

## Sterisch stabilisierte Vesikel

Danilo D. Lasic\*

Nach bedeutenden Fortschritten in der Flüssigkristall- und Polymerforschung interessierten sich Wissenschaftler vermehrt für lyotrope Systeme. So wurden das Phasenverhalten und die Stabilität kolloider Teilchen, die wasserlösliche oder oberflächenadsorbierte Polymere oder Block-Copolymere enthalten und als Suspensionen vorliegen, studiert. Am häufigsten untersucht wurden Micellen, Latexteilchen und Lipidvesikel (Liposomen). In Gegenwart hydrophiler Polymere aggregieren und verschmelzen Liposomen. Werden Blockcopolymere von Liposomen adsorbiert oder Tenside mit großen, polymeren polaren Kopfgruppen in die Liposomenmembran eingebaut, so

sind die Eigenschaften der Liposomen aufgrund der schlecht definierten Natur solcher Systeme schwer zu erklären. Liposomen mit Diacylgruppen enthaltenden Tensiden, die längere Polymerketten kovalent gebunden haben, zeigen viele neue Eigenschaften, die sowohl für die Grundlagenforschung als auch für mögliche Anwendungen von Bedeutung sind. Sie ermöglichen z.B. das Studium von Phasenverhalten und Polymerkonformation, von Skalierungsgesetzen, von Kolloid- und Oberflächeneigenschaften sowie von Zellfunktionen; unter Anwendungsgesichtspunkten steht die Verwendung von Liposomen als Wirkstofftransportsysteme im Vordergrund. Während

in der Grundlagenforschung die Theorie weiter ist als das Experiment, hinkt der medizinischen Anwendung das theoretische Verständnis hinterher. Erst relativ spät wurde entdeckt, daß Liposomen in biologischem Milieu – für ihre Verwendung als Wirkstoffträger unvermeidbare Bedingungen – bedeutend stabiler sind, wenn sie mit bestimmten Polymeren beschichtet werden. Durch diese Erkenntnis wurden Anstrengungen, Liposomen in der Krebstherapie und für den gezielten Wirkstofftransport einzusetzen, wiederbelebt. All dies war nur durch effektives und synergistisches Zusammenspiel mehrerer wissenschaftlicher Fachgebiete möglich.

### 1. Einführung

In der Natur kommen Stoffe im allgemeinen in drei Zuständen vor. Manche Stoffe verhalten sich jedoch unter bestimmten Bedingungen weder als Gas, noch als Flüssigkeit noch als Feststoff. Flüssigkristalle z.B. zeigen einige Eigenschaften von Flüssigkeiten, wie niedrige Viskosität und Neigung zur Tropfenbildung, aber auch solche von Feststoffen, wie Anisotropie von optischen, mechanischen, elektrischen und magnetischen Eigenschaften<sup>[1]</sup>. Der flüssigkristalline Zustand ermöglicht bei relativ hohen Diffusions- und Permeabilitätsgeschwindigkeiten Organisations- und Ordnungsphänomene, er hat Barriereneigenschaften und dient als Informationsspeicher<sup>[2]</sup>. Dies alles ist für biologische Prozesse wichtig, wenn nicht sogar notwendig. Die Lipiddoppelschicht ist die in lebenden Zellen am häufigsten gefundene Mesophase. In ihr ordnen sich Lipidmoleküle in großen Schichten, die sich zu Membranen zusammenschließen. Sie können sowohl eine flüssig- als auch eine festanaloge Phase bilden. Die Temperatur des Phasenübergangs vom Kristall zum Flüssigkristall ( $T_c$ ), bei der der zweidimensionale Festkörper fluide

wird, ist ein wichtiger Parameter für das Verhalten von Liposomen und Biomembranen.

Einige Verbindungen bilden in zahlreichen Lösungsmitteln aufgrund von molekularen Wechselwirkungen geordnete Strukturen. In den meisten Fällen haben diese *Amphiphile* eine hydrophile und eine hydrophobe Gruppe im selben Molekül. Sie können zahlreiche lyotrope flüssigkristalline Phasen bilden, deren Struktur durch polare und nicht polare Wechselwirkungen der beiden Gruppen enthaltenden Moleküle bestimmt wird. Solche Amphiphile sind z.B. einige Proteine, Polypeptide und vor allem polare Lipide<sup>[3–5]</sup>.

Polare Lipide aggregieren in wässriger Lösung zu geordneten Strukturen und verschiedenen flüssigkristallinen Phasen (Abb. 1). Zwar können Phasendiagramme manchmal in Kenntnis der Molekülgeometrie und zwischenmolekularer Wechselwirkungen berechnet werden, im allgemeinen beruht die Selbstorganisation dieser Systeme jedoch darauf, daß die hydrophilen Teile des Moleküls den Kontakt zu Wasser suchen, während die nicht polaren Gruppen eine unpolare Umgebung bevorzugen. Die Strukturen zahlreicher flüssigkristalliner Phasen und kolloider Aggregate weisen genau diese molekulare Ordnung auf<sup>[1–5]</sup>.

Flüssigkristalle sind durch Fernordnung und, in Abhängigkeit von der Temperatur, durch Nahordnung oder -unordnung charakterisiert. In bezug auf die Symmetrie kann eine einzelne Phase durch null-, ein- oder zweidimensionale Positionsperiodi-

[\*] Dr. D. D. Lasic  
MegaBios Corp.  
871-J Industrial Road, San Carlos, CA 94070 (USA)  
Telefax: Int. + 415/802-0355

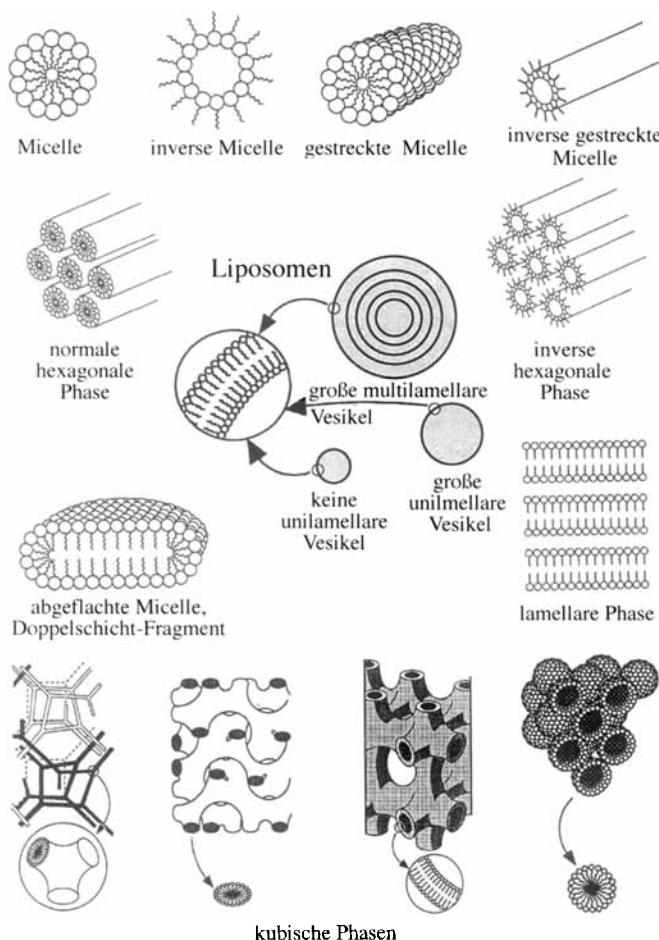


Abb. 1. Schematische Darstellung von zahlreichen Aggregaten und Phasen, die von Amphiphilen im Gemisch mit Wasser bei unterschiedlichen Konzentrationen gebildet werden. Sphärische inverse Micellen entstehen nur mit einigen geladenen, einketigen Tensiden bei höheren Temperaturen, während sie in ternären Gemischen mit einer nicht polaren Phase öfter auftreten. In wäßrigen Suspensionen wird die inverse hexagonale Phase von einer Lipidmonoschicht umhüllt. Der offene Kreis steht für den hydrophilen Teil des Moleküls, während das hydrophobe Ende als geschlängelte Linie dargestellt ist.

zität und in gewissem Maße durch Orientierungsordnung charakterisiert sein. Mit Ausnahme von einigen nicht im Gleichgewicht stehenden kubischen Phasen<sup>[6]</sup> sind diese Zustände thermodynamisch stabil, so daß sich die Moleküle durch reversible Selbstorganisation Änderungen von Konzentration(en), Temperatur, Druck, Ionenstärke oder pH-Wert anpassen können.

Die periodische Lipid-Wasser-Struktur von lyotropen flüssigkristallinen Phasen kann sich bei Verdünnung unter Bildung kolloider Teilchen auflösen. Dieser Vorgang wird besonders durch Rühren oder Schütteln gefördert. Dabei bleiben die molekulare Anordnung und die lokale molekulare Symmetrie in kleinen und mittleren Entfernungen bestehen, während die Fernordnung verloren geht. Die homogenen lyotropen flüssigkristallinen Phasen können bei Verdünnung auch in ein heterogenes System zerfallen, das eine voll verquollene flüssigkristalline Phase in einem Überschuß an Wasser enthält<sup>[4]</sup>. Der Zerfall von großen Micellen normaler hexagonaler Phasen aus polaren Lipiden mit einfachen Ketten in kleine Micellen ist ein Beispiel für den erstgenannten Prozeß<sup>[4]</sup>. Brechen hingegen die aus Diacyllipiden gebildeten lamellaren Phasen zusammen, entstehen gewöhnlich Liposomen<sup>[7]</sup>. Der Zerfall der flüssigkristallinen Phase in kolloide Partikel und der damit verbundene Verlust der Fernordnung führt, außer bei einfachen Micellen, zum Verlust der thermodynamischen Stabilität des Systems<sup>[8]</sup>.

Liposomen sind sphärische, in sich geschlossene Vesikel von kolloider Dimension mit Phospholipid-Doppelschichten, die Teile des Lösungsmittels, in denen sie suspendiert sind, in ihren Innenraum einschließen<sup>[9, 10]</sup>. Abhängig von Größe und Zahl der Lamellen definiert man kleine und große unilamellare Vesikel sowie bei vielen konzentrischen Doppelschichten große multilamellare Vesikel (Abb. 1)<sup>[11]</sup>.

Aufgrund ihrer Struktur, chemischen Zusammensetzung und kolloider Größe, die bei der Herstellung gut zu kontrollieren sind, haben Liposomen einige nützliche Eigenschaften. Die wichtigsten Merkmale sind kleiner Durchmesser, fast einheitliche Teilchengrößenverteilung in Bereichen von 20 bis 500 nm (es gibt aber auch Methoden, die die Bildung von größeren Liposomen mit Durchmessern bis zu 50 µm erlauben) und spezielle Membran- und Oberflächencharakteristika. Dazu zählen das Phasenverhalten der Doppelschicht, ihre mechanischen Eigenschaften und Permeabilität, Ladungsdichte, die Anwesenheit von oberflächengebundenen oder gepropften Polymeren sowie das Verknüpfen mit speziellen Liganden. Durch ihren amphiphilen Charakter und ihr sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sind Liposomen für eine Reihe von Verbindungen wirksame Lösungs- und Dispersionssysteme. Neben diesen physikochemischen Eigenschaften verfügen Liposomen aus natürlichen Lipiden über spezielle biologische Merkmale wie Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit sowie (spezifische) Wechselwirkungen mit biologischen Membranen und Zellen<sup>[2]</sup>.



Danilo D. Lasic wurde 1952 in Ljubljana (heute Slowenien) geboren, wo er Chemie und Physik studierte. 1979 promovierte er am J.-Stefan-Institut über lyotrope Flüssigkristalle. Nach Postdoktorandenjahren bei C. Tanford (Duke University) und H. Hauser (ETH Zürich) sowie einer Visiting-Scientist-Position am Physik-Department der University of Waterloo in Ontario, Kanada, arbeitete er von 1988–1993 für die Firma Liposome Technology Inc. (LTI) in der Nähe von San Francisco. Seit Anfang des Jahres arbeitet er bei der Firma MagaBios. In seiner Hochschulzeit beschäftigte er sich mit der Thermodynamik und dem Mechanismus der Vesikelbildung. Bei LTI war er an der Entwicklung der Stealth-Liposomen beteiligt, und derzeit beschäftigt er sich mit kationischen Liposomen sowie mit DNA-Liposomen-Komplexen in der Gentherapie. 1993 erschien ein Buch von ihm mit dem Titel „Liposomes: from Physics to Applications“.

Auf diesen Eigenschaften basiert die Anwendung von Liposomen als Lösungs- oder Dispersionsmittel für schwer lösliche Substanzen, als Depot- und Transportsysteme, Stabilisatoren, Schutzstoffe und Mikroreaktoren. Alle lebenden Zellen dieser Planeten sind von einer Membran umgeben, in der Proteine in Lipiddoppelschichten eingelagert sind. Diese Doppelschicht, ähnlich der Liposomen-Doppelschicht, ist eine mechanische, chemische und elektrische Barriere zwischen Innen- und Außenraum. Daher sind Liposomen nicht nur für die oben erwähnten Anwendungen von Interesse, sie eignen sich auch als Modellsysteme für topologische, biophysikalische, photophysikalische und photochemische Studien; an ihnen lassen sich kolloide Wechselwirkungen, Zellfunktionen, Signalübertragung (einschließlich des Transports von synaptischen Vesikeln mit verkapselten Neurotransmittern), Sekretion und vieles mehr untersuchen<sup>[2, 5, 11–16]</sup>.

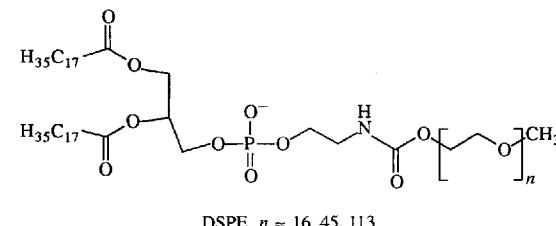
Da die Doppelschichten aus ausschließlich natürlich vorkommenden Substanzen hergestellt werden können, sind sie nicht toxisch, biologisch abbaubar und praktisch nicht immunogen und damit ideal als Wirkstofftransportsystem geeignet. Liposomen werden industriell auch als Adjuvanten bei Impfungen, Signalverstärker oder -träger in der medizinischen Diagnostik und in der analytischen Biochemie sowie als Transfektionsvektoren in der Genforschung verwendet. Der größte Markt liegt gegenwärtig jedoch in der Kosmetik, wo Liposomen als Dispersionsmittel und/oder Trägermatrix für zahlreiche Bestandteile dienen; nach einigen Berichten sollen sie auch deren Penetrationsverhalten verbessern<sup>[2]</sup>. Obwohl einige Ansprüche der kosmetischen Produkte nicht durch strenge wissenschaftliche Tests gestützt werden, bieten Liposomen zumindest dadurch eine Verbesserung, daß hier hydrophobe Substanzen in einer wäßrigen und biokompatiblen Matrix suspendiert sind, anstatt in hautreizenden Ölen, Alkoholen und Tensiden<sup>[2]</sup>.

