

Entwicklung von *delivery* Systemen zur kontinuierlichen Abgabe therapeutischer Proteine im Organismus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von
Sabine Meyenburg
aus Goslar
2000

Promotionsgesuch eingereicht am 23. Juni 2000.

Verteidigt am 30. November 2000.

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Rudolph

2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Lasch

3. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Winter

*Das schönste Glück des denkenden Menschen
ist, das Erforschliche erforscht zu haben und
das Unerforschliche ruhig zu verehren.*

GOETHE

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph möchte ich für die Anregung zu einer Arbeit danken, die mich immer wieder aufs Neue in ihren Bann gezogen hat, und bei deren Ausgestaltung er mir große Freiheiten ließ.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. Hauke Lilie verpflichtet. Während meiner gesamten Doktorandenzeit habe ich es kein einziges Mal erlebt, daß er keine Zeit für meine großen und kleinen Probleme gehabt hätte. Die regelmäßigen Diskussionen mit ihm haben nicht nur wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, sondern auch zur Entwicklung unserer eigenen „wissenschaftlichen“ Sprache geführt. Oder wüßte jemand außer uns, was „gatschige Lipos“ sind?

Den Regensburgern Herrn Dr. Günther Bernhardt, Herrn Dr. Thilo Spruss, Herrn Martin Oettel, Herrn Oskar Baumann und Herrn Franz Wiesenmayer möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche danken.

Herrn Dr. Wulf Pablke und seinen Mitarbeitern von der Firma Roche, Mannheim danke ich für die spontane und unkomplizierte Hilfe bei der Durchführung der „Retikulocytenexperimente“. Ohne sie wären diese Versuche gegen Ende der Arbeit wohl kaum zu schaffen gewesen.

Bei Herrn Dr. Thomas Nitsche und Herrn Prof. Dr. Helmut W. Meyer möchte ich mich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder bedanken. Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Michael Weiß für die kritischen Anmerkungen zur Auswertung der in vivo Daten.

Der gesamten Arbeitsgruppe Rudolph möchte ich für das gute Arbeitsklima und die vielen kleinen Dinge des (Labor-)Alltags danken. Frau Ulla Grauschopf, Frau Ariuna Bazarsuren, Frau Tanja Lisse und Herrn Till Scheuerman sowie Frau Jeannette Winter und Herrn Stefan Gleiter bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Ihre moralische Unterstützung war mir eine große Hilfe, und die von ihnen organisierten „all-inclusive-rundum-sorglos-Wochenenden“ gegen Ende des Zusammenschreibens waren entscheidende Motivationsschübe in Zeiten der Doppelbelastung. Frau Susanne Richter danke ich für ihre Hilfe, der Doktorarbeit ihren „letzten Schliff“ zu geben. Bei Frau Renate Nizsch entschuldige ich mich im Nachhinein für die außerordentliche Inanspruchnahme ihres Pipettierdaumens ...

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 Einleitung	5
1.1 <i>Delivery</i> Systeme auf Polymerbasis	7
1.2 <i>Delivery</i> Systeme auf Liposomenbasis	12
1.3 Fibrinverkapselte Liposomen als neues <i>delivery</i> System für Peptide und Proteine – Aufgabenstellung	17
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Peptide, Proteine und Fibrinkleber	21
2.1.2 Proteintests	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Anitbiotika und Narkotika	23
2.1.5 Standardpuffer	23
2.1.6 Verbrauchsmaterial	23
2.1.7 Versuchstiere	24
2.2 Geräte	24
2.3 Methoden	25
2.3.1 Arbeiten unter keimarmen Bedingungen	25
2.3.2 Liposomenherstellung	25
2.3.3 Charakterisierung der Liposomen	27
2.3.3.1 Größenverteilung der Liposomen	27
2.3.3.2 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie der Liposomen	28
2.3.3.3 Einschlußkapazität der Liposomen	28
2.3.3.3.1 Proteingehalt der Liposomen	28
2.3.3.3.1.1 POD-Aktivitätstest	28
2.3.3.3.1.2 EPO-Elisa	29
2.3.3.3.2 Lipidgehalt der Liposomen	29
2.3.3.3.3 Berechnung der Einschlußkapazität der Liposomen	30

2.3.3.4	Nachweis des Proteineinschlusses in den Liposomen _____	31
2.3.3.5	Detergensgehalt der Liposomen _____	31
2.3.3.6	Liposomenstabilität _____	32
2.3.4	Fibrin- und Behriplast [®] -Clots _____	33
2.3.4.1	Herstellung liposomenhaltiger Fibrinclots _____	33
2.3.4.2	Elektronenmikroskopie von liposomenhaltigen Fibrinclots _____	33
2.3.4.3	Herstellung liposomenhaltiger Behriplast [®] -Clots _____	33
2.3.5	<i>In vitro</i> Experimente mit Fibrin- und Behriplast [®] -Clots _____	34
2.3.5.1	<i>In vitro</i> Freisetzung von POD aus Fibrin- und Behriplast [®] -Clots _____	34
2.3.5.2	Plasminkatalysierter Abbau von liposomenhaltigen Fibrinclots _____	34
2.3.6	<i>In vivo</i> Experimente mit Fibrin- und Behriplast [®] -Clots _____	35
2.3.6.1	Lagerstabilität von EPO-Serumproben _____	35
2.3.6.2	<i>In vivo</i> Freisetzung von EPO aus Fibrin- und Behriplast [®] -Clots _____	35
2.3.6.2.1	<i>In vivo</i> Freisetzungsexperimente mit Fibrinclots _____	35
2.3.6.2.2	<i>In vivo</i> Freisetzungsexperimente mit Behriplast [®] -Clots _____	36
2.3.6.2.3	Auswertung der <i>in vivo</i> Freisetzungsexperimente _____	37
2.3.6.3	Explantation von Fibrin- bzw. Behriplast [®] -Clots _____	37
2.3.6.3.1	EPO-Restgehalt von explantierten Fibrin- bzw. Behriplast [®] -Clots _____	37
2.3.6.3.2	Lichtmikroskopie von explantierten Fibrinclots _____	38
2.3.6.4	Stimulation der Erythropoese durch EPO-haltige Behriplast [®] -Clots _____	38
2.3.6.4.1	Bestimmung der Retikuloerythrozytenzahlen _____	39

3 Ergebnisse und Diskussion _____ 41

3.1 Charakterisierung der Liposomen _____ 41

3.1.1	Größenverteilung und Lamellarität der Liposomen _____	41
3.1.2	Einschlußkapazität der Liposomen _____	44
3.1.3	Nachweis des liposomalen Proteineinschlusses _____	45
3.1.4	Detergensgehalt der Liposomen _____	46
3.1.5	Liposomenstabilität _____	50

3.2 Fibrin- und Behriplast[®]-Clots _____ 54

3.2.1	Elektronenmikroskopie von liposomenhaltigen Fibrinclots _____	54
3.2.2	<i>In vitro</i> Freisetzung von POD aus Fibrinclots _____	55
3.2.3	<i>In vitro</i> Freisetzung von POD aus Behriplast [®] -Clots _____	58
3.2.4	<i>In vivo</i> Experimente mit Fibrin- und Behriplast [®] -Clots _____	60
3.2.4.1	Lagerstabilität von EPO-haltigen Serumproben _____	60
3.2.4.2	<i>In vivo</i> Freisetzung von EPO aus Fibrinclots _____	62
3.2.4.2.1	Einfluß der liposomalen Verpackung auf die <i>Clearance</i> von EPO _____	64
3.2.4.2.2	Fibrinclots als EPO-Depotform _____	66
3.2.4.2.3	<i>In vivo</i> Stabilität von liposomenhaltigen Fibrinclots _____	68

3.2.4.2.4	EPO-Restgehalt von explantierten Fibrinclots	70
3.2.4.3	<i>In vivo</i> Experimente mit Behriplast [®] -Clots	71
3.2.4.3.1	EPO-Freisetzung aus Behriplast [®] -Clots	71
3.2.4.3.2	Stimulation der Erythropoese durch EPO-haltige Behriplast [®] -Clots	74
4	Zusammenfassung	79
5	Literaturverzeichnis	83
6	Anhang	97

Abkürzungen

<i>AUC</i>	Fläche unter der Konzentrationszeitkurve (<i>area under the curve</i>) von $t = 0$ bis ∞ , falls nicht anders angegeben
BSA	bovines Serumalbumin
BMP	Knochenwachstumsfaktor (<i>bone morphogenetic factor</i>)
$C_{m\max}$	Serumspiegelmaximum
CMC	kritische Micellenkonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CSF	koloniestimulierender Faktor (<i>colony stimulating factor</i>)
d_0	Detergenkonzentration der Liposomenpräparation
d_l	Detergenkonzentration der liposomalen Membranen
d_w	Detergenkonzentration der wäßrigen Phase einer Liposomenpräparation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DOC	Natriumdeoxycholat
<i>ee</i>	Einschlußkapazität einer Liposomenpräparation (<i>encapsulation efficiency</i>)
ee_{theo}	theoretische Einschlußkapazität einer Liposomenpräparation
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	enzym-gekoppelter Immunnachweis (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EPC	Ei-Phosphatidylcholin
EPO	(humanes rekombinantes) Erythropoetin
e.v.	extravaskulär
<i>f</i>	Bioverfügbarkeit
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
HDL	High Density Lipoprotein
HGF	<i>hepatic growth factor</i>
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
KIU	Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (<i>kiniogen inactivation units</i>)
l_0	Lipidkonzentration der Mischmicellenlösung

l_f	Lipidkonzentration der flotierten Liposomenpräparation
LUVs	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)
M_r	Molekulargewicht
MAT	mittlere Absorptionszeit (<i>mean absorption time</i>)
MLVs	multilamellare Vesikel
MRT	mittlere Verweilzeit (<i>mean residence time</i>)
MWC	molekulare Ausschlußgrenze (<i>molecular weight cutoff</i>)
N_A	Avogadrozahl
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
nOG	n-Octylglycosid
OD	optische Dichte
p_0	Proteinkonzentration der Mischmicellenlösung
p_f	Proteinkonzentration der flotierten Liposomenpräparation
P	Verteilungskoeffizient
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEG	Polyethylenglykol
PLGA	Copolymere aus Milch- und Glykolsäure (<i>copoly(lactic/glycolic) acids</i>)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
POD	Meerrettich-Peroxidase
RES	retikuloendotheliales System
REV	reverse phase evaporation vesicles
rhGh	<i>recombinant human growth hormon</i>
s.c.	subcutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
s.e.	Standardfehler (des Mittelwertes) (<i>standard error</i>)
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SUVs	kleine unilamellare Vesikel (<i>small unilamellar vesicles</i>)
T	Temperatur
$t_{1/2\alpha}$	terminale Eliminationshalbwertszeit („modellunabhängig“)
t_{max}	Zeitpunkt des Plasmaspiegelmaximums
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
\bar{r}_{int}	mittlerer intensitätsgewichteter Liposomendurchmesser

1 Einleitung

Neue Methoden in der Biologie und Biochemie haben in den letzten 10 bis 20 Jahren maßgeblich zu der Entdeckung zahlreicher biologisch aktiver Peptide und Proteine beigetragen. Viele dieser Substanzen besitzen ein außerordentlich interessantes therapeutisches Potential und ihre großtechnische Herstellung stellt aufgrund des rasanten Fortschritts auf dem Gebiet der rekombinanten DNS-Technologie nur noch selten ein Problem dar. Dennoch haben bisher nur wenige Peptide und Proteine Eingang in die Medizin gefunden.

Der Grund liegt in den besonderen Anforderungen, die diese Substanzen an ihre Applikation und somit an die Arzneiform stellen. Wie bei den klassischen niedermolekularen Wirkstoffen besteht deren Hauptaufgabe zwar weiterhin darin, eine maximale Stabilität des Wirkstoffes während seiner Lagerung (*shelf life*) und Freisetzung im Körper (*delivery*) zu gewährleisten. Eine Formulierung für niedermolekulare Wirkstoffe kann heute jedoch einem weitgehend rationalen Design folgen, weil die Biotransformationswege dieser Substanzen mitsamt ihren Kinetiken und biochemischen Grundlagen in den meisten Fällen bekannt sind [PFEIFER, 1995a-c]. Über eine im pharmazeutischen Sinn wirksame Stabilisierung der wesentlich komplexeren Peptid- und Proteinwirkstoffe ist bisher jedoch vergleichsweise wenig bekannt.

Eines der größten Probleme stellt die begrenzte chemische und physikalische Stabilität der Peptide und Proteine dar [WANG und HANSON, 1988; MANNING et al., 1989; CLELAND et al., 1993]. Die für diese Substanzklasse am häufigsten zu beobachtenden Modifikationen sind in Tabelle 1-1 aufgeführt und beeinflussen die biologische Aktivität der Makromoleküle in der Regel nachhaltig. Besonders weitreichende Folgen kann die Denaturierung haben, da mit dem Verlust der definierten Tertiärstruktur häufig eine irreversible Aggregation verbunden ist. Sie führt normalerweise zu einem totalen Aktivitätsverlust der betroffenen Peptide und Proteine.

Viele therapeutisch interessante Peptide und Proteine weisen außerdem extrem kurze *in vivo* Halbwertszeiten auf. Die anfängliche Eliminationsrate von i.v. verabreichtem Interleukin-2 (IL-2) liegt z.B. bei 6 bis 12 Minuten [ANDERSON und SORENSON, 1994]. Rekombinanter Plasminogenaktivator (t-PA) zeigt beim akuten Myokardinfarkt sogar nur eine dominante Plasmahalbwertszeit von 3,6 Minuten [TANSWELL et al., 1991]. Die neu zu entwickelnden Arzneiformen sollten deshalb nicht nur die chemische und physikalische Stabilität der Peptide und Proteine verbessern, sondern darüber hinaus auch deren biologische Aktivität nach der Applikation verlängern (vergleiche auch Tabelle 1-2).

Tabelle 1-1: Die häufigsten Modifikationen bei Peptiden und Proteinen*

Modifikation	betroffene Molekülregion/Auswirkung	Einflußfaktoren
Denaturierung	gesamtes Molekül/(teilweiser) Verlust der Tertiär- bzw. Sekundärstruktur	pH, T, Ionenstärke, Scherkräfte, Detergenzien, organische Lösungsmittel, Guanidiniumchlorid, Harnstoff
Aggregation	gesamtes Molekül/irreversible Assoziation der Moleküle	pH, T, Ionenstärke, Scherkräfte, Detergenzien, Oberflächenwechselwirkungen
Deamidierung	Asn or Gln/saures Produkt, Isoform oder Hydrolyse	pH, T, Ionenstärke
Isomerisierung/ Cyclisierung	Asn-X, Asp-X (X = Gly oder Ser)/basisches Produkt	pH, T, Ionenstärke
Spaltung	Asp-X/Molekülfragmente (Proteolyse aufgrund von Proteasespuren)	pH, T
Oxidation	Met, Cys, His, Trp, Tyr/oxidierte Formen	Sauerstoff (Ionen, Radikale, Peroxide), Licht, pH, T, Puffer, Metalle, (Detergenzien), Radikalfänger
Thiol-Disulfidaustausch	Cys/ inter- oder intramolekulare Disulfide	pH, T, Metalle, Redoxsubstanzen, nukleophile Reagenzien
β-Eliminierung	Cys/Dehydroalanin, freies Thiol	pH, T, Sauerstoff (Ionen, Radikale, Peroxide), Metalle

*Die Abbaureaktionen können unabhängig voneinander oder auch in Kombination auftreten.
Mit leichten Modifikationen entnommen aus CLELAND und LANGER [1994].

Im Idealfall kann mit solchen *drug delivery* Systemen die Wirkstoffkonzentration im Organismus über einen langen Zeitraum innerhalb des therapeutisch optimalen Rahmens gehalten werden. Häufig lassen sich durch die maximale Nutzung der Blutspiegel-Wirkungsbeziehung die Menge des insgesamt zu verabreichenden Wirkstoffs sowie die damit verbundenen Nebenwirkungen reduzieren. Zudem hilft die mit der verlängerten biologischen Aktivität verbundene Verringerung der Applikationshäufigkeit, die *compliance* der Patienten zu verbessern.

In der Literatur werden die unterschiedlichsten Ansätze für *drug delivery* Systeme diskutiert [RANADE, 1989a-b, 1990a-c, 1991a-c]. Für das *delivery* von Peptiden und Proteinen wurden jedoch vorwiegend Systeme auf Polymer- bzw. Liposomenbasis verwendet. Die Wirkungs-

verlängerung dieser Systeme beruht in allen Fällen auf einer verzögerten Freisetzung des Wirkstoffes (*sustained release*). Prinzipiell unterscheidet man zwischen lösungsmittelaktivierter und diffusions- bzw. chemisch/enzymatisch kontrollierter Freisetzung. Bei vielen Systemen beruht das *delivery* jedoch auch auf einer Kombination der zuvor genannten Mechanismen.

Tabelle 1-2: Polypeptide und Proteine, für die gegenwärtig *delivery* Systeme entwickelt werden

Einsatzgebiet	Polypeptide und Proteine
Krebstherapie	IgG (<i>targeting</i>), Cytokine (IL-6, TNF, IFN), Asparaginase, Neocarzinostatin
virale Infektionen	IFN
Entzündungshemmung	Superoxiddismutase
Fibrinolyse	t-PA, Urokinase, Streptokinase
Impfung	Oberflächenantigene (z.B. Hepatitis, HIV, Grippe)
Stimulierung des Immunsystems	Cytokine (IFN, IL-1, IL-2, CSF)
Stoffwechselstörungen	Insulin, Somatotropin
Wachstumsstörungen	FGF, EGF, HGF, TGF, NGF, EPO, BMP, neurotrophe Faktoren

Mit leichten Modifikationen entnommen aus IKADA [1998].

1.1 *Delivery* Systeme auf Polymerbasis

Aufgrund ihres nachgewiesenen Nutzens für das *drug delivery* haben Polymere die Arzneimitteltherapie in den letzten 25 Jahren entscheidend beeinflusst. Abb. 1-1 zeigt die wichtigsten Konzepte für *delivery* Systeme auf Polymerbasis, die in dieser Zeit entwickelt worden sind. In Abb. 1-1A ist ein System dargestellt, bei dem der in einem flüssigen oder festen Medium gelöste bzw. suspendierte Wirkstoff von einer Membran umgeben ist, durch die er langsam hindurchdiffundiert (membrankontrollierte Diffusion). Frühe Formen dieses Systems, das auch als Reservoirsystem bezeichnet wird, bestanden aus nicht abbaubaren Polymeren, die niedermolekulare, lipophile Arzneistoffe über extrem lange Zeiträume freisetzen konnten [FOLKMAN und LONG, 1964]. Ihre Verwendung führte unter anderem zu der Entwicklung von Norplant[®], einem Implantat, bei dem ein Kontrazeptivum über einen Zeitraum von 5 Jahren aus kleinen Silikonkapseln freigesetzt wird [SEGAL, 1987].

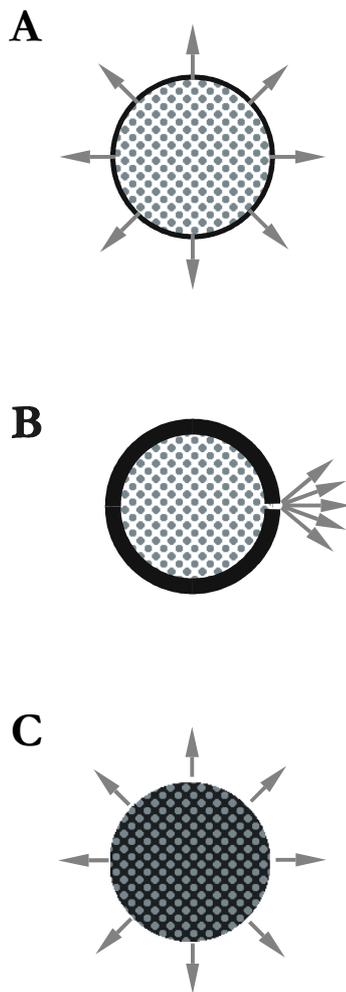


Abb. 1-1: Beispiele für *drug delivery* Systeme auf Polymerbasis. Die grauen Punkte stellen den Wirkstoff dar, die Pfeile die Richtung, in die der Wirkstoff freigesetzt wird. A: Reservoirsystem, bei dem der Wirkstoff langsam durch eine Membran diffundiert. B. Osmotisches System, bei dem der Wirkstoff über eine mit einem Laserstrahl erzeugte Öffnung freigesetzt wird. Dazu dringt Wasser durch die semipermeable Membran in das System ein, das durch den vom Wirkstoff verursachten osmotischen Druck angezogen wird. C: Matrixsystem, bei dem der Wirkstoff gleichmäßig in einem Polymer verteilt ist. Seine Freisetzung erfolgt entweder durch Diffusion oder durch eine Kombination aus Diffusion und Polymererosion (modifiziert nach LANGER [1998]).

Normalerweise gewährleisten diese Formulierungen eine hohe Dosierungsgenauigkeit. Mechanische Beschädigungen der Membran können bei Reservoir- und osmotischen Systemen (siehe Abb. 1-1B) jedoch leicht zu einer unerwünschten Spontanfreisetzung des Wirkstoffes führen (*dose dumping*). Darüber hinaus können aus diffusionskontrollierten Systemen nur Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 400 Da freigesetzt werden. Größere Moleküle sind nicht mehr in der Lage, durch ein Polymer wie Silikon hindurchzudiffundieren.

Durch die homogene Dispersion von festen Arzneistoffpartikeln in Polymermatrixen konnten diese Probleme umgangen werden. Ist deren Konzentration in der Matrix sehr hoch, kommt es zur Ausbildung eines weitverzweigten Porennetzes, durch das der Wirkstoff anschließend herausdiffundieren kann (Matrixsystem, siehe auch Abb. 1-1C) [LANGER und FOLKMAN, 1976]. In den 1960iger und 1970iger Jahren wurden für solche Systeme vor allem

Poly(hydroxyethylmethacrylat) und Ethylen-Vinylacetat-Copolymere verwendet [LANGER und FOLKMAN, 1976 und 1978]. Diese Polymere sind zwar biokompatibel aber nicht bioabbaubar und bergen daher erhebliche toxische Risiken.

Um jedoch die oftmals umständliche und schwierige Explantation der *delivery* Systeme am Ende der Freisetzungen zu vermeiden, wurden in der Folge zumeist hydrophobe, bioabbaubare Polymere entwickelt (siehe auch Tabelle 1-3). Sie zeichnen sich dadurch aus, daß sie *in vivo* auf chemischem oder enzymatischem Weg zu natürlichen bzw. inerten, nicht immunogenen Metaboliten abgebaut werden. Ihre Verwendung hatte jedoch zur Folge, daß die Freisetzungsmechanismen der entsprechenden Matrixsysteme komplexer wurden. Sie beruhen nun nicht mehr ausschließlich auf der Diffusion des Wirkstoffs, sondern auch auf dem Abbaumechanismus des Polymers [GÖPFERICH et al., 1994].

Tabelle 1-3: Synthetische bioabbaubare Polymere für die Entwicklung von *drug delivery* Systemen

Polymer	Abbaumechanismus	Literatur
Polyanhydride	Hydrolyse	LEONG et al., 1986
Polyester (PLGAs)	Esterhydrolyse, (Esterasen)	JAIN et al., 1998
Poly(orthoester)	Esterhydrolyse, (Esterasen)	HELLER, 1985
Polycaprolactone	Hydrolyse	COFFIN und MCGINITY, 1992
Polyphosphazene	Hdrolyse, Auflösung	ADRIANOV und PAYNE, 1998

Für die Entwicklung von bioabbaubaren *delivery* Systemen werden Polylactate mit Abstand am häufigsten verwendet. Zu ihnen gehören auch die Copolymere aus Milch- und Glykolsäure, die sog. PLGAs (*copoly(lactic/glycolic acids)*). Ihr *in vivo* Abbau erfolgt durch eine nicht-enzymatische Hydrolyse der Esterbindungen, wobei die Endprodukte der Abbaureaktion mit den physiologischen Ausgangssubstanzen identisch sind. Die Variation des Verhältnisses von Milch- zu Glykolsäure erlaubt die Herstellung von Polymeren mit nahezu beliebigen Abbaugeschwindigkeiten. So bilden z.B. Mikrokapseln aus PLGA die Grundlage für ein injizierbares *delivery* System (Lupron Depot®), aus dem der gegen Prostatakrebs eingesetzte Peptidwirkstoff Leuprolidacetat über einen Zeitraum von 4 Wochen freigesetzt wird [OGAWA et al., 1988; OKADA et al., 1991].

Die Suche nach geeigneten Formulierungen für das *delivery* von Polypeptiden und Proteinen gestaltet sich in der Regel weitaus schwieriger. Sie besitzen im Gegensatz zu Oligopeptiden wie dem Leuprolidacetat eine definierte Tertiärstruktur, die für ihre biologische Aktivität

außerordentlich wichtig ist. Viele der Techniken, die für die Mikroverkapselung von Oligopeptiden verwendet werden, sind jedoch mit dem Gebrauch von organischen Lösungsmitteln, hohen Temperaturen und Ultraschall verbunden, und führen deswegen zu einer Denaturierung der Polypeptide und Proteine [THIES, 1982].

Im Fall des Interferons konnte dieses Problem umgangen werden, indem anstelle der Mikrokapseln Implantate verwendet wurden [EPPSTEIN et al., 1986]. Sie können in der Regel unter vergleichsweise milderen Bedingungen hergestellt werden. Ähnlich einfache Lösungen lassen sich aber längst nicht für alle Proteinwirkstoffe finden und so stellt ihre optimale Stabilisierung während des Formulierungsprozesses nach wie vor eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung von *delivery* Systemen dar.

Auch während des *deliverys* spielt die Stabilisierung der Peptide und Proteine eine wichtige Rolle. Die zur ihrer Verkapselung häufig verwendeten PLGAs ändern z.B. ihre Eigenschaften während des Freisetzungprozesses grundlegend. Bei dem Abbau eines solchen Polymers werden saure Oligo- und Monomere freigesetzt, so daß die darin eingeschlossenen Wirkstoffe zu Beginn der Polymererosion andere Bedingungen vorfinden als gegen Ende. Zudem kann die partielle Hydratation, die ein *delivery* System auf der Basis von hydrophoben Polymeren im Körper erfährt, zu einer irreversiblen Aggregation der darin enthaltenen Proteinwirkstoffe führen [COSTANTINO et al., 1994].

Dennoch gibt es Beispiele für erfolgreiche *protein delivery* Systeme auf der Basis von synthetischen bioabbaubaren Polymeren. So gelang es 1997 rhGH (*recombinant human growth hormone*) durch die Bildung eines unlöslichen Komplexes mit Zink derart zu stabilisieren, daß ein Einschluß dieses Proteins in PLGA-Mikrokapseln ohne signifikanten Aktivitätsverlust möglich wurde. Noch bis zu 30 Tage nach der Applikation dieser Mikrokapseln an Ratten bzw. Affen konnten erhöhte Level von biologisch aktivem rhGH im Blutserum der Tiere festgestellt werden [CLELAND et al., 1997; JOHNSON et al., 1997].

Aus den bisherigen Ausführungen wird deutlich, daß das Problem des Aktivitätsverlustes von Peptiden und Proteinen bei der Entwicklung solcher *delivery* Systeme noch nicht universell gelöst ist. Die Tatsache, daß es bislang höchstens Einzellösungen für einige dieser Wirkstoffe gibt, ist vor allem auf die harschen Bedingungen zurückzuführen, denen die Makromoleküle während des Formulierungsprozesses ausgesetzt sind. Für die Zukunft wird es daher wichtig sein, Methoden für die Formulierung von *delivery* Systemen auf Polymerbasis zu entwickeln, die die speziellen chemischen und physikalischen Eigenschaften der Peptid- und Proteinwirkstoffe berücksichtigen. In dieser Hinsicht sind natürliche Polymere wie Alginat [GOMBOTZ und WEE, 1998], Collagen [FRIESS, 1998], Gelatine [TABATA und IKADA, 1998]

oder Fibrin [SENDEROFF et al., 1991] von Interesse. Wie HO et al. [1995] am Beispiel des Fibrins zeigen konnten, weisen diese Polymere jedoch große wäßrige Poren auf, die eine schnelle diffusionskontrollierte Freisetzung der Peptide und Proteine ermöglichen. Durch den einfachen Einschluß der Makromoleküle in diesen Polymeren sind daher keine Freisetzen über lange Zeiträume zu erreichen. Vielmehr ist dazu die Immobilisierung der Peptide bzw. Proteine in den Polymeren nötig.

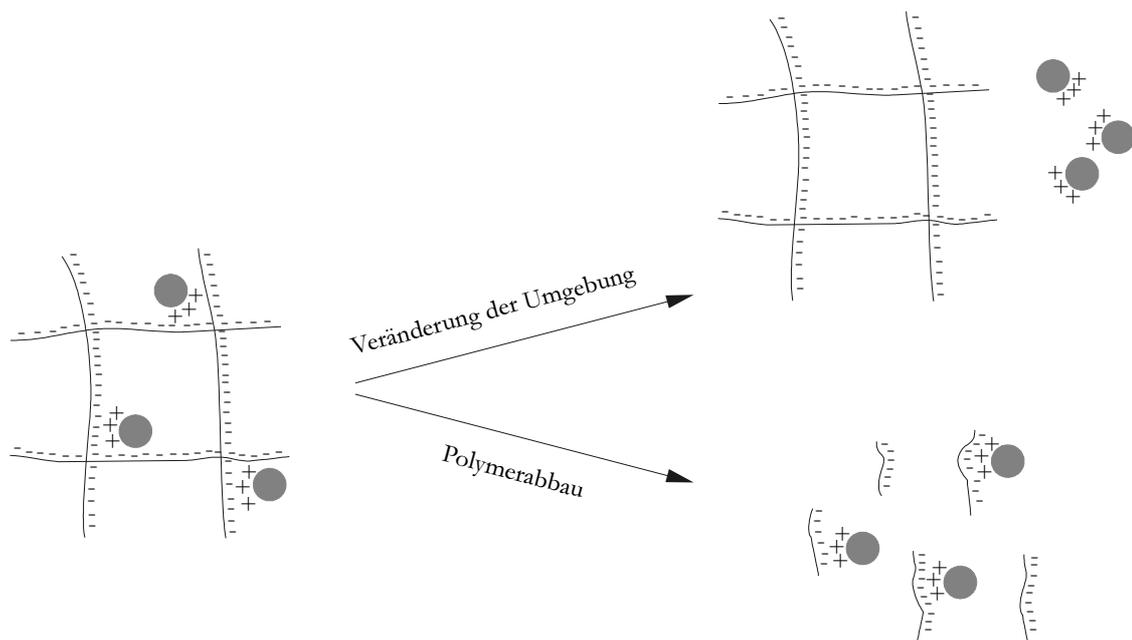


Abb. 1-2: Freisetzung eines über polyionische Wechselwirkungen gebundenen Proteinwirkstoffes aus einem bioabbaubaren Polymer. Entnommen aus TABATA und IKADA [1998].

Neben der kovalenten Bindung des Wirkstoffs an das Polymer [PITT und SCHINDLER, 1983] stellen polyionische Wechselwirkungen zwischen Makromolekül und Polymer eine Möglichkeit der Immobilisierung dar. Gelatine ist hierfür besonders geeignet, weil sie je nach Herstellungsprozeß basisch bzw. sauer ist. Sie kann deshalb sowohl negativ als auch positiv geladene Peptide und Proteine binden (siehe auch Abb. 1-2). Aufgrund der Stärke der polyionischen Wechselwirkungen ist bei diesen Systemen eine durch Veränderungen in der Umgebung ausgelöste Wirkstofffreisetzung eher unwahrscheinlich. Im Idealfall läßt sich diese ausschließlich über die *in vivo* Stabilität des Polymers steuern. Für Gelatineimplantate, die

immobilisiertes bFGF (*basic fibroblast growth factor*) enthielten, konnte z.B. eindeutig gezeigt werden, daß sie die Knochenneubildung bei Kaninchen um so nachhaltiger beeinflussen, je langsamer sie abgebaut werden [TABATA und IKADA, 1998].

1.2 *Delivery* Systeme auf Liposomenbasis

Liposomen sind geschlossene, vesikuläre Strukturen, bei denen ein wässriger Innenraum von einer oder mehreren Lipiddoppelschichten umgeben ist (vergleiche Abb. 1-3). Die potentielle Eignung solcher Vesikel als Arzneistoffträger (*drug carrier*) wurde vor mehr als 25 Jahren erkannt, als SESSA und WEISSMANN [1970] der liposomale Einschluß von Lysozym gelang. Liposomen können sowohl hydrophobe als auch hydrophile Arzneistoffe einschließen, wobei erstere in die Lipiddoppelschichten und letztere in den wässrigen Innenraum der Vesikel eingelagert werden (siehe auch Abb. 1-3). Sie sind wenig oder nicht immunogen und zu ihrer Herstellung werden hauptsächlich natürliche bioabbaubare Phospholipide verwendet (vergleiche Tabelle 1-4) [GREGORIADIS, 1995]. Je nach Größe und Lamellarität unterscheidet man zwischen MLVs (*multilamellar vesicles*), LUVs und SUVs (*large bzw. small unilamellar vesicles*).

