
Synthese und Charakterisierung von anti-EpCAM Antikörper-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sunhild Christine Salmen

aus Rotenburg (Wümme)

Hamburg

2017

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg in dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Horst Weller sowie am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie in der Gruppe Lipidstoffwechsel von Herrn Prof. Dr. Jörg Heeren und in der Interdisziplinären Klinischen Gruppe Eisenstoffwechsel von Herrn PD Dr. Dr. Peter Nielsen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

2. Gutachter: Prof. Dr. Alf Mews

Tag der Disputation: 04.08.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung.....	4
2 Theoretische Grundlagen	5
2.1 Eisenoxid-Nanopartikel für die molekulare MRT-Bildgebung zur Tumordiagnostik.....	6
2.1.1 Bluthalbwertszeit und Bioverteilung in Abhängigkeit verschiedener Eigenschaften der Nanopartikel.....	7
2.1.1.1 Polyethylenglykol als proteinresistente Oberflächenbeschichtung.....	11
2.1.2 Passive Anreicherung lang-zirkulierender Nanopartikel im Tumorgewebe.....	14
2.1.3 Aktive Anreicherung lang-zirkulierender Nanopartikel im Tumorgewebe.....	22
2.1.3.1 Das tumorassoziierte epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM.....	28
3 Ergebnisse und Diskussion	31
3.1 Synthese und hydrophile Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel.....	32
3.1.1 Hochtemperatursynthese und Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel.....	34
3.1.2 Hydrophile Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel.....	41
3.1.2.1 Synthese und Charakterisierung der phosphorylierten Polyethylenglykol-Liganden.....	45
3.1.2.2 Ligandenaustausch an Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln sowie vergleichende Untersuchung der Nanopartikel vor und nach Oberflächenmodifikation.....	55
3.1.3 Charakterisierung Polyethylenglykol-stabiler Eisenoxid-Nanopartikel.....	71
3.1.3.1 Untersuchungen zur Kontrastgebung.....	72
3.1.3.2 Untersuchungen zur Toxizität.....	80
3.1.3.3 Stabilitätsuntersuchungen an den PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln.....	87
3.1.3.4 Verfolgung der Blutzirkulation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mittels dynamischer MRT-Messung im Tiermodell.....	95
3.2 Oberflächenfunktionalisierung der PEGylierten Nanopartikel mit einem monoklonalen anti-EpCAM Antikörper.....	99
3.2.1 Bromcyan-vermittelte Kopplung von MOC31 an die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel.....	101
3.2.2 <i>In vitro</i> Untersuchung der Bindungsfähigkeit der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an EpCAM.....	104
3.2.2.1 <i>In vitro</i> Untersuchung der Bindungsfähigkeit der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an EpCAM mittels MRT.....	108
3.2.2.2 <i>In vitro</i> Untersuchung der Bindungsfähigkeit der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an EpCAM mittels AAS.....	113

3.2.3	Radiomarkierung des monoklonalen anti-EpCAM Antikörpers MOC31 mit ¹²⁵ Iod.....	121
3.2.3.1	Ermittlung der Effizienz der kovalenten Kopplung von ¹²⁵ Iod-markiertem MOC31 an die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel.....	124
3.2.3.2	<i>In vitro</i> Untersuchung der biologischen Aktivität Nanopartikel-konjugierter, ¹²⁵ Iod-markierter MOC31-Antikörper.....	128
4	Zusammenfassung	137
5	Abstract	140
6	Experimenteller Teil	143
6.1	Chemikalien.....	143
6.2	Durchgeführte Synthesen.....	143
6.2.1	Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel.....	143
6.2.2	Synthese heterobifunktionaler Polyethylenglykol-Liganden.....	144
6.2.2.1	Veresterung von Polyethylenglykol-Monoacrylat mit Phosphoroxchlorid.....	144
6.2.2.2	Umsetzung des Acrylat-Terminus des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Polymers in einer Michael-Typ-Addition.....	145
6.2.3	Ligandenaustausch mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol.....	145
6.2.4	Biokonjugation.....	146
6.2.4.1	Aktivierung der Eisenoxid-Nanopartikel und anschließende kovalente Kopplung von MOC31.....	146
6.2.4.2	Iodierung von MOC31.....	148
6.3	Charakterisierungsmethoden.....	149
6.3.1	Charakterisierungsmethoden zur Untersuchung der Ölsäure - und Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel, sowie der Polyethylenglykol-Liganden.....	149
6.3.1.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	149
6.3.1.2	Pulver-Röntgendiffraktometrie.....	149
6.3.1.3	Kernresonanz-Spektroskopie.....	150
6.3.1.4	Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI.....	151
6.3.1.5	Infrarot-Spektroskopie.....	151
6.3.1.6	Dynamische Lichtstreuung.....	151
6.3.1.7	Bestimmung der Eisenkonzentration in Partikelsuspensionen.....	152
6.3.1.8	Kernresonanz-Relaxometrie.....	153
6.3.1.9	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	154
6.3.1.10	Größenausschlusschromatographie.....	155
6.3.1.11	<i>In vivo</i> Magnetresonanztomographie.....	155
6.3.2	<i>In vitro</i> Bioanalytik der Konjugate.....	156
6.3.2.1	<i>In vitro</i> Magnetresonanztomographie.....	159
6.3.2.2	Atomabsorptionsspektroskopie.....	159
6.3.2.3	Messung der Radioaktivität.....	160
6.3.3	Statistik.....	160
7	Literaturverzeichnis	161

8	Anhang	175
8.1	Sicherheit.....	175
8.1.1	Verwendete Chemikalien.....	175
8.1.2	GHS-Kennzeichnung (Gefahrenpiktogramme, Sicherheits- und Gefahrenhinweise).....	177
8.2	Lebenslauf.....	185
8.3	Publikationen.....	186
8.4	Danksagung.....	188
8.5	Eidesstattliche Versicherung.....	190

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Unterdrückung der Adsorption von Oponinen auf der Nanopartikeloberfläche durch PEGylierung.....	13
Abbildung 2.2: Multiphotonenmikroskopische Aufnahme von Gefäßen in normalem, nicht-entartetem Gewebe sowie von Tumorgefäßen.	17
Abbildung 2.3: Passive Anreicherungsstrategie lang-zirkulierender Nanopartikel in Tumorgewebe..	20
Abbildung 2.4: Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf der Oberfläche von Nanopartikeln.....	24
Abbildung 3.1: Multifunktionale Eisenoxid-Nanopartikel für die molekulare Bildgebung mittels MRT.	32
Abbildung 3.2: Modell von LaMer und Dinegar zur Beschreibung von Keimbildung und Wachstum.	34
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung Ölsäure-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel.	36
Abbildung 3.4: TEM-Analyse Ölsäure-stabilsierter, monodisperser Eisenoxid-Nanopartikel.	38
Abbildung 3.5: Röntgendiffraktogramm Ölsäure-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel.....	40
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel..	44
Abbildung 3.7: Reaktionsschema zur Synthese heterobifunktionaler Polyethylenglykol-Liganden....	46
Abbildung 3.8: ³¹ P-NMR- Analyse des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers.....	47
Abbildung 3.9: ¹ H-NMR-Spektren des Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers vor und nach erfolgter Phosphorylierung.	48
Abbildung 3.10: ¹ H-NMR-Spektren des Polyethylenglykol-Polymers vor und nach erfolgter Michael-Typ-Additionsreaktion an der Acrylat-Funktion.	50
Abbildung 3.11: IR-spektroskopische Analyse von PEG-Acrylat, Phosphat-PEG-Acrylat und Phosphat-PEG.....	52
Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Ligandenaustausches zur hydrophilen Oberflächenmodifizierung Ölsäure-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel mit Polyethylenglykol-Liganden.....	56
Abbildung 3.13: TEM-Analytik sowie DLS-Profil von Eisenoxid-Nanopartikeln vor und nach erfolgtem Ligandenaustausch mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol.....	57
Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der mushroom- und der brush-Konformation.	59
Abbildung 3.15: Charakterisierung mehrerer Chargen Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel mittels DLS.	61
Abbildung 3.16: IR-Spektren von Ölsäure sowie von Ölsäure-stabilsierten Eisenoxid-Nanopartikeln.	63
Abbildung 3.17: IR-Spektren von Ölsäure, Ölsäure-stabilsierten sowie Polyethylenglykol-stabilsierten Eisenoxid-Nanopartikeln.	66
Abbildung 3.18: IR-Spektren von Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol sowie von den Polyethylenglykol-stabilsierten Eisenoxid-Nanopartikeln.	67
Abbildung 3.19: IR-Spektren von kristallinem und amorphem Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol sowie von den Polyethylenglykol-stabilsierten Eisenoxid-Nanopartikeln.....	69
Abbildung 3.20 Schematische Darstellung des Prinzips der Signalerzeugung in der MRT.....	73
Abbildung 3.21 Analytik der Kontrastgebung Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel.	77
Abbildung 3.22: Mikroskopische Aufnahmen von A549-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit Polyethylenglykol-stabilsierten Eisenoxid-Nanopartikeln sowie mit Cadmiumchlorid.....	85

Abbildung 3.23: Quantifizierung der Toxizitätsprüfung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel.	86
Abbildung 3.24: DLS-Analytik zur Untersuchung der kolloidalen Stabilität Polyethylenglykol-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel in hoher Verdünnung.	89
Abbildung 3.25: DLS-Analytik zur Untersuchung der Stabilität Polyethylenglykol-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart hoher Salzkonzentration.	92
Abbildung 3.26: Analytik der Stabilität Polyethylenglykol-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart von Proteinen aus dem Blutserum.	94
Abbildung 3.27: T ₂ *-gewichtete MRT-Aufnahmen der Leber sowie der Vena cava inferior zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Applikation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel sowie Resovist® in transversaler Schichtführung.	97
Abbildung 3.28: MRT-Signalintensität im Blut und in der Leber nach i.v. Applikation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel sowie des klinischen Standards Resovist® als Funktion der Zeit.	99
Abbildung 3.29: Schematische Darstellung der Bromcyan-vermittelten Kopplungsreaktion zwischen der Hydroxyl-terminierten Polymerhülle auf der Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel und der Aminofunktion eines Antikörpers.	102
Abbildung 3.30: Schematische Darstellung möglicher Antikörper-Nanopartikel-Konjugate sowie deren Bindungsfähigkeit an EpCAM.	106
Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Bindung der Antikörper-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an HT29-Zellen mit und ohne Blockierung der spezifischen Bindungsstellen.	107
Abbildung 3.32: Analyse der Bindung von nicht-konjugierten sowie von MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln an HT29-Zellen mittels MRT.	109
Abbildung 3.33: MRT-Analyse der Bindung von Antikörper-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln an HT29-Zellen.	111
Abbildung 3.34: AAS-Untersuchungen von HT29-Zellen vor und nach Inkubation mit nicht-konjugierten sowie mit MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln.	114
Abbildung 3.35: AAS-Analytik der zellulären Bindung von Eisenoxid-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichem Aktivierungsreagenzüberschuss an MOC31 gekoppelt wurden.	117
Abbildung 3.36: AAS-Analytik der zellulären Bindung von Eisenoxid-Nanopartikeln nach Kopplung an MOC31 bei einem 2,5*10 ⁶ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss und einem variierenden Antikörperüberschuss.	119
Abbildung 3.37: AAS-Analytik der Bindung von nicht-konjugierten sowie von MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln an HT29- sowie HT29EpCAMkd-Zellen.	120
Abbildung 3.38: Schematische Darstellung der Radiomarkierung eines IgG-Moleküls mit ¹²⁵ Iod.	123
Abbildung 3.39: Ermittelte Radioaktivität im Verlauf der Aufreinigung von Eisenoxid-Nanopartikel Suspensionen nach Konjugation ¹²⁵ I-markierter Antikörper.	124
Abbildung 3.40: Schematische Darstellung möglicher Produkte bei Umsetzung terminaler Hydroxylgruppen mit Bromcyan als Aktivierungsreagenz.	128
Abbildung 3.41: Schematische Darstellung der spezifisch an die Oberfläche EpCAM-positiver Zellen gebundenen Biokonjugate als Funktion der eingesetzten Menge an Eisenoxid-Nanopartikeln.	129
Abbildung 3.42: Analytik der biologischen Aktivität ¹²⁵ I-markierter Antikörper nach Anbindung an Eisenoxid-Nanopartikel.	131
Abbildung 3.43: Vergleich verschiedener analytischer Methoden zur Bestimmung der spezifischen Bindungsfähigkeit von Eisenoxid-Nanopartikeln nach Kopplung an MOC31.	134

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
a. u.	willkürliche Einheit, <i>arbitrary unit</i>
asym.	asymmetrisch
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Bluthirnschranke, <i>blood-brain barrier</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bzw.	beziehungsweise
CAN	Centrum für Angewandte Nanotechnologie
CAM	Zelladhäsionsmolekül, <i>cell adhesion molecule</i>
cpm	Impulse pro Minute, <i>counts per minute</i>
d_{hyd}	hydrodynamischer Durchmesser
D-PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}), <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DLS	dynamische Lichtstreuung, <i>dynamic light scattering</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGP-2	epitheliale Glykoprotein-2, <i>epithelial glycoprotein-2</i>
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
EpCAM	epitheliale Zelladhäsionsmolekül, <i>epithelial cell adhesion molecule</i>
EPR	verstärkte Permeabilität und Retention, <i>enhanced permeability and retention</i>
ESA	epitheliale Oberflächenantigen, <i>epithelial surface antigen</i>
<i>et al.</i>	und andere, <i>et alia</i>
Fc	kristallisierbare Fragment, <i>crystallisable fragment</i>
FCS	Fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FDA	Nahrungs- und Arzneimittelzulassung, <i>Food and Drug Administration</i>
GHS	Global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (<i>Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals</i>)
h	Stunde

His	Histidin
IFP	interstitiellen Flüssigkeitsdruck, <i>interstitial fluid pressure</i>
Ig	Immunglobulin
IR	Infrarot (FTIR: Fourier-Transform-IR-Spektroskopie)
i.v.	intravenös
JCPDS	<i>Joint Comitee on Powder-Diffraction-Standards</i>
M	Magnetisierung
M_s	Sättigungsmagnetisierung
M_{xy}	transversale Magnetisierung
M_z	longitudinale Magnetisierung
M_0	Gleichgewichtsmagnetisierung
MALDI	Matrix unterstützte Laser-Desorption und Ionisierung, <i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPEG	Polyethylenglykol-Monomethylether
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
M_w	Molekulargewicht, <i>molecular weight</i>
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze, <i>molecular weight cut-off</i>
NK	Negativkontrolle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NMR	Kernmagnetische Resonanz, <i>nuclear magnetic resonance</i>
PBS	Phosphatgepuffert Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEGylierung	Funktionalisierung mit PEG-Liganden
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
ppm	Millionstel, <i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
r_1	longitudinale Relaxivität
R_1	longitudinale Relaxationsrate
r_2	transversale Relaxivität
R_2	transversale Relaxationsrate

RES	retikuloendotheliales System
RGD	Einbuchstabencode für die Aminosäuresequenz aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure, kurz: Arg-Gly-Asp
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies, <i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt, <i>sever combined immunodeficiency</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie, <i>size exclusion chromatography</i>
s.e.m.	Standardfehler, <i>standard error of the mean</i>
s.d.	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SPION/SPIO	superparamagnetisches Eisenoxid-Nanopartikel, <i>superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i> (USPIO: <i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>)
sym.	symmetrisch
T_E	Echozeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
T_2^*	Effektive transversale Relaxationszeit
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie, <i>transmission electron microscopy</i>
Tfr	Transferrinrezeptor
TGF	Transformierende Wachstumsfaktor, <i>transforming growth factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
T_I	Verzögerungszeit
T_R	Repetitionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs, <i>Union internationale contre le cancer</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, <i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
XRD	Pulver-Röntgendiffraktometrie, <i>powder X-ray diffraction</i>

z.B.	zum Beispiel
δ	chemische Verschiebung
ω_0	Lamorfrequenz
v/v	Volumen pro Volumen, <i>volume per volume</i>
w/v	Masse pro Volumen, <i>weight per volume</i>

1 Einleitung

Krebserkrankungen gehören zu den tödlichsten Krankheiten weltweit; nach den Herz- und Kreislauferkrankungen stellen sie die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar.^[1-3] Die Diagnostik spielt als Grundlage einer erfolgreichen Prävention und effizienten Behandlung von Krebserkrankungen eine Schlüsselrolle. Die Prognose bei Erkrankung ist mit dem Stadium des Tumors bei der Erstdiagnose verknüpft. Häufig werden Krebserkrankungen erst spät diagnostiziert und damit spät therapiert; zu einem Zeitpunkt an dem Krebszellen schon in andere Gewebe eingedrungen sind und dort Metastasen gebildet haben.^[4] Zum Zeitpunkt der klinischen Vorstellung haben mehr als 60% der Patienten mit Lungen-, Brust-, Kolon-, Prostata- und Ovarialkrebs bereits versteckte oder offene Metastasen; in diesem Stadium sind therapeutische Ansätze in ihrer Effektivität limitiert.^[4] Eine Detektion im Frühstadium der Erkrankung erlaubt hingegen eine frühzeitige Auswahl geeigneter Behandlungsvarianten verbunden mit erhöhten Erfolgsaussichten.^[4-8]

Eines der leistungsstärksten Werkzeuge, welches heutzutage klinische Anwendung in der medizinischen Diagnostik findet ist die Magnetresonanztomographie (MRT), welche eine nicht-invasive anatomische Bildgebung mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung erlaubt.^[4,6,7,9-12] Dieses Verfahren basiert auf Messung der Protonenrelaxation in einem starken statischen, externen Magnetfeld nach Anregung durch einen Radiofrequenzpuls.^[12] Die MRT-Aufnahmen reflektieren die Unterschiede in der Protonendichte sowie in den longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten (T_1 und T_2 (T_2^*)) der betrachteten Gewebe, da die Signalintensität als Funktion dieser intrinsischen Parameter variiert.^[6,12-14] Der Einfluss der verschiedenen gewebsspezifischen Parameter und damit der Kontrast zwischen verschiedenen Gewebearten kann durch unterschiedliche Bildgebungssequenzen und Variationen der Sequenzparameter eingestellt werden.^[15,16] Häufig zeigen gesunde und pathologische Gewebe jedoch nur geringe Unterschiede in der Protonendichte sowie der Relaxationszeiten.^[6] Damit sind diagnostische Aussagen auf Grund der erhaltenen Bilder auch bei Wahl optimierter Bildgebungssequenzen häufig nicht eindeutig. Der Bildkontrast und damit die diagnostische Differenzierung kann durch die Gabe von Kontrastmitteln erhöht werden; diese finden bei etwa 30% aller klinischen Magnetresonanztomographien Einsatz.^[7] Kontrastmittel beeinflussen durch Veränderung des lokalen

Magnetfeldes die Relaxationsmechanismen umgebender Protonen.^[12] Die Veränderungen werden durch ihre inhärenten magnetischen Eigenschaften bedingt. Sogenannte positive Kontrastmittel verkürzen die intrinsischen longitudinalen Relaxationszeiten und verursachen eine Zunahme der Signalintensität, während negative Kontrastmittel den transversalen Relaxationsprozess beschleunigen und eine Signalabnahme zur Folge haben.^[6,9,12] Dies äußert sich in einem dunkleren Bild.

Als negative Kontrastmittel finden seit den späten 1980er Eisenoxid-Nanopartikel Anwendung in der medizinischen Bildgebung.^[9,12,13,17,18] Nanopartikel sind Intermediate zwischen dem atomaren bzw. molekularen Bereich und dem makroskopischen Festkörper.^[19] Partikel im Nanometermaßstab (1-100 nm) zeichnen sich durch einzigartige physikalische und chemische Eigenschaften aus, die in ausgedehnten Festkörperstrukturen nicht beobachtet werden und welche anders als die spezifischen intrinsischen Materialeigenschaften der Festkörper eine Größenabhängigkeit zeigen.^[6,19,20] Eine solche Eigenschaft ist der Superparamagnetismus, der auftritt, wenn die thermische Energie eine freie Ausrichtung des magnetischen Gesamtmoments ermöglichen kann.^[5,6,21] Superparamagnetische Partikel weisen in Abwesenheit eines externen Magnetfeldes keine permanente Magnetisierung auf; demzufolge aggregieren sie auch nicht aufgrund magnetischer Interaktionen.^[6,18,19] In Anwesenheit eines externen Feldes zeigen sie jedoch ein großes magnetisches Moment, welches mikroskopische Feldinhomogenitäten erzeugen kann.^[6,9] Eisenoxid ist ein sehr gut untersuchtes Material für biomedizinische Anwendungen und alle vermarkteten nanopartikulären Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie basieren auf superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln.^[18,22] Diese kombinieren die Vorteile ihres einzigartigen magnetischen Verhaltens mit hoher Biokompatibilität bedingt durch Biodegradierbarkeit und Verwertung des freigesetzten Eisens analog zum endogenen Eisen im physiologischen Eisenstoffwechsel.^[8,15,18,21,23,24] Die auf Eisenoxid-Nanopartikel basierenden Kontrastmittel in klinischer Anwendung bestehen aus polydispersen aggregierten Eisenoxid-Kernen beschichtet mit Dextran oder Carboxydextran.^[9,12,18] Ihre Anwendung basiert auf ihrer schnellen Aufnahme durch phagozytierende Zellen des Mononukleären Phagozyten Systems (MPS); hauptsächlich der Leber und Milz.^[9,12,18] Die Darstellung von Makrophagen ist daher die erste und immer noch wichtigste Anwendung dieser Kontrastmittel, vor allem für die Visualisierung von entartetem Lebergewebe.^[24] Im Gegensatz zum gesunden Leberparenchym liegt in läsierten Regionen wie primären Lebertumoren oder Leber-Metastasen ein Mangel an ortsansässigen spezialisierten

Makrophagen, den sogenannten Kupffer-Zellen, vor.^[9,12,18,24] Diese Gewebeabnormalität bedingt eine reduzierte Aufnahme des Kontrastmittels und damit eine starke Kontrastierung zwischen gesundem und pathologischem Gewebe.

Um eine Darstellung maligner Tumore, die nicht in der Leber oder Milz lokalisiert sind, zu erreichen, muss zunächst das Design lang-zirkulierender Nanopartikel erfolgen, die aufgrund ihrer Größe sowie Oberflächeneigenschaften einer sofortigen unspezifischen Phagozytose entgehen. Eine Verringerung der Größe sowie eine dichte Beschichtung mit neutralen hydrophilen Polymeren, wie Polyethylenglykol (PEG), führen dabei zu einer reduzierten unspezifischen Proteinadsorption aus dem Blutplasma.^[5,9,12,19,25–28] Spezielle Plasmaproteine, die sogenannten Oponine, fördern die Erkennung körperfremder Materialien durch die Phagozyten des MPS.^[6,12,26,28] Die Beeinflussung der Verteilung der Nanopartikel im Organismus über ihre Größe sowie Beschichtung wird als passive Strategie bezeichnet. Die passive Aufnahme lang-zirkulierender Partikel in Tumorgewebe wird in der Literatur auf Besonderheiten des Gefäßsystems des Tumors zurückgeführt.^[4,5,7,12,27,29–31]

Um Krebszellen mit hoher Spezifität und Affinität zu markieren und damit pathologische Gewebsveränderungen in nicht-invasiver Weise in frühen Entwicklungsstadien präzise zu detektieren, müssen aktive Markierungsstrategien eingesetzt werden. Das Design von zielgerichteten Kontrastmitteln zur Früherkennung molekularer Abnormalitäten beinhaltet das Anbringen ausgewählter bioaktiver Erkennungsmoleküle, wie zum Beispiel Antikörper, Proteine, Zucker oder kleine organische Moleküle, an die Oberfläche lang-zirkulierender Nanopartikel; durch die Biomoleküle können auf der Oberfläche von Krebszellen hoch exprimierte Rezeptoren gezielt angesteuert und spezifisch mit hoher Affinität gebunden werden.^[4,6,8,9,12,19,21,32–34] Ein von verschiedenen klinischen Tumorentitäten stark überexprimiertes Oberflächenprotein ist das tumorassoziierte Antigen EpCAM (epitheliale Zelladhensionsmolekül, *epithelial cell adhesion molecule*). Dieses transmembrane 38kDa-Glykoprotein wird in variablem, aber geringem Level in gesundem Epithelgewebe exprimiert, während unter anderem für Brust-, Pankreas-, Kolon-, Prostata- und Lungenkrebs eine hochregulierte Expression bestätigt wurde.^[35–43]

Die molekulare Bildgebung, welche eine frühzeitige Erkennung molekularer Abnormalitäten auf Basis spezifischer Erkennungsprozesse ermöglichen kann, verbunden mit der Möglichkeit einer biochemischen Charakterisierung der Tumore, bildet die Grundlage für die Entwicklung einer

zielgerichteten, personalisierten Therapie und gehört damit zu den wichtigsten aktuellen Ansätzen zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen.^[4,8,44]

1.1 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung lang-zirkulierender Eisenoxid-Nanopartikel, die nach Modifizierung ihrer Oberfläche mit dem monoklonalen anti-EpCAM Antikörper MOC31 eine spezifische Antikörper-vermittelte Bindung an EpCAM hoch exprimierende Zelllinien zeigen.

Um gezielten Zugang zu gröÙeneinheitlichen Nanopartikeln mit genau einstellbaren, anwendungsbezogenen Eigenschaften zu erhalten, sollten diese in organometallischen Hochtemperatursynthesen hergestellt werden. Die aufgrund der Synthesebedingungen hydrophobe Oberfläche der Nanopartikel sollte anschließend mit maßgeschneiderten Polyethylenglykol-Liganden modifiziert werden, um Nanopartikel mit hoher kolloidaler Stabilität unter physiologischen Bedingungen, sowie einer reduzierten unspezifischen Proteinadsorption und damit einer langen Bluthalbwertszeit zu erhalten. Die Polymerhülle sollte weiterhin eine terminale funktionelle Gruppe aufweisen, die die kovalente Anbindung von zielführenden Biomolekülen ermöglicht. Im Rahmen der Aktivierungsreagenz-vermittelten Kopplung des Antikörpers an die PEGylierten Nanopartikel sollte in *in vitro* Zellexperimenten untersucht werden, ob nach Konjugation des Antikörpers eine spezifische Bindung der Nanopartikel an EpCAM realisiert werden kann. Weiterhin sollte der Einfluss verschiedener Syntheseparameter auf die Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel gehören zu den am intensivsten untersuchten Nanomaterialien.^[21] Das große Interesse ist begründet in ihren attraktiven Eigenschaften für Anwendungen im Bereich der Materialwissenschaften und in der medizinischen Diagnostik sowie der Therapie.^[6,8,9,19,20,23] Zu den Merkmalen, welche nanopartikuläres Eisenoxid attraktiv für biomedizinische Anwendungen machen, gehören vor allem die besonderen magnetischen Eigenschaften und die hohe Biokompatibilität. Daneben weisen Nanopartikel, deren Größe vergleichbar ist mit der vieler biologischer Funktionseinheiten, wie zum Beispiel Proteine (5-50 nm)^[6], einen hohen Oberflächenanteil auf. Durch die große spezifische Oberfläche kann eine hohe lokale Dichte therapeutischer Einheiten als auch von ausgewählten zielführenden Biomolekülen erreicht werden. Diese multifunktionalen Nanopartikel bieten die Möglichkeit für eine vielseitige biomedizinische Anwendung.^[7,9,12,21] Biokonjugierte Eisenoxid-Nanopartikel können eine spezifische *in vitro* Detektion veränderter Zielzellen mit hoher Sensitivität in der Labor-Diagnostik ermöglichen.^[6,7] Ein besonders wichtiges Einsatzfeld dieser Konjugate wäre die nicht-invasive bildgebende magnetresonanztomographische *in vivo* Diagnostik: Durch die selektive Anlieferung und spezifische Anbindung an Zielstrukturen auf der Oberfläche maligner Zellen könnten diagnostische Befunde mit hoher Auflösung in einem frühen Entwicklungsstadium der Erkrankungen erhalten werden. In der klinischen Anwendung sind diese spezifischen, zielgerichteten Kontrastmittel für die molekulare Bildgebung jedoch noch nicht angekommen.

Im therapeutischen Bereich können superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel selbst direkt als Thermotherapeutikum in der magnetischen Wärmebehandlung von soliden Tumoren eingesetzt werden. Die magnetisch induzierte Hyperthermie ist ein Therapieverfahren bei dem die - durch das Anlegen eines alternierenden Feldes - durch superparamagnetische Nanopartikel erzeugte Wärme genutzt wird, um selektiv die Geweberegion aufzuheizen in der sich die Nanopartikel befinden.^[6,8,19,20,23,45] Ein Anstieg der Temperatur im Tumorgewebe auf 40-42 °C kann die malignen Zellen für eine begleitende Chemo- oder Strahlentherapie sensibilisieren oder sogar Apoptose des Tumorgewebes auslösen.^[6,19,20] In klinischer Anwendung befindet sich ein Verfahren, das von dem Berliner Unternehmen MagForce für die Glioblastoma-Behandlung entwickelt wurde. Das Glioblastoma ist der häufigste Hirntumor bei Erwachsenen.^[46] Bislang wird das Verfahren, bei dem Aminosilan-beschichtete 15 nm große Eisenoxid-Nanopartikel direkt in

solide Gehirntumore injiziert werden und dort für die Thermotherapie des Tumors verwendet werden können, in Kombination mit konventionellen Therapiekonzepten eingesetzt.^[22,23] Für eine auf systemische Injektion beruhende gezielte Behandlung verborgener, und damit nicht durch eine direkte intratumorale Applikation zugänglicher Tumore, müssten die Nanopartikel wiederum mit zielgerichteten Biomolekülen konjugiert werden. Daneben könnte die Oberfläche solcher Biokonjugate weiterhin mit therapeutischen Einheiten modifiziert werden. Der Vorteil des Einsatzes bioaktiver und damit ortsspezifischer nanopartikulärer Wirkstofftransporter gegenüber klassischer therapeutischer Moleküle liegt in der erreichbaren hohen lokalen Konzentration verbunden mit der hohen Spezifität und der daraus resultierenden signifikant verringerten systemischen Toxizität.^[4,5,27,31,33] Eine Kombination aus Hyperthermie und gezieltem Wirkstofftransport könnte daneben eine elektromagnetisch gesteuerte Wirkstofffreisetzung ermöglichen.^[23,47] Zum Beispiel durch Verwendung thermosensitiver Linker, über welche die nanopartikuläre Plattform mit dem therapeutischen Agens verbunden ist.^[48]

Der besondere Vorteil superparamagnetische Nanopartikel liegt weiterhin in der Möglichkeit der Kombination von Diagnostik und Therapie.^[6,12,19,20] Solche sogenannten theranostischen Nanoagenzien könnten die Darstellung und Verfolgung der Therapieeffizienz in Echtzeit ermöglichen.^[5,31]

Die Diagnostik spielt als Grundlage einer erfolgreichen Prävention sowie effizienten Therapie von Krankheiten eine entscheidende Rolle. Das zentrale Ziel der medizinischen Anwendung superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel stellt damit zunächst die magnetresonanztomographische Früherkennung maligner Zellen dar.

2.1 Eisenoxid-Nanopartikel für die molekulare MRT-Bildgebung zur Tumordiagnostik

Um Eisenoxid-Nanopartikel im Rahmen der molekularen Bildgebung zur frühzeitigen Tumordiagnostik mittels MRT einsetzen zu können, müssen diese verschiedenen Anforderungen genügen. Die intravenös applizierten Nanopartikel müssen eine hohe kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen sowie eine hohe Biorepulsivität aufweisen und ausreichend lange in dem Gefäßsystem zirkulieren. Eine lange Bluthalbwertszeit und damit eine hohe Bioverfügbarkeit kann das Erreichen des Tumorgewebes über den Blutstrom in hoher

Konzentration ermöglichen. Daher wird zunächst die Abhängigkeit der Bioverteilung von verschiedenen Eigenschaften wie Größe und Oberflächenchemie der Nanopartikel beschrieben (2.1.1). Daneben wird, in Hinblick auf die Möglichkeit einer passiven Anreicherung lang-zirkulierender Nanopartikel im Tumorgewebe, auf die Tumorentstehung und die damit verbundenen Besonderheiten, wie zum Beispiel das tumorassoziierte Gefäßsystem, eingegangen (2.1.2). Aktive, spezifische Markierungsstrategien könnten unter anderem den passiven Transport verstärken. Die lang-zirkulierenden Nanopartikel müssen hierfür eine stabile Bindung an geeignete zielführende Biomoleküle, wie zum Beispiel Antikörper, aufweisen. Die ausgewählten Biomoleküle müssen mit hoher Spezifität und Affinität an komplementäre Zielstrukturen binden, die spezifisch oder in erhöhtem Level auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden. Abschließend werden die Vorteile des aktiven Ansatzes unter Verwendung biokonjugierter Nanopartikel vorgestellt (2.1.3). In diesem Rahmen werden exemplarisch einige auf der Oberfläche von Tumorzellen überexprimierte Rezeptoren genannt; insbesondere wird dabei das tumorassoziierte Oberflächenprotein EpCAM als Zielstruktur vorgestellt.

2.1.1 Bluthalbwertszeit und Bioverteilung in Abhängigkeit verschiedener Eigenschaften der Nanopartikel

Die Blutzirkulationszeit und damit die Bioverteilung und Bioverfügbarkeit von Nanopartikeln wird maßgeblich durch die Interaktion der Partikel mit ihrer biologischen Umgebung, wie zum Beispiel Proteinen und Zellen, bestimmt und ist von verschiedenen Faktoren abhängig; unter anderem von der Größe (hydrodynamische Durchmesser), der Ladung und der Oberflächenchemie der Partikel.^[12,49]

Nanopartikel weisen Größen auf, die im Bereich biologischer Funktionseinheiten liegen; Proteine stellen mit einer Größe von etwa 5-50 nm die Größen-äquivalenten biologischen Gegenstücke zu Nanopartikeln dar.^[6,23] Nanopartikel sind damit deutlich kleiner als Erythrozyten, welche im Durchmesser etwa 7 μm aufweisen, und können leicht das Kapillarbett durchqueren.^[18] Das Kapillarbett ist ein Netzwerk aus Kapillargefäßen; diese sind die kleinste Einheit des Gefäßsystems und verbinden das arterielle und venöse Gefäßsystem.^[50] Im Bereich der Kapillaren findet der Austausch zwischen dem Blut und dem interstitiellen Gewebe statt.^[51] Die Größe der Nanopartikel

hat einen signifikanten Einfluss auf die Route und Rate der Entfernung aus dem Blutstrom. Der Transfer der Nanopartikel aus dem vaskulären System in das Interstitium der Gewebe ist abhängig von der Größe der Poren der Kapillargefäße und damit von der Permeabilität der Kapillaren. Die Endothelzellen, welche die Innenseite der Gefäßwände auskleiden, bestimmen anhand der Zellzwischenräume die Permeabilität. Weiterhin bestimmt die Struktur der Basalmembran die Durchlässigkeit. Es werden drei Endothelarten unterschieden: Das kontinuierliche, das fenestrierte und das diskontinuierliche Endothel.^[51,52] Bei den meisten Geweben, wie zum Beispiel dem der Lunge, ist das Endothel kontinuierlich und gekennzeichnet durch sogenannte *tight junction*:^[28,51-53] Dichte Zell-Zell-Kontakte mit einem Abstand kleiner als 2 nm.^[28] Das kontinuierliche Endothel verhindert den Austritt der meisten Nanopartikel aus dem Gefäßsystem durch Zellzwischenräume.^[28] Eine besondere Form des kontinuierlichen Endothels stellt das Endothel der Hirnkapillaren dar: Hirnendothelzellen stehen über sehr enge Zell-Zell-Verbindungen miteinander in Kontakt, die den parazellulären Transport von Molekülen verhindern (Blut-Hirn-Schranke, *blood-brain barrier* BBB).^[28,51,52] Das fenestrierte Endothel kommt unter anderem in der Bauspeicheldrüse und der Niere vor.^[51,52] Dieses Endothel weist ~ 60 nm große Fenestrationen auf, die Basalmembran ist jedoch kontinuierlich.^[51] Unterhalb einer Größe von ~ 6 nm werden Nanopartikel schnell durch Ausscheidung über die Niere aus dem Körper entfernt.^[54,55] Mit zunehmender Größe verschiebt sich der Entfernungsmechanismus der Nanopartikel aus dem Blutstrom von der reinen Filtrations-basierten, renalen Eliminierung zu einer vor allem Phagozytose-basierten Eliminierung durch das Mononukleäre Phagozyten System (MPS) in verschiedenen Organen - wie der Milz oder Leber, deren Kapillaren ein diskontinuierliches Endothel mit Poren von etwa 100 nm (diese Lücken beziehen auch die Basalmembran mit ein^[51]) aufweisen^[52,53] - oder direkt im Blutfluss.^[30] Das MPS ist zusammengesetzt aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Monoblasten, Promonozyten), sowie aus phagozytierenden Zellen: Monozyten und Makrophagen, wie etwa den Leber-ansässigen Kupffer-Zellen.^[56] Eine veraltete Bezeichnung für den Begriff des MPS, die in vielen älteren Arbeiten verwendet wird, ist der Begriff des RES (retikuloendotheliales System).^[57] Der Begriff des MPS wird in dieser Arbeit synonym für die veraltete Bezeichnung verwendet. Klinisch als MRT-Kontrastmittel eingesetzte sphärische Eisenoxid-Nanopartikel in einer Größenordnung von > 50 nm weisen in Folge der schnellen, unspezifischen Phagozytose durch das MPS der Leber und Milz kurze Bluthalbwertszeiten auf. Resovist® ist ein Beispiel für ein konventionelles, klinisches Kontrastmittel, welches schnell im MPS

der Leber und Milz akkumuliert und vor allem Einsatz findet zur Bildgebung der Leber und zur Detektion und Visualisierung von primären Lebertumoren, bei denen die Anzahl an Kupffer-Zellen und damit die Aufnahme der Nanopartikel in die Leber reduziert ist.^[9,12,18,24,58] Aufgrund der Synthese in wässriger Lösung durch Co-Präzipitation bei Raumtemperatur weisen die Carboxydextran-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel (Kerngröße im Mittel etwa 4 nm^[9,18]) zum Teil große Aggregate und dadurch eine breite Teilchengrößenverteilung auf.^[9,12,18] Der mittlere hydrodynamische Durchmesser liegt bei ~ 60 nm.^[18,58] Aggregation beeinflusst die zelluläre Antwort und aggregierte Partikel werden schnell durch das MPS entfernt.^[23,49] Kleinere Nanopartikel (< 50 nm) mit vergleichbarer Dextran-Oberflächenbeschichtung weisen eine reduzierte sofortige Aufnahme durch das MPS auf, verbleiben dadurch länger in der Blutzirkulation und gelangen aus den Blutgefäßen in das Interstitium.^[9,18,24] Anschließend werden sie durch die Lymphatische Drainage entfernt, in die Lymphknoten transportiert und dort durch Makrophagen aufgenommen.^[9,18,24] Analog zu Leberläsionen führen maligne Zellen in den Knoten zu einer reduzierten Aufnahme der Partikel. Harisinghani *et al.* konnten in einer Studie unter Verwendung von Combidex® die erfolgreiche nicht invasive Detektion von Lymphknoten-Metastasen in Patienten mit Prostata-Krebs zeigen.^[59] Combidex® besteht aus Dextran-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 20-40 nm^[18,58] Durch die Reduzierung der Größe kann die Zirkulationszeit verlängert und die Bioverteilung verbreitert werden. Dennoch wird der Großteil dieser Nanopartikel immer noch schnell durch das MPS erkannt und aus dem Blutkreislauf entfernt.

Die schnelle Aufnahme intravenös applizierter Nanopartikel durch das MPS ist vor allem verbunden mit einer unspezifischen Anlagerung von bestimmten Plasmaproteinen auf der Oberfläche der Nanopartikel. Nach Kontakt mit biologischen Systemen, wie zum Beispiel dem Blut, werden die Nanopartikel unmittelbar mit einer mehr oder weniger stark assoziierten Proteinschicht, der sogenannten Proteinkorona, bedeckt.^[5,12,55] Die initiale Zusammensetzung der Korona wird bestimmt durch die Konzentration der über 3700 Proteine im Plasma sowie der Bindungsaffinität der Proteine zur Partikeloberfläche.^[60] Proteine, die im Blutkreislauf in hoher Konzentration vorliegen, wie zum Beispiel Albumin, können initial die Nanopartikeloberfläche bedecken.^[49,60] Weisen diese Proteine aber eine geringe Affinität zur Oberfläche der Nanopartikel auf unterliegen sie einem Austausch mit geringer konzentrierten Proteinen höherer Bindungsaffinität.^[49,60] Proteine, die mit hoher Affinität binden und langsam desorbieren, bilden

die sogenannte harte Korona, während schwach gebundene Proteine, die einem permanenten Austausch mit anderen Proteinen unterliegen, die sogenannte weiche Korona bilden.^[55,61] Eine populäre Hypothese ist dabei, dass die Proteine der harten Korona direkt mit der Oberfläche der Nanopartikel interagieren und die der weichen eine zweite, dynamische Proteinschicht via Protein-Protein-Wechselwirkungen bilden.^[55,62]

Es wurden bisher über 100 verschiedene Proteine identifiziert, die an die Oberfläche von Nanopartikeln adsorbieren.^[55] Die Proteine, die am stärksten an die nicht-passivierte Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln als auch an die Oberfläche von polymeren Nanopartikeln binden, sind Albumin, Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems, Fibrinogen und Apolipoproteine.^[49]

Die Adsorption von Proteinen auf der Nanopartikeloberfläche kann dazu führen, dass die Proteine konformative Änderungen eingehen, die zum Beispiel mit der Freisetzung neuer Epitope verbunden sind, welche eine Autoimmunantwort induzieren können.^[8,49] Adsorbierte native oder entfaltete Proteine können zu einer Agglomeration der Nanopartikel führen und infolge eine unspezifische Aufnahme durch das MPS induzieren; daneben schirmen sie die Oberfläche der Partikel ab und bestimmen so auch die Wechselwirkung mit Geweben und Zellen und damit ihr biologisches Verhalten.^[5,49,55,61] Die Markierung der Partikeloberfläche mit speziellen Proteinen, den Opsoninen, spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Zirkulationszeit und damit Bioverteilung. Opsonine (z.B. Immunoglobuline und Komplementfaktoren) besitzen eine Signalfunktion für Makrophagen und beschleunigen so die Aufnahme der Partikel - in diesem Fall eine Rezeptor-vermittelte Phagozytose - durch das MPS.^[5,6,28,55] Eine Reduzierung der unspezifischen Opsoninadsorption und damit eine reduzierte Makrophagenerkennung sind somit entscheidend für eine lange Bluthalbwertszeit der Nanopartikel.

Das Ausmaß der Interaktionen der Nanopartikel mit Proteinen sowie auch die Art der Proteine, welche auf der Oberfläche binden, hängen von verschiedenen Faktoren ab: Unter anderem von der Größe, der Ladung sowie der Oberflächenchemie der Partikel.^[5,49,55,60,63,64]

Die Größe hat einen bedeutenden Einfluss auf die unspezifische Proteinadsorption und infolgedessen auch auf die Phagozytose: Mit zunehmender Größe und damit Oberfläche nimmt die Oberflächenbedeckung mit Plasmaproteinen zu.^[60,65,66] Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächeneigenschaften haben gezeigt, dass anionische oder kationische Oberflächenladungen via elektrostatischer Interaktionen zu einer erhöhten Proteinadsorption im Vergleich zu einer

neutralen Oberflächenbeschichtung führen.^[5,49,54,55,64,67] Mit zunehmender Ladungsdichte nimmt dabei die Bedeckungsdichte zu.^[68] Zusätzlich führt eine geladene Oberfläche verstärkt zu konformativen Änderungen der adsorbierten Proteine.^[55] Neben ionischen begünstigen auch hydrophobe Wechselwirkungen die Adsorption von Proteinen: Hydrophobe Nanopartikel weisen eine stärkere Bedeckung mit Proteinen auf als hydrophile und werden schnell von Proteinen beschichtet, die für die Detektion missgefalteter Proteine und Proteinaggregate bestimmt sind; vor allem Immunoglobuline und Apolipoproteine.^[23,69] Daneben tendieren hydrophobe Partikel zu einer schnellen Agglomeration in physiologischer Umgebung und werden so früh (Halbwertszeit von Sekunden bis Minuten) und unspezifisch durch das MPS entfernt.^[49] Ebenso wie geladene begünstigen hydrophobe Oberflächen bei Proteinadsorption die Änderung der Konformation der adsorbierten Proteine.^[55,70]

Um gegen Proteinadsorption möglichst inerte Oberflächen zu erzeugen, müssen sich diese somit durch elektrostatische Neutralität und Hydrophilie auszeichnen.

2.1.1.1 Polyethylenglykol als proteinresistente Oberflächenbeschichtung

Oberflächen, die eine hohe Proteinresistenz aufweisen sind von Bedeutung für viele medizinische und technische Anwendungen, bei denen es zu einem Kontakt mit Blut oder anderen Protein-enthaltenen Lösungen kommt: Künstliche Implantate, medizinische Utensilien, Kontaktlinsen, Immunassays und als Beispiel für technische Systeme die Außenhülle von Schiffen.^[71-74] Die nicht spezifische Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche löst die Ablagerung von Zellen, Bakterien und anderen Mikroorganismen aus, die zum Beispiel im Falle eines Implantats zu Entzündungen und damit zu Abstoßungsreaktionen durch den Körper führen können.^[72,75] Die Bildung einer Schicht organischen Materials, die sogenannte Biofilmbildung, kann durch den Einsatz proteinresistenter Polymere unterdrückt werden.^[71-74] Vor allem im Bereich der Medizin und Pharmazie ist Polyethylenglykol (PEG) der Goldstandard unter den Polymeren mit proteinabweisenden Eigenschaften.^[74] Das synthetische Polymer des Ethylenoxids weist die allgemeinen Formel $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$ auf; n gibt die Anzahl der Ethylenglykol-Einheiten und damit den Polymerisationsgrad wieder.^[74] Das von der *Food and Drug Administration* (FDA) für viele Anwendungen zugelassene Polymer bietet eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften, die zu einem breiten Anwendungsspektrum zum Beispiel im Bereich von Kosmetika, Lebensmitteln

beispielsweise als Zusatz, wie etwa PEG-Sorbitanester E432-E436, und Pharmazeutika führen.^[26,74,76] PEG weist eine hervorragende Wasserlöslichkeit auf.^[26,27,74,77] Selbst bei einem Molekulargewicht von 35000 g/mol können noch homogene 50%ige Lösungen bei Raumtemperatur hergestellt werden.^[74] Die hohe Wasserlöslichkeit ist auf den Abstand der sich wiederholenden Sauerstoffatome in der Polymerkette zurückzuführen, der die Ausbildung eines ausgedehnten Wasserstoffbrücken-Netzwerks zwischen den PEG-Ketten und Wasser erlaubt und damit die Ausbildung einer ausgeprägten, sehr effektiven Hydrathülle.^[74] Daneben weist es eine extrem geringe Toxizität, die sich invers proportional zur Polymerlänge verhält und vor allem bei oraler Einnahme auftritt, sowie eine geringe Immunogenität auf.^[26,74,76,77] Weiterhin ist PEG *in vivo* stabil und wird intakt in Abhängigkeit des Molekulargewichts renal oder über die Faeces (> 20 kDa) aus dem Körper ausgeschieden.^[76]

Im Bereich der Pharmazie ist die Wirkstoff-PEGylierung etabliert um die Pharmakokinetik vor allem von Protein- und Peptid-basierten Medikamenten durch Erhöhung des Molekulargewichts, Reduzierung der Immunogenität oder durch Abschirmung proteolytischer Enzyme zu verbessern.^[22,74,76,78] Hier wird allerdings kurz die PEGylierung liposomaler Transportsysteme am Beispiel der liposomalen Formulierung des Chemotherapeutikums Doxorubicin genannt. PEGyliertes liposomales Doxorubicin (Doxil®) ist das weltweit erste zugelassene Nanomedikament (Durchmesser: 100 nm^[79]).^[5] 1995 wurde es von der FDA für die Behandlung des Kaposi-Sarkoms, 1999 für die Ovarial- und 2003 für die Brustkrebsbehandlung zugelassen.^[76,80,81] Klassische Liposome zeigen infolge unspezifischer Proteinadsorption eine schnelle Aufnahme durch das MPS und können zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit möglichen pseudoallergischen Reaktionen führen.^[76,82] Im Vergleich zu den klassischen Liposomen zeigen die PEGylierten Gegenstücke eine reduzierte Aufnahme durch das MPS und infolge eine erhöhte Bluthalbwertszeit und damit eine Verschiebung der Verteilung zu Gunsten des pathologischen Gewebes.^[5,31,33,74,76,82-85] Die PEGylierung von liposomalen Doxorubicin führt zu einer 8-fach längeren Bluthalbwertszeit im Vergleich zu der rein liposomalen Formulierung.^[76] Die Beschichtung mit PEG führt zu einer verringerten Adsorption von Proteinen und folglich auch von Oponinen und somit zu einer reduzierten Aufnahme durch das MPS.^[33,76,82,84,85] Dieses Konzept ist auch auf anorganische Nanomaterialien übertragbar: Die Beschichtung mit Polyethylenglykol führt, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, analog zu einer reduzierten unspezifischen Oponin-

adsorption, hieraus folgt die verringerte Erkennung und Aufnahme durch das MPS und damit eine verlängerte Bluthalbwertszeit.^[9,26,27,64,86]

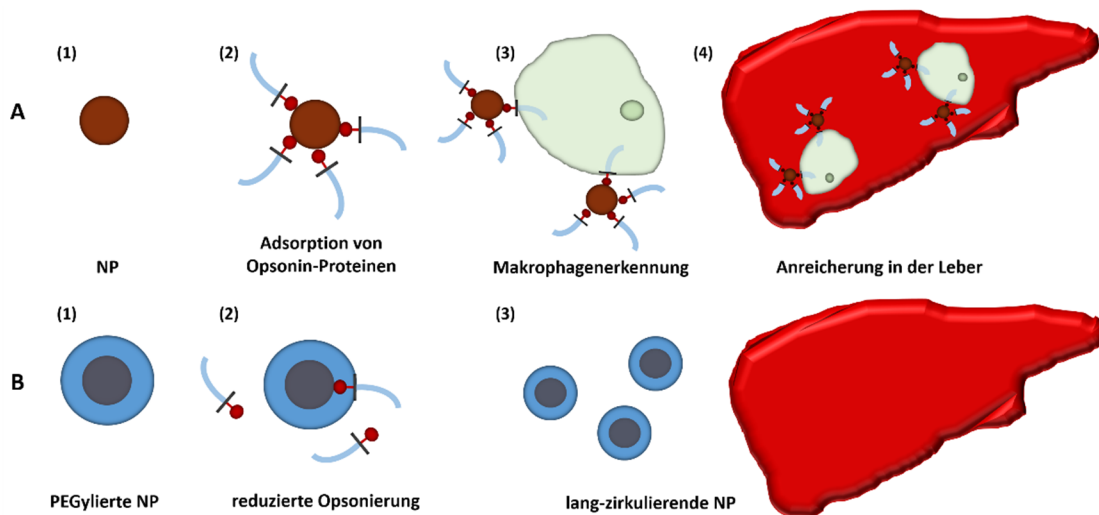


Abbildung 2.1: Unterdrückung der Adsorption von Opsoninen auf der Nanopartikeloberfläche durch PEGylierung. Polyethylenglykol beschichtete Nanopartikel (PEGylierte NP) (B) weisen im Vergleich zu ihren nicht-PEGylierten Gegenstücken (NP) (A) eine reduzierte Anlagerung von Opsonin-Proteinen auf (2). Die Unterdrückung der Opsonierung führt zu einer reduzierten Erkennung und Aufnahme durch phagozytierende Zellen des MPS, beispielsweise den in der Leber ansässigen Kupfer-Zellen, und damit zu einer längeren Zirkulationszeit im Blutkreislauf (3 und 4). Abbildung nach^[26]

PEGylierte Nanopartikel weisen eine Proteinabstoßungsfähigkeit auf, die einmalig auf dem Gebiet der Oberflächenbeschichtung ist.^[27] Für den Mechanismus der Proteinresistenz Polyethylenglykol-beschichteter Oberflächen gibt es kein einheitliches Modell; es wurden verschiedene Theorien aufgestellt.^[27,71,73,77,87–89] Ein Modell, welches den proteinabweisenden Charakter einer Polyethylenglykol-Beschichtung beschreibt, geht von einem sterischen Abstoßungseffekt aus, der bei Annäherung von Proteinen an die Oberfläche auftritt.^[71,88] Die sterische Abstoßung hat eine elastische (aufgrund der Konformationsentropie der PEG-Ketten) und osmotische (aufgrund der hydratisierten PEG-Ketten) Komponente und ist verbunden mit einer positiven freien Energie, die assoziiert ist mit der Kompression der flexiblen PEG-Ketten (Abnahme der Entropie) und der begleitenden Dehydratisierung (Zunahme der Enthalpie) der stark hydratisierten PEG-Hülle.^[87,88] Beide Effekte hängen von der Kettenlänge ab: Bei gegebener Oberflächendichte des Polyethylenglykols ist die Proteinresistenz umso ausgeprägter je länger die Polymerketten sind. Die sterische Repulsion ist kleiner für kurz-kettige PEG-Moleküle, da diese eine eingeschränkte konformative Freiheit (geringere Entropie) aufweisen und weiterhin die Hydratisierungsenergie pro Kette reduziert ist (geringerer Hydrationsgrad).^[88]

Weiterhin werden durch die dichte Beschichtung anorganischer Nanopartikel mit Polyethylenglykol Oberflächenladungen abgeschirmt und die PEGylierung verleiht den Partikeln Stabilität unter physiologischen Bedingungen und Hydrophilie.^[27,90] Die stark hydratisierte ungeladene PEG-Hülle verringert oder verhindert hydrophobe, elektrostatische oder andere nicht-kovalente Wechselwirkungen, die eine unspezifische Adsorption begünstigen.^[90]

Die sterische Abstoßung und die gleichzeitige Abwesenheit starker attraktiver Wechselwirkungen zwischen PEG-beschichteten Oberflächen und Proteinen scheinen die wichtigsten Beiträge zum proteinabweisenden Charakter zu leisten.^[90]

Der Effizienz der Proteinresistenz durch PEGylierung hängt dabei unabhängig von der Theorie des Mechanismus von zwei Faktoren ab: Der Kettenlänge und der Bedeckungsdichte. Hohe Oberflächendichten und langkettige PEG-Moleküle sollten zu einer optimalen Proteinresistenz führen. Von größerer Bedeutung für eine effektive Proteinabstoßung als die Polymerkettenlänge ist jedoch eine hohe Bedeckungsdichte auf der Oberfläche der Nanopartikel, die mit zunehmender Polymergröße allerdings schwerer zu erreichen ist.^[27,71]

Durch eine dichte Bedeckung der Nanopartikeloberfläche mit Polyethylenglykol kann die Proteinadsorption und damit auch Opsonierung verringert werden; ebenso können unspezifische Interaktionen mit Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, durch die PEGylierung reduziert werden. Beides führt zu einer verringerten Aufnahme der Nanopartikel durch das MPS und damit verbunden zu einer langsameren Eliminierung aus dem Blutkreislauf. Eine verlängerte Bluthalbwertszeit und infolge hohe Bioverfügbarkeit erlaubt eine breitere Bioverteilung und somit die Markierung und Visualisierung von pathologischem Gewebe.

2.1.2 Passive Anreicherung lang-zirkulierender Nanopartikel im Tumorgewebe

Intravenös applizierte Nanopartikel, welche aufgrund ihrer Größe sowie ihren Oberflächeneigenschaften einer sofortigen Aufnahme durch das MPS entgehen, können über das Gefäßsystem in den Tumor gelangen und sich verstärkt im Tumorinterstitium anreichern. 1986 wurden in zwei unabhängigen Studien von Gerlowski *et al.*^[91] und Matsumara *et al.*^[92] Mechanismen für den selektiven Transport von Makromolekülen aus dem vaskulären System in Tumore identifiziert.^[30] Das Endothel der den Tumor versorgenden Blutgefäße ist stark fenestriert und führt zu einer

erhöhten Permeabilität der vaskulären Struktur von Tumorgewebe im Vergleich zu nicht-entartetem Gewebe.^[6,12,30,32,33,47] Das gleichzeitige Fehlen einer effizienten lymphatischen Drainage führt zu einem erschwerten Abtransport der in das Tumoringterstitium ausgetretenen Makromoleküle.^[12,30,32] Zusammen führen beide Phänomene zu dem sogenannten EPR-Effekt (verstärkte Permeabilität und Retention, *enhanced permeability and retention* EPR).^[12,30,32,33] Dieses Modell zur Erklärung einer erhöhten passiven Anreicherungstendenz in Tumorgewebe wurde auch auf Nanopartikel übertragen.^[4,6-9,12,26,27,30,32,33,47] Nanopartikuläre organische Wirkstoffformulierung wie Doxil[®], die sich verstärkt aufgrund des EPR-Effekts unspezifisch in Tumorgewebe anreichern sollen, wurden erstmals Mitte der 1990er Jahre vermarktet.^[33] Diese passive Anreicherung im interstitiellen Raum des Tumors ist von großem Nutzen und Bedeutung sowohl für eine verträglichere Behandlung mit einer reduzierten systemischen Toxizität als auch für die Diagnose von Tumoren.^[12,30] Im Folgenden wird auf weitere Besonderheiten des Tumorgefäßsystems sowie die daraus resultierende tumorspezifische Mikroumgebung eingegangen. In diesem Zusammenhang werden kurz die Möglichkeiten und Grenzen einer EPR-basierten Nanomedizin sowohl im Bereich Diagnostik als auch im Bereich Wirkstofftransport - auch in Hinblick auf eine kontrollierte, ortsspezifische Wirkstofffreisetzung - aufgezeigt. Abschließend werden der EPR-Effekt und seine Ursachen kurz genauer erläutert, sowie eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete erhöhte Anreicherungstendenz von PEGylierten Nanopartikeln im Tumorgewebe vorgestellt.

Die Besonderheiten des Tumorgefäßsystems sowie die tumorspezifische Mikroumgebung können durch die Tumorentstehung erklärt werden. Tumorerkrankungen sind genetische Erkrankungen: Tumorzellen können entstehen wenn sich bestimmte Abschnitte des Genoms verändern und diese Entartungen nicht mehr repariert werden.^[93,94] Genetische Veränderungen können zum Beispiel durch Einwirkung verschiedener Kanzerogene, wie ionisierende und UV-Strahlung, aber auch chemische Agenzien hervorgerufen werden.^[93] Die Transformation normaler Zellen in Tumorzellen verläuft dabei in einem mehrstufigen Prozess über präkanzeröse Zellen.^[93] Bei normalen Zellen liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod vor und die Zellmenge verändert sich kaum. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Tumorzellen unabhängig von den unterschiedlichen auslösenden Faktoren durch ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod aus.^[95] Dies führt zu einem schnellen, invasiven, unkoordinierten Wachstum der Tumorzellen. Die Versorgung der malignen Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff

erfolgt zunächst durch Diffusion aus umliegenden Gefäßen.^[96,97] Aufgrund des schnell voranschreitenden, expansiven Tumorwachstums kann der hohe Nähr- und Sauerstoffbedarf ab einer bestimmten Tumorgöße nicht durch Diffusionsvorgänge abgedeckt werden.^[97] Es kommt im Tumorgewebe zur Ausbildung hypoxischer Gebiete. Der Begriff Hypoxie bezeichnet die Unterversorgung mit Sauerstoff. Durch die Hypoxie des Tumorgewebes wird über mehrere Schritte die massive Expression zahlreicher pro-angiogener Faktoren aktiviert.^[98] Diese Faktoren führen zur Auslösung des komplexen Prozesses der Angiogenese, welche die Ausbildung neuer Blutgefäße von einem bereits vorliegenden Kapillarnetz aus beschreibt.^[46,98] Einer der für die Tumorangio-genese bedeutendsten angiogenen Mediatoren ist der Wachstumsfaktor VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, *vascular endothelial growth factor*).^[46,98] Parallel zu der Hypoxie-induzierten verstärkten Ausschüttung angiogener Stimulatoren erfolgt eine verringerte Expression angiogener Inhibitoren, wie zum Beispiel Thrombospondin.^[98,99] In Tumoren ist damit das Gleichgewicht zwischen den pro- und anti-angiogenen Faktoren, welches in gesundem Gewebe den Prozess der Angiogenese kontrolliert, gestört.^[46,99-101] Dieses Ungleichgewicht zwischen den angiogenen Faktoren scheint die erheblichen Unterschiede zwischen neu gebildeten Tumorgefäßen und den Gefäßen im Normalgewebe zu bedingen.^[102] Abbildung 2.2 zeigt deutlich die Unterschiede von normalen und tumorassoziierten Gefäßen: Das angiogenetische Gefäßnetzwerk des Tumors zeichnet sich durch eine heterogene, unstrukturierte Architektur aus. Zu den charakteristischen Abnormalitäten des Tumorgefäßnetzwerks gehören die großen, unregelmäßigen intervaskulären Abstände.^[95,102] Durch die in gesundem Gewebe vorliegenden geringen Abstände wird die Sauerstoffdiffusionsgrenze ($< 70 \mu\text{m}$ ^[103]) nicht überschritten und die Sauerstoffversorgung jeder einzelnen Zelle wird durch Diffusion aus den umliegenden Kapillaren gewährleistet. An dieser Stelle sei angemerkt, dass der Sauerstoffbedarf in Tumoren aufgrund des schnellen Wachstums bis zu einem Faktor von fünf gesteigert sein kann.^[104] Die Heterogenität in der räumlichen Verteilung der Tumorblutgefäße führt dazu, dass in Abhängigkeit der Lage der Tumorzellen zum Gefäßsystem eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff als auch mit vielen anderen Nährstoffen, aufgrund der mit zunehmendem Abstand verlängerten Diffusionsstrecke, nicht mehr gewährleistet werden kann.^[96,105] Dies führt zu einer starken Heterogenität der Tumormikroumgebung mit Auftreten von Hypoxie als auch Tumorzellnekrosen vor allem im zentralen Tumorbereich. Hypoxische Bereiche treten auf, wenn die Abstände vom Gefäßsystem 100-200 μm überschreiten.^[106] Zellen in dieser Entfernung zum Gefäßsystem zeigen sich resistent

gegenüber Radiotherapeutika.^[105] Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hypoxie in Tumoren und der Resistenz gegen radiotherapeutische Behandlungen wurde erstmals 1988 aufgezeigt.^[104] Der Grund hierfür liegt in der Abhängigkeit der Effizienz der Radiotherapie von der lokalen Sauerstoffkonzentration. Gleichzeitig kann der Sauerstoffmangel auch zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber anderen Therapieformen führen: Es ist bekannt, dass eine Hypoxie als auch eine Unterversorgung mit Nährstoffen Zellen sensitiver gegenüber Hitze machen.^[6] Damit bietet die magnetisch induzierte Hyperthermie die Möglichkeit hypoxische Tumore effizient zu behandeln.

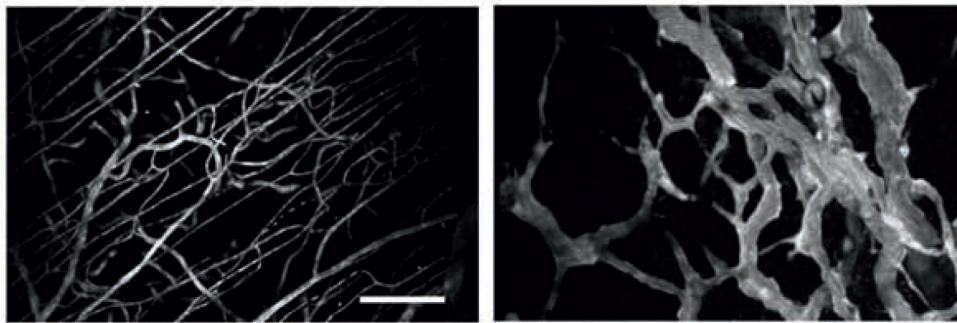


Abbildung 2.2: Multiphotonenmikroskopische Aufnahme von Gefäßen in normalem, nicht-entartetem Gewebe sowie von Tumorgefäßen. Das Gefäßsystem im Normalgewebe zeigt eine geordnete, homogene Struktur (links). Im Gegensatz dazu liegt in Tumorgewebe eine chaotische, heterogene Gefäßarchitektur mit unregelmäßig verteilter Gefäßversorgung und irregulären vaskulären Durchmessern vor (rechts). Die Längenskala entspricht 100 μm . Abbildung entnommen aus^[102]

In hypoxischen Regionen des Tumorgewebes erfolgt eine Umschaltung von einem aeroben zu einem anaeroben Metabolismus.^[104–106] Der anaerobe Stoffwechselvorgang eines Mols Glukose führt zur Bildung von 2 mol Milchsäure, welche bei physiologischem pH-Wert in Lactat unter Freisetzung von einem Proton dissoziiert, sowie 2 mol Adenosintri-phosphat (ATP).^[105] Die ATP-Gewinnung ist im Vergleich zu dem aeroben Stoffwechsel gering: Bei diesem werden 38 mol ATP aus einem Mol Glukose erhalten.^[98] ATP ist ein Hauptenergiespeicher innerhalb von Zellen. In energiearmen Umgebungen findet daher eine verstärkte ATP-Hydrolyse statt.^[105] Sowohl die Milchsäureproduktion als auch die ATP-Hydrolyse tragen zu der in vielen Tumoren gefundenen sauren Mikroumgebung bei.^[105,106] Unter Berücksichtigung der Stöchiometrie des gesamten Glukosestoffwechsels liefert die ATP-Hydrolyse den Hauptbeitrag von beiden.^[105] Der mittlere pH-Wert in Tumoren liegt bei ~ 7 , mit erheblichen Unterschieden zwischen verschiedenen Tumorregionen ($\sim 5.8-7.6$), in Normalgewebe bei ~ 7.5 .^[105] Mit zunehmender Entfernung von den versorgenden Blutgefäßen nimmt der Sauerstoffgehalt sowie der pH-Wert ab, allerdings mit einer

fehlenden räumlichen Korrelation zwischen beiden Parametern:^[30,102,105] Bei einer Entfernung zwischen 100 μm und 170 μm von den Gefäßen erreicht der pH-Wert ein Plateau, welches aus einer fehlenden Glukoseverfügbarkeit und damit eingeschränkten Glykolyse und infolge reduzierten Freisetzung von Protonen resultieren könnte.^[107] Als Konsequenz der Hypoxie kann die Konzentration verschiedener Enzyme in Abhängigkeit der Entfernung zu den Blutgefäßen ebenfalls variieren.^[30]

Im Rahmen des EPR-basierten, nanopartikulären Wirkstofftransports könnte die besondere Mikroumgebung von Tumorzellen für eine kontrollierte zum Beispiel pH-sensitive oder durch ortsspezifische Enzyme aktivierte Wirkstofffreisetzung genutzt werden. Eine effektive, lokalisierte Freisetzung in saurer Tumor Umgebung könnte beispielsweise durch Immobilisierung der therapeutischen Moleküle über eine pH-sensitive Hydrazon-Bindung an den nanopartikulären Transporter erreicht werden.^[108] Der Nanopartikel-basierte und damit erhöhte Wirkstofftransport in das Tumorgewebe und die kontrollierte Wirkstofffreisetzung könnten eine Wirkstoffkonzentration in der Tumorregion im hohen therapeutischen Bereich und im restlichen Körper unter der Toxizitätsschwelle ermöglichen, da der Wirkstoff das Tumorgewebe in hoher Konzentration ohne vorherige Metabolisierung erreichen könnte.

Eine homogene Verteilung der Nanopartikel im Tumorgewebe unterliegt allerdings einer Reihe von tumorcharakteristischen Barrieren, die vor allem aus strukturellen und physiologischen Abnormalitäten der Tumorgefäße resultieren: Der unregelmäßig verteilte Gefäßverlauf des angiogenetischen vaskulären Netzwerks zusammen mit einem räumlich sowie zeitlich irregulären Blutfluss, erschweren eine gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel im Tumorgewebe über das Gefäßsystem. Die heterogene Blutflussrate wird einerseits hervorgerufen durch eine Hyperpermeabilität-induzierte Flusstauung andererseits durch eine Stauung durch Kompression der Gefäße, vor allem durch die schnell proliferierenden Tumorzellen.^[30,100-102,109] Der irreguläre Blutfluss kann zudem zu einem vorübergehenden Auftreten von Hypoxie und damit verbunden zu einer Abnahme des pH-Werts in Regionen mit einer hohen Blutgefäßdichte führen.^[100,101] Das konvektive Eindringen der Nanopartikel in den perivaskulären Raum nach Austritt aus dem Gefäßsystem kann durch den erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck (*interstitial fluid pressur* IFP) erschwert werden.^[5,110] In Tumoren liegt der IFP in einem Bereich von 10-40 mmHg und im Vergleich dazu in Normalgewebe bei etwa 0 mmHg.^[5] Der hohe IFP in Tumoren resultiert vermutlich aus der erhöhten Permeabilität der Tumorgefäße sowie dem Fehlen eines funktionie-

renden Lymphsystems.^[30,100,102,110,111] Auf die Ursachen für diese beiden tumorcharakteristischen Abnormalitäten wird später kurz genauer eingegangen.