## 2. Liposomen als Wirkstofftransportsysteme

Die optimistischen Erwartungen, die in Liposomen als Wirkstofftransportsysteme gesetzt wurden, konnten hauptsächlich aufgrund mangelnder Stabilität nicht erfüllt werden. Zwar hat man die Probleme der Lagerbeständigkeit von Liposomen in den meisten Fällen schon vor einiger Zeit gelöst, sie in biologischem Milieu zu stabilisieren blieb hingegen eine größere Herausforderung, die erst kürzlich gemeistert wurde<sup>[17, 18]</sup>.

Intravenös verabreichte Liposomen setzen die verkapselten oder membrangebundenen Moleküle sehr schnell frei. Der Austritt (engl. leakage) kann jedoch durch Einbau von Cholesterin in die Membranen stark vermindert werden<sup>[19]</sup>. Dies half jedoch wenig dagegen, daß die hauptsächlich in Leber und Milz befindlichen Mononukleären Phagocyten (MPs) des Immunsystems die Liposomen schnell absondern und beseitigen, was als grösster Nachteil für die meisten Anwendungen angesehen wird. In den späten siebziger Jahren wurden erste Versuche unternommen, die Bioverteilung durch Anbringen von Oberflächenliganden oder Veränderung der Membranzusammensetzung zu verbessern. Die Ergebnisse zeigten, daß das Liposomenverhalten innerhalb des MP-Systems verändert werden kann. Die längsten Zirkulationszeiten erreichen kleine, neutrale, aus starren Lipiden und Cholesterin hergestellte Liposomen, vorausgesetzt man

will das Immunsystem nicht durch Vorsättigung mit Liposomen unterdrücken oder schwächen. Die erste entscheidende Verbesserung wurde durch Inkorporation von 5–10 Mol-% Gangliosid G<sub>M1</sub> oder Phosphatidylinositol in die Doppelschicht erreicht<sup>[20]</sup>. Die besten Ergebnisse erhielt man jedoch, wenn diese beiden Lipide durch synthetische, Polymerketten enthaltende Lipide ersetzt wurden. Kovalent an das Phospholipid gebundenes Polyethylenglykol (PEG) ergab die längsten Zirkulationszeiten (Abb. 2). Durch Einbau von ca. 5 Mol-% von Substanzen mit mittleren Molekulmassen (1500 und 5000 Da) in die Doppelschicht erreicht man die längsten Liposomenzirkulationszeiten im Blut<sup>[18]</sup>. Abbildung 3 zeigt Blutclearanceprofile mehrerer Formulierungen.



DSPE,  $n \approx 16, 45, 113$

Abb. 2. Formel des Polyethylenglykol(PEG)-Lipids DSPE, das normalerweise als Natriumsalz verwendet wird. Gebräuchliche relative Molekulmassen von PEG sind 750, 1000, 2000, 3000, 5000 und 12000. Kommerzielles PEG hat häufig einen Polydispersionsindex  $p$  von 1.1, BioTech-Qualität hat einen von 1.05;  $p$  ändert sich bei der Kupplung nicht.

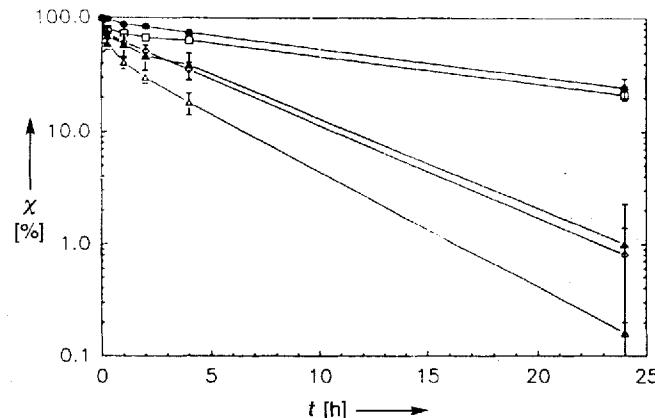


Abb. 3. Blutclearanceprofile einiger Liposomenformulierungen.  $x$  = Prozent der injizierten Dosis als Funktion der Zeit. Von oben nach unten: <sup>2000</sup>mPEG-DSPE/EPC-Chol (●), <sup>500</sup>mPEG-DSPE/EPC/Chol (□), <sup>120</sup>mPEG-DSPE/EPC/Chol (▲), EPC/Chol (2/1) (◊) und EPG/EPG(Chol) (Δ); Formulierungen mit molaren Verhältnissen von 0.15/1.85/1. Abkürzungen: mPEG Methoxypolyethyleneglykol, DSPE Distearolyphosphatidylethanolamin, EPC teilweise hydrierte Ei-Phosphatidylcholin (Iodzahl 40), Chol Cholesterin, EPG Ei-Phosphatidylglycerin. 100-nm-Liposomen wurden mit <sup>67</sup>Ga-Desferal markiert (nach Lit. [67]).

Analoge Versuche wurden mit anderen Kolloidsystemen von micellenbildenden Blockcopolymeren<sup>[21]</sup> bis Latexteilchen<sup>[22]</sup> angestellt. Während Latexteilchen mit adsorbierten Blockcopolymeren wie PEG-PPO (Polyethylenglykol-Polypropylenoxid) ähnliche Änderungen der Pharmakokinetik wie PEG-veredelte Liposomen zeigen<sup>[22]</sup>, werden Blockcopolymer-Micellen mit PEG-Ketten schnell durch Makrophagen (durch Pinocytose) aufgenommen<sup>[21]</sup>.

Im allgemeinen bietet die Oberflächen-Pfropspolymerisation aber eine bessere Kontrolle der kolloiden Eigenschaften. Lipo-

somen, deren Oberfläche Polymere nur adsorbiert hat, sind gewöhnlich nicht dicht genug, d.h. sie verlieren die verkapselten Moleküle zu schnell<sup>[23]</sup> oder sie aggregieren.

Die gesteigerte Stabilität von Liposomen im biologischen Milieu röhrt unserer Ansicht nach daher, daß die oberflächengebundenen Polymere eine sterische Barriere für die angreifenden Makromoleküle bieten. Aus diesem Grund werden sie oft als sterisch stabilisierte Liposomen<sup>[24]</sup> bezeichnet. Der Handelsname Stealth-Liposomen<sup>[\*]</sup> macht deutlich, daß sie für das körpereigene Immunsystem unsichtbar sind (Abb. 4).

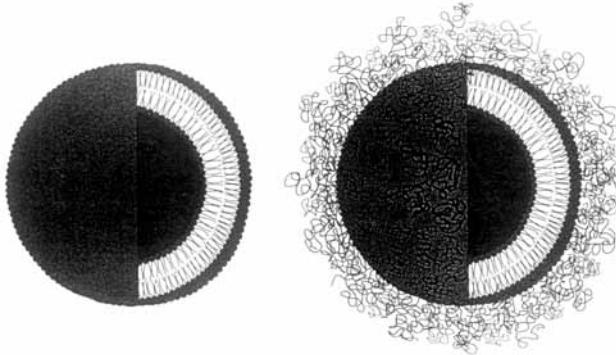


Abb. 4. Schematische Darstellung von konventionellen Liposomen (links) und Stealth-Liposomen (rechts). Polymerketten können auf einer oder auf beiden Seiten der Vesikel angebracht sein. Ich danke Phillip Le Roy Carter, Liposome Technology, Inc., für die Abbildung.

### 3. Stabilität von Liposomen

Bei Liposomen wird der Begriff Stabilität in Forschung und Anwendung sehr unklar gebraucht und ist oft nicht genau definiert. Im weitesten Sinne versteht man darunter die Stabilität der Liposomen und ihrer Bestandteile samt der eingeschlossenen Moleküle in beliebiger, auch liposomenerstörender („liposomicer“) Umgebung. Diese allgemeine Definition von Stabilität enthält einige Aspekte, die zwar getrennt definiert werden können, oft aber synergistisch wirken. Wir definieren die Stabilität willkürlich als Summe und Produkt von physikalischer, chemischer und kolloider Stabilität. Zusätzlich zu diesen inhärenten Stabilitätskomponenten muß man die Stabilität unter Anwendungsbedingungen – oft in liposomicer Umgebung – betrachten. Da die meisten Anwendungen pharmazeutischer Natur sind, kann man zusätzlich die biologische Stabilität und die Lagerbeständigkeit definieren, die durch einige der oben erwähnten Stabilitätsmerkmale bestimmt werden.

#### 3.1. Physikalische Stabilität

Hierbei geht es vor allem um die Aufrechterhaltung von Struktur und Käfigeigenschaften der Liposomen, d.h. um Stabilität von Größe und Form (Größenverteilung der Probe) sowie der Barriereneigenschaften der Doppelschicht für die verkapselten oder membrangebundenen Moleküle. Größen- und Barrieren-

stabilität hängen von den mechanischen Eigenschaften der Doppelschicht und von den thermodynamischen Parametern des Systems ab.

Vesikel sind aufgrund der Tatsache, daß ihre symmetrische Membran gekrümmt ist, thermodynamisch instabil, da die energieärmere Konformation normalerweise die ebene ist, d.h. die spontane Krümmung  $c_0 = 0$ . Für jede Vesikel ergibt sich durch ihre Krümmung ein Energieüberschuß von  $8\pi K$ , wobei  $K$  der elastische Biegungsmodul der Membran ist<sup>[2, 25, 26]</sup>. Vesikel können sich daher nur dann spontan bilden<sup>[27]</sup>, wenn die Doppelschicht niedrige Werte für  $K$  aufweist<sup>[28]</sup> oder eine asymmetrische Doppelschicht mit einer spontanen Krümmung vorliegt; dies kann von Unterschieden zwischen innerer und äußerer Phase, von nicht ausgewogener Lipiddzusammensetzung oder von der Verwendung asymmetrischer bipolarer Lipide herrühren<sup>[29–35]</sup>.

Sobald sich ein Liposom gebildet hat, ist es jedoch ziemlich stabil. Das weist darauf hin, daß die Bildung von Liposomen kinetisch kontrolliert ist; sie werden unter Bedingungen von hohen Energieüberschüssen durch eine irreversible Nicht-Gleichgewichtsreaktion gebildet<sup>[2, 8, 26, 36]</sup>. Um das Liposom zu öffnen oder zu zerstören, wird eine Energie von ca.  $50 \text{ kJ}$  benötigt<sup>[2, 37]</sup>. Diese Analyse zeigt, daß die Energie, die dem System bei der Liposomenbildung zugeführt wird, zum Teil in der Doppelschicht (Doppelschichtkrümmung<sup>[38]</sup>) als konformativ Energie gespeichert ist. Diese ist für die Metastabilität der Liposomen verantwortlich.

Ein einfaches Gedankenexperiment zeigt am Beispiel der Mikroverkapselung den Vortrag von kinetisch abgefangenen Systemen gegenüber Systemen im thermodynamischen Gleichgewicht. Ein System im Gleichgewicht paßt sich äußeren Änderungen wie Verdünnung, Änderung von Konzentration(en), Temperatur oder Druck, der Gegenwart anderer Substanzen oder der Injektion in Körperflüssigkeit durch Phasenänderung an. So lösen sich z.B. Micellen oder die Tröpfchen einer Mikroemulsion bei Verdünnung schnell auf (d.h. sie nehmen im Phasendiagramm eine andere Position ein), während Liposomen aus Phospholipid mit sehr niedrigen Werten für die kritische Micellenkonzentration (cmc) gegenüber Verdünnung stabil sind. Viele der unerwarteten Befunde bei der Untersuchung des Arzneimitteltransports durch kolloide Träger sind durch diese einfachen Überlegungen zu erklären.

Es ist auch interessant, daß Liposomen durch Zugabe von wasserlöslichen Frostschutzmitteln, z.B. Sucrose, gegenüber Phasenübergängen wie Gefriertauen und Gefrieretrocknen stabilisiert werden können. Das ermöglicht es, gefriergetrocknete (lyophilierte) Liposomenformulierungen mit verbesserter Lagerfähigkeit herzustellen<sup>[39]</sup>.

Die Haltbarkeit von Liposomen hängt auch von den mechanischen Eigenschaften der Doppelschicht ab. Mechanisch stärkere Doppelschichten – solche mit höheren Kohäsionskräften – sollten äußeren Störungen besser widerstehen können. Messungen von Mikropipettenmanipulationen erlauben es, die Streckmodule einzelner Membranen [isotrope Dehnungsmodul ( $K_{d/c}$ ) und kritische Flächenspannung ( $\tau$ ) von Doppelschichten<sup>[40, 41]</sup>] zu bestimmen. Man fand, daß diese Werte mit der Stabilität von Liposomen im Zusammenhang stehen. Tabelle 1 zeigt die Werte von  $K_{d/c}$  und  $\tau$  für einige Doppelschichten. Eine allgemeine Beobachtung ist, daß Cholesterin durch die Induktion einer geord-

[\*] Stealth Liposome ist ein eingetragener Handelsname der Liposome Technology, Inc., Menlo Park, CA, USA.

Tabelle 1. Mechanische Eigenschaften von Doppelschichten, die durch Mikropipetten-Manipulationstechnik gemessen wurden. Es sind Kompressibilitätsmodule  $K_{de}$  der elastischen Bereiche und Zugfestigkeit  $\tau$  von zahlreichen Liposomen-Doppelschichten angegeben. Aus *Biochemistry* 1988, 27, 8261 und 1992, 31, 2017 sowie *Biophys. J.* 1990, 58, 997.

