

**Synthese und Anwendung von FERR-*b*-PEO stabilisierten
SPIO Partikeln als Kontrastmittelsystem
für die Magnetresonanztomographie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Julia Maier

geboren am 16. August 1978 in Koblenz

Gutachter: Prof. Dr. Karsten Mäder
Prof. Dr. Thomas Groth
Prof. Dr. Markus Antonietti

Halle (Saale), im Juni 2008

Verteidigungsdatum: 17. Oktober 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000015079

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015079>]

Selbstständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 (2) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit

Synthese und Anwendung von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO* Partikeln als Kontrastmittelsystem für die Magnetresonanztomographie

am Max-Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam unter Anleitung von Herrn Prof. Markus Antonietti, und am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder, selbstständig erarbeitet bzw. im Rahmen der angegebenen Kooperationen erhalten habe, und nur die in der Dissertation angegebenen Literaturstellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin habe ich diese Arbeit bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät als Dissertationsschrift vorgelegt.

Berlin, 15. Juni 2008

Julia Maier

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation.....	1
2	Grundlagen	5
2.1	<i>Magnetresonanztomographie (MRT)</i>	5
2.1.1	Magnetismus	5
2.1.2	Physikalische Grundlagen der MRT	10
2.1.3	Aufbau eines Magnetresonanztomographen	14
2.1.4	Kontrastmittel für die MRT.....	15
2.1.4.1	Einführung.....	15
2.1.4.2	Positive und negative Kontrastmittel	16
2.1.4.3	<i>SPIO</i> als Kontrastmittel für die MRT	17
2.2	<i>Nanopartikel</i>	20
2.2.1	Einleitung	20
2.2.2	Synthese von anorganischen Nanopartikeln	20
2.2.2.1	<i>Top-Down</i> und <i>Bottom-Up</i>	20
2.2.2.2	Sol-Gel-Verfahren	21
2.3	<i>Das Eisenspeicherprotein Ferritin</i>	22
2.3.1	Funktion und Vorkommen in der Natur	22
2.3.2	Anwendungen des Proteins in der Chemie	23
3	Methoden.....	25
3.1	<i>Festphasenpeptidsynthese</i>	25
3.2	<i>Mikroskopie</i>	27
3.2.1	Lichtmikroskopie	27
3.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	29
3.3	<i>Dynamische Lichtstreuung</i>	31
4	Synthese von FERR-<i>b</i>-PEO stabilisierten <i>SPIO</i>.....	33
4.1	<i>Grundlegende Idee</i>	33
4.2	<i>Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO)</i>	34
4.2.1	Einführung.....	34
4.2.2	Synthese	34
4.2.3	Ergebnisse	36
4.2.4	Zusammenfassung	41
4.3	<i>Synthese von FERR-<i>b</i>-PEO</i>	42
4.3.1	Einführung.....	42
4.3.2	Wahl der Eisenbindungssequenz.....	43
4.3.3	Festphasenpeptidsynthese von FERR- <i>b</i> -PEO	46
4.3.4	Charakterisierung	47
4.3.5	Zusammenfassung	49
4.4	<i>Synthese von FERR-<i>b</i>-PEO stabilisierten <i>SPIO</i></i>	50
4.4.1	Einführung.....	50
4.4.2	Synthese	50
4.4.3	Charakterisierung	51
4.4.4	Zusammenfassung	59
5	Magnetische Eigenschaften von FERR-<i>b</i>-PEO stabilisierten <i>SPIO</i>	60
5.1	<i>Einführung</i>	60
5.2	<i>Ergebnisse</i>	60
5.3	<i>Zusammenfassung</i>	66

6	In vivo-Anwendung von FERR-<i>b</i>-PEO stabilisierten SPIO	68
6.1	Einführung.....	68
6.2	Verträglichkeitsexperiment an der Ratte.....	69
6.3	Bestimmung der Bluthalbwertszeit in der Ratte.....	70
6.3.1	MRT-Experiment	72
6.3.2	Pharmakologisch	74
6.3.2.1	Auswertung durch Eisenbestimmung (<i>ICP</i>)	74
6.3.2.2	Auswertung durch NMR-Relaxivitätsmessungen.....	76
6.3.3	Vergleich der errechneten Bluthalbwertszeiten	77
6.4	Bestimmung der Leberhalbwertszeit in der Ratte	78
6.4.1	MRT-Experiment	78
6.5	Molekulare und spezifische Bildgebung.....	79
6.5.1	Funktionalisierung mit RGD	80
6.5.2	Schlussfolgerung	83
6.6	Zusammenfassung der <i>in vivo</i> -Versuche	83
7	Zusammenfassung und Ausblick	85
8	Anhang	89
8.1	Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (<i>SPIO</i>).....	89
8.1.1	Kleine Ansätze	89
8.1.2	Große Ansätze	89
8.2	Synthese von <i>FERR-b-PEO</i>	90
8.2.1	Synthese von funktionalisiertem Polymer <i>FERR-b-PEO-NH₂</i>	90
8.2.2	Analytik von <i>FERR-b-PEO</i>	92
8.2.3	Synthese von <i>FERR-b-PEO</i> stabilisierten <i>SPIO</i>	100
8.2.4	Synthese von <i>FERR-b-PEO-NH₂</i> stabilisierten <i>SPIO</i>	100
8.3	<i>In vivo</i> -Experimente	100
8.3.1	Verträglichkeitsexperiment	100
8.3.1.1	Probenvorbereitung	100
8.3.2	Bluthalbwertszeit (<i>MRT</i>)	101
8.3.2.1	Probenvorbereitung	101
8.3.3	Bluthalbwertszeit (pharmakologisch)	102
8.3.3.1	Probenvorbereitung	102
8.3.3.2	Applizierte Dosis und Versuchstiere.....	103
8.3.3.3	Probenvorbereitung für <i>ICP</i>	103
8.3.3.4	Plasmaeisenkonzentration	104
8.3.4	Leberhalbwertszeit (<i>MRT</i>).....	105
8.4	Messparameter.....	105
8.4.1	MALDI-ToF-MS.....	105
8.4.2	¹ H-NMR-Spektroskopie	106
8.4.3	Simulation der Struktur des Polymers.....	106
8.4.4	Röntgendiffraktion	106
8.4.5	Transmissionselektronenmikroskopie	106
8.4.6	Hochauflösende TEM	107
8.4.7	Kraftmikroskopie	107
8.4.8	Dynamische Lichtstreuung.....	107
8.4.9	Zetapotentialmessung	107
8.4.10	Analytische Ultrazentrifugation	107
8.4.11	Thermogravimetrische Analyse	108
8.4.12	Magnetresonanztomographie (<i>MRT</i>).....	108
8.4.13	NMR-Relaxivitätsmessungen.....	108
8.4.14	Mössbauerspektroskopie	108

8.4.15	SQUID.....	108
8.4.16	Elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie.....	108
8.4.17	Hochtemperatur-EPR	109
8.4.18	NMR-Imaging	109
8.4.19	Fluxgate - Magnetometer (Förster Sonde)	109
8.4.20	ICP - AES	109
8.4.21	UV/Vis-Spektroskopie	110
8.5	<i>Abkürzungen</i>	<i>111</i>
9	Danksagung	113
10	Lebenslauf	115
11	Veröffentlichungen	117
12	Literatur	118

1 Einleitung und Motivation

Die rasche Entwicklung der Nanotechnologie innerhalb der letzten 20 Jahre beeinflusst auch zunehmend die Bereiche von Medizin und Pharmazie. Ein breites Spektrum von Anwendungen ergibt sich hier besonders aus der Fähigkeit, nanopartikuläre Therapeutika mit maßgeschneiderten Oberflächeneigenschaften herzustellen [1-4]. Dies wird durch anhaltendes Forschungsinteresse auf diesem Gebiet, aber auch den Erfolg bereits zugelassener Marktprodukte bestätigt.

Ein wichtiges Beispiel sind magnetische Nanopartikel für die spezifische und molekulare Bildgebung. Dabei sind superparamagnetische Eisenoxidpartikel (*SPIO*, *superparamagnetic iron oxides*), bestehend aus Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und -akzeptanz besonders interessant. *SPIO* werden für ihre biomedizinische Anwendung in den Bereichen Hyperthermie, magnetische *Gene Delivery*- und *Drug Delivery*-Systeme, *Tissue Engineering*, Magnetofektion, Zellaufreinigung und Stammzelltherapie intensiv untersucht [3, 5-7]. Den größten Beitrag für die Diagnostik leisten *SPIO* als Kontrastmittel für Magnetresonanztomographie (MRT).

Magnetresonanztomographie ist ein bildgebendes Verfahren zur Untersuchung von weichen Geweben und Organen. Das grundlegende Prinzip beruht auf der Veränderung der Relaxationszeiten (T_1 , T_2 , T_2^*) der Protonenspins des Gewebes im Magnetfeld. Eine erhebliche Verbesserung der Bildqualität erzielt man durch die Verabreichung von Kontrastmitteln, welche die Relaxationszeiten stark beeinflussen und damit den Signal-Rausch-Abstand erhöhen [8, 9].

Kontrastmittel werden bei der einfachen Funktionsdiagnostik, aber auch der gewebespezifischen Darstellung eingesetzt. Hier nutzt man die Verteilung des Kontrastmittels im Körper, die sich besonders aus den physikochemischen Eigenschaften, wie Partikelgröße und Oberflächenbeschaffenheit des Kontrastmittels ergibt. Für die Darstellung von Lebertumoren verwendet man z.B. sehr große, partikuläre Kontrastmittelsysteme, die rasch vom Immunsystem erkannt, und aus der Blutbahn in Zellen des RES (Retikulären Endothelialen Systems) aufgenommen werden. Hierzu gehören die Kupffer'schen Sternzellen im gesunden Lebergewebe. Das gesunde Lebergewebe zeigt im Bild einen veränderten Kontrast. Nach der Verabreichung von *SPIO* Partikeln erscheint es dunkel, während Lebertumoren, mit einer veränderten zellulären Zusammensetzung, hell bleiben. Zur Darstellung der Blutgefäße (Angiographie) hingegen, werden kleinere Kontrastmittelpartikel

eingesetzt, deren Oberfläche so verändert ist, dass die Partikel möglichst lange in der Blutbahn zirkulieren, bevor sie von der Immunabwehr erkannt und abgefangen werden.

Besonders interessant ist jedoch die Entwicklung von Kontrastmittelsystemen für eine molekulare Bildgebung. Hierdurch werden pathogene Veränderungen bereits auf molekularer Ebene diagnostizierbar, was einen wichtigen Zeitgewinn für die Therapie darstellt.

Für die molekulare Bildgebung nutzt man insbesondere das Prinzip des aktiven *Targetings*. Das bedeutet, dass sich das Kontrastmittel ‚aktiv‘, durch eine spezifische Bindung an charakteristische Rezeptoren des Zielgewebes (z.B. Tumor), anreichert. Hierfür muss das Kontrastmittel *Targeting* Funktionalitäten, wie z.B. Antikörpern oder Peptidsequenzen, die diese selektive Bindung ermöglichen, tragen. Zusätzlich sollte es möglichst verzögert von der Immunabwehr erkannt werden, damit sich über die Blutbahn eine für die Bildgebung ausreichende Kontrastmittelmenge am Tumor anreichern kann. Den eigentlichen Kontrast erzeugen in der MRT-Bildgebung generell paramagnetische Verbindungen (z.B. Gadoliniumchelate) und superparamagnetische Spezies (z.B. *SPIO*).

SPIO verhalten sich in einem Magnetfeld wie kleine Magneten, die sich perfekt in Richtung des Feldes ausrichten. Infolgedessen kommt es zu einer lokalen Störung des Magnetfeldes, dem so genannten T_2^* - oder Suszeptibilitätseffekt. Die T_2^* -Relaxationszeit der *Spins* wird stark verkürzt. Die T_1 -Relaxationszeit wird in einem geringeren Ausmaß ebenfalls durch *SPIO* beeinflusst. Um einen starken T_2^* -Effekt zu bewirken, müssen die Partikel ein hohes magnetisches Moment besitzen. Dieses steigt mit zunehmender Partikelgröße. Ein geordnetes Kristallgitter ist eine weitere Voraussetzung für gute magnetische Eigenschaften. Wenn die Eisenoxidpartikel kleiner als eine einzelne ferromagnetische Domäne (ca. 30 nm) sind, dann verhalten sie sich superparamagnetisch. Das bedeutet zum einen, dass sie sich im Magnetfeld ausrichten, aber auch dass sie nach Abschalten des Feldes keine bleibende Remanenzmagnetisierung aufweisen. Hierdurch wird zudem eine kolloidale Stabilisierbarkeit der Partikel in bioapplizierbaren Medien erleichtert.

Bis heute enthalten die meisten Kontrastmittel *SPIO* einer Größe von 4 – 10 nm [10]. Das ‚klassische‘ Syntheseverfahren für diese Partikel ist die basische Kopräzipitation von Eisensalzen. Durch die Anwesenheit von Wasser entsteht bei dieser Reaktion eine amorphe Eisenoxidschicht auf der Partikeloberfläche, die magnetisch inaktiv ist. Diese kleinen *SPIO* Partikel besitzen also ein verhältnismäßig niedriges magnetisches Moment.

Optimal hingegen sind hochkristalline ‚große‘ *SPIO*, die durch ihren starken T_2^* -Effekt eine Erniedrigung der Kontrastmitteldosis und damit eine geringere Belastung des

Patienten ermöglichen können. Die Synthese solcher ca. 20 nm großen, hochkristallinen *SPIO* Partikel durch nicht-wässrige Sol-Gel-Chemie wird in dieser Arbeit beschrieben.

Um die kontrastgebenden *SPIO* in eine biomedizinisch anwendbare, wässrige Suspension zu bringen, bedarf es zusätzlich einer guten Stabilisierung. Der Stabilisator muss Van-der-Waals- und magnetische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln abschirmen, und Partikelaggregation während der Lagerung, der Applikation und in der Blutbahn verhindern [11]. Zur Stabilisierung von *SPIO* werden sowohl niedermolekulare Substanzen (z.B. Citrat) als auch Polymere (z.B. Dextran, -derivate und Stärke) verwendet.

Für einige dieser Substanzen (z.B. Dextran) sind allerdings schwere allergische Reaktionen bekannt. Deshalb ist die Suche nach neuen, gut verträglichen und bioabbaubaren Stabilisatoren weiterhin von großem Interesse.

Das bioverträgliche PEO wird häufig zur Stabilisierung von partikulären Kontrastmittel- oder *Drug Delivery*-Systemen eingesetzt, und ist auch in zugelassenen Arzneimitteln enthalten. Durch ein *Coating* mit PEO werden die Partikel in wässrigen Medien dispergierbar und sterisch stabilisiert. Zusätzlich verleiht PEO dem partikulären System ‚*stealth*‘ Eigenschaften. Die hydrophilen, beweglichen Polymerketten verzögern die Adsorption von Plasmaproteinen und damit das Erkennen und Abfangen der Partikel durch die unspezifische Immunabwehr. Dadurch kann die Blutzirkulation eines Kontrastmittel- oder *Drug Delivery*-Systems deutlich verlängert werden [12, 13].

Um effektiv wirken zu können muss der Stabilisator PEO nun stabil an die Oberfläche der *SPIO* gebunden werden. In der Natur existieren einige erfolgreiche Prinzipien zur stabilen Bindung von Eisen. Ferritin ist ein Eisenspeicherprotein, das in Bakterien, Pflanzen aber auch höheren Säugern vorkommt. Sein Eisenfixierungs- und -speichermechanismus hat sich evolutionär durchgesetzt. So bleiben von Spezies zu Spezies sowohl die Struktur des Proteins als auch bestimmte Aminosäuremotive der Primärsequenz, die der Eisenbindung zugeschrieben werden, weitgehend erhalten. Durch das Zusammenspiel verschiedener Aminosäuren gehen diese kurzen, peptidischen Eisenbindungsmotive weiche, aber spezifische Wechselwirkungen mit Eisen(-oxid) ein. Die Eisenbindungsmotive des Ferritins können also als ein natürlicher ‚Eisenkleber‘ betrachtet werden. Als Ankersegment an einem PEO-Block ermöglichen sie dessen stabile und bioverträgliche Bindung an *SPIO*, und damit eine effektive Partikelstabilisierung. Blockcopolymere, bestehend aus einem Eisenbindungsmotiv des humanen *H*-Ferritins und einem ‚*stealth*‘ PEO-Block, im Folgenden als FERR-*b*-PEOs bezeichnet, wurden in dieser Arbeit durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Festphasenpeptidsynthese ermöglicht zudem eine Kopplung der Polymere mit

Targetingfunktionalitäten, wie Peptidsequenzen oder Antikörpern, für die Anwendung in der molekularen Bildgebung. Die synthetisierten Polymere sind hoch definiert und dadurch gut für eine pharmazeutische Zulassung geeignet.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines effektiven Kontrastmittelsystems für MRT, bestehend aus ‚großen‘ *SPIO*, die mit einem biomimetischen und biokompatiblen Polymer *FERR-b-PEO*, stabilisiert sind. Durch die Option der einfachen, weitergehenden Funktionalisierung soll auch eine spezifische und molekulare Bildgebung pathogener Strukturen, und damit ein frühzeitige Erkennung und Therapie von Krankheiten, ermöglicht werden.

2 Grundlagen

2.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

2.1.1 *Magnetismus*

Das Grundprinzip der Bildgebung durch Magnetresonanztomographie (MRT, Kernspinresonanztomographie) und der Funktionsweise von superparamagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln als Kontrastmittel wird mit magnetischen Phänomenen begründet. Deshalb werden hier im Folgenden die wichtigsten Grundlagen des Magnetismus erklärt.

Abhängig von Atomstruktur und Temperatur besitzen alle Stoffe ein bestimmtes Ausmaß magnetischer Eigenschaften. Wird magnetisches Material in ein magnetisches Feld der Stärke H gebracht, dann tragen die einzelnen Momente der Atome zu der Gesamtantwort, der magnetischen Induktion (Kraftflussdichte) B bei:

$$B = \mu_0(H + M) \quad \text{Gl. 1}$$

wobei μ_0 die Permeabilität des freien Raums ist und die Magnetisierung M durch

$$M = \frac{m}{V} \quad \text{Gl. 2}$$

beschrieben wird. Die Magnetisierung entspricht dem Magnetischen Moment m pro Volumeneinheit eines Stoffes. Die volumetrische magnetische Suszeptibilität χ ist eine charakteristische Größe für ein Material und beschreibt dessen Magnetisierung, die durch ein Feld der Stärke H induziert wird.

$$M = \chi \cdot H \quad \text{Gl. 3}$$

Die meisten Materialien sind schwach magnetisch. Sie werden nach ihrem Verhalten in Dia- und Paramagneten eingeteilt. Beim Einbringen in ein Magnetfeld drängt der Diamagnet die Feldlinien in seinem Inneren auseinander und wird damit zur Stelle der niedrigsten Induktion hin abgestoßen (Abb. 1). Im Gegensatz dazu werden die Feldlinien im Inneren eines Paramagneten verdichtet (Abb. 1). Damit wird er in einem inhomogenen Feld zu der Stelle der höchsten Flussdichte und magnetischen Feldstärke gezogen.

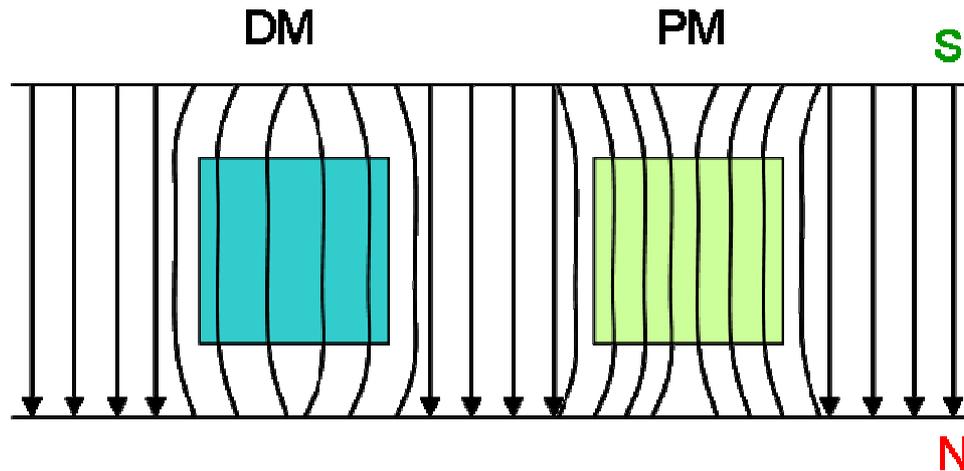


Abb. 1: Darstellung eines diamagnetischen (DM) und paramagnetischen Körpers (PM) im Magnetfeld. Der diamagnetische Körper drängt die magnetischen Feldlinien auseinander, während der paramagnetische Körper sie verdichtet und damit das Feld lokal verstärkt. (Abbildung modifiziert nach [14])

Die magnetische Induktion B im Inneren des Körpers entspricht:

$$B_{\text{innen}} = B_{\text{außen}} + B' \quad \text{Gl. 4}$$

mit B' , der Zu- oder Abnahme der Feldlinienanzahl. (Gl. 1 - 4 [14])

Alle Stoffe aus Atomen, Ionen oder Molekülen mit abgeschlossenen Elektronenschalen sind diamagnetisch. Die einzelnen magnetischen Momente der Elektronen heben sich auf, und nach Außen wird kein magnetisches Gesamtmoment bemerkbar. Stoffe aus Atomen, Ionen oder Molekülen mit ungerader Elektronenzahl sind paramagnetisch. Hier gleichen sich die magnetischen Momente der Elektronen nicht aus, und es entsteht ein permanentes, magnetisches Gesamtmoment. Diese ‚Molekularmagneten‘ sind durch thermische Bewegung zufällig verteilt und richten sich durch Anlegen eines Magnetfeldes, entgegen der Pole des äußeren Magnetfeldes aus. So entsteht ein zweites Magnetfeld, mit der gleichen Richtung wie das Primärfeld. Im Inneren des paramagnetischen Materials nehmen die Feldlinien zu [14].

Ferro-, Ferri- und Antiferromagnetismus (s. Abb. 2) sind kooperative, magnetische Phänomene. Sie treten unterhalb bestimmter Temperaturen als Wechselwirkungen zwischen den Elektronenspins individueller paramagnetischer Stoffteilchen auf, die über diamagnetische Teilchen miteinander verbunden sind. Als Folge kommt es zu einer parallelen Ausrichtung aller Elektronenspins innerhalb einer Domäne (Weiss'scher Bereich).

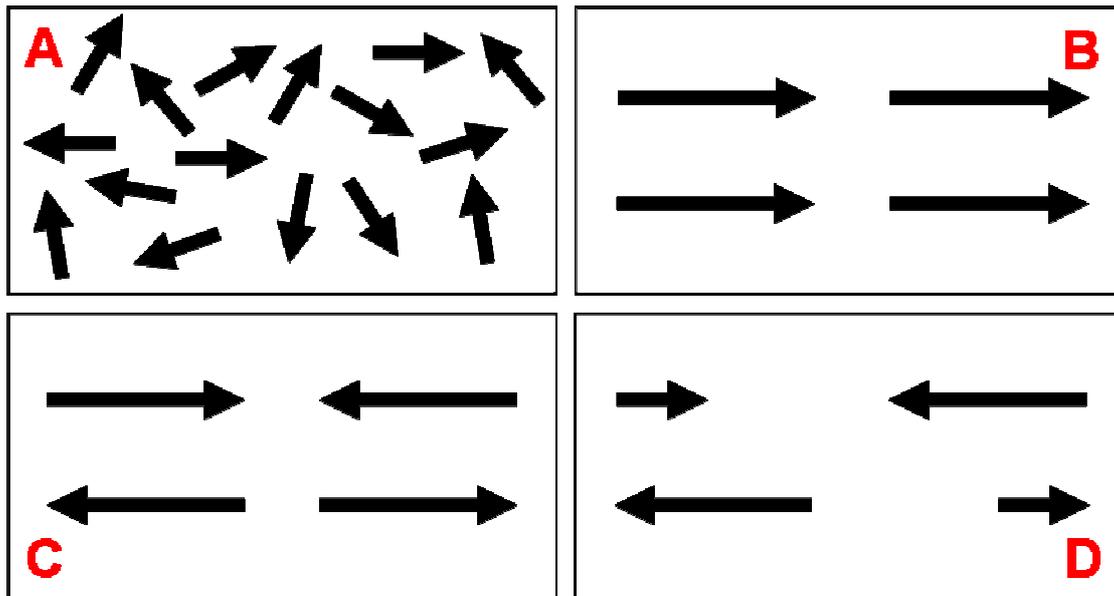


Abb. 2: zeigt verschiedene Modelle für Phänomene des kooperativen Magnetismus: (A) Paramagnetismus, (B) Ferromagnetismus, (C) Antiferromagnetismus, (D) Ferrimagnetismus. (Abbildung modifiziert nach [14])

Als Antiferromagnetismus (Abb. 2 (C)) bezeichnet man die antiparallele Ausrichtung der Elektronenspins, bei gleicher Größe der magnetischen Momente in zwei magnetischen Teilgittern. Sind die magnetischen Momente unterschiedlich groß, tritt Ferrimagnetismus auf (Abb. 2 (D)).

Ferromagnetische Stoffe bestehen aus Atomen bzw. Ionen mit nicht abgeschlossenen d- oder f- Schalen, deren Verhältnis des kürzesten Abstands der paramagnetischen Atome oder Ionen zum durchschnittlichen Radius der nicht abgeschlossenen Schalen ≥ 3 ist. Bei ferromagnetischen Stoffen richten sich die magnetischen Spinmomente unterhalb der Curie Temperatur (T_C) spontan parallel aus. Da die Magnetisierungsrichtung der einzelnen Domänen jedoch statistisch verteilt ist wird ohne das Einwirken eines externen magnetischen Feldes ein magnetisches Gesamtmoment von Null beobachtet (Abb. 2 (B)). Die Momente der Domänen werden erst im Magnetfeld parallel ausgerichtet und es kommt zur Magnetisierung. Nach Abschalten des Magnetfeldes bleibt eine Remanenzmagnetisierung. Beispiele für ferromagnetische Stoffe sind Eisen ($T_C = 770^\circ\text{C}$) und Gadolinium ($T_C = 16^\circ\text{C}$). Ferromagnetische Stoffe zeigen Hystereseschleifen, die für das Ferromagnetikum charakteristisch sind [14]. Bei ferro- und ferrimagnetischen Materialien erreicht die Magnetisierung bei hohen Magnetfeldstärken einen Sättigungswert. Durch das Anhängen der magnetischen Domänenwände an Verunreinigungen oder an der Partikeloberfläche, aber auch durch intrinsische Effekte (z.B. Anisotropie im Kristallgitter) kann es zur Hysterese kommen. Das bedeutet, dass die Magnetisierung in einem gewissen Ausmaß irreversibel verläuft. Die

Partikelgröße spielt hierbei eine große Rolle: große Partikel (μm -Bereich und größer), die im Grundstadium Multidomänen besitzen, zeigen eine enge Hysteresekurve. Bereits durch geringe Feldstärken werden die Domänenwände bewegt. Kleinere, ferromagnetische Partikel bestehen im Grundzustand aus einer Einzeldomäne, dies führt zu einer verbreiterten Hysteresekurve [8].

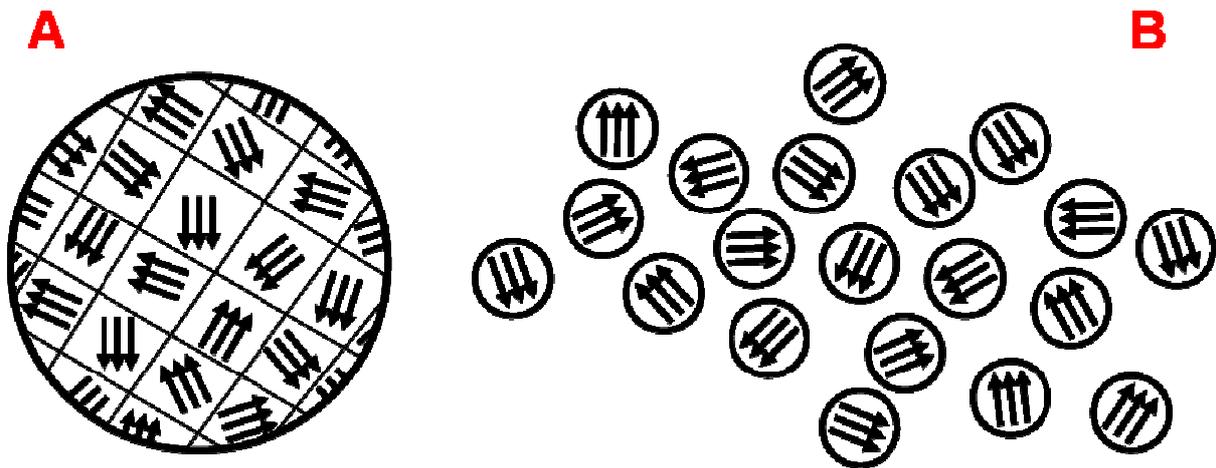


Abb. 3: Magnetische Domänen in (A) ferromagnetischem Nanopartikel und (B) superparamagnetischen Nanopartikeln. In Ferromagnetischen Materialien sind die Domänen vor Anlegen eines magnetischen Feldes nicht ausgerichtet. Bei Superparamagnetischen Nanopartikeln (B) ist die Kristallgröße kleiner als die der magnetischen Domänen (ca. 30 nm). Deshalb stellt jeder Partikel eine einzelne magnetische Domäne dar. (Abbildung modifiziert nach [8, 15])

Noch kleinere Partikel ($< 30 \text{ nm}$) verhalten sich superparamagnetisch (Abb. 3). Das magnetische Moment der Partikel kann sich durch thermische Energie frei bewegen, während die einzelnen Momente der Atome ihren geordneten Zustand zueinander beibehalten. Die Magnetisierungskurve verläuft deshalb ebenfalls sigmoidal, aber nicht hysteretisch. Die Magnetisierung wird bei großen Feldstärken gesättigt, bei Wegnahme des Feldes bleibt keine Remanenzmagnetisierung [16].

Die physikalische Grundlage des Superparamagnetismus findet sich im Aktivierungsgesetz für die Relaxationszeit τ der Nettomagnetisierung der Partikel [17, 18].

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad \text{Gl. 5}$$

Dabei ist ΔE die Energiebarriere für die Umkehr des Moments und $k_B T$ die thermische Energie. Die Energiebarriere hat verschiedene Ursachen, wie z.B. magnetokristalline und

formbedingte Anisotropien. Im einfachsten Fall jedoch hat sie eine uniaxiale Form und ist gegeben durch

$$\Delta E = K \cdot V \quad \text{Gl. 6}$$

mit der Anisotropieenergiedichte K und dem Volumen der Partikel V . Diese direkte Proportionalität zwischen ΔE und V ist der Grund, warum Superparamagnetismus für kleine Partikel von großer Bedeutung ist: ΔE ist bei Raumtemperatur vergleichbar mit $k_B T$.

Das Phänomen Superparamagnetismus hängt nicht nur von der Temperatur, sondern auch von Messzeit (τ_m) und -technik ab. Ist die Messzeit wesentlich größer als die Relaxationszeit $\tau \ll \tau_m$ reorientiert sich das Moment schnell, und die Partikel scheinen paramagnetisch zu sein (Abb. 4 (B)). Für $\tau \gg \tau_m$ erfolgt das Umklappen langsam und es wird ein quasi-statischer, so genannter blockierter Zustand des Systems, beobachtet (Abb. 4 (A)). Die Blockierungstemperatur T_B ist als der Mittelpunkt zwischen diesen beiden Zuständen definiert, an dem $\tau = \tau_m$ ist [8]. (Gl. 5, 6 [8])

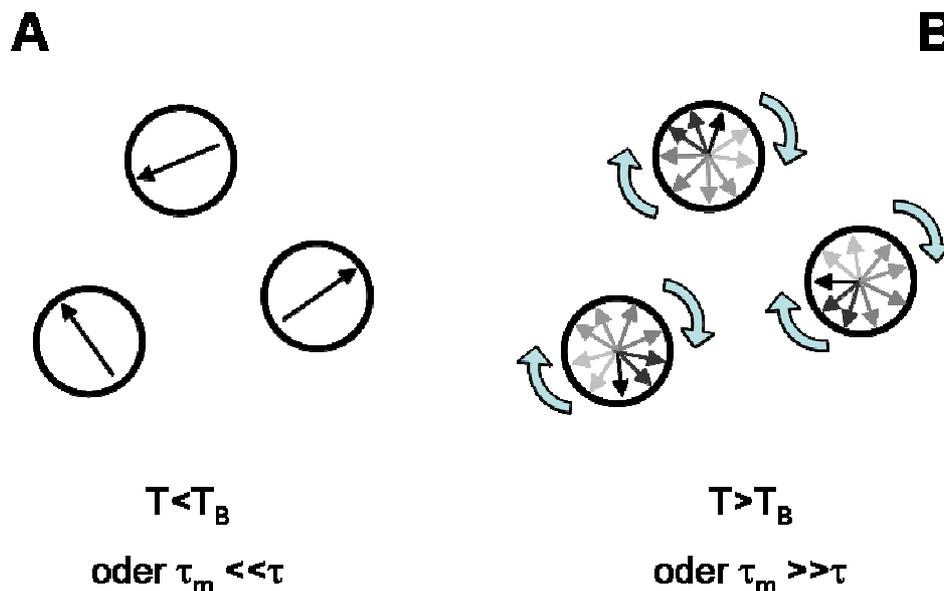


Abb. 4: Superparamagnetismus. Die Richtung der Magnetisierung ist durch Pfeile dargestellt. (A) Unterhalb der methodenabhängigen Blockierungstemperatur T_B der Partikel, oder für Relaxationszeiten, die wesentlich größer als die Messzeit sind, verhalten sich die magnetischen Momente quasi-statisch. (B) Bei Temperaturen über T_B , oder für Relaxationszeiten, die wesentlich kürzer als die Messzeit sind, geschieht das Umklappen des magnetischen Moments so rasch, dass das über die Zeit gemittelte Moment der Partikel ohne Anliegen eines externen Feldes aufgehoben wird. (Abbildung modifiziert nach [8])

2.1.2 Physikalische Grundlagen der MRT

Magnetresonanztomographie (MRT), auch Kernspintomographie genannt, ist ein bildgebendes Verfahren, das zur Darstellung von Schnittbildern weicher Gewebe verwendet wird. Sie wurde ab 1973 von Paul C. Lauterbur und Sir Peter Mansfield unter dem Namen bildgebende NMR entwickelt [19, 20]. 2003 erhielten Lauterbur und Mansfield für ihre Entwicklung den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Die NMR-Signale der Protonen im Gewebe werden bei MRT zu Schnittbildern verrechnet. Aufgrund der unterschiedlichen Protonendichte und Relaxationszeiten lassen sich die Gewebe voneinander unterscheiden. Das Gewebe wird in ein Magnetfeld mit einem Gradienten gebracht. Die beobachtete Resonanzfrequenz der Protonen verändert sich in die Richtung des Gradienten (z.B. z-Richtung), da sich die Protonen in Regionen unterschiedlicher Feldstärken befinden. Da man im Gegensatz zur NMR generell mit niedriger Auflösung arbeitet, erscheinen auch chemisch nicht-äquivalente Protonen bei derselben Frequenz. Durch die Messung des Resonanzsignals als Funktion der Frequenz erhält man eine Verteilung der Protonen als Funktion des Orts [21].

Atome mit ungerader Ordnungszahl (u. a. ^1H , ^{13}C , ^{31}P) besitzen einen permanenten Eigendrehimpuls (Spin), und damit trägt der Atomkern ein permanentes magnetisches Dipolmoment μ . Wird der Kern in ein statisches magnetisches Feld B_0 gebracht, so richtet sich der Kernspin nach B_0 aus. Der Kern wird aus seiner Ruhelage gebracht und präzidiert, wie ein Kreisel, der an Geschwindigkeit verliert, um die Richtung von B_0 (Abb. 5) [8].

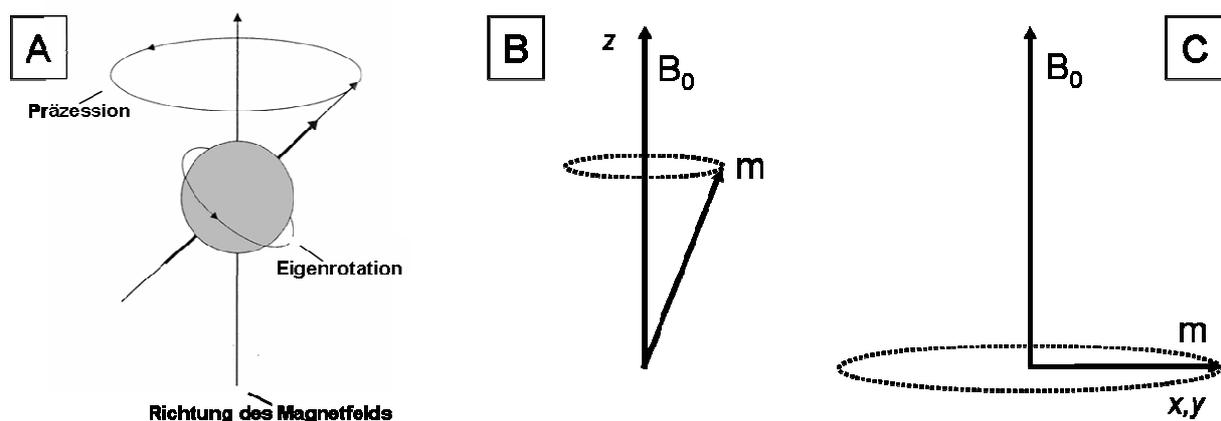


Abb. 5: (A) Präzessionsbewegung des Kerns. (B) Präzessionsbewegung des Kernspins mit dem magnetischen Moment m um die z-Richtung des Feldes B_0 . (C) Ausrichtung des Moments m in x,y-Richtung. Das Signal wird in x,y-Richtung durch Empfangsspulen aufgenommen. (Abbildung modifiziert nach [8, 22])

Nach dem Abstellen des Feldes fällt der Kern, entsprechend dem thermischen Gleichgewicht, in die ursprüngliche Lage zurück. Wenn ein zweites Magnetfeld, im rechten Winkel zu B_0 angelegt wird (Transversalfeld B_T) beginnt der Kern wieder zu präzidieren, bis sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat. Um den Kern dauerhaft in Präzession zu halten verwendet man für B_T ein hochfrequentes Wechselfeld (HF-Feld), das in x,y -Ebene rotiert.

Die Resonanzfrequenz (Lamorfrequenz ω) der Präzessionsbewegung ist wie folgt in der Larmorgleichung definiert:

$$\omega = \gamma \cdot B_0 \quad \text{Gl. 7}$$

Das gyromagnetische Verhältnis γ ist für jeden Kern charakteristisch und muss experimentell bestimmt werden. Für ^1H Protonen beträgt es

$$\gamma = 2,67 \cdot 10^8 \text{ rads}^{-1}\text{T}^{-1} \quad \text{Gl. 8}$$

MR Scanners für medizinische Zwecke arbeiten üblicherweise mit B_0 einer Feldstärke von 1 - 1,5 T. In einem Feld $B_0 = 1 \text{ T}$ entspricht die Lamorfrequenz einer Radiofrequenz mit

$$\frac{\omega_0}{2\pi} = 42,57 \text{ MHz} \quad \text{Gl. 9}$$

Diese Radiofrequenz wird so pulsiert, dass die Dauer ausreicht, um eine kohärente Antwort der magnetischen Momente der Protonen im MRT-Scanner zu messen. Ab dem Moment, in dem der RF-Puls abgestellt ist, wird die kohärente Antwort durch induzierte Ströme in Aufnahmespulen des Scanners gemessen. Die Aufnahmespulen verstärken das Signal um einen Faktor von 50 – 100. Durch Variation von B_0 und B_T können bestimmte Kerne in Resonanz gebracht werden. Das magnetische Moment wird um 90° in die x,y -Ebene gekippt und präzidiert um die Richtung von B_T . Eine Spule in x,y -Richtung misst die entstehende Spannung. Die Spannung ist proportional zur Quermagnetisierung M_T der magnetischen Momente aller Kerne. M_T ist vom Gewebetyp und vom Ort abhängig.

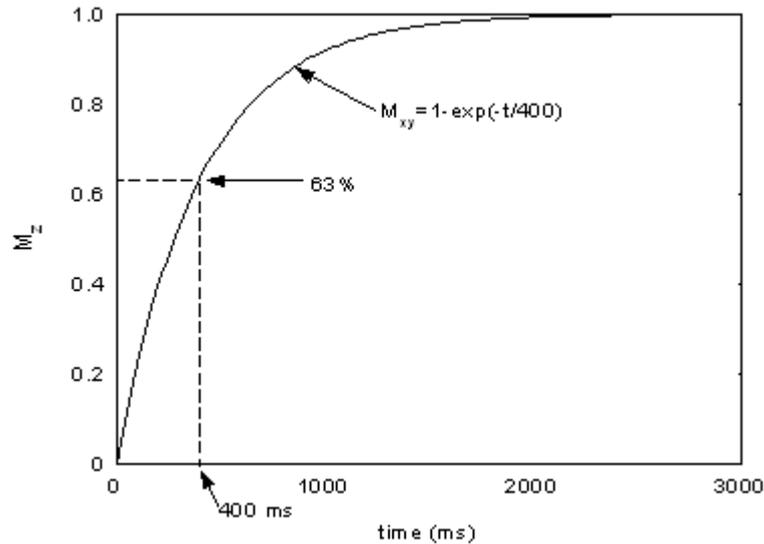


Abb. 6: Anstieg der Magnetisierung in z Richtung mit der Zeit (bezogen auf die Ausgangsmagnetisierung M_0). T_1 ist als die Zeit definiert, nach der M_z 63% von M_0 erreicht hat [23].

Wird der HF-Puls ausreichend lange in x,y-Ebene gebracht, so präzidieren alle Kerne in dieser Ebene, während die Magnetisierung in z-Ebene Null wird. Nach Abstellen des HF-Signals kommt es zur *Spin*-Gitter- oder Längs-Relaxation. Hierbei wird die Energie der Protonen an das Gitter abgegeben. Die *Spins* relaxieren exponentiell in Richtung von B_0 . Dabei gilt für die Magnetisierung:

$$m_z = m(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad \text{Gl. 10}$$

Die Zeit, nach der die Magnetisierung in z-Ebene 63% der Ausgangsmagnetisierung M_0 erreicht hat, wird als Längsrelaxationszeit T_1 bezeichnet (Abb. 6).

Die rotierende Quermagnetisierung M_T zerfällt sehr rasch durch Dephasierung. Die Relaxation kommt durch Wechselwirkung der benachbarten *Spins* zustande und wird als *Spin-Spin*-Relaxation bezeichnet. Für die Quermagnetisierung gilt:

$$m_{x,y} = m \sin(\omega_0 t + \phi) e^{-\frac{t}{T_2}} \quad \text{Gl. 11}$$

Die Querrelaxationszeit T_2 ist erreicht, wenn die Quermagnetisierung M_T 37% der Ausgangsmagnetisierung M_0 erreicht hat (Abb. 7).

