Aggregation zu erwarten¹⁴⁵ und zu beobachten war.

3.3.2.4 Verdünnungsverhalten

Mit der Intension einer späteren parenteralen Applikation ist eine Verdünnung der Mischmizellen mindestens *in vivo* zu erwarten. Da sich hierbei das Mischungsverhältnis zwischen Gallensalz, Phospholipid und wässriger Phase zugunsten der wässrigen Phase ändert, ist zu vermuten, dass sich auch die Mischmizellen- bzw. Aggregatzusammensetzung ändert.¹⁹⁵ Ein kritischer Parameter ist hierbei die Größe der Aggregate. Bereits in den 1980er Jahren wurde festgestellt, dass Mischmizellen nach Verdünnung ein Größenwachstum erfahren.^{194–196} Dies könnte *in vivo*, nach parenteraler Applikation potentiell kritisch sein und zu einer Embolie führen.¹³⁶ Daher wurde nachfolgend das Verdünnungsverhalten aller Mischmizellen in isotoner Kochsalzlösung mittels DLS untersucht. Für die Untersuchung wurden die Mischmizellen geometrisch verdünnt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 zusammengefasst.

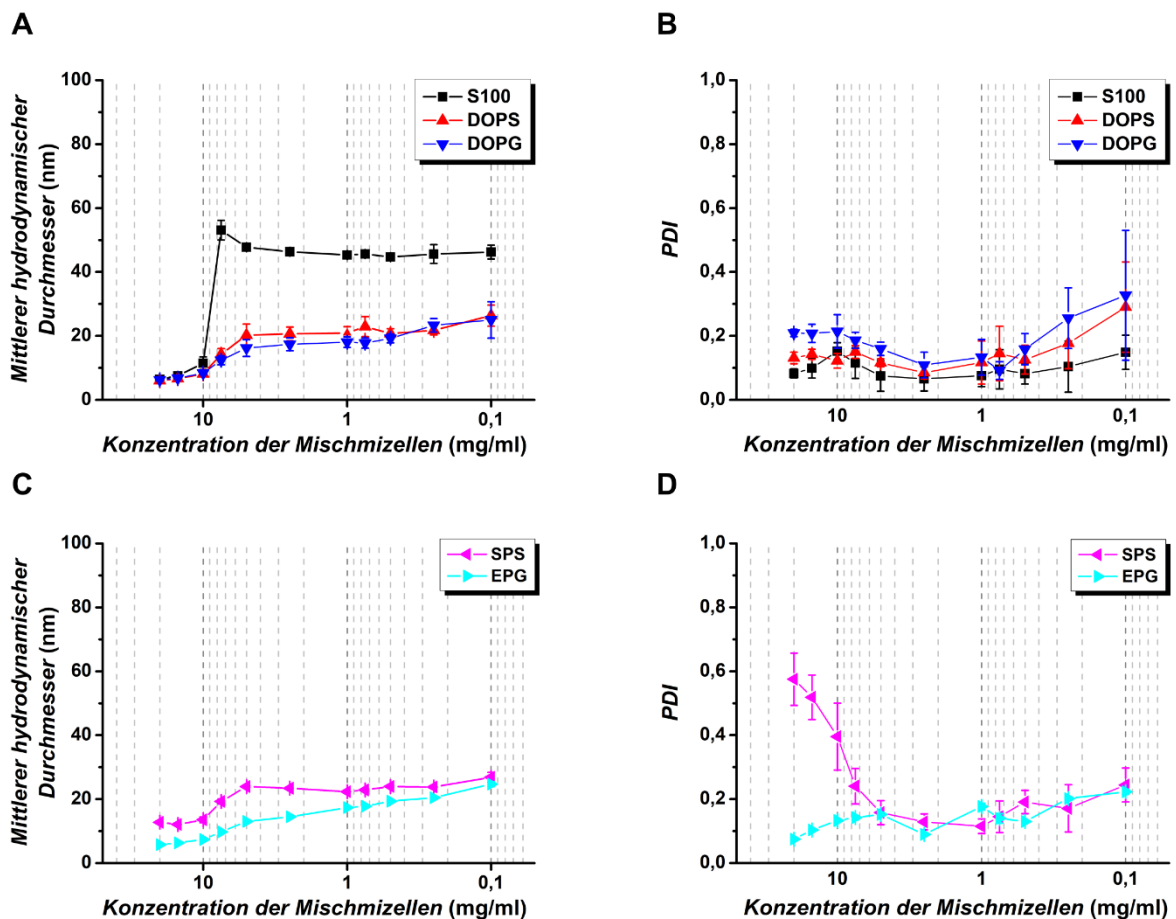


Abbildung 39: Verdünnungsverhalten der Mischmizellen, bestimmt mittels DLS.

A) und C) zeigen mittlere hydrodynamischen Durchmesser und B) und D) Polydispersitätsindices. In A) und B) sind S100, DOPS und DOPG und in C) und D) SPS und EPG präsentiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Sie zeigen für S100, DOPS, DOPG und EPG bis zu einer Gesamtkonzentration von 10 mg/ml Mischmizellen eines Durchmessers von ca. 10 nm mit Polydispersitätsindizes von max. 0,2. Für SPS wurden aufgrund des hohen Ca^{2+} -Ionen-Gehaltes größere Aggregate erhalten. Der Z-Average liegt bei 15 nm und der PDI bei 0,6, was einer polymodalen Verteilung entspricht. Unterhalb der Gesamtkonzentration von 10 mg/ml nahm der mittlere hydrodynamische Durchmesser aller Mischmizellen zu und der Polydispersitätsindex ab. S100 zeigte hier eine Größe von ca. 50 nm Durchmesser, wohingegen anionische Phospholipide Aggregate einer Größe von ca. 20 nm aufwiesen.

Das Größenwachstum in verdünnten Mischmizellen kann allgemein durch die Bildung von Mischvesikeln und Vesikeln erklärt werden.^{194–196} Unterhalb der CMC des Gallensalzes (Mischmizellenkonzentration < 10 mg) (3.3.2.1 Kritische Mizellbildungskonzentration) ist es wahrscheinlich, dass es die Phospholipide nicht mehr ausreichend solubilisieren kann.¹⁹⁰ Das Gallensalz liegt dann teilweise als Monomer und Mizelle vor. In der Mischmizelle hingegen steigt der Anteil an Phospholipid, wodurch dieses nicht mehr vollständig solubilisiert wird. Als Resultat formt das Phospholipid im wässrigen Milieu Mischvesikel bzw. bildet vesikuläre Strukturen.^{194–196} Schurtenberger *et al.* erhielten vergleichbare Ergebnisse.^{194–196} Der Übergang von Mischmizellen in vesikuläre Strukturen wurde nachfolgend mittels *negative-stain*-EM (3.3.2.5 Morphologie) sowie durch andere Arbeitsgruppen mittels NMR¹⁹⁷, SANS¹⁹⁸ und kryo-TEM¹⁹⁹ bestätigt. Die unterschiedlichen Größen von neutralen und anionischen Phospholipidaggregaten ist vermutlich bedingt durch die unterschiedliche Kopfgruppe und damit verbunden mit einer unterschiedlichen Packung.⁸¹ Hildebrand *et al.* veranschaulichten dies anhand von Studien an DPPG und DPPC. Sie stellten fest, dass DPPG dichter gepackt ist als DPPC.¹⁹³ Daher entstehen für DPPG kleinere Aggregate mit größerer spontaner Krümmung als für DPPC.^{81,193} Auch Schubert beschrieb dieses Phänomen für PS.¹⁹⁰ PS zeigte in verdünnten Mischmizellen kleinere Aggregate als PC.¹⁹⁰ Weiterhin beschrieb Schubert, dass die Verdünnung von Mischmizellen auch für die Herstellung von monomodal verteilten vorwiegend unilamellaren Liposomen genutzt werden kann. Er nennt diese Methode Detergenz-Entfernungs-Methode.¹⁹⁰ Im Rahmen der Verdünnung der hier hergestellten Mischmizellen konnten mittels DLS ebenfalls Aggregate definierter Größe und Größenverteilung detektiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um Mischvesikel oder Vesikel handelt. Der Nachweis von Vesikeln erfolgte nachfolgend mit Hilfe der *negativ-stain*-EM (3.3.2.5 Morphologie).

3.3.2.5 Morphologie

Zur Bestätigung der Größe und Größenverteilung sowie zur detaillierten Charakterisierung der Mischmizellenaggregate nach Verdünnung wurden *negative-stain*-EM-Aufnahmen angefertigt. Die Präparation erfolgte bei Raumtemperatur bei einer Mischmizellenkonzentration von 0,2 mg/ml (entspricht 0,1 mg/ml Phospholipid). In diesem Konzentrationsbereich waren in der DLS bereits Aggregate detektierbar (3.3.2.4 Verdünnungsverhalten). Die entsprechenden Bilder sind in Abbildung 40 visualisiert.

In allen verdünnten Mischmizellen konnte ein Übergang von Mischmizellen zu Mischvesikeln und Vesikeln verzeichnet werden. Besonders DOPS und EPG zeigten Vesikel von kleiner Größe, enger Größenverteilung und homogener Morphologie. Für S100 und DOPG hingegen wurden Vesikel heterogenerer Größe und Morphologie detektiert. SPS zeigte neben kleinen Vesikeln homogener Größe und Morphologie auch Aggregate mit Größen von mehreren hundert Nanometern. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um die durch Ca^{2+} -Ionen entstandenen SPS-Aggregate handelt.

In vivo kann das Größenwachstum von Mischmizellen nach parenteraler Applikation u.U. zu thromboembolischen Ereignissen führen. Galletly *et al.* untersuchten daher systematisch Gefäßverschlüsse bzw. Thrombosen nach Gaben von Diazepam (VALIUM®) als Propylenglykolformulierung und Mischmizellenformulierung im Vergleich zu einer Midazolam-Wirkstoffformulierung.²⁰⁰ Hierbei wiesen die Mischmizellen eine signifikant geringere Inzidenz für venöse Ereignisse auf, als die etablierte Propylenglykolformulierung bzw. die reine Wirkstoffformulierung von Midazolam.²⁰⁰ Die Mischmizellen wurden daher als sicher und als Alternative zur etablierten Formulierung vorgeschlagen.²⁰⁰ Im Kontext dieser Veröffentlichung und dem in dieser Arbeit gezeigten Größenwachstum der Mischmizellen zu mittleren hydrodynamischen Durchmessern von maximal 50 nm und enger Größenverteilung, wird das Risiko für Gefäßverschlüsse bzw. Embolien nach *i.v.* Applikation als gering bewertet.¹³⁶ Jedoch wird aufgrund der höheren Ca^{2+} -Ionen-Konzentration im Ausgangsprodukt der Lipoid GmbH und dem damit verbundenen Aggregationsverhalten des natürlichen SPS empfohlen, *in vivo* mit den synthetischen anionischen Phospholipiden weiter zu arbeiten.

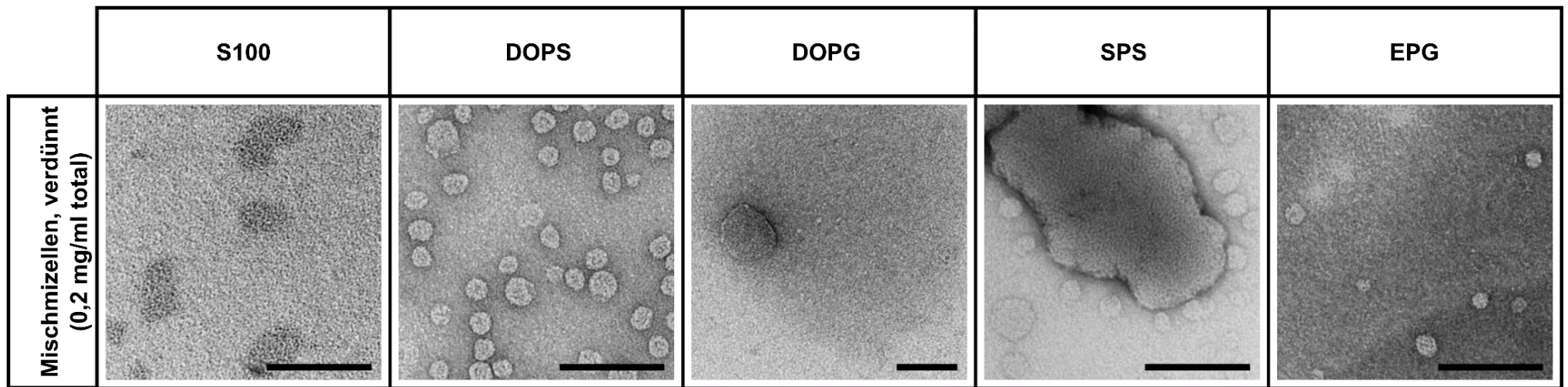


Abbildung 40: Morphologie, Größe und Größenverteilung der verdünnten Mischmizellen, bestimmt mittels *negative-stain-EM*.

Die Maßstabsskala zeigt eine Länge von 100 nm.

3.3.2.6 Oberflächenladung

In Anlehnung an die Eigenschaften von Liposomenformulierungen erfolgte auch für Mischmizellen der Versuch der Bestimmung des Zetapotentials mittels ELS. Mischmizellen sind jedoch im Gegensatz zu Liposomen als dynamische Systeme zu charakterisieren. Die Ausbildung einer Grenzfläche bzw. Oberfläche ist dynamisch, ebenso deren Morphologie. Es existieren verschiedene Modellvorstellungen. Small⁹⁵ und Mazer⁹⁶ beschrieben scheibenförmige, Hjelm^{97,100} hingegen stäbchenförmige Strukturen. Das Modell der Stäbchen-Mischmizelle ist das aktuell durch Röntgenstreuung⁹⁸, NMR⁹⁹ und SANS^{97,100} am besten untermauert. Es wird ein Radius der Stäbchen von 27 Å angenommen.¹⁰⁰ Die Länge der Stäbchen kann in Abhängigkeit der Konzentration der Mischmizellen, des Mischungsverhältnisses Phospholipid zu Gallensalz sowie der Umgebungsbedingungen, wie Ionenstärke des Mediums oder der Temperatur, variieren.²⁰¹ Aufgrund dieser flexiblen Struktur ist die Ausbildung einer ladungstragenden Oberfläche, auch bei Verdünnung auf 0,25 mg/ml Phospholipid, wenig wahrscheinlich. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der ELS untermauert. Sie sind im Anhang dargestellt (Abbildung A 23).

Die Zetapotentiale der Mischmizellen zeigten den Trend, dass Systeme mit anionischen Phospholipiden negativere Zetapotentiale besaßen, als S100. Die Zetapotentiale, bestimmt in isotoner Kochsalzlösung (hohe Ionenleitfähigkeit), waren für DOPG und EPG vom Betrag her teilweise größer als die in Glucoselösung (niedrige Ionenleitfähigkeit) Gemessenen. Für S100, DOPS und SPS war dies genau umgekehrt, was dem Verhalten der Liposomen ähnelt (3.2.2.4 Oberflächenladung). Jedoch waren hier die Absolutwerte der Mischmizellen nicht mit denen der Liposomen vergleichbar. Die Interpretation dieser Daten ist komplex. Dass speziell DOPS und SPS ähnliche Tendenzen zeigten, wie die entsprechenden Liposomen, ist vermutlich auf eine Interaktion mit Ca²⁺-Ionen zurückzuführen. Aufgrund des höheren Gehaltes an divalenten Kationen ist eine Aggregatbildung mit PS anzunehmen.¹⁴⁵ Für DOPG und EPG scheint die Aggregatbildung erst bei höheren Ca²⁺-Ionen-Konzentrationen einzusetzen, was mit den Ergebnissen von Rahmfeld *et al.* übereinstimmt¹⁴⁵, sodass in diesen Mischmizellen vermutlich dynamischere Systeme, ohne eine wirklich definierte Grenzfläche, vorliegen. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Ergebnisse der DLS (3.3.2.3 Größe und Größenverteilung, 3.3.2.4 Verdünnungsverhalten) und der *negative-stain*-EM (3.3.2.5 Morphologie). Besonders für SPS konnten große Aggregate nachgewiesen werden. In den anderen Mischmizellenformulierungen hingegen scheinen primär Mischmizellen vorzuliegen, wobei DOPS wohl auch die Tendenz zur Aggregatbildung hat. Aufgrund ihrer Größe von ca. 10 nm mittlerem hydrodynamischen Durchmesser und ihrer dynamischen Eigenschaften ist die Bestimmung eines Oberflächenpotentials mittels ELS erschwert. Daher wurde auf eine weitere Analytik in diesem Bereich verzichtet.

3.3.3 Stabilitätsuntersuchungen

3.3.3.1 Chemische Stabilität

Im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen wurden die Stabilität der Mischmizellen bei einer Lagerung bei 8 °C und vor Licht geschützt, untersucht. Die Dauer für die chemische Analytik (NP-HPLC) betrug 14 Tage, für die physikochemische Analytik (DLS) 28 Tage. Die Ergebnisse der chemischen Stabilitätsuntersuchungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

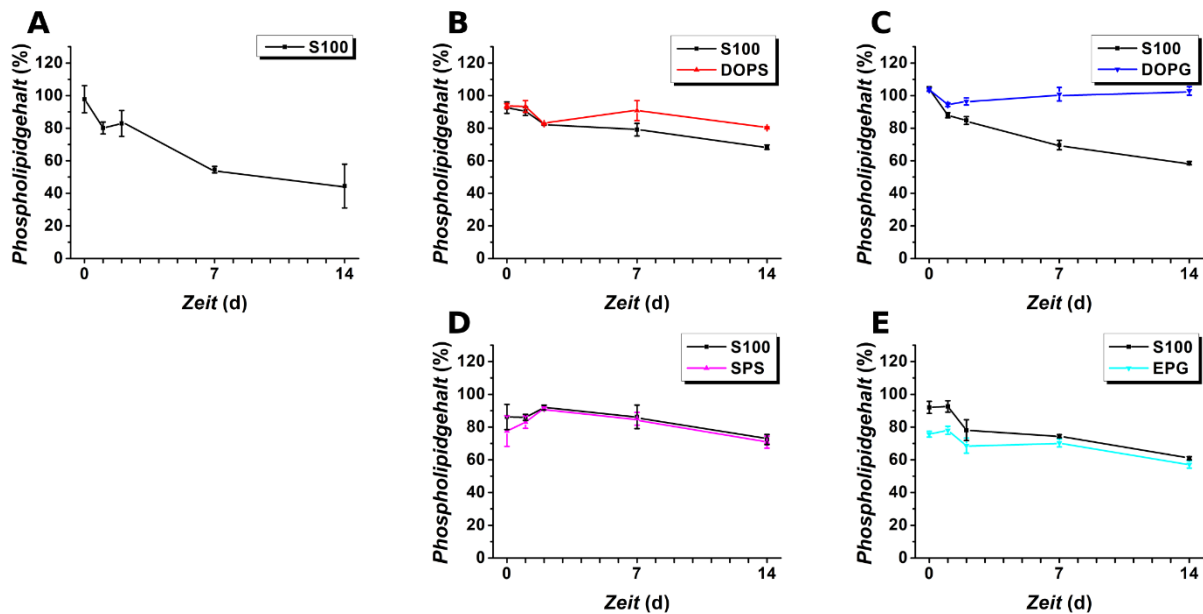


Abbildung 41: Chemische Stabilität von Mischmizellen, bestimmt mittels NP-HPLC.

Die Dauer der Stabilitätsuntersuchung betrug 14 Tage, die Lagerung erfolgte bei 8 °C vor Licht geschützt. A) zeigt S100, B) DOPS, C) DOPG, D) SPS und E) EPG Mischmizellen. Die Relativwerte sind bezogen auf den Sollgehalt des jeweiligen Phospholipids.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Das natürliche S100 zeigte über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen eine Reduktion des Gehalts von anfänglich 100 % auf 40 % zum Ende der Lagerzeit (Abbildung 41A). Für DOPS (Abbildung 41B) und DOPG (Abbildung 41C), hingegen wurde lediglich eine Reduktion der Gehalte um ca. 15 % festgestellt, wohingegen SPS (Abbildung 41D) und EPG (Abbildung 41E) eine Gehaltsreduktion von ca. 20-30 % zeigten. Es war festzustellen, dass analog der konventionellen Liposomen (3.2.3.1 Chemische Stabilität) die natürlichen Phospholipide S100, SPS und EPG schneller durch Oxidation bzw. Hydrolyse abgebaut wurden, als die synthetischen, einfach ungesättigten Phospholipide DOPS und DOPG. Darüber hinaus zeigten die Mischmizellen eine etwas geringere chemische Stabilität im Vergleich zu den Liposomen (3.2.3.1 Chemische Stabilität). Für die Mischmizellen war bereits nach 14 Tagen ein Abbau der Phospholipide zu verzeichnen, wohingegen die Liposomen erst nach 28 Tagen Abbau zeigten.

Die geringere chemische Stabilität der Phospholipide in den Mischmizellen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den durch das Gallensalz veränderten Aggregationszustand zurückzuführen. Bereits 1981 untersuchten Kepsil und Dennis das Hydrolyseverhalten von Phospholipiden in Abhängigkeit von ihrem Aggregationszustand.¹⁴⁹ Sie unterschieden hierbei in liposomale und mischmizellare Systeme. Als Detergenz wurde Triton-X-100 in den Mischmizellenformulierungen verwendet.¹⁴⁹ Sie konnten verdeutlichen, dass Liposomen eine 10- bis 20-fach geringere Hydrolyserate aufwiesen, als die entsprechenden Mischmizellen.¹⁴⁹ Begründet wurde dies durch unterschiedliche Eigenschaften der Phospholipid/Wasser Grenzflächen in den jeweiligen Systemen.¹⁴⁹ Hierzu zählten sie Unterschiede in den Dielektrizitätskonstanten, Unterschiede in den Grenzflächenkonzentrationen an Hydroxid-Ionen, Unterschiede in der Packung der Phospholipide sowie Unterschiede in der Zugänglichkeit des Dispersionsmediums.¹⁴⁹ Besonders hoben sie hervor, dass Phospholipide in mischmizellaren Systemen „lockerer“ gepackt sind, als in vesikulären Systemen.¹⁴⁹ Daraus resultierend wird, ihrer Meinung nach, das Eindringen von Hydroxid-Ionen zu den entsprechenden Esterbindungen der Phospholipide begünstigt und die Hydrolyse zu Lyso-Produkten erfolgt schneller. Aufgrund dieser Überlegungen wurden 1985 im Rahmen der Zulassung der VALIUM® Mischmizellen künstlich gealterte Formulierungen mit erhöhtem Lyso-Phosphatidylcholin-Anteil auf ihre Sicherheit *in vivo* untersucht.¹⁰³ Die Verträglichkeit war gegeben.¹⁰³ Um jedoch der geringeren chemischen Stabilität wässriger Mischmizellen Rechnung zu tragen, erscheint es sinnvoll, die Phospholipid-Gallensalz-Filme als Präkonzentrat zu lagern und die eigentlichen Mischmizellen erst kurz vor Verwendung durch Zugabe von Dispersionsmedium mit anschließender Sterilfiltration herzustellen.

3.3.3.2 Physikochemische Stabilität

Die physikochemischen Stabilitätsdaten der Mischmizellen sind im Anhang zu finden (Tabelle A 8). Bis auf SPS zeigten alle Mischmizellen weder eine Veränderung in ihrer Größe noch in ihrer Größenverteilung. Für SPS hingegen wurde Größenwachstum festgestellt. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Ca²⁺-Ionen-vermittelte Aggregationsverhalten von PS zurückzuführen (3.3.2.3 Größe und Größenverteilung). Die physikochemische Integrität der Mischmizellen scheint über den Untersuchungszeitraum gegeben. Ein chemischer Abbau ist jedoch wahrscheinlich (3.3.3.1 Chemische Stabilität). Daher wurden für die biologischen *in vitro* Untersuchungen, ebenso wie auch bei den Liposomen, nur frisch hergestellte Mischmizellen verwendet.

3.3.4 Biologische Charakterisierung *in vitro*

3.3.4.1 Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte auch für die Mischmizellen auf gesunden, nicht artifiziellen Fibroblasten-Zelllinien, der murinen 3T3 und der humanen NHDF Zelllinie. Es wurde das Resazurin-Assay verwendet. Für die wissenschaftliche Rationale bezüglich der verwendeten Zelllinien und des Resazurin-Assays ist auf das Kapitel 3.2.4.1 Zellviabilität verwiesen. Für beide Zelllinien wurde die metabolische Aktivität der Zellen nach drei unterschiedlichen Inkubationszeiten (4, 24, 96 Stunden) bestimmt. Das fluoreszierende Produkt Resorufin wurde spektralfluorometrisch quantifiziert. Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden die Mischmizellen analog den Liposomen verdünnt (3.2.4.1 Zellviabilität). Es wurden Konzentrationen von 10 µg/ml, 30 µg/ml und 100 µg/ml untersucht. Darüber hinaus wurde zusätzlich eine Maximalkonzentration von 200 µg/ml gewählt. Dies diente der Überprüfung der Sicherheit bei einer etwaigen Überdosierung der Mischmizellen. Die Ergebnisse für die 24 Stunden Inkubation sind in Abbildung 42 dargestellt.

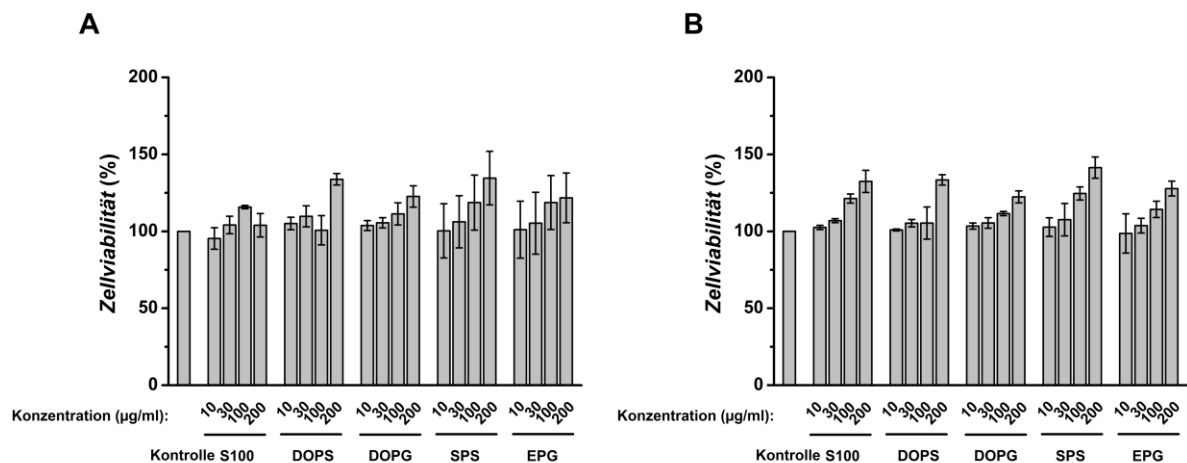


Abbildung 42: Zellviabilität der Mischmizellen auf auf Fibroblasten-Zelllinien, bestimmt mittels Resazurin-Assay.

Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. A) zeigt die Zellviabilität von murinen 3T3 und B) die von humanen NHDF Zellen. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der unbehandelten Kontrolle $\leq 15\%$ war.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen Zellviabilitäten, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Für keine der untersuchten Mischmizellenformulierungen wurde eine Reduktion der Zellviabilität festgestellt (Abbildung 42). Stattdessen zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der prozentualen Zellviabilität, sogar über den Referenzwert der unbehandelten Kontrolle hinaus. Auch für die weiteren Inkubationszeitpunkte 4 und 96 Stunden konnten vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Sie sind im Anhang zu finden (Abbildung A 24).

Eine mögliche Ursache für die Zunahme der Zellviabilität kann eine leichte Phagozytoseaktivität der Fibroblasten sein, wie sie bei Gauthier *et al.* beschrieben ist.¹¹⁹ Sie formulierten, dass die Phospholipidbestandteile ursächlich für die höhere Lebensfähigkeit der Fibroblasten sind. Für das Gallensalz hingegen, welches als Detergenz potentiell toxisch wirken kann, scheint ein negativer Einfluss gering. Dies ist auf der einen Seite durch die niedrige Gallensalzkonzentration (maximal 100 µg/ml) aber auch durch den protektiven Effekt der Phospholipide zu begründen. Die Phospholipide sind in der Lage, das toxische bzw. hämolytische Verhalten von Gallensalzen zu reduzieren.^{157,202} Narain *et al.* vermuteten, dass Lecithin bzw. Phospholipide die Zellmembranen vor der schädlichen Wirkung durch die Gallensalze schützen.²⁰² Sie schrieben diese Wirkung der Bildung von Mischvesikeln und Mischmizellen aus Phospholipid und Gallensalz zu, wodurch die Anzahl an Gallensalzmonomeren reduziert wird. Das Entstehen von Gallensalzmonomeren und Mischvesikeln ist bei Verdünnung der Mischmizellen wahrscheinlich (3.3.2.4 Verdünnungsverhalten). Es ist möglich, dass dann nachfolgend das Gallensalz an Albumin, welches u.a. in FBS enthalten ist, bindet.^{102,203–205} Bereits 1956 wurde publiziert, dass Gallensalze an Plasmaproteine, vorwiegend an Albumin, binden. Eine protektive Wirkung des Albumins auf das lytische Verhalten der Gallensalze in Gegenwart von RBC wurde beschrieben.²⁰³ Neben der protektiven Eigenschaften der Phospholipide ist auch eine Interaktion zwischen Gallensalz und Albumin eine mögliche Erklärung für die hier erhaltenen Ergebnisse.

3.3.4.2 Hämolyse

Auch die Untersuchung der verdünnten Mischmizellen an humanen RBC bestätigt das wenig toxische Verhalten der verdünnten Mischmizellen. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten zeigte keine der Mischmizellen Hämolyseeigenschaften (Abbildung 43). Alle verdünnten Mischmizellen konnten analog den Liposomen (3.2.4.2 Hämolyse) als nicht hämolytisch (< 2 % Hämolyse, gemäß ASTM F756¹⁰⁹) klassifiziert werden.^{113,114}

Eine weitere, detailliertere Charakterisierung der Hämolyseeigenschaften erfolgte am reinen Gallensalz, im Vergleich zu den Mischmizellen. Hierfür wurden Konzentrationsreihen des Gallensalzes von 100 µg/ml bis 10 mg/ml mit entsprechenden Konzentrationsreihen der Mischmizellen von 100 µg/ml bis 5 mg/ml (für Vergleichszwecke hier bezogen auf das Gallensalz) untersucht. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (Abbildung A 25). Für Natriumcholat (Abbildung A 25A) konnte ab einer Konzentration von 5 mg/ml eine Hämolyse der RBC festgestellt werden. Dies entspricht grob der CMC des Gallensalzes (3.3.2.1 Kritische Mizellbildungskonzentration). Ab dieser Konzentration liegen somit Gallensalzmizellen vor, die in der Lage sind, RBC zu lysieren. Bei niedrigeren Konzentrationen an Natriumcholat war keine Hämolyse ersichtlich.

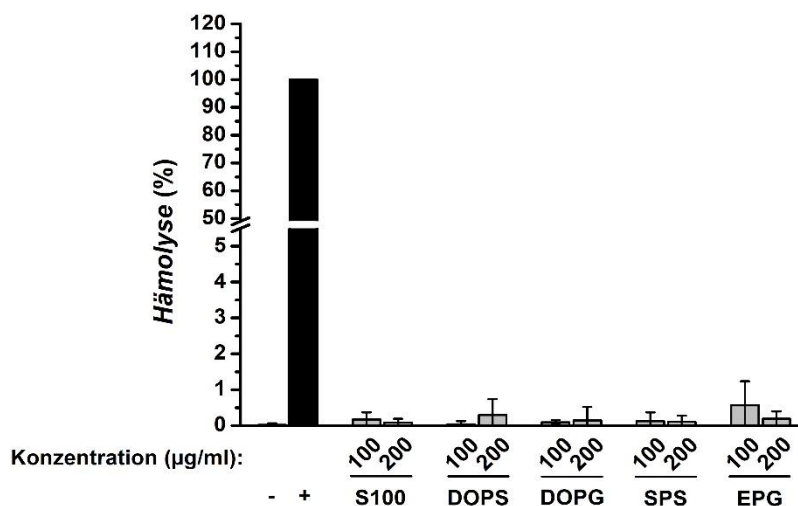


Abbildung 43: Hämolyseseaktivität der Mischmizellen, bestimmt auf RBC.

Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Für die Negativkontrolle (-) wurde PBS, für die Positivkontrolle (2 % SDS) verwendet. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der Positivkontrolle ≤ 25 % war.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Hämolysese in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Für Mischmizellen wurde unterschiedliches Verhalten festgestellt (Abbildung A 25). Für DOPS (Abbildung A 25C) und DOPG (Abbildung A 25D) wurde auch bei einer Gallensalzkonzentration von 5 mg/ml (der aufgrund des Analyseverfahrens höchsten möglichen Gallensalzkonzentration) kaum Hämolysese ermittelt. Die Hämolyseseigenschaften waren als leicht hämolysierend zu klassifizieren (2 % - 5 % Hämolysese).¹⁰⁹ Für SPS (Abbildung A 25E) und EPG (Abbildung A 25F) hingegen konnte Hämoglobin ab einer Konzentration von 5 mg/ml, für S100 (Abbildung A 25B) sogar bereits ab 2,5 mg/ml Gallensalz, nachgewiesen werden. Ein allgemein protektiver Effekt von Phospholipiden in Mischmizellen kann somit nicht bestätigt werden. Wahrscheinlich besitzen die Art und Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide einen Einfluss. Einfach ungesättigte Phospholipide, wie DOPS und DOPG, scheinen stärker protektiv zu wirken, als die mehrfach ungesättigten Phospholipide SPS, EPG und S100.

Im Menschen wurde das lytische Potential von Gallensalz Mischmizellen mit speziellem Fokus auf dem Gallensalz in einer doppelblind-, randomisierten, *Crossover*-Studie an gesunden Probanden untersucht.²⁰⁶ Die Mischmizellen wurden gegen isotonische Kochsalzlösung getestet. Hierbei wurden 0,738 g Glycocholsäure und 0,013 g Lecithin in 100 ml Infusionsmedium (= 7,38 mg/ml Glycocholsäure) über eine Stunde infundiert.²⁰⁶ Der Serumwert für Glycocholsäure stieg daraufhin im Mittel von 26,5 µg/dl (= 0,265 µg/ml) auf 115 µg/dl (= 1,15 µg/ml) an.²⁰⁶ Drei der zwölf Probanden zeigten Serum-Glycocholsäure-Werte von 190 µg/dl (= 1,90 µg/ml), 410 µg/dl (= 4,10 µg/ml) bzw. 790 µg/dl (= 7,90 µg/ml).²⁰⁶ Aktuelle Referenzwerte geben eine Gesamt-

Gallensalzkonzentration im Serum von $< 10 \mu\text{M}$ (= 4,7 $\mu\text{g/ml}$, Bezug auf 100 % Glycocholsäure) im nüchternen und $< 20 \mu\text{M}$ (= 9,3 $\mu\text{g/ml}$, Bezug auf 100 % Glycocholsäure) im *post prandialen* Zustand für gesunde Erwachsene an.²⁰⁷ Im Kontext dieser Referenz ist festzustellen, dass auch nach Infusion von 7,38 mg/ml Glycocholsäure die aktuell gültigen Richtwerte für Gallensalze im Serum (näherungsweise) nicht überschritten wurden.²⁰⁷ Darüber hinaus wurde im Rahmen der *in vivo* Studie beschrieben, dass die Glycocholsäure bereits nach 10 Minuten zu über 80 % durch die Leber aus dem Blutkreislauf eliminiert war.²⁰⁶ Weiterhin war eine Veränderung des Hämoglobinwertes *prä-* und *post-*Applikation nicht erkennbar.²⁰⁶ Das Risiko für eine hämolytische Reaktion wurde daher insgesamt, trotz der Infusion von 7,38 mg/ml Glycocholsäure, als gering bewertet.²⁰⁶ Darüber hinaus wurden die Hämolyseeigenschaften von Gallensalzen in Abhängigkeit des pH-Wertes des Mediums 1990 durch Ilani und Granoth untersucht.²⁰⁸ Sie führten Studien an stark verdünnten Ratten RBC durch. Hierbei zeigte Natriumcholat ab einer Konzentration von 5 mM (= 2,1 mg/ml) Hämolyse. Für die anderen untersuchten Gallensalze (Deoxycholat, Chenodeoxycholat, Ursodeoxycholat) wurden bereits ab 1 mM hämolytische Eigenschaften festgestellt. Natriumcholat wurde somit *in vivo* besser toleriert als die anderen untersuchten Gallensalze. Für einen Vergleich zwischen Ratten RBC und humanen RBC, wie er hier notwendig ist, müssen jedoch spezies-spezifische Unterschiede berücksichtigt werden. Speziesübergreifende Studien, die das Hämolyseverhalten von Gallensalzen untersuchen, existieren jedoch nicht. Stattdessen gibt es eine Arbeit aus dem Jahr 1979, welche das Hämolyseverhalten von RBC verschiedener Spezies in Gegenwart von u.a. Kochsalzlösungen unterschiedlicher Osmolalitäten beschreibt.¹⁶² Diese Studie veranschaulicht eindrucksvoll, dass Ratten RBC bereits bei 145 mOs/kg lysieren, wohingegen humane RBC auch Osmolalitäten von 72 mOs/kg vertragen.¹⁶² Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass humane RBC weniger empfindlich gegenüber lytischen Stoffen sind, als Ratten RBC. Es bestätigt die erhaltenen Ergebnisse. Für entsprechende *in vivo* Studien im Mausmodell ist es jedoch notwendig, vor Beginn *in vitro* auch Maus RBC mit Mischmizellen zu untersuchen. Eine in dieser Arbeit durchgeführte Vorstudie zeigte, dass 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Mischmizellen (entspricht 250 μg Phospholipid und 250 μg Gallensalz), wie sie *in vivo* injiziert werden würde, auch nach 60 Minuten Inkubation kaum Hämolyse in Maus RBC aufwies. Das hämolytische Risiko für Mäuse wird somit als gering bewertet.

Neben dem Gallensalz als potentiell lytischen Agens scheint auch die Art des Phospholipids einen Einfluss auf die Hämolyseeigenschaften zu haben. Die synthetischen Phospholipide DOPS und DOPG wirkten auch bei hohen Gallensalzkonzentrationen von 5 mg/ml protektiv, wohingegen S100, SPS und EPG bereits Lyse zeigten. Ein Einfluss durch chemische Abbauprozesse, wie z.B. Hydrolyse, ist hier zu vermuten.¹⁵⁷ Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen der Mischmizellen zeigte besonders S100 über die Lagerzeit von 14 Tagen einen stärkeren Abbau als die synthetischen Phospholipide (3.3.3.1 Chemische Stabilität). Hydrolytische Prozesse scheinen hier neben oxidativen Prozessen dominant zu sein. In der Literatur ist beschrieben, dass durch

Hydrolyse entstandene Lyso-Phospholipide aufgrund ihres Detergenzcharakters hämolytisch wirken können. Detaillierte Hämolysestudien, die u.a. den Einfluss des Sättigungsgrades der veresterten Fettsäuren im Lyso-Phospholipid untersuchten, wurden in den 1960er Jahren durchgeführt.^{209,210} Diese zeigten, dass speziell gesättigte Lyso-Phospholipide ein erhöhtes Hämolysepotential aufwiesen.^{209,210} Lyso-Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren hingegen besaßen ein geringeres hämolytisches Potential.^{209,210} Diese Ergebnisse stehen etwas im Kontrast zu den hier erhaltenen Resultaten, da die mehrfach ungesättigten Phospholipide eher Lyse zeigten, als die einfach ungesättigten Phospholipide. Es ist hier jedoch zu vermuten, dass die mehrfach ungesättigten Phospholipide schneller hydrolytisch abgebaut wurden, als die einfach ungesättigten Phospholipide, sodass quantitativ bereits mehr Lyso-Produkt in den mehrfach ungesättigten Phospholipiden vorlag. Trotz dieses Nachteils ungesättigter Phospholipide werden besonders die natürlichen Phospholipide in Mischmizellenformulierungen eingesetzt.¹⁵⁷ Erste präklinische Sicherheitsstudien hierzu wurden durch Hoffmann-La Roche im Rahmen der Zulassung von VALIUM® Mischmizellen publiziert.¹⁰³ Hierbei setzten sie künstlich Lyso-Lecithin den Mischmizellen zu und testeten diese „zersetzten“ Formulierungen *in vivo* in Tierstudien.¹⁰³ Versuchsreihen an Hunden zeigten, dass es ab einer Schwellendosis von 40 – 60 mg/kg Körpergewicht Lyso-Lecithin zu intravaskulärer Hämolyse, Leberenzymerrhöhung und intrahepatischer Cholestase kam.¹⁰³ Diese Nebenwirkungen waren jedoch, gemäß den Autoren, nach Absetzen der Mischmizellengabe reversibel.¹⁰³ Allgemein schlussfolgerten sie, dass die Mischmizellen gut verträglich sind und weder embryotoxisch, noch mutagen oder teratogen wirken.¹⁰³ Um jedoch das Risiko für eine durch chemischen Abbau induzierte Hämolyse zu reduzieren, ist zu empfehlen, die Mischmizellen aus Phospholipid-Gallensalz-Präkonzentraten erst kurz vor Applikation frisch herzustellen.

3.3.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen

Weitere *in vitro* Zellkulturen untersuchten die immunmodulierenden Eigenschaften der Mischmizellen (MM) im direkten Vergleich zu den entsprechenden Liposomen (L) an mIFN- γ /LPS stimulierten MPM. Als MPM wurden, wie unter 3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen ausführlich beschrieben, naive Makrophagen, die weder durch Thioglycolat noch LPS vorstimuliert waren, verwendet. Für den Vergleich von Mischmizellen und Liposomen wurden gleiche Konzentrationen an anionischen Phospholipiden gewählt. In Anlehnung an die Ergebnisse der konventionellen Liposomen wurden ebenfalls Gesamtkonzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ untersucht (3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen). Nach Zugabe der jeweiligen nanoskaligen Formulierungen und 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit mIFN- γ /LPS stimuliert und nochmals für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände abgenommen. Aus diesen erfolgte die Quantifizierung der Zytokine.

Nachfolgend wurden zwei Fragestellungen experimentell untersucht:

- Vergleich Mischmizellen und Liposomen hergestellt aus den synthetischen Phospholipiden DOPS und DOPG
- Vergleich Mischmizellen und Liposomen hergestellt aus den natürlichen Phospholipiden S100, SPS und EPG

Hierfür wurde neben der Routineanalytik mittels TNF- α -ELISA für ausgewählte Proben auch die Multiplex-Analytik verwendet. Diese hat den Vorteil mehrere Zytokine (2.4.4.2 Multiplex-Assay) gleichzeitig analysieren zu können.¹⁷⁰

Die Ergebnisse des Vergleichs der Mischmizellen und Liposomen, hergestellt aus synthetischen Phospholipiden, sind in Abbildung 44 dargestellt.

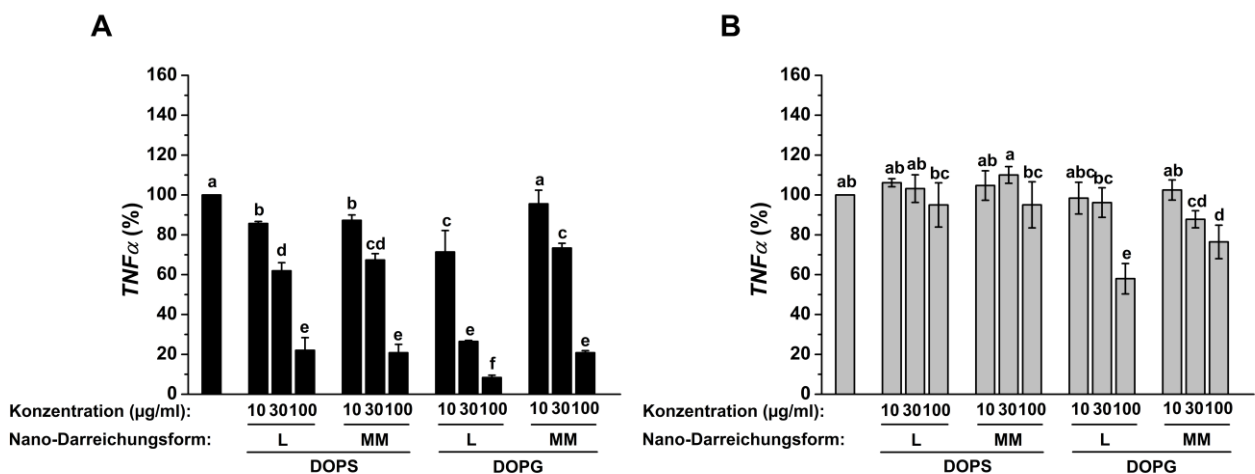


Abbildung 44: Immunmodulierende Eigenschaften synthetischer Mischmizellen (MM) im direkten Vergleich zu den Liposomen (L) auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. A) zeigt die direkte und B) die sequentielle Stimulation. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der stimulierten Kontrolle $\leq 25\%$ war.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen TNF- α -Werte (bezogen auf die stimulierte Kontrolle) von jeweils 3 natürlichen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 26.

Für die konventionellen Liposomen war in der direkten Stimulation (Abbildung 44A) eine dosisabhängige Reduktion der TNF- α -Produktion zu erkennen. DOPG L waren hier DOPS L überlegen (3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausemakrophagen). Für die Mischmizellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Besonders für DOPS MM wurde ein mit DOPS L vergleichbares Potential der TNF- α -Reduktion ersichtlich. DOPG MM hingegen besaßen im Vergleich zu den DOPG L ein geringeres Vermögen, TNF- α dosisabhängig zu reduzieren. In der sequentiellen Stimulation (Abbildung 44B)

war lediglich für DOPG ein Potential, TNF- α dosisabhängig zu reduzieren, erkennbar. Auch hier waren die DOPG L den DOPG MM überlegen.

Die Analytik mittels Multiplex-Assay (Tabelle A 9) zeigte neben Effekten für TNF- α auch für IL-6 vergleichbar starke reduzierende Effekte in beiden Stimulationsprotokollen. Darüber hinaus war in der direkten Stimulation auch für IL-1 α eine leichte Reduktion in Gegenwart von Liposomen erkennbar. Alle anderen untersuchten Zytokine besaßen Werte an der Nachweisgrenze, sodass hier keine Unterschiede ermittelt wurden. Synthetische Mischmizellen zeigten im direkten Vergleich zu Liposomen ebenfalls immunmodulierendes Potential.

Im zweiten Vergleich wurden die Mischmizellen und Liposomen, hergestellt aus den natürlichen Phospholipiden S100, SPS und EPG, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

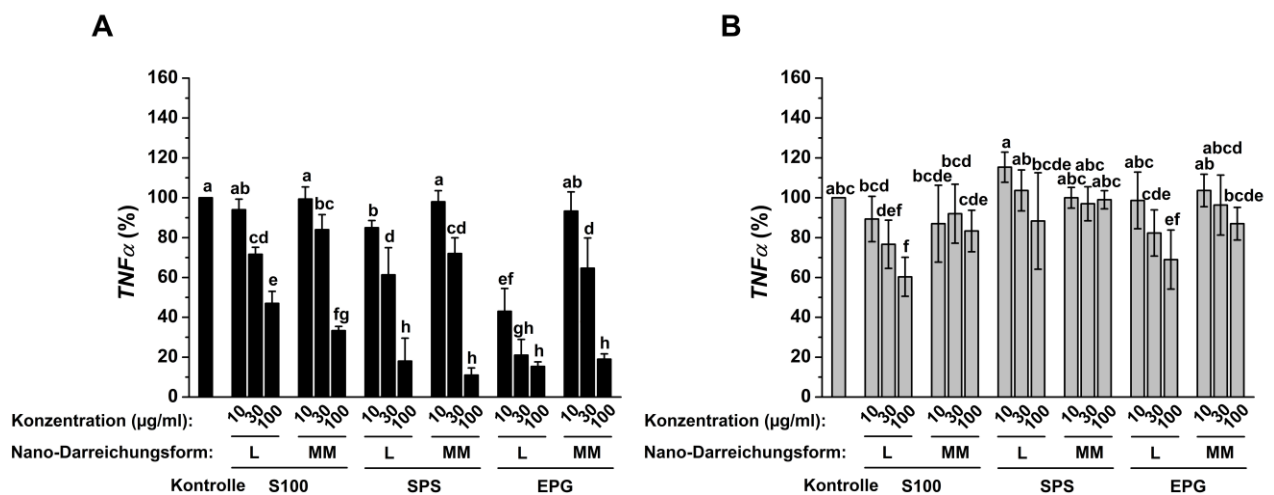


Abbildung 45: Immunmodulierende Eigenschaften natürlicher Mischmizellen (MM) im direkten Vergleich zu den Liposomen (L) auf MPM, bestimmt mittels TNF- α -ELISA.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. A) zeigt die direkte und B) die sequentielle Stimulation. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der stimulierten Kontrolle $\leq 25\%$ war.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen TNF- α -Werte (bezogen auf die stimulierte Kontrolle) von jeweils 3 natürlichen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 26.

Auch hier war für die Liposomen in der direkten Stimulation eine dosisabhängige TNF- α -Reduktion zu erkennen (Abbildung 45A). S100 L reduzierte TNF- α leicht, SPS L und EPG L zu einem stärkeren Ausmaß (3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausemakrophagen). EPG L zeigten hierbei ein größeres Potential, die TNF- α -Produktion dosisabhängig zu hemmen, als SPS L. Die Mischmizellen hingegen reduzierten TNF- α anders. S100 MM zeigten ein etwas größeres Potential die TNF- α -Produktion zu hemmen, als die S100 L. Für SPS MM und SPS L war die TNF- α -Reduktion, wie auch bei DOPS (Abbildung 44A), vergleichbar. EPG L hingegen zeigten ein höheres Potential TNF- α zu reduzieren, als die EPG MM. Auch dies wurde bereits für DOPG beobachtet

(Abbildung 44A). In der sequentiellen Stimulation (Abbildung 45B) war kaum eine Phospholipid-vermittelte TNF- α -Reduktion vorhanden. Lediglich S100 L und EPG L reduzierten TNF- α leicht. Die Analytik mittels Multiplex-Assay (Tabelle A 10) zeigte neben Effekten für TNF- α auch für IL-6 vergleichbar starke reduzierende Effekte. Darüber hinaus war in der direkten Stimulation auch für IL-1 α eine leichte Reduktion in Gegenwart von Liposomen erkennbar. Alle anderen untersuchten Zytokine besaßen Werte an der Nachweisgrenze, sodass hier keine Unterschiede ermittelt wurden. Natürliche Mischmizellen zeigten im direkten Vergleich zu Liposomenformulierungen somit ebenfalls immunmodulierendes Potential.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchung der Aktivität von MPM in Gegenwart der Mischmizellen ausführlich diskutiert. Auch für die Mischmizellen als galenische Alternative zu Liposomen konnten immunmodulierende Eigenschaften, repräsentiert als Reduktion der TNF- α Produktion, festgestellt werden. Weitere makrophagenabhängige proinflammatorische Zytokine wie IL-1 α und IL-6 wurden ebenfalls beeinflusst. Im direkten Vergleich zwischen Liposomen und Mischmizellen zeigten sich jedoch kleinere Unterschiede. So war S100 MM effektiver als S100 L. Für PS MM und PS L konnte, unabhängig von der Wahl des Phospholipidderivates, ein vergleichbares Potential TNF- α dosisabhängig zu reduzieren, ermittelt werden. PG MM hingegen waren weniger effektiv in der TNF- α -Reduktion als PG L. Ein Einfluss des Phospholipidderivates bestand nicht. Für eine entsprechende Rationale, warum die einzelnen Phospholipide unterschiedlich immunmodulierend wirken, ist auf die Diskussion im Kapitel Liposomen verwiesen (3.2.4.3 Aktivität peritonealer Mausmakrophagen). Kurz zusammengefasst liegen den Effekten höchst wahrscheinlich unterschiedliche zelluläre Mechanismen zu Grunde. PS wird phagozytiert^{2,41-43}, wohingegen S100 und PG extrazellulär am TLR-4 Rezeptor wirken^{63,165-167}.

Der Fokus der Diskussion soll nachfolgend auf den Unterschieden zwischen Mischmizellen und Liposomen liegen. Mischmizellen sind von ihrer Zusammensetzung und dem physikochemischen Verhalten komplexer als Liposomen. Als mögliche Einflussfaktoren sind hier die Verdünnung der Mischmizellen während der Analytik (3.3.2.4 Verdünnungsverhalten) sowie Stabilitätseinflüsse (3.3.3.1 Chemische Stabilität) zu diskutieren.