Zusammensetzung [mol mol <sup>-1</sup> ] [a]	$K_{de}$ [dyn cm <sup>-1</sup> ]	$\tau$ [dyn cm <sup>-1</sup> ]
SOPC	193	5.7
SOPC/Chol (ca. 86/14)	216	8.7
SOPC/Chol (ca. 50/50)	≈ 1200	24.9
DMPC	145	
DMPC/Chol (67/33)	559	
DMPC/Chol (50/50)	633	
DMPC (L <sub>e</sub> )	855	
DPPC/Chol	2235	
BSM/Chol (ca. 50/50)	≈ 1720	23.2
DAPC	57	2.3
DAPC/Chol (ca. 50/50)	102	4.5

[a] Abkürzungen: SOPC: Stearoyloleoylphosphatidylcholin, Chol: Cholesterin, DMPC: Dimiristoyl-PC, DPPC: Dipalmitoyl-PC, BSM: Rindersphingomyelin, DAPC: Diarachidonoyl-PC.

neten Flüssigphase den Zusammenhalt der Doppelschichten verbessert<sup>[41, 42]</sup>.

Doppelschichten können mechanisch, z.B. auch durch Polymerisation<sup>[43–48]</sup> oder die Verwendung von Lipiden mit Fluorkohlenwasserstoffketten<sup>[49–51]</sup>, stabilisiert werden. Trotz verminderter van-der-Waals-Anziehung entlang dieser Kohlenstoffschichten<sup>[2]</sup>.

### 3.2. Chemische Stabilität

Biomoleküle werden meist unterschiedlich abgebaut, und Lipide gehören zu den empfindlichsten Naturstoffen. Oxidation und Hydrolyse sind die häufigsten Abbaureaktionen (Abb. 5). Im allgemeinen sind die polaren Kopfgruppen stabiler als die Kohlenwasserstoffketten. Diese, besonders die ungesättigten, werden oxidiert; die Hydrolyse spaltet eine oder beide Ketten vom Rückgrat des Lipidmoleküls ab. Da diese Reaktion durch Säuren und Basen katalysiert wird, ist sie stark pH-abhängig (Abb. 5, oben links)<sup>[52, 53]</sup>. Die Einstellung eines optimalen pH-Wertes, normalerweise ca. pH 6.5, und vor allem das Einfrieren oder Trocknen der Probe in Gegenwart von Frostschutzmittel gehören daher zu den wichtigsten Schutzmaßnahmen für Liposomen.

Die Oxidation, eine Radikalreaktion, führt zum Bruch der Ketten oder, wenn im Molekül zwei benachbarte Doppelbindungen vorhanden sind, zur Bildung cyclischer Peroxide. Der Gebrauch von gesättigten Lipiden und die Zugabe von Antioxidantien wie Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) oder BHT (butyliertes Hydroxytoluol) verringern die Oxidationsgeschwindigkeit drastisch. Diese Schutzmaßnahmen ermöglichen es, daß Proben mit genauer Spezifikation (die chemische Zusammensetzung darf sich normalerweise maximal um 2% ändern) über Jahre stabil sein können<sup>[54]</sup>.

Einige synthetische Lipide, auch solche, in denen die Fettsäuren über Etherbrücken mit dem Glyceringerüst verbunden sind, sind chemisch viel stabiler<sup>[35]</sup>. Da sie aber durch Säugerenzyme nicht abgebaut werden, ist ihr Nutzen als parenteraler Arzneimittelträger begrenzt; in chemischen und kosmetischen Anwendungsbereichen werden sie allerdings oft eingesetzt.

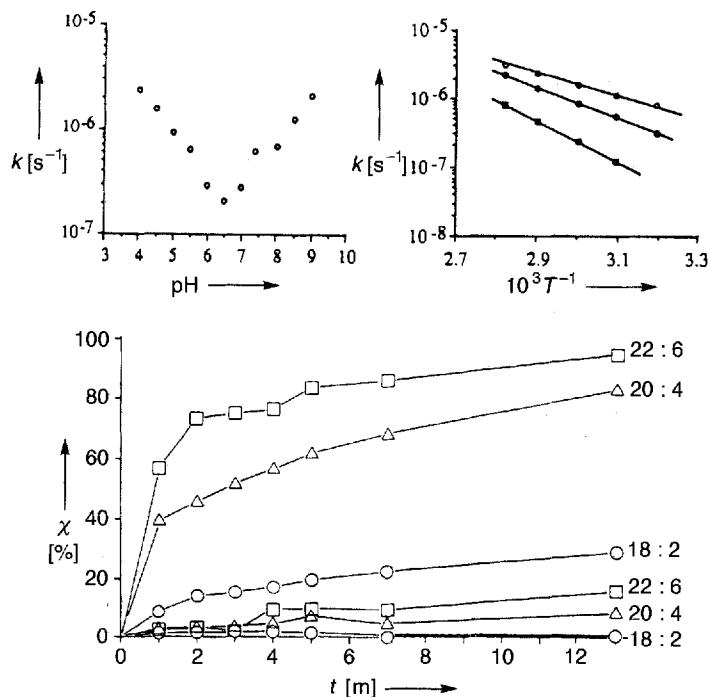


Abb. 5. Zur chemischen Stabilität von Liposomen. Oben: Hydrolysegeschwindigkeit von Sojabohnenlecithin in Liposomen als Funktion des pH-Wertes (links) und der Temperatur (rechts); die Temperaturabhängigkeit wurde bei pH 4.0 (○), 6.5 (□) und 8.0 (■) bestimmt (mit freundlicher Genehmigung M. Grit und D. Crommelin, Universität Utrecht). Unten: Oxidation von polyungeättigten Fettsäuren in Ei-Lecithin-Liposomen bei 38 °C in belüfteten Fläschchen als Funktion der Zeit (in Monaten). Die unteren drei Kurven demonstrieren die Verlangsamung der Oxidation durch 1 Mol-% Antioxidans 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT). Die Angaben rechts neben den Kurven geben die Kettenlänge und den Grad der Ungeättigtheit an; 22:6 z.B. bedeutet C<sub>22</sub>-Kette mit sechs Doppelbindungen (mit freundlicher Genehmigung von Frank Martin, LTI).

### 3.3. Kolloide Stabilität

Bei der Bildung von Phospholipid-Liposomen steigt die Teilchengröße hauptsächlich aufgrund von Teilchenaggregation an, das Teilchenwachstum durch Ostwald-Reifung ist hier neben-sächlich<sup>[2, 55]</sup>. Die Aggregation ist der erste Schritt der Vesikel-Vesikel-Verschmelzung<sup>[56]</sup> und hängt von der thermodynamischen Stabilität der Probe, von Kristalldefekten und der Gegenwart von inneren oder äußeren fusogenen Substanzen oder Vektoren ab. Während die Verschmelzung praktisch irreversibel ist, kann die Aggregation reversibel sein.

Zwischen den kolloidalen Teilchen wirken zahlreiche anziehende und abstoßende Kräfte. van-der-Waals-Anziehung wirkt zwischen allen Teilchen, die durch ein Medium mit unterschiedlich polarisierenden Eigenschaften getrennt sind. Tragen zwei Teilchen dieselbe Ladung, stoßen sie sich elektrostatisch ab. Diese beiden Kräfte sind die Basis für die DLVO-Theorie (DLVO = Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) der Stabilität von kolloidalen Teilchen, wobei das kolloide System als stabil definiert wird, wenn ein Minimum (mit einer Tiefe von  $\Delta E < 10 kT$ ) bei der Auftragung der potentiellen Energie gegen den Abstand vorliegt<sup>[57]</sup>. Oft kann diese Theorie jedoch die mangelnde Stabilität von Liposomen gegenüber Aggregation nicht erklären. Um zu verstehen, warum kolloide Suspensionen weniger stabil sind, müssen zusätzliche Anziehungskräfte wie die hydrophobe Anziehung oder die Anziehung durch Ion-Ion-

Wechselwirkung eingeführt werden<sup>[58–60]</sup>, während zur Erklärung der Stabilität von ungeladenen Liposomen und Liposomen in Medien mit hoher Ionenstärke andere Abstoßungskräfte, z.B. Hydratisierung<sup>[61]</sup> und Schwingung (Undulation)<sup>[62]</sup>, herangezogen werden müssen.

Einige dieser Kräfte sind noch umstritten, und auch ihr Ursprung ist bisher unbekannt. So wurde z.B. kürzlich die Hydratation als Quelle der Abstoßung angezweifelt, und es wurde dafür eine Abstoßung durch Ausstülpungen, eine besondere Art sterischer Abstoßung, vorgeschlagen, die durch Vertikalbewegung der polaren Kopfgruppen verursacht wird<sup>[63]</sup>. Hinsichtlich der anziehenden hydrophoben Fernkräfte ist die Situation sogar noch weniger klar<sup>[55, 58, 64]</sup>. Qualitativ lässt sich diese Anziehung jedoch als Folge der Störung der Wasserstruktur erklären. Während die Wassermoleküle in Wasser gerichtete Wasserstoffbrücken aufweisen, ist dieses dreidimensionale Netz von Wasserstoffbrücken bei Molekülen, die mit einer hydrophoben Oberfläche in Kontakt stehen, gestört<sup>[65, 66]</sup>. Durch die Bildung von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Wassermolekülen kann der Entropieverlust und/oder der Verlust elektrostatischer Energie nicht ausgeglichen werden; es entsteht eine Spannung und eine Anordnung mit ungünstiger Freier Energie. Die Wassermoleküle streben danach, diese Position zu verlassen, und dies ist die Ursache der anziehenden Kraft. Die Langzeitstabilität von Liposomen kann noch nicht zufriedenstellend erklärt werden.

Diese Kräfte können die Stabilität von Liposomen erklären und liefern Anregungen für ihre Stabilisierung. Haupt-sächlich bestimmen die Ladungsdichte der Oberfläche, Zeta-Potentiale, Größenverhältnisse und Homogenität sowie Ionenstärke und pH-Wert des Mediums die kolloide Stabilität in vitro. In biologischen Systemen ist das Verhalten durch die Gegenwart von aktiven liposomiden Substanzen jedoch vollkommen anders.

Zusätzliche Abstoßungskräfte werden durch Moleküle verursacht, die mit der Oberfläche verbunden sind (siehe Abschnitt 4). Es ist seit ägyptischen Zeiten bekannt, daß lyophile Kolloide wie Farbstoffe in Tinte durch natürliche Polymere, z.B. Gummi arabicum, Stärke oder Zellulose, stabilisiert werden können. Diese Stoffe verursachen die sogenannte sterische Abstoßung, die in Abschnitt 4 besprochen wird.

### 3.4. Biologische Stabilität

Sogar die stabilsten konventionellen Liposomen sind in biologischem Milieu höchst instabil. Sie wechselwirken mit zahlreichen Bestandteilen des Plasmas und mit Enzymen und werden obendrein durch das körpereigene Immunsystem aktiv aufgenommen (Abb. 6). Durch Erhöhung der mechanischen Stabilität von Liposomen kann die Wechselwirkung mit biologischen Komponenten in vitro und der Austritt von eingeschlossenen Substanzen in vivo reduziert werden, sie kann aber nicht merklich verhindern, daß parenteral verabreichte Liposomen durch phagocytische Zellen aufgenommen werden.

Liposomen werden hauptsächlich durch folgende Mechanismen aus dem Blut entfernt: 1) Opsonisierung (= der Phagocytose zuführen) durch Komponenten im Blut, wie Immunglobuline, Komplementsfaktoren und Fibronectin, und anschließende

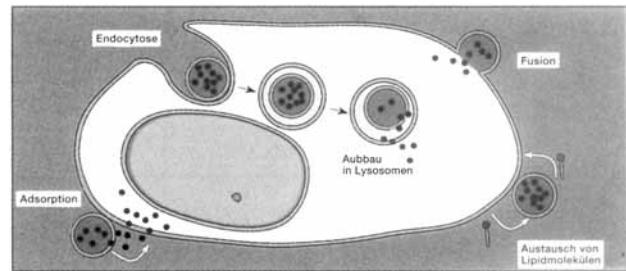


Abb. 6. Wechselwirkungen von Liposomen mit Zellen. Die vier wichtigsten Wechselwirkungen sind: Adsorption, Lipidaustausch, Fusion und Endozytose (nach Lit. [82]).

Aufnahme durch Makrophagen; 2) Reaktion mit den (Lipo)Proteinen des Plasmas. Die Makromoleküle müssen an die Liposomenoberfläche gebunden werden, um eine effektive Opsonisierung zu gewährleisten<sup>[24]</sup>. Diese Adsorption kann entweder Chemi- oder Physisorption sein; die Adsorptionsenergie ( $W_{\text{tot}}$ ) setzt sich aus elektrostatischen (est), hydrophoben (hfo), van-der-Waals- (vdW), Wasserstoffbrücken- (Hbond) und spezifische Wechselwirkungen (spec) zusammen [Gl. (a)].

$$W_{\text{tot}} = -W_{\text{est}} - W_{\text{hfo}} - W_{\text{vdW}} - W_{\text{Hbond}} - W_{\text{spec}} \quad (\text{a})$$

Spezifische Wechselwirkungen treten in erster Linie auf, wenn Antikörper oder Haptene gebunden werden. Beim idealen Trägersystem für den gezielten Arzneimitteltransport müßten alle Beiträge zu  $W_{\text{tot}}$  mit Ausnahme von  $W_{\text{spec}}$  ausgeschaltet werden. Zusätzlich erfordert die Adsorption oder Adhäsion bei einigen Proteinen konformative Änderungen, um die spätere Aufnahme durch Makrophagen zu ermöglichen.

Ähnliche Schlüsse können für die Wechselwirkungen mit Plasmamolekülen gezogen werden. Mechanisch stabile Doppelschichten mit stark kohäsiven Kräften werden von Plasmakomponenten weniger leicht angegriffen, und der Austausch der Lipidmoleküle mit dem Umgebungsmilieu geht langsamer vorstatten. Extrem kohäsive Doppelschichten im Gelstadium enthalten aber zu viele hydrophobe Defekte, um stabil zu sein<sup>[21]</sup>.

Ungeladene Liposomen sollten stabiler sein als geladene, da jede starke Ionenbindung fehlt ( $W_{\text{est}} = 0$ ). Werden die Doppelschichten durch starke Kohäsionskräfte mechanisch fest zusammengehalten, sollten hydrophobe Bindungen, z.B. durch das Eindringen eines Teils eines Makromoleküls in die Doppelschicht, verringert sein (Reduzierung von  $W_{\text{hfo}}$ ). Die Physisorption wird jedoch nicht verhindert, d.h.  $W_{\text{vdW}}$  und  $W_{\text{Hbond}}$  sind negativ; dies mag die niedrige Stabilität in vivo und die Aufnahme durch Makrophagen erklären. Die Physisorption kann durch den Aufbau eines sterischen „Schutzwalles“ („sterische Stabilisierung“) aus einem inerten, nicht immunogenen ( $W_{\text{spec}} = 0$ ) und nicht ionischen ( $W_{\text{est}} = 0$ ) Polymer (siehe Abb. 4 rechts) größtenteils reduziert werden. Durch gepropfte Polymere kann die Blutzirkulationszeit von flüssigen und wenig kohäsiven oder geladenen Liposomen verlängert werden<sup>[66]</sup>. Diese Eigenschaft ist wichtig, um cholesterinfreie Liposomen mit wohldefinierten Austrittscharakteristika zu entwerfen und die Verkapselungswirkung für hydrophobe Moleküle zu verbessern.