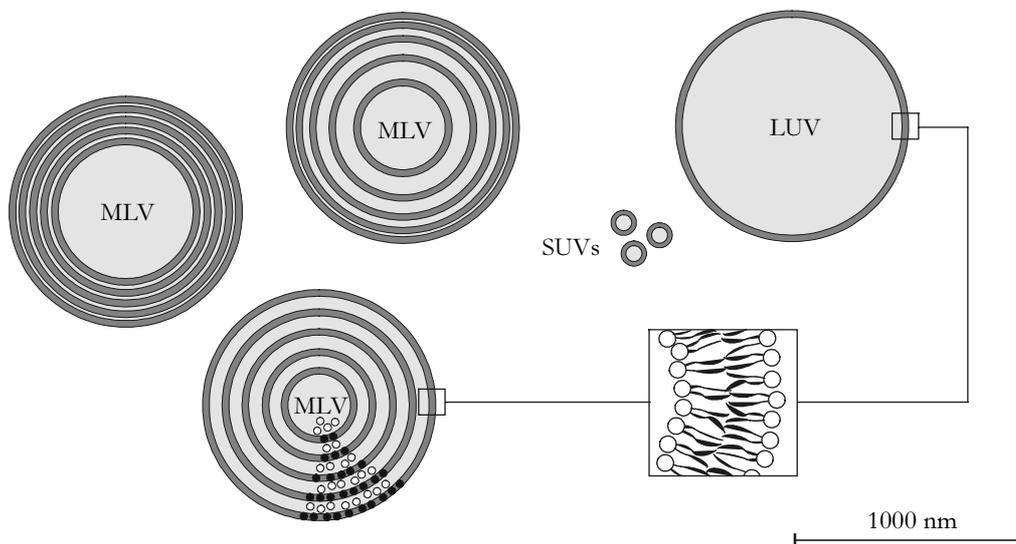
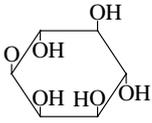
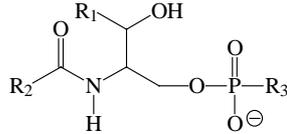


Abb. 1-3: Querschnitt durch verschiedene Liposomentypen. Kleine Liposomen (SUVs) besitzen einen Durchmesser von etwa 25-100 nm, während große Liposomen (MLVs bzw. LUVs) eine Größe von bis zu mehreren Mikrometern aufweisen können. Hydrophile Wirkstoffe (○) werden in den wässrigen Kompartimenten eingeschlossen, hydrophobe Wirkstoffe (●) werden in die Lipidmembranen eingelagert (modifiziert nach SCHREIER [1982]).

Tabelle 1-4: Strukturen der am häufigsten zur Herstellung von Liposomen verwendeten natürlichen Phospholipide

Lipidstruktur	Kopfgruppe (R ₃)	Name	Abkürzung
	OH	Phosphatidylsäure	PA
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^{\oplus}$	Phosphatidylcholin	PC
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^{\oplus}$	Phosphatidylethanolamin	PE
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^{\ominus})-\text{NH}_3^{\oplus}$	Phosphatidylserin	PS
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2(\text{OH})$	Phosphatidylglycerin	PG
		Phosphatidyinositol	PI
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^{\oplus}$	Sphingomyelin	SM

Mit Modifikationen entnommen aus NEW [1990a].

Schon früh erkannte man, daß der erfolgreiche Einsatz von Liposomen als *delivery* System von den folgenden Faktoren abhängt: (a) der Stabilität des Arzneistoffträgers auf dem Weg zum Wirkungsort, (b) der kontrollierten *clearance* der hauptsächlich i.v. verabreichten Vesikel aus dem Blutkreislauf sowie (c) ihrer gezielten Aufnahme durch das Zielgewebe oder -organ [GEGORIADIS, 1976a und b].

Alle drei Kriterien sind eng mit den Wechselwirkungen zwischen Liposomen und ihrer biologischen Umgebung verbunden. Für die Destabilisierung der Liposomenmembranen und die damit verbundene unkontrollierte Freisetzung liposomal verkapselten Materials werden z.B. die High Density Lipoproteine (HDLs) im Plasma verantwortlich gemacht, weil sie Liposomenmembranen Phospholipidmoleküle entziehen können [SCHERPHOF et al., 1978, 1983]. Die Plasmaelimination der Liposomen ist von der verabreichten Dosis und bestimmten Vesikeleigenschaften wie Größe und Oberflächenladung abhängig. In der Regel werden große Liposomen schneller aus dem Plasma eliminiert als kleine, und negativ geladene schneller als

positiv geladene oder neutrale [JULIANO und STAMP, 1975]. Hierfür ist neben den unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen Vesikeloberflächen und Plasmaproteinen [PATEL, 1992] bzw. Zellen [SANDRA und PAGANO, 1979; HEATH, 1987] vor allem die größten- und oberflächenabhängige Aufnahme von Liposomen durch das retikuloendotheliale System (RES) verantwortlich [RAHMAN et al., 1982].

Wenn also wie bei einer Reihe von Metallspeicher- [RAHAM, 1979] und Tropenkrankheiten [PANOSIAN et al., 1984] Zellen des RES das gewünschte Zielgewebe sind, stellt das *targeting* der Liposomen kein besonderes Problem dar. In diesem Fall besteht die Anforderung an sie lediglich darin, während der Zirkulation im Blut stabil zu sein. Nur so kann gewährleistet werden, daß der in den Liposomen eingeschlossene Wirkstoff in ausreichender Menge das RES erreicht. Dieses Problem konnte in den frühen 1980iger Jahren dadurch gelöst werden, daß bis zu 50 mol% Cholesterin in liposomale Membranen eingebaut wurden, die überwiegend aus Phospholipiden mit hohen Phasenübergangstemperaturen bestanden. Beide Maßnahmen machen Lipidmembranen wesentlich rigider und somit weniger anfällig für HDL-induzierte Destabilisierungen [WEBB et al., 1995]. Sollen intravenös verabreichte Liposomen jedoch in anderen Organen oder Geweben angereichert werden, so erfordert dies Strategien, die ihre schnelle Aufnahme durch das RES verhindern [GREGORIADIS, 1995; LASIC 1998].

Ein diesbezüglich vielversprechender Ansatz ist die Einlagerung von Phospholipiden mit sperrigen Polyethylenglykol(PEG)-Kopfgruppen in etwa 100 nm große Liposomen. Die stark hydrophilen Oberflächen der sog. Stealth[®] Liposomen verhindern das Anheften von Oponinen und erschweren somit die Aufnahme der Vesikel durch die Makrophagen des RES [LASIC et al., 1991; ALLEN und HANSEN, 1991]. Die damit verbundenen längeren Zirkulationszeiten der Stealth[®] Liposomen erhöhen die Wahrscheinlichkeit ihrer Extravasation und Akkumulation in Tumoren [HUANG et al., 1992; GABIZON und PAPAHAJIOPOULOS, 1988], da diese im Gegensatz zu gesundem Gewebe postkapillare Venolen mit erhöhter Permeabilität besitzen [GERLOWSKI und JAIN, 1986]. Dieses Wirkungsprinzip liegt dem auf dem Markt zugelassenen Präparat Doxil[®] zugrunde, das zur Behandlung des HIV-assoziierten Kaposi-Sarkoms eingesetzt wird. Die therapeutische Effektivität von Doxil[®] im Vergleich zu Standardmedikamenten ist sehr hoch, und durch die liposomale Verkapselung des Wirkstoffs konnten die mit einer konventionellen Doxorubicinbehandlung verbundenen Nebenwirkungen deutlich gemildert werden [LASIC, 1998].

Um ein *targeting* von Liposomen außerhalb der RES zu erreichen, ist es notwendig, rezeptorspezifische Liganden wie z.B. Antikörper oder Peptide auf der Liposomenoberfläche

zu präsentieren. Es zeigte sich jedoch, daß die *clearance* diese sog. Immunoliposomen stark beschleunigt ist. Bei ihrer bevorzugten Aufnahme durch Leber und Milz spielen offensichtlich Wechselwirkungen mit F_c- oder C3b-Rezeptoren eine entscheidende Rolle [WOLFF und GREGORIADIS, 1984; DEBS et al., 1987]. Durch die Verwendung von PEGylierten Immunoliposomen konnten die Zirkulationszeiten allerdings erheblich verlängert werden. Die sperrigen Polymergruppen erschweren zwar die Bindung solcher Vesikel an ein Antigen wie Myosin [KLIBANOV et al., 1991]. Aber TORCHILIN et al. [1992] konnten dennoch eine deutliche Anreicherung von PEGylierten Immunoliposomen in nekrotischem Myokardgewebe von Kaninchen nachweisen. Mit der kovalenten Bindung der Antikörper an die freien Enden der PEG-Ketten konnte die durch sie verursachte sterische Hinderung minimiert und die Effizienz des Liposomen-*targetings* weiter gesteigert werden [BLUME et al., 1993; MARUYAMA et al., 1995].

Liposomale Vakzine sind die bisher einzigen auf dem Markt befindlichen *delivery* Systeme, bei denen Proteine nicht für das *targeting* verantwortlich sind, sondern die eigentlichen Wirkstoffe darstellen (vergleiche auch Tabelle 1-5). Die Wirkungsweise dieser Vakzine beruht auf dem Adjuvanzeffekt von Liposomen, der eine Verstärkung der Immunantwort gegen die auf den Vesikeln präsentierten Antigene bewirkt [ALLISON und GREGORIADIS, 1974; GREGORIADIS, 1990; ALVING, 1991]. Nur wenige Proteine wurden bisher im wäßrigen Innenraum von Liposomen eingeschlossen. Der sich daraus ergebende therapeutische Nutzen konnte am Beispiel des Interleukins-2 (IL-2) gezeigt werden, das sich in sterisch stabilisierten SUVs befand. Es bewirkt bei Mäusen einen stärkeren Anstieg der Leukozytenzahlen und eine bessere Stimulierung der lymphokin-induzierten Killerzellaktivität als freies oder PEGyliertes IL-2 [KEDAR et al., 1994a und b]. Außerdem konnten MLVs, die ein makrophagenaktivierendes synthetisches Muramylpeptid enthielten, zur erfolgreichen Behandlung von Nierenkarzinomen eingesetzt werden [TANGUAY et al., 1994].

Die Tatsache, daß Peptide und Proteine auch bei der Entwicklung von liposomalen *drug delivery* Systemen offensichtlich nicht mit den niedermolekularen Wirkstoffen Schritt halten können, liegt wiederum an den hohen Anforderungen, die diese Makromoleküle an den Formulierungsprozeß stellen. Ähnlich wie im Fall der Polymersysteme beinhalten auch die klassischen Methoden zur Herstellung von Liposomen häufig den Gebrauch von organischen Lösungsmitteln, der in der Regel zu einer Inaktivierung der Peptide und Proteine führt. Vor einigen Jahren zeigte WEINER [1994] jedoch zahlreiche lösungsmittelfreie Herstellungsvarianten für Liposomen auf, die in Zukunft die Entwicklung von entsprechenden *delivery* Systemen erleichtern sollten.

Abb. 1-5.: Arzneimittel auf Liposomenbasis, die bereits auf dem Markt sind oder sich in der klinischen Phase befinden

Firma	Produkt	Status
Sequus, Menlo Park, CA, USA	Doxil: Doxorubicin in Stealth Liposomen Spy 07: Cisplatin in Stealth Liposomen	auf dem Markt seit 1995 (USA) bzw. 1996 Phase I
NeXstar, Boulder, CO, USA	Ambisome: liposomales Amphotericin B DaunoXome: liposomales Daunorubicin MiKasome: liposomales Amikacin	auf dem Markt seit 1990 (USA und Europa) auf dem Markt seit 1996 (USA und Europa) Phase I Phase III
Liposome Co., Princeton, NJ, USA	DC 99: liposomales Doxorubicin Ventus: liposomales Prostaglandin E ₁	Phase III nicht erfolgreich auf dem deutschen Markt
Astra Medica, Frankfurt, Deutschland	Salbe für die Krebstherapie	Phase III
Aronex, The Woodlands, TX, USA	Nyotran: liposomales Nystatin liposomales Anamycin	Phase II Phase II
Inex, Vancouver, BC, Kanada	Atragen: liposomale Retinolsäure liposomales Vincristin	Phase I
Swiss Serum Institute, Bern, Schweiz	Epaxal: IVIR-Liposomen als Hepatitis-A-Impfstoff* IVIR-Liposomen als trivalenter Grippe-Impfstoff* IVIR-Liposomen als Hepatitis-A- und -B-Impfstoff* IVIR-Liposomen als Hepatitis-A- und -B-Impfstoff*	auf dem Markt seit 1994 (Schweiz) Phase III Phase I Phase I
Novavax, Rockville, MD, USA	IVIR-Liposomen als Diphtherie-, Tetanus-, Grippe- und Hepatitis-A-Impfstoff* <i>E. coli</i> -Impfstoff in Novasomen [§] <i>Shigella flexneri</i> -Impfstoff in Novasomen [§]	Phase I Phase I Phase I
IGI, Vineland, NJ, USA	Impfstoff gegen die atypische Geflügelpest (<i>Newcastle disease</i>) in Novasomen [§] Vogel-Reovirus-Impfstoff in Novasomen [§]	auf dem Markt auf dem Markt
Biozone Labs, Pittsburgh, CA, USA	ELA-Max: liposomales Lidocain	auf dem Markt seit 1988 (USA)

*Rekonstituierte Virosomen, deren Phosphatidylethanolamin als Bindungsstelle für Virionen fungiert (*immunopotentiating reconstituted influenza virosomes*) [GLÜCK, 1999].

§Liposomen, die nicht von Phospholipiden, sondern von bioabbaubaren einkettigen Amphiphilen unter eventueller Beteiligung anderer Lipide gebildet werden [GUPTA et al., 1996].

Mit Modifikationen entnommen aus GREGORIADIS [1995] und LASIC [1998].

1.3 Fibrinverkapselte Liposomen als neues *delivery* System für Peptide und Proteine - Aufgabenstellung

Die bisherigen Ausführungen lassen erahnen, welche Möglichkeiten *drug delivery* Systeme der Medizin in Zukunft eröffnen werden. Sie machen aber auch deutlich, daß die mit dem Design dieser Systeme verbundenen Probleme noch längst nicht umfassend gelöst sind. Die bisher entwickelten *delivery* Systeme stellen in den meisten Fällen Einzellösungen dar, die sich nicht ohne weiteres auf andere Wirkstoffe übertragen lassen. Dies gilt insbesondere für die in den letzten zehn bis zwanzig Jahren verfügbar gewordenen Peptid- und Proteinwirkstoffe, die als Makromoleküle mit begrenzter Stabilität und kurzen *in vivo* Halbwertszeiten ganz besondere Anforderungen an das jeweilige *delivery* System stellen.

Depotarzneiformen sind aufgrund ihrer langsamen Wirkstofffreisetzung und der damit zu erzielenden Wirkungsverlängerung ideale Systeme für das *delivery* von Arzneistoffen mit kurzen Halbwertszeiten. Für ihre Herstellung werden oftmals synthetische bioabbaubare Polymere verwendet. Ihre Abbaumechanismen werden inzwischen recht gut verstanden und können dementsprechend nahezu beliebig gesteuert werden. Der Großteil dieser Polymere ist jedoch nur begrenzt für die Verpackung von Peptiden und Proteinen geeignet. Die entsprechenden Formulierungsprozesse erfordern häufig harsche Bedingungen und führen deshalb zu einer Inaktivierung der Makromoleküle. Für Liposomen gibt es durchaus Herstellungsmethoden, die sich für die Verpackung von Peptiden und Proteinen eignen. In den meisten Fällen werden sie allerdings intravenös verabreicht, was mit einer schnellen *clearance* durch das RES verbunden ist. Dementsprechend ist mit ihnen nicht die Wirkungsverlängerung zu erzielen, die bei der Verabreichung vieler Peptide und Proteine gewünscht ist.

Eine Kombination der beiden *delivery* Systeme, in der sich ihre jeweiligen Vorteile bei gleichzeitiger Elimination der Nachteile vereinen, könnte die ideale Formulierung für Peptide und Proteine sein. Wirkstoffhaltige Liposomen, die in ein Polymer eingeschlossen werden, bieten ihrem Inhalt nicht nur bei der Polymerisation sondern auch während des anschließenden *deliverys* Schutz vor der Umgebung. Außerdem können die Peptide und Proteine auf diese Weise in der von ihnen bevorzugten wäßrigen Umgebung verbleiben, der zusätzlich Stabilisatoren wie z.B. Trehalose [XIE und TIMASHEFF, 1997] zugesetzt sein können.

Bei natürlichen Polymeren, die unter milderen Bedingungen hergestellt werden können als synthetische, spielt die Schutzfunktion der Liposomen während der Polymerisationsreaktion eine untergeordnete Rolle. Durch die großen wäßrigen Poren dieser Polymere können jedoch

leicht Proteasen oder andere destabilisierende Substanzen an die empfindlichen Wirkstoffe gelangen. Zudem bewirken sie eine schnelle diffusionskontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe, die häufig unerwünscht ist.

In diesem Fall bieten Liposomen die Möglichkeit, den Wirkstoff im Polymer zu immobilisieren und damit den Freisetzungsmechanismus des Systems zu verändern (vergleiche Kapitel 1.1). Für eine solche Immobilisierung müssen die Liposomen stabil und groß genug sein, um durch das polymere Netzwerk festgehalten zu werden. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs nicht mehr diffusionskontrolliert, sondern geht mit dem Abbau des *carriers* einher. Da die Immobilisierung ausschließlich von den Eigenschaften der Liposomen bzw. des Polymers abhängt, ist sie nicht auf bestimmte Wirkstoffe beschränkt. Derartige *delivery* Systeme haben daher den großen Vorteil universell einsetzbar zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es, das eben beschriebene Prinzip bei der Entwicklung eines neuen *protein delivery* Systems auszunutzen. Während andere Autoren für ähnliche Systeme Collagen [WEINER et al., 1985], Poly(L-lysin) [KIBAT et al., 1990] oder Gelatine [DONG und ROGERS, 1993] als Polymer wählten, wird hier das natürliche, bioabbaubare Fibrin verwendet. Es entsteht durch eine thrombinkatalysierte Proteolyse aus dem löslichen Plasmaprotein Fibrinogen. Unter Abspaltung zweier N-terminaler Fibrinopeptide A und B werden zunächst die sog. Fibrinmonomere gebildet, die sich anschließend aufgrund von ionischen Wechselwirkungen zu geordneten faserförmigen Strukturen zusammenlagern [HENSCHEN und MCDONAGH, 1986] (siehe Abb. 1-4).

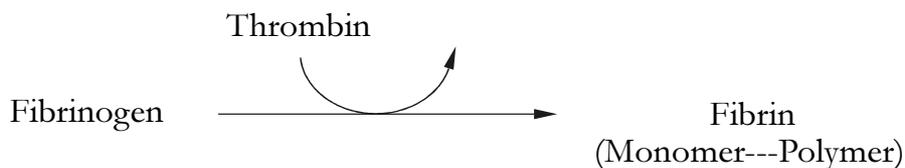


Abb. 1-4: Reaktionsschema für die thrombinkatalysierte Fibrinpolymerisation.

Die mit einem gut zu detektierenden Modellprotein gefüllten Liposomen werden mit Hilfe einer kontrollierten Detergensentfernung aus Mischmicellenlösungen hergestellt [MILSMANN et al., 1978; ZUMBÜHL und WEDER, 1981; MIMMS et al., 1981](siehe auch Abb. 1-5). Bei dieser Methode entstehen große unilamellare Liposomen mit enger Größenverteilung und hohen

Einschlußraten. Sie hat gegenüber vielen anderen Herstellungsverfahren den Vorteil, daß sie in der Gegenwart des zu verkapselnden Wirkstoffs ohne organische Lösungsmittel auskommt und ist somit für den Einschluß von Peptiden und Proteinen besonders gut geeignet [WEINER, 1994].

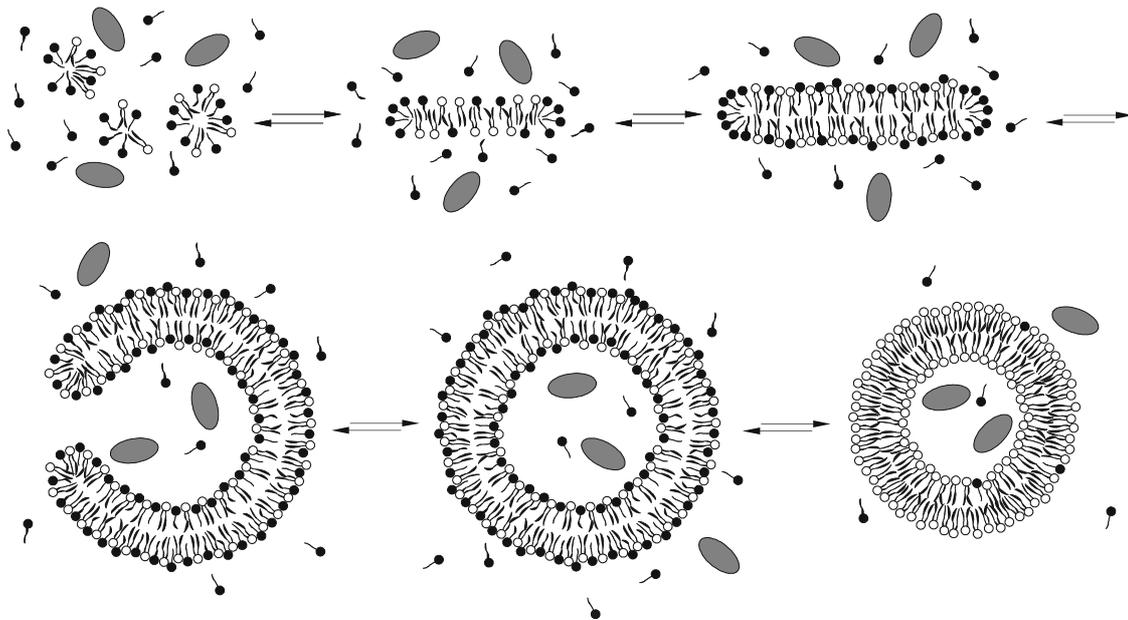


Abb. 1-5: Herstellung von LUVs mittels kontrollierter Detergendifalyse. Das Schema zeigt den für die Liposomenbildung vorgeschlagenen Mechanismus (Lipid (\rightleftharpoons), Detergens (\rightarrow)). Hydrophile Wirkstoffe (\bullet), die der Mischmicellenlösung zu Beginn der Dialyse zugesetzt werden, werden in der dargestellten Weise in den entstehenden LUVs eingeschlossen [modifiziert nach OLLIVON et al., 1988].

Durch die Polymerisation des Fibrins in Gegenwart der proteingefüllten Liposomen wird schließlich das gewünschte „kombinierte“ System erhalten. Mit seinem wirkstoffunabhängigen Design scheint es dem von Einzellösungen geprägten *protein delivery* grundlegend neue Möglichkeiten zu eröffnen. Die Untersuchungen zum *in vitro* bzw. *in vivo* Freisetungsverhalten diese neuen *delivery* Systems stellen den wichtigsten Teil der vorliegenden Arbeit dar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Peptide, Proteine und Fibrinkleber

Albumin (aus Rinderserum, Fraktion V, fettsäurefrei)	Roche, Mannheim
Aprotinin (aus Rinderlunge, 9455 KIU/ml)	Calbiochem, La Jolla
Behriplast [®] HS 0,5, 1,0 und 3,0 ml	Centeon Pharma, Frankfurt
Erythropoetin (human, rekombinant, ca. $2 \cdot 10^5$ - $2,2 \cdot 10^6$ U/ml in Phosphatpuffer, pH 7,0)	Roche, Mannheim
Fetales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Fibrinogen (aus Rinderserum, Typ IV)	Sigma, Deisenhofen
MAK 33-Antikörper	Roche, Mannheim
Meerrettich-Peroxidase (Typ VI-A)	Sigma, Deisenhofen
N-Glycosidase F (aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i> , rekombinant)	Roche, Mannheim
Plasmin (aus Rinderserum, 0,12 U/mg Protein)	Sigma, Deisenhofen
Thrombin (aus Rinderserum, 1.500 - 2.500 NIH U/mg Protein)	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Proteintests

ImmunoPure [®] TMB-Substrat Kit	Pierce Chemical, Rockfort
EPO-ELISA	Roche, Mannheim
Sigma Fast DAB mit Metall-Enhancer	Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Chemikalien

Ammoniumcyanat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat, ROTIPURAN [®] ≥ 98 %	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Na-Salz, für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Chloroform, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat, ROTIPURAN [®] ≥ 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Eisessig, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Epikuron 200 (Phosphatidylcholin aus Sojabohnen, 2% Tocopherol)	Lukas Meyer, Hamburg
Ethanol, ROTIPURAN [®] ≥ 99,8 %	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd, 37 %, zur Analyse	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehydlösung, 25 %ige Lösung in Wasser, standard grade	Serva, Heidelberg
Glycerin, ≥ 99 %	Sigma, Deisenhofen
Glycin, electrophoresis grade	ICN, Meckenheim
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat Monohydrat, zur Analyse	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat Monohydrat, > 99 %	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, ultra pure	ICN, Meckenheim
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat, zur Analyse	Fluka, Neu-Ulm
Natronlauge, 0,1N	Merck, Darmstadt
n-Octyl-β-D-glucopyranosid, ultrol [®] grade	Calbiochem, La Jolla
Rotiphorese [®] Gel 40, 38%ige Acrylamidstammlösung mit 2% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
TEMED, 99%, für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-97%, zur Analyse	Merck, Darmstadt

Silbernitrat, zur Proteinfärbung	Roth, Karlsruhe
Sucrose, research grade	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	ICN, Meckenheim
Tween 20®	ICN, Meckenheim

2.1.4 Antibiotika und Narkotika

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Ketamin 10% (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid)	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen
Rompun 2% (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	BayerVital, Leverkusen

2.1.5 Standardpuffer

Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4	10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl
Citratpuffer, pH 6,4	50 mM Citrat, 150 mM NaCl
Trispuffer, pH 7,5 bzw. 8,5	20 mM Tris/HCl, 180 mM NaCl

Ampicillinhaltige Puffer enthielten 100 µg/ml des Antibiotikums.

2.1.6 Verbrauchsmaterial

DC Aluminium-Folien Silicagel 60	Merck, Darmstadt
Dialysemembranen Diachema (MWC 5000)	Dianorm, München
Einmal-Kapillarpipetten mit Ringmarke (50 µl)	Roth, Karlsruhe
Formvar/Kohle-Grids	Plano, Wetzlar
1 ml Pantajet® Applikationssysteme	Centeon Pharma, Frankfurt
Parafilm M®	American National Can™, Neenah
Sephadex G-25 M Säulen (PD-10 Säulen)	Pharmacia Biotech, Uppsala

Sigmacote®	Sigma, Deisenhofen
Strohhalme	McDonald's, Halle
Supor® Acrodisc® Spritzenfilter (steril, 0,2 µm Porengröße)	GelmanSciences, Ann Arbor
Wundklammern nach Michel (7,5 x 1,75 mm)	Aesculap, Tutlingen

2.1.7 Versuchstiere

Für die EPO-Freisetzungskinetiken wurden männliche bzw. weibliche NMRI-Mäuse verwendet, die zwischen 30 und 45 g wogen. Die Mäuse wurden entweder über die Firma Charles River, Sulzfeld bezogen, oder stammten aus der Zucht des Tierlabors der Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Regensburg. Die Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit verschiedener EPO-Formulierungen wurden an ca. 6 Wochen alten männlichen B6D2F₁-Mäusen der Firma Charles River, Sulzfeld durchgeführt.

Die Tierhaltung erfolgte in Makrolon-Käfigen Typ III (UNO Roestvaststaal, Zevenaar) mit Einstreu bei künstlichem Hell-Dunkel-Rhythmus (12/12 h). Die Temperatur in den klimatisierten Haltungsräumen betrug 22°C (NMRI-Mäuse) bzw. 23°C (B6D2F₁-Mäuse). Futtermittel in Pelletform (H 1003 Alma, Kempten (NMRI-Mäuse) bzw. Ssniff Versuchstierdiäten, Soest (B6D2F₁-Mäuse)) und Trinkwasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Geräte

Geräte, die zur normalen Laborausstattung gehören (Pipetten, Waagen, pH-Meter etc.) sollen nicht extra aufgeführt werden. Alle anderen Geräte werden bei den jeweiligen Methoden genannt.

2.3 Methoden

2.3.1 Arbeiten unter keimarmen Bedingungen

Im folgenden wurde immer dann unter sterilen bzw. keimarmen Bedingungen gearbeitet, wenn es sich um *in vivo* Experimente bzw. Experimente mit längeren Inkubationsschritten handelte. In diesen Fällen wurden Glasgeräte, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße vor ihrer Verwendung autoklaviert. Nicht autoklavierbare Zentrifugenröhrchen sowie die Dialysezellen für die Liposomenherstellung wurden mit 70%igem Ethanol behandelt. Die für die Polymerisation der Fibrin- und Behriplast®-Clots verwendeten Strohhalme wurden für ca. 1 Stunde mit UV-Licht (254 und 366 nm) bestrahlt. Puffer und Lösungen wurden so weit wie möglich sterilisiert bzw. sterilfiltriert und gegebenenfalls mit Ampicillin versetzt.

2.3.2 Liposomenherstellung

Für die Herstellung von Liposomen aus Lipid-Detergens-Mischmicellenlösungen werden in der Regel neutrale Phosphat- bzw. Trispuffer verwendet [MILSMANN et al., 1978; ZUMBÜHL und WEDER, 1981; MIMMS et al., 1981]. Die Einzelkomponenten der Fibrinklebersets, die im Rahmen dieser Arbeit für die Verkapselung der Liposomen verwendet wurden (siehe auch 2.3.4.3), sind jedoch nur als citrathaltige Lyophilisate bzw. Citratpufferlösungen erhältlich. Um sämtliche Experimente in vergleichbaren Puffersystemen durchführen zu können, mußten daher sämtliche Liposomenpräparationen nach ihrer Herstellung in Citratpuffer umgepuffert werden. Als Detergenzien für die kontrollierte Dialyse wurden entweder n-Octyl- β -D-glucopyranosid (nOG) oder Natriumdeoxycholat (DOC) verwendet. Bei dem Lipid handelte es sich ausschließlich um Sojaphosphatidylcholin (SPC) mit 2% Tocopherol als Antioxidans.

Eine ethanolische Lösung, die entweder 37,5 mg SPC und 21,5 mg DOC (Molverhältnis SPC : DOC ungefähr 1:1) oder 30 mg SPC und 58,5 mg nOG (Molverhältnis SPC : nOG ungefähr 1:5) enthielt, wurde in einem 100 ml Rundkolben bei 30 bis 40°C am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der lösungsmittelfreie Lipid-Detergens-Film wurde anschließend unter leichtem Schwenken in 1,5 ml PBS aufgelöst. Die sich dabei bildende klare Mischmicellenlösung wurde in einer MiniLipoprep® (Dianorm, München) bei 4°C gegen 400 ml PBS

dialysiert (siehe Abb. 2-1). Nach einer Stunde und im Fall des nOGs auch nach zwei Stunden wurde der Puffer noch einmal gewechselt, bevor anschließend über Nacht weiterdialysiert wurde.

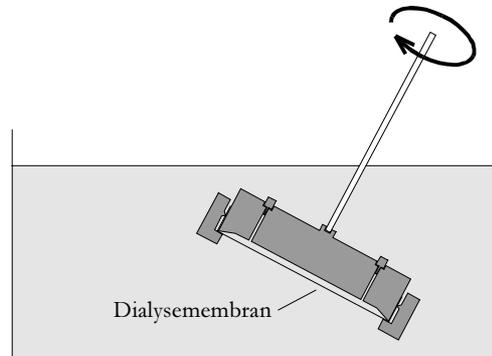


Abb. 2-1: Aufbau der MiniLipoprep®. Dargestellt ist die ca. 1,5 ml fassende Dialysezelle, die durch einen Motor langsam um die eigene Achse gedreht wird. Eine Luftblase, die in der Dialysekammer gelassen wird, sorgt für eine gute Durchmischung der Mischmicellenlösung während der Dialyse. Dadurch wird eine enge Größenverteilung der sich bildenden Liposomen gewährleistet (modifiziert nach NEW [1990b]).

Meerrettich-Peroxidase (POD) oder humanes Erythropoietin (EPO) enthaltende Liposomen wurden hergestellt, indem die Proteine zu Beginn der Dialyse der Mischmicellenlösung zugesetzt wurden (0,5 mg/ml POD bzw. 300.000 U/ml EPO). Die Abtrennung des nicht eingeschlossenen Proteins von der fertigen Liposomenpräparationen erfolgte durch Dichtegradienten-Flotation. Dazu wurden die Liposomen im Verhältnis 1:1 mit 2,5 M Sucroslösung gemischt. Diese Mischungen wurden anschließend mit mindestens der dreifachen Menge 1 M Sucroslösung sowie 400 µl Puffer überschichtet.

Die exakten Flotationsansätze und -bedingungen, die sich je nach Liposomenpräparation voneinander unterscheiden, können Tabelle 2-1 entnommen werden. Aus ihr geht ebenfalls hervor, daß die Dichtegradienten-Flotation in einigen Fällen zur gleichzeitigen Umpufferung der Liposomen in Citratpuffer verwendet wurde. Sie listet deswegen auch die Flotations- bzw. Umpufferungsbedingungen für „leere“ Liposomen auf.

Bei den nOG-Liposomen war die Abtrennung des nicht eingeschlossenen EPOs durch eine Dichtegradienten-Flotation in Citratpuffer nicht möglich, da sich die Vesikel anschließend nicht mehr zufriedenstellend resuspendieren ließen. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von Trispuffer für Herstellung (pH 7,5) und Flotation (pH 8,5) der EPO-gefüllten nOG-Liposomen umgangen werden. Die Umpufferung der Vesikel in Citratpuffer erfolgte im Anschluß an die Flotation mit Hilfe einer PD-10-Säule.

Tabelle 2-1: Flotationsansätze und -bedingungen für die Umpufferung von Liposomen und/oder die Abtrennung nicht verkapselten Proteins

Liposomenpräparation Detergenz	„Füllung“	Puffer	Zentrifuge*/Rotor*/Röhrchen und Flotationsvolumen	Flotationsbedingungen
DOC	„leer“	Citrat pH 6,4	Optima™ TLX/TLA-100.4 / 13 x 56 mm, 3,2 ml	1h bei 540.000 g
DOC	POD	Citrat pH 6,4	Optima™ TLX/TLA-100.4 / 13 x 56 mm, 3,2 ml	2 x (1h bei 540.000 g)
nOG	„leer“	Citrat pH 6,4	L8-60M/SW 55 Ti / 3 x 51 mm, 5 ml	1h bei 300.000 g
nOG	POD	Citrat pH 6,4	L8-60M/SW 55 Ti / 3 x 51 mm, 5 ml	2 x (1h bei 300.000 g)
nOG	„leer“ bzw. POD/EPO	Tris pH 7,5 bzw. Citrat pH 6,4 (POD)	L8-60M/SW 40 Ti / 14 x 95 mm, 14 ml	45 min bei 285.000 g

*(Beckman Instruments, Fullerton)

2.3.3 Charakterisierung der Liposomen

2.3.3.1 Größenverteilung der Liposomen

Die Bestimmung der mittleren Vesikelgröße und der Größenverteilung einer Liposomenpräparation erfolgte mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). Dazu wurden die Liposomen so weit mit Puffer verdünnt, bis die Lichtstreuung bei etwa 100 KCts/s lag. Nach Temperierung wurden die Proben bei 25°C in einem Zetasizer 3000 mit 5 mW He-Ne-Laser und Windows PCS Version 1.31 Software (Malvern Laboratories, Malvern) vermessen. Für die Berechnung der mittleren intensitätsgewichteten Vesikelgrößen (\bar{z}_{int}) wurden die Viskosität von Wasser sowie der Auswertemodus „multimodal“ und ein quadratischer Fit verwendet.