Eine Verteilung im gesamten Tumorgewebe ist vor allem für einen effektiven nanomedizinischen Wirkstofftransport und damit eine effiziente Therapie entscheidend. Um den eingeschränkten Transport der Nanopartikel zu überwinden und damit die Effizienz und den Erfolg von vor allem therapeutischen aber auch diagnostischen Ansätzen zu erhöhen, muss eine Normalisierung der tumorcharakteristischen, physiologischen Abnormalitäten erfolgen. Eine Strategie könnte die Kombination der Nanomedizin mit einer vaskulären Normalisierung darstellen. Die vaskuläre Normalisierung führt zu einer Verkleinerung der Gefäßporen und infolge zu einer Verringerung des IFPs.^[30,100,110-112] Als Beispiel sei eine antiangiogene Therapie mit VEGF-Inhibitoren genannt.^[5,100,110]

Im Folgenden werden der EPR-Effekt und seine Ursachen kurz genauer erläutert. Die Hypoxie-induzierte Überproduktion des Wachstumsfaktors VEGF scheint neben der Aktivierung der Angiogenese auch maßgeblich für die zahlreichen endothelialen Lücken der Auskleidung der Tumorgefäße und damit für die Permeabilitätserhöhung dieser Blutgefäße verantwortlich zu sein.^[113] Durch diese größeren Endothellücken können Nanopartikel leichter in das Tumorgewebe gelangen als durch reguläre Endothelien in Normalgewebe. Wie unter 2.1.1 beschrieben, hängt die Möglichkeit der Extravasation der Nanopartikel aus dem Gefäßsystem in das Interstitium von den Abständen der Endothelzellen, welche die Innenseite der Gefäßwände auskleiden, ab. Hieraus resultiert einer der Vorteile nanopartikulärer Wirkstoffformulierungen gegenüber molekularen Wirkstoffen: Kleine molekulare Medikamente können bereits durch *tight junctions*, welche charakteristisch für das Endothel der meisten Gewebe sind, austreten.^[5] Nanopartikuläre Formulierungen des Medikaments können diese engen Endothellücken hingegen nicht passieren. Dies führt zu einem reduzierten Verteilungsvolumen, zu einer verbesserten Dosis-Wirkstoff-Effizienz und einer reduzierten systemischen Toxizität. Die Größe der endothelialen Lücken der Tumorgefäßwände hängen vom Ort des Tumors und seiner Mikroumgebung ab.^[8,30,114] Die Ausschlussgröße (*cut-off size*) der Poren kann daher in einem Größenbereich von 100-800 nm liegen.^[114,115] Diese Größe gibt nur das größte Partikel an, das aus dem Blutfluss durch die Gefäßwände in das Gewebe dringen kann.^[30] Die vaskuläre Porengröße innerhalb eines Tumors kann stark variieren und die meisten Poren sind deutlich kleiner als die Ausschlussgröße.^[30] Die Heterogenität der Permeabilität der vaskulären Struktur von Tumorgewebe muss daher bei dem

Design EPR-basierter Nanomedizin beachtet werden.^[30] Da die vaskuläre Permeabilität mit zunehmender Partikelgröße abnimmt sind kleinere Partikel effektiver.^[110,116] Daneben führt eine zunehmende Partikelgröße zu einer reduzierten Zirkulationszeit, kleinere Partikel können dagegen länger in den Blutgefäßen zirkulieren und das Zielgewebe in höherer Konzentration erreichen. Abbildung 2.3 zeigt den passiven Transport lang-zirkulierender Nanopartikel in das Tumorgewebe durch Lücken im Endothel der Tumorblutgefäße.

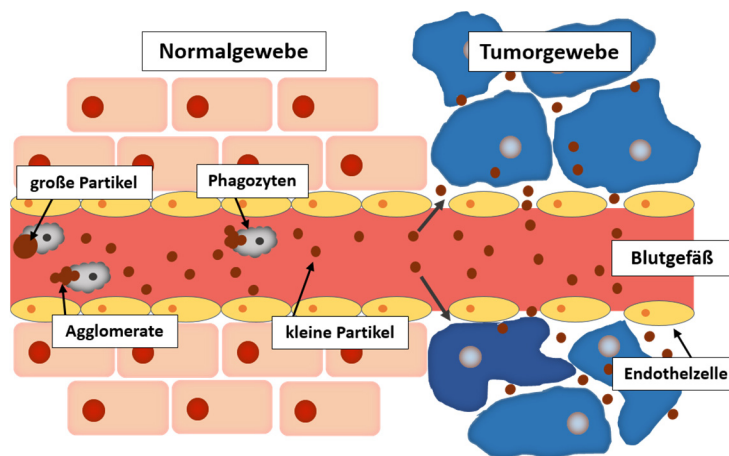


Abbildung 2.3: Passive Anreicherungsstrategie lang-zirkulierender Nanopartikel in Tumorgewebe. Große Partikel und Agglomerate werden schnell durch phagozytierende Zellen des MPS erkannt und aus dem Blutgefäßsystem entfernt. Kleinere Partikel weisen infolge der reduzierten sofortigen Aufnahme durch das MPS eine längere Blutzirkulationszeit auf. Die Abstände der Endothelzellen der Tumorblutgefäße sind im Vergleich zu denen der Blutgefäße von gesundem Gewebe größer und können den Transfer der lang-zirkulierenden Nanopartikel aus dem vaskulären System in den interstitiellen Raum des Tumors ermöglichen. Abbildung nach^[12]

Neben der Größe beeinflusst unter anderem auch die Oberflächenladung der Partikel die vaskuläre Permeabilität: Kationische Nanopartikel weisen im Vergleich zu neutralen und anionischen eine schnellere Eindring- sowie auch die höchste Akkumulationsrate auf.^[117–119] Die Ursache hierfür könnte in den attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Glykokalix der vaskulären Endothelzellen liegen.^[117–120] Neutrale und anionische Partikel können sich hingegen effizienter im interstitiellen Raum des Tumors verteilen; wahrscheinlich infolge der Minimierung der Interaktion mit geladenen Komponenten der extrazellulären Matrix, welche vor allem aus einem Netzwerk aus Kollagenfasern und anderen Molekülen, wie etwa Hyaluronsäure, besteht.^[30,118,121]

Die in das Interstitium des Tumors ausgetretenen Partikel reichern sich in diesem aufgrund der eingeschränkten lymphatischen Drainage verstärkt an. Die Ursache für das dysfunktionale lymphatische System in Tumorgewebe liegt in der Kompression der intratumoralen Lymphgefäße

als Konsequenz von mechanischem Stress (*mechanical stress, solid stress*), der vor allem durch die schnelle Proliferation der Tumorzellen erzeugt wird.^[30,102,109,122]

Im Rahmen der Diplomarbeit der Verfasserin^[123] wurde in Tiermodellstudien (SCID-Mäuse (*Sever Combined Immundeficiency SCID*)) mit insgesamt sechs verschiedenen humanen Tumorentitäten) der Einfluss tumorcharakteristischer Besonderheiten auf die Akkumulation neutraler, PEGylierter Eisenoxid-Nanopartikel (Kerndurchmesser: 13 nm, hydrodynamischer Durchmesser: ~ 29 nm) im Tumorgewebe untersucht. Ebenfalls wurde damit begonnen zu untersuchen, durch welche Zellen in der Tumormikroumgebung die Partikel aufgenommen werden. In der Mikroumgebung der meisten Tumore finden sich neben den eigentlichen Tumorzellen auch nicht-maligne Zellen wie etwa Fibroblasten und Zellen, die sich aus hämatopoetischen (blutzellbildenden) Stammzellen entwickeln, wie zum Beispiel Makrophagen.^[5,124,125] Im Rahmen der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass für die betrachteten Systeme kein Zusammenhang zwischen passiver Partikelakkumulation und Permeabilität der Tumorgefäße besteht. Hingegen korreliert eine hohe Dichte CD45 positiver Zellen mit einem hohen Ausmaß im Tumorgewebe angereicherter Partikel. CD45 ist ein membranständiges Protein, das auf den meisten Zellen hämatopoetischen Ursprungs, wie etwa Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, exprimiert wird. Allerdings erfolgt die Aufnahme der Partikel nicht nur durch CD45 positive Zellen, sondern auch andere tumorassoziierte Zellen, deren Identität im Rahmen der Diplomarbeit aus zeitlichen Gründen nicht genauer bestimmt werden konnte.

Nanopartikel, die einer sofortigen Aufnahme durch das MPS entgehen, können sich passiv im Tumorgewebe anreichern. In vielen Fällen ist allerdings eine längere Aufenthaltszeit sowie auch Internalisierung der Partikel durch maligne Zielzellen erforderlich.^[5,12,30] Die Möglichkeit einer passiven Anreicherung ist weiterhin nicht für jede Tumorart gegeben.^[5] Auch im Rahmen der Diplomarbeit der Verfasserin^[123] wurde für die betrachteten Tumorentitäten, mit Ausnahme einer Tumorentität, eine vernachlässigbar geringe passive Partikelakkumulation gefunden. Dies sind einige der Hindernisse, die alleine durch das Design lang-zirkulierender Partikel nicht überwunden werden können.

Um die Anreicherung im Tumorgewebe zu verbessern, sowie um Tumorzellen mit hoher Spezifität und Affinität markieren zu können und evtl. in diesem Rahmen auch eine effiziente Aufnahme der Partikel in diese Zielzellen zu bewirken, werden aktive Markierungsstrategien benötigt.

2.1.3 Aktive Anreicherung lang-zirkulierender Nanopartikel im Tumorgewebe

Aktive Markierungsstrategien unter Verwendung von Konjugaten lang-zirkulierender Nanopartikel mit ausgewählten bioaktiven Erkennungsmolekülen, die spezifisch und mit hoher Affinität an komplementäre Zielstrukturen auf der Zelloberfläche binden, können ein hohes Potential für Anwendungen in der Diagnostik sowie Therapie bieten. Im Folgenden sind einige Möglichkeiten genannt, die der Einsatz von Biokonjugaten bietet. Neben einer direkten Anbindung an Tumorzellen kann durch Wahl geeigneter zielführender Liganden auch das angiogenetische Tumorgefäßsystem mit hoher Spezifität und Affinität markiert werden.^[4,126] Das Anzielen der Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße ist vor allem von Interesse für eine Therapie unter Einsatz von Angiogenese-Hemmern, welche die Ausbildung neuer Blutgefäße und damit die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen inhibieren können.^[6,33] Im Vergleich zum ausschließlich passiven Transport kann eine aktive Zielführung basierend auf spezifischen, biologischen Erkennungsprozessen eine verstärkte Anreicherung der Nanopartikel im Tumorgewebe ermöglichen.^[12,30,32] Die durch die Eisenoxid-Nanopartikel induzierte Veränderung der Protonenrelaxation und damit die Signaländerung im MRT ist direkt abhängig von der Konzentration der angereicherten Partikel: Je höher die Konzentration, desto stärker ist der Gewebekontrast und damit die diagnostische Aussagekraft. Die erhöhte Akkumulation in der Zielregion könnte daher das Potential bieten, Tumore in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung zu detektieren.^[4,17,24] Eine frühzeitige Diagnose ist ein entscheidender Faktor für den Therapieerfolg, da die Prognose der Erkrankung mit dem Stadium der Erstdiagnostik verknüpft ist.^[6-8,17] Biokonjugierte Nanopartikel, die spezifisch Oberflächenmarker auf Tumorzellen erkennen, könnten zukünftig auch die Möglichkeit bieten transformierte Zellen einzeln zu adressieren und somit bereits die Entwicklung der Tumorzellen frühzeitig, präzise zu detektieren.^[4,6,8] Die direkte Visualisierung zelltypischer Biomarker könnte ebenso Informationen über das Muster und Ausmaß einer metastatischen Verteilung maligner Zellpopulationen ermöglichen.^[31]

Die Auswahl geeigneter zielführender Biomoleküle ist verbunden mit der Kenntnisse über die Existenz von Erkennungspartnern, die auf der Oberfläche der Zielzellen in erhöhtem Level, in mutierter Form oder spezifisch exprimiert werden. Diese Erkennungspartner können eine Unterscheidung der Zielzellen von gesunden Zellen ermöglichen. Zur spezifischen Erkennung

geeigneter Zielgruppen können verschiedene biologische Komponenten wie etwa Proteine (vor allem Antikörper), Nukleinsäuren (DNA, RNA), Peptide (zum Beispiel das Tripeptid RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure)), Vitamine (hauptsächlich Folsäure) und Kohlenhydrate (insbesondere Polysaccharide) Anwendung finden.^[5,7,9,33,126,127]

Nanopartikel weisen eine große spezifische Oberfläche auf. Der Anteil der Oberflächenatome nimmt invers proportional zum Durchmesser zu: Bei 40 nm großen Partikeln sind etwa 3% der Atome Oberflächenatome, bei 5 nm großen Partikeln etwa 25%.^[128] Die große spezifische Oberfläche der Nanopartikel bietet die Möglichkeit eine hohe lokale Ligandendichte zu erreichen.^[4,7,33] Dabei können mehrere, möglicherweise auch verschiedene Biomoleküle an die Oberfläche angebunden werden und so multivalente Interaktionen ermöglicht sowie Multifunktionalität erzeugt werden.^[21] Nanopartikel, an welche mehrere - auch gleiche - bioaktive Liganden angebracht sind, können multifunktional sein. Neben dem gezielten Ansteuern und spezifischen Binden von komplementären Zielstrukturen und damit dem Ermöglichen einer sensitiven Detektion auf Basis intrinsischer Eigenschaften der anorganischen Nanopartikel, könnten die Biomoleküle auch gleichzeitig eine therapeutische Funktion ausüben; wie etwa durch Rezeptorblockierung und der damit verbundenen Hemmung von Signalwegen oder in Form einer Antikörper-vermittelten Immuntherapie.^[7,129] Eine hohe Beladungsdichte der Nanopartikel mit Biomolekülen erlaubt die simultane Bindung mehrerer Zelloberflächenmarker. Durch diesen multivalenten Bindungseffekt kann eine erhöhte Bindungsaffinität sowie gleichzeitig auch eine Erhöhung der Selektivität erreicht werden.^[12,21,31,33,130] Die Bindungsstärke multivalenter, biokonjugierter Nanopartikel (Avidität) kann die Affinität freier Liganden übersteigen.^[130,131] Der Einsatz multivalent bindender Nanopartikel kann somit die Effizienz der Markierung der Zielstrukturen erhöhen.^[33] Allerdings gibt es Anzeichen dafür, dass eine hohe Bindungsaffinität in soliden Tumoren aufgrund der sogenannten „Bindungsstellen-Barriere“ („*binding-site-barrier*“) zu einer reduzierten Verteilung im Tumorgewebe führen kann.^[33,126] Die „Bindungsstellen-Barriere“ beschreibt den Effekt, dass Biomoleküle stark an die erste, nach Austritt aus dem Gefäßsystem erreichbare, komplementäre Bindungsstelle binden.^[30,126] Eine hohe Affinität zu der Zielstruktur kann weiterhin zu einer vermehrten Bindung an gesunde Zellen führen, wenn der Biomarker nicht spezifisch, sondern im Vergleich zu gesunden Zellen nur in erhöhtem Level auf der Oberfläche maligner Zielzellen exprimiert wird.^[41] Mit zunehmender Bindungsstärke des zielführenden

Biomoleküls kann das Ausmaß der aktiven Markierung von Zellen mit geringer Dichte des Oberflächenmarkers steigen.

Die Konjugation der Biomoleküle an die Nanopartikel kann durch nicht-kovalente oder direkte kovalente Bindung mittels Methoden der Kopplungschemie erfolgen. In Abbildung 2.4 ist eine Auswahl verschiedener Strategien zur Biofunktionalisierung von Nanopartikeln dargestellt.

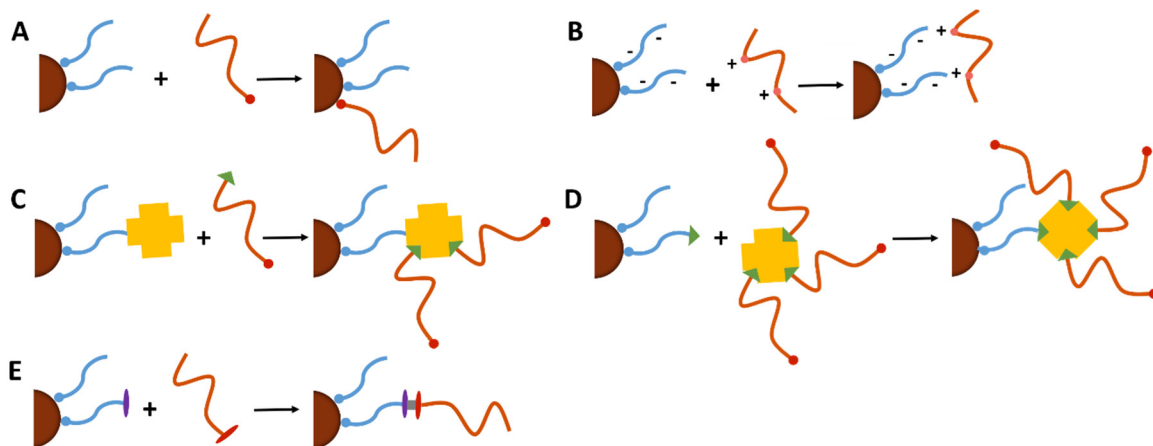


Abbildung 2.4: Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf der Oberfläche von Nanopartikeln. Biomoleküle können über dative Bindungen (A), elektrostatische Wechselwirkungen (B), spezifische Affinitätswechselwirkungen, wie etwa zwischen dem tetrameren Glykoprotein Avidin (gelb) und dem Vitamin Biotin (grün) (C und D (sind beide Reaktionspartner biotinyliert erfolgt die Konjugation über Avidin als Brückenmolekül)), oder durch direkte kovalente Bindungen (E) an die Nanopartikel gebunden werden. Abbildung nach^[21,132]

Nicht-kovalente Techniken für die Biokonjugation nutzen zum Beispiel dative Bindungen, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen sowie spezifische Affinitätswechselwirkungen. Durch Ausbildung einer dativen (koordinativen) Bindung kann eine direkte Koordination der biologischen Komponente an die native Oberfläche der anorganischen Nanopartikel erfolgen.^[21] Die Biomoleküle müssen hierfür eine metallkoordinierende Gruppe aufweisen, die eine hohe Affinität zur Nanopartikeloberfläche besitzt. Als Beispiel sei die hohe Affinität von Thiolen zu Gold (Thiol-Gold-Bindungsstärke: $\sim 126 \text{ kJ/mol}$ ^[133,134]) genannt:^[12,21,27,133,134] Proteine, welche die Aminosäure Cystein enthalten, können zum Beispiel direkt an die Oberfläche von Goldnanopartikeln binden; vorausgesetzt die Thiol-Gruppe des Cysteins ist für eine koordinative Bindung zugänglich. Die Bindungsstärke der im Vergleich zu einer direkten kovalenten Bindung schwachen dativen Bindung und damit die Stabilität der Biokonjugate kann durch multidentate Koordination unter Einsatz von Liganden mit einem Polythiol-Motiv erhöht werden.^[21,127] Ein Nachteil der direkten Koordination ist die mögliche Denaturierung der

Biomoleküle bei direktem Kontakt mit der nativen, ungeschützten Oberfläche und einem damit verbundenen Verlust der spezifischen, biologischen Aktivität.^[135]

Anstelle eine Bindung durch direkte Interaktion mit der nativen Partikeloberfläche einzugehen, kann das Biomolekül auch an eine passivierende Schicht auf der Nanopartikeloberfläche, zum Beispiel eine Polymerhülle, binden. Neben elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen kann als nicht-kovalentes Verfahren eine spezifische Affinitätswechselwirkung zur Immobilisierung genutzt werden. Hoch affine Bindungen basierend auf spezifischen Erkennungsreaktionen sind im Gegensatz zu elektrostatischen und hydrophoben Interaktionen nicht sensitiv gegenüber Umgebungsbedingungen wie etwa pH-Wert und Salzgehalt.^[135] Der Avidin-Biotin-Komplex stellt mit einer Assoziationskonstante von 10^{15} M^{-1} eine der stärksten nicht-kovalenten Interaktionen dar.^[21,127] Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein, jede Untereinheit kann ein Biotin-Molekül (Vitamin B7) binden.^[21] Die vier Bindungsstellen können wie in Abbildung 2.4 gezeigt die Anbindung mehrerer biotinylierter Biomoleküle an Avidin-funktionalisierte polymerumhüllte Nanopartikel oder an die ebenfalls biotinylierte Polymerhülle über Avidin als Brückenmolekül ermöglichen.^[21] Ein Problem des Avidin-Biotin-Systems stellt die mögliche Quervernetzung und Aggregation der Nanopartikel dar.^[21] Die Funktionalisierung der Nanopartikel sowie der zielführenden Biomoleküle mit Biotin oder Avidin kann durch kovalente Anbindungen erfolgen. Eine kovalente Bindung kann auch ohne den mehrstufigen Ansatz über einen Biotin-Avidin-Komplex direkt zwischen dem Biomolekül und der Polymerhülle erzeugt werden. In Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Biokonjugate ist eine direkte kovalente Bindung gegenüber einer nicht-kovalenten zu bevorzugen.^[135,136] Als Beispiel sei die Stabilität gegen kompetitive Verdrängung durch Komponenten des Blutserums, welche für nicht-kovalent gebundene Antikörper beobachtet wird, genannt.^[7] Die kovalente Bindung zur Herstellung stabiler Nanopartikel-Biokonjugate erfolgt über funktionelle Gruppen am distalen Ende der Polymerhülle und kopplungsfähigen Gruppen des Biomoleküls. Für die meisten terminalen Funktionen wie etwa Thiol-, Amin-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen erfolgt vor der Biofunktionalisierung eine Aktivierung unter Einsatz eines geeigneten Aktivierungsreagenz.^[135] Für Carboxylgruppen ist das Protokoll der sogenannten EDC-Kopplung (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid EDC) für die kovalente Anbindung an Amin-funktionalisierte Biomoleküle etabliert; Hydroxylgruppen können nach Aktivierung mit Bromcyan ebenfalls kovalent mit Aminen verknüpft werden.^[7,127,135] Natürliche Liganden verfügen meistens über

mehrere funktionelle Gruppen über welche eine kovalente Bindung erfolgen kann.^[21,127] Als Folge kann die Bindungsfähigkeit an die komplementäre Zielstruktur verringert werden oder unter Umständen komplett verloren gehen. Trotz vorbestimmter Affinität des Biomoleküls zum angezielten Oberflächenmarker kann die Bindungsaktivität durch kovalente oder auch nicht-kovalente Konjugation zum Beispiel durch sterische Hinderung beeinflusst werden.^[19]

Die Auswahl geeigneter, zielführender Biomoleküle erfolgt aufgrund der Kenntnis von Oberflächenmarker, welche Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden. Wirklich tumorspezifische Biomarker stehen nicht oder nur in extrem geringer Konzentration zur Verfügung.^[32] Als Zielstrukturen dienen daher meistens sogenannte tumorassoziierte Biomarker, welche nicht spezifisch, aber im Vergleich zu normalen Zellen in deutlich erhöhtem Level, in Tumorzellen exprimiert werden. An das Zielmolekül werden verschiedene Anforderungen gestellt: Idealerweise sollte es homogen und verstärkt (im Idealfall ausschließlich) auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert werden, es sollte *in vivo* zugänglich sein und es sollte keine Sekretion in den Blutkreislauf erfolgen.^[129]

Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sowie für Vitamine werden oft in schnell wachsenden Tumorgeweben überexprimiert; die Überexpression von Nährstoffrezeptoren dient der Aufrechterhaltung des erhöhten Metabolismus.^[33] Beispiele sind zellmembranassoziierte Rezeptoren für den Wachstumsfaktor EGF (Epidermale Wachstumsfaktor, *epidermal growth factor*) sowie für das Vitamin Folsäure. Der EGF-Rezeptor (auch bekannt als ERBB1^[124]) kann die Proliferation der Tumorzellen fördern und ist zum Beispiel im Ösophaguskarzinom (Speiseröhrenkrebs), sowie unter anderem in Lungen-, Brust-, Zungen-, Hals-, Nacken, Pankreas- und Kolorektalkrebs hochreguliert.^[5,33,124,129,137] Liganden mit einer Bindungsfähigkeit an diesen Rezeptor sind der Epidermale Wachstumsfaktor EGF sowie der Transformierende Wachstumsfaktor TGF (*transforming growth factor*). Als Zielsteuerungsmotiv kann auch ein gegen den EGF-Rezeptor (EGFR) gerichteter Antikörper eingesetzt werden.^[21,97,137–139] Ein Beispiel für einen anti-EGFR Antikörper, der auch bereits Anwendung in der Tumormimmuntherapie zur Ausschaltung der überexprimierten EGFR-Funktion findet, ist Cetuximab (Erbix[®]): Ein chimärer monoklonaler anti-EGFR Antikörper vom Typ IgG1, der 2004 durch die FDA zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen zugelassen wurde.^[7,12] Die Wirkweise beruht auf der Rezeptorblockierung und der damit verbundenen Hemmung der onkogenen Signalkaskade, die das Tumorzellwachstum und das Zellüberleben reguliert.^[129] Tumore weisen eine stark gesteigerte

Proliferationsrate auf. Um den damit verbundenen, hohen Bedarf an Folsäure zu decken wird der Folsäurerezeptor in vielen Tumorgeweben hochreguliert. Über diesen Rezeptor erfolgt die Internalisierung des Vitamins in die Zellen. Eine Überexpression des Folsäurerezeptors wurde bei einer Vielzahl humaner Tumorentitäten, unter anderem Ovarial-, Gebärmutterhals-, Brust-, Nieren- und Lungenkrebs, gefunden.^[4,33] Folsäure ist als zielführender Ligand geeignet, da sie stabil sowie im Allgemeinen nicht immunogen ist.^[140] Neben der Funktion von Folsäure als Tumormarker, konnte weiterhin eine Rezeptor-vermittelte, erhöhte Aufnahme Folsäuregebundener Nanopartikel in Tumorzellen gezeigt werden.^[31,140,141] Diese effiziente Internalisierung ist von besonderem Interesse für einen gezielten Wirkstofftransport in Tumorzellen, wenn der Wirkstoff im Inneren der Zelle freigesetzt werden soll. Eine weitere Zielstruktur auf der Oberfläche von Tumorzellen deren Expression mit der Stoffwechselrate korreliert ist der Transferrinrezeptor (Tfr). Dieser Rezeptor ist für die Aufnahme des Eisen-transportierenden Transferrins verantwortlich und stellt somit die Versorgung der Zellen mit Eisen sicher, weiterhin reguliert er auch das Zellwachstum.^[142] Eisen ist ein wichtiger Cofaktor der Ribonukleotid-Reduktase, welche in die DNA-Synthese sich schnell teilender Zellen involviert ist.^[142] Der erhöhte Eisenbedarf schnell proliferierender Tumorzellen kann somit zu der in verschiedenen Tumorentitäten gefundenen Überexpression dieses Rezeptors führen. Eine verstärkte Expression des Transferrinrezeptors wurde unter anderem für Pankreas-, Lungen-, Blasen- und Kolorektalkrebs bestätigt.^[33] Die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Transferrin kann ebenso wie die Konjugation mit Folat zu einer rezeptormediierten Aufnahme in die Tumorzellen führen.^[19,136,143] Transferrinrezeptoren befinden sich allerdings nicht nur auf der Zelloberfläche: Durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne des Rezeptors von der Zellmembran findet sich das abgespaltene Fragment, der sogenannte lösliche Transferrinrezeptor, in meist geringen Mengen auch im Blutkreislauf; wobei eine konstante Beziehung zwischen dem membranassoziierten Tfr-Gehalt und der Konzentration des löslichen Rezeptors im Serum besteht.^[144] Eine Herausforderung bei der Markierung von Tumorzellen durch das Ansteuern von Oberflächenmarkern, deren Expression mit der Stoffwechselrate korreliert, könnte in dem Umstand liegen, dass diese Rezeptoren unter anderem auch von proliferierenden gesunden Zellen, wie etwa Epithel- und Endothelzellen, stärker exprimiert werden.^[33,142]

Neben einer direkten Markierung der Tumorzellen kann auch das angiogenetische Tumorgefäßsystem mit hoher Affinität und Spezifität markiert werden. Dies erfolgt vor allem im

Rahmen vaskulärer Therapien. Im Folgenden wird daher kurz auf endotheliale Tumormarker eingegangen. Zu bekannten Tumorendothelmarkern gehören unter anderem zelluläre Oberflächenrezeptoren für Wachstumsfaktoren wie VEGF aber auch Integrine wie etwa $\alpha_v\beta_3$.^[145] Integrine sind Zelladhäsionsproteine und sind damit in eine Reihe von Prozessen, wie etwa Zell-Zell- oder auch Zell-Matrix-Wechselwirkungen, aber auch in die Signalübertragung und damit in die Zellproliferation sowie auch Differenzierung involviert.^[36] Das $\alpha_v\beta_3$ -Membranprotein wird nur auf proliferierenden Endothelzellen und damit in wachsenden oder in neu gebildeten Blutgefäßen (Neovaskulatur) stark überexprimiert, in ruhenden Endothelzellen etablierter Blutgefäße wird es hingegen kaum exprimiert.^[6] Ein Ligand dieses Tumorendothelmarkers ist beispielsweise das Tripeptid RGD.^[17,33,146] Eine Modifizierung mit dem RGD-Peptid als Zielsteuerungsmotiv kann neben der Bindung an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin eine Rezeptor-vermittelte zelluläre Aufnahme induzieren.^[146] Ein gegen das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gerichteter zielführender Ligand, welcher gleichzeitig auch Anwendung in der gezielten, antiangiogenen Therapie finden könnte, ist der monoklonale, humanisierte IgG1-Antikörper Etaracizumab (AbegrinTM).^[129,147] In *in vitro* sowie *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des Integrins durch Bindung des Antikörpers zu einer reduzierten Proliferation führt.^[147]

Da in dieser Arbeit das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM als Zielstruktur dient, wird dieser Tumorzellmarker im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

2.1.3.1 Das tumorassoziierte epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein.^[35,38] Da es von verschiedenen Forschungsgruppen unabhängig entdeckt wurde, existieren eine Reihe von Synonymen wie zum Beispiel MOC31, 17-1A, CD326, MK-1 - diese Bezeichnungen sind assoziiert mit der Spezifität monoklonaler Antikörper für das Oberflächenantigen; die Benennung erfolgt nach dem Antikörper^[36] - EGP-2 (epitheliale Glykoprotein-2, *epithelial glycoprotein-2*) und ESA (epitheliales Oberflächenantigen, *epithelial surface antigen*).^[36] 1979 wurde EpCAM mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 17-1A zum ersten Mal durch die Gruppe von Koprowski als Kolonkarzinom-spezifisches Antigen beschrieben.^[42,43,148] Ursprünglich wurde EpCAM aufgrund des hohen Expressionslevels in schnell proliferierenden Tumoren epithelialen Ursprungs als Karzinommarker identifiziert.^[36] EpCAM kommt aber nicht ausschließlich auf der Oberfläche

maligner Zellen vor, sondern wird in variablem, aber geringem Level auch in normalem Epithelgewebe exprimiert und gehört somit zu den sogenannten tumorassoziierten Antigenen.^[36] Unter den bekannten Zelloberflächenmarkern ist EpCAM eines der am häufigsten und intensivsten exprimierten, tumorassoziierten Antigene.^[39]

Anders als die meisten anderen Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecule* CAM), welche ein breites Expressionmuster in normalem Gewebe aufweisen und sich auf nahezu allen Zellen finden, ist die Expression von EpCAM in gesunden Individuen vor allem auf Epithelzellen beschränkt.^[36] Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül wird in nahezu allen adulten Epithelgewebe exprimiert mit Ausnahme des Plattenepithels sowie einiger Epithelzelltypen, wie zum Beispiel Hepatozyten (Leberepithelzellen).^[40,149] Neben der Expression in einer Reihe humaner Epithelgewebe wird EpCAM auch auf Vorläufer- und Stammzellen exprimiert:^[36,41] 2008 wurde EpCAM als Marker für humane embryonale Stammzellen identifiziert.^[41] Im Verlauf der Entwicklung verlieren allerdings viele Zellen ihre EpCAM-Expression: Hepatozyten sind zum Beispiel während der Embryonalentwicklung (Embryogenese) EpCAM-positiv, in der adulten Leber zeigt sich hingegen keine EpCAM-Expression.^[41]

Eine gesteigerte bzw. *de novo* EpCAM-Expression wurde für verschiedene Tumorentitäten epithelialen Ursprungs nachgewiesen. EpCAM wird unter anderem überexprimiert in Brust-, Pankreas-, Kolon-, Prostata- und Lungenkrebs.^[35,37-41,150] Während normale Leberepithelzellen EpCAM nicht exprimieren, konnte für hepatozelluläre Karzinome eine *de novo* EpCAM-Expression nachgewiesen werden.^[150] Ebenso zeigen zum Beispiel einige Plattenepithelkarzinome eine *de novo* Expression.^[150-153] Über den molekularen Mechanismus, der das Muster und das Ausmaß der EpCAM-Expression bestimmt, ist bisher wenig bekannt.^[36]

Tumorzellen epithelialen Ursprung weisen im Gegensatz zu normalen Epithelzellen eine hochregulierte Oberflächenexpression von EpCAM auf; ein weiterer Unterschied liegt in dem Ausmaß der Glykosylierung des transmembranen Glykoproteins. Bedingt durch die differentielle N-Glykosylierung weist EpCAM ein heterogenes Molekulargewicht von 35-42 kDa auf.^[154] EpCAM ist in gesunden Epithelgewebe meist schwach glykosyliert, in Tumorgewebe liegt es hingegen hyperglykosyliert vor.^[154] Unterschiedliche Funktionen sowie unterschiedliche Gewebeaffinitäten der verschiedenen glykosylierten Formen sind bisher noch nicht beschrieben.^[154] Die Unterschiede in der Glykosylierungsform von EpCAM in autologen gesunden sowie malignen Gewebe könnten unter Verwendung von Antikörpern, welche spezifisch

hyperglykosylierte EpCAM-Moleküle erkennen, evtl. genutzt werden, um die Oberfläche von Tumorzellen mit hoher Spezifität zu markieren.^[154] Ein weiterer Unterschied zwischen gesunden Epithelien und Karzinomen liegt in der Lokalisation des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls: In normalem Epithelgewebe wird EpCAM an der basolateralen Membran exprimiert, des Weiteren interagiert EpCAM auf normalen Zellen mit anderen Proteinpartnern, wie dem „tight-junction“-Protein Claudin-7, CD9 sowie CD44.^[39,41] Die vorrangige Lokalisation im interzellulären Raum, sowie die Komplexbildung bedingen eine geringe Zugänglichkeit für anti-EpCAM Antikörper.^[39,42] In Tumorzellen wird EpCAM hingegen homogen über die Zelloberfläche exprimiert.^[42] Weiterhin kann die Überexpression des Zelladhäsionsmoleküls dazu führen, dass EpCAM nicht ausschließlich in komplexierter Form vorliegt, so dass infolge der Zugang für gegen EpCAM-gerichtete Antikörper gewährleistet wird.^[39,41]

Neben der *in vivo* Zugänglichkeit konnte weiterhin demonstriert werden, dass EpCAM nicht im Serum detektierbar ist und somit keine signifikante Sekretion in den Blutkreislauf erfolgt.^[37,155] Sekretierte Antigene könnten Antikörper im Blutkreislauf binden und so in Abhängigkeit der sekretierten Antigenmenge die Bindung des Antikörpers an den Zieltumor verhindern.^[129]

3 Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und ihres superparamagnetischen Verhaltens, sowie aufgrund ihrer geringen Größe und der damit verbundenen großen spezifischen Oberfläche, bieten Eisenoxid-Nanopartikel ein großes Potential für verschiedene biomedizinische Anwendungen sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie.^[6,9,12,19,21–23,26]

Die große Oberfläche der Nanopartikel bietet die Möglichkeit der Anbindung diagnostischer, therapeutischer oder biologisch aktiver, zielführender Komponenten.^[4,9,12,32,33] Diese multifunktionalen Nanopartikel bieten Potential für Verbesserungen in der biomedizinischen Wissenschaft. Die Zukunft im Bereich der Eisenoxid-Nanopartikel unterstützten magnetographischen Diagnostik von Tumorerkrankungen liegt in der Anwendung spezifischer Kontrastmittel für die Visualisierung krankheitsspezifischer Biomarker auf dem molekularen Level zur Erhöhung der Früherkennungsrate. Wie in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt bestehen nanopartikuläre Eisenoxid-Kontrastmittel für die molekulare MRT-Bildgebung aus drei Komponenten.^[9] Der superparamagnetische Eisenoxid-Kern beeinflusst den Relaxationsprozess umgebender Protonen durch Erzeugung von mikroskopischen Feldinhomogenitäten im Bereich der Akkumulation und ermöglicht die Kontrastierung und damit die Detektion nach Anreicherung im Zielgewebe. Die Oberfläche der anorganischen Nanopartikel wird mit einer passivierenden hydrophilen Schicht modifiziert um eine hohe Biokompatibilität, eine hohe kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen sowie eine hohe Biorepulsivität (biorepulsiv bedeutet resistent gegen beispielsweise unspezifische Proteinadsorption) und infolge eine lange Zirkulationszeit im kardiovaskulären System zu erreichen. Die Beschichtung verfügt über funktionelle Gruppen, welche auf der Oberfläche präsentiert werden und nachfolgend kovalent an kopplungsfähige Gruppen eines Biomoleküls gebunden werden können. Diese bioaktive Komponente erlaubt die spezifische Anbindung an komplementäre, krankheitsspezifische Zelloberflächenmarker.

Die Konjugation von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln mit einem zielspezifischen Biomolekül erzeugt ein Produkt, in welchem das einzigartige magnetische Verhalten des nanopartikulären, anorganischen Kerns mit den spezifischen Erkennungsfähigkeiten der bioaktiven Komponente kombiniert werden.^[7,12,19,21,127] Diese Konstrukte sind in der Lage die Nanopartikel zielgerichtet und selektiv zu Tumorzellen zu führen und spezifisch mit hoher

Affinität an diese zu binden. Sie bieten ebenso die Möglichkeit für einen höchst empfindlichen Nachweis maligner Zellen.

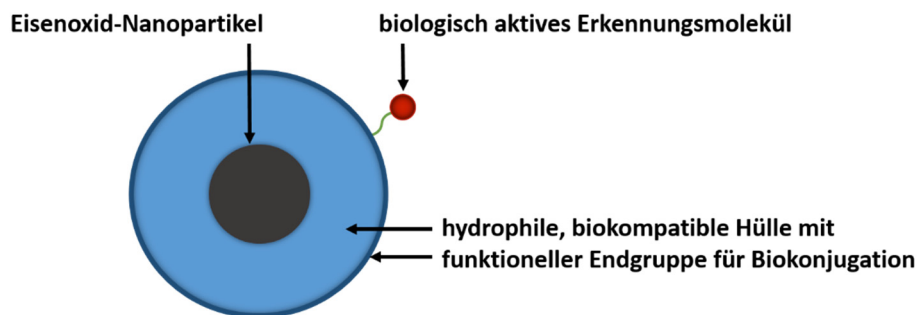


Abbildung 3.1: Multifunktionale Eisenoxid-Nanopartikel für die molekulare Bildgebung mittels MRT. Nanopartikel für die molekulare MRT-Bildgebung sind aus drei Komponenten aufgebaut: Dem superparamagnetischen, anorganischen Kern, der eine Signalveränderung im Bereich der Partikelakkumulation induziert, und damit die Möglichkeit zur Detektion gewährleistet. Einer wasserlöslichen Hülle, die den anorganischen Nanopartikeln Stabilität und Kompatibilität in biologischer Umgebung sowie eine lange Zirkulationszeit im Blutkreislauf verleiht und welche weiterhin eine reaktive funktionelle Gruppe am distalen Ende aufweist, über welche ein Biomolekül kovalent gebunden werden kann. Das Biomolekül stellt die Anbindung an maligne Zielzellen auf Basis eines spezifischen Erkennungsprozesses, wie zum Beispiel zwischen Antikörper und Antigen, sicher. Abbildung nach^[9]

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die kovalente Anbindung eines anti-EpCAM Antikörpers an Polyethylenglykol-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel.

Die Ergebnisse sind in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Abschnitt (3.1) wird auf die Synthese und die anschließende Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel mit maßgeschneiderten Polyethylenglykol-Liganden eingegangen: Es wird die umfassende Charakterisierung der Polyethylenglykol-Liganden und der Nanopartikel vor sowie insbesondere nach der Oberflächenmodifikation dargestellt. Im zweiten Abschnitt (3.2) werden die Ergebnisse der Aktivierungsreagenz-vermittelten Kopplung der PEG-stabilisierten Nanopartikel an den monoklonalen anti-EpCAM Antikörper MOC31 diskutiert.

3.1 Synthese und hydrophile Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel

Konventionelle negative Kontrastmittel bestehen aus polydispersen aggregierten Eisenoxid-Kernen geringer Kristallinität, mit einer stabilisierenden Beschichtung aus Dextran oder Carboxydextran. Die breite Teilchengrößenverteilung sowie der hohe Aggregationsgrad resultieren aus den Synthesebedingungen. Die Herstellung erfolgt durch Co-Präzipitation einer

wässrigen Lösung von Fe(II)- und Fe(III)-Salzen bei Raumtemperatur in Gegenwart eines Stabilisators und bedingt eine schwierig zu kontrollierende Größe sowie Größenverteilung.^[9,12,18] Die Größe hat einen entscheidenden Einfluss auf die magnetischen und damit kontrastgebenden Eigenschaften der Nanopartikel. Auf diesen Punkt wird kurz im Rahmen der Untersuchung der kontrastgebenden Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel eingegangen (3.1.3.1). Weiterhin zeigen auch die Blutzirkulationszeit und infolge die Bioverteilung und der Wirkungsort eine starke Größenabhängigkeit (2.1.1, 2.1.2). Eine hohe Monodispersität und damit eine enge Größenverteilung stellen somit eine Grundvoraussetzung für eine gezielte Anwendung der Nanopartikel dar. Die intrinsischen Materialeigenschaften, wie die chemische Zusammensetzung und die Kristallinität, als auch die extrinsischen Materialeigenschaften, wie die Morphologie, die Größenverteilung und der Aggregationsgrad (im Idealfall wird eine Aggregation vollständig verhindert), und somit die Güte der späteren Funktion werden im Syntheseverlauf geprägt. Der gezielte Zugang zu monodispersen Nanopartikeln mit genau einstellbaren, reproduzierbaren Eigenschaften erfordert präzise Synthesestrategien: Qualitativ hochwertige Nanopartikel können mittels Hochtemperatursynthesen in hochsiedenden, chemisch inerten Lösungsmitteln in Gegenwart von hochmolekularen, organischen Stabilisatoren dargestellt werden.^[6,12,17,156-160] Aufgrund der Synthesebedingungen weisen die Partikel eine stabilisierende, hydrophobe Oberflächenbeschichtung auf. Anders als die auf dem Markt befindlichen, durch wässrige Synthese hergestellten eisenbasierten Nanopartikel sind sie damit nicht geeignet für direkte biologische Anwendungen. Hydrophobe Partikel aggregieren unter physiologischen Bedingungen und werden daher schnell und unspezifisch durch das MPS erkannt.^[12,49] Weiterhin weisen hydrophobe Partikel einen hohen Bedeckungsgrad mit Plasmaproteinen auf; wobei hydrophobe Oberflächen gleichzeitig verstärkt zu konformativen Änderungen der adsorbierten Proteine führen.^[12,23,55,69,70] Der nächste Schritt für eine biomedizinische Anwendung stellt daher die Oberflächenmodifizierung der Partikel dar. Diese ermöglicht kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen und eine Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften. Im Falle von Nanopartikeln wird auch von einer „Partikokinetik“ gesprochen.^[161] Zudem kann durch anschließende Konjugation von biologischen Erkennungsmolekülen Funktionalität erreicht werden. In dieser Arbeit erfolgte der Phasentransfer durch Austausch der nativen hydrophoben Stabilisatoren gegen hydrophile, biokompatible

Liganden. Als stabilisierendes Polymer hat sich PEG aufgrund einer Reihe günstiger Eigenschaften für medizinische und biologische Anwendungen bewährt (2.1.1.1).

3.1.1 Hochtemperatursynthese und Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel

Um eine hohe Qualität der Nanopartikel zu gewährleisten wurden diese durch organometallische Hochtemperatursynthesen unter Verwendung von Ölsäure als Stabilisator hergestellt. Die qualitative Beschreibung der Bedingungen, unter denen größeneinheitliche Partikel erhalten werden, kann durch das Modell von LaMer und Dinegar^[162] erfolgen: Die Theorie von Nukleation und Wachstum wurde 1950 für den Bildungsprozess von monodispersen Schwefel-Hydrosolen aufgestellt und ist heute etabliert zur Beschreibung vieler Reaktionen bei denen monodisperse Kolloide, einschließlich kolloidaler Nanopartikel, entstehen. Nach diesem Modell erfolgen Keimbildung und Wachstumsprozess in drei Phasen (Abb. 3.2).

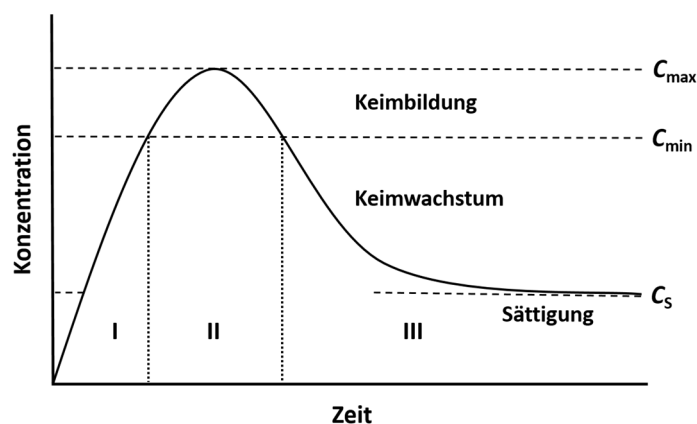


Abbildung 3.2: Modell von LaMer und Dinegar zur Beschreibung von Keimbildung und Wachstum. Der Bildungsprozess von Kolloiden kann in eine Nukleations- (II) und eine Wachstumsphase (III) eingeteilt werden. Die Theorie von Nukleation und Wachstum ist der Grundstein um monodisperse Nanopartikel zu erhalten: Es gilt der Zusammenhang von hoher Monodispersität und schneller, getrennt von der Wachstumsphase stattfindender Keimbildung. Abbildung nach^[20]

In Phase I erfolgt die Bildung der aktiven Monomereinheit. Bei dieser wird davon ausgegangen, dass es sich unabhängig von der Natur des verwendeten Eisenprecursor um ein Intermediat handelt, welches durch thermische Zersetzung eines Eisenoleat-Komplexes erhalten wird.^[157,163] Der Komplex wird *in situ* aus initialem Eisenprecursor und Ölsäure-Stabilisator gebildet.^[157,163] Die Konzentration an Monomer C steigt linear bis zum Erreichen des sogenannten kritischen Grenzwertes der Übersättigung C_{\min} an. Ist die kritische Konzentration an Monomer überschritten

entstehen Kristallisationskeime. Die spontane Bildung dieser Keime erfolgt in Phase II und führt zu einer allmählichen Aufhebung der Übersättigung. Sinkt die Monomerkonzentration in Folge des endothermen Nukleationsprozesses unter C_{\min} werden keine weiteren Keime mehr gebildet. Im weiteren Verlauf kommt es durch Anlagerung von freiem, im Verlauf der Nukleation nicht verbrauchtem Monomer an die Nukleationskeime zu einem exothermen Wachstum der gebildeten Keimzentren (Phase III).

Um eine enge Größenverteilung zu erhalten, ist eine effektive Trennung von Nukleation und Kristallwachstum erforderlich, weiterhin muss die Nukleation kurz gehalten werden, gefolgt von einer langsamen, kontrollierten Wachstumsphase.^[6,162-164] Synthesen von Eisenoxid-Nanopartikeln sind vor allem Aufheizsynthesen, bei denen alle Reaktanden vorgelegt und das Gemisch kontrolliert aufgeheizt wird. Eine parallel zum Wachstum erfolgende, langsame Bildung von Nukleationskeimen bedingt eine breite Teilchengrößenverteilung; früh entstandene Nukleationskeime wachsen länger und somit zu größeren Partikeln als spät entstandene. Das gleichzeitige Sattfinden beider Prozesse kann vermieden werden, wenn beide bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgen.^[163,165] Durch Erhöhung der Temperatur der Reaktionsmischung setzt zunächst die Monomerbildung ein: Mit steigender Temperatur steigt die Konzentration an Monomer bis eine starke Übersättigung erreicht wird, welche unmittelbar und ausschließlich durch gleichzeitige Bildung einer großen Anzahl an Nukleationskeimen abgebaut wird.^[12,164] Als Konsequenz sinkt die Monomerkonzentration drastisch. Durch Einstellen einer Temperatur, bei der die Bildung der Monomere langsamer oder mit derselben Rate erfolgt wie deren Anlagerung an die Nukleationskeime, wird der Zustand der Übersättigung nicht mehr erreicht und eine weitere Keimbildung ist nicht mehr möglich.^[164] Die Größenverteilung der Partikel wird durch die kurze, von dem kontrollierten, langsamen Teilchenwachstum getrennte Nukleationsphase eingeschränkt.

Die Abnahme des Monomeranteils im Verlauf der Wachstumsphase kann mit zunehmender Reaktionszeit zu dem Prozess der sogenannten Ostwald-Reifung führen.^[19,157,166,167] Wachstum durch Ostwald-Reifung setzt voraus, dass die Anlagerung des Monomers an die gebildeten Nukleationskeime reversibel erfolgen kann.^[168] Kleine Partikel lösen sich infolge ihrer höheren Oberflächenenergie auf, und freigesetzte Monomere lagern sich an größere Partikel an.^[6,19,167,168] Die Ostwald-Reifung führt zu einer Zunahme der Partikelgröße und Verbreiterung der Größenverteilung.^[166,167] Neben dem Wachstum durch Anlagerung von freiem Monomer oder

Ostwald-Reifung kann Wachstum auch durch Zusammenschluss mehrerer Partikel erfolgen; hierbei handelt es sich um einen aggregativen Wachstumsmechanismus. Aufgrund ihrer großen spezifischen Oberfläche ist der Einfluss der Oberfläche bei nanopartikulären Systemen bedeutend. Nanopartikel weisen infolge der mit ihrer geringen Größe verbundenen hohen Oberflächenenergie eine inhärente, ausgeprägte Tendenz zur Aggregation auf.^[12,20] Die thermodynamische Triebkraft ist die Verringerung der Oberfläche und die entstehenden chemischen Bindungen.^[169] Um den Prozess der Aggregatbildung zu unterbinden werden repulsive Kräfte, die zum Beispiel elektrostatischer oder sterischer Natur sein können, zwischen den Partikeln benötigt. Repulsive Wechselwirkungen können durch Beschichtung der anorganischen Nanopartikel mit organischen Oberflächenmolekülen erreicht werden.^[12,19,20,156,170] Eine sterische Stabilisierung wird durch Verwendung langkettiger und damit sterisch anspruchsvoller Oberflächenmoleküle vermittelt. Im Rahmen der durchgeführten Synthesen wurde Ölsäure verwendet. Ölsäure ist der am häufigsten eingesetzte Stabilisator für Metalloxid-Nanopartikel.^[12,170] Wie in Abbildung 3.3 gezeigt weist die Ölsäure eine metallaffine Carbonsäure-Gruppe sowie eine lange, hydrophobe Alkylkette auf. Die Carbonsäure-Gruppe interagiert mit der Metalloberfläche überwiegend in Form koordinativer Bindungen (aus der schematischen Darstellung geht die Bindungsform nicht hervor).^[12,133] Die durch die Alkylketten vermittelte Stabilisierung basiert auf sterischer Hinderung, die Abschirmung der Nanopartikel verhindert nicht nur Aggregation sondern kann auch Schutz vor Oxidation und anderen unerwünschten Reaktionen an der Oberfläche vermitteln. Weiterhin verleihen die ungesättigten Kohlenwasserstoffketten den Nanopartikeln kolloidale Löslichkeit in hydrophoben Lösungsmitteln wie etwa Chloroform und Hexan.

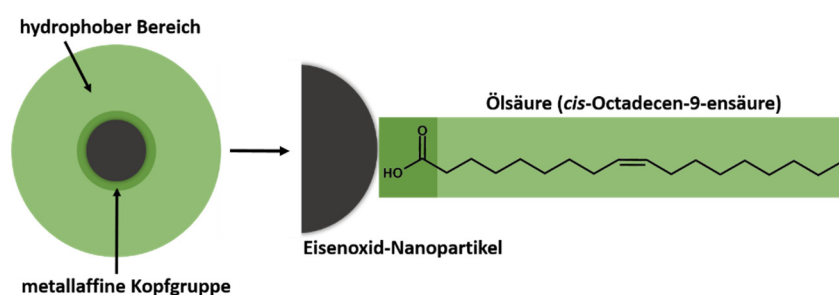


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung Ölsäure-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel. Der Stabilisator bindet über die Carboxylgruppe fest an die Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel. Die langen, hydrophoben Alkylketten sind dem Lösungsmittel ausgesetzt und verleihen den anorganischen Partikeln Löslichkeit in unpolaren, organischen Medien. Des Weiteren bilden sie eine organische Schutzhülle, die die Partikel gegen Oxidation schützt, sowie sterisch gegen Aggregation stabilisiert.

Die stabilisierenden Moleküle koordinieren nicht nur an die Oberfläche der Nanopartikel, sondern auch an die Oberfläche der Nukleationskeime.^[6,167] Die Anlagerung muss dabei reversibel erfolgen, um ein Wachstum zu ermöglichen. Die Stabilisatormoleküle bilden weiterhin Komplexe mit der reaktiven Monomer-Einheit.^[6,167] Über die Wahl des Stabilisators ist somit eine Größenkontrolle möglich. Die Regulation der Partikelgröße kann dabei über die metallaffine Gruppe erfolgen; eine starke Anbindung an die Oberfläche verlangsamt das Wachstum.^[6,164] Außerdem kann eine Regulation über das Ausmaß der sterischen Hinderung der Stabilisatoren erfolgen; kurzkettige Stabilisatoren ermöglichen ein schnelleres Wachstum.^[6,164] Die Partikelgröße ist weiterhin durch die einfache Variation weiterer Syntheseparameter, wie etwa der Reaktionszeit, der Reaktionstemperatur, des Reaktionsvolumens als auch des initialen Verhältnisses Precursor-zu-Stabilisator, kontrollierbar.^[164] Als Beispiel seien im Folgenden kurz die Parameter Reaktionszeit und Reaktionsvolumen genauer genannt. Je länger die Wachstumsphase, desto größer werden die Partikel. Es muss beachtet werden, dass mit zunehmender Reaktionsdauer und damit mit abnehmendem Monomergehalt der Prozess der Ostwald-Reifung wahrscheinlicher wird.^[157] Je größer das Reaktionsvolumen (bei unveränderter Precursor- sowie Stabilisatormenge), desto kleiner werden die Partikel.^[171] Mit zunehmendem Volumen sind mehr Keime notwendig um eine Übersättigung zu erreichen.^[171] Die größere Keimzahl und die durch diese bedingte geringere Menge an freiem Monomer in der Wachstumsphase führen zu einer Abnahme der Partikelgröße. Nach einem abgewandelten Protokoll von Yu *et al.*^[157] wurden kristalline, monodisperse, formkontrollierte Eisenoxid-Nanopartikel synthetisiert. Die Analyse der Qualität (definierte Morphologie, hohe Monodispersität, geringer Aggregationsgrad, Kristallinität) der Ölsäure-stabilisierten Nanopartikel erfolgte zunächst unter Anwendung folgender Standard-Charakterisierungsmethoden: Der Transmissionselektronenmikroskopie (*transmission electron microscopy* TEM), der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering* DLS) sowie der Pulver-Röntgendiffraktometrie (*powder X-ray diffraction* XRD).

Aus der Analyse mittels TEM können die Größe bzw. die Größenverteilung der anorganischen Nanopartikel sowie ihre Morphologie bestimmt werden. Abbildung 3.4 zeigt repräsentative TEM-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung einer Charge Ölsäure-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel sowie die Auftragung der Häufigkeit der Partikeldurchmesser. Es handelt sich hierbei um den Durchmesser der anorganischen Kerne, da die organischen Stabilisatoren keinen signifikanten Kontrast verursachen und daher bei der Vermessung nicht berücksichtigt werden.

Die statistische Auswertung des Partikeldurchmessers erfolgte durch die Auszählung von ~ 180 Partikeln auf verschiedenen TEM-Aufnahmen. Aus der TEM-Analytik geht hervor, dass die Eisenoxid-Nanopartikel einen mittleren Durchmesser von 10.5 nm aufweisen und einheitlich in Größe sowie Morphologie sind. Es werden uniforme, ausschließlich sphärische Partikel mit einer Standardabweichung von weniger als 6% erhalten.

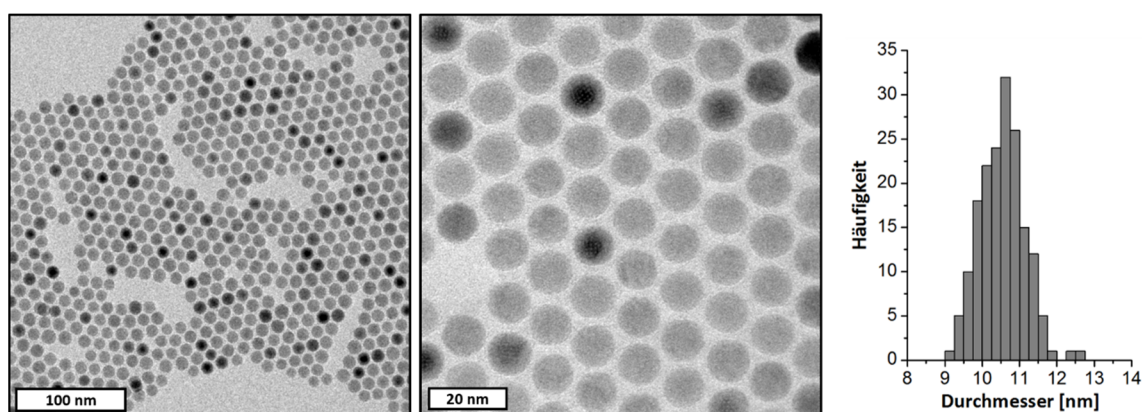


Abbildung 3.4: TEM-Analyse Ölsäure-stabilisierter, monodisperser Eisenoxid-Nanopartikel. Gezeigt sind repräsentative TEM-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung sowie die Häufigkeitsverteilung aus der Auswertung mehrerer TEM-Aufnahmen. Die Übersichtsaufnahmen und die Häufigkeitsverteilung belegen eine enge Teilchengrößenverteilung und hohe Uniformität der Nanopartikel. Aufgrund der hohen Monodispersität ordnen sich die Partikel in einer hexagonal dicht gepackten Überstruktur an. Die sphärischen Partikel weisen einen mittleren Durchmesser von 10.5 nm mit einer Standardabweichung von weniger als 6% auf.

Die TEM-Aufnahmen aus Abbildung 3.4 zeigen gleichmäßig auf dem Probenträger verteilte, separierte Nanopartikel; es scheinen keine Aggregate als Kontamination aufzutreten. Eine weitere Methode zur Bestimmung der Größenverteilung und damit zum Ausschluss des Vorhandenseins von Aggregaten ist die dynamische Lichtstreuung. Die DLS-Messung erfasst gegenüber der TEM-Analyse eine wesentlich größere Zahl an Partikel und repräsentiert damit statistisch gesehen besser die gesamte Probe.^[169] Weiterhin wird bei der Präparation von TEM-Proben die Kolloidlösung auf dem Probenträger eingetrocknet, die DLS-Messung erfolgt hingegen direkt aus der kolloidalen Lösung. Die DLS-Messung spiegelt damit direkt das Verhalten in Lösung und nicht evtl. Eintrocknungseffekte wieder. Dies wäre vor allem dann relevant, wenn durch das Eintrocknen Aggregate entstünden. DLS-Messungen liefern den sogenannten hydrodynamischen Durchmesser. Der hydrodynamische Durchmesser ist die scheinbare Größe eines dynamisch hydratisierten/solvatisierten Teilchens.^[17] Die dynamische Lichtstreuung nutzt die Brown'sche Molekularbewegung der suspendierten Partikel um Aussagen über die hydrodynamische Partikelgröße bzw. die Größenverteilung zu machen.^[172] Es wird die Fluktuation der Intensität des

gestreuten Lichts erfasst.^[169] Diese Fluktuationen erfolgen dabei umso schneller, je schneller sich das streuende Partikel bewegt und damit je kleiner das Partikel ist. Um aus dem zeitlichen Verhalten der Fluktuation Aussagen über die Partikelgröße zu machen wird die Autokorrelationsfunktion der Intensitätsschwankungen betrachtet. Der exponentielle Abfall dieser Funktion wird von dem Diffusionskoeffizient D bestimmt. Aus diesem kann nach der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius der Partikel ermittelt werden.^[172]

Der intensitätsgewichtete mittlere hydrodynamische Durchmesser der Ölsäure-stabilisierten Partikel beträgt ~ 16 nm. Für einfache Beschichtungen entspricht die Dicke der Ligandenhülle in etwa der Länge der Stabilisatormoleküle; bei längeren, komplexeren Molekülen muss der Einfluss der Konformation des Moleküls auf der Partikeloberfläche berücksichtigt werden.^[173] Der ermittelte hydrodynamische Durchmesser von 16 nm entspricht in etwa der Summe aus dem anorganischen Kern (10.5 nm) und der organischen Beschichtung (Länge der Ölsäure-Moleküle: 2 nm^[174]). Die aus den DLS-Messungen erhaltene Größenverteilung ist an dieser Stelle nicht gezeigt (siehe hierzu Abbildung 3.13). Die Ölsäure-stabilisierten Partikel zeigen keine Anzeichen von Aggregation: Die Partikel weisen einen erwartungsgemäßen hydrodynamischen Durchmesser auf und die DLS-Profile zeigen eine enge Teilchengrößenverteilung. Die untersuchten kolloidalen Lösungen zeigten auch über eine längere Lagerung bei Raumtemperatur keine Anzeichen von Sedimenten.

Mittels Röntgendiffraktometrie kann die kristalline Größe anhand der Auswertung der XRD-Reflexe mit Hilfe der Scherrer-Theorie bestimmt werden. Damit können unter Berücksichtigung der Ergebnisse der statistischen TEM-Größenanalyse Aussagen über die Kristallinität gemacht werden. Die Kristallinität hat Einfluss auf die Sättigungsmagnetisierung M_s und damit die kontrastgebenden Eigenschaften. Eine Kristallstruktur mit vielen Defekten reduziert den M_s -Wert.^[23] Die transversale Relaxivität r_2 beschreibt die Verkürzung der transversalen Relaxationszeit pro Konzentrationseinheit und damit die Fähigkeit der Eisenoxid-Nanopartikel den transversalen Relaxationsprozess umgebender Protonen zu beeinflussen. Die r_2 -Relaxivität wird direkt über die Sättigungsmagnetisierung bestimmt: Je größer M_s desto größer ist r_2 .^[5] Mittels Röntgenbeugung kann weiterhin eine Phasenanalyse erfolgen. Eisenoxid kann in verschiedenen chemischen Zusammensetzungen vorliegen. Als Beispiel seien Eisen(III)-Oxid mit der Summenformel Fe_2O_3 oder Eisen(II,III)-Oxid mit der Summenformel Fe_3O_4 , welche als natürlich vorkommende Mineralien auch unter den Namen Maghemit und Magnetit bekannt sind, genannt. Abbildung 3.5

zeigt das nach Untergrundkorrektur erhaltene Röntgendiffraktogramm der 10.5 nm großen Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Partikel im Vergleich mit den charakteristischen Reflexen von makroskopischem Maghemit sowie Magnetit. Weiterhin ist eine Vergrößerung des Winkelbereichs zwischen 40° und 45° sowie 60° und 65° als Ausschnitt gezeigt. Die Untergrundkorrektur erfolgt um die intensive Eisen-Röntgenfluoreszenz, welche bei der verwendeten Strahlung auftritt, zu kompensieren.

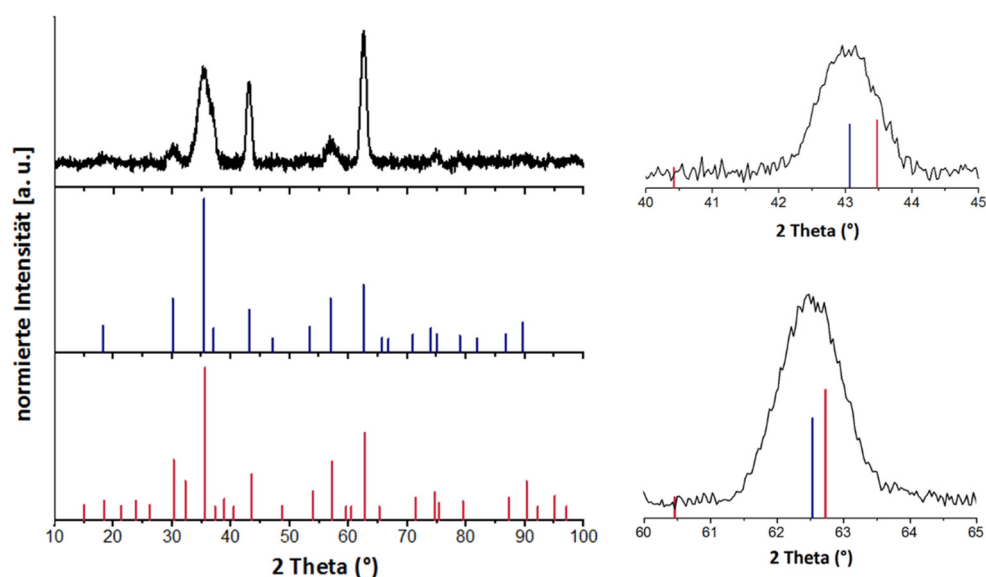


Abbildung 3.5: Röntgendiffraktogramm Ölsäure-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel. Gezeigt ist das Röntgendiffraktogramm von 10.5 nm großen Eisenoxid-Nanopartikeln, sowie zum Vergleich die Reflexe des Maghemit- (rot) und des Magnetit-Festkörpers (blau), welche der JCPDS-Datenbank (JCPDS-Referenznummer 00-024-0081 sowie 01-074-0748) entnommen wurden. Die Reflexe höchster Intensität der makroskopischen Referenzen liegen dicht beieinander und erschweren die genaue Zuordnung der verbreiterten Probenreflexe. Zur besseren Unterscheidung werden die Reflexe bei $\sim 43^\circ$ und $\sim 63^\circ$ genauer betrachtet. Aus den Ausschnitten des Röntgendiffraktogramms der Nanopartikel ist eine bessere Übereinstimmung mit den Reflexen des Magnetit-Festkörpers zu erkennen. Die über die Scherrer-Gleichung aus der Reflexverbreiterung (bei $\sim 63^\circ$) näherungsweise bestimmte kristalline Teilchengröße von ~ 9 nm stimmt gut mit der aus der statistischen TEM-Analyse ermittelten Größe überein. Dies deutet auf eine weitestgehend einheitliche Kristallstruktur und wenig amorphe Bereiche hin.

Die kristallspezifischen Reflexe der Nanopartikel sind im Vergleich zu denen der makrokristallinen Festkörper nicht scharf sondern weisen eine, auf die nanokristalline Natur zurückzuführende, größenabhängige Verbreiterung auf. Die Reflexverbreiterung erschwert zusätzlich die Unterscheidung der strukturell sehr ähnlichen Eisenoxid-Modifikationen, welche vergleichbare Gitterparameter ($a_{\text{Magnetit}}: 8.396 \text{ \AA}^{[23]}$, $a_{\text{Maghemit}}: 8.346 \text{ \AA}^{[23]}$) und damit Beugungsreflex-Positionen aufweisen: Die Reflexe höchster Intensität liegen dichter beieinander als die Linienverbreiterung der Nanopartikel. Die Probenreflexe bei etwa 43° und 63° besitzen eine hohe Intensität und unter ihnen liegt jeweils nur ein Reflex jeder Referenz. Werden diese Reflexe

genauer betrachtet, zeigt sich eine bessere Übereinstimmung mit den Reflexen der kubischen Spinell-Kristallstruktur des Magnetits. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass es sich bei den synthetisierten Partikeln um Magnetit-Nanopartikel handelt. Die aus der Halbwertsbreite des Reflexes bei etwa 63° (Reflex [440]^[175]) unter Verwendung der Debye-Scherrer-Gleichung näherungsweise berechnete Größe beträgt ~ 9 nm. Der mittels des Scherrer-Verfahrens bestimmte Teilchendurchmesser bezieht sich naturgemäß nur auf kristalline Bereiche; Gitterfehler und amorphe Bereiche werden im Gegensatz zur statistischen TEM-Analytik nicht mit einbezogen. Eine starke Abweichung zwischen den ermittelten Größen deutet auf Polykristallinität oder amorphe Bereiche. Die gute Übereinstimmung zwischen kristalliner und tatsächlicher Größe deutet darauf hin, dass die Nanopartikel eine weitestgehend einheitliche Kristallstruktur und wenig nichtkristalline Bereiche aufweisen.

Durch thermische Zersetzung eines Metallprecursors bei hohen Temperaturen in organischem Medium in Gegenwart von Ölsäure als Stabilisator konnten somit Eisenoxid-Nanopartikel mit hoher Qualität hinsichtlich Monodispersität, Uniformität und Kristallinität erhalten werden.

3.1.2 Hydrophile Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel

Der Phasentransfer der Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte durch den Austausch der hydrophoben Stabilisatoren gegen hydrophile, biokompatible Liganden. Das verwendete Ligandensystem muss dabei verschiedene Anforderungen erfüllen: Die Liganden müssen über zwei endständige Funktionalitäten verfügen: Eine funktionelle Gruppe, welche eine hohe Affinität zu den Nanopartikeln aufweist und eine starke Anbindung an deren Oberfläche ermöglicht; die sogenannte Ankergruppe. Sowie eine weitere funktionelle Gruppe in der äußeren Sphäre der Ligandenschicht, welche verfügbar für die im Anschluss an den Phasentransfer erfolgende kovalente Biokonjugation bleibt. Zwischen der Oberflächen-koordinierenden Gruppe und der funktionalisierbaren Endgruppe befindet sich eine Sequenz, welche Wasserlöslichkeit, kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen sowie Biorepulsivität und damit eine hohe Bluthalbwertszeit und infolge eine weitreichende Bioverteilung vermittelt.