Im Rahmen der MPM Zellkultur wurden die Mischmizellen von einer Ausgangskonzentration von 20 mg/ml auf Konzentrationen von 10 μ g/ml, 30 μ g/ml und 100 μ g/ml verdünnt. Aufgrund dieser Verdünnungen kam es zu Änderungen des ternären Mischungsverhältnisses von Gallensalz, Phospholipid und wässriger Phase hin zur wässrigen Phase sowie zur Bildung von Mischvesikeln und vesikulären Strukturen (3.3.2.4 Verdünnungsverhalten).¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Darüber hinaus enthält Zellkulturmedium neben Nährstoffen und Aminosäuren auch Proteine aus FBS, u.a. auch Albumin. Da Gallensalz an Serumproteine, besonders an Albumin, bindet^{102,203-205}, ist es möglich, dass es der Mischmizelle vermehrt entzogen wird, was die Bildung vesikulärer Strukturen begünstigt (3.3.4.1 Zellviabilität). Etwaige Mischstrukturen, wie sie in reiner isotoner Kochsalzlösung bei

gleicher Verdünnung noch vorhanden wären, könnten im Zellkulturmedium aufgrund der „aktiven“ Entfernung des Gallensalzes wenig vorhanden sein. Als Resultat ist zu vermuten, dass nach Verdünnung bzw. Detergenzentfernung vorwiegend unilamellare Liposomen definierter Größe vorliegen (3.3.2.5 Morphologie).¹⁹⁰ Eine Größenabhängigkeit bzw. Abhängigkeit der Morphologie könnte somit ursächlich für die Unterschiede der immunmodulierenden Eigenschaften von Mischmizellen und Liposomen sein. Für PS, welches phagozytiert wird, scheint Beides kaum eine Rolle zu spielen. Die Mischmizellen und Liposomen besitzen ein vergleichbares Potential, TNF- α dosisabhängig zu reduzieren. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch die durch Detergenzentfernung entstandenen Liposomen aus den Mischmizellen analog den reinen Liposomen phagozytiert werden. Für S100 und PG hingegen, welche extrazellulär am TLR-4 Rezeptor wirken^{63,165–167} und lediglich zu geringen Anteilen phagozytiert werden^{168,169}, existieren Unterschiede in den immunmodulierenden Eigenschaften. Hier scheinen Größe und Morphologie der nanoskaligen Formulierungen einen Einfluss zu haben. Für S100 ist zu vermuten, dass die durch Detergenzentfernung gebildeten Liposomen aus Mischmizellen schneller oxidiert werden (3.3.3.1 Chemische Stabilität), als die mittels Extrusion hergestellten Liposomen (3.2.3.1 Chemische Stabilität). Der höhere Anteil an oxidiertem PC könnte eine stärkere Wirkung am TLR-4 Rezeptor hervorrufen, sodass die Produktion von TNF- α stärker gehemmt wird.^{165–167} Ein toxischer Effekt des oxidierten PCs war hier noch nicht aufgetreten. PG MM zeigten im Vergleich zu PG L geringere immunmodulierende Effekte. Analog der S100 MM ist es für PG MM wahrscheinlich, dass die ungesättigten Fettsäuren von DOPG und EPG über die 48 Stunden Inkubationszeit chemisch schneller abgebaut werden, als die vergleichbaren Liposomen. Statt eines protektiven Effektes, wie er bei S100 beschrieben ist, scheint das oxidierte PG jedoch zytotoxisch auf die MPM zu wirken. Kuo *et al.* beschrieben diesen Effekt für die Zelllinie RAW 264.7, die mit an Luft oxidiertem DOPG in Kontakt kam.²¹¹ Hier wurde eine LDH-Freisetzung und somit eine zytotoxische Wirkung festgestellt.²¹¹ Die im Rahmen der eigenen Zellviabilitätsuntersuchungen an murinen und humanen Fibroblasten durchgeführten Studien über 96 Stunden Inkubationszeit veranschaulichen jedoch, dass die untersuchten PG MM keine Zelltoxizität aufweisen, unabhängig vom Phospholipidderivat (3.3.4.1 Zellviabilität). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass erste Effekte durch partielle Oxidation und Hydrolyse in der Zellkultur mit MPM aufgetreten sind.

Sowohl PS- als auch PG-haltige Mischmizellen besitzen immunmodulierende Eigenschaften. Sie werden als proliposomale galenische Formulierung angesehen. Leichte Unterschiede in den immunmodulierenden Eigenschaften von Liposomen und Mischmizellen sind wahrscheinlich begründet durch Variationen in der finalen Größe, Größenverteilung und Morphologie der Phospholipidformulierungen. Die Ergebnisse heben Mischmizellen als alternative galenische Formulierung für die parenterale Applikation von PS und PG vor.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen einer Entzündung werden komplexe immunologische Prozesse aktiv, die zur Beseitigung schädlicher Noxen beitragen und eine Reparatur des entstandenen Schadens initiieren. Am Beispiel des akuten Myokardinfarktes ist beschrieben, wie eine Modulation von Makrophagen hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp dazu beitragen kann, verstärkte Narbenbildung und ventrikuläres Remodeling zu verhindern und die Heilung zu fördern. Makrophagen sind somit für die Therapie der Entzündung und Förderung der Heilung ein interessantes Therapie-*Target*. Ihre Modulation kann mit Hilfe der endogenen Phospholipide Phosphatidylserin (PS) oder Phosphatidylglycerol (PG) erfolgen. Ihre pharmazeutisch technologische Anwendung beschränkt sich aktuell jedoch lediglich auf die Nutzung als Hilfsstoff. Ziel dieser Arbeit war es daher das immunmodulierende Potential PS- und PG-angereicherter parenteraler Formulierungen systematisch und vergleichend zu untersuchen.

Die galenische Basis bildeten nanoskalige Formulierungen als Liposomen und Gallensalz-Mischmizellen. Für deren Herstellung wurden sowohl definierte, synthetische Phospholipide (DOPS, DOPG) als auch natürliche, angereicherte Phospholipide [SPS, EPG, S100 (PC)] sowie DSPE-PEG-2000 (PEG) und Natriumcholat verwendet. Ein Gehalt von 30 % an PS zeigte in Vorstudien das stärkste immunmodulierende Potential. Die Herstellung der Liposomen erfolgte mittels Filmmethode und anschließender Extrusion durch Polycarbonatmembranen definierter Größe. Mischmizellen wurden ebenfalls mittels Filmmethode hergestellt. Die Charakterisierung der nanoskaligen Formulierungen umfasste *in vitro* sowohl physikochemische (u.a. Größe, Größenverteilung, Oberflächenladung) als auch biologische [Zelltoxizität an Fibroblasten, Hämolyseaktivität an humanen Erythrozyten (RBC), immunmodulierende Aktivität an peritonealen Mausmakrophagen (MPM)] Eigenschaften. Darüber hinaus erfolgte für Liposomen eine *in vivo* Untersuchung der Biodistribution im gesunden und myokardial infarktierten Mausmodell.

Liposomen wurden konventionell und mit DSPE-PEG-2000 Zusatz (*„stealth“*) formuliert. Die extrudierten Liposomen wiesen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von maximal 150 nm mit monomodaler Größenverteilung ($PDI \leq 0,1$) und uni- bis oligolamellarer Morphologie auf. Das Zetapotential der Liposomen war in Abhängigkeit der verwendeten Phospholipide neutral = S100 Liposomen, bzw. negativ = PS Liposomen und PG Liposomen. Die Oberflächenladung konnte durch Zusatz von DSPE-PEG-2000 abgeschirmt werden. Für die *„stealth“* Liposomen wurde dann ein annähernd neutrales Zetapotential erhalten. Verdünnte Liposomen zeigten weder auf Fibroblasten noch auf humanen RBC toxische oder lytische Effekte. Die Bestimmung der immunmodulierenden Eigenschaften auf mit $mIFN-\gamma$ /LPS stimulierten MPM veranschaulichte sowohl für PS als auch für PG eine dosisabhängige Reduktion des proinflammatorischen Zytokines $TNF-\alpha$. PG vermochte $TNF-\alpha$ stärker zu reduzieren als PS. Konventionelle und *„stealth“* Liposomen besaßen eine vergleichbare immunmodulierende Wirkung. Auch die Untersuchung der

anionischen Phospholipidderivate zeigte keine Unterschiede im immunmodulierenden Potential. Die *in vivo* Charakterisierung an gesunden SKH1 Mäusen präsentierte Unterschiede in der Biodistribution in Abhängigkeit der galenischen Formulierung (konventionell, ‚*stealth*‘) und der Art des Phospholipids. DOPS und DOPG reicherten sich in Organen und Geweben, die reich an mononukleären Zellen sind (Leber, Milz), an und wurden schnell eliminiert. S100 hingegen war stärker im gesamten Mäusekörper verteilt. Für S100 20 % PEG war eine Verlängerung der Zirkulation über den gesamten Untersuchungszeitraum von 48 Stunden zu erkennen. DOPS 20% PEG und DOPG 20 % PEG wurden stattdessen schnell eliminiert. *Ex vivo* war jedoch eine etwas stärkere Anreicherung in Leber und Milz zu erkennen. Im myokardial infarktierten Mausmodell wurden nachfolgend die ‚*stealth*‘ Liposomen untersucht. S100 20 % PEG reichte sich durch den EPR-Effekt vermittelt passiv im entzündeten Myokard an. DOPS 20 % PEG und DOPG 20 % PEG hingegen waren in Leber und Milz lokalisiert. Hier ist ein aktives *Targeting* des Myokards durch Einwanderung von Monozyten in das Gebiet der Entzündung zu vermuten.

Als galenische Alternative zu Liposomen wurden die anionischen Phospholipide als Gallensalz-Mischmizellen formuliert. Unverdünnt besaßen sie mittlere hydrodynamische Durchmesser von 10 nm und PDI-Werte von 0,2. Im Rahmen von Verdünnungsstudien wurde ein Größenwachstum der Mischmizellen festgestellt. Ein Übergang von mischmizellaren zu vesikulären Strukturen ist wahrscheinlich, was durch *negative-stain-EM* Bestätigung fand. Biologisch zeigten die Mischmizellen weder toxisches noch lytisches Potential. Die Bestimmung der immunmodulierenden Eigenschaften verdeutlichte auch für PS Mischmizellen und PG Mischmizellen das Potential, TNF- α dosisabhängig zu reduzieren. Die Effekte für PS Mischmizellen waren hierbei mit denen von PS Liposomen vergleichbar. PG und S100 Liposomen waren jedoch den PG und S100 Mischmizellen überlegen.

Zusammenfassend erfolgte ein systematischer Vergleich PS- und PG-angereicherter nanoskaliger Formulierungen *in vitro* und *in vivo*. Sowohl als Liposomen als auch als Mischmizellen formuliert wirkten sie immunmodulierend und reduzierten TNF- α in der MPM Zellkultur dosisabhängig. Darüber hinaus zeigten die Liposomen *in vivo* und *ex vivo* vermehrte Aufnahme in Organen des MPS, wodurch ein *Targeting* von Monozyten und Makrophagen in Leber und Milz möglich wird. Im Rahmen einer parenteralen Applikation, z.B. bei entzündlichen Erkrankungen wie Alzheimer, Osteoporose, Arthritis, Rhinitis oder Myokardinfarkt könnten sie als Therapie Anwendung finden. Der Zusatz antientzündlicher Wirkstoffe ist darüber hinaus möglich. Erste Studien mit Dexamethasonderivaten bestätigen die immunmodulierenden Eigenschaften. Weiterhin sind Depotformulierungen für eine lokale Applikation, z.B. am Auge, im Ohr oder im Gehirn plausibel und sollten zukünftig systematisch untersucht werden. Aufgrund des endogenen Charakters und der guten Verträglichkeit besitzen PS und PG ein hohes Potential für eine spätere klinische Anwendung.

5 Summary and Outlook

During inflammation, complex immunological processes become active that help to remove hazardous noxa and initiate healing. With the example of acute myocardial infarction, the modulation of macrophages from a pro- to an anti-inflammatory phenotype is described that influences and decreases scar formation, reduces ventricular remodelling and promotes wound healing. The treatment of inflammation and promotion of wound healing by targeting and modulation of macrophages is therefore an interesting therapy target. With the help of endogenous phospholipids like phosphatidylserine (PS) or phosphatidylglycerol (PG) macrophage modulation is possible. Today, both phospholipids are only used as excipients in pharmaceutical formulations. Hence, the aim of this thesis was to formulate both phospholipids as parental formulations and to explore their immunomodulatory potential systematically and comparatively.

As galenical basis for parenteral application, nanoscaled liposomes and mixed micelles were used. Both were either formulated with synthetic phospholipids, like DOPS and DOPG, or with natural, enriched phospholipids, like S100, SPS and EPG as well as with DSPE-PEG-2000 and sodium cholate. In a preliminary study, 30 % of PS were determined to have the most effective immunomodulating properties. Liposomes were prepared by thin-film-hydration method and sized by extrusion through polycarbonate membranes of defined pore size. Mixed micelles were also prepared by thin-film-hydration method. Characterization of nanoscaled formulations included physicochemical (size, size distribution, surface charge) as well as biological (cytotoxicity, hemolytic activity, immunomodulatory potential on MPM) *in vitro* properties. Furthermore, liposome biodistribution in healthy and myocardial infarcted mice was characterized *in vivo*.

Liposomes were either formulated as conventional or 'stealth' liposomes, containing additional DSPE-PEG-2000. Extruded liposomes revealed sizes of max. 150 nm with narrow size distribution ($PDI \leq 0.1$) and uni- to oligolamellar morphology. In dependence of the used phospholipids, the surface charge measurements revealed neutral (S100), to negative (PS, PG) zeta potential values. The addition of DSPE-PEG-2000 in 'stealth' formulations shielded the liposome surface and resulted in neutral zeta potentials. Diluted liposomes revealed neither cytotoxic nor hemolytic properties. The determination of the immunomodulatory properties of the phospholipids on mIFN- γ /LPS stimulated MPM revealed for both, PS and PG, a dose-dependent reduction of the pro-inflammatory cytokine TNF- α . PG was superior to PS. For both, the addition of DSPE-PEG-2000 did not impact the immunomodulatory properties. Also the comparison of synthetic and natural anionic phospholipids did not result in differences. Both were able to decrease TNF- α dose-dependently. *In vivo* in healthy mice, a dependence of the investigated galenical formulation and a dependence in the used phospholipids on the observed biodistribution and pharmacokinetic profiles was seen. DOPS and DOPG accumulated in organs rich in mononuclear cells (MPS), like liver and spleen and were also rapidly eliminated. Contrastingly, S100 showed a more homogenous

biodistribution throughout the whole mouse body, but was also rapidly eliminated. Contrastingly, for S100 20 % PEG a prolonged liposome circulation duration up to 48 hours was observed, whereas DOPS 20 % PEG and DOPG 20 % PEG presented rapide elimination. *Ex vivo* both showed a slightly higher accumulation of liposomes in liver and spleen as compared to the conventional formulations. Due to the fast clearance rates of the conventional liposomal formulations, only for the 'stealth' liposomes the biodistribution in myocardial infarcted mice was characterized. Due to the EPR-effect, a passive accumulation of S100 20 % PEG in the infarcted and inflamed myocardium was observed. In contrast, DOPS 20 % PEG and DOPG 20 % PEG were predominantly localized in liver and spleen. For them, active targeting of cells of the MPS in the liver and spleen with sequential mobilization to the infarcted and inflamed myocardium is expected.

As an galenical formulation alternative to liposomes, PS and PG were also formulated as bile salt containing mixed micelles. Undiluted, these mixed micelles revealed hydrodynamic diameter of around 10 nm and PDI values of 0.2. During dilution studies, an increase in size was observed. Mixed micelles to mixed vesicle and vesicle transition is probable and was confirmed by negative-stain-EM. In cell culture studies, mixed micelles revealed neither toxic nor hemolytic properties and were therefore comparable with the liposomal formulations. On mIFN- γ /LPS stimulated MPM also mixed micelles presented immunomodulatory potential by reducing TNF- α production dose-dependently. For PS, the effects of liposomes and mixed micelles were comparable, whereas for PG and S100, liposomes were more potent than the mixed micelles.

In summary, a systematic *in vitro* and *in vivo* comparison of PS- and PG-enriched nanoformulations for parenteral application was done. Both, liposomes and mixed micelles were able to decrease TNF- α dose-dependently. Slight differences between both may be related to differences in their final size, size distribution and morphology. The results highlight that PS and PG can be formulated as liposomes and mixed micelles. Furthermore, *in vivo* and *ex vivo* an increased accumulation of liposomes in organs rich in cells of the MPS was observed, allowing targeting of monocytes and macrophages. As nanoscaled formulations suitable for parenteral administration, PS- and PG-enriched liposomes or mixed micelles can be used in inflammatory diseases like Alzheimer's disease, osteoporosis, arthritis, rhinitis or myocardial infarct repair. Additionally, the incorporation of an API, as it was investigated with Dexamethasone derivatives in preliminary studies, is possible and increases the application area. Furthermore, the formulation as depotsystems with local application, e.g. in the eye, ear or brain seems possible and should be evaluated systematically. Due to their endogenous nature and their biocompatibility, both, PS and PG, have high potential to be used in clinical application.

6 Literaturverzeichnis

1. Galvão, I., Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Machado, M. G. & Sousa, L. P. The molecular mechanisms of inflammation. in *Immunopharmacology and inflammation* (eds. Riccardi, C., Levi-Schaffer, F. & Tiligada, E.) 3–32 (Springer Berlin Heidelberg, 2018).
2. Lawrence, T., Willoughby, D. A. & Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 787–795 (2002).
3. Boff, D., Fagundes, C. T., Russo, R. C. & Amaral, F. A. Innate immunity and inflammation: The molecular mechanisms governing the cross-talk between innate immune and endothelial cells. in *Immunopharmacology and inflammation* (eds. Riccardi, C., Levi-Schaffer, F. & Tiligada, E.) 33–56 (Springer International Publishing, 2018).
4. Uematsu, S. & Akira, S. Toll-Like Receptors (TLRs) and their ligands. in *Toll-like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Handbook of Experimental Pharmacology* (eds. Bauer, S. & Hartmann, G.) 1–21 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008).
5. Park, B. S. & Lee, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* **45**, e66-9 (2013).
6. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
7. Flayer, C. H., Killingbeck, S. S., Larson, E., Allakhverdi, Z. & Haczku, A. Adaptive immunity of airway inflammation in asthma. in *Immunopharmacology and Inflammation* (eds. Riccardi, C., Levi-Schaffer, F. & Tiligada, E.) 57–84 (Springer International Publishing, 2018).
8. Duque, G. A. & Descoteaux, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* **5**, 1–12 (2014).
9. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
10. Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B. & Ruth, P. Immunsystem. in *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 749–822 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2020).
11. Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B. & Ruth, P. Analgetika. in *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 252–286 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2020).
12. Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B. & Ruth, P. Glucocorticoide und Mineralocorticoide. in *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 704–718 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2020).
13. Fiehn, C. *et al.* S2e guideline: treatment of rheumatoid arthritis with disease-modifying drugs. *Z. Rheumatol.* **77**, 35–53 (2018).
14. Nam, J. L. *et al.* Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1108–1113 (2017).
15. Szondy, Z., Sarang, Z., Kiss, B., Garabuczi, É. & Köröskényi, K. Anti-inflammatory mechanisms triggered by apoptotic cells during their clearance. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
16. Mosser, D. M. & Zhang, X. Activation of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* **83**, 14.2.1-14.2.8 (2008).
17. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 1–13 (2014).
18. Hao, N. B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, (2012).

19. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).
20. Asano, T. & Kleinerman, E. S. Liposome-encapsulated MTP-PE: A novel biologic agent for cancer therapy. *J. Immunother.* **14**, 286–292 (1993).
21. Nardin, A., Lefebvre, M., Labroquere, K., Faure, O. & Abastado, J. Liposomal Muramyl Tripeptide Phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma. *Curr. Cancer Drug Targets* **6**, 123–133 (2006).
22. MacEwen, E. G. *et al.* Therapy of osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated Muramyl Tripeptide. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 935–938 (1989).
23. Fidler, I. J. & Poste, G. Macrophage-mediated destruction of malignant tumor cells and new strategies for the therapy of metastatic disease. *Springer Semin. Immunopathol.* **5**, 161–174 (1982).
24. Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Vadasz, Z., Toubi, E. & Giacomelli, R. Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* vol. 18 102369 (2019).
25. Tsujioka, H. *et al.* Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 130–138 (2009).
26. De Couto, G. *et al.* Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* **125**, 3147–3162 (2015).
27. Statistisches Bundesamt. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> (2018).
28. Kelm, M. *et al.* *ESC Pocket Guidelines - Therapie des akuten Herzinfarktes bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI)*. Journal of Chemical Information and Modeling (Börm Bruckmeier Verlag GmbH, 2017).
29. Frangogiannis, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* **110**, 159–173 (2012).
30. Hulsmans, M., Sam, F. & Nahrendorf, M. Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **93**, 149–155 (2016).
31. Maselli, F. *Der Makrophage im Myokardinfarkt - ein transkriptombasierter Ansatz*. (Justus-Liebig-Universität Gießen, 2012).
32. Frantz, S. & Nahrendorf, M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* **102**, 240–248 (2014).
33. Harel-Adar, T. *et al.* Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1827–32 (2011).
34. Folch, J. & Schneider, H. A. Amino acid in ox brain cephalin. *J. Biol. Chem.* **137**, 51–62 (1941).
35. Toita, R., Fujita, S. & Kang, J. Macrophage uptake behavior and anti-inflammatory response of bovine brain- or soybean-derived phosphatidylserine liposomes. *J. Oleo Sci.* **2018**, 5–7 (2018).
36. Birge, R. B. *et al.* Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* **23**, 962–978 (2016).

37. Daleke, D. L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 191–195 (2008).
38. Demchenko, A. P. The change of cellular membranes on apoptosis: Fluorescence detection. *Exp. Oncol.* **34**, 263–268 (2012).
39. Julian, L. & Olson, M. F. Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health Cytoskelet.* **7**, 133–142 (2015).
40. Bagalkot, V., Deuliis, J. A., Rajagopalan, S. & Maiseyeu, A. 'Eat me' imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 99 2–11 (2016).
41. Bratton, D. L. & Henson, P. M. Apoptotic cell recognition: Will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr. Biol.* **18**, 76–79 (2008).
42. Henson, P. M. & Bratton, D. L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 2773–2774 (2013).
43. Bevers, E. M. & Williamson, P. L. Getting to the outer leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol. Rev.* **96**, 605–645 (2016).
44. Fadeel, B., Xue, D. & Kagan, V. E. Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 7–10 (2010).
45. Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207–16 (1992).
46. Fadeel, B. & Xue, D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: Roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**, 264–277 (2009).
47. Matsuno, R., Aramaki, Y. & Tsuchiya, S. Involvement of TGF- β in inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production by macrophages stimulated with LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 614–620 (2001).
48. Huynh, M. N., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **109**, 41–50 (2002).
49. Freire-de-Lima, C. G. *et al.* Apoptotic cells, through Transforming Growth Factor- β , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**, 38376 – 38384 (2006).
50. Hashioka, S. *et al.* Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid β and interferon- γ -induced microglial activation. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 945–954 (2007).
51. Dvorianchikova, G., Agudelo, C., Hernandez, E., Shestopalov, V. I. & Ivanov, D. Phosphatidylserine-containing liposomes promote maximal survival of retinal neurons after ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 1755–1759 (2009).
52. Wu, Z., Ma, H. M., Kukita, T., Nakanishi, Y. & Nakanishi, H. Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. *J. Immunol.* **184**, 3191–3201 (2010).
53. Ma, H. M., Wu, Z. & Nakanishi, H. Phosphatidylserine-containing liposomes suppress inflammatory bone loss by ameliorating the cytokine imbalance provoked by infiltrated macrophages. *Lab. Investig.* **91**, 921–931 (2011).

-
54. Yeom, M. *et al.* Phosphatidylserine inhibits inflammatory responses in interleukin-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and alleviates carrageenan-induced arthritis in rat. *Nutr. Res.* **33**, 242–250 (2013).
 55. Urbano, P. C. M. *et al.* Effect of pegylated phosphatidylserine-containing liposomes in experimental chronic arthritis. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **16**, 1–11 (2015).
 56. Chen, J. *et al.* Dual-targeting theranostic system with mimicking apoptosis to promote myocardial infarction repair via modulation of macrophages. *Theranostics* **7**, 4149–4167 (2017).
 57. Stokes, C. . *et al.* Human rhinovirus-induced inflammatory responses are inhibited by phosphatidylserine containing liposomes. *Mucosal Immunol.* **9**, 1303–1316 (2016).
 58. Hoffmann, P. R. *et al.* Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* **174**, 1393–1404 (2005).
 59. Shin, S. A., Moon, S. Y., Park, D., Park, J. B. & Lee, C. S. Apoptotic cell clearance in the tumor microenvironment: a potential cancer therapeutic target. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 658–671 (2019).
 60. Melissen, P. M. B., van Vianen, W., Leenen, P. J. M. & Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. Tissue distribution and cellular distribution of liposomes encapsulating muramyltripeptide phosphatidyl ethanolamide: Tissue and cellular distribution of LE-MTPPE. *Biotherapy* **8**, 85–85 (1994).
 61. Fidler, I. J. Macrophages and metastasis—a biological approach to cancer therapy: Presidential address. *Cancer Res.* **45**, 4714–4726 (1986).
 62. King, R. J. & MacBeth, M. C. Interaction of the lipid and protein components of pulmonary surfactant role of phosphatidylglycerol and calcium. *Biochim. Biophys. Acta* **647**, 159–168 (1981).
 63. Voelker, D. R. & Numata, M. Phospholipid regulation of innate immunity and respiratory viral infection. *J. Biol. Chem.* **294**, 4282–4289 (2019).
 64. Chiba, H. *et al.* Pulmonary surfactant proteins and lipids as modulators of inflammation and innate immunity. *Respirology* **11 Suppl**, S2-6 (2006).
 65. Numata, M. *et al.* Phosphatidylglycerol provides short-term prophylaxis against respiratory syncytial virus infection. *J. Lipid Res.* **54**, 2133–43 (2013).
 66. Numata, M. *et al.* Phosphatidylglycerol suppresses influenza A virus infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **46**, 479–487 (2012).
 67. Kandasamy, P. *et al.* Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits Mycoplasma pneumoniae-stimulated eicosanoid production from human and mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* **286**, 7841–7853 (2011).
 68. Bollag, W. B. *et al.* Dioleoylphosphatidylglycerol accelerates corneal epithelial wound healing. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **61**, 1–4 (2020).
 69. Choudhary, V. *et al.* Phosphatidylglycerol inhibits Toll-Like Receptor-mediated inflammation by Danger-Associated Molecular Patterns. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 868–877 (2019).
 70. Adler-Moore, J. P. & Proffitt, R. T. Development, characterization, efficacy and mode of action of ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin b. *J. Liposome Res.* **3**, 429–450 (1993).
 71. Adler-Moore, J. & Proffitt, R. T. AmBisome: Liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 21–30 (2002).
-

-
72. Vyas, S. P. & Gupta, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 417–432 (2006).
 73. Hoffman, A. S. The origins and evolution of ‘controlled’ drug delivery systems. *J. Control. Release* **132**, 153–163 (2008).
 74. Tan, S. Y. & Grimes, S. Paul Ehrlich (1854-1915): Man with the magic bullet. *Singapore Med. J.* **51**, 842–843 (2010).
 75. Maeda, H. The tumor blood vessel as an ideal target for macromolecular anticancer agents. *J. Control. Release* **19**, 315–324 (1992).
 76. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release* **65**, 271–284 (2000).
 77. Crommelin, D. J. A., van Hoogevest, P. & Storm, G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *J. Control. Release* **318**, 256–263 (2020).
 78. van Hoogevest, P. & Wendel, A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 1088–1107 (2014).
 79. Israelachvili, J. . N. Soft and biological structures. in *Intermolecular and Surface Forces* 535–569 (Elsevier Inc., 2011).
 80. Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. & Ninham, B. W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *BBA - Biomembr.* **470**, 185–201 (1977).
 81. Hildebrand, A. Physikochemische Charakterisierung von Gallensalz-Mischmizellen als Grundlage für innovative Arzneistoffträgersysteme. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002).
 82. Holzer, M. Proteinvermittelter Lipidtransfer zwischen Liposomen zur Herstellung asymmetrischer Modellmembranen und die Rolle der Membranlipide bei der Organisation des T-Zellrezeptors. (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in Breisgau, 2009).
 83. Jones, M. N. & Chapman, D. *Micelles, monolayers, and biomembranes*. (Wiley, 1995).
 84. New, R. R. C. Introduction. in *Liposomes a practical approach* (ed. New, R. R. C.) 1–32 (Oxford University Press Inc., 1990).
 85. Vemuri, S. & Rhodes, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: A review. *Pharm. Acta Helv.* **70**, 95–111 (1995).
 86. Pattni, B. S., Chupin, V. V. & Torchilin, V. P. New developments in liposomal drug delivery. *Chem. Rev.* **115**, 10938–10966 (2015).
 87. Allen, T. M. & Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 65 36–48 (2013).
 88. Mouritsen, O. G. Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* **57**, 179–194 (1991).
 89. Barenholz, Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* **160**, 117–134 (2012).
 90. Crommelin, D. J. A., Metselaar, J. M. & Storm, G. Liposomes: The science and the regulatory landscape. in *Non-Biological Complex Drugs - The Science and the Regulatory Landscape* (eds. Crommelin, D. J. A. & Mühlebach, S.) vol. 20 77–106 (AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series Springer International Publishing Switzerland, 2015).
-

91. Small, D. M., Bourgès, M. C. & Dervichian, D. G. The biophysics of lipidic associations. I. The ternary systems lecithin-bile salt-water. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **125**, 563–580 (1966).
92. Heider, M. Lipid- und Polymernanopartikel für die perorale Anwendung: Herstellung, Charakterisierung und Untersuchung des intestinalen Abbaus. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2019).
93. Moore, B., Wilson, F. P. & Hutchinson, L. A contribution to the bio-chemistry of haemolysis. *Biochem. J.* **4**, 346–368 (1909).
94. Carey, M. C. & Small, D. M. Micellar properties of dihydroxy and trihydroxy bile salts: Effects of counterion and temperature. *J. Colloid Interface Sci.* **31**, 382–396 (1969).
95. Carey, M. C. & Small, D. M. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Am. J. Med.* **49**, 590–608 (1970).
96. Mazer, N. A., Benedek, G. B. & Carey, M. C. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry* **19**, 601–615 (1980).
97. Hjelm, R. P., Thiyagarajan, P. & Alkan-Onyuksel, H. Organization of phosphatidylcholine and bile salt in rodlike mixed micelles. *J. Phys. Chem.* **96**, 8653–8661 (1992).
98. Müller, K. Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile? X-ray structure analysis. *Biochemistry* **20**, 404–414 (1981).
99. Ulmius, J. *et al.* Molecular organization in the liquid-crystalline phases of lecithin-sodium cholate-water systems studied by Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* **21**, 1553–1560 (1982).
100. Hjelm, R. P., Thiyagarajan, P. & Alkan, H. A small-angle neutron scattering study of the effects of dilution on particle morphology in mixtures of glycocholate and lecithin. *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 858–863 (1988).
101. Steffen, H. & Schmidt, D. US4158707A. (1979).
102. Guentert, T. *et al.* Interaction of mixed micelles formed from glycocholic acid and lecithin with the protein binding of various drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**, 569–577 (1987).
103. Teelmann, K., Schläppi, B., Schüpbach, M. & Kistler, A. Preclinical safety evaluation of intravenously administered mixed micelles. *Arzneimittelforschung.* **34**, 1517–23 (1984).
104. Soedirman, J. R., De Bruijn, E. A., Maes, R. A., Hanck, A. & Grüter, J. Pharmacokinetics and tolerance of intravenous and intramuscular phylloquinone (vitamin K1) mixed micelles formulation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 517–23 (1996).
105. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *ICH harmonised tripartite guideline pharmaceutical development Q8 (R2)*. (2009).
106. Xu, X., Khan, M. A. & Burgess, D. J. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: I. Formulation, processing design and risk assessment. *Int. J. Pharm.* **419**, 52–59 (2011).
107. Dailey, L. A. Pharmaceutical quality by design in academic nanomedicine research: stifling innovation or creativity through constraint? *J. Interdiscip. Nanomedicine* **0**, jin2.52 (2018).
108. Martínez, D. G. Untersuchung der in vitro Toxizität nanoskaliger Arzneistoffformulierungen. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2018).
109. ASTM F756 - Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials.