Im Gegensatz zur elektrostatischen Stabilisierung, die für viele Anwendungen von Liposomen *in vitro* ausreicht, ist die sterische Stabilisierung geeignet, um Liposomen auf in biologischen Systemen und in Medien mit hohem oder veränderlichem Salzgehalt zu nutzen.

#### 4. Theoretisches Verständnis der sterischen Stabilisierung von Liposomen

Die Abstoßungs Kräfte zwischen zwei Teilchen können durch Oberflächenmodifizierungen und Beschichtungen mit passenden Molekülen vergrößert werden<sup>[68]</sup>. Natürliche und synthetische Polymere sind hierfür die gebräuchlichsten Materialien. Sie müssen inert, gut löslich und mit den Lösungsmitteln kompatibel sein und eine wasserähnliche Polarisierbarkeit aufweisen. Die Polymere können durch Adsorption, hydrophobe Insertion, elektrostatische Anziehung oder, am häufigsten, durch kovalente Bindungen an der Oberfläche gebunden sein und so die sterische Stabilisierung induzieren. Hierbei werden nicht ionische, wasserkompatible, flexible und gut hydratisierte Polymere bevorzugt. Die Abstoßung zwischen Oberflächen mit anhaftenden Polymeren ist von der Ppropfdichte und dem Grad der Polymerisation abhängig. Für niedrige Ppropfdichten, d.h. in Regionen, wo sich die Polymerketten nicht gegenseitig beeinflussen können, wurde das sogenannte Pilzmodell definiert. Da die Entropie der Polymerketten aufgrund verringriger konformativer Beweglichkeit in den Pilzen verringert ist, liefert dieses Modell die sterische Abstoßung in einem Abstand  $h$  nach Gleichung (b)<sup>[69]</sup>.

$$F_{\text{st}}^{\text{m}} = \frac{kT}{D^2 h_c} \left( \frac{h_c}{h} \right)^{8/3} \quad (\text{b})$$

$$h_c = Na \left( \frac{a}{D} \right)^{2/3} \quad (\text{c})$$

$D$  ist hier der durchschnittliche Abstand zwischen benachbarten Ppropfpunkten,  $a$  die Größe des Segments und  $N$  der Grad der Polymerisation. Bei höheren Dichten fangen die Polymere an, sich gegenseitig zu beeinflussen und bestimmen dadurch ihre Ausdehnung. Hier kann das sogenannte Bürstenmodell angewendet werden [Gl. (d)]<sup>[68]</sup>.

$$F_{\text{st}}^{\text{br}} = \frac{kT}{D^3} \left[ \left( \frac{h_c}{h} \right)^{9/4} - \left( \frac{h}{h_c} \right)^{3/4} \right] \quad (\text{d})$$

Diese Gleichungen erklären die Abstoßung für den Fall, daß Polymere sowohl die sogenannten Adsorptions- als auch die Verarmungsschichten bilden.<sup>[70]</sup> Wenn die Polymere nur die Verarmungsschichten bilden, sieht die Anordnung mehr wie ein inverser Tropfen oder eine Birne aus. Dadurch werden die Dichteprofile verändert, die Skalierungsgesetze bleiben aber unverändert<sup>[71]</sup>. Theoretische Überlegungen besagen, daß die Ketten hier im Vergleich zum zuvor diskutierten Modell 40 % länger sind<sup>[72]</sup>, d.h.  $7/5 R_F$  gegenüber  $R_F$ , wobei der Flory-Radius  $R_F = aN^{3/5}$  beträgt.

#### 4.1. Ein erweitertes DLVO-Potential zwischen Teilchen

Für den allgemeinen Fall gilt, daß das Gesamtpotential zwischen Teilchen alle Wechselwirkungen einschließlich der sterischen (st) enthält [Gl. (e)].

$$V_{\text{tot}} = -V_{\text{vdW}} - V_{\text{hfo}} + V_{\text{est}} + V_{\text{hyd}} + V_{\text{und}} + V_{\text{st}} \quad (\text{e})$$

Um die Stabilität eines Systems zu beschreiben, geht man wie beim DLVO-Modell für zwei Potentiale<sup>[57]</sup> vor. In erster Näherung können die Potentiale additiv behandelt werden. Für eine genauere Behandlung muß man jedoch davon ausgehen, daß zwischen den einzelnen Termen Abhängigkeiten bestehen. Bei geladenen Oberflächen und kovalent gebundenen Polymeren sollte man aufgrund der veränderten Wasserstruktur an der Oberfläche erwarten, daß die elektrostatischen, Hydratisierungs- und sterischen Wechselwirkungen voneinander abhängig sind<sup>[73]</sup>. Da im Falle von gepropften Polyelektryktetten die Konformation der Kette selbst eine Funktion von elektrostatischen Wechselwirkungen und Oberflächenladungen ist, ist in diesem Fall eine ausführliche Analyse nötig<sup>[73, 74]</sup>.

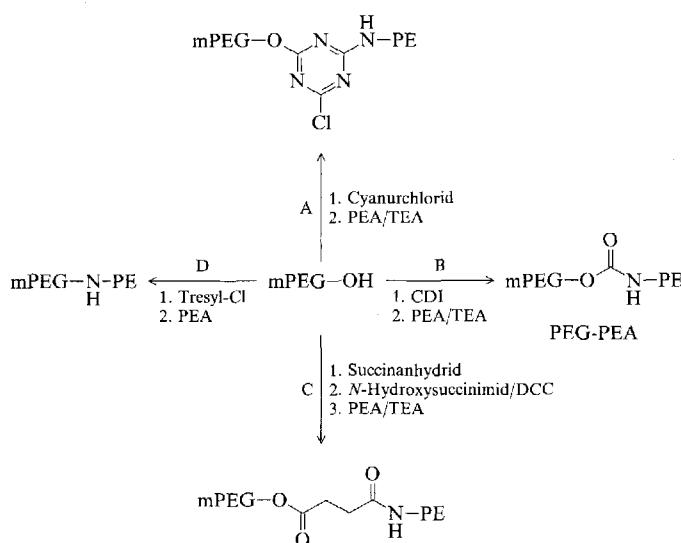
#### 5. Kupplung von Polyethylenglykol (PEG) an Lipide

PEG-Moleküle unterschiedlicher Länge können unter Verwendung von Kupplungsreagentien kovalent an Lipidmoleküle gebunden werden. Während kürzere Oligoethylenglykole an viele Lipide gebunden wurden<sup>[75]</sup>, war Phosphatidylethanolamin (PEA) mit unterschiedlichen Kettenlängen und Sättigungsgraden aufgrund der reaktiven Aminogruppe das einzige Lipid, das zum Anbringen von längeren PEG-Ketten genutzt wurde. Die Reaktivität der Aminogruppe kann durch Deprotonierung mit Triethylamin (TEA) noch weiter gesteigert werden. Die PEG-Ketten wurden auch mit Cholesterin verknüpft, was aber in der Regel keine längeren Blutzirkulationszeiten ergab<sup>[76]</sup>. Da Verbindungen wie Cholesterin-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>-H kommerzielle Tenside sind, ist dieses Ergebnis nicht unerwartet, denn die PEG-Lipidmoleküle gehen aufgrund ihrer hohen cmc-Werte, vor allem nach Verdünnung, rasch aus der Doppelschicht verloren. So wurde z.B. für das amphrophe Cholesterinderivat Tetraoxycholesterylhemisuccinat ein cmc-Wert von 1.6 mM gemessen<sup>[77]</sup>.

Synthesen unter Verwendung anderer Phospho- oder Sphingolipide wurden noch nicht durchgeführt, oder die Produkte hatten sehr instabile, hydrolysierbare Esterbindungen. Es wurden PEGs mit unterschiedlichen Kettenlängen und Polymerisationsgraden ( $n = 3, 8, 17, 45, 115$  und  $270$ ) eingesetzt. Der Polydisperionsgrad des Polymers ist vom Polydispersionsindex  $p$  des Ausgangsmaterials abhängig und ändert sich im Laufe der Reaktion fast nicht.  $p$  ist definiert als das Verhältnis von Gewichtsmittel zu Zahlenmittel des Molekulargewichts (siehe auch Legende zu Abb. 2).

Die Kupplungsstrategien stammen alle aus der Proteinchemie<sup>[78]</sup>. Alle Reaktionen beginnen mit Methoxy-PEG (mPEG) und verwenden Phosphatidylethanolamin als Lipid. Es wurden vier Synthesewege entwickelt (Schema 1), die zu Ester- (Weg C), sekundären Amin- (Weg A und D) und Urethanbindungen

(Weg B) führen<sup>[18]</sup>. Auch wenn die Esterhydrolyse nicht signifikant zur Liposomenaufnahme, z.B. durch Zellen, beträgt, sind die nach Weg C gebildeten Ester doch weniger stabil als die Urethane, die nach Weg B gewonnen werden<sup>[79]</sup>. Die Kupplung nach Weg A benötigt das giftige Cyanurchlorid.



Schema 1. Vier Wege, um das Polymer PEG mit dem Lipid PEA zu verbinden. Am häufigsten wird Weg B benutzt. Abkürzungen: mPEG Methoxypolyethylenglykol, PEA Phosphatidylethanolamin, TEA Triethylamin, CDI Carbonyldiimidazol, DCC Dicyclohexylcarbodiimid, Tresyl 2,2,2-Trifluorethyl.

Im Folgenden ist exemplarisch eine Synthese beschrieben: Die Reaktion von mPEG mit Carbonyldiimidazol (CDI) in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 in wasserfreiem Benzol unter Stickstoff ergab nach 16 h bei 75 °C das reaktive Carbamat des mPEG-Ethers; dessen Kupplung an Phosphatidylethanolamin gelang in Gegenwart von Triethylamin (molares Verhältnis von 1:2:2) in Benzol (6 h, 95 °C). Das so erhaltene PEG-PEA wurde durch Umkehrphasenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol- oder Wasser/Ethanol-Gemischen gereinigt. Da dieses PEG-PEA in wässriger Lösung Micellen bildet, kann es durch einfache Dialyse der micellaren Lösung gegen Wasser oder besser gegen Salzlösung gereinigt werden. PEG-Lipide verhalten sich in wässriger Lösung wie ionische Tenside, und die Zugabe von Elektrolyten verringert deutlich ihre cmc-Werte; im Falle von <sup>2000</sup>PEG-DSPE sinkt der cmc-Wert nach vorläufigen Messungen bei Zugabe von Salz von ca. 1 mM auf 30 µM.

Kürzlich wurde die Synthese weiter verbessert. Die Kupplungsreaktion kann bei 45 °C in 10 min durchgeführt werden, wenn statt des durch Carbonyldiimidazol aktivierten PEGs das Succinimidcarbonat von PEG eingesetzt wird. Die hohe Geschwindigkeit dieser Reaktion ermöglicht es, Polymere in wässriger Lösung an vorgeformte Liposomen zu kuppeln<sup>[80]</sup>. Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit begünstigt diese Methode wahrscheinlich auch gegenüber der mit Tresylchlorid-aktiviertem PEG.

Mit heterodifunktionalisierten PEG-Ketten gelang es in der Zwischenzeit auch, Antikörper an das entfernte Ende der grafted Polymerketten zu binden<sup>[80]</sup>. Weil alle oben angeführten Synthesen mPEG benutzen, das an einem Ende nicht reaktiv ist, mußte ein heterodifunktionalisiertes Polymer hergestellt werden. Auf einer Seite trägt dieses Polymer das reaktive Succinimidcarbonat für die Bindung an die Aminogruppe des Phosphatidylethanolamins und auf der anderen eine *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-geschützte Hydrazidgruppe. Da die Hydrazidgruppe chemisch vielseitig ist, können viele Liganden inklusive monoklonale oder polyklonale Antikörper mit vorgefertigten funktionalierten Liposomen, die dieses Konjugat enthalten, verknüpft werden<sup>[80]</sup>.

Vorläufige Versuche unter Verwendung einiger anderer Polymere zeigen, daß sich die Blutzirkulationszeiten der entsprechenden Liposomen nicht mit denen messen können, die mit PEG-modifizierten Liposomen erreicht werden. Es scheint, daß Polyacrylamid und Polyvinylpyrrolidon nicht die gleiche Hydrophilie und Flexibilität zeigen wie PEG. Dies gilt auch für Oligo- und Polysaccharide wie Glucuronsäure-, Dextran- und Cellulosederivate sowie Copolymere von Glucuronsäure mit einfachen Zuckern. Diese Polymere können vielleicht durch eine größere Dichte von Wasserstoffbrückenbindungen stärkere und dichtere „Schutzwälle“ bilden, die Mobilität der Polymerketten ist jedoch beeinträchtigt. Außerdem hat der Körper viele spezifische Rezeptoren für Zucker.

Liposomen mit PEG-Lipiden können mit allen üblichen Synthesemethoden hergestellt werden. Durch Hydratisierung dünner Filme erreicht man eine bessere Verteilung, und die Liposomen weisen eine geringere Zahl von Lamellen auf. Unilamellare Liposome zeichnen sich generell durch höhere Stabilität aus. Die PEG-Lipide können in den beiden Einzelschichten ungleichmäßig verteilt sein. Dies führt dann nicht nur zu der sterischen (kolloiden) Stabilisierung, sondern auch zu einer Erhöhung der thermodynamischen Stabilität, da eine spontane Krümmung erzeugt wird. Wie ein Gutachter vorschlug, könnten die PEG-Lipide außerdem bezüglich der Kettenlänge ungleich verteilt sein: Moleküle mit kleinerem Polymerisationsgrad könnten sich in der inneren Einzelschicht ansammeln. Das Argument der spontanen Krümmung gilt bestimmt, wenn die Polymere nur mit der äußeren Liposomenoberfläche verknüpft sind. Bei geeigneter Pfropfdichte kann sogar der Zustand  $c_0 = 1/R$  erreicht werden, was bedeutet, daß die spontane Krümmung zum Liposomenradius umgekehrt proportional ist.