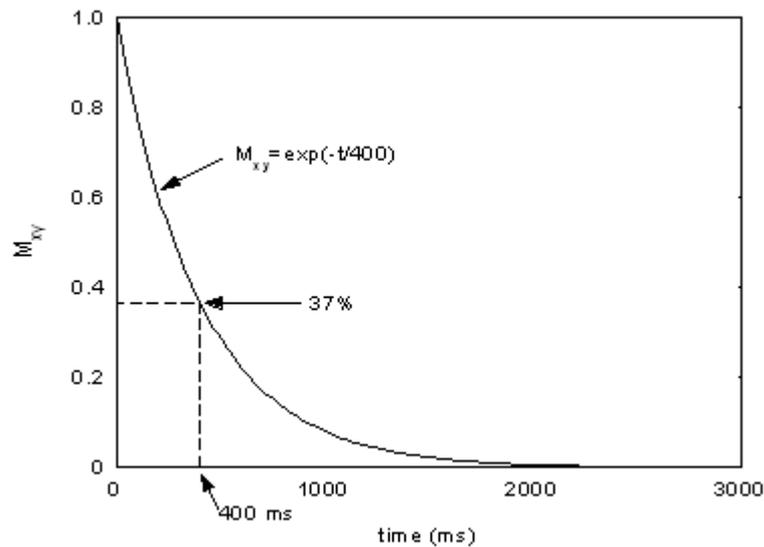


Abb. 7: Abfall der Quermagnetisierung M_{XY} (M_T) mit der Zeit. T_2 ist erreicht, wenn M_{XY} (M_T) 37% der Ausgangsmagnetisierung M_0 beträgt [23].

Die Dephasierung kann nicht nur durch die magnetischen Wechselwirkungen der *Spins* miteinander und mit anderen fluktuierenden Momenten im Gewebe kommen. Wird die Dephasierung durch lokale Inhomogenität im angelegten Longitudinalfeld verursacht, dann ersetzt man T_2 in Gl. 11 durch die kürzere Relaxationszeit T_2^* :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \frac{\Delta B_0}{2} \quad \text{Gl. 12}$$

ΔB_0 ist dabei die Veränderung des Felds, die durch Homogenitätsänderungen im Feld oder durch lokale Unterschiede in der magnetischen Suszeptibilität des Systems zustande kommt. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (*SPIO*) haben einen besonders ausgeprägten Effekt auf die T_2^* -Relaxationszeit [10]. Bei normalen Feldstärken eines MRT-Scanners sind sie magnetisch gesättigt und erzeugen ein lokal störendes, dipolares Feld auf. T_2^* wird dadurch stark verkürzt, während T_1 in geringerem Ausmaß vermindert wird [8]. Der Suszeptibilitätseffekt beschreibt also eine erhöhte T_2^* -Relaxationsrate, die durch Magnetisierungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Voxeln (Volumenpixeln) im MR Bild zustande kommt. Die superparamagnetischen Partikel sammeln sich an bestimmten Stellen im Gewebe an. Dadurch werden lokale Feldgradienten aufgebaut, die eine Dephasierung der *Spins* beschleunigen und das MR Signal deutlich verändern. (Gl. 7 – 20 [8])

Besonders wichtig ist der T_2^* -Effekt für superparamagnetisches Eisenoxid, da die magnetische Suszeptibilität von Eisenoxid sehr hoch ist und es dadurch zu einer hohen

induzierten Magnetisierung kommt. T_2^* hängt jedoch von vielen Faktoren wie der Messesequenz, möglicher Aggregation eines Kontrastmittels und der Verteilung im Körper ab [10].

Wichtige Parameter für die Bewertung eines Kontrastmittels sind die Relaxationsraten R_1 und R_2 (Einheit: s^{-1})

$$R_{1,2} = \frac{1}{T_{1,2}} \quad \text{Gl. 13}$$

und die Relaxivität $r_{1,2}$ ($s^{-1}mM^{-1}$), die angibt, wie stark die Relaxationsraten pro Konzentrationseinheit eines Kontrastmittels erhöht wird. Die Relaxivität ergibt sich als Proportionalitätskonstante aus

$$R_{1,2} = R_{1,2}^0 + r_{1,2}C \quad \text{Gl. 14}$$

$R_{1,2}^0$ ist dabei die Relaxationsrate ohne Kontrastmittel in der Probenmatrix (z.B. Wasser oder Blutplasma). $R_{1,2}$ steht für die Relaxationsrate der Probe mit Kontrastmittel der Konzentration C [10]. (Gl. 13, 14 [10])

2.1.3 *Aufbau eines Magnetresonanztomographen*

Ein Magnetresonanztomograph (Abb. 8) besteht aus einem Hauptfeldmagnet, der das statische Feld B_0 erzeugt, einer Gradientenspule, einem Hochfrequenzsender bzw. –empfänger, *Shim*spulen, die durch den Patienten selbst verursachte Störungen von B_0 ausgleichen, Messesequenzen und einem Bildrechner.

Eine Gradientenspule entlang der x-, y- und z- Richtung bewirkt ein lineares Gefälle in der Magnetfeldstärke. So ist es möglich das aufgenommene Signal dem Ort der Entstehung zu zuordnen. Messesequenzen sind bestimmte Abfolgen von HF-Impulsen. Sowohl die Abstände zwischen den Impulsen als auch der Empfangszeitraum für das Antwortsignal können variiert werden.

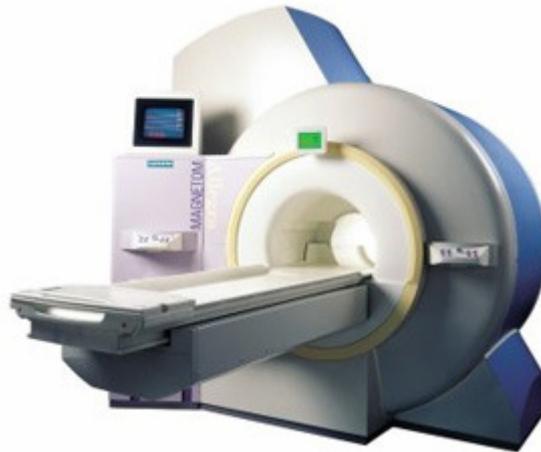


Abb. 8: Darstellung eines MRT-Ganzkörperscanners [24].

Je geringer der Abstand zwischen HF-Impuls und Empfangszeitraum, bzw. erneutem HF-Impuls ist, desto geringer ist die Signalintensität, da das System noch nicht vollständig in den relaxierten Ausgangszustand zurückgekehrt ist. Auch die Beschaffenheit des Gewebes spielt hier eine große Rolle. Die unterschiedlichen Signalintensitäten lassen sich als Kontrastunterschiede verrechnen.

In Messsequenzen wird die Repetitionszeit (T_R = time to repeat, Zeit zwischen den HF-Impulsen), die Echozeit (T_E = time to echo, Zeit zwischen Empfangszeitpunkt und Anregungsimpuls), die Stärke und zeitliche Abfolge der HF-Impulse, sowie der Auslenkwinkel (Flip-Winkel) variiert.

Werden T_R und T_E kurz gewählt so erhält man T_1 -gewichtete Bilder, bei langer T_R und T_E T_2 -gewichtete Bilder. Bei langer T_R und kurzer T_E erhält die Protonendichte-Wichtung. Bei den Messsequenzen unterscheidet man zwischen Spinecho-, Gradientenecho- und Multiechosequenzen.

2.1.4 Kontrastmittel für die MRT

2.1.4.1 Einführung

Durch die stetige Weiterentwicklung der MRT-Technologie können bereits durch die Wahl von Spulen, Magneten und geeigneter Messsequenzen hoch auflösende Gewebeschnitte erzeugt werden. (Super-)paramagnetischen Kontrastmittel erhöhen den Gewebekontrast weiter um ein Vielfaches, da sie die Relaxationszeiten verändern. Krankhaftes und gesundes Gewebe lässt sich so besser unterscheiden. Kontrastmittel für die MRT werden nach ihrem Effekt auf das Bild in positive und negative Kontrastmittel unterteilt [25]. Die Bildgebung

stellt die Verteilung des Kontrastmittels im Körper und Anreicherung in bestimmten Geweben dar. Die meisten Kontrastmittel werden intravenös in die Blutbahn appliziert. Seltener werden Kontrastmittel zur Darstellung des Magen-Darm-Traktes peroral verabreicht. Im Fokus der Entwicklung von Kontrastmitteln zur systemischen Verabreichung stehen eine Verlängerung der Zirkulationszeit und Erhöhung der Verweildauer am darzustellenden Organ. Durch die Weiterentwicklung des Prinzips der spezifischen und molekularen Bildgebung soll sich das Kontrastmittel aktiv am *Target*, dem Zielgewebe oder -rezeptor, anreichern [25-28].

2.1.4.2 Positive und negative Kontrastmittel

Positive Kontrastmittel sind in der Regel paramagnetisch. Sie bewirken eine Verkürzung von T_1 und erhöhen die Signalintensitäten in T_1 -gewichteten Bildern [25]. Bereiche in denen sich das Kontrastmittel angesammelt hat erscheinen heller. Eingesetzt werden Komplexverbindungen, geringer Molmasse mit gepaartem Elektronenspin und langen NMR-Relaxivitäten, sie enthalten z.B. Gadolinium, Mangan oder Eisen. So wird z.B. *Magnevist*[®] (Gadopentetate Dimeglumin, Bayer Healthcare) in cranialer und spinaler, aber auch der Ganzkörper-MRT angewendet. *Omniscan*[™] (Gadodiamid, GE Healthcare Buchler) wird bei cranialer und spinaler MRT, sowie zur Angiographie und Ganzkörperdarstellung eingesetzt. Eine Kontrastverstärkung in der Angiographie lässt sich z.B. durch *Vasovist*[®] (Gadofosveset Trinatium, Bayer Healthcare) erzielen. *MultiHance*[®] (Gadobenat Dimeglumin, Nycomed), dient der Darstellung von fokalen Leberläsionen, aber auch der cranialen und spinalen MRT. Mangan ist in *Teslascan*[™] (Mangafodipir-Trinatium, GE Healthcare Buchler) enthalten, und wird zur MRT von Leber- und Pankreasläsionen angewendet [29]. Sowohl Gadolinium als auch Mangan müssen stabil komplexiert vorliegen, da die freien Ionen toxisch wirken. Um das Wirkungsprofil zu verbessern, kann der Metallchelator auch in Formulierungen wie Liposomen oder polymere Nanopartikel eingearbeitet werden [30]. Bei Patienten mit eingeschränkter Nieren- und Leberfunktion ist die Anwendung von gadolinium- und manganhaltigen Kontrastmitteln kontraindiziert. Durch Ablagerungen von freien Gadoliniumionen besteht hier ein besonders hohes Risiko für das Entstehen einer nephrogenen systemischen Fibrose (NSF). Es handelt sich hierbei um eine Wucherung des Bindegewebes in Haut, Muskeln und inneren Organen. NSF wurde bisher in Zusammenhang mit der Anwendung von *Omniscan*[®], *Magnevist*[®] und *MultiHance*[®] beschrieben und kann zu körperlichen Behinderungen führen und potentiell letal verlaufen [31, 32].

Bereiche in denen sich ein negatives Kontrastmittel angereichert hat erscheinen dunkler im MR Bild. Als negatives Kontrastmittel wird in der Regel superparamagnetisches Eisenoxid (*superparamagnetic iron oxide, SPIO*) in Form kleiner Partikel oder Aggregaten kleiner Partikel eingesetzt. Dieses bewirkt lokale Inhomogenitäten im Magnetfeld, führt zu *Spin-Spin*-Relaxierung (T_2^* -Effekt) und damit einer Signalauslöschung [33].

2.1.4.3 SPIO als Kontrastmittel für die MRT

Als Kontrastmittel für MRT werden die Eisenoxidphasen Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) eingesetzt. Sie gehören der Gruppe der Ferritverbindungen. Das Kristallgitter von Magnetit und Maghemit hat eine Spinellstruktur. Die Grundformel ist dabei AB_2O_4 , hier als $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]\text{O}_4$. Magnetit wird als inverser Spinell bezeichnet, da 1/3 der Eisenionen (Fe^{3+} -Ionen) tetraedrisch und 2/3 der Eisenionen (Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen im Verhältnis 1:1) oktaedrisch zum Sauerstoff koordiniert sind [34]. Aufgrund der Kristallstruktur ist eine spontane Magnetisierung der Eisenoxidpartikel möglich. Die Partikel verhalten sich superparamagnetisch, wenn die verwendeten Kristalle kleiner als die ferromagnetische Domäne (~30 nm) sind.

Um in eine applikationsfähige, flüssige Form gebracht zu werden, müssen die magnetischen Eisenoxidpartikel stabilisiert werden. Der Stabilisator gewährleistet zum einen kolloidale Stabilität der Partikelsuspension während der Lagerung und Applikation. Zum anderen soll aber zusätzlich nach Applikation in die Blutbahn eine Adhäsion von Blutbestandteilen, und damit die frühzeitige Erkennung durch das Immunsystems verhindert werden. Der Stabilisator muss sowohl Van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch Magnetische Attraktion zwischen den Partikeln dauerhaft verhindern, und die Partikel stabil dispergiert halten [8, 11, 35]. Häufig werden große Mengen Stabilisator benötigt um dieses Ziel zu erreichen. Man unterscheidet zwischen hoch- und niedermolekularen Stabilisatoren. Bekannte makromolekulare Beschichtungsmaterialien sind z.B. Dextrane und deren Derivate wie z.B. Carboxydextran [36], Carboxymethyldextran, aber auch Stärke, PEO, Arabinogalaktan, Glycosaminoglykan, organische Siloxane oder sulfoniertes Styrol-Divinylbenzol [30]. Das bekannteste Beispiel für einen niedermolekularen Stabilisator ist Citrat [37-39]. Weitere Beispiele für niedermolekulare Stabilisatoren sind α -Hydroxysäuren wie z.B. Tartarsäure, aber auch α -Aminosäuren, Hydroxamate oder Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) [10].

Eisenoxidbasierte Kontrastmittel können nach der Partikelgesamtgröße und damit ihrer biologischen Wirkung unterteilt werden: Man unterscheidet nach *ultrasmall SPIO*,

USPIO ($d \leq 50$ nm), *SPIO* ($d \geq 50$ nm) und deutlich größeren paramagnetischen Partikeln [10]. Letztere werden zur Darstellung des Magen-Darm-Traktes peroral verabreicht. Ein Beispiel hierfür ist *Lumirem*[®] (silikonisiertes Eisenoxid, Guerbet). *SPIO* werden in der Blutbahn schnell von Makrophagen abgefangen und in die Leber aufgenommen, während *USPIO* länger im Blut zirkulieren [40]. *SPIO* werden deshalb in der Regel zur Darstellung der Leber verwendet. Beispiele hierfür sind *Resovist*[®] (Ferocarbutran, mit Carboxydextran *gecoatetes* Eisenoxid, Bayer Healthcare) und *Endorem*[®] (Ferumoxide, Dextran *gecoatetes* Eisenoxid, Guerbet). Durch *USPIO* können auch über längere Zeit Blutgefäße dargestellt werden (Angiographie) und Zellen markiert werden. *USPIO* sind in *Sinerem*[®] (Dextran *gecoatete USPIO*, Guerbet) und *Supravist*[®] (SHU555C, Carboxydextran *gecoatete USPIO*, Bayer Healthcare) enthalten. Auch Ferrumoxytol Code 7228 (Carboxymethyldextran *gecoatete USPIO*, Advanced Magnetics) und VSOP-C184 (Citrat stabilisierte *USPIO* für Angiographie) gehören in diese Gruppe. Dextran und Dextranderivat stabilisierte Eisenoxidpartikel führen häufig zu Nebenwirkungen wie vorübergehenden Rückenschmerzen, Brustschmerzen, Atemnot, Hitzegefühl und Hautrötungen. Als drastisch sind die selten auftretenden anaphylaktische Reaktionen einzustufen. Die Wahl des Stabilisators spielt eine entscheidende Rolle für Pharmakokinetik und -dynamik [1, 10, 25].

2.1.4.3.1 Verteilung, Metabolisierung und Biokompatibilität

Die Verteilung von *SPIO* Partikeln im Körper wird stark von den Oberflächeneigenschaften und Partikelgröße beeinflusst. In der Blutbahn werden Nanopartikel rasch von Opsoninen markiert und in Zellen des Retikuläre Endotheliale System (RES), insbesondere des Mononukleär-phagozytierenden Systems (MPS), aufgenommen. Hierzu gehören z.B. Makrophagen in Leber, Milz und Knochenmark. Die Partikel verschwinden damit aus der Blutbahn [41, 42]. Große Partikel werden schneller als fremd erkannt als kleine. Hydrophile, bewegliche Polymerketten (z.B. PEO) an der Oberfläche der Partikel verlängern die Blutzirkulation, indem sie die Adsorption von Blutbestandteilen erschweren. Dieses Phänomen ist auch als ‚*stealth*‘ Effekt von PEO bekannt [12, 13]. Dabei spielt die räumliche Anordnung und Dichte der Polymerketten am Partikel eine bedeutende Rolle [42]. Die bürstenartige Anordnung hat sich zur Proteinabstoßung als günstiger erwiesen als die gewickelte. Auch die Oberflächenladung beeinflusst die Pharmakokinetik. Sehr kleine, mit Citrat *gecoatete SPIO* werden durch ihre starke anionische Ladung rasch in Makrophagen aufgenommen und aus der Blutbahn entfernt [10, 43]. Die Bluthalbwertszeit von eisenoxidhaltigen Kontrastmitteln im Menschen variiert von einer Stunde bis zu 36 Stunden

[10]. Die Bluthalbwertszeit ist dosisabhängig. Hohe Konzentrationen bewirken eine Absättigung des MPS.

Eisenoxid wird, genau wie endogenes Eisen nur langsam eliminiert. COROT ET AL. berichten, dass nur 16 – 21% der injizierten Eisendosis nach 84 Tagen über die Faeces ausgeschieden sind (die renale Elimination ist mit weniger als 1% zu vernachlässigen) [10]. Ein Überschuss an Eisen wird im Eisenspeicherprotein Ferritin gespeichert. Ferritin findet man in besonders hohen Konzentrationen in Geweben, die Zellen des RES enthalten (z.B. Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten). Nach *SPIO* Gabe kann es auch zu erhöhten Ferritinspiegeln kommen. Der menschliche Körper speichert ca. 3500 mg Eisen, und eine gesunde Leber enthält 0,2 mg Eisen pro Gramm. Die zur Kontrastgebung verabreichte Eisenmenge von 50 bis 200 mg ist deshalb vernachlässigbar. Chronische Eisentoxizität entwickelt sich erst, wenn die Eisenkonzentration in der Leber 4 mg Eisen pro Gramm überschreitet [44]. Zahlreiche zugelassene eisenoxidhaltige Kontrastmittel beweisen, dass *SPIO* gut biokompatibel sind, und den umfangreichen toxikologischen und pharmakologischen Anforderungen durch die Arzneimittelzulassung entsprechen [36, 45].

2.2 Nanopartikel

2.2.1 *Einleitung*

Mit seiner Rede ‚*there is plenty of room at the bottom*‘ [46] anlässlich des Treffens der *American Physical Society* 1959 begründete Richard Feynman das Konzept der modernen Nanotechnologie. Bereits in der Mitte des 19. Jh. hatte Faraday jedoch mit der Charakterisierung von kolloidalen Systemen begonnen [47], und Edelmetallnanopartikel wurden schon wesentlich früher, im 4. Jh. v. Chr. von römischen Handwerkern für die Herstellung von farbigem Glas verwendet [48]. Als Zwischenstufe zwischen dem molekularen und dem festen Zustand vereinen anorganische Nanopartikel chemische Zugänglichkeit in Lösung mit den physikalischen Eigenschaften des *Bulkmaterials*. Sie besitzen eine große Oberfläche bei kleinem Volumen. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Materialien aus Nanobausteinen lassen sich gezielt steuern [5].

Die moderne Nanotechnologie hat sich erst im letzten Jahrzehnt so stark weiterentwickelt, dass sie in vielen Technologiesparten (z.B. Informationstechnologie, Energie, chemische Anwendungen wie Katalyse, Analytik und Aufreinigung) unerlässlich geworden ist. Auch für biomedizinische und diagnostische Anwendungen sind maßgeschneiderte, kolloidale Systeme wie Nanopartikel, von wachsender Bedeutung [2, 49].

2.2.2 *Synthese von anorganischen Nanopartikeln*

2.2.2.1 *Top-Down und Bottom-Up*

Bei der Synthese von Nanopartikeln werden zwei grundsätzliche Ansätze unterschieden. Beim *Top-Down* Ansatz (‚vom Großen zum Kleinen‘) werden mit hauptsächlich lithographischen Verfahren aus größeren Gebilden Nanomaterialien herausgeschnitten. Mit dieser Methode lassen sich Materialien bis unter 100 nm herstellen. Der *Bottom-Up* Ansatz (‚vom Kleinen zum Großen‘) ist durch chemische Prinzipien beeinflusst und impliziert die Anordnung von Atomen oder Molekülen zu atomaren bis hin zu supramolekularen Strukturen in Nanometergröße [50]. Für die Synthese von *SPIO* Partikeln zur biomedizinischen Anwendung sind *Bottom-Up* Verfahren maßgebend. Diese können weiter unterschieden werden in Gasphasen-Synthesen und Flüssigphasen-Synthesen. Mittels Gasphasen-Synthese werden vor allem eindimensionale Nanostrukturen gewonnen, während sich in Flüssigphasen-Ansätzen unterschiedlichste Partikelmorphologien herstellen lassen. Zu

den Flüssigphasen-Synthesen zählt man unter anderem Kopräzipitation, Sol-Gel-Chemie, Mikroemulsion, Hydrothermale/ Solvothermale Prozessierung und Templatsynthese [51].

2.2.2.2 Sol-Gel-Verfahren

Sol-Gel-Verfahren sind gut für die Herstellung von Metalloxid Nanopartikeln geeignet. Der Sol-Gel-Prozess kann als Umsetzung einer Precursorlösung in einen anorganischen Feststoff definiert werden [52]. Häufig ist der Precursor ein Metallalkoxid, seltener handelt es sich um ein anorganisches Metallsalz (z.B. Acetat, Chlorid oder Nitrat). Zunächst wird das Metallalkoxid vom Sol zum Gel, einem vernetzten, starren und porösen anorganischem Netzwerk, das von einer kontinuierlichen flüssigen Phase durchzogen ist. Dieser Umsetzung liegen hauptsächlich zwei Reaktionstypen zugrunde: Hydrolyse und Kondensation. Letztendlich kommt es zur Ausbildung von Metall-Sauerstoff-Metall (M-O-M)-Bindungen. Durch das gleichzeitige Auftreten von Hydrolyse und Kondensation, sind wässrige Sol-Gel-Verfahren nicht vollständig kontrollierbar. Bei nicht-wässriger Sol-Gel-Chemie wird der Sauerstoff für die M-O-M-Bindung durch Ether, Alkohole oder Alkoxide, weniger durch Wasser geliefert. Die zugrunde liegende Chemie beruht hier auf der Reaktivität der O-C Bindung. Die M-O-M-Bindung entsteht durch Kondensation zwischen den an zwei unterschiedliche Metallzentren koordinierten Liganden, und folgender Eliminierung eines organischen Fragments. Unter anderem beobachtet man Alkylhalogenid-, Ether- und Ester-Eliminierungen [50]. Die Umsetzung von Eisen(III)acetylacetonat mit Benzylalkohol stellt eine nicht wässrige Sol-Gel-Reaktion dar. In Abb. 9 ist der Reaktionsmechanismus dargestellt, durch den die M-O-M-Bindung zustande kommt.

Sol-Gel-Prozesse gehören zu den vielseitigsten und kostengünstigsten Synthesen für Nanomaterialien [51]. Die konventionelle wässrige Sol-Gel-Chemie birgt allerdings einige Nachteile: die erhaltenen Präzipitate werden erst durch anschließendes Kalzinieren kristallin. Beim Kalzinieren kann sich die gewünschte Partikelmorphologie durch Wachstum oder Umlagerung verändern. Außerdem sind während der Reaktion viele Parameter schwer zu kontrollieren, z.B. die hohe Hydrolyserate von Metalloxiden, der pH-Wert, die Art des Mischens, die Oxidationsrate, und besonders die Art und Konzentration des Anions. Durch nicht-wässrige Sol-Gel-Chemie in organischen Lösemitteln können viele dieser Probleme umgangen werden [50].

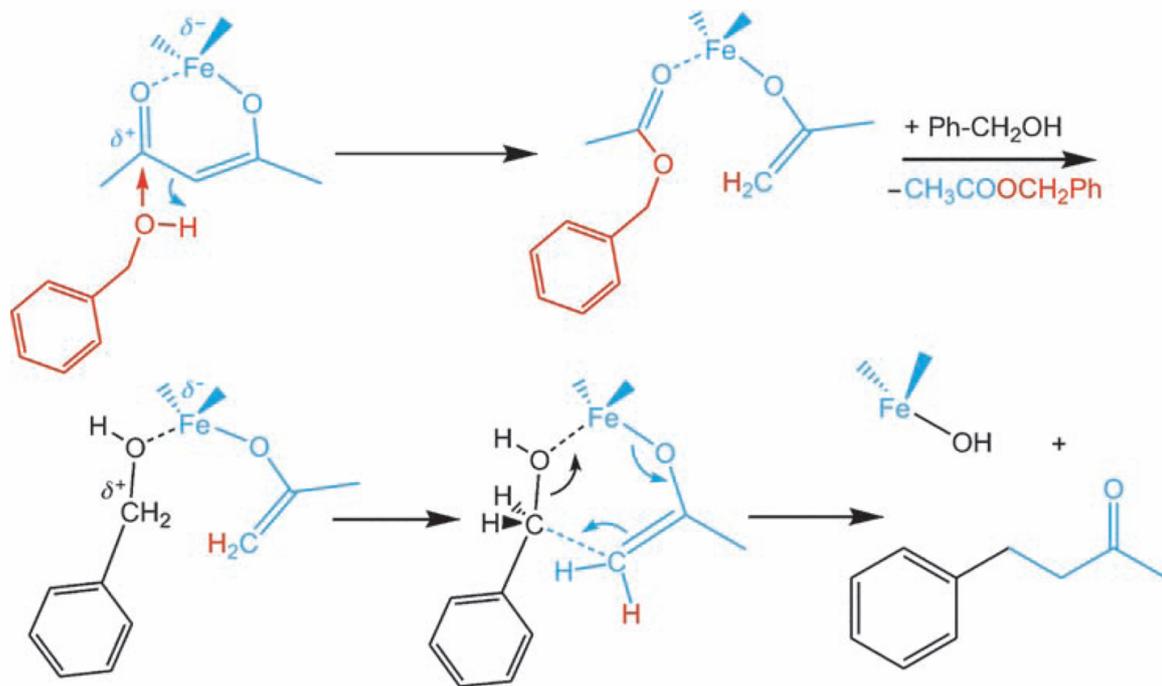


Abb. 9: Nicht-wässrige Sol-Gel-Chemie am Beispiel der solvothermalen Umsetzung von Eisen(III)acetylacetonat mit Benzylalkohol: Der von Niederberger und Garnweitner vorgeschlagene Mechanismus impliziert Solvolyse des Eisenacetylacetonats und anschließende Kondensation und Ausbildung von Metall-Sauerstoff-Bindungen. Als Endprodukt erhält man Magnetitnanopartikel [50].

2.3 Das Eisenspeicherprotein Ferritin

2.3.1 Funktion und Vorkommen in der Natur

Ferritin kommt ubiquitär in lebenden Spezies vor. Obwohl die Aminosäuresequenz von Spezies zu Spezies variieren kann, bleibt die dreidimensionale Struktur übereinstimmend. Alle Ferritine bestehen aus 24 Untereinheiten, die so angeordnet sind, dass sie eine 12 nm große, käfigartige Hohlkugel bilden (s. Abb. 10 (A)). Durch Kanäle können Eisenionen nach Innen und Außen diffundieren. Im Inneren, einem 8 nm großen Hohlraum, können bis zu 4500 $\text{Fe}(\text{III})$ Atome in Form des labilen Ferrithydrits gebunden werden. Als Untereinheiten liegen Bündel aus vier Helices vor, die in einem Winkel von 60° eine fünfte, kurze Helix tragen (s. Abb. 10 (B)). In Ferritinen von Wirbeltieren können die Untereinheiten aus schweren ($H = \text{heavy}$) und leichten ($L = \text{light}$) Ketten aufgebaut sein. Ferritine in Pflanzen und Bakterien sind ausschließlich aus H -Ketten aufgebaut. H -Ketten tragen Ferroxidase- und Nukleationsstellen, L -Ketten tragen zur Kernbildung bei [53, 54].

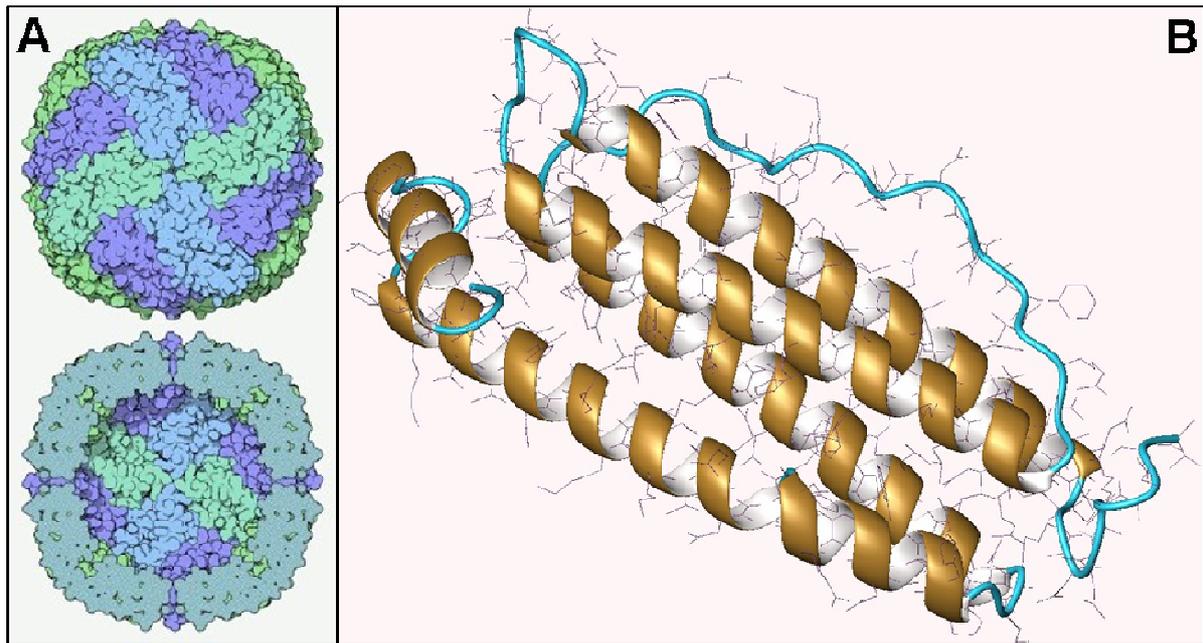


Abb. 10: Eisenspeicherprotein Ferritin. (A) Hohle Ferritinkugel, die aus 24 Untereinheiten besteht und von Kanälen durchzogen ist [55]. (B) Untereinheit des Ferritins, bestehend aus vier bündelartig angeordneten Helices. Eine weitere, kurze Helix steht in 60° Winkel zum Bündel [56].

Für die Eiseneinlagerung in Ferritin werden zwei Schlüsselstellen verantwortlich gemacht. Eintretendes Fe(II) wird an Ferroxidasezentren, das zwischen den Helices der *H*-Ketten liegt oxidiert. Drei Glutaminsäurereste an der Hohlräumoberfläche sind für die Nukleation des Ferrihydrits verantwortlich. Die aktiven Zentren wirken kooperativ auf die Kinetik der Eisenoxidanlagerung, so dass Mineralisierung nur im Proteinhohlraum und nicht außerhalb stattfindet. In natürlichem Ferritin liegt Eisen als Ferrihydrit mineralisiert vor. Da Ferrihydrit relativ labil ist, wird bei Eisenmangel eine rasche Versorgung des Organismus mit Eisenionen ermöglicht [57].

2.3.2 *Anwendungen des Proteins in der Chemie*

Apoferritin, die leere Proteinhülle des Ferritins, kann durch den definierten Hohlraum im Inneren und dessen Zugänglichkeit über definierte Kanäle als Nanoreaktor für die Kristallisation von anorganischen Materialien, aber auch für gröÑenselektive chemische Reaktionen genutzt werden. Mann et al. synthetisierten Mangan(III) Oxid Nanopartikel durch Inkubieren von Apoferritin mit Mangan(II)ionen in wässrigem Medium. Durch die Behandlung von nativen Ferritin-Eisenoxidkernen mit H₂S konnten Eisensulfidnanopartikel

synthetisiert werden. Es gelang auch die Mineralisierung von Magnetit in nativem Apoferritin, das als Magnetoferritin eine biomedizinische Anwendung finden sollte. [57, 58]. Ein Schema der Herstellung von Magnetoferritin ist in Abb. 11 gegeben. UCHIDA ET AL. mineralisierten Magnetit in genetisch synthetisiertem, humanem *H*-Ketten Ferritin, an dessen Oberfläche ein spezifisches *Targeting*peptid (RGD-C4) verankert war. In vitro konnte die spezifische Ansteuerung von C32 Melanomzellen gezeigt werden [59]. DOUGLAS ET AL. kristallisierten Cobalt(III)oxyhydroxid Partikel in Apoferritin [60]. KLEM ET AL. untersuchten die magnetischen Eigenschaften von Fe/Co Partikeln die in Apoferritin synthetisiert wurden [61]. UENO ET AL verwendete Apoferritin, das mit Palladium-Nanoclustern beladen war, um damit eine gröbenselektiven Hydrogenierung von Olefinen zu erreichen [62].

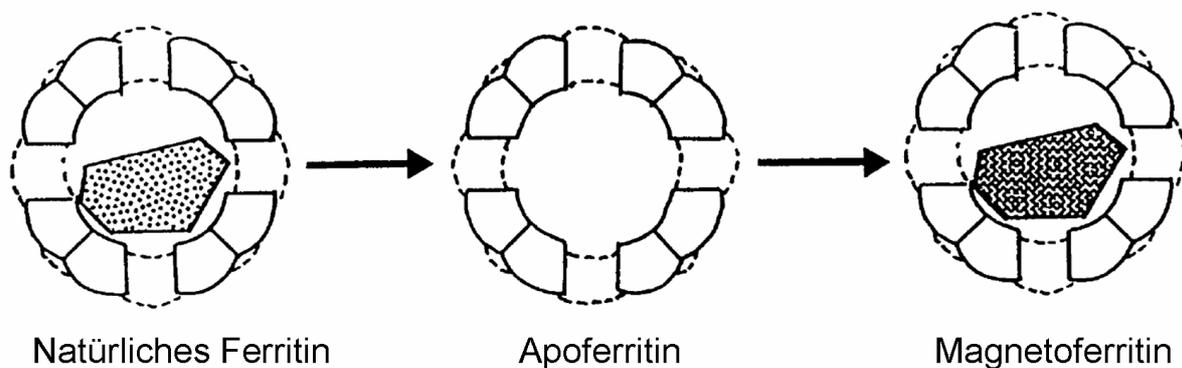


Abb. 11: Magnetoferritin [57]. Ferrihydrit wird aus dem natürlichen Ferritin (aus der Pferdemicz) herausgelöst. Anschließend wird Magnetit in das leere Apoferritin hineinkristallisiert. Es entsteht Magnetoferritin.

3 Methoden

3.1 Festphasenpeptidsynthese

Festphasenpeptidsynthese (*Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS*) ist heute die wichtigste Methode zur chemischen Herstellung von sequenziell definierten Peptiden. Sie wurde von 1963 von R. B. Merrifield eingeführt [63]. Das zu synthetisierende Peptid wird bei der *SPPS* über einen *Linker* an ein unlösliches Harz aus vernetztem Polymer angekuppelt. Die Peptidsequenz wird dann vom C- zum N-Terminus, also entgegen der ‚natürlichen‘ Syntheserichtung aufgebaut [64]. Die Aminosäuren werden in der gewünschten Reihenfolge nacheinander mit aktiviertem C-Terminus und in großem Überschuss an die Aminofunktion, der jeweils letzten angehängten Aminosäure gekuppelt. Übrige Reaktanden und Nebenprodukte können aus dem Reaktor gespült werden, da das (Zwischen-)Produkt am unlöslichen Harz gebunden ist. Es kommt zum kontrollierten Aufbau der gewünschten Aminosäuresequenz. Im letzten Schritt werden die Schutzgruppen und der Linker vom Harz abgespalten. Das Peptid liegt dann frei vor.

Um eine Peptidbindung bei Raumtemperatur und ‚milden‘ Bedingungen zu bilden muss die Carboxylfunktion der zu kuppelnden Aminosäure aktiviert sein. Ohne Aktivierung würde eine Carbonsäure mit einem Amin unter den Reaktionsbedingungen lediglich zu Ammoniumcarboxylat reagieren. An eine aktivierte Carbonsäure kann die Aminofunktion jedoch nukleophil angreifen. Unter Abspaltung von Wasser kommt es dann zur Ausbildung der Amidbindung. Eine hohe Selektivität dieser Reaktion bewirkt die Verwendung von Schutzgruppen an allen, die Reaktion störenden Funktionalitäten. Die α -Aminofunktion der zu kuppelnden, aktivierten Aminosäure ist dabei häufig mit einer Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl)-Schutzgruppe versehen [65]. Fmoc wird nach dem Binden der betreffenden Aminosäure an das Peptidende und vor der Kupplung einer neuen Aminosäure mit Piperidin abgespalten. Das entstehende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt kann UV-spektrometrisch nachgewiesen werden. So lässt sich die Vollständigkeit des jeweiligen Kupplungsschritts quantifizieren. Da sich die einzelnen Schritte nacheinander wiederholen und das Produkt an einer unlöslichen, festen Phase gebunden ist, lässt sich *SPPS* automatisieren. Ein vereinfachtes Schema der *SPPS* ist in Abb. 12 dargestellt. Der Reaktionszyklus verläuft immer gleich: Nach der Abspaltung der endständigen Fmoc-Gruppe am letzten N-Terminus folgt das Spülen. Die nächste, aktivierte Aminosäure wird gekuppelt, es wird erneut gespült, und der Zyklus wird fortgeführt.

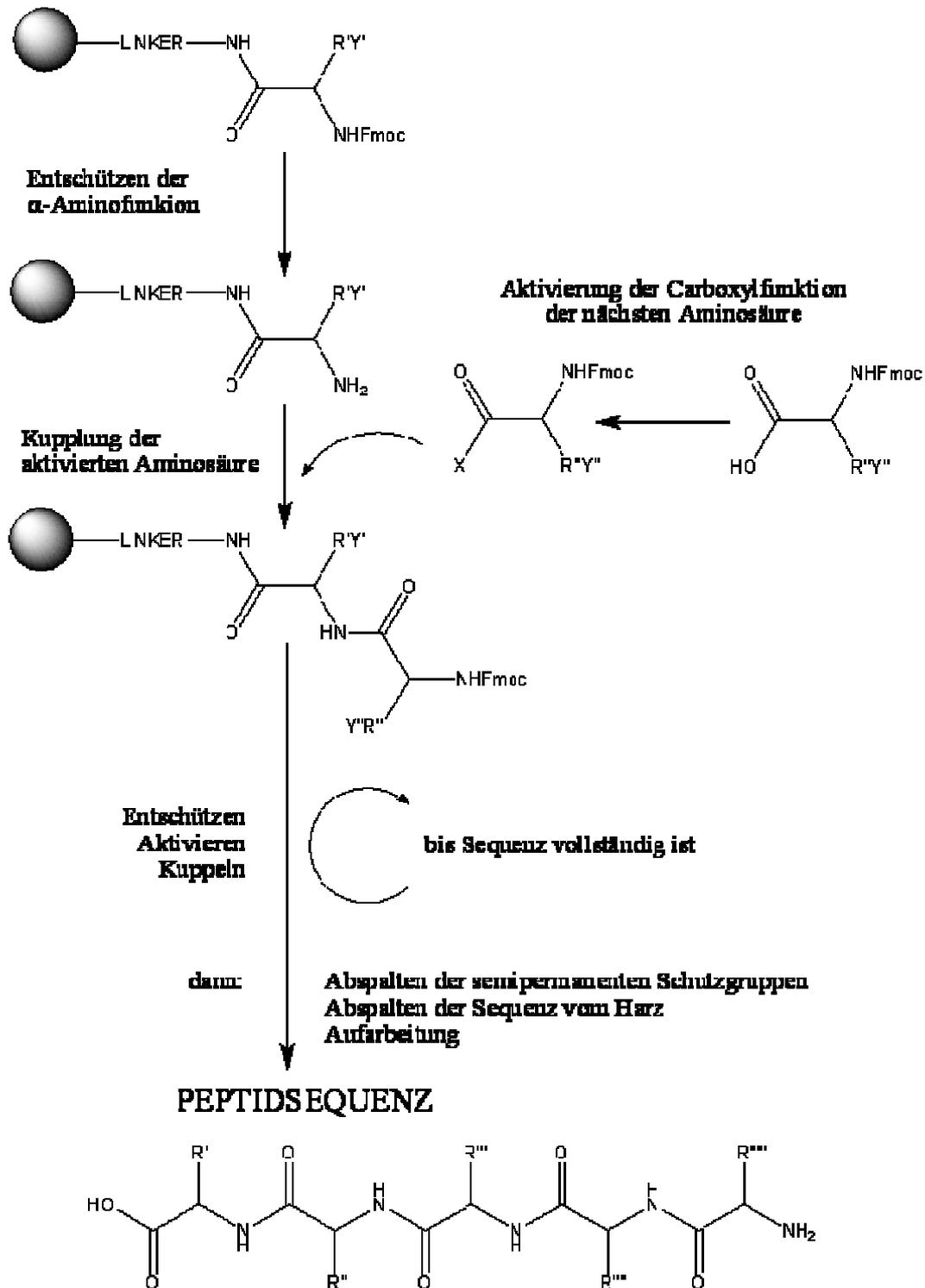


Abb. 12: Vereinfachtes Schema der Festphasenpeptidsynthese. (modifiziert nach [63])

Als Festphase wird häufig Polystyrolharz eingesetzt, das mit Divinylbenzol (DVB) quervernetzt ist. Normalerweise werden Harze verwendet, die zu 1% quervernetzt sind. Der Quervernetzungsgrad ist ausschlaggebend für die Quellfähigkeit und mechanische Stabilität des Harzes. Über eine abspaltbare Ankergruppe (*Linker*) wird die erste Aminosäure kovalent

an die Festphase gebunden [63]. Um Nebenreaktionen zu vermeiden müssen störende Funktionen in den Seitenketten wie zusätzliche Amino- (z.B. Lysin) und Carboxylreste (z.B. Glutaminsäure) blockiert werden. Die N-terminalen Schutzgruppen und die Seitenkettenschutzgruppen müssen so gewählt werden, dass sie sich nacheinander quantitativ abspalten lassen. Sowohl die verwendeten Schutzgruppen als auch die zu deren Abspaltung verwendete Chemie dürfen das Peptid nicht dauerhaft verändern. Am häufigsten wird mit Fmoc oder *t*Boc (*tert*-butyl-oxy-carbonyl) Chemie gearbeitet. Wird der N-Terminus mit Fmoc geschützt, so verwendet man für die Seitenketten basenstabile, säurelabile Schutzgruppen. Beispiele hierfür sind Boc (schützt Aminofunktionen, z.B. in Lysin), *tert*-Butyl (für Carboxyl- und Hydroxylgruppen, z.B. Asparaginsäure, Serin) und Trityl (Amide, z. B. in Glutamin). Die Aktivierung des Carboxylkohlenstoffs erfolgt meist durch Umsetzung der Aminosäure mit Guanidinium-/Uroniumreagenzien wie HBTU (2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) und HOBt (1-Hydroxybenzotriazol). Ein Zusatz von DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin) wirkt als Katalysator und reduziert die Racemisierungstendenz von HOBt. Bei der Reaktion entsteht ein O-acetyliertes Isoharnstoffderivat, das entweder direkt mit der freien Aminofunktion eine Peptidbindung ausbildet, oder mit dem ebenfalls in der Reaktion entstandenen HOBt-Anion einen Aktivester bildet. Der Aktivester wiederum wird nukleophil von der Aminofunktion des Peptids angegriffen. Unter der Abspaltung von Wasser wird eine Peptidbindung gebildet. Phosphoniumreagenzien wie BOP (Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat) und PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat) spielen ebenfalls eine große Rolle als Aktivatoren. Im Gegensatz zu HBTU reagieren sie nicht mit freien α -Aminofunktionen. Es bildet sich ein Aktivester, der leicht mit der Aminofunktion zum Amid reagieren kann. Die Abspaltung vom Harz erfolgt in den meisten Fällen mit 95% TFA (Trifluoressigsäure), wobei auch die gängigen Schutzgruppen der Seitenketten abgespalten werden.