-
110. Mauch, S. Der Einfluss von PS-Liposomen auf die Makrophagenaktivität im Kontext vom Myokardinfarkt. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2018).
 111. Rieckmann, M. *et al.* Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses. *J. Clin. Invest.* **129**, 4922–4936 (2019).
 112. Rieckmann, M. R. Autoantigenspezifische CD4⁺ T-Zellen in ihrer kardioprotektiven Rolle nach Myokardinfarkt im Mausmodell. (Universität Leipzig, 2019).
 113. Bauer, M. *et al.* Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility. *Macromol. Biosci.* **12**, 986–998 (2012).
 114. Schlenk, F. *et al.* Comprehensive analysis of the in vitro and ex ovo hemocompatibility of surface engineered iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Arch. Toxicol.* **91**, 3271–3286 (2017).
 115. Zijlstra, W. G. & Buursma, A. Spectrophotometry of hemoglobin: Absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **118**, 743–749 (1997).
 116. HaemoScan. Biomaterial hemolytic assay. (2013).
 117. Schaffer, B. S. *et al.* Immune competency of a hairless mouse strain for improved preclinical studies in genetically-engineered mice. *Mol Cancer Ther* **9**, 2354–2364 (2010).
 118. Aramaki, Y., Nitta, F., Matsuno, R., Morimura, Y. & Tsuchiya, S. Inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 1–6 (1996).
 119. Gauthier, A. *et al.* Glucocorticoid-loaded liposomes induce a pro-resolution phenotype in human primary macrophages to support chronic wound healing. *Biomaterials* 1–15 (2018) doi:10.1016/j.biomaterials.2018.04.006.
 120. Quan, H., Park, H. C., Kim, Y. & Yang, H. C. Modulation of the anti-inflammatory effects of phosphatidylserine-containing liposomes by PEGylation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **105**, 1479–1486 (2017).
 121. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2009).
 122. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* **101**, 890–898 (1998).
 123. Serinkan, B. F. *et al.* Apoptotic cells quench reactive oxygen and nitrogen species and modulate TNF- α /TGF- β 1 balance in activated macrophages: Involvement of phosphatidylserine-dependent and -independent pathways. *Cell Death Differ.* **12**, 1141–1144 (2005).
 124. Blume, A. Biological calorimetry: Membranes. *Thermochim. Acta* **193**, 299–347 (1991).
 125. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. & Cullis, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *BBA - Biomembr.* **812**, 55–65 (1985).
 126. Nayar, R., Hope, M. J. & Cullis, P. R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *BBA - Biomembr.* **986**, 200–206 (1989).
 127. MacDonald, R. C. *et al.* Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1061**, 297–303 (1991).
-

-
128. Lang, J., Vigo-Pelfrey, C. & Martin, F. Liposomes composed of partially hydrogenated egg phosphatidylcholines: fatty acid composition, thermal phase behavior and oxidative stability. *Chem. Phys. Lipids* **53**, 91–101 (1990).
129. Svetlovics, J. A., Wheaten, S. A. & Almeida, P. F. Phase separation and fluctuations in mixtures of a saturated and an unsaturated phospholipid. *Biophys. J.* **102**, 2526–2535 (2012).
130. Hirama, T. *et al.* Membrane curvature induced by proximity of anionic phospholipids can initiate endocytosis. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
131. Gabizon, A., Price, D. C., Huberty, J. & Bresalier, R. S. Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: Biodistribution and imaging studies. *Cancer Res.* **50**, 6371–6378 (1990).
132. Klibanov, A. L., Maruyama, K., Beckerleg, A. M., Torchilin, V. P. & Huang, L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *BBA - Biomembr.* **1062**, 142–148 (1991).
133. Boerman, O. C. *et al.* Optimization of technetium-99m-labeled PEG liposomes to image focal infection: effects of particle size and circulation time. *J. Nucl. Med.* **38**, 489–93 (1997).
134. Ramos, G. C. *et al.* Apoptotic mimicry: Phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **151**, 844–50 (2007).
135. Fadok, V. A., De Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M. & Bratton, D. L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 1071–1077 (2001).
136. Koster, V. S., Kuks, P. F. M., Lange, R. & Talsma, H. Particle size in parenteral fat emulsions, what are the true limitations? *Int. J. Pharm.* **134**, 235–238 (1996).
137. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
138. Meister, A. & Blume, A. (Cryo) Transmission electron microscopy of phospholipid model membranes interacting with amphiphilic and polyphilic molecules. *Polymers (Basel)*. **9**, (2017).
139. Jolanda Maria van den Hoven. Liposomal glucocorticoids: pharmaceutical, preclinical and clinical aspects. (Utrecht University, 2012).
140. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research FDA. *Liposome drug products chemistry, manufacturing, and controls; Human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation - guidance for industry.* <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> (2018).
141. Evans, E. A. & Parsegian, V. A. Energetics of membrane deformation and adhesion in cell and vesicle aggregation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **416**, 13–33 (1983).
142. Kunjachan, S. *et al.* Physicochemical and biological aspects of macrophage-mediated drug targeting in anti-microbial therapy. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **26**, 63–71 (2012).
143. Markones, M. *et al.* Engineering asymmetric lipid vesicles: Accurate and convenient control of the outer leaflet lipid composition. *Langmuir* **34**, 1999–2005 (2018).
-

-
144. Grit, M. & Crommelin, D. J. A. The effect of surface charge on the hydrolysis kinetics of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine and egg phosphatidylglycerol in aqueous liposome dispersions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1167**, 49–55 (1993).
 145. Rahnfeld, L., Thamm, J., Steiniger, F., van Hoogevest, P. & Luciani, P. Study on the in situ aggregation of liposomes with negatively charged phospholipids for use as injectable depot formulation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **168**, 10–17 (2018).
 146. Grit, M. & Crommelin, D. J. A. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 3–18 (1993).
 147. Grit, M., de Smidt, J. H., Struijke, A. & Crommelin, D. J. A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Int. J. Pharm.* **50**, 1–6 (1989).
 148. Grit, M., Underberg, W. J. M. & Crommelin, D. J. A. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *J. Pharm. Sci.* **82**, 362–366 (1993).
 149. Kepsil, C. R. & Dennis, E. A. Alkaline hydrolysis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biochemistry* **20**, 6079–6085 (1981).
 150. Samuni, A. M., Lipman, A. & Barenholz, Y. Damage to liposomal lipids: Protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. *Chem. Phys. Lipids* **105**, 121–134 (2000).
 151. Frank, J. *et al.* Synthesis, characterization, and nanoencapsulation of tetrathiatriarylmethyl and tetrachlorotriarylmethyl (trityl) radical derivatives-A study to advance their applicability as in vivo EPR oxygen sensors. *J. Org. Chem.* **80**, 6754–6766 (2015).
 152. Kempe, S., Metz, H. & Mäder, K. Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - Chances and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **74**, 55–66 (2010).
 153. Ramana, L. N., Sethuraman, S., Ranga, U. & Krishnan, U. M. Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine. *J. Biomed. Sci.* **17**, 1–9 (2010).
 154. Grit, M. & Crommelin, D. J. A. The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chem. Phys. Lipids* **62**, 113–122 (1992).
 155. Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D. & Schnekenburger, J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72**, 370–377 (2009).
 156. Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. & Hübner, H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. in *Cell Viability Assays - Methods and Protocols* (eds. Gilbert, D. F. & Friedrich, O.) 1–18 (Humana Press, 2017).
 157. van Hoogevest, P., Liu, X., Fahr, A. & Leigh, M. L. S. Role of phospholipids in the oral and parenteral delivery of poorly water soluble drugs. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **21**, 5–16 (2011).
 158. Parnham, M. J. & Wetzig, H. Toxicity screening of liposomes. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 263–274 (1993).
 159. Płaczek, M. *et al.* Comparison of the in vitro cytotoxicity among phospholipid-based parenteral drug delivery systems: Emulsions, liposomes and aqueous lecithin dispersions (WLDs). *Eur. J. Pharm. Sci.* **127**, 92–101 (2019).
 160. Roethlisberger, D., Mahler, H. C., Altenburger, U. & Pappenberger, A. If euhydic and isotonic do not work, what are acceptable pH and osmolality for parenteral drug dosage forms? *J. Pharm. Sci.* **106**, 446–456 (2017).
-

-
161. Wang, J. *et al.* Enhanced efficacy of curcumin with phosphatidylserine-decorated nanoparticles in the treatment of hepatic fibrosis. *Drug Deliv.* **25**, 1–11 (2018).
 162. Matsuzawa, T. & Ikarashi, Y. Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions. *Lab. Anim.* **13**, 329–331 (1979).
 163. Bou Ghosn, E. E. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2568–2573 (2010).
 164. Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. & Yau-Young, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *BBA - Biomembr.* **1066**, 29–36 (1991).
 165. von Schlieffen, E. *et al.* Multi-hit inhibition of circulating and cell-associated components of the Toll-Like Receptor 4 pathway by oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 356–362 (2008).
 166. Oskolkova, O. V. *et al.* Oxidized phospholipids are more potent antagonists of lipopolysaccharide than inducers of inflammation. *J. Immunol.* **185**, 7706–7712 (2010).
 167. Mauerhofer, C., Philippova, M., Oskolkova, O. V. & Bochkov, V. N. Hormetic and anti-inflammatory properties of oxidized phospholipids. *Mol. Aspects Med.* **49**, 78–90 (2016).
 168. Lee, K. D., Hong, K. & Papahadjopoulos, D. Recognition of liposomes by cells: In vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *BBA - Biomembr.* **1103**, 185–197 (1992).
 169. Quintero, O. A. & Wright, J. R. Metabolism of phosphatidylglycerol by alveolar macrophages in vitro. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, 399–407 (2000).
 170. Amsen, D., Visser, K. E. De & Town, T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. **511**, 107–142 (2009).
 171. Wu, Y. Z. *et al.* Surfactant protein-A and phosphatidylglycerol suppress type IIA phospholipase A2 synthesis via nuclear factor- κ B. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 692–699 (2003).
 172. Kuronuma, K. *et al.* Anionic pulmonary surfactant phospholipids inhibit inflammatory responses from alveolar macrophages and U937 cells by binding the lipopolysaccharide-interacting proteins CD14 and MD-2. *J. Biol. Chem.* **284**, 25488–25500 (2009).
 173. Schromm, A. B., Brandenburg, K., Rietschel, E. T. & Seydel, U. Do endotoxin aggregates intercalate into phospholipid membranes in a nonspecific, hydrophobic manner? *J. Endotoxin Res.* **2**, 313–323 (1995).
 174. Semple, S. C., Chonn, A. & Cullis, P. R. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry* **35**, 2521–2525 (1996).
 175. Sieber, S. *et al.* Zebrafish as an early stage screening tool to study the systemic circulation of nanoparticulate drug delivery systems in vivo. *J. Control. Release* **264**, 180–191 (2017).
 176. Allen, T. M. & Hansen, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *BBA - Biomembr.* **1068**, 133–141 (1991).
 177. Ahsan, F., Rivas, I. P., Khan, M. A. & Torres Suárez, A. I. Targeting to macrophages: Role of physicochemical properties of particulate carriers - Liposomes and microspheres - On the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release* **79**, 29–40 (2002).
 178. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 606–616 (2005).
 179. Gabizon, A. & Papahadjopoulos, D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *BBA - Biomembr.* **1103**, 94–100 (1992).
-

-
180. Daemen, T. *et al.* Different intrahepatic distribution of phosphatidylglycerol and phosphatidylserine liposomes in the rat. *Hepatology* **26**, 416–423 (1997).
 181. Levchenko, T. S., Rammohan, R., Lukyanov, A. N., Whiteman, K. R. & Torchilin, V. P. Liposome clearance in mice: The effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *Int. J. Pharm.* **240**, 95–102 (2002).
 182. Quan, H., Park, H. C., Kim, Y. & Yang, H. C. Modulation of the anti-inflammatory effects of phosphatidylserine-containing liposomes by PEGylation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **105**, 1479–1486 (2017).
 183. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Andresen, T. L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: An integrated analysis and perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**, 481–503 (2012).
 184. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
 185. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 1–22 (2014).
 186. Hofmann, A. F. & Small, D. M. Detergent properties of bile salts: Correlation with physiological function. *Annu. Rev. Med.* **18**, 333–376 (1967).
 187. Ben-Shaul, A. & Gelbart, W. M. Statistical thermodynamics of amphiphile self-assembly: Structure and phase transitions in micellar solutions. in *Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers* (eds. Gelbart, W. M., Ben-Shaul, A. & Roux, D.) 1–15 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994).
 188. Du Nouy, L. P. An interfacialtensiometer for universal use. *J. Gen. Physiol.* 625–632 (1925).
 189. Garidel, P., Hildebrand, A., Neubert, R. & Blume, A. Thermodynamic characterization of bile salt aggregation as a function of temperature and ionic strength using isothermal titration calorimetry. *Langmuir* **16**, 5267–5275 (2000).
 190. Schubert, R. Liposome preparation by detergent removal. *Methods Enzymol.* **367**, 46–70 (2003).
 191. Rupp, C., Steckel, H. & Müller, B. W. Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures. *Int. J. Pharm.* **387**, 120–128 (2010).
 192. Cohen, D. E. & Carey, M. C. Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particle structure and metastable cholesterol solubilities. *J Lipid Res* **32**, 1291–1302 (1991).
 193. Hildebrand, A., Beyer, K., Neubert, R., Garidel, P. & Blume, A. Solubilization of negatively charged DPPC/DPPG liposomes by bile salts. *J. Colloid Interface Sci.* **279**, 559–571 (2004).
 194. Schurtenberger, P., Mazer, N. & Känzig, W. Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salt and lecithin. *J. Phys. Chem.* **89**, 1042–1049 (1985).
 195. Mazer, N. A. *et al.* Quasi-elastic light scattering studies of native hepatic bile from the dog: Comparison with aggregative behavior of model biliary lipid systems. *Biochemistry* **23**, 1994–2005 (1984).
 196. Schurtenberger, P., Mazer, N. A. & Känzig, W. Dynamic laser light scattering studies of the micelle to vesicle transition in model and native bile. *Hepatology* **4**, (1984).
 197. Stark, R. E., Gosselin, G. J., Donovan, J. M., Carey, M. C. & Roberts, M. F. Influence of dilution on the physical state of model bile systems: NMR and quasi-elastic light-scattering investigations. *Biochemistry* **24**, 5599–5605 (1985).
-

198. Walter, A., Vinson, P. K., Kaplun, A. & Talmon, Y. Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle micelle transition. *Biophys. J.* **60**, 1315–1325 (1991).
199. Long, M. A., Kaler, E. W. & Lee, S. P. Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions. *Biophys. J.* **67**, 1733–1742 (1994).
200. Galletly, D. C., Wilson, L. F., Treuren, B. C. & Boon, B. P. Diazepam mixed micelle - Comparison with diazepam in propylene glycol and midazolam. *Anaesth. Intensive Care* **13**, 352–354 (1985).
201. Cohen, D. E., Thurston, G. M., Chamberlin, R. A., Benedek, G. B. & Carey, M. C. Laser light scattering evidence for a common wormlike growth structure of mixed micelles in bile salt- and straight-chain detergent-phosphatidylcholine aqueous systems: Relevance to the micellar structure of bile. *Biochemistry* **37**, 14798–14814 (1998).
202. Narain, P. K., Demaria, E. J. & Heuman, D. M. Lecithin protects against plasma membrane disruption by bile salts. *J. Surg. Res.* **78**, 131–136 (1998).
203. Rudman, D. & Kendall, F. E. Bile acid content of human serum. II. The binding of cholanic acids by human plasma proteins. *J. Clinical Investig.* **36**, 538–542 (1956).
204. Kakis, G., Yousef, I. M. & Fisher, M. M. Studies on the binding of bile acids by plasma proteins. in *Gastroenterology* vol. 72 1178 (1977).
205. Roda, A., Cappelleri, G., Aldini, R. & Barbara, L. Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J. Lipid Res.* **23**, 490–495 (1982).
206. Ballinger, A. B., Forget, D., Le Brun, A. & Farthing, M. J. G. An evaluation of the safety of mixed micelles in healthy subjects. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **20**, 110–112 (1996).
207. Diazyme, L. *Total bile acids test & clinical diagnosis*. <http://www.diazyme.com/websites/diazyme/images/products/pdf/MK035-TBA-Brochure-061715.pdf> (2015).
208. Ilani, A. & Granoth, R. The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts. *Biochim. Biophys. Acta* **1027**, 199–204 (1990).
209. Gottfried, E. L. & Rapport, M. M. The biochemistry of plasmalogens. II. Hemolytic activity of some plasmalogen derivatives. *J. Lipid Res.* **4**, 57–62 (1963).
210. Reman, F. C. *et al.* Studies on the lysis of red cells and bimolecular lipid leaflets by synthetic lysolecithins, lecithins and structural analogs. *Chem. Phys. Lipids* **3**, 221–233 (1969).
211. Kuo, J. H. S., Jan, M. S., Jeng, J. & Chiu, H. W. Induction of apoptosis in macrophages by air oxidation of dioleoylphosphatidylglycerol. *J. Control. Release* **108**, 442–452 (2005).

7 Anhang

Tabelle A 1: Einteilung der im Multiplex-Assay untersuchten Zytokine und Chemokine.

Die Einteilung erfolgt nach Gruppen mit Angabe ihrer Herkunft (Produzierende Zellen) und biologischen Wirkung. Entnommen aus ⁸, ¹⁰ und ¹⁷.

Abkürzung	Produzierende Zellen (Auswahl)	Biologische Wirkung (Auswahl)
Interleukine		
IL-1 α	Makrophagen, Monozyten, Epithelzellen	Makrophagenaktivierung, Aktivierung von T-Zellen, Entzündung, Fieber
IL-1 β		
IL-6	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Entzündung, Fieber
IL-10	T- und B-Zellen, Makrophagen	Inhibitor von Makrophagenfunktionen
IL-12p70	Makrophagen, dendritische Zellen	Aktiviert NK-Zellen
IL-17A	TH17-Zellen, NK-Zellen	Entzündung, Produktion proinflammatorischer Zytokine
IL-23	Makrophagen, dendritische Zellen	IFN- γ -Produktion, Proliferation von TH17-Zellen
IL-27	Monozyten, Makrophagen	IFN- γ -Produktion, Differenzierung zu TH1-Zellen
Interferone		
IFN- β	Fibroblasten	Antiviral, erhöhte MHC-Klasse I Expression
IFN- γ	T-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, erhöhte Expression von MHC-Molekülen
Tumornekrosefaktoren		
TNF- α	Makrophagen, T-Zellen	Endothelaktivierung, Entzündung
Koloniestimulierende Faktoren		
GM-CSF	T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen	Wachstum von Granulozyten- und Monozytenvorläufern
Chemokine		
MCP-1	TLR4-Signalweg	proinflammatorisch

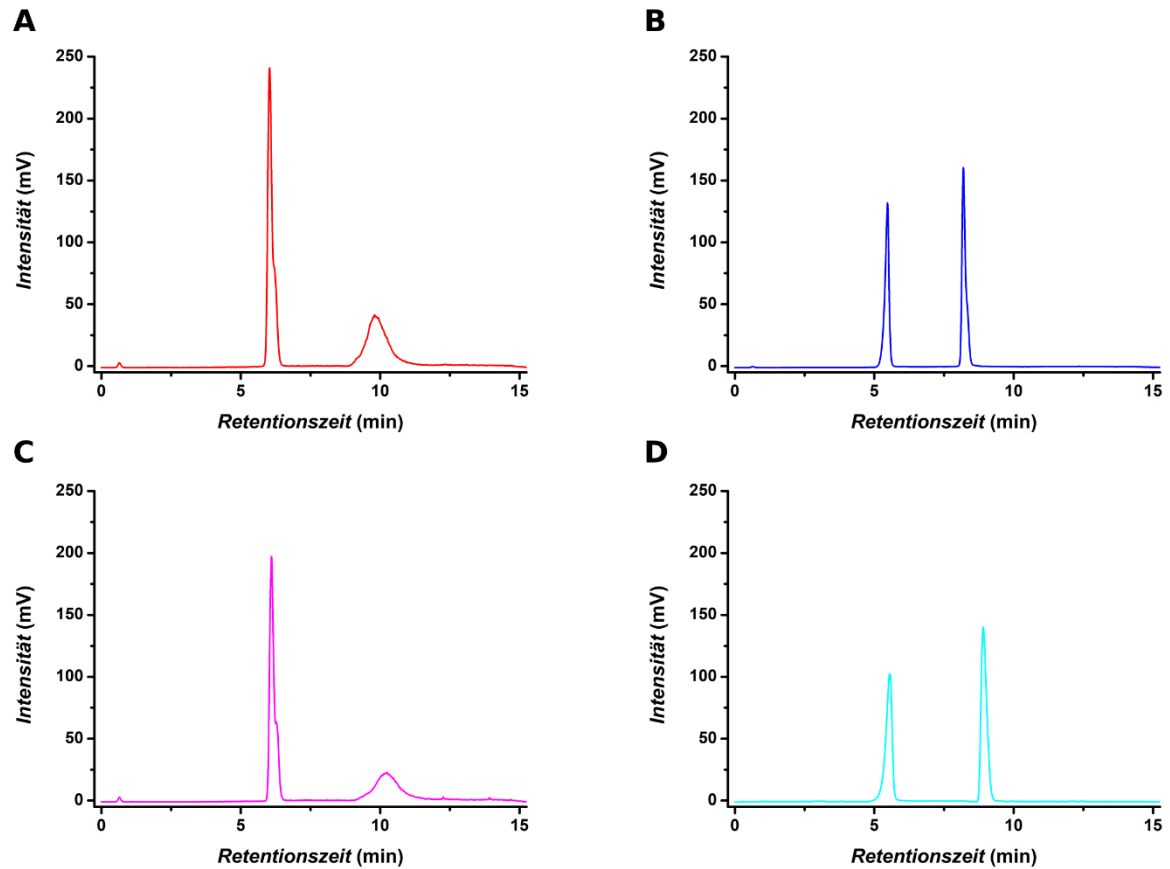


Abbildung A 1: Beispielchromatogramme, bestimmt mittels NP-HPLC (Säule 2).

A) zeigt DOPS (1. Peak = S100, 2. Peak = DOPS), B) DOPG (1. Peak = DOPG, 2. Peak = S100), C) SPS (1. Peak = S100, 2. Peak = SPS) und D) EPG (1. Peak = EPG, 2. Peak = S100) nanoskalige Formulierungen.

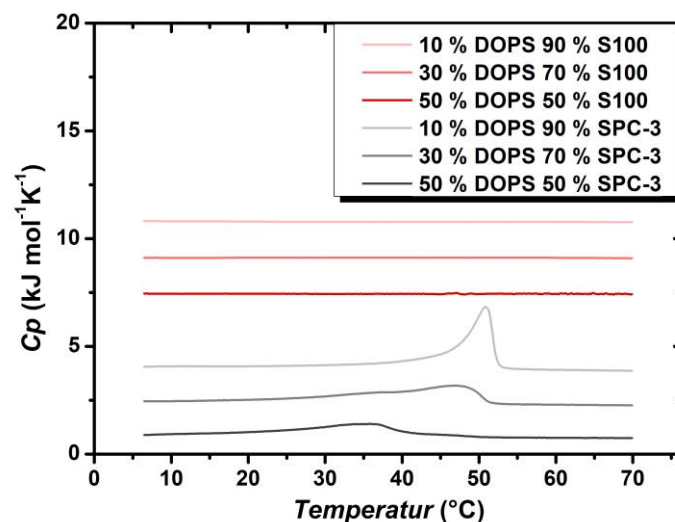


Abbildung A 2: Heizkurven der DOPS Liposomen, bestimmt mittels DSC.