2.3.3.2 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie der Liposomen

Die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie der verschiedenen Liposomenpräparationen wurde von Herrn Prof. Dr. H. W. MEYER am Institut für Ultrastrukturforschung des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Dazu wurden die Liposomenpräparationen zwischen zwei dünne Kupferplatten gebracht und ausgehend von Zimmertemperatur bei -185°C in flüssigem Propan schockgefroren. Bruch und Herstellung von Oberflächenabdrücken der Bruchflächen (Platin/Kohle) erfolgten bei -150°C in einer BAF 400 T Anlage (Balzer, Lichtenstein). Die mikroskopischen Bilder wurden unter Verwendung eines Zeiss CEM 902 Mikroskops (Zeiss, Oberkochen) angefertigt.

2.3.3.3 Einschlußkapazität der Liposomen

2.3.3.3.1 Proteingehalt der Liposomen

Für die Bestimmung der Einschlußkapazitäten der proteingefüllten Liposomen wurden ausschließlich flotierte Vesikelpräparationen verwendet. Dies war nötig, da das POD-Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) die Lipiddoppelschicht der Liposomen zumindest begrenzt überqueren konnte. Der POD-Aktivitätstest bot daher keine Möglichkeit, zwischen liposomal verkapseltem und „freiem“ Protein zu unterscheiden. Dasselbe Problem ergab sich für den EPO-ELISA. Im Unterschied zum POD-Aktivitätstest lag die Ursache jedoch nicht im „Substrat“, also dem Antikörper, sondern in einem detergenshaltigen Inkubationspuffer, der zur Auflösung der Liposomen während des ELISAs führte.

2.3.3.3.1.1 POD-Aktivitätstest

POD-Mikrotiterplatten-Assays wurden mit dem ImmunoPure[®] TMB Substrat Kit wie in der Gebrauchsanleitung beschrieben durchgeführt und an einem DIAS Mikrotiterplattenreader (Dynatech Laboratories, Billingshurst) vermessen. Die flotierten Liposomenpräparationen wurden hierzu mit Citratpuffer, der 1 mg/ml BSA und 0,01% Tween 20[®] enthielt, aufgelöst und auf eine POD-Konzentration von etwa 10 ng/ml verdünnt. Als Stammlösung für die Eichgerade wurden die entsprechenden unflotierten Liposomenpräparationen verwendet. Auf

diese Weise konnte dem zu beobachtenden Aktivitätsverlust der POD durch die vorangegangene Dialyse Rechnung getragen werden. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

2.3.3.3.1.2 EPO-ELISA

Bei dem verwendeten EPO-ELISA handelte es sich um eine bezüglich des Probenpuffers modifizierte Variante des käuflichen Kits. Die flotierten EPO-haltigen Liposomen wurden mit Probenpuffer auf eine Proteinaktivität von etwa 500 mU/ml verdünnt. 20 µl dieser Verdünnungen wurden in Mikrotiterplatten pipettiert, in denen bereits 30 µl Probenpuffer vorgelegt waren. Nach Zugabe von 50 µl Immunreagenz wurden die Platten für drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze verworfen und die Platten mit 4 x 200 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 100 µl ABTS-Substrat-Lösung zugegeben und nach einer erneuten Inkubation von ca. 20 min wurden die Absorptionen der sich nach grün verfärbenden Substratlösungen bei 405 nm an einem DIAS Mikrotiterplattenreader (Dynatech Laboratories, Billingshurst) gemessen. Zur Ermittlung der EPO-Konzentrationen wurden die gemessenen Absorptionen mit einer parallel vermessenen Eichkurve verglichen, für die eine EPO-Stammlösung bekannter Aktivität verwendet wurde. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3.3.3.2 Lipidgehalt der Liposomen

Neben der Enzym- bzw. Proteinaktivität der flotierten Liposomen wurde auch ihre Lipidkonzentration bestimmt. Dies war nötig, da nur Liposomenpräparationen mit gleichen Lipidkonzentrationen den direkten Vergleich ihrer Einschlußraten ermöglichen.

Der dazu verwendete STEWART-Assay [1980] beruht auf der Eigenschaft von Phospholipiden, in organischen Lösungsmitteln Komplexe mit Ammonium-Eisenthiocyanat zu bilden. 50 µl der flotierten und auf ca. 0,5-2 mg/ml Lipid verdünnten Liposomenpräparationen wurden zu 100 µl Methanol pipettiert. Nach der Zugabe von 1 ml Chloroform und 0,8 ml einer wässrigen Ammonium-Eisenthiocyanat-Lösung (27,03 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 30,4 g/l NH_4SCN) wurde der Ansatz für 15 Sekunden intensiv gemischt. Um organische und wässrige Phase voneinander abtrennen zu können, wurde anschließend für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert.

Die Absorption der klaren Chloroformphase wurde bei 485 nm in einer Glasküvette (10 mm Schichtdicke) gemessen. Ein mit Hilfe einer Eichgeraden (siehe Abb. 2-2) bestimmter Umrechnungsfaktor von 78 wurde für die Umrechnung der Absorptionswerte in Lipidmengen verwendet. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

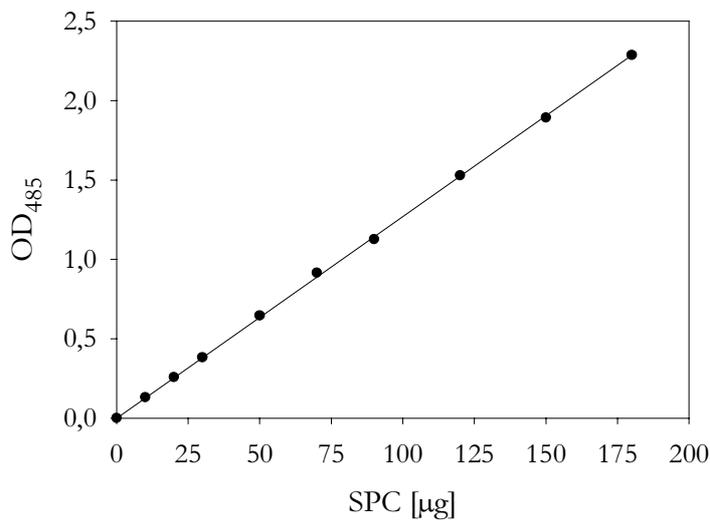


Abb. 2-2: Eichgerade zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors für die SPC-Bestimmung nach STEWART. Die Steigung der Geraden (78 µg/OD) entspricht dem für die Umrechnung von Absorptionen in Lipidmengen verwendeten Faktor.

2.3.3.3 Berechnung der Einschlußkapazität der Liposomen

Zur Berechnung der Einschlußkapazitäten (*encapsulation efficiency* (ee)) aus den ermittelten Protein- und Lipidkonzentrationen der flotierten Liposomenpräparationen wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$ee[\%] = \frac{p_f \cdot 100}{p_0} \cdot \frac{l_0}{l_f}, \quad (1)$$

p_0 und p_f sind die Proteinkonzentrationen der Liposomenpräparation vor und nach Flotation, wobei für p_0 die Proteinkonzentration der Mischmicellenlösung angenommen wird. l_0 und l_f sind die entsprechenden Lipidkonzentrationen der Liposomenpräparation.

2.3.3.4 Nachweis des Proteineinschlusses in den Liposomen

Um nachweisen zu können, daß das mit den flotierten Liposomen assoziierte Protein tatsächlich liposomenverkapselt ist, wurde EPO-gefüllten Liposomen N-Glycosidase F zugesetzt. Sie ist in der Lage, den Glycoanteil von EPO [TSUDA et al., 1990] unter Bedingungen abzubauen, bei denen Liposomen stabil sind, und bietet daher die Möglichkeit, liposomenverkapseltes und somit geschütztes EPO von „freiem“, dem Verdau ausgesetzten zu unterscheiden.

Flotierte, EPO-gefüllte nOG-Liposomen, die sich in Tris-Puffer pH 8,5 befanden, wurden mit 2 U N-Glycosidase F pro 100 µg liposomenassoziiertem EPO versetzt und bei 37°C für 36 h inkubiert. Als Kontrolle diente ein Verdauansatz von EPO-gefüllten Liposomen, die zuvor mit 3,8% (w/v) n-OG aufgelöst worden waren. Außerdem wurde „freies“ EPO in An- und Abwesenheit von 3,8% n-OG mit N-Glycosidase F verdaut. Sämtliche Ansätze wurden anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE [LAEMMLI, 1970] unter Verwendung eines 12%igen Polyacrylamidgels analysiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Silberfärbung [HEUKSHOVEN und DERNICK, 1985].

2.3.3.5 Detergensgehalt der Liposomen

„Leere“ Liposomenpräparationen wurden vor und nach Dichtegradientenflotation in einem Heizblock bei 90°C bis zur Trockene eingengt und anschließend in organischem Lösungsmittel aufgenommen (siehe Tabelle 2-2). Die sich bildenden Suspensionen wurden mit Hilfe eines TLC Applikators AS 30 (Degussa, Heidelberg) in einem bzw. drei Zyklen auf Aluminium-Folien Silikagel 60 aufgetragen. Ihre Entwicklung erfolgte in einer lösungsmittel-gesättigten Horizontalkammer (Camag, Schweiz) mit einer 3:1 (v:v) Chloroform-Methanol-Mischung als Laufmittel. Die luftgetrockneten DC-Folien wurden kurz in eine Färbelösung aus 0,5 ml Anisaldehyd, 50 ml Eisessig und 1 ml konzentrierter Schwefelsäure getaucht und dann bis zum Auftreten der Färbung in einem Trockenschrank auf 100°C erhitzt [STAHL, 1969; LISBOA, 1964; STAHL und KALTENBACH, 1961]. Die densitometrische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Image Master™ Software (Pharmacia Biotech, Uppsala), wobei die Detergenskonzentrationen durch den Vergleich mit einer Eichgeraden berechnet wurden.

Tabelle 2-2: Herstellung und Behandlung der „leeren“ Liposomenpräparationen zur Bestimmung ihres Detergensgehaltes

Detergens	Dialyse-/ Flotationspuffer	eingedampftes Liposomenvolumen	Lösungsmittel	aufgetragenes Probenvolumen
DOC	PBS/Citrat	12,5/25/50 µl	50 µl Methanol	2 µl
nOG	PBS/Citrat	50/100/200 µl	100 µl Chloroform	10 µl
nOG	Tris, pH 7,5/8,5	12,5/25/50 µl	100 µl Chloroform	10 µl

2.3.3.6 Liposomenstabilität

Die Permeabilität der POD-gefüllten DOC- bzw. nOG-Liposomen wurde unter Bedingungen untersucht, die denen der nachfolgenden *in vitro* Freisetzungsexperimente (Kapitel 2.3.5.1) sehr ähnlich waren. Sie wurden bei 20°C in einer ampicillinhaltigen Mischung aus PBS und Citratpuffer (Volumenverhältnis 5:2) inkubiert, die außerdem 1 mg/ml BSA bzw. 4,2 mg/ml Fibrinogen und 10 mM CaCl₂ enthält. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden diesen Ansätzen 5 µl-Proben entnommen, die mit 475 µl 2,5 M Sucrose in PBS gemischt wurden. 0,4 ml dieser Mischungen wurden in Zentrifugenröhrchen (13 x 56 mm) pipettiert und mit 2,4 ml 1M Sucroslösung sowie 0,4 ml PBS überschichtet. Nach einstündiger Flotation bei 543.000 g (siehe auch Tabelle 2-1) wurden die Zentrifugenröhrchen mit Hilfe einer langen Kanüle von unten nach oben leerpumpt. Hierbei wurden 0,5 bis 0,7 ml große Fraktionen gesammelt, deren POD-Aktivität bestimmt wurde. Da liposomenverkapselte POD in den oberen Fraktionen zu finden war und „freies“ Protein in den unteren, konnte aus den gemessenen POD-Aktivitäten das Verhältnis der beiden bestimmt werden. Alle Flotationsexperimente wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3.4 Fibrin- und Behriplast[®]-Clots

2.3.4.1 Herstellung liposomenhaltiger Fibrinclots

Eine Citratpufferlösung, die proteingefüllte Liposomen bzw. „leere“ Liposomen und „freies“ Protein enthielt, wurde mit 4,2 mg/ml Fibrinogen und 10 mM CaCl₂ versetzt. Anschließend wurde die Polymerisation des Fibrinogens durch Zugabe von Thrombin gestartet. Je nachdem, ob die sich bildenden Fibrinclots für *in vitro* oder *in vivo* Experimente verwendet werden sollten, betrug die Thrombinaktivität der Polymerisationslösung 1 bzw. 2 U/ml. Vor jedem Experiment wurden die Clots jedoch für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um ihr vollständiges Aushärten zu gewährleisten.

2.3.4.2 Elektronenmikroskopie von liposomenhaltigen Fibrinclots

10 µl einer Polymerisationslösung (siehe Kapitel 2.3.4.1), die POD-gefüllte nOG-Liposomen enthielt, wurden auf ein formvar- und kohlebeschichtetes Grid gegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur und hoher Luftfeuchtigkeit wurde der größte Teil des entstandenen Clots mit Filterpapier vom Grid entfernt. Der auf dem Grid verbliebene Rest wurde für drei Stunden mit 4%iger Glutaraldehydlösung in PBS überschichtet und anschließend mehrere Male mit PBS gewaschen. Es folgten eine fünfminütige Überschichtung mit DAB/Cobalt-Lösung und ein weiterer Waschschrift. Die mikroskopischen Bilder wurden an einem Tesla BS 500 Elektronenmikroskop (Tesla, Brno) angefertigt.

2.3.4.3 Herstellung liposomenhaltiger Behriplast[®]-Clots

Zu Citratpuffer, der proteingefüllte nOG-Liposomen bzw. „freies“ Protein und „leere“ nOG-Vesikel enthielt, wurde Aprotinin in einer Konzentration von 500 KIU/ml gegeben. Diese Lösung wurde zur Rekonstitution des lyophilisierten Fibrinogens von Behriplast[®] HS Sets (Komponente 1) verwendet. Die Thrombinlösung (Komponente 2) wurde nach Gebrauchsanleitung hergestellt. Mit Hilfe von 1 ml Pantajet[®] Applikationssets wurden aus gleichen Volumina der beiden Komponenten Behriplast[®]-Clots hergestellt. Die Aushärtung der Clots erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.3.5 *In vitro* Experimente mit Fibrin- und Behriplast[®]-Clots

2.3.5.1 *In vitro* Freisetzung von POD aus Fibrin- und Behriplast[®]-Clots

200 μl Fibrin- bzw. Behriplast[®]-Clots, die entweder POD-gefüllte Liposomen oder entsprechende Mengen „leere“ Liposomen und „freie“ POD enthielten, wurden in verschraubbaren 1,5 ml Reaktionsgefäßen auspolymerisiert. Anschließend wurden sie mit 500 μl 1 mg/ml BSA in PBS überschichtet und bei 20°C inkubiert (siehe Abb. 2-3). Aus den Überständen wurden in regelmäßigen Abständen 10 μl Proben entnommen, deren POD-Aktivität bestimmt wurde (vergleiche Kapitel 2.3.3.3.1.1).

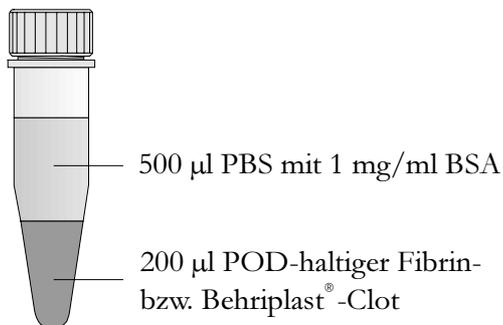


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Experimente zur Freisetzung von POD aus Fibrin- und Behriplast[®]-Clots.

2.3.5.2 Plasminkatalysierter Abbau von liposomenhaltigen Fibrinclots

Der plasminkatalysierte Abbau von Fibrinclots, die POD-gefüllte Liposomen enthielten, wurde direkt im Anschluß an die Clotpolymerisation oder nach Beendigung der POD-Freisetzung durchgeführt. Dazu wurde den Clots in PBS gelöstes Plasmin in einer Endkonzentration von 0,5 bis 1 U/ml zugesetzt. Bei diesen Plasminkonzentrationen und 20°C dauerte der komplette Verdau eines 200 μl Clots ca. zwei Tage. Die dabei entstehenden Lösungen konnten anschließend wie gewohnt auf ihren POD-Gehalt (Kapitel 2.3.3.3.1.1) oder die Stabilität der Liposomen (Kapitel 2.3.3.6) hin untersucht werden.

2.3.6 *In vivo* Experimente mit Fibrin- und Behriplast®-Clots

2.3.6.1 Lagerstabilität von EPO-Serumproben

Bevor die ersten *in vivo* Experimente mit EPO-haltigen Fibrin- und Behriplast®-Clots durchgeführt wurden, wurde zunächst die Lagerstabilität von EPO in murinen Serumproben getestet. Dazu wurde zwei männlichen sowie zwei weiblichen NMRI-Mäusen über einen Zeitraum von 15 Tagen je fünfmal retrobulbär Blut entnommen (siehe Abb. 2-4). Aus den geronnenen Blutproben wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 8.000 g die Blutseren gewonnen, von denen je 50 µl mit 5 µl 100 U/ml EPO in PBS versetzt wurden. Die Hälfte dieser Lösungen wurde bei 4°C aufbewahrt, die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Als Kontrollen wurden je 50 µl einer BSA-haltigen PBS-Lösung mit EPO versetzt und unter gleichen Bedingungen aufbewahrt. Alle Proben wurden am Tag der letzten Blutentnahme im EPO-ELISA (siehe Kapitel 2.3.3.1.2) vermessen.

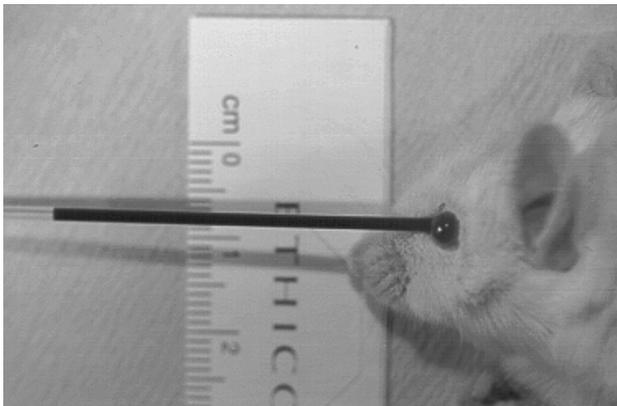


Abb. 2-4: Retrobulbäre Blutentnahme bei Mäusen. Während die Mäuse unter Etheranarkose standen, wurde ihnen mit 50 µl Einmal-Kapillarpipetten Blut aus dem *Plexus optthalmicus* entnommen.

2.3.6.2 *In vivo* Freisetzung von EPO aus Fibrin- und Behriplast®-Clots

2.3.6.2.1 *In vivo* Freisetzungsexperimente mit Fibrinclots

500 µl Fibrinclots wurden in Strohhalmen (ca. 1,8 x 0,6 cm) auspolymerisiert, die zuvor mit Sigmacote® überzogen und an einem Ende mit Parafilm M® verschlossen worden waren. Sie enthielten entweder 1000 U nOG-liposomenverkapseltes EPO oder entsprechende Mengen „freies“ Protein und „leere“ Vesikel. Nach Inkubation über Nacht wurden die Clots den

Strohhalmen entnommen und narkotisierten NMRI-Mäusen subcutan bzw. intraperitoneal implantiert (siehe Abb. 2-5). Als Narkotikum wurde eine 3:1 Mischung aus Ketamin 10% und Rompun 2% verwendet, von der einer 35 g schweren Maus 50 µl intraperitoneal gespritzt wurden. Kontrollmäusen wurde „freies“ EPO in FCS oder nOG-liposomenverkapseltes EPO in Citratpuffer verabreicht. Je 100 µl dieser Formulierungen (10.000 U/ml) wurden entweder intravenös, subcutan oder intraperitoneal gespritzt.

Anschließend wurde den Mäusen in regelmäßigen Abständen Blut entnommen (siehe auch Abb. 2-4). Der EPO-Gehalt der daraus gewonnenen Blutseren (siehe Kapitel 2.3.6.1) wurde mit Hilfe des bereits erwähnten EPO-ELISAs bestimmt (siehe Kapitel 2.3.3.3.1.2). Um Interaktionen des Blutserums mit dem ELISA zu verhindern, wurden alle Proben vor ihrer Vermessung mindestens fünffach mit Probenpuffer verdünnt.

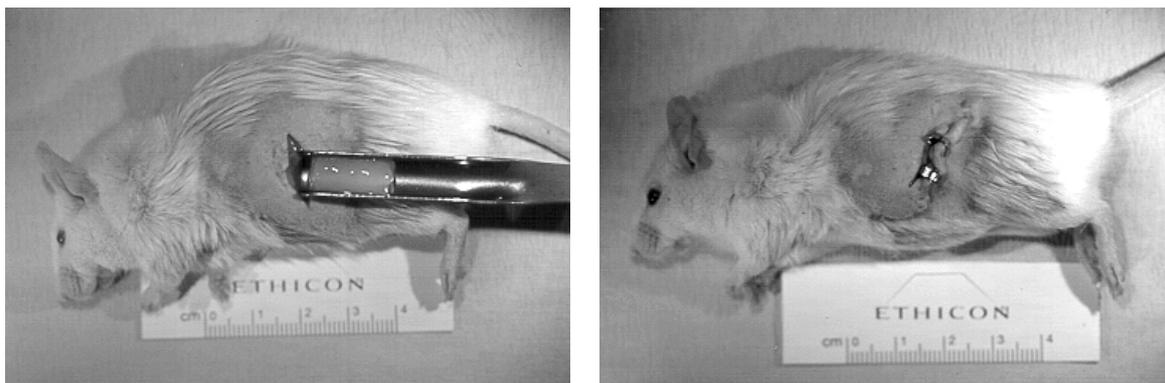


Abb. 2-5: Implantation von Fibrinclots in Mäuse. Die subcutanen Fibrinclots wurden mit Hilfe eines Spatels in die zuvor geformten Hauttaschen eingeführt. Diese wurden anschließend mit Wundklammern verschlossen. Für die intraperitonealen Implantate (nicht gezeigt) wurden die Schnitte parallel zur Wirbelsäule gesetzt und ebenfalls mit Wundklammern verschlossen.

2.3.6.2.2 *In vivo* Freisetzungsexperimente mit Behriplast[®]-Clots

nOG-liposomenverkapseltes EPO bzw. „freies“ EPO und „leere“ nOG-Liposomen wurden für die Herstellung von 500 µl Behriplast[®]-Clots verwendet (siehe Kapitel 2.3.4.3), die in Strohhalmen auspolymerisiert wurden. Sie enthielten je 1000 U EPO und wurden am darauffolgenden Tag subcutan in NMRI-Mäuse implantiert. Die Freisetzungskinetiken wurden über die EPO-Spiegel des Serums verfolgt (vergleiche Kapitel 2.3.6.2.1).

2.3.6.2.3 Auswertung der *in vivo* Freisetzungsexperimente

Die Auswertung der in den Kapiteln 2.3.6.2.1 und 2.3.6.2.2 gewonnenen pharmakokinetischen Primärdaten erfolgte mit einer kompartimentunabhängigen Analyse unter Verwendung der PC-Software TopFit 2.0 [HEINZEL et al., 1993]. Die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (*AUCs*) wurden durch numerische Integration mit Hilfe der Trapezregel ermittelt. Die dazu verwendeten EPO-Serumkonzentrationen wurden nicht um die zu vernachlässigenden inhärenten EPO-Level des Mausserums korrigiert.

Die Normalverteilung der berechneten pharmakokinetischen Größen wurde mit Hilfe des Software-Programmes SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael) unter Verwendung des KOLMOGOROV-SMIRNOV-Tests überprüft. Um feststellen zu können, ob es zwischen den verschiedenen Applikationsformen des EPOs signifikante Unterschiede gibt, wurden die normalverteilten Daten einer Varianzanalyse (*analysis of variance (ANOVA)*) unterzogen (siehe Anhang).

2.3.6.3 Explantation von Fibrin- bzw. Behriplast[®]-Clots

2.3.6.3.1 EPO-Restgehalt von explantierten Fibrin- bzw. Behriplast[®]-Clots

Um den EPO-Restgehalt der Fibrin- bzw. Behriplast[®]-Clots am Ende der meßbaren Freisetzungskinetiken (siehe Kapitel 2.3.6.2.1 bzw. 2.3.6.2.2) abschätzen zu können, wurden einige Clots nach der letzten Blutentnahme wieder explantiert. Der Verdau der Restclots erfolgte wie in Kapitel 2.3.5.2 beschrieben. Im Fall der aprotininhaltigen Behriplast[®]-Clots waren jedoch bis zu 5 U/ml Plasmin nötig, um sie vollständig abbauen zu können. Am Ende des Verdau wurden die Lösungen leicht anzentrifugiert, um Verunreinigungen entfernen zu können. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.3.3.3.1.2 beschrieben der EPO-Gehalt des Überstandes bestimmt.

2.3.6.3.2 Lichtmikroskopie von explantierten Fibrinclots

Intraperitoneal bzw. subcutan implantierte Fibrinclots (vergleiche Kapitel 2.3.6.2.1), die ausschließlich leere nOG-Liposomen enthielten, wurden nach 5 bis 12 Tagen wieder explantiert, um sie lichtmikroskopisch zu untersuchen. Die Anfertigung der mikroskopischen Präparate erfolgte durch Herrn Dr. T. SPRUSS von der Universität Regensburg. Dazu wurden die Clots direkt nach ihrer Entnahme für mindestens 24 h in BOUIN'scher Lösung [BOUIN, 1897; ROMEIS, 1989a] fixiert. Die anschließende Einbettung in Paraffin und das Ausblocken erfolgten mit Hilfe einer Histokinette nach einem Standardprotokoll. Von den eingebetteten Clots wurden mit einem Mikrotom 6 µm dicke Schnitte angefertigt, die nach ihrer Entparaffinierung mit der MASSON-GOLDNER-Färbung [GOLDNER, 1938] nach ROMEIS [1989b] angefärbt wurden.

2.3.6.4 Stimulation der Erythropoese durch EPO-haltige Behriplast[®]-Clots

Für die Abschätzung der erythropoetischen Aktivität von EPO stellt die ansteigende Retikulozytenzahl des Blutes eine leicht zugängliche Meßgröße dar. Ihre Bestimmung bei männlichen B6D2F₁-Mäusen, denen zuvor unterschiedliche EPO-Formulierungen subcutan appliziert wurden, wurde von Herrn Dr. W. PAHLKE bei der Firma Roche in Mannheim durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.3.6.4.1).

Bei den Formulierungen handelte es sich um 200 µl Citratpufferlösungen mit je 100 U „freiem“ bzw. nOG-liposomenverkapseltem EPO und um 500 µl Behriplast[®]-Clots mit 375 U „freiem“ EPO und „leeren“ nOG-Liposomen bzw. 100 U nOG-liposomenverkapseltem EPO (zur Herstellung und Applikation siehe auch Kapitel 2.3.4.3 und 2.3.6.2.1). Da die Menge des verabreichten EPOs in diesem Experiment 10fach niedriger als gewöhnlich lag, wurde zur Herstellung der Liposomen ausnahmsweise eine etwa 10fach geringer konzentrierte EPO-Lösung (ca. 30.000 U/ml) verwendet (vergleiche auch Kapitel 2.3.2). Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, daß die mit den liposomenhaltigen Formulierungen verabreichte Lipidmenge im üblichen Rahmen lag. Um den direkten Vergleich der Formulierungen gewährleisten zu können, wurden auch den Tieren, denen die Citratpufferlösungen injiziert wurden, zusätzlich Implantationsschnitte gesetzt. Dies war nötig, weil die Erythropoese durch Streß, wie ihn eine Implantation von Clots darstellt, stark beeinflußt wird [MÖLLMANN, 1992].

2.3.6.4.1 Bestimmung der Retikulozytenzahlen

Die Retikulozytenzählung, wie sie im vorliegenden Fall durchgeführt wurde, ist bereits von DICKMANN [1991] ausführlich beschrieben worden. Danach wurden 5 μl des aus der Schwanzvene von Mäusen entnommenen Blutes mit 1 ml 0,15 μM Acridinorangelösung in Elomel-Vollelektrolytlösung versetzt. Nach 10- bis 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden mindestens 30.000 Zellen der gefärbten Blutproben in einem Durchflußcytometer (FACScan, Becton-Dickinson, Heidelberg) analysiert, das mit einem Argonlaser (488 nm) ausgestattet war.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines *delivery* Systems, das therapeutische Proteine über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen kontinuierlich freisetzt. Hierfür wurden zwei häufig verwendete *delivery* Systeme miteinander kombiniert und proteingefüllte Liposomen in das Biopolymer Fibrin eingeschlossen. *In vivo* verabreichte Liposomen bieten Proteinen die Möglichkeit, in der von ihnen bevorzugten wässrigen Umgebung zu verbleiben und gleichzeitig vor destabilisierenden Einflüssen der Umgebung wie z.B. Proteasen geschützt zu sein. Sind solche Liposomen stabil und groß genug, um durch das Netzwerk von Fibrin festgehalten zu werden, so entsteht ein *delivery* System, bei dem die Freisetzung des optimal stabilisierten Proteins ausschließlich über die Resorption des Polymers gesteuert wird.

3.1 Charakterisierung der Liposomen

3.1.1 Größenverteilung und Lamellarität der Liposomen

Die mit nicht flotierten Liposomenpräparationen durchgeführten PCS-Messungen zeigten, daß der mittlere intensitätsgewichtete Vesikeldurchmesser (\bar{z}_{ave}) nur von dem für die Präparationen verwendeten Detergens abhing. Der Dialysepuffer oder das einzuschließende Protein schienen keinen signifikanten Einfluß auf den \bar{z}_{ave} -Wert zu haben. Wie aus Abb. 3-1 hervorgeht, besaßen die DOC-Liposomen eine mittlere Größe von etwa 200 nm, während nOG-Liposomen mit knapp 300 nm etwas größer waren. Die durchweg niedrigen Polydispersionsindices, die theoretisch einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen können, deuten darauf hin, daß alle Präparationen sehr homogen waren.

Über die Lamellarität von Liposomenpräparationen kann die Elektronenmikroskopie anhand von Gefrierbruchpräparationen Aufschluß geben. Wird ein Liposom bei dieser Methode gebrochen (*cross-fracturing*), erhält man einen Liposomenquerschnitt, bei dem auch eventuelle innere Lipiddoppelschichten der Vesikel sichtbar werden.

Die DOC-Liposomen (Abb. 3-2 A) waren wie erwartet unilamellar (vergleiche Kapitel 1.3), besaßen jedoch eine eigenartige, liposomen-untypische Form. Ähnliche Strukturen fanden LASCH et al. [1992], als sie die detergensinduzierte Umwandlung von kleinen unilamellaren Ei-Phosphatidylcholin-Vesikeln zu Mischmicellen untersuchten. Demnach bewirken „sub-solubilisierende“ nOG-Konzentrationen nicht nur das Anschwellen von Liposomen,

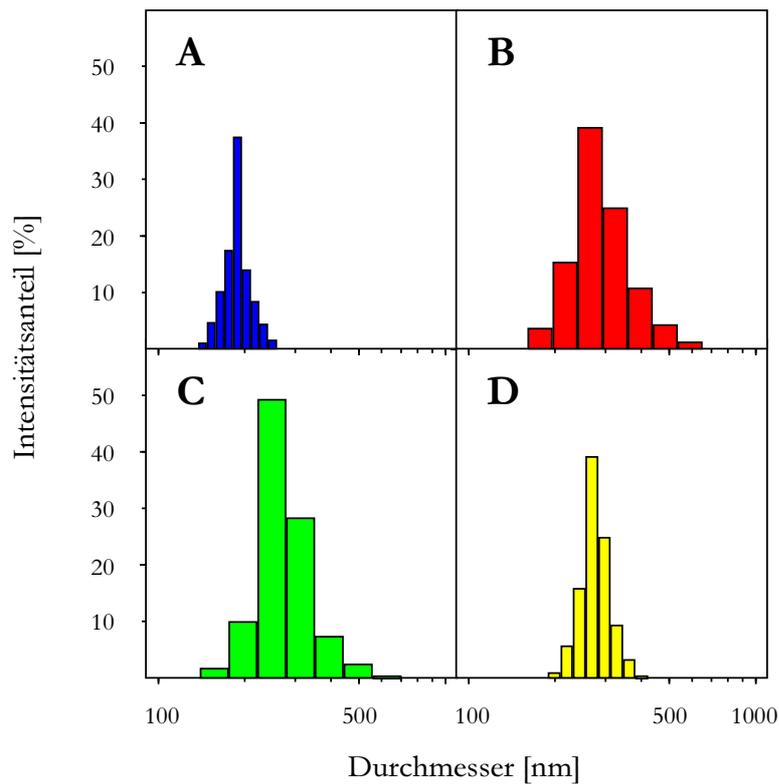


Abb. 3-1: Größenverteilungen verschiedener Liposomenpräparationen. A: POD gefüllte DOC-Liposomen (■), B: POD-gefüllte nOG-Liposomen (■), C: leere nOG-Liposomen (■), D: EPO-gefüllte nOG-Liposomen (■). Die ζ_{ave} -Werte und Polydispersitäten der Präparationen betragen 195,9 nm und 0,175 (■), 293,6 nm und 0,107 (■), 279,3 nm und 0,170 (■) sowie 282,7 nm und 0,068 (■). Für die Herstellung der EPO-gefüllten Liposomen wurde Trispuffer verwendet. Die übrigen Liposomenpräparationen wurden in PBS hergestellt. Für alle Messungen wurden der „multimodale“ Auswertemodus verwendet.