## 6. Diskussion einiger experimenteller Ergebnisse

Die Annahme, daß über der Membran ein vergrößerter Abstoßungsdruck herrscht und die Adsorption von Makromolekülen während der Blutzirkulation verringert ist, wurde durch die Messung des Abstoßungsdrucks zwischen den Membranen mit und ohne Einlagerung von polymerhaltigen Lipiden untersucht. Abbildung 7 zeigt oben, daß die Doppelschichten, die PEG-Lipide enthalten, viel größere Schichtabstände aufweisen als die ohne die PEG-Lipide. Bei starker Kompression sind die PEG-modifizierten Doppelschichten immer noch 40 Å voneinander entfernt; die einfachen Doppelschichten werden hingegen bis zum Einsetzen der Hard-wall-Abstoßung zusammengefaßt<sup>[80, 81]</sup>.

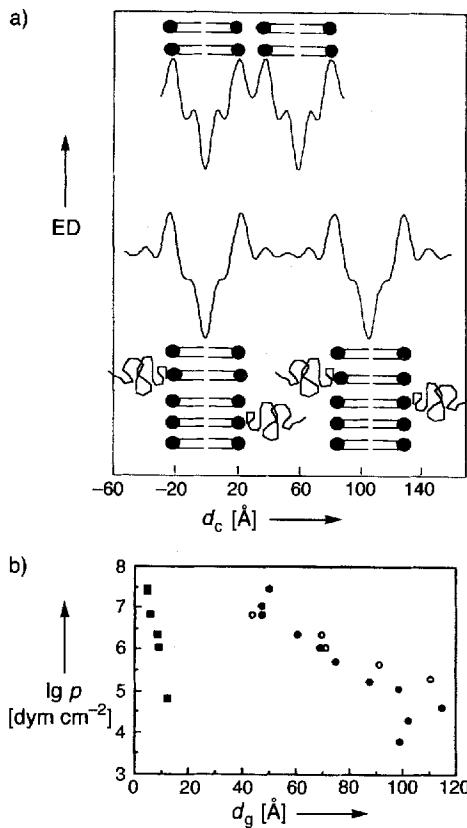


Abb. 7. a) Elektronendichte (ED) in willkürlichen Einheiten als Funktion des Abstands vom Zentrum der Doppelschicht ( $d_c$ ) für Doppelschichten mit (unten) und ohne (oben)  $^{200}\text{D}\text{PEG-Lipid}$  nach Kleinwinkel-Röntgenstreu-(SAXS)-Messungen an multilamellaren Vesikeln. Es sind jeweils Werte für zwei Einheitszellen gezeigt, und man kann deutlich sehen, daß die Gegenwart von Polymerketten den Spalt zwischen den Doppelschichten vergrößert. Weiterhin kann eine erhöhte Elektronendichte im wäßrigen Spalt darauf hinweisen, daß sich das Polymer, das für die Bildung der Verarmungsschicht bekannt ist, von der Doppelschicht weg orientiert. b) Auftragung des Drucks  $\lg p$  gegen die Größe des Spalts (Abstand zwischen den Oberflächen der Doppelschichten,  $d_g$ ) zwischen benachbarten Lamellen. ■: Stearoyloleoylphosphatidylcholin/Cholesterin(2/1)-Doppelschicht, ● und ○: die gleiche Doppelschicht mit 4 Mol-%  $^{200}\text{D}\text{PEG-Lipid}$  in 100 mM NaCl bzw. 1 mM NaCl. Für alle Drücke vergrößert die Gegenwart von polymertragenden Lipiden den Spalt zwischen den Doppelschichten merklich (nach Lit. [80]).

Die Abstoßung zwischen den Doppelschichten wurde aus dem Abstoßungsdruck berechnet, den die oberflächengebundenen Polymere in der Pilzformation bewirken [Gl. (f)].

$$P = \frac{5 k T N a}{2 D^2} \left( \frac{2 a}{h} \right)^{8/3} \quad (\text{f})$$

Mit  $N = 44$ ,  $a = 0.35$  nm und  $D = 3.57$  nm stimmen die Ergebnisse mit den experimentellen Befunden überein<sup>[82]</sup>. Für Entfernungen  $> h_c$  ist der Abstoßungsdruck gleich Null.

Ähnliche Ergebnisse erhält man auch bei der Messung der Oberflächenkräfte<sup>[83]</sup>. Danach nimmt die Abstoßung bei steigendem Anteil an PEG-Polymer zu. Nach biologischen Daten sind die Zirkulationszeiten bei geringerer Oberflächenbedeckung optimal, und bei Pfropfdichten, die sicherstellen, daß die Oberfläche vollständig ummantelt ist, wird ein sättigungsähnliches Verhalten beobachtet.

Die Existenz von oberflächengebundenen Polymeren wurde auch durch die Messung des Zeta-Potentials bestätigt<sup>[84]</sup>. Die

geringere Mobilität der PEG-überzogenen Liposomen im Vergleich mit konventionellen Proben gleicher Oberflächenladung führt man auf den hydrodynamischen Widerstand der Polymere zurück. Die geschätzte Dicke von 5 nm stimmt mit dem Wert überein, der durch Messung des osmotischen Drucks und der Oberflächenkräfte<sup>[83]</sup> und durch theoretische Vorhersagen<sup>[82]</sup> gewonnen wurde.

Einen direkten Beweis erhält man durch Proteinadsorptionsstudien an PEG-überzogenen Oberflächen. Vorläufige Untersuchungen an BLMs (Black Lipid Membranes), die PEG-Lipide enthalten, zeigen, daß diese Proteine schwächer adsorbieren und weniger mit Lipoproteinen wechselwirken<sup>[85]</sup>. Um die Bedeutung der Kettendicke und -flexibilität für die Aufnahme der Liposomen im Blutstrom zu erklären, werden ähnliche Studien bei höherer Pfropfdichte durchgeführt.

Auch für Polystyrol-Latexteilchen (75 nm), die mit Polyethylenoxid (> 5000 Da)-Polypropylenoxid(> 3000 Da)-Blockcopolymeren überzogen sind, beobachtet man eine geringere Proteinadsorption bei gleichzeitigem Anstieg der Blutzirkulationszeiten um das 40fache<sup>[86]</sup>. Auch in diesem Falle bewirkt die höhere Ummantelungsdichte nur bis zu einer bestimmten kritischen Dichte<sup>[87]</sup> geringere Proteinadsorptionsgeschwindigkeiten und Zirkulationszeiten. Optimale Stabilität fand man, wie bei Liposomen (siehe Tabellen 2 und Abb. 9), nahe dem Übergang von der Pilz- in die Bürstenkonformation<sup>[87]</sup>.

Nach der einfachen Theorie folgen aus höheren Pfropfdichten und längeren Ketten stärkere Abstoßung und wahrscheinlich bessere Stabilisierung und längere Zirkulationszeiten. Dementsprechend ergaben In-vitro-Studien größere Abstoßung bei höheren Pfropfdichten und Kettenlängen<sup>[83, 88]</sup>. Bei In-vivo-Experimenten findet man dieses Verhaltensmuster jedoch nicht. Die längsten Zirkulationszeiten erhielt man bei Zugabe von ca. 5–10 Mol-% PEG-Lipid mit relativ kurzer Kette ( $N = 40$ –130); das Optimum scheint bei Zugabe von 5 Mol-% und einer Kettenlänge  $N = 40$ –70 zu liegen.

Tabelle 2 enthält Daten zur Stabilität von Liposomen im Blutkreislauf aus mehreren Studien. Diese sind schwer miteinander zu vergleichen, da verschiedene Marker, Lipiddzusammensetzungen und -konzentrationen sowie Größenverteilungen der Liposomen und unterschiedliche Tiere eingesetzt wurden. Es werden auch keine Angaben über den plasmainduzierten Austritt aus den Liposomen gemacht, d. h. über den Anteil an Marker, der während der Zirkulation durch Austritt statt durch Aufnahme der Liposomen verloren geht. Das kann zu Unterschätzungen von 30–40% führen. Trotzdem habe ich die Ergebnisse vergleichbarer Studien zusammengetragen. Falls nichts anderes angegeben ist, wurden kleine Vesikel bei nicht sättigungsähnlichen Lipiddosen verwendet. Meistens wird die Dosis in Prozent angegeben, die zu einem bestimmten Zeitpunkt im Kreislauf verblieben ist, oder das Verhältnis von Restmarker zur Menge, die durch Leber oder Milz aufgenommen wurde (B/RES). Die größte Verwirrung entsteht dadurch, daß entweder auf die Anfangsdosis oder auf die Dosis, die zu einem bestimmten Zeitpunkt zurückgewonnen wurde, genormt wird. Hohe Verhältnisse müssen daher nicht unbedingt lange Zirkulationszeiten bedeuten, sondern können z.B. durch den Verlust des Markers künstlich erzeugt sein. In Kenntnis dieser Probleme versuchte ich, eine einzige Größe zu definieren, um diese Zahlen zu vergleichen und zu vereinheitlichen. Für die qualitative Diskussion

Tabelle 2. Stabilität von 100-nm-Liposomen im Blutkreislauf als Funktion von Pfropfdichte und Polymerkettenlänge. Es sind auch zahlreiche physikochemische Parameter des Systems angegeben. Bedeutung der Symbole:  $M_{\text{PEG}}$  Molekulmasse des Polyethylenglykols, Mol-% Prozentgehalt an PEG-Lipid in der Doppelschicht,  $t_{1/2}$  Blutzirkulationshalbwertszeit, B/RES Verhältnis der im Blut vorhandenen Menge an Liposomenmarker zum retikuloendothelialen System (Leber und Milz) 24 Stunden nach der Injektion, SF Stealth-Faktor,  $\bar{n}$  Polymerisationsgrad,  $R_F$  Flory-Radius,  $D$  durchschnittlicher Abstand zwischen den Pfropfpunkten auf der Basis eines Rechteckgitters,  $\rho$  Dichte an Monomeren pro Lipidfläche in der Doppelschicht; die Polymere liegen als Pilz (m) oder Bürste (b) vor, und  $\Delta$  ist die Differenz zwischen der Größe des Polymers und dem Abstand zwischen zwei Polymeren (negative Werte bedeuten Überlappung und Übergang in die Bürstenform).

$M_{\text{PEG}}$ [Da]	Mol-%	$t_{1/2}$ [h]	$c_{\text{Blut}}^{24h}$ [%]	B/RES	Kommentar	SF	$\bar{n}$	$R_F$ [ $\text{\AA}$ ]	$R_g$ [ $\text{\AA}$ ]	$D$ [ $\text{\AA}$ ]	$\rho$	Konf.	$\Delta$ $D-R_F$	Lit.
120	5	3.6	1	0.08		3	2.7	6.5		34.7	0.135	—	28.2	[67]
120	10	5.44	4.7	0.33		4.65	2.7	6.5		24.5	0.27	—	18	[67]
120	15	8.49	14.1				2.7	6.5				—		[76]
350	33.3	6.92	9	0.52		6.6	7.95	12.35		13.4	2.65	—	1.05	[a]
750	5	4.86	3.2	0.33		5	17.04	19.5	5.3	34.7	0.85	m	15.2	[b]
750	8		16				17.04	19.5	5.3					[76]
750	33.3	8.5	12.3	0.9		10	17.04	19.5	5.3	13.4	5.68	b	-6.1	[a]
1000	6	≈4	49.5	4.4	4 h, 200 nm		22.7	23.1	6.7		1.36			[c]
1000	6	≈4	49	4.4	4 h, 200 nm		22.7	23.1	6.7					[c]
1000	6		13.7	3.0	4 h, flüssig, 200 nm		22.7	23.1	6.7					[c]
2000	5	10.67–13.5	21–29	1.5–2.7	fest; flüssig	15–24	45.4	35.1	10.1	34.7	2.27	m-b	-0.4	[18, 24]
2000	5	18.5	40	4	negative Ladung(PG)	35.5	45.4	35.1	10.1					[18, 24]
2000	6	15.8	35				45.4	35.1	10.1					[76]
2000	7.5	5	50		5 h	12	45.4	35.1	10.1	28.3	3.40		-6.8	[d]
2000	6		47–49	4.8–5	4 h		45.4	35.1	10.1	30.2	2.72	b	-4.9	[c]
3000	5	17.94	34	4		35	68.2	44.1	12.9	34.7	3.41	m	-9.4	[a]
5000	5	10.98	33	2.2		19	113.6	60.9	17.8	34.7	5.68	b	-26.2	[d]
5000	5		21	2.17			113.6	60.9	17.8					[c]
5000	7		28.3				113.6	60.9	17.8	35		b	-25	[76]
5000	6		32.2	2.05	4 h, 200 m		113.6	60.9	17.8					[c]
5000	10	3.5	45		4 h	6.7	113.6	60.9	17.8	23.4	11.36	b	-40.5	[91] [e]
5000	10			1.56			6.7	113.6	60.9	17.8				[91] [e]
12000	6	2.44	34	1.8	4 h, 200 nm		272.7	103	29.4					[c]

[a] M. Newman, M. C. Woodle, persönliche Mitteilung. [b] M. C. Woodle et al., *Period. Biol.* **1991**, *93*, 349. [c] K. Maruyama et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1128*, 44. [d] A. L. Klibanov et al., *FEBS Lett.* **1990**, *286*, 235. [e] G. Blume, G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1029*, 91.

führen wir den „Stealth-Faktor“ ein, der zur Zeit  $t$  nach der Injektion willkürlich definiert wird [Gl. (9)].

$$\text{SF} = (t_{1/2}[\text{h}] - 3) + (\text{B}/\text{RES})[\text{t}] \times F[\text{t}] \quad (\text{g})$$

Meistens werde ich  $t = 24$  h benutzen und der numerische Faktor  $F[t = 24 \text{ h}] = 5$ . Da das Blut/RES-Verhältnis nicht so charakteristisch ist wie der Blutspiegel, wird es (empirisch) weniger gewichtet als die Blutzirkulationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  (normalerweise 2/3 des Wertes);  $t_{1/2}$  wird nicht als einziger Parameter benutzt, da sie aufgrund von undichten Liposomen, nicht gut gereinigten Proben und anatomischen Störungen, wegen derer die Liposomen durch Austritt in den extravaskulären Raum statt durch Endozytose verloren gehen, zu niedrige Werte annehmen kann. Weiterhin können Hintergrundrauschen und Sekundärclearance (das sogenannte  $\beta$ ) des Markers zu den Fraktionen im Blut einen Tag nach der Injektion <1% beitragen, was einem  $t_{1/2}$ -Wert von 3 h entspricht; deshalb zieht man empirisch 3 h ab. SF-Werte unter 5 charakterisieren konventionelle Liposomen, während für Stealth-Liposomen die SF-Werte >10–15 sind. Diese Werte sind auch von der Art des Markers abhängig. In den Experimenten, deren Ergebnisse in Tabelle 2 aufgeführt sind, wurden hauptsächlich wasserlösliche Liposomenmarker verwendet.