Im Vergleich zu anderen Nanopartikeln weisen Metalloxid-Nanopartikel relativ unreaktive Oberflächen auf, daher ist eine vergleichsweise geringe Anzahl an funktionellen Gruppen für eine Anbindung vorhanden.^[9] Für die chemische Anbindung an die Oberfläche von Eisenoxid-

Nanopartikeln werden Sauerstoff-haltige Liganden favorisiert.^[12] Einfache Alkohole sind schwach bindende Funktionalitäten für Eisenoxide, Diole weisen hingegen eine erhöhte Bindungsstärke auf.^[21] Unter den Diolen weisen die Catechol-Derivate hohe Affinitäten zu Eisenoxid-Oberflächen auf; die Ausbildung eines starken, bidentaten Komplexes führt zu stabilen kolloidalen Dispersionen.^[21] Catechole sind anfällig für Oxidation und Degradierung.^[12,21] Daher neigen Catechol-Eisenoxid-Komplexe unter physiologischen Bedingungen zu Dissoziation und somit zu kolloidaler Instabilität.^[21] Weitere Beispiele von Ankergruppen, welche hohe Bindungsstärken zur Eisenoxid-Oberfläche aufweisen, sind Carboxylate, Phosphate und Phosphonate.^[21,135,176–178]

Ligandenaustausch-Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen, die von der Bindungsstärke der involvierten Liganden abhängen.^[133] Damit der Ligandenaustausch vollständig erfolgen kann muss die Interaktion des einzuführenden Liganden mit der Eisenoxid-Oberfläche stärker sein als die des nativen hydrophoben Liganden. Weiterhin ist es notwendig den einzuführenden Liganden in einem großen Überschuss einzusetzen. Eine feste Bindung des neuen Liganden an die Partikeloberfläche ist nicht nur erforderlich um einen vollständigen Austausch und eine initiale hohe Bedeckungsdichte auf der Nanopartikeloberfläche zu erreichen, sondern auch um diesen dichten Bedeckungszustand aufrechtzuerhalten. Hierfür ist eine vernachlässigbar geringe Desorptionsrate aus der Ligandenhülle, vor allem unter physiologischen Bedingungen, erforderlich. Eine dichte Belegung der Oberfläche ist essentiell um den Partikeln eine hohe kolloidale Stabilität und Biorepulsivität zu verleihen.

Phosphate binden an die Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln in einer Weise, die vergleichbar ist mit der von Carboxylaten; bilden aber im Vergleich stärkere Bindungen aus.^[21,178] Sie stellen damit geeignete funktionelle Gruppen für den Ligandenaustausch dar.

Nanopartikel für Anwendungen in der Biomedizin sind häufig mit linearen Polymeren beschichtet, welche die Oberfläche passivieren sowie Aggregatbildung durch sterische Stabilisierung verhindern.^[179] Die Oberflächenbeschaffenheit der Nanopartikel und damit die an die Oberfläche gebundenen Polymere bestimmen die Interaktion der Nanopartikel mit der Umgebung. Aufgrund der großen Anzahl positiver Eigenschaften von Polyethylenglykol (beschrieben unter 2.1.1.1) wird die Oberflächen-PEGylierung bei biomedizinischen Anwendungen am häufigsten als Maskierungsstrategie verwendet.^[27] Das Anbringen von PEG an die Partikeloberfläche verleiht den Nanopartikeln Hydrophilie und Biokompatibilität. Zusätzlich führt die PEGylierung zu einer Reduktion der unspezifischen Adsorption von Proteinen und zur

reduzierten Erkennung und Aufnahme durch Zellen des MPS (Tarnkappen-Effekt, *stealth*-Effekt); was infolge zu einer erhöhten Bluthalbwertszeit führt.^[26,27,64,180,181] Nicht nur die Art des Polymers bestimmt das Verhalten der Nanopartikel *in vitro* sowie *in vivo*, sondern auch Faktoren wie die Kettenlänge oder die Bedeckungsdichte, welche beide die Polymerschichtdicke bestimmen. Wie unter 2.1.1.1 beschrieben zeigt sich das proteinabweisende Verhalten von PEG abhängig von diesen beiden Faktoren: Eine effiziente Biorepulsivität und damit erhöhte Zirkulationszeit kann durch längere PEG-Ketten und dichtere PEG-Hüllen erreicht werden; wobei eine hohe Bedeckungsdichte auf der Oberfläche der Nanopartikel von größerer Bedeutung als die Polymerkettenlänge ist.^[27,71] Der Abstand zwischen den Ankergruppen benachbarter PEG-Ketten und damit der Bedeckungsgrad bestimmt die Konformation der Liganden auf der Partikeloberfläche. Der sogenannte Flory-Radius R_F ist der End-zu-End-Abstand nicht-angebundener, geknäulter Polymere. Ist der Abstand D zwischen benachbarten Ankerpunkten größer als R_F ist die Bedeckungsdichte gering.^[26,72] In diesem Fall überlappen die Polymere nicht und treten kaum oder überhaupt nicht miteinander in Wechselwirkung.^[169] Unter der Annahme, dass keine attraktiven Wechselwirkungen zwischen den PEG-Ketten und der Oberfläche vorliegen, liegen die Ketten als gebundene willkürliche Knäuel in der sogenannten mushroom-Konformation vor.^[26] Nimmt die Polymerbedeckung zu und wird infolge D kleiner als R_F , interagieren die Polymere miteinander. Da sich die PEG-Ketten in einem guten Lösungsmittel - für PEG stellt Wasser ein sehr gutes Lösungsmittel dar^[71] - abstoßen, nehmen die Polymere eine von der Oberfläche ausgerichtete, gestreckte Anordnung ein, um die repulsiven Wechselwirkungen zu minimieren.^[169] Folglich ist die Dicke der Polymerschicht in der brush-Konformation höher als in der mushroom-Konformation.^[169] Eine schematische Darstellung der brush- und mushroom-Konformation ist zusammen mit der DLS-basierten Untersuchung der Konformation, in der sich die an die Eisenoxid-Nanopartikel gebundenen Polymere befinden, unter 3.1.2.2 gezeigt. Nanopartikel weisen ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und somit eine hohe Anzahl reaktiver Oberflächenatome auf. Eine hohe Bedeckungsdichte ist daher nicht nur wichtig um den Partikeln eine hohe Biorepulsivität zu verleihen, sondern auch um Reaktionen an der Partikeloberfläche zu verhindern. Als Beispiel kann die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies genannt werden; hierauf wird im Rahmen der Toxizitätsuntersuchungen an den PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln kurz eingegangen (3.1.3.2). Eine gestreckte Konformation der angebundenen Polymere ist weiterhin wichtig, um die Zugänglichkeit der

biofunktionalisierbaren Endgruppe zu gewährleisten. In der mushroom-Konformation kann eine erschwerte Zugänglichkeit der funktionellen Gruppe die Kopplungsreaktion erschweren oder ganz verhindern.^[26]

In dieser Arbeit erfolgte der Ligandenaustausch durch hydrophile Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel mit einem heterobifunktionellen PEG-Liganden. Abbildung 3.6 zeigt die schematische Darstellung der PEG-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel, sowie die Strukturformel des zum Phasentransfer verwendeten Liganden. Der Ligand wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einer zweistufigen Synthese aus Polyethylenglykol-Monoacrylat hergestellt.

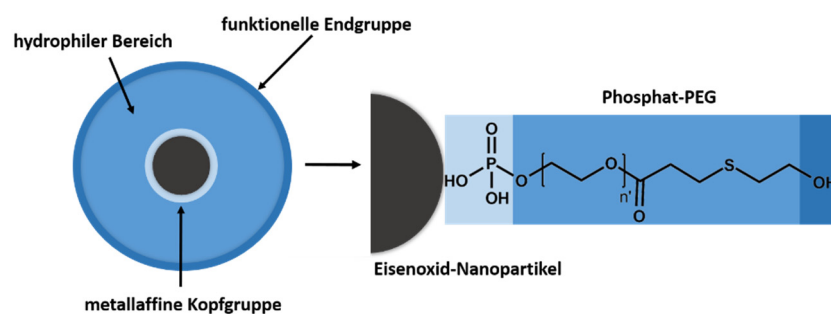


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel. Der hydrophile Stabilisator bindet über die Phosphat-Ankergruppe fest an die Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel (aus dieser Darstellung geht die Bindungsform nicht hervor). Wasserlöslichkeit, Biokompatibilität, kolloidale Stabilität und Biorepulsivität werden durch die Ethylenglykol-Einheiten ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) vermittelt. Laut Herstellerangaben zum Eduktpolymer (PEG-Monoacrylat), setzt sich der Ligand aus ~ 21 Ethylenglykol-Einheiten zusammen. Bei der funktionellen Gruppe in der äußeren Sphäre der Ligandenhülle, über welche eine Anbindung zielgerichteter Biomoleküle erfolgen kann, handelt es sich um eine Hydroxylgruppe. Aufgrund der geringen Reaktivität dieser Endgruppe muss der Biofunktionalisierung eine Aktivierung dieser Einheit vorangehen.

Der Ligand weist eine stabile Phosphat-Ankergruppe auf, welche fest an die Partikeloberfläche binden und eine dichte Belegung der Teilchenoberfläche ermöglichen kann. In früheren Arbeiten im Arbeitskreis Weller, an denen die Verfasserin beteiligt war^[182], sowie im Rahmen der Diplomarbeit der Verfasserin^[123] wurden bereits erfolgreich Phosphat-funktionalisierte PEG-Liganden zum Ligandenaustausch eingesetzt. Im Arbeitskreis Weller erfolgte eine Untersuchung des Effekts unterschiedlicher Kettenlängen des PEG-Liganden auf die Proteinresistenz, sowie auf die unspezifische Phagozytose PEGylierter Eisenoxid-Nanopartikel. Die besten Ergebnisse wurden für PEG mit einem mittleren Molekulargewicht von ~ 1100 g/mol erhalten; daneben wurden Molekulargewichte von 350, 550 sowie 2000 g/mol untersucht.^[182] Da die Proteinabstoßung bei gleichbleibender Oberflächendichte im Allgemeinen mit steigender Kettenlänge zunehmen

sollte, sind die erzielten Ergebnisse wahrscheinlich auf Unterschiede im Bedeckungsgrad zurückzuführen. Der Bedeckungsgrad wurde im Rahmen der durchgeführten Studie nicht untersucht. Da auch durch eine hohe Bedeckung mit kürzeren PEG-Liganden eine effiziente Stabilisierung erreicht werden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls PEG-Liganden mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 1000 g/mol eingesetzt. Auch im Rahmen der Diplomarbeit der Verfasserin^[123] wurden Phosphat-funktionalisierte PEG-Liganden mit vergleichbarem Molekulargewicht zur Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln vergleichbarer Kerngröße verwendet. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben zum mittleren Molekulargewicht des Acrylat-terminierten Eduktpolymers (~ 1000 g/mol) beträgt die Anzahl der Ethylenglykol-Einheiten ~ 21. In der in Abbildung 3.6 gezeigten Strukturformel wird die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten durch die ganze Zahl n' dargestellt. In Hinblick auf die unter 3.1.2.1 gezeigte NMR-Analytik der PEG-Liganden, erfolgt die Darstellung der Strukturformel von diesen im Folgenden in einer anderen Form. Diese erlaubt eine genaue Zuordnung der im ^1H -NMR-Spektrum zu einem Signal führenden Protonen. Die Zahl n entspricht der Anzahl der Ethylenglykol-Einheiten n' aus Abbildung 3.6 abzüglich zwei Einheiten (vgl. Bezeichnung in Abbildung 3.7). Das bifunktionalisierte Polymer weist neben der Phosphat-Ankergruppe eine biofunktionalisierbare Endgruppe auf. Als für die Kopplungsreaktion relevante Gruppe fand die Hydroxylgruppe Einsatz. Die Reaktivität der terminalen Hydroxylgruppe ist allerdings so gering, dass zur Anbindung an Biomoleküle eine Aktivierung erfolgen muss. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Aktivierungsreagenz-vermittelte Kopplung an MOC31 wird unter 3.2 beschrieben. Dieses Kapitel der Arbeit wird unterteilt in die Synthese sowie umfassende Charakterisierung des bifunktionellen PEG-Liganden (3.1.2.1) und in den Phasentransfer Ölsäure-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel durch Ligandenaustausch mit vergleichender Charakterisierung der Partikel vor und nach erfolgter Oberflächenmodifizierung (3.1.2.2).

3.1.2.1 Synthese und Charakterisierung der phosphorylierten Polyethylenglykol-Liganden

Der heterobifunktionelle PEG-Ligand wurde durch Endgruppenfunktionalisierung aus kommerziell erhältlichem Polyethylenglykol-Monoacrylat hergestellt. In Abbildung 3.7 ist das Reaktionsschema dieser zweistufigen Umsetzung gezeigt. In einem ersten Schritt (I) wird am Hydroxyl-terminierten Ende des Eduktpolymers durch Umsetzung mit Phosphoroxychlorid

(POCl₃) eine Phosphat-Ankergruppe eingeführt. Die Synthese wird in Gegenwart von Triethylamin (TEA) in Tetrahydrofuran (THF) bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Um die Synthese von mono-Polyethylenglykol derivatisiertem Phosphat sicherzustellen wird die Phosphor-Komponente im Überschuss eingesetzt. Verbleibende P-Cl-Bindungen werden anschließend hydrolysiert. Es ist nur die Strukturformel des Monoesters und nicht des Di- oder Triesters gezeigt. In einem zweiten Schritt (II) erfolgt die Einführung einer Hydroxylgruppe. Dies erfolgt durch Umsetzung des Phosphat-funktionalisierten PEG-Monoacrylats mit Mercaptoethanol in einer Michael-Typ-Additionsreaktion. Die Umsetzung an der Acrylat-Einheit erfolgt unter milden Reaktionsbedingungen mit *N*-Ethyl-diisopropylamin als Katalysator. In früheren Arbeiten im Arbeitskreis Weller wurde die Michael-Typ-Synthese erfolgreich eingesetzt um Thiol-funktionalisierte, tridentate PEG-Liganden zu erhalten.^[183]

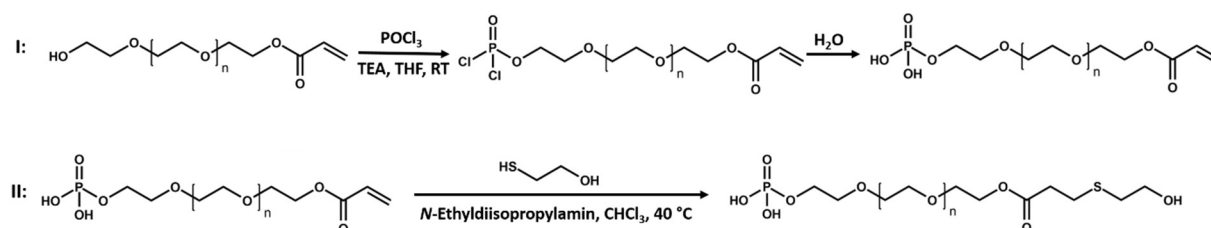


Abbildung 3.7: Reaktionsschema zur Synthese heterobifunktioneller Polyethylenglykol-Liganden. Die Synthese des Liganden für die hydrophile Oberflächenmodifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel erfolgt in zwei Stufen aus kommerziell erhältlichem Polyethylenglykol-Monoacrylat. Im ersten Schritt erfolgt die Einführung einer Phosphatgruppe durch Veresterung der Hydroxylgruppe des Polymers mit Phosphorylchlorid. Letzteres wird dabei im Überschuss eingesetzt, um die Synthese von mono-Polyethylenglykol derivatisiertem Phosphat sicherzustellen. Es ist nur die Strukturformel des Monoesters, der nach Hydrolyse der verbleibenden P-Cl-Bindungen durch Zugabe von Wasser erhalten wird, gezeigt (I). Im zweiten Schritt erfolgt die Einführung einer terminalen Hydroxylgruppe durch Umsetzung der Acrylat-Einheit des phosphorylierten Polyethylenglykols mit Mercaptoethanol in einer Michael-Typ-Reaktion (II).

Abbildung 3.8 zeigt die ³¹P-NMR-Analytik des Polymers nach der im ersten Schritt durchgeführten Veresterung der Hydroxylgruppe.

Phosphorsäureester des Polymers finden sich im ³¹P-NMR-Spektrum in einem Bereich um ~ 1 ppm.^[16,176] Das ³¹P-NMR-Spektrum zeigt in diesem Bereich ein intensives Signal. Dies belegt die Bildung von einem Phosphorsäureester. Aufgrund des im Überschuss eingesetzten Phosphorylchlorids wird aus der NMR-Auswertung angenommen, dass es sich um das monoveresterte Produkt handelt.

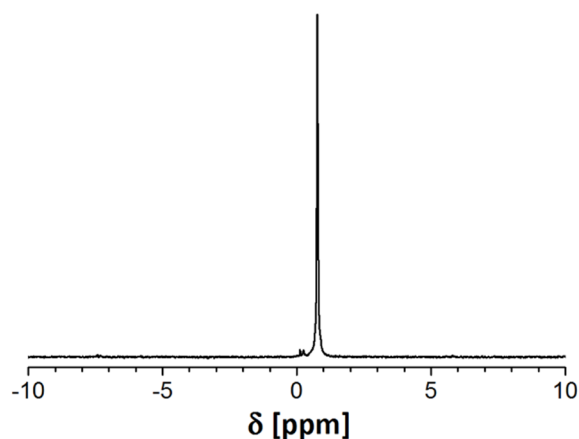


Abbildung 3.8: ^{31}P -NMR- Analyse des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers. Gezeigt ist das ^{31}P -NMR-Spektrum in deuteriertem Chloroform. Das erhaltene ^{31}P -Spektrum weist ein charakteristisches, intensives Signal in einem Bereich um ~ 1 ppm auf. Dies belegt die Bildung von einem Ester.

Die aus der ^{31}P -NMR-Analyse getroffene Annahme der Bildung des Monoesters konnte mittels ergänzender massenspektrometrischer Analytik bestätigt werden. Es werden Signale in einem breiten m/z -Bereich (m/z : Masse/Ladungsverhältnis) bis zu 1565 mit einem Abstand von 44 gefunden. Das Erhalten mehrerer Signale ist darauf zurückzuführen, dass keine Polymerisationsmethode verfügbar ist, die monodisperse Polymere mit einem einzigen, scharf definierten Molekulargewicht liefert. Stattdessen werden polydisperse Polymere und entsprechend Verteilungen der Kettenlänge und damit des Molekulargewichts erhalten. Die Signale von Molekülonen von PEG-Polymeren haben einen Abstand von $44/z$ ^[169]; benachbarte Signale unterscheiden sich um eine Monomereinheit. Die Ladung z der Ionen beträgt hier 1. In der massenspektrometrischen Analyse werden daher Signale in einem Massenbereich (bis zu 1565 u) gefunden, der dem Molekulargewicht des mono-Polyethylenglykol derivatisierten Phosphats (~ 1100 g/mol) entspricht. Mittels ^{31}P -NMR Analytik sowie massenspektrometrischer Analyse konnte die Bildung des Phosphorsäuremonoesters gezeigt werden.

Der Umsatz der Phosphatesterbildung kann über die ^1H -NMR-Analyse quantifiziert werden. Abbildung 3.9 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers vor und nach erfolgter Veresterung, sowie die Strukturformeln der Polymere mit Nummerierung einiger Protonen. Diese Protonen führen im Spektrum zu einem Signal, das nicht im Bereich der Ethylenglykol-Einheiten (um ~ 3.6 ppm) des Polymer-Grundgerüsts lokalisiert ist. In beiden Spektren finden sich neben den dominanten Signalen der Ethylenglykol-Einheit die Signale der beiden Esterprotonen. Diese sind bei ~ 4.3 ppm lokalisiert und mit 3 gekennzeichnet. Weiterhin finden sich vor und nach Veresterung die charakteristischen Signale der Protonen des Acrylats.

Diese liegen im Spektrum in einem Bereich von ~ 5.8 - 6.5 ppm und sind mit 1 und 2 gekennzeichnet. Nach der Umsetzung mit Phosphorylchlorid findet sich bei ~ 4.2 ppm ein Signal, welches durch die zwei Protonen in alpha-Position zur Phosphat-Gruppe verursacht wird. Diese Protonen sind in der Strukturformel sowie im ^1H -NMR-Spektrum mit der römischen Eins gekennzeichnet.

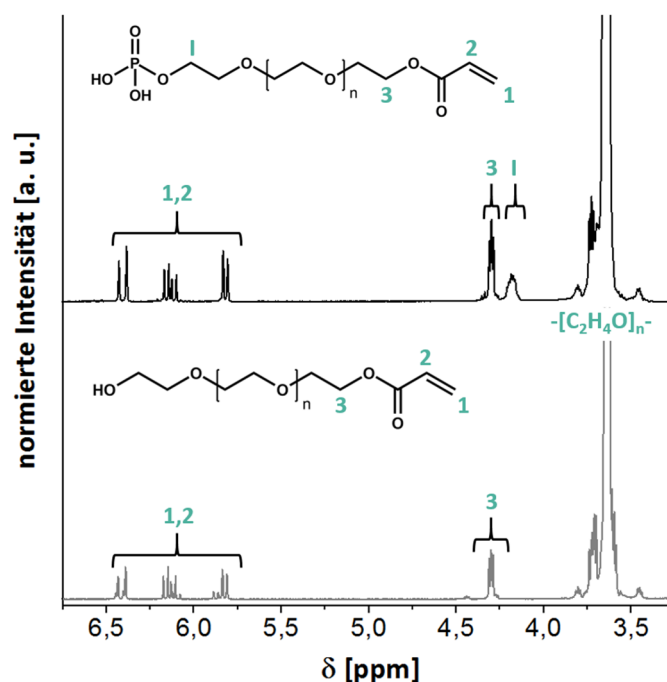


Abbildung 3.9: ^1H -NMR-Spektren des Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers vor und nach erfolgter Phosphorylierung. Nach Veresterung mit Phosphorylchlorid findet sich bei ~ 4.2 ppm ein zusätzliches Signal. Dieses ist den beiden Protonen in alpha-Position zur Phosphatgruppe (in der Strukturformel und im NMR-Spektrum mit der römischen Eins gekennzeichnet) zuzuordnen. Über das Verhältnis der Protonen in alpha-Position zur Phosphatgruppe und denen der Methylengruppe in alpha-Position zum Ester-Sauerstoff (gekennzeichnet mit 3) kann der Umsatz der Phosphorylierung mit $\sim 70\%$ angegeben werden. Mit Ausnahme des Protons der Hydroxylgruppe finden sich die Signale der in den Strukturformeln nicht gekennzeichneten Protonen im Bereich der Ethylenglykol-Einheit (um ~ 3.6 ppm).

Zur Quantifizierung der Umsetzung wird das Signal der Methylengruppe in alpha-Position zum Ester-Sauerstoff (~ 4.3 ppm) als Referenz verwendet; dieses hat ein Integral von 2. Der Umsatz der Phosphorylierung kann über das Verhältnis der beiden Protonen bei 4.3 ppm und denen der Methylengruppe in alpha-Position zur Phosphat-Gruppe bei 4.2 ppm bestimmt werden. Bei quantitativer Umsetzung würde das Verhältnis 2:2 betragen. Das Integral der Protonen bei 4.2 ppm beträgt ~ 1.4 . Dies entspricht einem phosphorylierten Anteil von $\sim 70\%$. Das Phosphorylchlorid wurde in einem 1.5-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Bei diesem Überschuss lag der phosphorylierte Anteil in der Regel zwischen ~ 60 - 70% . Der Umsatz konnte durch Erhöhung dieses Überschusses nicht weiter verbessert werden. Die nicht quantitative Veresterung könnte dadurch

erklärt werden, dass das Polymer in Lösung ein statistisches Knäuel bildet. Infolge könnte nur ein reduzierter Anteil der terminalen Hydroxylgruppen für die Veresterung zur Verfügung stehen. Eine vollständige Umsetzung könnte durch Variation weiterer Reaktionsparameter, wie etwa eine Erhöhung der Reaktionszeit oder der Reaktionstemperatur, erreicht werden. Die Reaktionszeit wurde im Vergleich zur Synthesevorschrift^[177] und zu Synthesen von Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Methylether (mPEG), die im Rahmen früherer Arbeiten im Arbeitskreis Weller durchgeführt wurden^[16,123,182] (der Umsatz der Phosphorylierung wurde hier nicht bestimmt), bereits von ~ drei auf ~ 18 Stunden verlängert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Variationen der Reaktionsparameter zur Erhöhung der Ausbeute der Phosphorylierung untersucht. Da das nicht Phosphat-funktionalisierte Polymer keine funktionelle Gruppe aufweist, die stark an die Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel bindet, ist eine Beeinflussung des Ligandenaustausches durch dieses Polymer nicht zu erwarten. Die nicht quantitative Einführung der Phosphat-Ankergruppe muss lediglich bei der Ermittlung des einzusetzenden Ligandenüberschusses berücksichtigt werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Umsetzung der Acrylat-Einheit des zuvor Phosphat-funktionalisierten Polymers mit dem als Nukleophil dienenden Mercaptoethanol zur Einführung einer Hydroxylgruppe. Die Charakterisierung des Liganden nach der Michael-Typ-Additionsreaktion erfolgte zunächst mittels NMR-Spektroskopie. In Abbildung 3.10 sind die ¹H-NMR-Analytik sowie die Strukturformel des Phosphat-funktionalisierten Polymers vor sowie nach erfolgter Umsetzung des Acrylat-Terminus gezeigt.

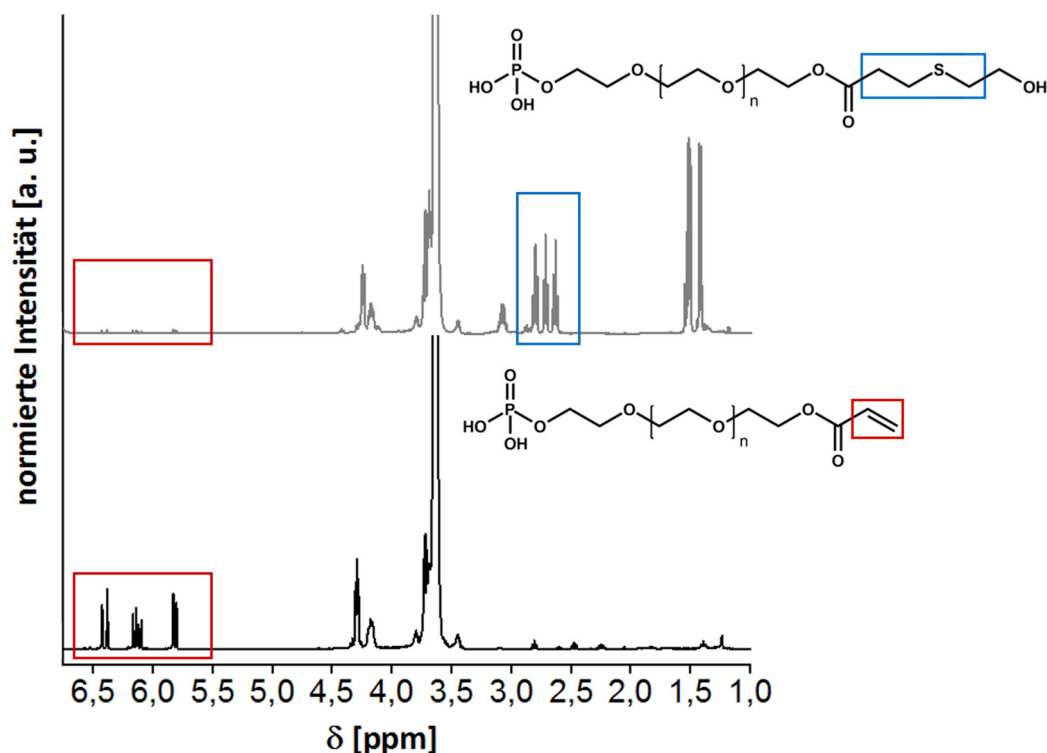


Abbildung 3.10: ¹H-NMR-Spektren des Polyethylenglykol-Polymers vor und nach erfolgter Michael-Typ-Additionsreaktion an der Acrylat-Funktion. Nach Umsetzung der Acrylat-Einheit mit Mercaptoethanol verschwinden die Signale im Bereich zwischen 5.8 ppm und 6.5 ppm, die den Protonen des Acrylats zuzuordnen sind, nahezu vollständig (im Spektrum sowie in der Strukturformel rot markiert). Gleichzeitig treten neue Signale im Bereich zwischen 2.6 ppm und 2.9 ppm auf. Diese können den durch Umsetzung der Acrylat-Einheit mit Mercaptoethanol entstandenen Alkylprotonen in alpha-Position zum Carbonyl-Sauerstoffatom sowie den Alkylprotonen der eingeführten Thioetherfunktion zugeordnet werden (im Spektrum sowie in der Strukturformel blau markiert).

Das nahezu vollständige Verschwinden der Signale der Acrylat-Protonen im Bereich von ~ 5.8-6.5 ppm sowie das Auftreten der Signale zwischen ~ 2.6-2.9 ppm zeigen die erfolgreiche Umsetzung des Polyethylenglykol-Monoacrylats zum Hydroxyl-terminierten Polymer. Die Signale im Bereich von ~ 2.6-2.9 ppm sind den Alkylprotonen der eingeführten Thioetherfunktion sowie den entstandenen Alkylprotonen in alpha-Position zum Carbonyl-Sauerstoffatom zuzuordnen. Nach Umsetzung mit Mercaptoethanol liegt die Acrylat-Einheit noch zu ~ 5% vor. Es werden wieder die Signale der Methylengruppe in alpha-Position zum Ester-Sauerstoff als Referenz (Integral von 2) verwendet. Das Spektrum zeigt Verunreinigungen durch die als Katalysator verwendete Base *N*-Ethyl-diisopropylamin. Das tertiäre Amin stört den Ligandenaustausch nicht. Zu den Ankergruppen, welche eine hohe Bindungsstärke zur Eisenoxid-Nanopartikeloberfläche aufweisen, gehören Sauerstoff-haltige Liganden wie etwa Carboxylate und Phosphate, letztere bilden im Vergleich zu den Carboxylaten stärkere Bindungen aus.^[12,21,178]

Anhand der ^1H -NMR-Analytik kann die mittlere Zahl der Ethylenglykol-Einheiten des Phosphat-funktionalisierten, Hydroxyl-terminierten PEG-Liganden ermittelt werden. Wird berücksichtigt, dass auch die Signale der Methylengruppen in beta-Position zur Phosphat-Gruppe sowie zum Ester-Sauerstoff als auch die Signale der Methylengruppe in alpha-Position zur Hydroxylgruppe im Bereich um ~ 3.6 ppm liegen, wird aus der NMR-Analytik (der Wert des Integrals beträgt ~ 78) eine mittlere Anzahl von Ethylenglykol-Einheiten n' (siehe Abbildung 3.6) von 20 angenommen. Diese Anzahl stimmt gut mit den Herstellerangaben überein. Laut diesen setzt sich der Ligand aus einer mittleren Anzahl von ~ 21 Ethylenglykol-Einheiten zusammen. Die Kenntnis der Zahl der Monomere erlaubt die Abschätzung der Dicke der PEG-Hülle in der mushroom- sowie der brush-Konformation. Diese ist unter **3.1.2.2** im Rahmen der DLS-basierten Abschätzung der Konformation der Polymere auf der Oberfläche der Nanopartikel beschrieben.

Der Nachweis der Umsetzung am Acrylat-Terminus erfolgte nicht nur mittels NMR-Spektroskopie sondern auch IR-spektroskopisch. Weiterhin wurden IR-Spektren vor sowie nach Phosphorylierung aufgenommen. Abbildung 3.11 zeigt die IR-spektroskopische Analyse des Eduktpolymers (PEG-Acrylat) sowie der Liganden nach Phosphorylierung (Phosphat-PEG-Acrylat) und nach der im Anschluss erfolgenden Michael-Typ-Additionsreaktion (Phosphat-PEG). Weiterhin sind die Strukturformeln der Liganden dargestellt. Die IR-Spektren sind von $750\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ sowie von $2600\text{-}3750\text{ cm}^{-1}$ gezeigt um die für die untersuchten Proben relevanten Banden übersichtlicher zu zeigen. In dem Bereich dazwischen finden sich keine Schwingungsbanden, die den Liganden zuzuordnen sind, sondern lediglich Schwingungen von Kohlenstoffdioxid (Banden bei etwa 2340 cm^{-1} und 2360 cm^{-1}). Weiterhin ist ein Ausschnitt der Spektren in dem Bereich zwischen 750 cm^{-1} und $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ gezeigt.

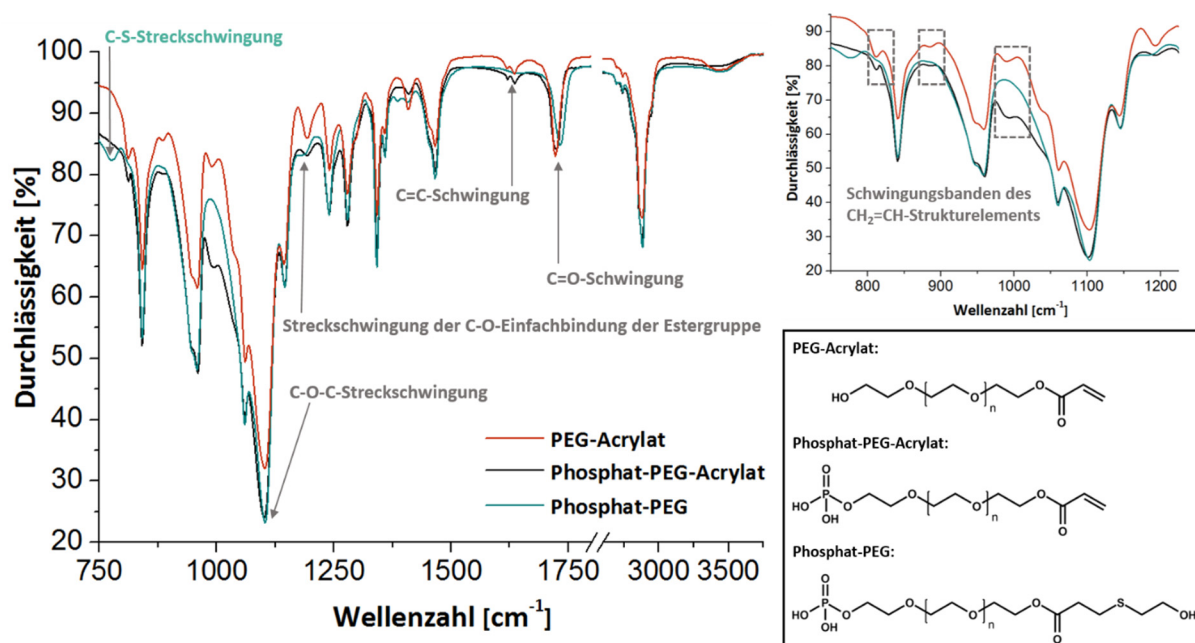


Abbildung 3.11: IR-spektroskopische Analyse von PEG-Acrylat, Phosphat-PEG-Acrylat und Phosphat-PEG. Gezeigt sind die IR-Spektren des Polyethylenglykol-Polymers vor (rot) und nach (schwarz) der Veresterung mit Phosphoroxchlorid, sowie nach erfolgter Michael-Typ-Additionsreaktion (cyan) im Bereich von 750-1800 cm^{-1} sowie von 2600-3750 cm^{-1} . In dem Bereich zwischen 1800-2600 cm^{-1} sind keine für die Liganden relevanten Signale vorhanden. Des Weiteren sind ein Ausschnitt aus den Spektren im Bereich von 750 cm^{-1} bis $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ und die Strukturformeln der Polyethylenglykol-Polymere gezeigt. Die Spektren sind von den Ethylenglykol-Einheiten dominiert. Besonders intensiv ist die charakteristische C-O-C-Schwingungsbande bei $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$. Für die Phosphat-Gruppe charakteristische Banden befinden sich in einem von der Polymereinheit dominierten Bereich. Daneben sind für die C=O-Schwingung der Estergruppe charakteristische Banden im Bereich von $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ vorhanden. Die Umsetzung der Acrylat-Funktion in der Michael-Typ-Addition zeigt sich in einer Verschiebung der Lage der C=O-Schwingungsbande. Des Weiteren ist das Verschwinden der Banden zu beobachten, die für das $\text{CH}_2=\text{CH}$ -Strukturelement in Konjugation mit einer Carbonylfunktion typisch sind. Die nach Addition auftretende Bande bei $\sim 780 \text{ cm}^{-1}$ ist vermutlich auf die C-S-Streckschwingung der Thioetherfunktion zurückzuführen.

Die IR-Spektren aller Liganden sind stark von den Signalen der Ethylenglykol-Einheit dominiert. Zunächst erfolgt daher eine Zuordnung der für die Polymereinheit charakteristischen Schwingungsbanden. Die intensivste Bande dieser Einheit findet sich im IR-Spektrum bei einer Wellenzahl von $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ und ist der C-O-C-Schwingung der Ethergruppe zuzuordnen. Weitere für die PEG-Kette charakteristische Banden finden sich bei Wellenzahlen von etwa 841 cm^{-1} , 958 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1145 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1279 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} (mit einer Schulter bei $\sim 1453 \text{ cm}^{-1}$) sowie bei 2880 cm^{-1} (mit mehreren Schultern). Eine Übersicht charakteristischer Schwingungsmoden der Ethylenglykol-Einheit ist in Tabelle 3.1 gegeben. Es sind Schwingungstyp und Wellenzahlbereich angegeben.

Tabelle 3.1: Lage der für die Ethylenglykol-Einheit charakteristischen Schwingungsbanden im IR-Spektrum. Die Zuordnung der Schwingungsmoden ist Matsuura *et al.*^[184] entnommen. Die Abkürzung sym. beschreibt eine symmetrische, die Abkürzung asym. entsprechend eine asymmetrische Schwingungsform.

Schwingungstyp	Wellenzahlbereich [cm ⁻¹]
CH ₂ -Streckschwingung (sym., asym.)	3000-2850
CH ₂ -Beugeschwingung	1500-1450
CH ₂ -Kippschwingung (sym.)	1420-1390
CH ₂ -Kippschwingung (asym.)	1380-1320
CH ₂ -Torsionsschwingung (sym.)	1310-1270
CH ₂ -Torsionsschwingung (asym.)	1280-1230
CH ₂ -Pendel-, C-O-C-, C-C-Streckschwingung	1160-810

Schwingungsbanden, die für die Phosphat-Gruppe charakteristisch sind, sollten in einem Bereich zwischen 800-1300 cm⁻¹^[185] liegen. Diese Banden treten in demselben Wellenzahlbereich wie einige der intensiven Schwingungsbanden der Ethylenglykol-Einheit auf und werden daher von diesen überlagert. Einige der Schwingungsmoden in diesem Bereich scheinen nach der Veresterung verbreitert. Dies könnte auf die eingeführte Phosphat-Gruppe zurückzuführen sein. Die Liganden vor sowie nach Phosphorylierung sind mittels IR-Spektroskopie allerdings nicht eindeutig zu unterscheiden.

Außer den Banden, die für die PEG-Kette charakteristisch sind, weisen die IR-Spektren der drei Liganden auch alle eine intensive Bande im Bereich von ~ 1700 cm⁻¹ auf. Diese Bande ist charakteristisch für die C=O-Schwingung der Estergruppe. Anhand der Lage der Carbonyl-Adsorption im Spektrum ist eine Unterscheidung der Liganden vor und nach erfolgter Michael-Typ-Reaktion möglich: Die Schwingungsbanden α - β -ungesättigter Carbonylverbindungen sind im Vergleich zu denen gesättigter infolge der möglichen Delokalisierung der π -Elektronen und damit der abnehmenden Bindungsstärke der Carbonylbindung zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Die Wellenzahl der Schwingung ist umso höher je stabiler und kürzer die Bindung ist. Die Schwingungsbande der Ester-Carbonylgruppe des Eduktpolymers sowie auch des Polymers nach Phosphorylierung liegt im Spektrum um ~ 1723 cm⁻¹ und verschiebt sich nach Umsetzung der Acrylat-Einheit in der Michael-Typ-Additionsreaktion zu einer Wellenzahl von 1733 cm⁻¹. Die Signale bei ~ 1190 cm⁻¹ sind wahrscheinlich der Schwingung der C-O-Einfachbindung der Estergruppe zuzuordnen. Neben dem Verschieben der für die C=O-Schwingung der Estergruppe charakteristischen Bande kann der Nachweis der Umsetzung der Acrylat-Einheit auch durch die

Untersuchung des Verschwindens der Banden, die für das $\text{CH}_2=\text{CH}$ -Strukturelement in Konjugation mit einer Carbonylfunktion typisch sind, erfolgen. Beim Eduktpolymer sowie beim phosphorylierten Liganden mit intaktem Acrylat-Terminus finden sich im IR-Spektrum Banden bei Wellenzahlen von 1635 cm^{-1} , 990 cm^{-1} sowie 810 cm^{-1} ; diese können Schwingungen der Vinylgruppe in alpha-Position zu einer Carbonylgruppe zugeordnet werden.^[186–188] Das Verschwinden dieser charakteristischen Schwingungsbanden deutet auf eine nahezu vollständige Umsetzung der Acrylat-Funktion hin. Das sehr schwache Signal bei $\sim 885\text{ cm}^{-1}$, das nur bei den beiden ungesättigten PEG-Liganden auftritt, ist vermutlich ebenfalls auf eine Acrylat-Schwingung zurückzuführen. Nach Umsetzung der Acrylat-Einheit mit Mercaptoethanol weist das Spektrum ein Signal bei $\sim 780\text{ cm}^{-1}$ auf, welches auf eine Schwingung der entstandenen Thioether-Bindung hindeutet. Die IR-spektroskopische Charakterisierung bestätigt zusätzlich zur NMR-Analytik die erfolgreiche Synthese Hydroxyl-terminierter PEG-Liganden mittels Michael-Typ-Reaktion.

Die IR-Spektroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit auch genutzt, um die Oberflächenbeschaffenheit der Nanopartikel nach der Hochtemperatursynthese sowie nach der Oberflächenmodifizierung genauer zu charakterisieren. Diese Charakterisierung erfolgte z.B. in Hinblick auf die Fragestellung, ob der Ligandenaustausch quantitativ durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse dieser vergleichenden IR-spektroskopischen Untersuchungen sind unter **3.1.2.2** gezeigt. Eine IR-Analytik könnte auch in Hinblick auf eine Untersuchung der Umsetzung der Acrylat-Einheit nach Anbindung der PEG-Liganden an die Partikeloberfläche interessant sein. Dies könnte von Interesse sein, wenn eine terminale Funktionalität eingeführt werden soll, die eine Inkompatibilität mit dem späteren Herstellungsprozess der PEGylierten Nanopartikel aufweist. Eine funktionelle Gruppe, wie zum Beispiel eine Carboxylgruppe, die eine Affinität zur Partikeloberfläche aufweist, kann durch Interaktion mit der Partikeloberfläche im Verlauf des Ligandenaustausches zur Verbrückung individueller Teilchen und damit zur Bildung von Aggregaten führen. In diesem Fall könnte die gewünschte finale Funktionalität nach Anbindung an die Partikeloberfläche durch eine Michael-Typ-Additionsreaktion am Acrylat-Terminus eingeführt werden. Allerdings kann keine NMR-Analytik der Umsetzung erfolgen, da die Eisenoxid-Nanopartikel in NMR-Spektren aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften eine starke Signalverbreiterung bewirken. Mittels IR-Spektroskopie der freien Liganden konnte die Umsetzung der Acrylat-Einheit gezeigt werden. In Hinblick auf die Durchführung der Michael-Addition nach PEGylierung der Nanopartikel wäre zu klären, ob eine Unterscheidung der PEG-

Liganden nach Anbindung an die Partikeloberfläche überhaupt möglich wäre. Diese Fragestellung wird im Rahmen der IR-spektroskopischen Charakterisierung der PEG-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel berücksichtigt.

3.1.2.2 Ligandenaustausch an Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln sowie vergleichende Untersuchung der Nanopartikel vor und nach Oberflächenmodifikation

Für Anwendungen in der Biomedizin muss die Oberfläche der in Hochtemperatursynthesen hergestellten und somit hydrophoben Nanopartikel in einem zweiten Schritt modifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Transfer in wässrige Lösung durch Ligandenaustausch mit einem Phosphat-funktionalisierten, Hydroxyl-terminierten PEG-Liganden. Abbildung 3.12 zeigt eine schematische Darstellung der Oberflächenmodifikation an den Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Der Austausch wurde mit einem ~ 30000 molaren Überschuss des Polymers bei ~ 64 °C durchgeführt. Der Überschuss ist bezogen auf die eingesetzte Menge an Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Die Stoffmenge wurde näherungsweise unter der Annahme von Sphärizität der Partikel und der Dichte von Magnetit (ρ : 5.2 g/cm³) ermittelt. Der hohe Überschuss des hydrophilen PEG-Liganden sowie die hohe Affinität der Phosphat-Ankergruppe zur Eisenoxid-Oberfläche begünstigen einen vollständigen Austausch der schwächer-gebundenen Ölsäure sowie eine dichte Belegung der Oberfläche mit dem Polymer. Eine hohe Bedeckungsdichte ist entscheidend für eine hohe Stabilität der Nanopartikel sowie für die Zugänglichkeit der terminalen Hydroxylgruppe. Bei geringer Bedeckungsdichte bilden die gebundenen Polymere ungeordnete Knäuel, was die Zugänglichkeit der funktionalisierbaren Endgruppe erschweren kann.^[26] Unter diesen Umständen könnte die unter 3.2 beschriebene Anbindung des anti-EpCAM Antikörpers MOC31 an die PEGylierten Nanopartikel erschwert oder verhindert werden.

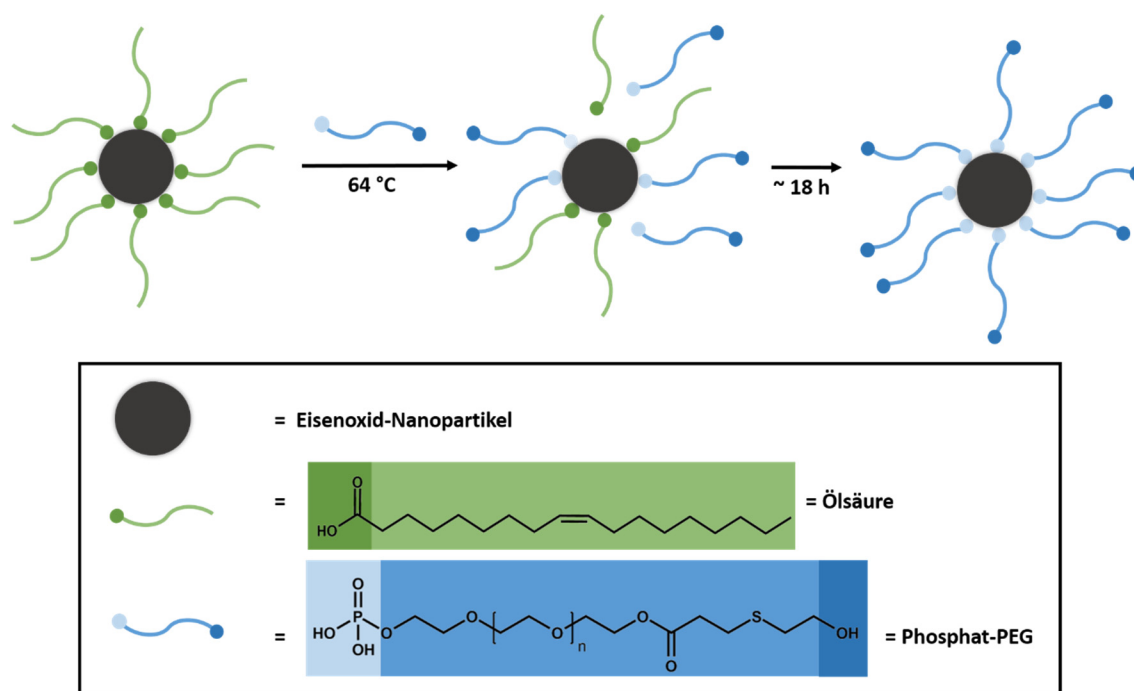


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Ligandenaustausches zur hydrophilen Oberflächenmodifizierung Ölsäure-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel mit Polyethylenglykol-Liganden. Die Synthese Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte durch Vermischen der Ölsäure-stabilisierten Partikel mit einem sehr hohen Überschuss des Phosphat-funktionalisierten, Hydroxyl-terminierten Polymers bei $\sim 64\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Phosphat-Gruppe weist zur Eisenoxid-Oberfläche im Vergleich zur Carboxylgruppe des nativen Liganden eine höhere Affinität auf.^[21,178] Daher kann letzterer ausgetauscht werden. Die feste Bindung der Phosphat-Gruppe des im Überschuss eingesetzten Polymers kann eine vollständige Verdrängung der Ölsäure erlauben und so zu einer hohen Oberflächendichte der Polymere auf der Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel führen. Eine dichte PEG-Hülle verhindert Aggregation und verleiht den Partikeln eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Die terminale Hydroxylgruppe dient der späteren Funktionalisierung der Nanopartikel.

Nach dem Ligandenaustausch wurden die Oberflächen-modifizierten Nanopartikel durch Zugabe von n-Hexan als Fällungsmittel sedimentiert und der Überstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Nanopartikel in Wasser resuspendiert. Es konnten klare wässrige, kolloidale Lösungen ohne Anzeichen von Ablagerungen erhalten werden. Nach weiterer Aufreinigung - zur Entfernung von Resten von nicht an die Partikel koordinierten, überschüssigen Stabilisatoren - blieben die Suspensionen der PEGylierten Partikel unverändert klar. Es wurden keine Anzeichen von Sedimenten gefunden.

Um die Partikel zu charakterisieren und somit den Erfolg des Phasentransfers zu untersuchen, wurden standardmäßig DLS- sowie teilweise auch TEM-Messungen durchgeführt. In Abbildung 3.13 sind TEM-Aufnahmen derselben Vergrößerung von Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIO, *superparamagnetic iron oxide nanoparticle*) vor sowie nach dem Ligandenaustausch gezeigt. Weiterhin sind repräsentative DLS-Profile Ölsäure-stabilsierter Partikel in Chloroform sowie PEGylierter Partikel in Wasser gezeigt.

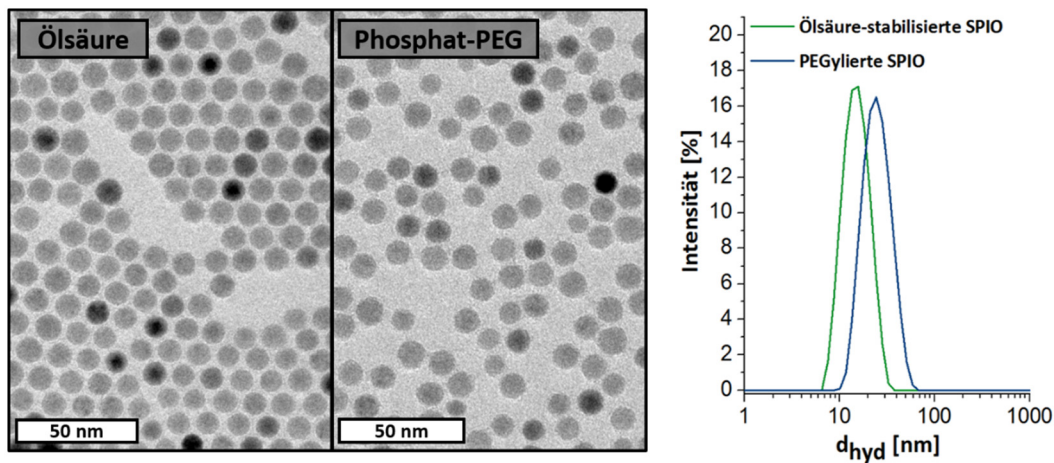


Abbildung 3.13: TEM-Analytik sowie DLS-Profile von Eisenoxid-Nanopartikeln vor und nach erfolgreichem Ligandenaustausch mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol. Es sind TEM-Aufnahmen (links) sowie die intensitätsgewichtete Größenverteilung aus den DLS-Messungen (rechts) für Ölsäure-stabilisierte Partikel in Chloroform sowie für Polyethylenglykol-stabilisierte in Wasser gezeigt. Anhand der TEM-Aufnahmen sind keine Unterschiede bezüglich der Morphologie oder Hinweise auf vorhandene Aggregate zu erkennen. Die DLS-Messungen zeigen wie erwartet eine Verschiebung der Größenverteilung in Folge der Stabilisierung der Partikel mit Polyethylenglykol. Es wird eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers von 16 nm auf 26 nm beobachtet. Das DLS-Profil zeigt weiterhin nur einen schmalen Peak. Dies belegt einen Austausch unter Erhalt einer engen Teilchengrößenverteilung ohne die Bildung von Aggregaten.

Die TEM-Analyse liefert keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Aggregaten. Die PEG-stabilisierten Partikel liegen ebenso wie die hydrophoben Partikel separiert und homogen verteilt auf dem Probenträger vor. Diese Ergebnisse deuten auf einen erfolgreichen Phasentransfer der Nanopartikel. Der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel ist ein entscheidender Faktor für biomedizinische Anwendungen; die Zirkulationszeit im kardiovaskulären System und infolge die Bioverteilung und somit der Wirkungsort der Partikel zeigen eine starke Größenabhängigkeit (2.1.1, 2.1.2). Die Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung ermöglicht Aussagen über die mittlere hydrodynamische Größe der Kolloide sowie die Teilchengrößenverteilung. Da intensitätsgewichtete DLS-Messungen sehr empfindlich auf einzelne Aggregate oder große Partikel reagieren, kann diese Analytik genutzt werden um solche Kontaminationen bereits in geringen Konzentrationen zu detektieren.^[169] Die intensitätsgewichteten DLS-Messungen zeigen eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers durch die Oberflächenmodifikation von 16 nm (hydrodynamischer Durchmesser der Ölsäure-stabilisierten Partikel) auf 26 nm. Anders als bei den Ölsäure-stabilisierten Partikeln entspricht die Zunahme durch die PEG-Hülle nicht einfach der Summe des anorganischen Kerns (10,5 nm) und der zweifachen Länge der Oberflächenmoleküle sondern ist komplizierter. Die Größe hängt stark von der Konformation der PEG-Moleküle auf der gekrümmten Partikeloberfläche ab.^[173] Die DLS-basierte Abschätzung der

Konformation erfolgt mit Methoden der Polymerphysik und wird an anderer Stelle dieses Kapitels gezeigt. Nach der hydrophilen Oberflächenmodifikation wird weiterhin nur ein einziger, schmaler Peak im DLS-Profil erhalten. Die Peak-Breite nimmt durch die Oberflächenmodifikation von ~ 5 nm auf ~ 9 nm zu. Die mittels intensitätsgewichteter DLS-Messung bestimmte geringe Zunahme des mittleren hydrodynamischen Durchmessers sowie das DLS-Profil zeigen die Homogenität der PEGylierten Nanopartikel; es werden keine Hinweise auf größere Partikel oder Aggregate erhalten. Anhand der TEM- sowie DLS-Analytik wurde darauf geschlossen, dass der Ligandenaustausch unter Erhalt der Kerngröße und der Morphologie sowie unter Erhalt einer engen Teilchengrößenverteilung und somit unter Verhinderung von Aggregatbildung durchgeführt werden konnte.

Der footprint ist die mittlere Fläche, die von einem Liganden auf der Nanopartikeloberfläche besetzt wird und gibt somit einen Hinweis auf die maximal mögliche Bedeckungsdichte. Je kleiner der footprint, desto höher ist die erreichbare Bedeckungsdichte. Der footprint hängt auf einer gegebenen Partikeloberfläche zunächst von der Ankergruppe ab; mehrzählige Liganden weisen einen höheren footprint auf als entsprechende einzählige.^[169,189] Der footprint hängt aber auch von der Molekülstruktur (etwa verzweigt oder linear) und dem Molekulargewicht des Liganden ab. Beides bestimmt den Platzanspruch auf der Oberfläche. Im Folgenden wird die Frage erörtert, ob die eingesetzte Ligandenmenge pro Partikel ausreichend ist, um eine hohe Bedeckungsdichte mit Polymer zu erreichen. Bezogen auf die Stoffmenge an Eisenoxidnanopartikeln wurde ein ~ 30000 -facher molarer Überschuss des PEG-Liganden eingesetzt. Der footprint der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Phosphat-funktionalisierten PEG-Liganden ist nicht bekannt. Für *n*-Alkanthiole auf Goldsubstraten beträgt der footprint ~ 0.22 nm²^[67,169], für Thiol-funktionalisierte PEG-Liganden (5000 g/mol) auf Goldoberflächen beträgt der footprint bereits ~ 0.35 nm²^[138]. Unter der Annahme eines footprints von 0.35 nm² würden ~ 1100 der Phosphat-funktionalisierten PEG-Liganden pro Eisenoxid-Nanopartikel (~ 11 nm Durchmesser, Oberfläche: 380 nm²) binden. Nicht alle Liganden weisen so hohe Bedeckungsdichten auf.^[26] Der Platzanspruch eines Phosphat-funktionalisierten PEG-Liganden sollte höher sein als der Anspruch eines entsprechenden Thiol-funktionalisierten PEG-Liganden. Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte ~ 30000 -fache molare Ligandenüberschuss sollte daher ausreichend sein, um eine vollständige Verdrängung der Ölsäure sowie eine hohe Bedeckungsdichte zu erreichen.

Eine hohe Bedeckungsdichte mit dem Polyethylenglykol-Liganden ist essentiell für eine hohe kolloidale Stabilität sowie für eine effiziente Proteinresistenz. Die Bedeckungsdichte bestimmt die Konformation der Polymere auf der Partikeloberfläche (3.1.2). Abbildung 3.14 zeigt eine schematische Darstellung der mushroom- sowie brush-Konformation. Wie ersichtlich ist die Dicke der Polymerschicht in der brush-Konformation höher als in der mushroom-Konformation. Damit sollte die bei hoher Bedeckungsdichte eingenommene gestreckte Konformation zu höheren hydrodynamischen Durchmessern führen.

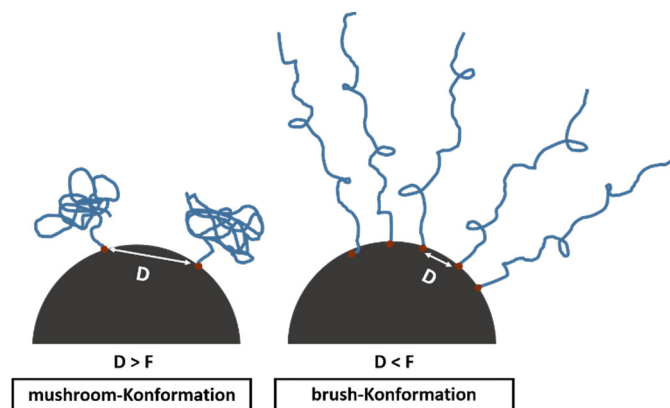


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der mushroom- und der brush-Konformation. In Abhängigkeit der Dichte auf der Nanopartikeloberfläche nehmen die PEG-Ketten unterschiedliche Konformationen ein. Ist der Abstand D zwischen den Ankerpunkten benachbarter Polymere größer als der Flory-Radius R_F ist die Oberflächendichte gering.^[26,72] Die Polymere liegen als gebundene statistische Knäuel in der mushroom-Konformation vor. Nimmt die Polymerbedeckung zu ($D < R_F$) werden die PEG-Ketten infolge der repulsiven Wechselwirkungen zwischen den PEG-Monomeren in die ausgedehnte brush-Konformation gezwungen; die Dicke der Ligandenhülle nimmt entsprechend zu.^[26,169] Abbildung nach^[190]

Im Folgenden wird untersucht, ob auf Grundlage der mittels DLS-Messung bestimmten Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers durch die PEG-Hülle Rückschlüsse auf die Konformation der PEG-Liganden und damit auf die Bedeckungsdichte gezogen werden können. Mittels statistischer TEM-Größenanalytik wurde für die Eisenoxid-Nanopartikel ein mittlerer Kerndurchmesser von 10.5 nm ermittelt. Der aus der Intensitätsverteilung bestimmte hydrodynamische Durchmesser der PEGylierten Nanopartikel beträgt 26 nm. Bezogen auf den mittels statistischer TEM-Analyse ermittelten Kerndurchmesser beträgt die Größenzunahme durch die PEG-Hülle demnach 15.5 nm. Anhand der NMR-Analytik wurde für den PEG-Liganden eine mittlere Anzahl von Ethylenglykol-Einheiten von ~ 20 angenommen. Durch die Kenntnis der Zahl der Monomereinheiten kann die Dicke L der PEG-Hülle in der mushroom- und brush-Konformation nach Hill^[191] berechnet werden. In der mushroom-Konformation gilt:

$L \sim N_{\text{Mono}}^{0.6} \cdot l_k$.^[191] In der brush-Konformation gilt: $L \sim 0.42N_{\text{Mono}} \cdot l_k$.^[191] Jede statistische Monomereinheit N_{Mono} setzt sich aus näherungsweise 1.6 PEG-Monomeren zusammen.^[191] N_{Mono} beträgt somit ~ 13 . Mit einer Kuhn-Länge l_k für PEG von 0.7 nm ^[191] beträgt die Dicke der PEG-Hülle bei 20 Monomereinheiten in der mushroom-Konformation $\sim 3.3 \text{ nm}$ und in der brush-Konformation $\sim 3.8 \text{ nm}$. Dies entspräche einer Zunahme des Durchmessers von $\sim 6.6\text{-}7.6 \text{ nm}$. Die beobachtete Zunahme des Durchmessers durch die PEGylierung beträgt 15.5 nm und ist damit sogar deutlich größer als die theoretische Abschätzung für die ausgestreckte Konformation. Unabhängig hiervon könnten die beiden Konformationen, aufgrund des durch die geringe Monomerzahl bedingten, relative geringen Unterschieds in der Dicke der Polymerschicht von $\sim 1 \text{ nm}$, mittels DLS-Messung nicht unterschieden werden.

Über die durch die PEG-Hülle bedingte Größenzunahme kann kein Rückschluss auf die Konformation der Liganden auf der Partikeloberfläche und somit auf den Bedeckungsgrad gezogen werden. Da die Stabilität der Nanopartikel immer davon abhängt wie vollständig die Bedeckung mit Liganden ist und wie dicht die Liganden bei vollständiger Bedeckung gepackt sind^[169], könnten Stabilitätsuntersuchungen an den PEGylierten Nanopartikeln (3.1.3.3) Hinweise auf die Bedeckungsdichte liefern.

Im Folgenden wurde die Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifikation untersucht. In Abbildung 3.15 sind die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Durchmesser und Standardabweichungen (die repräsentierten Daten stellen jeweils den Mittelwert aus drei Messungen dar) für neun Chargen PEGylierter Partikel gezeigt. Die Oberflächenmodifikationen erfolgten mit derselben Liganden-Charge sowie mit derselben Charge Ölsäure-stabilisierter Partikel (Kerndurchmesser: 10.5). Am Beispiel von drei Chargen ist weiterhin die intensitätsgewichtete Verteilung der hydrodynamischen Größe gezeigt.

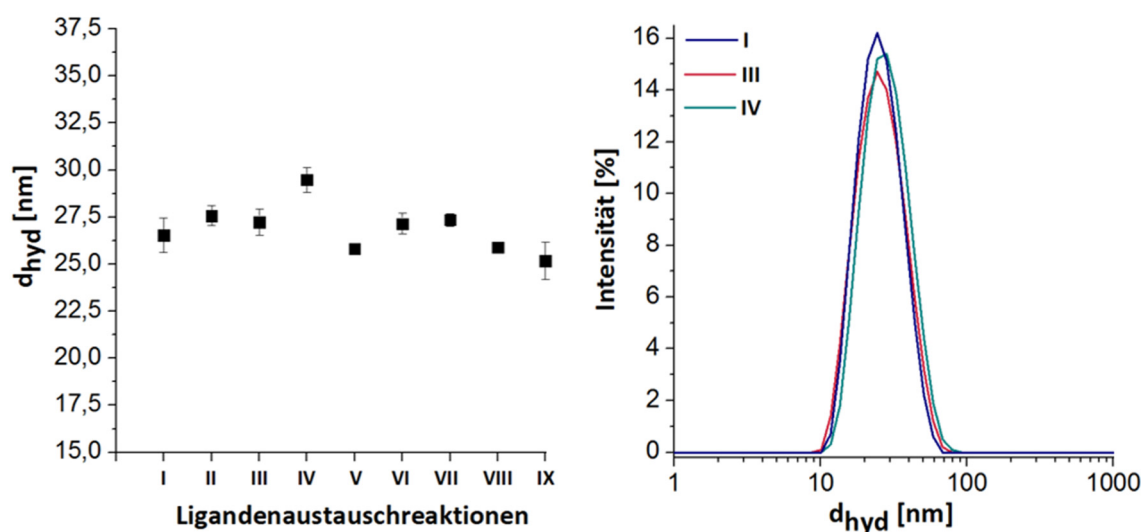


Abbildung 3.15: Charakterisierung mehrerer Chargen Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel mittels DLS. Gezeigt sind die mittleren hydrodynamischen Durchmesser und Standardabweichungen (Standardabweichung vom mittleren Durchmesser als Fehlerbalken) verschiedener Partikelchargen, die nach dem gleichen Protokoll synthetisiert wurden (links). Am Beispiel von drei Chargen sind intensitätsgewichtete Größenverteilungen (rechts) gezeigt. Die einzelnen Chargen weisen vergleichbare hydrodynamische Durchmesser auf. Im Mittel beträgt dieser $\sim 27 \pm 1.3$ nm, die Schwankung des Durchmessers liegt bei $\sim 5\%$. Die Peak-Breiten im DLS sind für alle Chargen schmal. Im Mittel beträgt die Breite $\sim 9.4 \pm 0.7$ nm. Die repräsentativen intensitätsgewichteten Größenverteilungen zeigen zusätzlich die vergleichbare enge Teilchengrößenverteilung. Die Charakterisierung mittels DLS zeigt die Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifizierung.

Bezogen auf den mittels statistischer TEM-Analyse ermittelten mittleren Kerndurchmesser von 10,5 nm liegt die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach PEGylierung in einem engen Bereich von ~ 15 -19 nm. Im Mittel beträgt der hydrodynamische Durchmesser der verschiedenen Chargen PEGylierter Nanopartikel ~ 27 nm ± 1.3 nm. Die Durchmesser schwanken somit um $\sim 5\%$. Im Mittel weisen die Größenverteilungen eine Breite von $\sim 9.4 \pm 0.7$ nm auf. Die vergleichbare enge Größenverteilung wird zusätzlich am Beispiel der intensitätsgewichteten DLS-Profile von drei Chargen Oberflächen-modifizierter Partikel gezeigt. Die repräsentativen Profile zeigen die Homogenität der PEGylierten Nanopartikel.

Die Oberflächenmodifikation wurde auch mit verschiedenen Liganden-Chargen sowie mit verschiedenen Chargen Ölsäure-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel durchgeführt. Der Austausch konnte unter Erhalt einer engen Teilchengrößenverteilung durchgeführt werden. Zum Teil wurden PEG-stabilisierte Partikel mit etwas größeren hydrodynamischen Durchmessern und im Vergleich breiteren Größenverteilungen erhalten: Beispielsweise wurden durch Ligandenaustausch an Ölsäure-stabilisierten Partikeln mit einem Kerndurchmesser von 10.9 ± 0.5 nm PEGylierte Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ~ 40 nm erhalten. Das DLS-Profil weist einen relativ schmalen Peak (Peak-Breite: ~ 18 nm) auf und zeigt damit keinen Hinweis

auf eine verstärkt stattfindende Aggregatbildung. Auch weitere Untersuchungen zu den kontrastgebenden Eigenschaften deuten nicht auf das Vorhandensein von Aggregaten. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird an späterer Stelle dieser Arbeit eingegangen (3.1.3.1).

Durch den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ligandenaustausch konnten Ölsäure-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel somit unter Erhalt einer engen Größenverteilung in PEG-stabilisierte Partikel überführt werden.

Im Anschluss an die Standardanalytik der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mittels DLS - sowie teilweise zusätzlich mittels TEM - wurden einzelne Chargen der PEG-stabilisierten Partikel, die durch Oberflächenmodifizierung Ölsäure-stabilsierter Partikel derselben Charge erhalten wurden, kombiniert. Die anschließende Analytik der kombinierten Ansätze zeigt unverändert die Qualität der PEGylierten Partikel.

Um die Oberflächenbeschaffenheit der Eisenoxid-Nanopartikel nach erfolgter Oberflächenmodifikation zu charakterisieren wurden IR-Spektren aufgenommen. In Hinblick auf die Fragestellung, ob der Austausch quantitativ durchgeführt werden konnte, erfolgte zunächst eine genaue IR-spektroskopische Untersuchung der Ölsäure-stabilisierten Partikel. Hierzu wurden Vergleichsspektren der freien Stabilisatoren aufgenommen. Abbildung 3.16 zeigt die IR-Spektren des freien Liganden sowie der Ölsäure-stabilisierten Partikel in einem Bereich von $525\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$ und von $2750\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ - in dem Bereich dazwischen finden sich lediglich Schwingungen von Kohlenstoffdioxid - sowie eine Ausschnittsvergrößerung des Spektrums der Nanopartikel im Bereich zwischen 1350 cm^{-1} und $\sim 1830\text{ cm}^{-1}$. Weiterhin sind mögliche Bindungsformen der Carboxylatgruppe an die Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel dargestellt. Es sind drei Koordinationsformen unterscheidbar.^[133,192] Die deprotonierte Carboxylgruppe kann als einzähniger oder zweizähniger Ligand fungieren. Die monodentate Koordination führt zu einer Ester-ähnlichen Bindungsform.^[133] Im Fall einer bidentaten Koordination ist zwischen einer mononuklearen und einer heteronuklearen Form zu unterscheiden. Im ersten Fall binden die beiden Sauerstoffatome chelatisierend an ein Metallzentrum, im zweiten Fall verbrücken die beiden Sauerstoffatome zwei Eisen-Atome.