3.2 Mikroskopie

3.2.1 Lichtmikroskopie

Die Existenz von Zellen und ihr Aufbau wurden insbesondere durch Lichtmikroskopie erforscht. Heute ist Lichtmikroskopie in vielen naturwissenschaftlichen Disziplinen unersetzlich. Das erste Mikroskop wurde vermutlich vor ca. 380 Jahren von holländischen Brillenschleifern gebaut. Leeuwenhoek (1632 – 1723), besonders Abbé und Zeiss

(1816 – 1888), Siedentopf und Zsigmondy entwickelten das Lichtmikroskop weiter [66]. Der Vergrößerung des Lichtmikroskops sind natürliche Grenzen gesetzt, die aus der Wellenlänge und Beugung des sichtbaren Lichts resultieren. Bildet man sehr kleine Gegenstände ab, so tritt durch Beugung der Lichtwellen ein Beugungsbild mit mehreren dunklen und hellen Ringen auf. Eine gute Auflösung zweier benachbarter Objekte ist nur gewährleistet, wenn sich diese Beugungsscheibchen wenig überlappen. Dieser Abstand, das Auflösungsvermögen d eines Mikroskops, ergibt sich nach Abbé folgendermaßen:

$$d = \frac{0,61 * \lambda}{n * \sin(\alpha/2)}$$

Gl. 15

dabei ist n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe, α der Öffnungswinkel des Objektivs (vgl. Abb. 13) und λ die Wellenlänge des benutzten Lichts. Die maximale Auflösungsgrenze für sichtbares Licht liegt bei ca. 200 nm. (Gl. 15 [21])

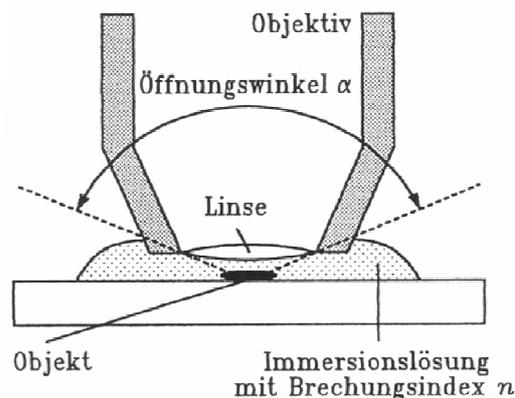


Abb. 13: Öffnungswinkels α der Objektivblende eines Lichtmikroskops [21].

Die Auflösung von Objekten im Nanometerbereich kann unter Verwendung anderer Strahlung, z.B. Elektronenstrahlung (Wellenlänge bis zu $\lambda = 0,001$ nm) erreicht werden (Transmissions- und Raster/ *Scanning*-Elektronenmikroskopie, TEM, SEM). Rastermikroskopische Methoden dienen der Darstellung von Oberflächenstrukturen (z.B. SEM, Kraft/ *Atomic Force*-Mikroskopie, AFM).

3.2.2 *Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)*

Bereits 1924 postulierte De Broglie, dass nicht nur Licht sondern auch alle Materieteilchen Welleneigenschaft besitzen. Elektronenmikroskopie beruht auf dieser Welleneigenschaft.

Die Wellenlänge eines Elektrons ergibt sich aus seiner Geschwindigkeit v und seinem Impuls p :

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v} \quad \text{Gl. 16}$$

$$p = m_e \cdot v \quad \text{Gl. 17}$$

m_e : Masse des Elektrons

h : Planck'sche Konstante

Die Elektronengeschwindigkeit kann so geregelt werden, dass man Wellenlängen von etwa 0,001 nm erreicht. Mit einer Apertur von etwa 10^{-3} ist dann die Auflösung maximal 1000mal höher als in der Lichtmikroskopie. Dies ermöglicht die Untersuchung von biologischen Strukturen im Nanometerbereich. Aufgrund der starken Streuung von Elektronen in Gasen muss im Hochvakuum gearbeitet werden (mind. 10^{-2} Pa) [21]. Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ermöglicht eine direkte Abbildung des Objekts. Je nach dessen Beschaffenheit und der Beschleunigungsspannung der Elektronen darf dieses wenige nm bis einige μm dünn sein. (Gl. 16, 17 [21])

Wie aus Abb. 14 ersichtlich ähnelt das Bauprinzip des Transmissions- oder Durchstrahlelektronenmikroskops stark dem des Lichtmikroskops. Anstelle von Kondensator, Objektiv und Projektionslinse/ Okular werden jedoch Elektronenlinsen eingesetzt. Hierfür verwendet man z.B. von Spulen erzeugte magnetische Felder. Die Elektronen werden durch Glühkathoden, z.B. ein geheizter Wolframdraht, der unter negativer Hochspannung steht, oder Feldemissionskathoden produziert. Der erzeugte Elektronenstrahl wird im Hochvakuum in Richtung der durchbohrten Anode gelenkt und beschleunigt. Die verwendete Beschleunigungsspannung beträgt dabei zwischen 50 und 200 kV. Bei einer Spannung von 50 kV werden Wellenlängen bis zu 0,005 nm erreicht. Das zur Zeit leistungsfähigste TEM steht am MPI für Metallforschung in Stuttgart und besitzt bei einer Beschleunigungsspannung von 1250 kV ein Punktauflösungsvermögen von 0,105 nm [66].

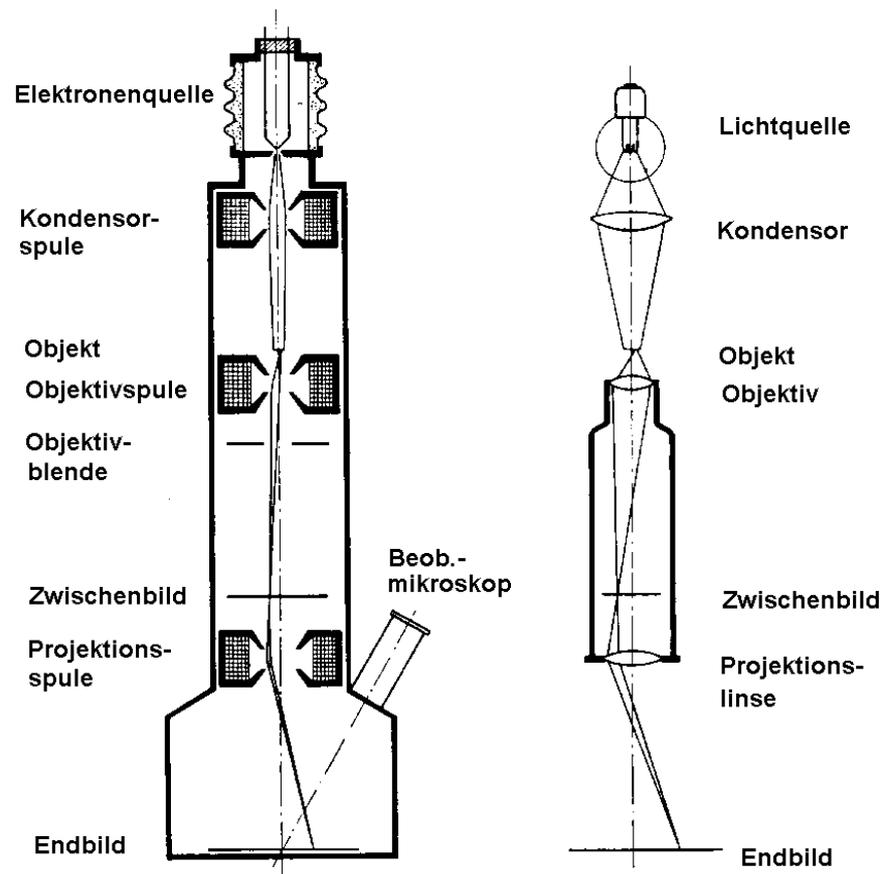


Abb. 14: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops (links) verglichen mit dem eines Lichtmikroskops (rechts) [21].

Der Elektronenstrahl passiert die Anode und wird durch den Kondensator, einer Elektronenlinse, parallel gebündelt auf das Objekt gerichtet. Das Objekt befindet sich auf einem kohlenstoffbeschichteten Probenträger aus Kupfer, in der Probenhalterung zwischen Kondensator und Objektiv. Die Elektronenstrahlen müssen das Objekt passieren. Aufgrund der niedrigen Eindringtiefe von Elektronen in Feststoffe (ca. 100 nm) muss das Objekt sehr dünn sein. Es kann zur Absorption, Brechung, elastischer und inelastischer Streuung der Elektronenstrahlung kommen. Streuphänomene beruhen auf der Wechselwirkung der Elektronen mit dem Nukleus der Probe. Probenbestandteile hoher Dichte oder mit schweren Elementen streuen mehr, wodurch weniger Elektronen beim Detektor ankommen und das Bild dunkel erscheint. Organische Verbindungen erscheinen durch geringere Streuung hell, da hier oft die Massendickedifferenz den Kontrast bestimmt. Durch elektronendichte Kontrastierung mit z.B. Schwermetallsalzen wie Uranylacetat kann dieser verbessert werden. Durch den Kondensator wird inelastische Strahlung abgelenkt und der Kontrast zwischen Hell und Dunkel verbessert. Durch ein Projektiv hinter der Probe wird das vom Objektiv

kommende Bild vergrößert und auf einen Detektor geworfen. Zur Aufzeichnung wird häufig eine CCD-Kamera verwendet.

3.3 Dynamische Lichtstreuung

Über dynamische Lichtstreuung (DLS, Photonenkorrelationsspektroskopie) lässt sich der hydrodynamische Durchmesser d_H von kolloidaldispersen Teilchen (d_H : 5 nm bis 3 μm) bestimmen [67]. Das Messprinzip erfasst die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel über die Fluktuation der Streulichtintensität. Das Streulicht wird meist im Winkel von 90° zum Laser in einem Photomultiplier aufgefangen, verstärkt und über einen Autokorrelation in eine zeitliche Abhängigkeit gesetzt.

Ein Korrelator berechnet aus den zeitlichen Schwankungen der Streulichtintensität eine Autokorrelationsfunktion, die an eine theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ angepasst wird. Für die Korrelationsfunktion gilt:

$$g(\tau) = e^{-2DK^2\tau} \quad \text{Gl. 18}$$

- τ : Verzögerungszeit
- D : Diffusionskoeffizient
- K : Betrag des Streulichtvektors

Aus der Korrelationsfunktion ergibt sich der Diffusionskoeffizient D , der ein Maß für die Bewegung der Partikel ist. Je kleiner die Partikel, desto schneller bewegen sie sich. Je schneller sich die Partikel bewegen, desto stärker steigt die Fluktuation der Streulichtintensitäten. Die zeitliche Korrelation der Intensitäten nimmt ab und der Diffusionskoeffizient steigt. Die Verzögerungszeit τ und der Betrag des Streulichtvektors K sind von den Messbedingungen abhängig und aus bekannten Größen während einer Messung rechnerisch zugänglich.

Unter Annahme von kugelförmigen Partikeln ist der mittlere hydrodynamische Radius (r_H) über die Stokes-Einstein-Beziehung zu berechnen:

$$r_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Gl. 19}$$

- k: Boltzmannkonstante
T: absolute Temperatur
 η : dynamische Viskosität

Die Breite der Partikelgrößenverteilung kann durch den ‚Polydispersitätsindex (PDI)‘ angegeben werden. Dieser stellt hier die Abweichung zwischen der Autokorrelationsfunktion und der angepassten Korrelationsfunktion dar und gibt an, wie breit die Partikelgrößenverteilung der gemessenen Partikel ist. Theoretisch erhält man also bei monodispersen Partikeln 0. Praktisch sollte der PDI unter 0,5 liegen, um die Messung als monomodale Verteilung auswerten zu können. (Gl. 18, 19 [67])

4 Synthese von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO*

4.1 Grundlegende Idee

Auf *SPIO* (*superparamagnetic iron oxide*, superparamagnetischem Eisenoxid) basierende Kontrastmittel für die Darstellung von Blutgefäßen und Tumoren, zeichnen sich häufig durch kleine Kristallitgrößen (4 – 10 nm) aus. Diese kleinen Partikel lassen sich zwar einfach stabilisieren und in wässrigen Medien suspendieren, besitzen jedoch ein niedrigeres magnetisches Moment, und verkürzen damit die T₂*-Relaxationszeit weniger als große Partikel. Die magnetischen Eigenschaften von *SPIO* Partikeln sind stark größenabhängig [68, 69]. Das magnetische Moment nimmt mit der Partikelgröße zu. Bei kleinen Partikeln treten aufgrund der hohen Oberfläche Effekte wie *Surface Spin Canting* stärker in Erscheinung als bei größeren [70]. Auch eine hohe Kristallinität ist eine wichtige Voraussetzung für rasches und vollständiges Auf- und Abmagnetisieren in magnetischen Feldern. Bei der üblichen Herstellung von *SPIO* Partikel durch Kopräzipitation von Eisensalzen in wässrigem Milieu, kommt entsteht eine amorphe Randschicht. Diese trägt nicht zum magnetischen Gesamtmoment des Partikels bei und stellt also nur überflüssiges Volumen dar.

Optimal für ein Kontrastmittel ist also die Verwendung von großen, hochkristallinen *SPIO* Einzelpartikeln. Wählt man hier einen Durchmesser knapp unter der ferromagnetischen Domäne (ca. 30 nm), so besitzen die Partikel ein verhältnismäßig hohes magnetisches Moment bei superparamagnetischem Verhalten und kolloidaler Stabilisierbarkeit. Dieses Konzept ermöglicht aufgrund des starken Effekts der ‚großen‘ *SPIO* auf T₂* möglicherweise sogar die Gabe einer geringeren Dosis Kontrastmittel, bei gleicher oder besserer Kontrastgebung. Somit würde der Körper mit weniger Kontrastmittel belastet. Die Synthese solcher Partikel über nicht-wässrige Sol-Gel-Chemie hat gegenüber der klassischen Kopräzipitation viele Vorteile und wird in dieser Arbeit beschrieben.

Um *SPIO* Partikel in biologischen Medien zu suspendieren bedarf es potenter Stabilisatoren, die entweder nieder- oder hochmolekularer Art sind. Beispiele hierfür werden ausführlich in Kapitel 2.1.4.3 beschrieben. Der Stabilisator muss Van-der-Waals- und Magnetisch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln abschirmen, aber auch die Partikel suspendierbar machen und die Adhäsion von Plasmaproteinen verzögern (‚*stealth*‘ Effekt). Biokompatibilität und –abbaubarkeit sollte ebenfalls gewährleistet sein. Oft werden Dextranderivate für die Stabilisierung von *SPIO* verwendet. Es sind jedoch schwere allergische Reaktionen gegen Dextran bekannt. Nicht zuletzt deshalb ist die Entwicklung neuer, innovativer Stabilisatoren von großem Interesse.

Der im Folgenden beschriebene *SPIO* Stabilisator FERR-*b*-PEO vereint die Eigenschaften eines Peptids, das als Metalloxidkleber fungiert mit den ‚*stealth*‘ Eigenschaften eines PEO Blocks. Der peptidische Metalloxidkleber hat ein natürliches Vorbild: Er stellt eine Eisenbindungssequenz des humanen *H*-Ferritins dar und imitiert damit die natürliche Eisenfixierung. Das Polymer ist biokompatibel und sehr hoch definiert. Die Herstellung über Festphasenpeptidsynthese gewährleistet eine einfache Automatisierung des Prozesses und eine relativ niedrige Polydispersität des Produktes. Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit der weitergehende Funktionalisierung für Versuche zum aktiven *Targeting*.

Die Synthese und Charakterisierung der Einzelkomponenten und des neuen MRT-Kontrastmittelsystems, bestehend aus ‚großen‘, hochkristallinen *SPIO* Partikeln, die mit FERR-*b*-PEO stabilisiert wurden, sind in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

4.2 Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (*SPIO*)

4.2.1 Einführung

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (*SPIO*) aus Magnetit und Maghemit können auf unterschiedlichen Wegen hergestellt werden. Die gängige Methode basiert auf der Kopräzipitation von Fe(II)- und Fe(III)chlorid (molares Verhältnis 1:2) in wässrigem Medium durch Zusatz von Base. Obwohl diese Methode bei Raumtemperatur ausgeführt werden kann, ist sie sehr störanfällig. So muss die Basenzugabe, der pH-Wert sowie die Art des Mischens sorgfältig kontrolliert werden um reproduzierbare Teilchengrößen zu erhalten. Auch die Temperatur und die Art des Anions beeinflussen das Ergebnis maßgeblich. Außerdem müssen häufig große Mengen oberflächenaktiver Substanzen eingesetzt werden um die entstehenden Partikeln zu stabilisieren [5, 50, 71, 72]. Aus wässrigen Synthesen stammende *SPIO* besitzen eine verhältnismäßig dicke Oberflächenschicht amorphen Eisenoxids, die nicht zum magnetischen Gesamtmoment beiträgt [73]. Die Vorteile von Sol-Gel-Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln wurden bereits in Kapitel 2.2.2.2 ausführlich beschrieben.

4.2.2 Synthese

0,5 g Eisen(III)acetylacetonat wurde mit 20 ml Benzylalkohol gemischt, und in einen 40 ml Stahlautoklaven mit Tefloneinsatz überführt. Der Autoklav wurde im Trockenschrank über 48 h auf 200°C erhitzt [72]. Aus dem vor der Reaktion roten Gemisch der Edukte entstand ein schwarzer Niederschlag aus Magnetit, der mehrfach mit THF gewaschen wurde. Diese *SPIO* ($d_{\text{XRD}} = 8 - 10 \text{ nm}$) wurden als Kristallisationskeime für die Synthese ‚großer‘

SPIO (soll: $d = \text{ca. } 20 \text{ nm}$) verwendet. Dafür wurden in einem zweiten Reaktionsschritt 0,5 g Eisen(III)acetylacetonat und 20 ml Benzylalkohol mit 10% (w/w) Kristallisationskeimen versetzt und im Autoklaven bei 200°C über 48 h umgesetzt. Die schwarzen Präzipitate werden mehrfach mit THF gewaschen und zum Lagern und weiteren Verarbeiten in Ethanol überführt. Die Ausbeute beträgt 25%.

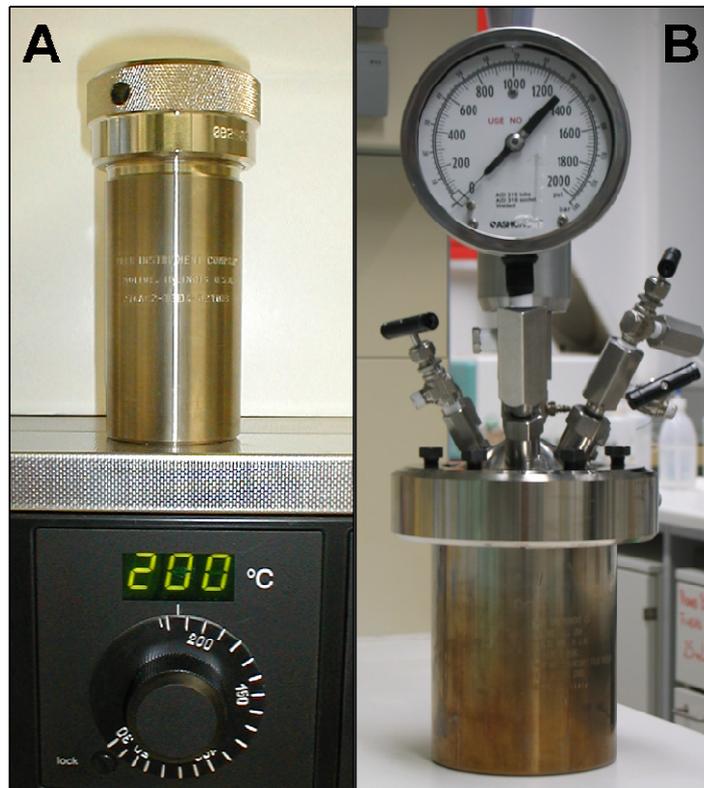


Abb. 15: Autoklaven für die Synthese von Eisenoxidpartikel. (A) 40 ml Stahlautoklav für kleine Syntheseansätze. Maximale Füllhöhe mit Tefloneinsatz 20 ml. Die Reaktion findet in einem Heizschrank bei 200°C statt. (B) 1000 ml Stahlautoklav mit Rührwerk, Druck- und Gasventilen. Maximale Füllhöhe mit Tefloneinsatz 500 ml. Während der Reaktion befindet sich der Autoklav in einer Halterung mit Heizquelle und Rührautomatik.

Zur Herstellung größerer Produktmengen wurde die Reaktion analog in einem 500 ml Autoklaven mit Rührwerk (Parr Instruments) durchgeführt. Die Reaktionszeit der einzelnen Reaktionsschritte wurde auf 24 h verkürzt. Bereits nach dieser Zeit ist die Reaktion abgeschlossen. Es befindet sich kein roter Niederschlag mehr in der Waschlösung. Zudem ließen sich ‚große‘ *SPIO* aus der 24 h Synthese besser mit Polymer stabilisieren, als die Partikel aus 48 h Ansätzen. Die verwendeten Autoklaven sind in Abb. 15 abgebildet. Der Reaktionsmechanismus der Synthese ist bei GARNWEITNER UND NIEDERBERGER beschrieben [50].

4.2.3 *Ergebnisse*

Als Produkt erhält man schwarze superparamagnetische Eisenoxidpartikel (*SPIO*). Ethanol vermag die Partikel so weit zu stabilisieren, dass sich eine schwarze Suspension bildet, die nach längerer Lagerung einen aufschüttelbaren Bodensatz bildet. Das Zetapotential der Partikel beträgt -21,9 mV (gemessen aus ethanolischer Dispersion). In Wasser überführt aggregieren die *SPIO* sofort. In basischem, wässrigem Medium bilden sich jedoch über einige Wochen stabile, klare Dispersionen. Bei pH 10 wurde eine Oberflächenladung von -43,6 mV (+/-1,1) gemessen. In saurem, wässrigem Medium lässt sich lediglich eine geringe Menge der *SPIO* stabilisieren. Die Suspension ist einige Tage stabil. Bei einem pH Wert von 6,3 beträgt das Zetapotential 16,5 mV (+/-1,2). Wie in Kapitel 4.4 näher erläutert wird, können jedoch durch Umhüllung der Partikel mit FERR-*b*-PEOs bei neutralem pH stabile, wässrige Partikeldispersionen hergestellt werden.

Kristallinität und Partikelgrößen wurden mittels Röntgendiffraktometrie (XRD) untersucht. Wie aus der Veränderung der Reflexbreite in den XRD-Spektren ersichtlich (Abb. 16), sind die synthetisierten Partikel kristallin und die Größe nimmt nach dem zweiten Reaktionsschritt zu. Die Position der Reflexe deutet auf das Vorliegen von Eisenoxid in Form von Magnetit und/ oder Maghemit hin. Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt eine größere Übereinstimmung der Diffraktogramme mit den angegebenen Reflexen für Magnetit als für Maghemit. Durch die ähnliche Kristallstruktur ist im XRD jedoch keine eindeutige Unterscheidung zwischen den beiden Phasen möglich [74]. Für die genaue Analyse sind weitere Messungen, wie z.B. Mössbauerspektroskopie notwendig. Aus der Reflexbreite konnte über die Scherrer-Gleichung der Partikeldurchmesser (d_{XRD}) errechnet werden. Für die Kristallisationskeime beträgt d_{XRD} 7 nm, während d_{XRD} für die ‚großen‘ *SPIO* bei 14 nm liegt.

Größe und Morphologie der Partikel konnte durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) weitergehend analysiert werden. TEM Bilder verdeutlichen, dass aus den Prekursoren mit einem Durchmesser $d_{\text{TEM}} = 5 - 10$ nm (Abb. 17 (A)), nach dem zweiten Reaktionsschritt ‚große‘ *SPIO* mit einem Durchmesser $d_{\text{TEM}} = 18 - 20$ nm (Abb. 17 (B)) entstehen. Auch ohne zusätzliche Größenselektionsmaßnahmen zeigen die Partikel eine enge Größenverteilung. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass bei den ‚großen‘ *SPIO* unterschiedliche Partikelformen vorliegen. Vermutlich ist dies mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten im Kristallwachstum zu begründen [75].

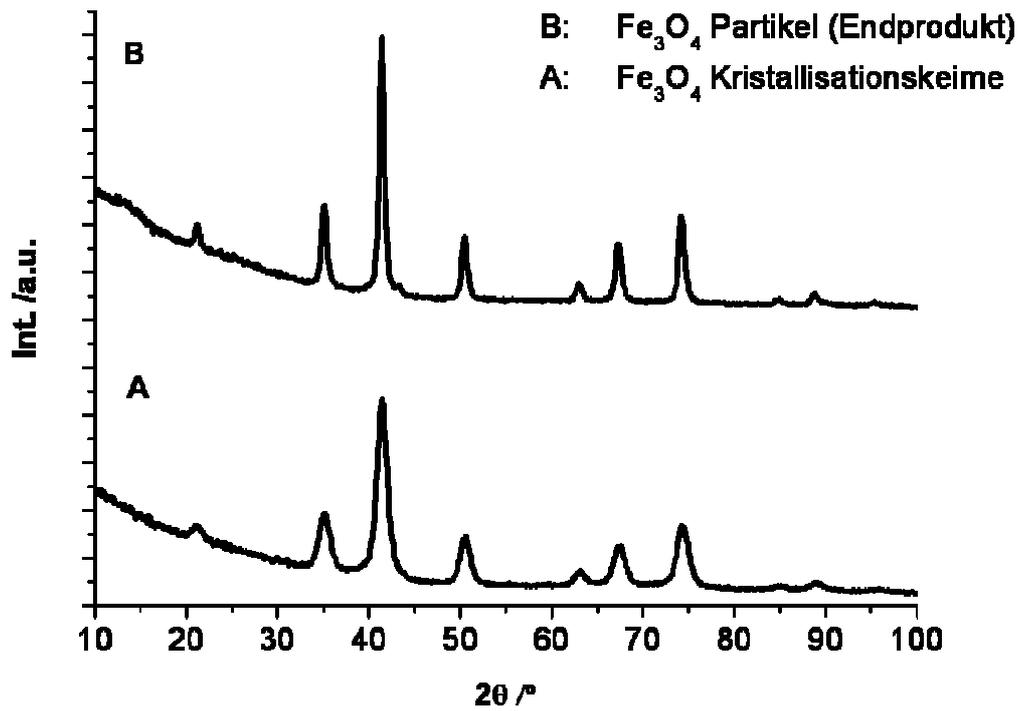


Abb. 16: Röntgendiffraktogramm von Eisenoxidpartikeln. Sowohl die Kristallisationskeime aus der ersten Reaktionsstufe (A) als auch das Endprodukt ‚große‘ *SPIO* (B) sind kristallin. Der Partikeldurchmesser nimmt von (A) nach (B) zu.

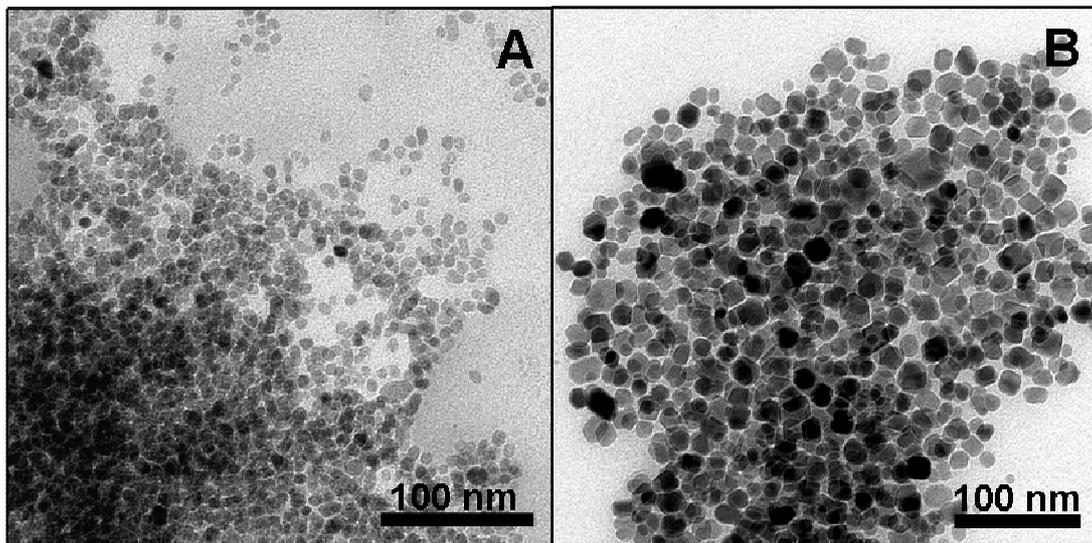


Abb. 17: TEM Bilder der synthetisierten Eisenoxidnanopartikel. (A) zeigt 6 – 8 nm große Kristallisationskeime, (B) das Endprodukt, ‚große‘ *SPIO* aus der zweiten Reaktionsstufe mit $d = 18 - 20$ nm.

Die Abweichungen zwischen den Durchmessern aus XRD und TEM ist darauf zurück zu führen, dass bei der Röntgendiffraktion alle Partikel erfasst werden, bei TEM Messungen jedoch nur eine kleine Partikelpopulation. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit zur Methode, aber auch der guten Reproduzierbarkeit von d_{TEM} und den Vergleichsmöglichkeiten mit TEM Bildern von polymerstabilisierten *SPIO* wurde im Weiteren d_{TEM} als Vergleichsgröße gewählt.

Weitergehende Untersuchungen mit Hochauflösender TEM (high resolution TEM) ermöglichte eine Auflösung der lokalen Kristallstruktur der Partikel (Abb. 18). Das *SPIO*-Endprodukt besteht aus Einzelkristallen und ermöglicht somit rasche Auf- und Abmagnetisierung.

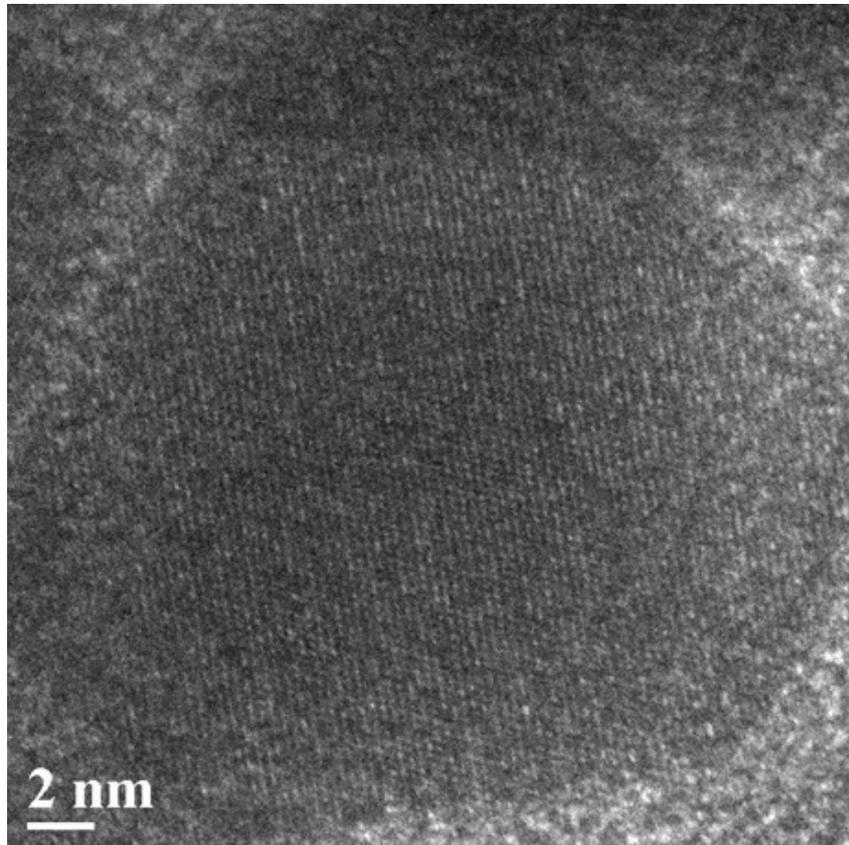


Abb. 18: HRTEM eines *SPIO* Teilchens. Die lokale Kristallstruktur ist deutlich sichtbar und unterstreicht den einzelkristallinen Charakter der Partikel.

Die synthetisierten *SPIO* Partikel sind kleiner als einzelne ferromagnetische Domänen (~ 30 nm) und sollten sich daher superparamagnetisch verhalten. Dies konnte durch *SQUID*-Messungen (*Supraconducting Quantum Interference Device*, Supraleitende Quanteninterferenzeinheit) bei 293 K bestätigt werden. Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der

Messung. Die Partikel besitzen nach Abschalten des Feldes keine Remanenzmagnetisierung. Die Sättigungsmagnetisierung M_S liegt bei 74 emu/g. Sie ist vergleichbar mit den Literaturwerten für *Bulk*- γ - Fe_2O_3 $M_S = 60 - 80$ emu/g und *Bulk*- Fe_3O_4 $M_S = 92 - 100$ emu/g [76]. Aufgrund ihres superparamagnetischen Verhalten und einer hohen Sättigungsmagnetisierung sind die hier dargestellten *SPIO* Partikel also sehr gut für eine Anwendung als Kontrastmittel geeignet.

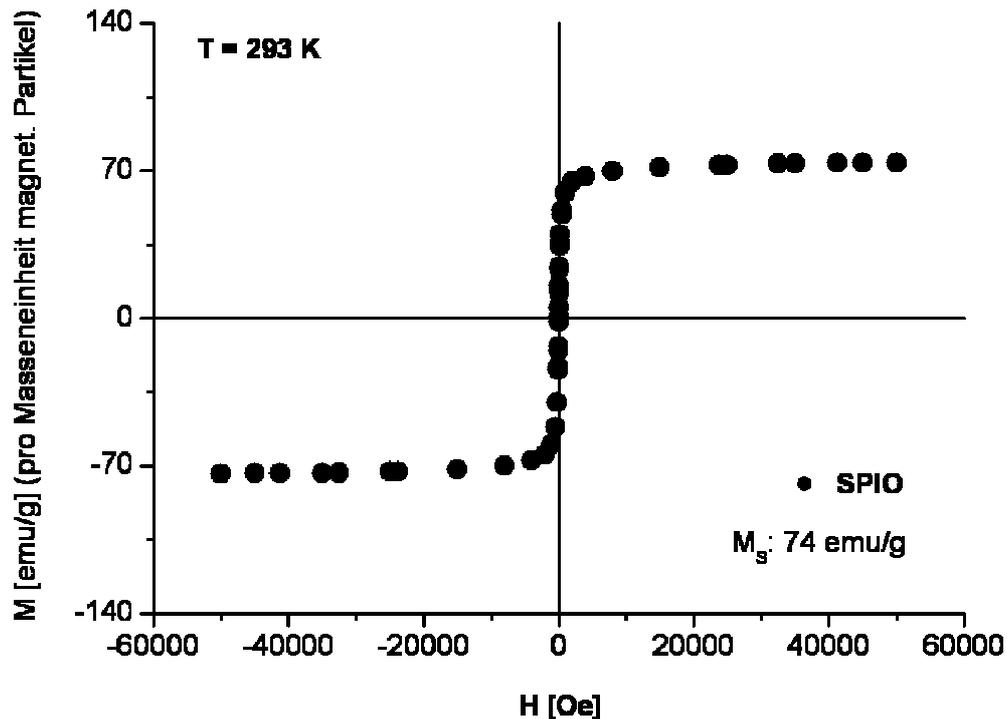
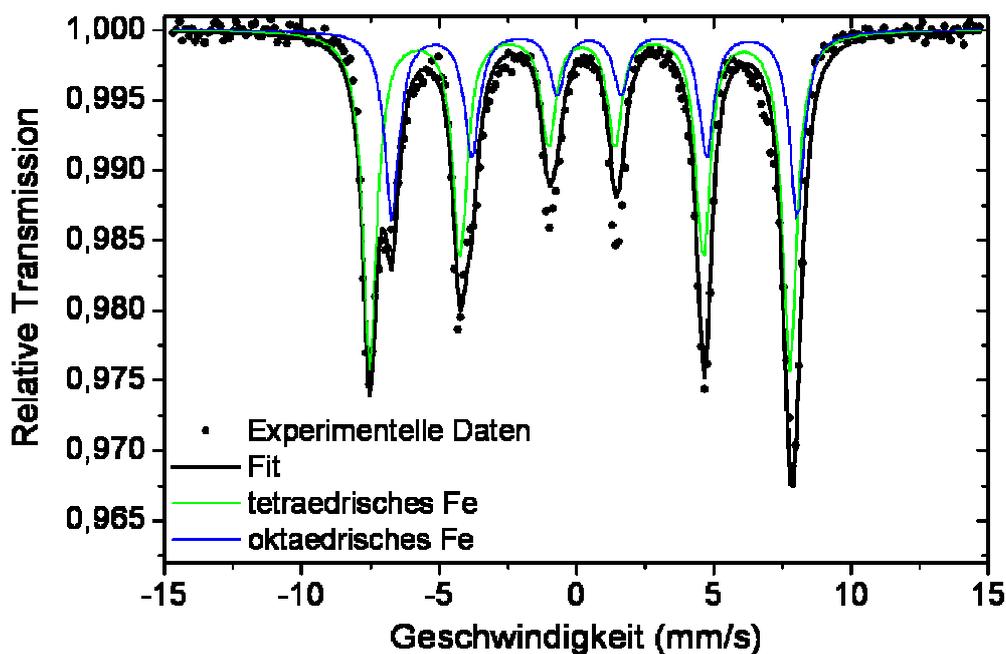


Abb. 19: Magnetisierungskurve aus *SQUID* Messung. Bei 293 K verhalten sich die Partikel superparamagnetisch. Die Sättigungsmagnetisierung liegt bei 74 emu/g.

Anhand der XRD-Daten konnte noch keine eindeutige Aussage über die Kristallstruktur der erzeugten Partikel getroffen werden. Sowohl Fe_3O_4 als auch γ - Fe_2O_3 kommen als Kontrastmittel zum Einsatz. Fe_3O_4 wird jedoch aufgrund der höheren Sättigungsmagnetisierung und besseren Biokompatibilität bevorzugt [73]. Es ist also von Interesse, welche Eisenoxidphase hier vorliegt.

Die schwarze Farbe der erhaltenen ethanolischen Partikelsuspension gibt bereits einen Hinweis auf das Vorliegen von Fe_3O_4 . Nach langer Lagerung (ca. 6 Monate und mehr) in Ethanol verfärbt sich die Suspension zunehmend bräunlich. Dieses Phänomen lässt sich durch zunehmende Oxidation des Fe_3O_4 zu γ - Fe_2O_3 erklären.

Mössbauerspektroskopie konnte dies bestätigen: die Eisenoxidphase der gealterten Proben besteht aus nicht-stöchiometrischem Magnetit, einem Vertreter der Magnetit/Maghemit-Reihe, bei dem eine partielle Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} stattgefunden hat. Die Hyperfeinaufspaltung des Mössbauerspektrums (s. Abb. 20) zeigt, dass zwei Sextette mit 47,4 T und 45,7 T, in einem Verhältnis von 1,5:1 auftreten. Stöchiometrisches Fe_3O_4 besitzt zwei Sextette bei einem Feld von 49 T (tetraedrische koordiniertes Fe^{3+}) und 46 T (oktaedrisches $\text{Fe}^{2,5+}$) in einem Verhältnis von 1:2. Reines $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ besitzt 2 Sextette bei einem Feld von 49 T (tetraedrisch) und 50 T (oktaedrisch) in einem Verhältnis von 1:1,7 [77]. Die gefundenen Subspektren könnten nun so interpretiert werden, dass die Stelle bei 47 T dem Fe^{3+} in tetra- bzw. oktaedrischer Koordination entspricht, mit Ähnlichkeit zu der tetraedrischen Stelle von Fe_3O_4 oder einer anderen Stelle von $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Die 45,7 T Stelle könnte dem oktaedrisch koordinierten Fe^{2+} entsprechen, ähnlich dem $\text{Fe}^{2,5+}$ von Fe_3O_4 , aber mit einem geringeren Anteil durch partielle Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} .



Temp. (K)	Γ (mm/s)	δ_{Fe} (mm/s)	2ε (mm/s)	B_{hyp} (T)	%
300	0,62	0,27	-0,06	47,4	63,7
	0,63	0,67	0,20	45,7	36,3

Abb. 20: Mössbauerspektroskopie des Endprodukts, gemessen bei 300 K. Gemessene Daten (\bullet), Fit ($-$), tetraedrisches Fe ($-$), oktaedrisches Fe ($-$). Die Hyperfeinaufspaltung ist der Tabelle zu entnehmen.