Nach  $t_{1/2}$ , B/RES und SF zu urteilen erhält man die besten Ergebnisse bei  $\Delta$ -Werten um Null, wobei  $\Delta$  die Differenz zwischen dem durchschnittlichen Abstand zwischen den Verankerungspunkten der Polymerketten und der durch den Flory-Radius definierten Größe des Polymers ist. Bei großen  $\Delta$ -Werten ist die Bedeckung unvollständig („Pilz-Bedeckung“); bei  $\Delta = 0$  be-

ginnen einzelne Pilze in Wechselwirkung zu treten und zu überlappen, während bei  $\Delta < 0$  die Polymerbürsten entstehen. Es gibt keine große Abhängigkeit zwischen SF und  $n$ , der Monomerdichte pro Position oberhalb der Doppelschicht. Bei geringerer Kettenlänge und hohen Pfropfdichten findet man keine Wirkung, wahrscheinlich aufgrund der zu dünnen Oberflächenbarriere, die keine van-der-Waals-Bindung verhindern kann<sup>[18]</sup>. Bei langen Ketten kann der Zusammenhang zwischen SF und  $n$  der  $\Delta$ -Abhängigkeit folgen, d. h. er ist vom Pilz-Bürsten-Übergang der Polymerkonformation abhängig.

Daß der SF-Wert nicht, wie aufgrund von Gleichung (g) erwartet, mit  $\Delta$  und  $n$  über eine gewisse optimale Grenze hinauswächst, dafür gibt es – qualitativ betrachtet – drei mögliche Ursachen: 1) die Flexibilität der Polymerketten, 2) Phasentrennung und/oder der Zusammenbruch einer Polyoxyethylen-Bürste und 3) geringe Löslichkeit des PEG-Lipids in der Doppelschicht aufgrund des gesteigerten Lateraldrucks des Polymers über der Oberfläche der Doppelschicht oder zusätzlicher Oberflächenspannung. Mit anderen Worten: unsere Annahme, daß die Blutzirkulationszeiten umgekehrt proportional zur Proteinadsorption sind, die wiederum umgekehrt proportional zum Abstoßungsdruck oberhalb der Membran ist, muß verfeinert werden.

Die oberflächengebundenen Polymerketten müssen flexibel sein, um die Adsorption von Blutkomponenten an biokompatiblen Oberfläche zu verringern<sup>[89]</sup>. Es wurde vermutet, daß die Korrelationszeiten der Kettenbewegung der Polymere kleiner sein müssen als die zur Bindungsbildung nötigen Kontaktzeiten, wenn man die Adsorption zurückdrängen will. Zuvor gibt es noch keine NMR-Relaxationsstudien an Liposomen mit ge-

pfropften Polymerketten, doch zeigen ähnliche Arbeiten an PEG-Polymeren den Zusammenhang zwischen Molekülbewegung und Adsorptionsgeschwindigkeit<sup>[90]</sup>. Die Bedeutung der Beweglichkeit der Kette, d.h. der sich ständig verändernden Konformation und ihrer Auswirkung auf die Adsorption<sup>[18]</sup> wurde kürzlich als „mobile sterische Hinderung“ bezeichnet<sup>[91]</sup>. Es ist vernünftig zu erwarten, daß Mobilität und Flexibilität der Polymerketten mit zunehmender Ppropfdichte sinken. Eine höhere Polymerkonzentration auf der Oberfläche kann jedoch zwei weitere Effekte bewirken. Bei hoher lokaler PEG-Konzentration kann es zu intra- und intermolekularen Reaktionen kommen, und dies kann zur Kondensation der Ketten führen und den Zusammenbruch der Bürste bewirken<sup>[92]</sup>. Dies ist ein ähnlicher Vorgang wie die Phasentrennung bei wäßrigen PEG-Lösungen bei hohen Konzentrationen und Ionenstärken<sup>[93]</sup> (oberhalb der  $\nu$ -Temperatur). Höhere Konzentrationen von PEG-Lipiden in der Doppelschicht können zuerst (bei geringerer Sättigung) die Phasentrennung fördern und dann (bei höherer Sättigung) den Zerfall der Liposomen in gemischte micellare Phasen bewirken, die in Gegenwart von Liposomen schwer nachzuweisen sind<sup>[94]</sup>. Alternativ können hohe Lateraldrücke zwischen den Polymerketten die Stabilität der Doppelschicht beeinflussen, und die Bildung von zahlreichen Defekten in der Oberfläche der Doppelschicht kann dazu führen, daß hydrophobe Gruppen herausragen und Proteine adsorbieren<sup>[83]</sup>. Viele Untersuchungen, z.B. der Proteinadsorption, der Blutzirkulationszeiten, der Liposomenstabilität und des Austritts in vitro sowie spektroskopische und Streustudien zur Polymerkonformation und -dynamik, könnten zur Lösung dieses Problems beitragen. Es scheint, daß Pilz- und Bürstenanordnung der Polymere Vor- und Nachteile haben: Während beide die Proteinadsorption verringern, kann die Pilzform die Oberfläche nicht gegen kleinere Makromoleküle schützen, wohingegen die Bürstenform entweder Doppelschichtdefekte oder Phasenänderungen bewirkt oder schwache Proteinadsorption ermöglicht. Liposomen, die gleichzeitig mit einer Bürste von kürzeren und einem Pilz von längeren Polymeren bedeckt sind (z.B. 4–6 Mol-% PEG 2000 und 2 Mol-% PEG 5000) sollten die höchste biologische Stabilität aufweisen.

Alle diese Modelle setzen voraus, daß die PEG-Ketten vollkommen inert sind. Wenn man jedoch annimmt, daß die Adsorptionsenthalpie  $\Delta H$  für die Bindung von Proteinen an PEG (leicht) negativ sein kann, kann man qualitativ den Unterschied zwischen dem in vitro gemessenen Abstoßungsdruck und der biologischen Stabilität erklären. Ein einfaches Modell für die Adsorptionsgeschwindigkeit in Abwesenheit von PEG ( $K$ ) und an PEG-Ketten ( $k$ ) liefert nach Gleichung (h) die Adsorptions-

$$A = K(1 - \vartheta) + k\vartheta \quad (h)$$

geschwindigkeit, wobei  $\vartheta$  der Teil der Oberfläche ist, der mit Polymer umhüllt ist. Wenn man voraussetzt, daß die biologische Stabilität umgekehrt proportional zur Protein-Adsorptionsgeschwindigkeit ist, erhält man ein Stabilitätsmaximum, wenn der erste Term bei vollständiger Bedeckung Null wird, und im Bürsten-Regime ist  $A$  proportional zu  $k\vartheta'$ , wobei  $\vartheta'$  proportional der PEG-Konzentration auf der Oberfläche ist. Das kann mit anderen Worten bedeuten, daß zwei oder mehr Ketten gleichzeitig gebunden werden<sup>[95]</sup>. Abbildung 8 zeigt Daten aus Tabelle 2

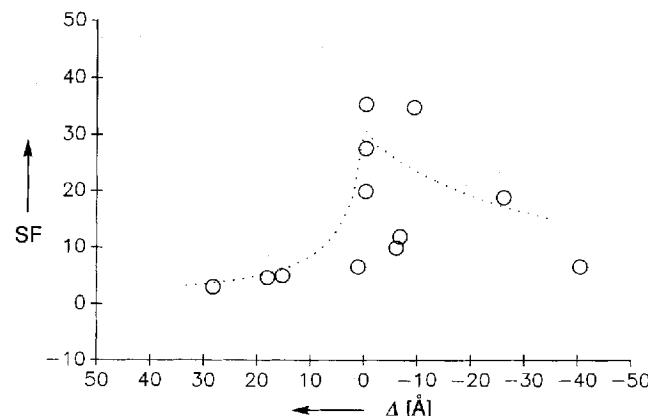


Abb. 8. Stealth-Faktor SF als Funktion der Differenz zwischen dem durchschnittlichen Abstand der Polymer-Pfropfpunkte  $D$  und dem Flory-Radius  $R_f$ . Die Datenpunkte entstammen Tabelle 2 und unveröffentlichten Ergebnissen von M. Newman und M. C. Woodle. Die gepunktete Linie ist eine Anpassung der einfachen empirischen Gleichung (h).

und die theoretische Kurve, die man aus Gleichung (h) unter der Voraussetzung erhält, daß die biologische Stabilität umgekehrt proportional zu  $A$  ist, also Stabilität =  $A^{-1}$ , für  $K = 0.033$  und  $k = 0.1$  K. Natürlich ist mit diesem einfachen Bild kein Verständnis auf molekularer Ebene möglich.

Eine andere noch unbeantwortete Frage ist die, warum die Blutzirkulationszeiten mit steigender Größe der Liposomen sinken. Liposomen, die größer als 200 nm sind, werden zwar noch kaum in der Leber, aber schon deutlich in der Milz aufgenommen. Man geht daher von verschiedenen Mechanismen und/oder Vermittlern für diese Aufnahme aus. Es ist möglich, daß kleine Proteine des Komplementsystems noch an die Lipidoberfläche gebunden werden, daß aber die Wechselwirkung der Liposomen mit den Rezeptoren der Milz durch die sterische Barriere beeinträchtigt wird und daß diese Wechselwirkung großesabhängig ist. Die Proteinbindung könnte aber auch einfach eine Folge der Krümmung der Liposomen sein (die auch die Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten und deren Mobilität bestimmt) oder von der Rotationsdiffusionsrate der Teilchen und deshalb von der Teilchengröße abhängen.

Das bringt uns zu der abschließenden Frage, ob wir heute schon künstliche Kolloidteilchen herstellen können, die mit Erythrozyten, die hundert Tage lang zirkulieren und SF-Werte >2000 haben, vergleichbar sind. Da trotz ihrer hohen sterischen Stabilität durch die Glycocalyx Erythrozyten einer Person nicht in einer anderen mit unterschiedlicher Blutgruppe zirkulieren können, müssen spezifische Wechselwirkungen auch mit Molekülen wie Dysopsonin oder dem Histokompatibilitätskomplexen eine Rolle spielen. Eine dicke Bürste aus 7.5-kDa-Polysacchariden auf roten Blutkörperchen scheint starrer und dichter zu sein als künstliche Polymerbeschichtungen.

## 7. Anwendungen sterisch stabilisierter Liposomen

Sterisch stabilisierte Vesikel eignen sich als Modelle für Studien über Polymere und Skalierungsgesetze, Kolloidstabilität und Zellbiologie. Es scheint, daß bei Zellen die spezifische Anziehung und die unspezifische Abstoßung eine wichtige Rolle spielen; gleiches gilt für diese Vesikel. Deshalb bieten sterisch stabili-

sierte Liposomen ein viel besseres Modell für die Untersuchung von Zellfunktionen und Zell-Zell-Wechselwirkungen als konventionelle Liposomen, die viele unspezifisch anziehende Wechselwirkungen zeigen. Zusätzlich bieten sterisch stabilisierte Liposomen wegen ihrer unspezifischen Abstoßung viele Anwendungsmöglichkeiten, hauptsächlich in der Diagnostik und im Wirkstofftransport (drug delivery).

Neben Liposomen und anderen lyotropen kolloiden Teilchen können PEG-Lipidmoleküle auch andere Lipidstrukturen stabilisieren. Ein typisches Beispiel sind Schäume. Aufgrund der großen polaren Kopfgruppen bilden PEG-Lipide in reiner Form keine sehr stabilen Schäume. Lecithinschäume, die 5–10 Mol-% PEG-Lipid enthalten, sind jedoch extrem stabil und widerstandsfähig gegenüber Ethanol als Entschäumer. Während typische Lecithinschäume innerhalb von Minuten zusammenbrechen, können diese Schäume über Monate stabil sein. Die Stabilität beruht wahrscheinlich darauf, daß das Wasser dank des gut gequollenen und immobilisierten Polymers aus der wäßrigen Schicht schlechter abfließt. Es ist jedoch noch zu früh, um über mögliche Anwendungen, z.B. die Bedeutung von Oberflächen mit PEG-Lipide enthaltenden Monoschichten, zu spekulieren.

### 7.1. Medizinische Anwendungen sterisch stabilisierter Liposomen

Stealth-Liposomen liefern aufgrund ihrer Fähigkeit, sich dem schnellen Clearance durch das Immunsystem zu entziehen, ein völlig neues und einzigartiges Medium für den Wirkstofftransport. Durch die Nutzung solcher Liposomen würde Ehrlichs fast ein Jahrhundert alte Idee von der magischen Kugel, d.h. einem System, das Wirkstoffe gezielt an erkrankten Zellen freisetzen kann, Wirklichkeit. Tatsächlich haben frühe Studien gezeigt, daß mit Antikörpern markierte Stealth-Liposomen vermehrt zum Zielgewebe in zugänglichen Bereichen befördert werden. Die zugänglichen Bereiche liegen bei systemischer Verabreichung in vaskulären Kompartimenten<sup>[96]</sup>, in Regionen größerer vaskulärer Permeabilität (die naturgemäß bei Infektionen, Entzündungen, Tumoren und anderen traumatischen Bedingungen gegeben ist oder künstlich induziert werden kann<sup>[97–100]</sup>, und bei örtlich gezielter Verabreichung im Zentralnervensystem und in der Bauchhöhle<sup>[101]</sup>. Dies ist auch bei nicht zielgerichteten Stealth-Liposomen, d.h. solchen, die nicht mit Antikörpern konjugiert sind und den größten Teil der Anwendungen ausmachen (siehe unten), der Fall. Ein Problem ist das Einschleusen der in den Liposomen eingekapselten Wirkstoffe in die Zelle, da der Großteil der Zellen nicht phagozytisch und Verschmelzung von Liposomen mit Zellen ein sehr seltenes Phänomen ist. Einen Weg, diese Schwierigkeit zu bewältigen, könnte sein, die Fusion durch oberflächengebundene fusogene Proteine zu unterstützen. Einfacher ist der Versuch, den Austritt der Wirkstoff aus den Liposomen durch Temperatur- oder pH-Änderungen zu induzieren oder Liposomen mit geringerer Stabilität zu verwenden. Dieses Gebiet ist gegenwärtig eines der heißesten der Liposomenforschung.