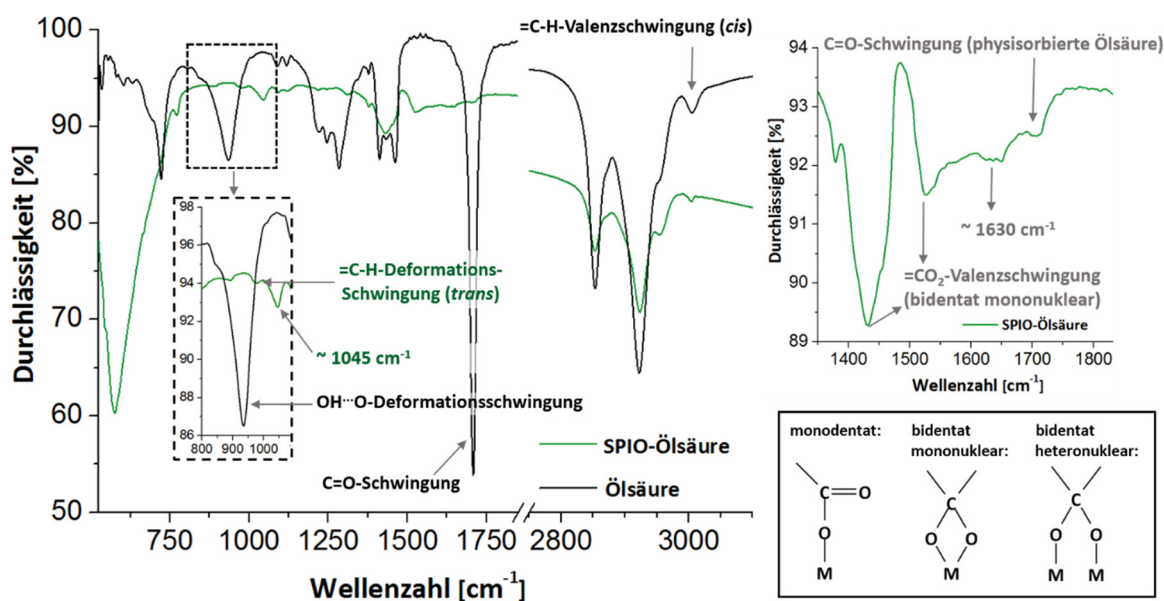


Abbildung 3.16: IR-Spektren von Ölsäure sowie von Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Gezeigt sind die IR-Spektren von Ölsäure (schwarz) sowie von Ölsäure-stabilisierten Partikeln (grün) im Bereich von 525-1850 cm^{-1} sowie von 2750-3100 cm^{-1} (links). In dem Bereich dazwischen sind keine für die untersuchten Proben relevanten Signale vorhanden. Des Weiteren sind ein Ausschnitt aus dem Spektrum der Partikel im Bereich von 1350-1830 cm^{-1} (rechts oben), sowie die möglichen Bindungsformen der Carboxylatgruppe an die Partikeloberfläche (rechts unten) gezeigt. Im Verlauf der Partikelsynthese findet zum Teil eine *cis/trans*-Isomerisierung der Doppelbindung der Ölsäure statt. Im Spektrum der Ölsäure-stabilisierten Partikel treten in Folge der Bindung an die Partikeloberfläche neue Schwingungsbanden auf, die auf eine bidentat mononukleare sowie monodentate Koordination weisen. Die Bande bei $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ kann nicht eindeutig einer Bindungsform zugeordnet werden. Sie könnte neben der C=O-Valenzschwingung bei monodentater Koordination auch auf die asymmetrische CO_2 -Valenzschwingung bei bidentat verbrückender Koordination deuten.

Zunächst wird das IR-Spektrum der freien Ölsäure genauer betrachtet. Bei Ölsäure handelt es sich um eine einfach ungesättigte, aliphatische Carbonsäure der Summenformel $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$. Die Strukturformel ist Abbildung 3.3 sowie 3.12 zu entnehmen. Die Banden im Bereich von $\sim 2853\text{-}2956 \text{ cm}^{-1}$ sowie bei $\sim 1462 \text{ cm}^{-1}$ und $\sim 722 \text{ cm}^{-1}$ können auf Schwingungen der Alkylgruppen zurückgeführt werden.^[193-196] Die Bande bei 3005 cm^{-1} ist der C-H-Valenzschwingung der *cis*-konfigurierten Doppelbindung zuzuordnen.^[193,196-198] Für die Carboxylgruppe charakteristische Schwingungen finden sich in einem Bereich zwischen $\sim 1000\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$. Die intensive Schwingung der Säure-Carbonylgruppe liegt bei einer Wellenzahl von $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$. Die Bande bei 1412 cm^{-1} sowie die Banden im Bereich von $1220\text{-}1284 \text{ cm}^{-1}$ weisen auf COH- sowie C-O-Schwingungen hin.^[196] Eine weitere charakteristische Schwingungsbande ist die Bande bei $\sim 935 \text{ cm}^{-1}$, welche der Deformationsschwingung von Carbonsäure-Dimeren zuzuordnen ist.^[196,199,200] Nach Koordination der Ölsäure an die Eisenoxid-Nanopartikel zeigt sich im IR-Spektrum eine breite, intensive Bande bei $\sim 577 \text{ cm}^{-1}$, die für die Fe-O-Schwingung des anorganischen Kerns charakteristisch ist.^[175,186,195,200] Die Spektren der freien sowie der an die Nanopartikel gebundenen Ölsäure zeigen

unverändert die für die Alkylgruppen charakteristischen Schwingungen im Bereich von ~ 2853 - 2956 cm^{-1} , die Bande bei 722 cm^{-1} wird nach Koordination an die Nanopartikel durch die intensive Schwingungsbande des Eisenoxid-Kerns überlagert. Die Schwingungsbande bei $\sim 935\text{ cm}^{-1}$ der achtgliedrigen Ölsäure-Dimere ist in Konjugation mit den Nanopartikeln nicht mehr vorhanden. Eine Anbindung der Ölsäure an die Oberfläche der Partikel verhindert die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. In diesem Wellenzahlbereich treten im IR-Spektrum der Nanopartikel zwei Schwingungsbanden auf: Eine Bande bei $\sim 892\text{ cm}^{-1}$, die vermutlich der C-C-Valenzschwingung zugeordnet werden kann^[199] und im Spektrum der freien Säure lediglich durch Schwingungen der Dimere überlagert wird. Die andere Bande bei $\sim 966\text{ cm}^{-1}$ ist auf C-H-Deformationsschwingungen *trans*-substituierter Alkene zurückzuführen^[193] und deutet auf eine im Verlauf der Partikelsynthese zum Teil erfolgende Isomerisierung der Alkylketten hin; aus der Oleylform (*cis*) in die Elaidinform (*trans*). Diese Konformationsänderung der Ölsäure während Nanopartikelsynthesen bei hohen Temperaturen ist bereits literaturbekannt.^[193] Die Änderung könnte sich aus einer besseren Packungsmöglichkeit ergeben. Die schwach ausgeprägte C=O-Schwingungsbande der Säuregruppe bei $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$ deutet auf eine Physisorption: Ölsäure könnte in einer zweiten Schicht in ihrer protonierten Form über Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Alkylketten an eine erste chemisorbierte Ölsäure-Schicht binden. Die Ausbildung einer Doppelschicht basierend auf hydrophoben Interaktionen zwischen Alkylketten wurde bereits von Sahoo *et al.*^[178] beschrieben. Im Folgenden wird untersucht, ob evtl. auch Informationen über die Art der Bindung der Ölsäure an die Partikeloberfläche erhalten werden können. Bei monodentater Koordination würde sich die Lage der C=O-Valenzschwingung zu niedrigeren Wellenzahlen verschieben.^[201,202] Mit der Bindung des anderen Carboxyl-Sauerstoffs an die Metalloxid-Oberfläche ist eine Schwächung der Doppelbindung verbunden. Hinweise auf eine monodentate Koordination kann evtl. die nach Koordination an die Partikeloberfläche auftretende Schwingungsbande bei 1045 cm^{-1} liefern, welche der C-O-Fe-Schwingung zugeordnet werden könnte. Die Bande bei 1630 cm^{-1} könnte ebenfalls auf eine monodentate Koordination hindeuten. Sie könnte der nach Koordination zu niedrigeren Wellenzahlen verschobenen C=O-Valenzschwingung zugeordnet werden. Weiterhin kann Ölsäure als zweizähniger Ligand binden. Roonasi *et al.*^[203] fanden nach Anbindung von Ölsäure an die Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln zwei Banden bei 1529 cm^{-1} und 1430 cm^{-1} , welche einer asymmetrischen und symmetrischen Schwingung der Carboxylatgruppe bei bidentat

mononuklearer Koordination zugeordnet wurden. Entsprechende Banden ($\sim 1430\text{ cm}^{-1}$ sowie $\sim 1525\text{ cm}^{-1}$) konnten auch im IR-Spektrum der Ölsäure-stabilisierten Nanopartikel gefunden werden, wobei die Bande bei $\sim 1430\text{ cm}^{-1}$ stark mit der Alkylgruppenschwingung im Bereich von $\sim 1462\text{ cm}^{-1}$ überlagert. Unter Berücksichtigung der Literaturdaten wird eine bidentat chelatisierende Anbindung angenommen. Eine Unterscheidung zwischen mono- und heteronuklear ist anhand der Wellenzahldifferenz zwischen asymmetrischer und symmetrischer Schwingung möglich: Für die mononukleare Koordination ist die Differenz kleiner als für nicht-adsorbiertes Oleat ($\sim 135\text{ cm}^{-1}$ ^[203]), für die heteronukleare Koordination gilt Umgekehrtes.^[201] Die Schwingungsbande bei 1630 cm^{-1} könnte somit auch einen Hinweis auf eine bidentat verbrückende Koordination ($\Delta \sim 200\text{ cm}^{-1}$) liefern.

Die Schwingungsbanden im IR-Spektrum der Ölsäure-stabilisierten Partikel, welche koordinativ gebundener Ölsäure zugeordnet wurden, fanden sich auch nach weiterer Aufreinigung (nach sechsmaliger, statt routinemäßig dreimaliger Fällung). Lediglich die Schwingungsbande bei $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$, welche auf physisorbierte und damit schwächer gebundene Ölsäure deutet, nimmt bei wiederholten Fällungsschritten ab. Auch ein Vergleich zweier Chargen Ölsäure-stabiler Partikel nach routinemäßigem Fällen zeigte vergleichbare IR-Spektren. Die Schwingungsbanden bei $\sim 1045\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1430\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1525\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ sollten somit wie angenommen einer Bindung der Ölsäure über die Carboxylatgruppe an die Partikeloberfläche zugeordnet werden können und nicht durch Verunreinigungen verursacht werden.

Im Folgenden wird untersucht ob der Ligandenaustausch mit dem Phosphat-funktionalisierten PEG-Liganden quantitativ durchgeführt werden konnte. Dazu ist in Abbildung 3.17 das IR-Spektrum der Partikel nach dem Ligandenaustausch im Vergleich mit den Ölsäure-stabilisierten Partikeln sowie im Vergleich mit der freien Ölsäure jeweils in einem Bereich von $525\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$ sowie von $2750\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ gezeigt.

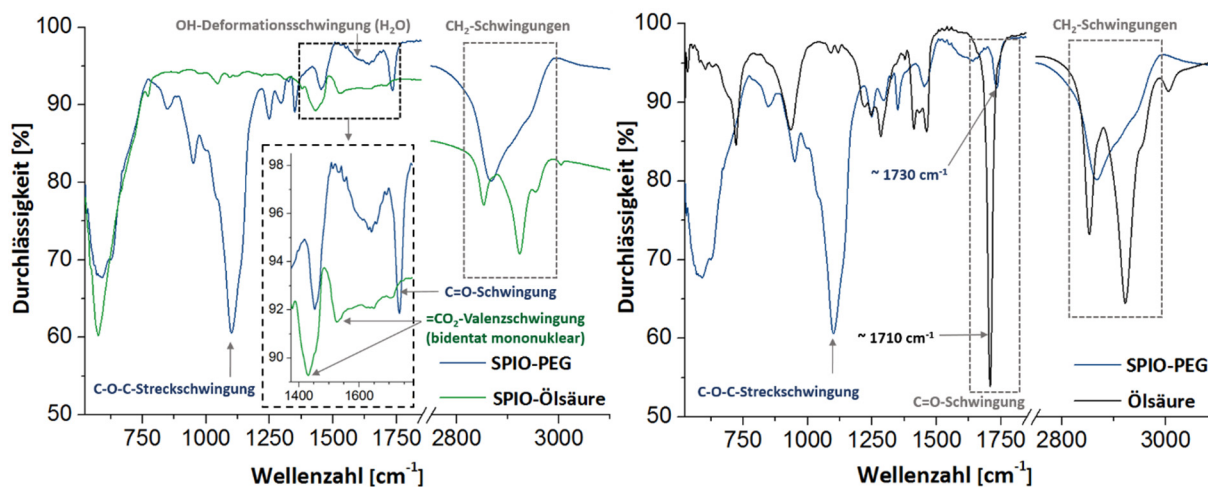


Abbildung 3.17: IR-Spektren von Ölsäure, Ölsäure-stabilisierten sowie Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Gezeigt sind die IR-Spektren der Eisenoxid-Nanopartikel vor und nach dem Ligandenaustausch im Bereich von 525-1850 cm^{-1} sowie von 2750-3100 cm^{-1} (links). In dem Bereich dazwischen sind keine für die untersuchten Proben relevanten Signale vorhanden. Des Weiteren ist das Spektrum der Polyethylenglykol-stabilisierten Partikel im Vergleich zu dem der Ölsäure im selben Wellenzahlbereich gezeigt (rechts). Nach der Oberflächenmodifizierung finden sich für die Ethylenglykol-Einheit charakteristische Schwingungsbanden, wie z.B. die intensive C-O-C-Streckschwingung. Es finden sich keine für die Ölsäure, in freier oder koordinierter Form, charakteristischen Schwingungsbanden, wie z.B. die der Alkylgruppe der Säure im Bereich von etwa 2850-2960 cm^{-1} , die in beiden Formen intensiv auftritt. Die C=O-Schwingungsbande der Polyethylenglykol-stabilisierten Partikel liegt im Vergleich zur C=O-Schwingung der Ölsäure bei höheren Wellenzahlen. Anhand der IR-spektroskopischen Analytik ist davon auszugehen, dass der Ligandenaustausch nahezu quantitativ durchgeführt werden konnte.

Nach Ligandenaustausch zeigen sich für die Monomereinheit des Polymers charakteristische Schwingungsbanden, wie die besonders intensive C-O-C-Schwingungsbande bei $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$. Weiterhin findet sich die charakteristische C=O-Schwingungsbande der Estergruppe des Polymers bei einer Wellenzahl von $\sim 1733 \text{ cm}^{-1}$. Im Vergleich dazu liegt die C=O-Schwingungsbande freier oder physisorbierter Ölsäure bei $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$. Im IR-Spektrum der Oberflächen-modifizierten Partikel finden sich keine Schwingungsbanden, die für freie oder gebundene Ölsäure charakteristisch sind. Als Beispiele seien die im Vorfeld erwähnte C=O-Schwingungsbande, die intensiven Schwingungsbanden der Alkylgruppen im Bereich von $\sim 2850\text{-}2960 \text{ cm}^{-1}$ sowie die Schwingungsbande bei $\sim 1530 \text{ cm}^{-1}$, die einer bidentat mononuklearen Koordination zugeordnet wurde, genannt. Die IR-spektroskopische Analyse deutet auf eine nahezu vollständige Entfernung der Ölsäure-Stabilisatoren.

Zum Abschluss der IR-spektroskopischen Analyse der Oberflächenbeschichtung werden die IR-Spektren der PEG-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel im Vergleich zu dem freien Polymer betrachtet. Abbildung 3.18 zeigt die IR-Spektren des PEG-Liganden sowie der PEG-stabilisierten Nanopartikel in einem Bereich von 530-1850 cm^{-1} sowie von 2750-3100 cm^{-1} . Weiterhin ist die Strukturformel des Polymers gezeigt.

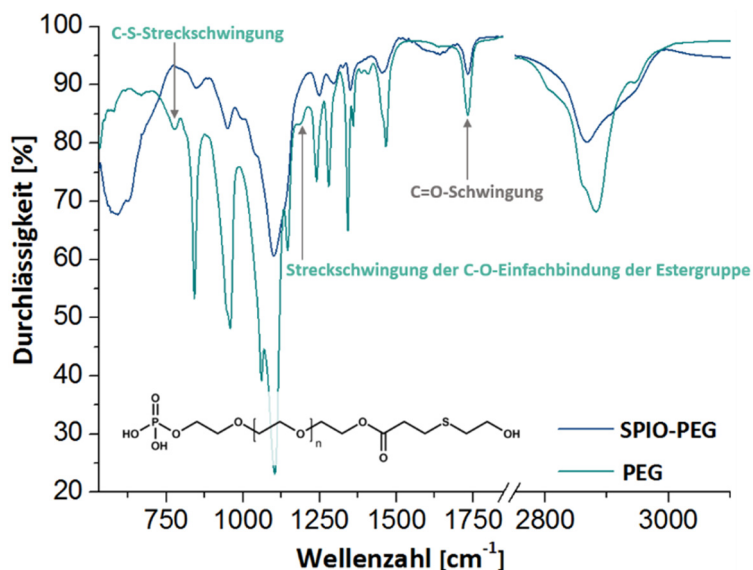


Abbildung 3.18: IR-Spektren von Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol sowie von den Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Gezeigt ist das IR-Spektrum der Polyethylenglykol-stabilisierten Partikel (blau) im Vergleich zu dem des freien Polymers (cyan), sowie dessen Strukturformel. In dem nicht gezeigten Bereich der Spektren von 1850-2750 cm⁻¹ finden sich keine für die Proben relevanten Signale. Schwingungsbanden, die nicht auf die Ethylenglykol-Einheit zurückzuführen sind, sondern auf andere Strukturelemente weisen könnten, verschwinden nach Koordination an die Partikeloberfläche vollständig. Als Beispiel seien die C-O-Streckschwingung der Estergruppe und die C-S-Streckschwingung der Thioetherfunktion genannt. Eine Ausnahme bildet die C=O-Schwingung der Estergruppe. Die spektrale Region für die strukturelle Untersuchung von Eisen-Orthophosphat-Komplexen auf der Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln liegt etwa zwischen 900-1200 cm⁻¹^[172,177,204] und damit in einem stark von intensiven Schwingungen der Ethylenglykol-Einheit dominierten Bereich. Die für die Ethylenglykol-Einheit charakteristischen Schwingungsbanden scheinen nach Anbindung des Polymers an die Partikeloberfläche in ihrer Intensität reduziert, verbreitert sowie zu sowohl höheren als auch niedrigeren Wellenzahlen verschoben zu sein.

Zunächst wird untersucht, ob evtl. Informationen über die Art der Bindung der Phosphat-funktionalisierten PEG-Liganden an die Partikeloberfläche erhalten werden können. Für die Phosphat-Ankergruppe (oder auch die Phosphonat-Gruppe) sind mehrere Koordinationsformen an die Oberfläche von Metalloxid-Nanopartikeln unterscheidbar: Mögliche Bindungsarten sind die monodentate, die bidentat mononukleare sowie die bidentat heteronukleare Koordination.^[205–207] Die Phosphor-Sauerstoff-Doppelbindung ist bei diesen Bindungsformen nicht an der Koordination der Eisenatome beteiligt, anders bei einer tridentaten Koordination.^[207] Die Kombination aus monodentater und bidentater Koordination benachbarter Eisenatome würde die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und somit eine zusätzliche Stabilisierung der Ligandenhülle ermöglichen.^[207] Die spektrale Region für die Untersuchung der Anbindung von Phosphaten an die Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln liegt zwischen ~ 900 cm⁻¹ und ~ 1200 cm⁻¹.^[172,177,204] Dieser Bereich ist allerdings stark von intensiven PEG-charakteristischen Schwingungsbanden dominiert. Daher können anhand der IR-spektroskopischen Analyse keine genauen Aussagen über die Bindungsart des Polymers an die Partikeloberfläche gemacht werden. Die unveränderte Lage

der C-O-C-Streckschwingung im IR-Spektrum bestätigt jedoch die aufgrund der hohen Affinität zur Eisenoxid-Oberfläche angenommene Koordination über die Phosphat-Ankergruppe. Bei Anbindung über die Ethergruppe durch eine Art elektrostatische Wechselwirkung müsste sich die C-O-C-Streckschwingung zu niedrigeren Wellenzahlen verschieben.^[208,209]

Mit Ausnahme der Ester-Carbonylbande verschwinden in Konjugation mit den Eisenoxid-Nanopartikeln alle Schwingungsbanden, die nicht auf die Ethylenglykol-Einheit zurückzuführen sind und somit im Vergleich schon vor Konjugation schwach ausgeprägt sind (siehe Abbildung 3.11), vollständig. Daher ist anzunehmen, dass die an die Partikel gebundenen PEG-Liganden vor und nach Michael-Typ-Addition anhand der Schwingungsbanden, die für das CH₂=CH-Strukturelement in Konjugation mit einer Carbonylfunktion charakteristisch sind, nicht zu unterscheiden wären. Die Umsetzung der Acrylat-Einheit könnte evtl. durch eine Verschiebung der C=O-Schwingung der Estergruppe von ~ 1720 cm⁻¹ zu ~ 1730 cm⁻¹ verfolgt werden. Anders als mittels NMR-spektroskopischer Untersuchung könnte die Umsetzung IR-spektroskopisch allerdings nicht quantifiziert werden.

Die für die Ethylenglykol-Einheit charakteristischen Schwingungsbanden sind nach Anbindung an die Partikeloberfläche in ihrer Intensität reduziert, weiterhin scheint zum Teil eine Verbreiterung sowie eine Verschiebung zu sowohl höheren als auch niedrigeren Wellenzahlen zu erfolgen. Diese Beobachtungen könnten auf Konformationsänderungen der PEG-Ketten nach Konjugation mit der Eisenoxid-Oberfläche zurückgeführt werden. Die interne molekulare Konformation beeinflusst die Lage der Schwingungsbande: Kristalline und amorphe Phasen zeigen Schwingungsmoden der PEG-Einheit bei charakteristischen Wellenzahlen.^[88] Um Aussagen über die Morphologie der PEG-Beschichtung zu machen, wurden die PEGylierten Nanopartikel IR-spektroskopisch mit kristallinen sowie in Chloroform gelösten PEG-Liganden verglichen. Laut Literatur weist geschmolzenes und in Chloroform gelöstes Polyethylenglykol eine eher ungeordnete, amorphe Konformation auf.^[210] Daher wird für das gelöste Polymer eine amorphe Konformation angenommen. In Abbildung 3.19 sind die erhaltenen IR-Spektren in einem Bereich von 750-1800 cm⁻¹ sowie von 2640-3700 cm⁻¹ gezeigt. In Tabelle 3.2 sind die Wellenzahlen der in den IR-Spektren auftretenden Schwingungsmoden der Ethylenglykol-Einheit in kristalliner sowie amorpher Form und nach Anbindung an die Nanopartikeloberfläche im Vergleich dargestellt.

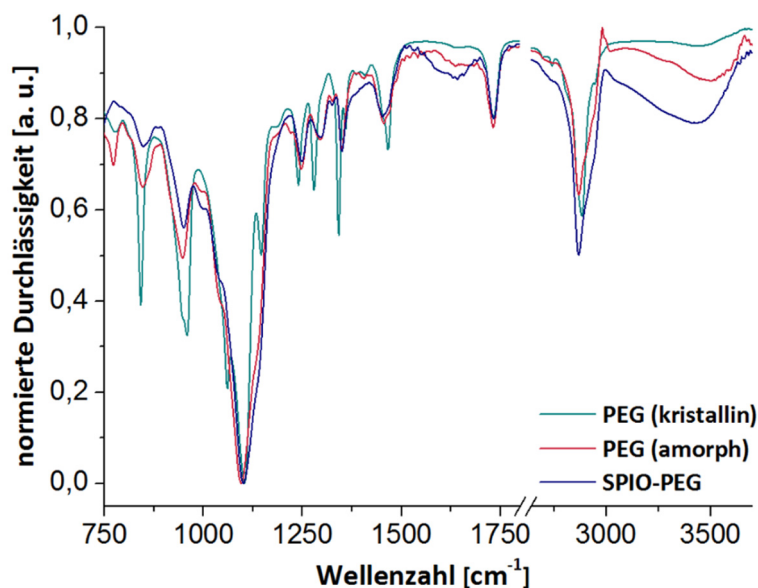


Abbildung 3.19: IR-Spektren von kristallinem und amorphem Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol sowie von den Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Gezeigt ist das IR-Spektrum der Polyethylenglykol-stabilisierten Partikel (blau) im Vergleich zu den Spektren des kristallinen (cyan) sowie des amorphen Polymers (rot) in einem Bereich von 750-1800 cm^{-1} sowie von 2640-3700 cm^{-1} . In dem Bereich dazwischen sind keine für die untersuchten Proben relevanten Signale vorhanden. Die kristalline und amorphe Phase weisen jeweils charakteristische Lagen der Schwingungsbanden der Ethylenglykol-Einheit auf.^[88] Das IR-Spektrum des Polymers in Konjugation mit den Nanopartikeln zeigt eine bessere Übereinstimmung mit dem Spektrum des in Chloroform gelösten Polymers. Nach Anbindung des Polymers an die Partikeloberfläche scheinen die für einen amorphen Zustand typischen Schwingungsmoden aufzutreten.

Wie aus Abbildung 3.19 und Tabelle 3.2 ersichtlich, zeigt der Vergleich der Lage der Schwingungsbanden eine bessere Übereinstimmung zwischen dem Partikeloberflächen-gebundenen Polymer und dem in Chloroform gelösten Polymer. Die Schwingungsbanden des gelösten Polymers zeigen weiterhin eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten^[88] für Banden, die einer amorphen, ungeordneten Konformation zugeordnet wurden. Die Lage der Schwingungsbanden der Ethylenglykol-Einheit in Konjugation mit den Nanopartikeln könnte daher auf eine amorphe Oberflächenstruktur des Polymers deuten.

Tabelle 3.2: Lage der Schwingungsbanden der Ethylenglykol-Einheit in kristallinem und amorphem Polyethylenglykol sowie in Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Eine genauere Zuordnung der Schwingungsmoden ist bereits in Tabelle 3.1 gegeben. Die Abkürzung sh (*shoulder*) beschreibt das Auftreten einer Schulter im genannten Wellenzahlbereich. Die mit * gekennzeichneten Wellenzahlen sind sehr breiten, die mit ** gekennzeichneten sehr schwachen Schwingungsbanden zuzuordnen.

PEG (kristallin)	SPIO-PEG	PEG (amorph)
Wellenzahl [cm ⁻¹]		
841	847	846
958	950	947
1060	~ 1040 [sh]	~ 1040 [sh]
1103	1101*	1095*
1145	~ 1140 [sh]	~ 1140 [sh]
1240	1248	1247
1279	1296	1295
1342	1349	1349
1360	1325**	1325**
1466, 1453 [sh]	1453*	1456*
2693, 2740, 2804 [sh]	-	-
2882, 2861 [sh], 2944	2867*, 2943 [sh]	2867*, 2943 [sh]

Harder *et al.*^[88] nahmen für eine Bedeckung von planaren Silber- und Gold-Oberflächen mit ausschließlich amorphem Polymer eine unvollständige, niedrige Oberflächenbedeckung an und beobachteten einen Verlust der Resistenz gegen eine unspezifische Adsorption von Proteinen. In der Studie von Harder *et al.* wurden Liganden aus kurzkettingen Ethylenglykol-Einheiten (maximal sechs Monomereinheiten) mit C₁₁-Alkylketten als Spacer verwendet. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hydrophile PEG-Ketten ohne hydrophobe Spacer verwendet. Bei PEG-Liganden ohne Spacer bestimmen nur repulsive Wechselwirkungen die Bedeckungsdichte während intermolekulare, attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten der Spacer eine höhere Bedeckungsdichte begünstigen können.^[169] Weiterhin werden gekrümmte statt planare Substrate betrachtet. Die Oberflächenkrümmung der sphärischen Eisenoxid-Nanopartikel bedingt, dass sich die PEG-Beschichtung zum Teil in einer amorphen und ungeordneten Struktur befindet. Durch die Krümmung der Oberfläche nimmt die Packungsdichte der PEG-Ketten mit dem distalen Abstand von der Oberfläche ab; die sphärische Symmetrie bedingt einen PEG-Dichtegradienten.^[169,180] Aus einer amorphen Oberflächenstruktur lässt sich

daher nicht unbedingt auf eine unvollständige Bedeckung und infolge auf eine geringe kolloidale Stabilität sowie reduzierte Biorepulsivität schließen.

Die PEG-stabilisierten Nanopartikel wurden weiterführend auf ihre Stabilität unter physiologischen Bedingungen untersucht. Unter anderem wurde ihre Resistenz gegen eine unspezifische Proteinadsorption durch Inkubation mit Fetalem Kälberserum (3.1.3.3), sowie ihre Zirkulationszeit im Blutkreislauf in Tiermodellen (3.1.3.4) untersucht.

3.1.3 Charakterisierung Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel

Die kolloidale Stabilität hängt maßgeblich von der Ligandenhülle ab, daher können Stabilitätstests genutzt werden, um die Polymer-Beschichtung der Eisenoxid-Nanopartikel weiter zu untersuchen.^[169] Eine hohe Stabilität bedingt eine dichte Bedeckung der Oberfläche mit den PEG-Liganden. Die kolloidale Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen ist ein wichtiger Aspekt der biologischen Anwendung. Dazu zählt unter anderem die Stabilität unter verschiedenen pH-Werten sowie unter hohem Salzgehalt. Weiterhin müssen die Partikel resistent gegen die unspezifische Adsorption von Serumproteinen und somit gegen Opsonierung sein. Genügen die Nanopartikel den hohen Anforderungen an die Stabilität führt dies zu einer hohen Bluthalbwertszeit. Eine lange Zirkulationszeit im Blutkreislauf ist dabei essentiell für eine nach Biokonjugation mögliche Anwendung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel als spezifisches Kontrastmittel für die molekulare MRT-Bildgebung. Ein weiterer, sehr wichtiger Aspekt für den Einsatz von Nanopartikeln in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen stellt ihre potentielle toxische Wirkung dar. Für biomedizinische Anwendungen sollte das eingesetzte nanopartikuläre System toxikologisch weitgehend unbedenklich sein. Neben partikokinetischen Parametern, wie der Bluthalbwertszeit, sind auch physikalische Eigenschaften des anorganischen Kerns bei der Anwendung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel zu berücksichtigen. Der Einsatz von Eisenoxid-Nanopartikeln in der Magnetresonanztomographie zur Kontrastverstärkung beruht auf ihrer Fähigkeit den Relaxationsprozess umgebender Wasserprotonen zu beeinflussen. Die Effektivität der Kontrastierung kann dabei durch die Relaxivität der Eisenoxid-Nanopartikel quantitativ beschrieben werden.

Dieses Kapitel der Arbeit befasst sich mit einer weiterführenden, umfassenden Charakterisierung der PEG-beschichteten Nanopartikel und wird in vier Abschnitte gegliedert: Es werden

Untersuchungen zur Kontrastgebung (3.1.3.1) sowie zur akuten *in vitro* Zytotoxizität (3.1.3.2) beschrieben. Weiterhin werden verschiedene Stabilitätsuntersuchungen (3.1.3.3) sowie die Verfolgung der Blutzirkulation der Nanopartikel mittels dynamischer MRT-Messungen im Tiermodell (3.1.3.4) dargestellt.

3.1.3.1 Untersuchungen zur Kontrastgebung

Die Magnetresonanztomographie ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, welches detaillierte anatomische Darstellungen ermöglicht. Die physikalischen Grundlagen der MRT stellen die kernmagnetische Resonanz (*Nuclear Magnetic Resonance* NMR) von Protonen sowie deren Relaxationsprozesse dar.^[9] Im Folgenden werden diese Grundlagen zum Verständnis der durchgeführten Untersuchung der kontrastgebenden Eigenschaften der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel genauer erläutert.

Protonen besitzen einen Spin von $\frac{1}{2}$. Es existieren daher zwei unterschiedliche Spinausrichtungen, α und β . Die Bezeichnung der entarteten Zustände erfolgt durch die Spinquantenzahlen $+\frac{1}{2}$ (α) und $-\frac{1}{2}$ (β).^[211] In Anwesenheit eines externen Magnetfeldes (B_0) wird die energetische Entartung zwischen den beiden Zuständen aufgehoben. Die Spins, welche in Bezug zur Richtung des äußeren Feldes eine günstigere parallele Orientierung aufweisen (α -Spins), werden energetisch abgesenkt. Die antiparallel und damit ungünstiger orientierten β -Spins werden energetisch angehoben. Im thermischen Gleichgewicht wird der energieärmere Zustand geringfügig stärker besetzt. Das Verhältnis der Besetzungszahlen wird durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben.^[211] Die Differenz in den Besetzungszahlen bewirkt eine kleine aber messbare Magnetisierung M_0 parallel zum angelegten Feld.^[211] M_0 wird auch als longitudinale Magnetisierung bezeichnet. M_0 ist proportional zur Stärke des angelegten Feldes B_0 , dem Quadrat des gyromagnetischen Verhältnisses γ und der Protonenspindichte ρ_0 .^[13] Das gyromagnetische Verhältnis stellt eine kernspezifische Konstante dar, die für Protonen einen Wert von 42.6 MHz/T annimmt.^[6,13] In weiterer Konsequenz des externen Magnetfeldes präzidieren die Spinvektoren mit der bei gegebener Feldstärke charakteristischen Larmor-Frequenz ω_0 (ω_0 ist das Produkt aus B_0 und γ) um die Achse des angelegten Feldes.^[9,212]

Grundlage der MRT ist die nach Beeinflussung des thermischen Gleichgewichts - und damit der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 - erfolgende Detektion der Rückkehr der Spins in den Gleich-

gewichtszustand. In Abbildung 3.20 ist die in Gegenwart eines externen magnetischen Feldes B_0 vorliegende Gleichgewichtsmagnetisierung M_z (im Gleichgewicht gilt: $M_z=M_0$) sowie das durch einen kurzen Radiofrequenzpuls (RF-Puls) bewirkte Umklappen des Magnetisierungsvektors in die xy -Ebene ($M_z=0$, M_{xy} ist unmittelbar nach dem Impuls maximal) und die Rückkehr in den initialen Gleichgewichtszustand dargestellt.

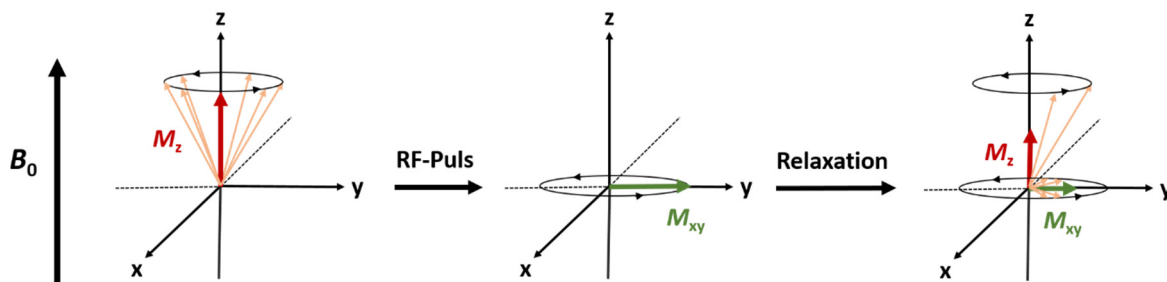


Abbildung 3.20 Schematische Darstellung des Prinzips der Signalerzeugung in der MRT. In Anwesenheit eines externen Magnetfeldes (B_0) präzidieren die Spins mit der Larmor-Frequenz um die Richtung des magnetischen Feldes (z -Richtung). Der Boltzmann-verteilte Besetzungsunterschied von α - und β -Spins führt zu einer makroskopischen Magnetisierung parallel zur Achse des externen magnetischen Feldes (M_z). Das Einstrahlen eines Radiofrequenzpulses (RF-Puls) bewirkt einen Übergang von α - in β -Spins und führt zu einer Gleichbesetzung der Spinzustände und damit zu einem Verschwinden der Magnetisierung entlang B_0 . Das in der transversalen Ebene eingebrachte Radiofrequenzfeld führt zu einem Umklappen des Magnetisierungsvektors aus der z - in die xy -Ebene. Unmittelbar nach der Anregung präzidieren die Spins synchron, M_{xy} ist maximal. Zwei unabhängige Relaxationsprozesse bewirken die Wiederherstellung des Gleichgewichtszustandes. Die longitudinale Relaxation beschreibt die Rückkehr zur Boltzmann-Verteilung im thermischen Gleichgewicht und somit den Wiederaufbau der longitudinalen Magnetisierung (M_z). Die transversale Relaxation beschreibt den Verlust der Phasengleichheit und somit die Abnahme der transversalen Magnetisierung (M_{xy}). Abbildung nach^[9,16]

Zunächst erfolgt eine Anregung der α -Spins in den antiparallelen Zustand. Die Energieadsorption durch die Protonen erfolgt unter Resonanzbedingungen. Die Resonanzfrequenz ist Funktion von B_0 und γ und enthält damit auch die Larmor-Frequenz.^[187] Das Einbringen eines kurzen Radiofrequenzpulses bewirkt α - β -Spinübergänge bis eine äquivalente Besetzung beider Zustände vorliegt.^[9,13,16,187] Die Gleichbesetzung bedingt, dass die z -Komponente der Magnetisierung den Wert Null annimmt. Gleichzeitig führt das bei einem typischen NMR-Experiment in der transversalen Ebene eingebrachte Radiofrequenzfeld zu einem Umklappen des Magnetisierungsvektors in die xy -Ebene (Richtungsänderung um 90°). Dieser Effekt wird als Quermagnetisierung bezeichnet und beruht darauf, dass die Frequenz des transversalen Feldes der Larmor-Frequenz entspricht und die Protonen für die Dauer des Pulses ein konstantes Feld (B_1 -Feld) in der xy -Ebene spüren um das sie präzidieren; die Präzessionsgeschwindigkeit ist proportional zur Stärke des Feldes B_1 .^[211] Direkt nach dem Einbringen des Radiofrequenzpulses besteht zwischen den individuellen Spins eine feste Phasenbeziehung. Weiterhin besteht der Magnetisierungsvektor in

der xy -Ebene aus gleich vielen α - und β -Spins, im Gleichgewicht werden hingegen die α -Spins stärker besetzt. Die im Anschluss an das Resonanzexperiment erfolgende Spin-Rückkehr in den Gleichgewichtszustand wird durch die Spinrelaxation beschrieben. Es werden zwei unabhängige Relaxationsmechanismen unterschieden: Die longitudinale und die transversale Relaxation.

Die longitudinale Relaxation beschreibt die exponentielle Rückkehr der longitudinalen Magnetisierung in den initialen Gleichgewichtszustand ($M_z=M_0$), der durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben wird.^[9,213] Die bei dem Übergang der β -Spins in die energetisch niedriger liegenden α -Spins freiwerdende Energie wird dabei in Form von Wärme an die Umgebung (Gitter) abgegeben, daher wird diese Relaxation auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet.^[12,211,212] Der exponentielle Aufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung folgt der Gleichung $M_z(t) = M_0(1-e^{-t/T_1})$ ^[13], und wird durch die Zeitkonstante T_1 beschrieben. Die longitudinale Relaxationszeit (T_1) entspricht der Zeit, nach der etwa 63% der Gleichgewichtsmagnetisierung wieder aufgebaut ist ($M_z = M_0(1-e^{-1})$).^[9]

Die transversale Relaxation führt nicht zu einer Rückkehr zur Gleichgewichtsbesetzung der Spinzustände sondern beschreibt die Abnahme der transversalen Magnetisierung in Folge von Dephasierungsprozessen.^[9,12,212,213] Die unmittelbar nach dem Anregungspuls bestehende Phasenkohärenz zwischen den individuellen Spins geht mit der Zeit kontinuierlich verloren; die Spins laufen verschieden schnell auseinander. Die Phasenverschiebung führt zum Auffächern der Spinvektoren in der xy -Ebene und damit verbunden zu einer Abnahme des resultierenden Gesamtvektors in dieser Ebene; die einzelnen Magnetisierungsvektoren beginnen sich gegenseitig aufzuheben anstatt sich zu addieren.^[212] Die Detektorspule befindet sich in der xy -Ebene. Das gemessene Signal ist maximal, wenn die individuellen Spins kohärent (phasengleich) sind. Bei Dephasierung wird das Gesamtsignal kleiner. Die transversale Relaxation besitzt zwei Komponenten. Die transversale Relaxationszeit T_2 charakterisiert den Phasenverlust infolge fluktuierender lokaler Magnetfeldänderungen, die zu spontanen Phasenunterschieden führen.^[13,212] Benachbarte Spins beeinflussen sich als kleine Magnete gegenseitig und verändern einander ständig das Magnetfeld.^[212] Da die Präzessionsgeschwindigkeit von der Magnetfeldstärke abhängt, präzedieren die Spins mit zeitlich nicht konstanten, voneinander unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die Dephasierung beruht nicht auf Abgabe von Energie an die Umgebung, sondern auf Wechselwirkungen zwischen den Spins und wird daher auch als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet.^[12,212] Die Zeitkonstante T_2 gibt an, wann die transversale

Magnetisierung auf einen Bruchteil von 37% (e^{-1}) zerfallen ist.^[9] Neben diesen fluktuierenden Inhomogenitäten tragen auch zeitlich konstante Inhomogenitäten (Suszeptibilitätseffekte) des externen Magnetfeldes oder im Körpergewebe zum Verlust der synchronen Präzession bei, sie bewirken einen beschleunigten Verlust der Kohärenz.^[9,16,212] Einzelne Spins weisen dabei abhängig von ihrem Ort unterschiedliche Larmor-Frequenzen und damit Präzessionsgeschwindigkeiten auf. Der Einfluss der statischen Inhomogenitäten wird in der Zeitkonstante T_2' zusammengefasst. Der Beitrag statischer und fluktuierender Inhomogenitäten wird durch die effektive transversale Relaxationszeit T_2^* ($1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_2'$)^[9,13] beschrieben. Der exponentielle Abfall der transversalen Magnetisierung und damit des MRT-Signals ist durch die Summe beider Beiträge gegeben und folgt der Gleichung $M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2^*}$.^[13]

Die MRT-Signale hängen von extrinsischen Parametern, wie dem Magnetfeld B_0 des Tomographen, sowie von intrinsischen Parametern der betrachteten Gewebe ab. Hierzu gehört die Protonenspindichte. Die transversale Magnetisierung und damit das messbare Signal wird aus der Gleichgewichtsmagnetisierung erzeugt; zwischen dieser und der Protonenspindichte besteht ein linearer Zusammenhang.^[13] Weitere intrinsische Parameter sind die longitudinale und transversale Relaxationszeit.^[6,12] Dies ist die Grundlage der Magnetresonanzbildgebung. Für die bildgebende Darstellung der MRT-Signale muss die Messung ortskodiert erfolgen. Es wird nicht genauer auf die MRT-Bildgewinnung eingegangen. Das Prinzip der Bildgewinnung kann zum Beispiel dem *Handbuch der Kernspintomographie*^[14] entnommen werden. Durch Bildgebungssequenzen können die verschiedenen intrinsischen Parameter unterschiedlich gewichtet werden.^[15,16] Häufig sind der Signalunterschied und damit die Kontrastierung zwischen verschiedenen Geweben sehr gering. Externe Kontrastmittel dienen der Erhöhung des Kontrasts und infolge der diagnostischen Aussagekraft. Die Kontrastmittel wirken dabei indirekt durch Veränderung der Relaxationszeiten umgebender Wasserprotonen. Es wird zwischen positiven und negativen Kontrastmitteln unterschieden. Positive Kontrastmittel verkürzen die longitudinale Relaxationszeit und verursachen in den gängigen Bildgebungssequenzen eine Zunahme der Signalintensität; dies äußert sich in einem helleren Bild.^[16] Negative Kontrastmittel haben einen verkürzenden Einfluss auf die transversale Relaxationszeit und bewirken eine Abnahme der Signalintensität und folglich ein dunkleres Bild. Die Beschleunigung des Dephasierungsprozesses der Protonenspins umgebender Wassermoleküle resultiert aus mikroskopischen Feldinhomogenitäten, die auf das magnetische Moment des Kontrastmittels zurückzuführen sind.^[6,9,12] Der Effekt von Eisenoxid-

Nanopartikeln auf die Signalintensität hängt von verschiedenen Faktoren wie der Konzentration, aber auch von der Zusammensetzung und der Größe der Nanopartikel ab.^[11,18] Die Signaländerung in einer bestimmten Region ist eine einfache Funktion der Konzentration des dort angereicherten Kontrastmittels. Auf den Einfluss der Größe auf die kontrastgebenden Eigenschaften wird im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zur Kontrastgebung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel eingegangen. Die Effizienz eines Kontrastmittels einen bestimmten Relaxationsprozess zu beschleunigen wird quantitativ durch die Relaxivitäten r_1 und r_2 beschrieben.^[9,12] Diese beschreiben die Verkürzung einer bestimmten Relaxationszeit pro Konzentrationseinheit des Kontrastmittels. Je größer die transversale (r_2) bzw. die longitudinale (r_1) Relaxivität ist, desto stärker wird der entsprechende Relaxationsprozess verkürzt. Kontrastmittel mit einem hohen r_2/r_1 Verhältnis zeigen einen signifikanten T_2 -Effekt.

Zur Bestimmung der relaxometrischen Eigenschaften der PEG-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel wurden Untersuchungen an den wässrigen Nanopartikel-Dispersionen mit einem minispec mq-60 NMR Analyzer bei einer klinisch relevanten Feldstärke von 1.41 T (60 MHz) durchgeführt. Hierfür wurden für eine Konzentrationsreihe die transversalen und longitudinalen Relaxationszeiten bestimmt. Die den Messungen zugrundeliegenden Relaxationsprozesse wurden im Vorfeld beschrieben. Zur Ermittlung der Relaxivitäten (r_1 und r_2) wurden die inversen Relaxationszeiten gegen die analytische Eisenkonzentration aufgetragen. In Abbildung 3.21 sind die longitudinalen und transversalen Relaxivitäten, sowie die r_2/r_1 -Verhältnisse, von mit PEG-Molekülen vergleichbarer Kettenlänge beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln unterschiedlicher Kerngröße gezeigt. Die 4 nm und 19 nm großen Partikel sind mit Methoxy-terminierten und somit unreaktiven PEG-Liganden beschichtet. Die Werte für die transversalen und longitudinalen Relaxivitäten dieser Partikel wurden vorangegangenen Studien^[123,182] entnommen; die Messungen erfolgten analog. Die nicht gezeigten DLS-Messungen bestätigen, dass es sich bei den untersuchten Proben um nicht-aggregierte, kolloidal stabile Systeme handelt. Weiterhin sind in Abbildung 3.21 am Beispiel der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 10.5 nm großen Eisenoxid-Nanopartikel (d_{hyd} : 26 nm) die Auftragungen der ermittelten reziproken Relaxationszeiten (Relaxationsraten R) gegen die analytische Eisenkonzentration gezeigt. Die Steigung der Auftragung entspricht der konzentrationsunabhängigen Relaxivität ($1/T_1 = r_1[\text{Fe}]$. Entsprechendes gilt für den transversalen Fall).

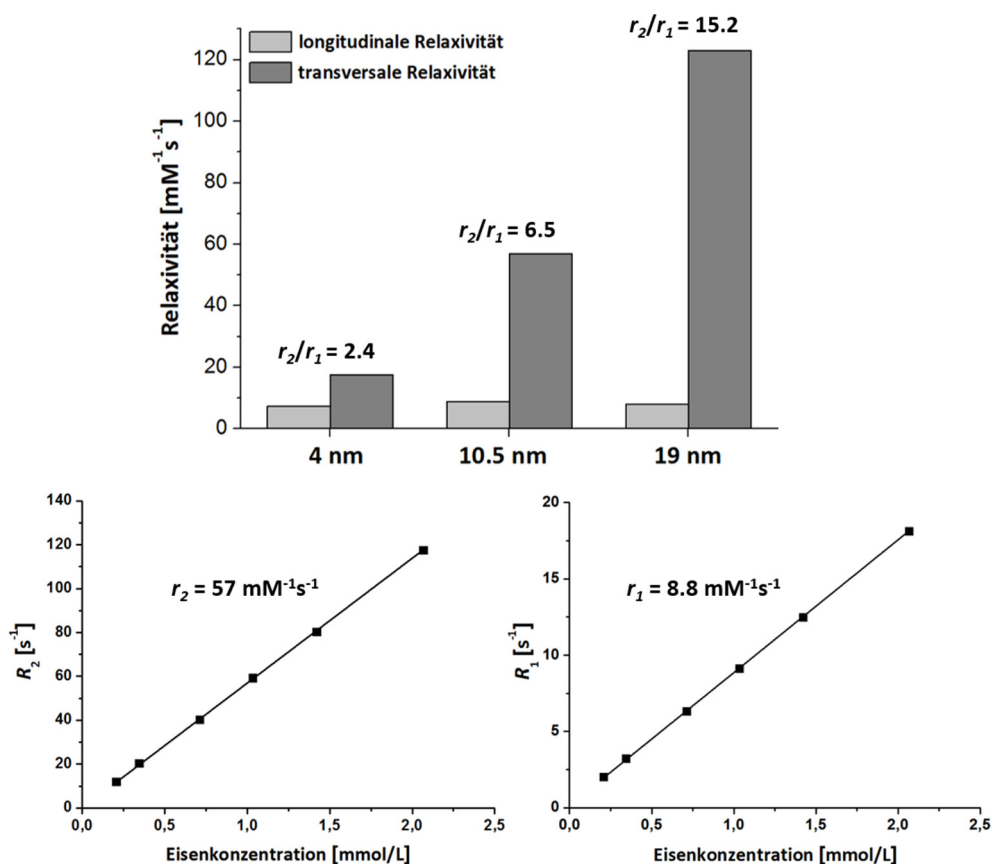


Abbildung 3.21 Analytik der Kontrastgebung Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel. Gezeigt sind die transversalen und longitudinalen Relaxivitäten für 10.5 nm große Partikel im Vergleich zu denen von 4 nm und 19 nm großen Partikeln, welche mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol-Methylether (mPEG) vergleichbarer Kettenlänge beschichtet sind (oben). Die Werte für die mPEG-stabilisierten Partikel wurden vorangegangenen Studien^[123,182] entnommen. Des Weiteren ist für die 10.5 nm großen Partikel die transversale und longitudinale Relaxationsrate R als Funktion der Konzentration der Nanopartikel (in Form des Eisengehalts) gezeigt (unten). Die Steigung dieser Auftragungen gibt die entsprechende konzentrationsunabhängige Relaxivität. Mit zunehmender Partikelgröße steigt sowohl die transversale Relaxivität als auch das r_2/r_1 -Verhältnis an.

Es ist erkennbar, dass die longitudinale Relaxivität aller untersuchten Proben nahezu identisch ist. Die Relaxivität eines Kontrastmittels setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen, der sogenannten *inner-sphere* und *outer-sphere* Relaxivität. Der *inner-sphere* Beitrag stellt einen wichtigen Beitrag bei der Behandlung von positiven Kontrastmitteln dar und beschreibt die Relaxation aller Protonen, die direkt an das Kontrastmittel gebunden sind.^[16,213] Damit sollte eine starke Abhängigkeit der longitudinalen Relaxation von der Hüllschicht gegeben sein. Die vergleichbare Beschichtung der untersuchten Proben könnte eine Erklärung für die ähnlichen r_1 -Werte sein.

Die transversale Relaxivität und damit auch das r_2/r_1 -Verhältnis steigen wie erwartet mit zunehmender Größe des anorganischen Kerns. Die transversale Relaxivität wird maßgeblich durch den sogenannten *outer-sphere* Beitrag bestimmt. Die *outer-sphere* Relaxivität beschreibt das Relaxationsverhalten der Protonen von Wassermolekülen, die in der Umgebung des Kontrastmittels

diffundieren.^[214] Der *outer-sphere* Beitrag zur transversalen Relaxation hängt von zahlreichen Parametern ab.^[9,16] Unter anderem besteht zwischen der transversalen Relaxationsrate ($1/T_2$) und dem magnetischen Moment eines einzelnen Partikels eine direkte Abhängigkeit.^[9] Damit wird r_2 über die Sättigungsmagnetisierung M_s bestimmt.^[16] Die transversale Relaxivität ist dabei umso größer, je höher die Sättigungsmagnetisierung ist. Bei makroskopischen Ferromagneten ist M_s eine materialintrinsische Größe. Im superparamagnetischen Bereich zeigt sich die Sättigungsmagnetisierung größenabhängig.^[16,17,19,215] Die Abhängigkeit von der Partikelgröße resultiert daher, dass anders als bei makroskopischen Ferromagneten die Störung der ferromagnetischen Ordnung an der Oberfläche stärker ins Gewicht fällt; nanoskalige Materialien weisen infolge der an der Oberfläche reduzierten Austauschenergie einen hohen Anteil nicht-kollineare (glasartige) Spinanordnungen auf.^[16,17,19,215] Mit abnehmender Teilchengröße in den nanoskaligen Bereich nimmt das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis drastisch zu; die Atome nehmen vermehrt Oberflächenplätze ein. Defekte an der Ober- und Grenzfläche spielen somit eine zunehmende Rolle und tragen zu einer direkten Beeinflussung der Sättigungsmagnetisierung bei.^[23,156,215] Dies macht sich in einem Abfall der Sättigungsmagnetisierung m_s der nanoskaligen Materialien mit abnehmender Teilchengröße r bemerkbar ($m_s = M_s[(r-d)/d]^3$; M_s ist die Sättigungsmagnetisierung des dreidimensionalen Festkörpers und d die Dicke der fehlgeordneten Oberflächenschicht).^[9,215] In den gängigen MRT-Bildgebungssequenzen würden die PEG-stabilisierten 10.5 nm großen Eisenoxid-Nanopartikel aufgrund ihrer vergleichsweise hohen transversalen Relaxivität eine schnelle T_2 -Relaxation umgebender Wasserprotonen verursachen. Sie wirken als negatives Kontrastmittel; für T_1 -Kontrastmittel liegt der r_2/r_1 -Wert typischerweise zwischen 1-2.^[18,214] Wie aus der Auftragung der Relaxivitäten gegen den Kerndurchmesser ersichtlich, kann der T_1 -Effekt durch eine Reduktion der Größe der Eisenoxidnanopartikel verstärkt werden und der T_2 -Effekt durch eine zunehmende Partikelgröße.

Die durch ein Kontrastmittel bewirkte Signaländerung ist eine einfache Funktion der Konzentration des Kontrastmittels. Der lineare Zusammenhang zeigt sich in der Auftragung der reziproken Relaxationszeit gegen die Eisenkonzentration. Mit zunehmender Konzentration nimmt die Relaxationszeit ab; die Relaxationsrate steigt entsprechend. Aus dieser Auftragung (Abbildung 3.21) kann auf eine hohe Stabilität bei Verdünnung geschlossen werden: Der *outer-sphere* Beitrag zur transversalen Relaxivität zeigt eine starke Abhängigkeit von der Zahl der Partikel in einem möglichen Aggregat.^[16] Die Ausbildung von Aggregaten würde die transversale Relaxationszeit

verkürzen. R_2 korreliert somit mit der Neigung zur Aggregation. Die lineare Abhängigkeit der Relaxationsrate von der Konzentration bleibt bis zu der untersuchten Nanopartikel-Konzentration von ~ 8 nM (Eisenkonzentration: ~ 0.2 mM) bestehen. Die lineare Regressionsgerade weist ein hohes Bestimmtheitsmaß ($R^2 \sim 1$) auf. Beim Auftreten von Aggregaten durch Destabilisierung beim Verdünnen würde R_2 steigen und der lineare Zusammenhang verloren gehen. Eine lineare Abhängigkeit der Relaxationsrate ($R^2 \sim 1$) und damit die hohe Stabilität gegen Verdünnung konnte auch für PEGylierte Nanopartikel (Kerndurchmesser: 10.9 nm) mit einem größeren hydrodynamischen Durchmesser von ~ 40 nm und einer breiteren Größenverteilung (siehe 3.1.2.2) beobachtet werden. Der untersuchte Nanopartikel-Konzentrationsbereich lag hier zwischen ~ 100 nM und ~ 11 nM. Für diese Partikel (kristalline Größe: ~ 9.5 nm) wurde eine longitudinale Relaxivität von ~ 8.3 mM $^{-1}$ s $^{-1}$ sowie eine transversale Relaxivität von ~ 62 mM $^{-1}$ s $^{-1}$ ermittelt. Für Resovist®, welches aus polydispersen aggregierten Eisenoxid-Kernen (Kerngröße: 4 nm^[9,18]) besteht, beträgt r_2 : 130 mM $^{-1}$ s $^{-1}$ (1.41 T)^[182]. Für nicht-aggregierte 4 nm große Eisenoxid-Nanopartikel wurde ein r_2 -Wert von ~ 18 mM $^{-1}$ s $^{-1}$ ^[182] ermittelt. Aggregate führen zu einem drastischen Anstieg der transversalen Relaxivität. Der r_2 -Wert von ~ 62 mM $^{-1}$ s $^{-1}$ deutet daher auf die Abwesenheit von Aggregaten. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem, der für die 10.5 nm großen PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel ermittelt wurde.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Kontrastgebung zeigen, dass PEGylierte Eisenoxid-Nanopartikel mit reproduzierbaren kontrastgebenden Eigenschaften erhalten werden konnten.

Die transversale Relaxationszeit der PEGylierten Nanopartikel blieb über einen untersuchten Zeitraum von bis zu ~ 20 Monaten unverändert. Diese Beobachtung weist zusammen mit der hohen Stabilität gegen die Verdünnungsschritte auf eine dichte Oberflächenbeschichtung und schwach ausgeprägte Desorption der Liganden von der Nanopartikeloberfläche. Die Desorption von Oberflächen-gebundenen Stabilisatoren führt zu einer abnehmenden Bedeckungsdichte und damit zu einer Zunahme von Defekten in der Ligandenhülle. Nicht abgeschirmte aktive Oberflächen und damit eine unzureichende Stabilisierung können zu einer Aggregation der Nanopartikel führen. In Anwesenheit eines äußeren Magnetfeldes weisen die Eisenoxid-Nanopartikel ein großes magnetisches Moment auf: Neben der für die Nanopartikel typischen Neigung zur Aggregation infolge der großen Oberfläche ist zu berücksichtigen, dass attraktive magnetische Wechselwirkungen eine Aggregation bei unzureichender Stabilisierung zusätzlich

begünstigen.^[20] Umfassende Untersuchungen zur Stabilität der PEGylierten Partikel sind unter **3.1.3.3** beschrieben.

3.1.3.2 Untersuchungen zur Toxizität

Eine potentielle Toxizität der nanopartikulären Materialien ist ein wichtiger Aspekt, der bei der angestrebten Anwendung beachtet werden muss. Eine biomedizinische Anwendung setzt eine möglichst geringe toxische Wirkung voraus. Sowohl Eisenoxid-Nanopartikel als auch PEG sind bereits klinisch zugelassen. Eisenoxid ist ein sehr gut untersuchtes Material für Anwendungen in der Biomedizin. Eisenoxid-basierte Nanopartikel weisen eine hohe Biokompatibilität auf und werden toxikologisch als weitgehend unbedenklich eingestuft.^[6,17,19,216] Eisenoxid-Nanopartikel finden bereits seit den späten 1980er Jahren Anwendung in der medizinischen Bildgebung.^[9,12,13,17,18] Weiterhin werden sie auch im therapeutischen Bereich genutzt: 2010 erhielt das Berliner Unternehmen MagForce die europäische Zulassung für die sogenannte NanoTherm Therapie®. Ein großer Vorteil dieser Nanopartikel liegt in der Biodegradierbarkeit des Eisenoxid-Kerns. Biologisch-beständige Nanopartikel können eine signifikante Toxizität vermitteln und granulomatöse Entzündungen hervorrufen.^[49] Der Abbaumechanismus der Eisenoxid-Nanopartikel sieht dabei wahrscheinlich wie folgt aus: Die Partikel werden durch Endozytose in die Zellen aufgenommen.^[161] Das entstandene frühe Endosom reift zum späten Endosom heran, durch Verbindung mit einem Lysosom entsteht ein Endolysosom (sekundäres Lysosom).^[161] In diesem kommt es durch das entstandene saure Milieu und die Anwesenheit Eisen-chelatisierender Verbindungen zur Degradation der Partikel.^[161] Das beim Abbau freigesetzte Eisen kann analog zum endogenen Eisen im physiologischen Eisenstoffwechsel verwertet werden.^[8,19,21,24,161] Eisen ist ein natürlich vorkommendes Spurenelement und spielt in zahlreichen biologischen Prozessen wie z.B. dem Sauerstofftransport eine wesentliche Rolle als Kofaktor.^[57] Die klinische Standard-Applikation von 50-100 mg Eisen in Form der Eisenoxid-Nanopartikel ist dabei gering im Vergleich zur Menge an physiologischen Eisen.^[6] Im Mittel enthält der Körper eines gesunden Erwachsenen 3500 mg.^[6] Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass freies Eisen - trotz seiner bedeutenden Rolle in Eukaryoten - katalytisch aktiv und damit toxisch für Zellen ist.^[57] Deshalb sind die Eisenaufnahme über die Nahrung sowie die Eisenspeicherung auch ausgeklügelten Mechanismen unterworfen.^[57] Intrazellulär wird Eisen in Form von Ferritin gespeichert.^[161] In

dieser Form liegt Eisen in der weniger reaktiven Oxidationsstufe +III vor.^[23] Die Toxizität des Eisens beruht auf der Eisen-induzierten Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species* ROS), wie etwa Hydroxyl-Radikale, durch die Fenton- (durch Fe^{2+} katalysiert; $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) oder die Haber-Weiss-Reaktion, welche auch als Superoxid-gesteuerte Fenton-Reaktion bezeichnet wird (in zwei Schritten; 1. Schritt: $\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$, 2. Schritt: Fenton-Reaktion).^[12,217-221] Die ROS-Produktion kann zum Beispiel zu einer Schädigung der DNA oder Oxidation von Proteinen führen, sowie den Zelltod verursachen.^[218,220] Es wurde gezeigt, dass die Reaktion von Fe^{2+} und Sauerstoff unter Bildung von ROS schneller abläuft wenn die Eisenionen nicht in Lösung sondern auf einer Mineraloberfläche adsorbiert vorliegen.^[222] Nanopartikel weisen ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und somit eine hohe Anzahl reaktiver Oberflächenatome auf. Die große spezifische Oberfläche der Nanopartikel sollte daher zu einer verstärkten Erzeugung von ROS durch katalytische Prozesse an der Oberfläche führen.^[8,222] Brunner *et al.* fanden für unbeschichtete Eisenoxid-Nanopartikel bei vergleichsweise geringen Eisenkonzentrationen eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in humanen Mesotheliom-Zellen.^[218] Die reduzierte Zellviabilität wurde auf eine verstärkte Produktion von ROS zurückgeführt^[218] und ist im Einklang mit einer hohen katalytischen Aktivität der nanopartikulären Oberfläche. Oberflächenmodifikationen ermöglichen die kontrollierte Veränderung von Grenzflächeneigenschaften.^[45] Eine potentielle biomedizinische Anwendung der Eisenoxid-Nanopartikel erfordert eine effiziente Oberflächenbeschichtung durch welche die hohe Reaktivität der Oberfläche, sowie infolge die Toxizität reduziert werden kann. Auf Eisenoxid-Nanopartikel basierte Kontrastmittel in klinischer Anwendung sind zum Beispiel mit Dextran oder Carboxydextran beschichtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eisenoxid-Nanopartikel mit PEG beschichtet. Die Vorteile dieser Oberflächenbeschichtung sind unter 2.1.1.1 genau erläutert. Deshalb sei an dieser Stelle nur erwähnt, dass PEG im Kontext medizinischer und biologischer Forschung sehr gut untersucht ist; von der FDA wurde es für viele Anwendungen zugelassen und es stellt im Bereich der Pharmazie und Medizin für viele Anwendungen den Goldstandard dar.^[26,74,169]

Im Rahmen einer früheren Arbeit im Arbeitskreis Weller^[182], an der die Verfasserin dieser Arbeit beteiligt war, konnte für 4 nm große, mPEG-beschichtete (M_w : ~ 1100 g/mol, Phosphat-Ankergruppe) Eisenoxid-Nanopartikel in *in vitro* Toxizitätsuntersuchungen eine unveränderte Zellviabilität beobachtet werden, analog zu dem zum Vergleich untersuchten klinischen Standard

Resovist®. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0.2-200 µg Eisen/mL untersucht, der Inkubationszeitraum betrug 24 Stunden. Eisenoxid-Nanopartikel (4 nm Kerngröße), die mit Phosphat-funktionalisiertem mPEG einer Kettenlänge von ~ 2000 g/mol beschichtet wurden, zeigten in dieser Studie eine reduzierte Zellviabilität. Die Reduktion wurde auf eine vermutlich geringere Bedeckungsdichte der Partikeloberfläche mit Polymer zurückgeführt. Dies zeigt die Bedeutung einer stabilen, dichten Oberflächenbeschichtung. Für eine reduzierte toxische Wirkung der Eisenoxid-Nanopartikel ist eine initiale hohe Bedeckungsdichte essentiell. Diese dichte Oberflächenbedeckung muss auch unter physiologischen Bedingungen aufrechterhalten werden. Hierfür ist eine vernachlässigbar geringe Desorptionsrate der Polymere aus der Ligandenhülle erforderlich. Eine unvollständige Bedeckung der aktiven Nanopartikeloberfläche könnte zur Freisetzung von Eisenionen, sowie zu einer verstärkten Erzeugung freier Radikale durch katalytische Prozesse an der Oberfläche führen. Weiterhin könnten unzureichend beschichtete Nanopartikel zu größeren Einheiten aggregieren. In Abhängigkeit des Ausmaß dieser Aggregate könnte *in vivo* eine sogenannte frustrierte Phagozytose induziert werden, die zu chronischen Entzündungen führen kann, und in Konsequenz die Gefahr einer Krebserkrankung oder einer neurodegenerativen Erkrankung erhöhen.^[23]

Ein entscheidendes Kriterium bei der Untersuchung der Toxizität einer Substanz ist die Konzentrationsabhängigkeit. Eine mögliche konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen ~ 3.58 µmol Eisen/L (0.2 µg Eisen/mL) und ~ 5370 µmol Eisen/L (300 µg Eisen/mL) untersucht. Im Rahmen der früheren Toxizitätsstudie^[182] wurde ein Konzentrationsbereich von 0.2-200 µg Eisen/mL untersucht. Die Konzentration von 200 µg Eisen/mL (~ 3580 µmol Eisen/L) wurde als biologisch relevant angenommen. Hierfür wurden typische Injektionsdosen für ein *in vivo* Mausexperiment zu Grunde gelegt: 0.2 mL Injektionsvolumen, 2 mL Gesamtblutvolumen, 2 mg Eisen/mL Injektionskonzentration.^[182] In Tierexperimenten wird gewöhnlich mit höheren Konzentrationen als in klinischen Anwendungen gearbeitet. Unter Berücksichtigung der gewichtsbezogenen Blutmenge bei Frauen von durchschnittlich 55.1 mL/kg^[223], einer klinischen Standardapplikation von 50-100 mg Eisen^[6] sowie einem Gewicht von 90 kg ergibt sich eine Konzentration von 10-20 µg Eisen/mL; für Männer (73.3 mL/kg^[223]) ergibt sich bei gleichen Parametern (90 kg, 50-100 mg Eisen) eine Konzentration von ~ 8-15 µg Eisen/mL. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Konzentrationsbereich deckt somit relevante Konzentra-

tionen ab. Die Untersuchung einer möglichen akuten Zytotoxizität der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte mit Hilfe eines Verfahrens, das routinemäßig Anwendung in dem Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN GmbH) findet. Hierfür wurde das Partikelsystem hinsichtlich einer zytotoxischen Wirkung auf der humanen Lungenkrebszelllinie A549 untersucht. Als positive Referenzkontrolle wurden die A549-Zellen mit Cadmiumchlorid in einer Konzentration bis zu 300 µM inkubiert. Cadmiumchlorid wirkt schon in geringen Konzentrationen toxisch. Als Negativkontrolle dienten die Zellen in Medium. Nach einer Inkubationszeit von ~ 16 Stunden wurden der Zellkern und die Mitochondrien gefärbt. Das Anfärben dieser Zellorganelle ermöglicht die Bestimmung der Zellzahl, der Zellmorphologie, der Zellkernmorphologie, der Zellkerngröße, der Intensität der Zellkerne (diese Größe wird im Folgenden genauer erklärt) und der Aktivität der Mitochondrien (Mitochondrienpotential). Die Beurteilung der Toxizität kann anhand dieser Parameter erfolgen. Eine beginnende zytotoxische Wirkung würde sich in einem zunehmenden mitochondrialen Membranpotential zeigen. Das Mitochondrienpotential kann vereinfacht als Indikator für den Energiestatus der Mitochondrien gesehen werden und ermöglicht qualifizierte Aussagen über den Zustand der Mitochondrien.^[224] Unter Zellstress zeigen die Mitochondrien eine gesteigerte Aktivität; die Mitochondrien-vermittelte Apoptose (programmierte Zelltod) wird eingeleitet. Eine beginnende zytotoxische Wirkung würde sich weiterhin in einer Kondensation des Chromatins der Zellkerne zeigen.^[218] Der Zellkern wurde mit dem DNA-Farbstoff Hoechst gefärbt. Die Kondensation des Chromatins geht mit einer Zunahme der Intensität des Hoechst-Farbstoffs und folglich der Zellkernintensität einher. Weiterhin kann die Zellzahl abnehmen. Mit zunehmender Konzentration des Xenobiotikums sterben die Zellen ab - die Zellzahl sinkt drastisch - und es kann ein starker Abfall des Mitochondrienpotentials beobachtet werden. Weiterhin wird die DNA internukleosomal gespalten und der Zellkern zerfällt schließlich.^[225] Infolge nehmen die Intensität des DNA-Farbstoffs und damit die Zellkernintensität, sowie die Zellkernzahl ab. Ist die zu testende Substanz nicht toxisch, bleiben die genannten Parameter über den untersuchten Konzentrationsbereich konstant. Diese vier Parameter können durch die durchgeführte Toxizitätsprüfung an einem Cellomics Array Scan® quantifiziert werden. Durch den Einfluss von toxischen Reagenzien verändert sich unter anderem auch die Morphologie der Zellen. Morphologische Parameter der Apoptose sind zum Beispiel das Schrumpfen oder Abrunden der Zellen. Morphologische Veränderungen, sowie eine Abnahme der Zellzahl infolge einer toxischen Wirkung können anhand mikroskopischer Aufnahmen der Zellen einfach und

zuverlässig charakterisiert werden. In Abbildung 3.22 sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der A549-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit den PEG-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln, sowie mit Cadmiumchlorid für den jeweils untersuchten Konzentrationsbereich gezeigt. Weiterhin ist eine repräsentative Aufnahme der A549-Zellen nach Inkubation in Medium ohne Probenzugabe über einen Zeitraum von ebenfalls 16 Stunden gezeigt.

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Zellzahl nach Zugabe von Cadmiumchlorid ab einer Konzentration von 100 μM abnimmt. Weiterhin sind deutliche morphologische Veränderungen zu beobachten: Die Zellen werden kompakter und runden sich ab. Mit zunehmender Konzentration an Cadmiumchlorid nimmt die Zellzahl weiter ab. Cadmiumchlorid zeigt bereits in niedrigen Konzentrationen den erwarteten zytotoxischen Effekt. Hingegen sind bei Inkubation der A549-Zellen mit den PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln bei keiner der untersuchten Konzentrationen morphologische Veränderungen zu beobachten. Die Zellen sind immer mit der Kontrolle vergleichbar. Bei der höchsten untersuchten Konzentration ($\sim 5370 \mu\text{mol Eisen/L}$ bzw. $300 \mu\text{g Eisen/mL}$) sinkt die Zellzahl leicht. Die PEGylierten Partikel scheinen ab dieser Konzentration erste leichte Veränderungen auf den A549-Zellen zu zeigen.