Die Kurven sind vertikal verschoben.

S100 enthält vorwiegend ungesättigte Fettsäuren, SPC-3 vorwiegend gesättigte Fettsäuren.

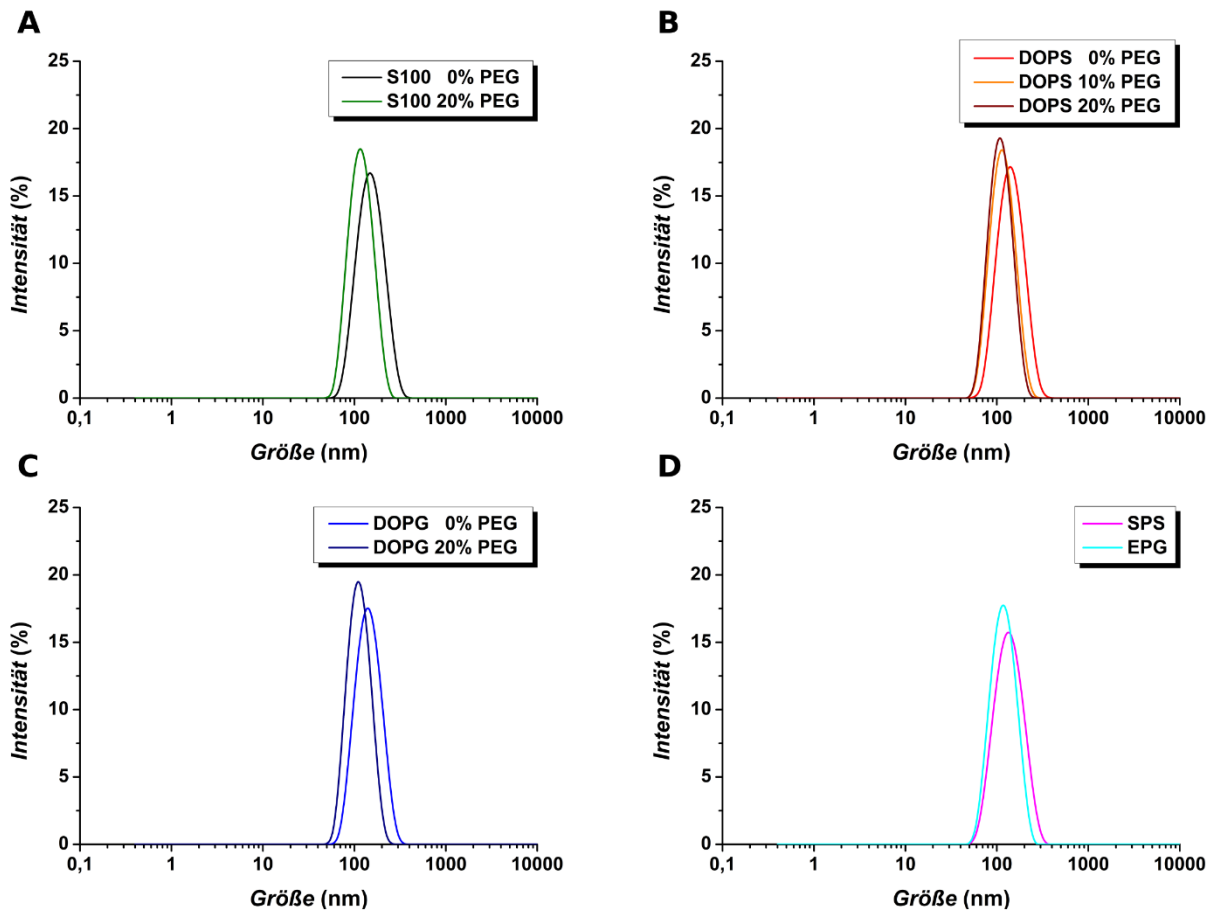


Abbildung A 3: Histogrammdarstellungen der intensitätsgewichteten Größenverteilungen der Liposomen, bestimmt mittels DLS.

A) zeigt S100, B) DOPS, C) DOPG und D) SPS und EPG Liposomenformulierungen.

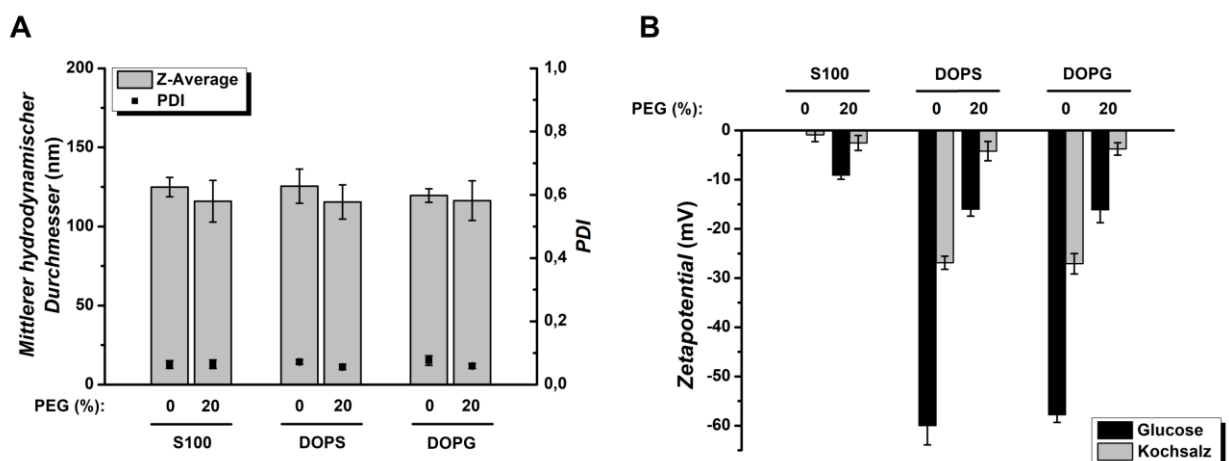


Abbildung A 4: Größe, Größenverteilung sowie Zetapotential DiR-markierter Liposomen, bestimmt mittels DLS bzw. ELS.

A) zeigt mittlere hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindices und B) Zetapotentiale.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

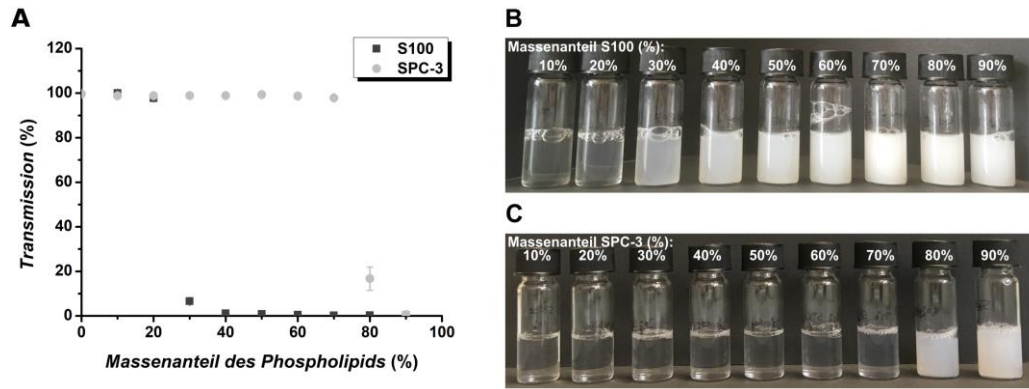


Abbildung A 5: Trübungsmessungen an Phospholipid-Lyso-Phospholipid-Mischungen, bestimmt mittels Spektralphotometer.

A) zeigt die prozentuale Transmission in Abhängigkeit von der Art und des Massenanteils des jeweiligen Phospholipids. B) und C) veranschaulichen makroskopische Aufnahmen für S100 für SPC-3. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils einem natürlichen Replikat.

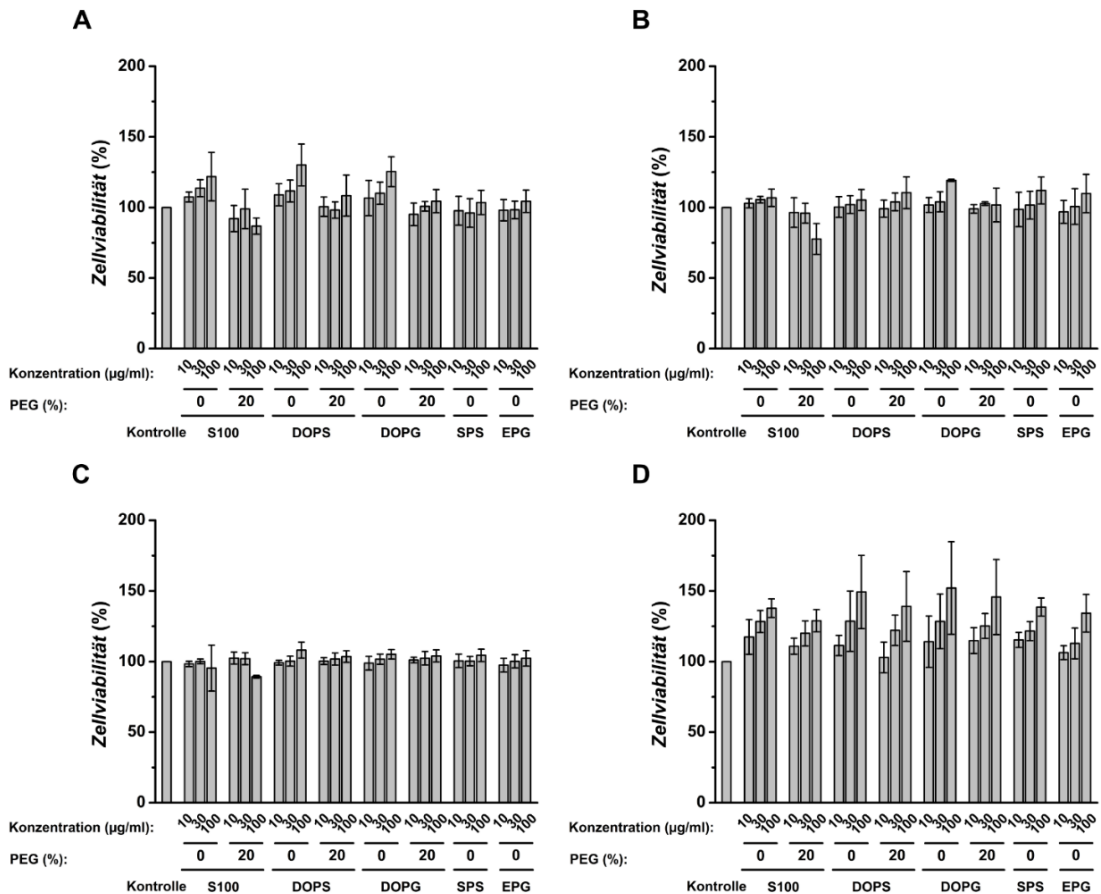


Abbildung A 6: Zellviabilität der Liposomen auf Fibroblasten-Zelllinien, bestimmt mittels Resazurin-Assay.

Die Inkubationszeit für A) und B) betrug 4, für C) und D) 96 Stunden. A) zeigt die Zellviabilität von murinen 3T3 und B) die von humanen NHDF Zellen. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der unbehandelten Kontrolle $\leq 15\%$ war.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen Zellviabilitäten, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Anhang

Tabelle A 2: Physikochemische Stabilitätsdaten der Liposomen, bestimmt mittels DLS.

Die Dauer der Stabilitätsuntersuchung betrug 28 Tage, die Lagerung erfolgte bei 8 °C vor Licht geschützt.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Liposomen- formulierung	initial				7 Tage				14 Tage				21 Tage				28 Tage			
	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD
S100	141	6	0,09	0,01	141	6	0,10	0,02	139	5	0,09	0,02	140	6	0,09	0,02	142	9	0,09	0,02
S100 20 % PEG	114	2	0,06	0,01	114	3	0,07	0,01	114	2	0,07	0,02	114	2	0,07	0,02	119	2	0,06	0,02
30 % DOPS	132	5	0,08	0,02	130	4	0,09	0,01	130	4	0,08	0,02	130	5	0,09	0,02	130	5	0,10	0,02
30 % DOPS 10 % PEG	111	2	0,06	0,02	112	3	0,07	0,02	111	2	0,07	0,02	112	3	0,07	0,02	111	2	0,06	0,02
30 % DOPS 20 % PEG	108	3	0,06	0,01	109	3	0,06	0,02	109	3	0,05	0,02	109	3	0,06	0,02	110	3	0,07	0,01
30 % DOPG	134	4	0,08	0,02	135	5	0,09	0,02	134	4	0,10	0,02	135	4	0,09	0,02	135	4	0,09	0,02
30 % DOPG 20 % PEG	112	5	0,08	0,04	111	2	0,07	0,02	111	3	0,06	0,02	112	2	0,07	0,02	116	4	0,07	0,02
30 % SPS	128	3	0,08	0,01	127	3	0,08	0,02	128	3	0,08	0,02	128	3	0,09	0,02	127	3	0,09	0,01
30 % EPG	126	2	0,08	0,02	126	3	0,09	0,02	127	3	0,09	0,02	127	3	0,08	0,02	127	2	0,09	0,01

Anhang

Tabelle A 3: Physikochemische Stabilitätsdaten der Liposomen, bestimmt mittels ELS.

Die Dauer der Stabilitätsuntersuchung betrug 28 Tage, die Lagerung erfolgte bei 8 °C vor Licht geschützt.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Liposomen- formulierung	initial				7 Tage				14 Tage				21 Tage				28 Tage			
	Saline	SD	Glucose	SD	Saline	SD	Glucose	SD	Saline	SD	Glucose	SD	Saline	SD	Glucose	SD	Saline	SD	Glucose	SD
S100	-1	1	-2	0	-2	1	-2	0	-2	1	-2	0	-2	1	-2	0	-2	1	-3	1
S100 20 % PEG	-2	1	-9	1	-2	1	-9	1	-2	1	-9	1	-2	1	-9	1	-2	1	-10	1
30 % DOPS	-30	5	-57	4	-28	4	-58	3	-30	3	-58	3	-29	2	-58	3	-28	2	-57	3
30 % DOPS 10 % PEG	-8	2	-23	2	-8	1	-23	1	-8	1	-23	1	-8	2	-22	1	-8	1	-22	1
30 % DOPS 20 % PEG	-3	1	-15	1	-3	1	-14	1	-3	1	-15	1	-3	1	-15	1	-3	1	-15	1
30 % DOPG	-29	2	-57	5	-27	2	-59	4	-27	1	-59	2	-28	2	-58	3	-28	2	-57	3
30 % DOPG 20 % PEG	-3	1	-16	1	-3	1	-16	1	-3	1	-16	1	-3	1	-15	1	-4	2	-17	2
30 % SPS	-30	3	-56	3	-27	2	-56	3	-25	2	-53	4	-25	2	-52	4	-27	2	-56	4
30 % EPG	-27	2	-57	3	-25	2	-55	4	-24	3	-55	3	-26	2	-56	3	-25	3	-58	3

Anhang

Tabelle A 4: Immunmodulierende Eigenschaften PEG-haltiger DOPS Liposomen auf MPM, bestimmt mittels Multiplex-Assay.

Es wurden C57BL/6J WT MPM verwendet. Tabelle A 4 1 zeigt die direkte und Tabelle A 4 2 die sequentielle Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokin- bzw. Chemokinwerte, bezogen auf die stimulierte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten als *Heatmap*.

1) Direkt		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPS		DOPS 10% PEG		DOPS 20% PEG	
				unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	62	100	59	100	61	97	92	96
IL-1a	%	31	100	32	30	27	34	34	37
IFN-g	%	0	100	0	94	0	99	1	112
TNF-a	%	1	100	1	23	1	25	1	28
MCP-1	%	14	100	16	97	14	134	30	115
IL-12p70	%	12	100	11	15	9	19	16	13
IL-1b	%	81	100	76	89	73	90	90	81
IL-10	%	105	100	149	71	23	94	109	56
IL-6	%	2	100	2	5	1	4	3	5
IL-27	%	23	100	21	33	22	25	36	24
IL-17a	%	120	100	145	110	52	92	113	61
IFN-b	%	14	100	19	50	21	43	32	55
GM-CSF	%	50	100	53	57	49	63	78	64

2) Sequentiell		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPS		DOPS 10% PEG		DOPS 20% PEG	
				unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	86	100	53	91	121	89	67	72
IL-1a	%	64	100	69	76	70	74	65	72
IFN-g	%	0	100	1	95	1	86	0	97
TNF-a	%	1	100	1	84	1	81	1	86
MCP-1	%	62	100	78	152	76	132	53	93
IL-12p70	%	25	100	10	88	53	79	27	61
IL-1b	%	82	100	77	94	100	95	83	81
IL-10	%	54	100	14	60	130	25	54	14
IL-6	%	1	100	2	84	1	64	1	61
IL-27	%	54	100	34	64	34	63	58	58
IL-17a	%	57	100	36	31	43	29	89	31
IFN-b	%	41	100	16	113	61	88	29	76
GM-CSF	%	104	100	32	80	143	97	74	103

Relative Werte (%)	100	80	60	40	20
--------------------	-----	----	----	----	----

Anhang

Tabelle A 5: Immunmodulierende Eigenschaften PEG-haltiger DOPG und S100 Liposomen auf MPM, bestimmt mittels Multiplex-Assay.

Es wurden C57BL/6J WT MPM verwendet. Tabelle A 5 1 zeigt die direkte und Tabelle A 5 2 die sequentielle Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokin- bzw. Chemokinwerte, bezogen auf die stimulierte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten als *Heatmap*.

1) Direkt		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPG		DOPG 20% PEG		S100		S100 20% PEG	
				unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	95	100	91	66	57	53	55	75	68	61
IL-1a	%	44	100	44	35	37	39	32	58	39	65
IFN-g	%	0	100	0	91	1	80	0	92	0	87
TNF-a	%	1	100	1	5	1	4	1	46	1	47
MCP-1	%	8	100	11	30	13	14	10	32	8	37
IL-12p70	%	16	100	14	14	14	11	12	12	17	10
IL-1b	%	67	100	69	72	67	67	79	77	77	68
IL-10	%	63	100	83	45	65	19	46	43	86	56
IL-6	%	1	100	1	2	1	2	1	9	1	9
IL-27	%	24	100	20	21	19	15	15	23	16	20
IL-17a	%	61	100	75	92	86	50	46	64	66	84
IFN-b	%	27	100	29	26	26	25	20	28	32	32
GM-CSF	%	48	100	47	34	31	35	48	51	59	37

2) Sequentiell		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPG		DOPG 20% PEG		S100		S100 20% PEG	
				unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	100	100	72	88	90	166	158	121	96	87
IL-1a	%	39	100	36	44	37	56	35	91	37	88
IFN-g	%	0	100	0	92	0	140	0	100	1	98
TNF-a	%	0	100	0	25	0	51	0	58	0	62
MCP-1	%	17	100	10	72	15	102	10	52	10	39
IL-12p70	%	20	100	17	22	18	43	33	31	23	20
IL-1b	%	96	100	96	96	96	96	96	96	96	96
IL-10	%	65	100	73	83	65	234	132	132	67	109
IL-6	%	0	100	0	6	0	15	0	25	0	24
IL-27	%	30	100	27	31	27	94	31	83	28	51
IL-17a	%	70	100	63	66	64	135	74	98	87	80
IFN-b	%	49	100	49	61	49	145	60	87	58	57
GM-CSF	%	71	100	67	78	69	111	78	78	68	71

Relative Werte (%) 100 80 60 40 20

Anhang

Tabelle A 6: Immunmodulierende Eigenschaften natürlicher (SPS, EPG) und synthetischer (DOPS, DOPG) konventioneller Liposomen auf MPM, bestimmt mittels Multiplex-Assay.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. Tabelle A 6 1 zeigt die direkte und Tabelle A 6 2 die sequentielle Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokin- bzw. Chemokinwerte, bezogen auf die stimulierte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten als *Heatmap*.

1) Direkt		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPS		SPS		DOPG		EPG	
	%			unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	134	100	75	96	169	205	114	101	142	139
IL-1a	%	16	100	11	9	12	14	14	20	17	25
IFN-g	%	0	100	0	91	0	122	0	102	0	115
TNF-a	%	0	100	0	17	1	21	0	9	1	12
MCP-1	%	14	100	10	69	11	96	11	24	11	28
IL-12p70	%	42	100	23	18	42	95	42	47	53	53
IL-1b	%	80	100	80	80	80	80	80	80	80	80
IL-10	%	169	100	76	82	124	120	85	80	149	120
IL-6	%	1	100	1	4	1	6	1	2	1	3
IL-27	%	12	100	4	9	6	12	8	12	17	11
IL-17a	%	28	100	21	30	82	74	56	104	100	41
IFN-b	%	41	100	34	41	41	96	47	47	60	58
GM-CSF	%	29	100	13	25	27	33	19	36	36	28

2) Sequentiell		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPS		SPS		DOPG		EPG	
	%			unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	66	100	44	125	61	143	99	110	56	73
IL-1a	%	8	100	7	32	10	33	9	45	9	95
IFN-g	%	0	100	0	103	0	109	0	110	0	109
TNF-a	%	0	100	0	79	0	99	0	43	0	54
MCP-1	%	12	100	16	97	14	136	13	102	18	73
IL-12p70	%	25	100	17	134	28	188	22	46	33	55
IL-1b	%	78	100	78	83	78	78	78	78	78	78
IL-10	%	59	100	96	169	56	239	160	259	49	45
IL-6	%	0	100	0	79	0	128	0	19	0	22
IL-27	%	19	100	10	123	24	158	14	61	22	74
IL-17a	%	72	100	18	131	54	151	54	82	61	83
IFN-b	%	34	100	24	125	36	195	42	99	44	95
GM-CSF	%	26	100	20	93	31	114	30	54	25	59

Relative Werte (%)	100	80	60	40	20
--------------------	-----	----	----	----	----

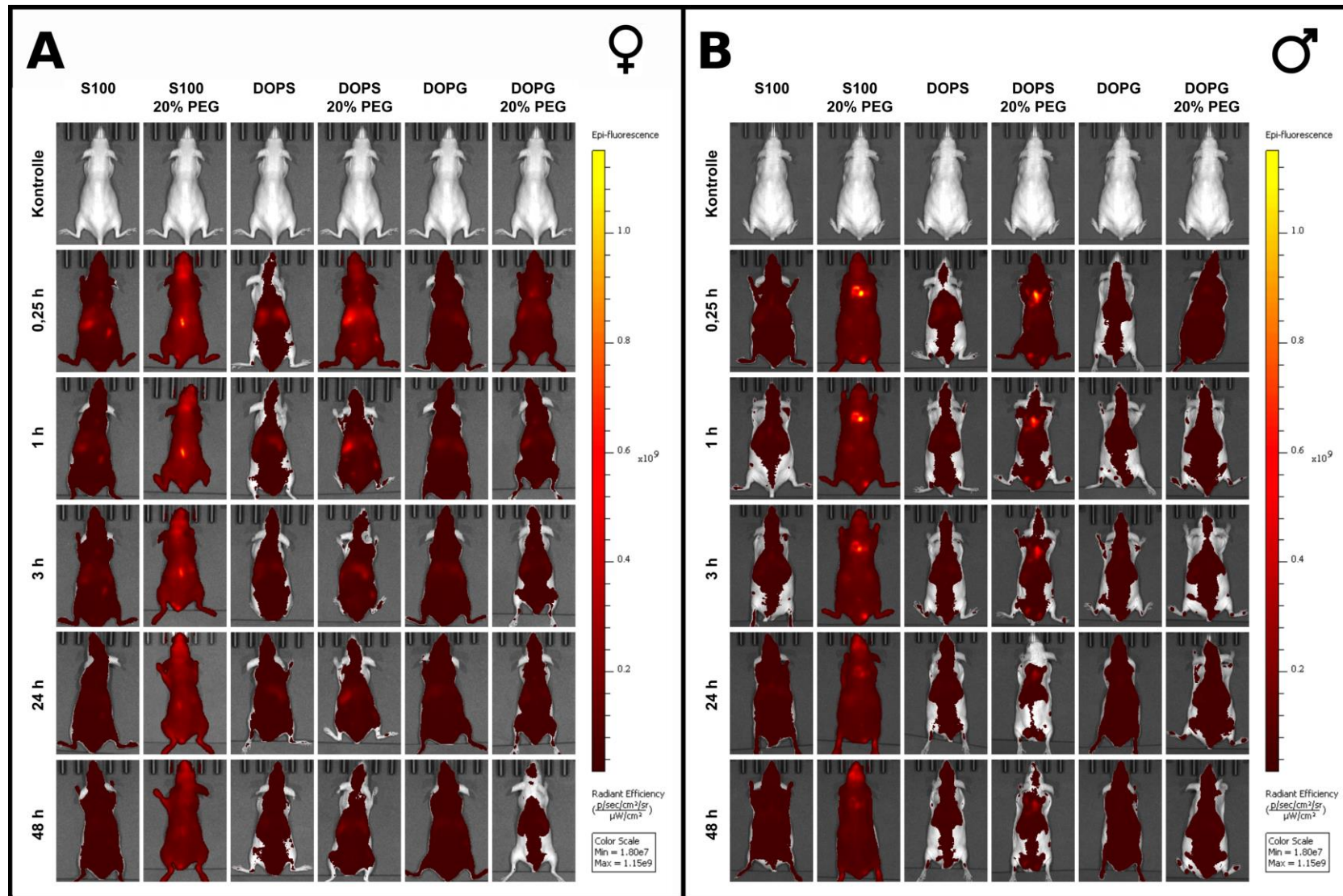


Abbildung A 7: Gesamtfloreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, dorsale Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

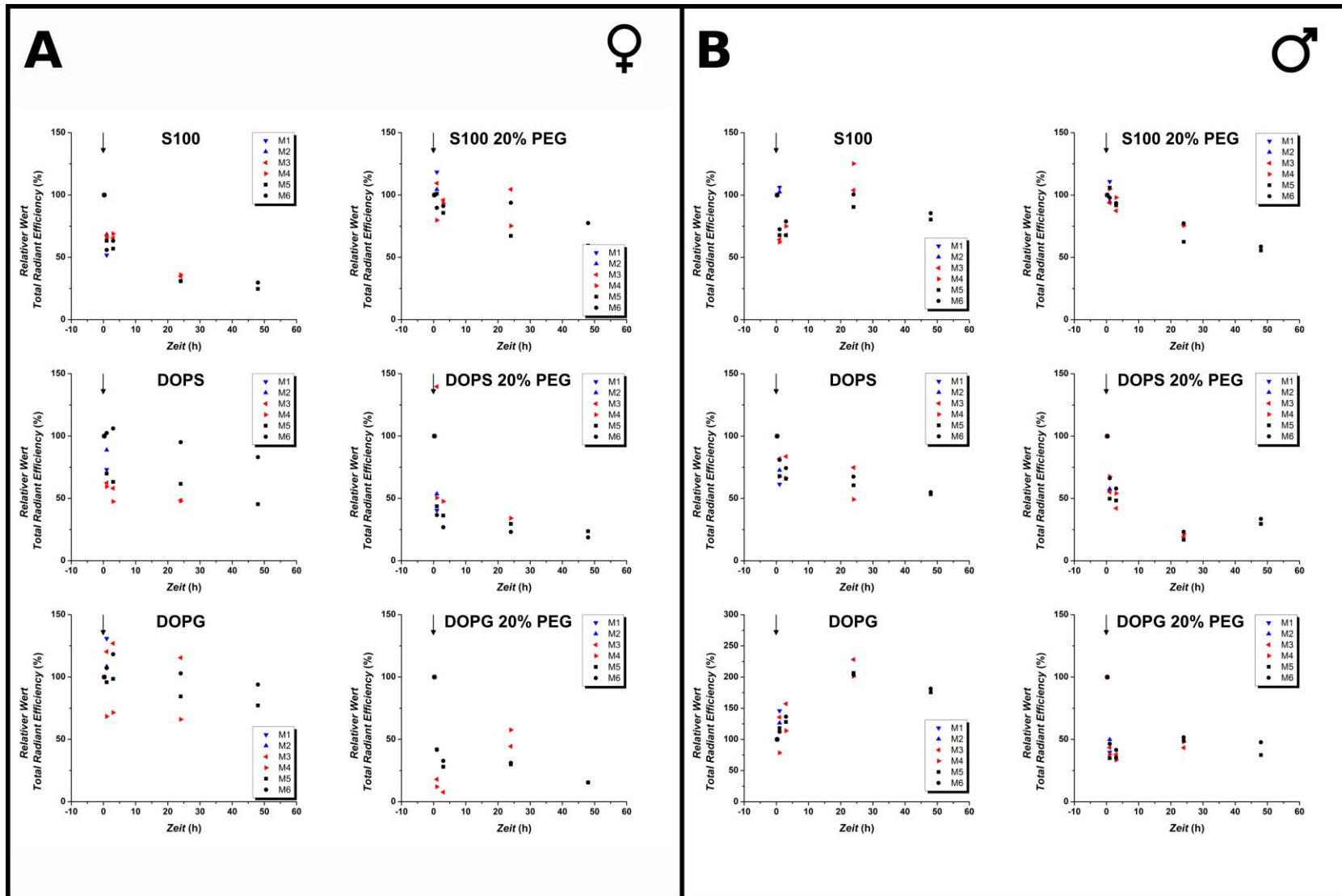


Abbildung A 8: TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, dorsale Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Dargestellt sind relative TRE bezogen auf den Zeitpunkt 0,25 Stunden *post* Injektion. M1 und M2 entsprechen Mäusen, die nach einer Stunde, M3 und M4 Mäusen, die nach 24 Stunden, M5 und M6 Mäusen, die nach 48 Stunden getötet wurden.

