

---

**Entwicklung und Charakterisierung echogener Liposomen  
zur Targetierung von ADAM8**

**Dissertation**

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

dem  
Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Eric Sasko**

**aus Bochum**

Marburg/Lahn 2017

---

Erstgutachter: **Prof. Dr. Udo Bakowsky**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Jörg-Walter Bartsch**

Eingereicht am 18.04.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2017

Hochschulkennziffer: 1180

---

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung  
und unter Leitung von

**Prof. Dr. Udo Bakowsky**

am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie  
der Philipps-Universität Marburg

---

Meiner Familie

---

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Aufgabenstellung.....	7
1.2 Summary of doctoral thesis (Zusammenfassung in englischer Sprache).....	8
1.3 Liposomen.....	10
1.3.1 Allgemeine Einführung.....	10
1.3.2 Aufbau.....	12
1.3.3 Beschallung.....	20
1.3.4 Modifizierung.....	22
1.3.5 Ligandentargeting.....	24
1.3.6 Liposomale Anwendungen.....	24
1.4 Ultraschall.....	27
1.4.1 Physikalische Grundlagen.....	27
1.4.2 Anforderungen an Ultraschallkontrastmittel.....	34
1.4.3 Anwendungsgebiete.....	34
1.5 Maligne Tumorerkrankungen.....	36
1.5.1 Allgemeines .....	36
1.6 Tumor-Targeting.....	38
1.6.1 Passives Tumor Targeting.....	39
1.6.2 Aktives Targeting.....	40
1.7 ADAM8 als Targetingmolekül.....	42
1.8 Concanavalin A.....	45
2 Methoden.....	47
2.1 Herstellung der Liposomen.....	47
2.2 Modifizierung der Liposomen.....	49
2.3 Charakterisierung der Liposomen.....	52
2.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie.....	52
2.3.2 Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscopy, kurz AFM).....	55
2.3.3 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM).....	56
2.4 Ultraschallkontrastmessungen.....	57
2.4.1 Durchflussmodell.....	57
2.4.2 Kontrastmessung.....	59
2.5 Kontrastvergleich mit SonoVue®.....	60
2.6 Stabilitätsmessung.....	61
2.7 Kontrastverbesserung.....	62
2.7.1 Variation der Lipidzusammensetzung.....	62
2.7.2 Variation der Herstellungsmethode.....	64
2.8 Zellkultur.....	66
2.9 Bindungsversuche, Targeting.....	68
2.9.1 Targetierung im ConA-Modell.....	68
2.10 Targetierung mit Antikörper MAB1031.....	70
2.10.1 Nachweis über Fluoreszenz an rekombinanter Ektodomäne.....	70
2.10.2 Nachweis über Fluoreszenz an U87-Glioblastom-Zellen:.....	70
2.10.3 Nachweis über Ultraschallkontrast an U-87-Glioblastom-Zellen.....	71
3 Charakterisierung der liposomalen Formulierungen.....	72
3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie.....	72
3.2 Rasterkraftmikroskop (AFM).....	74
3.3 Cryo-Transmissionselektronenmikroskop.....	75

---

3.4 Diskussion.....	77
4 Ergebnisse der Kontrastmessungen.....	86
4.1 Kontrastvergleich mit SonoVue®.....	86
4.2 Stabilitätsmessungen.....	89
4.2.1 Variation in Lipidzusammensetzung.....	91
4.2.2 Variation der Herstellungsmethode.....	94
5 Diskussion der Ultraschallkontrastmessungen.....	97
5.1 Kontrastvergleich mit SonoVue®.....	101
5.2 Variation der Lipidzusammensetzung.....	103
5.3 Variation der Herstellungsmethode.....	107
6 Ergebnisse der Targetierung im ConA-Modell.....	108
6.1 Statische Bindung an Glasobjektträgern.....	108
6.2 Dynamische Bindung.....	109
7 Ergebnisse der Targetierung mit Antikörper MAB1031.....	110
7.1 Statische Bindung an rekombinanter Ektodomäne.....	110
7.2 Statische Bindung an U87-Glioblastomzellen.....	112
7.3 Statische Bindung mit Nachweis über Ultraschallkontrast.....	118
8 Diskussion der Targeting-Versuchsreihen.....	119
8.1 Diskussion des ConA-Modells.....	120
8.1.1 Statische und dynamische Bindung.....	120
8.2 Antikörper MAB1031.....	123
8.2.1 Statische Bindung an rekombinanter Ektodomäne.....	124
8.2.2 Statische Bindung an U87-Glioblastom-Zellen.....	124
8.2.3 Statische Bindung mit Nachweis über Ultraschallkontrast.....	125
9 Zusammenfassung und Ausblick.....	127
10 Literaturverzeichnis.....	129
11 Anhang.....	141
11.1 Abkürzungsverzeichnis.....	141
11.2 Lebenslauf.....	145
11.3 Danksagung.....	146
11.4 Erklärung.....	148

---

# 1 Einleitung

## *1.1 Aufgabenstellung*

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung einer neuen, liposomalen, nanoskaligen Formulierung zur Anwendung als Ultraschallkontrastmittel mit der Eigenschaft, an die Zielstruktur ADAM8 zu binden.

Hierbei wurde speziell auf die Struktur und Funktionalität der Lipidvehikel hinsichtlich der Tumor-Targetierung geachtet. Dazu gehörten mit Polymeren, Fluoreszenzfarbstoffen und Anker-molekülen modifizierte Lipiddoppelschichten und die Einhaltung eines bestimmten Größenbereichs der Nanopartikel im Hinblick auf eine mögliche passive Anreicherung im Tumorgewebe. Größe, Zetapotential und Morphologie wurden mit verschiedenen Methoden untersucht und verglichen um die Liposomen zu charakterisieren.

Daneben müssen die Formulierungen als Ultraschallkontrastmittel über eine ausreichende starke Kontrastverstärkung bei guter Lagerfähigkeit verfügen. Dazu wurden die Partikel in ihrer Lipidzusammensetzung und Herstellungsmethode optimiert und in verschiedenen Durchflussmodellen mit diagnostischem Ultraschall vermessen. Die Intensität des Kontrastes wurde mit der eines kommerziell erhältlichen und klinisch verwendeten Ultraschallkontrastmittels verglichen.

Die Targetierung wurde zuerst mit der Modellsubstanz Concanavalin A, einem Lektin das an bestimmte Kohlehydrate bindet, durchgeführt. Hier wurden verschiedene Systeme für die Vermessung der Proben statisch und in einem Durchflussmodell erprobt.

Nach erfolgreicher Bindungsversuchen mittels ConA-Modell tauschten wir das Lektin gegen einen Anti-ADAM8-Antikörper aus. Die Zielstruktur ADAM8 wurde durch ihre Überexprimierung an verschiedenen Tumorzelltypen als vielversprechendes Target für die Liposomen ausgewählt. Dazu zählen, unter anderem besonders schlecht therapierbare Tumorerkrankungen.

Der Antikörper wurde kovalent an die Lipidvehikel gebunden und es wurden Targetierungsversuche mit der ADAM8-Ektodomäne und ADAM8-überexprimierenden humanen Glioblastom-Zellen durchgeführt, welche fluorimetrisch und über den Ultraschallkontrast ausgewertet wurden.

---

## ***1.2 Summary of doctoral thesis (Zusammenfassung in englischer Sprache)***

This doctoral thesis deals with the development and preparation of nano-scaled, antibody-conjugated, liposomal ultrasound contrast agents targeting ADAM8.

Liposomes offer a variety of properties which make them promising tools for ultrasound imaging and tumor targeting. Their size can be small enough to accumulate in tumor tissue, they can be PEGylated in order to gain increased circulation half-life, they can encapsulate drugs and contrast agents and can be conjugated with site-specific antibodies. Besides analyzing and optimizing the amount of ultrasound contrast, we examined *in vitro* specific interactions of the PEGylated, targeted lipid-based contrast agents with two different targeting models proving specific attachment of the conjugated liposomes on target-coated surfaces and ADAM8-overexpressing cells. The binding abilities were analyzed by fluorescence or ultrasound contrast measurements.

**Chapter 1** gives an introduction into micelles and liposomes, their structure, properties, possible modifications and current applications. Besides that, the reader is introduced into applications and the physics behind ultrasound contrast agents, into tumor diseases, types of tumor targeting, ADAM8 and concanavalin A as targeting ligands.

**Chapter 2** describes the methods used in this thesis for the preparation and characterization of the nanoparticles as well as the coupling mechanism and targeting studies.

In **Chapter 3** results of the size and zeta potential measurements are described, compared and discussed. The morphology of the formulations was visualized by cryo-transmission electron microscopy and was examined regarding the shell properties and shape, dimensions and size-distributions as well as variant types of lipid-based structures. Photon correlation spectroscopy, cryo-transmission electron microscopy and atomic force microscopy were used.

**Chapter 4** describes the results gained from ultrasound contrast measurements of varying lipid compositions and production methods. To characterize the ultrasound activity of our

---

formulations a self-made closed-loop flow system – first introduced by Kollmann *et al.*- was used[1], which simulates the ultrasound properties of a human blood vessel surrounded by tissue. Ultrasound was emitted, measured and analyzed by a portable medical ultrasound system. The amount of ultrasound contrast was compared to the commercially available contrast agent SonoVue®. Finally, our formulated ultrasound contrast agent was also examined after long-time storage.

**Chapter 5** discusses the ultrasound contrast measurements and the influence of the composition and production methods, as well as the comparison to SonoVue®.

In **Chapter 6** the results of the binding measurements are shown. Concanavalin A and mannan were used as a targeting model for specific antigen-antibody interactions. The binding abilities were proven on mannan-covered glass slides using fluorescence detection and inside the closed-loop flow system by measuring higher ultrasound contrast signals on the mannan-covered probe surface. Anti-ADAM8 antibody MAB1031-conjugated liposomes were used for targeting measurements on glioblastoma cells which overexpressed ADAM8 and its ectodomain hA8ecto-His. Binding studies were accomplished by the use of 1 mol% of fluorescent lipids and detected via fluorescence plate reader or via ultrasound contrast measurements.

**Chapter 7** discusses the binding abilities shown in Chapter 6 with regards to potential future oncological uses.

**Chapter 8** gives a brief summary of the thesis and outlook to further studies regarding diagnostic and drug or gene delivery systems.

**Chapter 9:** bibliography

**Chapter 10:** appendix (list of abbreviations, academic education, note of thanks)

---

## 1.3 Liposomen

### 1.3.1 Allgemeine Einführung

Liposomen sind sphärische, in sich geschlossene Körper, deren Hülle aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten besteht. Im Inneren umschließen sie das Medium, in welchem sie sich gebildet haben [2].

Die Lipiddoppelschichten bestehen aus amphiphilen Molekülen. Der Begriff *amphiphil* setzt sich zusammen aus den griechischen Wörtern ἀμφί (*amphi*=auf beiden Seiten) und φίλος (*philos*=Freund) und beschreibt die Eigenschaft, sowohl lipophil (aus dem griechischen λίπος (*lipos*=Fett)) als auch hydrophil (aus dem griechischen ὕδωρ (*hydor*=Wasser)) zu sein. Lipophilie beschreibt nach IUPAC-Definition *die Affinität eines Stoffes oder Moleküls zu einer lipophilen Umgebung* [3]. Demnach löst sich eine lipophile Substanz gut in fetten Ölen bzw. löst diese selbst gut. Um ein Maß für die Lipophilie einer Substanz zu beschreiben, wird die Konzentration dieser in einem Zweiphasensystem aus dem sehr lipophilen n-Octanol und Wasser angegeben. Der sich daraus ergebende Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient kann somit herangezogen werden, um das Verhalten der Substanz in unterschiedlichen Medien vorherzusagen. Beispiele hierfür wären, ob ein Arzneistoff dazu neigt, sich im Fettgewebe anzureichern, die Haut zu penetrieren, oder wie gut bzw. schlecht er sich in Körperflüssigkeiten löst [4].

Hydrophilie wiederum beschreibt die Eigenschaft, wie stark eine Substanz mit Wasser und anderen polaren Stoffen wechselwirkt. IUPAC definiert Hydrophilie als *Solvationstendenz eines Moleküls in Wasser* [5]. Hydrophile Substanzen sind in der Regel Salze oder Moleküle mit überwiegend polaren Gruppen und lösen sich demnach schlecht in fetten Ölen, d.h. sie sind meist lipophob (aus dem griechischen φόβος (*phóbos*=Furcht)). Polare Stoffe sind Stoffe, deren Moleküle elektrisch nicht neutral sind und ein permanentes elektrisches Dipolmoment besitzen. Das kann bei kovalenten Bindungen, wenn sich Atome ein oder mehrere freie Elektronenpaare teilen, auftreten. Am ausgeprägtesten ist dieser Effekt bei Ionenbindungen, hier gibt ein Atom dem anderen ein oder mehrere Elektronen ab und beide erhalten dadurch eine oder mehrere Ladungen. Hydrophile, kovalent gebundene Moleküle, wie beispielsweise Wasser, verfügen über lokale Ladungsverschiebungen durch Elektronegativitätsdifferenzen der Atome. Die dadurch resultierenden Dipolmomente ermöglichen elektrostatische

---

Wechselwirkungen mit polaren Gruppen anderer Moleküle.

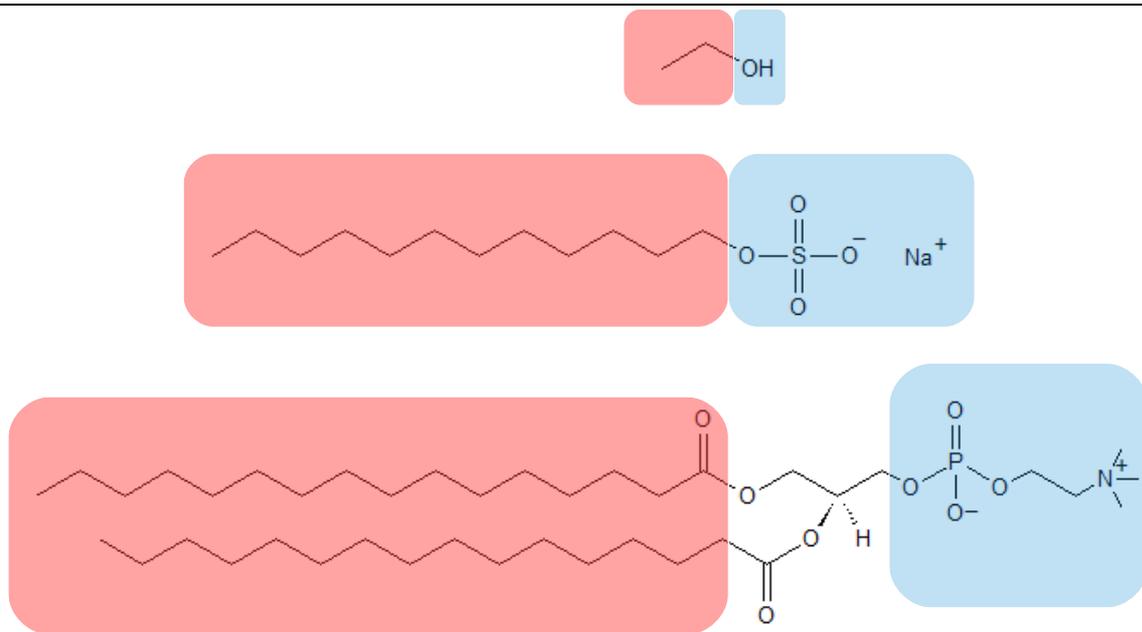
Dagegen bestehen zum Beispiel Fette besonders aus langkettigen Kohlenwasserstoffketten. Durch die gleiche Elektronegativität der Kohlenstoffatome erfolgen keine nennenswerten Ladungsverschiebungen und es resultiert kein Dipolmoment. Fette und viele andere Kohlenwasserstoffverbindungen sind daher wenig polar [6].

Amphiphile vereinen durch polare und apolare Bestandteile der Molekülstruktur beide Eigenschaften.

Lipo- und Hydrophilie sind gewichtige Eigenschaften für die Pharmazie. Beispiele hierfür sind: Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen indem man sie von der lipophilen Basen- in die hydrophile Salzform überführt, die Analyse und Trennung von Substanzen mittels chromatographischer Methoden oder die Vorhersage der Hautgängigkeit eines Arzneistoffes. Neben den ausgeprägt lipo- und hydrophilen Substanzen existieren auch viele ausgeprägt amphiphile. Diese finden Verwendung als Tenside, Emulgatoren, Lösungsvermittler, Penetrationsverbesserer oder Bausteine für Membranen, Mizellen und Liposomen.

Beispiele für die Verwendung von Amphiphilen sind Ethanol, der Fettflecken löst und trotzdem in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar ist, Natriumlaurylsulfat (SDS) was als Tensid weit verbreitet ist in Waschmitteln und Cremes (hier als Emulgator), und Phospholipide. Allen dreien, doch sehr unterschiedlichen Molekülen, ist eins gemeinsam: ein polarer und ein unpolare Bereich in der Molekülstruktur (siehe Abbildung 1).

Diese Eigenschaften der Amphiphile bestimmen auch deren Verhalten in wässrigen Medien, von der Absenkung der Grenzflächenspannung bis zur Bildung von Assoziaten, wie Mizellen und Liposomen.



**Abbildung 1:** Beispiele amphiphiler Moleküle, von oben nach unten: Ethanol, SDS, Phospholipid. Die lipophilen Bereiche, hier gesättigte Kohlenwasserstoffketten, sind rot, die hydrophilen blau eingefärbt.

### 1.3.2 Aufbau

In einem hydrophilen, z.B. wässrigen, Medium lagern sich amphiphile Moleküle an Grenzflächen an. Unter Grenzfläche versteht man die Phasengrenze, genauer definiert ist dies die Fläche zwischen zwei in sich homogenen Phasen, an der sich die physikochemischen Eigenschaften sprunghaft ändern [7]. Die Ursache für die Anlagerung an der Grenzfläche liegt in der Verdrängung der Amphiphilen aus der Volumenphase des wässrigen Mediums. Dies passiert, wenn die Wechselwirkungen zwischen Amphiphilen und dem umgebendem Medium geringer sind, als die gegenseitigen Wechselwirkungen der Moleküle des Mediums. Umso größer der apolare Teil des Amphiphils ist, desto größer ist die Tendenz, sich an der Phasengrenze des hydrophilen Mediums anzureichern. Als Resultat der Anreicherung setzt sich die Grenzflächenspannung herab, daher bezeichnet man Amphiphile auch als *grenzflächenaktiv* [8].

Gibt man weiter amphiphile Moleküle zu dem wässrigen Medium hinzu, so sinkt die Grenzflächenspannung mit zunehmender Konzentration. Sind alle Grenzflächen mit Amphiphilen besetzt, sinkt die Grenzflächenspannung auch bei weiterer Zugabe der Tenside nicht weiter ab, sondern bleibt konstant [8]. Es ist eine Grenzkonzentration erreicht, die als kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *CMC = critical micelle concentration*) bezeichnet wird [9]. Als Resultat weichen die Amphiphilen in der Volumenphase des Mediums zur Selbstassoziation aus, sie

---

beginnen mit der Zusammenlagerung zu Mizellen. Mizellen sind einschichtige Assoziationskolloide mit einem Durchmesser von 10 bis 30 nm.

Bei Phospholipiden und artverwandten Strukturen fand man heraus, dass sie in wässriger Umgebung Liposomen formen. Alec Bangham, ein englischer Biophysiker, charakterisierte Liposomen erstmals in der Mitte der 1960er Jahre und begründete führend die Grundlagenforschung in diesem Bereich [10–12]. Seitdem gab es zahlreiche weiterführende Studien bezüglich der Präparation, Charakterisierung, Modifizierung und Anwendung von Liposomen.

Grundsätzlich haben Amphiphile die Eigenschaft, sich in wässriger Umgebung zu verschiedenartigen Strukturen zusammenzulagern. Hierbei werden die hydrophilen Kopfgruppen als eine Art Schild nach außen, gegen die umgebenden hydrophilen Moleküle angeordnet. Ziel dieser Molekülanordnung ist die Reduktion von hydrophoben Wechselwirkungen der Kohlenwasserstoffketten mit der umgebenden wässrigen Phase. Die aus dem Molekülaufbau resultierende Geometrie des Amphiphil-Assoziats wird mit Hilfe des kritischen Packungsparameter (auch: Formfaktor) beschrieben, somit kann die favorisierte Struktur der Assoziat vorhergesagt werden [13].

Der kritische Packungsparameter errechnet sich wie folgt:

$$P_{kritisch} = \frac{v}{(a_0 * l_c)}$$

$v$  = Volumen der hydrophoben Ketten

$a_0$  = Fläche des hydrophilen Bereiches

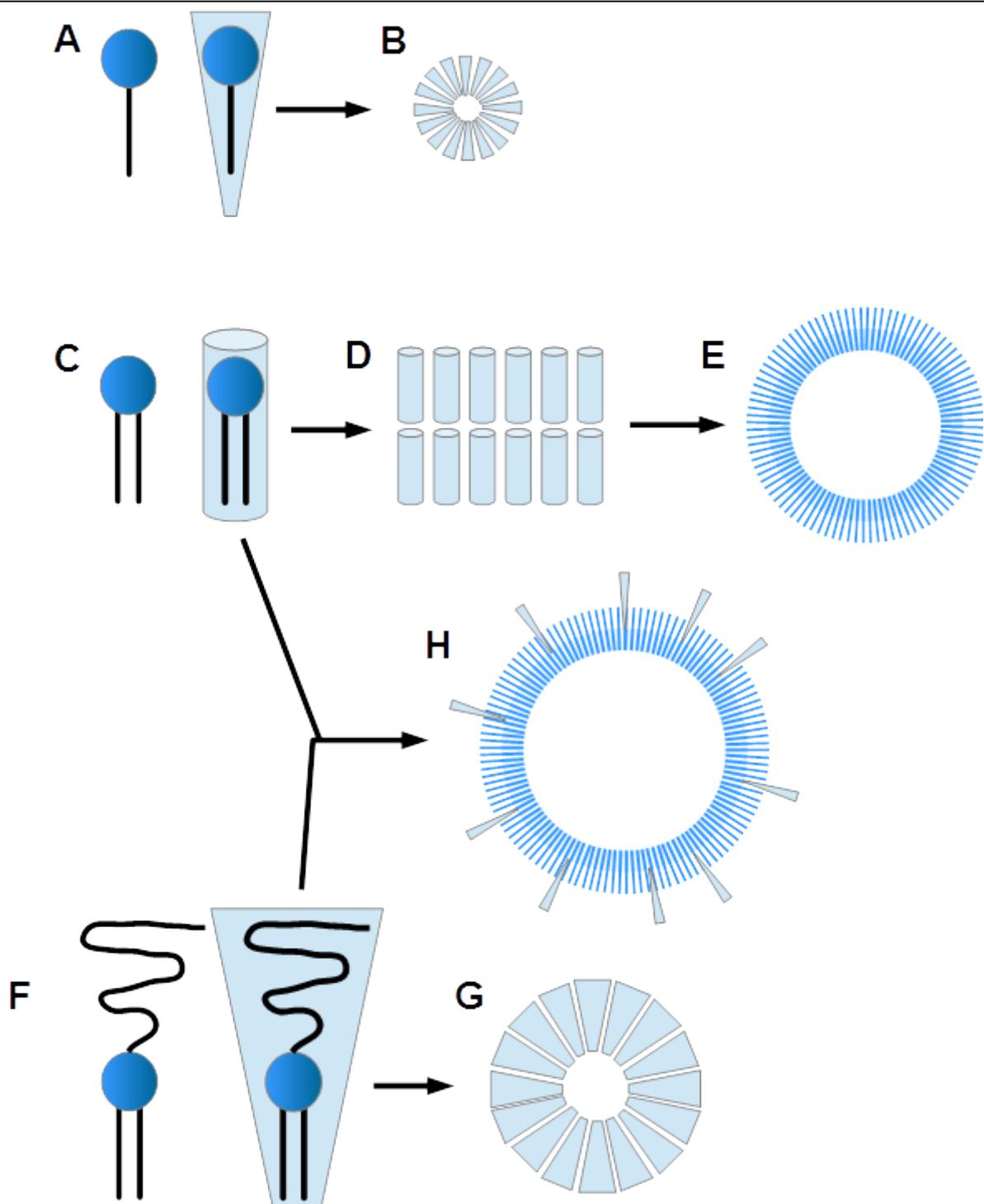
$l_c$  = Kettenlänge der Kohlenwasserstoffkette

Anhand des kritischen Packungsparameters lässt sich im Vorfeld abschätzen, ob sich Mizellen oder Liposomen bilden (siehe Abbildung 2). Für die Herstellung von Liposomen haben sich Phospholipide als besonders geeignet erwiesen. Durch ihre langen, zweikettigen Kohlenwasserstoffketten nimmt die zylindrische Geometrie der Phospholipide in der Masse zu viel Platz ein, um in den kleinen, stark gekrümmten Innenraum einer kugelförmigen Mizelle zu passen. Stattdessen ermöglicht die Aneinanderreihung dieser Amphiphilen die

Ausbildung von Bilayern. Die Ausbildung von sphärischen Mizellen bleibt ein- oder kurzkettigen Amphiphilen mit geringem kritischem Packungsparameter ( $P_{\text{kritisch}} < 1/3$ ) vorbehalten. Im Gegensatz dazu ist für die Herstellung von Liposomen, die aus gekrümmten Bilayern bestehen, ein kritischer Packungsparameter von  $0,74 < P_{\text{kritisch}} < 1$  ideal [14].

**Tabelle 1:** Je nach erhaltenem kritischem Packungsparameter kann auf die Packungsgeometrie des Moleküls und damit auf die zu erwartende Struktur der Assoziat geschlossen werden [14, 13].

Kritischer Packungsparameter	Packungsgeometrie	Assoziat bei Hydratation
$P_{\text{kritisch}} < 1/3$	Spitzer Kegel	Sphärische Mizellen
$1/3 < P_{\text{kritisch}} < 1/2$	Flacher Kegel	Zylindrische Mizellen
$1/2 < P_{\text{kritisch}} < 1$	Zylindrischer Kegel	Flexible Bilayer
$P_{\text{kritisch}} = 1$	Zylinder	planare Bilayer
$P_{\text{kritisch}} > 1$	Umgekehrter flacher Kegel	Inverse Mizellen



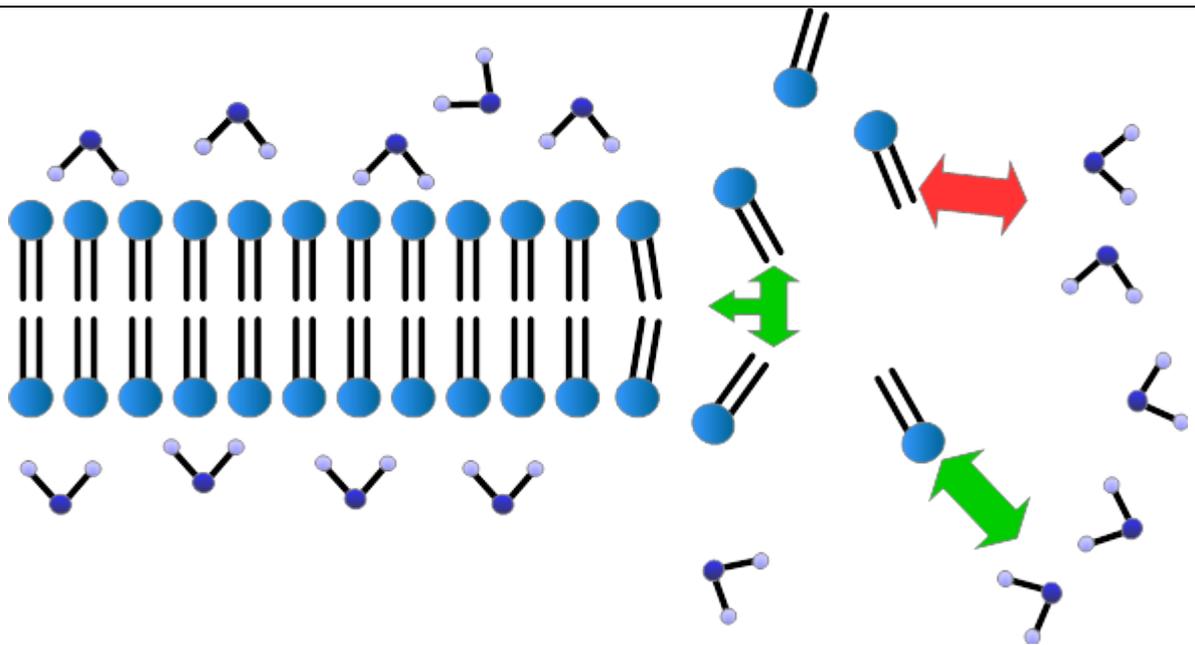
**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Amphiphilen und ihrer Assoziante im Hinblick auf die Geometrie. Anhand des kritischen Packungsparameters lassen sich resultierende Packungsgeometrien gebildeter Assoziante vorhersagen. (A): Tensid, einkettig (SDS) ( $P_{\text{kritisch}} < 1/3$ ), spitzer Kegel, bildet sphärische Mizellen aus (B). (C): Phospholipid, zweikettig ( $1/2 < P_{\text{kritisch}} \leq 1$ ), zylindrischer Kegel/Zylinder. Bildet Bilayer (D) und Liposomen (E) aus. (F): PEGyliertes Phospholipid, zweikettig ( $P_{\text{kritisch}} < 1/3$  durch den sehr großen hydrophilen Bereich), abgeflachter Zylinder, sphärische Mizellen (G). Mischung aus (C) mit geringem Anteil von (F), PEGylierte Liposomen (H).

---

Der Großteil der Phospholipide ist aufgrund des großen hydrophoben Molekülteils nicht wasserlöslich. Die Zugabe einer wässrigen Lösung würde nur die äußerste Schicht des Pulvers hydratisieren und das Innere des Agglomerats gar nicht erst benetzen. Zur Bildung von Liposomen braucht man daher spezielle Herstellungstechniken, eine gebräuchliche ist die Lipidfilm-Methode. Hierbei wird den in apolaren Lösungsmitteln gelösten Lipiden das Lösungsmittel entzogen, die Lipide benetzen dann in zahlreichen Doppelschichten als dünner, trockener Film das Innere der verwendeten Gefäße, wodurch die benetzbare Oberfläche möglichst groß wird [2]. Wird nun unter gleichzeitiger Temperaturerhöhung eine wässrige Lösung hinzugegeben, nehmen die Doppelschichten durch Hydratisierung an Volumen zu (*swelling*). Die Schichten bewegen sich dadurch auseinander und bilden tubuläre, Myelinartige Assoziate aus. Durch mechanische Einflüsse, wie Schwenken, Schütteln, Beschallung, etc. brechen diese Röhren-förmigen Kolloide und formen Kugeln aus, um die an der Bruchkante freiliegenden hydrophoben Ketten abzuschirmen [2, 15]. Dies führt zur Formung von großen Liposomen, meist mehrlamellarig und gegebenenfalls ineinander verschachtelt.

Je nach Anwendungsbereich sind Liposomen mit unterschiedlichen Größen und Membraneigenschaften erforderlich, sie werden grundsätzlich nach Größe und Lamellenzahl eingeteilt: Die kleinsten Liposomen mit Durchmessern von 20 - 100 nm werden *small unilamellar vesicles* (SUV) genannt. Größere, mit Durchmessern von 100 nm bis wenige Mikrometern, werden als *large unilamellar vesicles* (LUV) eingeteilt. Ferner findet sich die Bezeichnung *giant unilamellar vesicles* (GUV), für Größen von 1 - 100 µm. Die Liposomen mit einer Lipiddoppelschicht werden als *unilamellar vesicles* (UV), solche mit mehreren Lipiddoppelschichten als *multilamellar vesicles* (MV) bezeichnet. MV haben einen weit gestreckten Größenbereich mit Werten von 100 nm - 10 µm.

Die kleinen, einlamellarigen Liposomen ermöglichen einen verhältnismäßig größeren Einschluss anderer Stoffe, da der Raum im Inneren nicht wie bei großen, multilamellaren Liposomen durch weitere Liposomen bzw. Doppelschichten eingenommen wird. Für eine Tumor-Targetierung sind SUV vorteilhaft (siehe Kapitel 1.3.4) Um kleinere, möglichst einlamellarige Liposomen zu erhalten sind weitere Schritte nötig. Eine Möglichkeit ist die Temperierung und Behandlung mit Ultraschall, da Phospholipide temperaturabhängig ihre Konformation ändern.

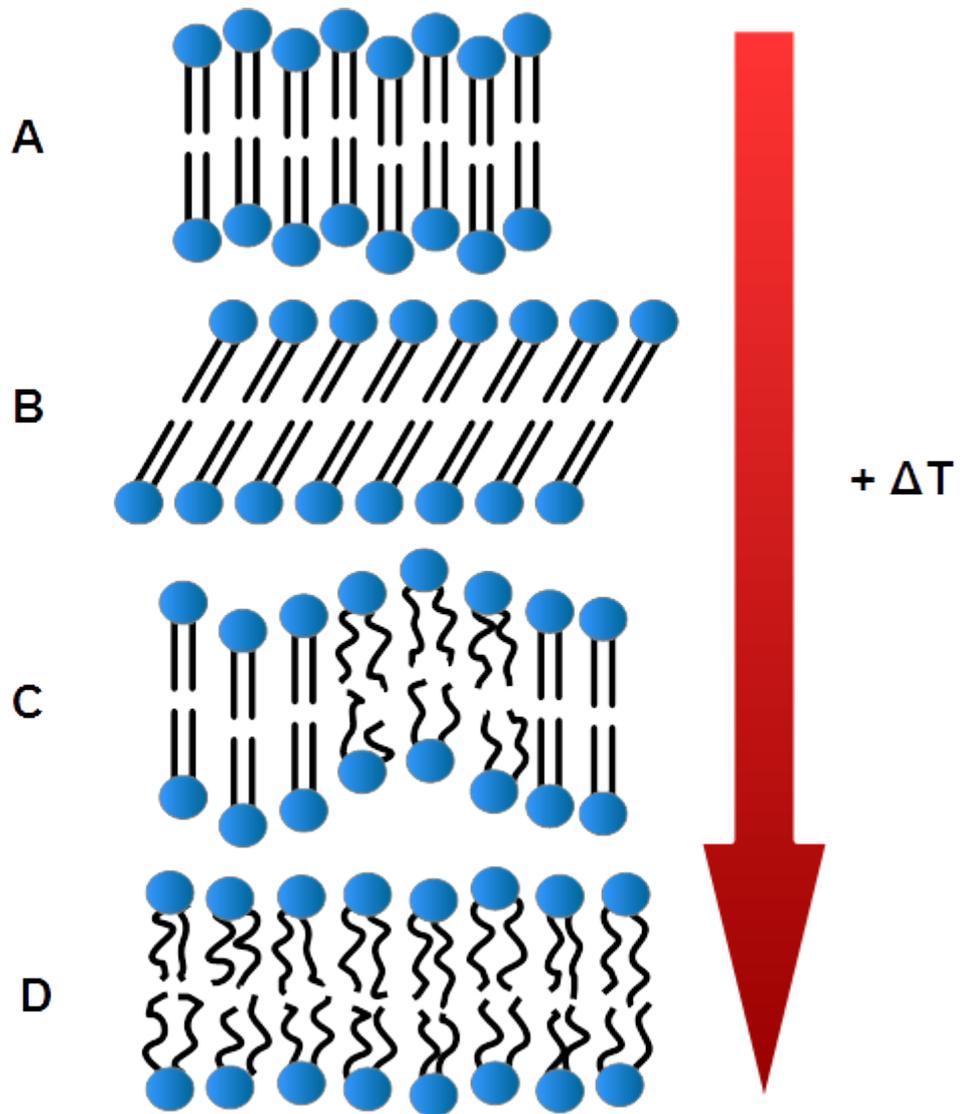


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung von Phospholipiden in wässriger Umgebung. Tendenz (grün) der lipophilen Schwanzgruppen zueinander, der Kopfgruppen zu den polaren Molekülen, und Abstoßung (rot) der Schwanzgruppen zu den polaren Molekülen. Die dadurch erfolgende Aggregation der Amphiphilen zur Doppelschicht schirmt die apolaren Schwanzgruppen von den polaren Wassermolekülen ab.

Jedes Phospholipid hat eine charakteristische Temperatur, bzw. einen Temperaturbereich, wo eine Phasenumwandlung stattfindet: die Phasenumwandlungstemperatur. Unterhalb dieser Temperatur liegen die Phospholipide in einer soliden, wenig mobilen kristallinen Phase vor. Hier sind die Phospholipide hoch geordnet und dicht gepackt, die Kohlenwasserstoffketten liegen in all-trans-Konformation vor. Die Kopfgruppen sind in dieser Phase noch starr und unvollständig hydratisiert [16], Bei großen Kopfgruppen und steigender Temperatur neigen sich die Phospholipide und werden mobiler, dabei können Wassermoleküle tiefer in die Grenzschicht eindringen, die Hydratisierung der Kopfgruppen nimmt zu. Diese Vorgänge zeichnen die Gelphase aus.

Bei weiterer Temperaturerhöhung folgt die *rippled phase*, hier kommt es zum partiellen Schmelzen in vielen Bereichen der Doppelschicht. Dies führt geometrisch zu lokalen Krümmungen. Da die Kopfgruppen jetzt nicht mehr in einer Ebene sind, erscheint die Doppelschicht nicht mehr linear, sondern gezackt. Durch das Schmelzen staucht sich das Lipid zusammen und die Kopfgruppe liegt nun neben den gestreckteren, nicht geschmolzenen Lipiden tiefer in der Ebene der Grenzfläche. In diesem Zustand rotieren die Phospholipide um die eigene Achse.

Eine weitere Energiezufuhr führt zum vollständigem Schmelzen der Doppelschicht bis zum Erreichen der flüssigkristallinen Phase. Hier besitzen die Ketten nicht mehr all-trans, sondern viele trans-gauche-Konformationen. Die Phospholipide diffundieren untereinander und rotieren nun schneller um die Längsachse, die Doppelschicht ist mobiler, fluider und gedehnt (Siehe Abbildung 4) [17, 18].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung einer Phospholipiddoppelschicht mit zunehmender Temperatur von RT (oben) über die Phasenumwandlungstemperatur hinaus (unten). Bei niedrigen Temperaturen liegen die Lipide in einer hoch geordneten, dicht gepackten kristallinen Phase vor (A). Durch Neigung der Lipide bei Temperaturzunahme und bei großen Kopfgruppen wird die Gelphase (B) erreicht, hier sind die Kopfgruppen mobiler und vermehrt hydratisiert. In der *rippled phase* (C) sind die Doppelschichten partiell geschmolzen und gestaucht, dadurch liegen die Kopfgruppen nicht mehr in einer Ebene, was die Hydratisierung weiter erhöht. Bei weiterer Temperaturerhöhung ist das vollständige Schmelzen zur

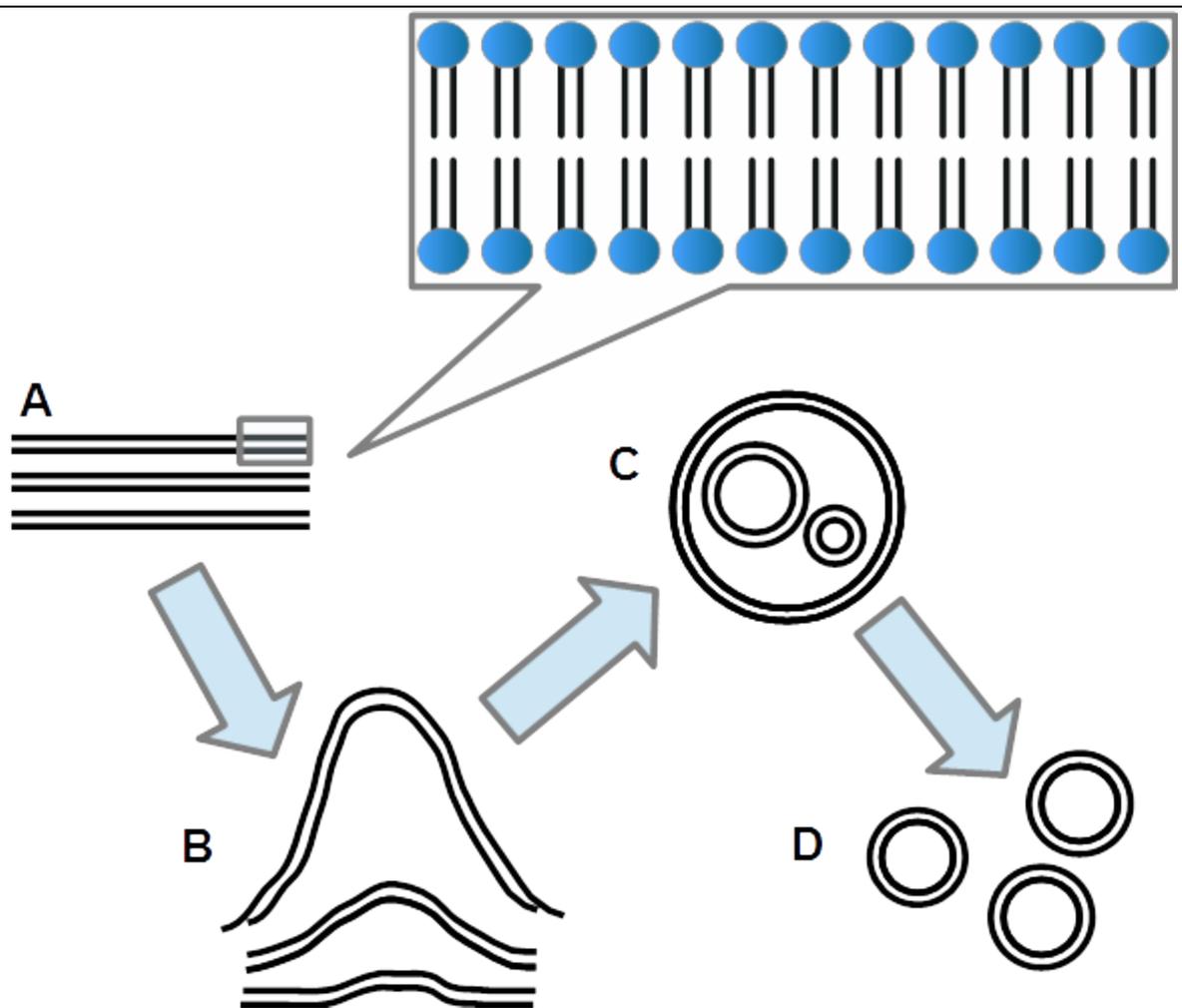
---

flüssigkristallinen Phase (D) erreicht, hier isomerisieren die Lipide von der all-trans in viele trans-gauche-Konformationen.