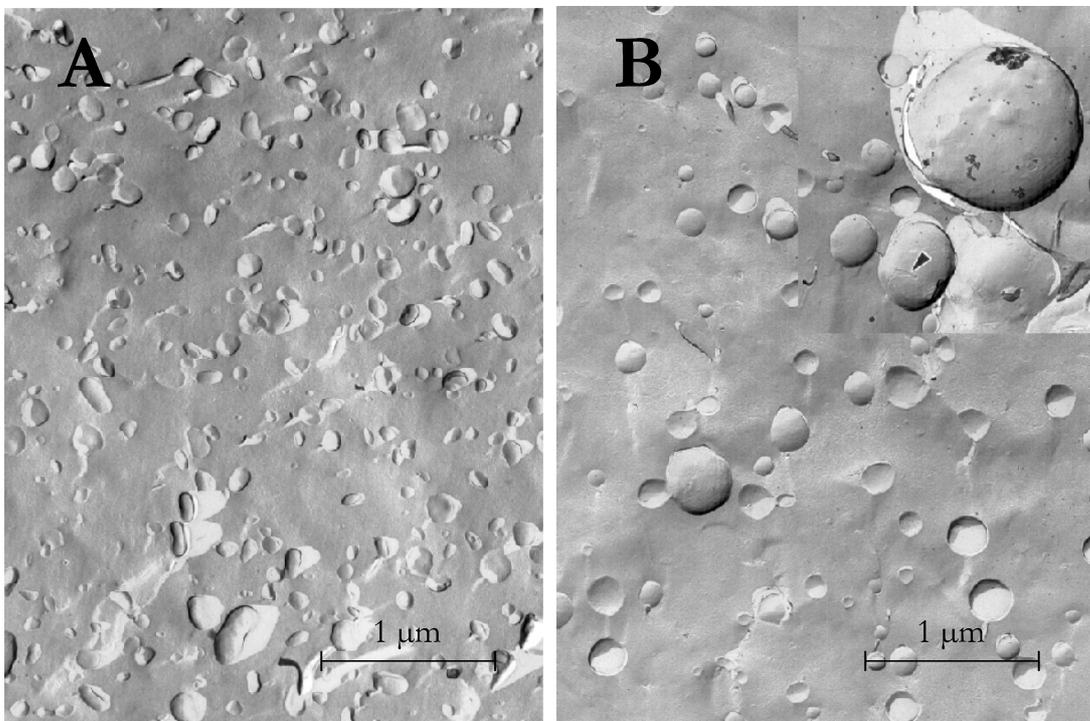


Abb. 3-2: Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von POD-gefüllten Liposomen. A: DOC-Liposomen, B: nOG-Liposomen. Es handelte sich um dieselben Präparationen, die auch für die PCS-Messungen (Abb. 3-1) verwendet wurden. Der Pfeil im oberen Bild der Abbildung B deutet auf den Bruch eines multilamellaren Liposoms.

sondern führen auch zur Ausbildung von starken lokalen Krümmungen in den liposomalen Bilayern. Sie verleihen den entsprechenden Vesikeln ein „buckeliges“ Aussehen (*humpbacked*) und werden als Folge der Einlagerung von kegelförmigen „Gastmolekülen“ in die Lipiddoppelschichten verstanden (vergleiche Abb. 3-3). Es lag daher die Vermutung nahe, daß die DOC-Liposomen einen beträchtlichen Restdetergensgehalt aufweisen könnten (vergleiche Kapitel 3.1.4).

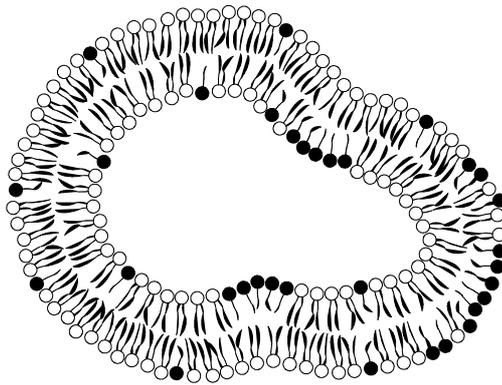


Abb. 3-3: *Humpbacked* Liposomen. In die Bereiche der Lipidmonoschichten, die eine stark konvexe Krümmung aufweisen, sind vermehrt kegelförmige Detergensmoleküle eingelagert (Lipidmolekül (☉), Detergensmolekül (●), modifiziert nach LASCH [1995]).

Wie bei den PCS-Messungen waren die nOG-Liposomen (Abb. 3-2 B) auch im elektronenmikroskopischen Bild deutlich größer als die DOC-Liposomen. Der weitaus größte Teil der Präparation schien unilamellar zu sein. Allerdings konnten vereinzelt auch große (> 500 nm) multilamellare Liposomen beobachtet werden. Ähnliches schildern MIMMS et al. [1981], die die Eigenschaften von nOG-Liposomen im Zusammenhang mit dem für die Mischmicellenlösung verwendeten Lipid-Detergens-Verhältnis untersuchten. Sie stellten fest, daß bei dem im vorliegenden Fall verwendeten molaren Verhältnis von 0,2 neben unilamellaren auch multilamellare Vesikel und Lipidaggregate gebildet werden, falls keine optimalen Dialysebedingungen vorliegen. Aus den vorherigen PCS-Messungen geht jedoch hervor, daß ihr Anteil an der Gesamtpräparation sehr gering sein mußte. Denn obwohl der Vesikeldurchmesser mit der sechsten Potenz in die Streulichtintensität eingeht [MALVERN, 1996] und somit große Teilchen einen sehr viel höheren Beitrag zur Streulichtintensität leisten als kleine, lieferte der „multimodale“ Fit eine Größenverteilung ohne signifikantes Tailing am oberen Größenrand.

3.1.2 Einschlußkapazität der Liposomen

Ein wichtiges Charakteristikum von Liposomenpräparationen im Hinblick auf ihre Verwendung als Arzneistoffträger ist ihre Einschlußkapazität (ee). Ist die einzuschließende Substanz hydrophob, lagert sie sich in die Lipiddoppelschichten der Liposomen ein. Hydrophile Substanzen werden im wäßrigen Innenraum der Liposomen eingeschlossen [SCHREIER, 1982]. Im Idealfall entspricht die Einschlußkapazität für hydrophile Substanzen dem von den Liposomen eingeschlossenen Anteil am Gesamtvolumen der Präparation. Handelt es sich um homogen verteilte unilamellare Vesikel, kann dieser Volumenanteil mit Hilfe der folgenden Gleichung aus der durchschnittlichen Größe der Liposomen berechnet werden:

$$ee_{theo} [\%] = \frac{N \cdot a \cdot (r - \delta)^3}{3 \cdot (r^2 + (r - \delta)^2)} \cdot 100 \quad (2)$$

$N = N_A \cdot \nu_0 \cdot M_{r,SPC} = 1,94 \cdot 10^{19}$ ($1,55 \cdot 10^{19}$) ist die Zahl der Phospholipidmoleküle pro ml DOC- bzw. nOG-Liposomenpräparation und $a = 0,7 \text{ nm}^2$ das Oberflächenareal, das eine Lipid-Kopfgruppe im Bilayer einnimmt. $\delta = 4 \text{ nm}$ entspricht der Dicke der Lipiddoppelschicht und $r = 100$ bzw. 145 nm dem mittleren Radius der Liposomen, der sich aus den entsprechenden z_{ave} -Werten ergibt [LASIC, 1993].

Beobachtungen von ADRIAN und HUANG [1979] ließen vermuten, daß die etwa 40 bzw. 30 kDa großen Modellproteine POD und EPO sowohl von DOC- als auch von nOG-Liposomen mit theoretischen Einschlußraten verkapselt werden. Die Autoren untersuchten die Einschlußkapazität von Liposomen in Abhängigkeit von Vesikel- und Proteingröße, und stellten fest, daß für SUVs die Einschlußrate ab einer Proteingröße von etwa 25 kDa zwar sukzessive abnimmt. Für große unilamellare Vesikel (LUVs), zu denen auch die hier verwendeten Liposomen zählen, wurden jedoch bis zu einem Molekulargewicht von 97 kDa größenunabhängige Proteineinschlußraten beobachtet.

In Tabelle 3-1 sind die theoretischen (ee_{theo}) und die tatsächlich gemessenen Einschlußkapazitäten (ee) sämtlicher gefüllter Liposomenpräparationen aufgeführt. Der Vergleich zeigt, daß die tatsächlichen Einschlußkapazitäten entgegen den Erwartungen nur für die nOG-Liposomen mit dem theoretischen Wert übereinstimmten. Im Gegensatz dazu war ee im Fall der POD-gefüllten DOC-Liposomen nur etwa halb so groß wie ee_{theo} .

Tabelle 3-1: Einschlußkapazitäten verschiedener Liposomenpräparationen. Die experimentell ermittelten Einschlußkapazitäten sind Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelmessungen.

Liposomenpräparation	ee [%]	ee_{theo} [%]
POD gefüllte DOC-Liposomen	9,6	20,9
POD gefüllte nOG-Liposomen	26,5	24,8
EPO gefüllte nOG-Liposomen	23,3	24,8

Zu diesem Zeitpunkt konnte nur vermutet werden, daß die niedrige Einschlußrate der DOC-Liposomen mit dem ebenfalls vermuteten hohen Detergensgehalt dieser Präparationen (siehe auch Kapitel 3.1.4) im Zusammenhang stand. Es ist bekannt, daß Detergenzien die Permeabilität von Lipidbilayern erhöhen und somit die Freisetzung liposomenverkapselter Substanzen (*liposome leakage*) induzieren, lange bevor ihre Konzentration hoch genug ist, um die Liposomen vollständig zu solubilisieren [SCHUBERT et al., 1986; PATERNOSTRE et al., 1988, RUIZ et al., 1988; MEMOLI et al., 1999]. Ein Verlust von eingeschlossener POD durch detergensinduzierte Fusion der DOC-Liposomen [ALONSO et al., 1982; EDWARDS und ALMGREN, 1990] konnte allerdings ausgeschlossen werden, da deren Größe über mehrere Wochen konstant blieb (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.1.3 Nachweis des liposomalen Proteineinschlusses

Durch die Flotation der proteingefüllten Liposomen nach ihrer Herstellung konnte nachgewiesen werden, daß ein Teil des zu den Mischmicellenlösungen zugesetzten Proteins am Ende der Dialyse liposomenassoziiert war. Darüber hinaus stimmte dieser Anteil im Fall der nOG-Liposomen sehr gut mit der theoretischen Einschlußkapazität dieser Vesikel überein (siehe Kapitel 3.1.2). Dennoch war dies kein eindeutiger Beweis für den tatsächlichen Einschluß der Proteine in den Liposomen. Theoretisch wäre es auch denkbar gewesen, daß die Proteine lediglich auf der Oberfläche der Liposomen adsorbiert sind.

Für den eindeutigen Nachweis der liposomalen Verkapselung der Proteine wurde die Tatsache ausgenutzt, daß intakte Membranen für Makromoleküle so gut wie undurchlässig sind. Setzt man proteinhaltigen Liposomenlösungen Proteasen bzw. Glycosidasen zu, sollten diese das Protein nur dann verdauen, wenn es sich nicht in den Liposomen, sondern entweder „frei“ in Lösung oder auf der Oberfläche der Liposomen befindet. Wie aus Abb. 3-4 hervorgeht, wurde das liposomenassoziierte EPO bis auf einen kaum zu detektierenden Anteil

nicht verdaut. Nur wenn die Liposomen mit n-Octylglycosid aufgelöst wurden, konnte das zuvor verkapselte EPO deglykosyliert werden. Die schwachen Abbaubanden im Fall der intakten Liposomen sind wahrscheinlich auf Spuren von „freiem“ EPO zurückzuführen, die bei der vorausgegangenen Flotation der Vesikel nicht abgetrennt werden konnten.

Der Nachweis des Proteineinschlusses konnte nicht auf die POD-gefüllten Liposomen ausgeweitet werden. Die ebenfalls hoch glycosylierte POD ließ sich weder durch gängige Proteasen wie Proteinase K oder Trypsin noch durch Glycosidasen wie N-Glycosidase F verdauen.

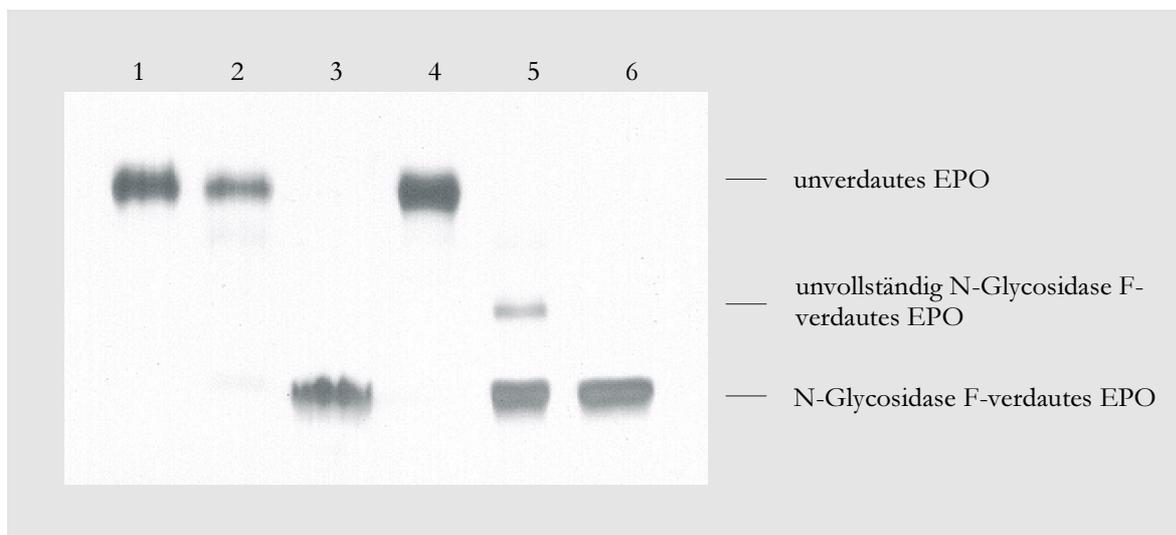


Abb. 3-4: SDS-PAGE des N-Glycosidase F-Verdaus von EPO-gefüllten nOG-Liposomen. Alle Proben enthielten 0,5 µg EPO und gegebenenfalls 0,2 U N-Glycosidase F bzw. 3,8% n-Octylglycosid. Vor ihrer Auftragung auf das 15%ige Acrylamidgel wurden sie für 36 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit einer Silberfärbung. Spur 1: florierte Liposomen, Spur 2: florierte Liposomen und N-Glycosidase F, Spur 3: mit n-Octylglycosid aufgelöste, florierte Liposomen und n-Glycosidase F, Spur 4: „freies“ EPO, Spur 5: „freies“ EPO und N-Glycosidase F, Spur 6: „freies“ EPO und n-Glycosidase F in Gegenwart von n-Octylglycosid.

3.1.4 Detergensgehalt der Liposomen

Wie bereits in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 erwähnt, bestand insbesondere bei den DOC-Liposomenpräparationen der Verdacht, daß sie einen erheblichen Detergensgehalt aufweisen. Diesem Aspekt kommt insofern besondere Bedeutung zu, als daß schon Spuren von Detergenzien einen ausgeprägten Effekt auf die Permeabilität von liposomalen Membranen haben können [SCHUBERT et al., 1986; PATERNOSTRE et al., 1988]. Die sich möglicherweise daraus ergebende, rasche Freisetzung der liposomal verkapselten Substanzen begrenzt die

Eignung der entsprechenden Vesikel als *drug carrier*. Ihr Einsatz in dem hier zu entwickelnden *delivery* System käme überhaupt nicht in Frage, da dessen Proteinfreisetzung über den Abbau des Fibrins und nicht über die Permeabilität der Liposomen gesteuert werden soll.

In Tabelle 3-2 sind die relativen Detergenskonzentrationen verschiedener „leerer“ Liposomenpräparationen vor und nach Flotation aufgeführt. Ein Vergleich der unflotierten Präparationen zeigt, daß der Detergensgehalt der nOG-Liposomen sehr viel niedriger war als der der DOC-Liposomen. Letztere enthielten immerhin noch ein Viertel des Detergens der Mischmicellenlösung, aus der sie hergestellt worden waren. Diese Beobachtung bekräftigte die bereits geäußerte Vermutung, daß die ungewöhnliche Form der DOC-Liposomen eine Folge ihres hohen Detergensgehaltes ist (siehe auch Kapitel 3.1.1).

Tabelle 3-2: Detergensgehalt von Mischmicellenlösungen und „leeren“ Liposomenpräparationen vor bzw. nach Flotation

	Dialysepuffer/ Flotationspuffer	molares Detergens/Lipid- Verhältnis in der Mischmicellenlösung	molares Detergens/Lipid-Verhältnis in der Liposomenpräparation	
			vor Flotation	nach Flotation
DOC-Liposomen	PBS/Citrat	1,025	0,256	0,107
nOG-Liposomen	PBS/Citrat	5,168	0,020	< 0,003
nOG-Liposomen	Tris pH 7,5/8,5	5,168	0,031	< 0,004

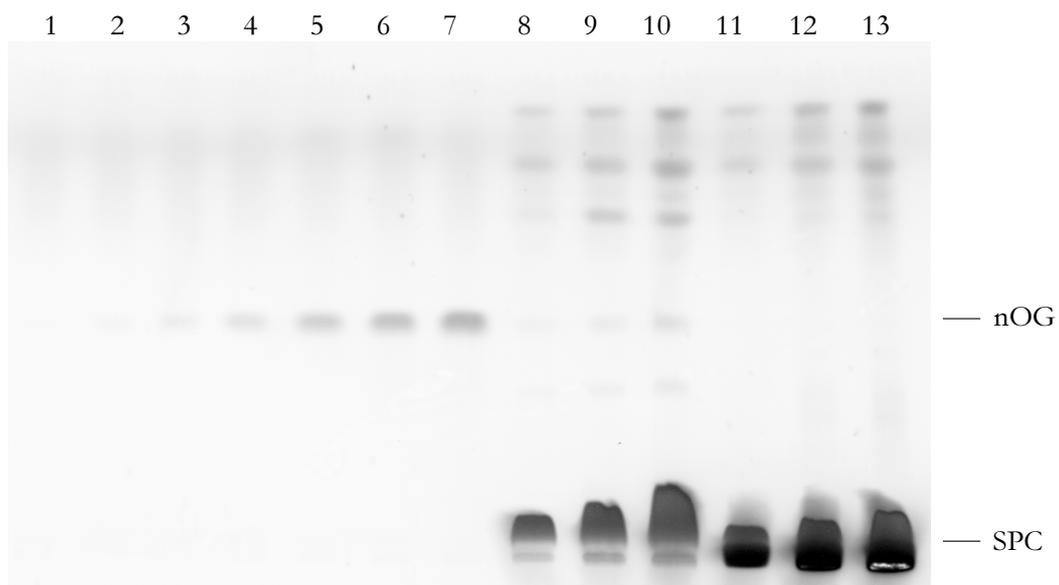


Abb. 3-5: Detergensgehalt von nOG-Liposomen vor und nach Flotation in Citratpuffer. Die Spuren 1-7 zeigen Standards mit 0 – 20 µg nOG. Auf den Spuren 8, 9 und 10 bzw. 11, 12 und 13 wurden 5, 10 und 20 µl einer nOG-Liposomenpräparation vor bzw. nach Flotation aufgetragen.

Weiterhin fällt auf, daß im Fall der nOG-Liposomen die Wahl des Dialysepuffers keinen signifikanten Einfluß auf die Effizienz der Dialyse hatte, und daß der Detergensgehalt aller Liposomenpräparationen durch einen der Dialyse nachgeschalteten Flotationsschritt gesenkt werden konnte. Im Fall der nOG-Liposomen lag die Detergensenkonzentration nach der Flotation unterhalb der Nachweisgrenze der zur Analyse verwendeten DC-Technik (Abb. 3-5).

Kennt man die Detergensenkonzentration einer Liposomenpräparation (d_0), und ist diese nicht nur kleiner als ihre Lipidkonzentration, sondern auch kleiner als die detergensspezifische CMC, so kann man die Detergensenkonzentration der Liposomenbranen (d_l) unter der Annahme berechnen, daß das Lipidvolumen der Präparationen im Vergleich zu ihrem Gesamtvolumen vernachlässigbar ist. In diesem Fall entspricht d_0 der Detergensenkonzentration der wäßrigen Phase d_w , und d_l ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$d_l = P \cdot d_w \quad (3)$$

Verwendet man für die Berechnung von d_l die von LASCH et al. [1983] für Ei-Phosphatidylcholin ermittelten detergensspezifischen Verteilungskoeffizienten (P), so ergeben sich für die Membranen der flotierten Liposomenpräparationen die in Tabelle 3-3 aufgeführten Detergensenkonzentrationen.

Tabelle 3-3: Detergensenkonzentrationen der Lipidmembranen flotierter „leerer“ Liposomenpräparationen

	CMC [mM]	P	d_l [mM]	Anzahl Detergensmoleküle auf 1000 Lipidmoleküle*
DOC	3,7	198	265	200
nOG	20,9	58	< 4	< 3

*Das durchschnittliche Volumen eines Ei-Phosphatidylcholin-Moleküls im Bilayer beträgt 1253 \AA^3 [HUANG und MASON, 1978]. Daraus ergibt sich ein molares Lipidvolumen von 0,755 l.

Es scheint allerdings kaum möglich zu sein, anhand der ermittelten d_l -Werte Rückschlüsse auf die Permeabilität der entsprechenden liposomalen Membranen zu ziehen. Viele Autoren, die sich mit dem Effekt von DOC und nOG auf die Membranstabilität bzw. -permeabilität beschäftigen [SCHUBERT et al., 1986; UENO 1989; LASCH et al., 1992; MEMOLI et al., 1999],

wählen einen experimentellen Ansatz, der nicht mit den Bedingungen im vorliegenden Fall zu vergleichen ist. Sie gehen in der Regel von detergentenfreien Liposomen aus, denen erst im Anschluß an ihre Herstellung Detergens zugesetzt wird.

SCHUBERT et al. [1986] konnten bei dieser Art von Experimenten eine Freisetzung von tritiummarkiertem Inulin (M_r 5.000) aus LUVs bei „subsolubilisierenden“ Cholat-konzentrationen beobachten. Interessanterweise sind die Freisetzungsraten nach einer Inkubationszeit von 24 h mit denen identisch, die kurz nach der Detergenzugabe gefunden wurden. Die Autoren erklären dies mit der Bildung von transienten, cholatinduzierten Poren in den liposomalen Membranen, die sich unmittelbar nach Detergenzugabe aufgrund der zunächst ungleichmäßigen Verteilung des Cholats in den Lipidbilayern bilden. Die Neuordnung der Membranen führt jedoch zu deren rascher Stabilisierung, die ein weiteres Austreten von Inulin verhindert. Im Hinblick auf die Membranpermeabilität scheint es dementsprechend einen signifikanten Unterschied zu machen, ob sich die detergentenhaltige Liposomenpräparation im thermodynamischen Gleichgewicht befindet oder nicht. Und während SCHUBERT et al. Membranpermeabilitäten während der Einstellung dieses Gleichgewichtes untersuchten, sind im vorliegenden Fall vornehmlich Permeabilitäten im Gleichgewichtszustand von Interesse.

UENO [1989] erklärt den von ihm untersuchten Zusammenhang zwischen der Permeabilität von Ei-Phosphatidylcholinmembranen und ihrem nOG-Gehalt sehr anschaulich. Geht man davon aus, daß die Kopfgruppen von Detergens und Lipid vergleichbare Größen besitzen, dann sind die in einer Lipidmembran befindlichen Detergenmoleküle ausschließlich von Lipidmolekülen umgeben, solange ihre Molfraktion unter 0,3 liegt (siehe Abb. 3-6). Bei einer Molfraktion über 0,3 können die Detergenmoleküle miteinander in Kontakt kommen, worin UENO die Ursache für den bei dieser Detergenkonzentration auftretenden sprunghaften Anstieg der Membranpermeabilität sieht.

Im Fall der flotierten DOC-Liposomen liegt die Molfraktion des Detergens mit 200 DOC-Molekülen pro 1000 Lipidmolekülen bei 0,2 und somit leicht unter dem von UENO definierten „Grenzwert“. Berücksichtigt man jedoch die ausgeprägte Dynamik von Lipidmembranen und die damit verbundene Möglichkeit des Auftretens lokal erhöhter Detergenkonzentrationen, so ist ein Einfluß des Detergens auf die Permeabilität der DOC-Liposomen durchaus denkbar.

Im Gegensatz dazu ist die Detergenkonzentration in den Lipidmembranen der nOG-Liposomen mit ca. einem Detergenmolekül pro 200 Lipidmolekülen sehr niedrig. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von MIMMS et al. [1981], die den Restdetergengehalt von dialysierten EPC-Liposomen mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten untersuchten. Hierbei

eluierten 1 ± 1 ^{14}C -markierte nOG-Moleküle mit 400 Lipidmolekülen. Gemäß der „Permeabilitätstheorie“ von UENO entsprach die Ionenpermeabilität dieser Liposomen der von beschallten, also völlig detergensfreien, Ei-Phosphatidylcholin-Vesikeln [HAUSER et al., 1973; TOYOSHIMA und THOMPSON, 1975].

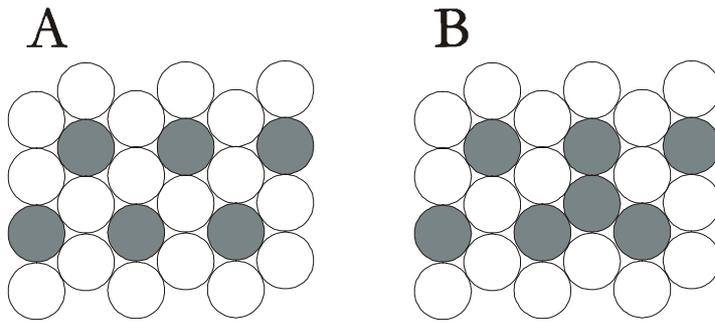


Abb. 3-6: Modell für die Anordnung von Phospholipid- und Detergensmolekülen in einer Lipiddoppelschicht (Aufsicht). A: Molfraktion des Detergens liegt unter 0,3; B: Molfraktion des Detergens liegt über 0,3. (●) Detergensmolekül; (○) Phospholipidmolekül. (entnommen aus UENO, 1989)

3.1.5 Liposomenstabilität

Eine durch Detergenzien erhöhte Permeabilität liposomaler Membranen bedeutet nicht zwangsläufig, daß die entsprechenden Liposomen das in ihnen eingeschlossene Material mit der Zeit verlieren. Dies ist sogar um so unwahrscheinlicher, je höher das Molekulargewicht der verkapselten Substanz ist. So konnten z.B. SCHUBERT et al. [1986] zeigen, daß die Cholatmenge, die nötig ist, um eine 50%ige Freisetzung verschiedener Zucker aus dialysierten Ei-Phosphatidylcholin-Liposomen zu bewirken, mit dem Molekulargewicht des Zuckers ansteigt. Während für besagte Freisetzung im Fall der Raffinose (M_r 594) eine Cholatmolfraktion in der liposomalen Membran von etwas mehr als 0,2 ausreichte, war im Fall des Dextrans (M_r 70.000) bereits eine Molfraktion von ca. 0,5 nötig.

Auf der anderen Seite gewährleistet eine niedrige Liposomenpermeabilität nicht, daß die in einen Fibrinclot einpolymerisierten Vesikel nicht unbeabsichtigt ihren Inhalt freisetzen, weil sie in einer solchen Umgebung möglicherweise nicht stabil sind. So können Wechselwirkungen zwischen Serumproteinen und Liposomen die Freisetzung des in den Vesikeln verkapselten Materials zur Folge haben [ALLEN and CLELAND, 1980; SCHERPHOF et al., 1978]. Außerdem beobachteten COHEN et al. [1991], daß Calcium, was im vorliegenden Fall für die Polymerisation des Fibrins benötigt wird, in einer Konzentration von 1 mM und höher einen

destabilisierenden Effekt auf Liposomen aus Ei-Phosphatidylcholin und Cholesterin (molares Verhältnis 1:1) hat.

Aus diesem Grund wurde die Permeabilität der DOC- bzw. nOG-Liposomen für die in ihnen verkapselte POD unter Bedingungen untersucht, die denen der nachfolgenden *in vitro* Freisetzungsexperimente aus liposomenhaltigen Fibrinclots (siehe Kapitel 3.2.2) hinsichtlich Pufferzusammensetzung („Pufferumgebung“) und Fibrin- bzw. Calciumgehalt („Clotumgebung“) sehr ähnlich waren. In Abb. 3-7 ist ein typisches Experiment gezeigt, das zur Untersuchung der POD-Freisetzung aus DOC- bzw. nOG-Liposomen diente. Dazu wurden den „puffer-“ bzw. „clotähnlichen“ Inkubationsansätzen zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, die unmittelbar danach einer Flotation unterzogen wurden. Während die unverkapselte POD in den unteren Fraktionen verblieb, befand sich die liposomenverkapselte POD am Ende der Flotation in den beiden oberen Fraktionen des Sucrosegradienten. Dies ermöglichte es, den Anteil der freigesetzten POD am Gesamtprotein aus den Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen zu berechnen.

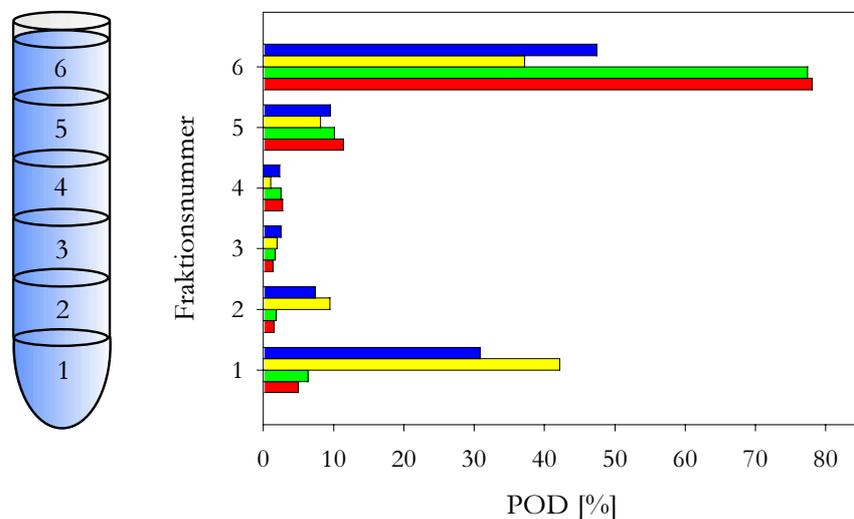


Abb. 3-7: POD-Freisetzung aus DOC- und nOG-Liposomen nach 234 h Inkubationszeit in „Puffer-“ bzw. „Clotumgebung“. Freigesetzte und liposomenverkapselte POD wurden mittels Gradientenflotation voneinander getrennt. Anschließend wurden die POD-Aktivität der 0,5 bis 0,7 ml großen Fraktionen bestimmt (DOC-Liposomen in „Clotumgebung“ (■), DOC-Liposomen in „Pufferumgebung“ (■), nOG-Liposomen in „Clotumgebung“ (■), nOG-Liposomen in „Pufferumgebung“ (■)).

Tabelle 3-4: POD-Freisetzung aus Liposomen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in „Puffer-“ und „Clotumgebung“

Inkubationszeit [h]	POD-Freisetzung [%] aus DOC-Liposomen in „Pufferumgebung“ bzw. „Clotumgebung“	POD-Freisetzung [%] aus nOG-Liposomen in „Pufferumgebung“ bzw. „Clotumgebung“
3	36,3	6,5
5	41,0	4,6
21	55,0	4,1
68	53,3	3,3
115	44,5	5,9
234	53,7	7,3
Mittelwerte	47,3	5,3

Wie Tabelle 3-4 entnommen werden kann, konnte für keinen der Inkubationsansätze eine Zunahme der freien POD über den untersuchten Zeitraum festgestellt werden. Vielmehr streuten die Werte für die POD-Freisetzungen um einen Mittelwert, der offensichtlich nicht von der Zusammensetzung der Inkubationslösung wohl aber von der Art der Liposomen abhing. Im Fall der DOC-Liposomen lag dieser Mittelwert mit etwa 45% ca. 7,5fach höher als im Fall der nOG-Liposomen, bei denen etwa 6% der POD in den Inkubationsansätzen unverkapselt vorlagen.

Der konstante Anteil an freier POD in den Inkubationsansätzen der nOG-Liposomen läßt sich vermutlich eher mit einer unzureichenden Abtrennung der nicht verkapselten POD von den dialysierten Liposomenpräparation erklären als mit einer Instabilität der Liposomen (siehe auch Kapitel 3.1.3). Es ist denkbar, daß ein geringer Teil der im Verlauf der Liposomenbildung nicht eingeschlossenen POD an der äußeren Oberfläche der Vesikel adsorbiert und somit bei der anschließenden Flotation nicht abgetrennt werden kann. Sobald die Liposomen aber zu den proteinhaltigen Inkubationslösungen gegeben werden, löst sich die an ihren Oberflächen befindliche POD unter Austausch gegen andere Proteine ab und verbleibt in der nachfolgenden Flotation in den unteren Fraktionen des Sucrosegradienten.

Diese Argumentation scheint für die DOC-Liposomen allerdings nicht ausreichend zu sein. Es ist nicht nachvollziehbar, warum die Abtrennung nicht verkapselter POD bei den nOG-Liposomen verhältnismäßig gut und bei den DOC-Liposomen nur unzureichend funktionieren sollte, selbst wenn sich die dazu verwendeten Flotationsansätze geringfügig voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 2-1). Die Tatsache, daß ein konstanter Prozentsatz

der vormals verkapselten POD in den Inkubationsansätzen frei vorlag, erinnert an ein bereits beschriebenes Experiment von SCHUBERT et al. [1986] (siehe Kapitel 3.1.4), bei dem durch die Zugabe von „subsolubilisierenden“ Cholatmengen zu EPC-Liposomen eine transiente Freisetzung von liposomal verkapseltem Inulin induziert werden kann. Diese Freisetzung dauert nach Ansicht der Autoren so lange, bis die durch die Aufnahme der Detergensmoleküle nötige Neuordnung der liposomalen Membranen abgeschlossen ist, und ist somit ein thermodynamisch bedingter Prozeß.