Viele Anwendungen von Liposomen werden durch die mangelnde Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln jedoch nicht beeinträchtigt<sup>[2]</sup>. Beispielsweise können Anthracycline (Wirkstoffe gegen Krebs) in sehr hohen Konzentrationen in Liposomen geladen werden (normalerweise 1 g Wirkstoff pro 7.5 g Lipid,

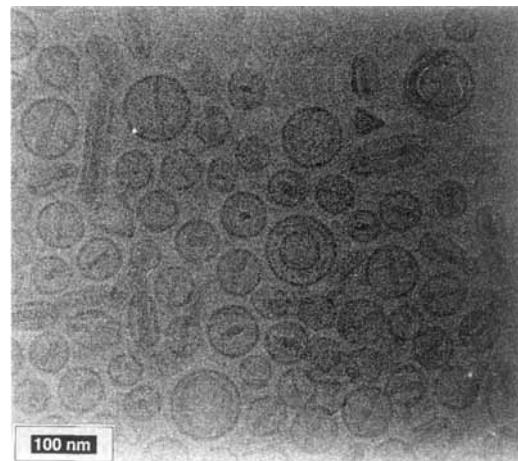


Abb. 9. Cryoelektronenmikroskopische Aufnahme von unilamellaren Vesikeln mit verkapselftem Doxorubicin. Dieses kann unter Verwendung von zahlreichen Gradienten bei sehr hohen Lipidkonzentrationen verkapselt werden. In unserem Fall haben wir als Gradienten Ammoniumsulfat benutzt, wobei die schwache Base NH<sub>3</sub> ( $pK = 9.3$ ) gegen die schwache Base Doxorubicin ( $pK = 8.3$ ) ausgetauscht wird. Wenn Doxorubicin in das Liposom eingedrungen ist, fällt die geladene Form mit Sulfat als Gegenion aus und diese Senke hält den Gradienten des chemischen Potentials von Doxorubicin so lange aufrecht, bis der Großteil an Wirkstoff ausgefallen ist. Das führt zu sehr hohen Konzentrationen im Liposominnenraum, und das Festwerden des Wirkstoffs führt zu seltsamen Veränderungen der Liposomenform. Ich danke P. Frederik, Universität Limburg, Maastricht, NL, für diese Aufnahme.

siehe Abb. 9), und durch die Verkapselung in Stealth-Liposomen wurde eine wesentlich bessere therapeutische Wirksamkeit erreicht. Nach unserem jetzigen Verständnis<sup>[17]</sup> können die Liposomen aufgrund ihrer verlängerten Anwesenheit im Blut an Stellen aus Gefäßen austreten, wo die Gefäßwand undicht ist. Das ist oft in Tumoren der Fall<sup>[97–99]</sup>, und tatsächlich haben Experimente an Tieren und Menschen gezeigt, daß die Wirkstoffkonzentration in Tumoren bei Verabreichung durch Liposomen um den Faktor 10 höher sind als bei Verabreichung des freien Wirkstoffs<sup>[102–105]</sup>. In diesen Fällen scheint es, daß die Liposomen im entsprechenden Gewebe festgehalten sind und dort ihren Inhalt entweder durch „Lecken“ oder den Abbau durch Enzyme wie Phospholipasen langsam freigeben. Dies paßt zu der Beobachtung, daß in Tumoren 3–4 Tage nach der Liposomenapplikation maximale Wirkstoffspiegel gefunden werden; für freie Wirkstoffe treten sie nach wenigen Stunden auf<sup>[98]</sup>. Das Maximum der Konzentration des Wirkstoffs kann bei Transport durch Stealth-Liposomen 10–30mal höher sein<sup>[106]</sup>.

Abbildung 10 zeigt den Effekt von zahlreichen Behandlungen auf die Tumorgroße in einem C26-Tumor-Mausmodell, das gegenüber freiem Adriamycin (=Doxorubicin, S-Dox,,) und auch gegenüber konventionellen Liposomen, die den Wirkstoff enthalten, praktisch unempfindlich ist<sup>[107]</sup>. Tiere, die mit Placebo-Liposomen und ihren Gemischen mit freien Wirkstoffen als Kontrolle behandelt worden waren, zeigten gegenüber den unbehandelten Tieren (lediglich Injektion von Salzlösungen) keine signifikanten Effekte. Die Applikation von Stealth-Liposomen, die Adriamycin enthielten, führte jedoch bei früher Behandlung zur vollständigen Remission des Tumors und bei später Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung (Abb. 10). Fast die gleichen Ergebnisse erhielt man mit dem sehr ähnlichen Wirkstoff Epirubicin<sup>[108]</sup>.

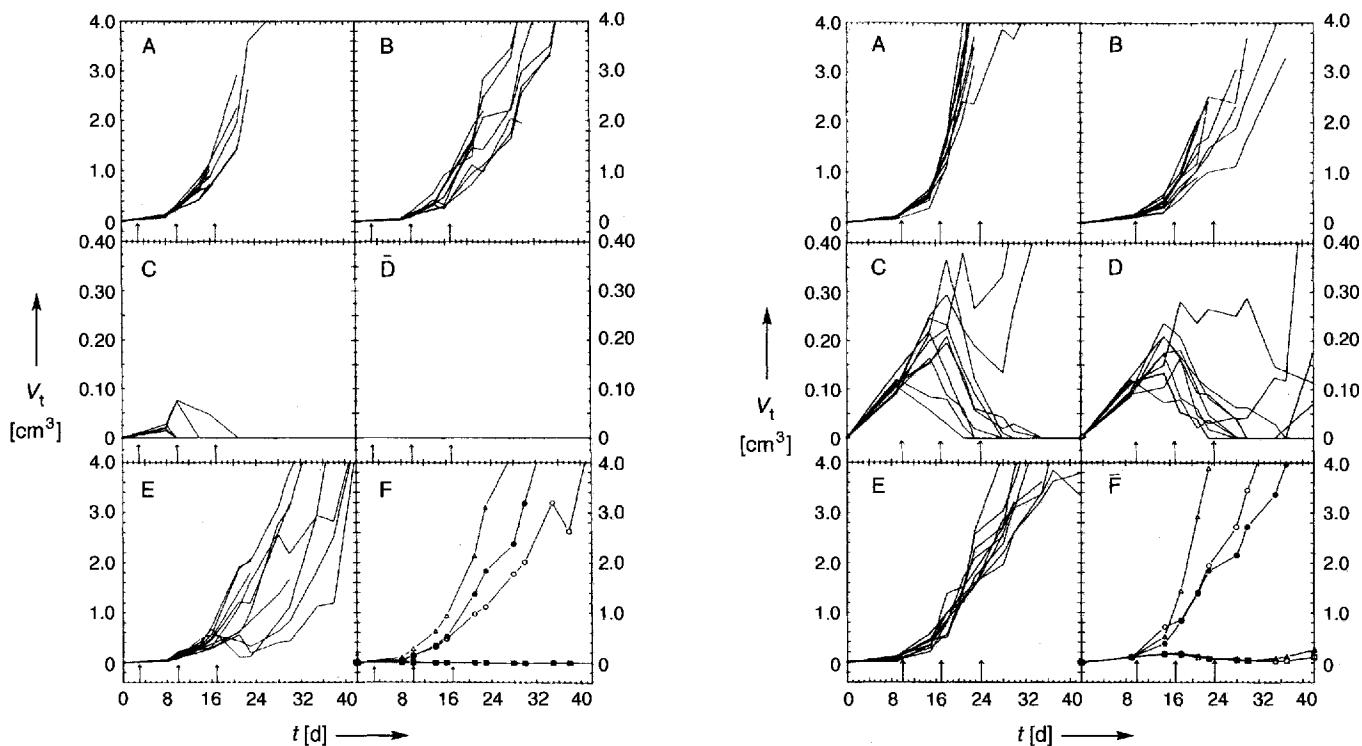


Abb. 10. Wirkung von Epirubicin auf das Wachstum des soliden C26-Tumors, der gegenüber konventionellen Therapien praktisch resistent ist. Aufgetragen ist die Tumogröße ( $V_t$ ) als Funktion der Zeit  $t$ . Den Mäusen wurde am Tag Null  $10^6$  C26-Zellen injiziert. Die Behandlungen wurden am 3., 10. und 17. (links) bzw. am 10., 17. und 24. Tag (rechts) durchgeführt (Pfeile). Die Bilder A – E zeigen das Tumorgrowth von zehn Tieren bei unterschiedlichen Behandlungen: A) Salzlösung (Kontrollexperiment), B) freies Epirubicin mit 6 mg pro kg Körergewicht, C) und D) Epirubicin in Stealth-Liposomen bei 6 mg/kg bzw. 9 mg/kg, E) Kontrollexperiment: Gemisch von Placebo-Liposomen und freiem Wirkstoff, F) Durchschnitt all dieser Behandlungen (von links nach rechts): Salz, freier Wirkstoff, Gemisch und Überschneiden der beiden liposomerverkapselten Wirkstoffe (Achtung: bei C) und D) sind andere Maßstäbe). Aus Lit. [102]. Praktisch gleiche Ergebnisse erhielt man mit Doxorubicin enthaltenden Stealth-Liposomen [103].

Verbesserungen erreichte man auch bei anderen resistenten Tumormodellen, z.B. dem Mammakarzinom (Abb. 11). Adriamycin-Formulierungen waren nicht nur für die Heilung von Mäusen mit frisch implantierten Tumoren wesentlich effektiver, sondern verminderten auch das Auftreten von Metastasen, die sich von diesen Brustimplantaten ableiten<sup>[109]</sup>. Das Wachstum von menschlichen Lungentumortransplantaten in Scid-Mäusen (Scid = severe combined immunodeficient)

konnte durch Adriamycin-Formulierungen vollständig aufgehalten werden, während freie Wirkstoffe und in konventionellen Liposomen verkapselte Wirkstoffe unwirksam waren<sup>[110]</sup>.

Die Fähigkeit von kleinen Liposomen, undichte Gefäßwände zu durchdringen, kann auch zur Behandlung von Entzündungen und Infektionen, die durch erhöhte Gefäßpermeabilität gekennzeichnet sind, genutzt werden<sup>[111]</sup>.

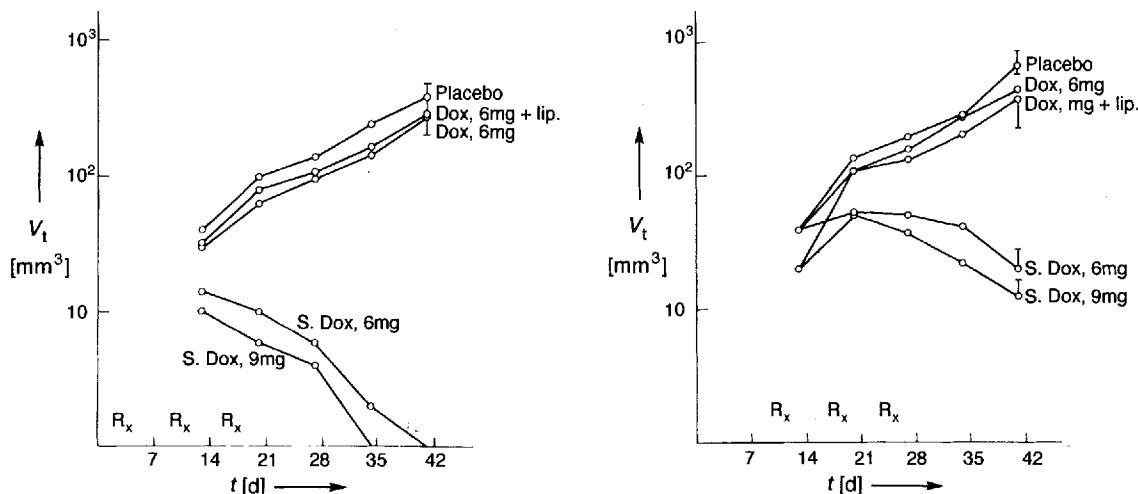


Abb. 11. Abhängigkeit der Tumogröße ( $V_t$ ) von der Zeit bei Mäusen mit implantierten MC2B-Mammatumoren ( $1 \text{ mm}^3$ ). Das linke Bild zeigt die Behandlung ( $R_x$ ) am 3., 10. und 17. Tag, das rechte Bild die Behandlung am 10., 17. und 24. Tag. Die Behandlung beinhaltet (von oben nach unten) Salzlösung, Gemisch von freiem Doxorubicin und Placebo-Liposomen (6 mg/kg), freier Wirkstoff bei 6 mg/kg und in Stealth-Liposomen verkapseltes Doxorubicin bei 6 bzw. 9 mg/kg. Aus Lit. [104].

Während derzeit die Verkapselung vieler neuer Wirkstoffe in sterisch stabilisierten Liposomen getestet wird, haben Phase I und II der klinischen Prüfung von Stealth-Liposomen, die mit Doxorubicin beladen sind, am Menschen sehr vielversprechende Ergebnisse geliefert: Die Blutzirkulationszeit beträgt an der Plasmakonzentration des Wirkstoffs gemessen, ca. 45 h. Dies führt zu einer Verminderung der Unterdrückung der Knochenmarksbildung, zu Neutropenie und Leukopenie sowie auch zu einer Veränderung der Verteilung von Doxorubicin im Körper hin zu Tumoren, wie bei AIDS-Patienten mit Kaposi-Sarkom beobachtet wurde<sup>[103, 112]</sup>. In diesen Läsionen wurden 11.4-, 5.2- und 9.9fach höhere Doxorubicinkonzentrationen bei injizierten Dosen von 10, 20 und 40 mg pro m<sup>2</sup> gemessen<sup>[103]</sup>. Im Gegensatz zum freien Wirkstoff, wo Faktoren wie akute Myelosuppression (Verringerung der Anzahl der weißen Blutkörperchen) und kumulative Cardiotoxizität die Dosis begrenzen, ist der begrenzende Faktor für die in Stealth-Liposomen verkapselten Wirkstoffe Stomatitis, eine Hauterkrankung (hier Läsion), im Mund.

Die Eigenschaft von sterisch stabilisierten Vesikeln, die schnelle Aufnahme durch Leber und Milz zu umgehen, macht das Konzept, zielgerichtete Liposomen für Anwendungen in vivo zu nutzen, durchführbar; zur Zeit wird in dieses Gebiet viel Arbeit investiert, um die Vesikel, die Wirkstoffe oder Marker enthalten und mit geeigneten Antikörpern oder anderen Liganden konjugiert sind, gezielt zu Krebszellen, atherosklerotischen Läsionen und Plaques (ischämischen Bezirken) sowie anderen traumatischen Bereichen zu bringen.