Die Phasenumwandlung von kristalliner zur flüssigkristallinen Phase hat auch großen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Doppelschicht. Zu erwähnen ist jedoch, dass die Konformationsänderungen nicht nur temperaturabhängig sind, sondern noch von weiteren Faktoren abhängt: Zusammensetzung, Symmetrie und Länge der Kohlenwasserstoffketten sowie Polarität, Ladung und Größe der Kopfgruppe [17, 19].

### *1.3.3 Beschallung*

Die Beschallung von großen, multilamellaren Liposomen stellt eine hohe Energieeinbringung in das System ein und erzeugt aus den Fragmenten der zerstörten großen Liposomen viele kleine unilamellare Liposomen. Beschallt werden kann direkt, mit einer in die Liposomen-Dispersion getauchten Ultraschallsonde oder indirekt, durch ein Gefäß, welches in ein Ultraschallbad getaucht wird. Nachteil der direkten Methode ist die häufige Verunreinigung mit Metallpartikeln (häufig Titan) von der Sondenspitze, welche dann per Zentrifugation abgetrennt werden müssen. Ein Vorteil ist jedoch die, verglichen mit der Herstellung im Ultraschallbad, höhere Energie, die dem System zugeführt werden kann. Dies kann gleichzeitig auch zum Nachteil werden, da sich die Dispersion erhitzen kann [2, 20].



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Liposomen-Entstehung mittels Filmmethode und Beschallung. Nach Evaporation des Lösungsmittel bleiben die Lipide als dünner Lipidfilm an der Gefäßinnenwand zurück. Eine Lipiddoppelschicht ist hier durch eine doppelte Linie dargestellt (A). Bei der anschließenden Hydratisierung kommt es durch zunehmende Anlagerung von Wassermolekülen im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen zum *swelling* (engl. für *Anschwellen*, *Volumenzunahme*) der Doppelschichten (B). Es bilden sich multilamellare, große Liposomen (C), welche durch Ultraschall aufgebrochen werden und sich spontan in kleinere SUV (D) umwandeln.

---

### 1.3.4 Modifizierung

Liposomen sind in der Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht flexibel und dadurch für vielseitige Anwendungsgebiete geeignet sind. Durch die Verwendbarkeit von modifizierten Phospholipiden erlangen Liposomen ihre speziellen und versatilen Eigenschaften.

Cholesterol spielt bei Liposomen eine wichtige Schlüsselrolle und hat zahlreiche Funktionen [21–23]. CH ändert konzentrationsabhängig die Packungsdichte der Phospholipide in Lipiddoppelschichten, es füllt unter anderem die Lücken, die durch das Abknicken der Fettsäurereste nach der Doppelbindung entstehen [24, 25]. Darüber hinaus behindert CH die Aggregation der Vesikel [26], reduziert die Phaseninversionstemperatur [27, 28] und verringert die Permeabilität der Lipiddoppelschicht für eingeschlossene Stoffe [29]. Diese Eigenschaften sind nicht nur für liposomale Arzneistoffträger wichtig, sondern auch in biologischen Membranen um die Durchlässigkeit für Ionen zu verringern und das Membranpotential aufrechtzuerhalten [30]. CH stabilisiert zudem die *rippled phase* beim Phasenübergang [31]. Die Funktion von CH in Membranen ist temperaturabhängig, bei niedrigen Temperaturbereichen erhöht CH die Unordnung, während es bei höheren Temperaturen die Ordnung erhöht [2].

Um einer Aggregation entgegenzuwirken und *in vivo* eine höhere Verweildauer durch Schutz vor biologischer Elimination zu erreichen, lassen sich Liposomen sterisch stabilisieren. Meist erfolgt dies unter Verwendung von Polyethylenglykol (PEG), welches kovalent an Phospholipide gebunden wird [32, 33]. PEG ist ein linear aufgebautes Polymer aus Ethylenoxid-Monomeren ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ )<sub>n</sub>. Für Liposomen hat sich die Verwendung von PEG mit einer mittleren molekularen Masse von 2000 Da durchgesetzt, dies entspricht einer Kettenlänge von etwa 45 Monomeren. Diese hydrophilen und dadurch stark hydratisierten Polymerketten bilden einen flexiblen, sterischen Schirm um die Liposomen. Diese Flexibilität ermöglicht bestimmte Anordnungen der Polymerketten, bei niedrigen Konzentrationen wurde ein Pilz-förmiges Modell ohne gegenseitige Beeinflussung der Polymere beschrieben. Bei höheren Konzentrationen wiederum richten sich die PEG-Ketten büstenförmig aus und beeinflussen sich dadurch ungünstig [2]. Es kommt zu gegenseitigen Behinderung der sonst flexiblen PEG-Ketten, bis hin zu deren Kondensation und dem Verlust von Polymerketten, was sich nachteilig auf den sterischen Schutz auswirkt. Die besten Ergebnisse einer PEGylierung wurden mit einem Lipidanteil von 5 - 7 mol% erzielt [32]. Diese „PEGylierten“

---

Liposomen werden "Stealth-Liposomen" genannt, in Anlehnung an die militärische Tarnkappentechnik. Die PEGylierung schützt somit sterisch und zusätzlich durch seine Hydrophilie vor Interaktionen wie der Anlagerung von Plasmaeiweißen [37].

Liposomen ohne Stealth-Schicht erliegen schnell der Clearance durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES). Durch die PEGylierung erreicht man längere Zirkulationszeiten und der Aggregation der Liposomen wird entgegengewirkt [34–36]. Neben der Oberfläche spielt auch die Größe der Liposomen eine Rolle bei der Eliminierung: große Liposomen werden schnell vom RES eliminiert, während kleine PEGylierte Liposomen länger zirkulieren.

Den Trend zur PEGylierung zeigt die galenische Entwicklung von liposomalen Anthrazyklinen der zweiten Generation, so ist liposomales Doxorubicin (myocet<sup>®</sup>, Caelyx<sup>®</sup>) kleiner (50 – 100 nm) und PEGyliert, dadurch erlangt man intravasale Verweilzeiten der Liposomen von mehreren Tagen [34].

---

### 1.3.5 Ligandentargeting

Um die Liposomen an den Zielort im Organismus zu dirigieren, kann man die Liposomenoberfläche mit zielsuchenden Liganden bestücken und nutzt somit erneut die variable Lipidzusammensetzung liposomaler Formulierungen [39]. Für die Targetierung eignen sich besonders Antikörper, die über Ankerlipide an die Liposomenhülle gebunden werden können. Da PEGylierung direkt an die Liposomenmembran gekoppelte Antikörper sterisch ungünstig abschirmen und die Antigenpräsentation erschweren, ging man oft dazu über, den Anker an das distale Ende der PEG-Kette zu setzen. So erhält man weit in den Raum ragende Antikörper ohne auf den Stealth-Effekt verzichten zu müssen [40–42]. Des Weiteren ist denkbar, dass durch ein Liposom mit mehreren flexiblen PEG-Ankern mehrere Antikörper an das Target binden. Im Gegensatz dazu kann, bedingt durch die geometrische Konformation und starre Anordnung von direkt an Liposomen gekoppelten Antikörpern, nur je ein Antikörper präsentiert werden, da dessen benachbarter Antikörper gewinkelt in eine andere Richtung zeigt [43].

### 1.3.6 Liposomale Anwendungen

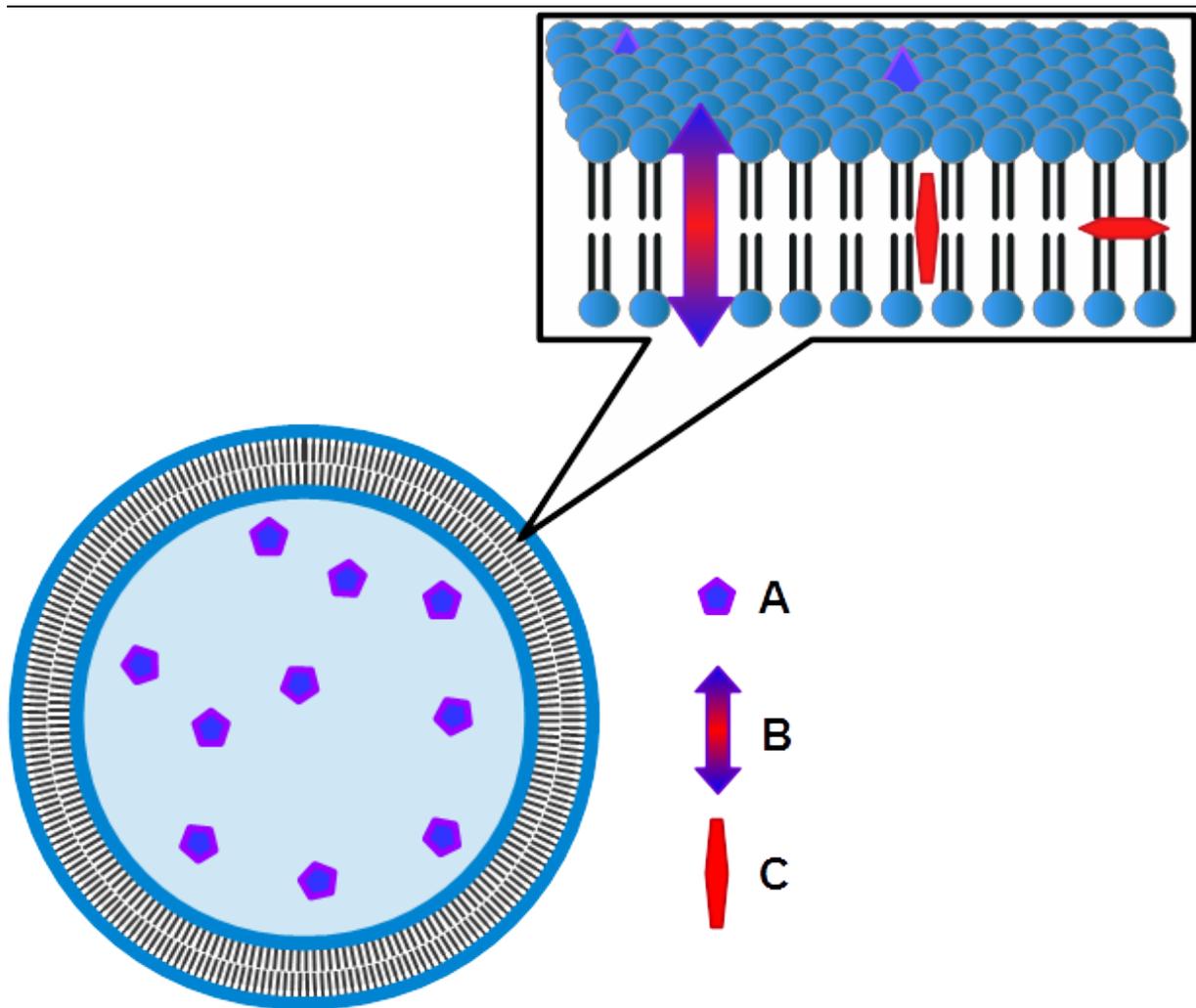
Durch die membranartige Konstruktion fanden Liposomen zuerst Verwendung in der Kosmetik, so konnte man die Hautpermeabilität für Wirkstoffe steigern sowie Lipide aus der Liposomenmembran in die Haut einbauen. Auch einfach mit Wasser gefüllte Liposomen wurden in Cremes benutzt um die Hauthydratisierung zu verbessern. Dem folgten andere dermale Anwendungen, wie das Mykotikum Econazol (z.B. Pevaryl® Lipogel). Die Transfektion, also das Einschleusen genetischer Information in Zellen (*gene delivery*), konnte mit Liposomen als Vektoren erzielt werden [44, 45]. Vor allem als Arzneistoffträger erlangten einige beladene Liposomen als Arzneimittel Zulassungen (siehe Tabelle 2), weitere befinden sich noch in klinischen Studien.

Es können grundsätzlich sowohl hydro- als auch lipophile Arzneistoffe über Liposomen verabreicht werden. Hydrophile Wirkstoffe können im hydrophilen Innenraum des Liposoms und lipophile zwischen der Phospholipiddoppelschicht transportiert werden. Amphiphile Wirkstoffe können Teil der Membran sein bzw. die Doppelschicht durchspannen (siehe Abbildung 6). Aus thermodynamischen Gesichtspunkten ist anzunehmen, dass in das

Liposom eingeschlossene Gase sich, bezogen auf die Lokalität, wie lipophile Stoffe verhalten. Die Gase werden während der Herstellung aus der umgebenden Atmosphäre oder durch spezielle Herstellungsverfahren wie Frier-Tau-Zyklen mit Cryoprotektant in die Liposomen eingeschlossen [48, 49].

**Tabelle 2:** Beispiele für liposomale Arzneimittel, die bereits als Arzneimittel zugelassen sind und klinisch angewendet werden mit jeweiliger Indikation, daneben befinden sich zahlreiche liposomale Arzneistoffträger und klinischer Erprobung [46, 47, 39]:

<b>Wirkstoff und Produktname</b>	<b>Indikation</b>
<i>Daunorubicin</i> DaunoXome®	Kaposi-Sarkom
<i>Doxorubicin</i> Mycet®	Kombinationstherapie bei metastasierendem Brustkrebs
<i>Doxorubicin</i> (PEGyliert) Doxil®, Caelyx®	Kaposi-Sarkom, Eierstockkrebs, metastasierender Brustkrebs
<i>Amphotericin B</i> AmBisome®	Pilzinfektionen
<i>Vincristin</i> Marqibo®	Metastasierendes bösartiges Uvealmelanom
<i>Cisplatin</i> Lipoplatin®	Diverse Tumorerkrankungen
<i>Heparin-Natrium</i> Heparin PUR ratiopharm® Sprühgel	Adjuvans bei akuten Schwellungszuständen nach stumpfen Traumen



**Abbildung 6:** Schematischer Aufbau eines Liposoms mit unterschiedlichen, eingeschlossenen Wirkstoffen, rechts oben ein vergrößerter Ausschnitt aus der Liposomenmembran. Hydrophile Stoffe (A) sind im wässrigen Kern lokalisiert, lipophile und gasförmige Stoffe (C) zwischen den Lipiddoppelschichten, amphiphile Stoffe (B) können, je nach Struktur, Membrandurchspannend oder zwischen den anderen, die Lipiddoppelschicht bildenden Molekülen lokalisiert sein und die Struktur beeinflussen oder stören.

---

## 1.4 Ultraschall

### 1.4.1 Physikalische Grundlagen

Unter Schall versteht man Schwingungen eines elastischen Mediums durch Übertragung periodischer oder nicht-periodischer Bewegungen [50]. Das Medium kann gasförmig, flüssig oder fest sein, in Vakuum findet jedoch keine Schallausbreitung statt, da ein Vakuum nicht komprimierbar ist. In dem Medium erfolgen sich ausbreitende Dichte-, Druck-, Geschwindigkeits-, und Temperaturschwankungen, die sinusförmig sein können. Schallquellen versetzen Moleküle mit einer bestimmten Frequenz in Schwingungen [50]. Durch eine Schallquelle, zum Beispiel eine Stimmgabel, Gitarrensaite oder einem Lautsprecher, wird ein Atom oder Molekül zum Schwingen angeregt und überträgt diese kinetische Energie auf das jeweils benachbarte Atom oder Molekül. Diese gerichtete Energieübertragung wird als akustische Welle bezeichnet. Akustische Wellen treten als Longitudinalwelle (Längswelle) auf, wobei die Welle in Ausbreitungsrichtung schwingt, und als Transversalwellen auf, deren Amplitude senkrecht zur Ausbreitungsrichtung steht. Somit können akustische Wellen als longitudinale Kompressionswellen verstanden werden, d.h. es werden periodisch Moleküle verdichtet und entspannt. Dies führt zu lokalen Druckschwankungen innerhalb des beschallten Mediums. Die Zeit, die für eine Schwingung benötigt wird, bezeichnet man als Periodendauer bzw. Schwingungsdauer  $T$ . Schall breitet sich mit einer Schallfrequenz  $f$  aus, wobei die Frequenz die Anzahl der Schwingungen bzw. Perioden während einer bestimmten Zeit ist und in Hertz ([Hz],  $1 \text{ Hz} = 1/\text{s}$ ) angegeben wird. Üblicherweise wird Schall nach seiner Frequenz unterteilt (siehe Tabelle 3) [51].

**Tabelle 3:** Einteilung des Schalls anhand der Frequenz

---

Bezeichnung	Frequenz
Infraschall	Bis 16 Hz
Hörbarer Schall	16 Hz bis 20 kHz
Ultraschall	20 kHz bis 1 GHz
Hyperschall	Ab 1 GHz

---

**Tabelle 4:** Technische bzw. medizinische Anwendungen von Schall und verwendete Frequenzbereiche [52]

Anwendung	Frequenzbereich
Medizinisch-diagnostische Anwendung	1 - 20 MHz
Reinigung von Geräten	25 - 50 kHz
Werkstoffprüfung	50 kHz - 25 MHz
SONAR-Ortung	1,5 kHz - 25 kHz

Wir werden uns im Weiteren auf den von uns verwendeten Ultraschall und seine Anwendung konzentrieren.

Die Geschwindigkeit, mit der sich Schall ausbreitet ist die Schallgeschwindigkeit  $c$ . In trockener Luft und bei Raumtemperatur beträgt  $c = 343,2 \text{ m/s}$  ( $= 1236 \text{ km/h}$ ), in Wasser  $1483 \text{ m/s}$  ( $= 5341 \text{ km/h}$ ) [50]. Die Schallgeschwindigkeiten in den verschiedenen medizinisch relevanten Medien zu kennen ist für die Diagnostik des Ultraschalls wichtig.

**Tabelle 5:** Schallgeschwindigkeiten und Dichten von medizinisch besonders relevanten Medien[50]

Stoff ( $p_n, T_n$ )	Schallgeschwindigkeit $t \text{ [m/s]}$	Dichte [ $\text{kg/m}^3$ ]	Impedanz [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
Luft	331	1,293	430
Fett	1470	970	$1,38 \cdot 10^6$
Wasser	1483	998,2	$1,5 \cdot 10^6$
Gehirn	1530	1020	$1,56 \cdot 10^6$
Muskel	1568	1040	$1,70 \cdot 10^6$
Knochenmark	1700	970	$1,65 \cdot 10^6$
Knochen	3600	1700	$\sim 30 \cdot 10^6$

---

Die Wellenlänge  $\lambda$  des Schalls ist abhängig von der Schallgeschwindigkeit und der Frequenz. Bei konstanter Frequenz ist sie nur vom Medium abhängig. Es gilt:

$$\lambda = c / f$$

wobei  $c$  die Schallgeschwindigkeit (im jeweiligen Medium) und  $f$  die Frequenz ist [50].

Durchläuft eine Welle ein Medium, so stellt sich dieser ein Wellenwiderstand (Impedanz) entgegen. Die Impedanz  $z$  ist gleich dem Produkt aus der Dichte und der Schallgeschwindigkeit im entsprechenden Medium. Wenn eine Welle von einem Medium in ein Medium unterschiedlicher Dichte übertritt, so kommt es zu einem Impedanzsprung an dieser Grenzfläche. An dieser akustischen Grenzfläche wird ein Teil des eintretenden Schalls reflektiert (Reflexion) und der andere Teil des Schalls transmittiert (Transmission), also dringt weiter in das andere Medium ein und wird gebrochen (Brechung, siehe Abbildung 7) [50, 52]. Bei großem Impedanzunterschied überwiegt die Reflexion, bei geringem Impedanzunterschied überwiegt die Transmission [53]. Der reflektierte Teil der Welle wird beim Schall als Echo bzw. Echosignal bezeichnet und ist grundlegend für die Ultraschalldiagnostik. Das reflektierte Signal wird durch Umwandlung in Graustufen am Monitor für die Bildgebung benutzt [52, 54].

Trifft eine Welle senkrecht auf eine Grenzfläche zweier Medien mit der Impedanz  $z_1$  und  $z_2$ , so wird die reflektorische Intensität  $I_{\text{reflekt}}$  wie folgt ermittelt:

$$I_{\text{reflekt}} = I_0 * \left( \frac{z_2 - z_1}{z_2 + z_1} \right)^2$$

Die transmittierende Intensität in das zweite Medium beträgt:

$$I_{\text{trans}} = 1 - I_{\text{reflekt}}$$

*Beispiele:*

Von Muskelgewebe zu Wasser ergibt sich:

$$I_{\text{reflekt}} = I_0 * 0,004 \quad I_{\text{trans}} = I_0 * 0,996$$

Für Luft zu Wasser ergibt sich:

$$I_{\text{reflekt}} = I_0 * 0,9989 \quad I_{\text{trans}} = I_0 * 0,0011$$

---

Die Werte zeigen, dass bei Muskelgewebe zu Wasser die Intensität der transmittierenden Wellen noch 99,6 % der Anfangsintensität zeigt und bei Luft zu Wasser lediglich 0,11 % der Anfangsintensität transmittiert. Diese Rechnung zeigt somit auf, wieso wir die Sonde nicht einfach nur nahe an den Messkörper halten. Die Luft würde zwischen Sonde und Messkörper ein Störfaktor sein und die Schallwellenfortleitung praktisch nicht – nämlich nur zu 0,11% – stattfinden.

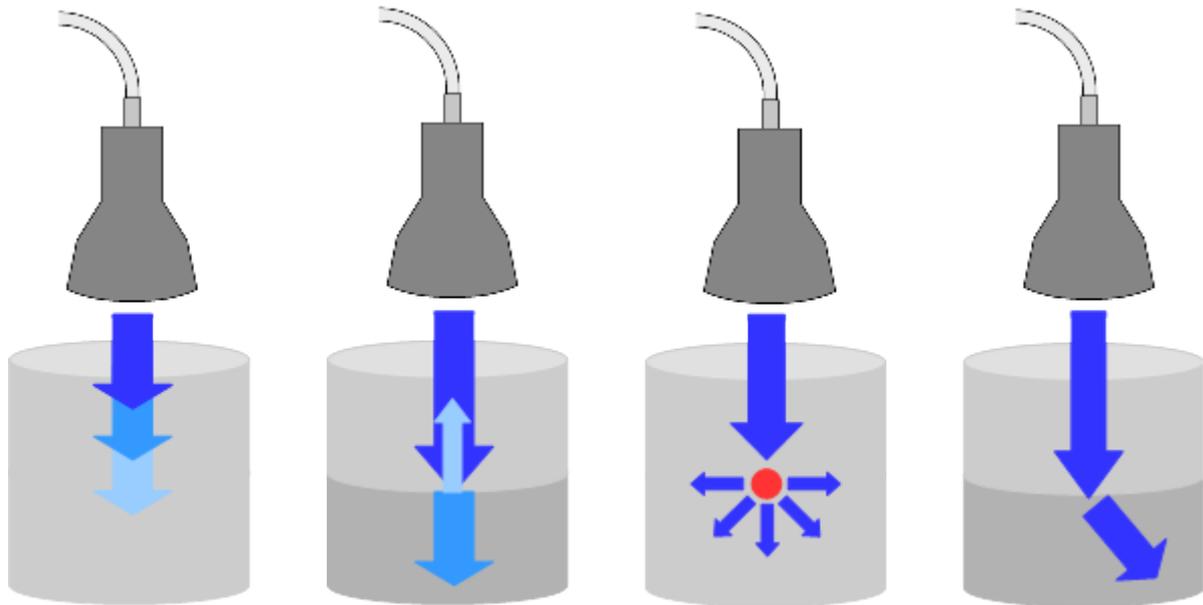
Der Reflektionskoeffizient R gibt die Intensität in % an, die reflektiert wird [55]:

$$R = 100 * \left( \frac{z_2 - z_1}{z_2 + z_1} \right)^2$$

Für die bestmögliche Bildgebung bei der Ultraschalldiagnose sollte R möglichst groß an der Grenzfläche des zu untersuchenden Objektes sein und möglichst klein auf dem Weg der Schallwelle dorthin.

Neben den Grenzflächenphänomenen Brechung und Reflexion werden auch die Phänomene Streuung und Absorption beobachtet (siehe Abbildung 7).

Da die Grenzflächen zwischen zwei Medien unterschiedlicher Impedanz vor allem bei medizinischen Anwendungen meist rau und nicht glatt sind, so werden die Schallwellen an dieser Grenzfläche nicht dem Einfallswinkel entgegen reflektiert, sondern wie eine Kugelwelle gestreut. Bei Strukturen, die kleiner sind als die einfallende Wellenlänge überwiegt die Streuung, bei Strukturen, die wesentlich größer als die Wellenlänge sind überwiegt die Reflexion. Die Absorption der Schallwellen beruht darauf, dass die das Gewebe durchdringenden Schallwellen sich nicht verlustfrei ausbreiten, ein Teil der Energie wird in Absorptionswärme umgewandelt. Man spricht bei der Absorption von Schallwellen auch von Dämpfung. Die Absorption der Schallwellen begrenzt die Eindringtiefe, ihr Ausmaß hängt von der Frequenz und einem Dämpfungskoeffizienten ab, dieser ist im menschlichen Körper abhängig von Gewebeart und -zustand [53, 56].



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung von Schallwellen (blau dargestellt), die über eine Schallsonde auf ein oder zwei Medien gerichtet werden. Von links nach rechts dargestellte Phänomene: Absorption, Reflexion, Streuung, Brechung

### *Sonographie-Verfahren*

Die apparative Ausstattung zur Ultraschalldiagnostik ist vergleichsweise simpel: benötigt wird ein Ultraschallkopf, ein Ultraschallkontakt- oder Koppelgel und eine elektronische Vorrichtung, welche die Zeit zwischen Schallimpuls und Echo misst [50]. Bei der Sonographie werden zur Erzeugung von Ultraschall Piezoelemente verwendet. Bei einigen Kristallen treten an deren Oberfläche elektrische Ladungen auf, wenn sie in bestimmte Richtungen deformiert werden. Dies ist als *Piezoeffekt* oder *piezoelektrischer Effekt* bekannt und wurde bereits 1880 von den Gebrütern Curie beschrieben. Dieser Effekt kann sich zum *reziproken piezoelektrischen Effekt* umkehren, hier führt eine an den Kristall angelegte elektrische Spannung zur Verformung des Kristalls. Je nach Polung staucht oder dehnt sich der Kristall und es lassen sich Schallimpulse erzeugen [57]. Die Kristalle bilden hierbei sowohl die Sender als auch die Empfänger der Ultraschallwellen. Die Kristalle werden mit einer Wechselspannung angeregt, geben einen Impuls aus 2 - 3 Schallwellen (ca. 0,1  $\mu$ s) ab und wirken danach ebenfalls als Empfänger der zurück treffenden Ultraschallwellen. Die Kristallverformung führt zu einer messbaren Spannungsänderung, die dann in ein Bild in Graustufen umgewandelt wird. Es erfolgt also eine Umwandlung von elektrischer in mechanische Energie und wieder zurück [58]. Dieses Verfahren wird daher auch Echo-

---

Impuls-Verfahren genannt und nahezu alle in der Ultraschall-Diagnostik eingesetzten Verfahren basieren hierauf.

Moderne Ultraschallsonden verwenden mit Kristallen versetzte Polymerwerkstoffe oder Sinterkeramiken z.B. Bariumtitanat-Mischungen [59], bis zu über 500 Kristallelemente sind in einer für die Bildgebung verwendeten Ultraschallsonde eingebaut. Um den Kristall nach einer Anregung wieder schnell in den Ruhezustand zu bringen ist hinter den Kristallen ein Dämpfungselement eingebaut [56].

#### *A-Mode*

Das sogenannte A-Mode (engl. *Amplitude-Mode* = Amplituden-Modus) ist das älteste und mittlerweile fast obsolete Darstellungsverfahren und liefert lediglich eindimensionale Informationen. Hierbei werden die Echos als Amplituden (Kurvenausschläge, Echozacken) oszillografisch dargestellt. Der A-Modus kann zwar Tiefen und Echogenität abzeichnen, aber erlaubt kein genaues Erkennen von Strukturen und fordert eine exakte Kenntnis der zu untersuchenden Strukturen.

#### *B-Mode*

Bei dem von uns verwendeten B-Modus (engl. *Brightness-Mode* = Helligkeits-Modus) werden die Amplituden als Lichtpunkte auf einem Monitor dargestellt. Je heller der Lichtpunkt, umso höher die Intensität des empfangenen Signals. Üblicherweise werden 256 Graustufen verwendet, je nach Gerät können zudem farbgebende Filter benutzt werden [56].

#### *Doppler-Effekt*

Unter einem Doppler-Effekt versteht man die Stauchung oder Dehnung einer Welle, wenn sich der Abstand zwischen Sender und Empfänger ändert, bzw. wenn sich Sender und Empfänger relativ zueinander bewegen [60]. Für den Empfänger ändert sich scheinbar die Frequenz (Quotient aus der Schallgeschwindigkeit und der Wellenlänge). Den Doppler-Effekt macht man sich in der medizinischen Ultraschalldiagnostik zunutze, um bewegte Vorgänge, z.B. den Blutfluss zu erfassen und eine Aussage über die Flussgeschwindigkeit, etwa in verengten Gefäßen zu treffen [61]. Durch die heutige farbkodierte Doppler-Sonographie können so Gefäßverschlüsse gut dargestellt werden.

Bei Linear Array (engl. *lineare Anordnung*)-Sonden sind die Kristalle nebeneinander auf einem geraden Schallkopfende angeordnet und die Ultraschallstrahlen verlaufen parallel zueinander. Der Frequenzbereich liegt bei 5 - 13 MHz. Eine Sonderform ist eine Phased-Array-Sonde, bei ihr werden Wellenfronten erzeugt, die durch zeitlich versetzte und simultane Ansteuerung der Elemente, den Schallkopf gerade und gewinkelt verlassen. Durch das gezielte Ansteuern kann man sowohl sehr kleine Bereiche abtasten, als sich auch ein großflächiges Übersichtsbild machen. Bei Convex- oder Curved-Array (engl. *kurvige Anordnung*)-Sonden sind die Kristalle auf einem gebogenem Schallkopfende angeordnet und die Schallwellen verlassen den Kopf nicht parallel sondern fächerförmig. Da der Wellenabstand mit Abstand vom Schallkopf abnimmt, nimmt auch die Auflösung mit der Entfernung ab. Der Frequenzbereich liegt bei 3 - 7 MHz [53, 56].

#### *1.4.2 Anforderungen an Ultraschallkontrastmittel*

Die intravenöse Applikation als einfachste Art der Verabreichung gibt die galenische Form vor. Ultraschallkontrastmittel müssen ausreichend stabil sein, zumindest muss die Stabilität im Blut bei Körpertemperatur den Zeitraum der Untersuchung abdecken. Eine Größe unter 5 µm ist erforderlich um unterhalb des Kapillardurchmessers zu liegen. Kontrastmittel und seine Bestandteile sollen nicht toxisch, Nebenwirkungsarm und biologisch abbaubar sein. Darüber hinaus sollen Kontrastmittel über ausreichender Echogenität verfügen um ihrer Aufgabe gerecht zu werden.

#### *1.4.3 Anwendungsgebiete*

Ziel der Verwendung von Ultraschallkontrastmitteln in der Diagnostik ist eine nicht-invasive Beurteilung diverser Organ- und Gefäßzustände bei geringem Kosten- und Zeitaufwand.

Ursprünglich war die Untersuchung der Leber das Hauptgebiet der der kontrastverstärkten Ultraschalluntersuchung. Hierbei machte man sich eine Besonderheit der Leber zunutze; die Leber wird pro Minute mit etwa 1,5 l Blut durchströmt. Einen Großteil macht das Blut aus den Venen des Gastrointestinaltraktes aus, dieses ist reich an Nährstoffen und Substanzen die metabolisiert oder sogar eliminiert werden müssen. Aufgrund der vielen in der Leber ablaufenden Stoffwechselprozesse ist eine überdurchschnittlich hohe Sauerstoffversorgung notwendig. Diese erhält die Leber durch die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*), welche

---

aus der Aorta sauerstoffreiches Blut liefert. Verabreicht man nun ein Kontrastmittel intravenös, meist in die Armvenen (Vena mediana cubiti oder Vena cephalica), so wird dieses zum Herz geführt und kommt von dort über die verschiedenen arteriellen und venösen Gefäße zur Leber. Durch den Zeitpunkt der Kontrastmittelaufnahme und charakteristischen Kontrastdarstellung pathologischer Befunde können Lebertumore diagnostiziert werden. Leberfremde Fernmetastasen enthalten beispielsweise kein Pfortadersystem und stellen sich dadurch mit anderen Kontrastmittelfärbungen dar, etwa als dunkler Fleck, als Lebergewebe [62–64].

Mittlerweile wird kontrastmittelverstärkter Ultraschall bei Erkrankungen fast aller Organsysteme angewendet. Bei stumpfen Bauchtraumen, etwa nach einem Unfall, kann man schnell überprüfen, welche Organbereiche noch durchblutet sind oder Hämatome aufzeigen. Auch kann man bei Patienten mit starken Flankenschmerzen schnell Nierensteine sowie eine Nierenperfusion ausschließen, wenn etwa eine schwarze Region im Kontrastbild auf einen Niereninfarkt hindeutet [65]. Beim Bauchaorten-Aneurysma (Erweiterung der Bauchschlagader) bildet sich durch eine geschwächte Stelle in der Gefäßwand eine ballonartige Ausstülpung. Wird die Gefäßwand weiter geschwächt, so droht sie schon bei normalem Blutdruck zu reißen, was zum letalen Verbluten innerhalb von Sekunden führt. Gefäßspezialisten fordern daher ein flächendeckendes Ultraschall-Screening für Risikopatienten.

Für alle Bildgebungen gilt grundsätzlich, dass als alternative Untersuchungstechnik Computertomographie zur Verfügung stehen. Dies geht jedoch mit erheblicher Strahlenbelastung einher. Für möglichst viele Untersuchungen bietet sich daher der unschädliche kontrastverstärkte Ultraschall an. Besonders bei jungen Patienten sowie bei strahlungsempfindlichen Organen, wie den Hoden, ist diese Form der Bildgebung sinnvoll [66]. Aus gleichem Grund ist aufgrund der fehlenden Strahlung der Ultraschall Methode der Wahl in der Gynäkologie und Geburtshilfe, um den wachsenden Fötus in der Schwangerschaft darzustellen. Somit hat das mögliche Patientengut, vom Kind über Schwangere bis hin zu Schwerstkranken Patienten des hohen Lebensalter, das maximale Spektrum. Zudem sind Ultraschallkontrast-Untersuchungen schnell durchführbar, kostengünstig und durch die in jeder Klinik obligatorischen Ultraschallgeräte fast überall durchführbar [67].

---

## ***1.5 Maligne Tumorerkrankungen***

### *1.5.1 Allgemeines*

Zu den malignen Tumorerkrankungen, umgangssprachlich Krebs genannt, zählen verschiedene Erkrankungen, die durch bösartige Tumore verursacht werden. Bösartig bezeichnet hier die Fähigkeit der Zellen, sich unkontrolliert zu teilen, sowie den Zellverband zu verlassen („zu streuen“/Metastasierung) um in umliegendes oder entferntes Gewebe einzuwachsen und dort Schäden hervorzurufen. Krebserkrankungen gehen auf genetische Schädigungen zurück, die viele Ursachen haben können. Beispiele sind karzinogene Stoffe, die durch die Umwelt aufgenommen, oder bewusst eingenommen werden, wie Ethanol oder gepökeltes Fleisch (*international agency for research on Enhancer-Einstufung*, Kategorie 1). Auch ionisierende Strahlung ruft Schäden an der DNA hervor, welche zu einer Krebserkrankung führen. Dies ist Strahlung ab Energien von etwa 4 Elektronenvolt, was etwa der Bindungsenergie der Nukleotiden eines DNA-Stranges entspricht. Zu ionisierender Strahlung zählt UV-C-Strahlung, Röntgenstrahlung und radioaktive Strahlung [68, 69]. Unser Körper hat zwar die Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren, allerdings ist diese begrenzt und nimmt mit dem Alter ab, dies spiegelt sich in den Zahlen der Neuerkrankungen wieder (mittleres Alter bei 69 Jahren) [70, 71].

Nach wie vor gehören bösartige Tumorerkrankungen mit einer halben Million Neuerkrankungen im Jahr zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und sind die zweithäufigste Todesursache. Seit den Siebziger Jahren hat sich die Zahl der Neuerkrankungen fast verdoppelt [72, 73]. Ein hierzu beitragender Anteil liegt in höheren Lebenserwartung und somit steigender Anzahl älterer Menschen. Darüber hinaus werden weltweit Tumorerkrankungen in westlichen und wirtschaftlich stärkeren Regionen, vor allem Industrienationen, häufiger diagnostiziert. Der Grund liegt in der besseren medizinischen Versorgung und damit frühere und häufigere Diagnosestellungen maligner Erkrankungen. Nicht zuletzt hat auch der als „westlich“ bezeichnete Lebensstil mit der lokalen Häufung der Tumorerkrankungen zu tun: eine hektische, stressreiche Lebensweise mit unzureichender Bewegung und Fehlernährung, sowie des Genusses von Alkohol und Tabakprodukten wird als beitragend angesehen. Bei einigen Karzinomen wie z.B. dem malignen Prostatakarzinom führen noch genetische Unterschiede zwischen den Ethnien, z.B. zwischen kaukasischen,

---

afrikanischen und asiatischen, zu unterschiedlicher Häufigkeit bestimmter Tumorerkrankungen [74, 75]. In den Entwicklungsländern ist die Ursache der Tumorerkrankungen häufig eine Infektionskrankheit z.B. das Humane Papillom Virus (HPV), welches in Afrika, Asien und Südamerika Zervixkarzinome verursacht [76, 77].

Die Diagnose „Krebs“ ist gefürchtet und maligne Tumorerkrankungen werden von den Patienten und ihren Angehörigen als lebensbedrohliche Erkrankungen wahrgenommen. Tumorerkrankungen stellen für unsere Gesellschaft und unser Gesundheitssystem eine große Herausforderung da, nicht nur durch die oft schwierige und kostenintensive Behandlung. Tumorerkrankungen sind wesentlicher Beitrag zu einer erhöhten Morbidität, was sich in einer hohen Rate Pflegebedürftigkeit und Hospitalisierungen widerspiegelt: im Jahr 2013 hatte jeder achte Pflegefall eine Tumorerkrankung als den Pflegebedarf begründende Diagnose. Neben den Krankheitskosten, die durch die Behandlung und Nachsorge entstehen, führen bösartige Tumorerkrankungen oft zu kurz- oder langfristiger Arbeitsunfähigkeit bis hin zu völliger Erwerbsminderung. Auch bei Tod und vorgezogener Rente durch die Erkrankung entstehen verlorene Erwerbstätigkeitsjahre [71, 73].

---

## ***1.6 Tumor-Targeting***

Bei der Therapie von Krebserkrankungen versucht man entartete Zellen zu reduzieren oder abzutöten, ohne gesundes umliegendes Gewebe zu schädigen. Bei Chemotherapeutika wird versucht, die schnell proliferierenden Zellen zu töten. Dazu zählen zwar viele Tumorarten, jedoch auch gesunde, schnell sich teilende Zellen wie Schleimhautzellen oder Darmepithelzellen. Dies führt zu gravierenden Nebenwirkungen und einer verminderten Lebensqualität des Patienten. Die verabreichte Dosis muss festgelegt werden: es gilt, möglichst viele Tumorzellen unschädlich zu machen, ohne den Patienten durch mögliche Nebenwirkungen potentiell tödlichen Risiken auszusetzen. Die mangelhafte Tumorselektivität vieler Therapeutika begrenzt die Menge an Wirkstoff, die den Tumor erreichen kann und entschied begrenzt somit die Effektivität der Therapie. Eine möglichst hohe Tumorspezifität wird daher angestrebt mit dem Ziel, möglichst wenig toxischen Wirkstoff in der Peripherie zu verbreiten. Das Ziel von einem „Tumor-Targeting“ (auf Deutsch etwa „*Tumor-anvisieren*“) ist demnach eine möglichst zielgerichtete und selektive Therapie. Das Tumor-Targeting kann unterschieden werden in passives und aktives Targeting.

### ***1.6.1 Passives Tumor Targeting***

Beim passiven Targeting mit nanopartikulären Systemen bedient man sich häufig einer Besonderheit der Gefäßstruktur des Tumors: Erreicht ein Tumor eine gewisse Grösse, so initiiert der lokale Nähr- und Sauerstoffmangel eine Angiogenese um die Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Bei dieser Neovaskularisierung werden die Gefäße nur unvollständig durch glatte Muskelzellen und Perizyten stabilisiert. Dies führt zu erweiterten und unförmigen Gefäßen, die Gefäßwände sind fenestriert, das heisst diese weisen Poren mit einem Durchmesser von bis zu mehreren hundert Nanometern auf. In gesundem Gewebe sind die Lücken zwischen den Endothelzellen dagegen nur 1 - 10 nm groß und vollständig durch glatte Muskelzellen umgeben. Dies wurde das erste Mal von Yasuhiro Matsumura und Hiroshi Maeda beschrieben [78–80]. Die beiden Japaner verabreichten Mäusen markierte Peptide unterschiedlicher Größe (12-160 kDa) und stellten eine Peptid-Anreicherung im Tumorgewebe fest. Somit konnten beide Wissenschaftler eine vermehrte passive Diffusion von Makromolekülen bestimmter Größe in Tumorgewebe

---

beweisen.