Ähnliches wäre im Fall der DOC-Liposomen denkbar. Möglicherweise lag die Ursache für die POD-Freisetzung gar nicht in der Inkubation der Liposomen an sich, sondern vielmehr in den vor- und nachgeschalteten Flotationen. So konnten SCHUBERT et al. [1986] beobachten, daß der während einer Flotation auf cholathaltige Vesikel ausgeübte Streß zu deutlich höheren Freisetzungen von liposomenverkapseltem Material führt als eine mit denselben Vesikeln durchgeführte Gelfiltration. Außerdem konnte in Kapitel 3.1.4 gezeigt werden, daß den Liposomenpräparationen bei der Flotation Detergens entzogen wurde. Dies könnte ähnlich wie eine Detergenseinlagerung einen vorübergehenden perturbierenden Effekt auf die Lipidbilayer haben und der Grund für die Freisetzung von liposomenverkapseltem Material während der Flotation sein.

Daraus würde folgen, daß es mit Hilfe von Flotationen nicht möglich ist, die Langzeitstabilität von POD-gefüllten Liposomen zu untersuchen bzw. POD-gefüllte Liposomenpräparationen herzustellen, die keine freie POD enthalten. Unabhängig von der tatsächlichen Ursache für die POD-Freisetzung aus den DOC-Liposomen zeigte dieses Experiment jedoch, daß die DOC-Liposomen deutlich instabiler waren als die nOG-Liposomen.

Die vorausgegangenen Experimente zur Charakterisierung der DOC- bzw. nOG-Liposomen zeigten, daß es sich bei beiden Liposomenpräparationen um LUVs (large unilamellar vesicles) handelte. Dabei waren die DOC-Liposomen mit einer Größe von ca. 200 nm rund 100 nm kleiner als die nOG-Vesikel. Der nachweisbar hohe Detergensgehalt der DOC-Liposomen war wahrscheinlich nicht nur die Ursache für die liposomenuntypische Form dieser Vesikel (sog. humped vesicles), sondern auch für deren geringe POD-Einschlußkapazität, die anders als bei den nOG-Liposomen bei nur etwa der Hälfte des theoretischen Wertes lag. Der hohe Detergengkonzentration ließ weiterhin vermuten, daß die Permeabilität der DOC-Liposomen im Vergleich zu detergensfreien Vesikeln deutlich erhöht ist. Stabilitätsuntersuchungen, bei denen die Freisetzung von POD aus DOC-Liposomen in einer einem Fibrinclot ähnelnden Umgebung untersucht

werden sollte, bestätigten, trotz der unklaren molekularen Interpretation, die geringe Stabilität der DOC-Liposomen. Im Gegensatz dazu waren die nOG-Liposomen gegenüber den gewählten Inkubationsmedien in dem Sinne stabil, als daß sie über einen Zeitraum von 10 Tagen keine POD freisetzten.

3.2 Fibrin- und Behriplast[®]-Clots

3.2.1 Elektronenmikroskopie von liposomenhaltigen Fibrinclots

Mit den Stabilitätsexperimenten in Kapitel 3.1.5 wurde für die nOG-Liposomen gezeigt, daß sie in einer einem Fibrinclot ähnelnden Umgebung stabil waren. Im Gegensatz zu einer tatsächlichen Clotumgebung war diese jedoch ausschließlich flüssig. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, daß das sich bei der Fibrinpolymerisation ausbildende Netzwerk einen derartigen mechanischen Druck auf die im Clot befindlichen Liposomen ausübt, daß diese ihren Inhalt freisetzen oder sogar ganz zerstört werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Integrität POD-gefüllter nOG-Liposomen in einem auspolymerisierten Fibrinclot mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.

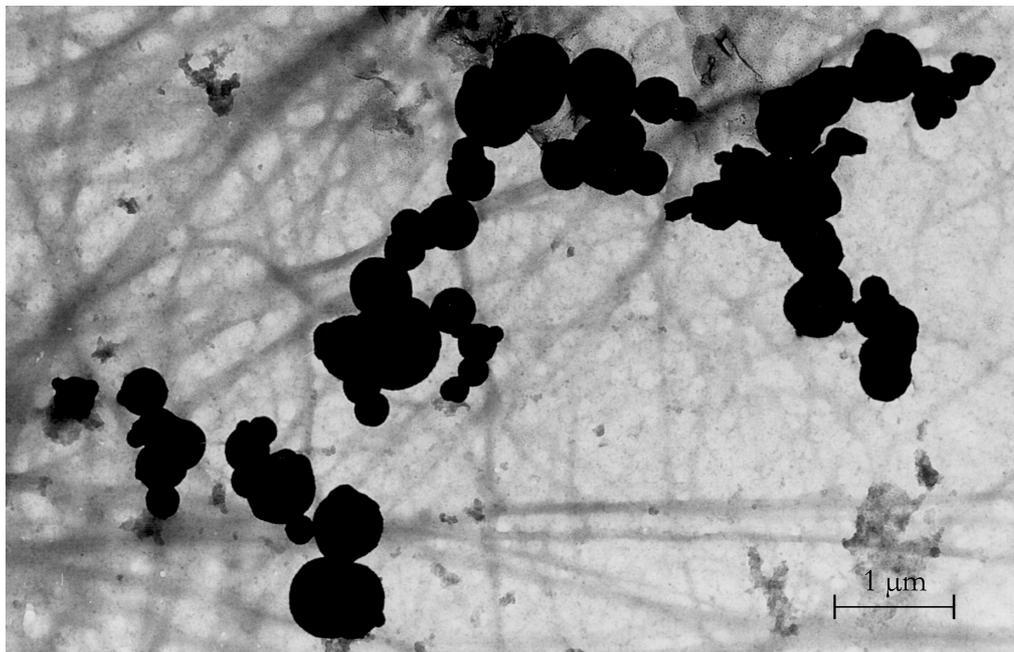


Abb. 3-8: Elektronenmikroskopisches Bild von POD-gefüllten nOG-Liposomen in einem Fibrinclot. Die Anfärbung der enzymatisch aktiven POD erfolgte mit DAB/Co²⁺. Die nominale Vergrößerung betrug 18100:1.

Dazu wurde der auf einem Grid befindliche liposomenhaltige Clot mit DAB/Co²⁺ gefärbt. DAB zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, liposomale Membranen zu überqueren und elektronendichte Niederschläge in peroxidasekatalysierten Reaktionen zu bilden, die durch die Anwesenheit von Metallionen wie Co²⁺ verstärkt werden [GRAHAM und KARNOVSKY, 1966; NOVIKOFF und GOLDFISCHER, 1969; WISSE et al., 1976]. Aufgrund dieser Färbung erscheinen die Liposomen in Abb. 3-8 als runde, scharf begrenzte schwarze Flecken in einem schwächer sichtbaren Fibrinnetzwerk. Änderte man beim Blick durch das Mikroskop die Fokussierungsebene, so ließen sich sogar die Membranen erkennen, die die Liposomen umgeben. Diese Beobachtungen sind ein deutlicher Hinweis auf die Integrität der nOG-Liposomen im Fibrin-clot. Vergleicht man darüber hinaus die Größe der Liposomen mit dem Durchmesser der Poren des Fibrinnetzwerkes, so wird deutlich, daß der stark verzweigte Clot in der Lage sein sollte, die Liposomen im Fibrin zu immobilisieren.

3.2.2 *In vitro* Freisetzung von POD aus Fibrinclots

Nachdem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden konnte, daß die in einen Fibrinclot eingeschlossenen nOG-Liposomen stabil sind, sollte mit den nachfolgenden *in vitro* Freisetzungsexperimenten die Frage geklärt werden, ob das Fibrinnetzwerk überdies in der Lage ist, die Liposomen im Clot festzuhalten. Neben der Liposomenstabilität ist diese Polymereigenschaft die zweite Grundvoraussetzung für ein *protein delivery* System, dessen Depotwirkung über den Abbau des Fibrins gesteuert werden soll.

Für die Freisetzungsexperimente wurden Fibrinclots, die POD-gefüllte DOC- bzw. nOG-Liposomen enthielten, mit Puffer überschichtet. Aus diesem wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, deren Enzymaktivität bestimmt wurde. Als Kontrollen wurden Fibrinclots verwendet, die neben „freier“, d. h. nicht liposomenverkapselter POD leere DOC- bzw. nOG-Liposomen enthielten. Beobachtungen von GÜNTHER et al. [1995] und eigene Experimente hatten gezeigt, daß Phospholipide die Elastizität und mechanische Belastbarkeit von Fibrin erheblich beeinflussen. Aus diesem Grund wären lipidfreie Kontrollclots eventuell nicht mit den liposomenhaltigen Testclots vergleichbar gewesen.

In Abb. 3-9 sind die auf diese Weise erhaltenen Freisetzungskinetiken dargestellt. Danach diffundierte „freie“ POD mit einer Halbwertszeit von etwa 50 h quantitativ aus den liposomenhaltigen Kontrollclots heraus. Die Freisetzungskinetiken der Testclots waren

bezüglich ihrer Halbwertszeit und dem Erreichen eines Plateaus nach etwa 200 h mit denen der Kontrollclots vergleichbar. Allerdings wurden im Fall der DOC-Liposomen bis zum Erreichen des Plateaus nur etwa 60% der vormals im Clot eingeschlossenen POD freigesetzt. Bei den nOG-Liposomen waren es sogar nur noch rund 1% der POD-Gesamtmenge des Systems. Erst wenn man beiden Testclots die fibrinspaltende Protease Plasmin zusetzte, erreichten die Freisetzungen auch hier 100%. Der Übersichtlichkeit halber ist in Abb. 3-9 jedoch nur die plasmininduzierte POD-Freisetzung des nOG-Liposomensystems dargestellt.

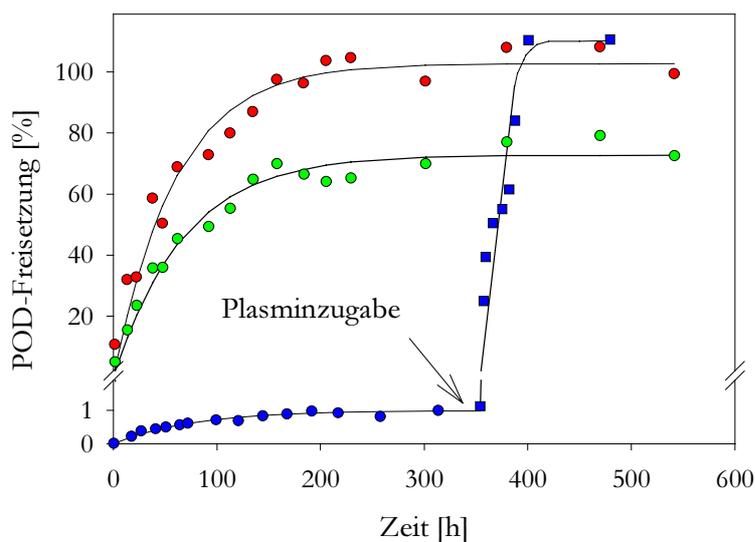


Abb. 3-9: *In vitro* Freisetzung von POD aus Fibrinclots. Die 200 μ l großen Clots wurden durch die Zugabe von 1 U/ml Thrombin zu einer Citratpufferlösung hergestellt, die neben 4,2 mg/ml Fibrinogen entweder POD-gefüllte Liposomen oder „leere“ Vesikel und „freie“ POD enthielt. Nachdem die Freisetzungskurve im Fall der POD-gefüllten nOG-Liposomen ein Plateau erreicht hatte, wurden dem Ansatz 0,5 U/ml Plasmin zugesetzt. Die dargestellten POD-Freisetzungen wurden bei 20°C gemessen und stellen volumenkorrigierte Mittelwerte aus mindestens vier Einzelmessungen dar. („freie“ POD und „leere“ DOC-Liposomen (●), POD-gefüllte DOC- (●) bzw. nOG-Liposomen (●,■)) Die mit ● nahezu identische Freisetzungskinetik von Clots mit „freier“ POD und „leeren“ nOG-Liposomen ist nicht gezeigt.

Die sich auffällig ähnelnden Freisetzungskinetiken legen die Vermutung nahe, daß auch im Fall der plasminfreien Testclots „freie“ und nicht etwa liposomenverkapselte POD freigesetzt wurde. Die Tatsache, daß über den gesamten Zeitraum der POD-Freisetzung keine signifikante Lipidfreisetzung beobachtet werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt), stützt diese These ebenso wie die Untersuchungen zur Liposomenstabilität (siehe Kapitel 3.1.5). Das Ergebnis dieser Experimente, daß nämlich in POD-gefüllten DOC-Liposomenpräparationen,

etwa 45% der POD unverkapselt vorlagen, während vergleichbare nOG-Präparationen nur sehr geringe Mengen an „freier“ POD enthielten, liefert die Erklärung, warum die beiden Testsysteme sehr unterschiedliche POD-Mengen mit der gleichen Kinetik freisetzen. Demnach handelt es sich bei der freigesetzten POD um solche, die schon in den zur Herstellung der Fibrinclots verwendeten Liposomenpräparationen „frei“ vorlag. Sie wurde daher mit derselben Kinetik freigesetzt wie die ausschließlich „freie“ POD der Kontrollclots. Die liposomenverkapselte POD hingegen wurde durch das engmaschige Fibrinnetz daran gehindert, aus dem Clot herauszudiffundieren, und lieferte daher solange keinen Beitrag zur POD-Freisetzung, bis den Testsystemen Plasmin zugesetzt wurde. Die liposomale Verkapselung dieser durch Plasmin freigesetzten POD wurde mit Hilfe von Flotationsexperimenten nachgewiesen, die denen in Kapitel 3.1.5 entsprachen.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit Beobachtungen von MAKINO et al. [1993], die bei 37°C und in Abwesenheit von Plasmin die *in vitro* Freisetzung von „freiem“ bzw. liposomenverpacktem Insulin aus (quervernetzten) Fibrinclots untersuchten (vergleiche Kapitel 3.2.3). Solange die insulingefüllten unilamellaren Liposomen aus Phosphatidylcholin einen Durchmesser von mehr als 200 nm haben, und somit groß genug sind, um durch die höchstens 200 nm großen Poren des quervernetzten Fibrinnetzes festgehalten zu werden, werden innerhalb von 7 Tagen nur 5,4 % des zuvor eingeschlossenen Insulins freigesetzt. SUVs aus demselben Lipid zeigen jedoch Freisetzungskinetiken, die denen von „freiem“ Insulin sehr ähnlich sind. In beiden Fällen sind schon nach einem Tag etwa 75% des ehemals eingeschlossenen Proteins aus den Fibrinclots freigesetzt. Dies läßt sich entweder damit begründen, daß die SUVs ähnlich wie „freies“ Insulin nicht groß genug sind, um durch das Fibrinnetz festgehalten zu werden. Oder die nur 20 bis 35 nm großen Vesikel sind im Gegensatz zu den größeren Liposomen in Fibrin nicht stabil. Sie setzten daher ihr Insulin bereits im Clot frei, was sich in der Folge wie „freies“ Protein verhält. Beide Erklärungsmöglichkeiten unterstützen die Interpretation der eigenen Daten. Während erstere die Notwendigkeit der Immobilisierung der Liposomen im Fibrin zum Erreichen eines *sustained release* unterstreicht, erinnert letztere an die Eigenschaften der DOC-Liposomen. Die Untersuchungen von MAKINO et al. [1993] zeigen außerdem, daß die Ladung der für die Liposomenherstellung verwendeten Lipide keinen Einfluß auf die Freisetzungskinetiken der entsprechenden Fibrinclots hat. Auch die Lamellarität der Liposomen scheint im Unterschied zur ihrer Größe hierbei keine Rolle zu spielen.

3.2.3 *In vitro* Freisetzung von POD aus Behriplast®-Clots

Neben dem „eigenen“ wurde auch aus kommerziellem Fibrinkleber hergestelltes Fibrin für die Verpackung von POD-gefüllten nOG-Liposomen benutzt. Die sog. Behriplast®-Clots wurden aus sehr viel höher konzentrierten Fibrinogen- und Thrombinlösungen hergestellt, als die bisher verwendeten Fibrinclots. Im Gegensatz zu diesen enthielten sie außerdem den Plasmininhibitor Aprotinin sowie aktivierten Faktor XIII. Letzterer bewirkt eine kovalente Quervernetzung [SIERRA, 1993] des ansonsten ausschließlich über ionische Wechselwirkungen zusammengehaltenen Fibrinnetzes (siehe Kapitel 1.3 sowie Abb. 3-10).

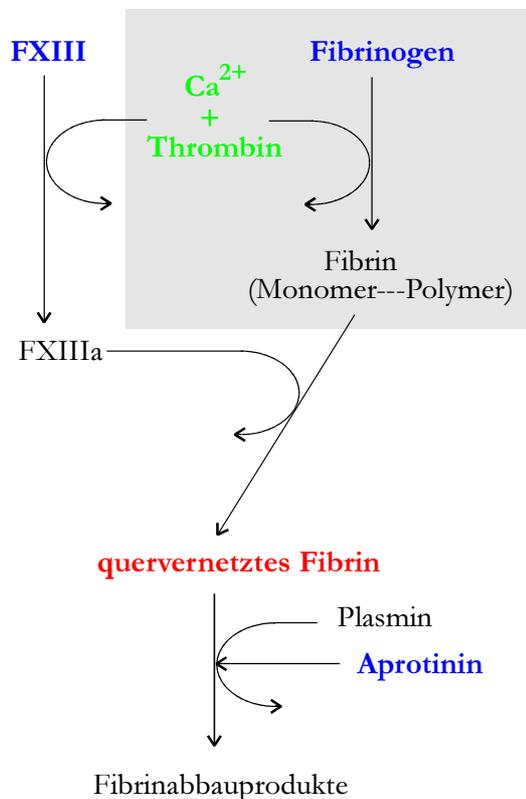


Abb. 3-10: Gerinnungsreaktion von Fibrinklebern. Fibrinkleber bestehen aus zwei Komponenten, deren Bestandteile sind in nebenstehender Abbildung in grün bzw. blau dargestellt. Das Reaktionsschema der bisher verwendeten Fibrinclots ist grau unterlegt. (modifiziert nach SIERRA, 1993).*

*Aufgrund der Herstellungsbedingungen für das bovine Fibrinogen ist davon auszugehen, daß auch die Fibrinclots Faktor XIII enthielten. Daher kann in ihrem Fall nicht von einer völligen Abwesenheit kovalenter Quervernetzungen ausgegangen werden. Die ionischen Wechselwirkungen zwischen den Fibrinmonomeren sollten allerdings dominiert haben.

Die nahezu identischen *in vitro* Freisetzungskinetiken von Fibrin- und Behriplast®-Clots (siehe Abb. 3-11) deuten darauf hin, daß die POD-gefüllten nOG-Liposomen auch in auspolymerisiertem Fibrinkleber stabil sind. Darüber hinaus scheint der Clottyp keinen signifikanten Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit der nicht liposomenverkapselten

POD zu haben. Dies bedeutet jedoch nicht, daß für beide Clottypen auch ähnliche *in vivo* Kinetiken zu erwarten sind. Aufgrund der bereits angesprochenen Unterschiede in der Zusammensetzung und der Art der Quervernetzung sollten Behriplast®-Clots eine sehr viel höhere *in vivo* Stabilität besitzen als die Fibrinclots. Dies würde sich im Fall von tatsächlich abbaukontrollierten POD-Freisetzungen natürlich auch in den entsprechenden Kinetiken widerspiegeln.

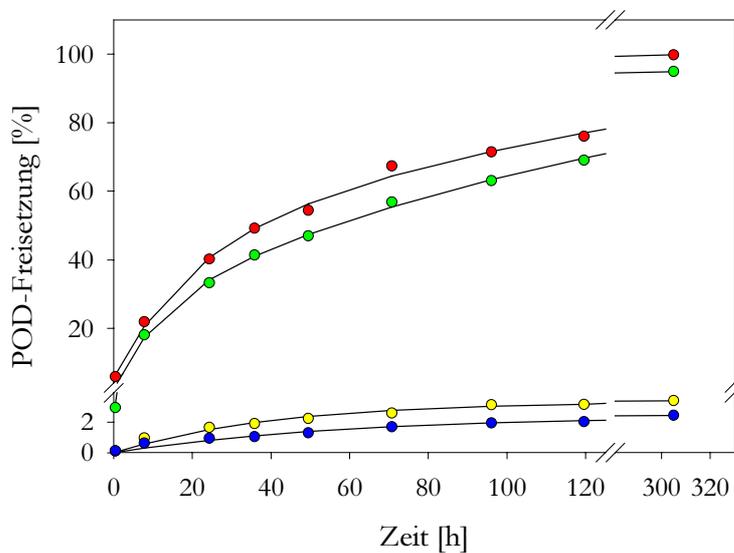


Abb. 3-11: Vergleich der *in vitro* Freisetzungen von POD aus Fibrin- und Behriplast®-Clots. Die Polymerisation der Fibrinclots erfolgte wie in Abb. 3-9 beschrieben. Im Fall der Behriplast®-Clots wurde das Fibrinogenkonzentrat mit der entsprechenden POD-haltigen Liposomensuspension rekonstituiert. Die Mischung der beiden Kleberkomponenten erfolgte mit Hilfe des Applikationsbestecks Pantaject®. Sämtliche Freisetzungskinetiken wurden bei 20°C aufgenommen und stellen Mittelwerte aus vier Einzelmessungen dar. („freie“ POD und leere nOG-Liposomen im Fibrin- (●) bzw. Behriplast®-Clot (●), POD-gefüllte nOG-Liposomen im Fibrin- (●) bzw. Behriplast®-Clot (●)).

Die bisherigen Untersuchungen an Fibrin- und Behriplast®-Clots zeigten, daß liposomenverkapselte POD ausschließlich durch den Abbau der Clots aus diesen freigesetzt wurde. Im Gegensatz dazu war „freie“ POD in der Lage, aus beiden Clottypen mit derselben Geschwindigkeit herauszudiffundieren. Für das im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnde abbaukontrollierte delivery System ist es daher wichtig, daß zur Herstellung der Clots Liposomenpräparationen verwendet werden, die möglichst wenig „freies“ Protein enthalten. Da dies auf die gefüllten DOC-Liposomen mit einem Mindestanteil an nicht liposomenverkapselter POD von etwa 45% nicht zutrifft, wurden diese in die nachfolgenden *in vivo* Experimente nicht mehr einbezogen.

3.2.4 *In vivo* Experimente mit Fibrin- und Behriplast®-Clots

Nachdem die fibrinverkapselten, POD-gefüllten nOG-Liposomen *in vitro* das gewünschte, abbaukontrollierte Freisetzungsverhalten zeigten, sollte das neue *protein delivery* System im Mausmodell getestet werden. Da POD jedoch sehr kurze Halbwertszeiten in Körperflüssigkeiten besitzt, wurde für sämtliche *in vivo* Experimente anstelle der POD rekombinantes humanes Erythropoietin (EPO) als Modellprotein verwendet. Dieses weist bei i.v. Verabreichung am Menschen eine mittlere Halbwertszeit von 8 Stunden auf [KAMPF et al., 1989].

Die physiologische Aufgabe des EPOs besteht in der Regulierung der Proliferation von erythroiden Vorläuferzellen und deren Differenzierung zu roten Blutkörperchen. In der Medizin wird humanes rekombinantes EPO deshalb hauptsächlich zur Behandlung der renalen Anämie eingesetzt [ADAMSON, 1991; MÖLLMANN, 1992; SPIVAK, 1998]. Da es jedoch auch bei Mäusen eine biologische Antwort hervorruft, wurde ein Teil der im folgenden durchgeführten *in vivo* Freisetzungskinetiken nicht über die EPO-Konzentrationen, sondern auch über die Retikuloerythrozytenzahlen des murinen Serums bzw. Blutes verfolgt.

MAKINO et al. haben 1993 bereits ganz ähnliche *in vivo* Experimente durchgeführt, indem sie Mäusen eine Fibrinogenlösung, die entweder „freies“ oder liposomenverkapseltes Insulin enthielt, zusammen mit Thrombin coinjizierten. Die *in vivo* Freisetzung des Insulins aus den sich unter der Haut der Mäuse bildenden Fibrinclots wurde jedoch nur indirekt verfolgt, indem die Clots nach unterschiedlichen Zeiten explantiert und auf ihren Insulingehalt hin untersucht wurden. Dieser Ansatz ist fragwürdig, da bei einem *delivery* System die Bioverfügbarkeit und die „tatsächliche“ Freisetzungskinetik des Wirkstoffes von weit größerem Interesse sind als der Wirkstoffrestgehalt des Systems im Verlauf des Experiments. Und so konnten MAKINO et al. zwar den Depoteffekt des Fibrins zeigen, aber die damit verbundenen Änderungen in der *in vivo* Kinetik des Insulins konnten mit dem gewählten experimentellen Ansatz nicht nachgewiesen werden.

3.2.4.1 Lagerstabilität von EPO-haltigen Serumproben

Bevor die ersten *in vivo* Freisetzungskinetiken durchgeführt wurden, mußte die Frage geklärt werden, ob die hierbei anfallenden murinen Serumproben bezüglich ihres EPO-Gehaltes stabil sind. Dazu wurden frisch gewonnene Serumproben von vier Mäusen im nachhinein mit einer bekannten Menge EPO versetzt und nach unterschiedlicher Lagerung vermessen.

Wie aus Abb. 3-12 hervorgeht, hing die EPO-Wiederfindungsrate weder bei den Serumproben noch bei den Kontrollen von der Art der Lagerung oder der Lagerungsdauer der Proben ab. In allen Fällen konnten im Rahmen der Meßgenauigkeit konstante EPO-Konzentrationen über die Zeit gemessen werden, die auch durch die Lagerungstemperatur der Proben nicht beeinflußt wurden. Die absoluten Wiederfindungsraten unterlagen jedoch unerwartet großen Schwankungen. Zwar konnten im Fall der Kontrollen annähernd 100% des ehemals zugesetzten EPO wiedergefunden werden. Bei den Serumproben lag die Wiederfindungsrate je nach Maus allerdings nur bei etwa 40 bis 75%.

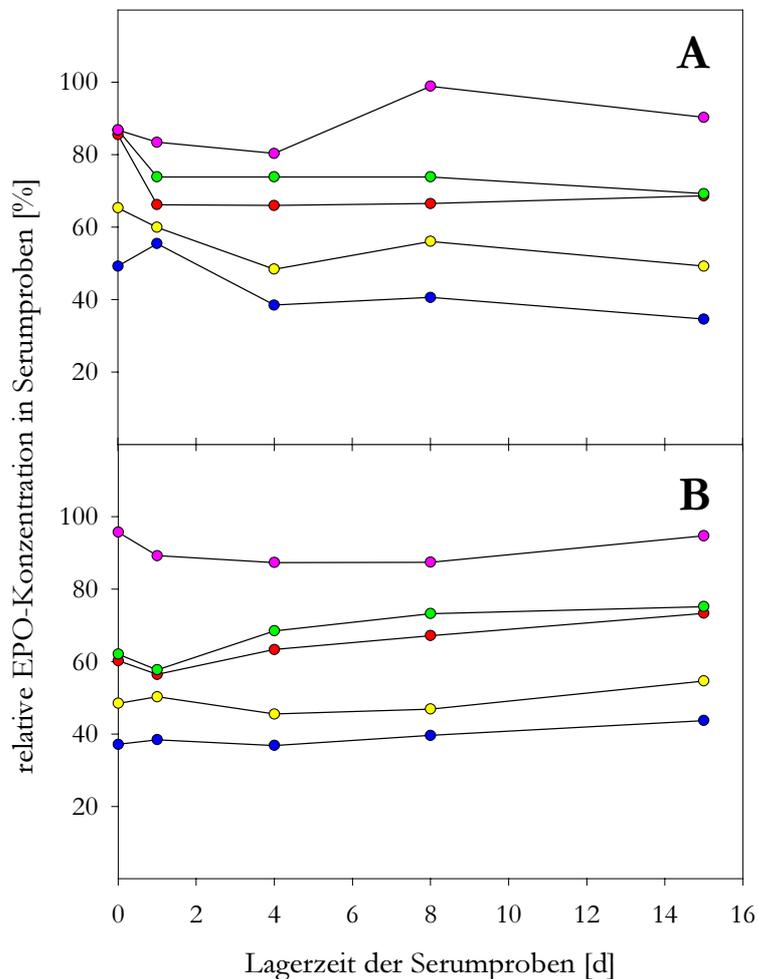


Abb. 3-12: Stabilität von EPO-haltigen Serumproben unter verschiedenen Lagerbedingungen. NMRI-Mäusen wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen mehrfach Blut entnommen. Die daraus gewonnenen Serumproben wurden mit 9 U/ml EPO versetzt und bei 4°C (A) bzw. -20°C (B) gelagert. Alle Proben wurden am Tag der letzten Probennahme gemeinsam vermessen (Maus 1, ♂ (●), Maus 2, ♂ (●), Maus 3, ♀ (●), Maus 4, ♀ (●), Kontrolle in BSA-haltigem PBS-Puffer (●)).

Mögliche Ursachen für diese individuellen und eventuell auch geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden nicht weiter untersucht. Ihre Kenntnis bewog uns allerdings dazu, wann immer möglich Tiere gleichen Geschlechts zu verwenden. Die gemessene individuelle

Variabilität der Wiederfindungsrate spiegelt darüber hinaus die Schwierigkeit wider, beim Vergleich der *in vivo* Kinetiken Größen zu interpretieren, die mit der absoluten EPO-Konzentration des Blutserums im Zusammenhang stehen, wie etwa die Serumspiegelmaxima (C_{max}) oder die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC).

Entsprechend den Ergebnissen zur Lagerstabilität der EPO-haltigen Serumproben, wurden diese in den nachfolgenden Experimenten bis zu ihrer Vermessung im EPO-ELISA in Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

3.2.4.2 *In vivo* Freisetzung von EPO aus Fibrinclots

Um die *in vivo* Freisetzung von liposomenverkapseltem EPO aus Fibrinclots untersuchen zu können, wurden NMRI-Mäusen diese Clots subkutan bzw. intraperitoneal implantiert. Zur Kontrolle wurden weiteren Mäusen Fibrinclots implantiert, die „freies“ EPO und „leere“ Liposomen enthielten, oder ihnen wurden EPO-Lösungen bzw. EPO-gefüllte Liposomen injiziert. In Abb. 3-13 ist der Verlauf der EPO-Serumspiegel nach i.v., i.p. und s.c. Applikation der einzelnen Formulierungen dargestellt, und in Tabelle 3-5 sind die daraus ermittelten pharmakokinetischen Daten zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Pharmakokinetische Daten verschiedener EPO-Formulierungen nach i.v., i.p. und s.c. Applikation an NMRI-Mäusen. Die Werte wurden aus den in Abb. 3-13 dargestellten Kinetiken unter Verwendung einer kompartmentunabhängigen Analyse ermittelt und stellen Mittelwerte \pm s.e. dar („freies“ EPO (●), EPO-gefüllte Liposomen (●), „freies“ EPO im Clot (●), EPO-gefüllte Liposomen im Clot (●)). Eine statistische Analyse der Daten findet sich in Anhang 6.1 bis 6.3.