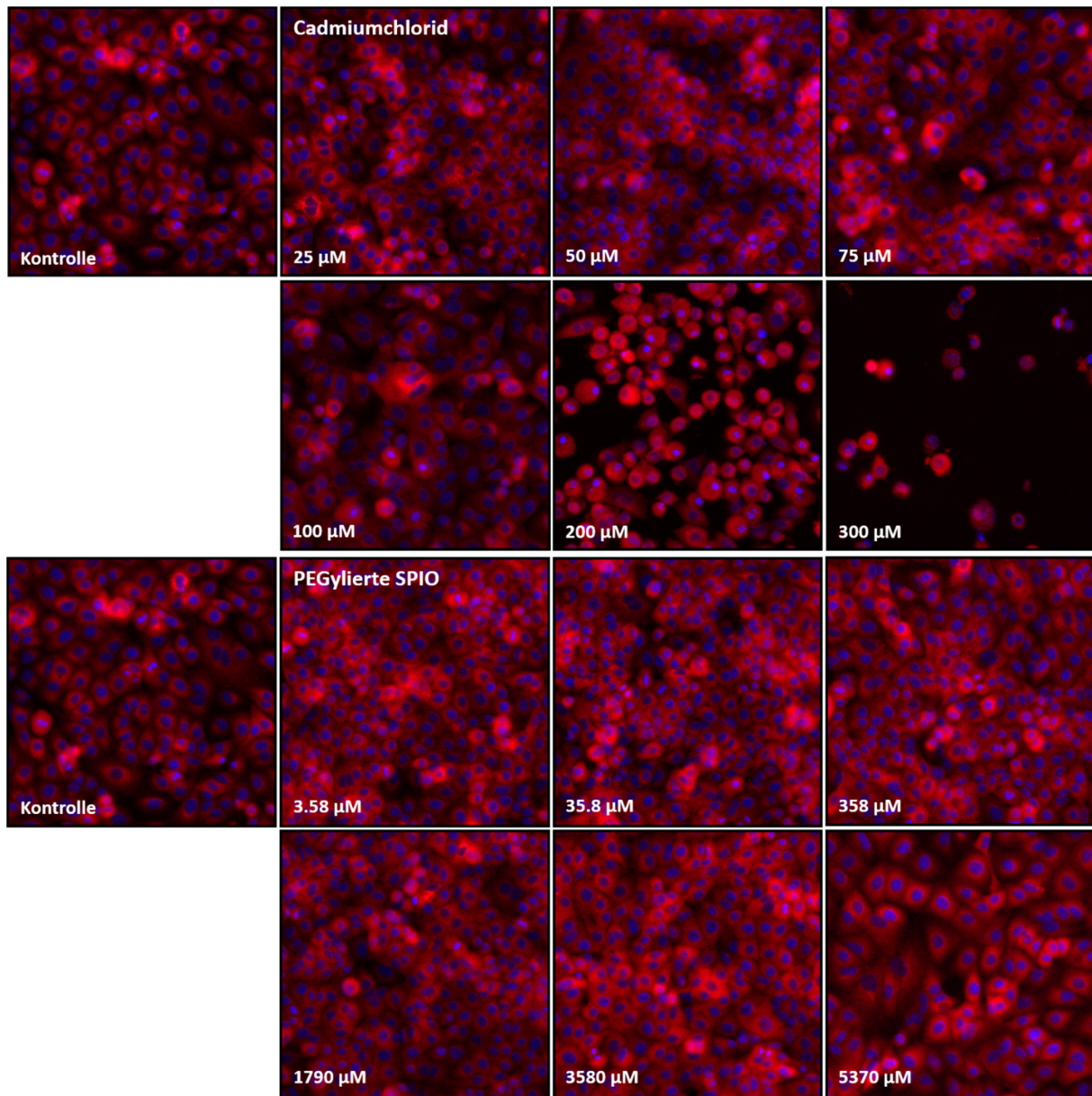


Abbildung 3.22: Mikroskopische Aufnahmen von A549-Zellen nach 16-stündiger Inkubation mit Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln sowie mit Cadmiumchlorid. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von A549-Zellen bei extrazellulären Cadmium-Konzentrationen von 25-300 µM (oben), sowie bei unterschiedlichen extrazellulären Nanopartikel-Konzentrationen (unten). Es ist nicht die Partikelkonzentration sondern die entsprechende Eisenkonzentration (~ 3.58-5370 µM) angegeben. Des Weiteren sind Zellen nach 16 Stunden Inkubation ohne Zugabe von PEGylierten Nanopartikeln oder Cadmiumchlorid dargestellt (Kontrolle). Die Zellkerne erscheinen durch einen DNA-Farbstoff (Hoechst 33342) blau. Die Mitochondrien wurden mit Mito Tracker® Deep Red gefärbt und erscheinen dadurch rot. Ab einer Konzentration von 100 µM Cadmiumchlorid nimmt die Zellzahl ab und die Morphologie der Zellen beginnt sich deutlich zu verändern. Konzentrationsabhängig nimmt die Zellzahl weiter ab. Für die Eisenoxid-Nanopartikel sind bei keiner der getesteten Konzentrationen morphologische Veränderungen zu beobachten. Bei der höchsten untersuchten Konzentration (~ 5370 µmol Eisen/L bzw. 300 µg Eisen/mL) sinkt die Zellzahl leicht.

Eine beginnende zytotoxische Wirkung sollte sich in einem Anstieg des Mitochondrienpotentials und bei zunehmender Konzentration des potentiellen Xenobiotikums in einem drastischen Abfall des mitochondrialen Potentials zeigen. Ein ähnlicher Verlauf sollte für die Intensität des DNA-

Farbstoffs und damit für die Zellkernintensität zu erwarten sein. In Abbildung 3.23 ist daher die Quantifizierung der Toxizitätsprüfung der PEGylierten Eisenoxid-Partikel gezeigt. Es sind die Zellzahl, die Zellkerngröße, die Intensität der Zellkerne und das Mitochondrienpotential als Funktion der Konzentration der Nanopartikel (in Form der extrazellulären Eisenkonzentration ~ 3.58 - $5370 \mu\text{M}$) dargestellt.

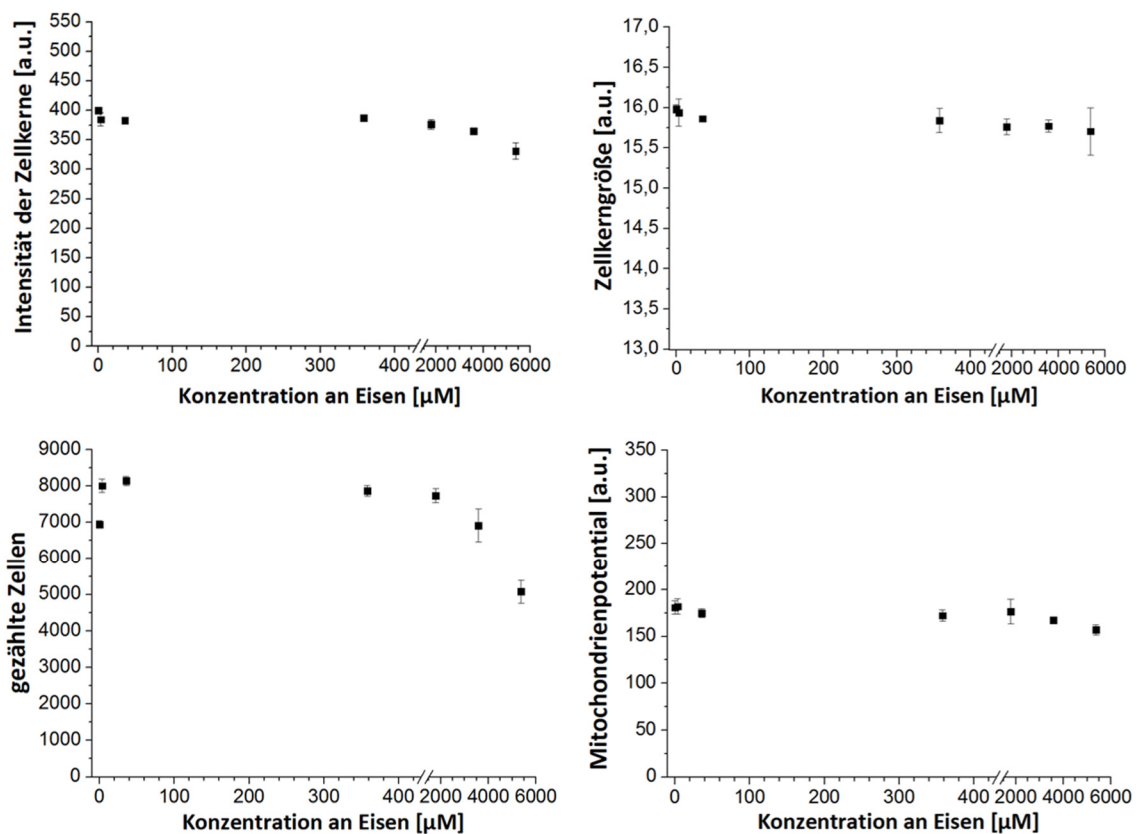


Abbildung 3.23: Quantifizierung der Toxizitätsprüfung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel. Gezeigt sind die Intensität der Zellkernfärbung, die Zellkerngröße, die Zellzahl sowie das Mitochondrienpotential nach 16-stündiger Inkubation der A549-Zellen als Funktion der Konzentration der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel (Eisengehalt von $\sim 3.58 \mu\text{M}$ bis $\sim 5370 \mu\text{M}$). Die Eisenkonzentration von $0 \mu\text{M}$ entspricht der Negativkontrolle. Die Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Replikaten pro Inkubationskonzentration (Mittelwert \pm s.d. mit $n = 3$). Die Zellkerngröße, die Zellkernintensität sowie das Mitochondrienpotential bleiben über den untersuchten Konzentrationsbereich konstant. Bei der höchsten Inkubationskonzentration ($\sim 5370 \mu\text{mol Eisen/L}$ bzw. $300 \mu\text{g Eisen/mL}$) sinkt die Zellzahl.

Aus den vier Auftragungen ist zu erkennen, dass weder die Intensität des DNA-Farbstoffs noch das mitochondriale Potential konzentrationsbedingt beeinflusst werden. Ebenso bleibt die Zellkerngröße über den untersuchten Konzentrationsbereich konstant. Die Quantifizierung der Zellzahl zeigt eine deutliche Abnahme bei der höchsten Eisenkonzentration ($\sim 5370 \mu\text{mol Eisen/L}$

bzw. 300 µg Eisen/mL) und korreliert damit mit der anhand der mikroskopischen Aufnahmen getroffenen Annahme, dass ab dieser Konzentration Veränderungen auftreten.

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen und der Quantifizierung der Toxizitätsprüfung sind keine eindeutigen Zeichen für einen toxischen Effekt zu erkennen. Ab einer Konzentration von 300 µg Eisen/mL (~ 5370 µmol Eisen/L) sinkt die Zellzahl, aber das mitochondriale Potential und die Intensität des DNA-Farbstoffs bleiben über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich konstant. Es ist nicht auszuschließen, dass bei weiterer Zunahme der Konzentration eine toxische Wirkung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel auf die A549-Zellen einsetzt. Es ist zu beachten, dass die höchste eingesetzte Konzentration von 300 µg Eisen/mL höher als die in der Literatur für *in vivo* Mausexperimente als relevant angenommene Konzentration von 200 µg Eisen/mL^[182] und weiterhin deutlich höher als Standardkonzentrationen in klinischer Anwendung (~ 8-20 µg Eisen/mL) ist. Die PEG-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel zeigen in dem untersuchten Zeitraum über einen physiologisch relevanten Konzentrationsbereich keine zytotoxische Wirkung.

Da die Toxizität eine starke Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit aufweist, sollte die Polymerhülle eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen aufweisen. Eine Desorption der Liganden von der Partikeloberfläche kann z.B. aktive Oberflächenatome freilegen und infolge können katalytische Prozesse an der Oberfläche zu einer Produktion von ROS und damit zu einer toxischen Wirkung der Partikel führen. Weiterhin können die Partikel bei unvollständiger Oberflächenbedeckung zu größeren Einheiten aggregieren; eine Aggregatbildung führt zu einer reduzierten Bluthalbwertszeit und könnte weiterhin eine sogenannte frustrierte Phagozytose zur Folge haben. Nachdem in *in vitro* Versuchen gezeigt werden konnte, dass die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel auch in sehr hohen Konzentrationen keine zytotoxische Wirkung zeigen, wurde die kolloidale Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen untersucht.

3.1.3.3 Stabilitätsuntersuchungen an den PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln

Eine hohe kolloidale Stabilität der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen stellt eine Grundvoraussetzung dar, um sich den Herausforderungen einer potentiellen biomedizinischen Anwendung zu stellen. Die Stabilität der Konjugate hängt immer davon ab wie vollständig die Bedeckung mit Liganden ist und wie dicht die Liganden bei vollständiger Bedeckung gepackt

sind.^[169] Eine effektive Stabilisierung bedingt eine hohe Anlagerungsdichte. Eine unzureichende Stabilisierung durch eine geringe oder instabile - Liganden desorbieren von der Oberfläche - und infolge unzureichende Ligandenbedeckung kann zur Bildung von Aggregaten führen. Die inhärente, ausgeprägte Tendenz der Nanopartikel zur Aggregation ist auf die mit ihrer geringen Größe verbundenen hohen Oberflächenenergie zurückzuführen.^[12,20,26] Nanopartikel weisen einen hohen Anteil an Oberflächenatomen auf: Der Oberflächenanteil nimmt invers proportional zum Durchmesser zu.^[128,226] Werden die aktiven Oberflächen nicht abgeschirmt, können die Partikel schnell unter Verringerung der Oberflächenenergie zu größeren Einheiten aggregieren.

Im Folgenden werden Untersuchungen zur Stabilität der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel unter biologisch relevanten Gesichtspunkten vorgestellt. Um eine mögliche Aggregatbildung und somit Größenänderung festzustellen wurde in der Regel der intensitätsgewichtete hydrodynamische Durchmesser mittels DLS bestimmt. Bei hoher Stabilität gegenüber den durchgeführten Stabilitätstests sollten der hydrodynamische Durchmesser und die Teilchengrößenverteilung unverändert bleiben. Eine zunehmende Polydispersität infolge von Aggregationsprozessen sollte zu einer Verbreiterung der Größenverteilung führen. Um eine mögliche Aggregation der Partikel in Folge der Stabilitätstests zu untersuchen wurden weiterhin die Relaxationszeiten bestimmt. Die Ausbildung von Aggregaten sollte sich in einer Verkürzung der transversalen Relaxationszeit zeigen. Die Messung der Relaxationszeit wurde bereits genutzt um die kolloidale Stabilität zu untersuchen: Tromsdorf *et al.*^[16,182] bestimmten die Relaxationszeiten PEGylierter Eisenoxid-Nanopartikel in Serum, um zu zeigen, dass die kontrastgebenden Eigenschaften der Partikel unter physiologischen Bedingungen unverändert bleiben. Nach 2-stündiger Inkubation in Serum konnte kein messbarer Einfluss auf die Relaxationszeiten gezeigt werden. Es wurde geschlossen, dass die Partikel unverändert homogen dispergiert vorliegen.

Für biomedizinische Verfahren stellt die Stabilität bei Verdünnung ein wichtiges Kriterium dar. Die Verteilung der Nanopartikel im Blutkreislauf nach i.v. Applikation stellt einen Verdünnungsschritt dar, der zu keiner Beeinträchtigung der kolloidalen Stabilität führen sollte. Eine Verdünnung der Nanopartikel kann durch Verschiebung des on/off-Gleichgewichts zwischen gebundenen und ungebundenen Liganden zu einer Entfernung gebundener Liganden aus der Hüllschicht führen.^[169] Die Desorptionsrate korreliert dabei mit der Bindungsaffinität der Ankergruppe. Eine geringe Affinität erhöht die Wahrscheinlichkeit der Desorption. Weiterhin steigt die Tendenz der Liganden von der Oberfläche zu desorbieren mit zunehmendem

Verdünnungsfaktor. Um den Einfluss von Verdünnung auf die Stabilität zu ermitteln, wurden wässrige Partikellösungen bis zu einer Partikelkonzentration von ~ 2.5 nM verdünnt.

In Abbildung 3.24 sind Ergebnisse zur Untersuchung der kolloidalen Stabilität PEGylierter Eisenoxid-Nanopartikel (d_{hyd} : ~ 26 nm) in hoher Verdünnung gezeigt. Es sind die DLS-Profile der unverdünnten (~ 900 nM) sowie der verdünnten (~ 2.5 nM) Partikellösung gezeigt.

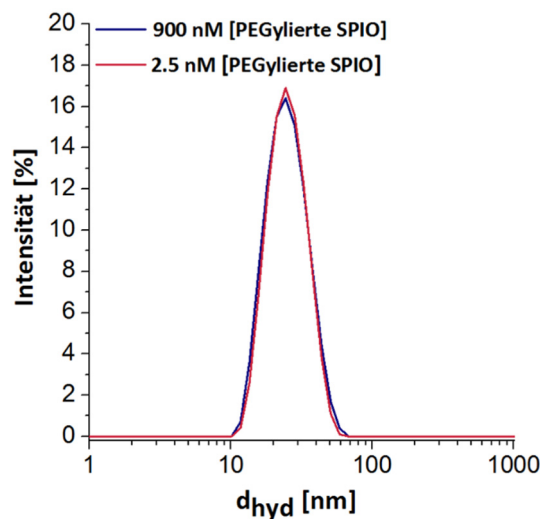


Abbildung 3.24: DLS-Analytik zur Untersuchung der kolloidalen Stabilität Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel in hoher Verdünnung. Gezeigt sind DLS-Profile wässriger Partikelsuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen. Nach Verdünnung ist keine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers oder Verbreiterung der Größenverteilung zu beobachten. Im DLS-Profil finden sich keine Anzeichen für eine Destabilisierung der kolloidalen Lösung durch den Verdünnungsschritt.

Nach Verdünnung ist keine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers zu beobachten. Die Teilchengrößenverteilung ist gleichbleibend schmal. Weiterhin blieb die verdünnte Kolloidlösung unverändert klar, es wurden keine Anzeichen von Sedimenten gefunden. Die PEGylierten Nanopartikel weisen auch bei sehr niedrigen Konzentrationen eine hohe Stabilität auf.

Aufgrund ihrer hohen Stabilität gegen Verdünnung sind die PEGylierten Nanopartikel ohne Beeinträchtigung in *in vivo* Anwendungen einsetzbar. In Tierexperimenten, die im Rahmen dieser Arbeit (3.1.3.4) oder im Rahmen der Diplomarbeit der Verfasserin durchgeführt wurden, lag die applizierte Eisendosis zwischen 70-300 μg . Das Blutvolumen einer Maus ergibt sich aus der gewichtsbezogenen Blutmenge und ihrem Körpergewicht. Die Blutmenge für Mäuse beträgt im Mittel ~ 72 mL/kg^[227] und das durchschnittliche Gewicht beträgt ~ 25 g^[227]. Das Blutvolumen beträgt somit ~ 1.8 mL. Im Rahmen der Diplomarbeit der Verfasserin wurde ein Volumen von ~ 400 μL injiziert. Wird ein Injektionsvolumen von maximal ~ 400 μL berücksichtigt, beträgt die

Eisenkonzentration unter Berücksichtigung der injizierten Eisenmenge und des Blutvolumens der Maus ~ 30-140 mg/L. Dieser Wert liegt in dem Bereich der in vorangegangenen Untersuchungen angenommenen biologisch relevanten Eisenkonzentration (~ 200 mg/L)^[182]. Die Untersuchung der Stabilität gegen Verdünnung erfolgte bei deutlich niedrigeren Eisenkonzentrationen: Eine Partikelkonzentration von ~ 2.5 nM entspricht ~ 3.4 bzw. ~ 3.8 mg Eisen/L bei Partikelgrößen von ~ 10.5 nm und ~ 10.9 nm. In Tierexperimenten wird gewöhnlich mit höheren Konzentrationen als in klinischen Anwendungen (~ 8-15 mg/L (siehe 3.1.3.2)) gearbeitet. Die klinischen Eisenkonzentrationen sind ebenfalls höher als die im Stabilitätstest untersuchte Konzentration. Die hohe Stabilität der PEGylierten Partikel gegen Verdünnung liegt in Übereinstimmung mit den Erwartungen: Die hohe Bindungsaffinität der Phosphat-Ankergruppe des Liganden zu der Eisenoxid-Oberfläche führt dazu, dass auch bei starker Verdünnung der gereinigten Partikellösungen eine thermodynamisch begünstigte Desorption vermutlich nur in geringem Ausmaß stattfindet und zu keiner erkennbaren Destabilisierung der kolloidalen Lösung führt.

Der Schlüsselfaktor für eine spätere Anwendung der Eisenoxid-Nanopartikel als spezifisches Kontrastmittel ist eine hohe Stabilität der Bindung zwischen dem zielführenden Biomolekül und den PEGylierten Partikeln. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Anbindung der bioaktiven Komponente an das distale Ende der Polymerhülle. Daher ist eine geringe Desorptionsrate der Polymere und somit auch der Polymer-gebundenen Biomoleküle aus der Ligandenhülle ein Faktor, der die Stabilität der Biokonjugate bestimmt.

Der Prozess der Aggregatbildung ist analog zu einer bimolekularen Reaktion und hängt von der Konzentration der Nanopartikel ab:^[45] Die Geschwindigkeit der Aggregation steigt mit dem Quadrat der Partikelkonzentration.^[45] Ein Verlust der kolloidalen Stabilität bei unzureichender Stabilisierung ist somit vor allem bei höheren Konzentrationen akut. Die folgenden Stabilitätsuntersuchungen an den PEGylierten Nanopartikeln erfolgten daher in höher konzentrierten Lösungen als die sich unter Berücksichtigung der klinischen Eisen-Standardapplikation ergebenden Konzentrationen von ~ 8-15 mg/L.

Im Folgenden wird die Untersuchung der Stabilität der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel gegen verschiedene, physiologisch relevante pH-Werte vorgestellt. In physiologischer Umgebung finden sich Bereiche mit variierenden pH-Werten. Der pH-Wert des Blutes liegt beim Menschen zwischen 7.35 und 7.45.^[181] In Normalgewebe liegt der pH-Wert zwischen 7 und 8, mit einem Mittelwert von ~ 7.5.^[105] Tumore weisen infolge eines Sauerstoff- sowie Nährstoffmangels eine saure

Mikroumgebung auf; der mittlere pH-Wert der extrazelluläre Matrix liegt bei 7.^[105] Verschiedene Tumorregionen weisen allerdings erhebliche Unterschiede in ihren pH-Werten auf; die pH-Wert-Spanne kann von 5.8 bis 7.6 reichen.^[105] Ein leicht saurer pH-Bereich (~ 4-6) ist assoziiert mit Endosomen und Lysosomen.^[21,228,229] Veränderungen des pH-Werts in physiologischer Umgebung sollten zu keiner Aggregatbildung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel führen, noch sollte eine schnelle Desorption der polymeren Liganden von der Oberfläche begünstigt und infolge die Tendenz zur Aggregation erhöht werden.

Die pH-Wert abhängige Stabilität der polymerumhüllten Eisenoxid-Nanopartikel wurde über einen Zeitraum von ~ 24 Stunden über einen pH-Bereich von 4 bis 9 untersucht. Die Partikel wurden in wässrigen Lösungen entsprechenden pH-Werts über den Untersuchungszeitraum inkubiert. Die Versuche wurden in zwei unterschiedlichen Partikelkonzentrationen durchgeführt (~ 50 nM und ~ 500 nM). Um eine mögliche Größenänderung infolge einer pH-Wert induzierten Destabilisierung festzustellen, wurden die Relaxationszeiten bestimmt. Unabhängig vom untersuchten pH-Wert blieben die relaxometrischen Eigenschaften der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel über den untersuchten Zeitraum von ~ 24 Stunden nahezu unverändert. Die Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Untersuchungen zeigen eine sehr gute Stabilisierung der Eisenoxid-Nanopartikel durch die PEG-Hülle. PEG ist biologisch nicht abbaubar. Die hohe *in vivo* Stabilität von Polyethylenglykol ist in der Literatur bekannt und kann zum Teil vermutlich auf die hohe Stabilität der Etherbindung gegen Hydrolyse in Gegenwart von Säuren und Basen zurückgeführt werden. Eine Änderung des pH-Werts könnte eine Entfernung gebundener Liganden zur Folge haben. Eine Desorption der über eine Phosphat-Ankergruppe an die Partikeloberfläche gebundenen PEG-Liganden könnte bei niedrigeren pH-Werten durch Protonierung der Ankergruppe begünstigt sein. Die hohe Stabilität der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel über den gesamten untersuchten pH-Bereich zeigt die hohe chemische Stabilität der Ligandenbindung an die Partikeloberfläche. Für die PEGylierten Nanopartikel sind bei den untersuchten, physiologisch relevanten pH-Werten keine Anzeichen einer signifikanten Destabilisierung zu beobachten. Die Partikel sind somit diesbezüglich für biomedizinische Anwendungen geeignet. Es wird nur die angestrebte intravenöse Administration und keine orale Verabreichung und somit eine Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt berücksichtigt.

Für eine biomedizinische Anwendung von Nanopartikeln ist weiterhin die Stabilität bei hohen Salzkonzentrationen entscheidend. Die im Blutserum gegebene Ionenstärke (~ 150 mM^[49]) darf zu

keiner Destabilisierung und infolge Aggregation der PEGylierten Partikel führen. Weiterhin weisen biologische Puffer ebenfalls einen hohen Salzgehalt auf. Zur Untersuchung einer möglichen Elektrolyt-induzierten Destabilisierung der Partikel wurden die wässrigen Kolloidlösungen zunächst auf eine Natriumchloridkonzentration von 150 mM eingestellt und anschließend DLS-Messungen durchgeführt. Über den untersuchten Zeitraum von ~ 22 Stunden blieb die Kolloidlösung unverändert klar, es wurden keine Anzeichen von Sedimenten gefunden. In Abbildung 3.25 sind DLS-Profile der Partikel (d_{hyd} : ~ 26 nm) zu Beginn des Stabilitätstests, sowie nach ~ 22 Stunden gezeigt. Die Partikelkonzentration betrug ~ 50 nM. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Partikelkonzentration bei den in FACS-Puffer durchgeführten *in vitro* Untersuchungen des Bindungsverhaltens der Biokonjugate (siehe 3.2) bei maximal ~ 12 nM lag.

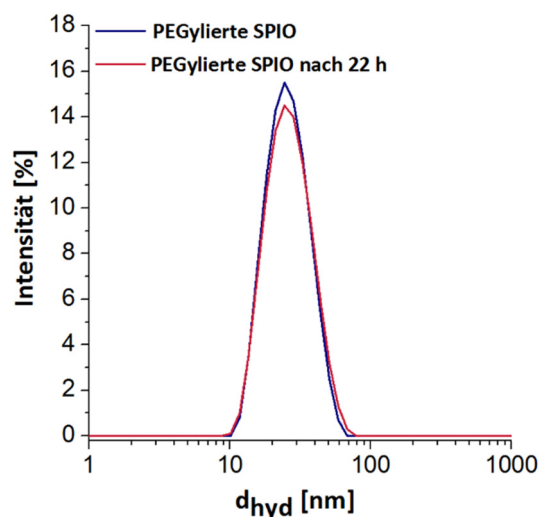


Abbildung 3.25: DLS-Analytik zur Untersuchung der Stabilität Polyethylenglykol-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart hoher Salzkonzentration. Gezeigt sind die intensitätsgewichteten Größenverteilungen in Gegenwart von 150 mM NaCl zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung sowie nach einem Untersuchungszeitraum von ~ 22 Stunden. Über den untersuchten Zeitraum ist keine signifikante Zunahme der hydrodynamischen Größe zu beobachten. Weiterhin bleibt eine vergleichbare Größenverteilung erhalten. Dies zeigt die Stabilität der PEGylierten Partikel in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen.

Die DLS-Profile weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Die PEGylierten Nanopartikel weisen im Untersuchungszeitraum eine hohe Stabilität gegen die untersuchte, biologisch relevante Salzkonzentration von 150 mM auf. Die Stabilität gegen hohe Ionenstärken hat vermutlich zwei Ursachen. Zunächst kann die koordinative Anbindung der PEG-Liganden an die Eisenoxid-Oberfläche über die bindungsaffine Phosphat-Ankergruppe sicherstellen, dass diese nicht im Verlauf von Experimenten in Medien mit hoher Ionenstärke oder während der Zirkulationszeit im Blut von der Partikeloberfläche desorbieren. Bei einer elektrostatischen Anbindung der Polymere

an die Partikeloberfläche wäre hingegen die Tendenz zur Desorption erhöht. Besonders entscheidend für die hohe Stabilität ist allerdings, dass die Polymere eine sterische Stabilisierung der Nanopartikel und somit eine sehr effektive Stabilisierung der Kolloidlösung bei hohem Salzgehalt bewirken. Thermodynamische Aspekte der sterischen Stabilisierung sind unter anderem entropische Effekte^[169], die unter 2.1.1.1 im Rahmen der Biorepulsivität beschrieben wurden. Anders als eine elektrostatische Stabilisierung, welche durch Salzzugabe durch zunehmende Abschirmung von Ladungen unwirksam werden kann^[169], ist eine sterische Stabilisierung nicht sensitiv gegenüber dem Salzgehalt.

Die PEG-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel weisen eine hohe Stabilität gegen Verdünnung auf. Weiterhin sind die Partikel über einen breiten pH-Bereich, sowie bei einer Ionenstärke von 150 mM stabil. Durch eine hohe kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen kann eine Partikelaggregation *in vivo* und infolge eine schnelle, unspezifische Phagozytose durch das MPS unterbunden werden. Dennoch kann eine unspezifische Anlagerung von Proteinen aus dem Blutserum an die Oberfläche der Nanopartikel erfolgen. Die Bildung einer Proteinkorona kann einerseits eine adsorptionsinduzierte Aggregation bewirken. Weiterhin können adsorbierte Oponine eine beschleunigte, Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Partikel durch das MPS bewirken. Beides führt zu einer signifikanten Abnahme der Nanopartikel im Blutstrom. Durch die PEG-Hülle kann die unspezifische Proteinadsorption verringert werden. Der Grad der Biorepulsivität ist dabei Funktion der Bedeckungsdichte der Oberfläche mit PEG-Liganden. Die angenommene hohe Bedeckungsdichte sollte zu einer geringen Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche führen. Im Folgenden wird der Effekt der PEG-Oberflächenbeschichtung auf die unspezifische Proteinadsorption untersucht. Um zu untersuchen wie sich die PEGylierten Partikel in Gegenwart hoher Proteinkonzentrationen verhalten, wurden diese für zwei Stunden bei 37 °C in Fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert. Zur Kontrolle erfolgte unter analogen Bedingungen die Inkubation der Partikel in PBS. Die Konzentration der Partikel betrug ~ 460 nM. Die Bildung einer Proteinkorona auf der Partikeloberfläche führt zu einer Vergrößerung des Partikeldurchmessers, weiterhin kann die Adsorption von Proteinen eine Partikelaggregation induzieren. Zur Untersuchung einer möglichen Größenänderung der PEGylierten Partikel infolge unspezifischer Proteinadsorption wurden die in Serum inkubierten, sowie die als Kontrolle dienenden Partikel einer Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography* SEC) unterzogen. Die SEC ermöglicht die Fraktionierung aufgrund von Größenunterschieden:

Kleineren Partikeln steht aufgrund ihrer Fähigkeit in die poröse, stationäre Matrix einzudringen ein größeres Säulenvolumen zur Verfügung. Somit werden diese länger retadiert und folglich später eluiert als größere Partikel. Eine Größenzunahme infolge von Proteinadsorption sollte sich demnach in einer Verkürzung der Retentionszeit zeigen.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben säulenchromatographisch aufgetrennt, anschließend wurde der Eisengehalt und damit rückschließend auch der Nanopartikelgehalt in den einzelnen Fraktionen photometrisch mittels Bathophenantrolin bestimmt. In Abbildung 3.26 ist das durch Auftragung des Eisengehalts gegen die entsprechende Fraktion erhaltene Elutionsprofil für die beiden untersuchten Proben gezeigt. Die Fraktionen wurden im Abstand von einer Minute gesammelt. Die erste Fraktion wurde ab der zehnten Minute gesammelt. Die erste Fraktion wurde ab der zehnten Minute gesammelt.

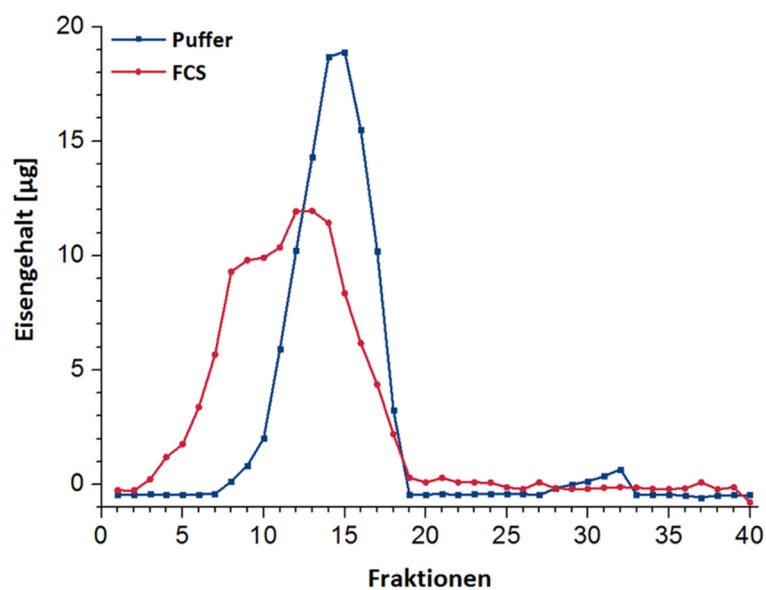


Abbildung 3.26: Analytik der Stabilität Polyethylenglykol-stabilsierter Eisenoxid-Nanopartikel in Gegenwart von Proteinen aus dem Blutserum. Gezeigt ist der Eisengehalt der Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie nachdem die Partikel einerseits mit PBS-Puffer (blau) andererseits mit Fetalem Kälberserum (FCS) (rot) über zwei Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Im Vergleich zu den in Puffer inkubierten Partikeln wird der Hauptpeak der in FCS inkubierten Partikel etwas früher eluiert, des Weiteren ist das Elutionsprofil breiter. Die Größenzunahme ist auf eine Proteinadsorption zurückzuführen. Laut Literatur eluieren bis ~ Fraktion 6 (Minute 15) aggregierte Partikel.^[16,57,161] Der Anteil adsorptionsinduzierter Aggregation in der untersuchten Probe ist gering.

Das Elutionsprofil der in PBS inkubierten Partikel weist einen Hauptpeak bei den Fraktionen 14 und 15 auf. Im Vergleich zu den in PBS inkubierten Partikeln wird der Hauptpeak der in FCS inkubierten Partikel zu früheren Fraktionen (12 und 13) verschoben. Des Weiteren ist das Elutionsprofil breiter; mit einem zweiten relativ intensiven Peak (Schulter) bei Fraktion 8 und 9. Das veränderte Elutionsprofil nach Inkubation in Fetalem Kälberserum ist auf eine Adsorption von

Proteinen auf der Partikeloberfläche zurückzuführen. Durch anschließende DLS-Messungen einzelner Fraktionen konnte eine leichte Größenzunahme bestätigt werden. Im Vergleich zu den nicht inkubierten wässrigen Partikellösungen (d_{hyd} : ~ 26 nm) nimmt der hydrodynamische Durchmesser der Partikel in Fraktion 8 (Schulter bei Inkubation in FCS) um ~ 10 nm zu.

Analog zu früheren Arbeiten im Arbeitskreis Weller^[16,182], in welchen der Effekt verschiedener Kettenlängen der Polymerbeschichtung auf die Proteinresistenz von Eisenoxid-Nanopartikeln in analoger Weise untersucht wurde, konnte eine Proteinadsorption durch PEGylierung auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig verhindert werden. In der früheren Arbeit wurde die höchste Resistenz gegen eine unspezifische Proteinadsorption für mPEG mit einem mittleren Molekulargewicht von ~ 1100 g/mol beobachtet. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten PEGylierten Partikel (Kerndurchmesser: 10.5 nm) scheinen im Vergleich mit den mPEG-beschichteten Partikeln (Kerndurchmesser: 4 nm) der früheren Arbeit eine verbesserte Biorepulsivität aufzuweisen. Die PEGylierten 4 nm großen Partikel weisen nach Inkubation in FCS ein stärker verändertes Elutionsprofil auf und eluieren zu einem höheren Anteil in früheren Fraktionen als die in Puffer inkubierten Partikel.^[16,182] Dies deutet auf ein größeres Ausmaß unspezifischer Proteinadsorption hin.

Die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel weisen eine zwar nicht vollständig verhinderte, aber dennoch reduzierte Proteinadsorption und eine geringe adsorptionsinduzierte Aggregatbildung auf. Zusammen mit der hohen kolloidalen Stabilität unter physiologischen Bedingungen deutet dies auf eine hohe Oberflächenbedeckung und stabile Polymerhülle hin. Die hohe Stabilität der polymeren Hüllschicht unter physiologischen Bedingungen, sowie die reduzierte Proteinadsorption sollten zu einer reduzierten Aufnahme durch Zellen des MPS und somit zu einer langen Zirkulationszeit der i.v. applizierten Partikel im Blutstrom führen. Im nächsten Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung der Blutzirkulation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mittels dynamischer MRT-Messungen im Tiermodell vorgestellt.

3.1.3.4 Verfolgung der Blutzirkulation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mittels dynamischer MRT-Messungen im Tiermodell

Eine schnelle, unspezifische Entfernung der Nanopartikel aus der Zirkulation durch phagozytierende Zellen des MPS verhindert das gezielte Ansteuern bestimmter Zellen oder

Gewebearten und reduziert so ihre biomedizinische Funktionalität.^[6,26] Vorausgesetzt, dass nicht etwa die Darstellung von Makrophagen des Leber- oder des Milzgewebes das Ziel der Anwendung ist. Ein idealer, biokonjugierter Nanovektor für eine aktive Zielführung wäre in der Lage nach intravenöser Injektion einer sofortigen Erkennung durch das MPS zu entgehen und somit ausreichend lange im Gefäßsystem zu zirkulieren um das Zielgewebe bzw. die Zielzellen in hoher Konzentration zu erreichen.

Im Folgenden wird in Tiermodellen die Partikokinetik - unspezifische Aufnahme in die Leber und Zirkulationszeit im kardiovaskulären System - mit Hilfe von dynamischen MRT-Messungen untersucht. Auf das Messprinzip wird später genauer eingegangen. Die Leber wird betrachtet, da sie ein Hauptaufnahmeorgan für Nanopartikel darstellt, die aufgrund ihrer Größe einer renalen Eliminierung entgehen.^[57,161] Die Leber und auch die Milz steuern einen großen Teil der Zellen des MPS bei und jede Minute werden 30% des gesamten Blutvolumens durch die Sinusoide der Leber transportiert und so in Kontakt mit den Zellen gebracht.^[57] Eine hepatische Aufnahme oder allgemein eine unspezifische Organaufnahme reduziert die Konzentration der PEGylierten Partikel im Blutkreislauf. Um Aussagen über die Zirkulationsdauer der Partikel machen zu können, werden daher weiterhin abdominale Blutgefäße, genauer die Vena cava inferior, betrachtet. Die Vena cava inferior (untere Hohlvene) ist ein großes Abdominalgefäß und drainiert das venöse Blut der unteren Extremitäten, der Eingeweide des Beckens, des unteren Teils des Wirbelkanals und des Rückenmarks, sowie der Leber und mündet im rechten Vorhof.^[230] In diesem Test wurde Resovist® als Referenz verwendet. Resovist® besteht aus polydispersen, aggregierten Eisenoxid-Kernen beschichtet mit Carboxydextran. Die mittlere Kerngröße beträgt $\sim 4 \text{ nm}$ ^[9,18], der mittlere hydrodynamische Durchmesser beträgt $\sim 60 \text{ nm}$ ^[18,58]. Die aggregierten Eisenoxid-Nanopartikel werden nach i.v. Injektion rasch durch Makrophagen des MPS entfernt. Das Resultat ist eine unspezifische Anreicherung in Leber und Milz. Infolge weist Resovist® eine kurze Bluthalbwertszeit auf.

Die MRT-Aufnahmen ermöglichen eine Visualisierung der Partikelverteilung. Sowohl Resovist® (r_2 : $130 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (1.41 T))^[182] als auch die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel (r_2 : $\sim 60 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (1.41 T)) verkürzen die transversale Relaxationszeit und führen so zu einer Signalabschwächung. Das MRT-Bild erscheint in der T_2 -gewichteten Bildgebung im Bereich der Partikelakkumulation dunkler. Zur nicht-invasiven Untersuchung der Blutzirkulationszeit mittels dynamischer MRT-Messung wurden Versuchsmäusen jeweils $\sim 300 \mu\text{g}$ Eisen in einem Gesamtvolumen von $300 \mu\text{L}$ in

die Schwanzvene injiziert. Es wurden fortlaufend alle 7.3 Sekunden transversale T_2^* -gewichtete Bilder des Abdoms aufgenommen. Von besonderem Interesse sind hierbei die Leber und die Vena cava inferior. Vor der Applikation des Kontrastmittels wurden ebenfalls T_2^* -gewichtete Aufnahmen derselben Körperschicht gemacht.

In Abbildung 3.27 sind zunächst repräsentative T_2^* -gewichtete MRT-Aufnahmen des Abdoms vor sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgter Partikelapplikation (Resovist® und PEGylierte Eisenoxid-Nanopartikel) gezeigt.

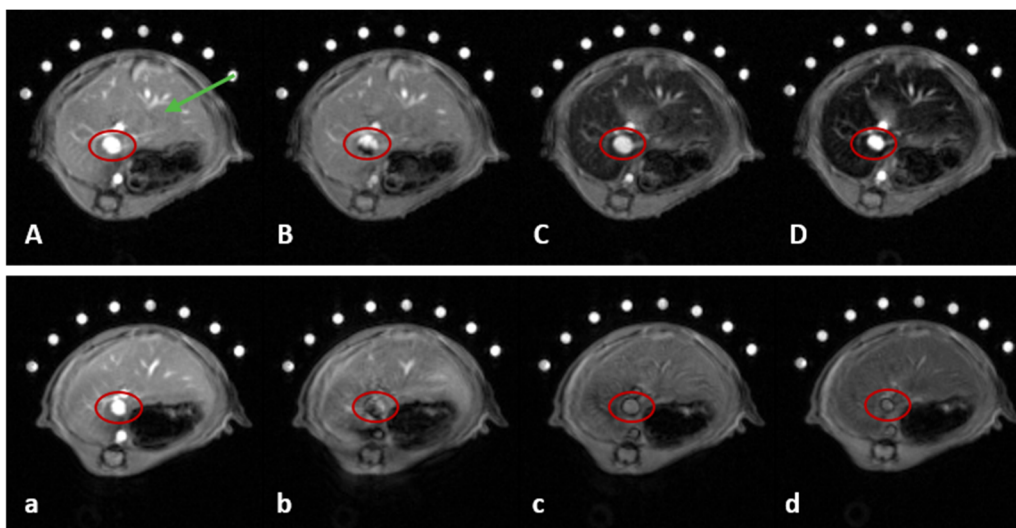


Abbildung 3.27: T_2^* -gewichtete MRT-Aufnahmen der Leber sowie der Vena cava inferior zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Applikation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel sowie Resovist® in transversaler Schichtführung. Für die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel (a, b, c, d) sowie für Resovist® (A, B, C, D) sind repräsentative Aufnahmen vor (A, a) und direkt nach der intravenösen Probenapplikation (B, b), sowie nach ~ sechs Minuten (C, c) gezeigt. Weiterhin sind repräsentative Aufnahmen am Ende der dynamischen Messungen nach ~ 24 Minuten gezeigt (D, d). Der rote Kreis markiert die Vena cava inferior, der grüne Pfeil markiert exemplarisch die Leber (A). Unmittelbar nach der Injektion kommt es durch Resovist® zu einem Signalabfall im Blut (B). Die Leber wird im weiteren Verlauf dunkel. Bereits kurze Zeit nach der i.v. Applikation wird das Blutgefäß wieder hell; die Leber bleibt dunkel (C). Über den Untersuchungszeitraum von ~ 24 Minuten erscheint die Vena cava inferior immer heller, die Leber wird dunkler (D). Dieser Prozess charakterisiert die Aufnahme des klinischen Standards aus dem Blut in die Leber. Die Vena cava inferior verbleibt nach i.v. Applikation der PEGylierten Nanopartikel über den gesamten Untersuchungszeitraum dunkel (b, c, d). Dies deutet darauf hin, dass die Partikel zu einem sehr hohen Anteil im Blutkreislauf verbleiben. Die beobachtete Signalabschwächung in der Leber ist vermutlich vor allem auf die Durchblutung zurückzuführen.

Unmittelbar nach der Probeninjektion ist das Blutgefäß dunkel. Für Resovist® wird die Vena cava inferior bereits kurze Zeit nach Applikation wieder hell; die Leber ist dunkel. Diese Beobachtung ist auf eine schnelle Anreicherung in der Leber zurückzuführen. Im weiteren Verlauf wird das Blutgefäß immer heller und die Leber dunkler. Dies ist vermutlich auf eine fortschreitende Aufnahme der Partikel durch das MPS zurückzuführen. Für die PEGylierten Partikel bleibt die Vena cava inferior über den gesamten Untersuchungszeitraum dunkel. Dies deutet auf eine lange

vaskuläre Zirkulationszeit. Die leichte Signalabschwächung in der Leber ist vermutlich vor allem auf die Durchblutung zurückzuführen; eine geringe hepatische Aufnahme ist nicht auszuschließen.

Die gezeigten MRT-Aufnahmen geben einen Eindruck von der Verteilung der Partikel nach i.v. Applikation. Pro Versuchstier konnten innerhalb von ~ 24 Minuten über 200 Datenpunkte gewonnen werden. So kann eine hepatische Aufnahme und Entfernung der Nanopartikel aus dem Blutstrom in Echtzeit verfolgt werden. In Abbildung 3.28 sind hierzu die Signalintensitäten in der Vena cave inferior (Blut) und in der Leber nach intravenöser Injektion der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel sowie von Resovist® als Funktion der Zeit aufgetragen. Die nicht-invasive Verfolgung der Blutzirkulation der PEGylierten Partikel wurde für insgesamt drei individuelle Tiere durchgeführt. Der am Beispiel von einem Versuchstier gezeigte Verlauf der Signalintensität ist repräsentativ.

Zunächst wird der Effekt der i.v. Applikation von Resovist® auf die Signalintensitäten in der Leber und im Blut beschrieben. Nach Injektion wird ein massiver Signalabfall im Blut als auch in der Leber beobachtet. Die bewirkte Signaländerung in der Leber ist dabei zunächst auf die Durchblutung zurückzuführen. Innerhalb der zweiten Minute nach Gabe des Kontrastmittels beginnt die Signalintensität im Blut wieder anzusteigen, während in der Leber ein kontinuierlicher Signalabfall beobachtet werden kann. Dieser Prozess charakterisiert die Aufnahme der Nanopartikel aus dem Blutstrom in die Leber. Wie erwartet weisen die aggregierten Eisenoxid-Nanopartikel eine kurze Blutzirkulationszeit auf. Nach i.v. Injektion werden die Partikel innerhalb von Minuten aus dem Blut entfernt. Im Gegensatz dazu zeigen die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel ein anderes Zirkulationsverhalten im Blutkreislauf. Unmittelbar nach der i.v. Injektion kommt es durch die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel zunächst zu einem starken Signalabfall in der Vena cava inferior, ebenso in der Leber. Der steile Signalabfall in der Leber ist auf die Durchblutung zurückzuführen. Nach dem steilen Abfall bleibt die Signalintensität im Blut über den untersuchten Zeitraum von ~ 24 Minuten nahezu konstant. Dies deutet darauf hin, dass die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel über den Untersuchungszeitraum in hoher Konzentration im Gefäßsystem verbleiben. In der Leber ist ein sehr geringer, kontinuierlicher Signalabfall zu beobachten, der auf eine entsprechend geringe hepatische Aufnahme hindeuten könnte. Die PEG-stabilisierten Partikel weisen eine hohe Zirkulationszeit im kardiovaskulären System auf.

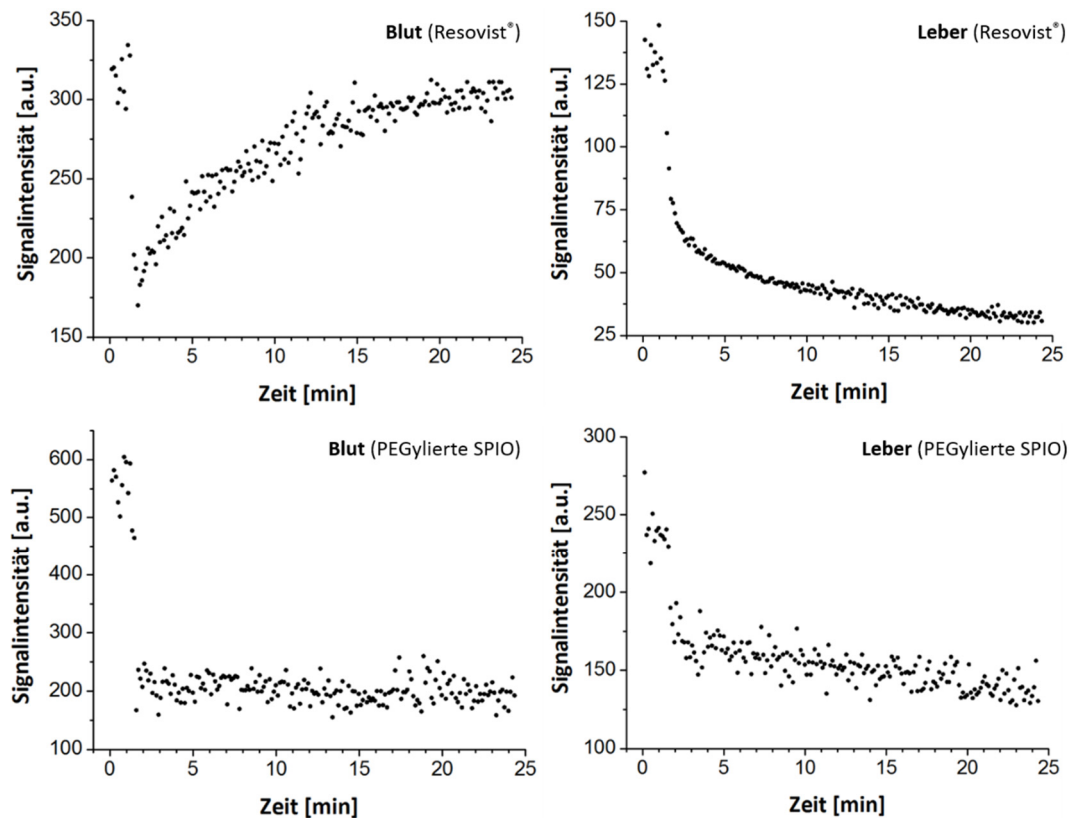


Abbildung 3.28: MRT-Signalintensität im Blut und in der Leber nach i.v. Applikation der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel sowie des klinischen Standards Resovist® als Funktion der Zeit. Gezeigt sind die Signalintensitäten in der Vena cava inferior (Blut) und in der Leber nach intravenöser Injektion der PEGylierten Partikel sowie von Resovist® über den Untersuchungszeitraum von ~ 24 Minuten (alle 7.3 Sekunden wurde ein Datenpunkt aufgenommen). Die Probeninjektion führt unmittelbar zu einem starken Signalabfall im Blut. Der steile Signalabfall in der Leber innerhalb der ersten Minuten ist auf die Durchblutung zurückzuführen. Für Resovist® fällt das Signal in der Leber anschließend kontinuierlich weiter, während das Signal im Blut wieder ansteigt. Diese Beobachtung ist auf eine schnelle Entfernung aus dem Gefäßsystem infolge einer starken hepatischen Anreicherung zurückzuführen. Für die PEGylierten Nanopartikel bleibt die Signalintensität im Blut nach dem steilen Abfall nahezu konstant. Dies deutet daraufhin, dass die Partikel über den untersuchten Zeitraum zu einem sehr hohen Anteil im Blutkreislauf verbleiben. In der Leber ist ein langsamer Signalabfall zu beobachten, der evtl. auf eine geringe hepatische Partikelaufnahme zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die PEGylierten Nanopartikel eine hohe kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen aufweisen. Die Partikel entgehen einer sofortigen Erkennung und unspezifischen Aufnahme durch das MPS und weisen infolge eine lange Zirkulationsdauer im Gefäßsystem auf.

3.2 Oberflächenfunktionalisierung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mit einem monoklonalen anti-EpCAM Antikörper

Ziel dieser Arbeit war nicht nur die Entwicklung lang-zirkulierender Eisenoxid-Nanopartikel, sondern auch die Synthese von Biokonjugaten, die idealerweise spezifisch und mit hoher Affinität

an komplementäre Zielstrukturen auf der Zelloberfläche von Krebszellen binden. Zur spezifischen Erkennung geeigneter Zielgruppen können verschiedene biologische Komponenten Anwendung finden. Im Rahmen dieser Arbeit wird der monoklonale Antikörper MOC31 als Zielsteuerungsmotiv verwendet. Antikörper sind nanometergroße biologische Funktionseinheiten und Teil des Immunsystems. Ein Antikörper erkennt eine bestimmte Stelle auf dem Zielmolekül; diese wird als Antigen determinante oder Epitop bezeichnet.^[231] Die meisten Antigene verfügen über mehrere Epitope.^[231] Polyklonale Antikörper sind heterogene Mischungen aus verschiedenen Antikörpern, die jeweils ein anderes Epitop desselben Antigens erkennen.^[231] Monoklonale Antikörper sind identisch und erkennen nur ein Epitop.^[231] Sie weisen daher eine besonders hohe Spezifität auf. Die Bindungsaffinität ist auf eine strukturelle Komplementarität, sowie auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch auf ionische, hydrophobe oder Wasserstoffbrückenbindungs-Kräfte zurückzuführen.^[232] Die Auswahl geeigneter zielführender Biomoleküle erfolgt aufgrund der Kenntnis von Oberflächenmarkern, die Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden. MOC31 ist gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM gerichtet. Unter 2.1.3.1 wurde beschrieben, warum sich das tumorassoziierte Transmembranprotein als Zielstruktur eignet. Für den monoklonalen anti-EpCAM Antikörper MOC31 konnte in *in vivo* Studien mit radioaktiv markiertem Antikörper die Anwendbarkeit zur Detektion von EpCAM-positiven Tumoren gezeigt werden.^[35,155] Trotz vorbestimmter Affinität des zielführenden Biomoleküls zum angezielten Oberflächenmarker kann die Bindung durch Konjugation an die Nanopartikel beeinträchtigt werden.^[19] Eine sehr wichtige Anforderung an die Biokonjugation ist daher der Erhalt der biologischen Aktivität des Antikörpers und damit der Bindungsfähigkeit an die komplementäre Zielstruktur. Weiterhin sollte die Funktionalität der Eisenoxid-Nanopartikel nicht beeinflusst werden und die Bindung zwischen Partikel und Zielsteuerungsmotiv sollte unter physiologischen Bedingungen stabil sein. Löst sich der zielführende Antikörper im Verlauf der Zirkulation von den PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln führt dies dazu, dass die Bioverteilung nicht richtig angezeigt wird.^[47] Unter 2.1.3 sind verschiedene Techniken zur nicht-kovalenten Anbindung von Biomolekülen an die Oberfläche der Nanopartikel, sowie kurz auch Verfahren zur direkten kovalenten Bindung vorgestellt. Eine direkte kovalente Bindung ist gegenüber einer nicht-kovalenten in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Biokonjugate zu bevorzugen (2.1.3). Für die meisten terminalen Funktionen wie etwa Thiol-, Amin-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen erfolgt vor der Biofunktionalisierung eine Aktivierung unter Einsatz eines

geeigneten Aktivierungsreagenz.^[135] In dieser Studie erfolgte die kovalente Anbindung des monoklonalen Antikörpers MOC31 an die terminale Hydroxylgruppe der Polymerhülle unter Verwendung einer Bromcyan-vermittelten Kopplungsreaktion.

3.2.1 Bromcyan-vermittelte Kopplung von MOC31 an die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel

Die kovalente Anbindung des anti-EpCAM Antikörpers an die organische Hüllschicht der Eisenoxid-Nanopartikel erfolgt über die Hydroxylgruppe der Polymere. Aufgrund der geringen Reaktivität dieser funktionellen Gruppe stellt der erste Schritt der Konjugation die Aktivierung der terminalen Hydroxylgruppe der PEG-Beschichtung dar. Zur Aktivierung wurde Bromcyan verwendet. Viele der chemischen Methoden zur Modifizierung von Hydroxylgruppen wurden ursprünglich zur Immobilisierung von Affinitätsliganden auf chromatographischen Matrices entwickelt^[232], so auch die Bromcyan-Methode. Diese wurde ursprünglich zur Aktivierung einer Agarosematrix und anschließender Kopplung von Liganden für Affinitätschromatographien verwendet.^[232] Seitdem wurde die Bromcyan-Methode unter anderem zur Immobilisierung von Biomolekülen auf polymeren Mikrokügelchen mit dem Ziel der Isolierung von Immunoglobulinen und von bestimmten Zelltypen aus biologischen Flüssigkeiten^[233,234] sowie zur Herstellung einer stationären Phase für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie^[235] eingesetzt.

Anders als eine Reihe anderer Methoden zur Aktivierung von Hydroxylgruppen, wie etwa die Aktivierung unter Verwendung von Carbodiimid (CDI), erlaubt die Bromcyan-vermittelte Biokonjugation eine Aktivierung sowie Kopplung unter milden, wässrigen Reaktionsbedingungen.^[232] Die Kopplung von Proteinen erfordert milde Bedingungen in wässrigem Medium um eine Denaturierung zu vermeiden; Proteinstrukturveränderungen gehen in den meisten Fällen mit einem Verlust der biologischen Aktivität einher.^[21] Die Aktivierung resultiert in der Bildung eines Cyanatesters.^[232,235,236] Das Kohlenstoffatom der Cyanatgruppe ist elektrophil und kann von nukleophilen Agenzien angegriffen werden. Die Reaktion mit Aminen führt zur Ausbildung einer Isoureabindung, welche unter pH-neutralen Bedingungen eine positive Ladung aufweist.^[232,236] Eine schematische Darstellung der Bromcyan-vermittelten Kopplungsreaktion ist in Abbildung 3.29 für die kovalente Immobilisierung eines Antikörpers auf der polymeren Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel gezeigt.

Die Bromcyan-vermittelte Konjugation kann über freie Aminogruppen des Antikörpers wie die ϵ -Aminogruppe der Lysin-Seitenkette oder aber auch die Aminogruppe des *N*-Terminus erfolgen. Lysin gehört zu den am häufigsten modifizierten Resten.^[76,237] Im Rahmen dieser Arbeit wird die Biokonjugation mit dem nativen Antikörper durchgeführt. In den meisten Proteinen sind mehrere Aminofunktionen auf der Oberfläche enthalten, so dass sie vor der Kopplung nicht modifiziert werden müssen. Dies reduziert die Gefahr einer Denaturierung im Verlauf einer Modifizierung und damit die Gefahr eines Verlusts der biologischen Aktivität. Gleichzeitig stellt das Vorhandensein mehrerer identischer Gruppen, über welche die Anbindung an die Nanopartikel erfolgen kann, auch einen Nachteil dar: Die Bindung eines Antikörpers an die Oberfläche der Partikel über mehrere Aminofunktionen kann die Bindungsaffinität an die komplementäre Zielstruktur verringern oder unter Umständen kann diese sogar komplett verloren gehen. Auf diesen Punkt wird unter 3.2.2 im Rahmen der Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM eingegangen.

In Abbildung 3.29 ist die kovalente Anbindung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel an einen Antikörper unter Ausbildung einer Isoureabindung gezeigt.

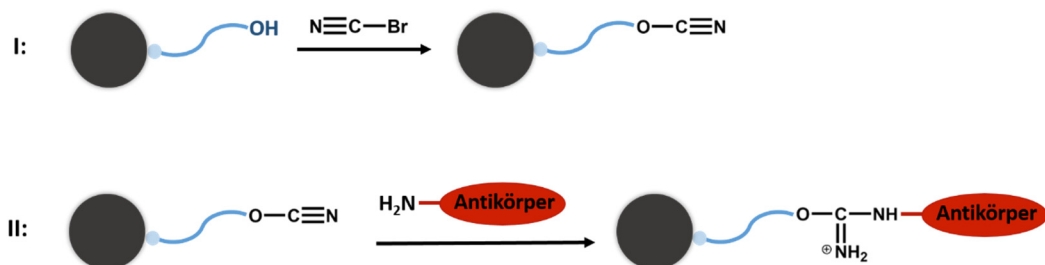


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung der Bromcyan-vermittelten Kopplungsreaktion zwischen der Hydroxyl-terminierten Polymerhülle auf der Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel und der Aminofunktion eines Antikörpers. Der erste Schritt der kovalenten Konjugation ist die Überführung der terminalen Hydroxylgruppe der Hüllmoleküle auf der Partikeloberfläche in eine aktivierte Form. Die Aktivierung erfolgt durch Zusatz des Kopplungsreagens Bromcyan. Als aktivierte Form wird ein Cyanat-ester erhalten (I). Im zweiten Schritt kann es zur kovalenten Kopplung über freie Aminogruppen des Antikörpers unter Ausbildung einer Isoureabindung kommen (II).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Menge an Aktivierungsreagenz und der Menge an Antikörper auf die Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM untersucht. Zur Aktivierung der Hydroxylgruppen wurden zunächst verschiedene Mengen an Bromcyan eingesetzt um das optimale Verhältnis von Bromcyan zu Eisenoxid-Nanopartikeln zu ermitteln. Hierzu wurde ein 3-facher Überschuss an MOC31 verwendet und das Bromcyan/Nanopartikel-Verhältnis wurde zwischen $2 \cdot 10^3$ und $3 \cdot 10^6$ variiert. Die Überschüsse beziehen sich jeweils auf die

eingesetzte molare Menge an Nanopartikeln. Da von einer Bedeckungsdichte von deutlich weniger als 1000 Liganden pro Nanopartikel ausgegangen werden kann (siehe hierzu 3.1.2.2), ergibt sich bezogen auf die Ligandenmenge pro Nanopartikel in jedem Fall ein Überschuss an Aktivierungsreagenz. Neben dem Bromcyan/Nanopartikel-Verhältnis sollte auch der MOC31-Überschuss optimiert werden. Daher wurden Ansätze mit einem gleichbleibenden Bromcyan/Nanopartikel-Verhältnis aber unterschiedlichen Mengen an MOC31 (äquimolarer Einsatz, 3-facher und 6-facher Überschuss) zur Reaktion gebracht.

Die Aufreinigung der biokonjugierten Eisenoxid-Nanopartikel von nicht konjugierten Biomolekülen erfolgte mithilfe einer Magnetseparationssäule. Es wird angenommen, dass vernachlässigbar geringe Mengen an ungebundenen Antikörpern in der Nanopartikelsuspension vorliegen. Diese Annahme konnte im Verlauf der Arbeit durch Untersuchung der eluierten Waschfraktionen (3.2.3; Abbildung 3.39) bestätigt werden.

Für die ersten Biokonjugationsreaktionen wurde zur Ermittlung des Anteils an Nanopartikel-konjugiertem Antikörper und somit zur Ermittlung der Kopplungseffizienz ein kolorimetrischer Proteinquantifizierungstest durchgeführt. Die Durchführung des BCA-Assays (Bicinchoninsäure, BCA) erfolgte durch Anna Schildt, die zu diesem Zeitpunkt Masterstudentin im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie von Prof. Dr. Udo Schumacher am UKE war und ist im experimentellen Teil nicht näher beschrieben. Der kleinste verwendete Standard lag bei 5 µg/mL. Mit der durchgeführten Methode war eine Quantifizierung des Antikörpers - aufgrund der geringen Menge, in der die Nanopartikel und damit der Antikörper eingesetzt wurden - allerdings nicht durchführbar. Bei unverändert kleinen Ansatzgrößen muss zur quantitativen Analyse der Nanopartikel-gebundenen Antikörpermenge daher eine sensitivere Methode Anwendung finden. Traditionell ist die radioaktive Markierung in der Biochemie der sensitivste Weg um quantitative Ergebnisse über das Verhalten *in vivo* zu erhalten.^[161] Im Rahmen dieser Arbeit wurde abschließend eine radioaktive Markierung des Antikörpers vorgenommen um unter anderem die Kopplungseffizienz zu ermitteln. Diese Ergebnisse sind unter 3.2.3 vorgestellt.

Eine hohe Kopplungseffizienz ist für die Biokonjugation von Vorteil. Entscheidender als die Frage danach, wie viel Nanopartikel-gebundener Antikörper vorliegt und folglich auch wie viele Biokonjugate erhalten wurden, sind die Bindungseigenschaften der Biokonjugate: Bleibt die biologische Aktivität des Antikörpers und damit die Bindungsfähigkeit an den komplementären

Oberflächenrezeptor erhalten? Daher wurden die Konjugate zunächst in *in vitro* Experimenten auf ihre Fähigkeit getestet spezifisch an EpCAM-positive Zellen zu binden.

3.2.2 *In vitro* Untersuchung der Bindungsfähigkeit der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an EpCAM

In den folgenden *in vitro* Experimenten wurde untersucht, ob die Biofunktionalisierung der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mit dem anti-EpCAM Antikörper MOC31 zu einer spezifischen Bindung an Zelloberflächen-präsentierte EpCAM-Moleküle führt. Dabei gilt: Je höher der Anteil an biologisch aktiven Nanopartikel-konjugierten Antikörpern, desto höher ist das Ausmaß an Biokonjugaten, die spezifisch über Antikörper-Antigen-Erkennung an der Zelloberfläche binden. Trotz vorbestimmter Affinität des Biomoleküls zum angezielten Oberflächenmarker kann die Bindungsfähigkeit durch Konjugation an die Oberfläche der Nanopartikel beeinflusst werden.^[19] Im Folgenden wird auf mögliche Ursachen für eine Verringerung oder einen Verlust der biologischen Aktivität Nanopartikel-konjugierter MOC31-Antikörper eingegangen. Hierzu wird zunächst kurz die Struktur von Immunoglobulinen (Ig), genauer von IgG, betrachtet. Es gibt fünf verschiedene Isotypen von Immunoglobulinen: IgG, IgE, IgD, IgA, IgM.^[231] Die häufigste Klasse von Antikörpern und die wichtigste im Blutserum^[231] sind jene vom Typ IgG (γ -Globuline).^[232,238] Bei dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper handelt es sich ebenfalls um einen Immunoglobulin-G-Antikörper. Das Ypsilon-förmige Immunoglobulin G besteht aus vier Ketten; zwei identischen schweren (~ 50 kDa) und zwei identischen leichten (~ 25 kDa).^[231,232,238] Jede schwere Kette ist mit einer leichten Kette über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden und die schweren Ketten sind untereinander ebenfalls durch mindestens eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft.^[231,232,238] Eine schematische, sehr stark vereinfachte Darstellung eines IgG-Moleküls ist in Abbildung 3.30 gezeigt. Die aminoterminalen Domänen der schweren und der leichten Kette bilden die Enden der Arme, die aus der Struktur ragen, und enthalten variable und hypervariable Regionen.^[231,238] Die spezifische Aminosäuresequenz dieser Regionen variiert zwischen verschiedenen Antikörpern. Die hypervariable Region bildet die eigentliche Antigenbindungsstelle aus und verleiht den Antikörpern Spezifität.^[232] Ein Antikörper enthält zwei identische hypervariable Bereiche und kann daher zwei Antigene binden. Die konstante Region Fc besteht

aus den carboxyterminalen Domänen der schweren Ketten und ist nicht an der Antikörper-Antigen-Bindung beteiligt.

Ein teilweise erfolgreicher oder vollständiger Verlust der biologischen Aktivität und damit der nativen Bindungsfähigkeit an das komplementäre Antigen kann zum Beispiel durch Blockierung der Antigenbindungsstelle im Verlauf der kovalenten Konjugation an die Oberfläche der Nanopartikel erfolgen. Die Größe der Nanopartikel ist nicht trivial; bei einer Orientierung der Bindungsstelle des Antikörpers in Richtung der Partikeloberfläche kann infolge der möglichen Blockierung des aktiven Zentrums mit einem Aktivitätsverlust gerechnet werden.^[127] Die meisten Antikörper weisen mehrere Lysin-Seitenketten auf der gefalteten Oberfläche auf. Daher involvieren Kopplungsreaktionen, die über Aminogruppen erfolgen, sicherlich auch Lysin-Seitenketten in der Antigenbindungsregion. Dies führt zu einer Blockierung der Bindungsstelle. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass nicht nur der Antikörper mehrere verfügbare Aminogruppen an verschiedenen Stellen aufweist, sondern dass auch die polymerumhüllten Eisenoxid-Nanopartikel über eine große Anzahl an terminalen Hydroxylgruppen verfügen. Diese Multivalenz erhöht die Wahrscheinlichkeit der Beeinflussung der Antikörperaktivität. Der multivalente Antikörper kann seine biologische Aktivität beispielsweise durch Blockierung der Bindungsstellen infolge einer Antikörper-vermittelten Nanopartikel-Nanopartikel-Quervernetzung verlieren. Weiterhin kann die Multivalenz des Antikörpers und des Nanopartikels zur Ausbildung mehrerer intrapartikulärer Bindungen führen. Ein Antikörper wird durch Multipunktanbindung an ein Partikel gebunden. Diese feste Anbindung kann die Flexibilität des Antikörpers drastisch reduzieren und infolge auch die Bindungsfähigkeit an das komplementäre Antigen.