Neben dieser bewiesenen Fenestrierung in der vaskulären Struktur, konnte gleichzeitig nur außen am Tumor ein funktionierendes lymphatische System gefunden werden, da im Inneren des Tumors die Lymphgefäße durch die proliferierenden Tumorzellen zusammengedrückt werden. Diese fehlende lymphatische Drainage führt zu einem verminderten Abtransport der Xenobiotika. Hingegen werden im gesundem Gewebe Makromoleküle relativ schnell über das Lymphatische System entfernt.

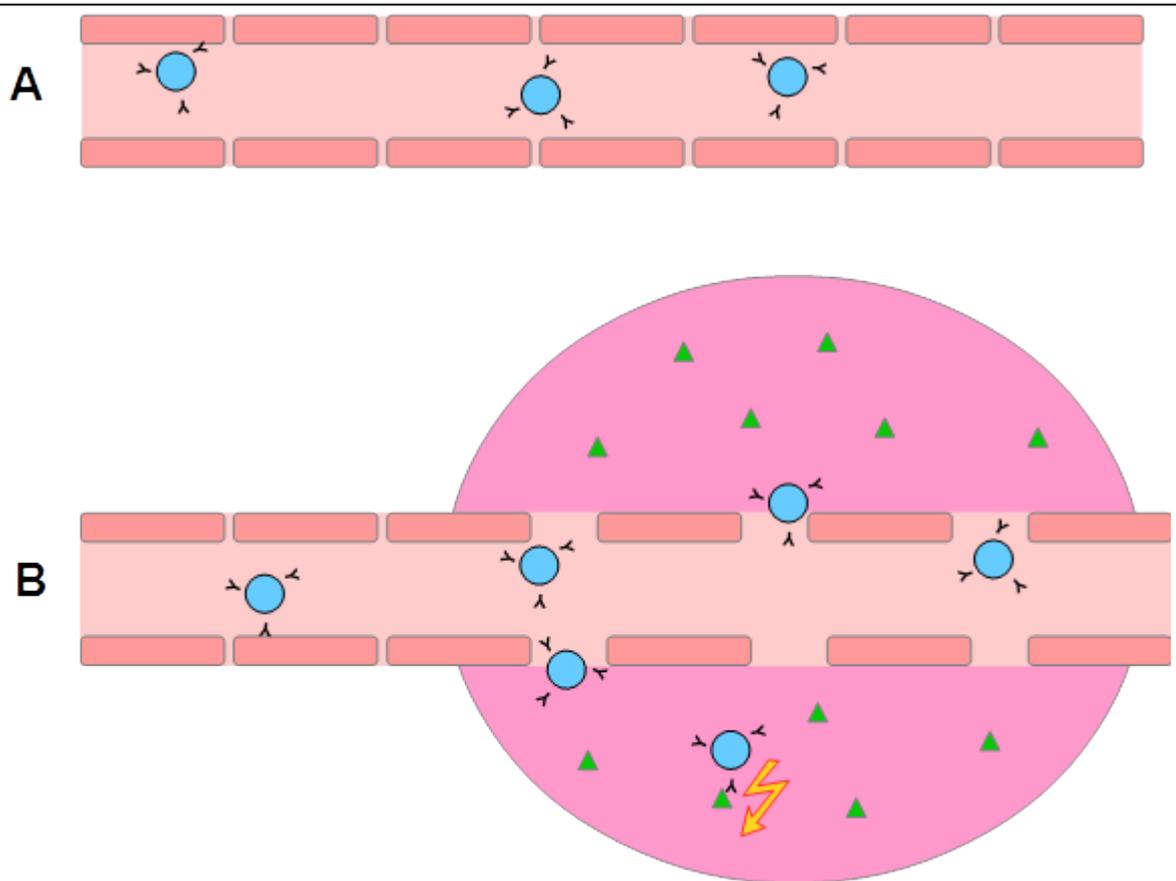
Diese passive Anreicherung von Liposomen, Nanopartikeln und Makromolekülen durch vermehrte Diffusion und mangelnden Abtransport im Tumorgewebe wird als *Enhanced Permeability and Retention-Effekt* (EPR-Effekt) beschrieben. Für den EPR-Effekt ist neben Oberflächenladung und -Struktur die Größe des Vehikels der einflussreichste Faktor [78, 79, 81–83]

---

### 1.6.2 Aktives Targeting

Durch die Konjugation des Liposoms (Arzneistoffträgers) an ein Molekül, welches die Eigenschaft hat an bestimmte Zielstrukturen zu binden, erreicht man ein aktives Targeting. Die Zielstruktur kann zum Beispiel bei Krebserkrankungen ein Oberflächenmolekül sein, welches charakteristisch für das Tumorgewebe ist oder auf diesem überexprimiert vorliegt [84–86]. Die Idee erinnert an Paul Ehrlich's Zauberkugel-These, besser bekannt als *magic bullet*, die eine zielgerichtete Arzneitherapie (in seinem Fall von Mikroben) vorsieht, ohne dabei den Rest des Körpers zu schädigen [87]. Gerade in der onkologischen Therapie mit Zytostatika sind die hohen unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf das gesunde Gewebe limitierend auf die Dosis, somit auch limitierend auf die Menge Zytostatikum, die das Tumorgewebe erreicht. Hohe Dosen am und im Tumorgewebe bei möglichst keinen unerwünschten Wirkungen am gesunden Gewebe sind für eine erfolgreiche Chemotherapie erstrebenswert.

Als geeignetes zielgerichtetes Molekül für die Targetierung haben sich Antikörper hervorgehoben. Zum Beispiel ist der *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor (EGFR) ein Transmembranprotein, welches im Gesunden als Wachstumsfaktor aller menschlicher Zellen vorkommt, in verschiedenen Tumorarten hochreguliert oder liegt mutiert vor [88]. Mit an Liposomen gebundenen Anti-EGFR- und Anti-IGFR-Antikörpern konnte bereits mehrfach erfolgreich ein aktives Targeting erreicht werden [89–92]. Die Targetierung von Tumorgewebe zeigte für einige Zielstrukturen bereits vielversprechende Ergebnisse und das aktive Targeting sowie die Suche nach spezifischen und selektiven Zielstrukturen sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung [43, 83, 84, 93].



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung von Antikörper-modifizierten Liposomen (blau), in gesunden Gefäßen (A) und passive Anreicherung durch EPR-Effekt, Bindung an die Zielstruktur (grün) im Tumorgewebe (rosa) durch fenestrierte Tumorgefäße (B). Hier spielen passives (Liposom diffundiert in das Tumorgewebe) und aktives Targeting (Liposom bindet mit Antikörper an Antigen auf Tumorzelle) zusammen.

---

## 1.7 ADAM8 als Targetingmolekül

ADAM ist eine Abkürzung für *A Disintegrin And Metalloproteinase*, und beschreibt eine Gruppe von von 29 Enzymen welche als Transmembranproteine - wie der Name verrät - eine Disintegrin und eine Metalloprotease-Domäne besitzen. Das Enzym ADAM8 ist eine ADAM-Metalloprotease, die Proteine hydrolytisch unter Bindung eines Wassermoleküls an ein Metallion spaltet.

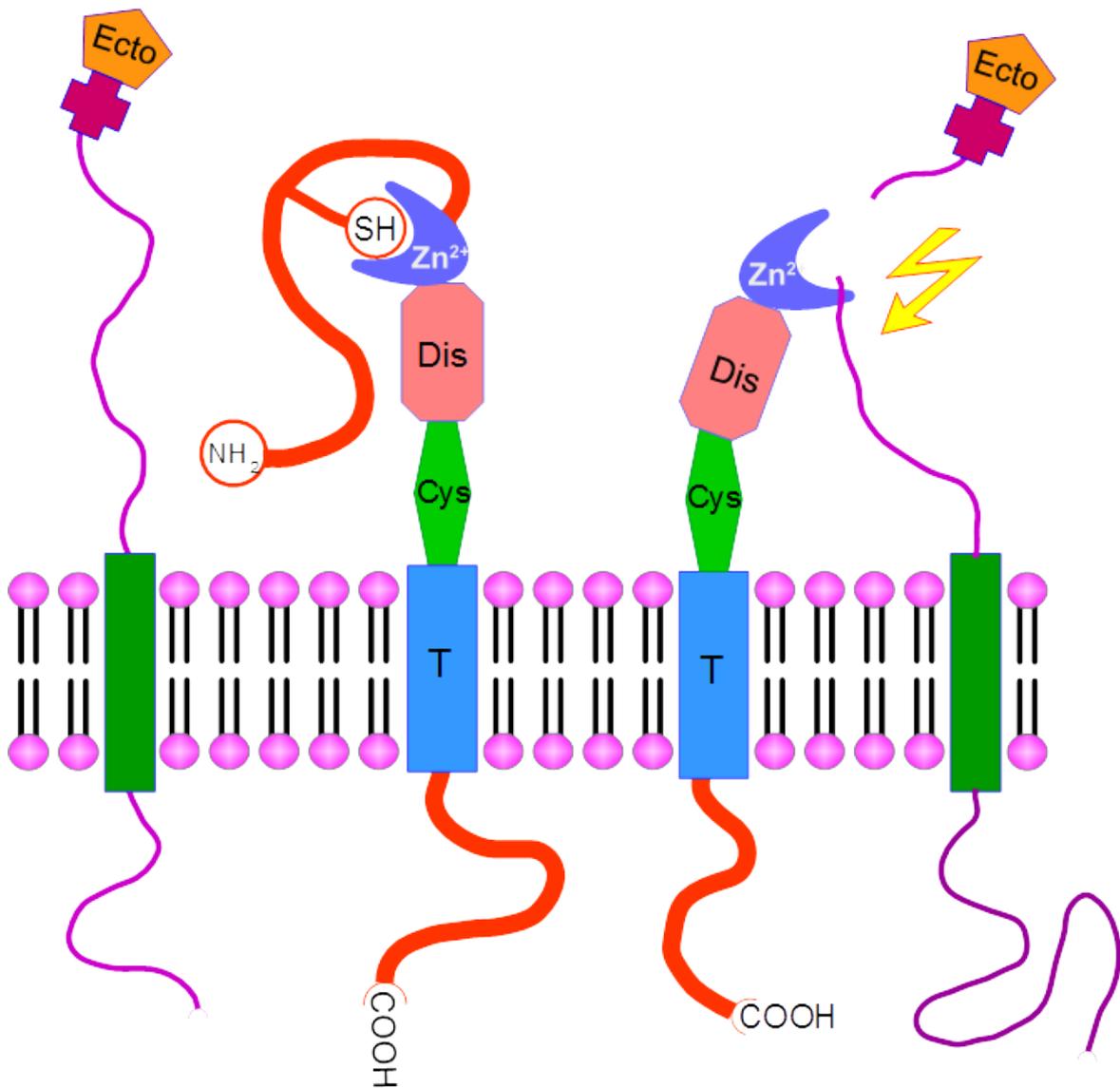
Die genaue Funktion einiger ADAM-Enzyme ist noch nicht abschließend geklärt, wobei bereits bekannt ist, dass ADAM-Proteine an vielfältigen Prozessen beteiligt sind [94]. Beispiele sind Zellfusion, Zellinteraktion, Zellmigration, Spermatogenese, Myogenese, Neurogenese, Entzündungen, Ectodomain-shedding sowie Tumorphiliferation und -migration [95, 96]. Zu den Membran-gebundenen Proteinen, die durch ADAMs „geschnitten“ werden gehören der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Amyloid precursor Protein und dem Heparinbindenden *Epidermal Growth Factor* (HB-EGF) [97]. Proteolysen spielen bei vielen regulatorischen Prozessen im Körper eine wichtige Rolle, durch das „Schneiden“ von Proteinen durch ADAMs können Prozesse gestoppt oder in Gang gesetzt werden.

ADAMs sind Transmembranproteine und gliedern sich in folgende strukturelle Bausteine von extra- nach intrazellulär: N-terminale Prodomäne, Metalloprotease-Domäne, Disintegrindomäne, Cystein-reiche Domäne und Transmembrandomäne. Intrazellulär liegt eine an die Transmembrandomäne sich anschließende C-terminale Sequenz. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

ADAM8 besteht aus 824 Aminosäuren und wird aktiviert durch Autokatalyse im trans-Golgi-Netzwerk, der Zellmembran zugewandten Seite des Golgi-Apparates [98, 99]. Einige der bekannten Funktionen von ADAM8 sind neben der Proteolyse verschiedener Substrate (beispielsweise Adhäsionsmoleküle), die Zelladhäsion- und -migration. In einigen malignen Tumorzelltypen, wie etwa primären Hirntumoren, ist ADAM8 hochreguliert, es deutet viel darauf hin, dass ADAM8 eine signifikante Rolle in der Invasivität des Tumors und damit im Fortschreiten der Tumorerkrankung spielt [100, 101]. Mit Invasivität ist das Ausmaß des Gewebe-durchsetzenden Wachstums des Tumors gemeint und spiegelt die Aggressivität wider. Auch bei Pankreastumoren zeigte sich, dass ADAM8 überexprimiert ist und mit der Invasivität des Tumors einhergeht. Durch gezieltes Silencing (engl. Ausschalten/Ruhigstellen) von ADAM8 konnte zwar nicht das Wachstum der Pankreastumorzellen gehemmt werden,

---

dafür konnte die Invasivität, Metastasierung, unterdrückt werden [98].



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Interaktion von zwei ADAM8 (Mitte) und anderen Transmembranproteinen, wobei links der inaktive Zustand und rechts der aktive Zustand beim Liganden-shedding gezeigt wird.

Auch beim Mammakarzinom und deren Metastasen ist ADAM8 überexprimiert, besonders beim *triple-negative breast cancer* (TNBC) [101]. Bei TNBC handelt es sich um einen Phänotyp des Mammakarzinomen, der keine Expression des Progesteron-, Östrogenrezeptors

---

oder des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2) aufweist, daher der Name *tripel-negativ*. Neben der grundsätzlichen Aggressivität von TNBC erschwert das Fehlen dieser drei Rezeptoren stark die Therapie. Die bei den anderen Formen eingesetzten Therapeutika, wie z.B. selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs) wie Tamoxifen, können hier aufgrund der fehlenden Rezeptoren nicht erfolgversprechend eingesetzt werden [102, 103].

Tumorzellen mit hohen ADAM8-Werten, wie bei TNBC, korrelieren mit schlechten Heilungs- und Therapiechancen für Patienten [101]. ADAM8 spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese, besonders in der Vaskularisierung des Tumors und der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen. Im Tierversuch wurde TNBC-tragenden Mäusen ein Antikörper gegen extrazelluläre ADAM8-Domänen verabreicht, dadurch konnte Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung signifikant reduziert werden [101].

Neben den beiden bereits genannten Tumoren ist ADAM8 auch in anderen Tumoren überexprimiert, darunter zählen das Bronchialkarzinom, Adenokarzinome, Prostatakarzinom, Osteosarkom und Kopf-Hals-Karzinom [99, 104–106].

Zusammenfassend kann ADAM8 als ein sehr vielversprechendes Target sowohl für Inhibitoren, Tumormarker als auch für zielgerichtete liposomale Arzneistoffträger angesehen werden.

---

## 1.8 Concanavalin A

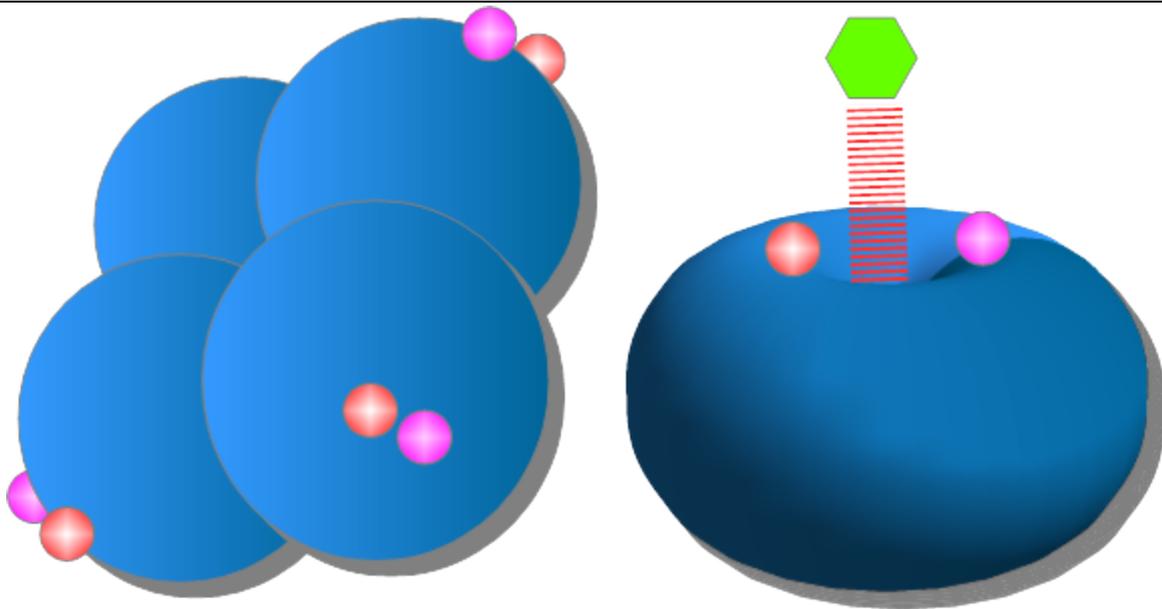
Concanavalin A, kurz ConA genannt, ist ein Lektin aus der Jackbohne (bot. *Canavalia ensiformis*), eine aus Zentralamerika stammenden Pflanze aus der Familie der Schmetterlingsblütler (bot. Faboideae). Lektine sind Makromoleküle, genauer gesagt Proteine, welche die Eigenschaft besitzen, spezifisch an Kohlenhydrate zu binden. Sie können von Menschen, Tieren und Mikroorganismen gebildet werden [107]. Ein prominentes Beispiel für ein Lektin ist das Ricin aus den Samenschalen des Wunderbaums (bot. *Ricinus communis*), welches als hoch potentes Gift und biologische Waffe bekannt ist. Ricin bindet mit seiner Lektinkette an Kohlenhydratreste auf Zelloberflächen, der andere Teil der Ricinstruktur gelangt über Endocytose in die Zelle und inaktiviert dort Ribosomen und damit die Proteinbiosynthese, was letal für den Organismus ist [108, 109]. Während Ricin an N-Acetylgalactosamin bindet, so bindet ConA spezifisch an ein anderes Kohlenhydrat: Mannan. Bei Mannan handelt es sich um ein Polysaccharid aus 1,4-verknüpfter D-Mannose [110].

Wie bei Ricin dient diese spezifische Funktion dem Schutz der Pflanze. ConA ist giftig für viele Insekten und Bakterien. Dadurch wird die landwirtschaftlich genutzte Jackbohne nur wenig von Krankheiten befallen.

Damit ConA an Mannan bindet, ist die Anwesenheit von Calcium- und Manganionen wichtig. ConA ist strukturell ein Homotetramer, ein Proteinkomplex aus vier identischen Untereinheiten welche nicht kovalent, d.h. nicht über Atombindungen, miteinander verbunden sind. Mangan und Calcium haben als Kofaktoren hier eine strukturegebende Funktion (siehe Abbildung 10). Jede Untereinheit besteht aus 235 Aminosäuren und verfügt über eine Bindungsstelle für Mannan [111–113].

Die Bindung von ConA an Liposomenoberflächen wurde bereits beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass die Lektine trotz Bindung an Liposomen ihre biologische Funktion beibehielten [114–117].

Somit eignet sich die spezifische Bindung von ConA an Mannan als Modellsystem nach Bendas *et al.* [114] für den Bindungskomplex von Antigen-Antikörper, wobei Mannan das Antigen und ConA den Antikörper darstellt.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung eines ConA-Tetramers (links), dargestellt sind die vier Untereinheiten mit Mangan- und Calciumionen, rechts schematisch ein ConA-Monomer mit Bindetasche, Mangan- und Calciumionen und Mannan (grün).

---

## 2 Methoden

### 2.1 Herstellung der Liposomen

Zur Herstellung wurden die Lipide 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DPPC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland), Cholesterol (CH) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland), 1,2-Distearyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-cyanur(Polyethylen glycol)2000] (DSPE-PEG2000-Cyanur) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglykol)2000] (DSPE-MPEG2000), 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phospho-ethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglykol) 5000] (DSPE-MPEG5000), 1-Palmitoyl-2-[6-[7-Nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl)Amino]Hexanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (16:0-6:0 NBD-PE) (Avanti® Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, USA) sowie Chloroform und Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

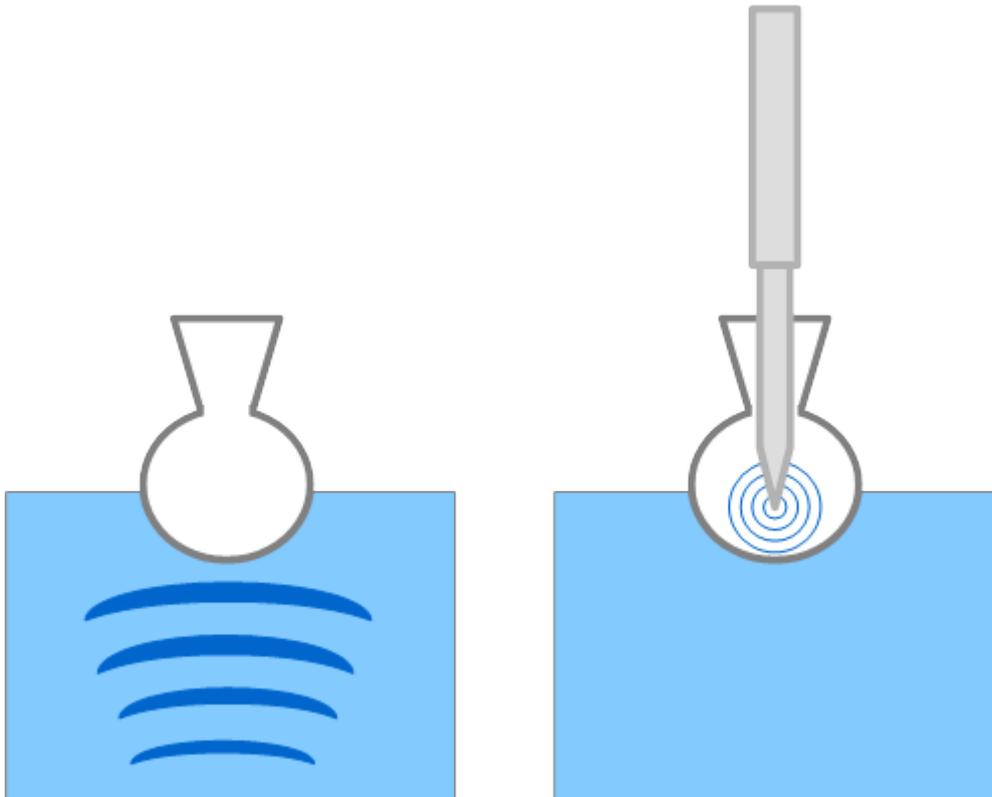
Die Liposomen wurden mittels Filmmethode hergestellt. Die Lipide wurden hierzu in einem Methanol/Chloroform-Gemisch (Verhältnis 1:2) in Erlenmeyer zu Stammlösungen mit einer etwaigen Konzentration von 10 mg/ml gelöst und in Maßkolben überführt. Die Lipide wurden mittels Kolbenhubpipette über das Volumen dosiert und in einen 5 ml - Glasrundkolben gefüllt. Die Menge der Gesamtlipide pro Rundkolben betrug 10 mg. Die gelösten Lipide wurden dann zur Abdampfung der Lösungsmittel bei 40 °C in einem Rotationsverdampfer einrotiert. Dem dabei entstandenen dünnen Lipidfilm an der Innenwand des Rundkolbens wurde zwecks Rehydratisierung 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,4; 0,15 mol/l) hinzugefügt.

Anschließend wurde auf einem temperierten Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) so lange suspendiert, bis der Lipidfilm abgelöst war. Zum vollständigen Ablösen des Films wurde der Kolben von Hand seitlich im Ultraschallbad gedreht. Anschließend wurden die Rundkolben über dem Wasserbad eingespannt, so dass der Kolben ausreichend tief in das Ultraschallbad eingetaucht ist. Dafür stand ein Kunststoffständer mit acht Halterungen für die Glaskolben bereit. Die Lipidmischung wurde 20 min lang inkubiert und auf 55 °C erwärmt. Darauf folgte die Beschallung über die für jede Versuchsreihe individuell erforderliche Zeitdauer.

Ergänzend zum Ultraschallbad wurde als zusätzliches Verfahren in drei Versuchsreihen ein Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus HD3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin,

---

Deutschland) mit einer MS72 Sonotrode benutzt. Die Beschallung mit Stab erfolgte für 30 s gepulst bei maximaler Amplitude, d.h. 0,2 s Beschallung, danach 0,8 s Pause bis zum nächsten 0,2s Schallstoss. Dadurch wurde ein zu hohes Erhitzen der Probe verhindert, insgesamt wurden nur 6 von 30 s beschallt. Der Kolben wurde zwecks Beschallung mit dem Ultraschallstab in eine Klemme eingespannt, welche an einer Stativstange befestigt ist. Die Elektrodenspitze tauchte etwa 1 - 2 mm tief in die Mitte der Oberfläche ein, ohne dabei der Außenwand zu nahe zu kommen.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Beschallung: links indirekte Beschallung eines Glasrundkolbens im Ultraschallbad, rechts direkte Beschallung mit dem Ultraschallstab.

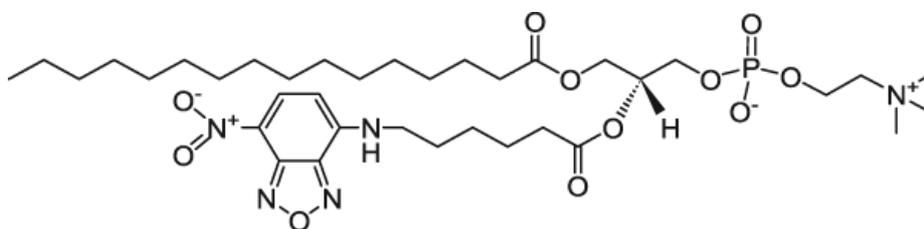
---

## 2.2 Modifizierung der Liposomen

Bei der Modifizierung von Liposomen müssen für eine effiziente Anwendung im Rahmen der Targetierungsversuche mehrere Eigenschaften erzielt werden.

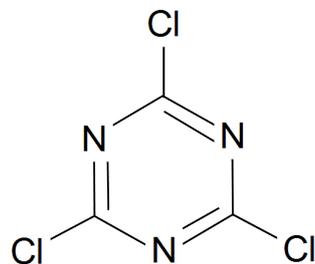
Um einen optimalen Schallkontrast zu finden wurde die Liposomenzusammensetzung variiert. Hierfür wurden die Liposomen mit Anteilen von 2,5 - 20 mol% CH (in Intervallen von 2,5 mol%) hergestellt und im Durchflussmodell vermessen. Auch wurden die Schalleigenschaften bei zusätzlichen Anteilen von DSPE-MPEG2000 und DSPE-MPEG5000 in Anteilen zwischen 1,5 – 7,5 mol% (in Intervallen von 1,5 mol%) und gleichzeitig gekoppeltem Antikörper oder Lektin gemessen. Beim DSPE-MPEG2000 und DSPE-MPEG5000 liegt das distale Ende der PEG-Kette nicht als Hydroxy- sondern als Methoxygruppe vor. Hiermit soll verhindert werden, dass die PEG-Phospholipide untereinander dimerisieren und sich somit zwei PEG-Ketten unter Wasserabspaltung aneinanderlagern.

Eine weitere wichtige Modifikation der Liposomen ist die Fluoreszenzfärbung zur Auswertung einer Targetierung. Hierfür wurde der mit Phosphatidylethanolamin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE benutzt. Analog zu den Lipiden, wurden NBD-PE in Chloroform und Methanol zu einer Stammlösung der Konzentration 10 mg/ml gelöst. Für Versuche mit Fluoreszenzmessungen wurde der Lipidmischung 1 mol% dieses Farbstoffes hinzugefügt. Um den Erfolg einer Beschichtung mit Mannan zu überprüfen, wurde mit Fluoresceinthiocyanat (FITC) gebundenes ConA verwendet (ConA-FITC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland).

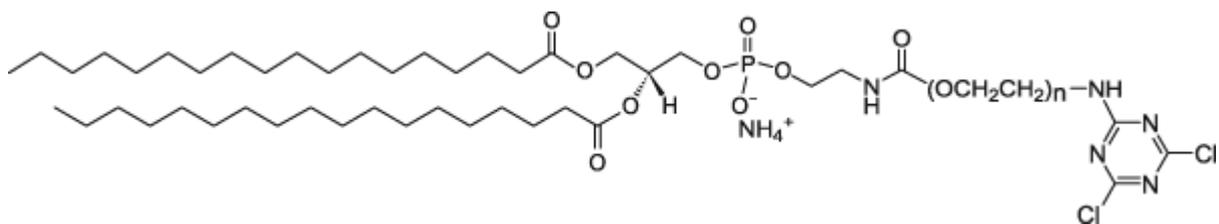


**Abbildung 12:** Strukturformel von 16:0-6:0 NBD-PE  
(Quelle: <https://avantilipids.com/images/structures/810130s.gif>)

Für die Targetierungsversuche essentielle Modifikation ist eine Kopplung von Lektinen und Antikörpern an Liposomen. Grundsätzlich gibt es hier für die Bindung verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Lipidankern. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Kopplungsreaktion der Liganden die Methode der Cyanurchlorid-Kopplung nach Bendas *et al.* [38] gewählt. Diese ist in wenigen und präparativ nicht aufwändigen Schritten unter milden Bedingungen durchführbar, so dass mögliche Fehlerquellen bei der Targetierung bereits im Herstellungsprozess minimiert werden können. Cyanurchlorid ist eine heterozyklische, stickstoffhaltige Verbindung mit drei Chlor-Atomen, die eine Reihe von nukleophilen Substitutionsreaktionen z.B. mit primären und sekundären Aminen eingehen können. Beim DSPE-PEG2000-Cyanur liegt am distalen Ende der PEG-Kette ein Cyanurchlorid-Atom als Anker-molekül vor.



**Abbildung 13:** Strukturformel von Cyanurchlorid



**Abbildung 14:** Strukturformel von DSPE-PEG-2000-Cyanur  
(Quelle: <https://avantilipids.com/images/structures/880122s.gif>)

Das erste Chlor-Atom von Cyanurchlorid ist sehr reaktionsfreudig und wird bereits nach Minuten bei Temperaturen um den Gefrierpunkt substituiert. Das Zweite benötigt bis zu 24 h und Raumtemperatur für eine Umsetzung während das Dritte nur unter drastischen Reaktionsbedingungen substituiert werden kann. Der Kopplungsschritt mit Lektin oder einem Antikörper erfordert die Anwesenheit eines Protonenakzeptors. Liegt das Cyanurchlorid

---

bereits als Lipidanker an die PEG-Kette gebunden vor, so ist ein Chlor-Atom bereits substituiert worden. Nun kann bei Raumtemperatur und unter Zugabe eines geeigneten Puffers (in unseren Versuchsreihen Borat-Puffer mit einem pH von 8,8) über 24 h der Antikörper an den Lipidanker binden. Das dritte Chlor-Atom bleibt dabei unverändert.

Ein großer Vorteil dieser Form der Bindung ist ihre Einfachheit. Bei kostspieligen oder empfindlichen Liganden wie zum Beispiel Antikörpern, muss als weiterer Vorteil der Ligand vorher nicht derivatisiert werden [38].

In unseren Versuchsreihen werden die Liposomen zur Kopplung im Verhältnis von 87,5:7,5:5 mol% DPPC/CH/DPPE-2000-Cyanur hergestellt. Die Gesamt-Lipid-Konzentration betrug jeweils 10 mg Lipide. Zur Resuspendierung des Lipidfilms wurde 1 ml Boratpuffer pH 8,8 verwendet. Nach Herstellung der Liposomen wurden sie für 24 h bei RT mit ConA bzw. dem Antikörper versetzt. Das Verhältnis von Ankerlipid zu Antikörper/Lektin betrug hierbei 4000:1 um ausreichende Anker für den Kopplungspartner anzubieten.

---

## 2.3 Charakterisierung der Liposomen

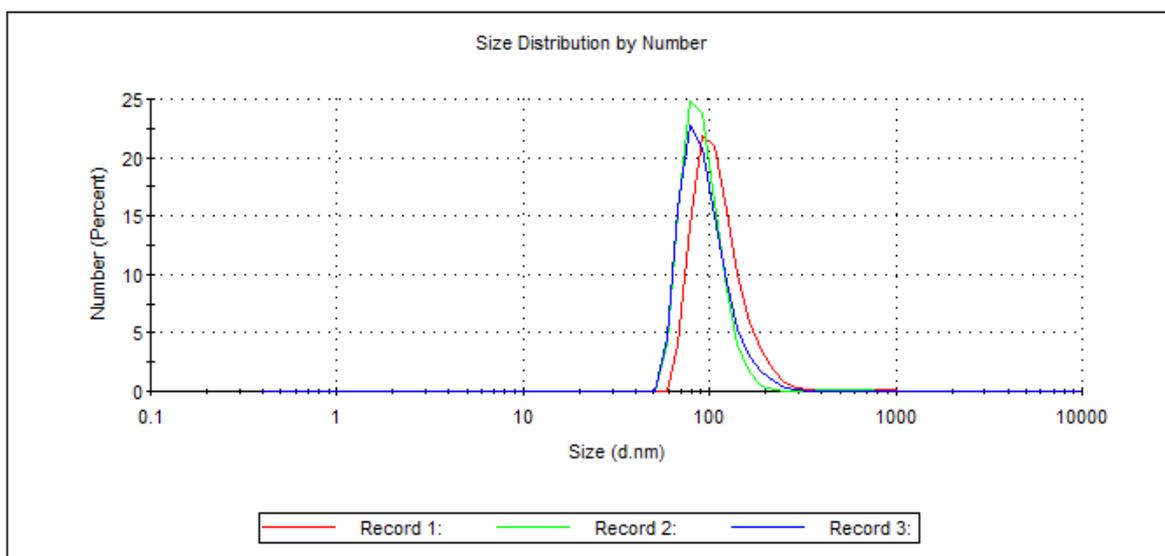
### 2.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die primäre Methode der Größenmessung stellte die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) dar. Die zu untersuchenden Partikel werden mit Laserlicht bestrahlt, streuen dieses und die Intensität des gestreuten Lichts wird zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Aus der Geschwindigkeit der Streulichtintensitätsänderung wird die Diffusionskonstante  $D$  der Partikel berechnet. Aus dieser kann mittels Stokes-Einstein-Beziehung die Partikelgröße berechnet werden. Bei der Messung muss die Temperatur konstant und die Viskosität der Prüflösung bekannt sein. Mittels PCS lassen sich Partikelgrößen von sich 1 nm - 10  $\mu$ m analysieren. Bestimmt wird der hydrodynamische Durchmesser, d.h. bei der Messung wird der Partikel als Durchmesser einer Kugel angegeben, auch wenn er in Wirklichkeit nicht kugelförmig ist. Je nach Form der Partikel können daher die Werte, die z.B. durch eine Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) erhalten werden, geringer sein als die mit PCS ermittelten. Vor allem bei PEGylierten Liposomen ist dies zu beachten, da die hydratisierten PEG-Ketten mitgemessen werden.

In unseren Versuchsreihen werden Messungen von drei Proben mit je zehn Wiederholungen vorgenommen. Sie werden als mittlerer Durchmesser  $\pm$  Standardabweichung und unter Angabe des Polydispersitätsindex (PDI) angegeben. Der PDI gibt Auskunft über die Breite der gemessenen Verteilung, ein niedriger PDI beschreibt eine weitestgehend monomodale Verteilung, Werte über 0,5 weisen auf Verunreinigungen durch Staubpartikel, Luftblasen oder einzelne, große oder aggregierte Partikel hin [118].

Gemessen wurde mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland), die Auswertung erfolgte über die Software der Firma Malvern. Bei hohem PDI ist es nicht sinnvoll, den Intensität-gewichteten z-Average als Partikeldurchmesser anzugeben, bei der Größenverteilung nach Intensität wird nicht berücksichtigt, dass größere Partikel und Agglomerate mehr Streulicht aussenden als kleine Partikel. Da bei unseren Messungen bei der Number-Auswertung nur eine Verteilung (Peak) gezeigt wurde, also 100 % der gemessenen Partikel in dem Bereich der Verteilung lagen, wurde hier die Number-Auswertung zur Ermittlung der Durchmesser herangezogen. Durch PCS konnte auch gut auf Verunreinigungen durch Staubpartikel oder auf Agglomerate geschlossen werden. Hierbei zeigte sich bei der

Intensität-Verteilung ein zweiter Peak. Dieser kann, auch beim Vorliegen weniger großer Partikel oder Agglomerate, die Verteilung dominieren bzw. sehr groß ausfallen [118]. So ist die Intensität des Streulichts proportional zum sechsten Quadrat des Durchmessers (*Rayleigh Theorie*). Ein Partikel mit einem Durchmesser von 1000 nm wird also  $10^6$  mal mehr Licht streuen als ein Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm. Dies macht auch eine Messung von Partikeln mit Fraktionen unterschiedlicher Durchmesser schwierig, da der Anteil des von den kleinen Partikeln gestreuten Lichts extrem klein ist, verglichen mit dem größerer Partikeln [118, 119, 120]. Das Zetapotential der Partikel in Lösung wurde von dem Messinstrument Zetasizer über Laser-Doppler-Anemometrie bei jeder Größenmessung mitbestimmt.



**Abbildung 15:** Größenanalyse mit der Malvern Software als Number-Verteilung. Alle drei Messungen zeigen 100 % der gemessenen Durchmesser im Bereich des Peaks (40 – 120 nm). So konnten auch bei hohem PDI mittels PCS die hydrodynamischen Durchmesser bestimmt werden. Bei Staubpartikeln oder Agglomeraten in der Probe wäre ein zweiter Peak jenseits 1000 nm, sowie dessen prozentualer Anteil angegeben.

---

### 2.3.2 Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, kurz *AFM*)

Bei der Rasterkraftmikroskopie (AFM) handelt es sich um eine Oberflächenanalysemethode, bei der eine nanoskopisch feine Nadelspitze eine Oberfläche abtastet. Die Nadel ist an einer Blattfeder (gebräuchlich engl. *cantilever*) befestigt. Während die Nadelspitze die jeweilige Oberfläche nach einem bestimmten Raster abtastet, wird die Resonanz der Blattfeder optisch gemessen und aufgezeichnet. Dabei wird entweder die Probe unter der Spitze bewegt, oder die Spitze wird über die Probe bewegt.

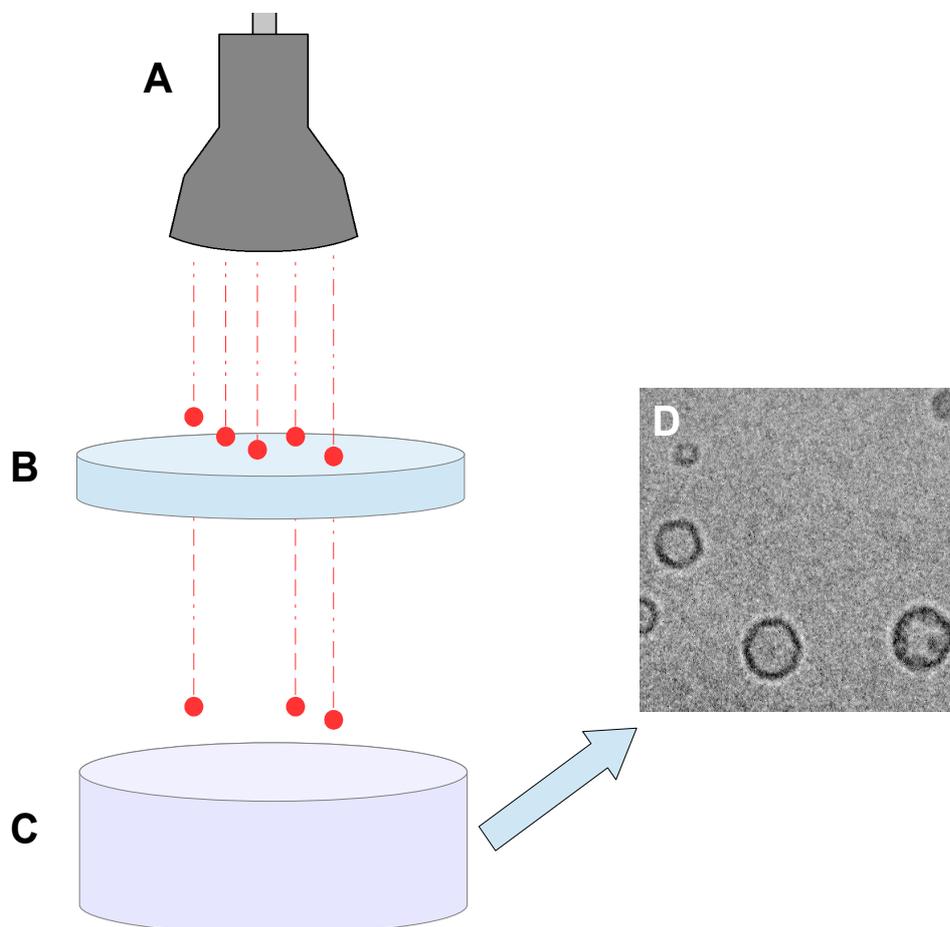
Grundsätzlich kann zwischen einem Kontakt- und einem intermittierenden Modus unterschieden werden. Dabei wird in Kontakt- und intermittierender Modus unterschieden. Im Kontaktmodus ist die Spitze sehr nah an der Probe, hier wirken elektrostatische, abstoßende Kräfte zwischen Spitze und den Elektronenhülle der Probenatome. Die Geräte werden über ein Piezoelement so geregelt, dass die Kräfte möglichst konstant bleiben. Fährt die Spitze über eine Erhebung, so muss nachgeregelt werden. Durch diese Regelung erschließt sich die Oberflächenstruktur. Im intermittierendem Modus wird die Blattfeder durch ein Piezoelement zum Schwingen angeregt und tastet mit einer bestimmten Frequenz die Oberfläche ab (engl. *tapping mode*). Bei einer auf die Spitze wirkenden Kraft, z.B. durch eine Erhebung, kommt es zu einer Frequenzverschiebung aus der auf die Struktur der Probe geschlossen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Liposomenstruktur mittels AFM untersucht. Zur Messung wurden, wie zuvor beschrieben [121, 122], 10 µl der Liposomendispersion auf einen Siliziumchip überführt und mit gefilterter Druckluft getrocknet. Als Mikroskop wurde das JPK NanoWizard 1 (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Um die liposomalen Strukturen bei der Messung möglichst nicht zu beschädigen, wurden alle Oberflächenanalysen im intermittierenden Modus durchgeführt. Es wurden pyramidale Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Spitzen (NSC16 AIBS, Micromash, Tallinn, Estland) auf der Blattfeder (Länge: 230 µm, Resonanzfrequenz 170 kHz, nominale Kraftkonstante 40 N/m) verwendet. Die Durchmesser der Liposomen wurden durch Messung von 30 Liposomen erhalten, diese werden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

---

### 2.3.3 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Die Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) ist eine Form der TEM, bei der wässrige Proben auf einen Objektträger aufgebracht werden und sehr schnell auf 90 K heruntergekühlt werden. Hierdurch kann das Wasser keine Kristalle bilden, welche die Probe beschädigen könnten und die Durchsicht optisch behindern würden. Durch dieses Verfahren lassen sich die Zielstrukturen in ihrer natürlichen Umgebung darstellen. Zur Mikroskopie wurde ein Leo 912 OMEGA (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Bei der Cryo-TEM wird die hauchdünne Probe von Elektronenstrahlen durchleuchtet, die Wechselwirkungen der Elektronen mit der Materie wird hierbei in Signale umgewandelt. Die unterschiedlichen Signalwerten werden in Grauwerte umgewandelt und ergeben das charakteristische Bild (siehe Abbildung 16) [123].