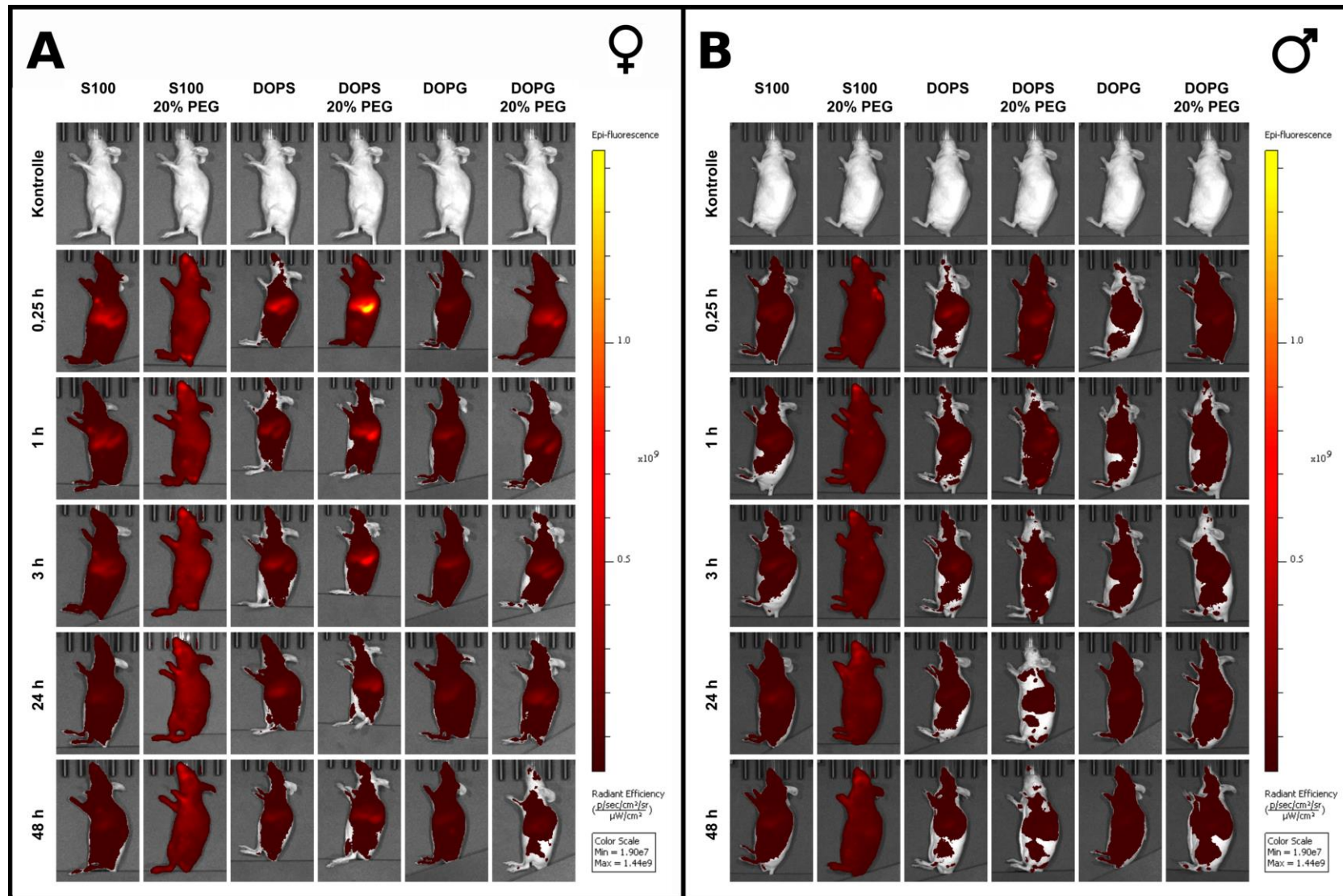


Abbildung A 9: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, lateral linke Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

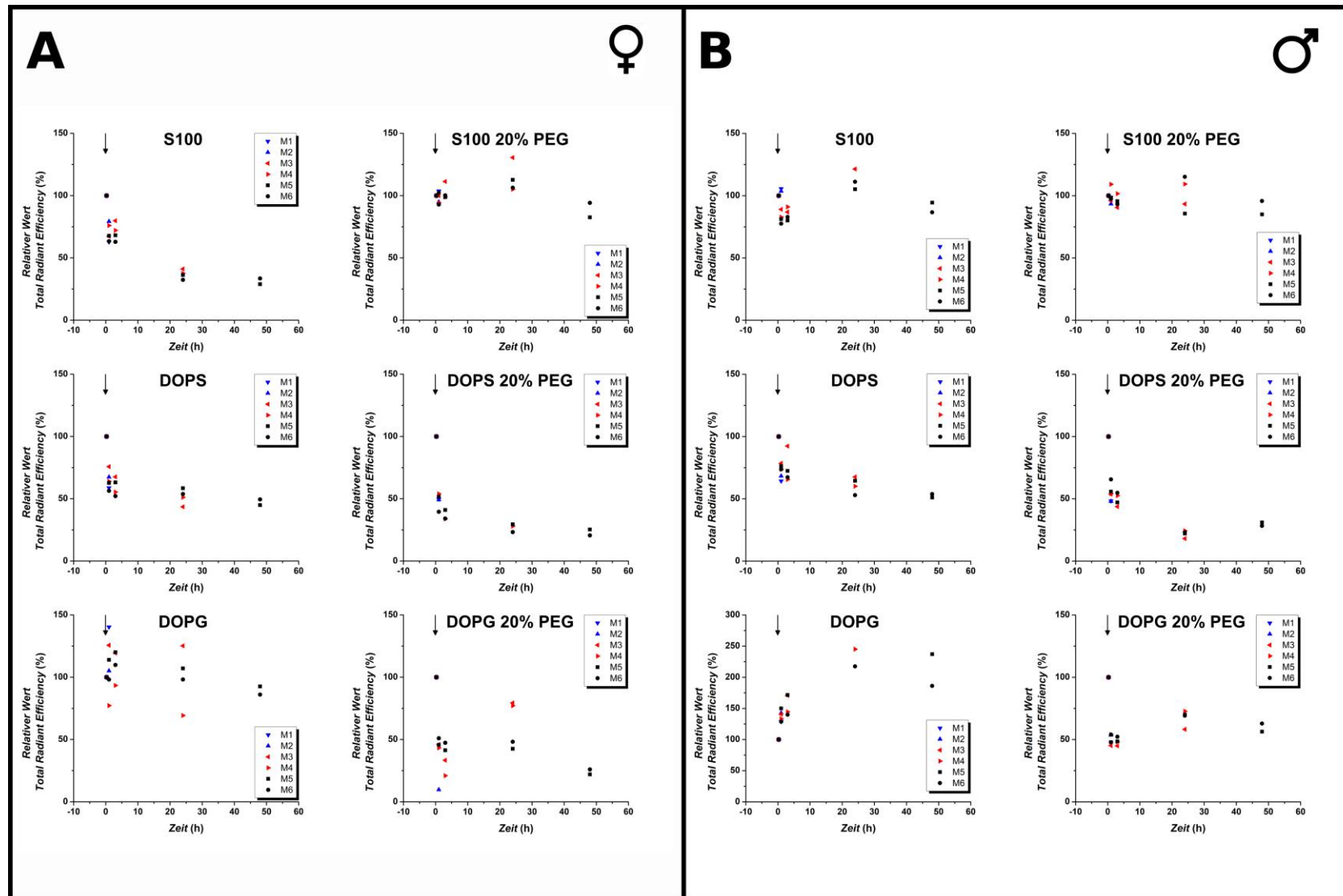


Abbildung A 10: TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, lateral linke Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.
 A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Dargestellt sind relative TRE bezogen auf den Zeitpunkt 0,25 Stunden *post* Injektion. M1 und M2 entsprechen Mäusen, die nach einer Stunde, M3 und M4 Mäusen, die nach 24 Stunden, M5 und M6 Mäusen, die nach 48 Stunden getötet wurden.

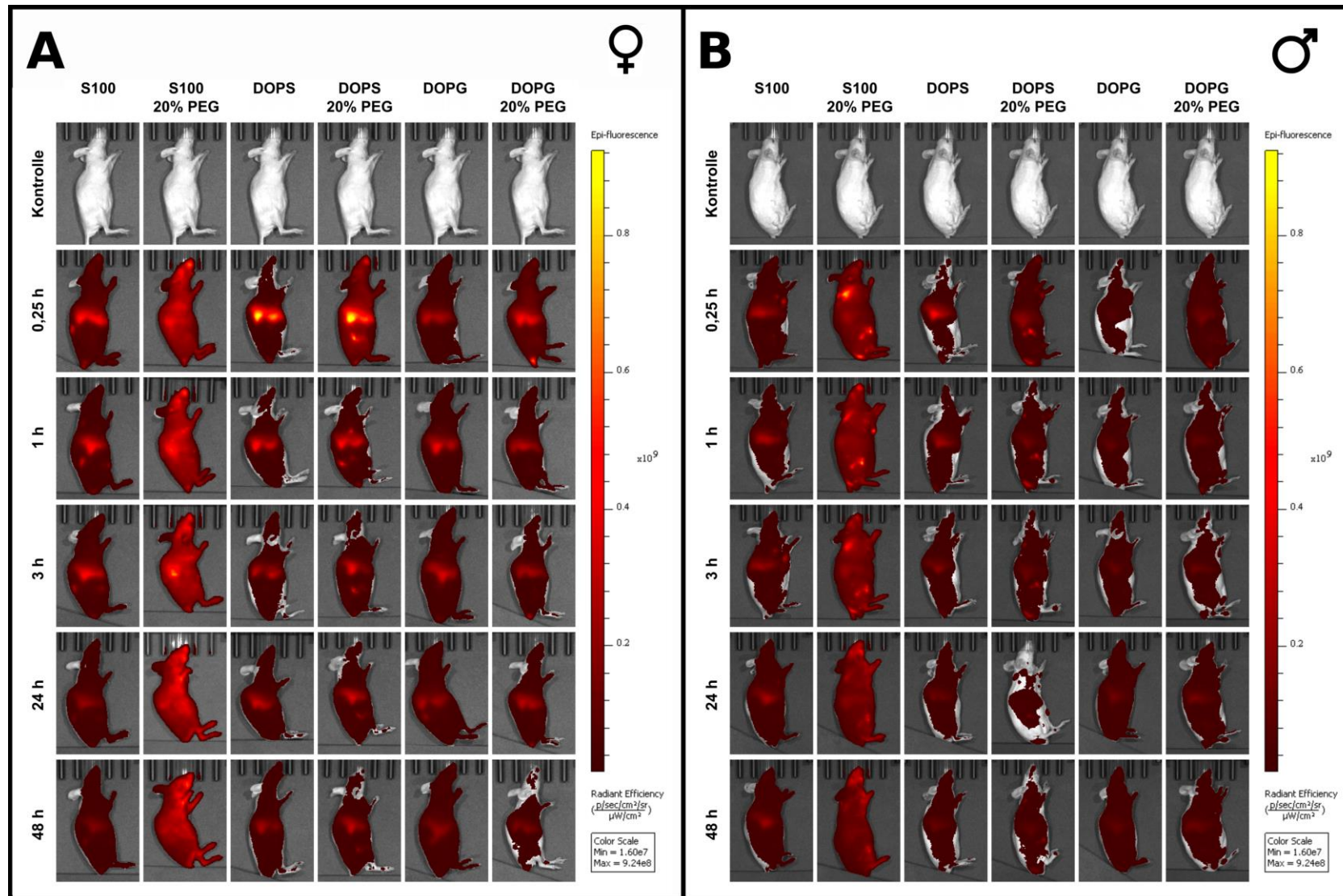


Abbildung A 11: Gesamtfloreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, lateral rechte Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

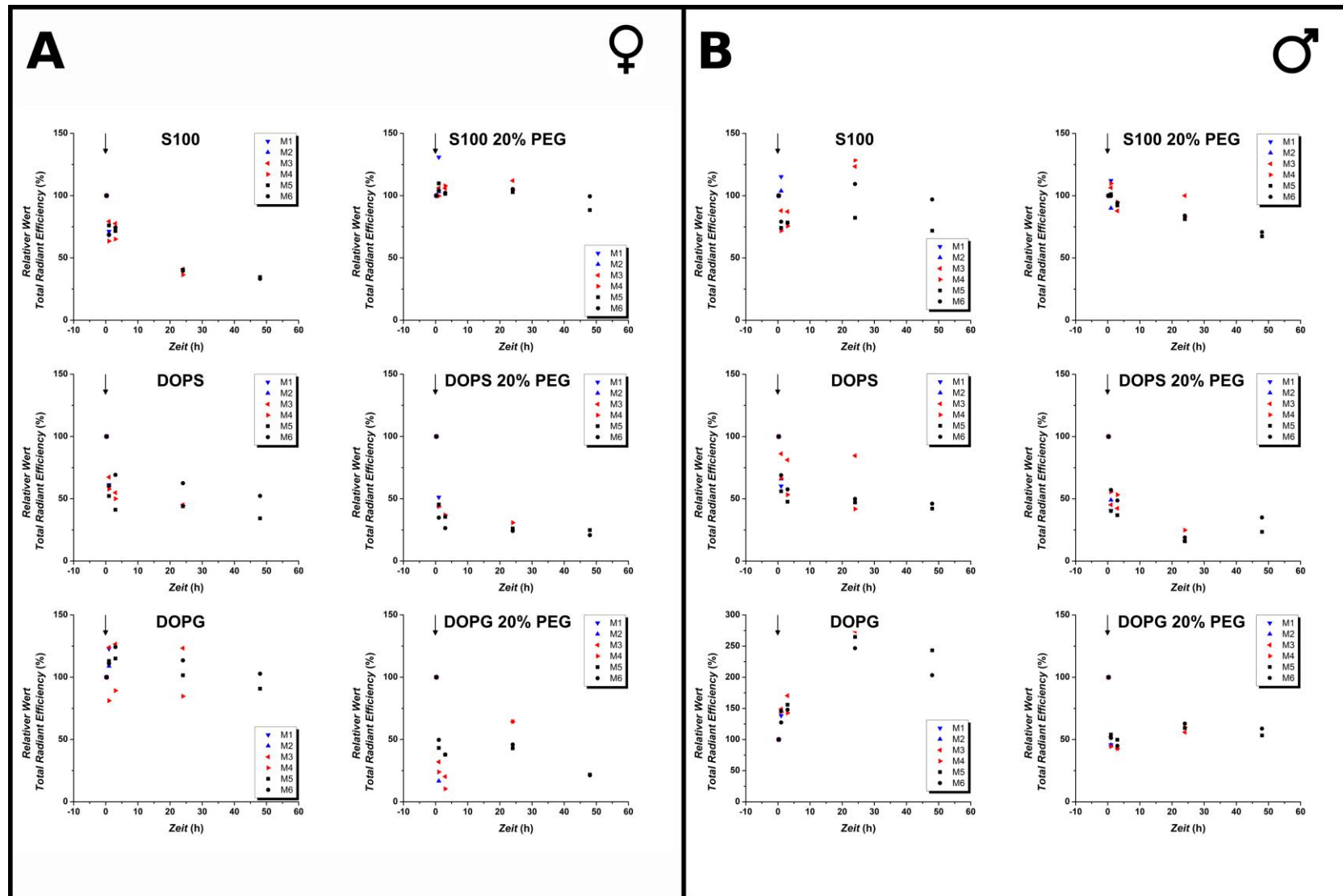


Abbildung A 12: TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in gesunden Mäusen, lateral rechte Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt weibliche und B) männliche SKH1 Mäuse. Dargestellt sind relative TRE bezogen auf den Zeitpunkt 0,25 Stunden *post* Injektion. M1 und M2 entsprechen Mäusen, die nach einer Stunde, M3 und M4 Mäusen, die nach 24 Stunden, M5 und M6 Mäusen, die nach 48 Stunden getötet wurden.

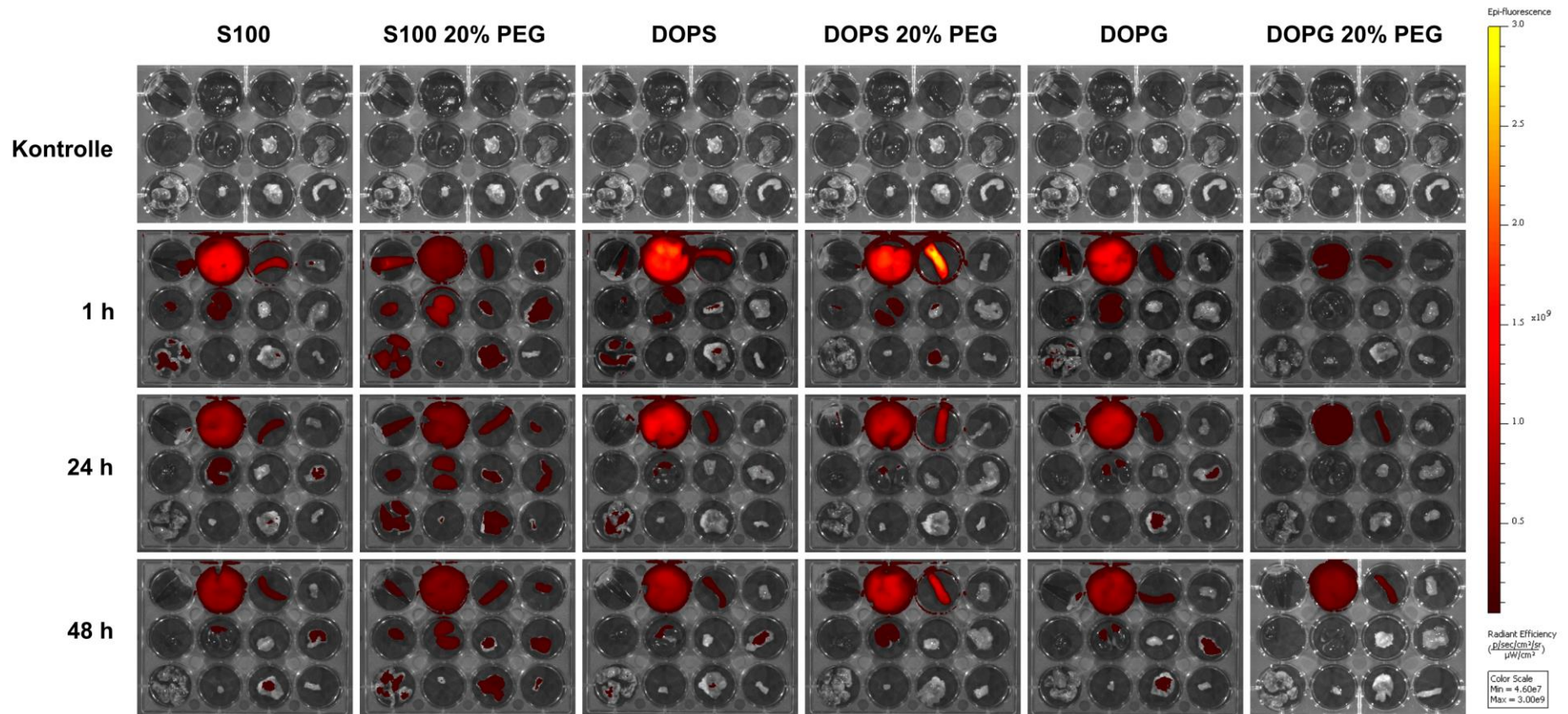


Abbildung A 13: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden weiblichen Mäusen, *ex vivo* Platte 1, bestimmt mittels *ex vivo* FI. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung und pro Endpunkt dargestellt.

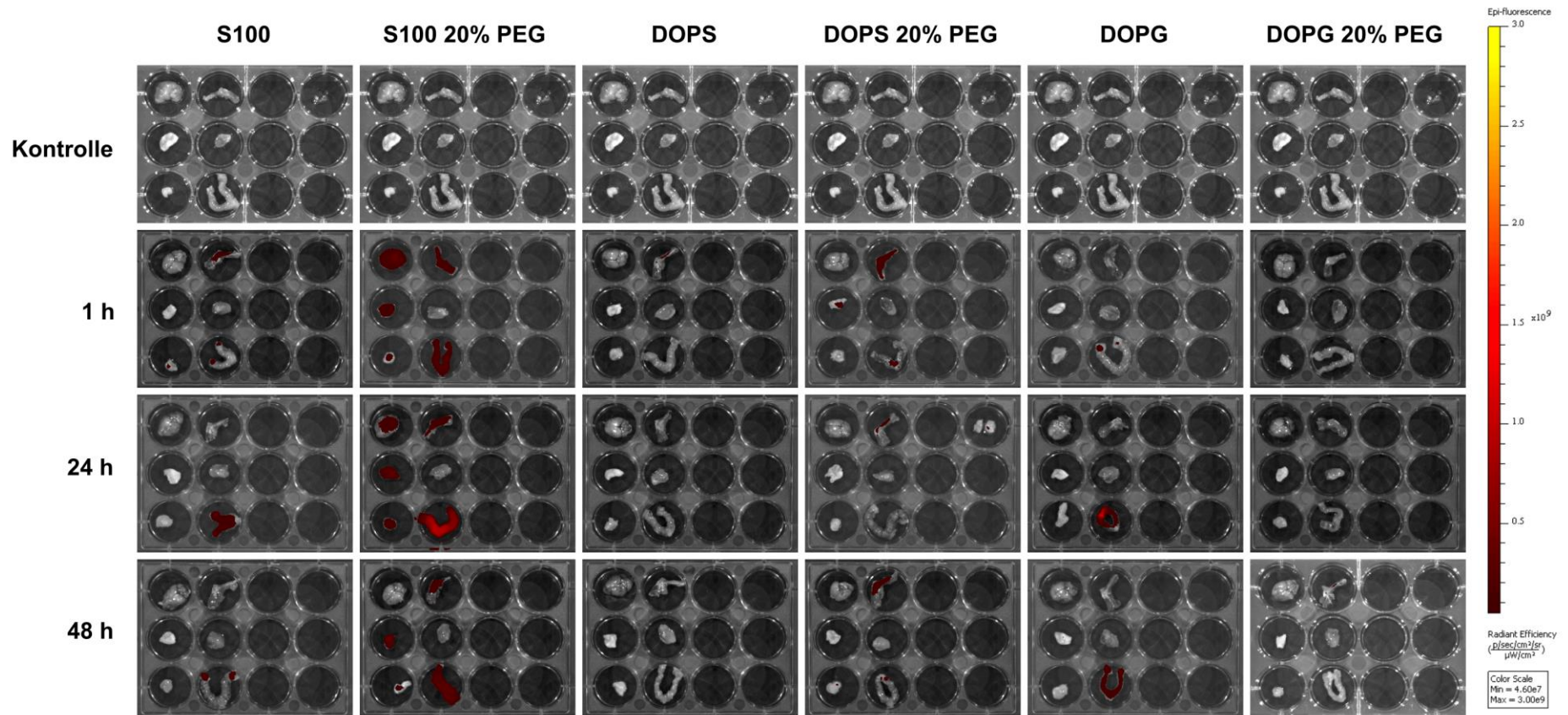


Abbildung A 14: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden weiblichen Mäusen, *ex vivo* Platte 2, bestimmt mittels *ex vivo* FI. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung und pro Endpunkt dargestellt.