4.2.4 Zusammenfassung

Das erste Teilziel ist erreicht: Durch eine zweistufige Sol-Gel-Reaktion, bei der Eisen(III)acetylacetonat mit Benzylalkohol umgesetzt wird, gelang die erfolgreiche Synthese von 18 – 20 nm (d_{TEM}) großen *SPIO* Partikeln. Die Partikel besitzen ein negatives Zetapotential und sind in Ethanol und basischen, wässrigen Medien ohne zusätzliche Stabilisatoren dispergierbar. Eine hohe Kristallinität konnte durch XRD und HRTEM bewiesen werden, eine enge Partikelgrößenverteilung durch TEM. Die einzelkristallinen Partikel verhalten sich bei 293 K superparamagnetisch und besitzen mit 74 emu/ g eine hohe Sättigungsmagnetisierung. Damit sind wichtige Grundvoraussetzungen für die Anwendung als Kontrastmittel getroffen. Durch Mössbauerspektrometrie konnte die Eisenoxidphase als nicht-stöchiometrisches Fe_3O_4 identifiziert werden. Im Zuge der Entwicklung eines Kontrastmittelsystems für MRT müssen die hier beschriebenen *SPIO* nun mit einem geeigneten Stabilisator, zum Beispiel dem im Folgenden beschriebenen Polymer FERR-*b*-PEO, beschichtet werden.

4.3 Synthese von FERR-*b*-PEO

4.3.1 Einführung

Ein Kontrastmittel besteht nicht nur aus dem kontrastgebenden Bestandteil, den *SPIO* Teilchen, sondern auch einem Stabilisator. Der Stabilisator wird dazu benötigt die Partikel in wässrigen Medien zu suspendieren. Die daraus erhaltene Nanosuspension muss stabil sein um eine sichere Anwendung zu gewährleisten. Aus der biomedizinischen Anwendung ergeben sich auch die Anforderungen der Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit. Außerdem sollte der Stabilisator den *SPIO* Partikeln ‚*stealth*‘ Eigenschaften verleihen. Das bedeutet, dass die unspezifische Immunabwehr die Partikel erst verzögert erkennt und abfängt. Hierdurch kann die Zirkulationszeit und damit die Zeit für eine Bildgebung deutlich erhöht werden. Ein Beispiel für ein Polymer, das durch seine beweglichen, hydrophilen Ketten *Drug Delivery*- und Kontrastmittel-Systemen ‚*stealth*‘ Eigenschaften verleiht ist das biokompatible PEO. Das Polymer muss jedoch stabil am Partikel fixiert sein. Hierzu bedarf es eines Ankersegments.

In der Natur wird Eisen z.B. im Speicherprotein Ferritin fixiert. Bei der Untersuchung der Proteinstruktur verschiedener Ferritine, findet man übereinstimmende Aminosäuresequenzen, der die Eisenfixierung zugeschrieben werden [78]. Durch Synthese dieser peptidischen Motive, die wie ein ‚Eisenkleber‘ an *SPIO* binden können, lässt sich die natürliche Eisenbindung imitieren.

Festphasenpeptidsynthese ermöglicht eine einfache und automatisierte Kopplung eines solchen Eisenklebers an einen ‚*stealth*‘ PEO Block. Die Stabilisierung von *SPIO* mit den hieraus resultierenden FERR-*b*-PEO Polymeren, ermöglicht die Herstellung eines stabilen, biokompatiblen und potenten Kontrastmittels. Die mobilen und hydrophilen PEO Ketten haben außerdem den großen Vorteil, dass sie die magnetische Wirkung der Partikel nicht zu stark abschirmen. Der Ansatz des Magnetoferritins scheiterte genau hieran: Magnetoferritin besteht aus Magnetit, das in leere Ferritinhüllen einkristallisiert wurde [57, 58, 79]. Diese Methode ist ohne Zweifel elegant als biomimetische Synthese kleiner (8 nm), monodisperser *SPIO* Partikel. Es zeigte sich jedoch, dass die feste Proteinhülle die magnetische Wirkung von Magnetoferritin zu stark abschirmte, weshalb eine Anwendung als Kontrastmittel uninteressant wurde. Eine hochdefinierte Proteinstruktur ist für Stabilisierungszwecke fertiger *SPIO* überflüssig, interessant bleiben die Eisenkleber Motive des Ferritins, die als Ankersegment zur Verbindung von *SPIO* Partikel mit PEO dienen und auf diese Weise stabilisieren.

Die Synthese und Charakterisierung von FERR-*b*-PEO Blockcopolymeren, die diese Eigenschaften vereinen, wird in diesem Kapitel beschrieben.

4.3.2 Wahl der Eisenbindungssequenz

Beim Vergleich der Eisenbindungsmotive verschiedener Ferritine stimmen sowohl bestimmte Sequenz-Motive überein, als auch das gehäufte Auftreten einiger Aminosäuren. Für die Eisenfixierung sind insbesondere Glutaminsäure (E), Histidin (H), Tyrosin (Y) und Glutamin (Q) von entscheidender Rolle [78]. Das Eisenbindungsmotiv um die zwei Glutaminsäuren 61 und 62 sowie das Histidin 65, weist zum einen zwei sehr eng stehende Bindungsmotive, aber auch eine hohe Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Spezies (z.B. Mensch und Lachs, aber auch Bakterien) auf und erscheint schon dadurch ein viel versprechender Metalloxid-Kleber zu sein. Daher wurde die in Abb. 21 gezeigte Sequenz als Ankersegment des Blockcopolymeren ausgewählt.

```

Sa11  MTSQVRQNFHQDCEAAINRQINIE LYASYTYLSMAYYFDRDDQALHNFAKFFKNQSH EERHAEKLMKVQNRGGRI FLQDVKKP
Sa12  MESQIRQNYHHDCEAAINRMINME MFASYTYLSMAFYFSRDDVALPGFAHFFKENSE EERHAEKLLSFQNRGGRI LLQDIKKP
BfMF  MVSQVRQNYHSDCEAAVNRMLNIE LYASYTYLSMYAFFDRDDVALHNVAEFFKEHSH EERHAEKFMKYQNRGGRVVLQDIKKP
BfHF  MDSQVRQNFHRDCEAAINRMVNM E LYASYTYLSMAFYFDRDDIALHNVAKFFKEQSH EERHAEKLMKDNQNRGGRI VLQDVKKP
ChHF  MATPPSQVRQNYHQDCEAAINRQINIE LYASYTYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSH EERHAEKLMKLNQNRGGRI FLQDIKKP
McHF  TTASPSQVRQNYHQDCEAAINRQINIE LYASYTYLSMSCYFDRDDVALKNFAKYFLHQSH EERHAEKLMKLNQNRGGRI FLQDIKKP
HuHF  TTASTSQVRQNYHQDCEAAINRQINIE LYASYTYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSH EERHAEKLMKLNQNRGGRI FLQDIKKP
1                                           56                                           72                                           88

```

Abb. 21: Vergleich der Primärsequenz von Ferritinen (Ausschnitt) (Abbildung modifiziert nach [22]). Rot umrandete Aminosäuren wurden als Metallliganden an den Ferroxidasezentren identifiziert. Der Blau unterlegte Abschnitt (Aminosäure 56 bis 72 von humanem ‚Heavy Chain‘-Ferritin, HuHF) wurde in unterschiedlichen Längen als Eisenbindungssequenz verwendet.

Die dargestellten Ferritinsequenzen verfügen durch die Variation der Aminosäuren über ein breites Spektrum von Bindungseigenschaften, das eine spezifische aber weiche Bindung an Metalloxidoberflächen ermöglicht. Dies wird durch Abb. 22 verdeutlicht. Hier werden die Aminosäuren der Ferritinsequenz entsprechend ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften und ihrer Einteilung im ‚Periodensystem‘ der Aminosäuren dargestellt [80]. Aus diesen Eigenschaften ergeben sich unterschiedliche Bindungspräferenzen und -arten.

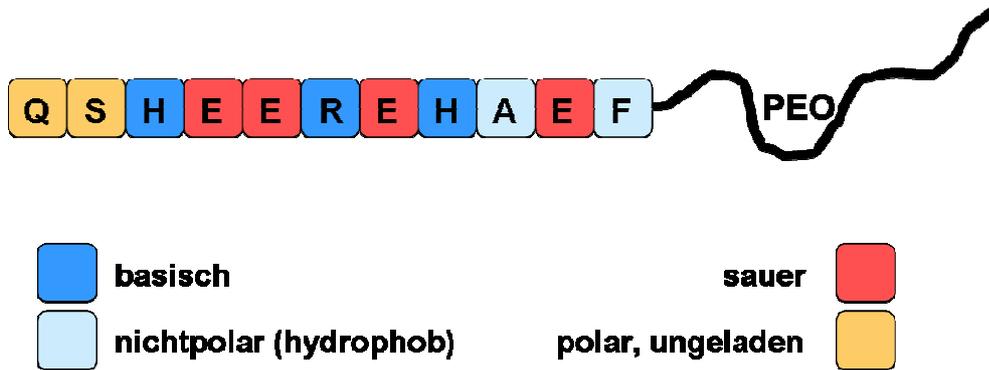


Abb. 22: Aminosäuren in FERR₁₁-*b*-PEO und deren Klassifizierung nach dem ‚Periodensystem‘ der Aminosäuren. Die physikochemischen Eigenschaften der Aminosäureseitenketten sind ausschlaggebend für die Art der Wechselwirkungen mit der Eisenoxidoberfläche.

Je nach Bindungspartner können dabei ionischen oder dipolare Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, hydrophoben oder Ligandenfeld Bindungen aufgebaut werden. Für die Wechselwirkungen zwischen dem Ferritinblock und der Eisenoxidoberfläche ist Glutaminsäure besonders wichtig. Durch die Carboxylgruppe in der Seitenkette kann es zu ionische oder kovalente Bindungen kommen. Histidin, eine basischen Aminosäure, vermag es über den Imidazolstickstoff koordinativ an Eisenoxid zu binden.

Um sich ein Bild über die räumliche Orientierung des Ferritinsegments zu machen wurde die Struktur von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ simuliert. Die Simulation in Abb. 23, verdeutlicht, dass die räumliche Nähe der Glutaminsäurereste 5, 7 und 8 und Histidinrest 4 eine Metalloxidbindung begünstigen. Auch die Argininseitenkette (Aminosäure Nr. 6) ermöglicht koordinative Wechselwirkungen.

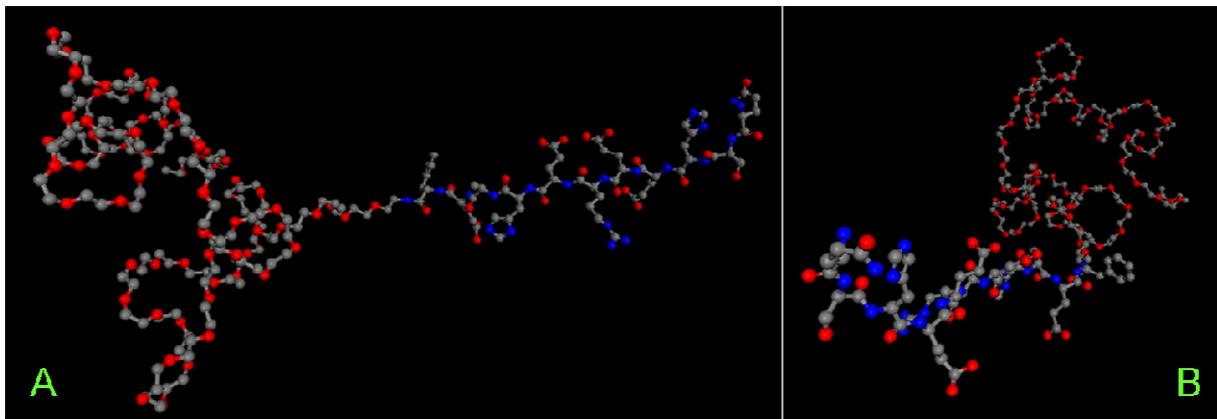


Abb. 23: Simulation von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ mit MS Modelling 3.1 im COMPASS Kraftfeld. A und B zeigen unterschiedliche Ansichten des Polymers.

FERR-*b*-PEO bietet folglich verschiedene Möglichkeiten für die Bindung an Metalloxidoberflächen. Diese unterschiedlichen, dynamischen Bindungsprozesse liegen in einem Gleichgewicht vor. Im Gegensatz zu niedermolekularen Komplexbildnern wie EDTA, wird in vivo das Bluteisen nicht dem Häm entzogen und auch das natürliche Redoxsystem im Blut nicht gestört.

Im natürlichen Protein Ferritin wird Eisen auch aufgrund der Sekundär- und Tertiärstruktur fixiert und anschließend kristallisiert. Es ist also zu überprüfen in welcher Länge, Konformation und evtl. Sekundärstruktur die Eisenbindungssequenz am besten mit Eisenoxid wechselwirkt und in welchem Maße die Verankerung auf der Partikeloberfläche die Magnetisierung stört. Dabei muss also ein Kompromiss zwischen stabiler Bindung und Abschirmung getroffen werden. Deshalb wurde für die Synthese das Ankersegment in drei unterschiedlichen Länge durch Festphasenpeptidsynthese an einen PEO-Block gekoppelt. Die Größe des PEO Blocks spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Besonders ausgeprägt ist der ‚stealth‘ Effekt für PEOs einer Größe von ca. 3000 g/mol und 5000 g/mol. Es muss aber auch ein Kompromiss zwischen magnetischer Abschirmung, und der Zugänglichkeit der jeweiligen Polymerendgruppen für Kopplungen getroffen werden. Ein Schema und die synthetisierten Kombinationen der Polymere sind Abb. 24 zu entnehmen.

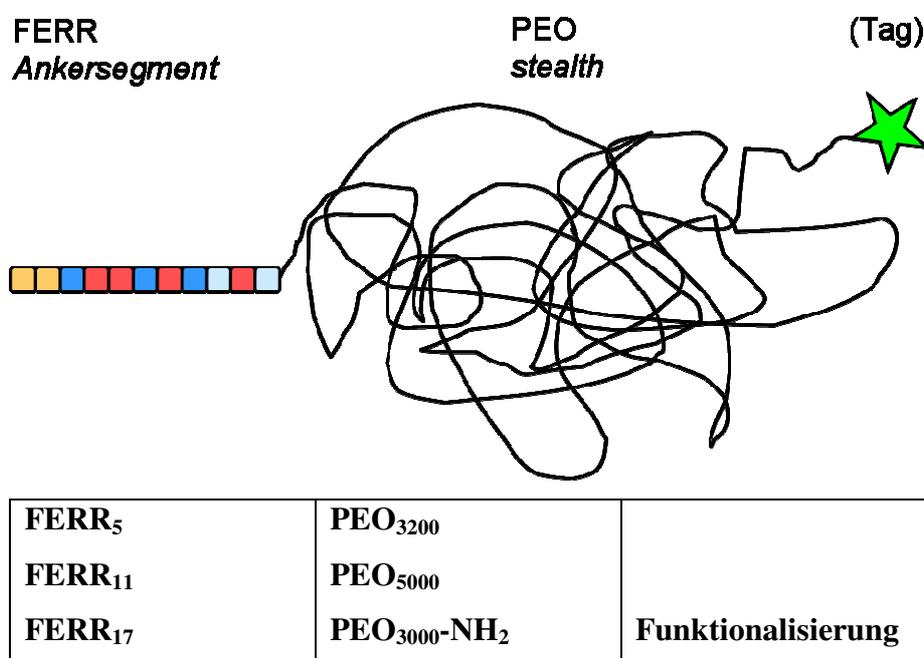


Abb. 24: Schema von FERR₁₁-*b*-PEO mit den Variationsmöglichkeiten für die einzelnen Blöcke. FERR-*b*-PEO besteht aus einem variablen Peptid-Eisenbindungsblock, aus 5, 11 oder 17 Aminosäuren, verbunden mit einem PEO-Block. Es wurden Blocklängen von 3200, 5000 g/mol verwendet. Zusätzliche Funktionalisierungen wurden über NH₂-Endgruppen an einem speziellen PEO (MG: 3000 g/mol) angekuppelt.

Es wurden Ferritinsequenzen mit 5, 11 und 17 Aminosäuren an PEO₃₂₀₀ und PEO₅₀₀₀ gekoppelt. Speziell für Versuche zur spezifischen Tumorbildgebung wurde PEO₃₀₀₀-NH₂ mit Ferritin₁₁ gekoppelt. Durch die NH₂-Gruppen konnten hier weitere Funktionalisierungen mit *Targeting* Sequenzen wie RGD durchgeführt werden.

4.3.3 Festphasenpeptidsynthese von FERR-*b*-PEO

Die Synthese von FERR-*b*-PEO erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese an einem Peptide Synthesizer ABI 433a der Firma Applied Biosystems, Darmstadt. Der Aufbau des Synthesizers wird in Abb. 25 gezeigt. Als Festphase wurde Tentagel[®] PAP Harz (0,22 mmol/ g; 0,25 mmol Ansatz) von Rapp Polymere GmbH, Tübingen verwendet. Bei Tentagel[®] PAP (*PAP, PEO attached Product*, an PEO gebundenes Produkt) Harzen ist das quervernetzte Polystyrol über einen abspaltbaren Benzyletherlinker mit einem PEO-*Spacer* verbunden, an dessen Aminoendgruppe das Peptid gekuppelt wird [64].

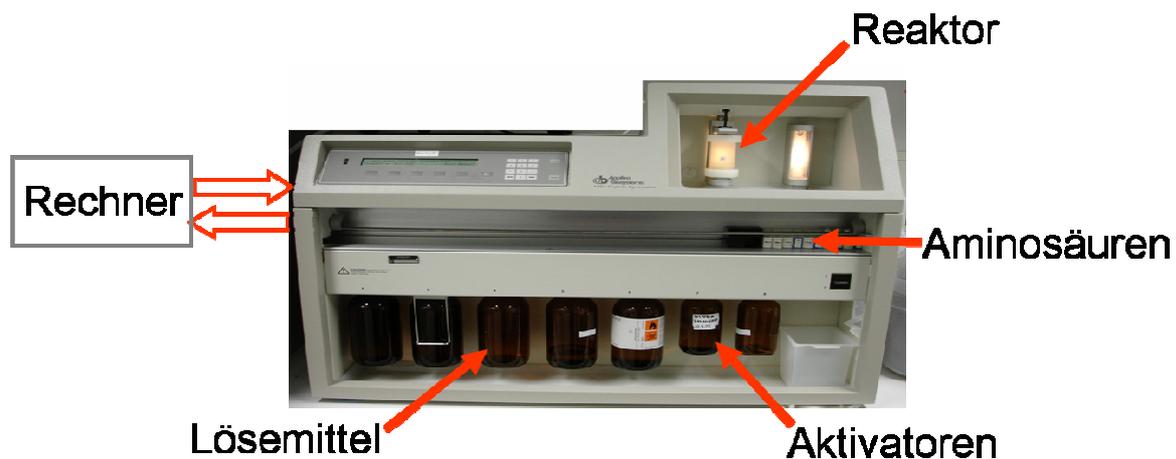


Abb. 25: Abbildung des verwendeten Peptidsynthesizers ABI 433a, Applied Biosystems, Darmstadt.

Der *Synthesizer* wurde mit den benötigten Reagenzien beladen. Ein Peptidblock mit nativen Amidbindungen entstand unter Verwendung von *Fastmoc ABI Standard*-Syntheseprotokollen. HBTU/ DIPEA/ NMP Chemie vereinfachte die Kupplung von Fmoc geschützten Aminosäuren. Ein kolorimetrischer Kaisertest überprüfte jeweils die komplette Umsetzung der einzelnen Kupplungsschritte. Die Abspaltung von dem gewünschten Produkt von der Festphase und Entschützung des Peptidblocks wurde durch sechsstündige Behandlung mit Abspalllösung (TFA 99%, TMSBr 1%) erreicht. Anschließend wurde das FERR-*b*-PEO in

Diethylether ausgefällt, zentrifugiert, in Methanol dialysiert ($MWCO = 1000$ Da), vakuumgetrocknet, in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug ca. 80%.

4.3.4 Charakterisierung

Die neu entwickelten Polymere wurden folgender Zusammensetzung hergestellt: FERR₆-*b*-PEO₃₂₀₀, FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀, FERR₁₇-*b*-PEO₃₂₀₀, FERR₁₁-*b*-PEO₅₀₀₀ und FERR₁₁-*b*-PEO₃₀₀₀-NH₂. Abb. 26 zeigt die chemische Struktur der Peptidblöcke. Die Polymere wurden durch *MALDI-ToF-MS* (*Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry*), ¹H-NMR und IR charakterisiert. Durch *MALDI-ToF-MS* können Polymere, Peptide und andere Biopolymere bis zu einer Größe von 500 kDa untersucht werden. Die *MALDI-ToF-MS* Spektren zeigen, dass die synthetisierten Polymere wie erwartet, eine enge Größenverteilung aufweisen. Diese entspricht weitestgehend der, des verwendeten, an Tentagel[®] angehängten PEO-Blocks. Exemplarisch ist in Abb. 27 ein *MALDI-ToF-MS* Spektrum von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ dargestellt. Die *Peaks* konnten exakt zugeordnet werden. Die Abstände der *Peaks* betragen 44,1 Da und entsprechen der Masse der Wiederholungseinheit Ethylenoxid (theoretische Masse: 44,03 Da). Das Maximum der Verteilung liegt hier bei 4860,6 Da. Damit setzt sich das Maximum aus der Masse von 76 Ethylenoxideinheiten, der Masse des Peptidblocks und der Masse von *TFA* zusammen. Zur Bildung von Ionenaddukte, wie dem Addukt aus Polymer und *TFA* kommt es sehr häufig während der *MALDI-ToF-MS*. Typischerweise kommt es zur Adduktbildung mit Alkali- oder Übergangsmetallionen [81]. Durch NMR-Spektroskopie konnte anschließend die Identität des Polymers nachgewiesen werden. Chemische Verschiebung und Anzahl der Protonen stimmen mit der Struktur überein. Die Identität konnte auch durch FT-IR bestätigt werden.

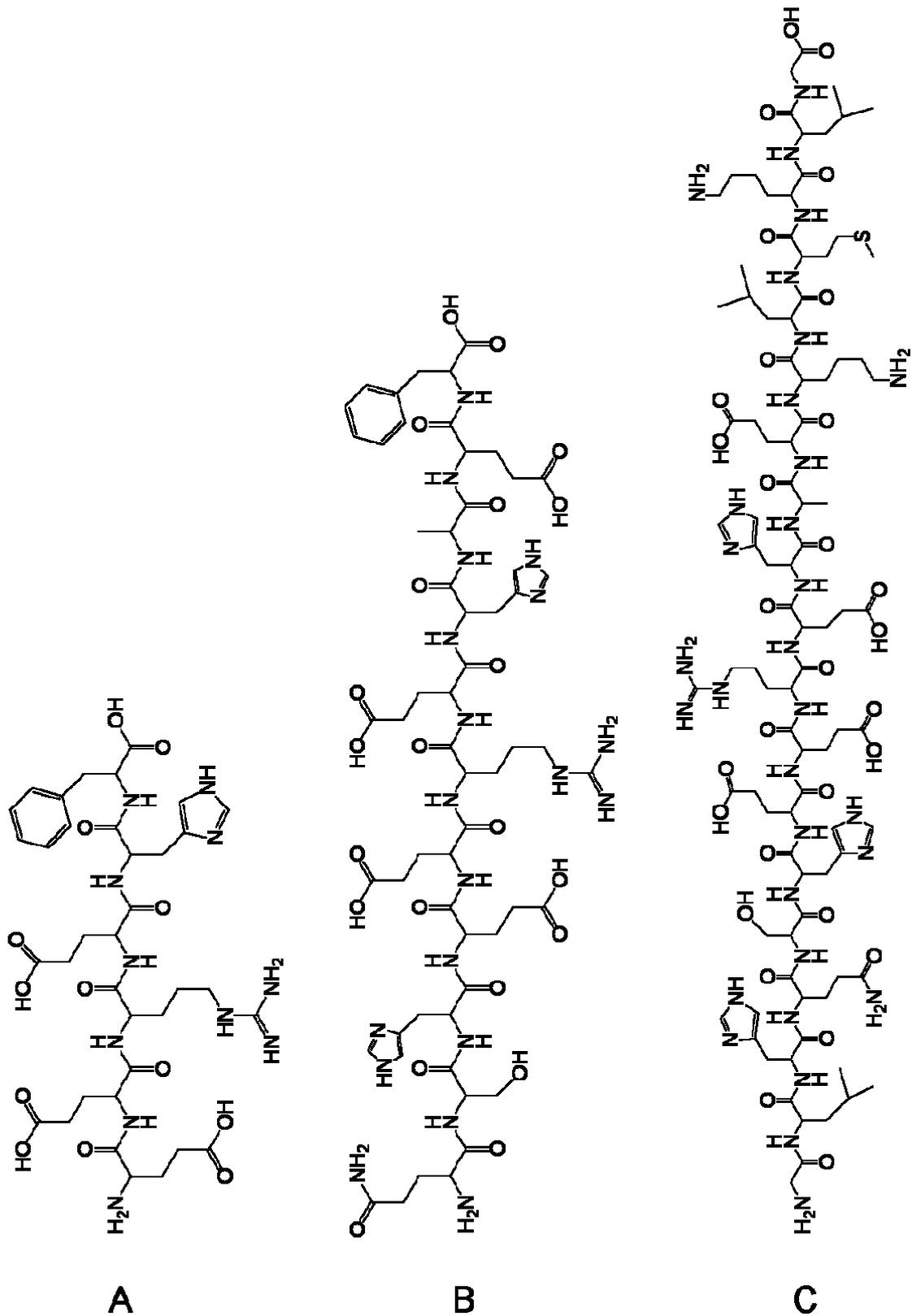


Abb. 26: Peptidblöcke der FERR-*b*-PEOs: (A) FERR₆, (B) FERR₁₁, (C) FERR₁₇.

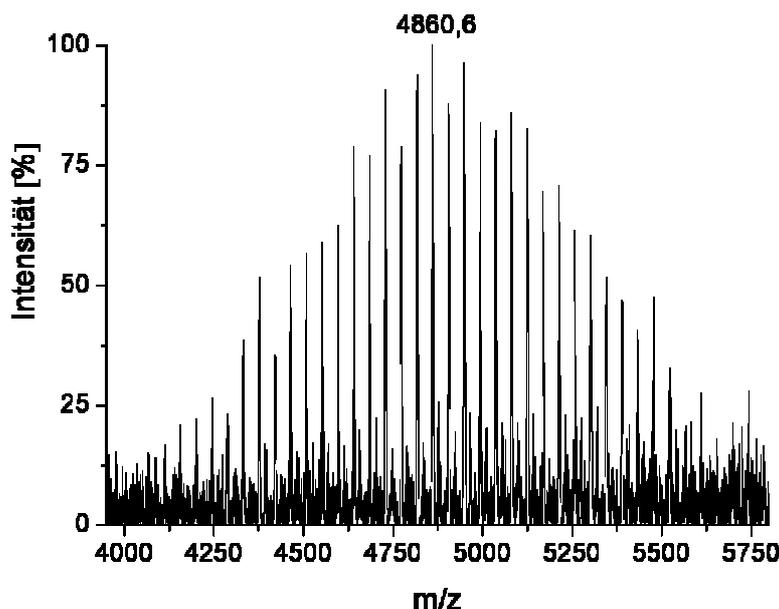


Abb. 27: MALDI-ToF-MS-Spektrum von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀. Das Polymer besitzt eine enge Größenverteilung. Die Massenverteilung entspricht der des PEOs. Die Peaks können exakt zugeordnet werden. Eine Ethylenoxid-Wiederholungseinheit entspricht 44,03 Da. Das Maximum liegt bei 4860,6 Da. Es entspricht der Masse von 76 EO Einheiten, dem Peptidblock und TFA.

4.3.5 Zusammenfassung

Durch Festphasenpeptidsynthese konnte biokompatible FERR-*b*-PEOs verschiedener Zusammensetzungen hergestellt werden. Um optimale strukturelle, und daraus resultierend optimale Eisenbindungseigenschaften zu finden wurden zunächst drei unterschiedlich lange peptidische Ankersequenzen FERR₆, FERR₁₁ und FERR₁₇ an PEO gekoppelt. Diese Eisenoxidklebersequenzen stammen aus dem Abschnitt 56 – 72 des humanen *H*-Ferritins. Die Ankersegmente wurde an PEO₃₀₀₀ oder PEO₅₀₀₀ gekoppelt. Auch die Größe des PEO Blocks beeinflusst die Eigenschaften eines Kontrastmittels maßgeblich. So muss bei der Wahl des PEOs ein Kompromiss zwischen ausreichendem ‚*stealth*‘ Effekt, chemische Zugänglichkeit der Polymerendgruppen und magnetischer Abschirmung getroffen werden.

Identität, Reinheit und enge Größenverteilung, wichtige Voraussetzungen für eine spätere Zulassung als Bestandteil in einem Kontrastmittelsystem, wurden durch MALDI-ToF-MS, NMR und FT-IR nachgewiesen. Im Folgenden wird nun untersucht werden, ob sich FERR-*b*-PEOs zur Stabilisierung der *SPIO* Partikel und deren Anwendung als Kontrastmittel eignen.

4.4 Synthese von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO*

4.4.1 Einführung

Zunächst wurden hochkristalline, 18 – 20 nm große *SPIO* über ein neues Sol-Gel-Verfahren hergestellt. Biomimetische FERR-*b*-PEO Blockcopolymere wurden synthetisiert und charakterisiert. Sie verfügen über ein FERR-Ankersegment, das die natürliche Eisenfixierung imitiert und mit einem ‚*stealth*‘ PEO Block verbunden ist. Im folgenden Kapitel wird nun die Stabilisierung der *SPIO* in wässrigen Suspensionen durch diese Blockcopolymere untersucht.

4.4.2 Synthese

Um die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (*SPIO*) mit FERR-*b*-PEO zu stabilisieren, wurde die unverdünnte, ethanolische Partikelsuspension zunächst kurz mit einem Ultraschallmikrofinger behandelt. Dadurch werden mögliche Aggregate zerstört. Das in Ethanol gelöste Polymer (25% (m/m) bezogen auf die Masse der zu stabilisierenden *SPIO*) wurde sofort zu den behandelten Partikeln gegeben. Anschließend wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt. Der *Coating*prozess ist in Abb. 28 dargestellt.

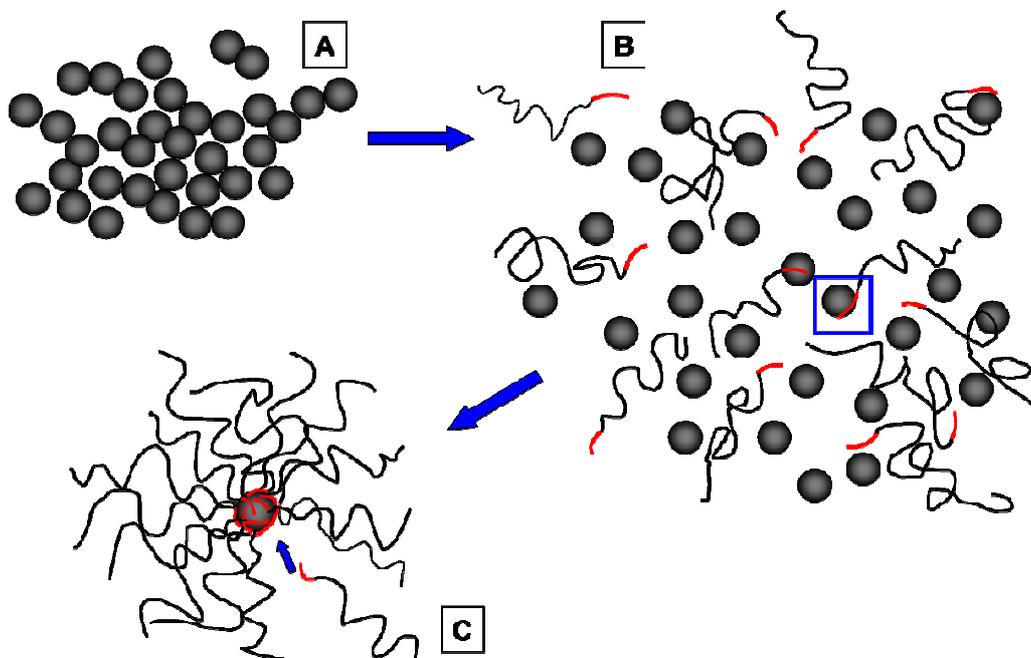


Abb. 28: Schema des *Coating*prozesses: Die Eisenoxidnanopartikel liegen zunächst in lockeren Aggregaten in ethanolischer Suspension vor (A), durch Ultraschallbehandlung lösen sich die Aggregate, und das in Lösung zugefügte Polymer hat freien Zugang zur Partikeloberfläche. Der Eisenbindungsblock kann an die Nanopartikeloberfläche binden (C) und stabilisiert die einzelnen Partikel.

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in einen Dialyseschlauch überführt, und das Lösemittel Ethanol innerhalb von 3 Tagen vollständig gegen gereinigtes Wasser ausgetauscht. Aufgrund der großporigen Dialysemembran und der langen Dialysezeit kann davon ausgegangen werden, dass nicht gebundenes Polymer weitestgehend entfernt wurde.

4.4.3 Charakterisierung

Alle synthetisierten FERR-*b*-PEOs bildeten stabile *SPIO*-Suspensionen. Als bester Kandidat erwies sich jedoch FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀, das große Mengen *SPIO* bei relativ niedrigen Partikelgrößen und sehr guten magnetischen Eigenschaften stabilisierte. Im Folgenden wird die weitere Charakterisierung der Systeme daher exemplarisch am System FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ stabilisierte *SPIO* dargestellt.

Die stabilisierte Partikelsuspension in Wasser ist zunächst schwarz. Nach längerer Lagerung (Wochen bis Monate) bildet sich ein geringfügiger, aufschüttelbarer Bodensatz. Bei einer erfolgreichen Stabilisierung lässt sich diese Suspension verdünnen und bleibt dabei stabil. Dies verdeutlicht Abb. 29. Verdünnt man nicht stabilisierte *SPIO* mit Wasser, so bildet sich eine schwarze, trübe Suspension von *SPIO* Aggregaten (vgl. Abb. 29 (A), links). Während die FERR-*b*-PEO stabilisierten Partikel verdünnt in Wasser eine klare braune Nanosuspension ergeben (Abb. 29 (A), rechts). Nach 20 Stunden sind die nicht stabilisierten *SPIO* fast vollständig zu einem schwarzen Bodensatz sedimentiert (Abb. 29 (B), links), während die Nanosuspension der FERR-*b*-PEO gecoateten Partikel über Wochen bis Monate stabil, klar und bräunlich bleibt (Abb. 29 (B), rechts). Die Bindung des Polymers an die Partikeloberfläche scheint also energetisch begünstigt zu sein.

Auch im Lichtmikroskop lassen sich nicht stabilisierte und *gecoatete SPIO* deutlich unterscheiden. Nicht stabilisierte *SPIO* in Ethanol wechselwirken stark miteinander, und es kommt zur Ausbildung von Aggregaten im Mikrometerbereich (Abb. 30 (A)). Noch deutlicher wird dies durch Ausbildung von Nadeln unter Einfluss eines Magnetfeldes (Abb. 30 (B)). Dagegen liegen die FERR-*b*-PEO gecoateten *SPIO* in Wasser vereinzelt vor. Aufgrund ihrer geringen Größe sind sie im Lichtmikroskop nicht erkennbar (Abb. 30 (C)). Erst durch Einwirken eines Magneten sind Aggregate zu beobachten (Abb. 30 (D)). Unter dem zusätzlichen Hitzeeinfluss durch die Mikroskoplampe haben sich sichtbare Superstrukturen ausgebildet.

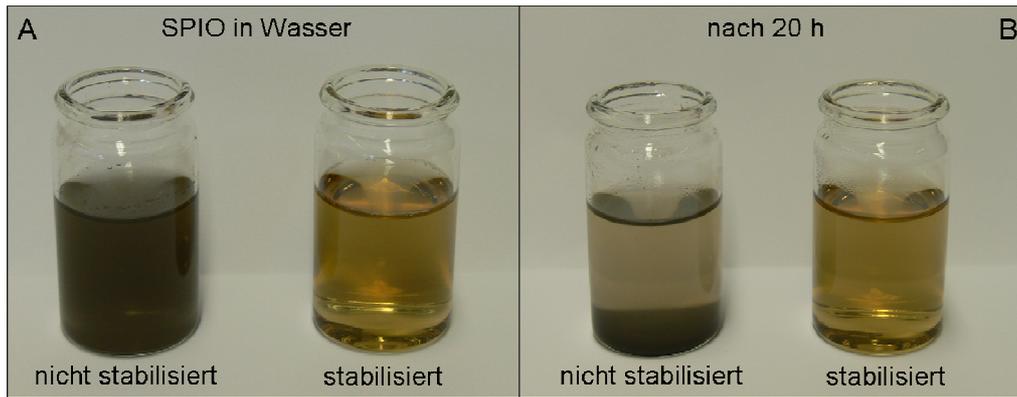


Abb. 29: *SPIO* suspendiert in Wasser. Links jeweils nicht stabilisiert, rechts jeweils mit FERR-*b*-PEO stabilisiert. (A) Durch Verdünnung mit Wasser bildet sich eine trübschwarze Suspension der nicht-stabilisierten *SPIO* und eine klare braune Nanosuspension stabilisierter *SPIO*. (B) Nach 20 h sind die nicht-stabilisierten *SPIO* deutlich sedimentiert, es bleibt ein trüber Überstand, während stabilisierte *SPIO* weiterhin eine stabile, klare Nanosuspension bilden.

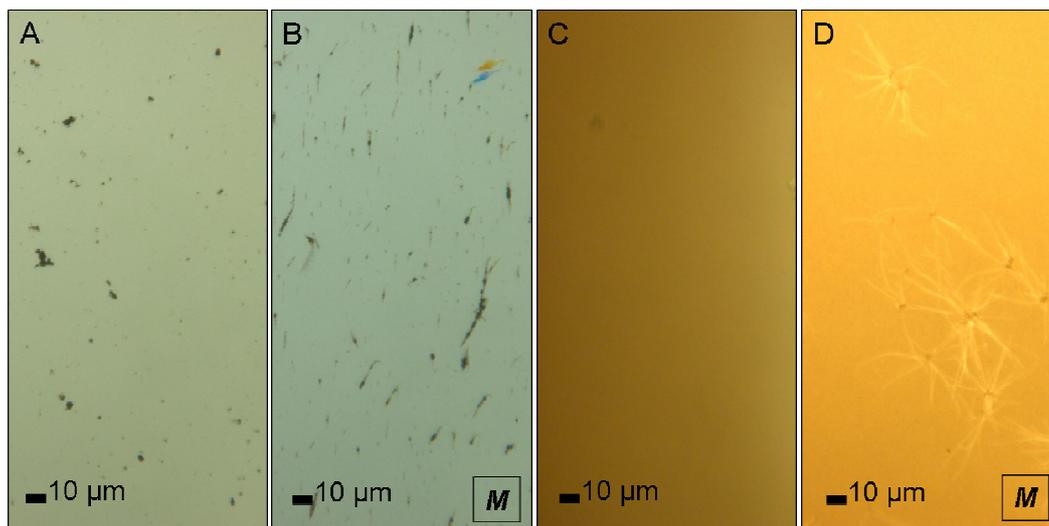


Abb. 30: *SPIO* im Lichtmikroskop. (A+B) Nicht stabilisierte *SPIO* in Ethanol. Es sind deutliche Aggregate erkennbar. (B) Durch Einwirken eines Magneten bilden sich nadelförmige Aggregate, die nach Entfernen des Magneten wieder zerfallen. (C+D) FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* in Wasser. Die Auflösung des Lichtmikroskops ist nicht ausreichend hoch, um die Partikel darzustellen (C). Durch Einwirken eines Magneten und Hitze haben sich Superstrukturen gebildet. Diese bestehen aus Eisenoxidaggregaten die von aggregierten Polymersträngen umgeben sind (D).

Im Transmissions Elektronenmikroskop (TEM) können Nanostrukturen dargestellt werden. Abb. 31 (A) zeigt unstabilierte *SPIO*, die stark miteinander wechselwirken und deshalb aggregiert vorliegen. Die FERR-*b*-PEO gecoateten *SPIO* in Abb. 31 (B) zeigen Partikel, die durch die Polymerhülle vereinzelt und in gleichmäßigen Abständen vorliegen. Diese Anordnung mit einem mittleren Abstand von 10 nm kann der sterischen Abschirmung durch das Polymer zugeschrieben werden.

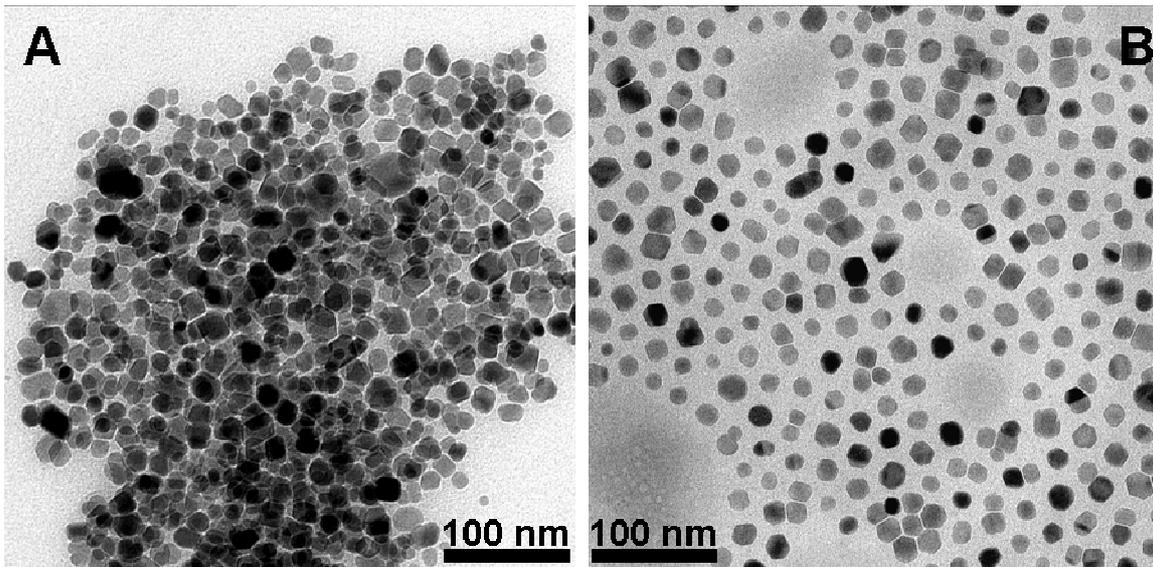


Abb. 31: TEM Bilder von *SPIO*: (A) nicht stabilisierte *SPIO*, die aggregiert vorliegen. (B) FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO*, die gleichmäßig (Abstand ca. 10 nm) angeordnet sind. Das Polymer stabilisiert sterisch und verhindert starke Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln.