**Abbildung 16:** Schematischer Aufbau einer Cryo-TEM-Messung: (A): Elektronenquelle und Elektronenstrahlung (rot), (B): Probe, wechselwirkt mit Elektroden, (C): magnetische Linse, (D): aus den Signalen resultierendes Bild

---

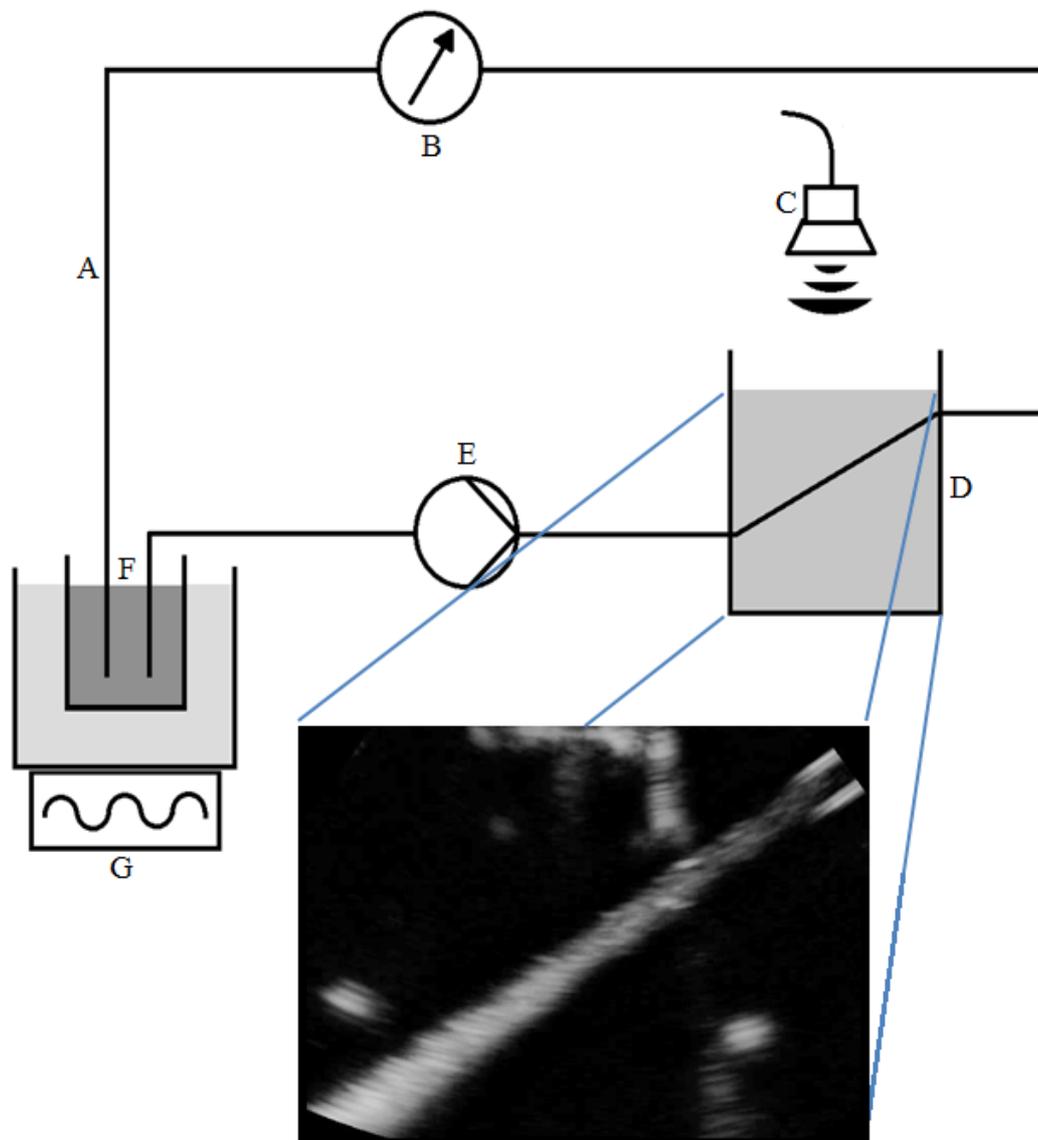
## 2.4 Ultraschallkontrastmessungen

### 2.4.1 Durchflussmodell

Zur Visualisierung einer simulierten Anwendung des entwickelten Kontrastmittels und als in vitro-Analogon zu einem menschlichen Gefäß benutzten wir ein selbstgebautes Durchflussmodell, wie zuvor veröffentlicht [122].

Vorbild war ein Testobjekt zur apparativen Qualitätssicherung bei Ultraschall-Doppler-Geräten nach Kollmann *et al.* [1]. Die wesentlichen Bestandteile waren eine Pumpe, Schläuche, ein Gelkörper sowie das Ultraschallmessgerät mit Schallköpfen. Die Pumpe war eine Rollerpumpe, die einen konstanten Fluss des Testfluids durch die verwendeten Silikonschläuche gewährleistete. Mit der Pumpe konnte ein mittlerer Druck von 120/80 mm/Hg eingestellt und mit einem Manometer überprüft werden. Es wurden jeweils 100 ml Prüflösung, z.B. Pufferlösung mit Liposomen, verwendet. Diese Lösung wurde in ein 250 ml Becherglas vorgelegt, welches in einem auf 37 °C temperiertem Wasserbad stand und dessen Temperatur mittels Temperaturfühler kontrolliert wurde. Dieses Reservoir haben wir mit einem Bleigewicht vom Aufschwimmen abgehalten. Beide Ende des Schlauchsystems, also Ein- und Auslass, münden in dieses Vorrats-Becherglas. Beim Einschalten der Pumpe wurde über den tief ins Reservoir reichenden Einlassschlauch die Prüflösung in das Schlauchsystem gesaugt, welches etwa 50 ml fasst, es verblieben somit 50 ml im Becherglas um zu gewährleisten, dass keine Luft in das System gesaugt wird. Die Liposomen wurden als Suspensionen in das Vorratsgefäß gegeben und verteilten sich durch die im System befindlichen Strömungen. Bis die Liposomen sich auch in den Messbereich der Sonde verteilt haben und die Messung begonnen werden kann, vergehen 15 - 20 s. Die Messung an sich erfolgt an einem Prüfkörper. Dieser besteht aus einem 2,5 l Becher (Labsolute<sup>®</sup>, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland) aus Polypropylen, welcher mit einem Agar-Gel befüllt ist. Durch die Mitte des Bechers verläuft ein C-Flex-Schlauch (C-flex<sup>®</sup>, Cole-Parmer Inc., Illinois, USA), welcher vor dem Eingießen des Agar-Gels mittels zwei Löchern und Silikon im Becher eingesetzt wird. Je nach Zielgabe kann dieser parallel zum Gefäßboden, also horizontal, oder diagonal eingegossen werden. Die verwendeten Schläuche im Prüfkörper waren horizontaler oder diagonal in einem Winkel von 30 ° zum Grund des Prüfkörpers angeordnet. Das Gel besteht aus 85,5 % bidestilliertem Wasser, 3 % Agar, 11 % Glycerol als

Feuchthaltemittel und 0,5 % Natriumazid als Biozid. Zur Herstellung wird das Agar langsam unter Erhitzen und stetem Rühren im Wasser gelöst, anschließend rührt man Glycerol ein und gibt das Natriumazid hinzu. Um ein möglichst Luftblasen-freies Gel zu bekommen, wurde das Gel 10 min im Ultraschallbad mittels einer Entgasungsfunktion beschallt. Der Schlauch mit Testflüssigkeit im Prüfkörper ähnelt in den Schalleigenschaften einem Blutgefäß und das umschließende Agar-Gel denen von menschlichem Gewebe. Zur Messung wurde Ultraschallgel auf den Prüfkörper gegeben, um den störfreien Kontakt zwischen Sonde und Prüfkörper zu gewährleisten. Die Messsonde wurde mit einer Stativklemme befestigt und die Höhe des Prüfkörpers konnte über eine Laborhebebühne justiert werden.



**Abbildung 17:** Schematische Anordnung des Durchflussmodells mit repräsentativer Aufnahme einer Messung. (A): Schlauch, (B): Manometer, (C): Schallsonde, (D): Prüfkörper, (E): Pumpe, (F): Vorratsgefäß mit Prüflösung, (G): Wasserbad, beheizt.

---

### 2.4.2 Kontrastmessung

Zur Untersuchung der Schalleigenschaften mit dem Durchflussmodell wurde ein tragbares Ultraschallmessgerät (eZono<sup>®</sup> 3000, eZono AG, Jena, Deutschland) aus dem medizinischen Bereich verwendet. Unter Verwendung des B-Modus wurde der Fokus auf den Schlauch eingestellt. Alle Messungen wurden mit folgende Grundeinstellungen bezüglich der Fokustiefe, den Scan-Bereich sowie den Kontrast- und Helligkeitseinstellungen vorgenommen: Scan-Modus B, Duale Ansicht (Roh), Tiefe: 9 cm, Helligkeit: 0, Kontrast:10, Bildverstärkung: 0-0-3-3-3, Frequenz: niedrig. Aufgrund des gewählten Ultraschallmodus (B-Mous) wurde die Echointensität der Messung in unterschiedliche Graustufen umgesetzt. So werden Flüssigkeiten dunkel (schwarz) und Gasblasen als sehr hell (weiß) dargestellt (siehe Einleitung).

Vor jeder Messung wird ein Bild gemacht, mit durchströmender Prüflösung ohne Kontrastmittel. Dieses diente der späteren Nullwert-Ermittlung, um den Kontrast des Schlauches und der Prüflösung zu subtrahieren. Anschließend wird mit einer Industriestoppuhr (Junghans<sup>®</sup> 312/4810, Junghans GmbH & Co. KG, Schramberg, Deutschland) die Zeit von 15 s nach der Liposomen-Zugabe (Probenvolumen: 100 µl = 1 mg Liposomen) gemessen und dann mit der Aufnahme eines Videos (Format: MS MPEG4 v2, Auflösung: 1024\*768, Bildfrequenz: 24) für etwa 10 s begonnen. Die Videos und Bilder wurden über einen USB-Anschluss auf einen Computer übertragen und in virtuellen Akten verwaltet.. Von den jeweiligen Videos werden mit der Mediaplayer-Software VLC (Version 2.2.2, VideoLAN, Frankreich) 10 Momentaufnahmen gemacht.

Um den Ultraschallkontrast der verschiedenen hergestellten Kontrastmittel bewerten zu können, wurden die Grauwerte der Messungen aus stets identischen Bereichen (engl. *region of interest* = ROI) miteinander verglichen. Dazu wurde das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.47/1.51f, W. Rasband, National Institutes of Health, USA) verwendet. In einem ersten Schritt wurde die Aufnahme ohne Liposomen-Zugabe in das Programm geladen und die ROI mit einem Makro bestimmt. Dazu wurde ein rechteckiger Ausschnitt aus dem Inneren des Schlauches bestimmt, der jeweils in jedes weitere zu analysierende Bild geladen werden konnte und somit ein direkter Vergleich zwischen den einzelnen Aufnahmen möglich wurde. In diesen einzelnen Ausschnitten konnte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes der Grauwert vermessen werden. Die Grauwerte aus 10 Aufnahmen wurden gemittelt und

---

anschließend von dem Grauwert subtrahiert, der aus der Aufnahme vor Liposomen-Zugabe (Blank) erhalten wurde. Die ermittelten Mittelwerte wurden mit Standardabweichung angegeben.

## **2.5 Kontrastvergleich mit SonoVue®**

Um die Intensität des Liposomen-Schallkontrasts bewerten zu können, wurde das kommerziell erhältliche und klinisch eingesetzte Ultraschallkontrastmittel SonoVue® (Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz) als Vergleich genommen. Es zählt zu den Ultraschallkontrastmitteln der zweiten Generation und gilt als Standard bei der Abdomensonographie und Echokardiographie. Es handelt sich um Mikrobläschen (engl. *microbubbles*) die mit Schwefelhexafluorid gefüllt sind, einem reaktionsträgen, ungiftigem Gas. Schwefelhexafluorid gehört zu den anorganischen chemischen Verbindungen aus Schwefel und Fluor und besitzt die Summenformel SF<sub>6</sub>. Weitere Bestandteile von SonoVue® sind PEG4000, DPPC, DPPG-Natrium und Palmitinsäure. Die Mikrobläschen werden durch eine Phospholipidhülle stabilisiert. SonoVue® wird als Lyophilisat (25 mg) mit einem Transfersystem und isotoner Kochsalzlösung (9 mg/ml) geliefert. Kurz vor der Injektion wird das Lyophilisat in der Kochsalzlösung suspendiert und aufgeschüttelt und kann so bis zu 6 h aufbewahrt werden, sofern es vor der Anwendung noch einmal aufgeschüttelt wird [124]. 1 ml der fertigen Suspension enthält 8 µl der Bläschen. Die Mikrobläschen haben einen mittleren Durchmesser von 2,5 µm, 90 % liegen unter 8 µm und sind damit ausreichend kapillargängig [37, 125]. Nach Bolus-Injektion wird das arterielle Gefäßsystem nach 10 - 30 s kontrastiert und erreicht nach 30 – 60 s ein Intensitätsmaximum und anschließendem Abfall des Kontrastes über 3 – 8 min. Während des Intensitätmaximums kann mit SonoVue® eine Signaintensitätszunahme von 15 – 20 dB erreicht werden[53].

SonoVue® wurde wenige Minuten vor der Messung hergestellt. Es wird eine äquivalente Menge von SonoVue® zu Liposomen vermessen. Bei der Grauwertbestimmung wird SonoVue® als 100 % -Standard herangezogen um den Schallkontrast der Liposomen vergleichend bewerten zu können.

---

## ***2.6 Stabilitätsmessung***

Zur Stabilität des Ultraschallkontrastes wurden Proben langfristig auf ihren Schallkontrast untersucht. In beiden Fällen wurde das oben beschriebene Durchflussmodell benutzt. Hierbei wurde anhand der Schlauchposition und des Schlauchquerschnitts auf den Bildern des Herstellungstages versucht, den möglichst exakt gleichen Bereich der ersten Messung zu aufzunehmen. Die Proben wurden am Tag der Herstellung vermessen und anschließend erneut, nach einer Lagerung über ein Jahr unter einfachen Lagerbedingungen: in wässriger Suspension, einem 1,5 ml - Reaktionsgefäß, und bei 2 - 8 °C. Kurz vor der Messung wurden die nach dieser Zeit teils abgesetzten Liposomen nur leicht von Hand aufgeschüttelt. Von der Benutzung eines Vortexmischers oder starkem Schütteln wurde hier abgesehen um keine Luftblasen in die Suspension einzuarbeiten, die das Ergebnis verfälschen könnten.

---

## 2.7 Kontrastverbesserung

### 2.7.1 Variation der Lipidzusammensetzung

Zur Ermittlung des optimalen Cholesterol-Gehaltes wurden verschiedene Konzentrationen mit DPPC und mittels Filmmethode zu Liposomen verarbeitet und untersucht. Hierbei wurden neben dem Ultraschallkontrast auch die Größe bestimmt. Nachdem in Vorversuchen vier verschiedene Konzentrationen jeweils über 20 mol% CH sehr schlechten Ultraschallkontrast zeigten und niedrigere Konzentrationen wesentlich bessere Kontraste aufwiesen, wurde ein Bereich von 2,5 - 20 mol% für die Testreihe ausgewählt. Die mit unterschiedlichen CH-Gehalten untersuchten Liposomen setzten sich aus den in Tabelle 6 dargestellten Lipidverhältnissen zusammen.

**Tabelle 6:** Die mit unterschiedlichen CH-Gehalten untersuchten Liposomen setzten sich aus folgenden Lipidverhältnissen zusammen

Probe	DPPC [mol%]	CH [mol%]
A	97,5	2,5
B	95	5
C	92,5	7,5
D	90	10
E	87,5	12,5
F	85	15
G	82,5	17,5
H	80	20

Des weiteren wurde der Einfluss von PEGylierten Phospholipiden auf den Ultraschallkontrast untersucht. Dazu wurden DSPE-MPEG2000 und DSPE-MPEG5000 in verschiedenen Verhältnissen hinzugefügt und die PEGylierten Liposomen auf ihren Schallkontrast untersucht.

**Tabelle 7:** Verhältnis DPPC, CH und DSPE-MPEG2000/5000 in untersuchten Liposomen

<b>Probe</b>	<b>DPPC [mol%]</b>	<b>CH [mol%]</b>	<b>DSPE-MPEG2000</b>
A2k	91	7,5	1,5
B2k	89,5	7,5	3
C2k	88	7,5	4,5
D2k	86,5	7,5	6
E2k	85	7,5	7,5

<b>Probe</b>	<b>DPPC [mol%]</b>	<b>CH [mol%]</b>	<b>DSPE-MPEG5000</b>
A5k	91	7,5	1,5
B5k	89,5	7,5	3
C5k	88	7,5	4,5
D5k	86,5	7,5	6
E5k	85	7,5	7,5

Da für Fluoreszenzmessungen der Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE in der Konzentration von 1 mol% eingesetzt wurde, musste auch dessen eventueller Einfluss auf den Ultraschallkontrast untersucht werden. Hierzu wurde der Farbstoff den Lipiden vor dem Entfernen des Lösungsmittels zugefügt und die Liposomen unter Vermeidung von Lichteinflüssen hergestellt. Dazu gehörte das Abdecken der Gefäße mit Aluminiumfolie sowie die Verwendung von lichtgeschützten Reaktions- und Lagerungsgefäßen.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Liposomen mit NPD-PE

<b>Probe</b>	<b>DPPC [mol%]</b>	<b>CH [mol%]</b>	<b>NBD-PE [mol%]</b>
Lipo 7,5 NBD	91,5	7,5	1

---

### 2.7.2 Variation der Herstellungsmethode

Es wurde untersucht, in wie weit sich die Herstellungsparameter auf die Echogenität der Liposomen auswirken.

Als ein möglicher Einfluss auf die Echogenität wurde die Ultraschallexposition angenommen. Hierzu wurden Testreihen durchgeführt, in der die Lipidsuspensionen mit unterschiedlichen oder kombinierten Schallquellen über unterschiedlich lange Zeiträume beschallt wurden. Die gleiche Lipidformulierung wurde entweder nur im Ultraschallbad oder nur mit dem Ultraschallstab beschallt, oder, als dritte Variante, kombiniert mit beiden Methoden. Es wurde immer zuerst im Ultraschallbad und erst danach mit dem Ultraschallstab beschallt. Im Anschluss wurden alle Proben mittels PCS auf ihre Größe untersucht und im Durchflussmodell ihr Ultraschallkontrast vermessen.

**Tabelle 9:** Beschallungsschemata der Lipide. Die gleiche Lipidformulierung wurde mit verschiedenen Beschallungstechniken und -zeiten behandelt, hierbei wurde einzig im Ultraschallbad oder mit dem Ultraschallstab beschallt und beide Methoden kombiniert. Hierbei wurde jeweils zuerst im Ultraschallbad, danach mit dem Ultraschallstab beschallt.

---

<b>Proben:</b>	<b>Ultraschallbad [min]</b>	<b>Ultraschallstab, gepulst [s]</b>
A	30	0
B	15	0
C	10	0
D	5	0
E	30	30
F	15	30
G	0	30

---

---

Neben der Schallintensität wurde der Einfluss von unterschiedlichen Positionen im Ultraschallbad untersucht. Während der Beschallung im Ultraschallbad konnten theoretisch bis zu acht Glaskolben in einem Ständer in Position gehalten werden. Drei dieser möglichen Positionen wurden mehrfach untersucht, wovon sich zwei der Glaskolben in Wandnähe befanden und ein Kolben mittig im Wasserbad. Dabei wurden jeweils drei identische Lipidsuspensionen in einem Herstellungsgang hergestellt und gleichzeitig in den unterschiedlichen Positionen untersucht. Anschließend wurden die Proben mittels PCS auf ihre Größe und im Durchflussmodell auf ihren Ultraschallkontrast vermessen.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Untersuchung auf Einflüsse durch bestimmte Positionen im Ultraschallbad. Hierzu wurden die Glaskolben in einem Ständer eingespannt und gleichzeitig beschallt. Anschließend wurden sie auf Größe und Ultraschallkontrast vermessen und die erhaltenen Werte verglichen.



---

Bei Erreichen von etwa 90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Das alte Medium wurde vorsichtig durch Absaugen entfernt. Da es sich um adhärente Zellen handelt, mussten wir diese erst für 2 min mit 2 ml Trypsin/EDTA ablösen. Durch die Zugabe von 10 ml Medium wurde das Trypsin neutralisiert. Die im Medium suspendierten Zellen wurden in sterile 15 ml Tubes gefüllt und 10 min bei 1100 U/min zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde mit 10 ml frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturplatten verteilt.

Die Zellen wurden anschließend zur Kryokonservierung mit 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid als Cryoprotektant in Medium in ein Kryoröhrchen überführt und 24 h bei - 70 °C eingefroren. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt und bei - 196 °C gelagert.

Im Falle eines Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C für etwa 60 s angetaut, sodass ein kleiner Rest Eis verbleibt. Kryoröhrchen werden unter sterilen Bedingungen geöffnet und der Inhalt in ein 15 ml Tube mit 8 ml Medium (RT) überführt. Nach Zentrifugation wird der Überstand erneut abgesaugt und das Zellpellet wie beschrieben resuspendiert.

Die Aussaat der Zellen auf 96-well-Platten erfolgte nach Auszählen der Zellen wurde mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die Zellzahl pro Well wurde nach Auszählung auf das zu übertragende Volumen umgerechnet und betrug etwa  $10^4$  Zellen.

---

## 2.9 Bindungsversuche, Targeting

### 2.9.1 Targetierung im ConA-Modell

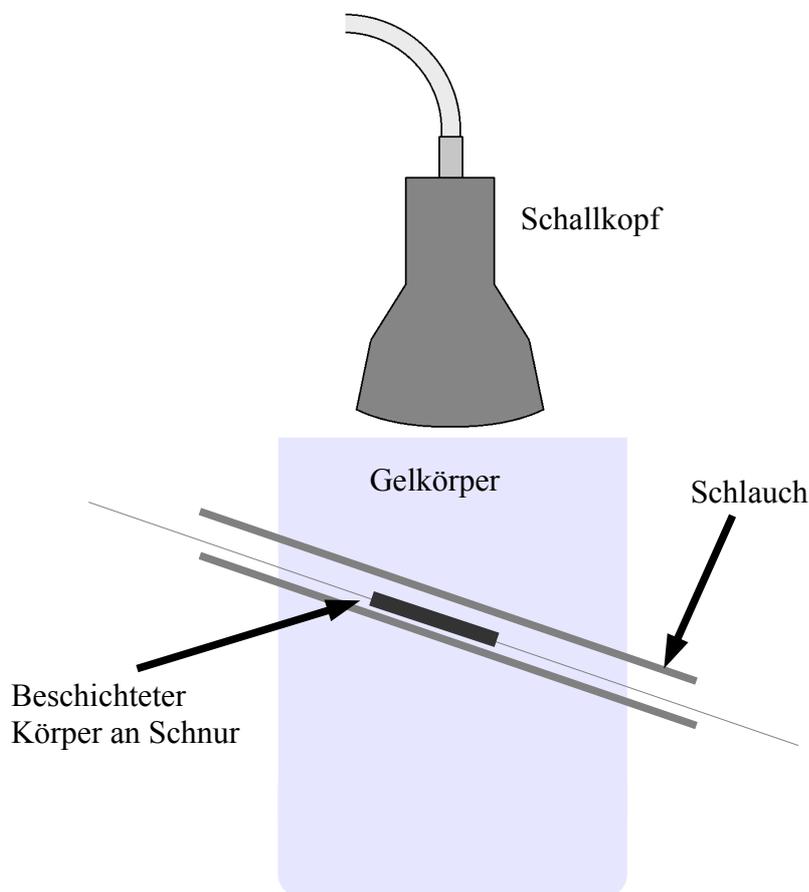
Zur statischen Bindung von ConA an Mannan wurden unter anderem Glasobjektträger nach einer Methode von Hartmann *et al.* [126] beschichtet. Dafür wurden Objektträger der Größe 76 x 26 x 1 mm aus Natron-Kalk-Glas verwendet (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland). Die Objektträger wurden erst 2 min in 6 M NaOH gereinigt, anschließend 30 min in Peroxomonoschwefelsäure-Lösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 % /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v), Verhältnis 60:40) inkubiert. Dem folgten 1,5 h in 1 % (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung und anschließendes sechsmaliges Waschen mit Toluol. Nach 1 h im Trockenschrank bei 105 °C, und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur folgte Inkubation in Boratpufferlösung pH 10,4, welche 0,3 ml 1,4-Butandiolglycidylether und 6 mg/ml Natriumborhydrid enthielt. Nach 12 h und mehrmaligem Waschen mit bidestilliertem Wasser wurden die Objektträger in Boratpuffer pH 8,8 getaucht, welche 5 mg/ml Mannan enthielt und für 24 h inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit bidestilliertem Wasser abgespült.

Die beschichteten Objektträger wurden in ein Becherglas in 50 ml bidestilliertes Wasser mit 10 mg Liposomen (NBD-PE-haltig und mit ConA gekoppelt) und 0,1 mM MnCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> getaucht, hierbei wurde die Eintauchtiefe markiert und anschließend wurden die Objektträger dreimal mit bidestilliertem Wasser abgespült. Dem folgte die Vermessung im CLSM mit besonderem Fokus auf die Grenze des Eintauchbereiches. Als Blindprobe wurde mit NBD-PE-haltigen Liposomen ohne ConA identisch verfahren.

Zur Bindung im Durchflussmodell wurden verschiedene Prüfkörper mit Mannan beschichtet und mittels Nylon-Schnur durch den Schlauch im Gelkörper geführt. Hier wurde der Einfachheit halber versucht die Nylon-Schnur zu beschichten. Dafür wurden in 50 ml Chloroform 40 µl N-Ethyl-diisopropylamin und etwa 20 mg Cyanurchlorid gelöst. Darin wurde die Schnur 24 h inkubiert und anschließend in auf pH 8,8 gepufferte Mannan-Lösung getaucht und wieder 24 h bei RT inkubiert. Es wurden verschiedene Schnurformen beschichtet und vermessen, ein einfacher Strang, eine vierfach geknotete Schnur oder mehrere Schnurknoten hintereinander. Anschließend wurden etwa 30 x 2 x 2 mm große Stücke des C-

---

Flex-Schlauches mit einem Skalpell geschnitten und wie oben beschrieben beschichtet. Diese Schlauchkörper wurden an beiden Enden mit einer feinen Nylonschnur befestigt, mit Hilfe derer sie in das Schlauch Modell gezogen werden konnten (siehe Abbildung 20). Im Durchflussmodell wurden die beschichteten Schlauchkörper mit 1 mg der Liposomen und 0,1 mM  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$  in der Prüflösung vermessen [114]. Um eventuelle Messfehler durch anhaftende Luftblasen auszuschließen, wurde am Ende der Messung mehrfach gegen den Gelkörper geklopft. Es wurden Liposomen mit gebundenem ConA und die gleichen Liposomen ohne ConA vermessen. Auch hier wurde von den Messungen Videos aufgezeichnet und aus Einzelaufnahmen Blindwert-korrigierte Grauwerte bestimmt und gemittelt.



**Abbildung 20:** Schematische Anordnung des Versuchsaufbaus des Durchflussmodells mit beschichtetem Schlauchkörper.

---

## **2.10 Targetierung mit Antikörper MAB1031**

Für die Bindungsversuche an ADAM8 bzw. der ADAM8-Ektodomäne hA8ecto-His verwendeten wir einen monoklonalen Maus-Antikörper namens MAB1031. Dieser Antikörper detektiert das aa 201 – 497 Epitop der humanen ADAM8-Ektodomäne, also den Abschnitt des Membranproteins, der von der Zellwand weg in den Extrazellularraum ragt. Bezogen wurde MAB1031 als Lyophilisat einer 0,2 µm-gefilterten, Trehalose-haltigen Suspension mit Phosphat-Puffer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### *2.10.1 Nachweis über Fluoreszenz an rekombinanter Ektodomäne*

Für den Nachweis über Fluoreszenz an rekombinanter Ektodomäne wurden jeweils 500 ng, 250 ng und 125 ng der rekombinanten ADAM8-Ektodomäne hA8ecto-His in jeweils 50 µl Aktivitätspuffer (20 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µM ZnCl<sub>2</sub>, 0,0006 % Brij) in eine Pierce<sup>®</sup> Nickel-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie drei mal mit 100 µl Aktivitätspuffer gespült. 100 µl der NBD-PE-haltiger MAB1031-Liposomen-Dispersion wurde den Kavitäten hinzugefügt. Für die Kontrollgruppe wurde die gleiche Menge NBD-PE-haltiger Liposomen ohne den MAB1031-Antikörper verwendet. Nach einer Stunde wurde wieder dreimal mit 100 µl Aktivitätspuffer gewaschen und die Fluoreszenz vermessen mit einem FluorStar Optima (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) Mikroplatten-Reader in Top-Modus (Messung von oben, 180 Zyklen mit 120 s, Anregungsfilter 485-12 nm, Emissionsfilter 520 nm).

### *2.10.2 Nachweis über Fluoreszenz an U87-Glioblastom-Zellen:*

Daneben wurde auch die Fluoreszenz an U87-Glioblastom-Zellen untersucht. Für diese Zellversuche wurden die U87 und U87-A8-kd (ADAM-8-knockdown) als Zellreihen verwendet. Diese wurden zuvor auf 96-well Platten ausgesät und im Brutschrank aufbewahrt. Den Platten wurden je 6 mal NBD-PE-haltige mit MAB1031 beladene Liposomen in Konzentrationen von 1, 0,5 und 0,25 mg in 50 µl Aktivitätspuffer hinzugefügt und bei RT 0,5 Stunden inkubiert. Ebenso wurde als Blindprobe auf der selben Platte mit NBD-PE-haltigen

---

Liposomen ohne Antikörper verfahren.

Die Kavitäten der Platten wurden dreimal vorsichtig mit 50 µl Aktivitätspuffer gewaschen und nach Zugabe von 50 µl Aktivitätspuffer einem FluorStar Optima vermessen (Messung von oben, Anregungsfilter 485-12 nm, Emissionsfilter 520 nm, Verstärkung: 1212). Die Werte wurden Blank-korrigiert.

### *2.10.3 Nachweis über Ultraschallkontrast an U-87-Glioblastom-Zellen*

Für die Messungen wurden Polystyrol Mikrotiterplatten mit 2 x 3 Kavitäten (Näpfchen) mit Flachboden verwendet. Die Kavitäten füllten wir mit jeweils 4 ml Agargel (4 % Caso-Agar, 11 % Glycerol, 84,5 % bidestilliertes Wasser und 0,5 % Natriumazid als Biozid) auf. Die ADAM8-Ektodomäne hA8ecto-His wurde wie folgt auf der Oberfläche des Gels immobilisiert: 1 ml Borat-Puffer (pH 7,2), mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,25 % (m/V) Glutaraldehyd. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Geloberfläche mindestens viermal mit Puffer gewaschen um den Glutaraldehyd-Überschuss zu entfernen. Danach wurden 5 µg hA8ecto-His in Puffer hinzugefügt und eine Stunde unter Schwenken inkubiert. Die Hinzugabe von 0,05 ml 1 M Glycin-Lösung für 30 min stoppt weitere Quervernetzung. Ungebundenes hA8ecto-His wurde mit 0,5 M NaCl-Lösung und danach drei mal Borat-Puffer gewaschen. 300 µl der MAB1031-Liposomendispersion wurde in die Kavitäten pipettiert und unter Schwenken 1 h inkubiert, anschließend wurde wieder dreimal mit Borat-Puffer gewaschen um ungebundene Liposomen zu entfernen. Als Blindprobe wurden je zwei Kavitäten analog mit Liposomen ohne Antikörper behandelt und eine komplett unbehandelt. Die Mikrotiterplatten wurden umgehend in ein Wasserbad mit einem Liter bidestilliertem Wasser überführt und mit dem eZono3000 Ultraschallgerät mittels einer linearen 7 - 15 MHz-Schallsonde (12LA, ezono AG, Jena, Deutschland) vermessen. Dabei wird auf der Skalierung auf dem Monitor bei jeder Messung der Abstand bestimmt um vergleichbare Bilder zu erhalten. Die erhaltenen Bilder werden mit ImageJ-Software analysiert, hierbei wird ein 40 x 40 Pixel großes Quadrat mittig auf die Gel-Wassergrenze gelegt und der Grauwert bestimmt.

---

## 3 Charakterisierung der liposomalen Formulierungen

### 3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die DPPC/CH (92,5:7,5)-Formulierungen hergestellt mit Standardmethode ergaben einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von  $131,53 \pm 18,66$  nm und einem PDI von  $0,42 \pm 0,16$ . Der PDI zeigt, dass es sich um eine multimodale Verteilung handelt. Das Zetapotential lag gemittelt bei  $-6,57 \pm 1,29$  mV. Die nicht PEGylierten Liposomen mit 1 mol% NBD-PE wiesen ein wesentlich erniedrigtes Zetapotential von  $-35,63 \pm 4,15$  mV auf.

PEGylierte Liposomen mit 1 mol% NBD-PE zeigten gegen über den nicht PEGylierten ein erniedrigtes Zetapotential von  $-29,2 \pm 1,13$  mV (PEG2000), ohne NBD-PE von  $-29,04 \pm 1,07$

Dieselben Liposomen, die mit Cryo-TEM vermessen wurden wurden vorher mit PCS gemessen, hier ergaben sich Größen von  $121,5 \pm 2,00$  nm (PDI  $0,26 \pm 0,02$ ) für die nicht PEGylierten Liposomen und  $143,2 \pm 1,80$  nm (PDI  $0,46 \pm 0,06$ ) für die PEGylierten Liposomen. Diese Formulierungen besaßen ein Zetapotential von  $-5,09 \pm 0,44$  mV für die nicht-PEGylierten und  $-8,99 \pm 0,31$  mV für die PEGylierten Liposomen.

Die Änderung der Beschallungstechnik führte zu unterschiedlichen Größenverteilungen, durch die sehr hohen PDI wurden die Hauptpeaks der Number-Auswertung verwendet.

**Tabelle 10:** Ergebnisse der verschiedenen Beschallungsschemata bei DPPC/DSPE-MPEG2000/CH (87,5:5:7,5 mol%)

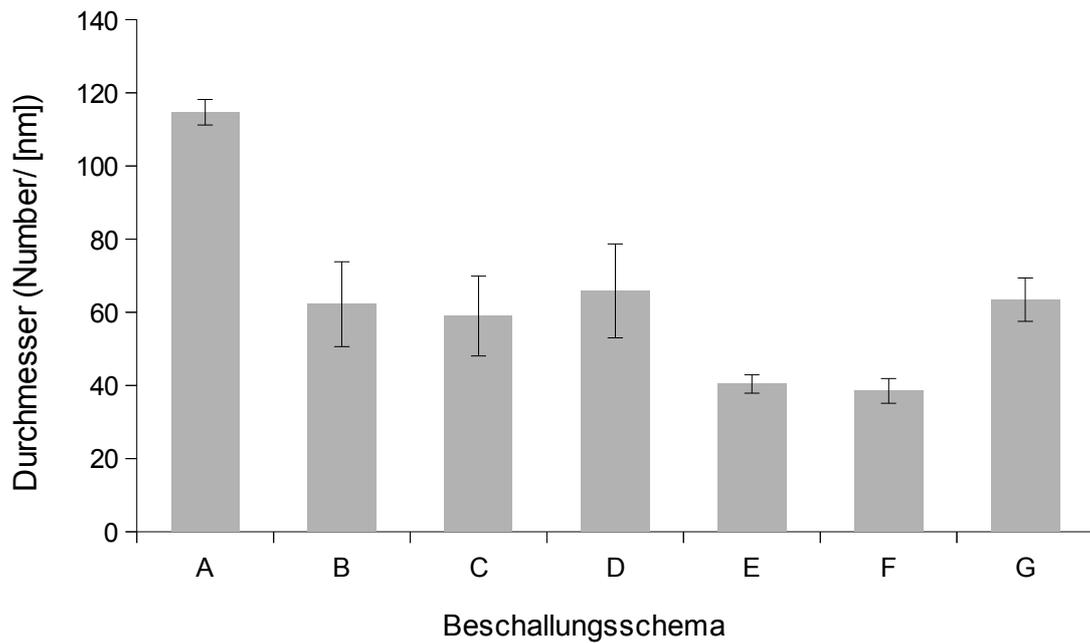
---

Proben:	Ultraschallbad [min]	Ultraschallstab, gepulst [s]	Durchmesser (Number)[nm]	Mittlerer PDI
A	30	0	$47,86 \pm 4,50$	0,40
B	15	0	$62,21 \pm 11,60$	0,68
C	10	0	$58,93 \pm 10,92$	0,54
D	5	0	$65,84 \pm 12,84$	0,54
E	30	30	$40,35 \pm 2,50$	0,37
F	15	30	$38,50 \pm 3,36$	0,36
G	0	30	$63,45 \pm 5,91$	0,55

---

---

## Größenverteilung bei unterschiedlicher Beschallung

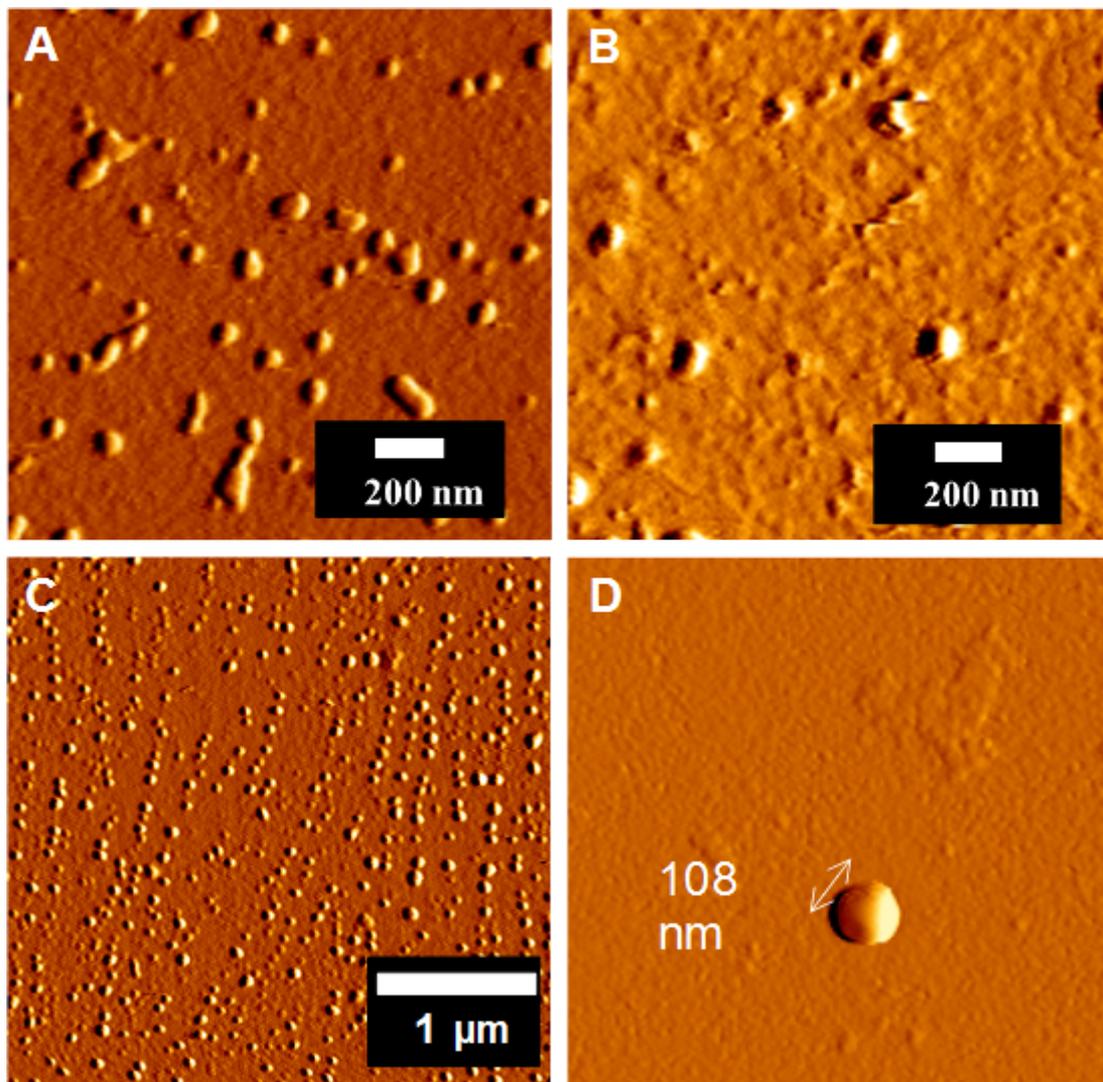


**Abbildung 21:** Größenverteilung bei unterschiedlicher Beschallung. Hierbei wurden Proben gleicher Zusammensetzung mit unterschiedlicher Beschallungszeit und -methode hergestellt und deren Größe mittels PCS bestimmt.