Anhang

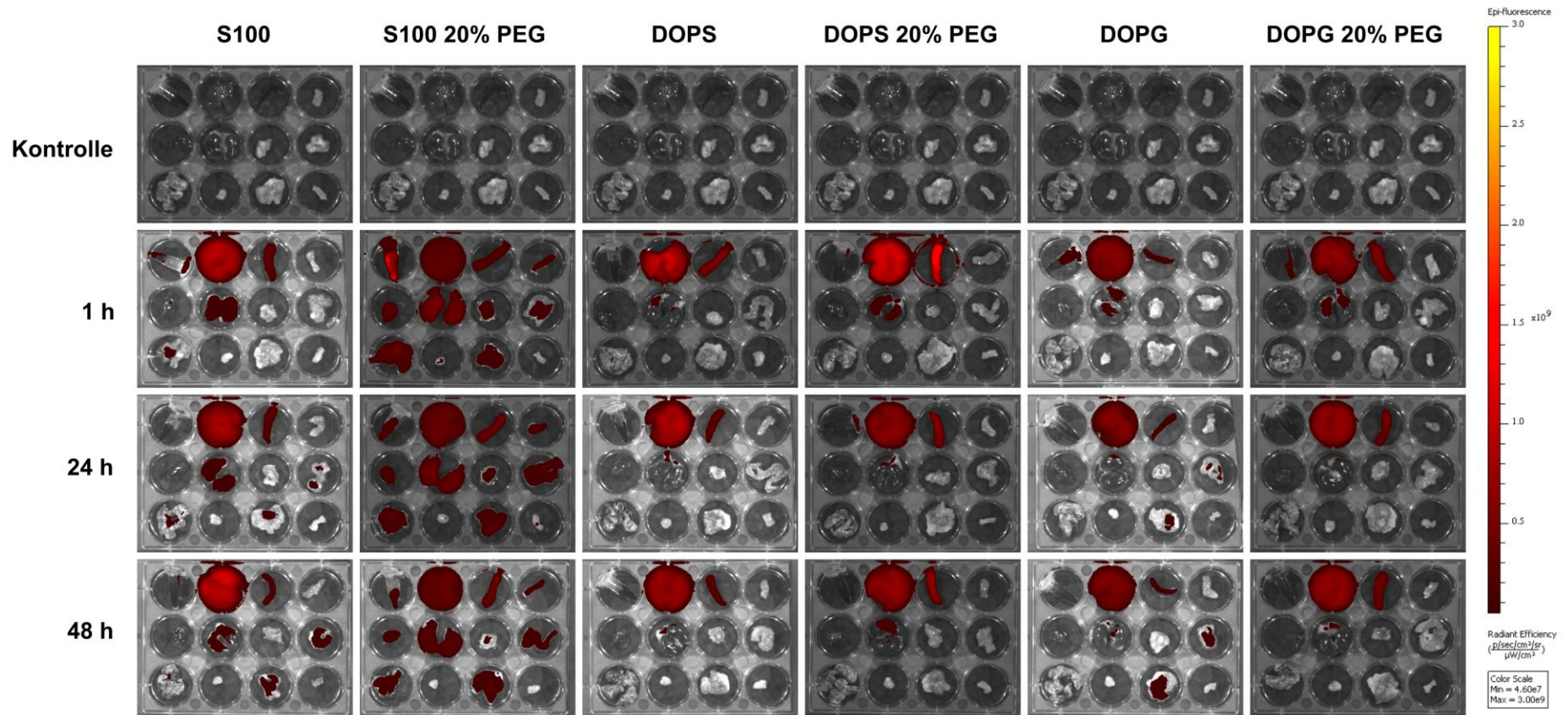


Abbildung A 15: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden männlichen Mäusen, ex vivo Platte 1, bestimmt mittels ex vivo FI. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung und pro Endpunkt dargestellt.

Anhang

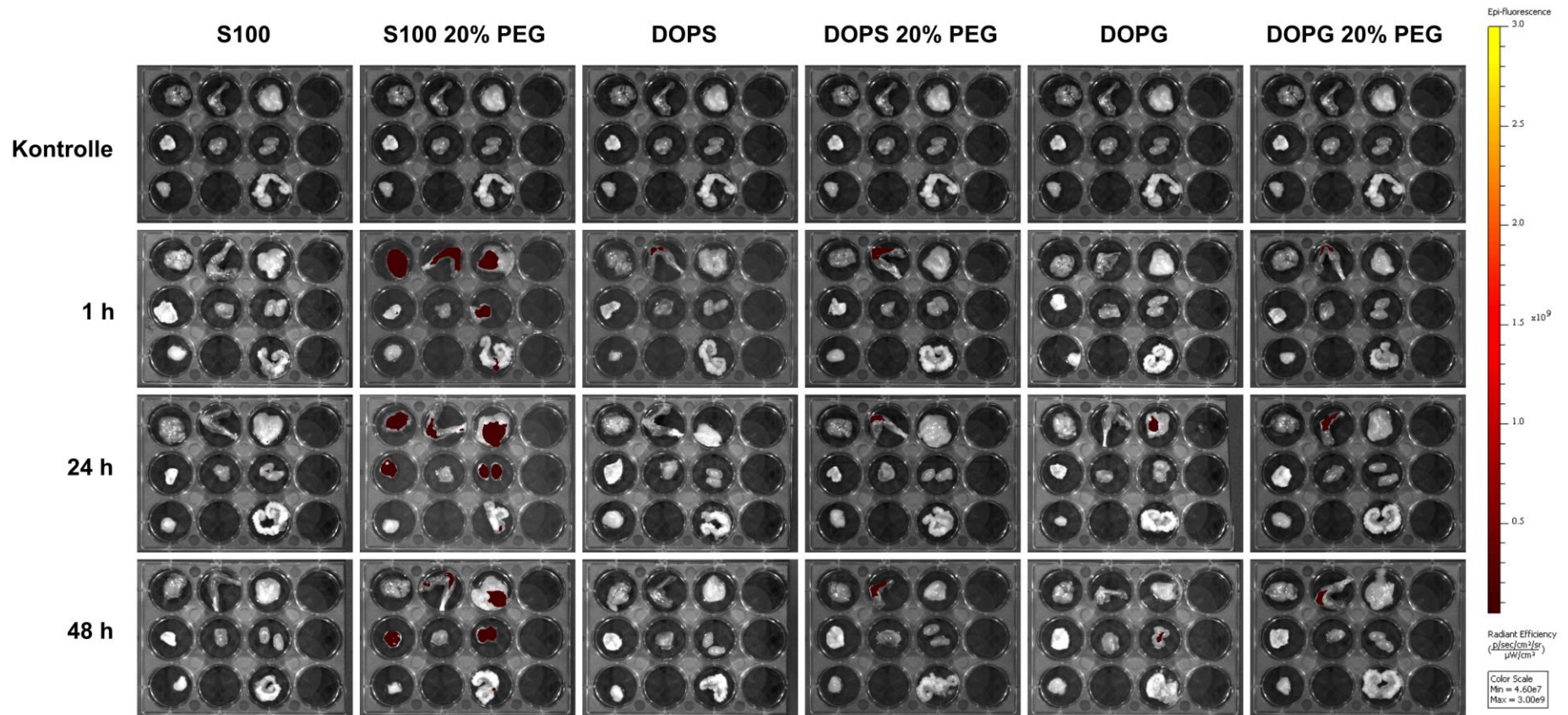


Abbildung A 16: Gesamtfluoreszenzintensitäten DiR-markierter Liposomen in gesunden männlichen Mäusen, ex vivo Platte 2, bestimmt mittels ex vivo FI. Exemplarisch wurde je eine Maus pro Liposomenformulierung und pro Endpunkt dargestellt.

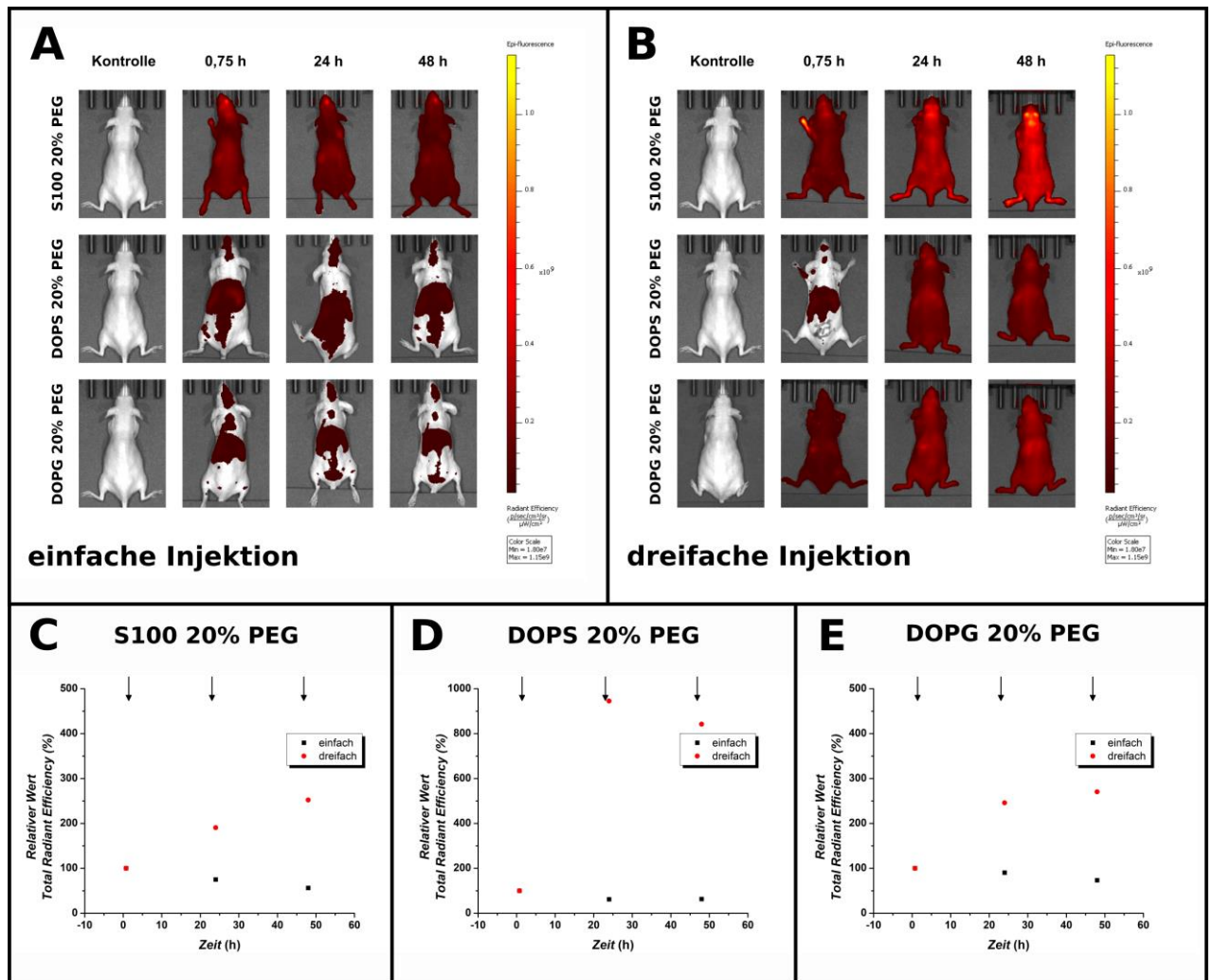


Abbildung A 17: Gesamtfloreszenzintensitäten sowie TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in EMI Mäusen, dorsale Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt Gesamtfloreszenzintensitäten der einfachen und B) die der dreifachen Injektion. In C) ist die TRE-Quantifizierung für S100 20 % PEG, in D) für DOPS 20 % PEG und in E) für DOPG 20 % PEG dargestellt. Exemplarisch wurde je eine SKH1 Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

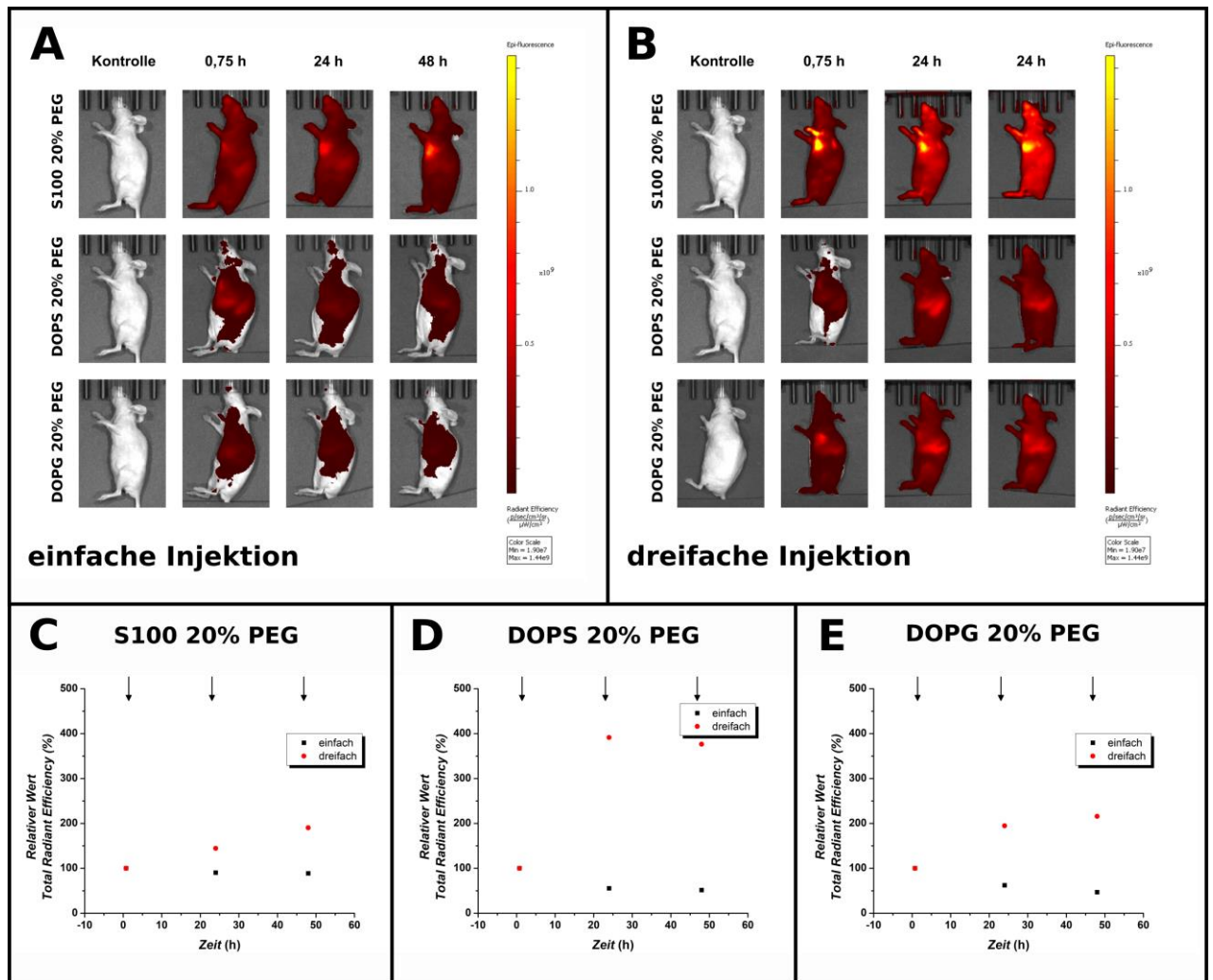


Abbildung A 18: Gesamtfloreszenzintensitäten sowie TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in EMI Mäusen, lateral linke Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt Gesamtfloreszenzintensitäten der einfachen und B) die der dreifachen Injektion. In C) ist die TRE-Quantifizierung für S100 20 % PEG, in D) für DOPS 20 % PEG und in E) für DOPG 20 % PEG dargestellt. Exemplarisch wurde je eine SKH1 Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

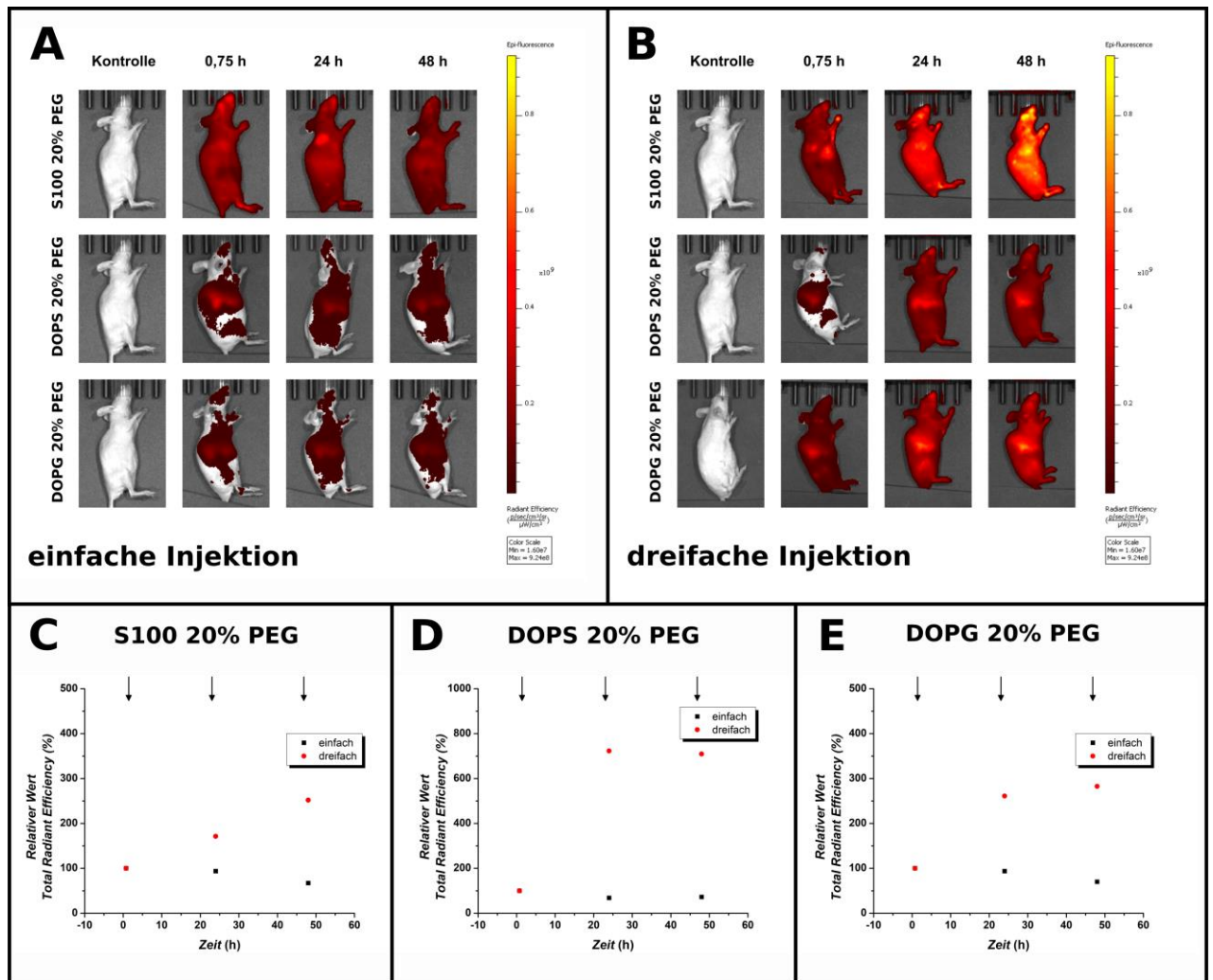


Abbildung A 19: Gesamtfloreszenzintensitäten sowie TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in EMI Mäusen, lateral rechte Position, bestimmt mittels *in vivo* FI.

A) zeigt Gesamtfloreszenzintensitäten der einfachen und B) die der dreifachen Injektion. In C) ist die TRE-Quantifizierung für S100 20 % PEG, in D) für DOPS 20 % PEG und in E) für DOPG 20 % PEG dargestellt. Exemplarisch wurde je eine SKH1 Maus pro Liposomenformulierung ausgewählt und der gesamte Untersuchungszeitraum von 48 Stunden dargestellt.

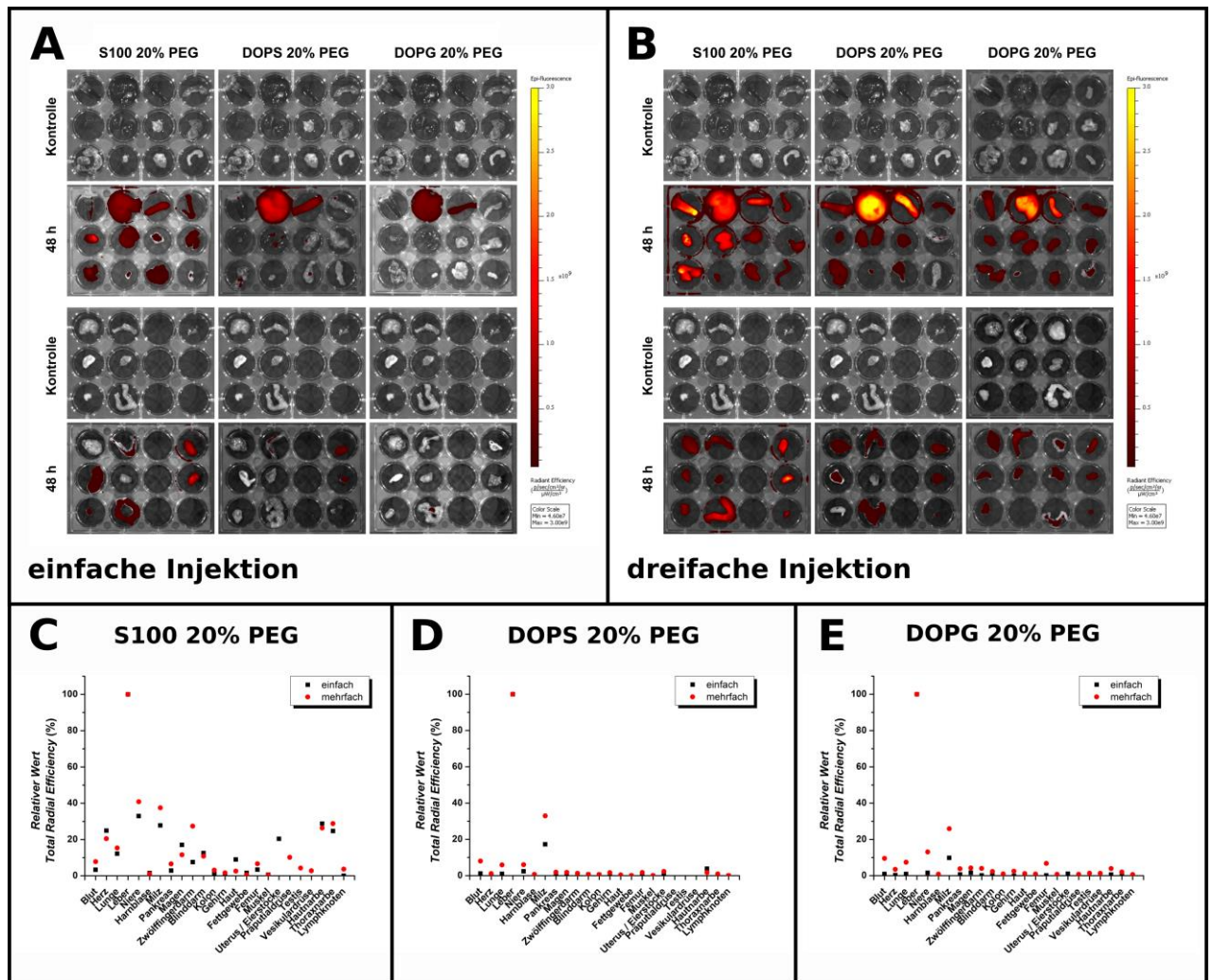


Abbildung A 20: Gesamtfluoreszenzintensitäten sowie TRE-Quantifizierung für definierte ROI DiR-markierter Liposomen in EMI Mäusen, bestimmt mittels *ex vivo* FI.

A) zeigt Gesamtfluoreszenzintensitäten der einfachen und B) die der dreifachen Injektion. Dargestellt sind die relative TRE bezogen auf die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Leber. In C) ist die TRE-Quantifizierung für S100 20 % PEG, in D) für DOPS 20 % PEG und in E) für DOPG 20 % PEG präsentiert.

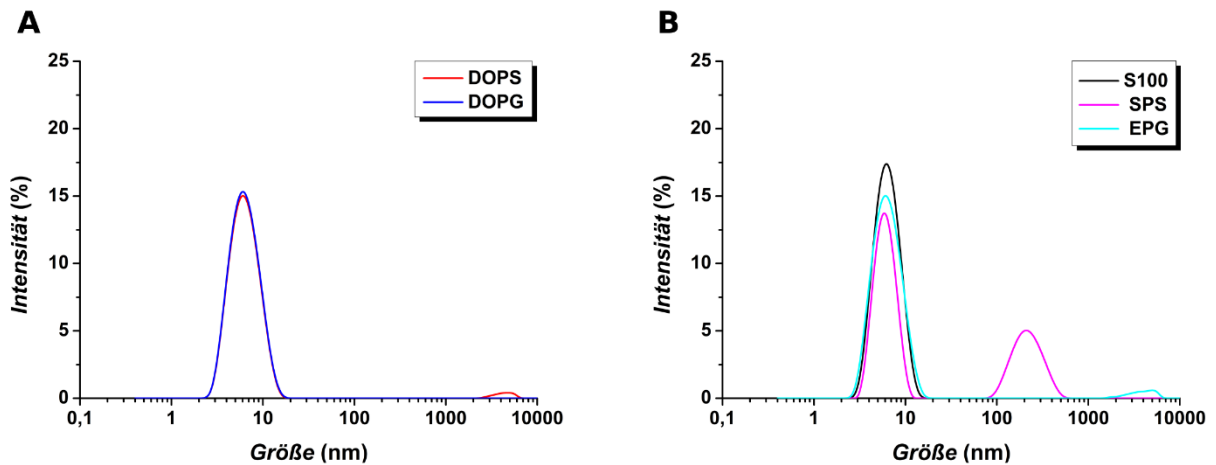


Abbildung A 21: Histogrammdarstellungen der intensitätsgewichteten Größenverteilungen der Mischmizellen, bestimmt mittels DLS.

A) zeigt die synthetischen Mischmizellen DOPS und DOPG und B) die natürlichen Mischmizellen S100, SPS und EPG.

Tabelle A 7: Gehalt an Ca^{2+} -Ionen in den verwendeten anionischen Phospholipiden.

Die Konzentrationsangaben wurden aus den Analysenzertifikaten des Herstellers Lipoid GmbH entnommen.

Phospholipid	DOPS-Na	SPS	DOPG-Na	EPG
Ca^{2+} -Ionen-Konzentration gemäß Lipoid	250 ppm	0,3 %	250 ppm	500 ppm
Ca^{2+} -Ionen-Konzentration auf 10 g Phospholipid	2,5 mg	30 mg	2,5 mg	5 mg

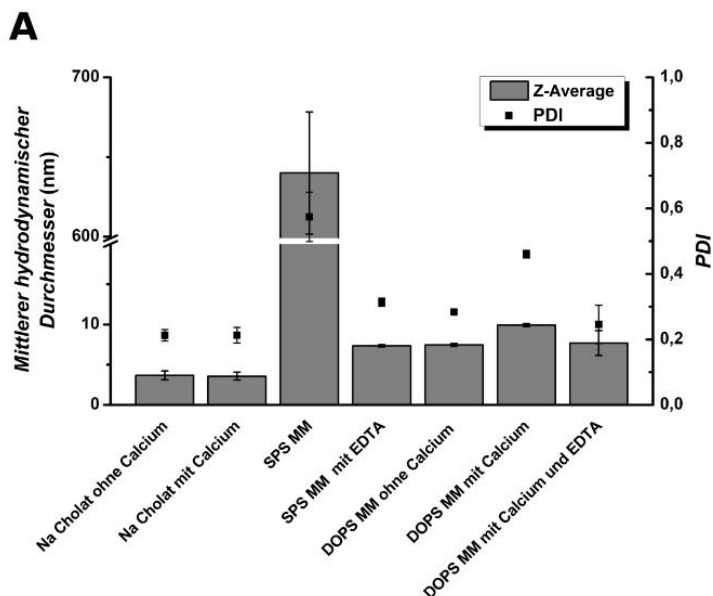


Abbildung A 22: Untersuchung des Einflusses von Ca^{2+} -Ionen auf die Größe und Größenverteilung von PS Mischmizellen.