Eine interessante Veränderung in der Partikelanordnung und Aggregatbildung beobachtet man, wenn an Stelle von wie bisher 25% Polymer (bezogen auf die Masse der zu stabilisierenden *SPIO*) nur 12,5% Polymer zur Stabilisierung verwendet. Da die Menge des Polymers nicht zur kompletten Abschirmung der Partikel gegeneinander ausreicht, ordnen sich die Partikel in wurmartigen Strukturen an. Sie aggregieren aber nicht vollständig (Abb. 32 (A)). Auch die Partikelgrößenbestimmung in der Lichtstreuung zeigt Aggregate im Mikrometerbereich.

Ein stabiles *Coating* ist die Voraussetzung für eine verbesserte Homogenität der Nanosuspension und damit auch die Dosierbarkeit, Stabilität und Handhabung eines Kontrastmittels. Auch für die Anwendung *in vivo* ist dies wichtig. Indem Aggregation verhindert wird, ist das Risiko von Verstopfen von Kapillargefäßen und damit verbundenen Komplikationen, aber auch allgemein eine längere Zirkulationszeit gewährleistet, da diese unter anderem größenabhängig ist.

Anhand der TEM Daten lassen sich darüber hinaus die Größen der stabilisierten Partikel sowie der Polymerhülle abmessen. Für die gecoateten Partikel wurde ein Durchmesser von 19 – 26 nm gemessen. Dieser setzt sich, wie in Abb. 32 (B+C) ersichtlich, aus einem Eisenoxidkern (17 – 21 nm) und der, sich deutlich vom Kohlenstoff-Untergrund absetzenden Polymerhülle (2 – 5 nm) zusammen.

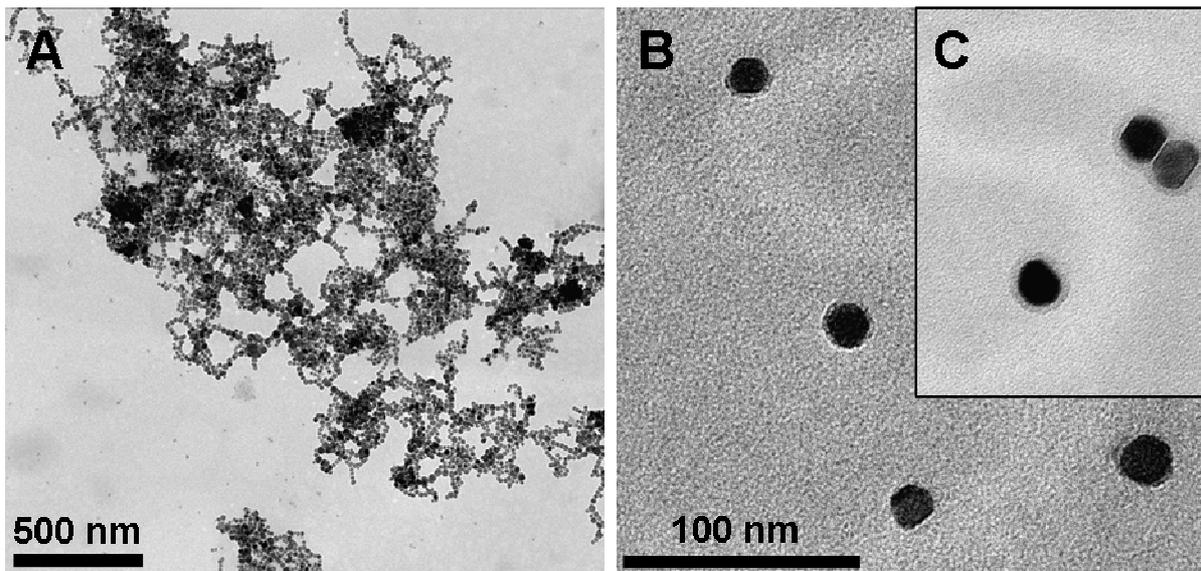


Abb. 32: TEM Aufnahmen von gecoateten *SPIO*: (A) zeigt *SPIO*, die mit einer unzureichenden Menge Polymer stabilisiert wurden (ca. 12,5%). Die Partikel werden nicht ausreichend abgeschirmt und ordnen sich deshalb aufgrund der magnetischen Wechselwirkungen wurmartig an. (B) und (C) zeigen hochauflösende Bilder von einzelnen, gecoateten *SPIO*, die mit einer ausreichenden Menge Polymer umhüllt sind (25% (m/m)). Die Partikel (17 – 21 nm Kerndurchmesser) liegen vereinzelt vor, und eine 2 – 5 nm dünne Polymerhülle ist deutlich erkennbar.

Ein hiermit übereinstimmendes Ergebnis lieferte die Charakterisierung durch Kraftmikroskopie (*AFM*, *Atomic Force Microscopy*), mit einer Partikelgröße von 14,7 nm (+/- 2,1). Das *AFM* Amplitudenbild von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO* ist in Abb. 33 wiedergegeben. Es ist jedoch zu beachten, dass sowohl d_{TEM} als auch d_{AFM} nicht den gequollenen und hydratisierten Zustand der Polymerhülle wiedergeben, und somit keine direkten Rückschlüsse auf das Verhalten der gecoateten *SPIO* in Dispersion zulassen.

Um die Partikel in Dispersion, und damit der Applikationsform eines Kontrastmittels, besser charakterisieren zu können wurden deshalb zusätzlich Messungen der dynamischen Lichtstreuung durchgeführt. Bei der intensitätsgewichteten Auswertung liegt hier das Größenmaximum bei einem hydrodynamischen Durchmesser d_{H} 102 – 109 nm (PDI 0,2), bei einer Auswertung über den Z-average (Malvern Instruments) liegt d_{H} bei 76 – 78 nm. Nach der zahlengewichteten Auswertung beträgt d_{H} 32 – 42 nm. Die Partikelgrößen in Lösung werden maßgeblich von der Polymergröße aber auch von der Bindungsstärke des Ankersegments beeinflusst, wie aus Abb. 34 ersichtlich ist. Mit zunehmender Lagerzeit ändern sich die Partikelgrößen nur noch geringfügig. Auch nach einem Jahr Lagerung bei 4 °C konnte nach Aufschütteln eines leichten Bodensatzes, für FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ stabilisierte Partikel ein intensitätsgewichteter d_{H} von 110 nm gemessen werden.

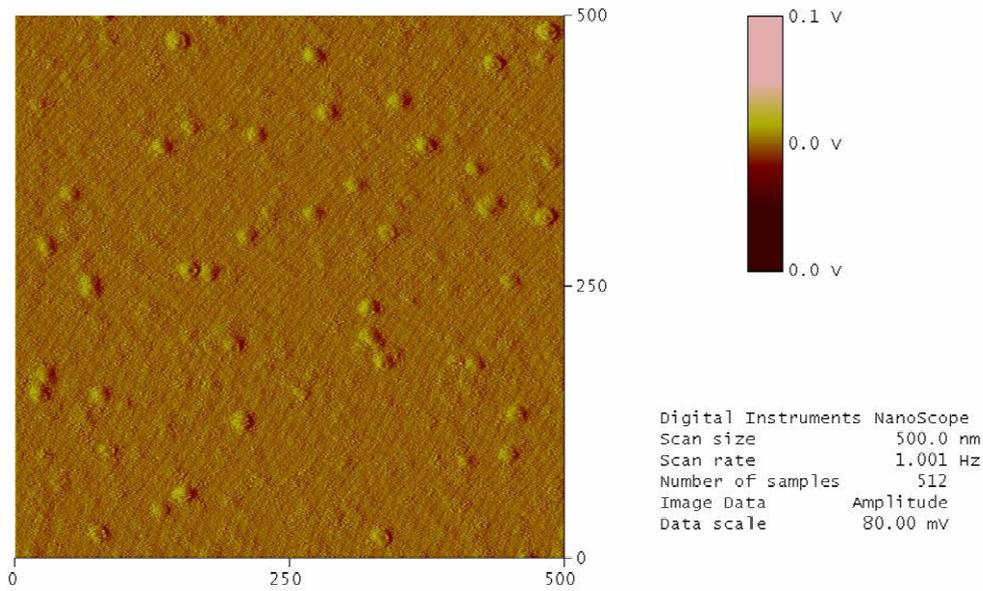


Abb. 33: AFM Amplitudenbild von FERR-*b*-PEO gecoateten *SPIO* (Skalierung in nm). Der Partikeldurchmesser beträgt 14,7 nm (+/- 2,1). $Z = 80$ mV

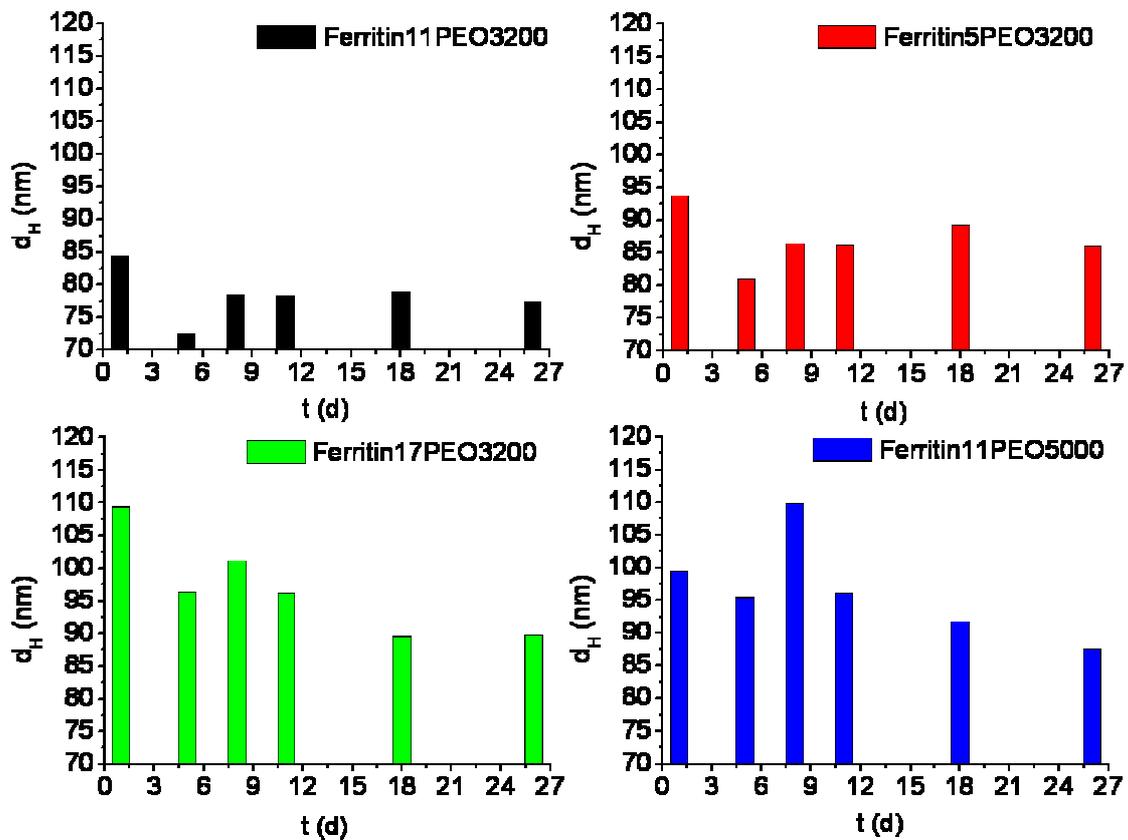


Abb. 34: Intensitätsgewichtete Partikelgrößen (DLS) (z-Average) von *SPIO*, die mit unterschiedlichen Polymeren stabilisiert sind. Einfluss von Polymer und Lagerzeit auf die Partikelgröße.

Eine weitere Methode zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius in Lösung ist die analytische Ultrazentrifugation (AUZ). Aus dem Sedimentationskoeffizienten, der angibt wie schnell ein Partikel im normierten Schwerefeld um eine Längeneinheit sedimentiert, kann der Radius berechnet werden. Die Partikelgrößenverteilungen aus AUZ-Messungen sind in Abb. 35 dargestellt. Das Sedimentationsverhalten ist masse- bzw. dichteabhängig. Folglich muss die Masse, bzw. Dichte der Partikel bekannt sein. Die genaue Dichte von polymerstabilisierten Eisenoxidpartikeln lässt sich jedoch nur schwer bestimmen. Nimmt man an, dass der gesamte Partikel aus Fe_3O_4 besteht (Dichte: 5,17 g/ml), so erhält man zu niedrige Durchmesser. Berücksichtigt man 18% Polymeranteil (s. Thermogravimetrische Analyse (TGA), Abb. 36), der eine niedrigere Dichte aufweist, so errechnet man eine Dichte von 3,29 g/ml für den Gesamtpartikel. Durch Verwendung dieser Dichte erhält man einen maximalen Durchmesser. Der reale Durchmesser liegt zwischen d_H min und d_H max, wobei d_H max aufgrund der angepassten Dichte dem tatsächlichen Wert näher kommt. Gemessen in wässriger Lösung liegt der tatsächliche hydrodynamische Durchmesser zwischen 19,9 und 26,9 nm. In Ethanol hingegen ist die Polymerhülle weniger stark gequollen und d_H befindet sich hier zwischen 16,2 und 21,5 nm.

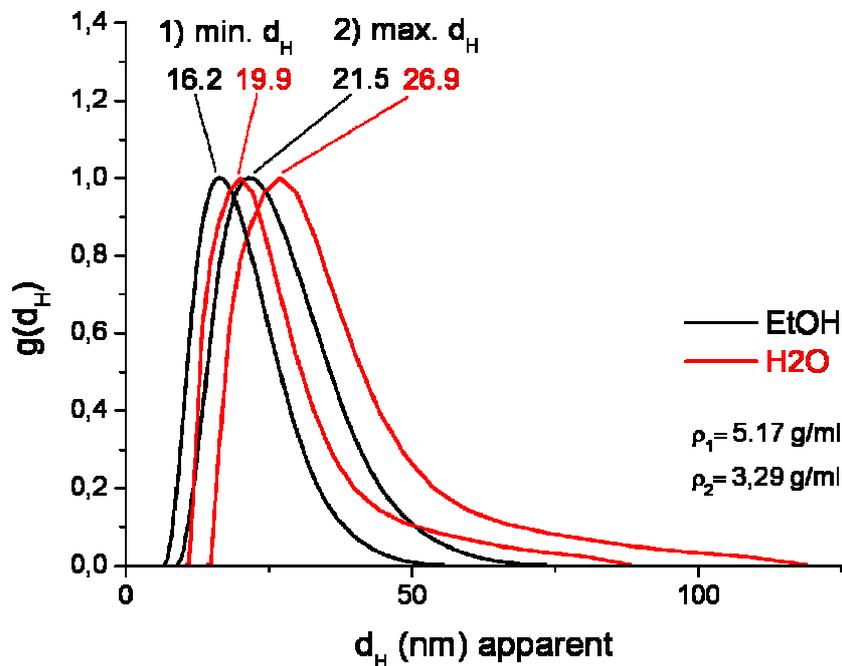


Abb. 35: Größenverteilung gecoateter *SPIO* aus Analytischer Ultrazentrifugation. Durch Einsetzen einer maximalen und kalkultierten minimalen Dichte erhält man einen minimalen und maximalen Durchmesser. Rot dargestellt ist sind die Verteilungen der Partikel in Wasser, schwarz die weniger gequollenen Partikel in Ethanol.

Die Partikelgrößenverteilung zeigt eine Schulter zu größeren Partikeldurchmessern hin. Dies ist durch die zahlengewichtete Auswertung der Analytischen Ultrazentrifugation zu erklären, bei der große und kleine Partikel gleicher Dichte gleichermaßen gewichtet werden. Im intensitätsgewichteten Lichtstreuexperiment hingegen wird das Maximum der Partikelverteilung zu größeren Größen verschoben, da größere Partikel stärker streuen und damit stärker zum Signal beitragen als kleine.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden ist in Tab. 1 gegeben. Der Partikeldurchmesser variiert dabei aufgrund des unterschiedlichen Hydratationszustandes, Gewichtung der Messmethoden und der Partikelverteilung zwischen 19 und 109 nm. Die Partikelgrößen aus der Lichtstreuung (intensitätsgewichtete und *Z-average* Auswertung) werden stark durch die Anwesenheit weniger großer Partikel oder Verunreinigungen wie Staub beeinflusst und zu großen Größen hin verschoben. Zur besseren Vergleichbarkeit, und unter Berücksichtigung der Anwesenheit größerer Partikel, wird hier für d_H die Auswertung über den *Z-average* 76 – 78 nm gewählt.

	TEM	AFM	AUZ (dH) Ethanol $\rho_{max} 5,17 \text{ g/ml}$	AUZ (dH) Ethanol $\rho_{min} 3,29 \text{ g/ml}$	AUZ (dH) HzO $\rho_{max} 5,17 \text{ g/ml}$	AUZ (dH) HzO $\rho_{min} 3,29 \text{ g/ml}$	DLS (dH) (Z) PDI 0,2	DLS (dH) Z-average (I) PDI 0,2	DLS (dH) (I) PDI 0,2
d (nm)	19-26	14,7 (+/- 2,1)	16,2	21,5	19,9	26,9	32-42	76-78	102-109

Tab. 1: Ergebnisse der Partikelgrößenmessung durch verschiedene Methoden

Die hier beschriebenen *SPIO* Partikel sind aufgrund ihrer Größe für die Darstellung von Blutgefäßen und Tumoren geeignet. Die intensitätsgewichtete Auswertung der Lichtstreuergebnisse, aber auch die zu großen Durchmessern hin flacher abfallende Verteilung der AUZ, zeigt, dass auch ein geringfügiger Anteil (in DLS ca. 1%) wesentlich größerer Partikel oder Aggregate anwesend ist. Diese Fraktion muss vor der Applikation *in vivo* entweder entfernt werden (z.B. durch Filtration).

Die Zirkulationszeit von partikulären Kontrastmittelsystemen, aber auch im Allgemeinen von partikulären *Drug Delivery* Systemen, ist abhängig von der Erkennung durch unspezifischen Immunabwehr, und der Schnelligkeit mit der die Fremdpartikel durch Oposone markiert, von Makrophagen aufgenommen, und in RES-haltige Gewebe abtransportiert werden. Für die Erkennung spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Zum einen sollten die Partikel nicht zu groß sein, zum anderen sollten sie von mobilen und hydrophilen ‚*stealth*‘ Polymerketten umhüllt sein, die die Adsorption von Oposoninen verzögern. Auch die Oberflächenladung spielt eine wichtige Rolle. So ist bekannt, dass ungeladene Partikel am

langsamsten von der Immunabwehr erkannt werden [42]. Deshalb ist es wichtig auch die Oberflächenladung eines Kontrastmittels zu untersuchen.

Durch die Stabilisierung mit PEO verschiebt sich das Zetapotential von -21,9 mV für die ‚nackten‘ *SPIO* Partikel auf +/- 0 mV für die *gecoateten*. Dieser Effekt lässt sich durch die Umhüllung der Partikel mit PEO erklären.

Normalerweise würde man für ungeladene Partikel eine rasche Aggregation erwarten, da Ferritin-*b*-PEO *gecoateten SPIO* aber zusätzlich über eine sterische Stabilisierung durch den PEO-Block verfügen, bleiben sie über mehrere Monate stabil.

Die chemische Zusammensetzung von FERR-*b*-PEO *gecoateten SPIO* wurde durch Thermogravimetrie (TGA), Photometrie und *ICP* untersucht. Interessant ist hierbei zunächst, dass von den eingesetzten 25% (m/m) Polymeranteil nur 18% in der wässrigen und gereinigten Partikelsuspension nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 36). Offensichtlich wird nicht die gesamte Menge des eingesetzten Polymers beim Stabilisierungsprozess an das Eisenoxid gebunden. Ein *SPIO* mit einem Kerndurchmesser von 20 nm würde dann rechnerisch von 623 Polymerketten stabilisiert, die jeweils 2,02 nm² der Oberfläche einnehmen.

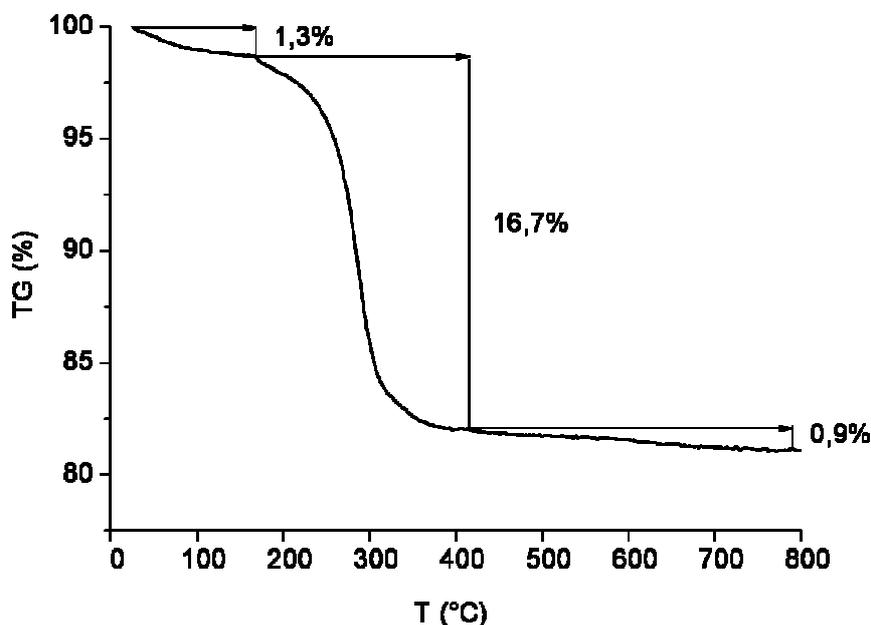


Abb. 36: Thermogravimetrische Analyse von FERR-*b*-PEO *gecoateten SPIO*. Der Masseverlust von insgesamt 18% zwischen 25 und 415 °C kann dem Polymer zugeschrieben werden. Zwischen 25 und 169 °C verliert die Probe zunächst adsorbierte Feuchtigkeit (1,3%). Der Masseverlust von 16,7% zwischen 169 und 415 °C kommt durch die thermische Zersetzung des Polymers zustande. Oberhalb von 415 °C ist kein signifikanter Masseverlust zu verzeichnen.

Um Bilder menschlicher Gewebe oder Organe im MRT zu erzeugen, muss eine ausreichende Menge *SPIO* in einem möglichst niedrigen Volumen verabreicht werden. Die

Eisenkonzentration in der Dispersion wurde nach Auflösen der Partikel in konzentrierter Säure, Oxidation und Umsetzung mit Phenantrolin zu einem farbigen Komplex photometrisch, oder nach Auflösen in konzentrierter Säure und Oxidation und über Induktiv gekuppeltes Plasma (*ICP-AES*, *Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*) bestimmt. *ICP-AES* ermöglicht eine spezifische und hochsensible Messung vieler Elemente aus wässrigen Medien [82]. Jedes Element sendet nach thermischer Anregung (hier durch Argon Plasma) charakteristische Banden im UV-VIS-Bereich des Spektrums aus. Die Intensität ist dabei proportional zur Konzentration des Elements im Probenmaterial. Nach Kalibration mit Eichlösungen bekannter Konzentration, werden die absoluten Gehalte der Proben direkt ausgegeben. Um die Gehalte unlöslicher Proben zu bestimmen z.B. Eisenoxidpartikel müssen die Proben zunächst gelöst werden. Dazu eignen sich z.B. stark oxidierende Reagenzien wie konzentrierte HNO_3 bei hoher Temperatur.

Der gemessene Eisengehalt der Partikelsuspensionen liegt zwischen 14 und 16 mg Fe/ ml entsprechend 0,251 bis 0,287 mmol/ ml. Dieser Eisengehalt ist für die Anwendung als Kontrastmittel angemessen und kann gut mit Marktpräparaten wie Resovist[®] mit einem Eisengehalt von 28 mg Fe/ ml verglichen werden. Das Kontrastgebungspotential lässt sich jedoch erst durch Untersuchung der magnetischen Eigenschaften beurteilen, die in Kapitel 5 beschrieben sind.

4.4.4 Zusammenfassung

SPIO konnten erfolgreich mit FERR-*b*-PEO stabilisiert und in ein wässriges System überführt werden. Das Polymer ist stabil und spezifisch an die Partikeloberfläche gebunden und die Partikel lassen sich im Gegensatz zu nicht stabilisierten *SPIO* mit Wasser verdünnen. Die verdünnte Suspension ist klar mit bräunlicher Farbe und aggregatfrei. Die Partikelgröße variiert stark durch die unterschiedliche Wertung der Messmethoden: Insgesamt wurden Partikeldurchmesser zwischen 19 und 109 nm gemessen. Ein geringer Anteil wesentlich größerer Partikel, kann vor i.v. Applikation durch Filtration entfernt werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wird für die Partikelgröße in Suspension im Folgenden die Auswertung über den *Z-average* (Malvern) angegeben, und damit ist $d_H = 76 - 78$ nm. Dies bedeutet, dass die Partikel prinzipiell für molekulares *Targeting* und Tumordarstellung verwendet werden können. Aufgrund des Zetapotential von ± 0 mV, das durch das PEO-*Coating* zu erklären ist, und der geringen Größe kann eine verlängerte Zirkulationszeit erwartet werden. Eine Eisenkonzentration von 14 – 16 mg/ ml Suspension eignet sich sehr gut zur Kontrastierung nach i.v. Applikation eines geringen Volumens des Kontrastmittelsystems.

5 Magnetische Eigenschaften von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO*

5.1 Einführung

FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* konnten erfolgreich hergestellt und physikochemisch charakterisiert werden. Erste Aussagen über ihr Potential für die MRT-Kontrastgebung lassen sich bereits ex vivo, durch magnetische Messungen treffen.

5.2 Ergebnisse

Superparamagnetisches Verhalten der FERR-*b*-PEO *gecoateten SPIO* ist durch die bereits bekannte Größe des Eisenoxidkerns anzunehmen, bewiesen wurde es jedoch durch das *SQUID* Experiment (*Supraconducting Quantum Interference Device*, Supraleitende Quanteninterferenzeinheit) (s. Abb. 37). Tatsächlich verhalten sich die Partikel in wässriger Suspension und bei Raumtemperatur (293 K) superparamagnetisch, die Sättigungsmagnetisierung liegt hier bei $M_S = 94 \text{ emu/g}$, einem Wert der sich im Bereich von *Bulk-Fe₃O₄* ($M_S = 92 - 100 \text{ emu/g}$) befindet, aber größer als der von *Bulk- γ -Fe₂O₃* ($M_S = 60 - 80 \text{ emu/g}$) ist [76]. Bei superparamagnetischen Partikeln kann jeder Partikel als ein einzelner kleiner Magnet betrachtet werden. Wenn sich diese im Magnetfeld ausrichten erzeugen sie ein beachtliches magnetisches Feld, das zu einem starken T_2^* -Effekt führt. Je höher hierbei die Sättigungsmagnetisierung der *SPIO* ist, desto stärker ist der Effekt. FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* sind also optimal für die Anwendung als MRT-Kontrastmittel.

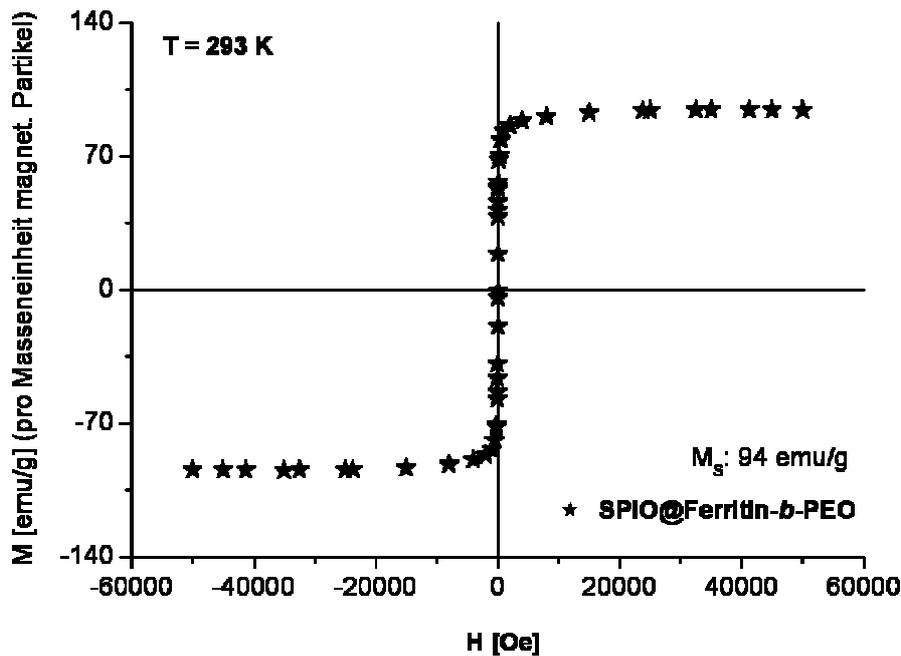


Abb. 37: SQUID Magnetisierungskurve: FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ gecoatete SPIO verhalten sich superparamagnetisch. Die Sättigungsmagnetisierung liegt bei 94 emu/ g.

Das superparamagnetische Verhalten konnte auch durch Elektronen Paramagnetische Resonanz-Spektroskopie (EPR) näher untersucht werden. Eine wichtige Kenngröße ist dabei die Reproduzierbarkeit der Spektren. Es konnte gezeigt werden, dass die Spektren auch nach wiederholtem Messen konstant bleiben, die Partikel sich also superparamagnetisch verhalten. Durch EPR lassen sich außerdem Aussagen über den Zustand des Eisens treffen. Die aufgezeichneten Spektren verschiedener Proben (Abb. 38) zeigen einen asymmetrischen und sehr breiten Linienverlauf. Bei $g = 4,3$ wurde kein Signal gefunden, was eher auf eine oktaedrische als auf eine rhombische Koordination des Fe(III) Ions im *High-Spin* Zustand schließen lässt. Die EPR-Linien der FERR-*b*-PEO gecoateten Proben (a) und (b) sind wesentlich breiter als die des Vergleichs Resovist[®]. Das EPR Spektrum von Resovist[®] kann als Überlagerung von drei symmetrischen EPR-Linien bei $g = 1,99$, $2,40$ und $2,56$, mit der Linienbreite $\Delta B_{pp} = 5,6$ mT, $35,4$ mT und $21,2$ mT simuliert werden. Der asymmetrische Verlauf der Spektren der FERR-*b*-PEO gecoateten Proben (a) und (b) kann auf die gleiche Weise erklärt werden. Hier überlagert sich eine Linie bei $g = 1,99$ und zwei breite symmetrische Linien mit g -Faktoren zwischen $2,40$ und $2,73$, $\Delta B_{pp} = 50$ mT, 85 mT und 100 mT [83, 84].

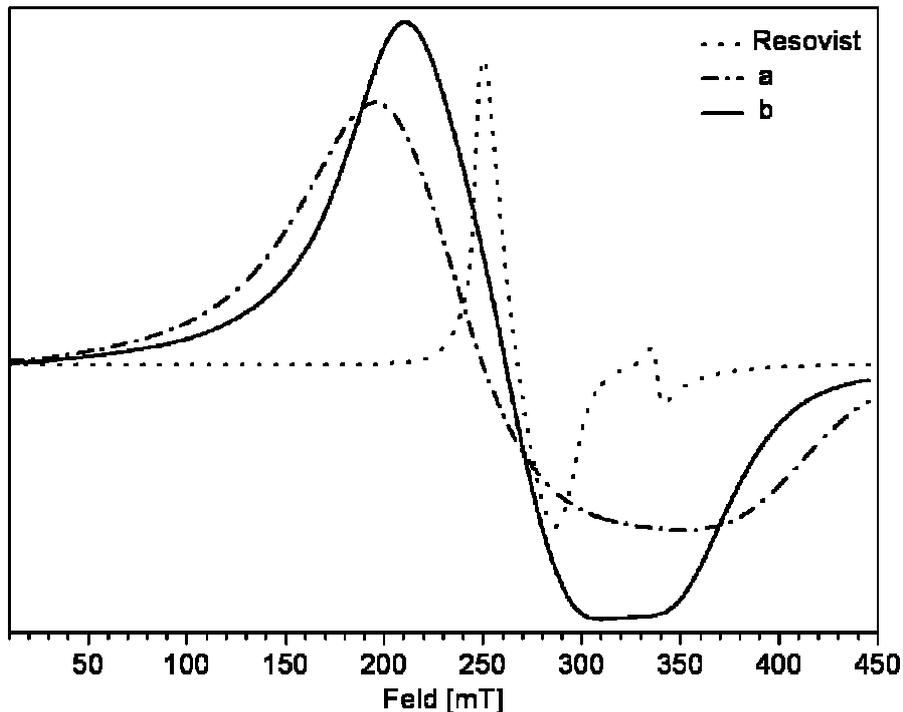


Abb. 38: EPR-Spektren von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO* Proben (a) und (b) verglichen mit Resovist®.

Wichtig für die Charakterisierung eines Kontrastmittels ist auch die Bestimmung der NMR-Relaxivität [10]. Sie dient als Maß für die ‚Leistungsfähigkeit‘ eines Kontrastmittels: Die Relaxivität wird aus den gemessenen Relaxationszeiten berechnet und gibt an, wie stark die Relaxationsraten durch eine Konzentrationseinheit des Kontrastmittels erhöht werden. Der Wert für die Relaxivität sollte also möglichst hoch sein. Da die Relaxationszeiten konzentrations-, viskositäts- und temperaturabhängig sind, wird immer bei gleichen Bedingungen gemessen. Alle Messungen wurden bei 1,41 T, 37°C, in Wasser bei einer Konzentration von 0,015 bis 0,27 mmol Eisen durchgeführt. Die Relaxivitäten von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ sind $r_1 = 11,21 \text{ L/ mmol*s}$ und $r_2 = 242,15 \text{ L/ mmol*s}$, das Verhältnis r_2/r_1 beträgt folglich 21,6. Diese Werte sind gut vergleichbar mit den Messergebnissen für das etablierte Kontrastmittel Resovist® mit $r_1 = 10,24 \text{ L/ mmol*s}$, $r_2 = 310,29 \text{ L/ mmol*s}$, $r_2/r_1 = 30,30$.

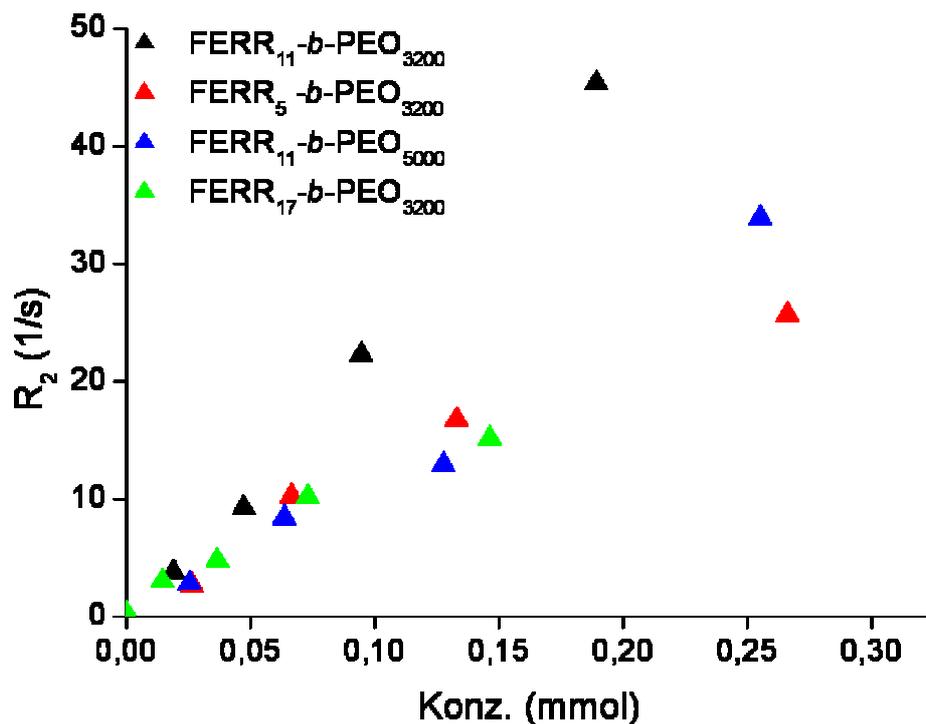


Abb. 39: Ansteigende R_2 -Relaxationsraten mit der Konzentration unterschiedlich stabilisierter *SPIO*. Die Relaxivität ergibt sich aus der Steigung der Gerade. Es wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,015 bis 0,27 mmol gemessen.

Die Leistungsfähigkeit eines Kontrastmittels wird im gemessenen Bereich auch deutlich von der Mobilität und dem Hydratisierungszustand des Stabilisatorpolymers beeinflusst. Bei der Wahl der Polymerhülle muss ein Kompromiss zwischen guter Stabilisierung und magnetischer Wirkung auf die Protonenspins des umgebenden Wassers gefunden werden. Abb. 39 zeigt die Steigung der Relaxationsraten mit der Konzentration für *SPIO*, die durch unterschiedliche Polymere stabilisiert wurden und die sich daraus ergebenden Relaxivitäten. Die guten Werte für FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ gecoatete *SPIO* waren, neben der guten Stabilität bei verhältnismäßig geringer Partikelgröße, ausschlaggebend für die Auswahl dieses Systems als Standard für weitere Untersuchungen. *Coatet* man *SPIO* mit einem Polymer, was einen deutlich größeren PEO Block besitzt (PEO₅₀₀₀), so sinken die Relaxivitäten auf $r_1 = 6,4 \text{ L/mmole}\cdot\text{s}$ und $r_2 = 155,3 \text{ L/mmole}\cdot\text{s}$. Die Verwendung eines *Coatings* aus FERR₁₉-*b*-PEO₃₂₀₀ erzeugt ebenfalls eine Abschirmung und damit eine Verringerung der Relaxivität ($r_1 = 5,65 \text{ L/mmole}\cdot\text{s}$ und $r_2 = 100,37 \text{ L/mmole}\cdot\text{s}$). Stabilisierung mit dem kurzen FERR₅-*b*-PEO₃₂₀₀ sollte die höchsten Relaxivitäten aufweisen, diese sind jedoch mit $r_1 = 8,3$ und $r_2 = 95,92 \text{ L/mmole}\cdot\text{s}$ niedriger als erwartet.

Möglicherweise spielt hier jedoch ein weiterer Faktor eine Rolle. Durch den kurzen Peptidblock und damit einer geringeren Polymerabdeckung der Oberfläche ist die Partikeloberfläche besonders zugänglich für Wasser. Besonders nach längerer Lagerung in wässrigem Medium kommt es zur Oxidation der Magnetitoberfläche und über eine Maghemitzwischenstufe zur Ausbildung einer nicht magnetischen Eisenoxidschicht kommen. Diese Umwandlung der Oberflächenschichten auch begründen, warum die Relaxivität der Partikel trotz der hohen Kristallinität und der großen Eisenoxidkerngröße von 18 – 20 nm, nach längerer Lagerungszeit gemessen, nicht so hoch ist wie erwartet. Der Vergleich Resovist[®] enthält *SPIO* mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 62 nm, die einen polykristallinen Eisenoxidkern, bestehend aus vielen, 4,2 nm großen Einzelkristallen, enthalten [85].

Die vermutete Oxidation der Eisenoxidphasen lässt sich gut durch Hochtemperatur-EPR-Experimente (HT-EPR) untersuchen. Hier konnte eine magnetisch inaktive Goethitschicht auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Abb. 40 zeigt dass sich das EPR-Signal im Bereich von 520 – 540 K ändert. Bei dieser Temperatur wandelt sich Goethit zu Hämatit um [86].

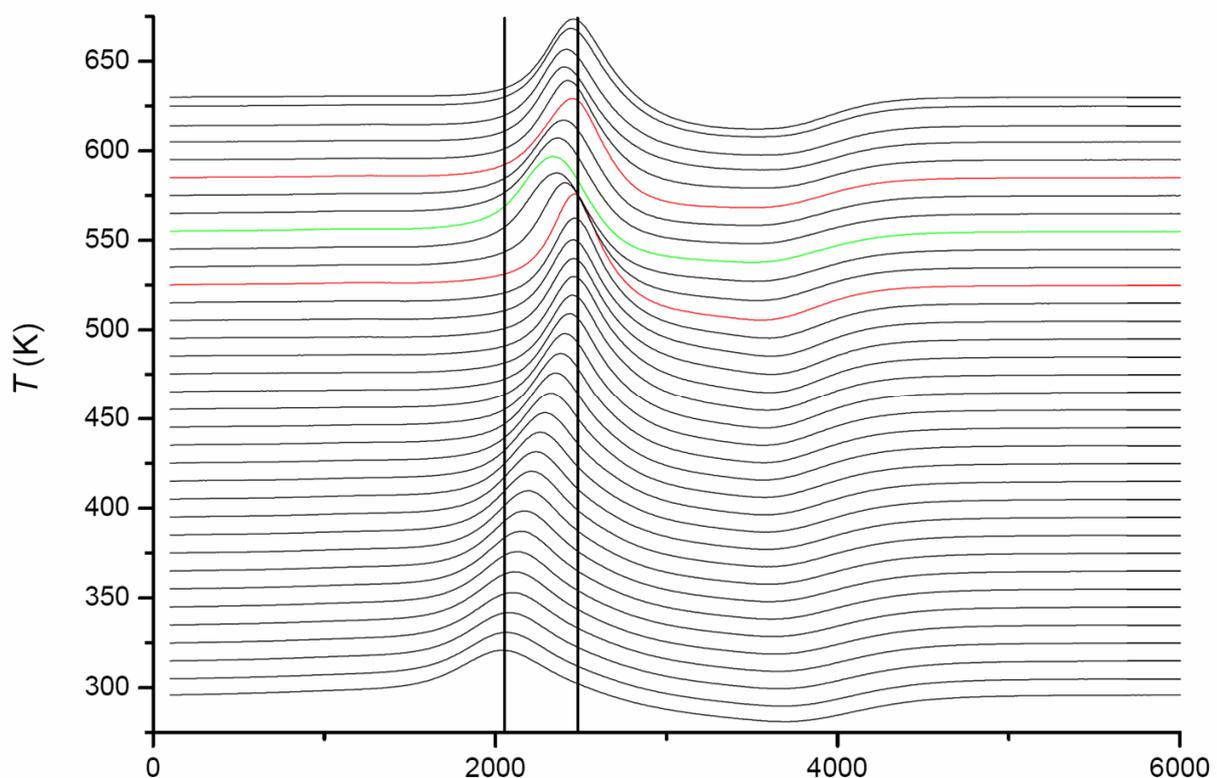


Abb. 40: Hochtemperatur-EPR. Das Signal ändert sich zwischen 520 und 540 K deutlich. Dies ist mit einer Oxidation einer dünnen Goethitschicht zu Hämatit erklärbar.