---

### 3.2 Rasterkraftmikroskop (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie wurde als Methode gewählt, um die Größe und in begrenztem Umfang auch die Morphologie der Liposomen zu bestimmen. Es galt die mit den anderen Verfahren ermittelten Größen zu bestätigen und Aufschlüsse auf die Form der Partikel zu gewinnen. Die nicht-PEGylierten Liposomen konnten als zahlreiche, runde, für sich allein stehende Kugeln abgebildet werden. Die Größen variierten zwischen 57 und 126 nm, mit einem Mittelwert von  $84,84 \pm 18,7$  nm. Die PEGylierten Liposomen waren in der Struktur den nicht-PEGylierten sehr ähnlich, allerdings traten hier vereinzelt verschmolzene und gespreitete Liposomen auf. Hier war auch eine Population kleiner, kugeligter Strukturen zu erkennen welche sich von den größeren deutlich unterschieden.



**Abbildung 22:** AFM-Aufnahmen von PEGylierte Liposomen (A), nicht PEGylierte Liposomen mit Übersichtsbildern (B + C) sowie Detailaufnahme eines Liposoms (D)

---

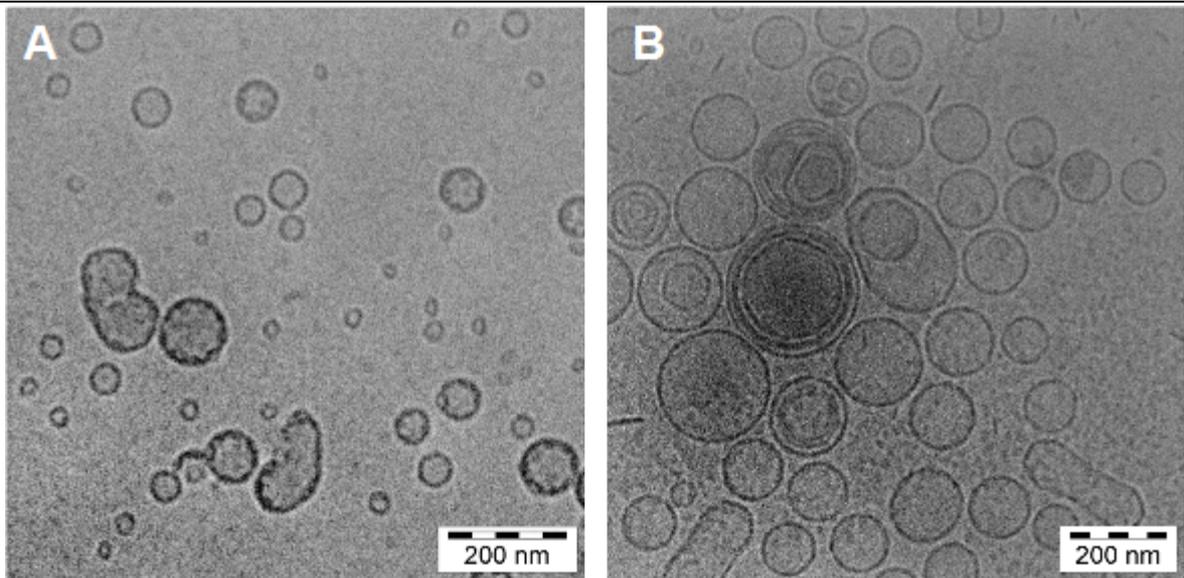
### 3.3 Cryo-Transmissionselektronenmikroskop

Die Cryo-TEM-Aufnahmen der Liposomen zeigen neben der Größe sehr gut die Morphologie und, im Gegensatz zu den AFM-Aufnahmen die Dicke der Hülle und den Liposomentyp (Lamellarität).

Bei den PEGylierten Liposomen fanden sich verschieden große Liposomen, auffallend sind mehrere Populationen, die für sich recht homogene Größen haben, die erste Population hat einen gemittelten Durchmesser von  $97,06 \pm 7,93$  nm und die andere Population  $48,81 \pm 5,09$  nm. Beide wiesen kleine diskoidale Artefakte im Bereich der Lipidhülle auf. Diese diskoidalen bis runden Artefakte traten auch zahlreich außerhalb der Liposomenhülle auf und ergaben einen gemittelten Durchmesser von  $26,67 \pm 4,02$  nm. Werden die beiden Hauptpopulationen gemittelt, ergibt sich ein Durchmesser von  $72,94 \pm 25,37$  nm.

Dagegen zeigen die Aufnahmen der Liposomen ohne PEGylierung einen größeren Durchmesser, wobei hier auffallend ist, dass sich die vereinzelt, großen (um 200 nm) Liposomen aneinander lagern, umgeben von einer großen Population, die recht einheitlich im Durchmesser ist. Diese Population hat einen gemittelten Durchmesser von  $109,38 \pm 17,01$  nm und ist damit nur etwas größer als die PEGylierte erste Population. Abseits der Anhäufung um die großen Liposomen findet sich eine relativ homogene Population kleinerer Liposomen, dessen gemittelter Durchmesser  $70,04 \pm 4,72$  nm beträgt. Bei einigen großen Liposomen erkennt man eine auffällig größere Hüllendicken. Daneben finden wir bei den großen vereinzelt Liposomen in Liposomen. Dieses Phänomen ist bei den PEGylierten nicht zu betrachten gewesen.

In allen Proben waren vereinzelt aufgebrochene oder verschmolzene Liposomen, letztere sehen Erdnuss- oder Nierenförmig aus.



**Abbildung 23:** Repräsentative Cryo-TEM-Aufnahmen: (A) PEGylierte Liposomen und (B) Aggregation von Liposomen ohne PEGylierung

---

### 3.4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es stabile, ultraschallaktive und kleine ( $< 200$  nm) Liposomen zu entwickeln, die gleichzeitig mit Liganden bestückt werden können und PEGyliert lange Zirkulationszeiten gewährleisten (siehe Kapitel 1.3.4).

Die geforderte kleine Größe der Liposomen begründet sich in der Möglichkeit des verbesserten passiven Targetings (siehe Kapitel 1.6.1).

Die durch PCS erhaltenen hydrodynamischen Durchmesser der liposomalen Formulierungen konnten mit AFM- und Cryo-TEM-Abbildungen bestätigt werden. Die AFM-Bilder zeigten Durchmesser zwischen 57 und 126 nm, die teils etwas höher oder gleich den Messergebnissen waren, die durch PCS erhalten wurden. Diese geringe Abweichung liegt möglicherweise an den Wechselwirkungen der weichen Liposomen mit der Oberfläche der Objektträger. Alternativ kann durch die vorher notwendige Trocknung der Proben eine Spreitung der Liposomen als Ursache der Abweichungen in Frage kommen. Die AFM-Bilder zeigen viele ideal runde Liposomen und nur wenige agglomerierte oder aufgebrochene Liposomen (siehe Abbildung 22). Letzteres kann ebenfalls auf den Trocknungsprozess zurückzuführen sein. Bei den nicht-PEGylierten Liposomen war der Großteil der Liposomen für sich allein stehend, lediglich einige wenige größere Liposomen stehen dicht aneinander, meist zu zweit. Hier kann man die Liposomen in zwei Populationen einordnen, die erste um 55 nm, die zweite Population um 92 nm. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Cryo-TEM-Abbildungen.

Die Cryo-TEM Bilder bestätigten die hauptsächlich liposomalen Strukturen und die hierdurch ermittelten Größen decken sich mit denen der PCS- und AFM-Messungen. Aus den unterschiedlichen, aber oft untereinander sehr einheitlichen Populationen die gefunden wurden sowie den vereinzelt großen Liposomen, erklärt sich der oft hohe Polydispersitätsindex bei den PCS-Messungen. Die beiden in den Cryo-TEM Aufnahmen beobachteten Hauptpopulationen, waren zumeist unilamellare Liposomen. Unter den vereinzelt großen Liposomen fanden sich auch multilamellare Liposomen. Die wenigen aufgebrochenen Liposomen bei den Cryo-TEM Aufnahmen können dem Einfrierprozess geschuldet sein oder dem Austreten mizellarer Strukturen aus der Liposomenmembran (ausführlicher siehe unten).

Die PCS-Aufnahmen zeigten, ausgewertet als z-Average, oft deutlich größere Werte als die durch AFM und Cryo-TEM erhaltenen Ergebnisse. Der z-Average ist der mittlere Intensität-

---

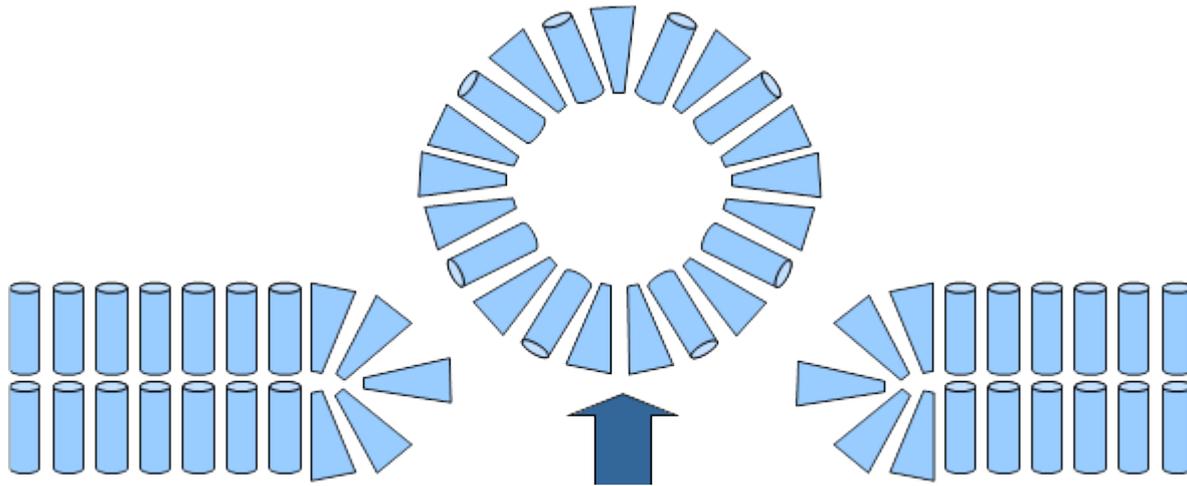
gewichtete Partikeldurchmesser. Befinden sich in der Probe, wie auf den Cryo-TEM-Bildern zu sehen, einzelne große Liposomen, deutet es auf mehrere größerer Partikel innerhalb der Probe hin. Diese großen Partikel fielen bei einigen wenigen Messungen in der Anzahl (engl. *number*)-Auswertung auf, lagen aber im Gesamtanzahl stets bei unter 1 % aller Partikel. Der Zetasizer kann über die Malvern-Software verschiedene Verteilungen auswerten, Intensitäts-, Volumen-, oder Anzahl-Verteilungen. Bei zwei deutlich unterschiedlichen Größen von Populationen würde man in der Number-Verteilung zwei Peaks sehen. Die mit PCS und AFM erhaltenen Populationen befinden sich vom Durchmesser innerhalb der Breite des bei PCS gemessenen einzelnen Number-Peaks, so dass mit PCS die zwei Fraktionen nicht weiter differenziert werden können. Dies hat sich bei vielen Messungen bestätigt, bei Vorhandensein von größeren Agglomeraten oder Liposomen in der Number-Verteilung war der z-Average sehr hoch. Ein guter Hinweis auch auf wenige große Partikel oder Verunreinigung durch Staubpartikel gibt der Blick auf die Intensität-Verteilungskurve, hier geben schon wenige große Liposomen einen beachtlichen Peak [118]. Je kleiner der PDI bei den Messungen war, umso näher kamen die z-Average-Werte an die durch AFM und Cryo-TEM erhaltenen Mittelwerte heran. Die AFM- und Cryo-TEM-Abbildungen zeigen vereinzelte große und aggregierte Liposomen sowie das Vorhandensein von Populationen verschiedenen Durchmessers, dies erklärt bei der PCS den hohen PDI und die erhaltenen Werte.

Die PEGylierten Liposomen zeigten bei der PCS höhere Durchmesser an, als die nicht-PEGylierten, und höhere Werte als bei der Messung mit Cryo-TEM. Zum einen könnte das an den hydratisierten PEG-Ketten liegen, welche den hydrodynamischen Durchmesser erhöhen können, zum anderen zeigte der höhere PDI ( $0,43 \pm 0,06$  gegenüber  $0,26 \pm 0,02$  bei den nicht-PEGylierten) hier eine breitere Verteilung der ermittelten hydrodynamischen Durchmesser an.

Die Cryo-TEM-Aufnahmen zeigten eine Besonderheit bei den Liposomen der größeren Population, hier waren viele diskoidale, sich im Schnitt oval-lanzettenförmige darstellende Domänen im Bereich der Lipiddoppelschicht. Die Koexistenz mizellarer DSPE-PEG-Domänen und Liposomen ist auf nicht-ideale Mischungsverhältnisse zurückzuführen und wurde vor allem für höhere DSPE-PEG Konzentrationen beschrieben [127–129]. Dies scheint speziell bei verwendeten Lipiden zu passieren, deren kritischer Packparameter außerhalb des Liposomen-bildenden Bereiches von  $0,74 < P_{\text{kritisch}} < 1$  liegt. DSPE-PEG2000 besitzt einen kritischen Packparameter von ungefähr 0,5, daraus ergibt sich die favorisierte Bildung von mizellaren Strukturen verglichen mit einem Phospholipid wie DPPC [128]. Dies

---

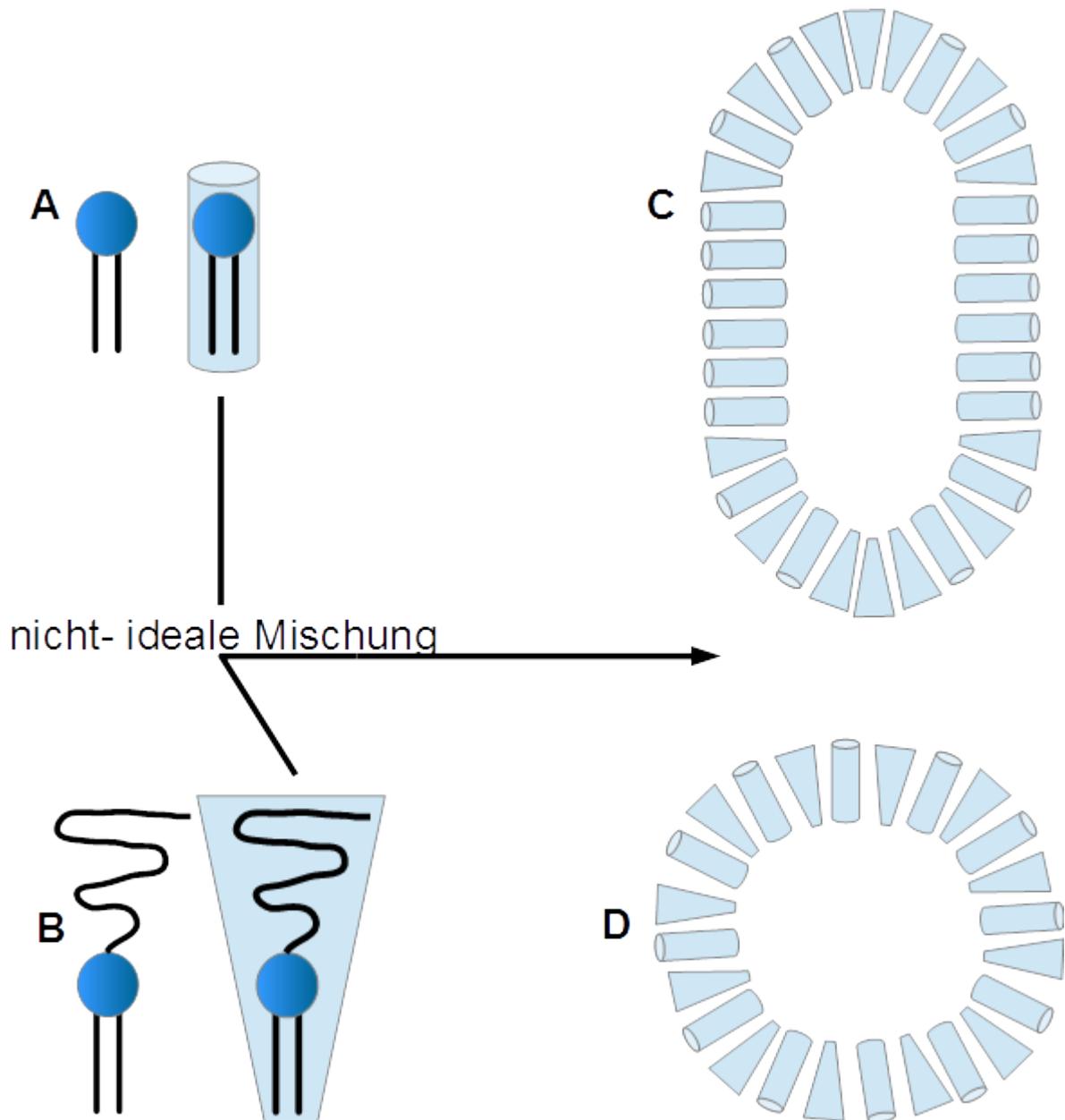
erklärt die Assoziation zu kleineren, mizellaren Strukturen mit höherem Krümmungsradius. Nach Ickenstein *et al.* [130] findet in der Liposomenmembran eine Umorientierung innerhalb der Membran zu diskoidalen Strukturen und daraus entstehenden Membranporen bei dem Übergang von der Gel- zur flüssigkristallinen Phase statt.



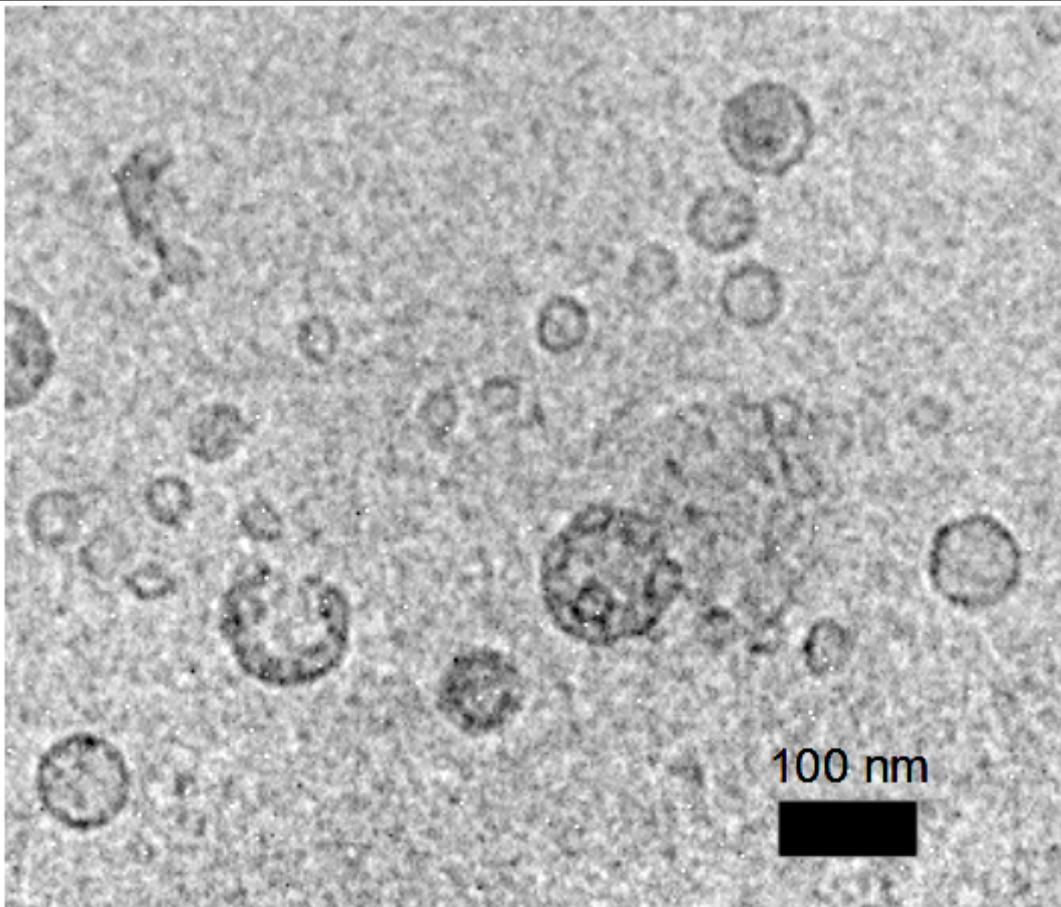
**Abbildung 24:** Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht unter Berücksichtigung der Geometrie der einzelnen Lipide. Gezeigt wird das Austreten der Mischmizellen aus DPPC (Zylinder) und DSPE-MPEG2000 (abgeflachter Konus) aus dem Lipiddoppelschicht-Verband und daraus resultierende Porenbildung. Die thermodynamisch ungünstigen offenen Poren der DPPC-Lipiddoppelschicht werden durch das PEGylierte Lipid mit wesentlich niedrigerem Packungsparameter stabilisiert. Dabei werden die hydrophoben Ketten des DPPC, die sonst der umgebenden wässrigen Phase ausgesetzt wären, vom DSPE-MPEG-2000 abgeschirmt.

Die DSPE-PEG-Moleküle scheinen in der Membran zu diskoidalen Strukturen zu assoziieren, um danach aus der Doppelschicht auszutreten. Bei einigen thermosensitiven Liposomen macht man sich genau dieses Prinzip zum Vorteil: die DSPE-PEG-Lipide assoziieren bei Temperaturerhöhung in der flüssigkristallinen Phase, scheiden aus dem Liposom ab und hinterlassen eine Pore, aus der die Arzneistoffmoleküle austreten können [131]. Bei den von uns untersuchten Liposomen wurden auf den Cryo-TEM-Aufnahmen diskoidale Mizellen außerhalb und innerhalb der Liposomenmembran, sowie Poren mit dem Durchmesser der mizellaren Strukturen gefunden (siehe Abbildung 26). Dies spricht dafür, dass die Assoziante sich in der Liposomendoppelschicht gebildet und diese verlassen haben. In Größe und Morphologie stimmen die kleinen Mizellen außerhalb der Liposomen mit den Assoziaten in der Liposomenhülle überein. Nach Johnson *et al.* [132] beginnen die PEG-Lipide in DPPC-Liposomen ab 4 - 10 mol% mit der Bildung kleiner, diskoidaler Mizellen, dies würde sich mit den uns gemachten Beobachtungen decken (siehe Abbildungen 24 und

25). Brüßler *et al.* [127] beschrieben in ihrer Arbeit zu nanoskaligen Ultraschallkontrast-Mitteln ebenfalls eine Zunahme diskoidaler Mizellen neben Liposomen bei steigendem Polyethylenglykol-40-stearat-Anteil an der Lipidzusammensetzung. Hier führte die Koexistenz von mizellaren und liposomalen Strukturen bei bestimmten Konzentrationen des PEG-Lipids sogar zu einem überlegenen Ultraschallkontrast gegenüber den Formulierungen ohne PEG.



**Abbildung 25:** Schematische Darstellung der Mischmizellen aus DPPC (A) und DSPE-PEG2000 (B) bei nicht-idealen Mischungsverhältnissen. (C): diskoidale Mischmizelle mit ungleichen Anteilen der jeweiligen Lipide, (D): sphärische Mischmizelle aus äquimolaren Anteilen.



**Abbildung 26:** Cryo-TEM-Aufnahme der PEGylierten Liposomen. Auf der linken Hälfte sieht man ein Liposom, aus dem eine diskoidale Mizelle ausgetreten ist und einen Membrandefekt hinterlässt, der im Durchmesser mit der Mizelle übereinstimmt. Rechts davon ein intaktes Liposom mit DSPE-PEG-Assoziaten. Ganz rechts ein Liposom ohne Assoziat, man kann aber an den Verdickungen in der Hülle eine Bildung dieser erahnen.

Das Zetapotential stellt ein wichtiges Kriterium für die Oberflächencharakteristik lipid-basierter Formulierungen dar. Die Messung der Änderung des Zetapotential bei Modifizierung der Liposomen ist ein wichtiger Schritt, so lässt sich mit Hilfe des Zetapotential die kolloidale Stabilität und das Schicksal applizierter Nanopartikel *in vivo* vorhersagen [133]. Infolge der geladenen Partikeloberfläche und dem daraus resultierende lokalen Ladungsüberschuss entsteht ein elektrisches Potential (Nernst-Potential) zwischen der Oberfläche und dem umgebenden Medium. Dieses Potential wird durch die Anlagerung von Ionen aus dem Dispersionsmedium kompensiert. Im Falle der negativen Oberflächenladung lagern sich Anionen adsorptiv durch van-der-Waals-Kräfte an die Oberfläche an (innere Helmholtzschicht). Dem folgt die äußere Helmholtz-Schicht aus hydratisierten Kationen, welche durch elektrostatische Wechselwirkungen angelagert sind. Innere und äußere

---

Helmholtz-Schicht werden zusammen auch Stern-Schicht oder ferner als elektrochemische Doppelschicht bezeichnet, die Ionen sind hier fest gebunden. Die Kationen können jedoch nicht die negative Oberflächenladung und die zusätzlich angelagerten negativen Ladungsträger kompensieren, daher lagern sich weitere, locker gebundene und freibewegliche Ionen in einer diffusen Schicht (Gouy-Chapman-Schicht) um den Partikel an um die Ladungen zu kompensieren. Dadurch ist der Nanopartikel nach außen neutral. Bei Diffusionsbewegungen des Partikels kommt es durch Reibungskräfte zu einem Abriss von Teilen der diffusen Schicht und dadurch zu einem Mangel an Gegenionen, wodurch der Partikel nach außen geladen ist. An der Abrissebene, auch Scherebene genannt, entsteht nach außen eine Potentialdifferenz, das Zetapotential [134]. Das Zetapotential wird in [mV] angegeben und ist wichtiger Indikator für die Stabilität kolloidaler Dispersionen, je höher das Zetapotential eines Partikels, umso größer die elektrostatische Abstoßung und somit die kolloidale Stabilität.

Die DPPC/CH-Liposomen wiesen ein Zetapotential von  $-6,57 \pm 1,29$  mV auf. Die Zetapotentiale um  $\pm 5$  mV gelten als recht neutral, hier ist also mit vermehrter Aggregation zu rechnen [135]. Dies war zu erwarten, da CH elektrisch neutral ist und DPPC eine negativ geladene Phosphatidyl-Gruppe und eine positiv geladene Cholin-Struktur aufweist. Das Zetapotential von Liposomen kann durch den Zusatz weniger mol% geladener Phospholipide, wie z.B. DPPG, verbessert werden. Dies zeigte sich sehr deutlich, sobald wir NBD-PE einsetzten, hier betrug das Zetapotential  $-35,63 \pm 4,15$  mV. Dies ist hier durch die negativ geladene Phosphatidyl-Struktur zu erklären, die nicht, wie etwa bei DPPC, die Ladung durch eine positive ausgleichen kann. Bei der Verwendung von dem ebenfalls negativ geladenem DSPE-MPEG2000 (5 mol%) wurde das Zetapotential leicht positiver, mit  $-29,04 \pm 1,07$  mV ohne NBD-PE und  $-29,2 \pm 1,13$  mV mit NBD-PE. Dabei scheinen die hydratisierten PEG-Ketten die negative Ladung zum Teil zu maskieren, was von Garbuzenko *et al.* als *hidden charge effect* (engl. *versteckter-Ladungs-Effekt*) beschrieben wurde.

Welches Zetapotential man für seine Nanopartikel anstrebt, ist abhängig von deren angestrebter Funktion und der Zielstruktur sowie dem umgebenden Medium. Neutrale und positiv geladene werden langsamer aus dem Körper entfernt, da sie weniger mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Proteinen im Blut wechselwirken [136]. Bei der Untersuchung negativ-geladener und neutraler PEGylierter Mizellen zeigten Yamamoto *et al.* jedoch auf, dass die Ladung hier

---

keinen signifikanten Einfluss mehr auf das Ausmaß der Clearance aus dem Blutkreislauf hatte [137]. Auch Gabizon *et al.* [138] zeigten moderat negativ geladene Liposomen als überlegen im Transport von Chemotherapeutika ins Tumorgewebe. Die Ladung der sauren oder basischen Gruppen hängt vom ihrem p<sub>K</sub>s-Wert ab und beschreibt die pH-Wert-abhängige Dissoziation. Die Dissoziation saurer Gruppen (z.B. -COOH) dissoziiert zu der geladenen -COO<sup>-</sup>-Gruppe. Der pH-Wert des umgebenden Mediums hat demnach auch einen Einfluss auf die Oberflächenladung. In der Tumorumgebung herrscht ein signifikant niedrigerer pH-Wert als bei normalem Gewebe vor, was zu positiverer Ladung der Nanopartikel führen kann [135, 139, 140].

Alle Formulierungen erfüllten die Anforderungen, die bezüglich der Morphologie gestellt wurden; Größe unter 200 nm und eine schallaktive Struktur. Die Bildung der diskoidalen Strukturen sowie die Bildung der Assoziate in der Hülle spricht für ein nicht-ideales Mischungsverhältnis. Da die PEG-Ketten Träger der Linker-Moleküle und somit auch der Targeting-Eigenschaften sind, ist dies als nachteilig zu bewerten, da der größere Teil eigenständige Strukturen außerhalb der Liposomen bildet und von der Geometrie her bei den Liposomen mit DSPE-PEG-Assoziaten ein Teil der PEG-Ketten mit dem Anker-molekül in das Innere der Liposomen zeigt. Daneben wirkt sich dieses Verhalten der Lipide auf die Stabilität der Liposomen aus. Das Abscheiden der DSPE-PEG2000-Mizellen aus der Membran hinterlässt eine große Pore aus der in das Liposom eingeschlossene Arzneistoffe austreten können. Allerdings kann man sich, wenn man untersucht, bei welchen Temperaturbereichen o.a. physikalischen Umständen dieses Abscheiden auftritt, diese Eigenschaft zunutze machen um getriggert an einer bestimmten Stelle im Körper den Arzneistoff aus den Liposomen zu befördern. Dazu müssten die Liposomen bei normalen Einflüssen durch den Körper stabil sein und möglichst nur auf lokale Temperaturerhöhung, Beschallung oder andere, von außen zugeführte lokale Reize, die Struktur öffnen [131].

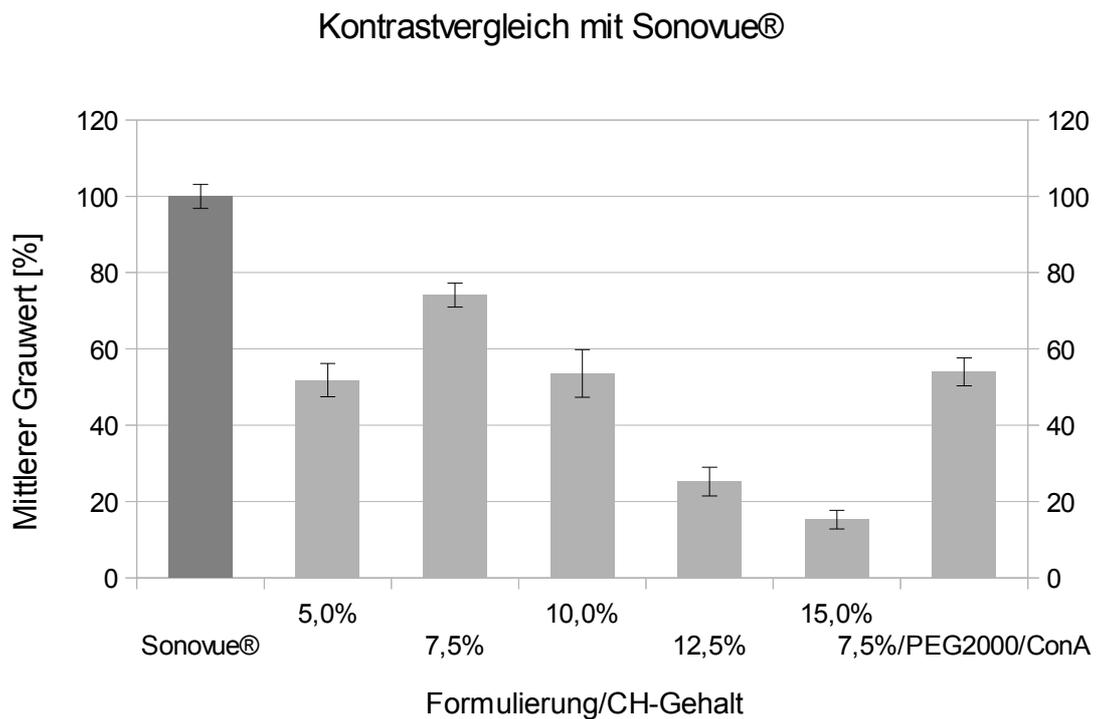
---

## 4 Ergebnisse der Kontrastmessungen

### 4.1 Kontrastvergleich mit SonoVue®

Zur Bewertung der Echogenität wurde das kommerziell erhältliche und klinisch angewandte Kontrastmittel SonoVue® verwendet. Es verfügt, sofern frisch zubereitet, über einen sehr guten, gleichmäßigen und dichten Ultraschallkontrast. SonoVue® wurde direkt vor der Messung nach den Anweisungen des Herstellers resuspendiert, nach wenigen Minuten nahm der Kontrast von SonoVue® stark ab, es wurde daher nur die erste Messung zur Standardisierung der Kontraststärke berücksichtigt.

Bei den Vorversuchen erzielte die Beimischung von 7,5 mol% das beste Ergebnis und erreichte auch im Vergleich mit SonoVue® 74 % des mittleren Grauwertes, der durch SonoVue® erreicht wurde. Das Kontrastbild der Formulierungen erschien bei etwas gröber, bzw. weniger dicht, als das von SonoVue®.

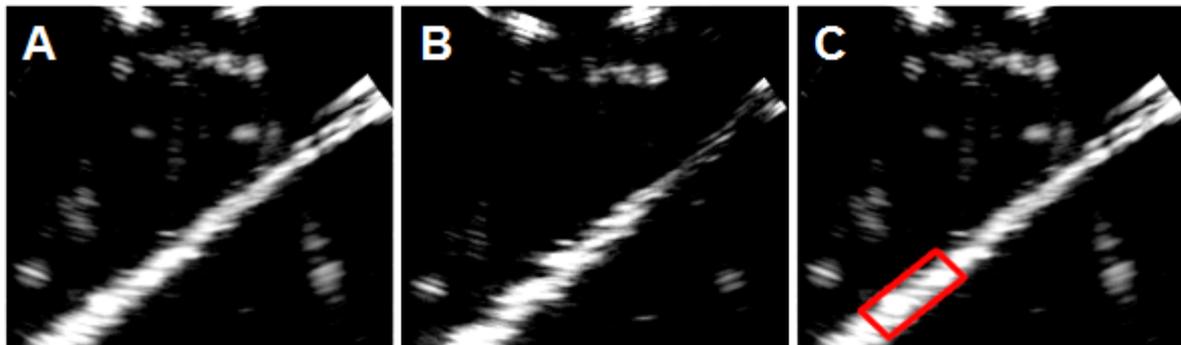


**Abbildung 27: Ultraschallkontrast-Messung im Durchflussmodell bei variablem CH-Gehalt sowie PEGylierter, an ConA gekoppelter Liposomen im Vergleich zu SonoVue®.**

---

## 4.2 Stabilitätsmessungen

Nach einem Jahr Lagerung der Liposomen bei 4 °C in Phosphatpuffer pH 7,4 waren die Liposomen sichtbar suspendiert, ließen sich aber durch Schwenken wieder gleichmäßig im Puffer dispergieren. Bei der erneuten Vermessung im Durchflussmodell konnten sie überzeugen, so wurden bis zu 88 % der mittleren Grauwerte aus der Messung am Tag der Herstellung ermittelt. Im Gegensatz dazu verlor SonoVue® in unseren Messungen schon nach 7 Tagen fast die gesamte Echogenität.



**Abbildung 28:** Echogene Liposomen, gemessen im Durchflussmodell am Tag der Herstellung (A) und ein Jahr später nach Lagerung in Phosphatpuffer pH 7,4 im Kühlschrank bei 4 °C (B). Der Fokus liegt rechts oben bei (B) nicht direkt im Schlauch, wie bei (A) und (C), dadurch enthält dieser Bereich weniger Signale. Ausgewertet wurde daher eine ROI im unteren Bereich links (C).

---

### 4.2.1 Variation in Lipidzusammensetzung

#### **Cholesterol:**

Bei den zahlreichen Messreihen der Vorversuche wurde die Stärke des Schallkontrasts der Einfachheit halber in Schulnoten angegeben, von 1 (sehr gut) für einen starken, dichten Ultraschallkontrast bis 6 (ungenügend) für vereinzelte, punktuelle Signale bis gar keine Echogenität.

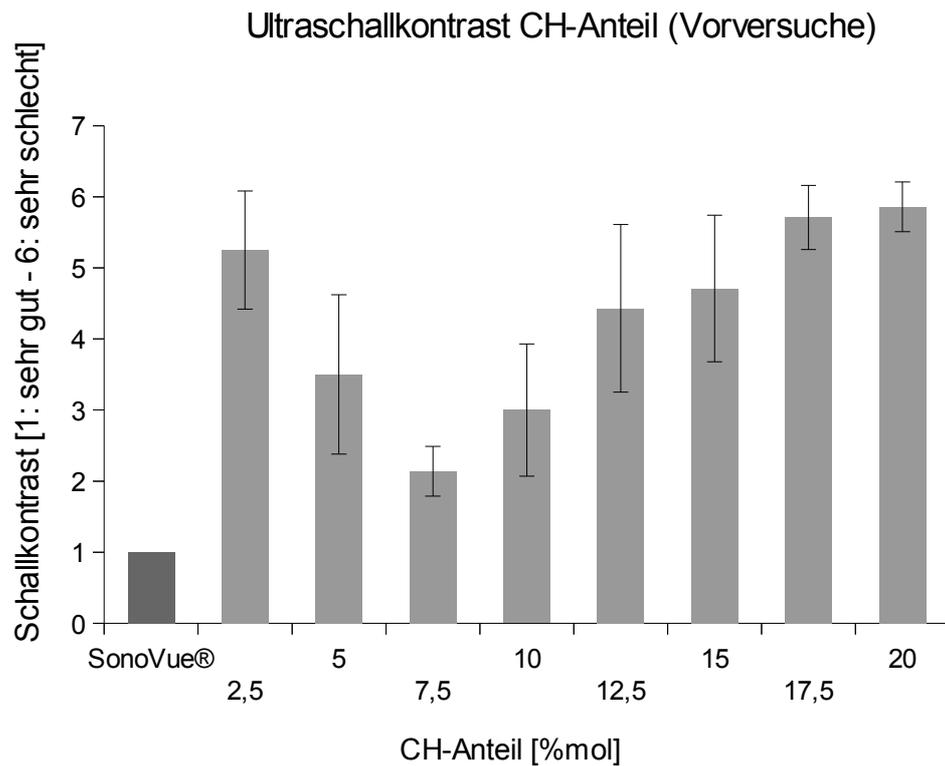
Demnach erzielte nach SonoVue® die Probe C mit einem Anteil von 7,5 mol% CH die Liposomen mit dem besten Ultraschallkontrast, gefolgt von Probe D mit 10 mol% und Probe B mit 5 mol%.