Trotz dieser potentiellen Probleme liegt in der Anwendung von monoklonalen Antikörpern als zielführende Komponente ein großes Potential; dies ist in der hohen Spezifität begründet. Antikörperkonjugate konnten weiterhin bereits erfolgreich genutzt werden.^[7]

In Abbildung 3.30 ist schematisch die Anbindung des MOC31-Antikörpers an die Partikeloberfläche über Aminogruppen in der Antigenbindungsregion und in Distanz zu dieser über Aminogruppen in der Fc-Region, sowie die Bindungsfähigkeit der entsprechenden Biokonjugate an das komplementäre Antigen EpCAM gezeigt.

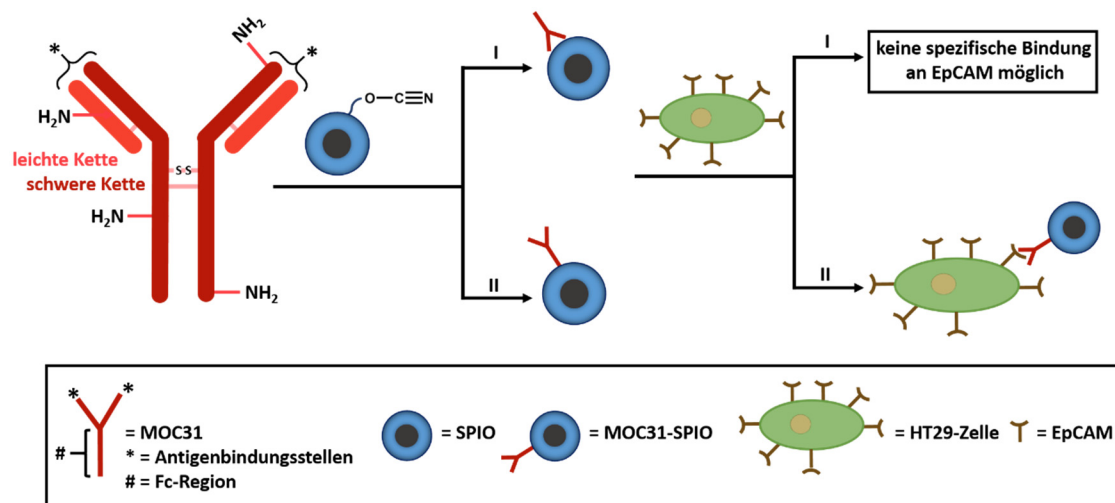


Abbildung 3.30: Schematische Darstellung möglicher Antikörper-Nanopartikel-Konjugate sowie deren Bindungsfähigkeit an EpCAM. Zur kovalenten Bindung des anti-EpCAM Antikörpers an die aktivierten, terminalen Hydroxylgruppen der Polymerhülle wird die Anwesenheit mehrerer verfügbarer Aminogruppen an verschiedenen Stellen des Antikörpers genutzt. Dies resultiert in einer willkürlichen Anlagerung an die Hüllschicht auf der Nanopartikeloberfläche. Erfolgt die kovalente Kopplung in der Nähe der Antigenbindungsstellen, kann dies zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen. Diese Konjugate zeigen in einem *in vitro* Test mit einer EpCAM hochexprimierenden Karzinomzelllinie keine spezifische Bindung an den Oberflächenrezeptor (I). Erfolgt die Kopplung in Distanz zu den aktiven Zentren - es ist die Anbindung an den Fc-Teil gezeigt - ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die biologische Aktivität des Antikörpers nach kovalenter Konjugation erhalten bleibt und die Biokonjugate spezifisch über EpCAM an die Zelloberfläche binden.

Die an den anti-EpCAM Antikörper MOC31 konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden *in vitro* mit einer humanen Kolonkarzinomzelllinie (HT29) charakterisiert. Die HT29-Zelllinie ist ein sehr gut geeignetes Modell zur Untersuchung der spezifischen Anbindung der MOC31-Nanopartikel-Konjugate an das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM: Heine *et al.*^[35] konnten für diese humane Karzinomzelllinie mittels FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, *fluorescence activated cell sorting*), Immunzytochemie und Immunhistochemie eine Überexpression von EpCAM auf der Zelloberfläche nachweisen.

Es ist zu berücksichtigen, dass neben der spezifischen, MOC31-vermittelten Anbindung an die Zelloberfläche über das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM auch unspezifische Bindungseffekte auftreten können. In diesem Fall erfolgt die Bindung nicht durch Antikörper-Antigen-Wechselwirkung. Um das Ausmaß der spezifischen Bindung beurteilen zu können, wurden Vergleichsuntersuchungen zur unspezifischen Anbindung der Biokonjugate an die HT29-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die spezifischen Bindungsstellen vor Inkubation mit den Biokonjugaten durch Vorbehandlung mit einem Überschuss an freiem MOC31-Antikörper blockiert. In Abbildung 3.31 ist exemplarisch die Anbindung biologisch aktiver Biokonjugate an die HT29-Zellen mit und ohne Blockierungsschritt dargestellt.

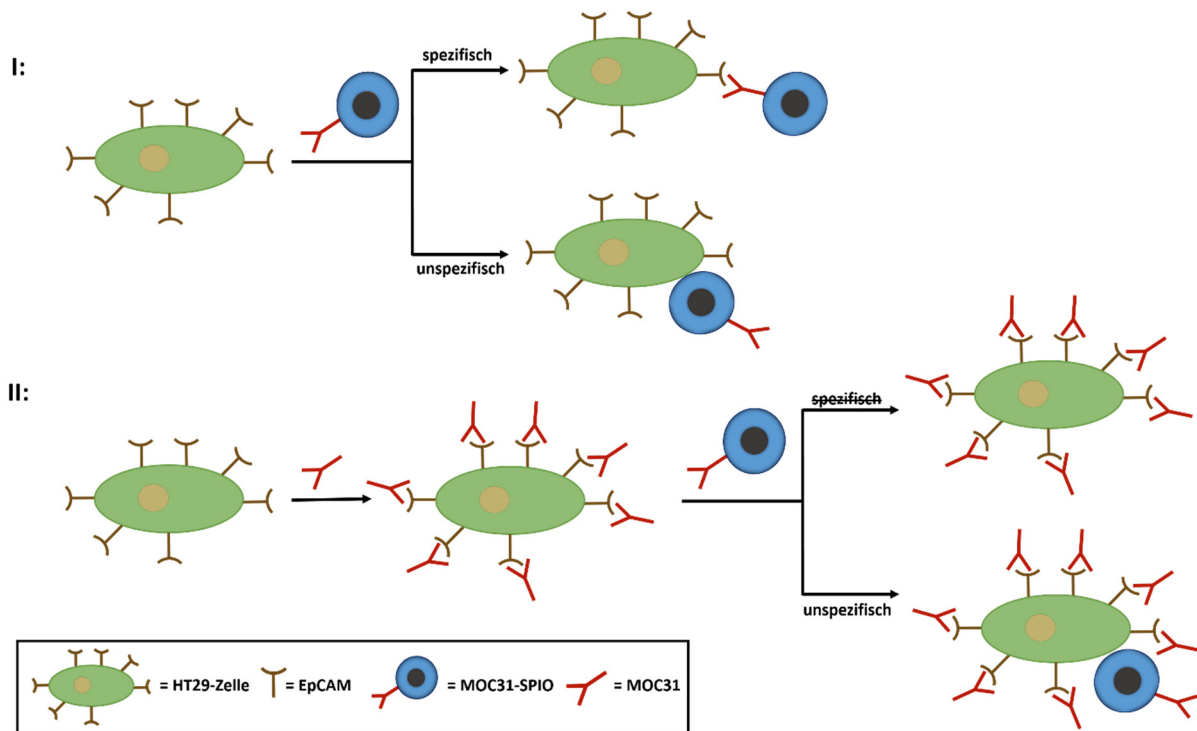


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Bindung der Antikörper-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an HT29-Zellen mit und ohne Blockierung der spezifischen Bindungsstellen. Werden die HT29-Zellen mit den Konjugaten inkubiert (MOC31-SPIO) können zwei Arten der Bindung auftreten. Neben der spezifischen Bindung der Konjugate über MOC31 an das auf der Zelloberfläche exprimierte Antigen EpCAM, können unspezifische Bindungseffekte auftreten (I). Werden die Zellen vor Inkubation mit den Konjugaten mit freiem MOC31 inkubiert, werden die spezifischen Bindungsstellen blockiert. Die spezifische Bindung über das Antigen wird damit inhibiert, unspezifische Bindung findet hingegen unverändert statt (II). Der Blockierungsschritt ermöglicht Aussagen über die Spezifität der Antikörper-Nanopartikel-Konjugate. Zeigt sich ein Einfluss der Blockierung spezifischer Bindungsstellen auf das detektierte Signal (z.B. im MRT-Experiment die ermittelte Relaxationszeit) - zeigen blockierte und unblockierte Zellen Unterschiede - zeigt dies die Spezifität der Konjugate und damit die biologische Aktivität der Nanopartikel-konjugierten Antikörper.

Ohne Blockierungsschritt (I) kann neben der spezifischen auch eine unspezifische Anbindung an die Zelloberfläche stattfinden. Durch die Vorinkubation mit freiem Antikörper (II) werden die spezifischen Bindungsstellen blockiert und somit eine Bindung über Antikörper-Antigen-Wechselwirkung inhibiert. Der Blockierungsschritt hat keinen Einfluss auf die unspezifische Anbindung an die Zelloberfläche und zeigt somit den Effekt der unspezifischen Anhaftung. Zeigt sich zwischen blockierten und unblockierten Zellen ein Unterschied im detektierten Signal, wie etwa die im MRT-Experiment ermittelte Relaxationszeit, ist dies auf eine spezifische Anbindung der Biokonjugate über den EpCAM-Oberflächenrezeptor zurückzuführen.

Um auszuschließen, dass MOC31-konjugierte Nanopartikel (Biokonjugate, MOC31-SPIO) trotz vorheriger Blockierung der EpCAM-Bindungsstellen spezifisch an die Zelloberfläche binden - evtl. durch Aufhebung der Blockierung durch multivalente, biokonjugierte Nanopartikel, deren Avidität die des freien Liganden übersteigt - wurden als zusätzliche Kontrolle PEGylierte

Eisenoxid-Nanopartikel ohne konjugierten MOC31-Antikörper (SPIO) mit HT29-Zellen unter identischen Bindungen inkubiert. Die nicht mit dem Antikörper gekoppelten Nanopartikel sollten keine spezifische Bindung an die HT29-Zellen zeigen. Unter der Annahme, dass das unspezifische Bindungsverhalten der Partikel durch die Biokonjugationsreaktion nicht beeinflusst wird, kann eine signifikante spezifische Bindung der Biokonjugate an blockierte Zellen durch einen vergleichbaren Gehalt an nicht-konjugierten Partikeln auf unblockierten (bzw. auch blockierten) Zellen und an Biokonjugaten auf vorinkubierten Zellen ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität der Biokonjugate wurden diese umfangreichen *in vitro* Tests unterworfen. Die Anwesenheit von Zelloberflächen-gebundenen Nanopartikeln wurde anschließend mit verschiedenen Methoden untersucht.

3.2.2.1 *In vitro* Untersuchung der Bindungsfähigkeit der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an EpCAM mittels MRT

Um die Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM beurteilen zu können, wurden die MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel mit und ohne vorangehenden Blockierungsschritt mit HT29-Zellen inkubiert und anschließend im MRT auf ihren Einfluss auf den T_2^* -Effekt getestet. Weiterhin wurden unbehandelte Zellen (Negativkontrolle) sowie mit nicht-konjugierten Partikeln inkubierte Zellen betrachtet. Die an die Zelloberfläche gebundenen superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel können mittels MRT über die von ihnen bewirkte Signaländerung detektiert werden. Magnetisch markierte Zellen erscheinen in der T_2^* -gewichteten Bildgebung dunkler. Die bewirkte Signaländerung ist dabei abhängig von dem Partikelgehalt auf der Zelloberfläche. Je höher der Gehalt an Nanopartikeln, desto stärker ist der induzierte Signalabfall und desto dunkler erscheinen die Zellen in der magnetomographischen Aufnahme.

Abbildung 3.32 zeigt T_2^* -gewichtete MRT-Aufnahmen unbehandelter HT29-Zellen, sowie entsprechende Aufnahmen von Zellen, die ohne Blockierungsschritt mit Biokonjugaten inkubiert wurden. Dies erfolgt repräsentativ am Beispiel der Konjugate, die mit einem 3-fachen Antikörperüberschuss und einem $2 \cdot 10^6$ -fachen Bromcyanüberschuss erhalten wurden. Weiterhin sind effektive transversale Relaxationszeiten für unbehandelte Zellen sowie für Zellen nach Inkubation mit Eisenoxid-Nanopartikeln - nicht-konjugierte Eisenoxid-Nanopartikel sowie Biokonjugate (am selben Beispiel wie die gezeigten MRT-Aufnahmen) - gezeigt.

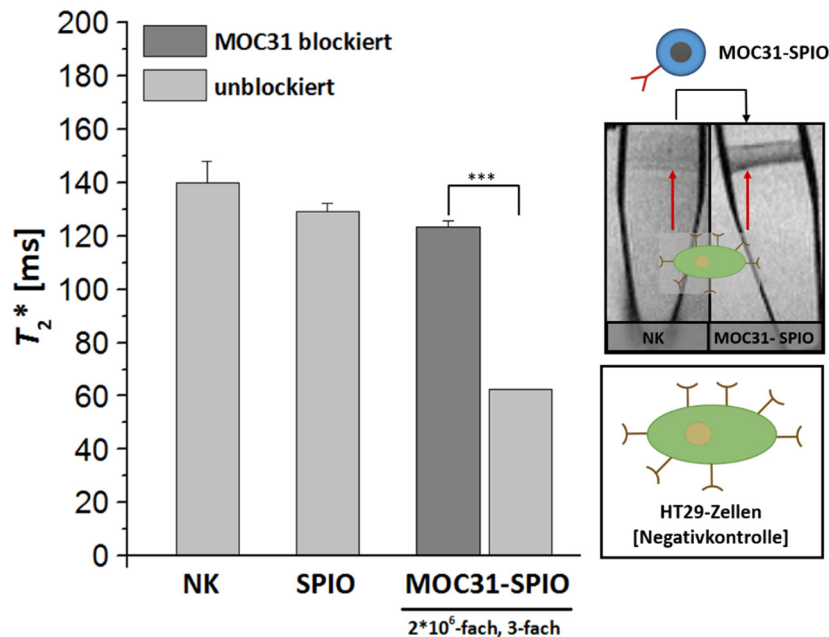


Abbildung 3.32: Analyse der Bindung von nicht-konjugierten sowie von MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln an HT29-Zellen mittels MRT. Gezeigt sind T_2^* -gewichtete Aufnahmen un behandelter (NK) sowie mit den Konjugaten (MOC31-SPIO) inkubierter Zellen (rechts). Der rote Pfeil markiert das Zellpellet. Des Weiteren sind die effektiven transversalen Relaxationszeiten (T_2^*) un behandelter Zellen sowie von Zellen, die mit nicht-konjugierten Nanopartikeln (SPIO) und den Konjugaten inkubiert wurden, gezeigt. Bei den Konjugat-behandelten Zellen erfolgte zusätzlich eine Vorinkubation mit freiem MOC31 (MOC31 blockiert) zur Blockierung spezifischer Bindungsstellen (links). Die Konjugate wurden mit einem 3-fachen Antikörperüberschuss und einem $2 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenz-überschuss erhalten. Die Behandlung der Zellen mit den Konjugaten führt zu einer Veränderung des T_2^* -Effekts im Vergleich zu den un behandelten Zellen. Die Messungen zeigen einen Einfluss der Blockierung der Bindungsstellen durch MOC31-Vorinkubation und damit Spezifität. Die Zellen wurden mit ~ 3250 fmol Nanopartikel ($\sim 5 \mu\text{g}$ Eisen) inkubiert. Es ist der Mittelwert aus mindestens drei Messungen an einem Zellphantom gezeigt. Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Nach Behandlung der HT29-Zellen mit den Biokonjugaten (MOC31-SPIO) erscheinen die Zellen im Vergleich zu den un behandelten Zellen (NK) in der T_2^* -gewichteten MRT-Bildgebung dunkler. Für das gezeigte Gelphantom wurden die EpCAM-Bindungsstellen der HT29-Zellen im Vorfeld der Behandlung mit den Biokonjugaten nicht blockiert. Daher zeigt dies zunächst nur, dass Nanopartikel auf der Zelloberfläche gebunden haben. Die beobachtete Änderung könnte sowohl auf unspezifische Adhäsion als auch auf spezifische Bindung der Biokonjugate über EpCAM zurückzuführen sein. Es sind keine magnetomographischen Aufnahmen von MOC31-vorinkubierten, Konjugat-behandelten Zellen gezeigt, da die Aussagekraft dieses visuellen Vergleichs gering ist.

Um Aussagen über das Ausmaß einer möglichen spezifischen Interaktion der Biokonjugate machen zu können wird die effektive transversale Relaxationszeit betrachtet. Diese Betrachtung stellt weiterhin auch die Vergleichbarkeit verschiedener Konjugate sowie auch nicht-konjugierter

Nanopartikel in Hinblick auf ihr Bindungsverhalten her. Es wird angenommen, dass die Biokonjugationsreaktion keinen Einfluss auf die relaxometrischen Eigenschaften der Eisenoxid-Nanopartikel hat. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (NK) zeigen die Zellen, die mit Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIO und MOC31-SPIO) inkubiert wurden, einen veränderten T_2^* -Effekt. Die beobachtete Verkürzung der effektiven transversalen Relaxationszeit ist auf die Anwesenheit von Nanopartikeln auf der Zelloberfläche zurückzuführen. Die transversale Relaxationszeit ist dabei umso kürzer, je höher der Nanopartikelgehalt auf der Zelloberfläche ist. Der Einfluss der nicht-konjugierten Nanopartikel auf den T_2^* -Effekt ist vergleichbar mit dem der Biokonjugate, die mit MOC31-vorbehandelten Zellen inkubiert wurden. Die Änderung der T_2^* -Relaxationszeit ist damit vor allem auf unspezifisch an die Zelloberfläche angebundene Nanopartikel (MOC31-SPIO) zurückzuführen; eine möglicherweise trotz Blockierung der EpCAM-Bindungsstellen signifikant stattfindende spezifische Bindung ist auszuschließen. Werden die MOC31-blockierten und unblockierten Konjugat-behandelten Zellen betrachtet, zeigt sich ein signifikanter Einfluss des Blockierungsschritts auf die gemessene T_2^* -Relaxationszeit. Die Ergebnisse zeigen, dass die biologische Aktivität des Antikörpers nach Anbindung an die Partikeloberfläche zu einem bisher noch unbestimmten Anteil erhalten bleibt.

Um den Einfluss der Menge des Aktivierungsreagenz auf die Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM zu untersuchen, wurde der Aktivierungsreagenzüberschuss bei einem gleichbleibenden 3-fachen Antikörperüberschuss zunächst zwischen $2 \cdot 10^3$ und $2 \cdot 10^6$ variiert. Statt der effektiven transversalen Relaxationszeit wird im Folgenden die effektive transversale Relaxationsrate (R_2^*) betrachtet. Zwischen der Relaxationszeit und der Relaxationsrate besteht ein reziproker Zusammenhang ($R_2 = 1/T_2$). Folglich ist die Relaxationsrate umso größer, je kürzer die Relaxationszeit ist. Damit gilt: Je mehr Nanopartikel an der Zelloberfläche binden, desto größer ist die Relaxationsrate. In Abbildung 3.33 sind die effektiven transversalen Relaxationsraten für unbehandelte Zellen sowie für Zellen nach Inkubation mit den Biokonjugaten gezeigt. Weiterhin ist die Differenz der Relaxationsraten (ΔR_2^*) der unblockierten und blockierten Zellen gezeigt. Die Ergebnisse für die Konjugate, die mit einem $2 \cdot 10^3$ -fachen Überschuss erhalten wurden, sind nicht gezeigt. Für diese Konjugate konnte kein signifikanter Unterschied zwischen blockierten und unblockierten Zellen detektiert werden; der ermittelte R_2^* -Wert lag bei $\sim 8 \text{ s}^{-1}$.

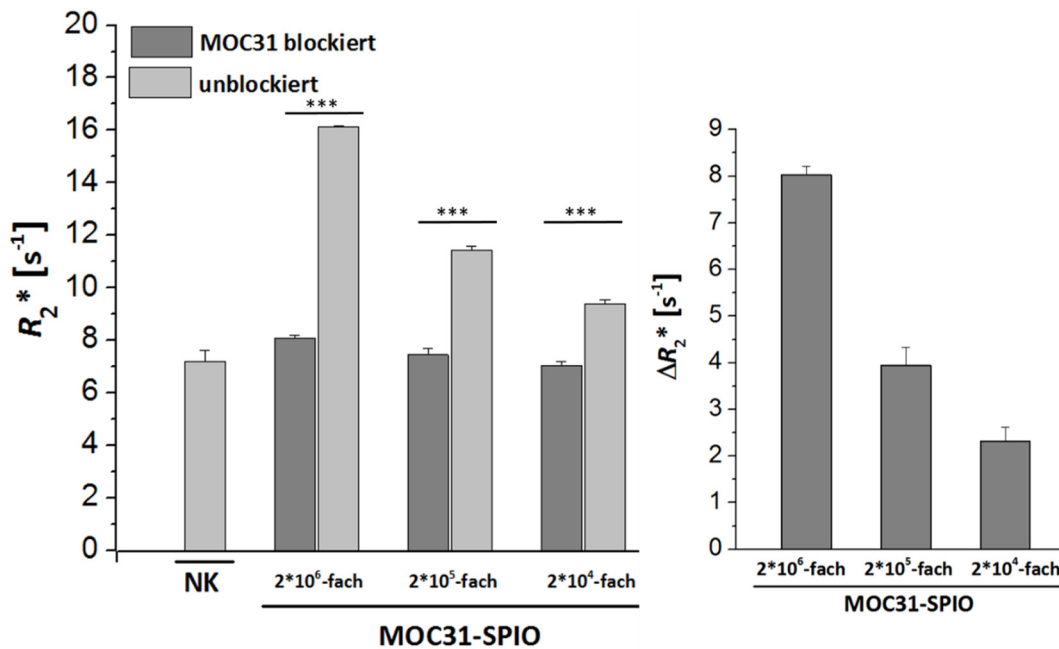


Abbildung 3.33: MRT-Analyse der Bindung von Antikörper-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln an HT29-Zellen. Gezeigt sind die effektiven transversalen Relaxationsraten unbehandelter Zellen (NK), sowie von Zellen, die mit (MOC31 blockiert) und ohne Vorinkubation (unblockiert) mit Konjugaten behandelt wurden (links). Die Konjugate wurden mit einem gleichbleibenden 3-fachen Antikörper- bei variierendem Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten. Des Weiteren ist für die Konjugat-behandelten Zellen die Differenz der Relaxationsraten (ΔR_2^*) der unblockierten und blockierten Zellen gezeigt (rechts). ΔR_2^* entspricht direkt der Signaländerung, die durch spezifisch gebundene Konjugate hervorgerufen wird. Für alle Konjugate zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Relaxationsraten der blockierten und unblockierten Zellen; alle Konjugate zeigen eine spezifische Bindung an EpCAM. Die für die unblockierten HT29-Zellen ermittelten Relaxationsraten unterscheiden sich signifikant. Mit zunehmendem Überschuss an Aktivierungsreagenz nimmt die Relaxationsrate der unblockierten Zellen, und damit auch ΔR_2^* zu. Daraus folgt, dass mehr Konjugate spezifisch auf der Zelloberfläche gebunden werden. Die Zellen wurden mit ~ 3250 fmol Nanopartikel (~ 5 μg Eisen) inkubiert. Es ist der Mittelwert aus mindestens drei Messungen an einem Zellphantom gezeigt. Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Die Konjugat-behandelten Zellen, bei denen die spezifischen Bindungsstellen im Vorfeld blockiert wurden, zeigen Relaxationsraten in einem vergleichbaren Bereich um ~ 7.5 s^{-1} . Die unblockierten, Konjugat-behandelten Zellen weisen hingegen signifikante Unterschiede in ihren Relaxationsraten auf. Mit abnehmendem Überschuss an Aktivierungsreagenz nimmt die Relaxationsrate ab. Daraus folgt, dass weniger Konjugate spezifisch an der Zelloberfläche gebunden werden. Zur anschaulichen Darstellung des Ausmaßes der spezifischen Bindung des jeweiligen Biokonjugats wird die Differenz der Relaxationsraten (ΔR_2^*) der unblockierten und blockierten Konjugat-behandelten Zellen betrachtet. Diese Differenz gibt die Änderung der Relaxationsrate an, die durch an EpCAM gebundene Konjugate bewirkt wird. Der Anteil an EpCAM-bindungsfähigen Biokonjugaten nimmt mit abnehmendem Aktivierungsreagenzüberschuss ab. Vermutlich ist diese Beobachtung darauf zurückzuführen, dass ein höherer Überschuss an Aktivierungsreagenz dazu führt, dass mehr aktivierte Bindungsstellen für den

Antikörper auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhanden sind und dadurch wahrscheinlich größere Mengen an Antikörper gebunden werden können. Es ist zu berücksichtigen, dass die Biokonjugationsreaktion nicht zwingend dazu führen muss, dass an der Oberfläche jedes Nanopartikels auch ein Antikörper gebunden wird. Es können daneben auch unkonjugierte Nanopartikel vorliegen. Durch Erhöhung des Aktivierungsreagenzüberschusses scheinen mehr bindungsaktive Antikörper-konjugierte Nanopartikel gebildet zu werden. An dieser Stelle kann festgehalten werden, dass zwischen den verschiedenen Biokonjugaten Unterschiede in Hinblick auf die Bindungsfähigkeit an EpCAM festgestellt werden können. Das beste Ergebnis in Bezug auf den Anteil an bindungsaktiven Konjugaten wird mit dem höchsten eingesetzten Aktivierungsreagenzüberschuss von $2 \cdot 10^6$ erhalten.

Die Zellversuche zu der im Vorfeld gezeigten magnetotomographischen Untersuchung wurden am selben Versuchstag durchgeführt; ebenso erfolgten die Konjugationsreaktionen an einem Tag. Für diese Untersuchungsreihe wurden die stärksten Signaländerungen infolge spezifisch gebundener Konjugate beobachtet. Bei Untersuchungen weiterer Chargen MOC31-konjugierter Eisenoxid-Nanopartikel wurden geringere Änderungen beobachtet. Beispielsweise wurden für Konjugate, die bei einem 3-fachen Antikörperüberschuss und einem $2 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss synthetisiert wurden, Signaländerungen durch spezifisch gebundene Konjugate von $\sim 3 \text{ s}^{-1}$ beobachtet. Für Konjugate, die bei einem $2 \cdot 10^5$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten wurden, konnte in diesen Zellexperimenten kein signifikanter Unterschied zwischen unblockierten und blockierten Zellen festgestellt werden. Der im Vorfeld beschriebene Trend, dass ein höherer Aktivierungsreagenzüberschuss zu einem höheren Anteil an bindungsaktiven Konjugaten führt, bleibt folglich erhalten. Daher wurde der Aktivierungsreagenzüberschuss anschließend in einem Bereich um $2 \cdot 10^6$ variiert. Die Bindungsfähigkeit dieser Biokonjugate wurde allerdings nicht mehr mittels *in vitro* MRT-Experimente untersucht. Mittels MRT kann die durch die Nanopartikel bewirkte Verkürzung der Relaxationszeit detektiert werden. Die bewirkte Änderung zeigt dabei eine Abhängigkeit von der Menge der Nanopartikel auf der Zelloberfläche. Um aus der Änderung der Relaxationszeit der Konjugat-behandelten Zellen den Nanopartikelgehalt auf der Zelloberfläche quantitativ zu bestimmen, müsste zunächst untersucht werden, ob die relaxometrischen Eigenschaften der Eisenoxid-Nanopartikel durch die Biokonjugationsreaktion tatsächlich unbeeinflusst bleiben. Dies wurde im Vorfeld für den Vergleich angenommen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Interaktion der Nanopartikel mit den Zellen auch zu

einer Aggregation der Partikel führen könnte. Eine Aggregation würde zu veränderten relaxometrischen Eigenschaften führen. Infolge wäre eine Quantifizierung des Partikelgehalts auf der Zelloberfläche nicht mehr möglich. Um die Bindungseigenschaften der Konjugate in *in vitro* Zellexperimenten quantitativ zu beschreiben erfolgte eine analytische Bestimmung des Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektroskopie.

3.2.2.2 *In vitro* Untersuchung der Bindungsfähigkeit der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel an EpCAM mittels AAS

In diesem Kapitel wird die quantitative Analyse der Bindungseigenschaften MOC31-konjugierter Eisenoxid-Nanopartikel beschrieben. Hierzu wurden Zellpellets nach Nanopartikelexposition mittels AAS-Analytik auf ihren Eisengehalt hin untersucht. Je höher der Gehalt an Nanopartikeln auf der Zelloberfläche desto höher ist der Eisengehalt. Zur quantitativen Untersuchung der Anreicherung der Eisenoxid-Nanopartikel auf der Zelloberfläche mittels Eisenanalytik wurden die Zelloberflächen-gebundenen Nanopartikel wie unter 6.3.2 beschrieben aufgelöst.

Um die spezifische Bindung der Biokonjugate an den Zelloberflächenrezeptor EpCAM zu quantifizieren, wurden zunächst *in vitro* Experimente mit der EpCAM-positiven Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt. Hierzu wurden HT29-Zellen mit MOC31-konjugierten als auch mit nicht-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln mit und ohne vorangehenden Blockierungsschritt inkubiert. Weiterhin wurden MOC31-blockierte und unblockierte Nanopartikel-unbehandelte Zellen betrachtet. Die analytische Betrachtung der unbehandelten Zellen dient der Bestimmung des endogenen Eisengehalts und wird unter anderem im Folgenden genauer erläutert.

Abbildung 3.34 zeigt den Eisengehalt unbehandelter HT29-Zellen sowie den Eisengehalt von HT29-Zellen, die mit nicht-konjugierten Nanopartikeln sowie mit Biokonjugaten inkubiert wurden. Letzteres erfolgt repräsentativ am Beispiel von Biokonjugaten, die mit einem 3-fachen Antikörperüberschuss und einem $2 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten wurden. Die Eisenquantifizierung zeigt die Ergebnisse einer *in vitro* Bindungsstudie, die mit derselben Charge MOC31-konjugierter Eisenoxid-Nanopartikel durchgeführt wurde. Die Daten der unbehandelten Zellen sowie der Zellen, die mit nicht-konjugierten Nanopartikeln behandelt wurden, zeigen die Ergebnisse von *in vitro* Bindungsstudien, die am selben Versuchstag wie die Studien mit den Konjugat-behandelten Zellen durchgeführt wurden. Die Zellexperimente wurden

in mindestens einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die einzelnen Zellexperimente wird der Fehler der Messwerte immer vernachlässigt. In Abbildung 3.34 ist weiterhin der Eisengehalt von unblockierten und blockierten HT29-Zellen als Mittelwert von jeweils mindestens neun Zellexperimenten an insgesamt drei Versuchstagen gezeigt.

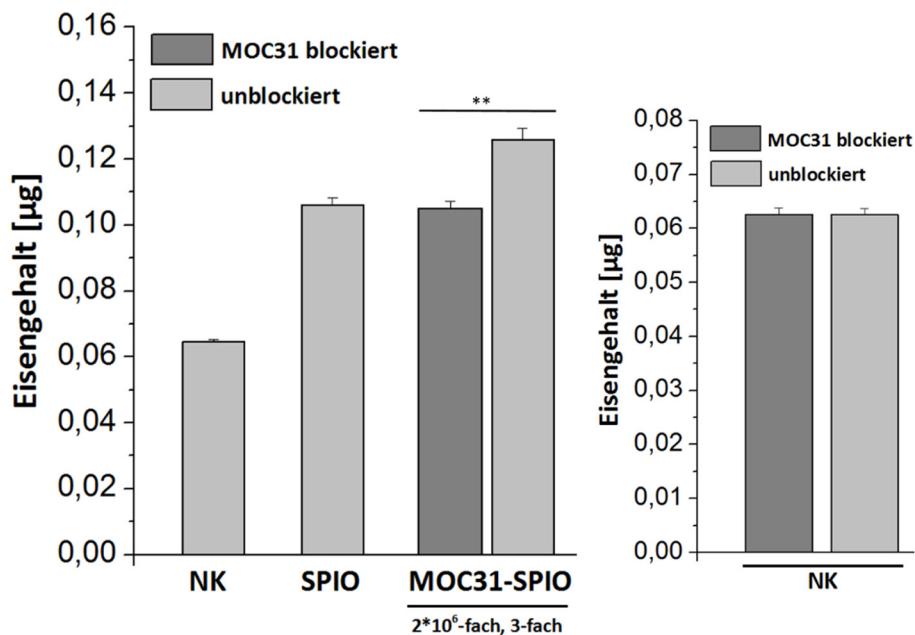


Abbildung 3.34: AAS-Untersuchungen von HT29-Zellen vor und nach Inkubation mit nicht-konjugierten sowie mit MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln. Gezeigt ist der Eisengehalt un behandelter Zellen (NK), sowie von Zellen, die mit nicht-konjugierten Nanopartikeln (SPIO) und mit Konjugaten (MOC31-SPIO) inkubiert wurden. Die Konjugate wurden mit einem 3-fachen Antikörperüberschuss und einem 2*10⁶-fachen Bromcyanüberschuss erhalten. Für die Konjugat-behandelten Zellen ist zusätzlich der Eisengehalt nach Vorinkubation mit MOC31 (MOC31 blockiert) gezeigt (links). Des Weiteren ist der Eisengehalt von unblockierten und blockierten Zellen als Mittelwert von jeweils mindestens neun Zellexperimenten an insgesamt drei Versuchstagen gezeigt (rechts). Der geringe Fehler zeigt den vergleichbaren intrinsischen Eisengehalt der Zellen unabhängig von dem Versuchstag. Blockierte und unblockierte Zellen weisen einen vergleichbaren Eisengehalt auf. Die Behandlung der Zellen mit den Konjugaten führt zu einer signifikanten Erhöhung des Eisenwertes im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Messungen zeigen einen Einfluss der Blockierung von EpCAM-Bindungsstellen durch MOC31-Vorinkubation und damit Spezifität. Die Zellen wurden mit ~ 3250 fmol Nanopartikel (~ 5 µg Eisen) inkubiert. Die Daten sind der Mittelwert aus mindestens drei Zellexperimenten, Mittelwert +/- s.e.m. mit n ≥ 3 (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Der native Eisengehalt der unbehandelten Zellen gibt den Untergrund vor. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigen alle Zellen, die mit oder ohne MOC31-Vorinkubation mit Nanopartikeln behandelt wurden eine Zunahme im Eisengehalt. Diese Zunahme ist auf exogenes Eisen und damit auf eine Bindung der Nanopartikel an die Zelloberfläche zurückzuführen. Mittels AAS-Analytik konnte die zusätzliche Eisenmenge, die auf die Zelloberflächen-gebundenen Eisenoxid-Nanopartikel zurückzuführen ist, signifikant vom intrinsischen Untergrund unterschieden werden. Dies deutet an, dass die ausgewählte Technik eine geeignete Methode ist, um die

Bindungseigenschaften der Biokonjugate vergleichend in *in vitro* Experimenten zu untersuchen. Analog zu den Ergebnissen der *in vitro* MRT-Analytik zeigt sich bei der Eisenquantifizierung ein Einfluss des Blockierungsschritts auf das Messergebnis und somit die Spezifität der Biokonjugate. Neben der spezifischen Bindungsfähigkeit an EpCAM weisen die Biokonjugate auch ein unspezifisches Bindungsverhalten an die Zelloberfläche auf. Die Adhäsion der Biokonjugate an die blockierten Zellen ist vergleichbar mit der Bindung von nicht-konjugierten Nanopartikeln an unblockierte HT29-Zellen. Im Vergleich mit den Ergebnissen der MRT-Analytik bindet allerdings eine wesentlich größere Anzahl der Nanopartikel an die Zelloberfläche der blockierten Zellen; wohingegen der Anteil der spezifischen Bindung im Vergleich reduziert ist. Mittels Scatchard-Analyse wurde von de Jonge *et al.*^[155] angenommen, dass ungefähr $3 \cdot 10^6$ spezifische Bindungsstellen für den MOC31-Antikörper pro GLC-28 Tumorzelle *in vitro* vorhanden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden $\sim 2 \cdot 10^6$ HT29-Zellen mit 0.07 nmol MOC31 vorinkubiert. Unter der Annahme, dass beide Zelllinien (HT29 und GLC-28) eine vergleichbare Anzahl an MOC31-komplementären Oberflächenrezeptoren aufweisen, würde die eingesetzte Zellzahl unter Berücksichtigung der Daten von de Jonge *et al.*^[155] $6 \cdot 10^{12}$ Bindungsstellen (0.01 nmol) entsprechen. Somit sollte der eingesetzte Überschuss an freiem MOC31 ausreichen, um alle spezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Daher sollte der beobachtete höhere Nanopartikelgehalt auf der Zelloberfläche von MOC31-vorinkubierten Zellen nicht darauf zurückzuführen sein, dass neben unspezifischer doch auch spezifische Bindung stattfinden kann. Die vergleichbaren Mengen an nicht-konjugierten Nanopartikeln (auf unblockierten Zellen) und Konjugaten (auf blockierten Zellen) liefern bereits ein Indiz gegen die Theorie freier Bindungsstellen auf der Oberfläche der vorinkubierten Zellen.

Im Folgenden wird der Einfluss des Aktivierungsreagenzüberschusses, bei einem gleichbleibenden 3-fachen Antikörperüberschuss, auf das Bindungsverhalten der Biokonjugate untersucht. Anstatt des Eisengehalts erfolgt direkt die Betrachtung des Nanopartikelgehalts. Der Eisengehalt setzt sich aus dem intrinsischen Eisenspiegel der Zellen sowie dem exogenen Eisen, das auf die Oberflächen-gebundenen Eisen-basierten Nanopartikel zurückzuführen ist, zusammen. Zunächst wird für jedes durchgeführte Zellexperiment der exogene Eisengehalt bestimmt, indem von dem Eisengehalt der Nanopartikel-behandelten Zellen - hier wird jedes Zellexperiment einzeln betrachtet - der mittlere Eisengehalt aus den am selben Versuchstag erfolgten Experimenten mit den entsprechenden nativen Zellen - der Fehler der gemittelten Zellexperimente wird nicht

berücksichtigt - abgezogen wird. Abschließend wird der Mittelwert über den exogenen Eisengehalt der einzelnen Zellexperimente gebildet. Aus dem so bestimmten Eisengehalt lässt sich die Stoffmenge der Nanopartikel unter der Annahme von Sphärizität der Partikel und der Dichte von Magnetit (ρ : 5.2 g/cm³) ermitteln.

Bevor für verschiedene Biokonjugate die auf diese Weise ermittelten Zelloberflächen-gebundenen Nanopartikelmengen gezeigt werden, wird kurz auf das rechte Diagramm in Abbildung 3.34 eingegangen. Dies zeigt den Eisengehalt von unblockierten und blockierten HT29-Zellen und zwar als Mittelwert von jeweils mindestens neun Zellexperimenten an insgesamt drei unabhängigen Versuchstagen ($n \geq 9$). Es ist ersichtlich, dass sich zwischen den mit freiem Antikörper inkubierten und den unblockierten Zellen kein Unterschied in Bezug auf den ermittelten Eisengehalt zeigt. Weiterhin zeigt der geringe Fehler, dass die Zellen auch an verschiedenen Versuchstagen immer eine vergleichbare intrinsische Eisenmenge aufweisen. Unter der Annahme, dass alle Biokonjugate eine vergleichbare unspezifische Bindung aufweisen, sollte die ausgewählte Technik uneingeschränkt geeignet sein, um die auf die Nanopartikel zurückzuführende Eisenmenge signifikant vom Untergrund zu unterscheiden und um somit den Gehalt der Eisen-basierten Nanopartikel auf der Zelloberfläche zu quantifizieren.

In Abbildung 3.35 ist der Gehalt an Nanopartikeln gezeigt, die mit und ohne vorangehenden Blockierungsschritt an EpCAM-positive Zellen binden. Es ist der Nanopartikelgehalt nach Inkubation mit nicht-konjugierten Nanopartikeln sowie mit Biokonjugaten gezeigt. Die Konjugate wurden bei einem gleichbleibenden 3-fachen Antikörperüberschuss und variierendem Aktivierungsreagenzüberschuss, Variation zwischen $1 \cdot 10^6$ und $3 \cdot 10^6$, erhalten. Mit Ausnahme der Konjugate, die mit einem $1 \cdot 10^6$ -fachen Bromcyanüberschuss erhalten wurden, sind Ergebnisse von mindestens zwei Kopplungsreaktionen gezeigt. Bei jeder Zellexperimentenreihe eines Versuchstags wurden *in vitro* Bindungsstudien mit nicht-konjugierten Nanopartikeln durchgeführt. Weiterhin ist in Abbildung 3.35 für die Konjugat-behandelten Zellen die Differenz des Nanopartikelgehalts der unblockierten und blockierten Zellen gezeigt. Die Differenz entspricht dem Gehalt an spezifisch gebundenen Antikörper-konjugierten Nanopartikeln. Unter der Annahme, dass ein an EpCAM-bindendes Biokonjugat aus genau einem Antikörper-konjugierten Nanopartikel besteht, wird die Menge an spezifisch gebundenen Eisenoxid-Nanopartikeln der Menge an spezifisch gebundenen Konjugaten gleichgesetzt.

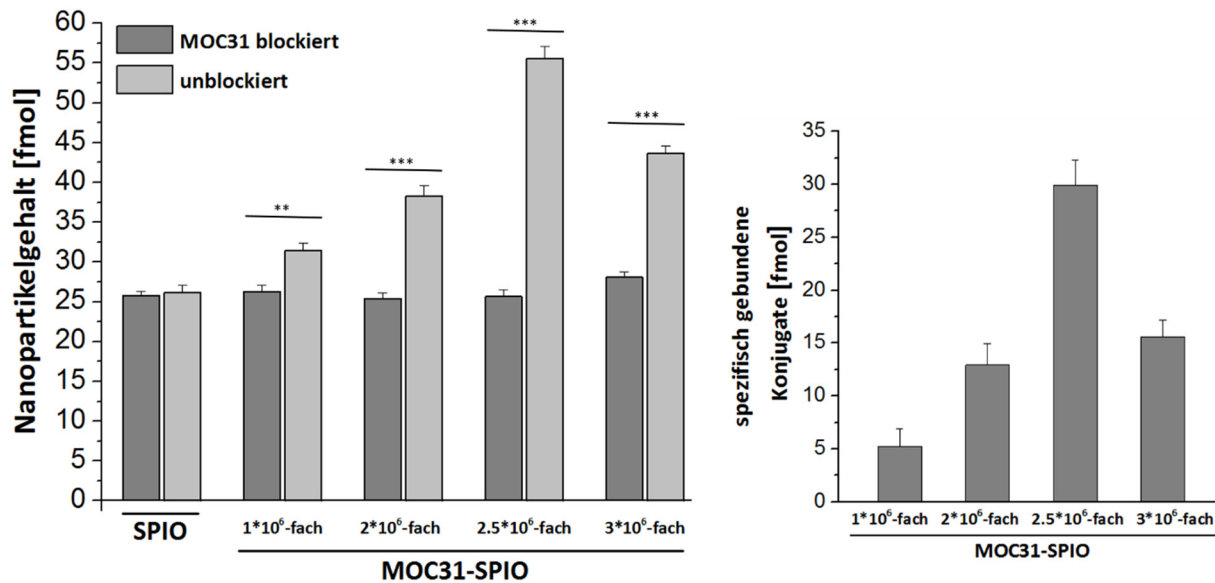


Abbildung 3.35: AAS-Analytik der zellulären Bindung von Eisenoxid-Nanopartikeln, die mit unterschiedlichem Aktivierungsreagenzüberschuss an MOC31 gekoppelt wurden. Gezeigt ist der Gehalt an Nanopartikeln, die an HT29-Zellen mit und ohne Präinkubationsschritt binden (links). Die Zellen wurden mit nicht-konjugierten Nanopartikeln (SPIO) und Konjugaten (MOC31-SPIO) inkubiert. Die Konjugate wurden mit einem gleichbleibenden 3-fachen Antikörperüberschuss erhalten. Des Weiteren ist für die Konjugat-behandelten Zellen die Differenz der an die unblockierten und blockierten Zellen gebundenen Partikel gezeigt (rechts). Für die blockierten Zellen werden vergleichbare Nanopartikelmenngen gefunden und damit ein vergleichbares Maß an unspezifischer Bindung. Für die nicht-konjugierten Nanopartikel wird kein Unterschied zwischen blockierten und unblockierten Zellen gefunden. Für die Konjugate zeigt sich ein Einfluss der Blockierung der spezifischen Bindungsstellen. Die für die unblockierten, Konjugat-behandelten HT29-Zellen erhaltenen Werte unterscheiden sich signifikant. Der größte Anteil spezifisch gebundener Konjugate wird bei einem Aktivierungsreagenzüberschuss von $2.5 \cdot 10^6$ erhalten. Die Zellen wurden mit ~ 3250 fmol Nanopartikel inkubiert. Es ist der Mittelwert aus mindestens drei Zellexperimenten gezeigt, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Bei vorheriger Blockierung der spezifischen Bindungsstellen mit freiem MOC31 ist zwischen den Konjugaten kein signifikanter Unterschied im Nanopartikelgehalt zu erkennen. Alle zeigen eine vergleichbare unspezifische Bindung, die auch vergleichbar mit der Bindung der nicht-konjugierten Nanopartikel ist. Für alle Konjugate zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Menge an Nanopartikeln auf der Zelloberfläche mit und ohne vorangehenden Blockierungsschritt. Die biologische Aktivität des Antikörpers bleibt nach Anbindung an die Partikeloberfläche zu einem bisher noch unbestimmten Anteil erhalten. Für die nicht-konjugierten Nanopartikel ist kein Unterschied erkennbar. Die verschiedenen Konjugate zeigen keinen Unterschied in Bezug auf den ermittelten Nanopartikelgehalt auf den zuvor blockierten Zellen. Für die verschiedenen Konjugate zeigen sich aber signifikante Unterschiede im Nanopartikelgehalt auf der nicht blockierten Zelloberfläche und damit in dem Ausmaß ihrer spezifischen Bindung. Der Anteil spezifisch gebundener Konjugate nimmt mit zunehmendem Überschuss an Aktivierungsreagenz zunächst zu. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der *in vitro*

MRT-Studien. Es wurde angenommen, dass mit Erhöhung des Aktivierungsreagenzüberschusses mehr aktivierte Bindungsstellen für den Antikörper auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhanden sind und infolge auch mehr bindungsaktive Antikörper-konjugierte Nanopartikel erhalten werden (3.2.2.1). Der größte Anteil spezifisch bindender Konjugate wird bei einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten. Bei weiterer Erhöhung des Überschusses erfolgt eine Abnahme der bindungsaktiven Konjugate. Diese Beobachtung könnte darauf zurückgeführt werden, dass der Antikörper auf der Nanopartikeloberfläche verstärkt über mehrere aktivierte Endgruppen an diese und damit fester gebunden wird. Diese Multipunktanbindung kann die Flexibilität des Antikörpers drastisch reduzieren; infolge kann die Zugänglichkeit der Antigenbindungsstellen beeinflusst und die Bindungsfähigkeit an EpCAM reduziert werden (3.2.2).

Im Folgenden wurden die eingesetzten Antikörperäquivalente bei gleichbleibendem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Bromcyanüberschuss variiert, um zu untersuchen, ob der Gehalt spezifisch gebundener Konjugate weiter erhöht werden kann. Der Antikörper wurde äquimolar sowie in einem 3- und 6-fachen Überschuss eingesetzt. In Abbildung 3.36 sind der Nanopartikelgehalt auf blockierten und unblockierten HT29-Zellen sowie der Gehalt an spezifisch gebundenen Konjugaten gezeigt. Für alle Konjugate sind Ergebnisse von mindestens zwei Kopplungsreaktionen gezeigt.

Die Ergebnisse der bereits gezeigten Bindungsstudien hinsichtlich des unspezifischen Bindungsverhaltens der Konjugate wurden bestätigt. Weiterhin lassen sich hinsichtlich des spezifischen Bindungsverhaltens Unterschiede zwischen den verschiedenen Konjugaten feststellen. Wird der Antikörper nicht in einem 3-fachen Überschuss sondern äquimolar eingesetzt, nimmt der Anteil spezifisch gebundener Konjugate signifikant ab. Es ist zu berücksichtigen, dass die Kopplungsreaktion nicht zwingend dazu führen muss, dass an der Oberfläche jedes Nanopartikels auch ein Antikörper gebunden wird; es können daneben auch nicht-konjugierte Nanopartikel vorliegen. Die Beobachtung ist daher vermutlich darauf zurückzuführen, dass mit zunehmender Antikörpermenge während der Kopplungsreaktion auch mehr bindungsaktive Antikörper-konjugierte Nanopartikel erhalten werden. Wird der Antikörperüberschuss von 3-fach auf 6-fach erhöht, nimmt hingegen der Anteil spezifisch gebundener Konjugate signifikant ab. Unter der Annahme, dass die Ausbeute an Antikörper-konjugierten Nanopartikeln bei Erhöhung des Antikörperüberschusses nicht abnimmt, ist die beobachtete Abnahme vermutlich darauf

zurückzuführen, dass die biologische Aktivität des Antikörpers nach Anbindung an die Partikel zu einem geringeren Anteil erhalten bleibt.

Durch die durchgeführten Variationen des Antikörperüberschusses konnte somit der Anteil an Konjugaten, die spezifisch über EpCAM an die Zelloberfläche binden, nicht weiter erhöht werden. Das beste Ergebnis bezüglich der spezifischen Bindungsfähigkeit wurde weiterhin bei einem 3-fachen Antikörperüberschuss erhalten.

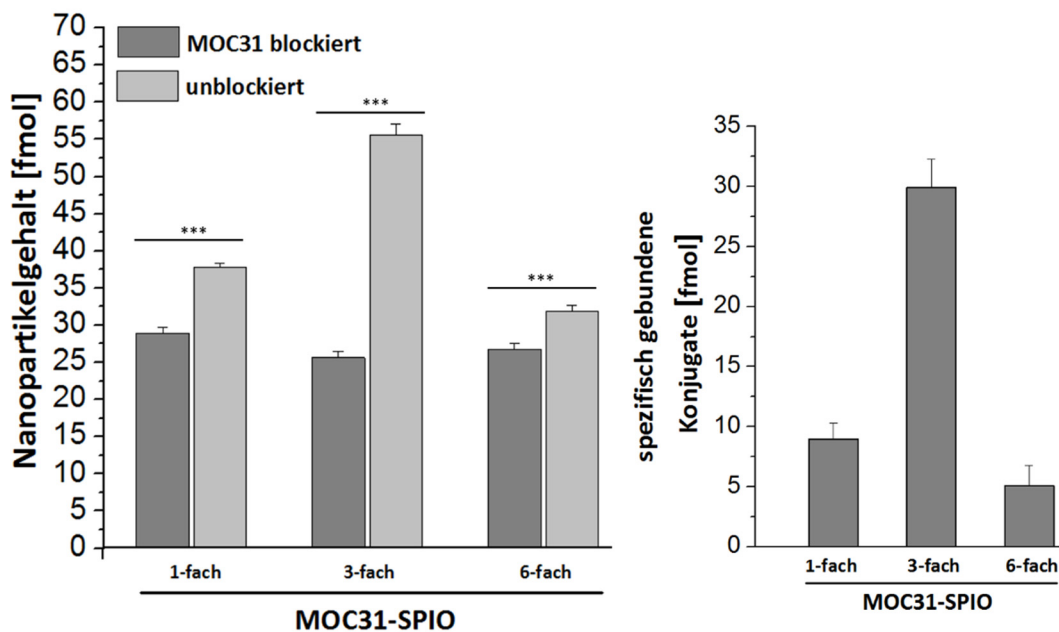


Abbildung 3.36: AAS-Analytik der zellulären Bindung von Eisenoxid-Nanopartikeln nach Kopplung an MOC31 bei einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss und einem variierenden Antikörperüberschuss. Gezeigt ist der Gehalt an Nanopartikeln, die an HT29-Zellen mit und ohne Präinkubationsschritt binden (links). Des Weiteren ist die Differenz der an die unblockierten und blockierten Zellen gebundenen Partikel gezeigt (rechts). An die blockierten Zellen werden vergleichbare Nanopartikelmen gen gebunden. Es zeigt sich ein Einfluss der Blockierung der spezifischen Bindungsstellen. Die für die unblockierten HT29-Zellen erhaltenen Werte unterscheiden sich signifikant. Der größte Anteil spezifisch gebundener Konjugate wird bei einem 3-fachen Antikörperüberschuss erhalten. Die Zellen wurden mit ~ 3250 fmol Nanopartikel inkubiert. Es ist der Mittelwert aus mindestens sieben Zellexperimenten gezeigt, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 7$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Neben den Bindungsstudien mit der EpCAM hoch exprimierenden Kolonkarzinomzelllinie HT29 erfolgten *in vitro* Experimente mit einer *knockdown* Kolonkarzinomzelllinie mit geringerer EpCAM Expression (HT29EpCAMkd). Bei diesen Zellen ist das EpCAM-Level auf der Zelloberfläche drastisch reduziert, was sich auf den spezifisch gebundenen Nanopartikelgehalt auswirken sollte. In Abbildung 3.37 ist der Nanopartikelgehalt auf HT29- und HT29EpCAMkd-Zellen nach Inkubation mit nicht-konjugierten Nanopartikeln sowie mit Biokonjugaten, diese wurden bei einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Bromcyanüberschuss und einem 3-fachen Antikörperüberschuss erhalten,

gezeigt. Die *in vitro* Bindungsstudien wurden mit derselben Charge MOC31-konjugierter Eisenoxid-Nanopartikel an einem Versuchstag durchgeführt. Die Daten der unbehandelten Zellen sowie der Zellen, die mit nicht-konjugierten Nanopartikeln behandelt wurden, zeigen die Ergebnisse von *in vitro* Bindungsstudien, die am selben Versuchstag wie die Studien mit den Konjugat-behandelten Zellen durchgeführt wurden.

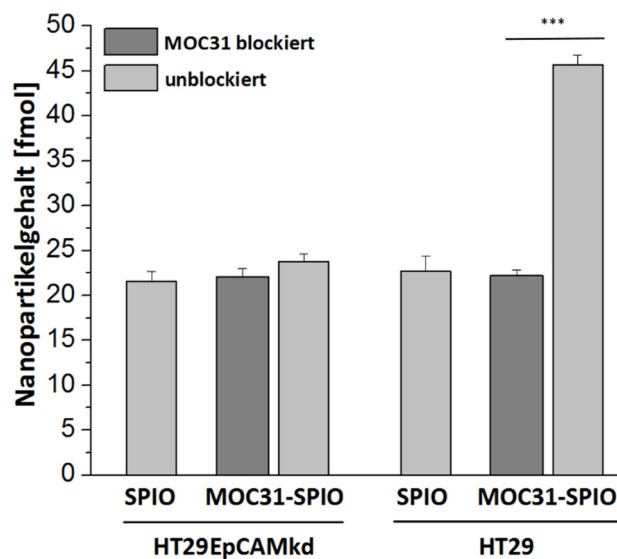


Abbildung 3.37: AAS-Analytik der Bindung von nicht-konjugierten sowie von MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikeln an HT29- sowie HT29EpCAMkd-Zellen. Gezeigt ist der Gehalt an Nanopartikeln, die an HT29-Zellen sowie HT29EpCAMkd-Zellen binden. Die Zellen wurden mit nicht-konjugierten Nanopartikeln (SPIO) sowie mit Konjugaten (MOC31-SPIO) inkubiert. Für die Konjugat-behandelten Zellen ist zusätzlich der Partikelgehalt nach Vorinkubation mit MOC31 (MOC31 blockiert) gezeigt. Die Konjugate wurden mit einem 3-fachen Antikörper- und einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten. Mit Ausnahme der HT29-Zellen, die ohne Vorinkubation mit den Konjugaten inkubiert wurden, werden vergleichbare Mengen an Nanopartikeln auf der Zelloberfläche gefunden. Die Zellen wurden mit ~ 2600 fmol Nanopartikel inkubiert. Es ist der Mittelwert aus mindestens drei Zellexperimenten gezeigt, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Der Vergleich mit den EpCAM-defizienten Zellen zeigt ein vergleichbares unspezifisches Bindungsverhalten der Nanopartikel an beide Zelllinien. Dies bestätigt die unter Berücksichtigung der Scatchard Analyse von de Jonge *et al.*^[155] getroffene Annahme, dass der eingesetzte Überschuss an freiem MOC31 im Präinkubationsschritt ausreicht, um alle spezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Für die HT29-Zellen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den blockierten und nicht-blockierten Konjugat-behandelten Zellen und damit spezifische Bindung. Für die EpCAM-defizienten Zellen unterscheidet sich der Nanopartikelgehalt infolge der geringen EpCAM-Dichte hingegen nicht signifikant. Mittels *in vitro* Bindungsstudien mit verschiedenen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Abnahme des EpCAM-Levels eine Reduzierung des Nanopartikelgehalts auf unblockierten Zelloberflächen bewirkt. Der signifikante Unterschied im

Nanopartikelgehalt auf jeweils unblockierten HT29- und HT29EpCAMkd-Zellen belegt die spezifische, Antikörper-vermittelte Bindung der Konjugate an EpCAM.

Allerdings bindet auch unter optimalen Bedingungen nur ein geringer Anteil der Nanopartikel spezifisch an EpCAM. Bezogen auf die im Zellexperiment eingesetzte Menge an Nanopartikeln beträgt der prozentuale Anteil spezifisch gebundener Konjugate maximal ~ 0.9%. Im nächsten Kapitel wird untersucht, ob dies evtl. mit der Zahl der eingesetzten Partikel zusammenhängt. Weiterhin erfolgt eine umfassende Charakterisierung der Biokonjugate; es wird die Kopplungseffizienz ermittelt und die biologische Aktivität der Antikörper nach Anbindung an die Partikeloberfläche untersucht. Ein geringer Anteil spezifisch gebundener Konjugate könnte evtl. durch eine niedrige Kopplungsausbeute und/oder eine reduzierte spezifische Bindungsfähigkeit der Nanopartikel-konjugierten Antikörper bedingt sein. Diese Untersuchungen erfolgten durch Radiomarkierung der Biokonjugate. Die Bindungsstudien erfolgten mit unblockierten HT29- und ebenfalls unblockierten HT29EpCAMkd-Zellen. Durch vorherige Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die blockierten HT29-Zellen und die unblockierten HT29EpCAMkd-Zellen keinen signifikanten Unterschied im Nanopartikelgehalt aufweisen (siehe Abbildung 3.37). Daher ist die Verwendung von unblockierten HT29EpCAMkd-Zellen anstelle von blockierten HT29-Zellen geeignet, um den Anteil der spezifischen Bindung zu bestimmen.

3.2.3 Radiomarkierung des monoklonalen anti-EpCAM Antikörpers MOC31 mit ¹²⁵Iod

Die Modifikation von Proteinen und anderen Biomolekülen mit radioaktiven Nukliden ist eine extrem sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung der radiomarkierten Moleküle im Verlauf von Aufreinigungsschritten und biochemischen Assays (Radioimmunassays). Weiterhin wird durch die Radiomarkierung die Verfolgung von physiologischen Vorgängen ermöglicht.^[232,239] Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Markierung des anti-EpCAM Antikörpers MOC31 mit Radionukliden um die Frage nach der Effizienz der kovalenten Kopplung von MOC31 an die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel zu beantworten (3.2.3.1), sowie um in Zellexperimenten zu klären, ob und wie sich die Modifizierung der Oberfläche der Nanopartikel mit MOC31 auf die biologische Aktivität des Antikörpers auswirkt (3.2.3.2). Weiterhin wird ein möglicher Einfluss der im Zellexperiment eingesetzten Partikelmenge auf den Gehalt spezifisch gebundener Konjugate untersucht (3.2.3.2). Zu den gängigsten Markierungsnukliden gehört unter anderen

¹²⁵Iod.^[232,240] Heine *et al.*^[35] nutzten die Radiomarkierung von MOC31 mit ¹²⁵Iod zur *in vivo* Untersuchung der Zugänglichkeit von EpCAM in Kolonkarzinom-Mausmodellen. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Markierung von MOC31 mit diesem radioaktiven Isotop. Für die Radioiodierung können zwei Durchführungsarten unterschieden werden: Die direkte sowie die indirekte Modifizierung.^[232] Bei der indirekten Methode wird zunächst eine intermediäre Komponente markiert, welche anschließend zur finalen Modifikation der Zielstruktur eingesetzt wird. Als Beispiel sei die ¹²⁵Iod-Markierung von Proteinen durch Modifizierung primärer Aminogruppen mit dem Bolton-Hunter Reagenz genannt.^[232,240,241] Bei der direkten Radioiodierung erfolgt in Gegenwart eines Oxidationsmittels die *in situ* Herstellung einer elektrophilen Radioiod-Spezies für eine anschließende Modifikation von Tyrosin- und Histidinresten durch elektrophile aromatische Substitution.^[232,240–242] Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Radioiodierung von MOC31 durch eine direkte elektrophile aromatische Substitutionsreaktion; die *in situ* Oxidation von Iodid erfolgte dabei durch Verwendung von Iodination Beads. Abbildung 3.38 zeigt schematisch die direkte Radioiodierung eines IgG-Moleküls unter Verwendung von Iodination Beads.

Bei den Iodination Beads handelt es sich um nicht poröse Polystyrolkugeln, welche an ihrer Oberfläche immobilisierte, oxidierende *N*-Chlorbenzylsulfonamid-Gruppen aufweisen; folglich handelt es sich um polymergebundene Chloramin-T-Analoga (Chloramin-T: *N*-chloriertes *p*-Toluolsulfonsäureamid).^[232,239,242] Bei der Iodierung mit Chloramin-T als Oxidationsmittel liegen alle Reaktanden in Lösung vor (Einphasensystem).^[240] Bei der Oxidation von Iodid mit Iodination Beads handelt es sich um eine Zweiphasenreaktion. Markwell *et al.*^[239] konnten zeigen, dass die aktive Iodierungsspezies auf der Oberfläche der Kugeln lokalisiert bleibt. Der Vorteil eines Zweiphasensystems gegenüber der direkten Verwendung von Chloramin-T in homogener Lösung liegt unter anderem in der erleichterten Abtrennung der iodierten Spezies von dem Iodierungsagenz und damit in dem vereinfachten Reaktionsabbruch.^[232,239,240] Bei der Verwendung von Chloramin-T muss zum Abbruch der Reaktion die Zugabe eines Reduktionsmittels erfolgen; dies kann bei Anwesenheit empfindlicher Disulfidbrücken kritisch sein.^[232,240] Weiterhin ist das an die Polymerkugeln gekoppelte *N*-Chlorbenzylsulfonamid ein milderes Oxidationsmittel als das *N*-chlorierte *p*-Toluolsulfonsäureamid.^[232,240,242] Chloramin-T oxidiert zum Beispiel nicht nur Iod sondern kann auch *alpha*-Aminogruppen von Aminosäuren zum Nitril oxidieren.^[240]

Bei der Verwendung von Iodination Beads wird die Kontaktzeit zwischen dem Oxidationsmittel und der zu iodierenden Spezies minimiert und infolge auch die Reaktionsrate der Iodinkorporation in Makromoleküle sehr stark reduziert.^[232,242] Eine hohe spezifische Radioaktivität kann eine extrem sensitive Detektion ermöglichen. Andererseits kann eine Überladung dazu führen, dass die biologische Aktivität durch die Iodierungsprozedur beeinträchtigt wird.^[232,240]

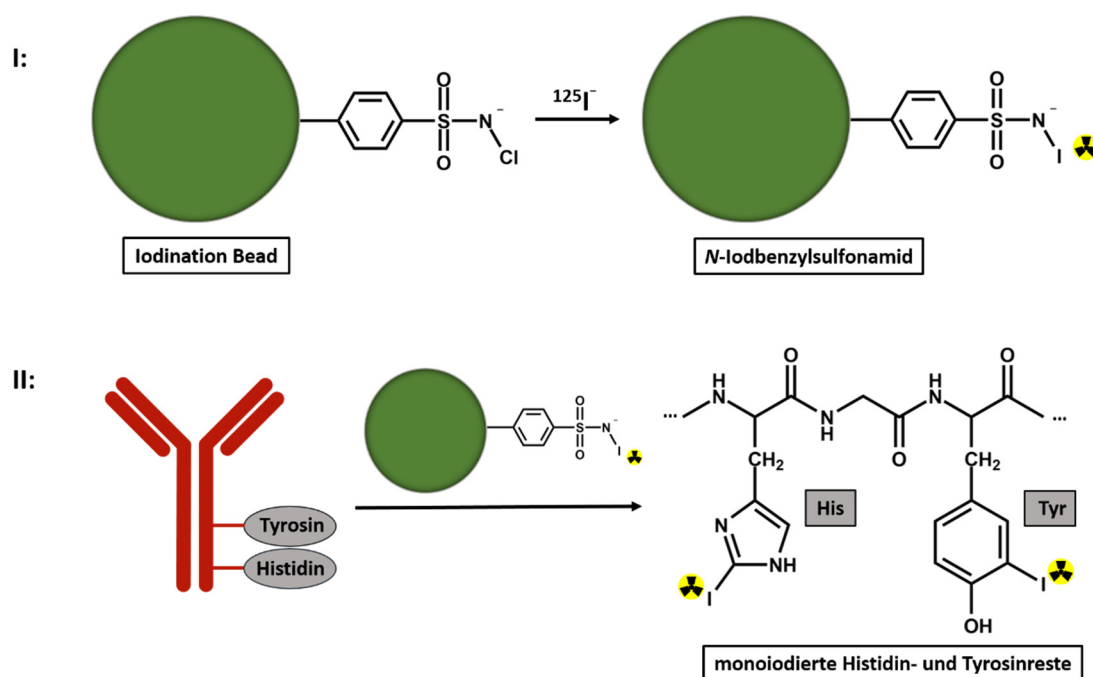


Abbildung 3.38: Schematische Darstellung der Radiomarkierung eines IgG-Moleküls mit ^{125}I od. Die Radioiodierung des MOC31-Antikörpers erfolgte unter Verwendung einer Iodination Bead. Bei dieser handelt es sich um porenfreie Polystyrolkugeln (~ 2.8 mm im Durchmesser^[239]), welche an ihrer Oberfläche immobilisierte, oxidierende N-Chlorbenzylsulfonamid-Gruppen aufweisen. Der Reaktionsmechanismus, der bei Umsetzung mit Iodid die elektrophile Iodspezies erzeugt, unterscheidet sich von anderen Oxidationsmitteln (z.B. Chloramin-T). Markwell *et al.*^[239] konnten zeigen, dass die aktive Iodierungsspezies auf der Oberfläche der Kugeln lokalisiert bleibt. Vermutlich erfolgt durch Substitution des Chloratoms gegen ein Iodat die Bildung von N-Iodbenzylsulfonamid als intermediäre reaktive Spezies (I).^[239] Durch das reaktive Intermediat ist in einer elektrophilen Substitutionsreaktion die direkte Iodierung von Tyrosin- (Tyr) und Histidinresten (His) im Antikörper möglich (II).

Die ^{125}I -Markierung von MOC31 ging der kovalenten Kopplung an die Nanopartikel voraus. Im Folgenden wird die Charakterisierung der radiomarkierten Biokonjugate vorgestellt. Es wurden Biokonjugate untersucht, die bei gleichbleibendem 3-fachen Antikörper- und variierendem Aktivierungsreagenzüberschuss ($2 \cdot 10^6$ - und $2.5 \cdot 10^6$ -fach), sowie bei gleichbleibendem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenz- und variierendem Antikörperüberschuss (1, 3 und 6 Äquivalente) erhalten wurden.

3.2.3.1 Ermittlung der Effizienz der kovalenten Kopplung von ^{125}I -markiertem MOC31 an die PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel

Die Kopplung mit dem ^{125}I -markierten Antikörper wurde in einem Isotopenlabor unter Befolgung der Strahlenschutzvorschriften durchgeführt. Die Aufreinigung der biokonjugierten Eisenoxid-Nanopartikel von nicht konjugiertem Antikörper erfolgte analog zu der Reinigung der nicht radioaktiv markierten Biokonjugate über eine Magnetseparationssäule (6.2.4.1). Die Reaktionslösung wurde auf die im Magnetfeld platzierte Säule aufgetragen. Nach Durchlauf dieser Lösung wurde die magnetisierte Säule mehrfach gewaschen, anschließend wurden die Eisenoxid-Nanopartikel von der entmagnetisierten Säule eluiert. In Abbildung 3.39 sind die Radioaktivität der verschiedenen Waschfraktionen, sowie die Radioaktivität der Suspension der eluierten Eisenoxid-Nanopartikel gezeigt.

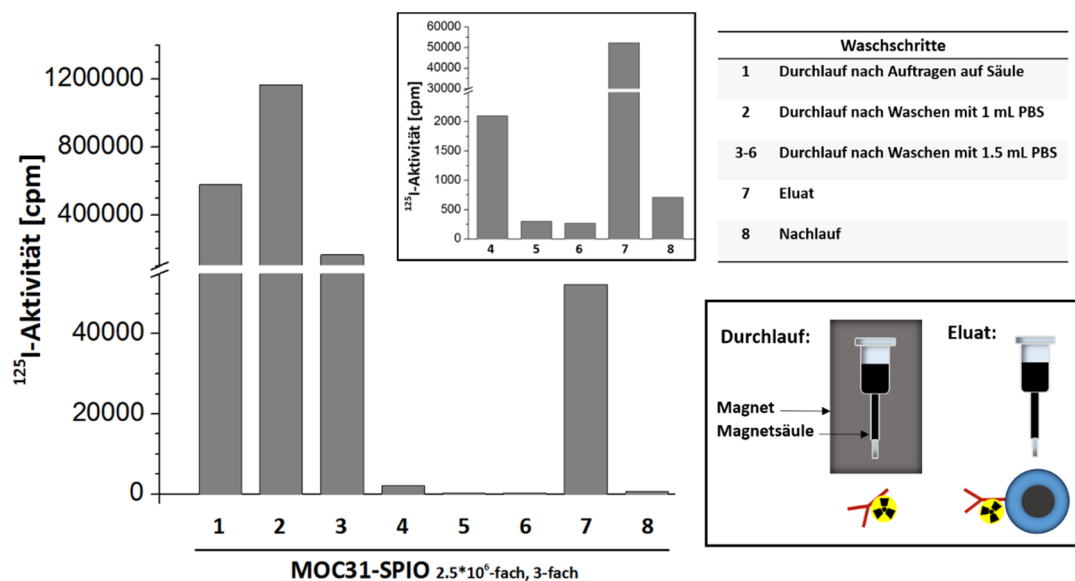


Abbildung 3.39: Ermittelte Radioaktivität im Verlauf der Aufreinigung von Eisenoxid-Nanopartikel Suspensionen nach Konjugation ^{125}I -markierter Antikörper. Gezeigt sind die Radioaktivität verschiedener Waschfraktionen sowie die Radioaktivität der von der Magnetsäule eluierten Eisenoxid-Nanopartikel. Dies ist repräsentativ am Beispiel von Konjugaten gezeigt, die bei einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenz- und bei einem 3-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden. Der Radioaktivitätsverlauf ist repräsentativ für alle Proben. Bevor die Eisenoxid-Nanopartikel eluiert werden nimmt die Radioaktivität ab. Im Eluat der Nanopartikel steigt die Radioaktivität drastisch an. Daraus wird geschlossen, dass in der Suspension der eluierten Nanopartikel keine bzw. vernachlässigbar geringe Mengen ungebundener Antikörper vorliegen.