Die Oxidation von Magnetit zu Goethit in wässrigem Milieu ist bekannt [73]. Da die Mössbauerspektroskopie (vgl. Kapitel 4.2) weiterhin das Vorliegen von nicht-stöchiometrischem Magnetit hinweisen, kann diese Goethitschicht nur sehr dünn sein. Auch die hohe Sättigungsmagnetisierung aus den *SQUID* Experimenten spricht gegen eine dicke, nicht magnetische Schicht.

Der magnetisch aktive Anteil des Partikels, also der magnetische Durchmesser (d_M) der Partikel, lässt sich nun mit *Fluxgate*-Messungen bestimmen. Durch *Fluxgate*-Magnetometer, auch Förster-Sonden genannt, lassen sich Magnetfelder vektoriell bestimmen [87, 88]. Die aus diesen Messungen ermittelte Größenverteilung des magnetischen Partikeldurchmessers ist in Abb. 41 dargestellt. Es fällt auf, dass das Maximum mit $d_M = 9$ nm deutlich unter den übrigen, gemessenen Kerndurchmessern, z.B. d_{TEM} mit 18 - 20 nm und d_{XRD} mit 14 nm, liegt. Auch diese Beobachtungen legen nahe, dass sich nach dem *Coating* mit FERR-*b*-PEO, durch Oxidation in wässrigem Milieu eine dünne, magnetisch inaktive Oberflächenschicht aus Goethit gebildet hat.

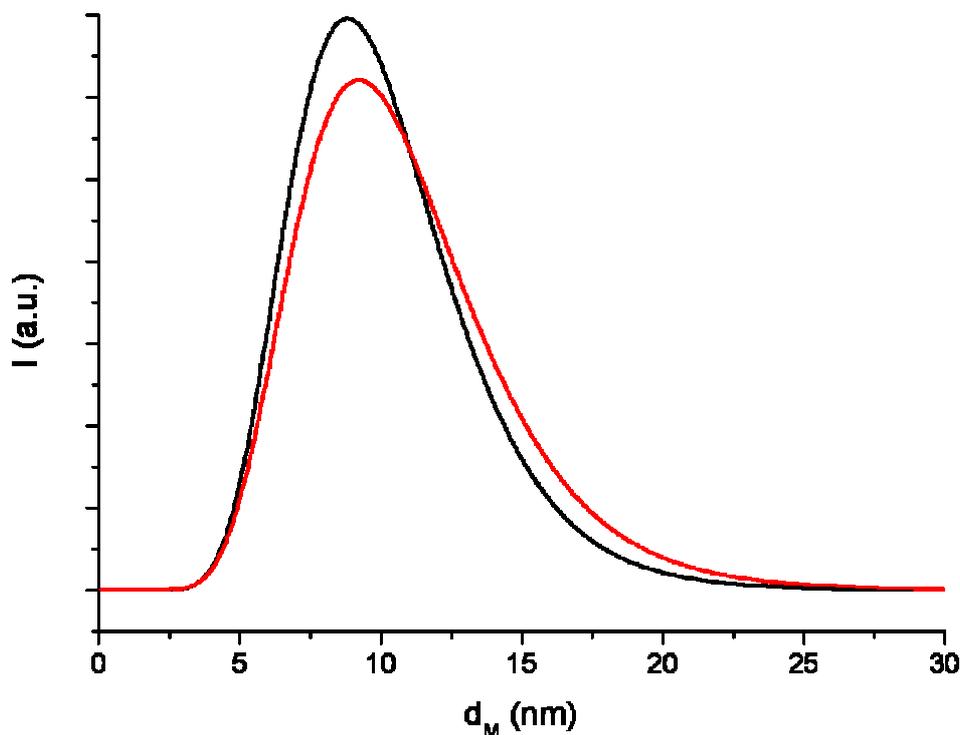


Abb. 41: D_M bestimmt durch Fluxgatemessung. Das Maximum beider FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ stabilisierter Proben liegt bei 9 nm.

Trotz der Goethitschicht zeigen FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* sehr gute magnetische Eigenschaften, die sie als MRT-Kontrastmittelsystem interessant macht. Eine erste erfolgreiche Anwendung von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ stabilisierten *SPIO* konnte im NMR-*Imaging* Experiment gezeigt werden. Mit Hilfe eines NMR-*Benchtop*-Geräts wurde aus den Relaxationszeiten Bilder errechnet. Wie in Abb. 42 (A) dargestellt, wurde dafür eine mit *SPIO* befüllte Glaskapillare in eine Hydrogelmatrix platziert. Durch die *SPIO* Partikel wurden die Relaxationszeiten der Protonenspins im umgebenden Hydrogel verkürzt. Obwohl *SPIO* und Hydrogel nicht in direktem Kontakt stehen wird ein deutliches Suszeptibilitätsartefakt sichtbar. Abb. 42 (B)-(C) vergleicht die Artefakte von FERR-*b*-PEO gecoateten *SPIO* (B) und Resovist[®] (C). Das Artefakt von Resovist[®] ist hierbei aufgrund der höheren Eisenkonzentration stärker.

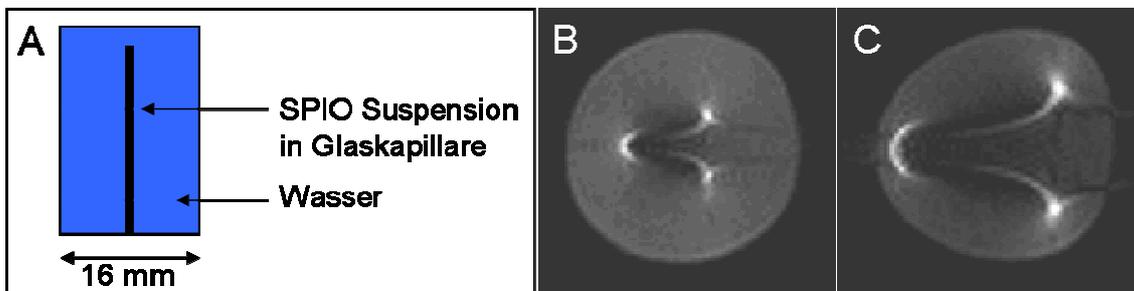


Abb. 42: NMR Bildgebung von Wasserröhrchen, in denen eine mit *SPIO* befüllte Kapillare steht. (A) zeigt den Versuchsaufbau. Das Suszeptibilitätsartefakt von FERR-*b*-PEO gecoateten *SPIO* ist weniger ausgeprägt als das von Resovist[®] (B).

5.3 Zusammenfassung

Durch *SQUID*- und EPR-Experimente konnte gezeigt werden, dass sich die synthetisierten FERR-*b*-PEO stabilisierten Eisenoxidpartikel bei Raumtemperatur superparamagnetisch verhalten. Mit 94 emu/g besitzen die Partikel zudem eine sehr hohe Sättigungsmagnetisierung. Diese Eigenschaften sind optimal für einen ausgeprägten T₂*-Effekt und damit für die Anwendung als Kontrastmittelsystem im MRT. Das gute Kontrastgebungspotential konnte weitergehen durch Bestimmung der NMR-Relaxivität bestätigt werden. Die Relaxivitäten, gemessen bei 1,41 T, 37°C und einer Konzentration von 0,015 bis 0,27 mmol Eisen, sind mit $r_1 = 11,21 \text{ L/ mmol*s}$, $r_2 = 242,15 \text{ L/ mmol*s}$ und $r_2/r_1 = 21,7$ gut vergleichbar mit den Relaxivitäten für das etablierte Kontrastmittel Resovist[®]. Es bestätigte sich weiter, dass FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ der optimale Stabilisator für *SPIO* Partikel

ist, da dieses System gute magnetische Eigenschaften mit kleiner Partikelgröße und guter Stabilität vereint. Systeme mit anderen Polymeren aus der FERR-*b*-PEO Reihe schnitten hinsichtlich der Relaxivität etwas schlechter ab.

Während der Lagerung der Partikel in wässrigem Milieu findet eine Oxidation der äußersten Magnetitschicht statt. Diese dünne, magnetisch inaktive Goethit-Schicht konnte durch HT-EPR nachgewiesen und identifiziert werden. Die Mössbauerspektroskopie (vgl. Kapitel 4.2), welche die Eisenoxidphase als nicht-stöchiometrisches Magnetit identifizierte, sowie die hohen Sättigungsmagnetisierungen aus den *SQUID* Messungen und die guten NMR-Relaxivitäten verdeutlichen weiter, dass die nicht-magnetische Goethitschicht nur sehr dünn ist. Der eigentliche, magnetisch aktive Kern der *SPIO* konnte durch *Fluxgate*-Messungen bestimmt werden und besitzt einen Durchmesser von $d_M = 9$ nm. Der magnetische Durchmesser liegt deutlich unter den, durch andere Methoden ermittelten Durchmessern wie d_{TEM} (18 – 20 nm) und d_{XRD} (14 nm), und lässt sich durch die oberflächliche Goethitschicht, aber auch durch die unterschiedlichen Wertungen der Messmethoden erklären.

Eine erste erfolgreiche Anwendung in der Bildgebung gelang durch NMR-*Imaging* Experimente. Die *gecoateten SPIO* erzeugen ein starkes Artefakt, das ähnlich dem von Resovist[®] ist. Die Relaxationszeiten der umgebenden Protonenspins sind also deutlich verkürzt worden.

FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* verkürzen also effektiv T_2^* und sind deshalb gut als Kontrastmittelsystem einzusetzen. Aufgrund der viel versprechenden physikochemischen und magnetischen Eigenschaften wurden die Partikel im Folgenden *in vivo* untersucht.

6 In vivo-Anwendung von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO*

6.1 Einführung

In vivo-Experimente sind nicht nur wichtig zur weiteren Bewertung des Potentials von FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO* für die Kontrastgebung, es lassen sich auch pharmakokinetische Parameter zur Beurteilung von Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion messen. Für ein Kontrastmittel sind folgende Parameter wichtig: ein guter Kontrast, eine für die Bildgebung ausreichende Zirkulationszeit in der Blutbahn, gute Verträglichkeit. Auch eine niedrige Leberhalbwertszeit, und somit lediglich eine kurzzeitige Belastung mit dem verabreichten Material ist von Bedeutung. Die Blut- und Leberhalbwertszeiten können durch unterschiedliche Methoden am Rattenmodell bestimmt werden. Auch die Verträglichkeit und Toxizität lässt sich oft erst gut durch in vivo-Versuche beurteilen.

Molekulare Bildgebung und eine spezifische Bildgebung von pathogenen Strukturen ermöglichen einen bedeutenden Zeitgewinn für die folgende Therapie. Deshalb ist die Entwicklung von Kontrastmittelsystemen für eine spezifische Bildgebung sehr wichtig. An Tumormodellen kann in vivo eine spezifische Bildgebung durch speziell, z.B. mit RGD, funktionalisierte Partikel untersucht werden.

In diesem Kapitel werden FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO* hinsichtlich ihrer Verträglichkeit untersucht. Die Bluthalbwertszeit wird im MRT und ‚klassisch pharmakologisch‘ durch Blutabnahme bestimmt. Die Blutplasmaproben werden hierbei mit unterschiedliche Methoden untersucht: Zum einen durch Bestimmung des Eisengehaltes nach chemischem Aufschluss durch *ICP AES*-Spektrometrie. Hierbei wird jedoch auch das Bluteisen erfasst. Zum anderen wurde der Eisengehalt durch NMR-Relaxometrie bestimmt, einer Methode die nur *SPIO* im Plasma erfasst. Am Rattenmodell wird außerdem durch MRT die Leberhalbwertszeit bestimmt.

Experimente zur spezifischen Bildgebung von RGD-funktionalisierten *SPIO* Partikeln, und damit die ersten Schritte in Richtung molekulare Bildgebung, werden im Maus-Tumormodell untersucht.

6.2 Verträglichkeitsexperiment an der Ratte

Um nachzuweisen, dass FERR-*b*-PEO gecoatete *SPIO* auch in höheren Dosen verträglich sind, wurden drei Ratten mit einer Dosis, die deutlich über der voraussichtlichen klinischen Dosis liegt, behandelt. Dazu wurden den Ratten unter Narkose ca. 0,5 mmol/ kg Körpergewicht (KG) in über die Schwanzvene injiziert. Nach dem Erwachen aus der Narkose und innerhalb der ersten Minuten nach der Injektion färbten sich die Innenohren grau. Dies ist auf eine Einlagerung der *SPIO* Partikel in gut durchbluteten Geweben zurück zu führen. Auch die Spitze der Schnauze verfärbte sich durch Einlagerung von *SPIO* dunkel. Abb. 43 (B-D) verdeutlichen die Dunkelfärbung von Innenohr, Schnauze und Pfote nach *SPIO* Gabe gegenüber einer unbehandelten Ratte in Abb. 43 (A).

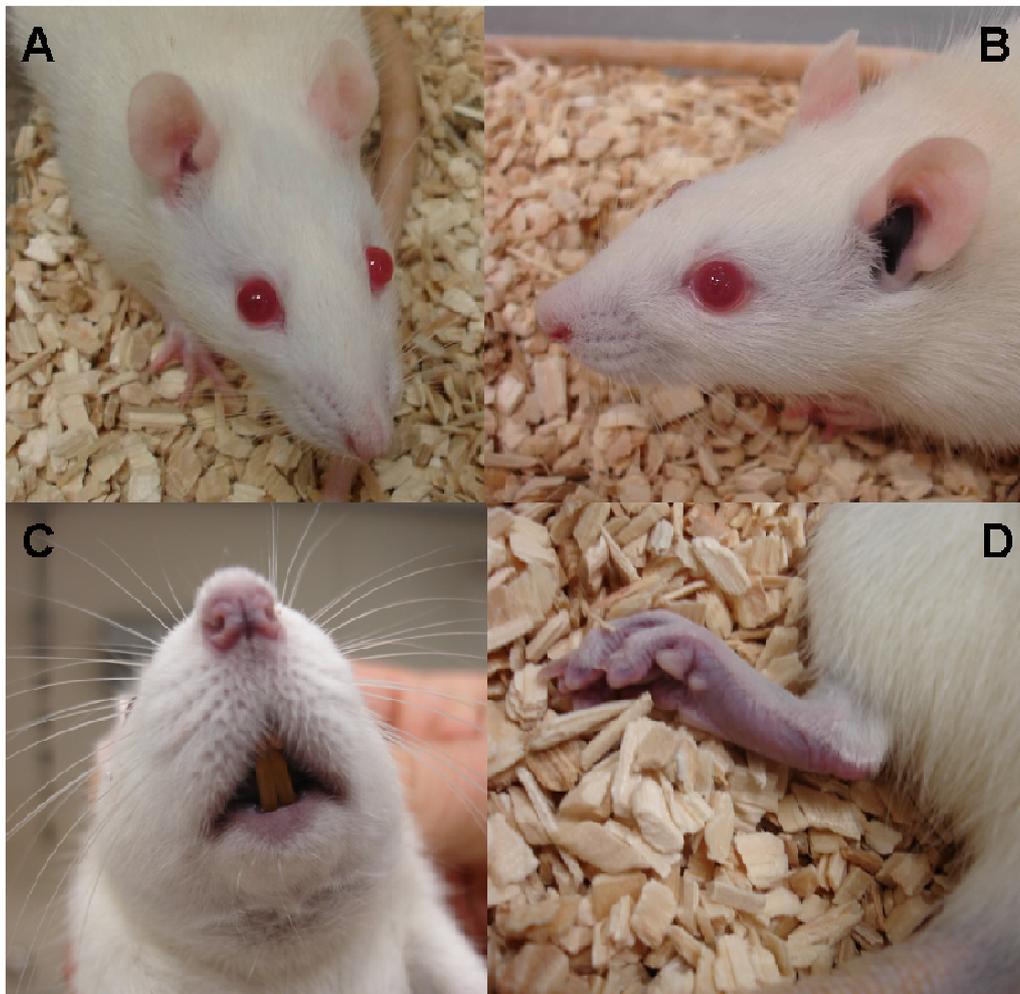


Abb. 43: (A und B) Verträglichkeitsexperiment: (A) Ratte vor der Injektion von *SPIO*. Die Innenohren erscheinen rosa. (B) Ratte nach der Injektion von ca. 0,5 mmol FERR-*b*-PEO gecoatete *SPIO*/ kg KG. Die Haut im Innenohr hat sich dunkel verfärbt. (C) zeigt die dunkle Verfärbung der Schleimhäute von Schnauze und Nase der Ratte. (D) Auch die Haut der Pfoten ist dunkel verfärbt. Die Dunkelfärbung ist auf eine Einlagerung von *SPIO* in gut durchbluteten Hautarealen zurückzuführen.

Eine Ratte stellte nach der Injektion ca. eine Stunde das Fell auf. Dies ist ein Zeichen für Unwohlsein. Insgesamt verhielten sich alle behandelten Ratten relativ ruhig: Sie schiefen, putzten sich und fraßen, und blieben aufmerksam und neugierig. Die Ratten der nicht behandelten Vergleichsgruppe verhielten sich sehr unruhig. Die Ratte, der die höchste *SPIO* Konzentration verabreicht wurde starb in der Nacht. Dies könnte jedoch auch auf die Wirkung der Narkose (Isofluran), bzw. mögliche Wechselwirkungen von Narkose und *SPIO* zurückzuführen sein. Die Obduktion zeigt, dass sich auch die gut durchbluteten Schleimhäute von Speiseröhre und Darm, Leber, Milz, und Knochenhäute dunkel verfärbt haben. Eine Einlagerung von *SPIO* in makrophagenreichen Geweben, wie Leber und Milz war zu erwarten. Die Aufnahme in Makrophagen ist jedoch sättigbar [10]. Da eine sehr hohe Konzentration *SPIO* verabreicht wurde, lagern sich *SPIO* in leicht zugänglichen, gut durchbluteten Geweben ein. *FERR-b-PEO gecoatete SPIO* sind für Ratten unter einer Konzentration 562 $\mu\text{mol/kg KG}$ verträglich. Ab dieser Konzentration können sie bei Ratten akut toxisch wirken.

6.3 Bestimmung der Bluthalbwertszeit in der Ratte

Die Halbwertszeit ist die Zeitspanne, nach der die Konzentration eines Pharmakons (z.B. im Blutplasma) um die Hälfte abgenommen hat. Die Elimination eines Pharmakons ist in der Regel nach ca. 4 – 5 Halbwertszeiten komplett abgeschlossen. Durch die Halbwertszeit lässt sich also sowohl die Dauer der Wirkung, als auch die gesamte Verweildauer eines Pharmakons im Organismus abschätzen [89]. Abb. 44 zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurve der Elimination eines Pharmakons im Einkompartimentmodell. Im Einkompartimentmodell wird der gesamte Körper als homogene Einheit angenommen und die Veränderung der Konzentration des Pharmakons im Plasma analysiert. Voraussetzung dieses Modells ist, dass die Verteilungsgeschwindigkeit zwischen Plasma, Körperflüssigkeiten und Geweben, verglichen mit der Elimination extrem schnell erfolgt und es z.B. durch intravenöse Bolusgabe zu einer schnellen Aufsättigung des Pharmakons (*SPIO*) kommt. Weiter wird angenommen, dass die Elimination einer Reaktion erster Ordnung folgt. Die zu jedem Zeitpunkt eliminierte Menge des Pharmakons ist also direkt proportional zu der noch im Kompartiment verbliebenen Arzneistoffmenge. Die Halbwertszeit lässt sich aus Konzentrations-Zeit-Kurven einfach ablesen. Eine weitere wichtige pharmakokinetische Größe ist die *AUC, Area Under the Curve*. Die Fläche unter der Kurve entspricht der bioverfügbaren Pharmakonmenge [90].

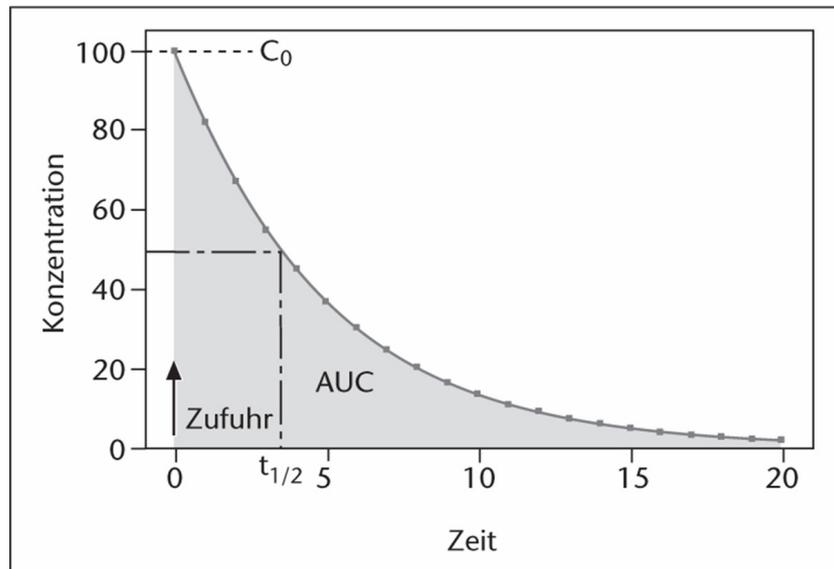


Abb. 44: Schema der Elimination als Konzentrations-Zeit-Kurve im Einkompartimentmodell. Die Funktion entspricht einer Reaktion erster Ordnung. Voraussetzungen sind eine rasche Zufuhr des Pharmakons und eine schnelle Verteilung im Organismus. C_0 ist die Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt t_0 , $t_{1/2}$ stellt die Halbwertszeit dar. *AUC* bedeutet *Area Under the Curve*, die Fläche unter der Kurve und stellt die verfügbare Konzentration des Pharmakons im Organismus dar [90].

Die Bluthalbwertszeit eines Kontrastmittels muss ausreichen, um eine Anreicherung der *SPIO* am *Target* zu ermöglichen und um eine angemessene Datenmenge zur Errechnung des Bildes zu gewinnen. Sie ist für *SPIO* im MRT aus der Zunahme der T_2 -Signalintensität mit der Zeit berechenbar und ‚klassisch‘ pharmakologisch aus der abnehmenden Plasmaeisenkonzentration mit der Zeit.

Die Bestimmung der Bluthalbwertszeit über MRT erfolgt nicht-invasiv. Es wird der Anstieg der T_2 -Signalintensität mit der Zeit untersucht. Dieser verläuft jedoch bei hohen Konzentrationen nicht proportional zur Signalintensität, da *SPIO* zu einer Signalauslöschung bewirken. So kann je nach Höhe der *SPIO* Dosis erst nach ausreichender Elimination der *SPIO* Partikel, und einem Anstieg der Signalintensität >0 , die Intensitätszunahme zur Bestimmung der Halbwertszeit herangezogen werden.

Interessant ist der Vergleich, der aus der MRT bestimmten Bluthalbwertszeit mit der klassisch pharmakologischen Methode. Diese bedarf zwar invasiver Eingriffe, liefert aber durch die Möglichkeit einer direkten Konzentrationsbestimmung genauere Ergebnisse. Hier wird aus dem Abfall der Plasmaeisenkonzentration mit der Zeit die Halbwertszeit bestimmt. Im Gegensatz zur MRT-Methode werden Blutproben von vigilen Tieren gezogen, der Stoffwechsel und Gefäßtonus wird also nicht von einem Narkotikum wie Isofluran beeinflusst. Die vorbereitenden Eingriffe für die pharmakologische Methode, sowie die

Abnahme von großen Blutmengen und der Volumenausgleich, stellt jedoch eine starke Belastung für die Versuchstiere dar.

Die Plasmaproben aus dem klassisch pharmakologischen Experiment wurden über Aufschluss des Gesamteisens und *ICP*-Spektrometrie und über NMR-Relaxometrie untersucht. Beim Aufschluss der Blutplasmaproben für die *ICP*-Analytik ist zu beachten, dass Reste des Bluteisens ebenfalls aufgeschlossen werden und in das Analysenergebnis mit eingehen. Während aus dem Abfall der Relaxationsraten mit der Zeit, ermittelt über Messung der T_2 -Relaxationszeiten, nur *SPIO* erfasst werden. Interessant ist auch hier ein Vergleich der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Methoden.

6.3.1 *MRT-Experiment*

Vor der Injektion wurden die Ratten zunächst unter Narkose im MRT untersucht. Dann wurden *SPIO* als Bolus über die Schwanzvene appliziert und unter Narkose MR Schnittbilder aufgenommen. Dabei wurde das gut durchbluteten Nierengewebe über mehrere Stunden hinweg verfolgt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Bluthalbwertszeit aus dem Anstieg der Signalintensitäten in einem selektierten Bildbereich. Ein Beispiel für eine MRT-Bildsequenz mit selektiertem Bildbereich ist in Abb. 45 (A+C) dargestellt. Abb. 45 (B) zeigt die graphische Darstellung des Anstiegs der Signalintensität (bzw. Abfall von $\ln(SI_0/SI)$) mit der Zeit.

Vor der Injektion erscheint das Nierengewebe im T_2 -Bild hell, die Signalintensität ist hoch. Sofort nach der *SPIO*-Injektion erscheint das Nierengewebe im Bild schwarz. Das Signal ist ausgelöscht. Dieser Effekt wird ab einer bestimmten Schwellendosis erreicht. Durch eine höhere *SPIO*-Konzentration kann der Effekt, also die Auslöschung des Signals nicht weiter gesteigert werden. Erst ab einer Signalzunahme und beginnenden Gewebeaufhellung durch Eliminierung sind die Signalintensitäten wieder proportional zur Konzentration und können für die Berechnung der Halbwertszeit herangezogen werden.

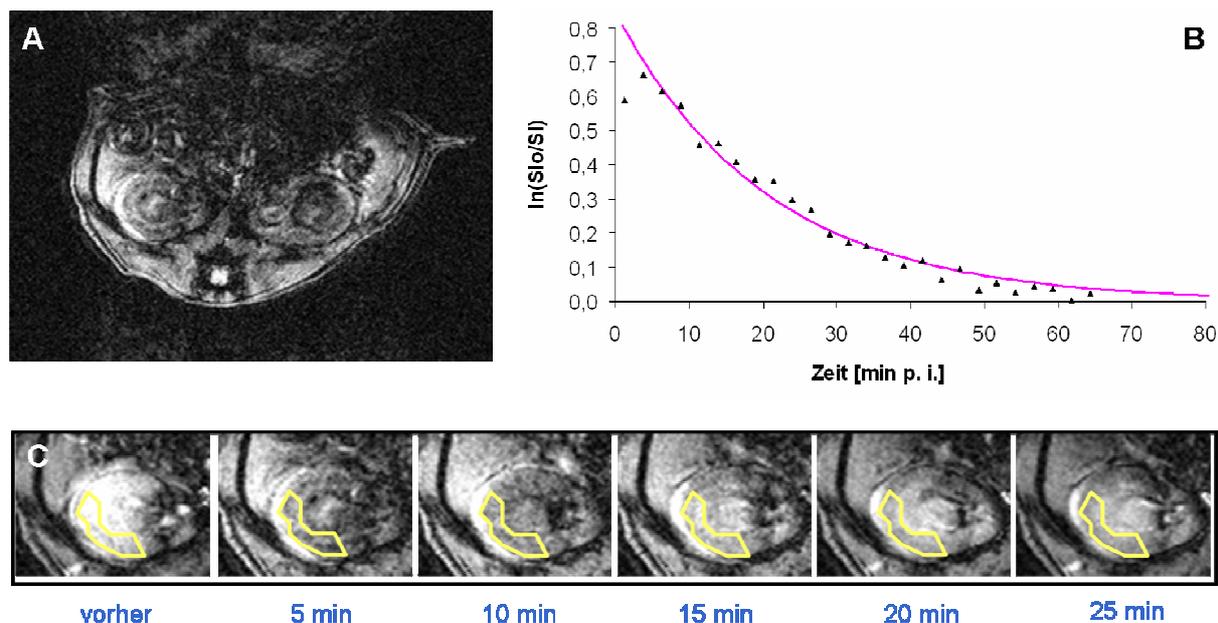


Abb. 45: Auswertung der Bluthalbwertszeit aus MRT-Bildern der Niere. (A) Tomographie durch die Ratte. Die beiden Nieren sind deutlich zu erkennen. (B) Ansteigende Signalintensitäten im Selektionsbereich der Nierenkortex am Beispiel von Ratte 6. (C) Beispiel einer Bildsequenz mit selektiertem Auswertungsbereich in der Nierenkortex. Zunächst erscheint die Nierenkortex im MRT hell. Nach der Injektion der *SPIO* wird das Bild dunkel (Signalintensität = 0), dann durch die rasche Aufnahme in Makrophagen und Transport in RES reiche Gewebe zunehmend heller. Die Halbwertszeit kann erst ab einem Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Signalintensität größer als Null wird.

Mit Hilfe von *Fit*-Funktionen wurden die in Tab. 2 gezeigten Werte errechnet. Hierbei wurden die ersten Werte, mit der Signalintensität $SI = +/-0$ als Messfehler betrachtet und nicht miteinbezogen. Das Auftreten mehrerer Halbwertszeiten lässt sich durch eine Größenfraktionierung der Partikelpopulation im Blut, gefolgt von unterschiedlich schneller Eliminierung erklären. Große Partikel werden schneller eliminiert, während kleine länger zirkulieren. Zusätzlich bewirken große Partikel eine Stärkere Signalauslöschung im T_2 -gewichteten MRT-Bild [69].

	$t_{1/2 \alpha}$ (1. Funktion)	$t_{1/2 \beta}$ (2. Funktion)	Anteil der (2. Funktion)	MW
Ratte 4m	6,77 min	113,52 min	22,9 %	15,60 min
Ratte 5m	1,59 min	27,38 min	82,3 %	11,41 min
Ratte 6m	14,33 min	-		14,33 min
				13,78 min (+/- 1,75)

Tab. 2: Übersicht über die errechneten Bluthalbwertszeiten aus dem MRT-Experiment. Eine gemittelte Bluthalbwertszeit von 13,78 min (+/-1,75) entspricht gut den der erwarteten Halbwertszeit für *SPIO* mit dieser Größenverteilung.

Abhängig von der Form der Kurve wurden eine oder zwei Exponentialfunktionen für die Berechnung angewendet. Für die gesamte Partikelpopulation wurde eine mittlere Bluthalbwertszeit von 13,78 min (+/-1,75) errechnet. Für FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ stabilisierte *SPIO* einer Größe von $d_H = 76 - 78$ nm (PDI 0.2) und einem Zetapotential von +/- 0 mV war ein Ergebnis in dieser Größenordnung zu erwarten.

6.3.2 *Pharmakologisch*

Die klassische pharmakologische Methode zur Bestimmung der Bluthalbwertszeiten wurde durch Blutabnahme an vigilen Tieren durchgeführt. Diese befanden sich während des Versuchs in kleinen Käfigen, die nur wenig Bewegung zuließen. Als vorbereitende Maßnahme wurde den Ratten ein Katheder in die Arteria Carotis gelegt, der eine Blutabnahmen innerhalb kurzer Abstände ermöglicht. Vor der weiteren Behandlung wurde von jeder Ratte eine Nullwert-Blutprobe genommen. Dann wurden *SPIO* über die Schwanzvene injiziert. Die Blutabnahme erfolgte zunächst in sehr kurzen Abständen und wurde nach größeren Intervallen von bis zu 24 Stunden nach der Injektion verfolgt. Bei jeder Blutabnahme wurde das entnommene Volumen mit heparinisierter, physiologischer Kochsalzlösung ersetzt. Durch diesen Volumenausgleich wird der Kreislauf der Ratte nicht unnötig belastet, aber es kommt zu einer Verdünnung des Blutes. Innerhalb des kurzen Zeitraums des Experiments kann der Organismus der Ratte den Blutverlust biosynthetisch nicht ausgleichen. Durch Zentrifugation wurde aus dem abgenommenen Vollblut Plasma gewonnen, das weitergehend mittels *ICP*-Spektroskopie und NMR-Relaxivitätsmessungen untersucht wurde.

6.3.2.1 *Auswertung durch Eisenbestimmung (ICP)*

Die Plasmaproben wurden mit HNO₃ und H₂O₂ in der Mikrowelle aufgeschlossen und anschließend der Eisengehalt durch *ICP AES* bestimmt. Die applizierte Probe enthielt 14165,12 µmol Fe/ L. Zur Berechnung waren zuvor fälschlicherweise 15186 µmol/ L (aus einer *ICP* Messung der Stammlösung, Probe ‚m‘) angenommen worden. Möglicherweise resultiert dieser Unterschied aus Fehlern der Pipetten beim Verdünnen.

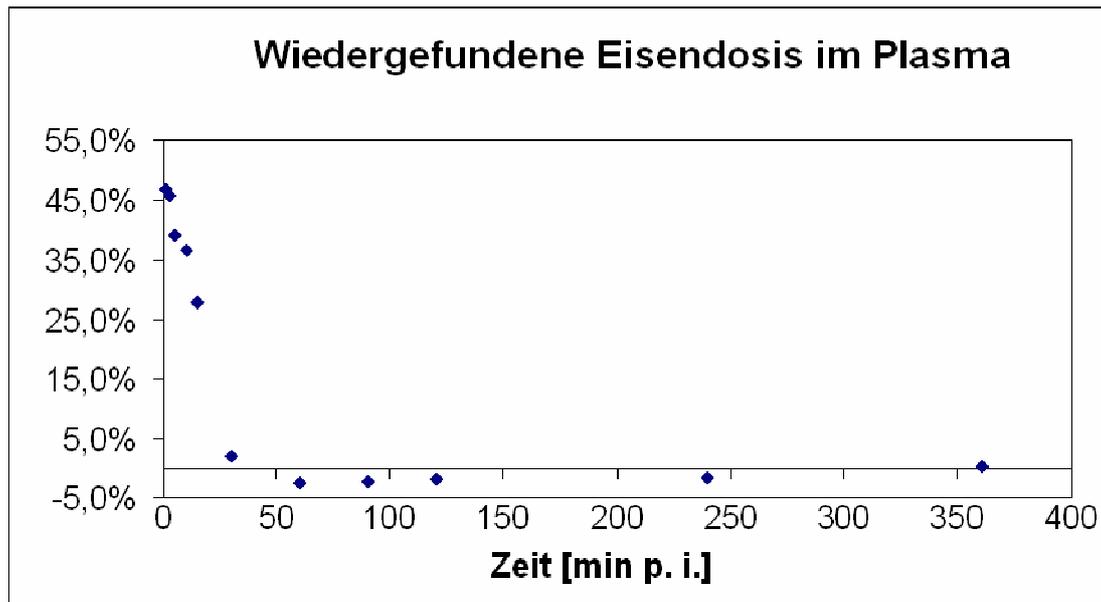


Abb. 46: Im Plasma wiedergefundene Eisendosis in Prozent. Innerhalb kurzer Zeit sinkt die wiedergefundene Eisendosis bereits auf Null ab. Die negativen Eisenkonzentrationen ergeben sich durch den Abzug des ‚Plasma-Nullwertes‘, der nur zu Anfang des Experiments bestimmt wurde, und dann jeweils um den Faktor der Verdünnung reduziert wurde. Die Untersuchung einer Vergleichsgruppe führt zu genaueren Ergebnissen, wurde jedoch aus Tierschutzgründen nicht durchgeführt.

In Abb. 46 wird die wiedergefundene Eisendosis im Plasma über die Zeit verfolgt. Die dargestellten Werte errechnen sich aus der durch *ICP* ermittelten Eisenkonzentration der Plasmaprobe, abzüglich der vorab bestimmten Eisenkonzentration (‚Nullwert‘), die jeweils um den Faktor der Verdünnung reduziert wurde, zusammen.

Nach einer Minute sind 46,9% (+/-22%) der applizierten Dosis im Blut zu finden. Die Eisendosis fällt wie erwartet steil ab. Dies ist darauf zurückzuführen, dass größere *SPIO* rasch von Makrophagen erkannt, abgefangen und aus der Blutzirkulation in Gewebe des RES, wie Leber und Milz transportiert werden. Nach 30 min ist die Eisendosis bereits unter Null gefallen. Erst nach einem Tag steigt der Messwert wieder in den positiven Konzentrationsbereich. Eine Erklärung hierfür ist, dass die aufgetragenen Werte die gemessenen Konzentration, abzüglich der Plasmaeisenkonzentration vor Versuchsbeginn, darstellen. Dieser Plasma-Nullwert wurde jedoch für jede Ratte nur einmal vor der Injektion der *SPIO* bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt war das Plasma der Ratte noch physiologisch ‚normal‘ hinsichtlich der Konzentration an Blutbestandteilen wie Hämoglobin. Vor der *ICP* Messung wurden alle Plasmaproben chemisch aufgeschlossen, dadurch geht auch Eisen aus Hämoglobin in die Messung mit ein. Die häufigen Blutabnahmen und das Nachspülen mit Kochsalzlösung bewirken zwar einen Volumenausgleich, die Biosynthese der Blutbestandteile dauert jedoch einige Zeit. Nach sehr kurzer Zeit sinkt auch der

Hämoglobinanteil im Plasma und der abgezogene Plasma-Nullwert ist zu hoch. Es ergibt sich eine scheinbar negative, wieder gefundene Eisendosis. Nach 24 h wird die Biosyntheseleistung der Ratte messbar. Das Plasma scheint annähernd physiologisch ‚normal‘ zu sein, der Hämoglobinanteil ist ähnlich dem des Plasmas vor Beginn des Experiments. Durch die Anpassung der Plasma-Nullwerts über den Faktor der Verdünnung kann der Fehler zwar verringert werden, optimal für einen solchen Versuch wäre jedoch mindestens eine Ratte als Vergleichsgruppe, die ohne *SPIO* Injektion gleich behandelt wird. Durch das Spritzen des gleichen Volumens an Kochsalzlösung und der gleichen Abfolge von Blutabnahmen und Volumenausgleich kann der Messfehler minimiert werden. Aus Respekt gegenüber dem Tier wurde dies jedoch unterlassen.

Die Halbwertszeit errechnet sich aus dem Abfall der Plasmaeisenkonzentration bzw. der wieder gefundenen Eisendosis. Die Werte der drei Ratten stimmen dabei sehr gut überein und es ergibt sich eine gemittelte Bluthalbwertszeit von 11,25 min (+/-0,74).

6.3.2.2 Auswertung durch NMR-Relaxivitätsmessungen

Die Plasmaproben können auch über NMR-Relaxivitätsmessungen analysiert werden. Der Abfall der Relaxationsraten mit der Zeit ist direkt abhängig von der *SPIO* Konzentration im Plasma. Deshalb kann hieraus die Bluthalbwertszeit errechnet werden. Im Gegensatz zur *ICP* Analytik nach Aufschluss des Plasmas, wird das Eisen aus dem Hämoglobin hier nicht erfasst. *SPIO* verändern die Relaxationszeiten T_1 und T_2 der Protonenspins. Weitere Faktoren, die die Beweglichkeit der Protonenspins, und damit die Relaxationszeiten, beeinflussen wie z.B. die Viskosität des Messmediums und Temperatur spielen ebenfalls eine große Rolle. Außerdem ist die Feldstärke des Messfeldes wichtig. Bei Messungen in Gewebe ist zusätzlich das Wasser-Fett-Verhältnis zu berücksichtigen.

Mit einem MiniSpec *NMR* Analyzer wurden die Relaxationszeiten der verdünnten Plasmaproben bei 37°C und 1,41 T gemessen. Die Errechnung der Bluthalbwertszeit erfolgte aus dem Abfall der Relaxationsraten. Abb. 47 zeigt den steilen Abfall der T_2 -Rate mit der Zeit. Aus dem Abfall der T_1 -Raten aller Ratten ergibt sich eine Bluthalbwertszeit von 11,8 min (+/-0,02). Eine Bluthalbwertszeit von 11,58 min (+/-0,29) errechnet sich aus dem Abfall der T_2 -Raten.

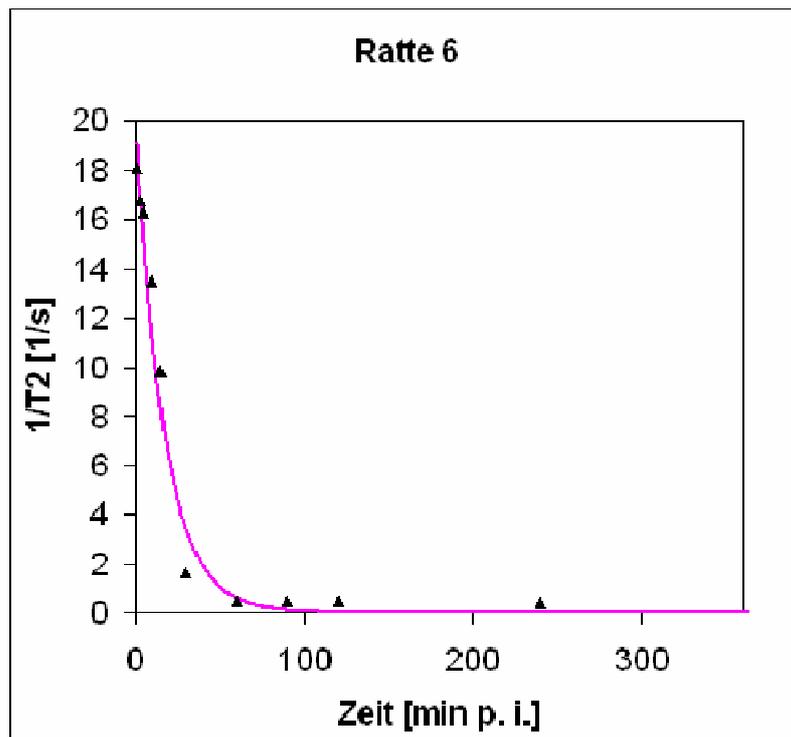


Abb. 47: Beispiel Abfall der T_2 -Rate mit der Zeit im Blutplasma von Ratte 6

6.3.3 Vergleich der errechneten Bluthalbwertszeiten

Die nicht-invasiv bestimmte, gemittelte Bluthalbwertszeiten aus den MRT-Messungen liegen bei 13,78 min (+/- 1,75). Dieser Wert stimmt gut mit dem gemittelten Ergebnis der pharmakologischen Bestimmungen von 11,54 min (+/- 0,35) überein, beinhaltet jedoch einen größeren Fehler. Die klassisch pharmakologische Methode ist deshalb zu bevorzugen. Tab. 3 zeigt, dass die Analysenergebnisse aus *ICP* und Abfall der Relaxationsraten sehr gut korrelieren. Die gemittelte Halbwertszeit aus allen Methoden entspricht 11,54 min (+/-0,35).

	<i>ICP</i>	$1/T_1$	$1/T_2$	MW	STW
Ratte 4ph	10,2	11,87	11,17	11,05	0,65
Ratte 5ph	11,78	11,78	11,78	11,78	0
Ratte 6ph	11,78	11,83	11,78	11,8	0,02
MW	11,25	11,8	11,58	11,54	0,35

Tab. 3: Übersicht über die errechneten Halbwertszeiten (min) aus der pharmakologischen Methode.