**Tabelle 11: Bewertung des Schallkontrasts bei verschiedenen CH-Gehalten in Vorversuchsreihen um eine optimale CH-Konzentration zu ermitteln.**

---

Probe	DPPC [mol%]	CH [mol%]	Schallkontrast [1= sehr gut bis 6= ungenügend]
A	97,5	2,5	5,25 ± 0,83
B	95	5	3,50 ± 1,12
C	92,5	7,5	2,14 ± 0,35
D	90	10	3,00 ± 0,93
E	87,5	12,5	4,43 ± 1,18
F	85	15	4,71 ± 1,03
G	82,5	17,5	5,71 ± 0,45
H	80	20	5,86 ± 0,35
SonoVue®	n.b.	-	1

---

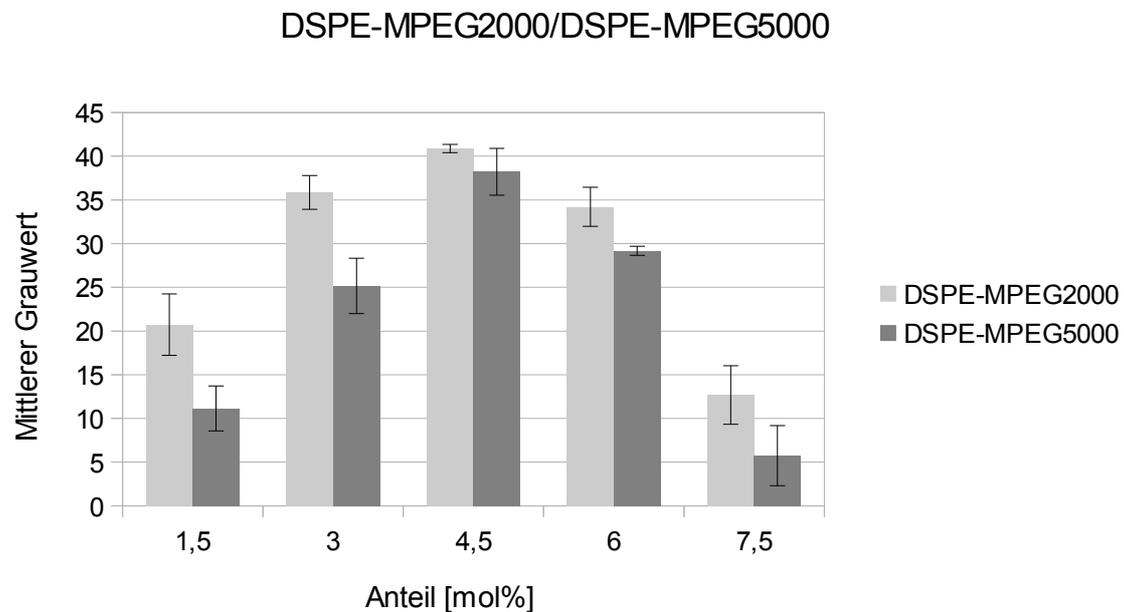


**Abbildung 29: Ultraschallkontrast-Messung von Liposomen mit variierendem CH-Gehalt neben SonoVue® im Durchflussmodell. Die Bewertung erfolgte hier anhand der erhaltenen Kontrastbilder analog zu Schulnoten, von 1 = sehr guter, dichter Kontrast bis 6 = ungenügender Kontrast mit vereinzelt Signalen.**

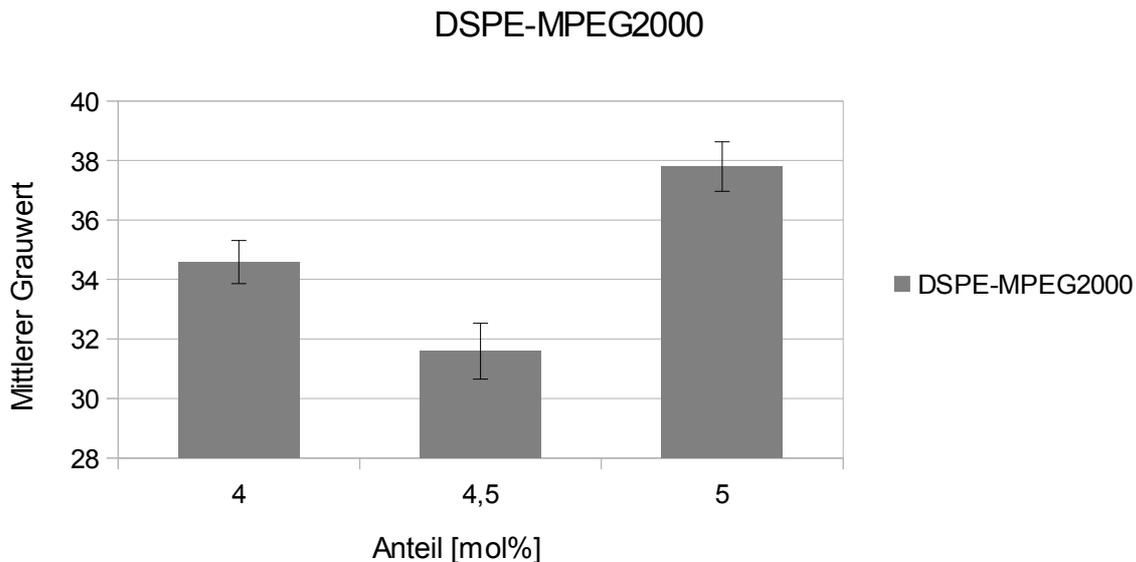
---

## PEGylierung:

Die PEG-Lipide welche zur PEGylierung verwendet werden wurden in verschiedenen Konzentrationen der DPPC/CH-Mischung zugefügt, wobei der CH-Anteil stets bei 7,5% lag. Die ermittelten Grauwerte waren bei der Verwendung von DSPE-MPEG2000 höher als bei der Verwendung von DSPE-MPEG5000. Bei 4,5 mol% war bei beiden Lipidmischungen der beste Kontrast messbar, gefolgt von 3 bzw. 6 mol%. Bei 1,5 und 7,5 mol% nahm der Kontrast ab. Bei diesen zwei Konzentrationen waren die Signale im Ultraschallbild zerstreut und uneinheitlich. Im Anschluss an diese Messreihen wurde nochmal eine Messreihe mit 4 mol%, 4,5 mol% und 5 mol% DSPE-MPEG2000 vermessen. Hier zeigten sich 5 mol% DSPE-MPEG2000 als kontraststärkste Mischung.



**Abbildung 30: Ultraschallkontrast-Messung im Durchflussmodell von Liposomen mit variierenden DSPE-MPEG2000/DSPE-MPEG5000-Gehalten. Der CH-Gehalt blieb nach den Ergebnissen der vorherigen Versuche konstant bei 7,5 mol%.**



**Abbildung 31: Ultraschallkontrast-Messung von Liposomen mit variierendem DSPE-MPEG2000 um den 4,5 mol%-Bereich. Nach den erhaltenen Ergebnissen (Abb. 27) wurde der Bereich um 4,5 mol% DSPE-MPEG2000 gemessen. Auch hier wurden die Formulierungen mit 7,5 mol% CH hergestellt.**

#### 4.2.2 Variation der Herstellungsmethode

Die Variation der Beschallung zeigte Einflüsse auf Größe, Abweichung und PDI. Sofern nur im Ultraschall beschallt wurde, blieb die Größe in etwa gleich, auch der PDI war hoch, mit Ausnahme der längsten Beschallungsdauer von 30 min. Hier waren die Werte deutlich kleiner und ähnlich denen der kombinierten Beschallung. Bei der alleinigen Beschallung durch den Ultraschallstab waren die Liposomen im Größenbereich der 5 - 15 min Beschallung im Ultraschallbad, auch beim PDI, einzig die Standardabweichung des Mittelwertes aus den gemessenen Durchmessern ist besser. Die deutlich kleinsten Durchmesser, Standardabweichungen und PDI wurden mit kombinierter Beschallung erreicht (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Ergebnisse der verschiedenen Beschallungstechniken bei der Verwendung von DPPC/DSPE-MPEG2000/CH (87,5:5:7,5 mol%):**

<b>Proben:</b>	<b>Ultraschallbad [min]</b>	<b>Ultraschallstab, gepulst [s]</b>	<b>Durchmesser (Number)[nm]</b>	<b>Mittlerer PDI</b>
A	30	0	47,86 ± 4,50	0,40
B	15	0	62,21 ± 11,60	0,68
C	10	0	58,93 ± 10,92	0,54
D	5	0	65,84 ± 12,84	0,54
E	30	30	40,35 ± 2,50	0,37
F	15	30	38,50 ± 3,36	0,36
G	0	30	63,45 ± 5,91	0,55

Bei der Beschallung der Proben war die Beschallung für 30 min im Ultraschallbad die Methode mit den höchsten ermittelten Grauwerten. Selbst die Grauwerte der Beschallung 30 min im Ultraschallbad plus 30 s Ultraschallstab ergaben keine höheren Grauwerte. Am schlechtesten mit weitem Abstand schnitt die alleinige Herstellung mit dem Ultraschallstab ab (siehe Tabelle).

**Tabelle 13: Ergebnisse der Kontrastmessungen von der Formulierung DPPC/DSPE-MPEG2000/CH (87,5:5:7,5 mol%) bei unterschiedlicher Beschallung:**

<b>Proben:</b>	<b>Ultraschallbad [min]</b>	<b>Ultraschallstab, gepulst [s]</b>	<b>Mittlerer Grauwert</b>
A	30	0	31,38 ± 5,49
B	15	0	22,25 ± 3,70
C	10	0	22,63 ± 1,63
D	5	0	18,04 ± 2,84
E	30	30	25,51 ± 1,90
F	15	30	25,27 ± 2,21
G	0	30	3,62 ± 1,25

---

Es konnte bei den Ergebnissen der unterschiedlichen Positionen im Ultraschallbad weder beim Schallkontrast noch bei der Größenbestimmung ein Trend festgestellt werden. Lediglich der Kolben, der sich während der Beschallung zwischen zwei anderen befand zeigte leicht besseren Ultraschallkontrast.

---

## 5 Diskussion der Ultraschallkontrastmessungen

Ultraschallkontrastmittel sind aus dem medizinischen Alltag ein nicht mehr wegzudenkendes bildgebendes Werkzeug, um schnell, risikoarm und schmerzlos Gewebe und Organe darzustellen.

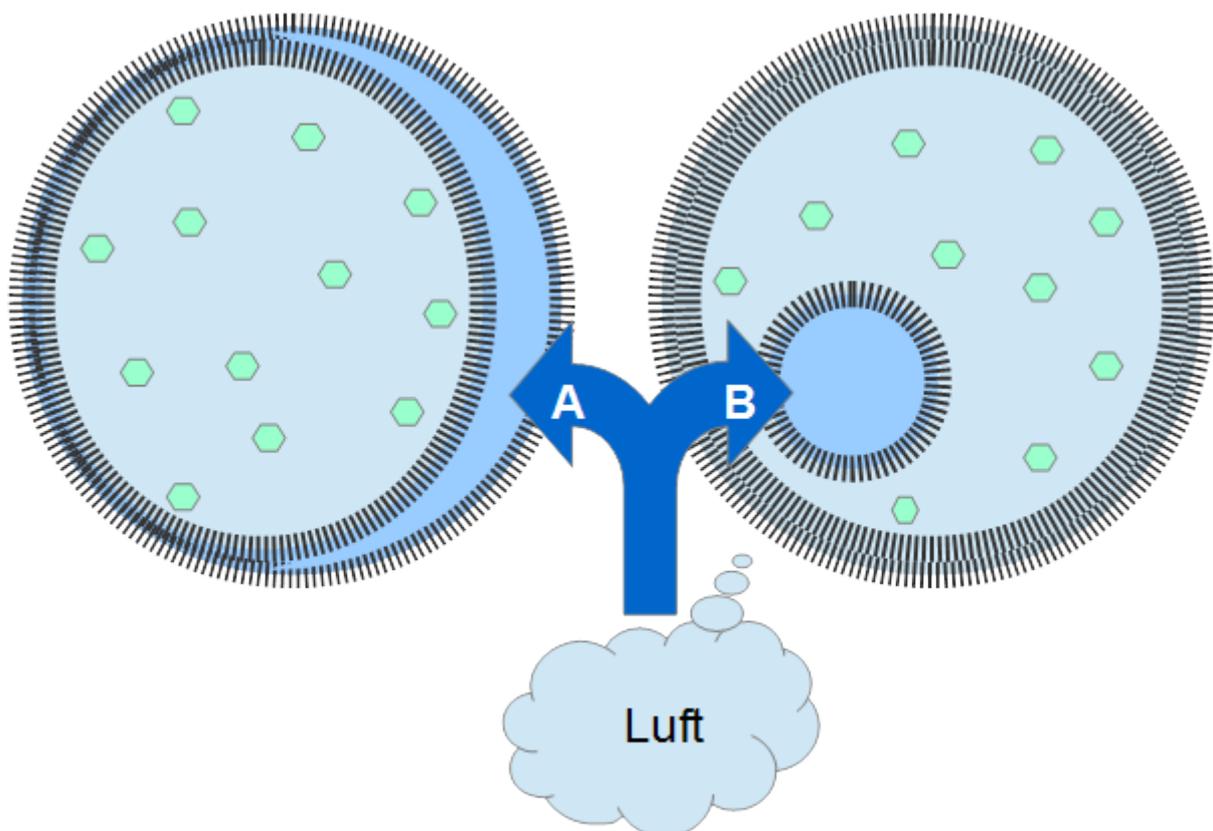
Ende der 1960er Jahre wurde entdeckt, dass durch die Injektion einer Salzlösung ein deutliches Ultraschallsignal erzeugt werden konnte und es wurde erkannt, dass Mikrobläschen in der Lösung für dieses Phänomen verantwortlich sind [141, 142]. Das Aufschütteln von Lösungen, um Mikrobläschen zu erzeugen, hatte allerdings den Nachteil, dass die Mikrobläschen keine ausreichende Stabilität aufwiesen. Erst 20 Jahre später wurde das erste stabile, industriell hergestellte Ultraschallkontrastmittel von der FDA (*food and drug administration*) zugelassen, hierbei handelte es sich um Albutex<sup>®</sup>, Luftbläschen mit Albuminhülle [143]. Die Qualität der Bildgebung und die eingesetzten Kontrastmittel haben sich seitdem stetig verbessert und sind Gegenstand aktueller Forschungen und Zulassungen [144, 106].

Echogene Liposomen wurden 1996 zuerst beschrieben und werden auch ELIPs (kurz für: *echogenic liposomes*) bezeichnet [145]. Erhöhte Echogenität erhalten Liposomen z.B. durch den Einschluss von Luft oder anderen Gasen. Aus thermodynamischen Gesichtspunkten ist davon auszugehen, dass sich das Gas beim Einschluss wie ein hydrophober Stoff verhält. Dadurch ergeben sich zwei theoretisch mögliche Aufenthaltsorte. Das Gas kann sich zwischen den Monolayern der Doppelschicht im lipophilen Zwischenraum aufhalten oder wie eine Mizelle als Gasblase, umgeben von einer Monoschicht aus Phospholipiden im Innenraum des Liposoms. Durch die schlechte Löslichkeit der Gase in Wasser, die bei Temperaturerhöhung (z.B. bei Liposomenherstellung) sind die Einschlüsse von Gasen bei konventioneller Liposomenpräparation, ohne Gefrier-Tau-Zyklen um Gas einzuarbeiten, sehr schlecht [146]. Bei RT und 1 atm Druck ist 1,8 % (v/v) Luft in Wasser löslich, bei 50 °C sind es nur noch 1,30 % (v/v). Dagegen spricht auch, dass die Applikation von Überdruck bei der Herstellung, wobei sich mehr Gas in Wasser lösen würde, keine signifikanten Verbesserungen zeigte [48].

Allerdings muss man bedenken, dass bei der Film-Methode, wie wir sie angewendet haben, die Exposition der lipophilen Ketten an der Luftgrenzfläche zur Luft stattfindet, während die Kopfgruppen dem Wasser zu gewandt sind. Es wäre denkbar, dass bei der Fusion der

---

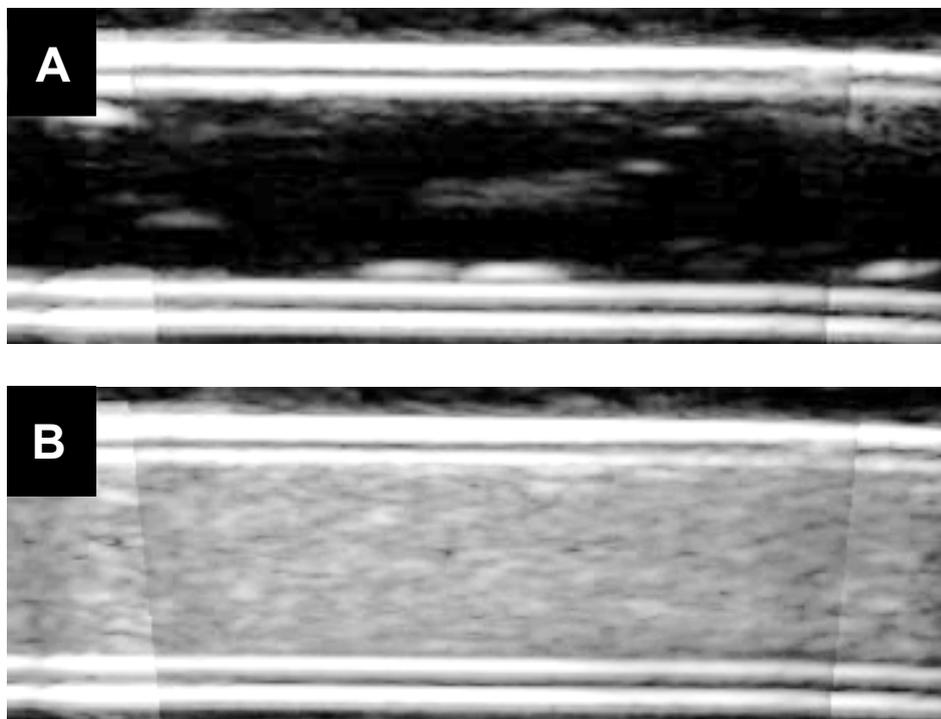
hydratisierten Schichten oder bei durch Exposition zur Luftphasengrenze entstehende kleine Mengen Luft eingeschlossen werden, innerhalb der Doppelschicht oder durch das Ausbilden einer Phospholipiddoppelschicht um eine Luftblase. Das würde die hohe Echogenität erklären, auch wenn im Wasser bzw. Puffer, in dem rehydratisiert wird, nur wenig Gase gelöst sind. Bei den Frier-Tau-Zyklen, durch die in einigen Formulierungen die Echogenität drastisch erhöht werden kann, ist es das Aufbrechen der Lipiddoppelschichten, was zur Exposition der lipophilen Oberfläche zur Luft führen muss [147, 48].



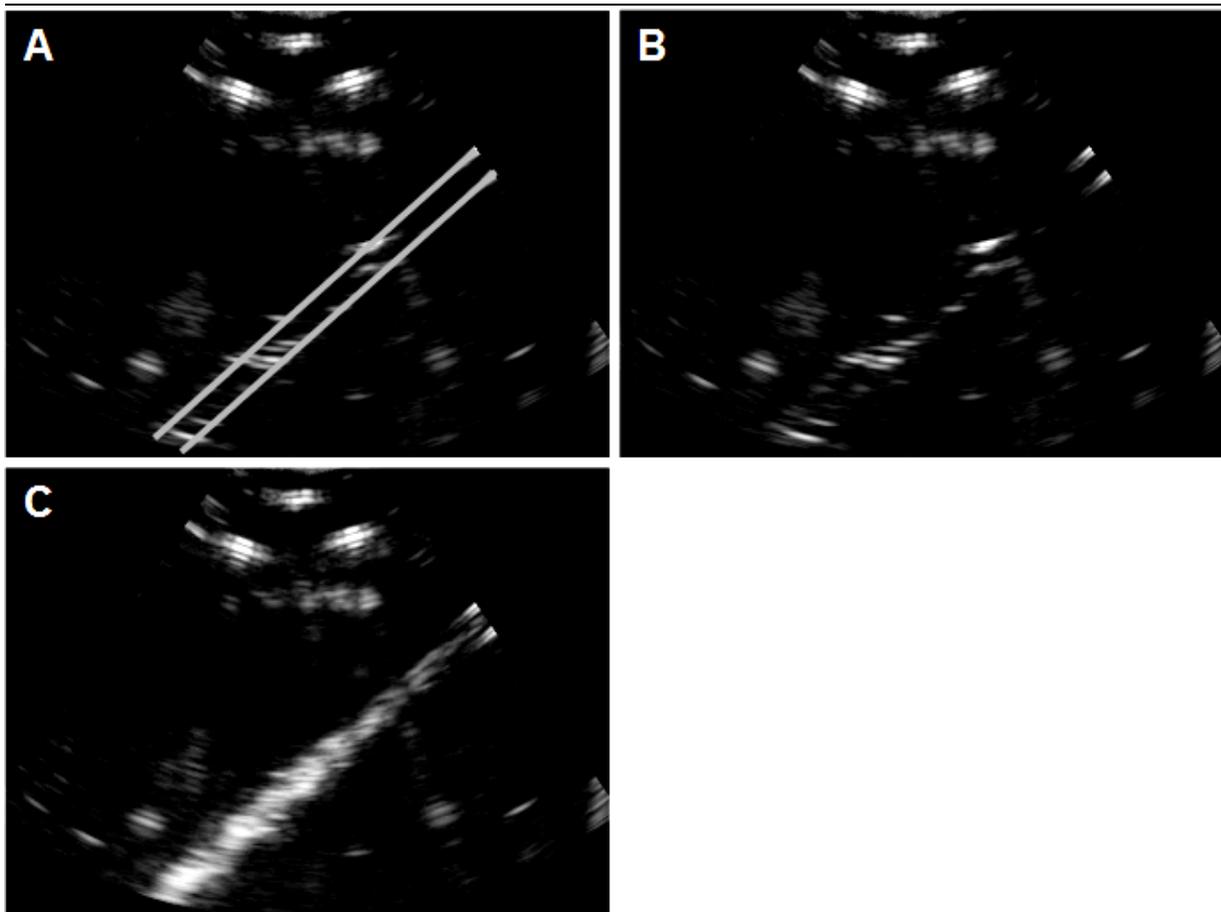
**Abbildung 32:** Theoretische Aufenthaltsorte von Gasen am Beispiel Luft, die in Liposome eingebracht wurden, es gibt zwei energetisch denkbare Möglichkeiten, die diskutiert werden: (A): Das Gas verhält sich ähnlich einem hydrophobem Stoff und bildet ein Reservoir im lipophilen Zwischenraum der Lipiddoppelschicht, (B): Eine Gasblase wird mizellar von einer Lipidmonoschicht umhüllt, dabei zeigen die lipophilen Kohlenwasserstoffketten nach innen in die Gasphase und die Kopfgruppen schirmen die innere, wässrige Phase im Liposomen-Innenraum ab.

---

Die ELIPs wurden in einem Durchflussmodell nach Kollmann *et al.* [1] auf ihre Echogenität vermessen. Durch den Aufbau des Schlauchsystems und die verwendeten Materialien für Schläuche und Prüfkörper konnte von Druck- und Schalleigenschaften ein Blutgefäß in menschlichem Gewebe simuliert werden. Dieses Durchflusssystem hat sich unserem Arbeitskreis bereits mehrfach als Modellsystem bewährt [122, 127]. Das Schlauchsystem wurde von uns noch weiter modifiziert, so wurde ein Agargel-Prüfkörper mit Schlauch, parallel zum Boden, anstatt im 30 °- Winkel, und geringeren Entfernungen von Oberfläche zu Schlauch, um simulierte oberflächennahe Blutgefäße zur Vermessung mit einer linearen Schallsonde zu messen. Die Anregung gelingt hier nicht so stark wie bei der konvexen Sonde, dafür ist die Abbildung der umgebenden Strukturen höher aufgelöst.



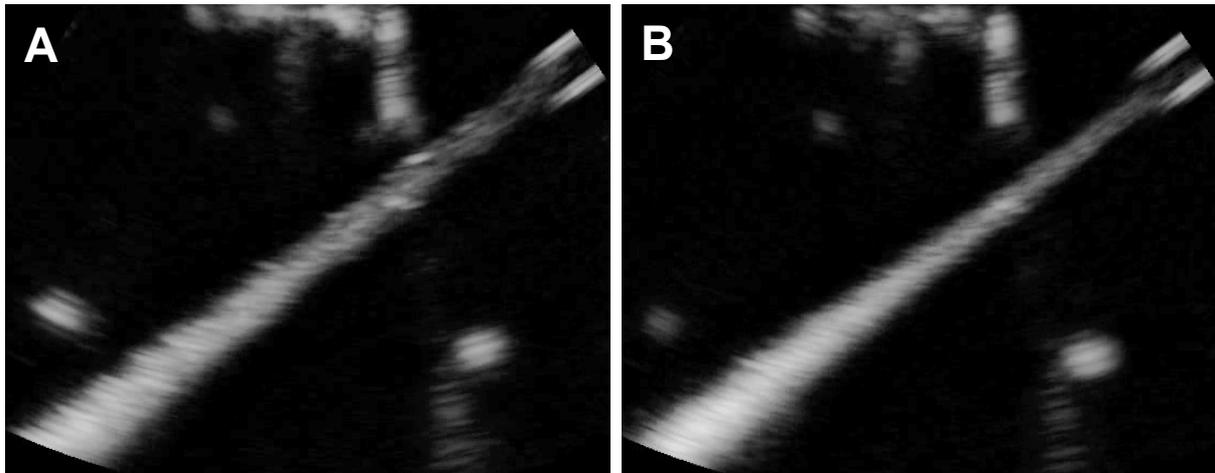
**Abbildung 33:** Ultraschallkontrastmessung des Schlauches mit Pufferlösung (A) und nach Applikation der Liposomen (B), hier in neu entwickeltem Schlauchmodell und linearer Sonde. Die Auflösung ist hier wesentlich besser, die Schlauchwände sind hier als doppelte Linien sehr gut sichtbar.



**Abbildung 34:** Ultraschallkontrastmessung, Schlauchmodell im Übersichtsbild, (A) Schlauchposition eingezeichnet (grau), (B) Messung mit Pufferlösung und (C) nach Liposomen-Zugabe.

---

## 5.1 Kontrastvergleich mit SonoVue®



**Abbildung 35:** Vergleich der Kontrastintensität einer äquivalenter Menge von (A): Liposomen und (B): SonoVue® im Durchflussmodell.

Die Proben mit 7,5 % CH erreichten bis zu 74 % der Kontrastintensitäten, die durch SonoVue® erreicht werden konnten. SonoVue® zeigte sich im Durchflussmodell von den Signalen her dichter und heller und zeigte auch eine Erhellung im Nahbereich um den Schlauch herum. Durch die Verwendung von 5 % DSPE-PEG2000-Cyanur und Bindung an ConA büßten die Liposomen 25 % der Kontrastintensität, bezogen auf nicht-modifizierte Liposomen, ein. Hier konnten bis zu 54 % der SonoVue® - Ergebnisse erreicht werden. SonoVue® wurde durch seine klinische Bedeutung als bewährtes Ultraschallkontrastmittel als Standard herangezogen. Es muss aber bedacht werden, dass man zwei unterschiedliche Systeme miteinander vergleicht. Die Liposomen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht aus DPPC/CH/(DSPE-PEG2000-Cyanur) um einen wässrigen Kern, bei eingeschlossenen Gasen handelt es sich um Luft. SonoVue® besteht nicht aus Liposomen, sondern aus Mikrobläschen, also Gasblasen aus Schwefelhexafluorid, mit einer Hülle aus DPPC, DSPC, Palmitinsäure und PEG4000. Die Mikrobläschen haben einen mittleren Durchmesser von 2,5 µm, also dem etwa 25-fachen, verglichen mit den Liposomen. Die PEGylierung und Kopplung an ConA reduzierte den mittleren Grauwert um etwa 25 %, verglichen mit der nicht PEGylierten Formulierung. Diese Kontrastabnahme ist durch die erhöhte Absorption des Ultraschalls durch die hydratisierten PEG-Moleküle erklärbar [148]. Die Abschwächung des Kontrastes ist auch durch eine Abschirmung des Liposoms durch die umgebenden ConA-Lektine denkbar

---

und wurde auch bei der Verwendung von Antikörpern berichtet [149].

Ein Vorteil der Liposomen gegenüber SonoVue<sup>®</sup> ist die wesentlich bessere Stabilität bei Lagerung, bei der präparierten SonoVue<sup>®</sup>-Dispersion kommt es schon nach 8 h zu einem Abfall der Grauwerte [125]. Die Liposomen muss man darüber hinaus nicht vor jeder Benutzung rekonstituieren sondern umgehend benutzen. Benötigt man nur eine kleine Menge SonoVue<sup>®</sup>, so muss man nach den Messungen den Überstand verwerfen und kann ihn nicht weiter als Kontrastmittel nutzen, wie es bei den echogenen Liposomen der Fall ist.

Wir haben in dieser Studie eine liposomale Formulierung gefunden, die bei einfacher Herstellung im Ultraschallbad und aus wenigen Komponenten bestehend, einen guten Ultraschallkontrast aufweist und die für die gestellten Anforderungen richtige Größe besitzt. Es heißt zwar im Allgemeinen; Je größer der Durchmesser der Ultraschallkontrastmittel, desto größer die Rückstreuung und der Streuquerschnitt [67]. Wie in der Diskussion auf den nächsten Seiten aufgezeigt, geht bei dem geometrischen Streuquerschnitt zwar der Radius mit 6. Potenz ein und unsere ELIPs haben einen recht kleinen Radius, jedoch ist, wie oben beschrieben, der geometrische Streuquerschnitt nicht alleine ausschlaggebend, wie stark ein Kontrastmittel zurückstreut. Der Radius kann aber die höhere Kontrastintensität von SonoVue<sup>®</sup> erklären. Unsere ELIPs sind zielgerichtet, d.h. sie sollen sich aktiv oder passiv im Zielgewebe anreichern. Dadurch erhöht sich am Zielgewebe die Konzentration der Streukörper, was wiederum zu erhöhter gestreuter Intensität und stärkerem Signal führen kann [54]. Die optimale Größe der Nanopartikel für Tumor-Targeting beträgt 10 - 200 nm, eine Vergrößerung des Radius würde sich nachteilig auf die Targetingfähigkeit auswirken [82].

---

## 5.2 Variation der Lipidzusammensetzung

Die Variation der Lipidzusammensetzung führte zu deutlichen Unterschieden im Ultraschallkontrast der Proben, bei allen verwendeten Lipiden wurde erst in Vorversuchen gemessen, in welchen Konzentrationen sie den Schallkontrast am wenigsten negativ oder am ehesten positiv beeinflussen. Bei funktionellen Lipiden wurde darauf geachtet, dass die Funktion in der gewählten Konzentration weiterhin gut gewährleistet wurde.

CH wurde in unterschiedlichen Anteilen eingearbeitet, dafür wurde jeweils der DPPC-Gehalt reduziert.

Es erwiesen sich hohe und niedrige CH-Gehalte als Schallkontrast-mindernd. Erste Vorversuche mit CH-Gehalten von 25 mol% und höher zeigten keinen signifikanten Schallkontrast. Durch die Versuchsreihen erwies sich eine Mischung von 7,5 mol% als optimal. Schon bei den Vorversuchen stach diese CH-Konzentration durch den guten Schallkontrast hervor, der direkte Vergleich mit SonoVue® bestätigte dies. Der Anteil an CH hatte auch eine größere Auswirkung als die PEGylierung und Kopplung mit ConA. Der Einfluss von CH auf die Membranstabilität, -permeabilität und -starrheit ist bereits gut untersucht [21, 23]. Huang *et al.* [150] untersuchten für ihre Formulierungen CH-Konzentrationen von 1, 5, 10, 15, 20, 30 und 40 mol% und erhielten ein Maximum an Schallkontrast bei 10 mol%. Die Lipidzusammensetzung unterschied sich jedoch von den von uns benutzten Formulierungen und kann daher nicht direkt verglichen werden. In hohen Konzentrationen beginnt eine Phasentrennung was zu verminderter Stabilität der Bilayer führt. Georghiou *et al.* [151] fanden heraus, dass geringe CH-Konzentrationen um 9 mol% die Lipiddoppelschicht stabilisieren während Konzentrationen  $\geq 13$  mol% zur Destabilisierung führten. Diese Eigenschaft des CH bei der verwendeten Zusammensetzung würde die erhaltenen nicht-linearen Werte der Kontrastverstärkung in Bezug auf den CH-Gehalt erklären. Der Gehalt an CH hatte, neben der Dauer und Art der Beschallung, den größten Einfluss auf die Echogenität der Liposomen.

Für die Stärke der Echogenität von Ultraschallkontrastmitteln sind, neben den nicht-linearen Effekten, zwei lineare Effekte verantwortlich. Durch den kleinen Radius der Ultraschallkontrastmittel sind sie häufig wesentlich kleiner, als die Wellenlänge von klinisch genutztem Ultraschall [52]. Das macht sie zu Raleigh-Streuern. Als Sonderform der Streuung, findet bei der Raleigh-Streuung eine unbestimmte Richtungsänderung der Welle statt (im

---

Gegensatz zur Reflexion und Beugung, wo die Welle gerichtet abgelenkt wird). Bei dieser Streuung nimmt der geometrische Streuquerschnitt, oder anders formuliert Wirkungsquerschnitt, mit der 6. Potenz des Radius und der 4. Potenz der Frequenz des einfallenden Schalls zu. Darüber hinaus ist er abhängig von der Schallgeschwindigkeit, Konzentration der Streukörper, Kompressibilität und Dichte.

Für die gestreute Intensität  $I_s$  gilt:

$$I_s = I_A c \sigma$$

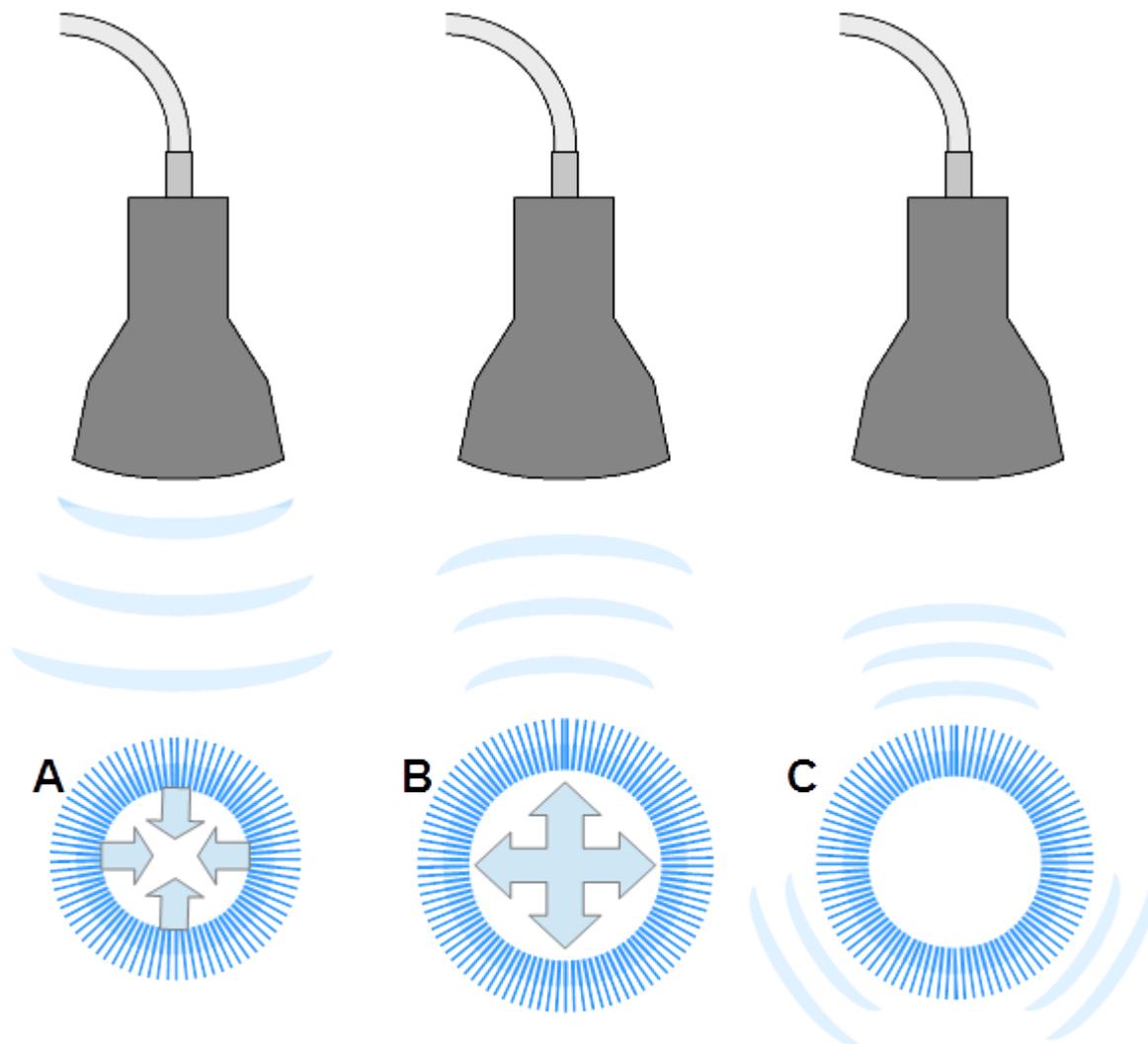
mit  $I_A$  = Einfallende Intensität,  $c$  = Konzentration Streukörper,  $\sigma$  = geometrischer Streuquerschnitt [54].

Da wir, verglichen mit den kommerziell erhältlichen Ultraschallkontrastmitteln, sehr kleine Radien für die ELIPs haben, spielt diese Form der Echogenität eine für uns untergeordnete Rolle. Der zweite Faktor, der zur Echogenität bei Ultraschallkontrast-Messungen beiträgt ist für uns weitaus bedeutender. Die Echogenität von Ultraschallkontrastmitteln ist auch ein Resonanzprozess, bei dem die Kontrastmittel Resonanzkörper darstellen, die sich durch die von Ultraschallwellen erzeugten, periodischen Druckschwankungen im Durchmesser verändern, sie expandieren und werden wieder komprimiert, sie oszillieren. Die dadurch entstehenden Resonanzeffekte führen zu einer erheblichen Verstärkung des reflektierten Signals. Dieses oszillierende Verhalten erzeugt Streuquerschnitte, welche sehr viel höher sind als die geometrischen Streuquerschnitte [67]. Die Resonanzfrequenz ist abhängig von dem umgebenden Flüssigkeitsdruck, der Dichte, der Steifigkeit der Liposomenhülle, und dem Radius. Hier gilt im Allgemeinen: Je kleiner der Radius der Ultraschallkontrastmittel, umso höher die Resonanzfrequenz [54]. Für die von uns hergestellten und vermessenen ELIPs sind diese Resonanzeffekte von Bedeutung, auch wenn die Liposomenhülle nicht so steif ist wie die anderer nanopartikulären Systeme, der Radius der Teilchen hat hier den stärkeren Einfluss.

Neben diesen linearen Effekten, wo sich die Größe der ELIPs linear zu den akustischen Drücken und Frequenzen verhält, treten auch nicht-lineare Effekte auf, diese treten bei Kontrastmitteln und höheren akustischen Drücken auf. Hier oszillieren die Kontrastmittel asymmetrisch, dadurch erzeugen sie Vielfache oder Teile (harmonisch/subharmonisch) der ursprünglich gesendeten Frequenz [152]. Diese Resonanzfrequenzen sind abhängig von

---

Radius, Größenverteilung, und der Steifigkeit der Hülle. Hier würde die Oszillation und damit das nicht-lineare Echosignal der ELIPs durch eine steife Hülle gedämpft werden. Dies ist im Hinblick auf die Liposomen mit ihrer verhältnismäßig weichen Hülle von Interesse.



**Abbildung 36:** (A): Ultraschallsignal trifft auf Liposom, es kommt zur Kompression, das Liposom reflektiert einen Teil des Signals (B) und oszilliert (C), was zu weiteren Echosignalen am Empfänger führt.

Bei der Verwendung von PEGylierten Lipiden zeigte DSPE-MPEG2000 bei 5 mol% den besten Ultraschallkontrast. Die PEGylierung mit PEG-Kettenlängen von 5000 Da war von der Echogenität her der PEGylierung mit 2000 Da-Kettenlängen unterlegen. Darüber hinaus birgt diese Wahl der längeren Ketten auch keine Verbesserung in der Zirkulationszeit der Liposomen [153]. Die Konzentration von 2 - 5 mol% PEG5000 ist zwar als ideale Konzentration für die Verhinderung der Plasmaproteinbindung beschrieben worden [154].

---

PEG5000 zeigte bei uns allerdings eine Verschlechterung des Ultraschallkontrastes, so dass wir bei 2000 Da Kettenlänge blieben.

Die cryo-TEM-Aufnahmen zeigten bei den PEGylierten Liposomen als Besonderheit runde Domänen in der Liposomenhülle, sowie runde bis diskoidale Mizellen. Dies spricht für ein nicht-ideales Mischungsverhältnis der Lipide mit DSPE-PEG2000 und dadurch heterogene Mischung aus größeren Liposomen und kleineren Mizellen. Bei den nicht-linearen Effekten (s.o.) ist die Resonanzfrequenz auch abhängig von der Größenverteilung. Nach Brüßler *et al.* [127] ist die Koexistenz mizellarer und liposomaler Strukturen bei der Verwendung PEGylierter Lipide je nach Konzentration sogar Kontrast-verstärkend.

Der Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE wurde in einer Konzentration von 1 %mol eingesetzt, in dieser geringen Konzentration war kein negativer Effekt auf die Kontrastintensität messbar.

---

### **5.3 Variation der Herstellungsmethode**

#### **Beschallung:**

Die Art und Dauer der Beschallung hatte deutliche Einflüsse auf den Schallkontrast der Liposomen. Die alleinige Beschallung mit dem Ultraschallstab ergab das mit Abstand schlechteste Ergebnis mit einem Grauwert von  $3,62 \pm 1,25$ . Dies scheint trotz der hohen eingebrachten und direkt übertragenen Energie keine geeignete Herstellungsmethode zu sein. Die kombinierte Beschallung lieferte mit  $25,27 \pm 2,21$  für Probe F (15 min/30 s) und  $25,51 \pm 1,90$  für Probe G (30 min/30 s) zwar bessere Ergebnisse als die alleinige Beschallung für 5, 10 oder 15 min im Ultraschallbad, die besten Ergebnisse wurden allerdings mit der 30-minütigen alleinigen Beschallung im Ultraschallbad erzeugt (Probe A). Bei der kombinierten 30 min/30 s betrug der mittlere Grauwert 81 % von dem der alleinigen Beschallung im Ultraschallbad für 30 min, war also sogar erniedrigt. Dies könnte an der verminderten Größe liegen (siehe Tabelle 11), da physikalisch gesehen größere Liposomen besseren Schallkontrast geben. Die Echogenität eines Ultraschallkontrastmittels hängt ab von der Wellenlänge des verwendeten Ultraschalls, der Dichten, der Kompressibilität und vom Radius des Kontrastkörpers ab. Der Radius hat hierbei den größten Einfluss [155]. Unser gesetztes Ziel, liposomale Kontrastkörper zu entwickeln schloss mit ein, dass diese kapillargängig und unter 200 nm sein sollen. Um einen Kompromiss aus geringer ( $< 200$  nm), aber ausreichender Größe und gutem Ultraschallkontrast zu haben wählten wir die Methode der 30-minütigen Beschallung.