Die höchste ^{125}I -Aktivität findet sich in den ersten drei Fraktionen, in den anschließenden Waschfraktionen (Waschschritt 4-6) ist ein sehr starker Abfall der Radioaktivität zu verzeichnen. Die gemessene Radioaktivität dieser Fraktionen (1-6) ist auf unkonjugierten Antikörper

zurückzuführen. Nanopartikel-konjugierte Antikörper eluieren erst von der entmagnetisierten Säule (7). Im Eluat der Nanopartikel (7) ist ein deutlicher Anstieg der ^{125}I -Aktivität zu beobachten. Aufgrund des geringen Radioaktivitätsgehalts der Fraktionen vor Partikelelution wird angenommen, dass im Eluat keine freien Antikörper vorhanden sind. Für die nicht gezeigten Konjugate wurde die ^{125}I -Aktivität auf analoge Weise im Verlauf der Isolierung der Nanopartikel bestimmt. Die gemessene Radioaktivität zeigt für alle Konjugate ein ähnliches Profil. Auffällig ist, dass sich der größte Anteil der ^{125}I -Aktivität in den ersten Waschfraktionen findet; nur ein Bruchteil ist in dem Eluat der Eisenoxid-Nanopartikel wiederzufinden.

Im Folgenden wird der Gehalt an Nanopartikel-konjugiertem Antikörper bestimmt. Die Quantifizierung des kovalent an die Polymerhülle der Eisenoxid-Nanopartikel gebundenen Antikörpers erfolgt über den radioaktiven Marker. Hierzu wurde die spezifische Aktivität des MOC31-Antikörpers nach Radioiodierung (^{125}I -Aktivität/ μg Antikörper) ermittelt. Aus der ermittelten ^{125}I -Aktivität der Nanopartikelsuspension kann so auf den Gehalt an konjugiertem Antikörper geschlossen werden. Dabei wird die Annahme berücksichtigt, dass kein ungebundener Antikörper vorliegt und dass die aus der gemessenen Aktivität ermittelte Antikörpermenge somit der Menge an Nanopartikel-konjugiertem Antikörper gleichgesetzt werden kann. Der Partikelgehalt der Suspension wurde über den photometrisch bestimmten Eisengehalt ermittelt. Die Kenntnis des Antikörper- sowie des Partikelgehalts ermöglicht die Bestimmung der Kopplungseffizienz. Diese wird definiert als der Anteil an konjugiertem Antikörper bezogen auf den Partikelgehalt ($n_{\text{MOC31}}/n_{\text{SPIO}} * 100\%$; n_{MOC31} : Stoffmenge an Antikörper, n_{SPIO} : Stoffmenge an Partikel). Unter der Annahme, dass ein Antikörper pro Nanopartikel bindet, entspricht die Kopplungseffizienz dem Anteil an Nanopartikeln, die einen Antikörper gebunden haben. In Tabelle 3.3 ist die ermittelte Kopplungseffizienz vergleichend für die verschiedenen Konjugate dargestellt.

Die Ergebnisse bestätigten die aus den *in vitro* MRT- und AAS-Experimenten getroffene Annahme hinsichtlich des Einflusses des Aktivierungsreagenz- sowie des Antikörperüberschusses auf die Menge an konjugiertem Antikörper. Mit zunehmenden Überschüssen wird mehr Antikörper gebunden.

Tabelle 3.3: Effizienz der Kopplungen, die bei variierenden Antikörper- und Aktivierungsreagenzüberschüssen durchgeführt wurden. Die Effizienz wird definiert als der Anteil an Nanopartikel-konjugiertem Antikörper bezogen auf den Partikelgehalt. Unter der Annahme, dass nur ein Antikörper pro Nanopartikel konjugiert wird, entspricht die Kopplungseffizienz direkt dem Anteil an Konjugaten. Mit zunehmendem Antikörper- und Aktivierungsreagenzüberschuss steigt die Kopplungseffizienz. * bezeichnet einen 3-fachen Antikörperüberschuss, ** bezeichnet einen $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss.

molare Überschuss des Aktivierungsreagenz*	Kopplungseffizienz [%]
$2 \cdot 10^6$	4.4
$2.5 \cdot 10^6$	7.8
eingesetzte Antikörperäquivalente**	Kopplungseffizienz [%]
1	3.3
3	7.8
6	15.5

Die Biokonjugate, für die in den zuvor durchgeführten *in vitro* Bindungsstudien das beste Ergebnis in Bezug auf den größten Anteil spezifisch gebundener Konjugate gefunden wurde, weisen eine Kopplungseffizienz von 7.8% auf. Diese Effizienz wurde für eine Charge MOC31-konjugierter Eisenoxid-Nanopartikel ermittelt. In einem zweiten Kopplungsansatz betrug die Kopplungseffizienz 8.5%. Die mittlere Effizienz aus diesen zwei Ansätzen beträgt demnach $\sim 8.2 \pm 0.5\%$. Unter der Annahme, dass nur ein Antikörper pro Nanopartikel konjugiert wird, würden im besten Fall gerade $\sim 16\%$ der Eisenoxid-Nanopartikel - und damit gerade jedes etwa sechste Nanopartikel - Antikörper-konjugiert vorliegen. Die Ergebnisse zeigen, dass die durchgeführte Biokonjugationsreaktion nicht sehr effizient ist. Im Folgenden wird nach möglichen Ursachen für die geringe Kopplungseffizienz gesucht. Eine mögliche Erklärung für die geringe Menge an konjugiertem Antikörper könnte eine bevorzugt stattfindende Antikörper-vermittelte Nanopartikel-Nanopartikel-Quervernetzung bieten. Die meisten Antikörper weisen mehrere reaktive Aminogruppen auf der gefalteten Oberfläche auf, über welche eine Anbindung an die aktivierten Nanopartikel erfolgen kann. Dies könnte dazu führen, dass mehrere Nanopartikel an denselben Antikörper binden. Die Antikörper-vermittelte Quervernetzung mehrerer Nanopartikel sollte im Sinne einer Aggregation der Partikel zu einer deutlichen Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers sowie gleichzeitig zu einer stark verbreiterten Größenverteilung führen. Anhand der DLS-Analytik einzelner Konjugat-Chargen konnten keine Hinweise auf eine verstärkt stattfindende Aggregatbildung gefunden werden. Weiterhin zeigten keine Konjugate Anzeichen von Sedimentation. Es ist daher auszuschließen, dass die geringe Menge an konjugiertem

Antikörper auf eine bevorzugt stattfindende Verbrückung mehrerer Nanopartikel über einen Antikörper zurückzuführen ist.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Umsatzrate könnte sein, dass für die Umsetzung mit dem Antikörper nur eine geringe Anzahl reaktiver Gruppen zur Verfügung steht. Aus den Stabilitätsuntersuchungen an den PEGylierten Partikeln wurde auf eine hohe Bedeckungsdichte geschlossen. Trotz einer hohen Bedeckung müssen aber nicht alle Hydroxylgruppen zugänglich sein. Dies kann durch die Oberflächenkrümmung der Nanopartikel begründet werden. Durch die Krümmung der Oberfläche nimmt die Packungsdichte der PEG-Ketten mit dem distalen Abstand von der Oberfläche ab und infolge könnten die PEG-Ketten mit zunehmender Distanz zur Partikeloberfläche auch als zufälliges Knäuel vorliegen.^[169,179] In dieser geknäuelten Form könnte die Zugänglichkeit der terminalen Hydroxylgruppen reduziert sein. Weiterhin ist die hohe Biorepulsivität bei hohen Bedeckungsdichten zu berücksichtigen. Die Zugänglichkeit und die Reaktivität der aktivierten Hydroxylgruppen können daher dadurch eingeschränkt sein, dass sie in einer Ligandenhülle auf Partikeln vorliegen. Ein weiterer Grund könnte die aktivierte Form der Hydroxylgruppen sein. Hierzu ist in Abbildung 3.40 eine schematische Darstellung der möglichen Produkte, die bei der Bromcyan-vermittelten Aktivierung der terminalen Hydroxylgruppen erhalten werden können, gezeigt. Die Aktivierung resultiert in der Bildung eines reaktiven Cyanatesters.^[232,235,236] Aufgrund der hohen Reaktivität des aktivierten Intermediats könnte dieses schon vor Reaktion mit dem Antikörper durch Hydrolyse zum inaktiven Carbamat (Abb. 3.40, I) deaktiviert werden.^[236,243] Durch die Pre-Hydrolyse wird die Anzahl an reaktiven Gruppen, die für die kovalente Kopplung des Antikörpers zur Verfügung stehen, reduziert. Reaktive Cyanatester können auch zur Bildung von Imidocarbonaten (II, III) führen.^[232,236,243] Imidocarbonate weisen im Vergleich zum Cyanatester eine deutlich geringere Reaktivität auf; könnten aber mit Aminogruppen des Antikörpers unter Ausbildung von z.B. *N*-substituierten Imidocarbonaten reagieren.^[232,236,243] Yavuz *et al.*^[234] koppelten Concanavalin A auf Bromcyan-aktivierten, polymeren Mikrokügelchen über Imidocarbonat-Reste bei einer Temperatur von 25 °C. Cyanatester wurden durch Aktivierung bei einem hohem pH-Wert (~ 11.5) über einen Zeitraum von 60 Minuten deaktiviert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Umsetzung mit dem Antikörper bei 4 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Es wurde nicht untersucht, ob durch Erhöhung der Reaktionstemperatur bei der Kopplung des Antikörpers eine verbesserte Kopplungseffizienz erreicht werden kann.

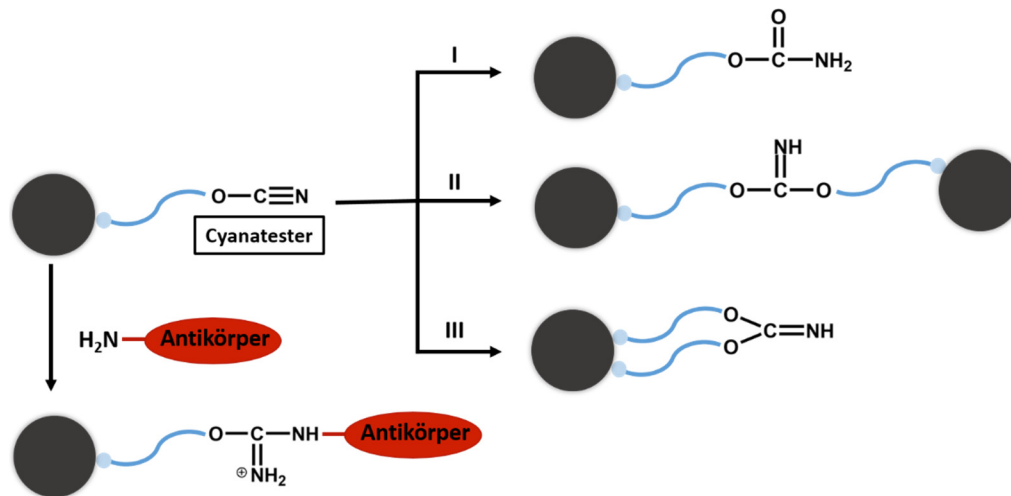


Abbildung 3.40: Schematische Darstellung möglicher Produkte bei Umsetzung terminaler Hydroxylgruppen mit Bromcyan als Aktivierungsreagenz. Als direktes Produkt im Aktivierungsschritt wird ein Cyanatester erhalten, der im anschließenden Kopplungsschritt mit freien Aminogruppen des Antikörpers unter Ausbildung einer Isoureaabbindung reagieren kann. Daneben sind weitere Reaktionen des reaktiven Cyanatesters möglich. Einerseits kann dieser durch Hydrolyse unter Bildung eines inerten Carbamats deaktiviert werden (I). Des Weiteren können durch Reaktion mit nicht aktivierten Hydroxylgruppen in der Polymerhülle eines weiteren oder desselben Partikels Imidocarbonate ((II) (interpartikulär) und III (intrapartikulär)) gebildet werden. Diese weisen im Vergleich zum Cyanatester eine deutlich reduzierte Reaktivität auf. Prinzipiell könnten Imidocarbonate mit freien Aminogruppen des Antikörpers im Kopplungsschritt umgesetzt werden. Abbildung modifiziert nach^[236]

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *in vitro* Bindungsstudien mit den ¹²⁵Iod-markierten Biokonjugaten gezeigt. Es wurde ein möglicher Einfluss der im Zellexperiment eingesetzten Partikelmenge auf den Gehalt spezifisch gebundener Konjugate untersucht. Weiterhin wurde untersucht ob und wie sich die Anbindung an die Partikeloberfläche auf die biologische Aktivität des Antikörpers auswirkt.

3.2.3.2 *In vitro* Untersuchung der biologischen Aktivität Nanopartikel-konjugierter, ¹²⁵Iod-markierter MOC31-Antikörper

Der Gehalt an Nanopartikeln, die spezifisch an EpCAM binden, ist bestimmt durch den Anteil an Nanopartikeln, die Antikörper-konjugiert vorliegen und durch den Anteil an Nanopartikel-konjugierten Antikörpern, die nach Anbindung an die Partikeloberfläche ihre biologische Aktivität behalten.

Bevor die Ergebnisse zur Untersuchung der biologischen Aktivität dargestellt werden, wird zunächst kurz auf die Ergebnisse der Untersuchung eines möglichen Einflusses der im Zellexperiment eingesetzten Partikelmenge auf den Gehalt an spezifisch gebundenen Konjugaten

eingegangen. Ein geringer Anteil spezifisch gebundener Konjugate könnte dadurch bedingt sein, dass bei der eingesetzten Partikelmenge die maximale Bindungskapazität der Zellen bereits erreicht ist. Abbildung 3.41 zeigt schematisch die Bindung der Konjugate an EpCAM als Funktion der im Zellexperiment eingesetzten Nanopartikelmenge (MOC31-SPIO). Sind alle spezifischen Bindungsstellen durch die Konjugate abgesättigt, stellt sich ein Plateau ein. Trotz weiterer Erhöhung der eingesetzten Nanopartikelmenge kann der Gehalt an spezifisch gebundenen Konjugaten nicht weiter zunehmen.

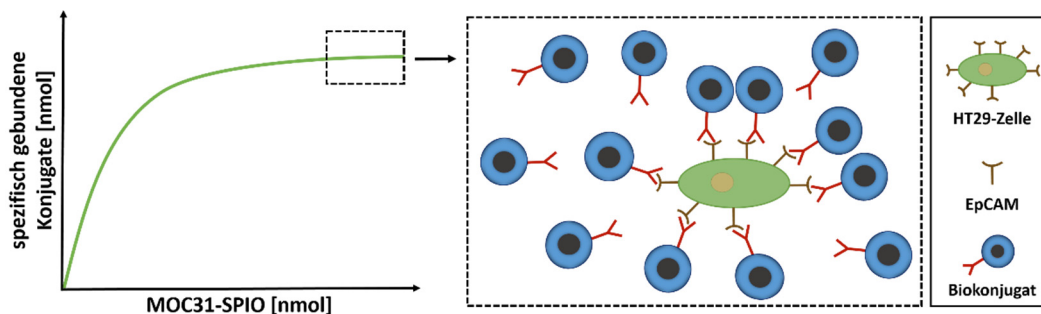


Abbildung 3.41: Schematische Darstellung der spezifisch an die Oberfläche EpCAM-positiver Zellen gebundenen Biokonjugate als Funktion der eingesetzten Menge an Eisenoxid-Nanopartikeln. Steigt die Menge an im Zellexperiment eingesetzten Eisenoxid-Nanopartikeln (MOC31-SPIO) bei gleichbleibender Zellzahl, nimmt der Anteil der an EpCAM gebundenen, und damit spezifisch gebundenen Konjugate zunächst stetig zu. Sind alle EpCAM-Bindungsstellen durch die Konjugate abgesättigt, stellt sich ein Plateau ein. Trotz weiterer Erhöhung der eingesetzten Nanopartikelmenge bleibt der Gehalt an spezifisch gebundenen Konjugaten unverändert. Vereinfacht sind nur bindungsaktive Biokonjugate gezeigt.

Unter Berücksichtigung der Daten von de Jonge *et al.*^[155] (siehe 3.2.2.2) würde die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Zellzahl $6 \cdot 10^{12}$ Bindungsstellen (0.01 nmol) entsprechen. Die im Rahmen der *in vitro* AAS-Experimente eingesetzte Menge an Nanopartikeln (~ 0.0033 nmol) sollte daher nicht dazu ausreichen alle spezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Unter Umständen sind aber weitere Parameter, wie die Zugänglichkeit der Bindungsstellen mit zunehmender Bedeckung der Zelloberfläche mit Nanopartikeln, zu berücksichtigen.

Um zu untersuchen, ob die maximale Bindungskapazität der Zellen bereits erreicht wurde, wurden Bindungsstudien bei unterschiedlichen Konzentrationen der Nanopartikel-konjugierten Antikörper durchgeführt. Die Bindungsstudien erfolgten mit unblockierten HT29- und ebenfalls unblockierten HT29EpCAMkd-Zellen. Die Menge an Nanopartikel-konjugierten, 125 Iod-markierten Antikörpern auf der Zelloberfläche wird aus der 125 Iod-Aktivität ermittelt. Die Differenz der Menge an Nanopartikel-konjugierten Antikörpern auf den HT29- und HT29EpCAMkd-Zellen entspricht der Menge an EpCAM-gebundenen Nanopartikel-konjugierten

Antikörpern. Für die Konjugate, die mit einem äquimolaren Einsatz an ^{125}I -markiertem Antikörper und einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss synthetisiert wurden, konnte bei Erhöhung der im Zellexperiment eingesetzten Antikörpermenge von ~ 85 fmol auf ~ 200 fmol eine Zunahme der Menge an spezifisch gebundenen, Nanopartikel-konjugierten Antikörpern von ~ 6 fmol auf ~ 14 fmol beobachtet werden. In dem untersuchten Konzentrationsbereich kann ein stetiger Anstieg der EpCAM-gebundenen Antikörper bei steigender eingesetzter Menge an konjugierten Antikörpern beobachtet werden. Der Untersuchungsbereich deckt die im Rahmen der *in vitro* AAS-Experimente eingesetzte Menge an Nanopartikeln (~ 3250 fmol) ab. 200 fmol Nanopartikel-konjugierter Antikörper entsprechen ~ 6000 fmol Nanopartikel (siehe Tabelle 3.3). Daher ist auszuschließen, dass der mittels AAS-Analytik ermittelte Anteil spezifisch gebundener Konjugate auf eine Absättigung der EpCAM-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Die Ergebnisse hinsichtlich der Bindungskapazität der HT29-Zellen konnten mit anderen Konjugaten bestätigt werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Untersuchung der biologischen Aktivität des Antikörpers nach Anbindung an die Partikeloberfläche diskutiert. Für die Konjugate, die bei einem 3-fachen Antikörper- und einem $2 \cdot 10^6$ -fach Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten wurden, erfolgten die Bindungsstudien nur bei einer Antikörpermenge. Für die anderen Konjugate wurden unterschiedliche Antikörpermengen im Zellexperiment eingesetzt. In Abbildung 3.42 ist für verschiedene Konjugate der prozentuale Anteil an biologisch aktiven Nanopartikel-konjugierten Antikörpern gezeigt. Biologisch aktiv sind die Nanopartikel-konjugierten Antikörper, die spezifisch über EpCAM an die Zelloberfläche binden.

Unabhängig von den untersuchten Variationen der Überschüsse liegt der Anteil an biologisch aktiven Nanopartikel-konjugierten Antikörpern in einem vergleichbaren Bereich. Einzige Ausnahme sind die Konjugate, die bei einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden. Bei diesen liegt der Anteil an Antikörpern, die nach Anbindung an die Partikeloberfläche biologisch aktiv sind, bei gerade $\sim 2\%$. Eine mögliche Erklärung für die geringere biologische Aktivität könnte eine mit zunehmendem Antikörperüberschuss vermehrt erfolgende Anbindung mehrerer Antikörper an dasselbe Partikel bieten. In Abhängigkeit der Orientierung der Antikörper zueinander könnte dies zu einer gegenseitigen Blockierung der Antigenbindungsstellen und infolge zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an EpCAM führen. Durch Vorlegen der Antikörperlösung und die schnelle Zugabe des größeren Volumens der aktivierten Partikel sollte

bereits durch die Partikelzugabe eine starke Durchmischung erreicht werden können. Die Beobachtung weist darauf hin, dass eine rein statistische Betrachtung die Reaktion zwischen Nanopartikel und Antikörper nicht ausreichend beschreibt, sondern dass veränderte Reaktivitäten der Antikörper-konjugierten Nanopartikel gegenüber unkonjugierten Nanopartikeln berücksichtigt werden müssen.

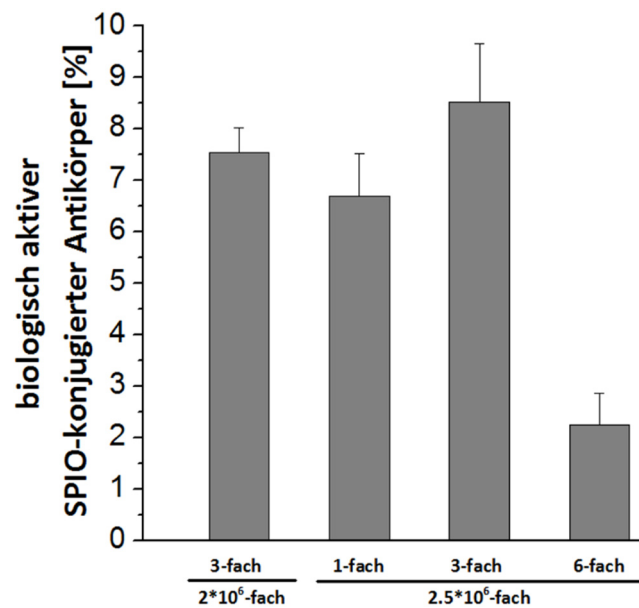


Abbildung 3.42: Analytik der biologischen Aktivität ^{125}I -markierter Antikörper nach Anbindung an Eisenoxid-Nanopartikel. Mit Ausnahme von den Konjugaten, die bei einem 6-fachen Antikörper- und einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten wurden, liegt der Anteil an biologisch aktiven Nanopartikel-konjugierten Antikörpern in einem vergleichbaren Bereich zwischen ~6% und ~9%. Bei einem 6-fachen Antikörperüberschuss nimmt die biologische Aktivität im Vergleich drastisch ab. Der Anteil biologisch aktiver Partikel-konjugierter Antikörper liegt nur noch bei ~2%. Die %-Angabe bezieht sich auf die im Zellexperiment zugesetzte Antikörpermenge. Diese lag bei ~85 fmol, ~200 fmol oder ~400 fmol. Der Anteil biologisch aktiver, Partikel-konjugierter Antikörper wurde aus der Differenz der Mittelwerte der an die HT29- und HT29EpCAMkd-Zellen gebundenen, prozentualen Anteile an Nanopartikel-konjugierten Antikörpern ermittelt. Die Mittelwerte wurden aus jeweils mindestens drei Zellexperimenten erhalten, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$. Für alle Konjugate unterscheiden sich die für die HT29- und HT29EpCAMkd-Zellen erhaltenen Werte signifikant.

Aufgrund der vergleichbaren biologischen Aktivität der Nanopartikel-konjugierten Antikörper - mit Ausnahme der Konjugate, die bei einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden - sind die in den *in vitro* AAS-Experimenten ermittelten Unterschiede in dem Gehalt spezifisch gebundener Konjugate wahrscheinlich vor allem auf die Unterschiede in der Menge an Antikörper-konjugierten Nanopartikeln zurückzuführen (Tabelle 3.3). Der im Vergleich höhere Aktivitätsverlust der Nanopartikel-konjugierten Antikörper, die bei einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden, scheint eine Erklärung für die geringe Menge an spezifisch gebundenen Konjugaten trotz hoher Kopplungseffizienz zu sein. Die Ergebnisse zur Unter-

suchung der biologischen Aktivität sind im Einklang mit den im Rahmen der *in vitro* AAS-Experimente getroffenen Vermutungen.

Mittels Radiomarkierung konnte die biologische Aktivität der Antikörper nach Anbindung an die Partikeloberfläche ermittelt werden. Werden Bindungsstudien mit ¹²⁵Iod-markierten, unkonjugierten MOC31-Antikörpern durchgeführt, wird eine Bindung von ~ 75% der zugesetzten Antikörper an HT29-Zellen beobachtet. Unter optimalen Bedingungen binden gerade ~ 9% der im Zellexperiment eingesetzten Nanopartikel-konjugierten Antikörper an EpCAM. Im Folgenden wird auf mögliche Ursachen für die reduzierte Bindungsfähigkeit eingegangen.

Die biologische Aktivität kann dadurch reduziert sein, dass die Antikörper direkt auf der polymeren Oberfläche der Nanopartikel gebunden werden. Werden z.B. Methoxy-terminierte und damit unreaktive Polyethylenglykol-Liganden zur Stabilisierung der Nanopartikel und länger-kettige PEG-Polymere mit funktioneller Endgruppe für die Biokonjugation verwendet, könnte der Antikörper aus der stabilisierenden Polymerhülle herausragen. Dies könnte die Wahrscheinlichkeit verringern, dass die biologische Aktivität durch sterische Hinderung reduziert wird. In gemischten Ligandenhüllen würde die Anzahl der für die Kopplungsreaktion verfügbaren aktivierten Gruppen allerdings weiter reduziert werden. Dies könnte sich daher auf die Kopplungseffizienz auswirken. Die Reaktion von Proteinen erfordert milde Bedingungen in wässrigem Medium um eine Denaturierung zu vermeiden. Daher ist eine kovalente Anbindung des Antikörpers an das Polymer und ein anschließender Phasentransfer der Ölsäure-stabilisierten Nanopartikel durch Ligandenaustausch - mit kürzeren, stabilisierenden und längeren, Antikörper-funktionalisierten PEG-Liganden - schwierig.

Eine entscheidende Rolle bei der reduzierten biologischen Aktivität spielt sicherlich der Umstand, dass der Anbindungspunkt zwischen Antikörper und polymerumhüllten Partikel durch die durchgeführte Bromcyan-vermittelte Kopplungsreaktion nicht gesteuert werden kann. Die Kopplungsstrategie nutzt das Vorhandensein mehrerer freier Aminogruppen auf der Oberfläche des Antikörpers. Der Vorteil hiervon ist, dass der Antikörper vor der Kopplungsreaktion zur Einführung kopplungsfähiger Gruppen nicht modifiziert werden muss. Der beobachtete Aktivitätsverlust deutet allerdings darauf hin, dass in hohem Maße Aminogruppen in der Antigenbindungsregion an der Kopplung beteiligt sind. Um bei unveränderter Kopplungsstrategie die Bindungseigenschaften der Biokonjugate zu verbessern, könnten die aktiven Zentren im Vorfeld der Kopplungsreaktion blockiert werden. Ein möglicher Einfluss dieser Blockierung auf

die biologische Aktivität der Nanopartikel-konjugierten Antikörper konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da ein festphasengebundenes Antigen nicht verfügbar ist.

Durch Bindungsstudien mit Nanopartikel-konjugierten, ¹²⁵Iod-markierten Antikörpern konnte gezeigt werden, dass eine Kopplungsstrategie ohne Kontrolle über den Anbindungspunkt des Antikörpers an die Partikeloberfläche, zu einer drastischen Verringerung der biologischen Aktivität führt. Optimale Biokonjugationsreaktionen involvieren die Befestigung über die Fc-Region während die Antigenbindungsstellen in Richtung des umgebenden Mediums orientiert und somit zugänglich für die Bindung an das komplementäre Antigen sind.^[7] Antikörper, welche in der Fc-Region glykosyliert sind, können über die Kohlenhydrat-Einheit an die Polymerhülle der Nanopartikel gebunden werden.^[21,135,136,244] Diese Kopplungsstrategie setzt die Modifizierung der Kohlenhydrat-Einheit zur Erzeugung kopplungsfähiger Gruppen voraus. Joshi *et al.*^[244] konnten erfolgreich glykosylierte Antikörper über die Fc-Region an die Oberfläche PEGylierter Gold-Nanorods koppeln. Vergleichende Untersuchungen zur Kopplungseffizienz und zur biologischen Aktivität Nanopartikel-konjugierter Antikörper unter Anwendung weiterer Kopplungsstrategien konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die Menge an Nanopartikel-konjugierten, ¹²⁵Iod-markierten Antikörpern, die über EpCAM an die Zelloberfläche binden, wird über die Detektion der radioaktiven Strahlung ermittelt. Somit könnten auch radioaktiv-markierte Antikörper detektiert werden, die evtl. gar nicht biologisch aktiv sind, aber mit einem biologisch aktiven Antikörper an dasselbe Nanopartikel konjugiert vorliegen. Mittels AAS-Analytik wurden die Eisenoxid-Nanopartikel quantifiziert. Durch die Experimente nach Radiomarkierung des Antikörpers konnten die Nanopartikel-konjugierten, ¹²⁵Iod-markierten Antikörper quantifiziert werden. Durch Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen analytischen Methoden könnten Aussagen über die Zusammensetzung der bindungsaktiven Biokonjugate ermöglicht werden. Hierzu wurde zunächst die Annahme gemacht, dass bindungsaktive Biokonjugate aus genau einem Antikörper und einem Nanopartikel bestehen. Die Menge an spezifisch gebundenen Nanopartikeln (AAS), sowie die Menge an biologisch aktiven Nanopartikel-konjugierten Antikörpern (¹²⁵Iod-Markierung) entspricht damit direkt der Menge an bindungsaktiven Konjugaten. In Abbildung 3.43 ist der prozentuale Anteil spezifisch gebundener Konjugate dargestellt. Für die AAS-Experimente und für die Experimente

nach Radiomarkierung des MOC31-Antikörpers wurden verschiedene Chargen von Biokonjugaten verwendet.

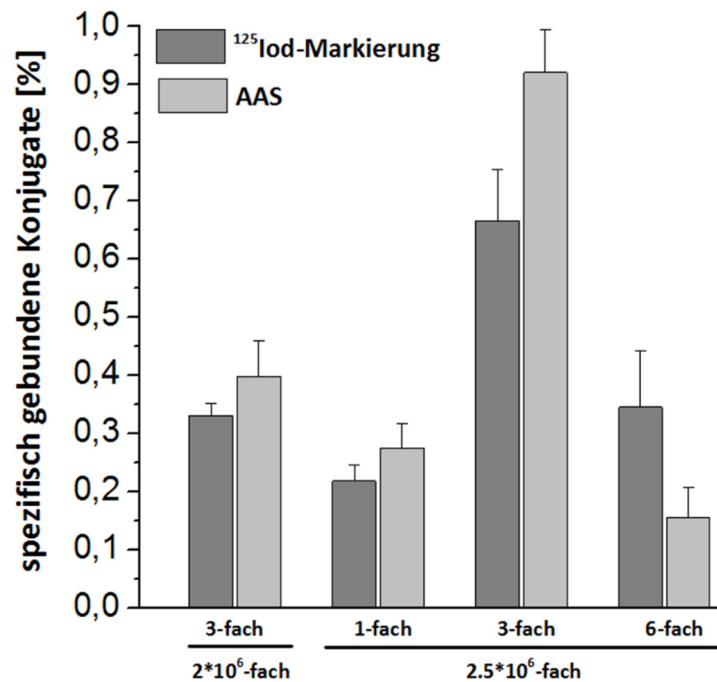


Abbildung 3.43: Vergleich verschiedener analytischer Methoden zur Bestimmung der spezifischen Bindungsfähigkeit von Eisenoxid-Nanopartikeln nach Kopplung an MOC31. Um aus der Eisenquantifizierung und der Messung der Radioaktivität den Anteil spezifisch gebundener Konjugate zu ermitteln, wurde die Annahme gemacht, dass bindungsaktive Konjugate aus genau einem Eisenoxid-Nanopartikel und einem Antikörper bestehen. Mit Ausnahme von den Konjugaten, die bei einem 6-fachen Antikörper- und einem 2,5*10⁶-fachen Aktivierungsreagenzüberschuss erhalten wurden, zeigt sich der Trend, dass der durch Radioiodierung ermittelte Anteil an spezifisch gebundenen Konjugaten kleiner ist (im Mittel ~ 25%). Die verschiedenen analytischen Methoden liefern aber vergleichbare Ergebnisse. Dies deutet darauf hin, dass die im Vorfeld getroffene Annahme für diese Konjugate zutreffend ist. Für die Konjugate, die bei einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden, zeigt sich ein anderer Trend. Der durch Radioiodierung ermittelte Anteil an spezifisch gebundenen Konjugaten ist größer. Dies deutet darauf hin, dass in bindungsaktiven Konjugaten mehr als ein Antikörper pro Nanopartikel konjugiert vorliegt. Es ist die Differenz aus Mittelwerten von jeweils mindestens drei Zellexperimenten gezeigt, Mittelwert +/- s.e.m. mit $n \geq 3$. Die %-Angabe bezieht sich auf die im Zellexperiment zugesetzte Antikörper- bzw. Nanopartikelmenge.

Werden die Ergebnisse für die Konjugate, die mit einem 2,5*10⁶-fachen Aktivierungs- und einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden, zunächst nicht in die vergleichende Betrachtung der analytischen Methoden einbezogen, zeigt sich, dass beide unabhängigen Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Dies deutet darauf hin, dass die im Vorfeld getroffene Annahme für die betrachteten Konjugate zutreffend ist. Der geringe Unterschied zwischen den verschiedenen analytischen Methoden - im Vergleich ist der durch Radioiodierung des Antikörpers bestimmte Wert im Mittel um ~ 25% kleiner - kann verschiedene Ursachen haben. Zunächst ist zu berücksichtigen, dass mittels analytischer Eisenbestimmung und Radiomarkierung

verschiedene Chargen von Biokonjugaten auf ihre spezifische Bindungsfähigkeit hin untersucht wurden. Weiterhin könnte die Verwendung von unblockierten HT29EpCAMkd-Zellen anstelle von blockierten HT29-Zellen dazu beitragen, dass ein kleinerer Gehalt an spezifisch gebundenen Konjugaten ermittelt wird. Überdies könnten die Unterschiede auch durch eine bereits durch die Iodierung erfolgte, geringfügige Reduzierung der biologischen Aktivität des Antikörpers bedingt sein.

Werden die Ergebnisse für die Konjugate, die mit einem 6-fachen Antikörperüberschuss synthetisiert wurden, betrachtet, kann für die verschiedenen analytischen Methoden ein anderer Trend beobachtet werden. In diesem Fall ist der durch Radioiodierung des Antikörpers ermittelte Anteil an spezifisch gebundenen Konjugaten deutlich größer. Dies deutet darauf hin, dass bindungsaktive Konjugate aus mehr als einem Antikörper pro Nanopartikel bestehen. Wird die Annahme gemacht, dass zwei Antikörper - von denen mindestens einer biologisch aktiv ist - an ein Nanopartikel konjugiert vorliegen, zeigen die beiden unabhängigen Methoden vergleichbare Werte (AAS: 0.16 +/- 0.052% ¹²⁵Iod-Markierung: 0.17 +/- 0.048%). Dies kommt dem Trend näher, der für die anderen Konjugate beobachtet wurde. Die Ergebnisse bestätigen die aus der reduzierten biologischen Aktivität getroffene Annahme bezüglich der Zusammensetzung dieser Biokonjugate. Mit zunehmendem Antikörperüberschuss werden mehrere Antikörper an ein Nanopartikel gebunden.

Durch die Radiomarkierung des Antikörpers mit ¹²⁵Iod konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Antikörper- und Aktivierungsreagenzüberschuss mehr Antikörper gebunden wird. Für die Konjugate, die bei einem 2.5*10⁶-fachen Aktivierungs- und einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden, scheint eine Anbindung mehrerer Antikörper an dasselbe Partikel zu erfolgen. Der Anteil an Nanopartikel-konjugierten Antikörpern kann daher nicht dem Anteil an Biokonjugaten gleichgesetzt werden. Weiterhin war es mit Hilfe der Radioiodierung möglich die biologische Aktivität der Nanopartikel-konjugierten, ¹²⁵Iod-markierten Antikörper in *in vitro* Versuchen zu prüfen. Mit Ausnahme von den Konjugaten, die bei einem 2.5*10⁶-fachen Aktivierungs- und einem 6-fachen Antikörperüberschuss erhalten wurden, liegt der Anteil an biologisch aktiven Partikel-konjugierten Antikörpern unabhängig von den eingesetzten Überschüssen in einem vergleichbaren Bereich zwischen gerade ~ 6% und ~ 9%. Bei einem 6-fachen Antikörperüberschuss nimmt die biologische Aktivität im Vergleich drastisch ab. Bei diesen Konjugaten muss in Hinblick auf die Ergebnisse der im Vorfeld gezeigten Korrelation zusätzlich

berücksichtigt werden, dass der Anteil an biologisch aktiven Antikörpern kleiner als der ermittelte Wert von ~ 2% sein kann.

Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Biofunktionalisierung der polymerumhüllten Eisenoxid-Nanopartikel mit dem anti-EpCAM Antikörper MOC31 konnte in *in vitro* Untersuchungen eine spezifische Markierung EpCAM hoch exprimierender HT29-Zellen erreicht werden. Unter optimalen Bedingungen binden aber gerade ~ 0.9% der im Zellexperiment eingesetzten Nanopartikel spezifisch an EpCAM. Eine deutliche Steigerung der Antikörpervermittelten Bindung der Nanopartikel an die Zielzellen ist vor allem in Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung unerlässlich. *In vivo* müssen neben der Kopplungseffizienz und der biologischen Aktivität der Biomoleküle zahlreiche weitere Einflussfaktoren berücksichtigt werden, die die Effizienz der spezifischen Markierung beeinflussen. Wilhelm *et al.*^[245] konnten in einem umfassenden Vergleich verschiedener Literaturdaten zeigen, dass die Effizienz der spezifischen Markierung von soliden Tumoren durch nanopartikuläre Biokonjugate *in vivo* im Mittel gerade bei ~ 0.6% liegt.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Synthese lang-zirkulierender Eisenoxid-Nanopartikel sowie deren Modifizierung mit einem monoklonalen anti-EpCAM Antikörper untersucht. Diese Partikel könnten vielversprechende Kandidaten für die gezielte *in vivo* Detektion verschiedener EpCAM hoch exprimierender Tumorentitäten darstellen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Herstellung sowie umfassende Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel vorgestellt.

Durch die thermische Zersetzung eines Metallprecursors in Gegenwart von Ölsäure als Stabilisator konnten Eisenoxid-Nanopartikel mit hoher Qualität hinsichtlich Monodispersität, Uniformität sowie Kristallinität erhalten werden. Die Nanopartikel sind aufgrund der Synthesebedingungen durch eine stabilisierende Ölsäureschicht bedeckt. Im nächsten Schritt wurde die Partikeloberfläche durch Ligandenaustausch mit einem maßgeschneiderten Polyethylenglykol-Liganden modifiziert. Der heterobifunktionelle Ligand konnte durch Endgruppenfunktionalisierung hergestellt werden. Es wurde gezeigt, dass der Ligandenaustausch unter Erhalt einer engen Teilchengrößenverteilung und somit unter Verhinderung von Aggregation der Nanopartikel durchgeführt werden konnte.

In umfangreichen Untersuchungen konnte das Potential der so erhaltenen PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel für biomedizinische Anwendungen demonstriert werden. In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die PEG-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel über einen physiologisch relevanten Konzentrationsbereich keine akute zytotoxische Wirkung zeigen. Weiterhin konnte die hohe kolloidale Stabilität der PEGylierten Partikel unter physiologischen Bedingungen demonstriert werden. Die Partikel weisen eine hohe Stabilität gegen Verdünnung auf und sind über einen breiten pH-Bereich, sowie bei einer im Blutserum gegebenen Ionenstärke stabil. Durch Inkubation in FCS wurde gezeigt, dass eine Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche nicht vollständig verhindert werden kann; die Partikel weisen aber eine hohe Stabilität gegen eine Protein-induzierte Aggregation auf. Die hohe kolloidale Stabilität sowie die Biorepulsivität konnten auch in abschließenden *in vivo* MRT-Untersuchungen zur Blutzirkulation im Tiermodell demonstriert werden. Die Partikel weisen eine lange vaskuläre Zirkulationszeit auf;

nach intravenöser Partikelapplikation blieb die Signalintensität im Blut über den untersuchten Zeitraum von 24 Minuten nahezu konstant.

Im zweiten Teil wurde die Biofunktionalisierbarkeit der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel mit dem anti-EpCAM Antikörper MOC31 untersucht.

Die Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM wurde in *in vitro* Experimenten mit einer EpCAM hoch exprimierenden, humanen Kolonkarzinomzelllinie (HT29) untersucht. Im Rahmen dieser Experimente konnte durch Untersuchung des Einflusses der Blockierung von EpCAM-Bindungsstellen eine spezifische Bindung der Konjugate gezeigt werden. In Experimenten mit einer *knockdown* Kolonkarzinomzelllinie (HT29EpCAMkd) konnte ein Einfluss des EpCAM-Levels auf die spezifische Bindung demonstriert werden. Dies belegt zusätzlich die Spezifität der Biokonjugate für EpCAM.

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften wurden verschiedene analytische Methoden eingesetzt. Die Anwesenheit der Nanopartikel auf der Zelloberfläche konnte erfolgreich mittels MRT-Analytik nachgewiesen werden. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Atomabsorptionsspektroskopie eine geeignete Methode für die *in vitro* Detektion und Quantifizierung von Zelloberflächen-gebundenen, Eisen-basierten Nanopartikeln darstellt. Durch eine der kovalenten Anbindung an die Nanopartikel vorangehende Radioiodierung des Antikörpers war eine quantitative Erfassung der Nanopartikel-konjugierten Antikörper trotz der geringen Ansatzgrößen der Kopplungsreaktionen möglich. Weiterhin konnte auf diese Weise die biologische Aktivität des MOC31-Antikörpers nach kovalenter Anbindung an die Polymerhülle der Nanopartikel überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Syntheseparameter Aktivierungsreagenz- und Antikörpermenge auf die Bindungsfähigkeit der Biokonjugate an EpCAM untersucht. Zwischen den verschiedenen Konjugaten konnten Unterschiede nachgewiesen werden. Der höchste Anteil an Biokonjugaten, die spezifisch an EpCAM binden, wurde für die Kopplungsprodukte erhalten, bei denen das Aktivierungsreagenz in einem $2.5 \cdot 10^6$ -fachen und der Antikörper in einem 3-fachen Überschuss eingesetzt wurden. Mittels AAS-Analytik konnte gezeigt werden, dass unter diesen optimalen Bedingungen $\sim 0.9\%$ der im Zellexperiment eingesetzten Partikel spezifisch an EpCAM binden. Durch Radioiodierung konnte für diese Konjugate eine Kopplungseffizienz von $\sim 8\%$ sowie ein prozentualer Anteil an biologisch aktiven Nanopartikel-konjugierten Antikörpern von

~ 9% ermittelt werden. Durch Erhöhung des Antikörperüberschusses konnte zwar die Kopplungseffizienz gesteigert werden (~ 16%); allerdings scheint eine Anbindung mehrerer Antikörper an dasselbe Partikel zu erfolgen. Gleichzeitig nimmt der Anteil biologisch aktiver Nanopartikel-konjugierter Antikörper drastisch ab (~ 2%). Mittels AAS-Analytik wurde gezeigt, dass nur ~ 0.16% der im Zellexperiment zugesetzten Partikel spezifisch an EpCAM binden. Durch die Kombination der AAS-Analytik mit der Radiomarkierung des Antikörpers konnte eine umfassende Charakterisierung der Biokonjugate erreicht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel weisen ein hohes Potential für biomedizinische Anwendungen auf. Die Ergebnisse der Biofunktionalisierung zeigen, dass eine spezifische Markierung von EpCAM hoch exprimierenden Karzinomzellen mit Eisenoxid-Nanopartikeln über MOC31 möglich ist. Eine Optimierung in Hinblick auf das Ausmaß dieser spezifischen Bindung ist jedoch erforderlich.

5 Abstract

The focus of this work was the synthesis of long-circulating iron oxide nanoparticles as well as their modification with a monoclonal anti-EpCAM antibody. These particles could be promising candidates for the targeted *in vivo* detection of a variety of different tumor entities with EpCAM overexpression.

In the first chapter of the thesis, iron oxide nanoparticle production and detailed characterization were presented.

The thermal decomposition of a metal precursor in the presence of oleic acid yielded iron oxide nanoparticles with high monodispersity, shape uniformity as well as crystallinity. Due to synthesis conditions, the particles are coated with a stabilizing layer of oleic acid. In the next step the particle surface was modified with a tailor-made polyethylene glycol ligand using a ligand exchange method. The synthesis of the heterobifunctional ligand was achieved by end-group modification. The ligand exchange could be successfully performed: A narrow size distribution and therefore the prevention of particle aggregation were ascertained.

The potential of the PEGylated particles for biomedical applications could be demonstrated by detailed investigations. In *in vitro* cytotoxicity assays, no acute toxicity of the PEG-coated particles was observed at relevant physiological concentrations. Furthermore, the high colloidal stability of the PEGylated particles under physiological conditions was shown. The particles exhibit excellent stability in high dilution, over a large pH-range and at physiological ionic strength. When incubating the particles with FCS, the results demonstrated that protein adsorption to the particle surface could not be completely prevented; but the particles show a high stability against protein-induced aggregation. In order to investigate the blood circulation time living animal dynamic MRI was employed. The particles are characterized by a long circulation time; after intravenous application of the particles, the signal intensity in the blood remained nearly unchanged over the probed time span of 24 minutes. The MRI measurements confirmed the high colloidal stability and bio-repulsion.

In the second chapter, the biofunctionalization of the PEGylated iron oxide nanoparticles with the anti-EpCAM antibody MOC31 was investigated.

The binding of the bioconjugates to EpCAM was tested in *in vitro* experiments with the human colon cancer cell line HT29 that highly expresses EpCAM. Blockage of the EpCAM binding sites was used to investigate specific binding. For the conjugates, a specific antigen binding could be demonstrated. In experiments with a *knockdown* colon cancer cell line (HT29EpCAMkd) the influence of the EpCAM protein level on specific binding was shown. Furthermore, these observations proved the specificity of the conjugates for EpCAM.

The binding properties were investigated by different analytical methods. MRI studies could be successfully used to verify the presence of the particles on the cell surface. Additionally, it was possible to show that the atom absorption spectroscopy is suitable for *in vitro* detection and quantification of iron-based nanoparticles bound to cell surface. Radio-labeling of the antibody before conjugation allowed quantitative analysis of nanoparticle-conjugated antibodies despite the small batch sizes. Furthermore, through the use of the radioactive label it was possible to verify the biological activity of the antibody after the coupling.

The effect of the excess of activating agent and antibody on the binding properties of the conjugates was investigated: Different conjugation conditions resulted in differences in the specific binding capacity. Among our experiments, the highest degree of specific binding to EpCAM was obtained with a $2.5 \cdot 10^6$ -fold excess of activating agent and a 3-fold excess of antibody. For these conjugates AAS-analysis revealed a specific binding efficiency of $\sim 0.9\%$. Through radioactive iodination the coupling efficiency was determined to be $\sim 8\%$ and the percentage of nanoparticle-conjugated antibodies that preserved their biological activity was determined to be $\sim 9\%$. Increasing the excess of antibody, the coupling efficiency could be improved ($\sim 16\%$); however, it seems that these bioconjugates are composed of more than one antibody per nanoparticle. Simultaneously the percentage of antibodies with preservation of their biological activity was significantly reduced ($\sim 2\%$). AAS-analysis revealed a specific binding efficiency of just $\sim 0.16\%$. The combination of AAS-analysis with the radio-labeling of the antibody allowed a detailed characterization of the bioconjugates.

The PEGylated iron oxide nanoparticles are promising candidates for biomedical applications. The results of the bioconjugation demonstrated that specific particle labeling of cells with EpCAM overexpression is possible through MOC31. Nevertheless, a significant improvement in efficiency of specific binding is necessary.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Grüssing, Merck, Sigma Aldrich und VWR bezogen. Die im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) sowie die im Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN GmbH) verwendeten Medien und Lösungen für die Zellkulturexperimente stammen, sofern nicht anders erwähnt, von Thermo Fisher Scientific Inc. und Lonza. Es wurde Reinstwasser (18.2 M Ω) aus einer Milli-Q-Reference A+ Anlage mit einem Millipak-20 Express (0.22 μ m) Membranfilter (Millipore GmbH) verwendet.

6.2 Durchgeführte Synthesen

6.2.1 Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel

Die Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte in einer organischen Hochtemperatursynthese nach einem abgewandelten Protokoll von Yu *et al.*^[157]

0.62 g (7.0 mmol) fein gemörsertes Eisen(III)oxidhydroxid wurden mit 8.2 g (29 mmol) Ölsäure und 50 mL 1-Octadecen in einem 100 mL Dreihalskolben vorgelegt. Der Kolben wurde mit einem Septum, einem Temperaturfühler sowie einem Rückflusskühler versehen, und über den Kühler mit einer Schlenkapparatur verbunden. Der Reaktionsansatz wurde unter Stickstoffatmosphäre für 90 Minuten auf 220 °C erhitzt, und nach Abkühlen auf 100 °C für ebenfalls 90 Minuten bei dieser Temperatur konditioniert. Dieser Vorgang wurde analog wiederholt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter Stickstoffatmosphäre für weitere 60 Minuten bei 220 °C gerührt und direkt im Anschluss für 80 Minuten bei 320 °C zum Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde unter Rühren das Abkühlen der Lösung auf 100 °C abgewartet. Bei dieser Temperatur erfolgte die Injektion von ~ 20 mL Toluol um ein Festwerden der Reaktionslösung bei Raumtemperatur zu verhindern. Um die Nanopartikel aus dem Reaktionsmedium zu isolieren wurde dieses nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit Ethanol als Fällungsreagenz bis zu einer einsetzenden

Trübung versetzt und anschließend zentrifugiert (3260 g, 10 min). Der klare, leicht gelbliche Überstand wurde verworfen. Nach der Aufnahme des dunkelbraunen Fällungsprodukts in Chloroform erfolgte eine weitere Fällung durch Zusatz von Aceton, gefolgt von Zentrifugation (3260 g, 10 min). Resuspension und Fällung wurden analog ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das gereinigte Produkt in Chloroform resuspendiert und als kolloidale Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

6.2.2 Synthese heterobifunktioneller Polyethylenglykol-Liganden

6.2.2.1 Veresterung von Polyethylenglykol-Monoacrylat mit Phosphoroxychlorid

Die Synthese des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers erfolgte angelehnt an die Vorschrift von White *et al.*^[177] mit mehreren Modifikationen.

Zur Phosphatesterbildung wurden 9.7 g (~ 9.7 mmol) kommerziell erhältliches Polyethylenglykol-1000-Monoacrylat (~ 1000 g/mol) (Monomer-Polymer & Dajac Labs) in einem 100 mL Dreihalskolben vorgelegt. Der Dreihalskolben wurde mit einem Temperaturfühler und einem Septum versehen und über einen Kühler an eine Schlenkapparatur angeschlossen. Zur Entfernung von Wasserspuren wurde das Polymer für 5 h bei 80 °C unter Rühren konditioniert. Anschließend wurde unter Stickstoffatmosphäre abgekühlt. Bei ~ 40 °C erfolgte die Zugabe von 28 mL absolutem Tetrahydrofuran (THF) und bei Raumtemperatur die Zugabe von 2.1 mL (15 mmol) Triethylamin (TEA). Unter Eiskühlung und starkem Rühren erfolgte anschließend die Zugabe von 1.4 mL (15 mmol) Phosphoroxychlorid (POCl₃). Die erhaltene trübe, weißliche Lösung wurde für ~ 18 h unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ~ 70 mL Wasser unter Eiskühlung und starkem Rühren abgebrochen. Die Isolation des Rohprodukts erfolgte, indem die nach Wasserzugabe klare Reaktionslösung dreimal mit je ~ 100 mL Chloroform extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Chloroform unter vermindertem Druck (~ 350 mbar) bei etwa 40 °C am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

6.2.2.2 Umsetzung des Acrylat-Terminus des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Polymers in einer Michael-Typ-Addition

Die Einführung einer terminalen Hydroxylgruppe mittels Michael-Typ-Reaktion erfolgte nach einem Protokoll von Thiry *et al.*^[183] mit einigen Modifikationen.

Hierzu wurden 2.7 g (~ 2.5 mmol) des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Monoacrylat-Polymers (~ 1080 g/mol) in einem 50 mL Dreihalskolben mit Septum und Rückflusskühler, über welchen ein Anschluss an eine Schlenkapparatur erfolgte, vorgelegt. Das Polymer wurde mit 174 μ L (2.48 mmol) Mercaptoethanol und 1.273 mL (7.437 mmol) *N*-Ethyldiisopropylamin versetzt. Das Gemisch wurde anschließend in 26 mL absolutem Chloroform aufgenommen und unter Stickstoffatmosphäre auf 40 °C erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde bei dieser Temperatur für ~ 72 Stunden unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte, indem die Reaktionslösung zunächst auf ~ -20 °C abgekühlt und anschließend langsam in kaltem Diethylether (~ -20 °C) gegeben wurde. Der gebildete weiße Niederschlag wurde zügig durch Vakuumfiltration über einen Glasfiltertiegel abgetrennt und mehrfach mit kaltem Diethylether gewaschen. Abschließend wurde das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das erhaltene farblose Pulver wurde bis zur weiteren Verwendung, dem Phasentransfer der Ölsäure-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel, bei Raumtemperatur gelagert.

6.2.3 Ligandenaustausch mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol

Zur hydrophilen Oberflächenmodifizierung wurden in Chloroform suspendierte Ölsäure-stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit Aceton bis zur Trübung versetzt und zentrifugiert (~ 20000 g, 5 min). ~ 2 nmol der Nanopartikel wurden in 1.5 mL THF resuspendiert. Parallel dazu wurden 316 mg (~ 0.273 mmol) des Phosphat-funktionalisierten Polyethylenglykol-Liganden in einer 0.1 M Natriumhydroxydlösung gelöst (der pH-Wert der Lösung betrug 7) und mit THF versetzt (Ligandenkonzentration: ~ 0.16 M). Unter starkem Rühren wurden 370 μ L der Ligandenlösung in die vorgelegte Partikellösung überführt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren für ~ 18 h im Ölbad auf 64 °C erhitzt. Nach erfolgtem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Partikel gefällt. Dazu wurde die Reaktionslösung zunächst bis zum Erhalt einer einphasigen Lösung mit Ethanol und Chloroform versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von

n-Hexan bis sich die Lösung trübte. Nach Zentrifugation (~ 20000 g, 5 min) wurde die überstehende farblose Lösung verworfen, der Niederschlag im Stickstoffstrom getrocknet und in ~ 500 μL Wasser aufgenommen. Die weitere Aufreinigung erfolgte in der Regel mittels eines 10 kDa Amicon Ultra Zentrifugenfilters (10000 MWCO, regenerierte Zellulose, Merck Millipore). Zum Teil erfolgte die Reinigung über eine Magnetsäule (LD Column, Miltenyi Biotec).

Der Ligandenaustausch erfolgte analog in mehrfacher Ausführung. Einzelne Ansätze wurden nach erfolgter Standardanalytik (DLS sowie teilweise auch TEM) kombiniert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

6.2.4 Biokonjugation

6.2.4.1 Aktivierung der Eisenoxid-Nanopartikel und anschließende kovalente Kopplung von MOC31

Die Bromcyan-vermittelte Bindung von MOC31 an die Hydroxyl-terminierte Hülle der Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte basierend auf einer in *Bioconjugate Techniques*^[232] beschriebenen Methode. Der für die Kopplung verwendete monoklonale anti-EpCAM Antikörper MOC31 wurde vom Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie am UKE von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Udo Schumacher für die Durchführung der Experimente zur Verfügung gestellt.

Für die Kopplung wurden die eingesetzten Mengen an Aktivierungsreagenz und Antikörper variiert. Die Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die veränderten Parameter.

In einem Standardexperiment wurden 0.078 nmol der Nanopartikel in Aktivierungspuffer (Nanopartikelkonzentration: ~ 70 nM; Aktivierungspuffer: 0.1 M Na_2CO_3) mit einer entsprechenden Menge an Bromcyan gelöst in Acetonitril versetzt. Nach 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln wurden die Nanopartikel zunächst von überschüssigem Aktivierungsreagenz befreit. Die Aufreinigung erfolgte über eine sterile Magnetseparationssäule (LD Column, Miltenyi Biotec), diese besitzt eine Matrix aus Eisenkugeln. Die Säule wurde in einem Permanentmagneten platziert. Durch das starke Magnetfeld werden die Eisenoxid-Nanopartikel in der Matrix zurückgehalten, alle Moleküle ohne magnetische Markierung können die Säule ungehindert passieren. Die Reaktionslösung wurde auf die Magnetsäule, welche im Vorfeld mit

kaltem Wasser äquilibriert wurde, aufgetragen. Nach Durchlauf dieser Lösung wurde die Säule zunächst mit 1 mL kaltem Wasser und dann mit 1 mL kaltem Kopplungspuffer (0.1 M Na₂CO₃, pH: 8.5) gewaschen. Anschließend wurden die Nanopartikel mit kalter Pufferlösung in eine entsprechende Menge an MOC31 von der entmagnetisierten Säule eluiert. Hierzu wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Das Endvolumen betrug ~ 2 mL. Der Ansatz wurde für ~ 24 Stunden bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Um noch aktiviert vorliegende Nanopartikel zu blockieren wurden drei Äquivalente Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) gelöst in 500 µL Kopplungspuffer in den Reaktionsansatz gegeben und die Inkubation analog für weitere 3 Stunden durchgeführt. Der Überschuss an Tris ist bezogen auf die eingesetzte molare Menge an Aktivierungsreagenz. Der Überschuss an freiem Antikörper und Tris wurde über eine in einem Permanentmagneten platzierte Magnetsäule abgetrennt. Im Vorfeld wurde diese mit kaltem Kopplungspuffer äquilibriert. Nach Durchlauf der aufgetragenen Reaktionslösung wurde die Säule mit 1 mL und anschließend viermal mit 1.5 mL kaltem PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) (pH 7.4) gewaschen. Die Elution der Nanopartikel von der entmagnetisierten Säule erfolgte mit ~ 2-3 mL PBS. Die Konjugate wurden bei 4 °C in PBS gelagert. Die Durchführung der Zellexperimente zur Untersuchung der Bindungseigenschaften der an MOC31 gekoppelten Nanopartikel ist unter **6.3** beschrieben.

In einigen Fällen wurde der Antikörper vor der Kopplung mit ¹²⁵Iod radioaktiv markiert. Die Iodierung von MOC31 wird unter **6.2.4.2** beschrieben. Die Kopplungen mit dem ¹²⁵Iod-markiertem Antikörper erfolgte auf analoge Weise. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Antikörperstammlösung nach Radiomarkierung in einer höheren Verdünnung vorlag (~ 0.0019 mM).

Die Kopplungen mit dem iodierten Antikörper wurden im Isotopenlabor des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am UKE unter Befolgung der entsprechenden Strahlenschutzvorschriften durchgeführt. Vor Beginn der Versuche erfolgte eine Einweisung in den Strahlenschutz durch den Strahlenschutzbeauftragten Prof. Dr. Heeren.

Tabelle 6.1: Bedingungen für die Aktivierung der Eisenoxid-Nanopartikel und anschließende kovalente Kopplung von MOC31. Der Überschuss an Aktivierungsreagenz und Antikörper bezieht sich auf die eingesetzte molare Menge an Nanopartikeln. Diese lag in Standard-Kopplungen bei 0.079 nmol. Wurde der höchste Aktivierungsreagenzüberschuss untersucht, betrug die Konzentration der Bromcyanlösung 2.13 M*. Um die Nanopartikelkonzentration bei der Aktivierungsreaktion (~ 64 nM) konstant zu halten, wurden die Ansätze mit abnehmendem Aktivierungsreagenzüberschuss (für 2.5*10⁶- und 2*10⁶-fach) mit einer entsprechenden Menge an Acetonitril versetzt. Wurde ein 3*10⁶-facher Überschuss nicht untersucht, wurden geringer konzentrierte Bromcyanlösungen verwendet (bei 2.5*10⁶-fach als höchster Überschuss: 1.78 M; bei 2*10⁶-fach als höchster Überschuss: 1.44 M). Für geringere Überschüsse als 2*10⁶-fach wurden standardmäßig verdünnte Bromcyanlösungen (0.144 M**, 0.0144 M***, 0.00144 M****) verwendet. Bei einem äquimolaren Einsatz des Antikörpers wurde die MOC31-Stammlösung (~ 0.0074 mM) zuvor verdünnt (~ 0.0025 mM[†]).

Bromcyan:

Volumen [µL]	Stoffmenge [µmol]	Überschuss
110 *	234	~ 3*10 ⁶
92*	196	~ 2.5*10 ⁶
74*	158	~ 2*10 ⁶
110 **	15.8	~ 2*10 ⁵
110 ***	1.58	~ 2*10 ⁴
110 ****	0.158	~ 2*10 ³

MOC31:

Volumen [µL]	Stoffmenge [nmol]	Überschuss
32 #	0.08	~ 1.0
32	0.24	~ 3.0
64	0.48	~ 6.0

6.2.4.2 Iodierung von MOC31

Für die Radiomarkierung des Antikörpers wurden ~ 0.5 mg von diesem in 1 mL PBS mit einem Aliquot (30 µCi) einer kommerziell erhältlichen Na¹²⁵I-Lösung in 0.1 M Natriumhydroxid-Lösung (PerkinElmer) versetzt. Nach Zugabe einer Pierce® Iodination Bead (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Ionen wurden chromatographisch mit Hilfe einer PD-10 Säule (GE Healthcare) abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Die ¹²⁵Iod-Aktivität wurde wie unter 6.3.2.3 beschrieben bestimmt.

Die Iodierung des Antikörpers erfolgte durch Dr. Markus Heine, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte durch Sandra Ehret, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE).

6.3 Charakterisierungsmethoden

6.3.1 Charakterisierungsmethoden zur Untersuchung der Ölsäure- und Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel, sowie der Polyethylenglykol-Liganden

6.3.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Jeol JEM-1011 Mikroskop bei 100 kV und alternativ an einem CM-300 UT Mikroskop von Philips bei 300 kV aufgenommen. Zur Messung wurden stark verdünnte Suspensionen der Ölsäure-stabilisierten Nanopartikel in Toluol, und der Polyethylenglykol-stabilisierten Nanopartikel in Wasser hergestellt. Es wurden 10 μL der Partikellösung auf ein mit amorphem Kohlenstoff beschichtetes Kupfer-Netzchen aufgebracht. Im Falle der wässrigen Proben wurde der Kupfer-Träger hierzu auf einem Deckglas platziert. Die Proben wurden vor der Messung für mindestens 24 h bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Die statistische Auswertung der TEM-Aufnahmen erfolgte mit der Software ImageJ (Version 1.44 p) der National Institutes of Health.

Die TEM-Aufnahmen an dem Philips CM-300 UT Mikroskop wurden von Stefan Werner, Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg, angefertigt.

6.3.1.2 Pulver-Röntgendiffraktometrie

Die Pulver-Röntgendiffraktometrie wurde an einem Philips X'Pert-Diffraktometer mit Bragg-Brentano-Geometrie gemessen. Dabei wurde Kupfer-K α -Strahlung ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$) verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden einige Tropfen einer konzentrierten Suspension der Nanopartikel in Chloroform auf einen Silizium-Träger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

Die Röntgendiffraktogramme wurden von Almut Barck, Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg, aufgenommen.

Die erhaltenen kristallspezifischen Reflexe von Nanopartikeln sind im Gegensatz zu denen makrokristalliner Festkörper nicht scharf, sondern weisen eine größenabhängige Verbreiterung auf. Unter Verwendung der Debye-Scherrer-Gleichung kann der kristalline Teilchendurchmesser aus der Reflexverbreiterung ermittelt werden. Für die Linienbreite in Höhe der halben Maximalintensität gilt:

$$H_B = \frac{K\lambda 57.3}{D \cos \theta} \quad [6.1]$$

H_B beschreibt die Halbwertsbreite des erhaltenen Reflexes bei maximaler Intensität, θ den Beugungswinkel und D den Durchmesser der kristallinen Domäne senkrecht zur reflektierenden Netzebene. 57.3 ist der Umrechnungsfaktor von rad zu grad. K stellt einen Formfaktor dar, der für sphärische Partikel näherungsweise gleich 0.89 gesetzt werden kann. Die Bestimmung der Halbwertsbreite erfolgte mit Anpassung durch eine Voigt-Verteilungsfunktion (Voigt-Fit) mit der Software *fityk* (Version 0.9.7). Zuvor wurde eine Untergrundkorrektur der Diffraktogramme mit der Software X'PertHighScorePlus (Version 2.2.3) der Firma Panalytical B.V. durchgeführt.

6.3.1.3 Kernresonanz-Spektroskopie

Die Messung der ^{31}P - und ^1H -NMR-Spektren erfolgte bei Raumtemperatur an einem Bruker DRX 500 Spektrometer bei einer Frequenz von ~ 500 MHz oder alternativ an einem Bruker Avance bzw. Avance I Spektrometer bei einer Frequenz von ~ 400 MHz. Zur Probenvorbereitung wurden ~ 30 mg des Polymers in 0.7 mL deuteriertem Chloroform (Chloroform-d, Deutero) gelöst. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mittels der Software MestRe-C (Version 4.7.0.1) der Firma Mestrelab Research.

Die NMR-Spektren wurden vom NMR-Service des Instituts für Organische Chemie, Universität Hamburg, aufgenommen.

6.3.1.4 Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem Bruker Daltonik UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF-System unter Verwendung eines SmartbeamTM-II Lasers (355 nm). Die Messungen wurden im Reflexionsmodus (positiver Ionenmodus) aufgenommen und erfolgten durch mindestens 1000 Laserschüsse. Es wurde im m/z -Bereich von 600-3400 gemessen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (154 g/mol) verwendet. Lösungen der Analyten (~ 1 mg/mL) in Chloroform wurden mit Matrix (10 mg/mL in Acetonitril/Wasser 30:70 (v/v) und 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure) im Verhältnis 1:1 gemischt. 1 μ L dieser Lösung wurde auf den MALDI-Probenträger (GroundsteelTarget) aufgetragen.

Die massenspektrometrischen (MS-) Experimente wurden vom MS-Service des Instituts für Organische Chemie, Universität Hamburg, durchgeführt.

6.3.1.5 Infrarot-Spektroskopie

Fouriertransformierte IR-Spektren wurden mit einem Varian Cary 660 FT-IR-Spektrometer unter Verwendung des Aufbaus für Messungen nach dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflektion (ATR, *attenuated total reflection*) aufgenommen. Flüssige Proben wurden auf die Diamantzelle der ATR-Einheit getropft und nach dem Eintrocknen vermessen. Feste, trockene Proben wurden ohne Vorbereitung direkt auf der Diamantzelle vermessen.

6.3.1.6 Dynamische Lichtstreuung

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde an einem Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 bei einer Wellenlänge von 633 nm unter Verwendung eines Helium/Neon-Lasers durchgeführt. Die DLS-Messungen der Proben erfolgten in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels in unterschiedlichen Küvetten. Dispersionen in organischen Lösungsmitteln wurden in einer Quarzglasküvette, wässrige Lösungen in einer PMMA-Einwegküvette (Halb-Mikroküvette, Carl Roth) bei einer optischen Weglänge von 10 mm und wenn nicht anders erwähnt bei einer Temperatur von 20 °C vermessen. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wurden die Anzahl sowie die Dauer der einzelnen Zyklen auf automatische

Anpassung durch die Steuerungssoftware eingestellt. Für jede Probe wurden drei Messungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Dispersion Technology Software (Version 5.10) von Malvern Instruments.

6.3.1.7 Bestimmung der Eisenkonzentration in Partikelsuspensionen

Quantitative Bestimmung des Eisengehalts mittels Bathophenanthrolin:

Die photometrische Bestimmung des Eisengehalts in den wässrigen Eisenoxid-Nanopartikel Suspensionen wurde angelehnt an das Protokoll von Huberman *et al.*^[246], wie unter Tromsdorf *et al.*^[182] beschrieben, durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von Eisen(III)chlorid (0.1-51.2 µg/mL). Zum Aufschluss der Nanoteilchen wurden 200 µL der Proben sowie des Standards in eine transparente 96 Well-Platte (96 Well Polystyrol Mikroplatte, Greiner) überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50 µL 5 M Salzsäure. Nach erfolgter Inkubation bei 70 °C für 30 Minuten, wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur die Eisenbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden 50 µL je Ansatz in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von 150 µL reduzierender Essigsäure/Acetat-Pufferlösung (40% (v/v) 2 M Acetat-Puffer (pH 4.75), 8% (v/v) Ascorbinsäurelösung (0.1 g/mL), 52% (v/v) Wasser) sowie 100 µL Bathophenanthrolinlösung (1 g/mL) je Well erfolgte nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Messung der Absorption bei 540 nm mittels eines TECAN Infinite 200 Plate Readers. Für jede Probe erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, mindestens eine Dreifachbestimmung des Eisengehalts.

Quantitative Bestimmung des Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektroskopie:

Die Bestimmung des Eisengehalts in Suspensionen Ölsäure-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte atomabsorptionsspektroskopisch.