Die Blut-/Plasmakinetik lässt sich also nicht nur direkt über die Eisenkonzentration, sondern auch sehr genau indirekt über das relaxometrische Verhalten der *SPIO* im Plasma bestimmen. Die Zirkulationszeit im Blut, folglich auch die Bluthalbwertszeit ist stark abhängig von der Größe der Partikel und deren Oberflächenbeschaffenheit. Eine Bluthalbwertszeit von 11,54 min (+/- 0,35) in der Ratte für 76 – 78 nm große Partikel (*Z-average*, PDI 0,2) mit einem Zetapotential von +/- 0 mV, ist gut vergleichbar mit 13 – 14 min für stärkerstabilisierte Partikel einer Größe von 52 – 66 nm und einem Zetapotential von +/- 0 mV [91]. Die Bluthalbwertszeit für *SPIO* ist, wie für viele andere nanopartikuläre Systeme, dosisabhängig. Dies ist zurückzuführen auf die zunehmende Sättigung der Makrophagenaufnahme in Geweben wie Leber, Milz und Knochenmark. In der Ratte ist die Bluthalbwertszeit meist wesentlich kürzer als im Menschen [10]. Das liegt unter anderem an den unterschiedlichen Herzfrequenzen und Retikulären Endothelialen Systemen.

6.4 Bestimmung der Leberhalbwertszeit in der Ratte

Eine weitere wichtige pharmakologische Kenngröße für ein Kontrastmittel auf *SPIO*-Basis ist die Leberhalbwertszeit. Je kürzer die Leberhalbwertszeit, desto weniger wird die Leber durch das Kontrastmittel belastet, und desto schneller kann eine neue *SPIO* Dosis verabreicht werden. *SPIO* werden durch Makrophagen aus dem Blut eliminiert und in Organen des RES (besonders Leber, Milz, Knochenmark) eingelagert. Dort erfolgt der Abbau des Eisenoxids in eine biologisch verwertbare Form. Die Eisenionen werden schließlich in Ferritin aufgenommen und gespeichert. Prinzipiell kann der Organismus Eisen nur über größere Blutverluste oder Hautabschuppungen eliminieren. Die Eisendosis, die als Kontrastmittel verabreicht wird ist jedoch verglichen mit dem Gesamteisenvorkommen im Körper so gering, dass der Körper die Eisenmenge problemlos speichern kann [45]. Die Leberhalbwertszeit kann aus dem Abfall der Signalintensitäten im MRT-Schnittbild der Leber errechnet werden.

6.4.1 *MRT-Experiment*

Die Lebern der Ratten wurden zunächst vor der Injektion im MRT vermessen. Dann wurde den Tieren ca. 25 µmol/ kg KG FERR-*b*-PEO gecoatete *SPIO* über die Schwanzvene injiziert. In festgelegten Abständen wurde die Leber bis 18 Tage nach Applikation im MRT untersucht. Aus dem Anstieg der Signalintensitäten wurde die Leberhalbwertszeit bestimmt.

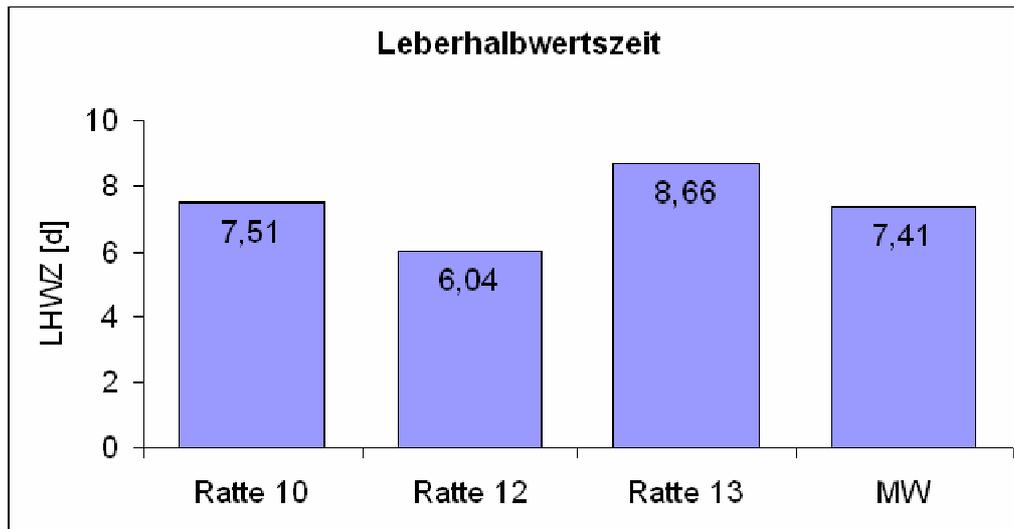


Abb. 48: Übersicht über die gemessenen Leberhalbwertszeiten aus der MRT. Die Leberhalbwertszeit ergibt einen Mittelwert von 7,41 Tagen ($\pm 1,07$). Am niedrigsten ist die Leberhalbwertszeit von Ratte 12 mit 6,04 Tagen, während die Leberhalbwertszeit von Ratte 13 mit 8,66 Tagen am höchsten ist.

Die gemittelte Leberhalbwertszeit von FERR-*b*-PEO gecoatete *SPIO* beträgt 7,41 Tage ($\pm 1,07$). Wie aus Abb. 48 ersichtlich wird variieren die Einzelwerte der Ratten zwischen 6,04 und 8,66 Tagen. Dies ist ein sehr gutes Ergebnis für einen Versuch am lebenden Organismus. Wie bei der nicht-invasiven Bestimmung der Bluthalbwertszeit über MRT ist auch hier sicherlich ein größerer Messfehler als bei einer direkten Gehaltbestimmung aus Lebergewebeproben zu erwarten. Die Durchführung eines solchen Experiments ist jedoch ethisch nicht vertretbar.

6.5 Molekulare und spezifische Bildgebung

Tumorgewebe zeichnet sich durch eine erhöhte Permeabilität des Endothels, sowie eine fehlende Lymphdrainage aus. Daraus ergibt sich der *EPR*-Effekt (*Enhanced Permeability and Retention*, erhöhte Permeabilität und Rückhaltung) [92, 93]. Makromoleküle und Proteine können in das Tumorgewebe eindringen und verweilen dort. Gesunde Endothelien sind nur für Makromoleküle unter 50000 Da permeabel. Kleinere Moleküle werden über die Lymphe entfernt. Diese Effekte lassen sich für ein gezieltes Ansteuern (*Targeting*) mit Wirkstoffen in nano- und mikropartikulären Systemen ausnutzen. Während ‚kleine‘ Wirkstoffmoleküle auch aus gesundem Endothel austreten können, wird Wirkstoff der in einem nanopartikulären Träger verpackt ist, selektiv im Tumorgewebe angereichert. Man unterscheidet weitergehend zwischen aktivem und passivem *Targeting*. Beim passiven *Targeting* hängt die Aufnahme in das Zielgewebe hauptsächlich von physikochemischen Eigenschaften des Trägersystems, wie

der Partikelgröße, und den partikelrückhaltenden Eigenschaften des Tumorgewebes (*EPR*-Effekt) ab. Aktives *Targeting* verläuft über rezeptorvermittelte Endozytose [2, 94]. Dabei ist meist ein *targetspezifischer* Ligand an die Partikeloberfläche gekoppelt. Dieser bindet an den Rezeptor und der Partikel wird endozytiert. Auch *SPIO* können durch aktives *Targeting* im Tumorgewebe angereichert werden und bewirken damit eine spezifische Bildgebung [3, 10, 28, 95, 96].

6.5.1 Funktionalisierung mit RGD

Das Tripeptid RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) ist eine bekannte *Targeting*sequenz, die spezifisch an Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet. Da Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf den Endothelien vieler solider Tumoren überexprimiert ist, stellt es ein gut zugängliches *Target* für eine spezifische Bildgebung dar [97-101]. Sowohl lineare als auch zyklisierte RGD-Sequenzen binden an dieses Integrin $\alpha_v\beta_3$. In Abb. 49 (A) ist eine lineare RGD-Sequenz abgebildet. Zyklisierte Tripeptide (cRGDs) binden weitaus selektiver an Integrine. Bei dem in Abb. 49 (B) gezeigtem cRGD (-RGDfK-) wurde die Aminosäuresequenz zugunsten eines verbesserten Struktur-Wirkungsverhältnis abgeändert. Der *D*-Phenylalaninrest (f = *D*-Phe) direkt hinter der RGD-Sequenz erhöht die Bindungselektivität an Integrine, während der Lysinrest (K = Lys) die stabile Kupplung des Peptids an einen *Spacer* oder direkt an ein Polymer ermöglicht [102]. Die Konzentration eines partikulären *Drug Delivery*- oder Bildgebungssystems am Tumor kann durch die Funktionalisierung mit RGD Sequenzen aktiv erhöht werden [28].

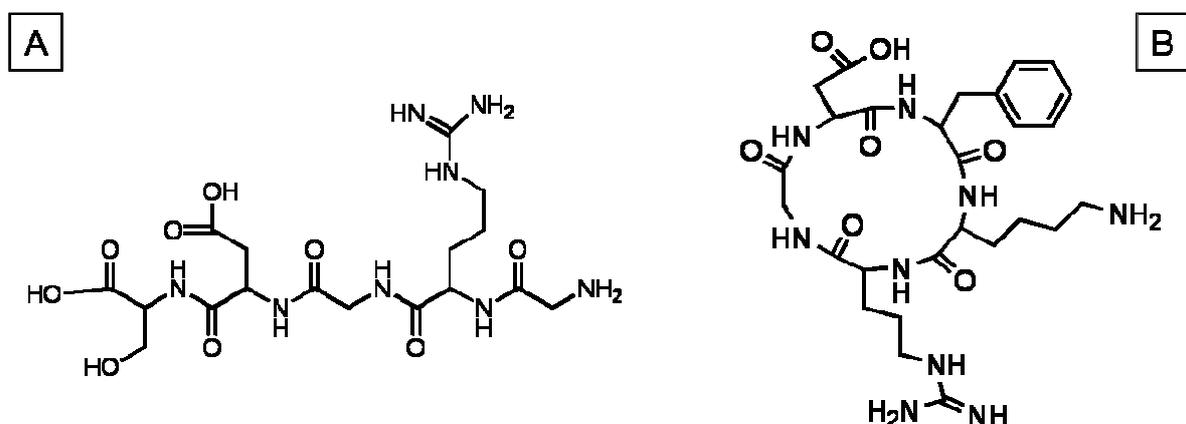


Abb. 49: G-RGD-S-Sequenzen. (A) lineares RGD (lin.RGD), (B) zyklisches RGD (-RGDfK-).

Für FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* bieten sich viele Möglichkeiten der Funktionalisierung mit RGD Sequenzen für *Targeting*experimente. Zunächst sollte zwischen der Funktionalisierung am polymerstabilisierten *SPIO* und der Funktionalisierung am Polymer unterschieden werden. Durch Festphasenpeptidsynthese gelang es, eine lineare RGD-Sequenz an die NH₂-Endfunktion des PEO-Blocks von FERR₁₁-*b*-PEO₃₀₀₀NH₂ zu koppeln. Das synthetisierte FERR₁₁-*b*-PEO₃₀₀₀NH-S-DGR-G wurde (1:3 (m/m)) mit FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ an die *SPIO* gebunden (vgl. Kapitel 4.4). Die so hergestellten Partikel wurden anschließend mit ⁶⁸Ga-DOTA markiert und die *Targetingeffizienz* am Maus-Tumormodell getestet (Institut für Radiopharmazie, TU München). Dazu wurden vier 10 – 12 Wochen alte Nacktmäuse, mit xenotransplantiertem, humanem M21-Melanom verwendet, auf dessen Oberfläche α_vβ₃ Integrin exprimiert ist. 2 Stunden nach der Injektion wurde im Tumor 1% Aktivität gemessen, jedoch 23% Aktivität in der Leber und 14% in der Milz (vgl. Abb. 50).

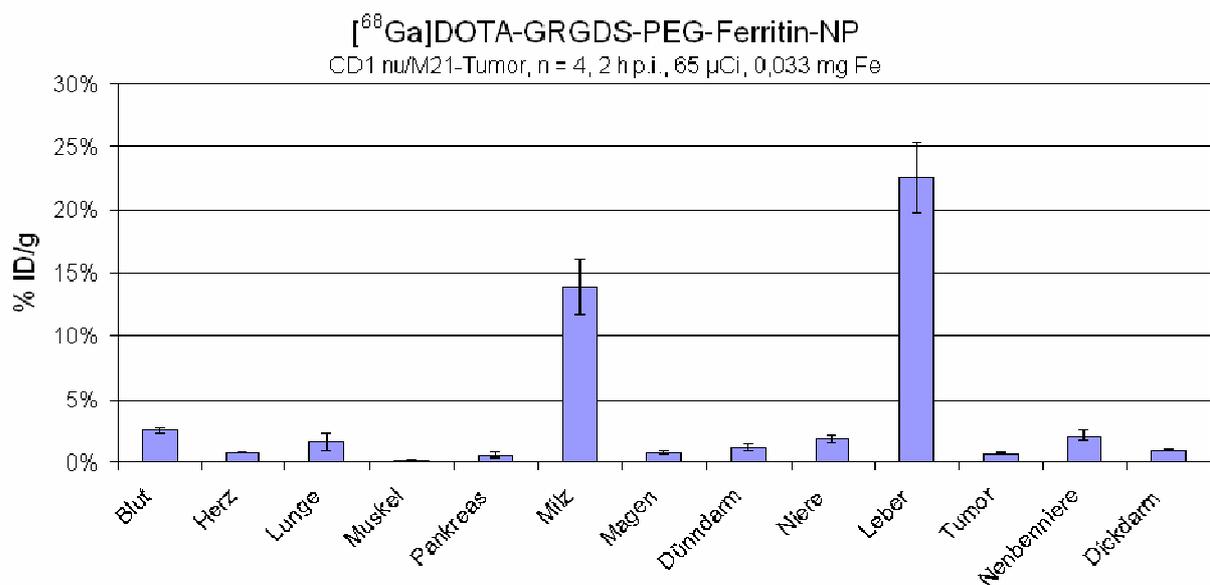


Abb. 50: Wiedergefundener Anteil der ⁶⁸Ga markierten *SPIO* in der Maus (% ID/g = Prozentualer Anteil der injizierten Dosis pro g Probenmaterial). Im Tumor findet man nur 1% der injizierten Dosis markierte *SPIO*, während sich der größte Teil in Leber (23%) und Milz (14%) wiederfindet.

Offensichtlich erfolgte eine rasche Oponisierung und Aufnahme in Makrophagen. Eine zu kurze Zirkulationszeit könnte der Grund für die fehlende Tumoranreicherung darstellen. Die markierten Partikel wurden in 0,9% NaCl Lösung injiziert. Da die Partikel in Kontakt mit Kochsalzlösung aggregieren, könnten größere Aggregate zu einer rascheren Oponisierung geführt haben. Ein neuer Versuch, in der z.B. mit isotonischer Sorbitollösung

nachgespült wird, könnte die Zirkulationszeit verlängern und zu einem erfolgreichen Tumortargeting führen. Auch die Kopplung des Galiumchelators an die Partikel kann die Partikelstabilität negativ beeinflusst haben. Obwohl das Ergebnis des aktiven Tumortargetings negativ ist, bleibt es interessant den Versuch unter Umgehung von stabilitätsbeeinflussenden Reaktionen zu wiederholen.

Eine weitere Möglichkeit FERR-*b*-PEOs noch an der Festphase mit cRGD zu funktionalisieren ist die kovalente Kopplung der geschützten Sequenz unter Verwendung von kurzen Linkermolekülen. Das oben abgebildete cRGD (-RGDfK-) (Abb. 49 (B)) wurde von der Abteilung Radiopharmazie der TU München zur Verfügung gestellt. Die Kupplung an SPIO und Polymer erfolgt durch Kopplung über PDIT (Phenyldiisothiocyanat) (Abb. 51).

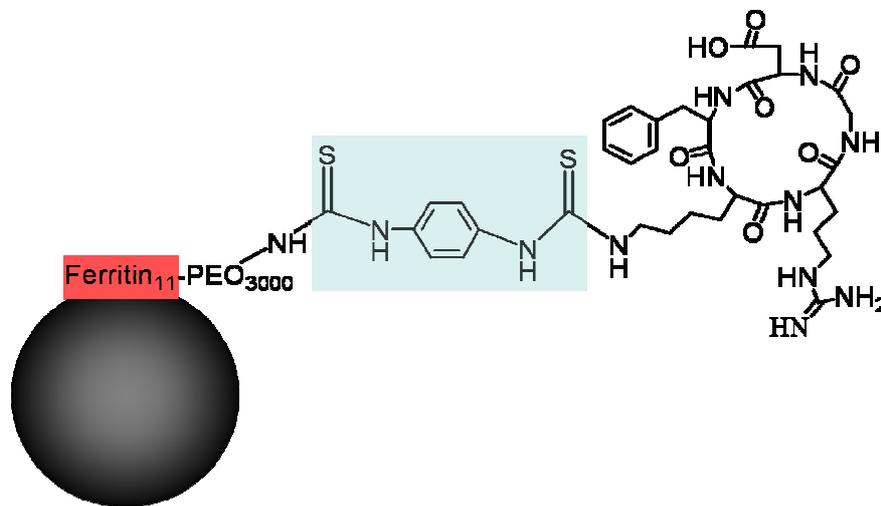


Abb. 51: Funktionalisierung mit cRGD durch PDIT (hellblau) erfolgte entweder noch an der Festphase gefolgt von Stabilisierung der SPIO, oder direkt am FERR-*b*-PEO stabilisierten SPIO.

Für die Funktionalisierung am Polymer wurde das noch nicht von der Festphase abgespaltene Polymer auf DCM/ DMF 4:1 umgespült, und 1 äq. cRGD in DCM/ DMF hinzugegeben. Nach 10 min Spülen mit Argon wurde 1 äq. PDIT in DCM/ DMF und unter katalytischem DIPEA-Zusatz weitere 20 min mit Argon durchspült. Das Gemisch wurde über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden über 6 h das Polymer und die Schutzgruppen mit 99% TFA und 1% TMSBr abgespalten. Die Aufreinigung des Polymers erfolgte durch mehrfaches Ausfällen in kaltem Ether, Gefriertrocknen, Lösen und erneutem Ausfällen. Zur Partikelstabilisierung wurde wie bei FERR₁₁-*b*-PEO₃₀₀₀NH-S-DGR-G beschrieben vorgegangen. Die Ergebnisse der in vivo-Verteilung stehen hier noch aus.

Die Polymerfunktionalisierung mit cRGD kann auch am polymerfunktionalisierten Partikel in Dispersion erfolgen. Hierzu wurden mit Ferritin₁₁-*b*-PEO₃₀₀₀NH₂ stabilisierten *SPIO* über eine Sephadexsäule auf DCM umgespült. Das Lösemittel wurde eingengt. PDIT in DCM/DMF 4:1 wurde zugesetzt und anschließend cRGD und DIPEA in DCM/DMF hinzugegeben. Die Umsetzung erfolgte über 72 h. Anschließend wurde wieder über eine Sephadexsäule auf Wasser umgespült und DCM-Reste abrotiert. Die cRGD funktionalisierten *SPIO* sind am Maus-Tumormodell zu testen.

6.5.2 *Schlussfolgerung*

Es wurden unterschiedliche Strategien der RGD Funktionalisierung der *SPIO* verfolgt. Jedoch konnte bis jetzt noch kein aktives *Targeting* am Maus-Tumormodell nachgewiesen werden. Eine Wiederholung des *in vivo-Targetings* bleibt interessant. Dabei sollte der Versuchsaufbau und die Analytik noch einmal auf Fehler überprüft werden. Hiermit könnte Aggregation, die eine rasche Aufnahme ins RES bewirkt, vermieden werden. Ein aktives *Targeting* kann direkt im MRT untersucht werden. In einem solchen Ansatz würde außerdem die möglicherweise störende Kopplungschemie für ⁶⁸Ga-DOTA entfallen. Auch die Kopplung von anderen Funktionalitäten, insbesondere für gefäßständige *Targets*, kann die Entwicklung von MRT-Kontrastmittelsystemen für eine spezifische und molekulare Bildgebung ermöglichen.

6.6 Zusammenfassung der *in vivo*-Versuche

FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* sind unter einer Dosis von ca. 0,5 mmol/ kg KG bei der Ratte verträglich. Eine Dosis $\geq 0,56$ mmol/ kg KG führte bei einer Ratte zum Tode. Die Partikel akkumulieren in gut durchbluteten Geweben und in Organen des RES. Im Innenohr, aber auch in Füßen und Schnauze zeigen sich deshalb graue Verfärbungen. Die Bluthalbwertszeit wurde durch MRT, und durch Blutabnahme und anschließende Analytik der Blutproben mit *ICP* und Relaxivitätsmessung bestimmt. Beide Methoden bringen sehr gut übereinstimmende Ergebnisse. Aufgrund der höheren Genauigkeit ist die pharmakologische Methode zu bevorzugen. Hierbei ergibt sich eine gemittelte Bluthalbwertszeit von 11,54 min (+/- 0,35). Für Partikel mit einem Durchmesser von 76 – 78 nm (*Z-average*, PDI 0,2) und einem Zetapotential von +/- 0 mV, war eine Bluthalbwertszeit in diesem Bereich zu erwarten. Die Leberhalbwertszeit wurde aus dem abfallenden MRT-Signal bestimmt und liegt

bei 7,4 Tagen. Diese Ergebnisse sind sehr gut und sprechen für eine Anwendung der Partikel in der spezifischen und molekularen Bildgebung für gefäßständige *Targets*.

Um das Potential der Partikel in der spezifischen Bildgebung zu testen, wurden auf unterschiedliche Arten RGD-*Targeting*sequenzen an die *SPIO* Partikel gekoppelt. Nach der Markierung mittels ^{68}Ga -DOTA wurde die Verteilung im Maustumormodell beobachtet. In einem ersten Experiment konnte keine Aktivität im Tumor, und damit kein aktives Tumortargeting nachgewiesen werden. Für weitere Experimente gilt es, mögliche Fehlerquellen zu vermeiden, die die Stabilität des Partikelkonstrukts gefährden. Eine direkte Untersuchung der *Targeting*effizienz im MRT, ist aufgrund der Einfachheit, geringer Stabilitätsbeeinflussung des Partikelkonstrukts und hoher Auflösung sehr interessant. Auch andere, gefäßständige *Targets* sollten für die spezifische Bildgebung untersucht werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuen Kontrastmittelsystems für MRT. Hierfür wurden einzelkristalline, monodisperse, 18 – 20 nm (d_{TEM}) große *SPIO* Partikel hergestellt. Dies gelang durch eine zweistufige Sol-Gel-Reaktion, bei der Eisen(III)acetylacetonat mit Benzylalkohol umgesetzt wird.

Diese ‚großen‘ *SPIO* Partikel, die kleiner als die ferromagnetische Domäne sind, vereinen gute magnetische Eigenschaften mit kolloidaler Stabilisierbarkeit. Durch ihr hohes magnetisches Moment verursachen sie dabei eine effektivere Verkürzung der T_2^* -Relaxationszeit im MRT, als etwa 4 – 10 nm kleine *SPIO* Partikel, die bis heute in den meisten Kontrastmitteln enthalten sind. Durch ‚große‘ *SPIO* wird zudem ein höheres Volumen Protonenspins beeinflusst. Dies ermöglicht einen guten Kontrast bei der Verabreichung von niedrigen Dosen des Kontrastmittels und damit einer geringeren Belastung des Patienten.

Durch Mössbauerspektroskopie konnte die Eisenoxidphase als nicht-stöchiometrisches Magnetit, einen Vertreter aus der Magnetit/Maghemit-Reihe identifiziert werden. Aufgrund der guten Biokompatibilität und der hohen Sättigungsmagnetisierung ist Magnetit die bevorzugte Eisenoxidphase für die Kontrastgebung.

Für eine Erfolg versprechende in vivo-Anwendung ‚großer‘ *SPIO* Partikel bedarf es einer stabilen, bioanwendbaren Nanosuspension, die eine für die Bildgebung und Bindung an *Targets* ausreichende Blutzirkulationszeit besitzt. Ohne zusätzliche Stabilisierung besitzen die Partikel ein Zetapotential von -21,9 mV und sind nur in Ethanol und basischen, wässrigen Medien suspendierbar. Für eine Bioanwendung wird jedoch ein Stabilisator benötigt.

Die Stabilisierung der Partikel auch im neutralen wässrigen Medium, bzw. unter in vitro- und in vivo-Bedingungen kann durch den Einsatz geeigneter Polymere gewährleistet werden. Bisher angewendete Polymere wie z.B. Dextrane sind jedoch nur eingeschränkt für medizinische Anwendungen geeignet, da sie u. a. schwere allergische Reaktionen hervorrufen können. In dieser Arbeit wurden daher für die Stabilisierung massgeschneiderte Blockcopolymere hergestellt.

Diese so genannten FERR-*b*-PEO Polymere kombinieren einen Peptidblock, der spezifisch an Eisenoxid bindet, und einen PEO-Block, der durch ‚*stealth*‘ Eigenschaften die Zirkulationszeit in der Blutbahn erhöht. Der Peptidblock, eine Eisenbindungssequenz des humanen *H*-Ketten Ferritins, wurde durch Festphasenpeptidsynthese direkt am PEO-Block synthetisiert. Dies führt zu hoch definierten Systemen, ein wichtiger Faktor für eine pharmazeutische Zulassung. FERR-*b*-PEOs konnte durch Festphasenpeptidsynthese in

verschiedenen Zusammensetzungen hergestellt werden. Identität, Reinheit und ‚enge‘ Größenverteilung, wurden durch *MALDI-ToF-MS*, $^1\text{H-NMR}$ und FT-IR nachgewiesen.

Das *Coating* von *SPIO* mit FERR-*b*-PEO erfolgte in Lösung und unter Einwirken von Ultraschall. Mittels Dialyse wurde die Partikelsuspension aufgereinigt und ins wässrige Medium überführt. Beim *Coating*-Prozess wirkt das FERR-Ankersegment wie ein Eisenkleber. Durch die Kombination von Aminosäuren unterschiedlicher Bindungspräferenz werden weiche, aber spezifische Wechselwirkungen mit der Eisenoxidoberflächen erzeugt. Der kovalent an das FERR-Segment gebundene PEO-Block fungiert als sterischer und hydrophiler ‚*stealth*‘ Stabilisator. Durch diese Beschichtung der *SPIO* Partikel mit FERR-*b*-PEOs konnten langzeitstabile und reproduzierbare Nanosuspensionen in wässrigem Medium hergestellt werden. FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ stabilisierte Partikel zeigten die besten kolloidalen und magnetischen Eigenschaften und wurden deshalb als Standardpolymer für weitere Untersuchungen verwendet.

Die erfolgreiche Stabilisierung der *SPIO* zeigt sich zunächst in einer Größenzunahme des Durchmessers auf 76 – 78 nm (d_{H} *z-average*). Darüberhinaus führt die erfolgreiche PEO-Beschichtung zu einer Abschirmung der Oberflächenladungen, wie die Erhöhung des Zetapotentials der Partikel auf +/-0 mV zeigt. Durch dieses ‚*stealth*‘ *Coating* und die kleine Partikelgröße ist auch eine ausreichend lange Zirkulationszeit der Partikel für die spezifische Bildgebung nach Bindung an vaskuläre *Targets* zu erwarten.

SQUID- und EPR-Messungen zeigen, dass sich die stabilisierten Partikel bei Raumtemperatur superparamagnetisch verhalten. Durch ihre hohe Sättigungsmagnetisierung von 94 emu/ g sind sie optimal für eine Anwendung als Kontrastmittel geeignet, da hier ein ausgeprägter T_2^* -Effekt zu erwarten ist. Das gute Kontrastgebungspotential konnte weitergehen durch Bestimmung der NMR-Relaxivitäten bestätigt werden. Diese wurden bei 1,41 T, 37°C und 0,015 - 0,27 mmol Eisen gemessen. Sie sind mit $r_1 = 11,21 \text{ L/ mmol*s}$, $r_2 = 242,15 \text{ L/ mmol*s}$ und $r_2/r_1 = 21,7$ gut vergleichbar mit den Relaxivitäten des etablierten Kontrastmittels Resovist®.

Während der Lagerung der Partikel in wässrigem Milieu findet eine Oxidation der äußersten Magnetitschicht statt. Diese dünne, magnetisch inaktive Goethit-Schicht konnte durch HT-EPR nachgewiesen und identifiziert werden. Die Mössbauerspektroskopie, welche die Eisenoxidphase als nicht-stöchiometrisches Magnetit identifizierte, sowie die hohen Sättigungsmagnetisierungen aus den *SQUID*-Messungen und die guten NMR-Relaxivitäten verdeutlichen weiter, dass die nicht-magnetische Goethitschicht nur sehr dünn ist. Der eigentliche, magnetisch aktive Kern der *SPIO* konnte durch *Fluxgate*-Messungen bestimmt

werden und besitzt einen Durchmesser von $d_M = 9$ nm. Der magnetische Durchmesser d_M liegt deutlich unter den, durch andere Methoden ermittelten Durchmessern wie d_{TEM} (18 – 20 nm) und d_{XRD} (14 nm), und lässt sich durch die magnetisch inaktive Goethitschicht, aber auch durch die unterschiedlichen Wertungen der Messmethoden erklären.

Eine erste erfolgreiche Anwendung in der Bildgebung gelang durch NMR-*Imaging* Experimente. Die *gecoateten SPIO* erzeugen ein starkes Artefakt, das gut vergleichbar mit den Daten des kommerziellen Produkts (Resovist[®]) ist. Die Relaxationszeiten der umgebenden Protonenspins wurden durch die *SPIO* im Vergleich zu reinem Wasser deutlich verkürzt, ohne dass ein direkter Kontakt stattgefunden hat.

FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* verkürzen also effektiv T_2^* und sind deshalb optimal als Kontrastmittelsystem einzusetzen. Die guten magnetischen Eigenschaften und eine hohe Eisenkonzentration von 14–16 mg/ml Nanosuspension ermöglichen die Applikation niedrigen Kontrastmittelvolumina.

Durch in vivo-Versuche konnte das synthetisierte Kontrastmittelsystem weitergehend untersucht werden. Im MRT ist die Kontrastwirkung deutlich zu beobachten. FERR-*b*-PEO stabilisierte *SPIO* Partikel sind unter einer Dosis von ca. 0,5 mmol/kg KG bei der Ratte verträglich. Die Partikel akkumulieren in gut durchbluteten Geweben und in Organen des RES. Im Innenohr, aber auch in Füßen und Schnauze zeigen sich graue Verfärbungen durch Akkumulation von *SPIO*.

Durch MRT und Blutabnahme wurde die Bluthalbwertszeit der Partikel bestimmt, die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden stimmen gut überein und es konnte eine Bluthalbwertszeit von 11,5 min ermittelt werden. Ein Wert in diesem Bereich war zu erwarten und ist mit Literaturdaten gut vergleichbar. Die Leberhalbwertszeit, die angibt wie schnell das Kontrastmittel eliminiert wird, wurde über MRT bestimmt und beträgt 7,4 Tagen. Diese Ergebnisse sind sehr gut und sprechen für eine Anwendung der Partikel in der spezifischen und molekularen Bildgebung nach Bindung an gefäßständige *Targets*.

Für eine Anwendung der stabilisierten Partikel in der spezifischen Bildgebung müssen zusätzliche *Targeting*funktionalitäten eingeführt werden. Die Verwendung von Festphasensynthese zur Herstellung der Stabilisatoren ermöglicht dabei das Einfügen weiterer Peptidstrukturen wie RGD-Sequenzen, die dann als *Targeting*funktionalität dienen können. Nach der zusätzlichen Markierung der RGD-funktionalisierten Partikel mit ⁶⁸Ga-DOTA wurde die Verteilung im Maustumormodell untersucht. In einem ersten Experiment konnte zunächst keine Radioaktivität im Tumor, und damit kein aktives Tumortargeting nachgewiesen werden. Für weitere Versuche sollten die Partikel, ohne die möglicherweise zu

Instabilitäten führende Radioaktivmarkierung, im MRT als direkter Versuch einer spezifischen Tumordarstellung untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit entwickelten ‚großen‘, FERR-*b*-PEO stabilisierten *SPIO* Partikel ein effektives und vielfältig einsetzbares Kontrastmittelsystem für MRT darstellen. Durch die weitergehende Funktionalisierbarkeit, sind die Partikel auch für die spezifische und molekulare Bildgebung von vaskulären *Targets* interessant. Dies gilt es in der Zukunft noch weiter zu untersuchen.

Als interessanter Versuch sei auch die weitere Vergrößerung der PEO-Blocks, oder das Einführen von verzweigtem PEO erwähnt. Hierdurch könnte die Zirkulationszeit sogar noch weiter erhöht werden und auch gewebeständige *Targets* spezifisch dargestellt werden. Da jedoch die chemische Zugänglichkeit der Polymerendfunktionalitäten mit der Größe des Polymerblocks abnimmt ist hier eine geringere Funktionalisierungseffizienz zu erwarten.

Auch eine Anwendung der Partikel als magnetisches *Drug Delivery*- und *Gene Delivery*-System ist möglich. Hierzu ist ein Austausch des PEO-Blocks gegen ein den Anforderungen entsprechendes Polymer, z.B. Polyethylenimin (PEI), denkbar. So ergeben sich aus dem Baukastensystem FERR-*b*-(PEO/X) stabilisierte *SPIO* interessante, neue Möglichkeiten für Medizin und Pharmazie. Aufgrund des großen Eisenoxidkerns FERR-*b*-PEO sollten stabilisierte *SPIO* auch hinsichtlich ihrer Hyperthermiewirkung untersucht werden.

8 Anhang

8.1 Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO)

8.1.1 Kleine Ansätze

0,5 g Eisen(III)acetylacetonat ($\text{Fe}(\text{AcAc})_3$, Sigma Aldrich, 97%) wurden mit 20 ml Benzylalkohol (Benzylalkohol, Reagent Plus™ $\geq 99\%$) gemischt und in einen Tefloneinsatz (inneres Volumen 45 ml) gegeben. Der Tefloneinsatz wurde in einem Stahlautoklaven (Parr) sorgfältig verschlossen. Der Autoklav wurde 2 Tage in einem Heizschrank auf 200°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die schwarze Eisenoxidsuspension mehrfach mit THF (Fluka) gewaschen. Am Ende wurde der THF-Überstand abzentrifugiert und die Partikel in Ethanol (mit 1% Petrolether vergällt) suspendiert.

Die 8 – 12 nm großen Eisenoxidpartikel aus dem ersten Reaktionsschritt wurden im Folgenden als Vorstufe/ Precursor zur Herstellung von ca. 20 nm großen Eisenoxidpartikeln verwendet. Ein Volumen, das 0,05 g Partikeln entspricht wurde mit 5 ml Benzylalkohol gemischt und in einen Rundkolben überführt. Ethanol wurde 30 min bei 40°C und 100 mbar abrotiert und der Rückstand nach Abkühlen, mit 0,5 g $\text{Fe}(\text{AcAc})_3$ und 15 ml Benzylalkohol vermischt, in einen Tefloneinsatz gefüllt und im geschlossenen Stahlautoklav 2 Tage auf 200°C erhitzt. Nach mehrfachem Waschen in THF wurden die ‚großen‘ Partikel in vergälltem Ethanol stabilisiert gelagert. Die Ausbeute beträgt ~25%.

8.1.2 Große Ansätze

Große Ansätze wurden in einem 1000 ml Stahlautoklaven mit Rührwerk und externer Heizvorrichtung hergestellt (Parr, USA). Der Tefloneinsatz wurde mit dem maximalem Volumen von 500 ml befüllt. Die Synthese erfolgt ebenfalls in zwei Schritten. Die Edukte wurden in, den kleinen Ansätzen entsprechenden Mengen, eingesetzt. Der sorgfältig geschlossene Autoklav wurde in eine Heizvorrichtung gestellt und unter Rühren einen Tag auf 200°C (max. +/-10°C) erhitzt. Die Reaktionszeit wurde verkürzt, da sich Partikel nach nur einem Tag Reaktionszeit besser stabilisieren ließen, als Partikel nach zwei Tagen Reaktionszeit im großen Autoklaven. Nach dem Abkühlen wurde mehrfach mit THF gewaschen. Für die Weiterverarbeitung wurden die Partikel in Ethanol suspendiert. Die Ausbeute beträgt ~25%.

8.2 Synthese von FERR-*b*-PEO

Die Synthese der Polymere erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese an einem *Peptide Synthesizer* ABI 433a der Firma Applied Biosystems, Darmstadt. Als Festphase wurde *Tentagel*[®] PAP Harz (0,22 mmol/g; 0,25 mmol Ansatz) (Rapp Polymere GmbH, Tübingen) verwendet. Der *Synthesizer* wurde mit den benötigten Reagenzien beladen. Ein Peptidblock mit nativen Amidbindungen entstand unter Verwendung von *Fastmoc ABI* Standard-Syntheseprotokollen. HBTU/ DIPEA/ NMP Chemie vereinfachte die Kupplung von Fmoc geschützten Aminosäuren. Die Abspaltung des gewünschten Produkts von der Festphase und Entschützung des Peptidblocks erzielten wir durch sechsstündige Behandlung mit Abspaltungslösung (TFA 99%, TMSBr 1%). Anschließend wurde das Polymer in Diethylether ausgefällt, zentrifugiert, in Methanol dialysiert (*MWCO* = 1000 Da), vakuumgetrocknet, in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug ca. 80%.

8.2.1 Synthese von funktionalisiertem Polymer FERR-*b*-PEO-NH₂

Für die Synthese von FERR-*b*-PEO-NH₂ wurde zunächst ein Chlortritylharz (Iris Biotech) mit Glycin beladen. Die theoretische Beladung betrug 1,48 mmol aktive Gruppen/ g Harz. Dafür wurde das Harz in einen ausgeheizten 100 ml Schlenkkolben gegeben und in trockenem DCM 15 min gequollen. Anschließend wurde das in ca. 30 ml trockenem DCM gelöste Fmoc-Gly-OH (Iris Biotech) und ca. 0,75 äq. DIPEA hinzugegeben. Der Kolben wurde 1,5 Stunden auf dem Schüttler bewegt. Das Reaktionsgemisch färbte sich violett. Die Kupplungsreagenzien wurden abgesaugt und das Harz wurde mit DCM gewaschen. Hydrolyse der noch nicht umgesetzten, reaktiven Gruppen am Harz erfolgte 2h lang mit 50 ml *Cappinglösung* (*Cappinglösung* 100 ml: 80 ml trockenes DCM, 15 ml Methanol, 5 ml DIPEA). Die übrige Lösung wurde zum Spülen verwendet. Das Harz wurde mit DCM, DMF und erneut mit DCM gewaschen und getrocknet. Die Beladung wurde durch Kupplung mit Fmoc-Phe-OH (Iris Biotech) überprüft. Die tatsächliche Beladung betrug 0,12 mmol/ g. Die gewünschte Aminosäuresequenz wurde an einem *Peptidsynthesizer* ABI 433a, Applied Biosystems aufgebaut. Als Festphase wurde das zuvor beschriebene, Glycin-beladene Chlortritylharz verwendet (0,1 mmol Ansatz). Der *Synthesizer* wurde mit den benötigten Reagenzien beladen. Ein Peptidblock mit nativen Amidbindungen entstand unter Verwendung von *Fastmoc ABI* Standard-Syntheseprotokollen. HBTU/ DIPEA/ NMP Chemie vereinfachte die Kupplung von Fmoc geschützten Aminosäuren. Anschließend wurden Fmoc-NH-PEO₃₀₀₀-COOH (Iris Biotech) in 2 Schritten per Hand gekuppelt. Dafür wurde das

Harz in einen Wasserpfeifenreaktor überführt und mit DMF gewaschen. 1,6 äq. Fmoc-NH-PEO₃₀₀₀-COOH, PyAop, HoAt und 3,2 äq. DIPEA wurden in wenig DMF gelöst und zusammengegeben. Im Stickstoffgegenstrom wurden die Reagenzien auf das Harz gegeben und mit einem Septum verschlossen. Bei einem Ansatz von 0,058 mmol/ g wurde 3 Tage lang gekuppelt. Das Harz wurde gründlich mit DMF gewaschen und es erfolgte eine 2. Kupplung mit 2,5 äq. Fmoc-NH-PEO₃₀₀₀-COOH, PyAop, HoAt und 5 äq. DIPEA. Dazu wurden erneut die Reagenzien in DMF gelöst, zusammengegeben, und unter Stickstoffstrom auf das Harz gegeben. Die Kupplung erfolgte 3 Tage lang. Ein kolorimetrischer Kaisertest überprüfte die komplette Umsetzung der PEO-Kupplung [64]. Nach Beenden der Kupplung wurde das Harz erneut mit DMF gewaschen und in einen Synthesizerreaktor überführt. Die Fmoc-Schutzgruppen wurden abgespalten und das Harz mit NMP und DCM gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Harz 2x 5 min mit 2% TFA in DCM abgespalten. Das Absaugen erfolgte in Dioxan. Nach dem Abrotieren wurde das Produkt in Diethylether ausgefällt und getrocknet. Es wurde mit Methanol/Wasser gelöst und nach Dialyse (MWCO 2000) gegen Wasser gefriergetrocknet. Ausbeute: 50%

8.2.2 Analytik von FERR-*b*-PEO

8.2.2.1.1 Analytik von FERR₆-*b*-PEO₃₂₀₀

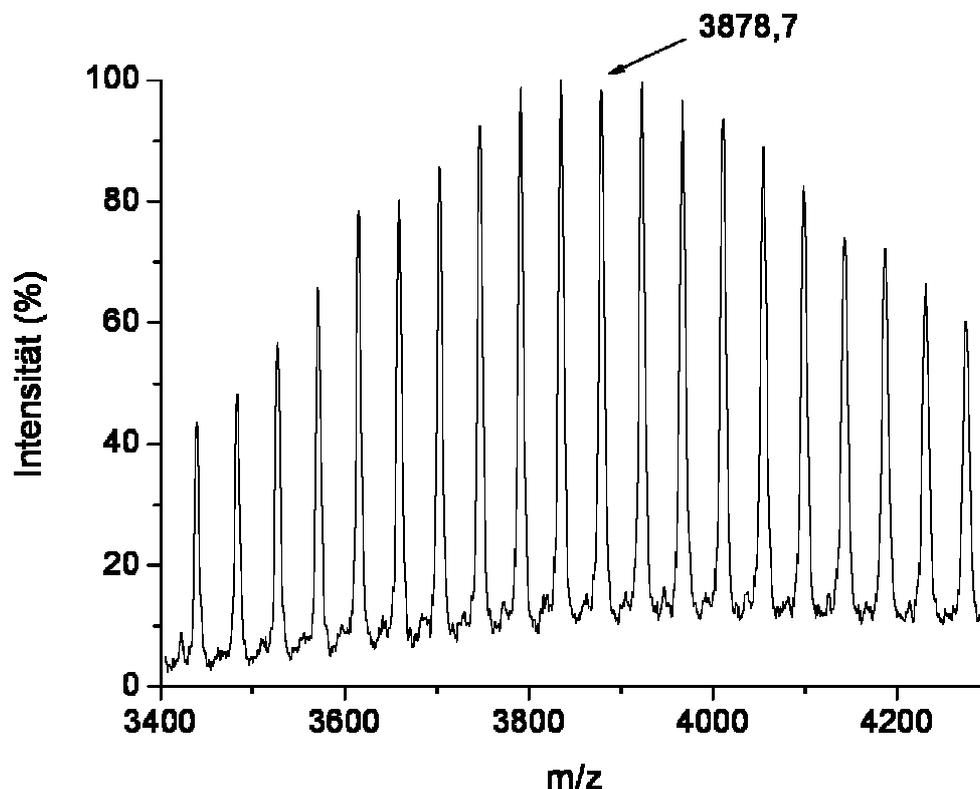


Abb. 52: MALDI-ToF-MS von FERR₆-*b*-PEO₃₂₀₀

MALDI-ToF-MS: $m/z = 3878,7$ Da [(M(Peptid) + M(68x Ethylenoxid) + M(K⁺))] EO 44,05.