	C_{max} [$\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$]	t_{max} [h]	$t_{1/2\alpha}$ [h]	AUC [$\text{U}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$]	f^* [%]	MRT [h]	MAT^{\S} [h]
i.v. ●	-	-	$6,4 \pm 0,7$	1806 ± 144	-	$5,7 \pm 0,2$	-
●	-	-	$6,7 \pm 0,7$	1840 ± 88	-	$4,4 \pm 0,5$	-
i.p. ●	$140,2 \pm 41,0$	$4,1 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,6$	1605 ± 344	$88,9 \pm 20,3$	$12,2 \pm 1,0$	$6,5 \pm 0,2$
●	$86,6 \pm 14,4$	$5,4 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,5$	772 ± 147	$42,0 \pm 8,2$	$10,6 \pm 1,1$	$6,2 \pm 0,3$
●	$113,1 \pm 6,1$	$3,2 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,2$	1202 ± 48	$66,6 \pm 5,9$	$12,2 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,1$
●	$34,9 \pm 3,7$	$5,2 \pm 0,6$	$12,1 \pm 0,4$	412 ± 27	$22,8 \pm 1,8$	$14,4 \pm 1,0$	$10,0 \pm 0,3$
s.c. ●	$43,2 \pm 5,1$	$7,1 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,9$	821 ± 105	$45,5 \pm 6,9$	$15,9 \pm 0,9$	$10,2 \pm 0,2$
●	$14,8 \pm 1,2$	$10,6 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,6$	272 ± 9	$14,8 \pm 0,9$	$16,6 \pm 0,3$	$12,2 \pm 0,1$
●	$25,8 \pm 0,8$	$14,4 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,5$	556 ± 69	$30,8 \pm 4,5$	$18,6 \pm 0,5$	$12,9 \pm 0,1$
●	$7,0 \pm 1,1$	$12,9 \pm 0,8$	$12,6 \pm 1,7$	190 ± 45	$10,3 \pm 2,5$	$25,6 \pm 2,2$	$21,2 \pm 0,6$

$$f[\%] = (AUC_{e.v.} / AUC_{i.v.}) \cdot 100, \quad \S MAT = (MRT_{e.v.} - MRT_{i.v.})$$

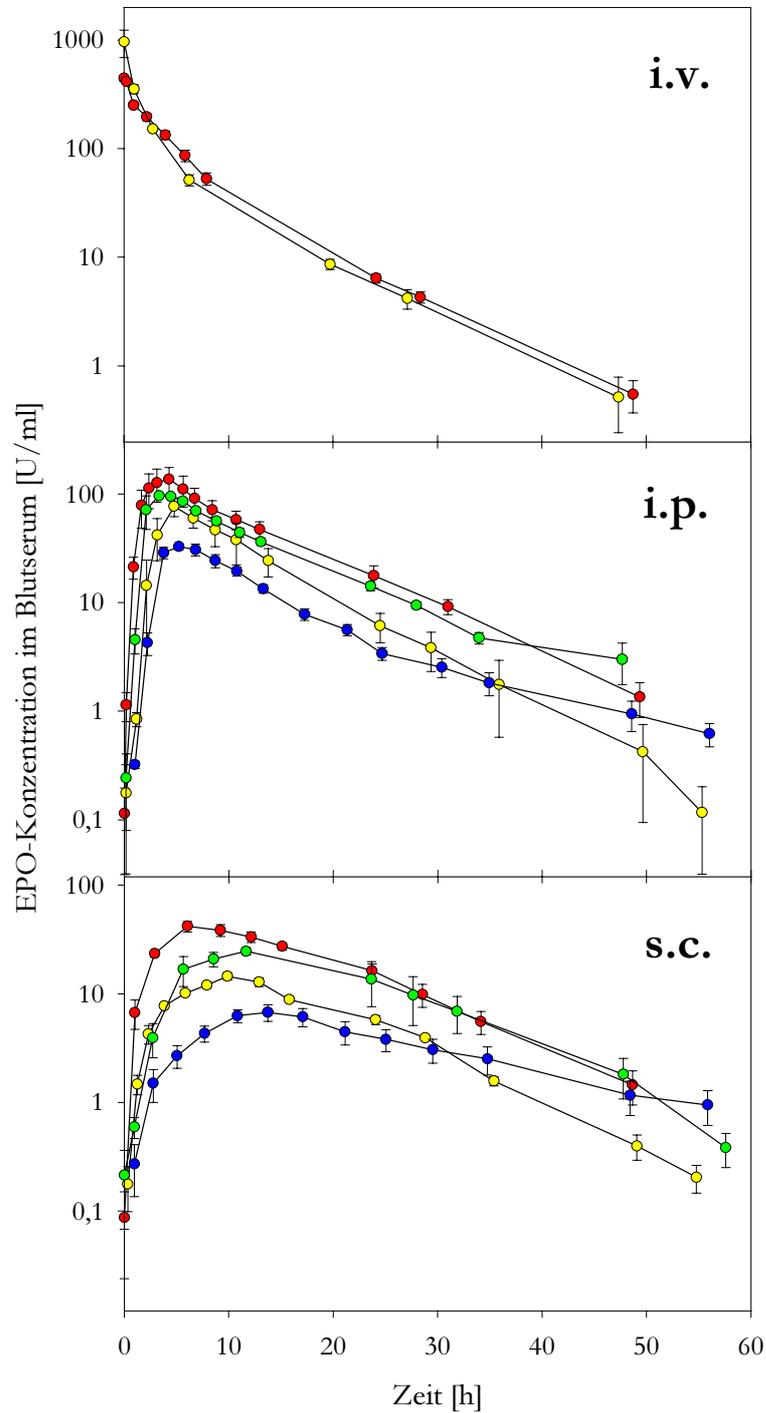


Abb. 3-13: EPO-Konzentrationen im Blutserum von NMRI-Mäusen nach i.v., i.p. und s.c. Applikation verschiedener EPO-Formulierungen. Sowohl die Fibrinclots (500 μ l) als auch die Injektionslösungen (100 μ l) enthielten jeweils 1000 U EPO („freies“ EPO, ♀/♂ (i.v.), ♂ (i.p. und s.c.) (●); EPO-gefüllte nOG-Liposomen, ♂ (i.v.), ♀ (i.p. und s.c.) (●); fibrinverkapseltes „freies“ EPO, ♀ (i.p.), ♂ (s.c.) (●); fibrinverkapselte EPO-gefüllte nOG-Liposomen, ♀ (i.p. und s.c.) (●)). Die dargestellten EPO-Konzentrationen stellen Mittelwerte (\pm s.e.) von drei (i.v. ●) bzw. vier Tieren dar.

3.2.4.2.1 Einfluß der liposomalen Verpackung auf die clearance von EPO

Obwohl die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten liposomengefüllten Fibrinclots wegen ihres Ausmaßes für eine i.v. Applikation ungeeignet waren, wurden „freies“ und liposomenverkapseltes EPO auf diese Weise appliziert. Die hieraus gewonnenen kinetischen Daten waren nötig, um im Fall der i.p. und s.c. Formulierungen die wichtigen Bezugsgrößen biologische Verfügbarkeit (f) und mittlere Absorptionszeit (MAT) berechnen zu können.

Die Konzentrationsprofile von i.v. appliziertem „freiem“ bzw. liposomenverpacktem EPO unterschieden sich kaum voneinander. In beiden Fällen konnte ein biphasischer Abfall der EPO-Serumkonzentration mit nahezu identischen terminalen Eliminationshalbwertszeiten und AUCs beobachtet werden. Auch die MRT-Werte der beiden Formulierungen waren nicht signifikant verschieden, obwohl die Eliminationsrate der ersten Phase bei den EPO-gefüllten Liposomen etwas größer zu sein schien als beim „freien“ EPO.

Bezüglich des biphasischen Verlaufs stimmen die i.v. Kinetiken mit den Ergebnissen von MORIYA et al. [1997] überein, die Ratten sowohl „freies“ als auch liposomal verpacktes EPO unter anderem i.v. applizierten. Allerdings konnten die Autoren für die ca. 200 nm großen REVs (*reverse-phase evaporation vesicles*) aus Dipalmitoylphosphatidylcholin und Soja-Sterinen eine höhere AUC und eine langsamere clearance beobachten als für „freies“ EPO. Sie begründen dies mit der Behauptung, daß die Sialinsäurereste des hochglycosylierten EPOs aus den proteingefüllten REVs herausragen [MAITANI et al, 1999]. Dies soll zu einer verlängerten Zirkulationszeit der REVs führen, wie sie auch durch die Einlagerung des Gangliosids G_{M1} in liposomale Membranen erreicht werden kann, indem dessen Sialinsäurereste die Aufnahme der Liposomen durch die Galactosylrezeptoren der Leber inhibieren [ALLEN und CHONN, 1987; MARUYAMA et al., 1993].

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten proteingefüllten LUVs konnte mittels Zetapotentialmessungen allerdings kein Penetrieren der liposomalen Membranen durch EPO-Zuckerreste nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem weisen die Versuche zur Degradation des Glycoanteils von EPO (vergleiche Kapitel 3.1.3) darauf hin, daß auf der Oberfläche von EPO-gefüllten Liposomen keine lösungsmittlexponierten Zuckerreste vorlagen.

Vermutlich lassen sich die identischen $t_{1/2\alpha}$ -Werte von i.v. appliziertem „freiem“ bzw. liposomenverkapseltem EPO am plausibelsten damit erklären, daß die nOG-Liposomen durch den Kontakt mit Serumproteinen sehr schnell zerfielen [ALLEN und CLELAND, 1980;

SCHERPHOF et al., 1978]. Das hierbei aus den Liposomen freigesetzte EPO unterschied sich nicht mehr vom „freiem“ Protein und zeigte deshalb dieselbe terminale Eliminationshalbwertszeit.

Im Vergleich zur i.v. Applikation zeigten sich bei der i.p. und s.c. Verabreichung von „freiem“ bzw. liposomenverpacktem EPO etwas deutlichere Unterschiede. Unabhängig vom Applikationsort waren die terminalen Eliminationshalbwertszeiten der beiden Formulierungen zwar nach wie vor sehr ähnlich und mit denen für die i.v. Applikation vergleichbar. Allerdings zeigten die EPO-gefüllten Liposomen bei ihrer s.c. Applikation jedoch einen im Vergleich zum „freien“ EPO signifikant retardierten Eintritt in den Blutkreislauf. Während t_{max} für das „freie“ EPO bei $7,1 \pm 0,1$ h lag, betrug es für liposomenverkapseltes EPO $10,6 \pm 0,2$ h. Außerdem besaß das liposomale EPO eine deutlich größere MAT als unverkapseltes EPO. Die entsprechenden i.p. verabreichten Formulierungen zeigten für t_{max} und MAT zwar keine signifikanten Unterschiede aber zumindest dieselben Tendenzen.

Die Bioverfügbarkeiten des „freien“ EPOs lagen mit $88,9 \pm 20,3\%$ bei i.p. Applikation bzw. $42,0 \pm 8,2\%$ bei s.c. Verabreichung deutlich über denen des liposomenverkapselten EPOs, das nur zu $45,5 \pm 6,9$ bzw. $14,8 \pm 0,9$ % verfügbar war. Die Bioverfügbarkeiten des s.c. applizierten EPOs wiesen damit ein zu den Ergebnissen von MORIYA et al. [1997] genau entgegengesetztes Verhalten auf. Die Autoren fanden bei Ratten für s.c. appliziertes „freies“ EPO eine Bioverfügbarkeit von $15,0 \pm 2,8\%$, während die bereits erwähnten REVs bei s.c. Applikation mit $41,0 \pm 1,6$ % eine knapp dreifach höhere Bioverfügbarkeit aufweisen.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von MORIYA et al. [1997] stehen Beobachtungen von OUSSOREN et al. [1997]. Sie konnten an Ratten zeigen, daß s.c. verabreichte Liposomen in Abhängigkeit von ihrer Größe und Lipidzusammensetzung zu einem beträchtlichen Prozentsatz am Ort ihrer Applikation verbleiben, ohne vom Lymphsystem und in der Folge vom Blutkreislauf aufgenommen zu werden. So bleiben z.B. 40 nm große Liposomen aus Ei-Phosphatidylcholin, Ei-Phosphatidylglycerol und Dipalmitoylphosphatidylglycerin (molares Verhältnis 10 : 1 : 4) schon zu etwa 25% am subkutanen Injektionsort liegen und 10fach größere Vesikel derselben Zusammensetzung sogar zu mehr als 80%. Einen ähnlichen Effekt konnten HIRANO und HUNT [1985] für i.p. verabreichte Liposomen aus Ei-Phosphatidylcholin, Phosphatidylsäure, Cholesterin und α -Tocopherol (molares Verhältnis 40 : 10 : 50 : 1) beobachten. Diese Vesikel, die mit Sucrose gefüllt waren, werden von Ratten ebenfalls über das Lymphsystem in die Blutbahn aufgenommen. Die in diesem Fall von der Liposomengröße unabhängige Absorptionsrate beträgt 5 Stunden nach Applikation nur etwa 50% während „freie“ Sucrose zu annähernd 100% absorbiert wird.

Darüber hinaus muß berücksichtigt werden, daß Liposomen, die vom Lymphsystem aufgenommen worden sind, nicht zwangsläufig in den Blutkreislauf gelangen. Sowohl für i.p. als auch für s.c. applizierte Liposomen ist beschrieben, daß sie umso stärker in den Lymphknoten akkumuliert werden, je größer sie sind [HIRANO und HUNT, 1985; OUSSOREN et al., 1997]. Es ist daher davon auszugehen, daß sich die Bioverfügbarkeiten von „freiem“ und liposomenverkapseltem Wirkstoff noch stärker voneinander unterscheiden als es die entsprechenden Absorptionsraten tun.

Die Summe dieser Beobachtungen könnte erklären, warum im vorliegenden Fall das liposomenverkapselte EPO eine im Vergleich zum „freien“ EPO geringere Bioverfügbarkeit aufwies, sobald es i.p. oder s.c. appliziert wurde. Aus den Ausführungen wird weiterhin deutlich, daß i.p. bzw. s.c. verabreichte Liposomen in der hier verwendeten Form kein geeignetes Depotsystem darstellen. Durch den liposomalen Einschluß des EPOs wurde zwar sein Eintritt in den Blutkreislauf verzögert. Die Verkapselung hatte jedoch keinen Einfluß auf die terminale Eliminationshalbwertszeit des EPOs und führte daher nicht zu dem charakteristischen *sustained release* eines Depotsystems.

3.2.4.2.2 Fibrinclots als EPO-Depotform

Die Kinetiken von „freiem“ EPO und von fibrinverkapseltem „freiem“ EPO wiesen im Fall einer i.p. Applikation keine signifikanten Unterschiede auf. Dennoch konnte wiederholt beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt), daß C_{max} und f für die injizierbare Formulierung geringfügig größer waren als für das Implantat. Diese Tendenzen wurden durch die entsprechenden signifikanten Unterschiede bei der s.c. Applikation der beiden Formulierungen bestätigt. Darüber hinaus war t_{max} für das s.c. verabreichte EPO-Implantat mit $14,4 \pm 0,3$ h rund doppelt so groß wie für die entsprechende EPO-Lösung. Dies spiegelte sich auch in deren signifikant verschiedenen mittleren Verweilzeiten wider.

Etwas größere Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der EPO-haltigen Liposomen mit den entsprechenden fibrinverkapselten Vesikeln. t_{max} wurde durch den Einschluß der i.p. verabreichten Liposomen in Fibrin zwar nicht beeinflußt, aber die Bioverfügbarkeit des EPOs wurde hierdurch signifikant gesenkt. Außerdem wirkte sich die zusätzliche Verpackung des EPOs auf seine Elimination aus. Während i.p. applizierte Liposomen eine monophasische Elimination zeigten, wurde bei den entsprechenden Fibrinclots eine biphasische Elimination beobachtet. Dabei war die Eliminationshalbwertszeit der schnelleren, ersten Phase mit dem

$t_{1/2\alpha}$ -Wert der unverkapselten Liposomen vergleichbar, und die Halbwertszeit der zweiten Phase etwa doppelt so groß wie die der ersten. Als Folge dieser verlangsamten Elimination stieg mit dem Einschluß der Liposomen in Fibrin auch deren mittlere Verweilzeit um ca. 4 h auf $14,4 \pm 1,0$ h an.

Ein noch stärkerer Anstieg der mittleren Verweilzeit konnte bei der s.c. Applikation der beiden liposomalen Formulierungen beobachtet werden. Mit $25,6 \pm 2,2$ h lag hier die MRT für das Implantat um etwa 9 h höher als für die unverkapselten Liposomen. Dies ist erneut darauf zurückzuführen, daß das Implantat eine signifikant langsamere EPO-Elimination zeigte als die unverkapselten Liposomen. Im Gegensatz zum i.p. verabreichten Implantat war die EPO-Elimination des s.c. applizierten Implantats aber monophasisch. Die zugehörige Halbwertszeit stimmte mit $12,6 \pm 1,7$ h jedoch auffallend gut mit dem $t_{1/2\alpha}$ -Wert des ersteren überein. Außerdem wurde durch die Verkapselung des s.c. verabreichten, liposomalen EPOs in Fibrin eine Abnahme seiner Bioverfügbarkeit um etwa eine Drittel bewirkt. Ähnliche Unterschiede in den Bioverfügbarkeiten wurden bereits bei der subcutanen Applikation der beiden „freien“ EPO-Formulierungen beobachtet.

Diese Experimente zeigten, daß Fibrin durchaus einen Einfluß auf die *in vivo* Kinetiken des „freien“ bzw. liposomenverkapselten EPOs hatte. Im Vergleich zu den vorangegangenen *in vitro* Experimenten war der *in vivo* Effekt des Fibrins jedoch sehr schwach ausgeprägt. Die Beobachtung, daß sowohl i.p. als auch s.c. implantierte Fibrinclots innerhalb weniger Stunden auf etwa ein Drittel ihrer ursprünglichen Größe schrumpften, bietet allerdings einen Anhaltspunkt für mögliche Erklärungen. Aufgrund der Geschwindigkeit des Schrumpfungsprozesses ist zwar nicht anzunehmen, daß es sich hierbei um einen Abbau des Fibrins handelte (siehe auch Kapitel 3.2.4.2.3), und auch osmotische Effekte sind aufgrund der Verwendung von Puffern mit physiologischen Ionenkonzentrationen eher unwahrscheinlich. Es ist allerdings vorstellbar, daß die Fibrinclots *in vivo* den hohen mechanischen Belastungen nicht standhalten und daher ausgedrückt werden wie ein nasser Schwamm.

Wenn bei einem solchen Vorgang ein Großteil des EPOs aus den Fibrinclots herausgedrückt würde, könnte dies erklären, warum das Fibrin kaum in der Lage war, den Eintritt des „freien“ bzw. liposomenverkapselten EPOs in den Blutkreislauf zu verzögern. Es würde darüber hinaus verständlich machen, warum die Eliminationsraten des „freien“ EPOs durch seine Fibrinverkapselung nicht wesentlich beeinflusst wurden. Bei den EPO-gefüllten Liposomen scheint der durch das Ausdrücken der Fibrinclots verursachte *burst* etwas geringer

als beim „freien“ EPO zu sein. Dadurch war es offensichtlich möglich, eine terminale Eliminationsphase zu beobachten, die durch eine verzögerte Freisetzung von nicht herausgedrückten Liposomen beeinflusst wurde.

3.2.4.2.3 *In vivo* Stabilität von liposomenhaltigen Fibrinclots

Wie in Kapitel 3.2.4.2.2 dargestellt schrumpften die als *protein delivery* System in Mäusen getesteten Fibrinclots innerhalb weniger Stunden auf ein Drittel ihrer ursprünglichen Größe. Um beurteilen zu können, welche Ursachen dieser abrupte Schrumpfungsprozeß hatte, wurden lichtmikroskopische Bilder von Clots mit unterschiedlichen *in vivo* Verweilzeiten angefertigt (vergleiche Abb. 3-14).

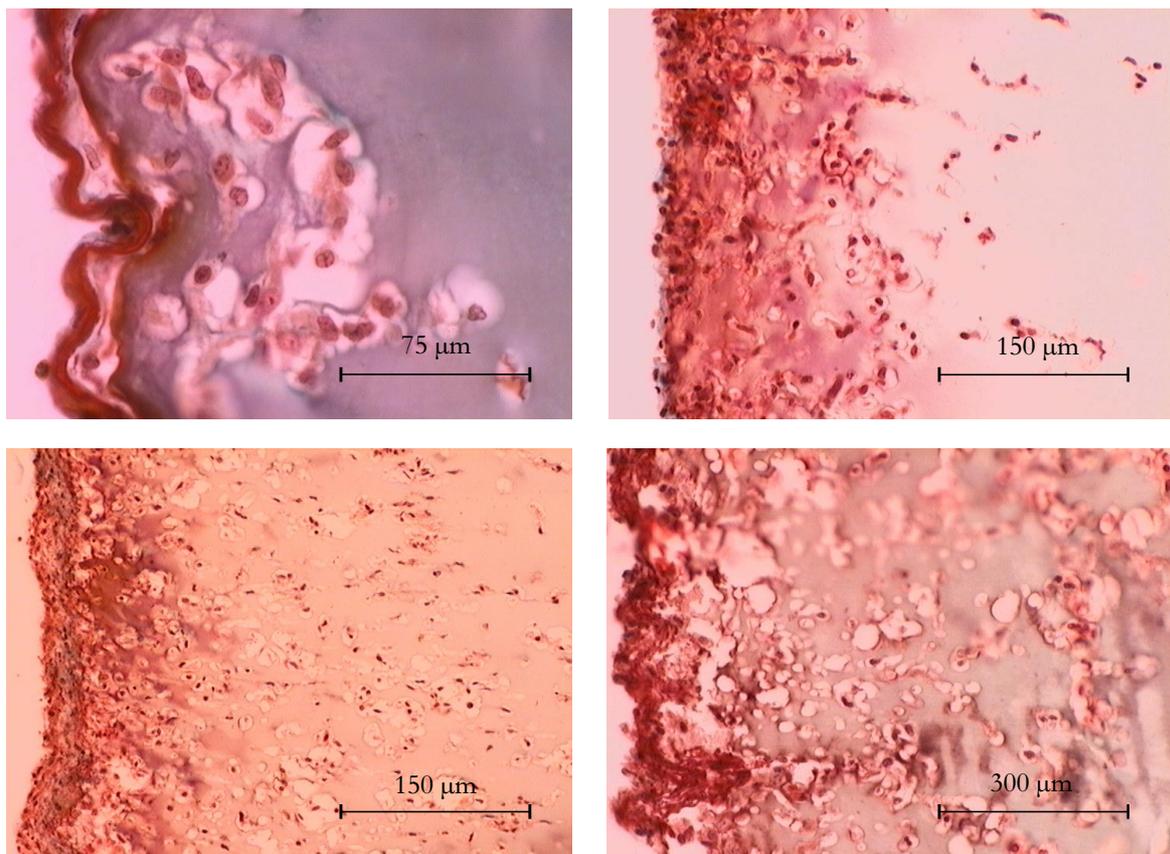


Abb. 3-14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von explantierten Fibrinclots. Von links oben nach rechts unten sind Schnitte von nOG-liposomenhaltigen Fibrinclots gezeigt, die 5, 7, 10 und 12 Tage nach ihrer s.c. Implantation wieder explantiert wurden. Die Schnitte wurden mit Hilfe der MASSON-GOLDNER nach ROMEIS [1989b] angefärbt.

Aus diesen Aufnahmen wurde deutlich, daß die i.p. bzw. s.c. implantierten Clots zwei Tage nach ihrer Applikation keine Unregelmäßigkeiten im Fibrinnetzwerk aufwiesen. Zum gleichen Zeitpunkt konnte auf den Clotoberflächen eine vorwiegend einlagige Schicht von mononukleären Zellen beobachtet werden (nicht dargestellt). Diese Zellen begannen am fünften Tag in das Fibrin einzuwandern, und nach zehn Tagen waren sie bereits bis zu 500 µm tief in die Implantate eingedrungen. Gleichzeitig wurden erste Löcher im unmittelbaren Umfeld der mononukleären Zellen sichtbar, deren Zahl und Größe in den darauffolgenden Tagen noch deutlich zunahm.

Diese Beobachtungen stehen in gutem Einklang mit Ergebnissen von UCHINO et al. [1991]. Im Rahmen ihrer Untersuchungen zur extravaskulären Fibrinolyse beschreiben die Autoren die Infiltration von polymorphonukleären Neutrophilen in s.c. implantierte Fibrinclots. Außerdem beobachteten sie, daß Inhibitoren von Leukocytelastase den extravaskulären Abbau von Fibrin verzögern können, während Plasmininhibitoren keinen Einfluß auf die Clotstabilität haben. Das bedeutet, daß im extravaskulären Raum die Fibrinolyse nicht durch Plasmin, sondern durch eine Neutrophilen-Protease katalysiert wird. Dieser Umstand unterstützt die bereits geäußerte Vermutung, daß es sich bei dem hier beobachteten schnellen Schrumpfungsprozeß der implantierten Fibrinclots nicht um einen Abbau des Fibrins handelt (siehe Kapitel 3.2.4.2.2). Wäre er die Ursache, so müßten die Clots schon nach wenigen Stunden von mononukleären Zellen durchdrungen sein, was offensichtlich nicht der Fall war.

Auf der anderen Seite läßt die nach einigen Tagen stattfindende Einwanderung von mononukleären Zellen darauf schließen, daß nach dem Schrumpfungsprozeß tatsächlich ein langsamer Clotabbau stattfindet. Im Fall der i.p. applizierten Fibrinclots sollte daher, wenn auch nach längerer Zeit, eine vollständige Resorption des Fibrins möglich sein. An der Oberfläche der s.c. implantierten Clots wurde neben der Invasion von mononukleären Zellen jedoch auch die Bildung einer immer stärker werdenden Zellschicht aus Fibroblasten und Fibrocyten beobachtet. Diese Schicht könnte die Einwanderung weiterer mononukleärer Zellen in den Clot behindern und dazu führen, daß diese verkapselt werden, bevor ihre Resorption abgeschlossen ist.

Obwohl dies nicht näher untersucht wurde, konnte mit späteren Experimenten zumindest gezeigt werden, daß die Fibroblasten- und Fibrocytenschicht keinen Einfluß auf die Bioverfügbarkeit des in den Clots verpackten EPOs hatte. S.c. implantierte Behriplast®-Clots wiesen 20 Tage nach ihrer Applikation so gut wie kein EPO mehr auf, unabhängig davon, ob das Protein zusätzlich in Liposomen verkapselt war oder nicht (vergleiche Kapitel 3.2.4.3.2).

3.2.4.2.4 EPO-Restgehalt von explantierten Fibrinclots

Wie aus Abb. 3-13 hervorgeht, wurden die *in vivo* Freisetzung von EPO aus Fibrinclots über einen Zeitraum von etwa 55 h verfolgt. Die hierbei zu beobachtenden *burst*-Kinetiken stellten keine durch den Abbau des Fibrins gesteuerten Freisetzungen dar (vergleiche Kapitel 3.2.4.2.3), sondern beruhten wahrscheinlich auf einem mechanisch bedingten „Ausdrücken“ der Clots unmittelbar nach ihrer Implantation. Dementsprechend zeigte fibrinverkapseltes „freies“ EPO sowohl bei i.p. als auch bei s.c. Applikation Kinetiken, die denen des freien EPOs sehr ähnlich waren. Im Fall der fibrinverkapselten EPO-gefüllten Liposomen konnten allerdings $t_{1/2\alpha}$ -Werte beobachtet werden, die sehr viel kleiner waren, als dies für „herausgedrückte“ und somit nicht mehr fibrinverkapselte Liposomen zu erwarten gewesen wäre. Um beurteilen zu können, ob diese terminalen Eliminationen auf einer zweiten, tatsächlich abbaukontrollierten Freisetzungsphase beruhen, wurden i.p. bzw. s.c. applizierte Fibrinclots, die entweder „freies“ oder liposomenverkapseltes EPO enthielten, ca. 60 h nach ihrer Implantation wieder explantiert und auf ihren EPO-Restgehalt hin untersucht (siehe Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: EPO-Restgehalt von explantierten Fibrinclots. Die Zusammensetzung der Fibrinclots („freies“ EPO (●), liposomenverkapseltes EPO (●)) entsprach der in Abb. 3-9 beschriebenen. Alle Clots wurden ca. 60 h nach ihrer i.p. bzw. s.c. Implantation wieder explantiert, wobei die aufgeführten EPO-Restgehalte Mittelwerte von jeweils drei Clots darstellen.

EPO-Restgehalt der explantierten Fibrinclots [%]		
i.p.	●	< 1,0
	●	20,2
s.c.	●	< 1,0
	●	20,3

Es zeigte sich, daß nur die Fibrinclots mit liposomenverkapseltem EPO nach ihrer Explantation einen deutlichen, vom ursprünglichen Applikationsort unabhängigen EPO-Restgehalt von etwa 20% aufwiesen. Das „freie“ EPO war 60 h nach der Clotimplantation schon nahezu vollständig aus dem Fibrin freigesetzt. Dieses Ergebnis steht in gutem Einklang mit der Beobachtung, daß nur Fibrinclots mit liposomenverkapseltem EPO terminale Eliminationsraten zeigten, die kleiner waren, als die der entsprechenden fibrinfreien

Formulierungen. Denn nur Implantate, die nach dem „Ausdrücken“ noch EPO enthalten, können das Protein anschließend mit einer Kinetik freisetzen, die durch die vergleichsweise langsame Phagozytose der Clots gesteuert wird (vergleiche auch Kapitel 3.2.4.2.3).

Nach den Ergebnissen der in vitro Experimente war davon auszugehen, daß in Fibrinclots einpolymerisierte Liposomen auch in vivo nur dann wieder aus diesen freigesetzt werden, wenn das Fibrin durch biologische Prozesse abgebaut wird. Unter der weiteren Voraussetzung, daß ein i.p. bzw. s.c. implantierter Fibrinclot so langsam resorbiert wird, daß in ihm eingeschlossenes „freies“ EPO zuvor komplett herausdiffundiert ist, hätte die in vivo Freisetzung von nOG-liposomenverkapseltem EPO aus Fibrin deutlich langsamer sein sollen, als die von „freiem“ EPO. Dieser Effekt fiel im Tierversuch allerdings sehr viel geringer aus als erwartet. Die Analogien in den Pharmakokinetiken der Implantate und der entsprechenden fibrinfreien Formulierungen lassen sich vermutlich auf eine ungenügende mechanische Stabilität der Fibrinclots zurückführen. Sie bewirkte, daß ein Großteil des „freien“ bzw. liposomenverkapselten EPOs innerhalb weniger Stunden aus den Implantaten herausgedrückt wurde wie Wasser aus einem nassen Schwamm und führte somit zu Freisetzungskinetiken, die denen der fibrinfreien Formulierungen sehr ähnlich waren. Die Tatsache, daß im Fall der EPO-gefüllten Liposomen der Fibrinclot dennoch einen Einfluß auf die terminalen Eliminationsraten hatte, ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß in den „ausgedrückten“ Fibrinclots zwar kein „freies“ EPO mehr zu finden war wohl aber liposomenverkapseltes. Dieses konnte im Anschluß an den stabilitätsbedingten burst release durch den Abbau der geschrumpften Fibrinclots freigesetzt werden. Da die vollständige Resorption der Fibrinclots im Gegensatz zu ihrem „Schrumpfungsprozeß“ jedoch über mehrere Tage bis Wochen zu laufen scheint, machte sich diese zweite, sehr langsame Freisetzungsphase hauptsächlich in einer verringerten terminalen EPO-Eliminationsrate bemerkbar.

3.2.4.3 In vivo Experimente mit Behriplast[®]-Clots

3.1.1.1.1 EPO-Freisetzung aus Behriplast[®]-Clots

In einer weiteren Serie von *in vivo* Experimenten wurde wie schon im Fall der *in vitro* Versuche anstelle des selbst hergestellten Fibrins kommerziell erhältlicher Fibrinkleber für die Verpackung des „freien“ bzw. liposomenverkapselten EPOs verwendet. Die Behriplast[®]-Clots besaßen *in vitro* zwar nahezu dieselben Freisetzungskinetiken wie die entsprechenden Fibrinclots (siehe Kapitel 3.2.3), *in vivo* war allerdings davon auszugehen, daß sich das

Freisetungsverhalten dieser beiden Clotarten durchaus voneinander unterscheidet. Wie in diesem Zusammenhang bereits beschrieben, wurden die Behriplast®-Clots aus hochkonzentrierten Fibrinogen- bzw. Thrombinlösungen hergestellt und ihr Fibrinnetz wurde nicht nur über ionische, sondern auch über kovalente Bindungen zusammengehalten. Beide Faktoren sollten sowohl die mechanische als auch die biochemische Stabilität der Behriplast®-Clots im Vergleich zu den Fibrinclots erhöhen [UCHINO et al., 1991] und hierdurch die *in vivo* Freisetzungen von „freiem“ bzw. liposomenverkapseltem EPO aus den Implantaten beeinflussen.

Von besonderem Interesse war die erhöhte mechanische Stabilität der Behriplast®-Clots. Durch sie sollte das bei den Fibrinclots zu beobachtende „Ausdrücken“ der Implantate verhindert werden, was dazu führte, daß die Fibrinclots nicht die erwarteten *in vivo* Freisetzungen zeigten. In Abb. 3-15 und Tabelle 3-7 sind die Ergebnisse eines Experiments gezeigt, bei dem EPO-haltige Behriplast®-Clots s.c. in Mäuse implantiert wurden.

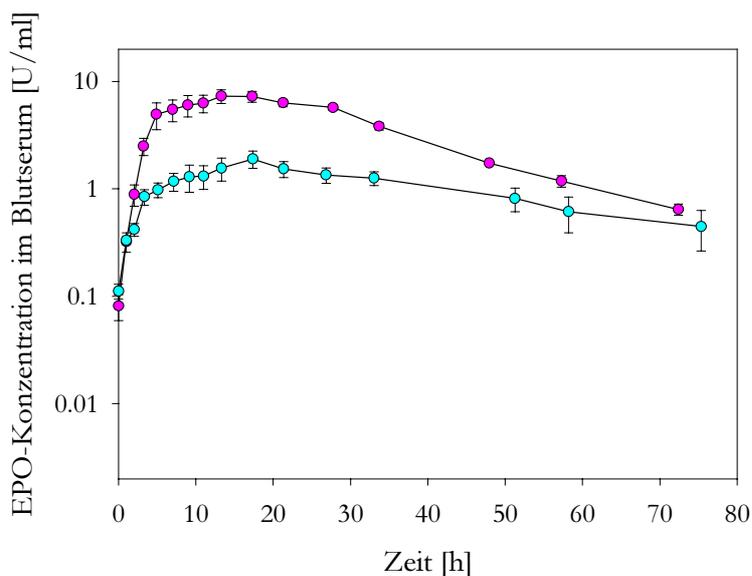


Abb. 3-15: EPO-Konzentrationen im Blutserum von NMRI-Mäusen nach der s.c. Applikation von EPO-haltigen Behriplast®-Clots. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in Abb. 3-13 beschrieben (fibrinverkapseltes „freies“ EPO, ♀ (●); fibrinverkapselte EPO-gefüllte nOG-Liposomen, ♀ (●)). Die dargestellten EPO-Konzentrationen stellen Mittelwerte (\pm s.e.) von vier Tieren dar.

Tabelle 3-7: Pharmakokinetische Daten von EPO-haltigen Behriplast®-Clots nach s.c. Applikation an NMRI-Mäusen. Die Daten wurden aus den in Abb. 3-15 dargestellten Kinetiken unter Verwendung einer kompartimentunabhängigen Analyse ermittelt und stellen Mittelwerte \pm s.e. dar („freies“ EPO im Behriplast®-Clot (●), EPO-gefüllte Liposomen im Behriplast®-Clot (●)). Ihre statistische Analyse findet sich in Anhang 6.4.

	C_{max} [U·ml ⁻¹]	t_{max} [h]	$t_{1/2\alpha}$ [h]	AUC [U·h·ml ⁻¹]	f^* [%]	MRT [h]	MAT^{\S} [h]
●	7,9 \pm 0,7	15,9 \pm 2,2	15,1 \pm 1,0	264 \pm 20	14,6 \pm 1,6	29,6 \pm 2,2	23,9 \pm 5,7
●	1,9 \pm 0,4	17,3 \pm 0,4	41,0 \pm 15,5	115 \pm 28	6,2 \pm 1,6	66,0 \pm 21,1	61,6 \pm 33,1

$$f[\%] = (AUC_{e.v.} / AUC_{i.v.}) \cdot 100, \quad \S MAT = (MRT_{e.v.} - MRT_{i.v.})$$

Obwohl die Behriplast[®]-Clots *in vivo* tatsächlich nicht abrupt schrumpften, sondern nur sehr langsam kleiner wurden (Ergebnisse nicht gezeigt), unterschieden sich ihre Kinetiken nicht grundsätzlich von denen der entsprechenden Fibrinclots (zur statistischen Analyse siehe Anhang 6.5). So wiesen z.B. die C_{max} -Werte für beide Clotsorten die gleiche Tendenz auf, indem sie für Implantate mit „freiem“ EPO grundsätzlich höher waren als für vergleichbare Implantate mit EPO-gefüllten Liposomen. Erwartungsgemäß waren die C_{max} -Werte der mechanisch stabileren Behriplast[®]-Clots jedoch signifikant niedriger als die der entsprechenden Fibrinclots. In unmittelbarem Zusammenhang mit dem verringerten *burst release* sind wohl auch die t_{max} -Werte der Behriplast[®]-Clots zu sehen. Sie waren für beide Formulierungen zwar nach wie vor sehr ähnlich, aber mit etwa 16 bis 17 h doch deutlich größer als im Fall der Fibrinclots.