#### **Position im Ultraschallbad:**

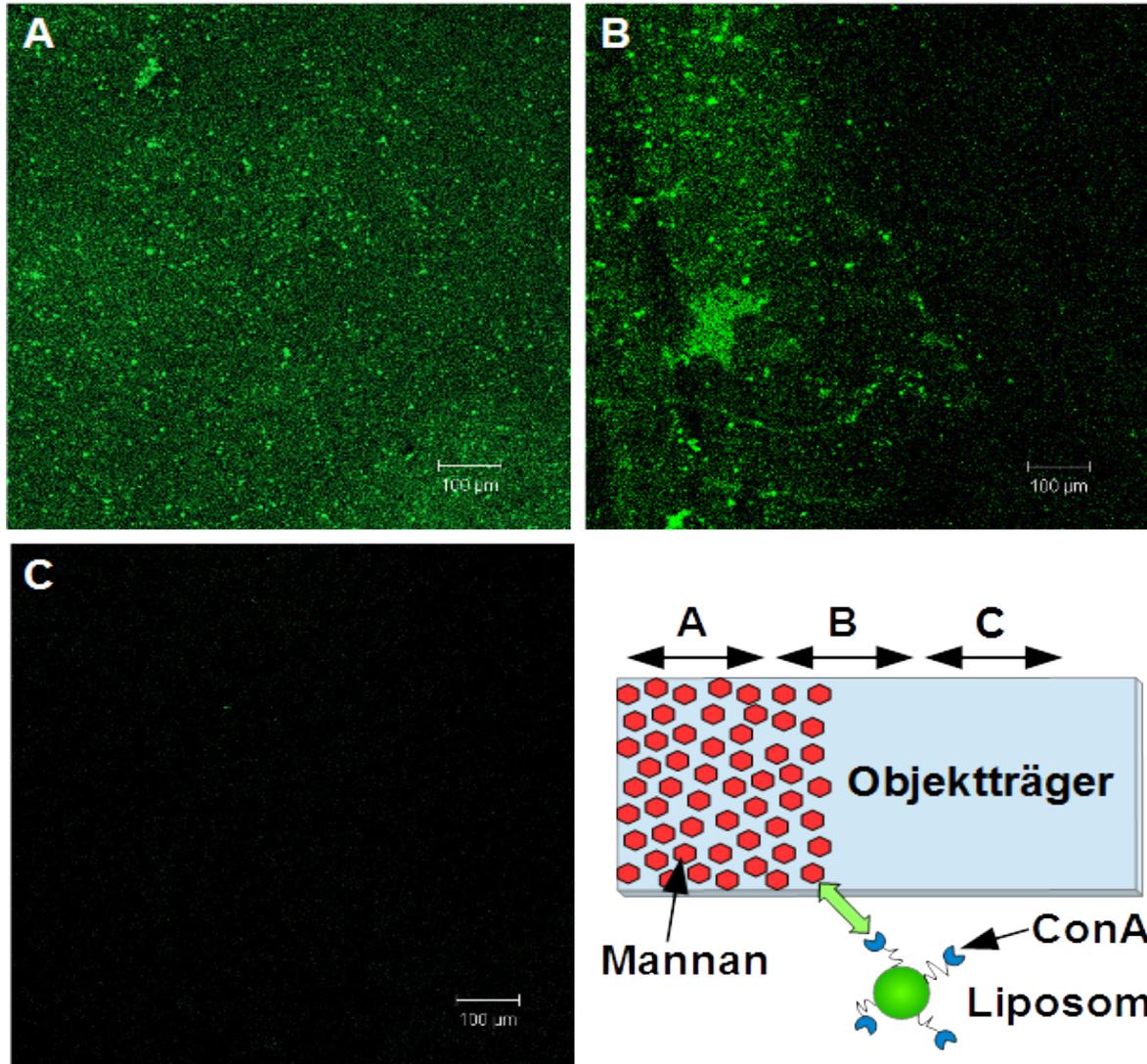
Oft waren, bei der Herstellung mehrerer Proben in einem Herstellungsgang, einzelne Proben, die gar keinen oder auffallend schlechten Schallkontrast zeigten. Luftdruckschwankungen und andere äußere Einflüsse konnten ausgeschlossen werden, da andere Proben guten Kontrast zeigten. Daher wurde die Herstellungsmethode genauer untersucht. Die Position im Ultraschallbad hatte keinen großen Einfluss auf den Ultraschallkontrast. Lediglich der mittlere Kolben zeigte leicht erhöhten Kontrast, verglichen mit den anderen Glaskolben. Dies wurde während weiteren Herstellungen im Auge behalten und konnte sich dabei nicht bestätigen. Auch in den Größenmessungen war kein Trend erkennbar. Die Auswirkung der Position im Ultraschallbad scheint bei keinen signifikanten baren Einfluss auf die Liposomen zu haben.

---

## 6 Ergebnisse der Targetierung im ConA-Modell

### 6.1 Statische Bindung an Glasobjektträgern

Die Vermessung der Glasobjektträger zeigte deutliche Fluoreszenz in dem Eintauchbereich, in dem die mit ConA modifizierten Liposomen in Kontakt mit den Platten waren. Jenseits der Eintauchgrenze war keine Fluoreszenz zu beobachten, ebenso nicht bei der Blindprobe.



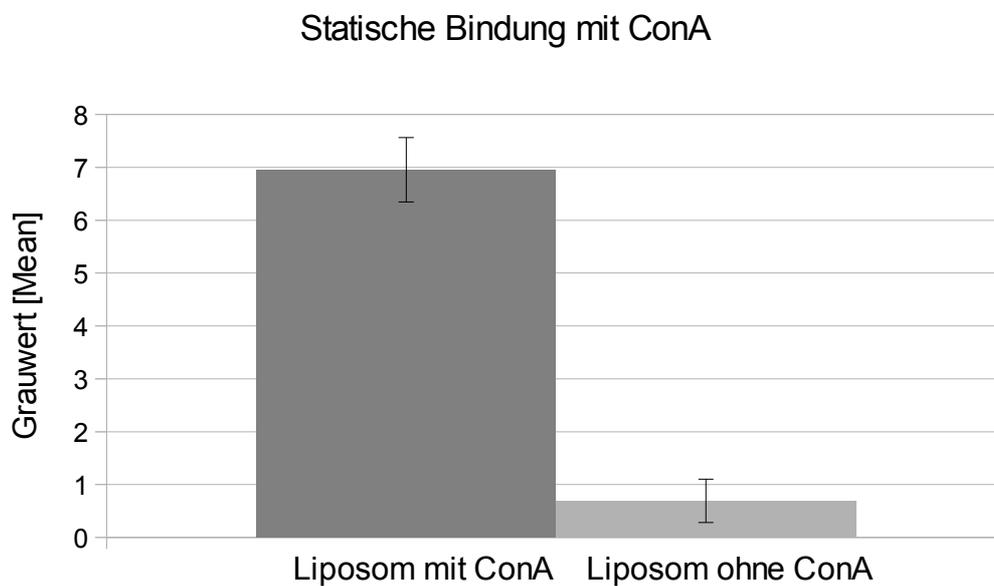
**Abbildung 37:** CLSM-Aufnahmen und schematische Zeichnung der partiell mit Mannan (rot) beschichteten Glasobjektträger nach statischer Bindung von fluoreszierenden Liposomen (grün), an die mittels DPPE-PEG2000-Cyanur als Linkerlipid ConA (blau) gebunden wurde. (A) zeigt den Mannan-beschichteten Bereich mittig. Man sieht deutlich eine grüne Fluoreszenz der Liposomen, die mit ConA an Mannan binden, verteilt über den ganzen Bereich. (B) zeigt den Grenzbereich der Mannan-Beschichtung, die linke, zur Beschichtung gerichtete Seite ist fluoreszierend, mittig durchläuft die Beschichtungsgrenze senkrecht das

---

Bild, rechts nimmt die Fluoreszenz sprunghaft ab. (C) zeigt die Blindprobe, hier ist keine Fluoreszenz bis auf wenige Punkte.

## 6.2 Dynamische Bindung

Die Bindungsversuche im Flussmodell erzeugten im Bereich des beschichteten Schlauches eine signifikante Grauwertzunahme. Bei den Liposomen ohne ConA ergab sich eine Grauwertzunahme um  $0,69 \pm 0,41$ , bei den Liposomen mit ConA betrug sie  $6,96 \pm 0,61$ . Beide Werte sind Blindwert-korrigiert.



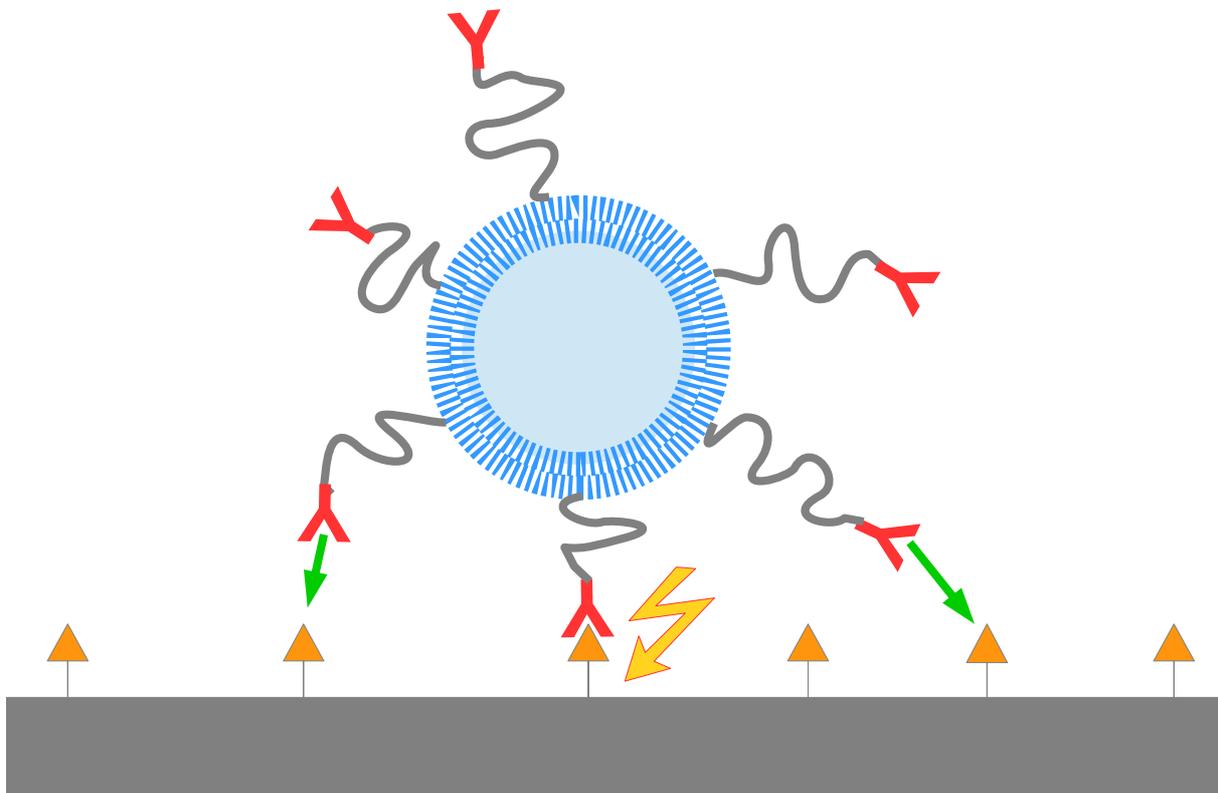
**Abbildung 38:** Grauwertzunahme bei Messung von ConA-modifizierten Liposomen gegenüber Liposomen ohne ConA nach Messung im Durchflussmodell.

---

## 7 Ergebnisse der Targetierung mit Antikörper MAB1031

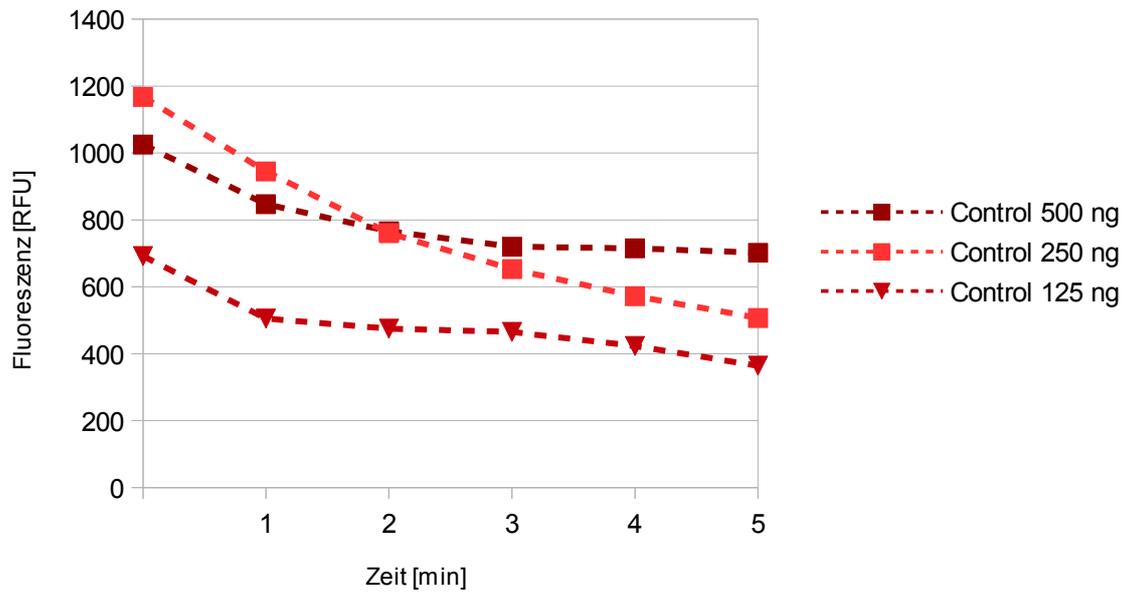
### 7.1 Statische Bindung an rekombinanter Ektodomäne

Die Detektion durch Fluoreszenzmessungen der Mikrotiterplatten nach Inkubation mit fluoreszenten MAB1031-Formulierungen und nachfolgenden Spülschritten zeigten konzentrationsabhängig signifikant erhöhte Signale bei 500 und 250 ng. Bei 125 ng lagen die Signale unter denen der Blindwerte. Die Blindwerte zeigten sich deutlich unter denen der Antikörper-modifizierten Liposomen.



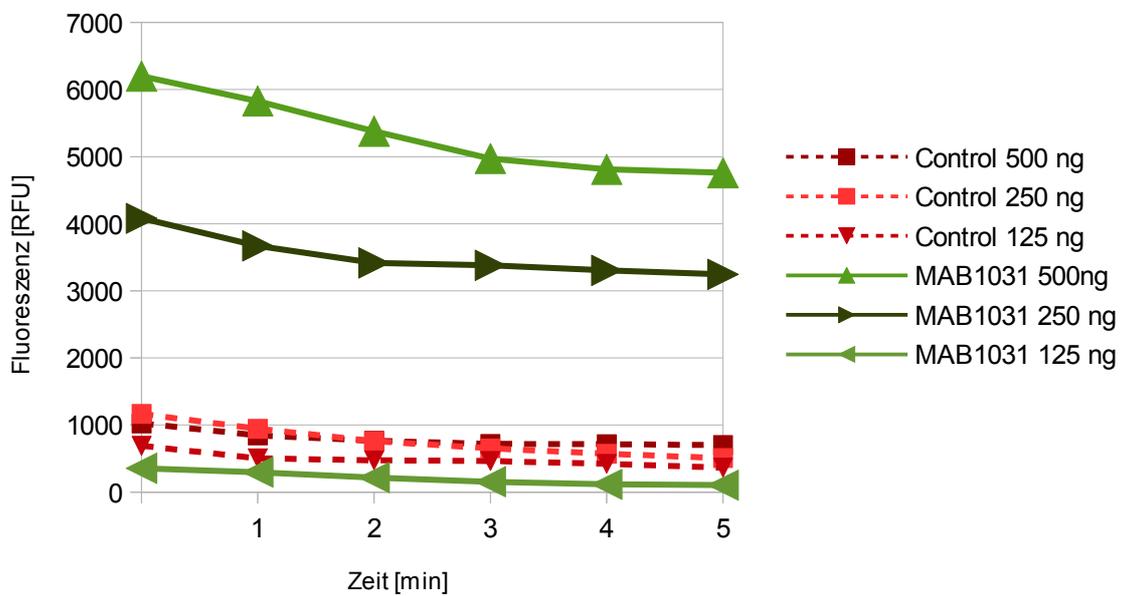
**Abbildung 39:** Schematische Darstellung der Methode. Mit Anti-ADAM8-Antikörper MAB1031(rot) modifizierte, fluoreszierende Liposomen binden an die auf der Oberfläche präsentierte ADAM8-Ektodomäne.

### Statische Bindung Control Fluoreszenz



**Abbildung 40:** Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit der Zeit für die Blindproben (Control) bei der Bindung an die ADAM8-Ektodomäne. Hierbei wurden fluoreszierende Formulierungen ohne gebundenen Antikörper verwendet.

### Statische Bindung MAB1031 + Control Fluoreszenz



**Abbildung 41:** Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit der Zeit für die Liposomen mit Antikörper MAB1031 neben den Blindwerten (Control) bei der Bindung an die ADAM8-Ektodomäne.

---

## 7.2 Statische Bindung an U87-Glioblastomzellen

Die fluorimetrische Auswertung der Platten mit den Zelllinien U87 und U87-A8-kd zeigte eine signifikant erhöhte Fluoreszenz für die mit dem Antikörper MAB1031 modifizierten Proben an ADAM8-überexprimierenden U87-Zellen. Bei den U87-A8-kd Zellen zeigte die gleiche Formulierung keine signifikante Erhöhung, sondern Werte im Bereich der Fluoreszenz der Blank-Werte. Ebenso fielen die Werte für die Formulierungen ohne Antikörper aus, auch an den ADAM8-überexprimierenden U87-Zellen.

**Tabelle 14:** Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der zwei Zelllinien mit unterschiedlicher ADAM8-Expression nach Inkubation mit Liposomen mit und ohne Anti-ADAM8-Antikörper:

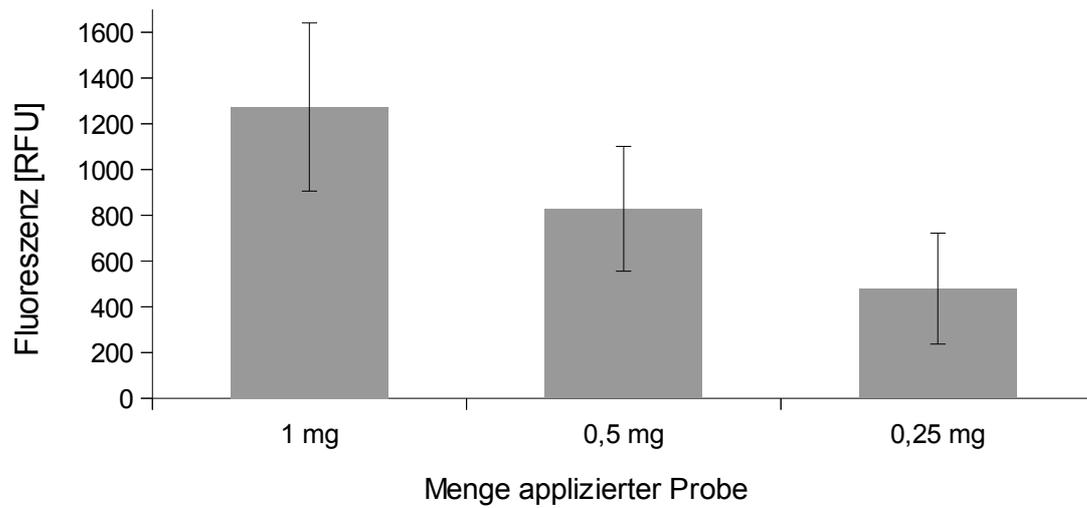
---

<b>Probe:</b>	<b>Applizierte Probenmenge [mg]</b>	<b>Zelllinie</b>	<b>Fluoreszenz [RFU]</b>
Lipo MAB1031	1	U87	1273 ± 367,40
Lipo MAB1031	0,5	U87	828,50 ± 272,48
Lipo MAB1031	0,25	U87	480 ± 242,14
Lipo ohne AK	1	U87	10 ± 9,16
Lipo ohne AK	0,5	U87	-11 ± 11,36
Lipo ohne AK	0,25	U87	2,67 ± 15,50
Lipo MAB1031	1	U87-A8-kd	32,5 ± 15,69
Lipo MAB1031	0,5	U87-A8-kd	47 ± 24,37
Lipo MAB1031	0,25	U87-A8-kd	25,75 ± 48,89
Lipo ohne AK	1	U87-A8-kd	16 ± 20,78
Lipo ohne AK	0,5	U87-A8-kd	-6,33 ± 10,69
Lipo ohne AK	0,25	U87-A8-kd	-10 ± 14,73

---

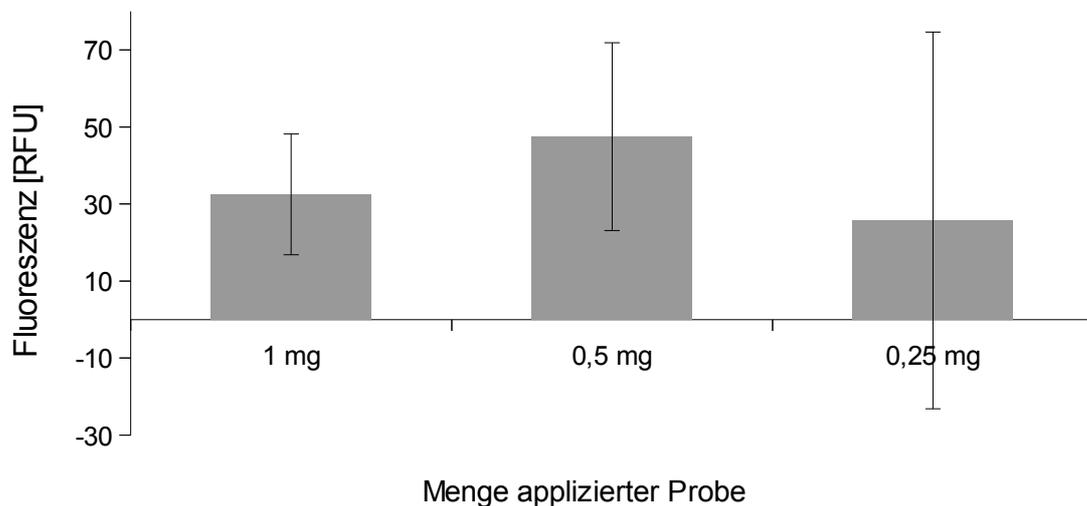
---

### Bindung Lipo-AK an U87-Zellen



**Abbildung 42:** Fluorimetrische Auswertung der Anti-ADAM8-Antikörper-modifizierten Formulierungen an ADAM8-überexprimierenden U87-Glioblastom-Zellen.

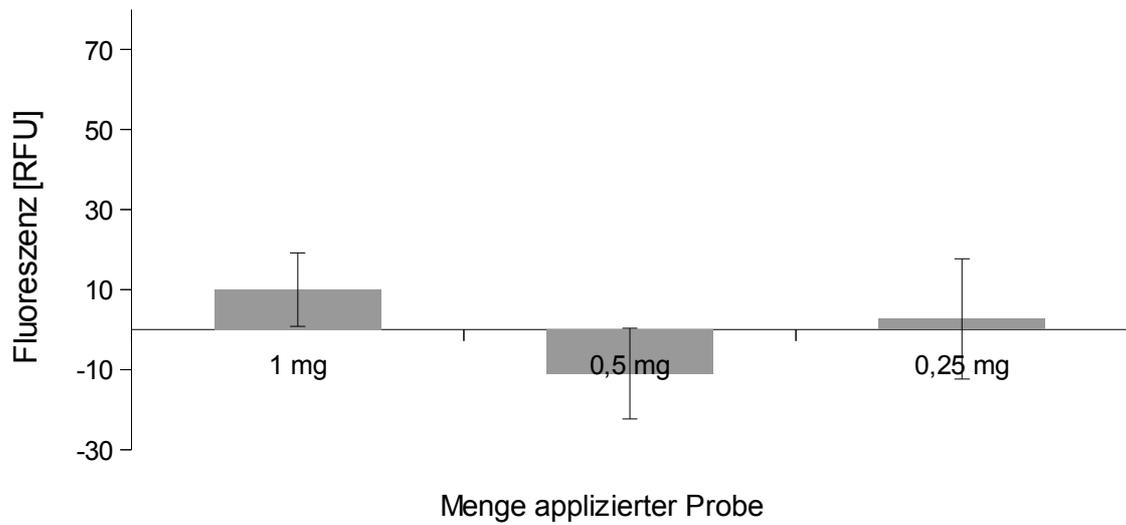
### Bindung Lipo ohne AK an U87-Zellen



**Abbildung 43:** Fluorimetrische Auswertung der Formulierungen ohne Antikörper an ADAM8-überexprimierenden U87-Glioblastom-Zellen.

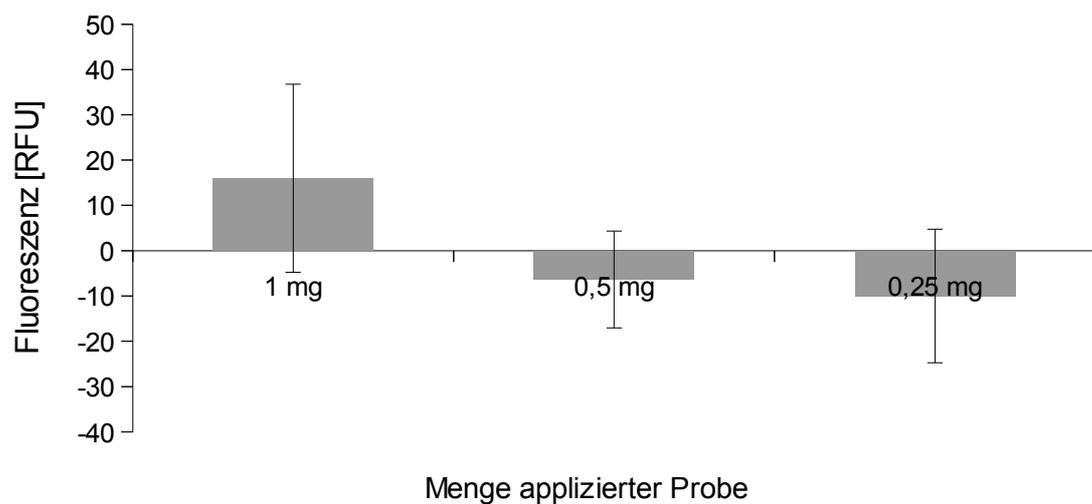
---

### Bindung Lipo-AK an U87-A8-kd-Zellen



**Abbildung 44:** Fluorimetrische Auswertung der Anti-ADAM8-Antikörper-modifizierten Formulierungen an ADAM8-knockdown U87-Glioblastom-Zellen.

### Bindung Lipo ohne AK an U87-A8-kd-Zellen

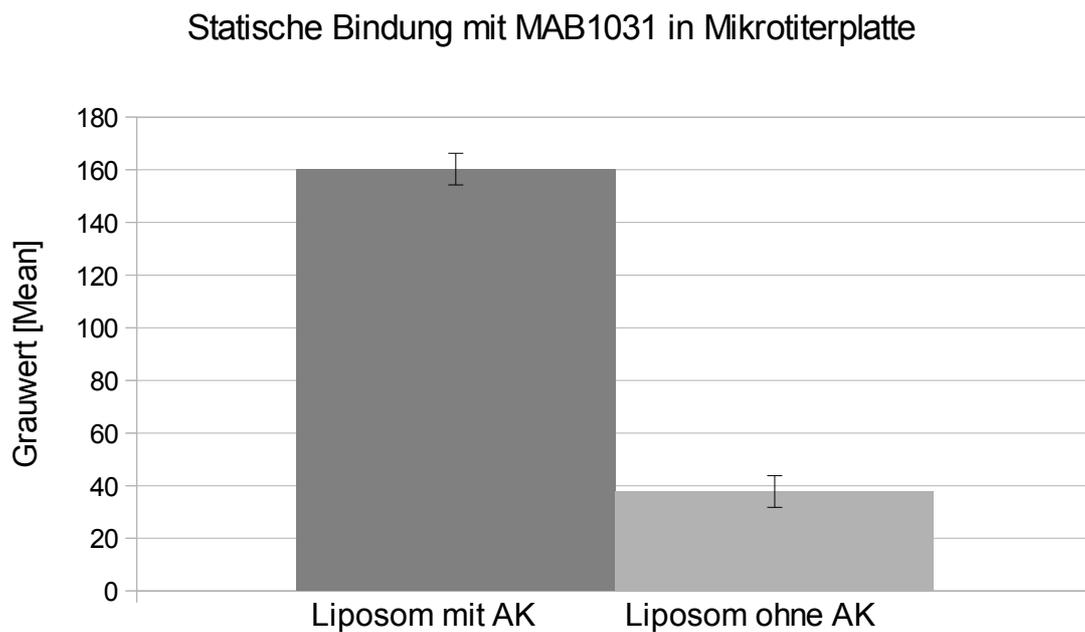


**Abbildung 45:** Fluorimetrische Auswertung der Formulierungen ohne Antikörper an ADAM8-knockdown U87-Glioblastom-Zellen.

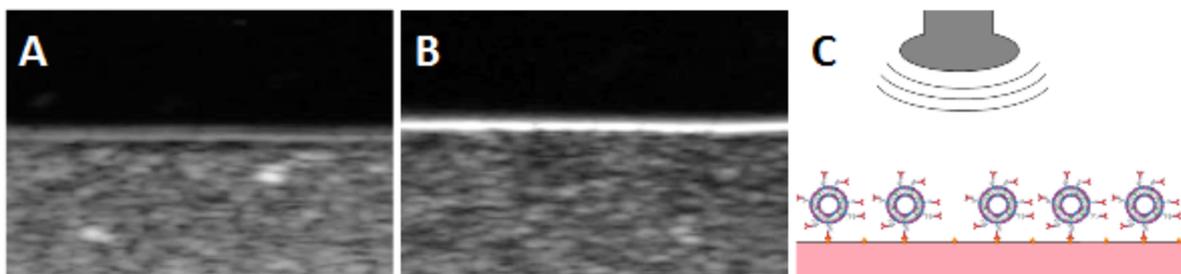
---

### 7.3 Statische Bindung mit Nachweis über Ultraschallkontrast

Bei der statischen Bindung in den Mikrotiterplatten und Ultraschallmessung zeigten die Kavitäten deutliche Grauwertzunahmen an der Oberfläche der Gelphase. Die Zunahme betrug  $37,75 \pm 5,90$  für die Liposomen ohne Antikörper und  $160,25 \pm 6,33$  für die Liposomen, die mit dem Antikörper MAB1031 modifiziert waren. Die Werte wurden Blindwert-korrigiert.



**Abbildung 46:** Grauwerte der Messung von Antikörper MAB1031-modifizierten Liposomen gegen Liposome ohne Antikörper bei statischer Messung in Mikrotiterplatten.



**Abbildung 47:** Ultraschallkontrast-Messung der modifizierten Geloberfläche nach Inkubation, (A): Liposomen ohne Antikörper, (B): Liposomen mit Antikörper MAB1031, (C): Methode, schematisch

---

## 8 Diskussion der Targeting-Versuchsreihen

Jahrzehnte nach der Entdeckung durch Alec Bangham haben sich Liposomen als vielseitige Werkzeuge bewiesen und waren und sind Gegenstand intensiver Forschung. Gregory Gregoriadis begründete schon Anfang der 1970er Jahre das Modell der liposomalen Arzneistoffträger [156, 157]. Die einfache und effiziente Methode, Stoffe in Liposomen einzuschließen, sowie die Modifizierbarkeit von Größe und Oberfläche, macht Liposomen zu idealen Arzneistoffträgern. Schon 1975 zeigten Tierversuche mit liposomalem Cytarabin einen erhöhten chemotherapeutischen Effekt bei Leukämie in Mäusen [158]. Nach weiteren vielversprechenden Tierversuchen mit anderen liposomalen Arzneistoffen und intensiver Forschung an liposomalem Doxorubicin und Amphotericin B, erfolgten erste klinische Studien am Menschen [159, 160]. Besonders bei der Behandlung maligner Tumore ist es erforderlich, den Wirkstoff in ausreichenden Dosen selektiv an den Zielort zu transportieren, um einen Therapieerfolg bei möglichst geringer Belastung des gesunden Gewebes zu gewährleisten. Durch die Modifizierbarkeit der Phospholipide konnten Liposome mit Antikörpern bestückt werden und damit die selektive Zytotoxizität steigern [161]. Seitdem ist das aktive Targeting mit Liganden, die an Liposomen gebunden wurden, ein Bereich vieler Forschungsarbeiten sowohl mit positiven als auch negativen Ergebnissen.

Die Kopplung von Antikörpern an die Liposomen soll möglichst stabil, also über eine kovalente Bindung, erfolgen. Dabei sollte die Kopplung in wenigen Reaktionsschritten und ohne negativen Einfluss auf den Antikörper (etwa Denaturierung) erfolgen. Die Kopplungsreaktion mit Cyanurchlorid erwies sich als solche Methode.

Wir wählten Mannan und ConA als Modellvariante für das Antigen-Antikörper-Kopplungsverhalten von modifizierten Liposomen, wie bereits von Bendas *et al.* [114] beschrieben.

Bei der Targetierung mit Antikörpern werden Zielstrukturen nach ihrer Selektivität oder Überexpression an den Zielzellen des Tumortyps ausgewählt [41]. Nach den erfolgreichen Versuchen mit dem ConA-Modell wählten wir ADAM8 als Zielstruktur und MAB1031 als Antikörper für die Targetierung aus. Hier konnte ebenfalls bei allen Targetierungsversuchen eine Bindung der Lipidvehikel an ADAM8 auf den Zellen bzw. der rekombinanten Ektodomäne nachgewiesen werden.

---

## ***8.1 Diskussion des ConA-Modells***

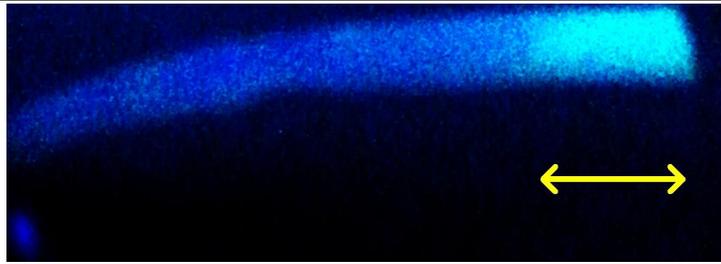
Die ConA-Versuche erwiesen sich als simple und kostengünstigere Modellvariante für Bindungsversuche. Dies erlaubt ein wirtschaftlicheres Arbeiten für Vorversuche mit zahlreichen Versuchsreihen und hohen Mengen von einsetzbarem ConA.

### *8.1.1 Statische und dynamische Bindung*

#### **Objektträger:**

Bei den Objektträgern ließen sich auf den CLSM-Bildern sehr deutlich die hell fluoreszierenden Bereiche von den dunklen abgrenzen. Diese Grenze war identisch mit der Eintauchgrenze, also der Beschichtung mit Mannan. Bei der Blindprobe blieb der Eintauchbereich wie zu erwarten dunkel.

Bei den Beschichtungen mit ConA im Flussmodell erwies sich die Suche nach dem geeigneten Modell als schwierig. So sammelten sich an Knoten der Nylonschnur Luftbläschen, weil in den Knoten bereits Luftreste vorhanden waren und nicht von Wasser verdrängt werden konnten. Dies führte in den Messungen zu starken Echos an den Knoten und machten eine Auswertung unmöglich. Auch musste ein Kompromiss geschlossen werden zwischen einem Objekt, das groß genug ist um auf dem Ultraschallbild gut erkannt zu werden und trotzdem den Schlauchinnenradius nicht zu sehr einnimmt weil dies zu hohen Scherkräften durch den schnelleren Durchfluss führen würde. Eine größerer Durchmesser bietet den Liposomen durch mehr Anker auch eine größere Angriffsfläche, eben zum Nachteil der höheren Scherung. Nach zahlreichen Versuchen erwies sich ein mittels Skalpell geschnittenes, möglichst glattes Stück des C-Flex<sup>®</sup>-Schlauchmaterials als beste Wahl. Die Beschichtung war einfach und lies sich durch ConA-FITC schnell unter der UV-Lampe nachweisen (siehe Abbildung 48). Der beschichtete Teil fluoreszierte deutlich. Ein Stück Schlauch, welches mit denselben Chemikalien, allerdings ohne Mannan behandelt wurde fluoreszierte nicht.



**Abbildung 48:** Schnell-Test auf erfolgreiche Mannan-Beschichtung mit ConA-FITC und UV-Lampe. Der Mannan-beschichtete Teil (gelber Doppelpfeil) des Schlauchstückes fluoresziert nach Inkubation mit ConA-FITC-Lösung deutlich.

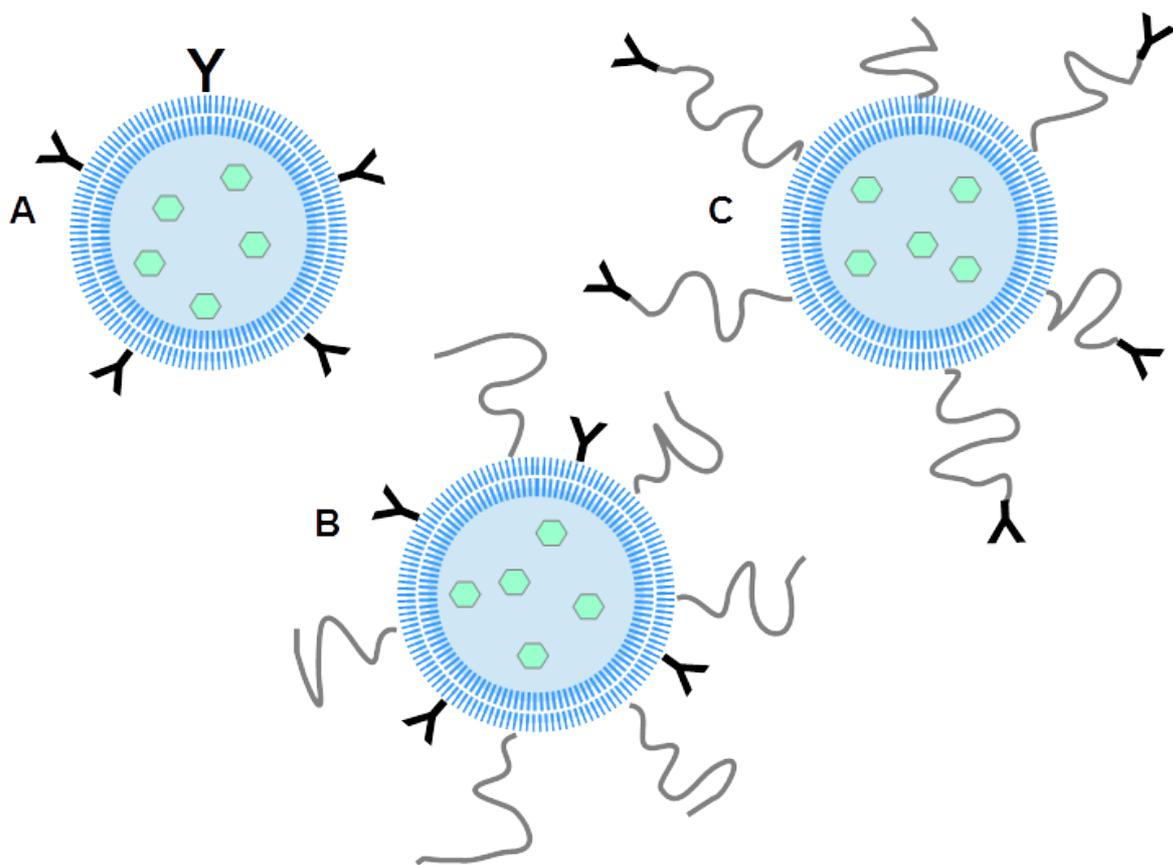
Nach Zugabe der ConA-modifizierten Liposomen konnte eine Grauwertzunahme um  $6,96 \pm 0,61$  in exakt dem Bereich des Schlauchstückes gemessen werden, was für eine Bindung der echogenen Liposomen am Schlauchstück spricht. Die Position des beschichteten Körpers konnte gut anhand der zwei Knoten mit denen er befestigt ist bestimmt werden, diese waren auf dem Ultraschallbild in Bewegung gut sichtbar. An dem Schlauchstück blieben bei der Messung sichtbar keine Luftblasen hängen, diese wurden dennoch ausgeschlossen. Hierbei wurde durch Klopfen gegen den Gelkörper am Ende der Messung auf eventuell anhaftende große Gasbläschen, z.B. durch Luftreste im Schlauchsystem, überprüft. Durch das Klopfen lösen sich die Luftblasen und schwimmen, durch ihr starkes Echosignal gut sichtbar, mit dem Strom aus dem Messbereich heraus. Es kann auch ausgeschlossen werden, dass vorbeigehende Liposomen für das Signal verantwortlich sind, da 10 verschiedene Einzelbilder ausgewertet werden. Die Messung der Liposomen ohne ConA im Durchflussmodell ergaben eine Grauwertzunahme von  $0,69 \pm 0,41$ , dies entspricht fast 10 % der Grauwertzunahme bei den ConA-modifizierten Liposomen. Dies kann an einer generellen leichten Grauerhöhung im System durch winzige Gasbläschen liegen, das System pumpt während den Messungen die Prüfflüssigkeit ist auf  $37\text{ °C}$  erwärmt, wodurch sich Gasbläschen aus der Flüssigkeit lösen könnten die im System zirkulieren. Es wäre auch denkbar, dass Liposomen ohne ConA adhäsiv an der beschichteten Stelle anhaften oder spreiten. Korrigiert man den Grauwert der ConA-modifizierten Liposomen um den Grauwert der Liposomen ohne ConA, so erhält man immer noch eine deutliche Grauwertzunahme, was für die Adhäsion der echogenen Liposomen spricht.