A) zeigt Größe und Größenverteilung, bestimmt mittels DLS und B) die makroskopisch die sichtbare Trübung von SPS Mischmizellen sowie die Komplexbildung der Ca^{2+} -Ionen mit EDTA.

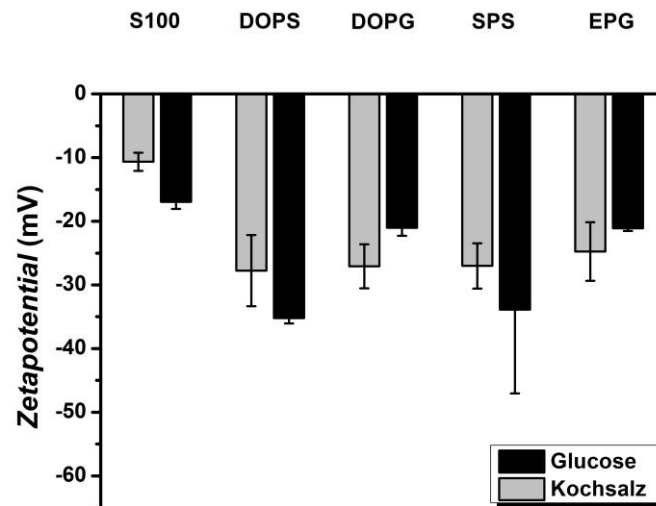


Abbildung A 23: Zetapotential der Mischmizellen, bestimmt mittels ELS.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

Anhang

Tabelle A 8: Physikochemische Stabilitätsdaten der Mischmizellen, bestimmt mittels DLS.

Die Dauer der Stabilitätsuntersuchung betrug 28 Tage, die Lagerung erfolgte bei 8 °C vor Licht geschützt.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

MM- Formulierung	initial				7 Tage				14 Tage				21 Tage				28 Tage			
	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD	Z-Average	SD	PDI	SD
S100	6	0	0,09	0,04	7	0	0,15	0,07	6	0	0,14	0,05	6	0	0,13	0,05	6	1	0,15	0,07
DOPS	6	0	0,19	0,03	6	0	0,17	0,05	6	0	0,19	0,03	6	0	0,20	0,02	6	0	0,23	0,02
DOPG	6	0	0,22	0,02	6	0	0,23	0,02	6	0	0,23	0,03	6	0	0,22	0,03	6	0	0,23	0,01
SPS	10	0	0,44	0,02	602	118	0,47	0,06	472	177	0,41	0,96	525	114	0,43	0,05	549	58	0,39	0,11
EPG	6	0	0,16	0,06	6	0	0,15	0,07	6	0	0,16	0,06	6	0	0,16	0,05	6	1	0,19	0,06

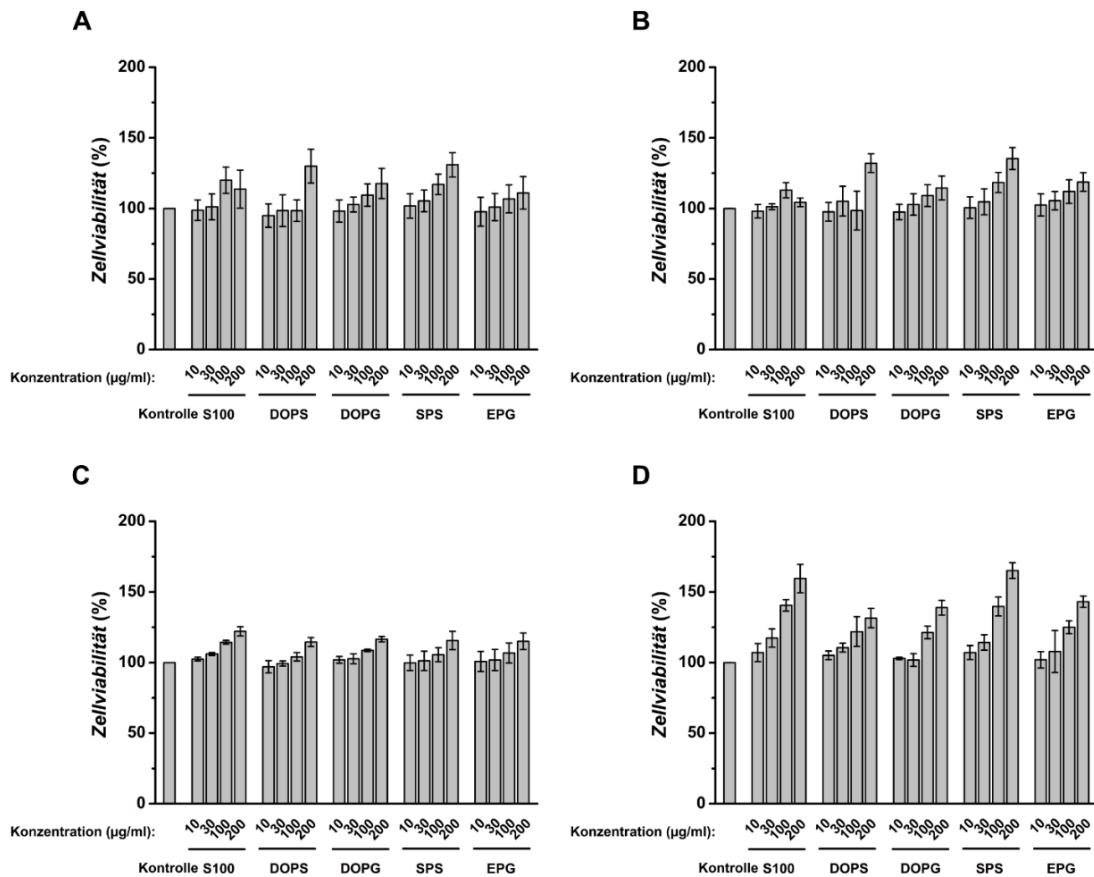


Abbildung A 24: Zellviabilität der Mischmizellen auf Fibroblasten-Zelllinien, bestimmt mittels Resazurin-Assay.

Die Inkubationszeit für A) und B) betrug 4, für C) und D) 96 Stunden. A) zeigt die Zellviabilität von murinen 3T3 und B) die von humanen NHDF Zellen. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, deren relative Standardabweichung der unbehandelten Kontrolle $\leq 15\%$ war.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen Zellviabilitäten, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten.

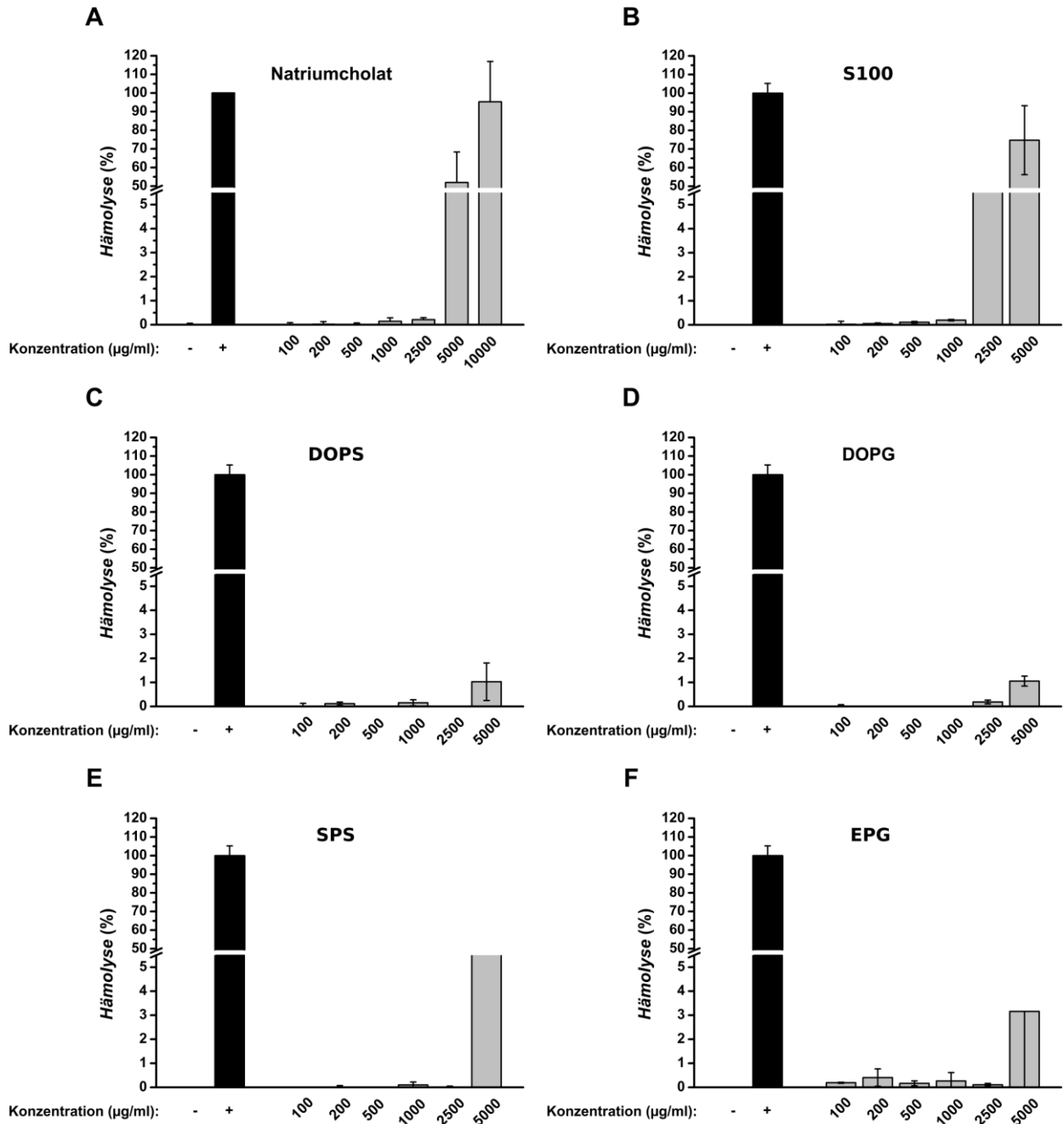


Abbildung A 25: Hämolyseaktivität der Mischmizellen, weitere Konzentrationen, bestimmt auf RBC. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Für die Negativkontrolle (-) wurde PBS, für die Positivkontrolle (2 %SDS) verwendet. A) zeigt Natriumcholat, B) S100, C) DOPS, D) DOPG, E) SPS und F) EPG Mischmizellen. Für Vergleichszwecke bezieht sich die Konzentration der Mischmizellen hierbei auf den Gehalt des enthaltenen Natriumcholats. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Hämolyse in Prozent, bezogen auf die Positivkontrolle, von jeweils 2 natürlichen Replikaten.

Anhang

Tabelle A 9: Immunmodulierende Eigenschaften synthetischer Mischmizellen (MM) im direkten Vergleich zu Liposomen (L) auf MPM, bestimmt mittels Multiplex-Assay.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. Tabelle A 9 1 zeigt die direkte und Tabelle A 9 2 die sequentielle Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokin- bzw. Chemokinwerte, bezogen auf die stimulierte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten als *Heatmap*.

1) Direkt		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPS L		DOPS MM		DOPG L		DOPG MM	
				unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	46	100	54	43	153	55	43	115	52	73
IL-1a	%	17	100	11	14	18	15	14	16	18	19
IFN-g	%	0	100	1	97	1	120	0	99	0	123
TNF-a	%	1	100	1	21	2	21	1	8	1	22
MCP-1	%	29	100	18	61	38	50	23	44	25	55
IL-12p70	%	13	100	21	9	71	28	11	63	11	27
IL-1b	%	72	100	74	70	92	73	72	69	83	69
IL-10	%	52	100	88	62	116	82	68	40	39	67
IL-6	%	2	100	1	8	3	7	2	3	2	6
IL-27	%	47	100	52	24	102	60	38	44	39	46
IL-17a	%	36	100	63	23	74	83	79	24	36	78
IFN-b	%	53	100	49	47	82	84	24	37	22	59
GM-CSF	%	30	100	63	28	102	30	28	28	53	36

2) Sequentiell		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	DOPS L		DOPS MM		DOPG L		DOPG MM	
				unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	51	100	51	76	154	659	51	51	52	78
IL-1a	%	14	100	15	39	33	107	15	64	16	51
IFN-g	%	1	100	0	92	1	128	0	94	0	86
TNF-a	%	0	100	1	82	1	104	0	47	1	64
MCP-1	%	34	100	38	87	37	119	25	56	44	88
IL-12p70	%	23	100	27	113	87	355	7	22	28	63
IL-1b	%	91	100	83	110	84	118	83	89	89	110
IL-10	%	93	100	97	103	114	348	83	55	90	65
IL-6	%	0	100	0	92	1	104	0	26	0	61
IL-27	%	49	100	49	101	71	133	41	60	40	62
IL-17a	%	181	100	43	85	156	484	56	67	94	95
IFN-b	%	117	100	46	303	271	1069	93	96	56	81
GM-CSF	%	50	100	83	94	355	943	48	51	68	86

Relative Werte (%)	100	80	60	40	20
--------------------	-----	----	----	----	----

Anhang

Tabelle A 10: Immunmodulierende Eigenschaften natürlicher Mischmizellen (MM) im direkten Vergleich zu Liposomen (L) auf MPM, bestimmt mittels Multiplex-Assay.

Es wurden SKH1 MPM verwendet. Tabelle A 10 1 zeigt die direkte und Tabelle A 10 2 die sequentielle Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zytokin- bzw. Chemokinwerte, bezogen auf die stimulierte Kontrolle, von jeweils 3 natürlichen Replikaten als *Heatmap*.

1) Direkt		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	S100 L		S100 MM		SPS L		SPS MM		EPG L		EPG MM	
	%			unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	56	100	63	45	92	59	31	57	34	39	43	43	30	61
IL-1a	%	10	100	13	31	11	13	9	12	10	10	9	13	12	12
IFN-g	%	0	100	0	86	1	89	0	92	0	79	0	88	0	110
TNF-a	%	0	100	1	35	1	23	0	12	0	7	0	12	0	17
MCP-1	%	11	100	12	43	30	42	11	42	7	17	7	19	17	18
IL-12p70	%	16	100	21	13	36	14	12	18	11	11	12	11	11	12
IL-1b	%	70	100	86	60	37	65	73	53	50	71	65	50	42	52
IL-10	%	61	100	118	26	80	36	7	107	7	13	16	13	22	7
IL-6	%	1	100	1	7	1	6	0	5	1	2	0	3	1	4
IL-27	%	21	100	22	8	39	13	14	37	7	10	14	11	18	20
IL-17a	%	53	100	64	42	83	51	36	62	36	40	36	38	47	36
IFN-b	%	34	100	40	51	70	56	24	75	18	24	17	21	20	36
GM-CSF	%	16	100	22	27	34	15	12	24	12	12	12	14	12	15

2) Sequentiell		Kontrolle, unstimuliert	Kontrolle, stimuliert	S100 L		S100 MM		SPS L		SPS MM		EPG L		EPG MM	
	%			unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
IL-23	%	69	100	66	69	70	83	225	567	433	360	401	546	269	318
IL-1a	%	15	100	14	129	15	93	15	53	16	84	14	105	15	87
IFN-g	%	0	100	0	103	0	99	0	115	1	108	1	120	1	115
TNF-a	%	0	100	0	61	0	94	0	88	0	92	0	62	0	87
MCP-1	%	40	100	20	68	33	86	35	125	103	196	72	195	82	231
IL-12p70	%	16	100	12	25	11	54	34	165	103	349	73	167	34	243
IL-1b	%	70	100	101	140	101	84	127	150	85	70	69	139	114	127
IL-10	%	73	100	76	728	559	118	115	1203	483	382	145	176	1262	799
IL-6	%	0	100	0	25	0	62	0	72	0	78	0	24	0	65
IL-27	%	19	100	20	86	48	96	22	202	59	166	26	109	51	197
IL-17a	%	99	100	88	119	92	114	132	567	640	730	257	633	422	738
IFN-b	%	26	100	29	136	46	113	51	253	136	230	90	208	83	230
GM-CSF	%	34	100	26	83	41	75	46	182	86	183	47	124	119	215

Relative Werte (%)	100	80	60	40	20
--------------------	-----	----	----	----	----

II Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Prof. Dr. Karsten Mäder selbstständig bzw. im Rahmen der angegebenen Kooperationen erarbeitet wurden und ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Dazu habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Inhaltlich oder wörtlich übernommene Stellen aus anderen Arbeiten oder Werken sind als solche kenntlich gemacht wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe und die vorliegende Dissertationsarbeit keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Miriam Elisabeth Klein

III Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Karsten Mäder** für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas sowie für die Betreuung der Dissertation. Sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine fortwährende Diskussionsbereitschaft sowie sein tiefes Vertrauen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Bei Frau **PD Dr. Annette Meister** möchte ich mich ebenfalls für die Bereitstellung des Themas und für die Betreuung der Dissertation bedanken. Ihre wertvollen Impulse und ihr kritisches Hinterfragen waren zu jeder Zeit sehr hilfreich. Weiterhin bedanke ich mich bei ihr für das Präparieren und Mikroskopieren der elektronenmikroskopischen Proben.

Herrn **Prof. Dr. Harald Loppnow** gilt mein Dank für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die *in vitro* Versuche am Mausmakrophagen-Protokoll und Hämolyse-Assay. Ohne seine wissenschaftliche Expertise sowie rege Diskussionsbereitschaft wären große Teile der biologischen *in vitro* Charakterisierung nicht möglich gewesen.

Frau **Dr. Henrike Lucas** gilt mein Dank für die Konzeption und die Durchführung der *in vivo* Studien im Mausmodell. Weiterhin möchte ich mich bei ihr für die rege Diskussionsbereitschaft, ihr Vertrauen und die Unterstützung in der Fibroblasten-Zellkultur bedanken.

Herrn **Dr. Max Rieckmann** gilt mein Dank für die dienstagsmorgendlich durchgeführte Peritoneallavage sowie für die Kooperation während der *in vivo* Versuche im Herzinfarktmodell. Ohne seine chirurgischen Fähigkeiten wären die Studien im experimentellen Myokardinfarkt nicht durchführbar gewesen.

Bei Herrn **PD Dr. Simon Drescher** bedanke ich mich für die Einführung in die praktischen Arbeiten der differentiellen Leistungskalorimetrie sowie für seine Diskussionsbereitschaft in Fragen der Physikochemie.

Herrn **Dr. Gerd Hause** danke ich für die Anfertigung der kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie für seinen kritischen Blick auf die erhaltenen Aufnahmen.

Frau **M. Sc. Dialén Martínez** danke ich für die Unterstützung in der Fibroblasten-Zellkultur. Durch die Etablierung und Optimierung des Zellviabilitäts-Assays hat sie viel zum Gelingen dieser Versuche beigetragen.

Herrn **Apotheker Georg Gallander** danke ich für die Unterstützung des Projektes im Rahmen erster Wirkstoffstudien mit Dexamethasonderivaten. Ich wünsche ihm, dass er die Zeit findet, seine Diplomarbeit fertig zu stellen und erfolgreich zu verteidigen.

Bei der ehemaligen **Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrich Hoffmann, Dr. Gustavo Ramos** und **Dr. Simone Mauch** möchte ich mich für die Einführung in die Makrophagen-Zellkultur sowie für die gute Kooperation vor allem zu Beginn der Dissertation bedanken.

Danksagung

Weiterhin gilt mein Dank der **Arbeitsgruppe Prof. Loppnow**, hier besonders den technischen Kräften **Frau Claudia Pilowski** und **Frau Susanne Koch**, die durch ihre strenge aber offene Art für Ordnung im Labor, Struktur und eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Bei der **Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie** möchte ich mich für das Interesse am Thema, die rege Diskussionsbereitschaft sowie viele interessante Ratschläge beim Kaffee bedanken. Den technischen Kräften, besonders **Frau Manuela Woigk** und **Frau Kerstin Schwarz**, gilt mein Dank für die Durchführung der chemischen Stabilitätsstudien sowie für die Einführung in die Herstellung liposomaler Formulierungen. Ein besonderer Dank gilt auch meinen Bürokollegen Frau **Apothekerin Johanna Zech** und Herrn **Apotheker Anastasios Nalbadis**, die immer für mehr oder weniger dissertationsnahe Gespräche offen waren.

Dem **Phospholipid Research Center Heidelberg**, hier besonders Herrn **PD Dr. Peter van Hoogevest**, danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes sowie für den stetigen wissenschaftlichen Austausch.

Ein besonderes Dankeschön gilt meine Eltern Frau **Dr. Carmen Klein** und Herrn **Dipl.-Ing. Matthias Klein**. Sie haben immer meine Neugier gefördert und mich auch in kritischen Phasen unterstützt.

Meinen **Freunden** danke ich sehr herzlich für die moralische Unterstützung und Bestärkung in schwierigen Phasen dieser Arbeit.

IV Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Miriam Elisabeth Klein
Geburtsdatum: 17.07.1989
Geburtsort: Friedrichroda
Familienstand: ledig

Arbeitstätigkeiten

05/2020 – jetzt Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

10/2019 – 02/2020 Peter Debye Institut, Abteilung Molekülphysik, Universität Leipzig
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

06/2016 – 05/2017 Löwenapotheke, Münnernstadt
Angestellte Apothekerin

04/2016 – 09/2019 Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Stipendiatin (Phospholipid Research Center)

02/2015 – 11/2015 MSAT, Solida Produktion, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
MSAT Manager

08/2014 – 01/2015 MSAT, Solida Produktion, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
Trainee

06/2014 – 07/2014 Lilien-Apotheke, Erfurt
Angestellte Apothekerin

Praktika

11/2013 – 05/2014 Lilien-Apotheke, Erfurt
Pharmazeutin im Praktikum

05/2013 – 10/2013 MSAT, Solida Produktion, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
Pharmazeutin im Praktikum

11/2012 – 04/2013 Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Universität Leipzig
Diplomstudentin

Lebenslauf

11/2011 – 06/2012	Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Universität Leipzig Studentische Hilfskraft – Tutor
10/2011 – 02/2012	Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Universität Leipzig Studentische Hilfskraft – Praktikumsbetreuung
08/2011 – 09/2011	Bahnhof-Apotheke Langnau i. E. (Schweiz) Praktikum
03/2011 – 04/2011	Stadt-Apotheke Gotha Praktikum
10/2010 – 02/2011	Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Universität Leipzig Studentische Hilfskraft – Vorlesungsvorbereitung
02/2010 – 03/2010	AEROPHARM GmbH, Rudolstadt Zweiter Abschnitt der Famulatur Pharmazie
03/2009 – 03/2009	Stadt-Apotheke Gotha Erster Abschnitt der Famulatur Pharmazie

Ausbildung

Studium

Pharmazie (Staatsexamen)

10/2008 – 06/2014
Universität Leipzig
Abschluss: Approbation als Apothekerin

Pharmazie (Diplom)

11/2012 – 09/2013
Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie,
Universität Leipzig
Abschluss: Diplom-Pharmazeutin

Schulische Ausbildung

2000 – 2008
Arnoldschule staatliches Gymnasium Gotha
Abschluss: Abitur

1996 – 2000
Evangelische Grundschule Gotha

Miriam Elisabeth Klein

Halle/Saale, den

V Veröffentlichungen

Publikationen

Klein, M.E. *et al.* Biodistribution of phosphatidylserine (PS)- and phosphatidylglycerol (PG)-enriched nanodispersions in healthy and myocardial infarcted mice – *In Vorbereitung*

Klein, M.E., *et al.* Phosphatidylserine (PS)- and phosphatidylglycerol-(PG)-enriched mixed micelles (MM): a new nano-drug delivery system with antiinflammatory potential?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 152 (2020)

Klein, M.E., *et al.* Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) nanodispersions as potential anti-inflammatory therapeutics: Comparison of *in vitro* activity and impact of pegylation. *Nanomedicine, Nanotechnology, Biol. Med.* 23, (2020)

Konferenzbeiträge

M. E. Klein, H. Lucas, A. Meister, K. Mäder:

„*In vivo* biodistribution of phosphatidylserine-(PS)- and phosphatidylglycerol-(PG)-enriched liposomes and impact of PEGylation“ *(Poster)*

6th Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Phospholipid Research Center, 2019, Heidelberg, Deutschland

M. E. Klein, A. Meister, K. Mäder:

“Phosphatidylserine-(PS)- and phosphatidylglycerol-(PG)-enriched mixed micelles (MM) as potential anti-inflammatory therapeutics” *(Orale Präsentation)*

6th Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Phospholipid Research Center, 2019, Heidelberg, Deutschland

M. E. Klein, H. Lucas, A. Meister, H. Loppnow, K. Mäder:

“Phosphatidylserine-(PS)- and phosphatidylglycerol-(PG)-enriched mixed micelles (MM) as potential anti-inflammatory therapeutics” *(Poster)*

6th Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Phospholipid Research Center, 2019, Heidelberg, Deutschland

M. Klein, M. Rieckmann, D. G. Martinez, G. Hause, A. Meister, H. Loppnow, K. Mäder:

“Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) containing nanodispersions as potential anti-inflammatory therapeutics” *(Poster)*

Annual Meeting & Exposition der Controlled Release Society, 2019, Valencia, Spanien

M. Klein, M. Rieckmann, D. G. Martinez, G. Hause, A. Meister, H. Loppnow, K. Mäder:
“Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) liposomes as potential anti-inflammatory therapeutics: investigation of *in vitro* activity and impact of pegylation” (Poster)
Annual Meeting German Chapter der Controlled Release Society, 2019, Leipzig, Deutschland

M. Klein, A. Meister, K. Mäder:
“Phosphatidylserine Enriched Phospholipids as Anti-Inflammatory Agents” (Orale Präsentation)
RESEARCHER’S DAY of the Phospholipid Research Center, 2018, Limburgerhof, Germany

M. Klein, S. Mauch, G. Ramos, U. Hofmann, A. Meister, K. Mäder:
“Phosphatidylserine lipid enriched nanodispersions as anti-inflammatory agents – physico-chemical characterization and *in vitro* response” (Poster)
11th WORLD MEETING on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2018, Granada, Spanien

M. Klein, S. Mauch, G. Ramos, U. Hofmann, A. Meister, K. Mäder:
“Phosphatidylserine enriched phospholipids as anti-inflammatory agents” (Poster)
Annual Meeting German Chapter der Controlled Release Society, 2018, Halle/Saale, Deutschland

K. Mäder, M. Klein, S. Mauch, G. Ramos, U. Hofmann, A. Meister:
“Phosphatidylserine enriched phospholipids as anti-inflammatory agents” (Orale Präsentation)
5th Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Phospholipid Research Center, 2017, Heidelberg, Deutschland

M. Klein, S. Mauch, G. Ramos, U. Hofmann, A. Meister, K. Mäder:
“Phosphatidylserine lipid enriched nanodispersions – physico-chemical characterization and *in vitro* response” (Poster)
5th Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Phospholipid Research Center, 2017, Heidelberg, Deutschland

S. Mauch, M. Rieckmann, M. Klein, K. Mäder, S. Frantz, U. Hofmann, G. Ramos:
“Modulating macrophage activity in the context of myocardial infarction” (Poster)
4th Researcher’s Day, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2016, Halle/Saale, Deutschland