Darüber hinaus zeigten beide Behriplast[®]-Formulierungen die bereits bei den s.c. applizierten Fibrinclots zu beobachtende monophasische Elimination. Die Tatsache, daß die $t_{1/2\alpha}$ -Werte der beiden Behriplast[®]-Implantate im Gegensatz zu den Fibrinimplantaten keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, erlaubt jedoch nicht den Schluß, daß die Freisetzungsmechanismen der beiden Behriplast[®]-Formulierungen dieselben waren. Aus der graphischen Darstellung der Freisetzungskinetiken (siehe Abb. 3-15) wird deutlich, daß $t_{1/2\alpha}$ für die Behriplast[®]-verkapselten EPO-gefüllten Liposomen mit einem beträchtlichen Fehler belegt war, der von den großen individuellen Unterschieden der vier vermessenen Mäuse herrührte. Betrachtet man deren Einzelkinetiken (Ergebnisse nicht gezeigt), so waren drei der vier $t_{1/2\alpha}$ -Werte größer als der $t_{1/2\alpha}$ -Mittelwert des Behriplast[®]-verkapselten „freien“ EPOs. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Fibrinclot-Experimenten deutet dies darauf hin, daß die zusätzliche Verpackung des EPOs in Liposomen nicht nur *in vitro* (vergleiche Kapitel 3.2.2 und 3.2.3) sondern auch *in vivo* einen Einfluß auf seine Freisetzungskinetik hatte.

Aus den im Vergleich zu den Fibrinclots durchweg größeren $t_{1/2\alpha}$ -Werten der Behriplast[®]-Implantate wird deutlich, daß letztere im Anschluß an den *burst release* mehr EPO pro Zeiteinheit freisetzen als die Fibrinclots. Dies ist durchaus verständlich, wenn man davon ausgeht, daß der EPO-Gehalt der Clots unmittelbar nach dem *burst* um so höher sein sollte, je schwächer dieser ausgeprägt ist. 85 h nach der Implantation wiesen nur noch die Behriplast[®]-Clots, die proteingefüllte Liposomen enthielten, einen deutlichen EPO-Restgehalt auf (siehe Tabelle 3-8). Trotzdem waren die EPO-Konzentrationen des Mausextrates für beide Behriplast[®]-Formulierungen nach annähernd gleicher Zeit, nämlich ca. 150 h, wieder auf endogene Level abgesunken (Ergebnisse nicht gezeigt, vergleiche Kapitel 3.2.4.3.2).

Tabelle 3-8: EPO-Restgehalt von explantierten Behriplast®-Clots. Die Zusammensetzung der Behriplast®-Clots („freies“ EPO (●), liposomenverkapseltes EPO (●)) entsprach der in Abb. 3-9 beschriebenen. Alle Clots wurden ca. 85 h nach ihrer s.c. Implantation wieder explantiert, wobei die aufgeführten EPO-Restgehalte Mittelwerte von jeweils drei Clots darstellen.

EPO-Restgehalt der explantierten Fibrinclots [%]		
s.c.	●	< 1,0
	●	20,3

3.2.4.3.1 Stimulation der Erythropoese durch EPO-haltige Behriplast®-Clots

Wie eingangs erwähnt (siehe Kapitel 3.2.4) stimuliert humanes rekombinantes EPO nicht nur die Hämatopoese beim Menschen sondern auch bei anderen Säugern wie z.B. Mäusen. Als Parameter der EPO-Aktivität diente zunächst die Einbaurate von radioaktiv markiertem Eisen (^{59}Fe) in das Hämoglobin neugebildeter Erythrocyten [PLZAK et al., 1955]. Da dieser Assay jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, wurde vor einigen Jahren ein alternativer Bioassay für EPO auf Basis einer automatisierten Retikulozytenzählung entwickelt [DICKMANN, 1991]. Er beruht darauf, daß die noch nicht voll ausgereiften Retikulozyten im Gegensatz zu den aus ihnen hervorgehenden Erythrocyten über einen ribosomalen Apparat zur Hämoglobinsynthese verfügen, der sich mit Hilfe geeigneter Farbstoffe nachweisen läßt [Kozenow und May, 1952].

In Abb. 3-16 ist die Veränderung der Zahl der Retikulozyten nach s.c. Applikation verschiedener EPO-Formulierungen dargestellt. Da DICKMANN [1991] bei subkutaner Verabreichung von EPO-Lösungen nur für einen Dosisbereich von 0,352 bis 180,0 U pro Maus eine gut ausgeprägte Dosiswirkungsbeziehung beobachten konnte, wurden im vorliegenden Fall mit jeder Formulierung anstelle der bisher üblichen 1000 U Dosen in der obigen Größenordnung appliziert. So sollte sichergestellt werden, daß das verabreichte EPO tatsächlich zu einer konzentrations- bzw. freisetzungsabhängigen Veränderung der Retikulozytenzahlen führt. Darüber hinaus war bekannt, daß die maximale biologische Antwort auf eine subkutane EPO-Injektion nach etwa drei bis vier Tagen zu erwarten ist [DICKMANN, 1991]. Dementsprechend wurden die ersten Retikulozytenzählungen 72 Stunden nach Applikation der Formulierungen durchgeführt.

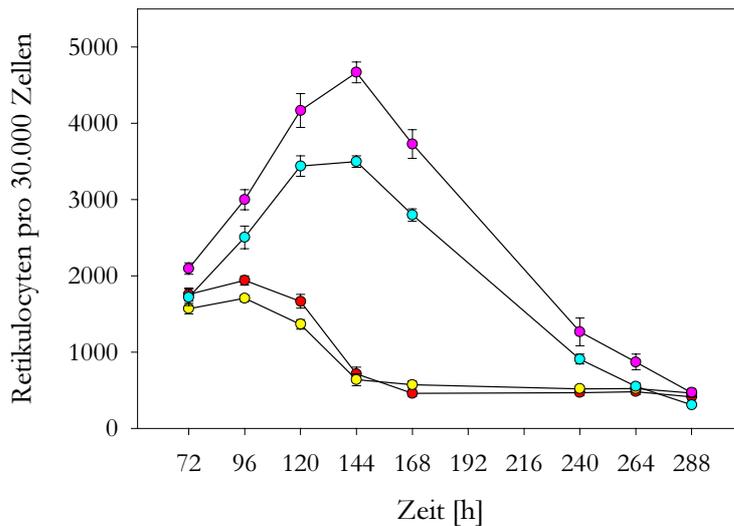


Abb. 3-16: Retikulozyten im Blut von Mäusen nach s.c Applikation verschiedener EPO-Formulierungen. Sowohl die Behriplast®-Clots (500 μ l) mit EPO-gefüllten Liposomen (●) als auch die Injektionen (200 μ l) mit „freiem“ (●) bzw. (●) liposomenverkapseltem EPO enthielten jeweils 100 U EPO. Lediglich die mit „freiem“ Protein gefüllten Behriplast®-Clots enthielten 375 U EPO (●). Die dargestellten Retikulozytenzahlen stellen Mittelwerte (\pm s.e.) von 10 (●, ●, ●) bzw. 9 (●) männlichen Tieren dar.

Tabelle 3-9: AUCs für die in Abb. 3-16 dargestellten Kinetiken. Die AUCs wurden für den Zeitraum von 72 bis 288 Stunden berechnet und sind um die endogene Retikulozytenzahl der Mäuse korrigiert („freies“ EPO (●), liposomenverkapseltes EPO (●), „freies“ EPO im Behriplast®-Clot (●), liposomenverkapseltes EPO im Behriplast®-Clot (●)).

	AUC [Retikulozyten·h·(30.000 Zellen) ⁻¹]	Verhältnis der AUCs
●	96385	1,1
●	88991	1,0
●	485971	~*
●	353932	4,0

* Ein direkter Vergleich ist in diesem Fall unzulässig, da hier anstelle der sonst üblichen 100 U 375 U EPO verabreicht wurden.

Erstaunlicherweise unterschieden sich einige Formulierungen bezüglich ihrer biologischen Wirkung sehr viel stärker voneinander als aufgrund ihrer EPO-Freisetzungskinetiken angenommen werden konnte (vergleiche Kapitel 3.2.4.2 und 3.2.4.3.1). Offensichtlich beruhen die Unterschiede in der Stimulierung der Hämatopoese ausschließlich auf dem Einschluß des EPOs in Behriplast®-Clots. Die liposomale Verkapselung des EPOs wirkte sich weder in An- noch in Abwesenheit der Clots auf die Retikulozytenzahlen aus. So führte die s.c. Verabreichung von „freiem“ EPO nach 96 h zu einem maximalen Anstieg der Retikulozyten auf etwa 1800 pro 30.000 ausgezählten Zellen. Ca. 150 h nach Applikation war der endogene EPO-Level wieder erreicht. Eine identische Abhängigkeit wurde im Fall des liposomal verkapselten EPOs beobachtet. Im Gegensatz dazu bewirkte die Applikation von EPO-

gefüllten Behriplast®-Clots eine deutlich länger andauernde und wesentlich stärker ausgeprägte biologische Antwort. Hier war die maximale Retikuloctytenzahl ungefähr doppelt so hoch wie bei den clotfreien Formulierungen. Beide Implantate erreichten dieses Maximum nach ca. 144 h und den endogenen EPO-Level nach etwa 260 h. Die Unterschiede in der biologischen Wirkung von fibrinfreien und fibrinhaltigen Formulierungen spiegeln sich auch in den AUCs wider (vergleiche Tabelle 3-9). Sie waren für die Implantate mit EPO-gefüllten Liposomen um etwa das Vierfache größer als für die beiden EPO-Injektionen, obwohl in allen drei Fällen gleiche EPO-Mengen appliziert wurden. Dies läßt vermuten, daß der bei den EPO-Injektionen auftretende *burst release* trotz bewußt niedrig gewählter Wirkstoffdosen zu physiologisch irrelevant hohen EPO-Konzentrationen führt, die keine dosisabhängige biologische Antwort mehr erlauben.

Ein Vergleich der hier diskutierten Daten mit den in Abb. 3-13 und 3-15 dargestellten EPO-Freisetzungskinetiken zeigt, daß die Retikuloctytenzahlen nicht nur auf das Auftreten erhöhter EPO-Level im Blut mit Verzögerung reagieren. Auch geraume Zeit nach dem erneuten Erreichen endogener EPO-Konzentrationen ließen sich noch erhöhte Retikuloctytenzahlen nachweisen. Durch Extrapolation der Freisetzungskinetiken ergibt sich, daß die EPO-Konzentrationen im Fall der s.c. injizierbaren Formulierungen vermutlich nach 90 bis 100 h wieder auf normale Level abgesunken waren, während die Retikuloctytenzahlen erst nach weiteren 50 h wieder physiologische Werte aufwiesen. Die s.c. implantierten Behriplast®-Clots, die für ca. 150 h zu erhöhten EPO-Leveln führten (Daten nicht gezeigt), bewirkten auf der anderen Seite, daß sich die Retikuloctytenwerte erst nach etwa 260 h wieder normalisierten.

Wenn man davon ausgeht, daß die vollständige Ausreifung der Retikuloctyten zu Erythrocyten ca. 48 h dauert [PETRIDES, 1997], so stimmt dies im Fall des „freien“ bzw. liposomal verkapselten EPOs erstaunlich gut mit der Zeitspanne zwischen der Normalisierung der EPO-Konzentrationen und Retikuloctytenzahlen überein. Da die Retikuloctytenzahlen bei den EPO-Implantaten etwas langsamer abfielen, läßt sich vermuten, daß über die meßbaren Proteinfreisetzungen hinaus für eine geraume Zeit geringfügige EPO-Mengen aus den Clots freigesetzt wurden. Obwohl diese nicht mehr detektierbar waren, reichten sie offensichtlich aus, um die Erythropoese zu stimulieren und somit den Abfall der Retikuloctytenzahlen zu verlangsamen.

Der Umstand, daß für die vorliegenden Experimente normozytämische Mäuse verwendet wurden, könnte ebenfalls einen Einfluß auf die Geschwindigkeiten des Abbaus der Retikuloctyten gehabt haben. Normozytämische Mäuse verfügen im Gegensatz zu den bei EPO-Bioassays normalerweise verwendeten polyzytämischen Mäusen [COTES und BANGHAM, 1961;

DEGOWIN et al., 1962; KAZAL und ERSLEV, 1975] über eine Eigenerthropoese. Für diese wird ein sauerstoffsensitiver Mechanismus postuliert, der bei einer Sauerstoffunterversorgung des Organismus zu einer vermehrten Bildung von EPO führt (negative Rückkopplung) [MÖLLMANN, 1992]. Da jedoch ein solcher Regulationsmechanismus bei den hier verabreichten exogenen EPO-Mengen vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt, wurde sein Einfluß auf die in Abb. 3-16 dargestellten Retikuloerythrozytenzahlen nicht näher untersucht.

Es fällt auf, daß sich die Retikuloerythrozytenzahlen für beide Behriplast[®]-Formulierungen zum gleichen Zeitpunkt wieder normalisierten. Dies steht in gutem Einklang mit der bei diesen Clots ebenfalls zu beobachtenden zeitgleichen Normalisierung der EPO-Serumkonzentrationen (vergleiche Kapitel 3.2.4.3.1). Aufgrund der unterschiedlichen terminalen EPO-Halbwertszeiten der beiden s.c. applizierten Implantate erscheint es jedoch unverständlich.

Für diese vermeintlich widersprüchlichen Beobachtungen sind zwei Erklärungen denkbar. Zum einen könnten die *in vivo* Bedingungen dazu führen, daß die Behriplast[®]-verkapselten Liposomen nicht wie im Fall der *in vitro* Experimente über die gesamte Dauer der Freisetzung stabil sind (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3), sondern mit der Zeit zerfallen. Zum anderen könnten die Clots aufgrund von Abbau und mechanischer Belastung im Verlauf der *in vivo* Freisetzungskinetiken so „löchrig“ werden, daß auch intakte EPO-gefüllte Liposomen sie verlassen können, noch bevor der Clot vollständig abgebaut ist. In beiden Fällen würden die Endphasen der daraus resultierenden Freisetzungsmechanismen denen des Behriplast[®]-verkapselten „freien“ EPOs ähneln und zu einer vollständigen EPO-Freisetzung führen, noch bevor das Implantat vollständig abgebaut ist. Tabelle 3-10 zeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist. Behriplast[®]-Clots, in die ursprünglich liposomenverkapseltes EPO eingeschlossen worden war, enthielten ebenso wie Implantate mit „freiem“ EPO 20 Tage nach ihrer Implantation so gut wie keinen Wirkstoff mehr, obwohl beide Formulierungen zu diesem Zeitpunkt noch etwa ein Viertel ihrer ursprünglichen Größe besaßen.

Tabelle 3-10: EPO-Restgehalt von explantierten Behriplast[®]-Clots. Es handelt sich hierbei um die Implantate, die für die in Abb. 3-16 dargestellten Retikuloerythrozytenzählungen verwendet wurden. Alle Clots wurden ca. 480 h nach ihrer s.c. Implantation wieder explantiert, wobei die aufgeführten EPO-Restgehalte Mittelwerte von jeweils drei Clots darstellen.

		EPO-Restgehalt der explantierten Fibrinclots [%]
s.c.	●	< 0,01%
	●	0,11%

Durch den Einsatz von käuflichem Fibrinkleber (Behriplast[®]) anstelle des zuvor verwendeten selbst hergestellten Fibrins konnte die mechanische Stabilität der EPO-Implantate verbessert und ihr burst release im Tierexperiment verringert werden. Beide subcutan implantierten Behriplast[®]-Formulierungen zeigten Freisetzungskinetiken, die bezüglich ihrer Bioverfügbarkeiten mit denen der entsprechenden Fibrinclots vergleichbar waren. Die t_{max} -Werte und die terminalen Eliminationshalbwertszeiten wurden durch die Verwendung von Fibrinkleber für die Herstellung der Implantate durchweg erhöht. Dennoch blieb $t_{1/2}$ für Clots mit liposomenverkapseltem EPO deutlich größer als für entsprechende Formulierungen mit „freiem“ EPO. Um so erstaunlicher war die Beobachtung, daß die EPO-Level des Blutserums in beiden Fällen zum selben Zeitpunkt wieder physiologische Konzentrationen erreichten. Auch die Retikulozytenzahlen als biologische Antwort auf das aus den Clots freigesetzte EPO fielen für beide Implantate nach derselben Zeit erneut auf endogene Level ab. Diese in einem scheinbaren Widerspruch zu den *in vitro* Experimenten stehenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß entweder die im Clot eingeschlossenen Liposomen *in vivo* nicht dauerhaft stabil sind, oder daß der Clot mit der Zeit derart „löchrig“ wird, daß intakte Liposomen genauso aus ihm herausdiffundieren können wie „freies“ EPO. Auch das Ausmaß der Erythropoese wurde nicht durch die liposomale Verkapselung des EPOs beeinflusst, sondern lediglich durch seinen Einschluß in Fibrin. Die durch den Clot bewirkte Verstärkung der biologischen Antwort auf s.c. appliziertes EPO fiel um ein Vielfaches deutlicher aus, als dies aufgrund der geringen Unterschiede in den *in vivo* Freisetzungskinetiken von „freiem“ und fibrinverkapseltem „freiem“ EPO zu erwarten war.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, daß das biokompatible und bioabbaubare Fibrin als Polymermatrix für den sustained release von Proteinen geeignet ist. Die zusätzliche Verkapselung der Makromoleküle in Liposomen dient diesen nicht nur als Schutz vor der Umgebung, sondern ermöglicht auch die Modifizierung der Proteinfreisetzung. Trotz der zu beobachtenden signifikanten Unterschiede bei den *in vitro* und *in vivo* Freisetzungskinetiken von Clots mit „freiem“ bzw. liposomenverkapseltem Protein konnte durch die Liposomen jedoch keine Verlängerung der *in vivo* Proteinfreisetzung aus Fibrin und keine Beeinflussung der biologischen Wirkung der Implantate erzielt werden.

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Depotsystem für den *sustained release* von Peptid- und Proteinwirkstoffen zu entwickeln. Hierzu sollten zwei vornehmlich für die Verabreichung von niedermolekularen Wirkstoffen verwendete *drug delivery* Systeme in der Weise miteinander kombiniert werden, daß sich ihre jeweiligen Nachteile für das *delivery* von Makromolekülen aufheben. Die Idee bestand darin, durch die Verkapselung von proteingefüllten Liposomen in Fibrin eine Formulierung zu schaffen, die die empfindlichen Peptide und Proteine vor destabilisierenden Einflüssen der Umgebung schützt und deren Freisetzungskinetik sich ausschließlich über den Abbau des Polymers steuern läßt. Eine solche abbaugesteuerte Freisetzung erforderte nicht nur die dauerhafte Stabilität der Liposomen im Fibrin, sondern auch deren komplette Immobilisierung im Netzwerk des Polymers.

Durch eine kontrollierte Detergensdialyse von SPC-nOG-Mischmicellenlösungen wurden sog. nOG-Liposomen hergestellt, die unilamellar waren, eine Größe von etwa 300 nm besaßen und die Modellproteine POD bzw. EPO mit der theoretisch berechneten Einschlußrate einschlossen. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß diese Vesikel bei der Polymerisation des Fibrins nicht zerstört wurden und im auspolymerisierten Clot intakt waren. Da sie wesentlich größer waren als die Poren des stark verzweigten Fibrinnetzwerkes, konnte zudem davon ausgegangen werden, daß sie durch das Polymer vollständig festgehalten werden.

Nachfolgende *in vitro* Experimente bestätigten die Stabilität und Immobilisierung von proteingefüllten nOG-Liposomen in Fibrin. Während „freie“, d.h. nicht liposomenverkapselte POD innerhalb von 200 h vollständig aus dem Polymer freigesetzt wurde, war im gleichen Zeitraum bei der fibrinverkapselten liposomalen POD nur eine marginale Proteinfreisetzung zu beobachten. Erst durch den plasmininduzierten Abbau des Fibrins konnte in diesem Fall die Freisetzung der immer noch intakten Liposomen mitsamt des in ihnen eingeschlossenen Proteins erreicht werden.

Unter der Annahme, daß *in vivo* der Fibrinabbau langsamer ablaufen würde als die diffusionskontrollierte Freisetzung des „freien“ Proteins, war davon auszugehen, daß Clots mit nOG-liposomenverkapseltem Protein als abbaukontrolliertes *delivery* System bei ihrer Implantation in Mäuse eine bessere Depotwirkung aufweisen als Clots mit „freiem“ Protein. Als Modellprotein für die Tierversuche wurde EPO anstelle von POD verwendet, da ersteres deutlich längere Halbwertszeiten in Körperflüssigkeiten aufweist. Nach i.p. bzw. s.c.

Applikation der beiden Clottypen wurden die Proteinfreisetzungen anhand der Änderungen der EPO-Serumspiegel verfolgt. Hierbei zeigten die Implantate mit nOG-liposomenverkapseltem EPO zwar grundsätzlich größere mittlere Verweildauern und terminale Eliminationshalbwertszeiten als die Clots mit „freiem“ EPO, die Unterschiede zwischen den an identischen Orten implantierten Formulierungen fielen jedoch insgesamt sehr viel geringer aus als erwartet. So zeigten beide Implantate einen stark ausgeprägten *burst release*, wodurch ihre Proteinfreisetzungen denen der entsprechenden fibrinfreien Formulierungen, nämlich denen des „freien“ bzw. ausschließlich liposomenverkapselten EPOs sehr ähnlich wurden. Wie sich in zusätzlichen Experimenten zur Clotstabilität herausstellte, beruhte dieser *burst* jedoch nicht auf einer schnellen Resorption des Fibrins, sondern vielmehr auf der unzureichenden mechanischen Stabilität der Clots.

Um diesen zu verringern, wurden für weitere *in vivo* Experimente EPO-haltige Implantate verwendet, die aus Fibrinkleber hergestellt wurden. Diese sog. Behriplast[®]-Clots ließen aufgrund ihrer Zusammensetzung eine gegenüber den Fibrinclots verbesserte mechanische und biochemische Stabilität erwarten. Tatsächlich konnte hierdurch das zuvor beobachtete abrupte Schrumpfen der Implantate vollständig verhindert und der *burst release* der beiden Clot-Formulierungen abgeschwächt werden. Auch die terminalen Eliminationshalbwertszeiten der beiden Behriplast[®]-Clots waren signifikant größer als die der entsprechenden Fibrinclots. Nach wie vor zeigten die beiden Behriplast[®]-Implantate jedoch Kinetiken, die denen der Fibrin-implantate sehr ähnlich waren. Auch untereinander wiesen sie nur geringe aber dennoch signifikante Unterschiede auf. Erstaunlicherweise konnte durch den zusätzlichen Einschluß des EPOs in Liposomen keine Verlängerung der *in vivo* Proteinfreisetzung aus den Implantaten erzielt werden.

In einem weiteren *in vivo* Experiment wurde anhand von Retikulozytenzählungen die biologische Wirkung von vier verschiedenen EPO-Formulierungen („freies“ und liposomenverkapseltes EPO bzw. „freies“ und liposomenverkapseltes EPO im Behriplast[®]-Clot) untersucht. Trotz der großen Ähnlichkeit in ihren *in vivo* Freisetzungskinetiken zeigten sich hierbei zwischen den fibrinfreien und fibrinhaltigen Formulierungen entscheidende Unterschiede. So erreichten die Retikulozytenzahlen im Fall der s.c. implantierten Behriplast[®]-Clots erst ihr Maximum als sie für die entsprechenden fibrinfreien Applikationsformen schon wieder auf endogene Level abgesunken waren. Darüber hinaus lag dieses Maximum bei den Implantaten deutlich höher als bei den injizierbaren Formulierungen. Die liposomale Verkapselung des EPOs schien sich jedoch weder bei den fibrinfreien noch bei den fibrinhaltigen Formulierungen auf die Retikulozytenzahlen auszuwirken.

Um eindeutig klären zu können, warum die liposomale Verpackung des Modellproteins bei den *in vivo* Freisetzungskinetiken aus Fibrin eine eher untergeordnete Rolle spielte, obwohl sie *in vitro* die Freisetzung entscheidend beeinflusste, reichen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht aus. Sie erlauben z.B. keine Aussagen über die *in vivo* Stabilität der verwendeten Liposomen. Hierzu wäre ein Doppellabeling von liposomalem Bilayer und liposomenverkapseltem Protein hilfreich [POOL et al., 1982; STEIN et al., 1989]. Mit ihm ließe sich klären, wann und wo die proteingefüllten Liposomen der Fibrinimplantate ihren Inhalt freisetzen. Außerdem sollten die Experimente zur biologischen Wirksamkeit der Behriplast[®]-Formulierungen mit vergleichbaren und zudem deutlich geringeren EPO-Dosen an polyzytämischen Mäusen wiederholt werden [COTES und BANGHAM, 1961; DEGOWIN et al., 1962; KAZAL und ERSLEV, 1975]. Nur so kann beurteilt werden, ob die Clotformulierungen mit „freiem“ bzw. liposomenverpacktem EPO trotz kleiner aber signifikanter Unterschiede in den EPO-Freisetzungskinetiken tatsächlich die gleiche biologische Wirkung aufweisen.

5 Literatur

- ADAMSON, J.W. (1991) Erythropoietin: its role in the regulation of erythropoiesis and as a therapeutic in humans. *Biotechnology* **19**, 351-363.
- ADRIAN, G.; HUANG, L. (1979) Entrapment of proteins in phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **18**, 5610-5614.
- ADRIANOV, A.K.; PAYNE, L.G. (1998) Protein release from polyphosphazene matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **31**, 185-196.
- ALLEN, T.M.; CLELAND, L.G. (1980) Serum-induced leakage of liposome contents. *Biochim. Biophys. Acta* **597**, 418-426.
- ALLEN, T.M.; CHONN, A. (1987) Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* **223**, 42-46.
- ALLEN, T.M.; HANSEN, C. (1991) Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta* **1068**, 133-141.
- ALLISON, A.G.; GREGORIADIS, G. (1974) Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* **252**, 252.
- ALONSO, A; SAEZ, R; VILLENA, A.; GONI, F.M. (1982) Increase in size of sonicated phospholipid vesicles in the presence of detergents. *J. Membr. Biol.* **67**, 55-62.
- ALVING, C.R. (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J. Immunol. Methods* **140**, 1-13.
- ANDERSON, P.M.; SORENSON, M.A. (1994) Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin. Pharmacokinet.* **27**, 19-31.
- BLUME, G.; CEVC, G.; CROMMELIN, M.D.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.; KLUFT, C.; STORM, G. (1993) Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 180-184.

- BOUIN, P. (1897) Etudes sur l'évolution normale et l'involution du tube séminifère. *Arch. d'Anat. Micr.* **1**, 225-339.
- CLELAND, J.L.; POWELL, M.F.; SHIRE, S.J. (1993) The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation [Erratum in *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1994) **11**, 60]. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **10**, 307-377.
- CLELAND, J.L.; LANGER, R. (1994) Formulation and delivery of proteins and peptides: design and development strategies. In *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*. J.L. Cleland and R. Langer, eds. (Washington DC: American Chemical Society), 1-19.
- CLELAND, J.L.; MAC, A.; BOYD, B.; YANG, J.; DUENAS, E.T.; YEUNG, D.; BROOKS, D.; HSU, C.; CHU, H.; MUKKU, V.; JONES, A.J. (1997) The stability of recombinant human growth hormone in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm. Res.* **14**, 420-425.
- COFFIN, M.D.; MCGINITY, J.W. (1992) Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles in aqueous media. *Pharm. Res.* **9**, 200-205.
- COHEN, S.; BANO, M.C.; CHOW, M.; LANGER, R. (1991) Lipid-alginate interactions render changes in phospholipid bilayer permeability. *Biochim. Biophys. Acta* **1063**, 95-102.
- COSTANTINO, H.R.; LANGER, R.; KLIBANOV, A.M. (1994) Solid-phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions. *J. Pharm. Sci.* **83**, 1662-1669.
- COTES, B.M.; BANGHAM, D.R. (1961) Bioassay for erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a deduced pressure. *Nature* **191**, 1065-1067.
- DEBS, R.J.; HEATH, T.D.; PAPAHAJIOPOULOS, D. (1987) Targeting of anti-Thy 1.1 monoclonal antibody conjugated liposomes in Thy 1.1 mice after intravenous administration. *Biochim. Biophys. Acta* **901**, 183-190.
- DEGOWIN, R.L.; HOFSTRA, D.; GURNEY, C.W. (1962) The mouse with hypoxia-induced erythremia, an erythropoietin bioassay animal. *J. Lab. Clin. Med.* **60**, 846-852.
- DICKMANN, M. (1991) Untersuchungen zur Entwicklung eines In-vivo-Bioassays für Erythropoietin in einem normozythämischen Tiermodell. *Dissertation* (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg).

- DONG, C.; ROGERS, J.A. (1993) Acacia-gelatin microencapsulated liposomes: preparation, stability, and release of acetylsalicylic acid. *Pharm. Res.* **10**, 141-146.
- EDWARDS, K.; ALMGREN, M. (1990) Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles. *Colloid. Polymed. Sci.* **82**, 190-197.
- EPPSTEIN, D.A.; VAN DER PASS, M.A.; SCHRYVER, B.B.; FELGNER, P.L.; GLOFF, C.A.; SOIKE, K.F. (1986) Controlled release and localized targeting of interferons. In *Delivery Systems for Peptide Drugs*. S.S. Davis, L. Illum, and E. Tomlinson, eds. (New York: Plenum Press), 277-284.
- FOLKMAN, J.; LONG, D. (1964). The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *Surg. Res.* **4**, 139-142.
- FRIESS, W. (1998) Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 113-136.
- GABIZON, A.; PAPAHAJIOPOULOS, D. (1988) Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**, 6949-6953.
- GERLOWSKI, L.E.; JAIN, R.K. (1986) Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.* **31**, 288-305.
- GLÜCK, R. (1999) Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs). *Vaccine* **17**, 1782-1787.
- GOLDNER, J. (1938) A modification of the Masson trichrom technique for routine laboratory use. *Amer. J. Path.* **14**, 237-243.
- GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **31**, 267-285.
- GÖPFERICH, A.; GREF, R.; MINAMITAKE, Y.; SHIEH, L.; ALONSO, A.; TABATA, Y.; LANGER, R. (1994). Drug delivery from bioerodible polymers. In *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*. J.L. Cleland and R. Langer, eds. (Washington DC: American Chemical Society), 242-277.

- GRAHAM, R.C. JR.; KARNOVSKY, M.J. (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291-302.
- GREGORIADIS, G. (1976a) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* **295**, 704-710.
- GREGORIADIS, G. (1976b) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **295**, 765-770.
- GREGORIADIS, G. (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* **11**, 89-97.
- GREGORIADIS, G. (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* **13**, 527-537.
- GUPTA, R.K.; VARANELLI, C.L.; GRIFFIN, P.; WALLACH, D.F.; SIBER, G.R. (1996). Adjuvant properties of non-phospholipid liposomes (Novasomes) in experimental animals for human vaccine antigens [Erratum in *Vaccine* (1996) **14**, 1]. *Vaccine* **14**, 219-225.
- GÜNTHER, A.; KALINOWSKI, M.; ROSSEAU, S.; SEEGER, W. (1995) Surfactant incorporation markedly alters mechanical properties of a fibrin clot. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 712-718.
- HAUSER, H.; OLDANI, D.; PHILLIPS, M.C. (1973) Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles. *Biochemistry* **12**, 4507-4517.
- HEATH, T.D. (1987) Interaction of liposomes with cells. *Methods Enzymol.* **149**, 135-143.
- HEINZEL, G.; WOLOSZCZAK, R.; THOMANN, P. (1993) *TopFit: Version 2.0; Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC.* (Stuttgart: Gustav Fischer Verlag).
- HELLER, J. (1985) Controlled drug release from poly(ortho esters) - a surface eroding polymer. *J. Controlled Release* **2**, 167-177.

- HENSCHEN, A.; McDONAGH, J. (1986) Fibrinogen, fibrin and factor XIII. In *Blood coagulation*. R.F.A. Zwaal and H.C. Hemker, eds. (Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)), 171-241.
- HEUKSHOVEN, J.; DERNICK, R. (1985) Silberfärbung von Proteinen: Untersuchungen zum Mechanismus und Einfluß einiger Parameter auf die Effektivität der Silberfärbung. In *Elektrophorese Forum*. B.J. Radola, ed. (Technische Universität München), 108-118.
- HIRANO, K.; HUNT, C.A. (1985) Lymphatic transport of liposome-encapsulated agents: effects of liposome size following intraperitoneal administration. *J. Pharm. Sci.* **74**, 915-921.
- HO, H.S.; HSIAO, C.C.; SOKOLOSKI, T.D.; CHEN, C.Y.; SHEU, M.T. (1995) Fibrin-based drug delivery systems. III: The evaluation of the release of macromolecules from microbeads. *J. Controlled Release* **34**, 65-70.
- HUANG, C.; MASON, J.T. (1978) Geometric packing constrains in egg phosphatidylcholine vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 308-310.
- HUANG, S.K.; MAYHEW, E.; GILANI, S.; LASIC, D.D.; MARTIN, F.J.; PAPAHAJIOPOULOS, D. (1992) Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma. *Cancer Res.* **52**, 6774-6781.
- IKADA, Y. (1998). Preface. *Advanced Drug Delivery Reviews* **31**, 183-184.
- JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. (1998) Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24**, 703-727.
- JOHNSON, O.L.; JAWOROWICZ, W.; CLELAND, J.L.; BAILEY, L.; CHARNIS, M.; DUENAS, E.; WU, C.; SHEPARD, D.; MAGIL, S.; LAST, T.; JONES, A.J.; PUTNEY, S.D. (1997) The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm. Res.* **14**, 730-735.
- JULIANO, R.L.; STAMP, D. (1975) The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome-encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 651-658.