Bei der PEGylierung der Targeting-Liposomen besteht die Möglichkeit, die Liganden über Ankerlipide direkt an die Liposomenhülle binden und daneben PEG-Lipide zu verwenden, oder aber die PEG-Lipide mit einem Anker, in unserem Fall Cyanurchlorid, zu versehen.

---

Dadurch gewinnt man, neben der Möglichkeit der Interaktion mehrerer Liganden durch die flexiblen PEG-Ketten, auch an Abstand zwischen Ligand und Liposomenhülle.

Dies wird im Hinblick auf die Verwendung unserer Liposomen mit negativer Oberflächenladung als Drug Targeting-Vehikel wichtig, da die Zellenoberfläche ebenfalls negativ geladen ist. So überwiegen bei nahem Abstand der Liganden zur Liposomenhülle die abstoßenden elektrostatischen Kräfte die der Ligand-Target-Interaktionen und die Bindung bleibt aus [114]. Die Verwendung von PEG-Ketten als *spacer* überwindet diese Abstoßung durch das Verlegen der Ligand-Target-Interaktionen aus dem Nahbereich der Membran heraus.



**Abbildung 49:** Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von Antikörpern (Y) auf der Liposomen-Hülle. (A) Direkt auf der Oberfläche mittels direkt an Lipide gebundene Anker-moleküle, (B) Direkt auf der Oberfläche bei PEGylierung, hier ist deutlich erkennbar, wieso diese Anordnung sterisch ungünstig für die Annäherung der Antikörper an die Zielstrukturen ist. (C) Antikörper an das distale Ende der PEG-Ketten gebunden, bei Verwendung von PEGylierten Lipiden mit Anker-molekül, z.B. DSPE-PEG-2000-Cyanur.

---

## **8.2 Antikörper MAB1031**

Die Targetierung von Oberflächenstrukturen an Tumoren mit aktiv adressierten Liposomen sind vielversprechende Methoden sowohl für diagnostische als auch therapeutische Strategien. Liposomen sind einfach und kostengünstig herzustellen, aber besonders interessant für Diagnostik und Therapie machen sie die Vielfältigkeit durch die enorme Breite an Modifizierbarkeit. Liposomen können hydrophile und lipophile Wirkstoffe sowie Kontrastmittel einschließen. Sie lassen sich im Hinblick auf Größe, Ladung, Wirkstofffreisetzung, Zirkulationszeit, Stabilität, und Targetierung vielseitig einsetzen.

Das Transmembranprotein ADAM8 erwies sich als überexprimiert bei diversen Tumorzelltypen und trägt zur Metastasierung und somit zum Fortschreiten der Tumorerkrankung bei [101, 100]. Diese Aufgaben und Einflüsse machen ADAM8 zu einem vielversprechenden Ansatz für neuartige Therapiesysteme. ADAM-Sheddase einfach zu inhibieren ist durch die hohe Anzahl an Substraten und die Vielzahl der Aufgaben und Regulationsmechanismen schwierig. So musste eine Studie zur Behandlung rheumatoider Arthritis mit ADAM17-Inhibitoren aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen abgebrochen werden [162]. Daher war unser Ansatz, die ADAM8-überexprimierenden Tumorzellen als Target für modifizierte Liposomen zu nehmen. Die Verwendung dieser zielgerichteten und darüber hinaus echogenen Liposomen würde eine schnelle Diagnostik von Tumorgewebe ermöglichen, etwa um bei der chirurgischen Tumorreduktion noch während der Operation auf Tumorgewebe zu untersuchen. Der andere Ansatz ist die Möglichkeit, die Liposomen mit Arzneistoffen zur Tumorbehandlung zu beladen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, befinden sich zahlreiche liposomale Chemotherapeutika bereits auf dem Markt und werden therapeutisch bei malignen Tumorerkrankungen eingesetzt [46]. Es wurden bereits andere Zielstrukturen auf Tumoren wie der SRIF-Rezeptor oder IGF1-Rezeptor mit Antikörper-modifizierten Liposomen targetiert. So zeigte die Adressierung des IGF1-Rezeptors mit Doxorubicin beladenen, PEGylierten und Anti-IGF-Rezeptor-AK vielversprechende Ergebnisse beim Nebennierenrindenzinom *in vitro* und *in vivo* [90].

Die erfolgreichen Bindungsversuche der Liposomen mit dem ConA-Modellsystem ließen uns auf den Anti-ADAM8-Antikörper MAB1031 als Targeting-Ligand wechseln.

---

### *8.2.1 Statische Bindung an rekombinanter Ektodomäne*

Zum Nachweis der gebundenen Liposomen über Fluoreszenz wurde die Menge an hA8ecto-His pro Kavität variiert, während die Menge der applizierten Liposomen konstant blieb. In den Kavitäten mit 250 und 500ng konnte eine deutlich erhöhte Fluoreszenz gegenüber den Liposomen ohne Antikörpern gemessen werden, für 500 ng das über 6-fache der Fluoreszenz bei der Blindprobe. Die Kavität mit 125 ng zeigte allerdings eine Fluoreszenz unter der bei den Blindproben gemessenen. Die Messungen sollten um mehrere Konzentration erweitert werden und wiederholt werden, um Messfehler bzw. Fehler der Beschichtung/den Spülvorgängen auszuschließen.

### *8.2.2 Statische Bindung an U87-Glioblastom-Zellen*

Bei den Versuchen, die Kontrastmittel direkt an den Zellen zu binden, konnte mit dem Anti-ADAM8-Antikörper MAB1031 eine deutliche Fluoreszenz gemessen werden. Allerdings nur auf den ADAM8-überexprimierenden U87-Zellen. Die Zellen mit ADAM8-knockdown zeigten keine Erhöhung der Fluoreszenz, die über den Bereich der Blank-Werte hinausging. Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurden bei jeder Messung parallel Formulierungen vermessen, die nicht mit einem AK modifiziert waren. Die Werte der entsprechenden Positionen auf der Mikrotiterplatte befanden sich ebenfalls im Bereich der Blank-Werte. Die Dauer der Inkubation wurde bei den Versuchen an Zellen gegenüber den Versuchen an rekombinanter h8ecto-His von 1,5 h auf 0,5 h verkürzt. Die Abweichungen der Werte waren relativ hoch, dies kann an den ohnehin relativ hohen Abweichungen der Blanks liegen, unspezifische Liposomen oder ungleichmäßiges Zellwachstum können weitere Gründe hierfür sein.

Bindungsversuche an Zellen können an adhären Zellen oder Zellen, die in Suspension kultiviert werden unterteilt haben. Die Verwendung adhären Zellen hat bei unseren Versuchen mehrere Vorteile; die Zellen können nach Inkubation mit den Liposomen schnell und einfach gespült werden um ungebundene Liposomen zu entfernen, daneben bilden die adhären Zellen einen dichten Zellrasen, bei dem von einer breiten Präsentation des Antigens ADAM8 auf der Oberfläche des Zellrasens auszugehen ist. Somit ist bietet sich bei gegenüber den Suspensionszellen, bei denen eine Zelle die andere verdecken kann oder die Bindung auf dem der Messung abgewandten Seite stattfand, eine Zellschicht, auf dessen

---

Oberfläche die gebundenen Liposomen direkt der Messung zugewandt sind.

### 8.2.3 Statische Bindung mit Nachweis über Ultraschallkontrast

Die Grauwerte nahmen bei Liposomen, die mit dem Antikörper modifiziert waren deutlich zu. Die Grauwertzunahme beträgt ein vielfaches von den bei den ConA-Versuchen erhaltenen Werte. Da hier eine andere Schallsonde als bei den ConA-Versuchen verwendet wurde und mit anderer Frequenz gearbeitet wurde, sind die Grauwerte nicht mit denen der ConA-Versuchsreihen vergleichbar. Darüber hinaus wird eine wesentlich größere Fläche vermessen was mit einem höheren Grauwert einhergeht. Schwankungen entstanden hier besonders durch das Analyse-Verfahren. Beim Messen der Grauwerte lag das zu bestimmende Quadrat in den Bildern zur Hälfte auf der Agar-Phase, diese unterschied sich in den unterschiedlichen Kavitäten leicht in ihrer Helligkeit und in Art und Ausmaß der Lufteinschlüsse. Die Liposomen ohne Antikörper zeigten auch eine Grauerterhöhung, zwar ist diese wesentlich geringer als die der Antikörper-modifizierten aber beträgt immerhin 23,56 % der Grauerterhöhung der modifizierten Liposomen. Grund dafür können unspezifische Adhäsionen der Liposomen und ihrer Anker an die beschichtete Oberfläche sein.

Die Werte aus den hier vorgestellten Versuchsreihen weisen auf eine Anhaftung der echogenen Liposomen *in vitro* an die Zielstruktur ADAM8 hin. Und dies sowohl bei der Ektodomäne h8ecto-HIS, als auch bei den ADAM8-überexprimierenden U87-Glioblastom-Zellen. Die unspezifische Bindung über nicht-reagierte Anker-moleküle o.ä. konnte durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung von U87-ADAM8-kd-Zelllinien konnte die Targetspezifität der Formulierungen gezeigt werden.

Durch den Austausch des Antikörpers lassen sich die von uns entwickelten ELIPs auf viele andere erdenkliche Zielstrukturen targetieren lassen. In unserer Studie benutzten wir ConA und den Antikörper MAB1031 als Targeting-Liganden und zeigten damit auch die Fähigkeit der Liposomen, durch den simplen Wechsel der Liganden an zwei gänzlich verschiedenen Strukturen zu binden. Die Liposomen sind also nicht auf ADAM8 beschränkt und können auch mit anderen Targetierungs-Liganden genutzt werden. Die von uns verwendete Kopplungstechnik über Cyanurchlorid bzw. DSPE-PEG-2000-Cyanur hat gegenüber einigen anderen gebräuchlichen Techniken den Vorteil, die Lektine und Antikörper vor der Kopplung nicht derivatisieren zu müssen [38]. Durch die Verwendung des Anker-moleküls am distalen Ende der PEG-Kette eines PEG-Lipids, ragen die Antikörper weit und flexibel in den Raum,

---

ohne sterisch in Bindungsprozessen von den PEG-Ketten behindert zu werden [40, 42, 41].

In den letzten Jahren entwickelte sich der Ansatz der „*Theranostics*“, Therapeutikum und Diagnostikum in einem System zusammenzufassen, um simultan mit einem Arzneimittel einen Krankheitsherd zu detektieren und zu therapieren. Dazu muss das Theranostikum ausreichend stabil, detektierbar und selektiv sein, Liposomen sind daher die vielversprechendsten Systeme für klinische Anwendungen [93, 39]. Sie lassen sich gut targetieren und mit Arzneistoffen beladen, die sie auf einen äußeren Reiz hin freigeben können.

Die von uns entwickelten Liposomen wurden in dieser Arbeit auf die Verwendung als Diagnostikum und zukünftig mögliches Theanostic speziell bei Tumorerkrankungen optimiert. Die Größe ist nach den gemittelten, ausgewerteten Cryo-TEM-Aufnahmen  $70,04 \pm 4,72$  bzw.  $72,94 \pm 25,37$  nm (für PEGylierte Liposomen), welche durch PCS (57 - 127 nm) und AFM (gemittelt  $84,84 \pm 18,70$  nm) bestätigt wurden. Die Durchmesser der Formulierungen wurde in dieser Arbeit besonders berücksichtigt. Es zeigte sich, dass die Neovaskulatur bei Tumoren fenestrierte Gefäßwände aufweist, durch die Partikel eines bestimmten Größenbereichs diffundieren können. Dies wurde von Maeda *et al.* „EPR-Effekt“ genannt (siehe Einleitung/ [78, 79]). Nach Untersuchungen von Cabral *et al.* [163] zeigte sich eine Abhängigkeit der Größe vom EPR-Effekt, je nach Tumorart. Es zeigte sich, dass nur Nanopartikel  $< 70$  nm erfolgreich im wenig permeablen Tumorgewebe (z.B. humanes Pankreaskarzinom) akkumulieren, während Größen von 30 - 100 nm sich vergleichbar in hochpermeablen Tumoren wie dem Kolonkarzinom von Mäusen akkumulierten. Durch die inhomogene Größenverteilung unserer Liposomen kann auch bei einer niedrigen Grenze wie 70 nm, wie z.B. beim Pankreaskarzinom bei dem ADAM8 überexprimiert ist {Valkovskaya 2007 #86, davon ausgegangen werden, dass ein ausreichender Anteil Liposomen in das Gewebe diffundiert.

Daneben hat auch die Ladung des Nanopartikels einen Einfluss auf den EPR-Effekt, durch ihren Einfluss auf die systemische Zirkulationszeit des Vehikels. Positive Ladungen wechselwirken zwar weniger mit Plasmabestandteilen wie Proteinen und  $\text{Ca}^{2+}$  [136], aber durch die Gegebenheiten in der Tumorumgebung wurde eine leicht negative Oberflächenladung für Nanopartikel zur Tumor-Targetierung als optimal beschrieben [137, 138, 164]. Die von uns formulierten Liposomen weisen mit um - 30 mV solch eine moderate, negative Ladung auf.

---

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Das ADAM8-Transmembranprotein ist bei verschiedenen Tumorzelltypen hochreguliert, dazu gehören schwer therapierbare Tumorformen, wie TNBC und Pankreastumore. Dadurch bietet sich ADAM8 als Target bei der Diagnose und Therapie von bestimmten Tumorerkrankungen an.

In den letzten Jahren entwickelte sich der Ansatz der „*Theranostics*“, Therapeutikum und Diagnostikum in einem System zusammenzufassen, um simultan mit einem Arzneimittel einen Krankheitsherd zu detektieren und zu therapieren. Dazu muss das Theranostikum ausreichend stabil, detektierbar und selektiv sein, Liposomen sind daher die vielversprechendsten Systeme für klinische Anwendungen [39, 93]. Sie lassen sich gut mit Arzneistoffen beladen und können diese auf einen äußeren Reiz hin freigeben. Die Verwendung von Liposomen als Arzneistoffträger ist bereits gut untersucht und mehrere liposomale Arzneimittel sind zugelassen und werden therapeutisch eingesetzt, viele andere befinden sich in klinischen Phasen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung echogener Liposomen und ihrer Targetierung an Zielstrukturen, hier insbesondere ADAM8. Sowohl mit der Modellsubstanz ConA als Mannan-gerichteter Ligand, als auch mit dem Antikörper MAB 1031 konnte eine Bindung der Liposomen an die Targets erreicht werden. Somit wurde das primäre Ziel dieser Arbeit, die Targetierung von ADAM8 mit echogenen Liposomen, erreicht.

Darüber hinaus wurden die Formulierungen durch Variationen in der Herstellungsmethode und Zusammensetzung der Lipide auf ihren Ultraschallkontrast, ihr Zetapotential und ihre Größe im Hinblick auf Tumor-Targetierung optimiert.

Es zeigte sich in der Morphologie eine Koexistenz von liposomalen und mizellaren Strukturen. Die Durchmesser und das Zetapotential der Partikel entsprechen den an sie gestellten Anforderungen im Hinblick auf ihre Verwendung an Tumorgeweben. Bindungsprozesse wurden mit verschiedenen Methoden und an unterschiedlichen Zielstrukturen durchgeführt.

Zusammenfassend stellen echogene, durch Antikörperkonjugation ADAM8-adressierte, lipidbasierte Formulierungen attraktive Ultraschallkontrastmittel für die onkologische

---

Diagnostik und potentielle Arzneistoffträger und Theranostika dar. Die hier gewonnenen Ergebnisse sollten weiter untersucht werden, beispielsweise die Entmischung der PEG-Lipide. In weiteren, fortführenden Untersuchungen soll die Beladung der Formulierungen mit Arzneistoffen und die gezielte Freisetzung an ADAM8-überexprimierenden Zellen durchgeführt werden, um das Anwendungsspektrum der Kontrastmittel zu erweitern.

---

## 10 Literaturverzeichnis

1. Kollmann C, Bezemer RA, Fredfeldt KE, Schaarschmidt UG, Teirlinck CJ. Ein Testobjekt für die apparative Qualitätssicherung bei Ultraschall-Doppler(Duplex)-Geräten, ausgehend vom Normenentwurf IEC 61685. *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany)* : 1980) 1999; 20: 248–257
2. Lasic DD. *Liposomes*. Amsterdam: Elsevier, 1993
3. lipophilicity. In: Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A (Hrsg.). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009
4. Schmuck C. *Chemie für Mediziner*. München: Pearson Studium, 2008
5. hydrophilicity. In: Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A (Hrsg.). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009
6. Mortimer CE, Müller U, Beck J. *Chemie*. Stuttgart: Thieme, 2015
7. Lauth GJ, Kowalczyk J. *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2016
8. Tscheuschner, H-D (Hrsg.). *Grundzüge der Lebensmitteltechnik*. Hamburg: Behr, 2010
9. Alam MS, Ragupathy R, Mandal AB. Self-Association, Mixed Micellization, and Thermodynamic Studies of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and Hexanediyl-1,6-Bis(Dimethylcetylammonium Bromide) (16-6-16). *Journal of Dispersion Science and Technology* 2016; 37: 1760–1766
10. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* 1964; 8: 660-IN10
11. Deamer DW. From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2010; 24: 1308–1310
12. Düzgüneş N, Gregoriadis G. Introduction: The Origins of Liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Liposomes*: Elsevier, 2005: 1–3
13. Barnes G, Gentle I. *Interfacial science*. Oxford: Oxford University Press, 2011
14. Kumar VV. Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 444–448
15. Lasic DD, Joannic R, Keller BC, Frederik PM, Auvray L. Spontaneous vesiculation. *Advances in colloid and interface science* 2001; 89-90: 337–349

- 
16. Lewis BA, Das Gupta SK, Griffin RG. Solid-state NMR studies of the molecular dynamics and phase behavior of mixed-chain phosphatidylcholines. *Biochemistry* 1984; 23: 1988–1993
  17. Tristram-Nagle S, Nagle JF. Lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 2004; 127: 3–14
  18. Heimburg T. A Model for the Lipid Pretransition. *Biophysical Journal* 2000; 78: 1154–1165
  19. Checchetti A, Chidichimo G, Golemme A, et al. On the stability of the ripple phase in the DPPC/PLPC/water ternary system. *Chemistry and Physics of Lipids* 1997; 90: 109–115
  20. Winterhalter M, Lasic DD. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chemistry and Physics of Lipids* 1993; 64: 35–43
  21. Halstenberg S, Heimburg T, Hianik T, Kaatz U, Krivanek R. Cholesterol-Induced Variations in the Volume and Enthalpy Fluctuations of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 1998; 75: 264–271
  22. Briuglia M-L, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug delivery and translational research* 2015; 5: 231–242
  23. Yotsuyanagi T, Hashimoto H, Iwata M, Ikeda K. Effect of cholesterol on liposome stability to ultrasonic disintegration and sodium cholate solubilization. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 1987; 35: 1228–1233
  24. Dufourc EJ. Sterols and membrane dynamics. *Journal of chemical biology* 2008; 1: 63–77
  25. Demel RA, Kruyff B de. The function of sterols in membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1976; 457: 109–132
  26. Virden JW, Berg JC. Sodium chloride-induced aggregation of dipalmitoylphosphatidylglycerol small unilamellar vesicles with varying amounts of incorporated cholesterol. *Langmuir* 1992; 8: 1532–1537
  27. Liang X, Mao G, Ng KYS. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of colloid and interface science* 2004; 278: 53–62
  28. McMullen TP, Lewis RN, McElhaney RN. Differential Scanning Calorimetric and Fourier Transform Infrared Spectroscopic Studies of the Effects of Cholesterol on the Thermotropic Phase Behavior and Organization of a Homologous Series of Linear Saturated Phosphatidylserine Bilayer Membranes. *Biophysical Journal* 2000; 79: 2056–2065
  29. Lee S-C, Lee K-E, Kim J-J, Lim S-H. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on

---

the stabilization of incorporated Retinol. *Journal of liposome research* 2005; 15: 157–166

30. Haines TH. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Progress in lipid research* 2001; 40: 299–324
31. Mortensen K, Pfeiffer W, Sackmann E, Knoll W. Structural properties of a phosphatidylcholine-cholesterol system as studied by small-angle neutron scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1988; 945: 221–245
32. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 1991; 1066: 29–36
33. Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, et al. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Bioscience reports* 2002; 22: 225–250
34. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS letters* 1990; 268: 235–237
35. Needham D, McIntosh TJ, Lasic DD. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1992; 1108: 40–48
36. Blume G, Cevc G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 1993; 1146: 157–168
37. Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, et al. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochimica et biophysica acta* 1994; 1195: 11–20
38. Bendas G, Krause A, Bakowsky U, Vogel J, Rothe U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *International journal of pharmaceutics* 1999; 181: 79–93
39. Xing H, Hwang K, Lu Y. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. *Theranostics* 2016; 6: 1336–1352
40. Blume G, Cevc G, Crommelin MD, Bakker-Woudenberg IA, Kluft C, Storm G. 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. *Biochimica et biophysica acta* 1993; 1149: 180–184
41. Kirpotin D, Park JW, Hong K, et al. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 1997; 36: 66–75
42. Hansen CB, Kao GY, Moase EH, Zalipsky S, Allen TM. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling

---

procedures. *Biochimica et biophysica acta* 1995; 1239: 133–144

43. Perche F, Torchilin VP. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *Journal of drug delivery* 2013; 2013: 705265
44. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 11307–11311
45. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84: 7413–7417
46. Elbayoumi TA, Torchilin VP. Current trends in liposome research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2010; 605: 1–27
47. Swarbrick, J (Hrsg.). *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York, NY: Dekker, 2001
48. Huang S-L, Hamilton AJ, Pozharski E, et al. Physical correlates of the ultrasonic reflectivity of lipid dispersions suitable as diagnostic contrast agents. *Ultrasound in medicine & biology* 2002; 28: 339–348
49. Huang S-L, MacDonald RC. Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release. *Biochimica et biophysica acta* 2004; 1665: 134–141
50. Zabel H. *Kurzlehrbuch Physik*. Stuttgart: Thieme, 2011
51. Hering E, Schönfelder G. *Sensoren in Wissenschaft und Technik*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 2012
52. Delorme S, Debus J. *Ultraschalldiagnostik*. Stuttgart: Hippokrates-Verl., 1998
53. Schäberle W. *Ultraschall in der Gefäßdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015
54. Kollmann C, Putzer M. *Ultraschallkontrastmittel -- physikalische Grundlagen*. *Der Radiologe* 2005; 45: 503–512
55. Chudleigh T. *Ultraschalldiagnostik in der Geburtshilfe*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences Germany, 2011
56. Sohn, C, Holzgreve, W (Hrsg.). *Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2013
57. Fercher AF. *Medizinische Physik*. Vienna, s.l.: Springer Vienna, 1992
58. van Aken HK, Wulf H, Niesel HC. *Lokalanästhesie, Regionalanästhesie, Regionale Schmerztherapie*. s.l.: Georg Thieme Verlag KG, 2010

- 
59. Sasko P. Kompensation der Polarisationsladung in der Bariumtitanatkeramik. Aachen, 1980
  60. Tipler, PA, Gerlich, D (Hrsg.). Physik. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl., 2004
  61. Weiser H-F, Birth M. Viszeralchirurgische Sonographie. Berlin, Heidelberg: Springer, 2000
  62. Burns PN, Wilson SR, Simpson DH. Pulse inversion imaging of liver blood flow: improved method for characterizing focal masses with microbubble contrast. *Investigative radiology* 2000; 35: 58–71
  63. Wong GL-H, Xu H-X, Xie X-Y. Detection of focal liver lesions in cirrhotic liver using contrast-enhanced ultrasound. *World journal of radiology* 2009; 1: 25–36
  64. Albrecht T, Blomley MJ. Characteristics of hepatic hemangiomas at contrast-enhanced harmonic US. *Radiology* 2001; 220: 269–270
  65. Correas J-M, Claudon M, Tranquart F, Helenon AO. The kidney: imaging with microbubble contrast agents. *Ultrasound quarterly* 2006; 22: 53–66
  66. Piscaglia F, Nolsoe C, Dietrich CF, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 2012; 33: 33–59
  67. Goldberg BB, Liu JB, Forsberg F. Ultrasound contrast agents: a review. *Ultrasound in medicine & biology* 1994; 20: 319–333
  68. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International journal of dermatology* 2010; 49: 978–986
  69. McColl N, Auvinen A, Kesminiene A, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Ionising and non-ionising radiation and cancer. *Cancer epidemiology* 2015; 39 Suppl 1: S93-100
  70. Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature reviews. Cancer* 2016; 16: 35–42
  71. Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut), 2016
  72. Becker N, Seidel D, Stegmaier C, Ziegler H. Entwicklung von Inzidenz (1970–2003) und Mortalität (1952–2003) an Krebs in Deutschland. *Onkologe* 2008; 14: 276–290
  73. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, et al. Krebs in Deutschland 2009/2010 - 9. Ausgabe, 2013: Robert Koch-Institut, 2013-12-16
  74. Kimura T. East meets West: ethnic differences in prostate cancer epidemiology between

75. Kheirandish P, Chingwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *British journal of cancer* 2011; 105: 481–485
76. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015; 65: 87–108
77. Kanavos P. The rising burden of cancer in the developing world. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2006; 17 Suppl 8: viii15-viii23
78. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in enzyme regulation* 2001; 41: 189–207
79. Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2001; 74: 47–61
80. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* 1986; 46: 6387–6392
81. Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer research* 1994; 54: 3352–3356
82. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)* 2004; 303: 1818–1822
83. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews* 2014; 66: 2–25
84. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (London, England)* 2013; 8: 1509–1528
85. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced drug delivery reviews* 2008; 60: 1615–1626
86. Egusquiaguirre SP, Igartua M, Hernandez RM, Pedraz JL. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2012; 14: 83–93
87. Heynick F. The original 'magic bullet' is 100 years old - extra. *The British journal of*

88. Lehtinen J, Raki M, Bergstrom KA, et al. Pre-targeting and direct immunotargeting of liposomal drug carriers to ovarian carcinoma. *PloS one* 2012; 7: e41410
89. Kim SK, Huang L. Nanoparticle delivery of a peptide targeting EGFR signaling. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012; 157: 279–286
90. Hantel C, Lewrick F, Reincke M, Suss R, Beuschlein F. Liposomal doxorubicin-based treatment in a preclinical model of adrenocortical carcinoma. *The Journal of endocrinology* 2012; 213: 155–161
91. Wong A. Modified epidermal growth factor receptor (EGFR)-bearing liposomes (MRBLs) are sensitive to EGF in solution. *PloS one* 2009; 4: e7391
92. Mamot C, Drummond DC, Noble CO, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer research* 2005; 65: 11631–11638
93. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery* 2005; 4: 145–160
94. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends in genetics : TIG* 2000; 16: 83–87
95. Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, et al. ADAM family proteins in the immune system. *Immunology today* 1999; 20: 278–284
96. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development* 2003; 17: 7–30
97. Schlomann U, Rathke-Hartlieb S, Yamamoto S, Jockusch H, Bartsch JW. Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000; 20: 7964–7971
98. Valkovskaya N, Kayed H, Felix K, et al. ADAM8 expression is associated with increased invasiveness and reduced patient survival in pancreatic cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007; 11: 1162–1174
99. Schlomann U, Koller G, Conrad C, et al. ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nature communications* 2015; 6: 6175
100. Wildeboer D, Naus S, Amy Sang Q-X, Bartsch JW, Pagenstecher A. Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2006; 65: 516–527

- 
101. Romagnoli M, Mineva ND, Polmear M, et al. ADAM8 expression in invasive breast cancer promotes tumor dissemination and metastasis. *EMBO molecular medicine* 2014; 6: 278–294
  102. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine* 2010; 363: 1938–1948
  103. Lumachi F, Luisetto G, Basso SMM, Basso U, Brunello A, Camozzi V. Endocrine therapy of breast cancer. *Current medicinal chemistry* 2011; 18: 513–522
  104. Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, et al. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10: 8363–8370
  105. Fritzsche FR, Jung M, Xu C, et al. ADAM8 expression in prostate cancer is associated with parameters of unfavorable prognosis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2006; 449: 628–636
  106. Zielinski V, Brunner M, Heiduschka G, et al. ADAM8 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a retrospective study. *BMC cancer* 2012; 12: 76
  107. Goldstein IJ, Hayes CE. *The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of Plants and Animals. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Volume 35*: Elsevier, 1978: 127–340
  108. Lord JM, Roberts LM. Ricin: structure, synthesis, and mode of action. In: Schmitt MJ, Schaffrath R (Hrsg.). *Microbial Protein Toxins*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005: 215–233
  109. Harmony JA, Cordes EH. Interaction of human plasma low density lipoprotein with concanavalin A and with ricin. *The Journal of biological chemistry* 1975; 250: 8614–8617
  110. Ladeveze S, Tarquis L, Cecchini DA, et al. Role of glycoside phosphorylases in mannose foraging by human gut bacteria. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288: 32370–32383
  111. Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1998; 1383: 9–36
  112. Min W, Dunn AJ, Jones DH. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. *The EMBO journal* 1992; 11: 1303–1307
  113. Sumner JB, Gralen N, Eriksson-Quensel IB. The molecular weights of urease, concanavalin, concanavalin A and concanavalin B. *Science (New York, N.Y.)* 1938; 87: 395–396
  114. Bendas G, Vogel J, Bakowski U, Krause A, Müller J, Rothe U. A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1997; 1325: 297–308

- 
115. Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, et al. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. *Biochimica et biophysica acta* 2001; 1511: 397–411
  116. Bakowsky H, Richter T, Kneuer C, et al. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochimica et biophysica acta* 2008; 1778: 242–249
  117. Biswas S, Dodwadkar NS, Sawant RR, Torchilin VP. Development of the novel PEG-PE-based polymer for the reversible attachment of specific ligands to liposomes: synthesis and in vitro characterization. *Bioconjugate chemistry* 2011; 22: 2005–2013
  118. Tscharnuter W. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 2000: pp. 5469 – 5485
  119. Washington C. Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries. New York: Horwood, 1992
  120. Egelhaaf SU, Wehrli E, Müller M, Adrian M, Schurtenberger P. Determination of the size distribution of lecithin liposomes. *Journal of Microscopy* 1996; 184: 214–228
  121. Sitterberg J, Ozcetin A, Ehrhardt C, Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2010; 74: 2–13
  122. Marxer EEJ, Brussler J, Becker A, et al. Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2011; 77: 430–437
  123. Kuhlbrandt W. Cryo-EM enters a new era. *eLife* 2014; 3: e03678
  124. Greis C. Technology overview: SonoVue (Bracco, Milan). *European radiology* 2004; 14 Suppl 8: P11-5
  125. Schneider M. Characteristics of SonoVue™. *Echocardiography* 1999; 16: 743–746
  126. Hartmann M, Nikitin P, Keusgen M. Innovative analytical system for screening on lectins. *Biosensors & bioelectronics* 2006; 22: 28–34
  127. Brussler J, Marxer E, Becker A, et al. Correlation of structure and echogenicity of nanoscaled ultrasound contrast agents in vitro. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2014; 117: 206–215
  128. Garbuzenko O, Barenholz Y, Prieve A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids* 2005; 135:

- 
129. Hashizaki K, Taguchi H, Itoh C, et al. Effects of poly(ethylene glycol) (PEG) chain length of PEG-lipid on the permeability of liposomal bilayer membranes. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 2003; 51: 815–820
  130. Ickenstein LM, Arfvidsson MC, Needham D, Mayer LD, Edwards K. Disc formation in cholesterol-free liposomes during phase transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003; 1614: 135–138
  131. Unezaki S, Maruyama K, Takahashi N, et al. Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethylene glycol in combination with local hyperthermia. *Pharmaceutical research* 1994; 11: 1180–1185
  132. Johnsson M, Edwards K. Liposomes, Disks, and Spherical Micelles. *Biophysical Journal* 2003; 85: 3839–3847
  133. Carrión FJ, La Maza A de, Parra JL. The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. *Journal of colloid and interface science* 1994; 164: 78–87
  134. Atkins PW, Paula J de. *Physikalische Chemie*. Place of publication not identified: Wiley-VCH, 2014
  135. Honary S. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems -A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013; April 2013: 265–273
  136. Juliano RL, Stamp D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochemical and biophysical research communications* 1975; 63: 651–658
  137. Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K. Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2001; 77: 27–38
  138. Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 6949–6953
  139. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical pharmacology* 2003; 66: 1207–1218
  140. Chen B, Dai W, He B, et al. Current Multistage Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment. *Theranostics* 2017; 7: 538–558

- 
141. Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Investigative radiology* 1968; 3: 356–366
  142. Kremkau FW, Gramiak R, Carstensen EL, Shah PM, Kramer DH. Ultrasonic detection of cavitation at catheter tips. *American Journal of Roentgenology* 1970; 110: 177–183
  143. Feinstein SB, Cheirif J, Cate FJ ten, et al. Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *Journal of the American College of Cardiology* 1990; 16: 316–324
  144. Seitz K, Strobel D. Ein Meilenstein: Zulassung von CEUS zur Leberdiagnostik an Erwachsenen und Kindern in den USA. *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 2016; 37: 229–232
  145. Alkan-Onyuksel H, Demos SM, Lanza GM, et al. Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent. *Journal of pharmaceutical sciences* 1996; 85: 486–490
  146. Huang S-L. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2008; 60: 1167–1176
  147. Pantazatos DP, Macdonald RC. Directly observed membrane fusion between oppositely charged phospholipid bilayers. *The Journal of membrane biology* 1999; 170: 27–38
  148. Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 2009; 162: 1–16
  149. Tiukinhoy-Laing SD, Huang S, Klegerman M, Holland CK, McPherson DD. Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes. *Thrombosis research* 2007; 119: 777–784
  150. Huang SL, Hamilton AJ, Nagaraj A, et al. Improving ultrasound reflectivity and stability of echogenic liposomal dispersions for use as targeted ultrasound contrast agents. *Journal of pharmaceutical sciences* 2001; 90: 1917–1926
  151. Georghiou S, Mukhopadhyay AK. Phase transitions and cholesterol effects in phospholipid liposomes A new method employing the enhancement of the O-O vibronic transition of pyrene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1981; 645: 365–368
  152. Jong N de, Cornet R, Lancée CT. Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres. Part one. *Ultrasonics* 1994; 32: 447–453
  153. Ishida T, Harada M, Wang XY, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2005; 105: 305–317

- 
154. Gref, Luck, Quellec, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2000; 18: 301–313
  155. Schmidt T. *Handbuch diagnostische Radiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003
  156. Gregoriadis G, Ryman BE. Liposomes as carriers of enzymes or drugs. *Biochem. J.* 1971; 124: 58P-58P
  157. Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS letters* 1973; 36: 292–296
  158. Kobayashi T, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect of cytosine arabinoside entrapped in liposomes on mouse leukemia L-1210. *Gan* 1975; 66: 719–720
  159. Gabizon A, Peretz T, Sulkes A, et al. Systemic administration of doxorubicin-containing liposomes in cancer patients: a phase I study. *European journal of cancer & clinical oncology* 1989; 25: 1795–1803
  160. Lopez-Berestein G, Fainstein V, Hopfer R, et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *The Journal of infectious diseases* 1985; 151: 704–710
  161. Heath TD, Montgomery JA, Piper JR, Papahadjopoulos D. Antibody-targeted liposomes: increase in specific toxicity of methotrexate-gamma-aspartate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80: 1377–1381
  162. Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, et al. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clinical proteomics* 2011; 8: 9
  163. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature nanotechnology* 2011; 6: 815–823
  164. Xiao K, Li Y, Luo J, et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 3435–3446

---

# 11 Anhang

## 11.1 *Abkürzungsverzeichnis*

°C	Grad Celsius
A-Mode	Amplitudenmodus
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AFM	Atomic-force microscopy/Rasterkraftmikroskopie
B-Mode	brightness modulation/Grauwertsonographie
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CH	Cholesterol
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
ConA	Concanavalin A
Cryo-TEM	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
DPPE-MPEG2000	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglycol)-2000]
DPPE-PEG2000-Cyanur	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Cyanur-(Polyethylenglycol)2000]
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn- Glycero-3-Phosphoglycerol
DSPE-MPEG5000	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglycol)-5000]
EGF	Epidermal Growth Factor/epidermaler Wachstumsfaktor
ELIP	Echogenic liposomes/Echogene Liposomen
engl.	englisch

---

EPR	Enhanced Permeability and Retention
et al.	und andere
et al.	et alii = und andere/Koautoren
f	Frequenz
FITC	Fluoresceinthiocyanat
GHz	Gigahertz
GUV	Giant unilamellar vesicles
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HER2	Humaner epidermale Wachstumsfaktorrezeptor
HPV	Humane Papillom Viren
Hz	Hertz
I	Schallintensität
i.A.	im Allgemeinen
i.d.R.	in der Regel
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
km	Kilometer
l	Liter
LUV	Large unilamellar vesicles
M	Molare Masse
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute

---

mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)chlorid
mol%	Molares Verhältnis in Prozent
mV	Millivolt
MV	multilamellar vesicles
n.b.	nicht bekannt
nm	Nanometer
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol (Macrogol)
PEG4000	Polyethylenglykol der mittleren Molekülmasse 4000
pH	pH-Wert (potentia Hydrogenii)
p <sub>n</sub>	Druck unter Normalbedingungen
RES	Retikuloendotheliales Systems
ROI	region of interest/Messbereich, -feld
RT	Raumtemperatur 20 °C/293 K
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
SERM	selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren
StdAbw.	Standardabweichung
SUV	Small unilamellar vesicles
T <sub>n</sub>	Temperatur unter Normalbedingungen
U87	U-87 MG humane primäre Glioblastomzellen
U87-A8-kd	U87-Zellen mit ADAM8-knockdown
TNBC	Triple-negative breast cancer

---

UV	unilamellar vesicles
UV-C	Ultraviolette Strahlung C-Bereich
Z	Impedanz eines Mediums
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{s}$	Mikrosekunden

---

## **11.2 Lebenslauf**

*Dieses Kapitel ist nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.*

---

### **11.3 Danksagung**

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky, der mir erst als Dozent und Prüfer im Studium, dann als Doktorvater und Vorgesetzter stets Vertrauen, Geduld, Unterstützung, und Diskussionsbereitschaft entgegengebracht hat. Ich möchte ihm auch danken für die interessante Themenstellung, den Freiraum bei der Durchführung und die gute Zeit neben der Forschung.

Ich danke Frau Prof. Dr. Maike Petersen für die Leitung der Prüfungskommission bei der Dissertation und nicht zuletzt für die lehrreiche Zeit und ihr stets offenes Ohr während des Studiums.

Ich danke Frau Prof. Petersen und Herrn Prof. Dr. Cornelius Krasel für die Begutachtung der Dissertation als Nebenfachprüfer.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Jörg-Walter Bartsch und Dr. Uwe Schlomann vom Universitätsklinikum Marburg bedanken, für die gute Zusammenarbeit, die Hilfestellungen, die fachlichen Gespräche und guten Ideen sowie für die Bereitstellung der Zelllinien. Herrn Prof. Dr. Bartsch danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau Dr. Jana Brüßler und Frau Dr. Elena Marxer für die Betreuung, die vielen Ratschläge, die fachbezogenen Diskussionen, die Einführung in die Herstellung und Messung der ELIPs und die guten Gespräche, auch abseits des Labors.

Bei Frau Sabine Barnert und Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert möchte ich mich für die Aufnahme der Cryo-TEM Bilder bedanken.

Herrn Boris Strehlow danke ich für die Unterstützung bei den CLSM Bildern, Herrn Dr. Eyas Dayyoub danke ich für die Hilfe bei den AFM-Aufnahmen.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen und Ehemaligen, Michael Agel, Mohamad Alawak, Walaa & Elias Baghdan, Jürgen Bürding, Dr. Eyas Dayyoub, Henriette Dietrich, Lili Duse, Jana Fuß, Konrad Engelhardt, Nathalie Goergen, Sascha Hubing, Dr. Jarmila Jedelská, Susanne Lüttebrand, Dr. Gihan Mahmoud, Julia Michaelis, Eva Mohr, Shashank Pinnapireddy, Nikola Plenagl, Dr. Jens Schäfer, Christian Stähler, Benjamin Seitz, Hendrik Vögeling (& Cerberus) und Matthias Wojcik des Arbeitskreises Bakowsky sowie Frau Prof. Dr. Cornelia Keck und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe und den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Marc Schneider, für die Hilfe, Anregungen, Gespräche und nicht

---

zuletzt das gute Arbeitsklima und die erlebte Zeit zusammen.

Ich danke meiner Familie und Freundin für die Unterstützung, Liebe, Geduld und den Halt, besonders meinem während der Promotionszeit verstorbenem Vater, der mich bis zuletzt sehr unterstützt und gut beraten hat.

---

## **11.4 Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

### **Entwicklung und Charakterisierung echogener Liposomen zur Targetierung von ADAM8**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 18.04.2017

Eric Sasko