Diese Messungen wurden zum Teil im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt: Zum Aufschluss der Partikel wurden die Proben mit 5 M Salzsäure versetzt (Endkonzentration Salzsäure: 1 M) und für 30 Minuten bei 70 °C inkubiert und konnten anschließend vermessen werden. Daten zur Messung sind unter 6.3.2.2 beschrieben.

Die Bestimmungen des Eisengehalts erfolgten vor allem durch die Verfasserin dieser Arbeit, sowie teilweise durch Dr. Barbara Freund, zu diesem Zeitpunkt wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE).

Weiterhin wurde der Eisengehalt in Suspensionen Ölsäure-stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie in der zentralen Elementaranalytik des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg bestimmt. Der Aufschluss der Partikel erfolgte vor Ort mittels Salpetersäure und Perchlorsäure.

6.3.1.8 Kernresonanz-Relaxometrie

Die Ermittlung der longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten erfolgte an einem minispec mq-60 NMR Analyzer von Bruker bei einer magnetischen Flussdichte von 1.41 Tesla (60 MHz) bei 37 °C.

Die Messung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 erfolgte über eine Inversion-Recovery-Sequenz bei 20 verschiedenen Verzögerungszeiten TI (die letzte als 80-faches der ersten Verzögerungszeit) zwischen dem Inversionspuls (180°) und dem 90°-Detektionpuls. Die erhaltenen Datenpunkte wurden unter Verwendung folgender Gleichung gefittet:

$$M(TI) = M_0(1 - e^{-TI/T_1}) \quad [6.2]$$

Die nach der Verzögerungszeit TI noch verbleibende Signalintensität entspricht $M(TI)$, M_0 stellt die Gleichgewichtssignalintensität vor dem 180°-Puls dar.

Die Bestimmung der transversalen Relaxationszeit T_2 erfolgte mittels einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Spinecho-Sequenz. Es erfolgte die Aufnahme von 200 Datenpunkten als Vielfaches der Echozeit T_E ($t = nT_E = 2n\tau$). τ (0.1 ms) ist das Zeitintervall zwischen dem 90°-Anregungspuls und dem ersten 180°-Refokussierungspuls.

Die erhaltenen Datenpunkte wurden unter Verwendung folgender Gleichung gefittet:

$$M(t = nT_E) = M_0 e^{-t/T_2} \quad [6.3]$$

Dabei ist $M(t = nT_E)$ die Signalintensität zum Zeitpunkt t .

6.3.1.9 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden humane Lungenkarzinomzellen (A549-Zellen), die von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen wurden, verwendet. A549-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Well (100 Zellen pro μL Medium) in schwarze 96-Well-Zellkulturplatten (Nunc™ MicroWell™ 96-Well-Platten mit transparentem Boden aus Polymer, Thermo Fisher Scientific Inc.) ausgesät. Als Medium wurde DMEM mit 10% (v/v) FCS (PAN Biotech), 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 1% (v/v) Natriumpyruvat (Lonza) verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 48 Stunden bis zu einer Konfluenz von 100% inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 100 μL einer mit Medium verdünnten Suspension der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel versetzt. Es wurden sechs verschiedene Verdünnungen (Eisenkonzentration: ~ 3.58 μM - ~ 5370 μM) untersucht. Als Postivkontrolle dienten mit Cadmiumchlorid (25-300 μM in Medium) versetzte Zellen, als Negativkontrolle die Zellen in Medium. Das Endvolumen je Well betrug 100 μL . Jede Verdünnung wurde in einer Dreifachbestimmung untersucht. Die Zellen wurden für etwa 16 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Entfernen des Mediums erfolgte die Zugabe von 100 μL Färbelösung (0.0075% (v/v) einer 1 mM Lösung MitoTracker® Deep Red (Thermo Fisher Scientific Inc.) in DMSO, 0.025% (v/v) Hoechst 33342 (10 mg/mL in Wasser, Thermo Fisher Scientific Inc.), in Medium) je Well. Nach Inkubation (37°C, 5% CO₂) für 30 Minuten wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden nach Zugabe von 100 μL Fixierlösung (10% (v/v) 37%iges Formaldehyd in D-PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation wurde die Fixierlösung abgenommen und die Zellen zunächst mit 100 μL D-PBS gewaschen und anschließend mit 200 μL D-PBS versetzt. Die 96-Well Platten wurden mit Nescofilm abgeklebt und bis zur Toxizitätsuntersuchung an einem Cellomics ArrayScan® bei 4 °C gelagert. Die Messungen zur Untersuchung der Zelltoxizität erfolgten an

einem Cellomics ArrayScan® IV von Thermo Fischer Scientific Inc. In Kanal 1 wurde die Intensität des Hoechstfarbstoffs und in Kanal 2 die Intensität des MitoTracker® Deep Red gemessen. Weiterhin wurden je Well an 50 verschiedenen Punkten Bilder aufgenommen.

Die Zellkulturexperimente zur Untersuchungen der Zytotoxizität der Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden durch Charis Schlundt, Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN GmbH), durchgeführt.

6.3.1.10 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) wurde am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie am UKE durchgeführt. Es wurde eine Superose-6 10/300 GL Säule (GE-Healthcare) verwendet. Die Säule wurde mit ~ 200 µL Probe beladen. Die Polyethylenglykol-stabilisierten Partikel wurden bei einem Fluss von 0.5 mL/min in 40 Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktionen wurden im Abstand von einer Minute gesammelt. Die erste Fraktion wurde ab der 10. Minute gesammelt. Als Elutionspuffer wurde PBS (pH 7.4) verwendet.

Der Eisennachweis in den einzelnen Fraktionen erfolgte photometrisch wie unter **6.3.1.7** beschrieben, wobei jeweils 200 µL pro Fraktion aufgeschlossen wurden.

6.3.1.11 *In vivo* Magnetresonanztomographie

Die MRT-Untersuchungen wurden an einem 7 Tesla Kleintier MRT ClinScan® (Bruker BioSpin MRI GmbH) durchgeführt. Die dynamischen MRT-Messungen des Abdoms erfolgten mittels T_2^* -gewichteter Gradientenecho-Sequenz in transversaler Schichtführung. Die Sequenzparameter sind in Tabelle 6.2 gezeigt. Neben der Aufnahme der T_2^* -gewichteten MRT-Bilder wurden Signalintensitätswerte aus ausgewählten Arealen ermittelt. *Regions of interest* wurden in der Leber und der Vena cava inferior platziert.

Tabelle 6.2: Parameter der für die Experimente verwendeten T₂'-gewichteten Gradientenecho-Sequenz.

FOV [mm]	Schichtdicke [mm]	FA [°]	TR [ms]	T _E [ms]	Mittelungen	Voxelauflösung [μm ³]	zeitliche Auflösung [s]
30 x 30	1.5	20	19	2	4	234 x 234 x 1500	7.3

FOV: Messfeld *field of view* FA: FlipWinkel *flip angle*, TR: Repetitionszeit, T_E: Echozeit

Die MRT-Untersuchungen erfolgten mit vier Versuchstieren. Für die Experimente wurden BALB/c Mäuse verwendet. Bei drei der Tiere erfolgte die Injektion von jeweils 300 μL (~ 300 μg Eisen) wässriger Lösung der Polyethylenglykol-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel in die Schwanzvene. Der anderen Versuchsmaus wurde zum Vergleich eine Mischung aus 10 μL Resovist® (~ 280 μg Eisen) (Bayer Schering Pharma AG) und 290 μL Natriumchlorid-Lösung in die Schwanzvene injiziert. Die Scanzeit pro Tier nach i.v. Injektion betrug ~ 24 Minuten. Die Tiere wurden während dieser Zeit durch die kontinuierliche Inhalation von Isofluran (1.5-2%) anästhesiert. Während der Messung wurde die Körpertemperatur der Versuchsmäuse durch eine interne Heizvorrichtung konstant auf 37 °C gehalten.

Alle Tierversuche unterlagen den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach § 8 des Tierschutzgesetzes und wurden von dem Tierschutzkomitee des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, BSG, Hamburg (Tierversuchs-Nr. G14/01) genehmigt.

Die in vivo MRT-Untersuchungen wurden von Dr. Caroline Jung, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), nach einem Protokoll von Michael Kaul, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), durchgeführt.

6.3.2 *In vitro* Bioanalytik der Konjugate

Die Zellkulturexperimente zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der MOC31-konjugierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am UKE durchgeführt. Der *in vitro* Test auf Spezifität erfolgte mit einer EpCAM hoch exprimierenden Kolonkarzinomzelllinie (HT29) sowie einer *knockdown* Kolonkarzinomzelllinie mit geringer

EpCAM Expression (HT29EpCAMkd). Die Zelllinie HT29 wurden von Cell Lines Service (CLS) bezogen. Die Zelllinie HT29EpCAMkd wurde vom Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Udo Schumacher zur Verfügung gestellt.

Die humanen Zelllinien HT29 und HT29EpCAMkd wurden in RPMI (Gibco) mit 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 10% (v/v) FCS bei 37 °C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium der HT29EpCAMkd Zellen enthielt zusätzlich noch 1 µg/mL Puromycin (Sigma Aldrich). Die Passagierung erfolgte im Abstand von 3 bis 4 Tagen durch Trypsinierung und Aussaat in eine neue Zellkulturflasche. Am Tag des Zellkulturexperiments wurden die Zellen nach Trypsinierung und Zellzählung mit Trypanblau (Serva) in FACS-Puffer (1% (w/v) bovines Serumalbumin, 0.1% (w/v) Natriumazid, in PBS) aufgenommen.

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte größtenteils durch Birgit Henkel, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Nur die Vorbereitung der Zellen für anschließende MRT-Untersuchungen erfolgte durch Anna Schildt, die zu diesem Zeitpunkt Masterstudentin im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie von Prof. Dr. Udo Schumacher am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) war.

Die meisten Experimente zur Untersuchung der Bindungseigenschaften der Konjugate erfolgten mit Zellen, die mit unkonjugiertem MOC31 vorinkubiert wurden, sowie gleichzeitig auch mit Zellen, bei denen die spezifischen Bindungsstellen nicht blockiert wurden. Zur Blockierung wurden in einem Standard-Zellexperiment $2 \cdot 10^6$ Zellen ($4 \cdot 10^6$ Zellen/mL FACS-Puffer) mit ~ 0.07 nmol MOC31 (~ 0.015 mM in PBS)) versetzt. Zellen dieser Versuchsreihe, bei denen die spezifischen Bindungsstellen nicht blockiert werden sollten, wurden stattdessen mit einem entsprechenden Volumen an FACS-Puffer versetzt. Im Verlauf des gesamten Zellkulturexperiments wurde mit kaltem FACS-Puffer gearbeitet. Die Zellen wurden anschließend bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 20 Minuten wurden die Zellen bei 500 g (langsame Beschleunigung und Bremsung) und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 300 µL FACS-Puffer aufgenommen und die Zellen anschließend mit den Eisenoxid-Nanopartikeln inkubiert. Erfolgten Zellexperimente ohne Vorinkubationsschritt in der Versuchs-

reihe wurden die Zellen nach Trypsinierung und Aufnahme in FACS-Puffer direkt mit den Eisenoxid-Nanopartikeln inkubiert.

$2 \cdot 10^6$ der in FACS-Puffer suspendierten Zellen wurden mit variierenden Mengen der Eisenoxid-Nanopartikel Suspensionen (~ 0.6 pmol bis ~ 6 pmol Antikörper-konjugierte und unkonjugierte Eisenoxid-Nanopartikel) versetzt und mit FACS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von $500 \mu\text{L}$ gebracht. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 4°C unter Schütteln mit den Nanopartikeln inkubiert. Als Negativkontrolle wurden $2 \cdot 10^6$ der in $500 \mu\text{L}$ FACS-Puffer suspendierten Zellen ohne Nanopartikelzusatz für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Für jede zu untersuchende Probe wurden die Zellexperimente, soweit nicht anders erwähnt, in mindestens einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Ebenso die Negativkontrollen. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 mL FACS-Puffer und die Zellen wurden bei 500 g (langsame Beschleunigung und Bremsung) und 4°C für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde entfernt. Die Zellen wurden anschließend mehrfach mit FACS-Puffer gewaschen. Hierzu wurde das Zellpellet in 1 mL FACS-Puffer resuspendiert und bei 500 g (langsame Beschleunigung und Bremsung) und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen, je nach anschließender Analytik zur Untersuchung des Bindungsverhaltens, unterschiedlich behandelt.

Für die unter **6.3.2.1** beschriebene *in vitro* Magnetresonanztomographie wurden die Zellen in $75 \mu\text{L}$ PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig auf eine Polyacrylamid-Schicht in einem 0.2 mL Eppendorfgefäß aufgetropft und mit PBS luftfrei aufgefüllt. Zur Sedimentation der Zellen wurden die Zellphantome bis zur Messung (für mindestens zwei Stunden) bei 4°C gelagert.

Für eine Eisenbestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie (**6.3.2.2**) wurden die Zellen in $200 \mu\text{L}$ Wasser aufgenommen und mit $50 \mu\text{L}$ 5 M Salzsäure versetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 70°C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Wasser auf $500 \mu\text{L}$ aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 1000 g für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend atomabsorptionsspektroskopisch auf den Eisengehalt untersucht.

Erfolgten Zellkulturexperimente mit Eisenoxid-Nanopartikeln, die an ^{125}I -markierte Antikörper gekoppelt wurden, wurden die Zellen in 1 mL FACS-Puffer aufgenommen und die Radioaktivität der Zellsuspensionen wurde wie unter **6.3.2.3** beschrieben bestimmt.

Die Probenvorbereitung (Durchführung der Zellexperimente und Vorbereitung der Zellphantome) für die MRT-Untersuchungen erfolgte durch Anna Schildt, die zu diesem Zeitpunkt Masterstudentin im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie von Prof. Dr. Udo Schumacher am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) war.

6.3.2.1 *In vitro* Magnetresonanztomographie

Die MRT-Messungen der Zellphantome wurden an einem 7 Tesla Kleintier MRT ClinScan® (Bruker BioSpin MRI GmbH) durchgeführt. Es wurde eine T_2^* -gewichtete Messung mit Gradientenecho-Sequenz vorgenommen. Die Sequenzparameter sind in Tabelle 6.3 gezeigt. Die Proben wurden in einem Wasserbad bei 22 °C gemessen.

Tabelle 6.3 Parameter der für die *in vitro* MRT-Untersuchungen verwendeten Gradientenecho-Sequenz.

FOV	Schichtdicke	FA	TR	T_E	ETL	Mittelungen	SNR
[mm]	[mm]	[°]	[ms]	[ms]			
30	0.5	25	300	8	12	2	1

FOV: Messfeld *field of view*, FA: FlipWinkel *flip angle*, TR: Repetitionszeit, T_E : Echozeit, ETL: Anzahl der Echos *echo train length*, SNR: Signal-zu-Rausch-Verhältnis *signal to noise ratio*

Die *in vitro* MRT-Messungen wurden von Dr. Nina Raabe, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), sowie von Anna Schildt, die zu diesem Zeitpunkt Masterstudentin im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie von Prof. Dr. Udo Schumacher am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) war, durchgeführt.

6.3.2.2 Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wurde mit einem Perkin-Elmer Graphitrohr AAS 4100 mit HGA 700 Heizeinheit bei einer Wellenlänge von 248 nm im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am UKE durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Matrixlösung (0.02 M Salpetersäure, 0.01 µg/mL Triton® X-100) verdünnt. Von jeder zu untersuchenden Probe wurden mindestens drei Verdünnungen in jeweils einer Dreifachbestimmung gemessen. Alle verwendeten Arbeitsgeräte wurden im Vorfeld eisenfrei gewaschen (Waschlösung: 0.1% (v/v) Triton, 0.14% (v/v) 65%-ige Salpetersäure, in Wasser).

6.3.2.3 Messung der Radioaktivität

Die ^{125}I -Aktivität wurde an einem 2479 WIZARD² Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer) im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am UKE gemessen. Die zu untersuchenden Proben wurden ohne weitere Vorbereitung mit dem ^{125}I -Programm über einen Zeitraum von 1 bis 10 Minuten vermessen.

6.3.3 Statistik

Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-Test* überprüft. Bei $p < 0.05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

7 Literaturverzeichnis

1. Wagener C.; Müller O. *Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, Molekulare Aspekte*. Thieme: Stuttgart, **2009**.
2. World Health Organisation *Global status report on noncommunicable diseases* **2014**.
3. Robert Koch-Institut *Krebs in Deutschland*. Berlin, **2015**.
4. Nie S.; Xing Y.; Kim G. J.; Simons J. W. Nanotechnology Applications in Cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, *9*, 257-288.
5. Mirkin C. A.; Meade T. J.; Petrosko S. H.; Stegh A. H. (Hrsg.) *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*. Springer: Heidelberg, u.a., **2015**.
6. Krishnan K. M. Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Trans. Magn.* **2010**, *46*, 2523-2558.
7. Arruebo M.; Valladares M.; Gonzalez-Fernandez. A. Antibody-Conjugated Nanoparticles For Biomedical Applications. *J. Nanomater.* **2009**, 439389.
8. Riehemann K.; Schneider S. W.; Luger T. A.; Godin B.; Ferrari M.; Fuchs H. Nanomedizin - Herausforderung und Perspektiven. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 886-913.
9. Na H. B.; Song I. C.; Hyeon T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2133-2148.
10. Kumar S.; Aaron J.; Sokolov K. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 314-320.
11. Lee J.-H.; Huh Y.-M.; Jun Y.-w.; Seo J.-w.; Jang J.-t.; Song H.-T.; Kim S.; Cho E.-J.; Yoon H.-G.; Suh J.-S.; Cheon J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 95-99.
12. Schladt T. D.; Schneider K.; Schild H.; Tremel W. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6315-6343.
13. Schmid G. (Hrsg.) *Nanoparticles, From Theorie to Applications*. Wiley: Weinheim, **2010**.
14. Dilcher L.; Venator M.; Dilcher S. *Handbuch der Kernspintomographie*. E. Ferger: Bergisch Gladbach, **2002**.
15. Rummery E. J.; Reimer P.; Heindel W. (Hrsg.) *Ganzkörper MR-Tomographie*. Thieme: Stuttgart, New York, **2002**.
16. Tromsdorf U. I. *Superparamagnetische Ferrit-Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie*. Dissertation der Universität Hamburg, **2009**.
17. Jun Y.-w.; Lee J.-H.; Cheon J. Chemisches Design von leistungsfähigen Nanosonden für die Kernspintomographie. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5200-5213.
18. Wang Y.-X. J.; Hussain S. M.; Krestin G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* **2001**, *11*, 2319-2331.
19. Gupta A. K.; Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021.
20. Goesmann H.; Feldmann C. Nanopartikel-Funktionsmaterialien. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1402-1437.

21. Sapsford K. E.; Algar W. R.; Berti L.; Gemmill K. B.; Casey B. J.; Oh E.; Stewart M. H.; Medintz I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904-2074.
22. Wagner V.; Dullaart A.; Bock A.-K.; Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1211-1217.
23. Bogart L. K.; Pourroy G.; Murphy C. J.; Puentes V.; Pellegrino T.; Rosenblum D.; Peer D.; Lévy R. Nanoparticles for Imaging, Sensing, and Therapeutic Intervention. *ACS Nano* **2014**, *8*, 3107-3122.
24. Bulte J. W. M.; Kraitchman D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* **2004**, *17*, 484-499.
25. Brigger I.; Dubernet C.; Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 631-651.
26. Jokerst J. V.; Lobovkina T.; Zare R. N.; Gambhir S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 715-728.
27. Karakoti A. S.; Das S.; Thevuthasan S.; Seal S. PEGylierte anorganische Nanopartikel. *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2024-2040.
28. Garnett M. C.; Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: Some physiological principles. *Occup. Med.* **2006**, *56*, 307-311.
29. Maeda H.; Fang J.; Inutsuka T.; Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: Various factors, mechanisms involved and its implications. *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 319-328.
30. Chauhan V. P.; Jain R. K. Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 958-962.
31. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 161-171.
32. Gao X.; Cui Y.; Levenson R. M.; Chung L. W. K.; Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969-976.
33. Peer D.; Karp J. M.; Hong S.; Farokhzad O. C.; Margalit R.; Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751-760.
34. Salvati A.; Pitek A. S.; Monopoli M. P.; Prapainop K.; Baldelli Bombelli F.; Hristov D. R.; Kelly P. M.; Aberg C.; Mahon E.; Dawson K. A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 137-143.
35. Heine M.; Freund B.; Nielsen P.; Jung C.; Reimer R.; Hohenberg H.; Zangemeister-Wittke U.; Wester H.-J.; Lüers G. H.; Schumacher U. High Interstitial Fluid Pressure Is Associated with Low Tumour Penetration of Diagnostic Monoclonal Antibodies Applied for Molecular Imaging Purposes. *PLoS ONE* **2013**, *7*.
36. Trzpis M.; Mc Laughlin P. M. J.; de Leij L. M. F. H.; Harmsen M. C. Epithelial Cell Adhesion Molecule. More than a Carcinoma Marker und Adhesion Molecule. *Am. J. Pathol.* **2007**, *171*, 386-395.
37. Riethmüller G.; Schneider-Gädicke E.; Schlimok G.; Schmiegel W.; Raab R.; Höffken K.; Gruber R.; Pichlmaier H.; Hirche H.; Pichlmayr R.; Buggisch P.; Witte J.; German Cancer Aid 17-1A Study Group. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* **1994**, *343*, 1177-1183.

38. Ordóñez N. G. Value of the MOC-31 Monoclonal Antibody in Differentiating Epithelial Pleural Mesothelioma From Lung Adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* **1998**, *29*, 166-169.
39. Baeuerle P. A.; Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 417-423.
40. Went P.; Vasei M.; Bubendorf L.; Terracciano L.; Tornillo L.; Riede U.; Kononen J.; Simon R.; Sauter G.; Baeuerle P. A. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target EpCAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 128-135.
41. Imrich S.; Hachmeister M.; Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhes. Migr.* **2012**, *6*, 30-38.
42. Munz M.; Baeuerle P. A.; Gires O. The emerging role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5627-5629.
43. Van der Gun B. T. F.; Melchers L. J.; Ruiters M. H. J.; de Leij L. F. M. H.; McLaughlin P. M. J.; Rots M. G. EpCAM in carcinogenesis: The good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1913-1921.
44. Sumer B.; Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 137-140.
45. Stark W. J. Nanoparticles in Biological Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1242-1258.
46. Saranadasa M.; Wang E. S. Vascular endothelial growth factor inhibition: Conflicting roles in tumor growth. *Cytokine* **2011**, *53*, 115-129.
47. Sailor M. J.; Park J.-H. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3779-3802.
48. Riedinger A.; Guardia P.; Curcio A.; Garcia M. A.; Cingolani R.; Manna L.; Pellegrino T. Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azofunctionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2399-2406.
49. Nel A. E.; Mädler L.; Velegol D.; Xia T.; Hoek E. M. V.; Somasundaran P.; Klaessig F.; Castranova V.; Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543-557.
50. Fung Y. C. Blood flow in the capillary bed. *J. Biomech.* **1969**, *2*, 353-372.
51. Huppelsberg J.; Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Thieme: Stuttgart, New York, **2009**.
52. Alexis F.; Pridgen E.; Molnar L. K.; Farokhzad O. C.; Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 505-515.
53. Weidl E. *Die Transplantation von humanen endothelialen und angiogenen Zellen verbessert die linksventrikuläre Funktion im Myokardinfarktmodell der Nacktratte*. Dissertation der Technischen Universität München, **2007**.
54. Choi H. S.; Liu W.; Misra P.; Tanaka E.; Zimmer J. P.; Ipe B. I.; Bawendi M. G.; Frangioni J. V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165-1170.
55. Walkey C. D.; Chan W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. **2012**, *41*, 2780-2799.
56. Van Furth R. Current View on the Mononuclear Phagocyte System. *Immunobiology.* **1982**, *161*, 178-185.
57. Bargheer D. *Lokalisation und Quantifizierung der Aufnahme von Nanokristallen in der Leber*. Dissertation der Universität Hamburg, **2014**.
58. Tran N.; Webster T. J. Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 8760-8767.

59. Harisinghani M. G.; Barentsz J.; Hahn P. F.; Deserno W. M.; Tabatabaei S.; van de Kaa C. H.; de la Rosette J.; Weissleder R. Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2491-2499.
60. Cedervall T.; Lynch I.; Foy M.; Berggard T.; Donnelly S. C.; Cagney G.; Linse S.; Dawson K. A. Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5754-5756.
61. Bargheer D.; Nielsen J.; Gébel G.; Heine M.; Salmen S. C.; Stauber R.; Weller H.; Heeren J.; Nielsen P. The fate of a designed protein corona on nanoparticles in vitro and in vivo. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 36-46.
62. Walczyk D.; Bombelli F. B.; Monopoli M. P.; Lynch I.; Dawson K. A. What the Cell „Sees“ in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5761-5768.
63. Lundqvist M.; Stigler J.; Elia G.; Lynch I.; Cedervall T.; Dawson K. A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14265-14270.
64. Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 523-528.
65. Vonarbourg A.; Passirani C.; Saulnier P.; Benoit J.-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4356-4373.
66. Harashima H.; Sakata K.; Funato K.; Kiwada H. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 402-406.
67. Walkey C. D.; Olsen J. B.; Song F.; Liu R.; Guo H.; Olson W.; Cohen Y.; Emili A.; Chan W. C. W. Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. *ACS Nano* **2014**, *8*, 2439-2455.
68. Gessner A.; Lieske A.; Paulke B. R.; Müller R. H. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: Analysis by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*, 165-170.
69. Gessner A.; Waicz R.; Lieske A.; Paulke B.-R.; Mäder K.; Müller R. H. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobics: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 245-249.
70. Roach P.; Farrar D.; Perry C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8168-8173.
71. Jeon S. I.; Lee J. H.; Andrade J. D.; De Gennes P. G. Protein-Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide. I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149-158.
72. Norde W.; Gags D. Interaction of Bovine Serum Albumin and Human Blood Plasma with PEO-Tethered Surfaces: Influence of PEO Chain Length, Grafting Density, and Temperature. *Langmuir* **2004**, *20*, 4162-4167.
73. Lee J. H.; Kopeckova P.; Kopecek J.; Andrade J. D. Surface properties of copolymers of alkyl methacrylates with, methoxy (polyethylene oxide) metiacrylates and their application as protein-resistant coatings. *Biomaterials* **1990**, *11*, 455-464.
74. Dingels C.; Schömer M.; Frey H. Von der Kosmetik zum Ionenleiter: Die vielen Gesichter des Poly(ethylenglykol)s. *Chem. Unserer Zeit* **2011**, *45*, 338-349.

75. Park K.; Mosher D. F.; Cooper S. L. Acute surface-induced thrombosis in the canine ex vivo model: Importance of protein composition of the initial monolayer and platelet activation. *J. Biomed. Mater. Res.* **1985**, *20*, 589-612.
76. Harris J. M.; Chess R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214-221.
77. Pochechueva T.; Chinarev A.; Bovin N.; Fedier A.; Jacob F.; Heinzelmann-Schwarz V. PEGylation of microbead surfaces reduces unspecific antibody binding in glycan-based suspension array. *J. Immunol. Methods* **2014**, *412*, 42-52.
78. Bailon P.; Berthold W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharm. Sci. Technol. Today* **1998**, *1*, 352-356.
79. Chauhan V. P.; Jain R. K. Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, Suppl. S1-12.
80. Allen T. M.; Cullis P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36-48.
81. Petros R. A.; DeSimone J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615-627.
82. Allen T. M. Liposomes: Opportunities in Drug Delivery. *Drugs* **1997**, *54*, 8-14.
83. Papahadjopoulos D.; Allen T. M.; Gabizon A.; Mayhew E.; Matthay K.; Huang S. K.; Lee K.-D.; Woodle M. C.; Lasic D. D.; Redemann C.; Martin F. J. Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11460-11464.
84. Romberg B.; Hennink W. E.; Storm G. Sheddable Coatings for Long-Circulating Nanoparticles. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 55-71.
85. Allen T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1994**, *13*, 285-309.
86. Shah N. B.; Vercellotti G. M.; White J. G.; Fegan A.; Wagner C. R.; Bischof J. C. Blood-Nanoparticle Interactions and in vivo Biodistribution: Impact of Surface PEG and Ligand Properties. *Mol. Pharm.* **2014**, *9*, 2146-2155.
87. Bergström K.; Österberg E.; Holmberg K.; Hoffman A. S.; Schuman T. P.; Kozłowski A.; Harris J. M. Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection. *J. Biomater. Sci Polym. Ed.* **1994**, *6*, 123-132.
88. Harder P.; Grunze M.; Dahint R.; Whitesides G. M.; Laibinis P. E. Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426-436.
89. Feng L.; Wang Y.; Wang N.; Ma Y. Preparation of poly(ethylene glycol)-grafted silica nanoparticles using a facile esterification condensation method. *Polym. Bull.* **2009**, *63*, 313-327.
90. Malmsten M.; Emoto K.; Van Alstine J. M. Effect of Chain Density on Inhibition of Protein Adsorption by Poly(ethylene glycol) Based Coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *202*, 507-517.
91. Gerlowski L. E.; Jain R. K. Microvascular Permeability of Normal and Neoplastic Tissues. *Microvascular Res.* **1986**, *305*, 288-305.
92. Matsumura Y.; Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392.

93. Rademacher P. Chemische Carcinogene. *Chem. Unserer Zeit* **1975**, 9, 79-84.
94. Janning W.; Knust E. *Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungs-genetik*. Thieme: Stuttgart, **2008**.
95. Ljungkvist A. S. E.; Bussink J.; Kaanders J. H. A. M.; van der Kogel A. J. Dynamics of Tumor Hypoxia Measured with Bioreductive Hypoxic Cell Markers. *Radiat. Res.* **2007**, 167, 127-145.
96. Holm E. *Stoffwechsel und Ernährung bei Tumorkrankheiten: Analysen und Empfehlungen*. Thieme: Stuttgart, **2007**.
97. Yu M. K.; Park J.; Jon S. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy. *Theranostics* **2012**, 2, 3-44.
98. Harris A. L. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 38-47.
99. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1995**, 1, 27-31.
100. Jain R. K. Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. *J. Clin. Oncol.* **2013**, 31, 2205-2218.
101. Jain R. K. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* **2005**, 307, 58-62.
102. Fukumura D.; Jain R. K. Imaging angiogenesis and the microenvironment. *APMIS* **2008**, 116, 695-715.
103. Chitneni S. K.; Palmer G. M.; Zalutsky M. R.; Dewhirst M. W. Molecular Imaging of Hypoxia. *J. Nucl. Med.* **2011**, 52, 165-168.
104. Pacheco-Torres J.; López-Larrubia P.; Ballesteros P.; Cerdán S. Imaging tumor hypoxia by Magnetic Resonance methods. *NMR Biomed.* **2011**, 24, 1-16.
105. Tannock I. F.; Rotin D. Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Res.* **1989**, 49, 4373-4384.
106. Dang C. V.; Semenza G. L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 68-72.
107. Helmlinger G.; Yuan F.; Dellian M.; Jain R. K. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* **1997**, 3, 177-182.
108. Lee J. E.; Lee D. J.; Lee N.; Kim B. H.; Choi S. H.; Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for pH controlled drug release and dual modal imaging. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 16869-16872.
109. Padera T. P.; Stoll B. R.; Tooredman J. B.; Capen D.; di Tomaso E.; Jain R. K. Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* **2004**, 427, 695.
110. Jain R. K.; Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, 7, 653-664.
111. Goel S.; Duda D. G.; Xu L.; Munn L. L.; Boucher Y.; Fukumura D.; Jain K. R. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* **2011**, 91, 1071-1121.
112. Jain R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* **2001**, 7, 987-989.
113. Dvorak H. F.; Brown L. F.; Detmar M.; Dvorak A. M. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvasculatur Hyperpermeability, and Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **1995**, 146, 1029-1039.

114. Hobbs S.; Wayne L. M.; Yuan F.; Roberts W. G.; Griffith L.; Torchilin V. P.; Jain K. R. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4607-4612.
115. Yuan F.; Dellian M.; Fukumura D.; Leunig M.; Berk D. A.; Torchilin V. P.; Jain R. K. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3752-3757.
116. Cabral H.; Matsumoto Y.; Mizuno K.; Chen Q.; Murakami M.; Kimura M.; Terada Y.; Kano M. R.; Miyazono K.; Uesaka M.; Nishiyama N.; Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815-823.
117. Dellian M.; Yuan F.; Trubetsky V. S.; Torchilin V. P.; Jain K. R. Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 1513-1518.
118. Krasnici S.; Werner A.; Eichhorn M. E.; Schmitt-Sody M.; Pahernik S. A.; Sauer B.; Schulze B.; Teifel M.; Michaelis U.; Naujoks K.; Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 561-567.
119. Stylianopoulos T.; Soteriou K.; Fukumura D.; Jain R. K. Cationic Nanoparticles Have Superior Transvascular Flux into Solid Tumors: Insights from a Mathematical Model. *Ann. Biomed. Eng.* **2013**, *41*, 68-77.
120. Campbell R. B.; Fukumura D.; Brown E. B.; Mazzola L. M.; Izumi Y.; Jain R. K.; Torchilin V. P.; Munn L. L. Cationic Charge Determines the Distribution of Liposomes between the Vascular and Extravascular Compartments of Tumors. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6831-6836.
121. Stylianopoulos T.; Poh M. Z.; Insin N.; Bawendi M. G.; Fukumura D.; Munn L. L.; Jain R. K. Diffusion of Particles in the Extracellular Matrix: The Effect of Repulsive Electrostatic Interactions. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1342-1349.
122. Stylianopoulos T.; Martin J. D.; Chauhan V. P.; Jain S. R.; Diop-Frimpong B.; Bardeesy N.; Smith B. L.; Ferrone C. R.; Hornicek F. J.; Boucher Y.; Munn L. L.; Jain R. K. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15101-15108.
123. Salmen S. C. *Untersuchungen zur Anreicherung von PEG-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln im Tumorgewebe*. Diplomarbeit an der Universität Hamburg **2011**.
124. Pollard J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 71-78.
125. Condeelis J.; Pollard J. W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* **2006**, *124*, 263-266.
126. Allen T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 750-763.
127. Algar W. R.; Prasuhn D. E.; Stewart M. H.; Jennings T. L.; Blanco-Canosa J. B.; Dawson P. E.; Medintz I. L. The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 825-858.
128. Chen L. X.; Rajh T.; Wang Z.; Thurnauer M. C. XAFS Studies of Surface Structures of TiO₂ Nanoparticles and Photocatalytic Reduction of Metal Ions. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10688-10697.
129. Scott A. M.; Wolchok J. D.; Old L. J. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 278-287.

130. Wiley D. T.; Webster P.; Gale A.; Davis M. E. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *PNAS* **2013**, *110*, 8662-8667.
131. Hong S.; Leroueil P. R.; Majoros I. J.; Orr B. G.; Baker J. R. Jr.; Holl M. M. B. The Binding Avidity of a Nanoparticle-Based Multivalent Targeted Drug Delivery Platform. *Chemistry and Biology* **2007**, *14*, 107-115.
132. Veiseh O.; Gunn J.; Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *62*, 284-304.
133. Neouze M.-A.; Schubert U. Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands. *Monatsh. Chem.* **2008**, *139*, 183-195.
134. Lavrich D. J.; Wetterer S. M.; Bernasek S. L.; Scoles G. Physisorption and Chemisorption of Alkanethiols and Alkyl Sulfides on Au. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3456-3465.
135. Ju H.; Zhang X.; Wang J. u.a. *NanoBiosensing: Principles, Development and Application*. Springer: New York, Dordrecht, Heidelberg, London, **2011**.
136. Nobs L.; Buchegger F.; Gurny R.; Allémann E. Current Methods for Attaching Targeting Ligands to Liposomes and Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1980-1992.
137. Suwa T.; Ozawa S.; Ueda M.; Ando N.; Kitajima M. Magnetic resonance imaging of esophageal squamous cell carcinoma using magnetite particles coated with anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int. J. Cancer* **1998**, *75*, 626-634.
138. Qian X.; Peng X.-H.; Ansari D. O.; Yin-Goen Q.; Chen G. Z.; Shin D. M.; Yang L.; Young A. N.; Wang M. D.; Nie S. *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83-90.
139. Yokoyama T.; Tam J.; Kuroda S.; Scott A. W.; Aaron J.; Larson T.; Shanker M.; Correa A. M.; Kondo S.; Roth J. A.; Sokolov K.; Ramesh R. EGFR-Targeted Hybrid Plasmonic Magnetic Nanoparticles Synergistically Induce Autophagy and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*.
140. Zhang Y.; Kohler N.; Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.
141. Das M.; Mishra D.; Maiti T. K.; Basak A.; Pramanik P. Bio-functionalization of magnetite nanoparticles using an aminophosphonic acid coupling agent: new, ultradispersed, iron-oxide folate nanoconjugates for cancer-specific targeting. *Nanotechnol.* **2008**, *19*.
142. Daniels T. R.; Delgado T.; Rodriguez J. A.; Helguera G.; Penichet M. L. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 144-158.
143. Daldrup-Link H.; Rudelius M.; Oostendorp R. A. J.; Settles M.; Piontek G.; Metz S.; Rosenbrock H.; Keller U.; Heinzmann U.; Rummeny E. J.; Schlegel J.; Link T. M. Targeting of Hematopoietic Progenitor Cells with MR Contrast Agents. *Radiology* **2003**, *228*, 760-767.
144. Skikne B. S. Serum transferrin receptor. *Am. J. Hematol.* **2008**, *83*, 872-875.
145. Cai W.; Chen X. Multimodality Molecular Imaging of Tumor Angiogenesis. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 113-129.
146. Nasongkla N.; Bey E.; Ren J.; Ai H.; Khemtong C.; Guthi J. S.; Chin S.-F.; Sherry A. D.; Boothman D. A.; Gao J. Multifunctional Polymeric Micelles as Cancer-Targeted, MRI-Ultrasensitive Drug Delivery Systems. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2427-2430.

147. Landen C. N.; Kim T.; Lin Y. G.; Merritt W. M.; Kamat A. A.; Han L. Y.; Spannuth W. A.; Nich A. M.; Jennings N. B.; Kinch M. S.; Tice D.; Sood A. K. Tumor-Selective Response to Antibody-Mediated Targeting of $\alpha_v\beta_3$ Integrin in Ovarian Cancer. *Neoplasia* **2008**, *10*, 1259-1267.
148. Herlyn D.; Herlyn M.; Stepkowski Z.; Koprowski H. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur. J. Immunol.* **1979**, *9*, 657-659.
149. Winter M. J.; Nagtegaal I. D.; van Krieken J. H. J. M.; Litvinov S. V. The Epithelial Cell Adhesion Molecule as a Morphoregulatory Molecule Is a Tool in Surgical Pathology. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2139-2148.
150. Momburg F.; Moldenhauer G.; Hämmerling J.; Möller P. Immunohistochemical Study of the Expression of a Mr. 34,000 Human Epithelium-specific Surface Glycoprotein in Normal and Malignant Tissues. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2883-2891.
151. Litvinov S. V.; Velders M. P.; Bakker H. A. M.; Fleuren G. J.; Warnaar S. O. Ep-CAM: A Human Epithelial Antigen Is a Homophilic Cell-Cell Adhesion Molecule. *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 437-446.
152. Gires O.; Kieu C.; Fix P.; Schmitt B.; Münz M.; Wollenberg B.; Zeidler R. Tumor Necrosis Factor α Negatively Regulates the Expression of the Carcinoma-Associated Antigen Epithelial Cell Adhesion Molecule. *Cancer* **2001**, *92*, 620-628.
153. Litvinov S. V.; van Driel W.; van Rhijn C. M.; Bakker H. A. M.; van Krieken H.; Fleuren G. J.; Warnaar S. O. Expression of Ep-CAM in Cervical Squamous Epithelia Correlates with an Increased Proliferation and the Disappearance of Markers for Terminal Differentiation. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 865-875.
154. Pauli C.; Münz M.; Kieu C.; Mack B.; Breinl P.; Wollenberg B.; Lang S.; Zeidler R.; Gires O. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett.* **2003**, *193*, 25-32.
155. De Jonge M. W. A.; Kosterink J. G. W.; Bin Y. Y.; Bulte J. W. M.; Kengen R. A. M.; Piers D. A.; Hauw The T.; de Leij L. Radioimmuno-detection of Human Small Cell Lung Carcinoma Xenografts in the Nude Rat Using ^{111}In -labelled Monoclonal Antibody MOC-31. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A*, 1885-1890.
156. Lu A.-H.; Salabas E. L.; Schüth F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222-1244.
157. Yu W. W.; Falkner J. C.; Yavuz C. T.; Colvin V. L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem. Commun.* **2004**, 2306-2307.
158. Sun S.; Zeng H.; Robinson D. B.; Raoux S.; Rice P. M.; Wang S. X.; Li G. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279.
159. Jana N. R.; Chen Y.; Peng X. Size- and Shape-Controlled Magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) Oxide Nanocrystals via a Simple and General Approach. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3931-3935.
160. Sun S.; Zeng H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205.
161. Freund B. *Synthese und in vivo Charakterisierung von ^{59}Fe -markierten, monodispersen, superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln*. Dissertation der Universität Hamburg, **2012**.
162. Dinegar H.; LaMer V. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847-4854.

163. Park J.; An K.; Hwang Y.; Park J.-G.; Noh H.-J.; Kim J.-Y.; Park J.-H.; Hwang N.-M.; Hyeon T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891-895.
164. Murray C. B.; Sun S.; Gaschler W.; Doyle H.; Betley T. A.; Kagan C. R. Colloidal synthesis of nanocrystals and nanocrystal superlattices. *IBM J. Res. Dev.* **2001**, *45*, 47-56.
165. Bronstein L. M.; Huang X.; Retrum J.; Schmucker A.; Pink M.; Stein B. D.; Dragnea B. Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3624-3632.
166. Park J.; Joo J.; Kwon S. G.; Jang Y.; Hyeon T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4630-4660.
167. Yin Y.; Alivisatos A. P. Colloidal nanocrystal synthesis and the organic - inorganic interface. *Nature* **2005**, *437*, 664-670.
168. Kwon S. G.; Piao Y.; Park J.; Angappane S.; Jo Y.; Hwang N.-M.; Park J.-G.; Hyeon T. Kinetics of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystal Formation by "Heating-Up" Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12571-12584.
169. Schulz F. *Untersuchungen zur Synthese, PEGylierung und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln für medizinische Anwendungen*. Dissertation der Universität Hamburg, **2014**.
170. Willis A. L.; Turro N. J.; O'Brien S. Spectroscopic Characterization of the Surface of Iron Oxide Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5970-5975.
171. Xie J.; Peng S.; Brower N.; Pourmand N.; Wang S. X.; Sun S. One-pot synthesis of monodisperse iron oxide nanoparticles for potential biomedical applications. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 1003-1014.
172. Muthukumar T.; Philip J. Enhanced thermal stability of phosphate capped magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2014**, *115*, 224304.
173. Sperling R. A.; Liedl T.; Duhr S.; Kudera S.; Zanella M.; Lin C.-A. J.; Chang W. H.; Braun D.; Parak W. J. Size Determination of (Bio)conjugated Water-Soluble Colloidal Nanoparticles: A Comparison of Different Techniques. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11552-11559.
174. Zahng L.; He R.; Gu H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253*, 2611-2617.
175. Hoa L. T. M.; Dung T. T.; Dahn T. M.; Due N. H.; Chein D. M. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles coated with polyethylene glycol. *J. Phys. Conf. Ser.* **2009**, *187*, 012048.
176. Bin Na H.; Lee I. S.; Seo H.; Park Y. I.; Lee J. H.; Kim S.-W.; Hyeon T. Versatile PEG-derivatized phosphine oxide ligands for water-dispersible metal oxide nanocrystals. *Chem. Commun.* **2007**, 5167-5169.
177. White M. A.; Johnson J. A.; Koberstein J. T.; Turro N. J. Toward the Syntheses of Universal Ligands for Metal Oxide Surfaces: Controlling Surface Functionality through Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11356-11357.
178. Sahoo Y.; Pizem H.; Fried T.; Golodnitsky D.; Burstein L.; Sukenik C. N.; Markovich G. Alkyl Phosphonate/Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids. *Langmuir* **2001**, *17*, 7907-7911.
179. Krueger K. M.; Al-Somali A. M.; Mejia M.; Colvin V. L. The hydrodynamic size of polymer stabilized nanocrystals. *Nanotechnol.* **2007**, *18*, 475709.

180. Gref R.; Lück M.; Quellec P.; Marchand M.; Dellacherie E.; Harnisch S.; Blunk T.; Müller R. H. "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 Surf. B Biointerfaces* **2000**, *18*, 301-313.
181. Knop K.; Hoogenboom R.; Fischer D.; Schubert U. S. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288-6308.
182. Tromsdorf U. I.; Bruns O. T.; Salmen S. C.; Beisiegel U.; Weller H. A Highly Effective, Nontoxic T1 MR Contrast Agent Based on Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4434-4440.
183. Thiry M.; Boldt K.; Nikolic M. S.; Schulz F.; Ijeh M.; Panicker A.; Vossmeier T.; Weller H. Fluorescence Properties of Hydrophilic Semiconductor Nanoparticles with Tridentate Polyethylene Oxide Ligands. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4965-4973.
184. Matsuura H.; Fukuhara K. Vibrational Spectroscopic Studies of Conformation of Poly(oxyethylene). II. Conformation-Spectrum Correlations. *J. Polym. Sci. Part B* **1986**, *24*, 1383-1400.
185. Bartl F.; Urjasz H.; Brzezinski B. FT-IR study of pyridoxal phosphate. *J. Mol. Struct.* **1998**, *441*, 97-101.
186. Khoee S.; Kavand A. A new procedure for preparation of polyethylene glycol-grafted magnetic iron oxide nanoparticles. *J. Nanostruct. Chem.* **2014**, *4*, 111.
187. Hesse M.; Meier H.; Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme: Stuttgart, **2005**.
188. Beckert R.; Fanghänel E.; Habicher W. D.; Metz P.; Pavel D.; Schwetlick K. u.a. *Organikum*. Wiley: Weinheim, **2004**.
189. Cao P.; Tong L.; Hou Y.; Zhao G.; Guerin G.; Winnik M. A.; Nitz M. Improving Lanthanide Nanocrystal Colloidal Stability in Competitive Aqueous Buffer Solutions using Multivalent PEG-Phosphonate Ligands. *Langmuir* **2012**, *28*, 12861-12870.
190. Wang M.; Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 90-99.
191. Hill R. J. Hydrodynamics and electrokinetics of spherical liposomes with coatings of terminally anchored poly(ethylene glycol): Numerically exact electrokinetics with self-consistent mean-field polymer. *Phys. Rev. E* **2004**, *70*, 051406.
192. Engstler M.; Thilo L.; Weise F.; Grünfelder C. G.; Schwarz H.; Boshart M.; Overath P. Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1105-1115.
193. Shukla N.; Liu C.; Jones P. M.; Weller D. FTIR study of surfactant bonding to FePt nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2003**, *266*, 178-184.
194. Gasgnier M. IR spectra of some potassium carboxylates. *J. Mater. Sci. Lett.* **2001**, *20*, 1259-1262.
195. Cara C.; Musinu A.; Mameli V.; Ardu A.; Niznansky D.; Bursik J.; Scorciapino M. A.; Manzo G.; Cannas C. Dialkylamide as Both Capping Agent and Surfactant in a Direct Solvothermal Synthesis of Magnetite and Titania Nanoparticles. *Cryst Growth Des.* **2015**, *15*, 2364-2372.
196. Hou Y.; Kondoh H.; Shimojo M.; Sako E. O.; Ozaki N.; Kogure T.; Ohta T. Inorganic Nanocrystal Self-Assembly via the Inclusion Interaction of β -cyclodextrins: Toward 3D Spherical Magnetite. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4845-4852.

197. Klokkenburg M.; Hilhorst J.; Ern  B. H. Surface analysis of magnetite nanoparticles in cyclohexane solutions of oleic acid and oleylamine. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *43*, 243-248.
198. Cannas C.; Musinu A.; Ardu A.; Orr  F.; Peddis D.; Casu M.; Sanna R.; Angius F.; Diaz G.; Piccaluga G. CoFe₂O₄ and CoFe₂O₄/SiO₂ Core/Shell Nanoparticles: Magnetic and Spectroscopic Study. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 3353-3361.
199. Susuki M.; Shimanouchi T. Infrared and Raman Spectra of Succinic Acid Crystal. *J. Mol. Spectrosc.* **1968**, *28*, 394-410.
200. Xu X. Q.; Shen H.; Xu J. R.; Li X. J. Aqueous-based magnetite magnetic fluids stabilized by surface small micelles of oleoylsarcosine. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *221*, 430-436.
201. Kirwan L. J.; Fawell P. D.; van Bronswijk W. *In Situ* FTIR-ATR Examination of Poly(acrylic acid) Adsorbed onto Hematite at Low pH. *Langmuir* **2003**, *19*, 5802-5807.
202. Specht C. H.; Frimmel F. H. An *in situ* ATR-FTIR study on the adsorption of dicarboxylic acids onto kaolinite in aqueous suspensions *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 5444-5449.
203. Roonasi P.; Holmgren A. A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nano-particle surface. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 5891-5895.
204. Tejedor-Tejedor M. I.; Anderson M. A. Protonation of Phosphate on the Surface of Goethite As Studied by CIR-FTIR and Electrophoretic Mobility. *Langmuir* **1990**, *6*, 602-611.
205. Chen C.-T.; Chen Y.-C. Fe₃O₄/TiO₂ Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO₂ Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5912-5919.
206. Yee C.; Kataby G.; Ulman A.; Prozorov T.; White H.; King A.; Rafailovich M.; Sokolov J.; Gedanken A. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **1999**, *15*, 7111-7115.
207. Textor M.; Ruiz L.; Hofer R.; Rossi A.; Feldmann K.; H hner G.; Spencer N. D. Structural Chemistry of Self-Assembled Monolayers of Octadecylphosphoric Acid on Tantalum Oxide Surfaces. *Langmuir* **2000**, *16*, 3257-3271.
208. García-Jimeno S.; Estelrich J. Ferrofluid based on polyethylene glycol-coated iron oxide nanoparticles: Characterization and properties. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *420*, 74-81.
209. Bernson A.; Lindgren J.; Huang W.; Frech R. Coordination and conformation in PEO, PEGM and PEG systems containing lithium or lanthanum triflate. *Polymer* **1995**, *36*, 4471-4478.
210. Koenig L.; Angood A. C. Spectra of Poly(ethylene Glycols) in Solution. *J. Polym. Sci. Part A* **1970**, *8*, 1787-1796.
211. Atkins P. W. *Physikalische Chemie*. Wiley: Weinheim, **2001**.
212. Weishaupt D.; K chli V. D.; Marincek B. *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung*. Springer: Berlin, Heidelberg, **2014**.
213. Lauffer R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901-927.
214. Caravan P.; Ellison J. J.; McMurry T. J.; Lauffer R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.
215. Jun Y.-W.; Seo J.-W.; Cheon J. Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 179-189.

-
216. Weissleder R.; Stark D. D.; Engelstad B. L.; Bacon B. R.; Compton C. C.; White D. L.; Jacobs P.; Lewis J. Superparamagnetic Iron Oxide: Pharmacokinetics and Toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **1989**, *152*, 167-173.
217. Chen C.; Paw B. H. Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1823*, 1459-1467.
218. Lewinski N.; Colvin V.; Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **2008**, *4*, 26-49.
219. Valko M.; Morris H.; Cronin M. T. D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161-1208.
220. Van den Bos E. J.; Wagner A.; Mahrholdt H.; Thompson R. B.; Morimoto Y.; Sutton B. S.; Judd R. M.; Taylor D. A. Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Transplantation* **2003**, *12*, 743-756.
221. Nuñez M. T.; Garate M. A.; Arredondo M.; Tapia V.; Muñoz P. The cellular mechanisms of body iron homeostasis. *Biol. Res.* **2000**, *33*, 133-142.
222. Auffan M.; Achouak W.; Rose J.; Roncato M.-A.; Chanéac C.; Waite D. T.; Masion A.; Woicik J. C.; Wiesner M. R.; Bottero J.-Y. Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 6730-6735.
223. Feldschuh J.; Enson Y. Prediction of the Normal Blood Volume. Relation of Blood Volume to Body Habitus. *Circulation* **1977**, *56*, 605-612.
224. Tischleder A. *Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials und der Apoptoserate peripherer mononukleärer Blutzellen HIV-positive, bisher nicht antiretroviral behandelte Patienten*. Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, **2008**.
225. John S. E. *In-vitro-Untersuchung zur Schutzwirkung natürlicher und synthetischer Huminsäuren gegenüber UVB-Strahlenschäden an humanen Linsenepithelzellen*. Dissertation der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, **2010**.
226. Zhang Q.-L.; Du L.-C.; Weng Y.-X.; Wang L.; Chen H.-Y.; Li J.-Q. Particle-Size-Dependent Distribution of Carboxylate Adsorption Sites on TiO₂ Nanoparticle Surfaces: Insights into the Surface Modification of Nanostructured TiO₂ Electrodes. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 15077-15083.
227. Diehl K.-H.; Hull R.; Morton D.; Pfister R.; Rabemampianina Y.; Smith D.; Vidal J.-M.; van der Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.* **2001**, *21*, 5-23.
228. Banerjee S. S.; Chen D.-H. Multifunctional pH-sensitive magnetic nanoparticles for simultaneous imaging, sensing and targeted intracellular anticancer drug delivery. *Nanotechnol.* **2008**, *19*, 505104.
229. Yang Q.; Wang S.; Fan P.; Wang L.; Di Y.; Lin K.; Xiao F.-S. pH-Responsive Carrier System Based on Carboxylic Acid Modified Mesoporous Silica and Polyelectrolyte for Drug Delivery. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5999-6003.
230. Freyschmidt J.; Hahn D. (Hrsg.) *Handbuch diagnostische Radiologie: Kardiovaskuläres System*. Springer: Berlin, Heidelberg, **2007**.
231. Berg L. M.; Tymoczko J. L.; Stryer L. *Stryer Biochemie*. Spektrum: München, **2007**.
232. Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: San Diego, **2008**.
233. Denizli A.; Rad A. Y.; Pişkin E. Protein A immobilized polyhydroxyethylmethacrylate beads for affinity sorption of human immunoglobulin G. *J. Chromatogr. B* **1995**, *668*, 13-19.

-
234. Yavuz H.; Özden K.; Kin E. P.; Denizli A. Concanavalin A Binding on PHEMA Beads and Their Interactions with Myeloma Cells. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **2009**, *46*, 163-169.
235. Jurado L. A.; Mosley J.; Jarrett H. W. Cyanogen bromide activation and coupling of ligands to diol-containing silica for high-performance affinity chromatography: Optimization of conditions. *J. Chromatogr. A* **2002**, *971*, 95-104.
236. Kohn J.; Wilchek M. Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromide. *Enzyme Microb. Technol.* **1982**, *4*, 161-163.
237. Sletten E. M.; Bertozzi C. R. Bioorthogonale Chemie - oder: in einem Meer aus Funktionalität nach Selektivität fischen. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108-7133.
238. Plattner H.; Hentschel J. *Zellbiologie*. Thieme: Stuttgart, **2002**.
239. Markwell M. A. K. A new solid-state reagent to iodinate proteins. *Anal. Biochem.* **1982**, *125*, 427-432.
240. Rahm H.; Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum: Heidelberg, **2009**.
241. Schumacher T. N. M.; Tsomides T. J. *In vitro* radiolabeling of peptides and proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **1995**, 3.3.
242. Mohnike W.; Hör G.; Hertel A.; Schelbert H. (Hrsg.) *PET/CT-Atlas: Interdisziplinäre PET/CT- und PET/MR-Diagnostik und Therapie*. Springer: Berlin, Heidelberg, **2016**.
243. Jennissen H. P. Cyanogen Bromide and Tresyl Chloride Chemistry Revisited: The Special Reactivity of Agarose as a Chromatographic and Biomaterial Support for Immobilizing Novel Chemical Groups *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8*, 116-124.
244. Joshi P. P.; Yoon S. J.; Hardin W. G.; Emelianov S.; Sokolov K. V. Conjugation of Antibodies to Gold Nanorods through Fc Portion: Synthesis and Molecular Specific Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 878-888.
245. Wilhelm S.; Tavares A. J.; Dai O.; Ohta S.; Audet J.; Dvorak H. F.; Chan W. C. W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Rev.* **2016**, *1*, 1-12.
246. Huberman A.; Pérez C. Nonheme iron determination. *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 375-378.

8 Anhang

8.1 Sicherheit

8.1.1 Verwendete Chemikalien

In der Tabelle 8.1 sind die verwendeten Chemikalien mit Sicherheits- und Gefahrenhinweisen sowie GHS-Kennzeichnung aufgeführt.

Tabelle 8.1 : Verwendete Chemikalien.

Substanz	GHS-Kennung	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	GHS02, GHS07	225, 319, 336 EUH: 066	210, 261, 305 + 351 + 338
Acetonitril	GHS02, GHS07	225, 302 + 312 + 332, 319	210, 280, 305 + 351 + 338
Ascorbinsäure	-	-	-
Bathophenantrolin	-	-	-
bovines Serumalbumin	-	-	-
Bromcyan	GHS05, GHS06, GHS09	300 + 310 + 330, 314, 410	260, 264, 273, 280, 284, 301 + 310
Chloroform	GHS06, GHS07	302, 315, 319, 331, 336, 351, 361d, 372	261, 281, 305 + 351 + 338, 311
Chloroform-d	GHS06, GHS07	302, 315, 319, 331, 351, 361, 372	261, 281, 351 + 338, 311
Diethylether	GHS02, GHS07	224, 302, 336	210, 261
Eisen(III)chlorid	GHS05, GHS07	290, 302, 315, 318	280, 305, 351 + 338
Eisen(III)oxidhydroxid	-	-	-
Essigsäure [96 %]	GHS02, GHS05	226, 314	280, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 383, 301 + 330 + 331
Ethanol	GHS02	225	210
Fetales Kälberserum	-	-	-
Hexan	GHS03, GHS07, GHS08, GHS09	225, 304, 315, 336, 361f, 373, 411	210, 261, 273, 301 + 310, 308 + 313, 331
Mercaptoethanol	GHS05, GHS06, GHS08, GHS09	301 + 331, 310, 315, 317, 318, 373, 410	261, 280, 301 + 310 + 330, 302 + 352 + 310, 305 + 351 + 338 + 310, 403 + 233
Natriumacetat	-	-	-

Substanz	GHS-Kennung	H-Sätze	P-Sätze
Natriumazid	GHS06, GHS08, GHS09	300 + 310, 373, 410	273, 280, 301 + 310 + 330, 302 + 352 + 310, 391, 501
Natriumhydroxid-Lösung [1 M]	GHS05	290, 314	280, 303 + 361 + 353, 303 + 340 + 310, 305 + 351 + 383
Natriumsulfat	-	-	-
N-Ethyl-diisopropylamin	GHS02, GHS05, GHS06	225, 302, 318, 331, 335	210, 261, 280, 305 + 351 + 338, 311
1-Octadecen	GHS08	304	301 + 310, 331
Ölsäure	GHS07	315	-
PBS	-	-	-
Phosphoroxchlorid	GHS05, GHS06, GHS08	302, 314, 330, 372 EUH: 014, 029	280, 301 + 330 + 331, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310
Polyethylenglykol-1000-Monoacrylat	-	-	-
Salpetersäure [65 %]	GHS03, GHS05	272, 290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310
Salzsäure [35-37 %]	GHS05, GHS07	314, 335	261, 280, 305 + 351 + 338, 310
Tetrahydrofuran	GHS02, GHS07, GHS08	225, 319, 335, 351	210, 261, 281, 305 + 351 + 338
Toluol	GHS02, GHS07, GHS08	225, 304, 315, 336, 361d, 373	210, 261, 281, 301 + 351 + 338
Triethylamin	GHS02, GHS05, GHS06	225, 302, 311 + 331, 314, 335	210, 261, 280, 303 + 361, 353, 305 + 351 + 338, 370 + 378
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	-	-	-
Triton® X-100	GHS05, GHS07	302, 318	280, 305 + 351 + 338, 313

8.1.2 GHS-Kennzeichnung (Gefahrenpiktogramme, Sicherheits- und Gefahrenhinweise)

In der Tabelle 8.2 sind die GHS-Piktogramme mit Kodierung, Signalwort und Gefahrenklasse angegeben.

Tabelle 8.2 : GHS-Piktogramme.

Gefahren-piktogramm	GHS-Kodierung	Signalwort	Gefahrenklasse
	GHS01	Gefahr	instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	GHS02	Gefahr/Achtung	entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzliche, pyrophor, Organische Peroxide
	GHS03	Gefahr/Achtung	entzündend (oxidierend) wirkend
	GHS04	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verflüssigte, gelöste Gase
	GHS05	Gefahr/Achtung	auf Metall korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	GHS06	Gefahr	akute Toxizität
	GHS07	Achtung	
	GHS08	Gefahr/Achtung	diverse Gesundheitsgefahren
	GHS09	Achtung	gewässergefährdend

Gefahrenhinweise (H-Sätze, hazard statements)**H200-Reihe: Physikalische Gefahren**

- H200 Instabil; explosiv.
- H201 Explosiv; Gefahr der Massenexplosion.
- H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
- H220 Extrem entzündbares Gas.
- H221 Entzündbares Gas.
- H222 Extrem entzündbares Aerosol.
- H223 Entzündbares Aerosol.
- H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
- H242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -Verletzungen verursachen.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein

H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.

- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H360 D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 Fd Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H361 f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H361 d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361 fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H400-Reihe: Umweltgefahren

- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.

Ergänzende Gefahrenmerkmale und Kennzeichnungselemente (EUH-Sätze)

- EUH001 In trockenem Zustand explosiv.
- EUH006 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- EUH014 Reagiert heftig mit Wasser.
- EUH018 Kann bei Verwendung explosionsfähige / entzündbare Dampf /Luft-Gemische bilden.
- EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- EUH044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
- EUH029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- EUH031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- EUH059 Die Ozonschicht schädigend.
- EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- EUH070 Giftig bei Berührung mit den Augen.
- EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.
- EUH201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.
- EUH201 A Achtung! Enthält Blei.
- EUH202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- EUH203 Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH206 Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
- EUH207 Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
- EUH208 Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH209 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
- EUH209 A Kann bei Verwendung entzündbar werden.
- EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
- EUH401 Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

Sicherheitshinweise (P-Sätze, precautionary statements)**P100-Reihe: Allgemeines**

- P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
- P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

P200-Reihe: Prävention

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P221 Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.
- P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.
- P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
- P230 Feucht halten mit
- P231 Unter inertem Gas handhaben.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung /... verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
- P250 Nicht schleifen / stoßen /.../ reiben.
- P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
- P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- P282 Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
- P283 Schwer entflammbar / flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 Atemschutz tragen.

- P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
- P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
- P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P300-Reihe: Reaktion

- P301 Bei Verschlucken:
- P302 Bei Berührung mit der Haut:
- P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
- P304 Bei Einatmen:
- P305 Bei Kontakt mit den Augen:
- P306 Bei kontaminierter Kleidung:
- P307 Bei Exposition:
- P308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:
- P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:
- P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:

- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr bei Brand.
- P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
- P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P378 ... zum Löschen verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301 + P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
- P302 + P334 Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P304 + P341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P307 + P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat Einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P309 + P311 Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen /nassen Verband anlegen.
- P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P400-Reihe: Aufbewahrung

- P401 ... aufbewahren.
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P406 In korrosionsbeständigem /... Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P411 Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ... aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.
- P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
- P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren
- P402 + P404 In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 + P233 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
- P411 + P235 Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.

P500-Reihe: Entsorgung

- P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

8.2 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

8.3 Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften:

- Carambia A.; Schwinge D.; Huber S.; Schramm C.; Lüth S.; Lohse A. W.; Freund B.; Heine M.; Nielsen P.; Heeren J.; Bruns O. T.; Reimer R.; **Salmen S. C.**; Weller H.; Ittrich H.; Waurisch C.; Eychmüller A.; Wraith D. C.; Korn T.; Herkel J. Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice, *Journal of Hepatology* **2015**, *62*, 1349-1356.
- Bargheer D.; Nielsen J.; Gébel G.; Heine M.; **Salmen S. C.**; Stauber R.; Weller H.; Heeren J.; Nielsen P. The fate of a designed protein corona on nanoparticles in vitro and in vivo. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 36-46.
- Jung C.; Kaul M. G.; Bruns O. T.; Ducic T.; Freund B.; Heine M.; Reimer R.; Meents A.; **Salmen S. C.**; Weller H.; Nielsen P.; Adam G.; Heeren J.; Ittrich H. Intraperitoneal Injection Improves the Uptake of Nanoparticle Labeled HDL to Atherosclerotic Plaques Compared to Intravenous Injection: A Multimodal Imaging Study in ApoE Knockout Mice, *Circulation: Cardiovascular Imaging* **2014**, *7*, 303-311.
- Freund B.; Tromsdorf U. I.; Bruns O. T.; Heine M.; Giemsa A.; Bartelt A.; **Salmen S. C.**; Raabe N.; Heeren J.; Ittrich H.; Reimer R.; Hohenberg H.; Schumacher U.; Weller H.; Nielsen P. A Simple and Widely Applicable Method to ⁵⁹Fe-Radiolabel Monodisperse Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for In Vivo Quantification Studies, *ACS Nano* **2012**, *6*, 7318-7325.
- Tromsdorf U. I.; Bruns O. T.; **Salmen S. C.**; Beisiegel U.; Weller H. A Highly Effective, Nontoxic T1 MR Contrast Agent Based on Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4434-4440.

Patente:

- Herkel J.; Carambia A.; Freund B.; Herren J.; Nielsen P.; Bruns O. T.; Lohse A.; Lüth S.; Weller H.; **Salmen S.** Nanoparticle compositions for generation of regulatory T cells and treatment of autoimmune diseases and other chronic inflammatory conditions, **EP 2591801 (A1) 2013-05-15**

Konferenzbeiträge:

- Vortrag: *Cancer detection using EpCAM-specific iron oxide nanoparticles*
Bunsentagung **2014**, Hamburg
- Vortrag: *Conjugation of iron oxide nanoparticles to a cancer-specific antibody for a highly sensitive MRI cancer detection and characterisation*
Bunsentagung **2013**, Karlsruhe
- Poster: *Iron oxide nanoparticles conjugated to a cancer-specific antibody for a highly sensitive detection*
Nanocon **2012**, Brno

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Horst Weller danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung dieses interessanten Forschungsthemas, sowie die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung von diesem und die gute Betreuung und Unterstützung während der Arbeit.

Prof. Dr. Alf Mews danke ich für die freundliche Übernahme der Aufgabe des Zweitgutachters.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Markus Heine für die vielfältigen Diskussionen, die enorm wertvolle und umfangreiche Unterstützung, die schöne Zusammenarbeit, die motivierenden Worte sowie die Durchsicht dieser Arbeit. Danke für eine wirklich tolle Zeit! Bei Dr. Florian Schulz bedanke ich mich herzlich für das engagierte Korrekturlesen meiner Arbeit und die hilfreichen Anregungen. Dr. Sören Becker möchte ich ganz herzlich für viele hilfreiche Gespräche und die unermüdliche Versorgung mit guten Ratschlägen sowie aufbauenden Worten danken.

Für ihre Hilfe bei organisatorischen und bürokratischen Dingen möchte ich mich bei Beate Kreuzer, Sigrid Zeckert und Martina Krasa bedanken. Ein besonderer Dank gilt hierbei Frau Kreuzer.

Bedanken möchte ich mich auch für die guten Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Jörg Heeren, PD Dr. Dr. Peter Nielsen, Prof. Dr. Udo Schumacher und Prof. Dr. Gerhard Adam. PD Dr. Dr. Peter Nielsen und Prof. Dr. Jörg Heeren danke ich weiterhin für die Möglichkeit umfangreiche experimentelle Arbeiten durchzuführen und die damit verbundene unkomplizierte Bereitstellung zahlreicher Gerätschaften und Materialien.

Dr. Barbara Freund und Dr. Denise Bargheer möchte ich für die Hilfsbereitschaft, die vielen netten Gespräche sowie die vielfältige Unterstützung rund um die Eisenbestimmung mittels AAS danken. Ein herzliches Dankeschön ist auch an Rosemarie Kongi gerichtet, die mir bei Problemen mit dem AAS-Gerät immer hilfreich zur Seite stand. Für die unermüdliche Versorgung mit Zellen möchte ich mich herzlich bei Birgit Henkel bedanken. Ein besonderer Dank gilt weiterhin Anna

Schildt für die unentwegte Zurverfügungstellung des MOC31-Antikörpers, die Durchführung verschiedener experimenteller Arbeiten sowie die angenehme Zusammenarbeit. Dr. Caroline Jung und Dr. Nina Raabe möchte ich für die MRT-Untersuchungen danken.

Stefan Werner danke ich für die Anfertigung der vielen TEM-Aufnahmen sowie Almut Barck für die XRD-Messungen. Bei Charis Schlundt bedanke ich mich für die Durchführung der Toxizitätstests. Ein weiterer Dank gilt der MS-Abteilung des Instituts für Organische Chemie für die Aufnahme der Massenspektren sowie dem NMR-Service des Instituts für Organische Chemie für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Bei allen Mitgliedern des AK Wellers bedanke ich mich für die tolle Stimmung, die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen spannenden Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei meinen lieben Bürokollegen bedanken. Vielen Dank für eine unglaublich schöne, unvergessliche Zeit! Auch meinen Laborkollegen möchte ich für eine tolle Zeit und fröhliche Stunden danken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Sarah Wölper, Friederike Gorris und Dr. Christopher Wolter für ihr immer offenes Ohr, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen wunderschönen und fröhlichen Stunden, die wir auch außerhalb der täglichen Arbeit verbracht haben.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Daniela Stummer für ihre fachliche Unterstützung und viele hilfreiche, schöne, unterhaltsame und auch aufmunternde Gespräche.

Vielen Dank auch an alle Freunde, die bisher noch nicht namentlich genannt wurden, für ihren Zuspruch, ihr Verständnis und die Ablenkung, die sie mir geschenkt haben. Ein ganz besonderer Dank geht hier an meine Schwester Isabel. Danke, dass du immer für mich da bist.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, deren großartige, bedingungslose und unentwegte Unterstützung mein Studium und meine Promotion ermöglicht hat. Vielen Dank für die liebevolle Art, in der ihr diese aufregende Zeit begleitet habt, für eure Geduld, euren Rückhalt und euren Zuspruch, eure Liebe und dafür, dass ihr immer an meiner Seite seid.

8.5 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 31.05.2017

Sunhild Christine Salmen