- KAMPF, D.; KAHL, A.; PASSLICK, J.; PUSTELNIK, A.; ECKARDT, K.U.; EHMER, B.; JACOBS, C.; BAUMELOU, A.; GRABENSEE, B.; GAHL, G.M. (1989) Single-dose kinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous, subcutaneous and intraperitoneal administration. Preliminary results. *Contrib. Nephrol.* **76**, 106-110.
- KAZAL, L.A.; ERSLEV, A.J. (1975) The measurement of erythropoietin. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **5**, 91-97.
- KEDAR, E.; RUTKOWSKI, Y.; BRAUN, E.; EMANUEL, N.; BARENHOLZ, Y. (1994a) Delivery of cytokines by liposomes. I. Preparation and characterization of interleukin-2 encapsulated in long-circulating sterically stabilized liposomes. *J Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.* **16**, 47-59.
- KEDAR, E.; BRAUN, E.; RUTKOWSKI, Y.; EMANUEL, N.; BARENHOLZ, Y. (1994b) Delivery of cytokines by liposomes. II. Interleukin-2 encapsulated in long-circulating sterically stabilized liposomes: immunomodulatory and anti-tumor activity in mice. *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.* **16**, 115-124.
- KIBAT, P.G.; IGARI, Y.; WHEATLEY, M.A.; EISEN, H.N.; LANGER, R. (1990) Enzymatically activated microencapsulated liposomes can provide pulsatile drug release. *FASEB J.* **4**, 2533-2539.
- KLIBANOV, A.L.; MARUYAMA, K.; BECKERLEG, A.M.; TORCHILIN, V.P.; HUANG, L. (1991) Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 142-148.
- KOZENOW, W.; MAY, H. (1952) Fluorescence microscopy of blood cells. *Ztschr. Kinderheilk.* **70**, 552
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LANGER, R.; FOLKMAN, J. (1976) Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* **263**, 797-800.

- LANGER, R.; FOLKMAN, J. (1978) Sustained release of macromolecules from polymers. In *Polymeric Delivery Systems*. R.J. Kostelnik, ed. (New York: Gordon and Breach), 175-196.
- LANGER, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature* **392**, 5-10.
- LASCH, J.; BERDICHEVSKY, V.R.; TORCHILIN, V.P.; KOELSCH, R.; KRETSCHMER, K. (1983) A method to measure critical detergent parameters. Preparation of liposomes. *Anal. Biochem.* **133**, 486-491.
- LASCH, J.; HOFFMAN, J.; RICHTER, W.; MEYER, H.W. (1992) Structural Perturbations of Phospholipid Bilayers Induced by the Neutral Detergent Octyl Glycoside. *J. Liposome Res.* **2**, 1-9.
- LASCH, J. (1995) Interaction of detergents with lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 269-292.
- LASIC, D.D.; MARTIN, F.J.; GABIZON, A.; HUANG, S.K.; PAPAHAJIOPOULOS, D. (1991) Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 187-192.
- LASIC, D.D. (1993) Preparation of liposomes. In *Liposomes: from physics to applications*. D.D. Lasic, ed. (Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.),. 63-107.
- LASIC, D.D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* **16**, 307-321.
- LEONG, K.W.; KOST, J.; MATHIOWITZ, E.; LANGER, R. (1986) Polyanhydrides for controlled release of bioactive agents. *Biomaterials* **7**, 364-371.
- LISBOA, B.P. (1964) Characterization of delta-3-oxo-C12-steroids on thinlayer chromatography by "in situ" colour reactions. *J. Chromatog.* **16**, 136-151.
- MAITANI, Y.; MORIYA, H.; SHIMODA, N.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. (1999) Distribution characteristics of entrapped recombinant human erythropoietin in liposomes and its intestinal absorption in rats. *Int. J. Pharm.* **185**, 13-22.
- MAKINO, Y.; SAKURAI, K.; MOCHIZUKI, S.; SUZUKI, Y. (1993) Novel sustained release medicine composition. *JP 07041432 A*

- MALVERN (1996) *Zetasizer 1000/2000/3000 manual: PCS Theory. Manual Number MAN 0152.* (Malvern, Malvern Instruments Ltd.)
- MANNING, M.C.; PATEL, K.; BORCHARDT, R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.* **6**, 903-918.
- MARUYAMA, K.; UNEZAKI, S.; TAKAHASHI, N.; IWATSURU, M. (1993) Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 209-216.
- MARUYAMA, K.; TAKIZAWA, T.; YUDA, T.; KENNEL, S.J.; HUANG, L.; IWATSURU, M. (1995) Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**, 74-80.
- MEMOLI, A.; ANNESINI, M.C.; PETRALITO, S. (1999) Surfactant-induced leakage from liposomes: a comparison among different lecithin vesicles. *Int. J. Pharm.* **184**, 227-235.
- MILSMANN, M.H.; SCHWENDENER, R.A.; WEDER, H.G. (1978) The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 147-155.
- MIMMS, L.T.; ZAMPIGHI, G.; NOZAKI, Y.; TANFORD, C.; REYNOLDS, J.A. (1981). Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry* **20**, 833-840.
- MORIYA, H.; MAITANI, Y.; SHIMODA, N.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. (1997) Pharmacokinetic and pharmacological profiles of free and liposomal recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administrations in rats. *Pharm. Res.* **14**, 1621-1628.
- MÖLLMANN, M. (1992). Erythropoietin - Physiologie and therapeutische Einsatzmöglichkeiten. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* **27**, 461-468.
- NEW, R.R.C. (1990a) Introduction. In *Liposomes: a practical approach*. R.R.C. New, ed. (Oxford: Oxford University Press), 1-32.
- NEW, R.R.C. (1990b) Preparation of Liposomes. In *Liposomes: a practical approach*. R.R. New, ed. (Oxford: Oxford University Press), 33-103.

- NOVIKOFF, A.B.; GOLDFISCHER, S. (1969) Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 675-680.
- OGAWA, Y.; OKADA, H.; YAMAMOTO, M.; SHIMAMOTO, T. (1988) In vivo release profiles of leuprolide acetate from microcapsules prepared with polylactic acids or copoly(lactic/glycolic) acids and in vivo degradation of these polymers. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **36**, 2576-2581.
- OKADA, H.; INOUE, Y.; HEYA, T.; UENO, H.; OGAWA, Y.; TOGUCHI, H. (1991) Pharmacokinetics of once-a-month injectable microspheres of leuprolide acetate. *Pharm. Res.* **8**, 787-791.
- OLLIVON, M.; EIDELMAN, O.; BLUMENTHAL, R.; WALTER, A. (1988) Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry* **27**, 1695-1703.
- OUSSOREN, C.; ZUIDEMA, J.; CROMMELIN, D.J.; STORM, G. (1997) Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim. Biophys. Acta* **1328**, 261-272.
- PANOSIAN, C.B.; BARZA, M.; SZOKA, F.; WYLER, D.J. (1984) Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome-intercalated amphotericin B. *Agents Chemother.* **25**, 655-656.
- PATEL, H.M. (1992) Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **9**, 39-90.
- PATERNOSTRE, M.T.; ROUX, M.; RIGAUD, J.L. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* **27**, 2668-2677.
- PETRIDES, P.E. (1997) Stoffwechsel spezifischer Gewebe: Blut. In *Biochemie und Pathobiochemie*. G. Löffler and P.E. Petrides, eds. (Berlin: Springer Verlag), 879-947.
- PFEIFER, S. (1995a) Pharmacokinetic drug interactions. Part 1: Drugs A-C. *Pharmazie* **50**, 163-179.

- PFEIFER, S. (1995b). Pharmacokinetic drug interactions. Part 2: Drugs D-O. *Pharmazie* **50**, 235-259.
- PFEIFER, S. (1995c) Pharmacokinetic drug interactions. Part 3: Drugs P-Z. *Pharmazie* **50**, 307-332.
- PIIT, C.G.; SCHINDLER, A. (1983) Biodegradation of Polymers. In *Basic Concepts*. S.D. Bruck, ed. (Boca Raton: CRC Press), 53-80.
- PLZAK, L.F.; FRIED, W.; JACOBSON, L.O.; BETHARD, W.F. (1955) Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe⁵⁹. *J. Lab. Clin. Med.* **46**, 671-678.
- POOL, G.L.; FRENCH, M.E.; EDWARDS, R.A.; HUANG, L.; LUMB, R.H. (1982) Use of radiolabeled hexadecyl cholesteryl ether as a liposome marker. *Lipids* **17**, 448-452.
- RAHMAN, Y.E. (1979) Potential of the liposomal approach to metal chelation therapy. *Front Biol.* **48**, 625-652.
- RAHMAN, Y.E.; CERNY, E.A.; PATEL, K.R.; LAU, E.H.; WRIGHT, B.J. (1982) Differential uptake of liposomes varying in size and lipid composition by parenchymal and kupffer cells of mouse liver. *Life Sci.* **31**, 2061-2071.
- RANADE, V.V. (1989a) Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J. Clin. Pharmacol.* **29**, 685-694.
- RANADE, V.V. (1989b) Drug delivery systems. 2. Site-specific drug delivery utilizing monoclonal antibodies. *J. Clin. Pharmacol.* **29**, 873-884.
- RANADE, V.V. (1990a) Drug delivery systems. 3A. Role of polymers in drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 10-23.
- RANADE, V.V. (1990b) Drug delivery systems. 3B. Role of polymers in drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 107-120.
- RANADE, V.V. (1990c) Drug delivery systems. 4. Implants in drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 871-889.

- RANADE, V.V. (1991a) Drug delivery systems. 5A. Oral drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **31**, 2-16.
- RANADE, V.V. (1991b) Drug delivery systems. 5B. Oral drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **31**, 98-115.
- Ranade, V.V. (1991c) Drug delivery systems. 6. Transdermal drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **31**, 401-418.
- ROMEIS, P. (1989a) Fixierung histologischer Präparate. In *Mikroskopische Technik*. B. Romeis, ed. (München: Urban & Schwarzenberg), 69-112.
- ROMEIS, P. (1989b) Färben der Schnitte. In *Mikroskopische Technik*. B. Romeis, ed. (München: Urban & Schwarzenberg), 179-250.
- RUIZ, J.; GONI, F.M.; ALONSO, A. (1988) Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochim. Biophys. Acta* **937**, 127-134.
- SANDRA, A.; PAGANO, R.E. (1979) Liposome-cell interactions. Studies of lipid transfer using isotopically asymmetric vesicles. *J. Biol. Chem.* **254**, 2244-2249.
- SCHERPHOF, G.; ROERDINK, F.; WAITE, M.; PARKS, J. (1978). Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **542**, 296-307.
- SCHERPHOF, G.; VAN LEEUWEN, B.; WILSCHUT, J.; DAMEN, J. (1983). Exchange of phosphatidylcholine between small unilamellar liposomes and human plasma high-density lipoprotein involves exclusively the phospholipid in the outer monolayer of the liposomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **732**, 595-599.
- SCHREIER, H. (1982). Liposomen - ein neuartiger Arzneistoffträger. I Phospholipide; Herstellung und Charakterisierung von Liposomen. *Pharmazie in unserer Zeit* **11**, 97-102.
- SCHUBERT, R.; BEYER, K.; WOLBURG, H.; SCHMIDT, K.H. (1986) Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochemistry* **25**, 5263-5269.

- SEGAL, S. (1987) A new delivery system for contraceptive steroids. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **157**, 1090-1092.
- SENDEROFF, R.I.; SHEU, M.T.; SOKOLOSKI, T.D. (1991) Fibrin based drug delivery systems. *J. Parenter. Sci. Technol.* **45**, 2-6.
- SESSA, G.; WEISSMANN, G. (1970) Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *J. Biol. Chem.* **245**, 3295-3301.
- SIERRA, D.H. (1993) Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications. *J. Biomater. Appl.* **7**, 309-352.
- SPIVAK, J.L. (1998). The biology and clinical applications of recombinant erythropoietin. *Semin. Oncol.* **25**, 7-11.
- STAHL, E. (1969) Spray reagents. In *Thin-Layer Chromatography*. E. Stahl, ed. (Berlin: Springer-Verlag), 857.
- STAHL, E.; KALTENBACH, U. (1961) Dünnschichtchromatographie. VI. Mitteilung. Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten. *J. Chromatog.* **5**, 351-355.
- STEIN, Y.; HALPERIN, O.; STEIN, O. (1980) Biological stability of [³H]cholesteryloleylether in cultured fibroblasts and intact rat. *FEBS Lett.* **111**, 104-106.
- STEWART, J.C.M. (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **104**, 10-14.
- TABATA, Y.; IKADA, Y. (1998) Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **31**, 287-301.
- TANGUAY, S.; BUCANA, C.D.; WILSON, M.R.; FIDLER, I.J.; VON ESCHENBACH, A.C.; KILLION, J.J. (1994) In vivo modulation of macrophage tumoricidal activity by oral administration of the liposome-encapsulated macrophage activator CGP 19835A. *Cancer Res.* **54**, 5882-5888.
- TANSWELL, P.; SEIFRIED, E.; STANG, E.; KRAUSE, J. (1991) Pharmacokinetics and hepatic catabolism of tissue-type plasminogen activator. *Arzneimittelforschung* **41**, 1310-1319.
- THIES, C. (1982). Microcapsules as drug delivery devices. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 335-383.

- TORCHILIN, V.P.; KLIBANOV, A.L.; HUANG, L.; O'DONNELL, S.; NOSSIFF, N.D.; KHAW, B.A. (1992) Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *FASEB J.* **6**, 2716-2719.
- TOYOSHIMA, Y.; THOMPSON, T.E. (1975) Chloride flux in bilayer membranes: chloride permeability in aqueous dispersions of single-walled, bilayer vesicles. *Biochemistry* **14**, 1525-1531.
- TSUDA, E.; KAWANISHI, G.; UEDA, M.; MASUDA, S.; SASAKI, R. (1990) The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* **188**, 405-411.
- UCHINO, R.; CARDINALI, M.; CHUNG, S.I. (1991) Regulation of extravascular fibrinolysis by factor XIII. *Fibrinolysis* **5**, 93-98.
- UENO, M. (1989) Partition behavior of a nonionic detergent, octyl glucoside, between membrane and water phases, and its effect on membrane permeability. *Biochemistry* **28**, 5631-5634.
- WANG, Y.J.; HANSON, M.A. (1988) Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers. *J. Parenter. Sci. Technol.* **42** supplement, S4-S26.
- WEBB, M.S.; HARASYM, T.O.; MASIN, D.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D. (1995) Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *Br. J. Cancer* **72**, 896-904.
- WEINER, A.L.; CARPENTER-GREEN, S.S.; SOEHNGEN, E.C.; LENK, R.P.; POPESCU, M.C. (1985) Liposome-collagen gel matrix: a novel sustained drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* **74**, 922-925.
- WEINER, A.L. (1994) Liposomes for protein delivery: selecting manufacture and development processes. *Immunomethods* **4**, 201-209.
- WISSE, E.; GREGORIADIS, G.; DAEMS, W.T. (1976) Electron microscopic cytochemical localization of intravenously injected liposome-encapsulated horseradish peroxidase in rat liver cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **73** PT-A, 237-245.
- WOLFF, B.; GREGORIADIS, G. (1984) The use of monoclonal anti-Thy1 IgG1 for the targeting of liposomes to AKR-A cells in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 259-273.

XIE, G.; TIMASHEFF, S.N. (1997) The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* **64**, 25-43.

ZUMBÜHL, O.; WEDER, H.G. (1981) Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 252-262.

6 Anhang

6.1 One Way ANOVA für die i.v. Daten aus Tabelle 3-5

Data source: $t_{\frac{1}{2}z}$, intravenous

Normality Test: Passed (P = 0.609)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.880)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr epo	6.429	1.370	0.685
lip epo	6.733	1.166	0.673

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800.
 You should interpret the negative findings cautiously.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	0.159	0.159	0.0950	0.770
Residual	5	8.351	1.670		
Total	6	8.510			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.770).

Data source: AUC, intravenous

Normality Test: Passed (P = 0.430)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.856)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	3	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr epo	1806.308	287.843	143.921
lip epo	1839.693	152.975	88.320

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800.
 You should interpret the negative findings cautiously.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	1910.693	1910.693	0.0323	0.864
Residual	5	295363.124	59072.625		
Total	6	297273.817			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference ($P = 0.864$).

Data source: MRT, intravenous

Normality Test: Passed ($P = 0.789$)

Equal Variance Test: Failed ($P = 0.032$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo§	3	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	5.767	5.325	6.108
lip epo	4.450	3.800	5.013

$H = 3.125$ with 1 degrees of freedom. $P(\text{est.}) = 0.077$ $P(\text{exact}) = 0.114$

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference ($P = 0.114$)

* **fr epo** steht für nicht liposomenverkapseltes, „freies“ EPO

§ **lip epo** steht für liposomenverkapseltes EPO

6.2 Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks für die i.p. Daten aus Tabelle 3-5

Data source: C_{\max} , intraperitoneal

Normality Test: Failed (P = 0.049)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	127.850	77.400	203.000
lip epo	83.200	66.100	107.050
fr clot	116.000	104.600	121.500
lip clot	37.050	29.850	39.850

H = 9.816 with 3 degrees of freedom. (P = 0.020)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected** by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.020)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	36.000	4	2.673	Yes
lip epo vs fr epo	13.000	3	1.275	No
fr clot vs fr epo	1.000	2	0.144	No Test Needed

Data source: t_{\max} , intraperitoneal

Normality Test: Passed (P = 0.257)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.140)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	4.175	3.792	4.308
lip epo	5.125	4.283	6.433
fr clot	3.175	2.808	3.575
lip clot	5.050	4.300	6.125

H = 9.858 with 3 degrees of freedom. (P = 0.020)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected** by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.020)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
fr clot vs fr epo	19.500	4	1.448	No
lip clot vs fr epo	17.000	3	1.667	No Test Needed
lip epo vs fr epo	16.500	2	2.382	No Test Needed

Data source: t_{1/2} z, intraperitoneal

Normality Test: Passed (P = 0.679)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.594)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	7.883	6.808	8.250
lip epo	5.792	5.067	6.608
fr clot	7.308	6.892	7.442
lip clot	12.000	11.542	12.708

H = 11.537 with 3 degrees of freedom. (P = 0.009)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.009)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip epo vs fr epo	23.000	4	1.708	No
lip clot vs fr epo	22.000	3	2.157	No Test Needed
fr clot vs fr epo	7.000	2	1.010	No Test Needed

Data source: AUC, intraperitoneal

Normality Test: Failed (P = 0.037)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	1634.980	1043.778	2165.384
lip epo	663.055	576.015	968.026
fr clot	1188.790	1131.982	1272.102
lip clot	439.197	384.179	440.577

H = 11.537 with 3 degrees of freedom. (P = 0.009)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.009)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	42.000	4	3.119	Yes
lip epo vs fr epo	23.000	3	2.255	Yes
fr clot vs fr epo	7.000	2	1.010	No

Data source: f, intraperitoneal

Normality Test: Failed (P = 0.037)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	90.530	57.795	119.899
lip epo	36.036	31.305	52.610
fr clot	65.824	62.679	70.438
lip clot	23.869	20.879	23.944

H = 11.537 with 3 degrees of freedom. (P = 0.009)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.009)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	42.000	4	3.119	Yes
lip epo vs fr epo	23.000	3	2.255	Yes
fr clot vs fr epo	7.000	2	1.010	No

Data source: MRT, intraperitoneal

Normality Test: Passed (P = 0.098)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.428)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	13.050	11.133	13.192
lip epo	10.158	8.767	12.408
fr clot	12.158	11.375	12.917
lip clot	14.292	12.617	16.108

H = 3.529 with 3 degrees of freedom. (P = 0.317)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.317)

Data source: MAT, intraperitoneal

Normality Test: Passed (P = 0.098)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.428)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	7.350	5.433	7.492
lip epo	5.758	4.367	8.008
fr clot	6.458	5.675	7.217
lip clot	9.892	8.217	11.708

H = 7.301 with 3 degrees of freedom. (P = 0.063)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.063)

* **fr epo** steht für nicht liposomenverkapseltes, „freies“ EPO

§ **lip epo** steht für liposomenverkapseltes EPO

† **fr clot** steht für „freies“ EPO im Clot

§ **lip clot** steht für liposomenverkapseltes EPO im Clot

6.3 Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks für die s.c. Daten aus Tabelle 3-5

Data source: C_{\max} , subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.050)
Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	43.650	34.750	51.550
lip epo	14.300	12.800	16.700
fr clot	26.150	24.550	26.950
lip clot	6.490	5.335	8.690

H = 14.118 with 3 degrees of freedom. (P = 0.003)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.003)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	48.000	4	3.565	Yes
lip epo vs fr epo	32.000	3	3.138	Yes
fr clot vs fr epo	16.000	2	2.309	Yes

Data source: t_{\max} , subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.145)
Equal Variance Test: Passed (P = 0.125)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	7.225	6.967	7.292
lip epo	10.608	10.242	10.933
fr clot	14.433	14.100	14.750
lip clot	12.567	11.900	13.892

H = 13.277 with 3 degrees of freedom. (P = 0.004)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.004)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
fr clot vs fr epo	45.000	4	3.342	Yes
lip clot vs fr epo	35.000	3	3.432	Yes
lip epo vs fr epo	16.000	2	2.309	Yes

Data source: t_{1/2} z, subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.787)
 Equal Variance Test: Failed (P = 0.004)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	8.033	6.242	9.025
lip epo	6.950	5.967	7.883
fr clot	6.500	6.175	7.375
lip clot	12.258	9.783	15.458

H = 8.903 with 3 degrees of freedom. (P = 0.031)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.031)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	27.000	4	2.005	No
lip epo vs fr epo	8.000	3	0.784	No Test Needed
fr clot vs fr epo	7.000	2	1.010	No Test Needed

Data source: AUC, subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.589)
 Equal Variance Test: Failed (P = 0.003)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	824.800	642.917	999.618
lip epo	272.851	256.388	288.238
fr clot	571.327	450.494	661.914
lip clot	167.221	123.908	256.993

H = 12.199 with 3 degrees of freedom. (P = 0.007)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.007)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	41.000	4	3.045	Yes
lip epo vs fr epo	33.000	3	3.236	Yes
fr clot vs fr epo	10.000	2	1.443	No

Data source: f, subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.581)
 Equal Variance Test: Failed (P = 0.003)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	45.670	35.599	55.350
lip epo	14.829	13.934	15.665
fr clot	31.635	24.944	36.651
lip clot	9.088	6.734	13.967

H = 12.199 with 3 degrees of freedom. (P = 0.007)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.007)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	41.000	4	3.045	Yes
lip epo vs fr epo	33.000	3	3.236	Yes
fr clot vs fr epo	10.000	2	1.443	No

Data source: MRT, subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.407)
 Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	16.250	14.492	17.333
lip epo	16.533	16.158	16.975
fr clot	18.417	17.667	19.417
lip clot	25.250	21.833	29.417

H = 12.199 with 3 degrees of freedom. (P = 0.007)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.007)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	40.000	4	2.970	Yes
fr clot vs fr epo	23.000	3	2.255	Yes
lip epo vs fr epo	1.000	2	0.144	No

Data source: MAT, subcutaneous

Normality Test: Passed (P = 0.407)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Group	N	Missing
fr epo*	4	0
lip epo [§]	4	0
fr clot [†]	4	0
lip clot [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr epo	10.550	8.792	11.633
lip epo	12.133	11.758	12.575
fr clot	12.717	11.967	13.717
lip clot	20.850	17.433	25.017

H = 11.912 with 3 degrees of freedom. (P = 0.008)

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.008)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip clot vs fr epo	46.000	4	3.416	Yes
fr clot vs fr epo	24.000	3	2.353	Yes
lip epo vs fr epo	18.000	2	2.598	Yes

* **fr epo** steht für nicht liposomenverkapseltes, „freies“ EPO

§ **lip epo** steht für liposomenverkapseltes EPO

† **fr clot** steht für „freies“ EPO im Clot

§ **lip clot** steht für liposomenverkapseltes EPO im Clot

6.4 One Way ANOVA für die Daten aus Tabelle 3-7

Data source: C_{\max} , Kleberclots

Normality Test: Failed (P = 0.030)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr kleber	7.700	7.055	8.745
lip kleber	1.630	1.465	2.365

H = 5.333 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.021 P(exact)= 0.029

The **differences** in the median values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.029)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunnett's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
lip kleber vs fr kleber	16.000	2	2.309	Yes

Data source: t_{\max} , Kleberclots

Normality Test: Passed (P = 0.149)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.211)

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr kleber	15.925	4.491	2.246
lip kleber	17.304	0.801	0.401

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.049

The power of the performed test (0.049) is below the desired power of 0.800.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	3.804	3.804	0.366	0.568
Residual	6	62.445	10.407		
Total	7	66.249			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.568).

Data source: t_{1/2}, Kleberclots

Normality Test: Passed (P = 0.316)
 Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr kleber	15.550	13.742	16.458
lip kleber	39.500	14.542	67.417

H = 1.333 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.248 P(exact)= 0.343

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.343)

Data source: AUC, Kleberclots

Normality Test: Passed (P = 0.565)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.550)

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr kleber	264.094	39.948	19.974
lip kleber	114.535	56.472	28.236

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.943

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	44735.864	44735.864	18.698	0.005
Residual	6	14354.909	2392.485		
Total	7	59090.773			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.005).

Multiple Comparisons versus Control Group (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q'	P<0.05
fr kleber vs. lip kleber	-149.559	2.000	6.115	Yes

Data source: f, Kleberclots

Normality Test: Passed (P = 0.562)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.568)

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr kleber	14.623	2.212	1.106
lip kleber	6.225	3.069	1.535

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.954

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	141.067	141.067	19.712	0.004
Residual	6	42.937	7.156		
Total	7	184.004			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.004).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr kleber vs. lip kleber	8.398	2	6.279	Yes

Data source: MRT, Kleberclots

Normality Test: Passed (P = 0.515)
 Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr kleber	29.417	26.250	32.917
lip kleber	63.917	29.917	102.083

H = 1.333 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.248 P(exact)= 0.343

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.343)

Data source: MAT, Kleberclots

Normality Test: Passed (P = 0.515)
 Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
fr kleber*	4	0
lip kleber§	4	0

Group	Median	25%	75%
fr kleber	23.717	20.550	27.217
lip kleber	59.517	25.517	97.683

H = 2.083 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.149 P(exact)= 0.200

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough** to exclude the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.200)

* **fr kleber** steht für „freies“ EPO im Behriplast®-Clot

§ **lip kleber** steht für liposomenverkapseltes EPO im Behriplast®-Clot

6.5 One Way ANOVA für den Vergleich von Fibrin- und Behriplast®-Kinetiken

Data source: C_{max}, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Passed (P = 0.464)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.634)

Group	N	Missing
fr clot*	4	0
fr kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr clot	25.750	1.642	0.821
fr kleber	7.900	1.383	0.692

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	637.245	637.245	276.490	<0.001
Residual	6	13.829	2.305		
Total	7	651.074			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr clot vs. fr kleber	17.850	2	23.516	Yes

Data source: C_{max}, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed (P = 0.500)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.143)

Group	N	Missing
lip clot†	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
lip clot	7.012	2.273	1.136
lip kleber	1.915	0.712	0.356

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.939

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	51.969	51.969	18.323	0.005
Residual	6	17.018	2.836		
Total	7	68.987			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.005).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
lip clot vs. lip kleber	5.097	2	6.054	Yes

Data source: t_{\max} , Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Failed (P = 0.038)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
fr clot*	4	0
fr kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
fr clot	14.433	14.100	14.750
fr kleber 1	5.025	13.092	18.758

H = 0.759 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.384 P(exact)= 0.486

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.486)

Data source: t_{\max} ; Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed (P = 0.408)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.372)

Group	N	Missing
lip clot [†]	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
lip clot	12.896	1.356	0.678
lip kleber	17.304	0.801	0.401

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.996

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	38.867	38.867	31.314	0.001
Residual	6	7.447	1.241		
Total	7	46.314			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.001).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
lip kleber vs. lip clot	4.408	2	7.914	Yes

Data source: $t_{1/2z}$, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Passed (P = 0.618)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.371)

Group	N	Missing
fr clot*	4	0
fr kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr clot	6.775	0.992	0.496
fr kleber	15.100	2.010	1.005

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	138.611	138.611	55.163	<0.001
Residual	6	15.076	2.513		
Total	7	153.688			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr kleber vs. fr clot	8.325	2	10.504	Yes

Data source: $t_{1/2z}$, Vergleich Fibrin-/Kleberclot mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed (P = 0.421)
 Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
lip clot [†]	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
lip clot	12.258	9.783	15.458
lip kleber	39.500	14.542	67.417

H = 3.036 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.081 P(exact)= 0.114

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.114)

Data source: AUC, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Passed (P = 0.366)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.075)

Group	N	Missing
fr clot*	4	0
fr kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr clot	556.204	138.865	69.432
fr kleber	264.088	39.950	19.975

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.909

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	170664.099	170664.099	16.348	0.007
Residual	6	62638.325	10439.721		
Total	7	233302.424			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.007).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr clot vs. fr kleber	292.116	2	5.718	Yes

Data source: AUC, Vergleich Fibrin-/Kleberclot mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed (P = 0.443)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.436)

Group	N	Missing
lip clot [†]	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
lip clot	190.451	89.882	44.941
lip kleber	114.529	56.472	28.236

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.134

The power of the performed test (0.134) is below the desired power of 0.800.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	11528.095	11528.095	2.046	0.203
Residual	6	33803.498	5633.916		
Total	7	45331.593			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are not great enough to exclude the possibility** that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.203).

Data source: f, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Passed (P = 0.366)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.075)

Group	N	Missing
fr clot*	4	0
fr kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr clot	30.798	7.689	3.845
fr kleber	14.623	2.212	1.106

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.909

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	523.223	523.223	16.347	0.007
Residual	6	192.044	32.007		
Total	7	715.267			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.007).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr clot vs. fr kleber	16.174	2	5.718	Yes

Data source: f, Vergleich Fibrin-/Kleberclot mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed (P = 0.443)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.436)

Group	N	Missing
lip clot†	4	0
lip kleber§	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
lip clot	10.351	4.885	2.442
lip kleber	6.225	3.069	1.535

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.134

The power of the performed test (0.134) is below the desired power of 0.800.

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	34.045	34.045	2.046	0.203
Residual	6	99.845	16.641		
Total	7	133.890			

The **differences** in the mean values among the treatment **groups are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.203).

Data source: MRT, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Passed (P = 0.398)
 Equal Variance Test: Passed (P = 0.056)

Group	N	Missing
fr clot*	4	0
fr kleber§	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr clot	18.542	1.075	0.537
fr kleber	29.583	4.351	2.176

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.982

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	243.836	243.836	24.274	0.003
Residual	6	60.270	10.045		
Total	7	304.107			

The **differences** in the mean values among the treatment groups are **greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference (P = 0.003).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr kleber vs. fr clot	11.042	2	6.968	Yes

Data source: MRT, Vergleich Fibrin-/Kleberclot mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed (P = 0.431)

Equal Variance Test: Failed (P = <0.001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
lip clot [†]	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
lip clot	25.250	21.833	29.417
lip kleber	63.917	29.917	102.083

H = 3.000 with 1 degrees of freedom. P(est.)= 0.083 P(exact)= 0.114

The **differences** in the median values among the treatment groups are **not great enough to exclude the possibility** that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference (P = 0.114)

Data source: MAT, Vergleich Fibrin-/Kleberclots mit „freiem“ EPO

Normality Test: Passed (P = 0.398)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.056)

Group	N	Missing
fr clot [*]	4	0
fr kleber [§]	4	0

Group	Mean	Std Dev	SEM
fr clot	12.842	1.075	0.537
fr kleber	23.883	4.351	2.176

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.982

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	1	243.837	243.837	24.274	0.003
Residual	6	60.271	10.045		
Total	7	304.108			

The **differences** in the mean values among the treatment groups **are greater than would be expected by chance**; there is a statistically significant difference ($P = 0.003$).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: Group t

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
fr kleber vs. fr clot	11.042	2	6.968	Yes

Data source: MAT, Vergleich Fibrin-/Kleberclot mit liposomenverkapseltem EPO

Normality Test: Passed ($P = 0.431$)

Equal Variance Test: Failed ($P = <0.001$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing
lip clot [†]	4	0
lip kleber [§]	4	0

Group	Median	25%	75%
lip clot	20.850	17.433	25.017
lip kleber	59.517	25.517	97.683

$H = 3.000$ with 1 degrees of freedom. $P(\text{est.}) = 0.083$ $P(\text{exact}) = 0.114$

The **differences** in the median values among the treatment groups **are not great enough to exclude** the possibility that the difference is due to **random sampling variability**; there is not a statistically significant difference ($P = 0.114$)

* fr clot steht für „freies“ EPO im Fibrinclot

§ fr kleber steht für „freies“ EPO im Behriplast[®]-Clot

† lip clot steht für liposomenverkapseltes EPO im Fibrinclot

§ lip kleber steht für liposomenverkapseltes EPO im Behriplast[®]-Clot

Lebenslauf

Name: Sabine Meyenburg
Geburtsdatum: 26.09.1969
Geburtsort: Goslar

Ausbildung:

8/1975-7/1979 Grundschole Jürgenohl in Goslar
8/1979-7/1981 Orientierungsstufe Goldene Aue in Goslar
8/1981-5/1988 Christian-von-Dohm Gymnasium in Goslar
5/1988 Aushändigung des Abiturzeugnisses

10/1988-3/1995 Chemiestudium an der TU Braunschweig
9/1992-8/1993 DAAD-Gaststudent an der University of Utah, USA
7/1994-3/1995 Diplomarbeit bei der Firma Boehringer Mannheim über das Thema
*„Synthese eines chromogenen Phospholipidsubstrates zur Bestimmung von
Inhibitionskonstanten und enzymkinetischen Daten ausgewählter Inhibitoren der
klonierten humanen Synovial-Phospholipase A₂“*
(Betreuer: Prof. Dr. K. Buchholz, Institut für landwirtschaftliche
Technologie und Zuckerindustrie, TU Braunschweig)

3/1995 Verleihung des Diploms

4/1995-12/1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.
Dr. G. Strack am Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle/Saale

seit 1/1996 Dissertation zum Thema
*„Entwicklung von Delivery-Systemen zur kontinuierlichen Abgabe
therapeutischer Proteine im Organismus“*
(Betreuer: Prof. Dr. R. Rudolph, Institut für Biotechnologie, Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg)

seit 2/2000 Postdoc bei der Firma Aventis Research & Technologies in Frankfurt
am Main

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Halle an der Saale,