## 8. Schlußbemerkung

Polymerveredelte Liposomen und ihrer Anwendungen sind das Resultat der Anstrengungen von Wissenschaftlern vieler Disziplinen von der theoretischen Physik, der Kolloid- und Grenzflächenwissenschaft über die Organische Chemie und Biologie bis zur Medizin (Immunologie, Pharmakologie, Anatomie und Onkologie). Die neu entwickelten Liposomen sind in biologischer Umgebung sehr stabil und weisen ein bemerkenswertes therapeutisches Potential auf. Das nächste Ziel ist jetzt, die räumliche und zeitliche Kontrolle über die Freigabe der verkapselten Wirkstoffe zu verbessern. Die Zielgenauigkeit der Liposomen kann (in physisch erreichbaren Lagen) dadurch verbessert werden, daß man Antikörper an das Ende der Polymerketten bindet. Eine bessere Kontrolle der zeitlichen Abgabe der Wirkstoffe wird hauptsächlich auf drei Wegen versucht: 1. Ausnutzung physikalischer Effekte wie Temperatur- oder pH-Wert-Änderung oder Phasenänderung, die durch die Bindung an das Zielsystem induziert wird; 2. Ausnutzung chemischer Effekte, z.B. die Lipide an bestimmten Orten durch chemische Veränderung der membranbildenden Lipide zu destabilisieren und Doppelschichten mit fusogenen Eigenschaften herzustellen; 3. Ausnutzung biologischer Effekte: so lassen sich z.B. fusogene Moleküle an die Liposomenoberfläche binden oder die Internalisierung stimulieren. Für ein solches rationales Design von Liposomen müssen diese natürlich aus einer geeigneten Doppelschichtmatrix hergestellt sein. Schon jetzt hat sich gezeigt, daß sterisch stabilisierte Vesikel ein Beispiel dafür sind, wie komplexe und schwer lösbare Probleme multidisziplinär angegangen

werden können; für die Fortsetzung dieser Entwicklung wird sogar eine noch breitere interdisziplinäre Arbeit erforderlich sein.

Eingegangen am 28. Juni,  
veränderte Fassung am 25. Oktober 1993 [A 7]  
Übersetzt von Dr. Petra Tebben, Wuppertal

- [1] P. G. deGennes, *Physics of Liquid Crystals*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1974.
- [2] D. D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [3] V. Luzzati, H. Mustachi, A. Skoulios, R. Husson, *Acta Crystallogr.* **1960**, *13*, 660–667.
- [4] G. H. Brown, J. W. Doane, V. D. Noff, *Structure and Properties of Liquid Crystals*, CRC, Boca Raton, FL, USA, 1970.
- [5] H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzner, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117–162; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113–158.
- [6] J. Charvolin, J. F. Sadoc, *Colloid Polym. Sci.* **1990**, *268*, 190–195.
- [7] D. D. Lasic, *J. Theor. Biol.* **1987**, *124*, 35–41.
- [8] D. D. Lasic, *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *140*, 302–304.
- [9] A. D. Bangham, R. W. Horne, *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660–668.
- [10] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238–252.
- [11] *Ann. NY Acad. Sci.* **1978**, *308*, 1–412 (Hrsg.: D. Papahadjopoulos).
- [12] S. Leibler, *Phys. Today* **1988**, *41* (2), 25.
- [13] R. Lipowsky, *Nature* **1991**, *349*, 475–481.
- [14] J. Kas, E. Sackmann, R. Podgornik, S. Svetina, B. Zeks, *J. Phys. II* **1993**, *3*, 631–645.
- [15] *Handbook on Membranes* (Hrsg.: R. Lipowsky, E. Sackmann), Elsevier, Amsterdam, im Druck.
- [16] J. Maddox, *Nature* **1993**, *363*, 205.
- [17] D. Papahadjopoulos, D. T. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, S. K. Huang, K. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann, F. J. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11460–11464.
- [18] M. C. Woodle, D. D. Lasic, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113*, 171–199.
- [19] G. Gregoridis, *News Physiol. Sci.* **1989**, *4*, 146–151.
- [20] A. Gabizon, D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6949–6953.
- [21] M. K. Pratten, J. B. Lloyd, G. Horpel, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem.* **1985**, *186*, 725–733.
- [22] L. Illum, S. S. Davis, R. H. Muller, E. Mak, P. West, *Life Sci.* **1987**, *40*, 367–374.
- [23] M. C. Woodle, M. S. Newman, F. J. Martin, *Int. J. Pharm.* **1992**, *88*, 327–334.
- [24] D. D. Lasic, F. J. Martin, A. Gabizon, S. K. Huang, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 187–192.
- [25] W. Helfrich, *Phys. Lett. A* **1974**, *50*, 115–116.
- [26] D. D. Lasic, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *692*, 501–502.
- [27] D. D. Lasic, *Nature* **1992**, *355*, 279–280.
- [28] L. Cantu, M. Corti, M. Musolino, P. Salina, *Europophys. Lett.* **1990**, *13*, 1655–1657.
- [29] J. M. Gebicki, M. Hicks, *Nature* **1973**, *243*, 232–234.
- [30] E. W. Kaler, A. K. Murthy, B. E. Rodriguez, J. A. N. Zasadzinski, *Science* **1989**, *245*, 1371–1374.
- [31] Y. Talmon, D. F. Evans, B. W. Ninham, *Science* **1983**, *221*, 1047–1048.
- [32] B. Z. Lin, C. C. Yin, H. Hauser, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1147*, 237–244.
- [33] D. D. Lasic, *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *124*, 428–435.
- [34] P. Mariam, V. Luzzati, H. Delacroix, *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 165–189.
- [35] J. H. Fuhrhop, D. Fritsch, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 130–137.
- [36] D. D. Lasic, *Biochem. J.* **1988**, *252*, 1–11.
- [37] K. H. Klotz, M. Winterhalter, R. Benz, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1147*, 161–164.
- [38] D. D. Lasic, *Nature* **1991**, *351*, 613.
- [39] J. A. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman, *Science* **1984**, *223*, 201–203.
- [40] E. Evans, R. Skalak, *CRC Crit. Rev. Bioeng.* **1979**, *3*, 181–330.
- [41] D. Needham, R. Nunn, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 997–1009.
- [42] M. Bloom, O. Mouritsen, E. Evans, *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 293–397.
- [43] S. L. Regen, B. Czech, A. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6638–6671.
- [44] J. H. Fendler, *Science* **1984**, *223*, 888–894.
- [45] H. H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, H. Ringsdorf, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 962–964; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 938–940.
- [46] W. Reed, D. Lasic, H. Hauser, J. H. Fendler, *Macromolecules* **1985**, *18*, 2005–2012.
- [47] D. S. Johnston, S. Sanghera, M. Pons, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *602*, 57–69.
- [48] B. Hupfer, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Chem. Phys. Lipids* **1983**, *83*, 355–374.
- [49] T. Kunitake, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 692–710; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 709–726.
- [50] C. Santalla, P. Vierling, J. G. Riess, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 584–586; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 567–568.
- [51] H. Bader, H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1982**, *20*, 1623–1628.

- [52] M. Grit, J. H. deSmit, A. Struijke, D. J. A. Crommelin, *Int. J. Pharm.* **1989**, *50*, 1–6.
- [53] M. Grit, D. J. A. Crommelin, *Chem. Phys. Lipids* **1992**, *62*, 113–122.
- [54] F. J. Martin in *Specialized Drug Delivery Systems* (Hrsg.: E. Tyle), M. Dekker, New York, **1990**, S. 267–316.
- [55] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, New York, **1985**.
- [56] S. Nir, J. Bentz, J. Wilschut, N. Duzgunes, *Prog. Surf. Sci.* **1983**, *13*, 1–124.
- [57] E. J. Verwey, J. Th. G. Overbeek, *The Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam, **1948**.
- [58] C. Helm, J. N. Israelachvili, P. M. McGuigan, *Science* **1989**, *246*, 919–921.
- [59] A. M. Carmona-Ribeiro, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9555–9557.
- [60] S. I. Leon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. deGennes, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149–158.
- [61] A. C. Crowley, N. L. Fuller, R. P. Rand, V. A. Parsegian, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3163–3168.
- [62] W. Helfrich, *Z. Naturforsch. A* **1978**, *33*, 305–315.
- [63] J. N. Israelachvili, H. Wennerstrom, *Langmuir* **1990**, *6*, 837–876.
- [64] R. Podgornik, V. A. Parsegian, *Chem. Phys.* **1991**, *154*, 477–483.
- [65] S. Svetina, B. Zeks, *Croat. Chem. Acta* **1987**, *60*, 505–516.
- [66] S. Svetina, B. Zeks, *Stud. Biophys.* **1986**, *111*, 127–134.
- [67] M. C. Woodle et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1105*, 193–200.
- [68] D. H. Naper, *Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions*, Academic Press, New York, **1983**.
- [69] P. G. deGennes, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, *27*, 189–209.
- [70] P. G. deGennes, *Macromolecules* **1981**, *14*, 1637–1644.
- [71] P. G. deGennes, persönliche Mitteilung, **1992**.
- [72] K. Hristova, D. Needham in *Stealth Liposomes* (Hrsg.: D. D. Lasic, F. Martin), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, im Druck.
- [73] J. N. Israelachvili, persönliche Mitteilung, **1993**.
- [74] R. S. Ross, P. Pincus, *Macromolecules* **1992**, *25*, 2177–2183.
- [75] G. Vanlerberghe, R. M. Handjani-Villa, A. Ribier, *Coll. Natl. CNRS* **1978**, *938*, 303–311.
- [76] T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, Y. Y. Yang, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1066*, 29–36.
- [77] G. Decher, H. Ringsdorf, *Liq. Cryst.* **1993**, *13*, 57–69.
- [78] S. Zalipsky, C. Lee in *Poly(ethylene) Glycol Chemistry* (Hrsg.: J. M. Harris), Plenum, New York, **1992**, S. 347–370.
- [79] S. Zalipsky, R. Seltzer, S. Menon-Rudolph, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1992**, *15*, 100–114.
- [80] S. Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 296–299.
- [81] D. Needham, T. J. McIntosh, D. D. Lasic, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1108*, 40–48.
- [82] D. Needham, K. Hristova, T. J. McIntosh, M. Dewhirst, N. Wu, D. D. Lasic, *J. Liposome Res.* **1992**, *2*, 411–430.
- [83] T. L. Kuhl, D. E. Leckband, D. D. Lasic, J. N. Israelachvili, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1479–1488.
- [84] M. C. Woodle, L. R. Collins, E. Sponsler, N. Kossovsky, D. Papahadjopoulos, F. Martin, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 902–910.
- [85] R. Benz, K. H. Klotz, D. D. Lasic, M. Winterhalter, unveröffentlicht.
- [86] J. S. Tan, D. E. Butterfield, C. L. Voycheck, K. D. Caldwell, J. T. Li, *Biomaterials*, im Druck.
- [87] K. D. Caldwell, persönliche Mitteilung, **1993**.
- [88] J. D. Andrade, S. Nagaoka, S. Cooper, T. Okano, S. W. Kim, *ASAIO Trans.* **1987**, *33*, 75–78.
- [89] T. J. McIntosh, D. Needham, persönliche Mitteilung, **1992**.
- [90] E. Bayer, W. Rapp in *Poly(ethylene glycol) Chemistry* (Hrsg.: M. Harris), Plenum, New York, **1992**, S. 325–340.
- [91] G. Blume, G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1146*, 157–168.
- [92] P. G. deGennes, *C. R. Seances Acad. Sci. Ser. I* **1991**, *313*, 1117–1122.
- [93] P. Molynex, *Water Soluble Synthetic Polymers*, CRC, Boca Raton, FL, USA, **1990**.
- [94] D. D. Lasic, M. C. Woodle, F. Martin, T. Valentincic, *Period. Biol.* **1991**, *93*, 287–291.
- [95] Ich danke P. G. de Gennes, H. Wennerstrom, J. N. Israelachvili, G. Tiddy, J. Andrade, K. Caldwell, E. Evans, L. Auveray, O. Borisov, E. Sackmann, D. Papahadjopoulos, D. Needham und M. C. Woodle für Diskussionen.
- [96] J. Connel, T. M. Allen, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1484–1488.
- [97] H. F. Dvorak, A. J. Nagy, J. T. Dvorak, A. M. Dvorak, *Am. J. Pathol.* **1988**, *133*, 95–108.
- [98] J. A. Nagy et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *948*, 305–326.
- [99] R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.* **1987**, *6*, 559–593.
- [100] Z. Ning, D. Da, T. L. Rudoll, D. Needham, A. Whorton, M. W. Dewhirst, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3765–3770.
- [101] U. K. Nassander, A. Steereberg, H. Poppe, G. Prels, W. DeJong, D. J. A. Crommelin, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 646–653.
- [102] A. Gabizon, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 891–896.
- [103] D. W. Northfelt, L. Kaplan, J. Russell, P. A. Volberding, F. Martin in *Stealth Liposomes* (Hrsg.: D. D. Lasic, F. Martin), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, im Druck.
- [104] D. D. Lasic, *Am. Sci.* **1992**, *80*, 20–31.
- [105] D. D. Lasic in *Structure and Dynamics of Membranes* (Hrsg.: R. Lipowsky, E. Sackmann), Elsevier, Amsterdam, im Druck.
- [106] P. W. Working, M. S. Newman, K. Huang, E. Mayhew, J. Vaage, D. D. Lasic, *J. Liposome Res.* **1994**, *4*, 667–687.
- [107] E. Mayhew, D. D. Lasic, S. Babbar, F. J. Martin, *Int. J. Cancer* **1992**, *51*, 302–309.
- [108] S. K. Huang, E. Mayhew, S. Gilani, D. D. Lasic, F. Martin, D. Papahadjopoulos, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6774–6781.
- [109] J. Vaage, E. Mayhew, D. D. Lasic, F. J. Martin, *Int. J. Cancer* **1992**, *51*, 942–948.
- [110] S. S. Williams, T. R. Alosco, E. Mayhew, D. D. Lasic, F. J. Martin, R. B. Bankert, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3964–3967.
- [111] I. A. J. M. Bakker-Woudenberg, A. F. Lokersee, M. T. ten Kate, J. W. Mouton, M. C. Woodle, G. Storm, *J. Infect. Dis.* **1993**, *168*, 164–171.
- [112] J. R. Bogner, F. D. Göbel in *Stealth Liposomes* (Hrsg.: D. D. Lasic, F. Martin), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, im Druck.