¹H-NMR (DMSO, RT, δ in ppm: 1,4 – 1,6 (4 H, γ -CH₂-Amid (R), β -CH₂-Amid (R)), 1,6 – 2 (6H, β -CH₂-Amid (E)), 2,2 – 2,35 (6H, γ -CH₂-Amid (E)), 2,49 DMSO, 2,9 – 3,15 (4H, Amid (R), α -CH₂-Aromat (H, F)), 3,45 – 3,6 (298 H, O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂), 4,2 – 4,6 (5H, α -CH-Amid (E,R)), 7,15 – 7,3 (6 H, H-Ar (H,F)), 8,05 – 8,2 (6 H, NH-Amid).

FT-IR: (ν in cm⁻¹) 1104 (ν_s , C-O, Ether), 1534 (ν , C-N und δ , C-N-H, Amid II), 1628 (C=O Amid I), 1669 (ν_s , C=O Amid I), 2883 (ν_s , C-H, Ether).

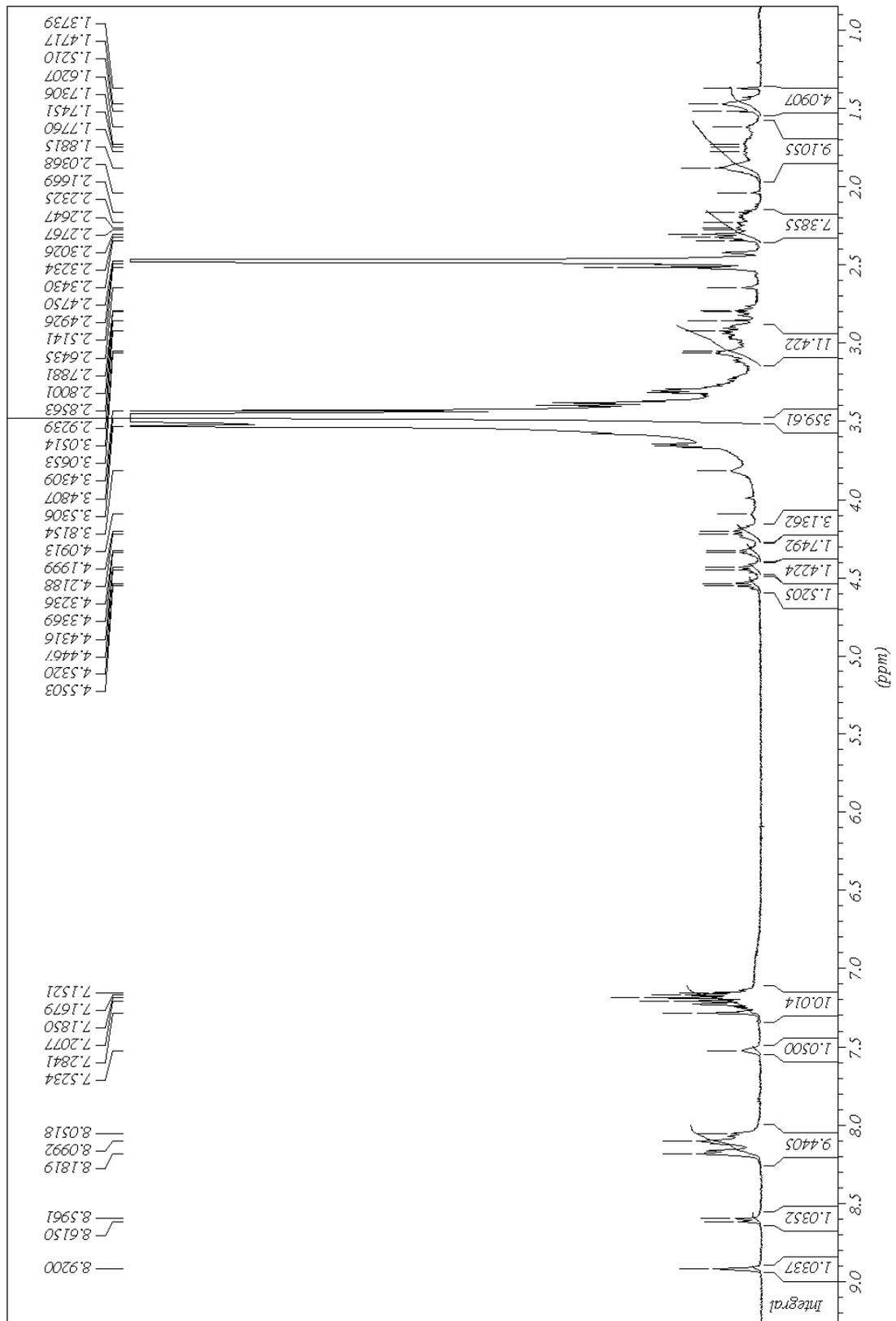


Abb. 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{FERR}_6\text{-}b\text{-PEO}_{3200}$ gemessen in DMSO bei Raumtemperatur

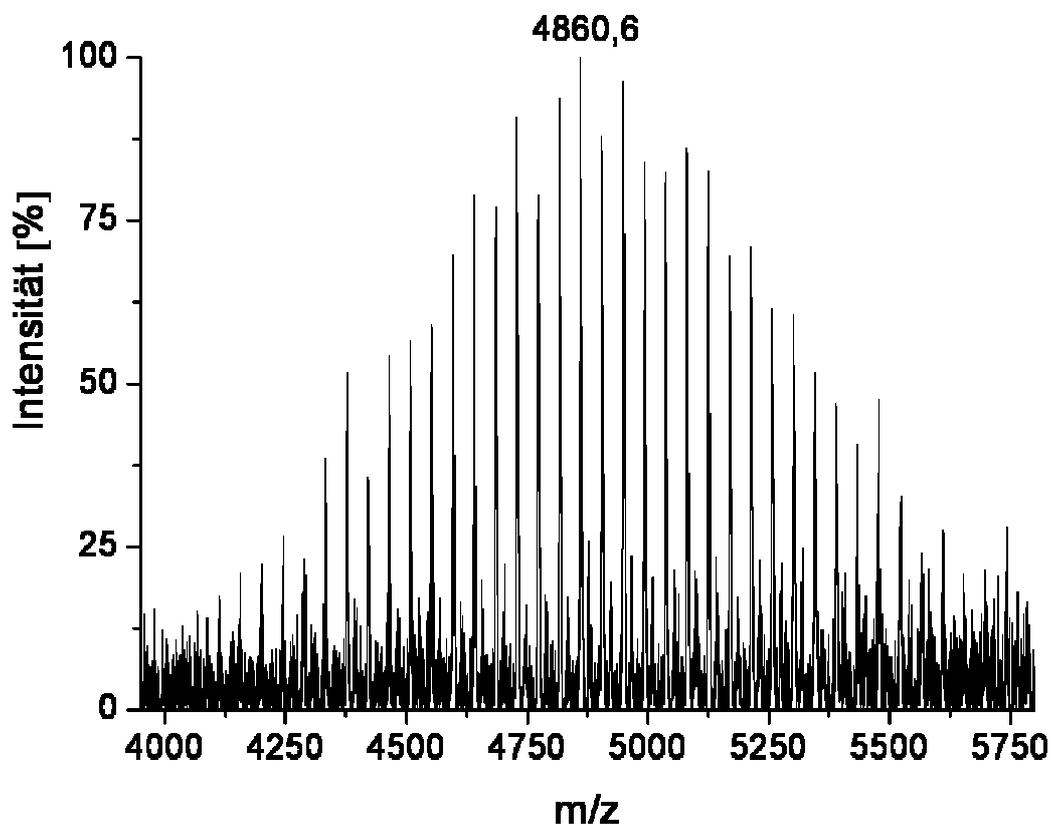
8.2.2.1.2 Analytik von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀

Abb. 54: MALDI-ToF-MS von FERR₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀.

MALDI-ToF-MS: $m/z = 4860,6$ Da , M = PEO76-*block*-F-E-A-H-E-R-E-E-H-S-Q + TFA

¹H-NMR (DMSO, RT, δ in ppm): 1,1 – 1,25 (3 H, CH₃ (A)), 1,4 – 2,35 (14 H, β -CH₂-Amid (R), γ -CH₂-Amid (R), β -CH₂-Amid (E), β -CH₂-Amid (Q), γ -CH₂-Amid (Q), γ -CH₂-Amid (E)), 2,49 DMSO, 2,6 – 3,4 (δ -CH₂-Amid (R), α -CH₂-Aromat (H, F), H₂O), 3,45 – 3,6 (280 H, O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂), 3,75 – 4,0 (2H, β -CH₂-Amid (S)) 4,18 – 4,7 (11 H, α -CH-Amide), 7,15 – 7,49 (9 H, H-Ar), 7,5 – 8,95 (11 H, NH-Amid) ppm.

FT-IR (ν in cm⁻¹): 1103 (ν_s , C-O, Ether), 1541 (ν , C-N und δ , C-N-H, Amid II), 1625 (ν , C-O Amid I), 1668 (ν_s , C-O Amid I), 2882 (ν_s , C-H, Ether).

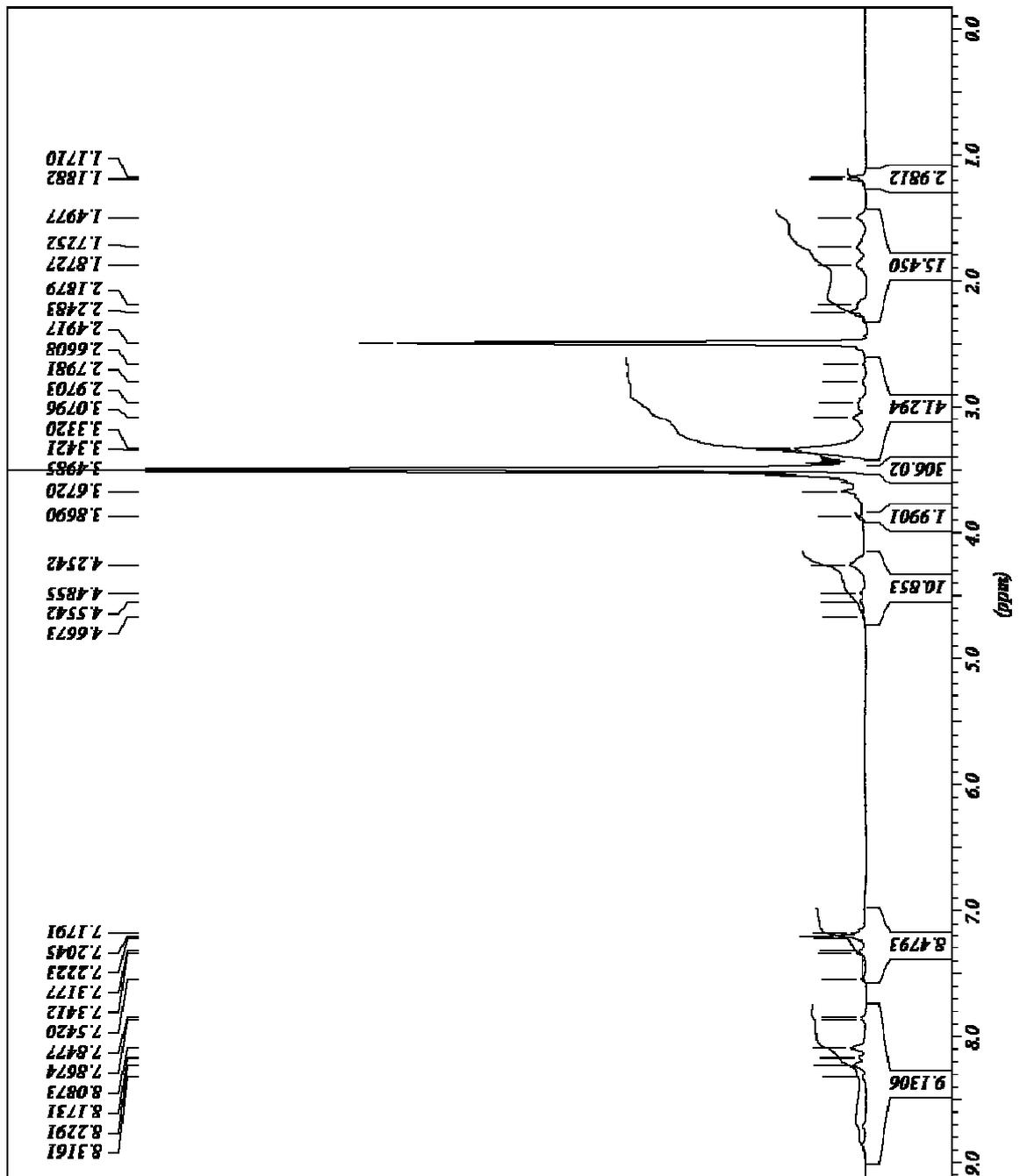


Abb. 55: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Ferritin₁₁-*b*-PEO₃₂₀₀ gemessen in DMSO bei Raumtemperatur

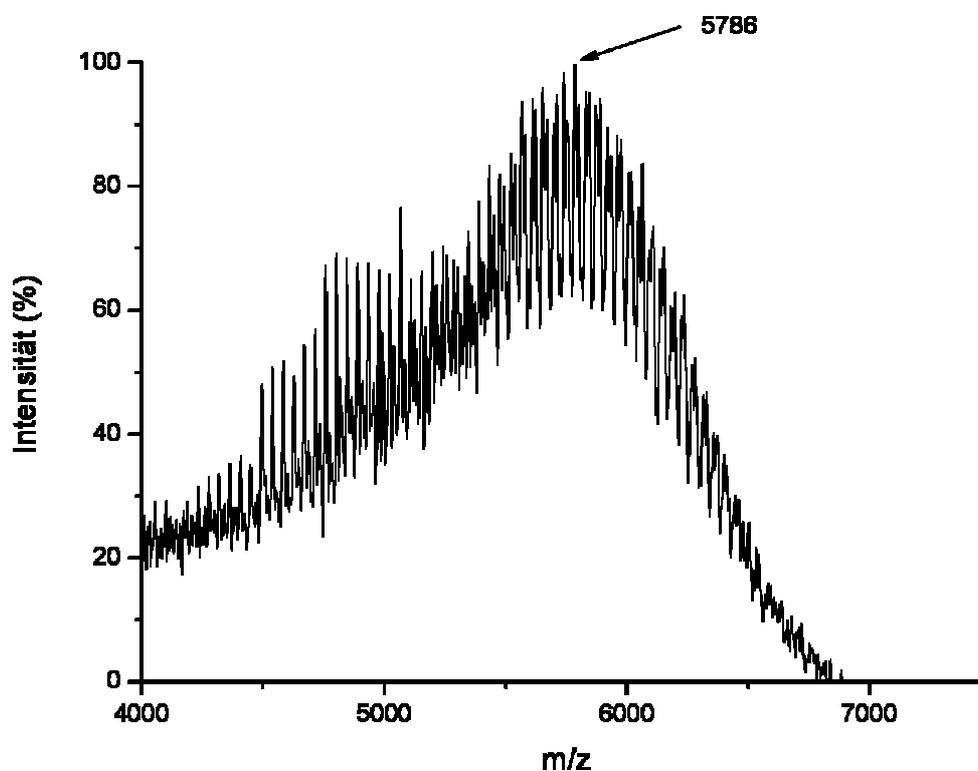
8.2.2.1.3 Analytik von FERR₁₇-*b*-PEO₃₂₀₀

Abb. 56: MALDI-ToF-MS von FERR₁₇-*b*-PEO₃₂₀₀

MALDI-ToF-MS: $m/z = 5786$ Da [(M(Peptid) + M(81 x Ethylenoxid) + M(H⁺))] EO 43,9

¹H-NMR (DMSO, RT, δ in ppm): 0,7 – 0,9 (3 H, γ -CH₃ (V)), 0,9 – 2,4 (47 H, γ -CH₂-Amid (K), CH₃ (A), δ -CH₂-Amid (K), β -CH₂-Amid (V), γ -CH-Amid (V), β -CH₂-Amid (E), β -CH₂-Amid (Q), CH₃ (M), β -CH₂-Amid (M), γ -CH₂-Amid (Q), γ -CH₂-Amid (E), γ -CH₂-Amid (M)), 2,49 DMSO, 2,65 – 2,8 (6H, δ -CH₂-Amid (R), ϵ -CH₂-Amid (K)), 3,1 – 3,25 (6H, β -CH₂-Amid (H)), 3,4 – 3,6 (423 H, O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂), 4,1 – 4,3 (18 H, β -CH₂-Amid (H), α -CH-Amid (V, Q, E, R, K, M), 6,7 – 6,9 (3 H, CH-Ar (H)), 7,2 – 7,4 (3 H, CH-Ar (H)), 7,5 – 8,2 (18 H, NH-Amid).

FT-IR (ν in cm⁻¹): 1103 (ν_s , C-O, Ether), 1541 (ν , C-N und δ , C-N-H, Amid II), 2881 (ν_s , C-H, Ether).

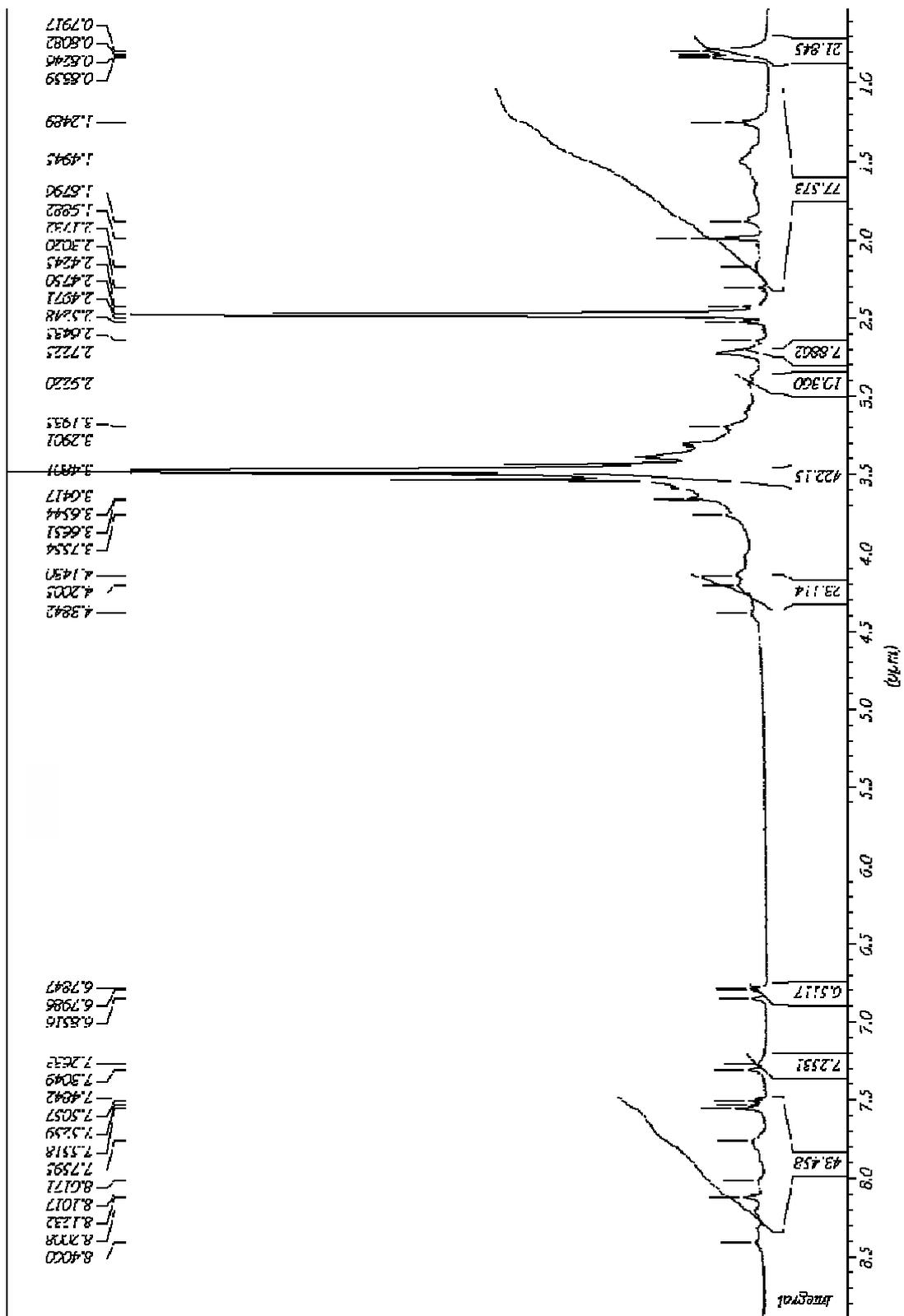


Abb. 57: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{FERR}_{17}\text{-}b\text{-PEO}_{3200}$ gemessen in DMSO bei Raumtemperatur

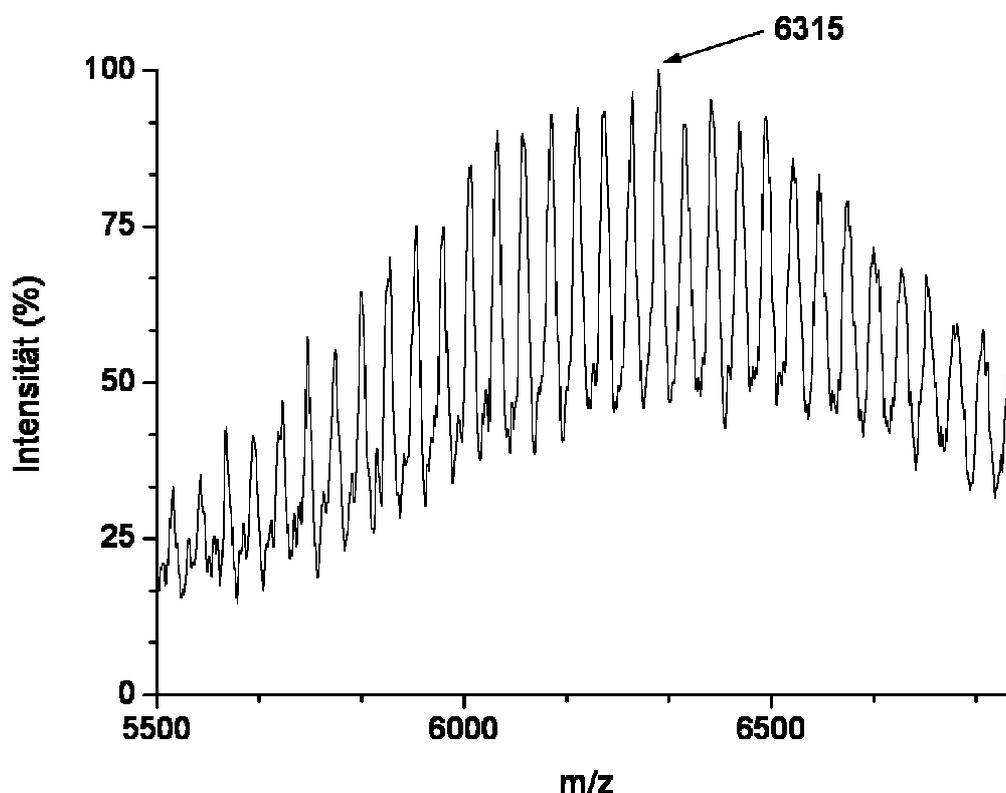
8.2.2.1.4 Analytik von FERR₁₁-*b*-PEO₅₀₀₀

Abb. 58: MALDI-ToF-MS von FERR₁₁-*b*-PEO₅₀₀₀

MALDI-ToF-MS: $m/z = 6315$ Da [(M(Peptid 1444,64) + M(110 x Ethylenoxid) + M (Na⁺)]
EO 44,07.

¹H-NMR (DMSO, RT, δ in ppm): 0,6 – 1,6 (7 H, CH₃ (A), β -CH₂-Amid (R), γ -CH₂-Amid (R)), 1,7 – 2 (10 H, β -CH₂-Amid (E), β -CH₂-Amid (Q)), 2,0 – 2,4 (γ -CH₂-Amid (Q), γ -CH₂-Amid (E)), 2,49 DMSO, 2,6 – 2,7 (2 H, δ -CH₂-Amid (R)), 2,8 – 3,0 (4 H, α -CH₂-Aromat (H, F)), 3,4 – 3,6 (449 H, O-CH₂-CH₂, O-CH₂-CH₂), 4,2 – 4,5 (12 H, β -CH₂-Amid (S), α -CH₂-Amide (E, R, S, A, H, F)), 6,8 – 7,3 (9 H, H-Ar (H, F)), 7,5 – 8,6 (11 H, NH-Amid).

FT-IR (ν in cm⁻¹): 1100 (ν_s , C-O, Ether), 1539 (ν , C-N und δ , C-N-H, Amid II), 1626 (ν , C-O Amid I), 1664 (ν_s , C-O Amid I), 2883 (ν_s , C-H, Ether).

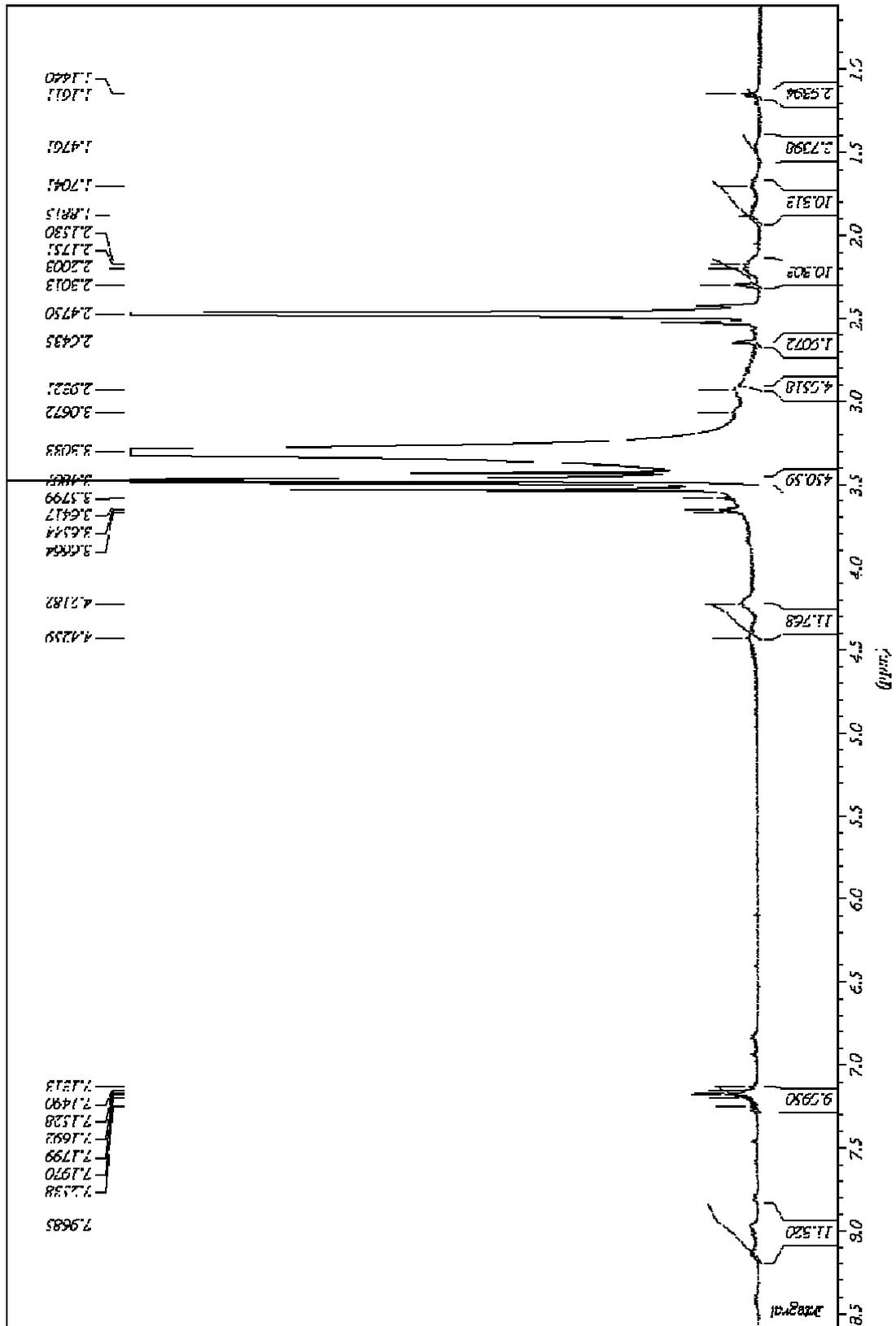


Abb. 59: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FERR₁₁-b-PEO₅₀₀₀ gemessen in DMSO bei Raumtemperatur

8.2.3 *Synthese von FERR-b-PEO stabilisierten SPIO*

Die Synthese der Polymerstabilisierten Nanopartikel erfolgte in Lösung unter Einwirken von Ultraschall. 25 % (m/ m Eisenoxidpartikel) Polymer wurde zum Stabilisieren verwendet. Das Polymer wurde in einem kleinen Volumen Ethanol aufgelöst. Die Eisenoxidnanopartikel in Ethanol wurden unter Eiskühlung 2x 30 s mit einem Ultraschallmikrofoner ($\varnothing = 2$ mm) (Branson *Digital Sonifier* W-450 D) behandelt um mögliche Aggregate zu zerstören. Unmittelbar nach der Ultraschallbehandlung wurde das gelöste Polymer in die Partikelsuspension gespritzt. Die Ultraschallbehandlung wurde wiederholt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in einen Dialyseschlauch aus rekombinanter Zellulose (MWCO 6 – 8000) überführt und das Lösemittel Ethanol wurde innerhalb von 3 Tagen vollständig gegen gereinigtes Wasser ausgetauscht. Gleichzeitig wurde nicht gebundenes Polymer entfernt.

8.2.4 *Synthese von FERR-b-PEO-NH₂ stabilisierten SPIO*

Die Synthese erfolgte analog zu 8.2.3. Zur Stabilisierung wurden 25% Polymer wurden eingesetzt. Dafür wurde eine Mischung von 8% FERR₁₁-b-PEO₃₂₀₀-NH₂ und 17% FERR₁₁-b-PEO₃₂₀₀ jeweils in einem kleinen Volumen Ethanol gelöst, gemischt und zur ultraschallbehandelten Partikelsuspension gegeben.

8.3 In vivo-Experimente

Die in vivo-Versuche wurden gemäß der geltenden Tierschutzvorschriften durchgeführt. Alle Versuche wurden im Rahmen einer Kooperation bei Bayer-Schering Pharma, Berlin durchgeführt. Für alle Versuche wurden weibliche Ratten (Wistar Han Ch. R.) eines Gewichts von ca. 250 g eingesetzt.

8.3.1 *Verträglichkeitsexperiment*

8.3.1.1 Probenvorbereitung

Verdünnung der Proben: 2,022 ml Probe ‚3000‘ (ICP: 196,7 mmol Fe/ L) wird mit 0,978 ml 5,48% Sorbitol in Wasser, steril gefiltert verdünnt. Die Ratten wurden in einer Narkosekammer mit Isofluran narkotisiert. Über eine Flügelkanüle wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Katheter in die Schwanzvene gebracht. Die NaCl-

Lösung wurde durch Einspritzen von ca. 0,5 ml Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa, Fresenius Kabi) aus dem Schlauch entfernt. 1 ml *SPIO* wurden zügig eingespritzt und mit ca. 0,5 ml Ampuwa nachgespült. Der Zugang zur Schwanzvene wurde entfernt. Eine Übersicht über Tiere und verabreichte Dosis ist in Tab. 4 gegeben.

	Ratte 14	Ratte 15	Ratte 16
Gewicht (g)	237	245	236
Appl. Volumen (ml)	1 ml	1 ml	1 ml
Appl. Dosis	133 μmol	133 μmol	133 μmol
Dosis/ kg KG	559 μmol/ kg KG	541 μmol/ kg KG	562 μmol/ kg KG
Reaktion	Gute Verträglichkeit	Gute Verträglichkeit	Nach 1d gestorben

Tab. 4: Verträglichkeitsexperiment

8.3.2 *Bluthalbwertszeit (MRT)*

8.3.2.1 **Probenvorbereitung**

Verdünnung der Proben: 120 μ l Probe ‚m‘ (ICP: 15186 mmol Fe/ L)+ 180 μ l 5,48% Sorbitol in Wasser, sterilgefiltriert. Die Ratten wurden in einer Narkosekammer mit Isofluran narkosiert. Über eine Flügelkanüle wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Katheter in die Schwanzvene gelegt. Die Ratte wurde im MRT fixiert um Atemungsartefakte zu reduzieren. Es wurde zunächst eine Messung vor Kontrastmittelgabe durchgeführt. Die Bildregionen von Aorta, Niere und Leber wurden genauer untersucht. Anschließend wurde die NaCl-Lösung durch Einspritzen von ca 0,5 ml Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa, Fresenius Kabi) aus dem Schlauch entfernt. 0,2 ml der in Sorbitol/ Wasser (entsprechend einer Dosis von ca. 3 μ mol; bzw. 11,7 – 13,4 μ mol/ kg KG) verdünnten Probe wurden zügig eingespritzt und mit ca. 1 ml Ampuwa nachgespült. Simultan wurde die MR Messung gestartet. Während dem gesamten Messzeitraum erfolgte eine Narkose durch 1,8% Isofluran in Sauerstoff über die Atemluft. Eine Übersicht über Dosis und Versuchstiere gibt Tab. 5.

	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Gewicht (g)	260 (nach Injektion)	257	227
Konz. Fe in Probe	15186 $\mu\text{mol}/\text{l}$	15186 $\mu\text{mol}/\text{l}$	15186 $\mu\text{mol}/\text{l}$
Appl. Volumen (ml)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Appl. Dosis	3,04 μmol	3,04 μmol	3,04 μmol
Dosis mmol/ kg KG	11,7 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$	11,8 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$	13,4 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$

Tab. 5: Übersicht Bluthalbwertszeit MRT

Die Messung erfolgte an einem MRT, Allegra, Fa. Siemens mit einer Feldstärke von 3 T. Es wurde eine Handgelenkspule verwendet und mit einer Gradienten-Echosequenz gemessen. Zur Bestimmung der Bluthalbwertszeit wurden die Schnittbilder so gewählt, dass die Aorta und die Niere, als gut durchblutete Gefäße beobachtet werden konnten. Die Messung erfolgte eine Stunde lang in Abständen von ca. 2:50 min.

8.3.3 Bluthalbwertszeit (pharmakologisch)

Die pharmakologische Bluthalbwertszeit wurde an weiblichen Wistar Ratten ($n = 3$) mit einem Gewicht von ca. 250 g bestimmt.

8.3.3.1 Probenvorbereitung

Die Probe wurde so hergestellt, dass einem 250 g schweren Tier ca. 3 μmol Fe injiziert werden, entsprechend ca. 12 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$. Dafür wurden 0,12 ml Probe ‚m‘ einer Konzentration von 253,1 mM/ L (ICP) mit 1,880 ml Sorbitol/ H₂O (5,48% Sorbitolanteil) versetzt. Die Applikationslösung wurde anschließend mit ICP hinsichtlich des Eisengehalts untersucht. Die tatsächliche applizierte Dosis liegt zwischen 11,21 und 11,64 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$. Zur Bestimmung der Bluthalbwertszeit von gecoateten *SPIO* in der Ratte, wurde der Ratte zunächst ein Katheder in die linke Arteria carotis gelegt. Dafür wurde die Ratte in einer Narkosekammer mit Isofluran narkotisiert. Dann wurde das Blutgefäß frei präpariert und ein 50,5 cm langer, mit Heparin-NaCl (10 IE/ ml, Liquemin[®]) gefüllter PE-50-Katheter in die Arterie eingebunden. Mit Hilfe eines Trokars wurde der Katheder unter der Haut entlang auf die rechte Körperseite verlegt und im Bereich des Nackens nach außen geleitet. Nach dem Abfluten der Narkose und einer Regenerationspause wurde zunächst über den Katheter arterielles Blut für einen Nullwert entnommen. Während des Versuches wurden die Tiere in

kleinen Käfigen mit wenig Bewegungsfreiheit gehalten. Eine für die Bildgebung übliche Dosis (ca. 11,4 mmol/kg KG) gecoateter *SPIO* wurde über eine Tuberkulinspritze und Flügelkanüle in die Schwanzvene injiziert und mit ca. 0,6 ml 5,48% Sorbitol in Aqua bidest. nachgespült. Dann wurde in definierten Abständen (1, 3, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 min und 24 h) 0,4 ml Vollblut über einen Katheter abgenommen. Dafür wurde zunächst der Katheter von NaCl-Lösung befreit indem ca. 0,5 ml Volumen aus dem Katheter in die angeschlossene Spritze aufgezogen wurden. Mit einer neuen Tuberkulinspritze (Fa. Primo) wurde das Vollblut entnommen. Das vorher entnommene NaCl-Blutgemisch wurde wieder in den Katheter injiziert und der Volumenverlust durch heparinisierte NaCl Lösung ausgeglichen. Durch die Zugabe von heparinisierte physiologische NaCl Lösung wurde zudem möglicher Blutgerinnung im Katheter entgegen gewirkt. Eine Übersicht über die untersuchten Tiere und die applizierte Dosis gibt Tab. 6.

8.3.3.2 Applizierte Dosis und Versuchstiere

	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Gewicht	222 g	240 g	219 g
Appl. Volumen	0,18 ml	0,19 ml	0,18 ml
Konz. Fe in Probe	15186 µmol/l	15186 µmol/l	15186 µmol/l
Appl. Dosis	2,74 µmol	2,89 µmol	2,74 µmol
Dosis mmol/ kg KG	12,34 µmol/ kg KG	12,04 µmol/ kg KG	12,51 µmol/ kg KG

Tab. 6: Übersicht über Versuchstiere und applizierte Dosis für pharmakologische Bluthalbwertszeit

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Blutproben in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 10 min bei 8000 RPM zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend in 0,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und kühl gelagert.

8.3.3.3 Probenvorbereitung für ICP

Für *ICP AES* Messungen gibt es bestimmte Voraussetzungen: die Proben müssen partikelfrei sein, ein Volumen von 4 – 10 ml besitzen. Der Analyt sollte in einer Konzentration von 0,1 µM bis 1 mM vorliegen. Die Aufarbeitung der Proben geschah wie im Folgenden beschrieben: 100 µl Plasma wurden mit 40 µl internen Standards, einer Lösung die 1000 PPM Yttrium enthält versetzt und in Glasröhrchen für *ICP* gefüllt. Durch die

Verwendung eines internen Standards lassen sich Fehler durch die Probenvorbereitung und die Messung korrigieren. Für die Plasma-Nullwerte wurde, mangels Masse, 75 µl Plasma mit 40 µl Yttriumstandard versetzt. Außerdem wurde ein Yttriumnullwert mit 40 µl Yttriumstandard vorbereitet. Um die Proben aufzuschließen wurden je 1,3 ml 65%ige HNO₃ und 1 ml 30%ige H₂O₂ zugegeben. Der Probenständer aus Teflon wurde verschlossen und in einer 650 W Mikrowelle (MDS 2000, CEM, Kamp-Lintfort) über ein gestaffeltes Programm erhitzt (Zunächst 10 min bei 10% der Energie, 10 min bei 15%, 10 min bei 10%, 10 min bei 30%, 10 min 40%). Nach dem Abkühlen waren die Proben klar gelöst. Das Probenmaterial wurde auf 4 ml mit Reinstwasser aufgefüllt, vorsichtig aufgeschüttelt und in 4 ml ICP Probenbehälter gefüllt. Die Messung wurde mittels eines ICP-AES, TJA IRIS Advantage HR durchgeführt.

8.3.3.4 Plasmaeisenkonzentration

8.3.3.4.1 Verabreichte Dosis nach Rückrechnung (ICP)

	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Konz. Fe in Probe	14165,12 µmol/ l	14165,12 µmol/ l	14165,12 µmol/ l
Appl. Dosis	2,55 µmol	2,69 µmol	2,55 µmol
Dosis mmol/ kg KG	11,49 µmol/ kg KG	11,21 µmol/ kg KG	11,64 µmol/ kg KG

Tab. 7: Pharmakologische Halbwertszeit rückgerechnete Dosis durch ICP

Die Messung der applizierten Probe mittels ICP ergab eine tatsächliche Konzentration 14165,12 µmol Fe/ L. Zur Berechnung wurden zuvor 15186 µmol Fe/ L (aus einer ICP Messung der Stammlösung, Probe ,m') angenommen (s. Tab. 7). Möglicherweise resultiert dieser Unterschied aus Fehlern der Pipetten beim Verdünnen. Ratten besitzen ein Gesamtblutvolumen von 64 ml/ kg KG und ein Gesamtplasmavolumen von 40 ml/ kg KG [103]. Eine Übersicht über biologische Parameter der Versuchstiere gibt Tab. 8.

	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Gewicht	222 g	240 g	219 g
Blutvolumen	14,21 ml	15,36 ml	14,02 ml
Plasmavolumen	8,88 ml	9,6 ml	8,76 ml

Tab. 8: Plasmavolumen der untersuchten Ratten

8.3.3.4.2 Probenvorbereitung für NMR-Relaxivitätsmessung

Für Relaxivitätsmessungen wurden 50 µl Plasma mit 150 µl Reinstwasser versetzt und in ein Glasröhrchen zur Relaxivitätsmessung überführt. Als Blindprobe wurden 50 µl vor *SPIO*-Injektion abgenommenes Plasma (Nullwert) mit 150 µl Reinstwasser gemessen. Die Messung wurde bei 37°C und 1,41 T an einem *MiniSpec mq60 NMR Analyzer*, Fa. Bruker durchgeführt.

8.3.4 Leberhalbwertszeit (MRT)

Den Ratten wurde 0,2 ml Partikelsuspension in die Schwanzvene appliziert. Die applizierte Dosis und ein Überblick über die Tiere ist in Tab. 9 geben.

	Ratte 10	Ratte 12	Ratte 13
Gewicht (g)	237	245	236
Konz. Fe in Probe	30372 µmol/ l	30372 µmol/ l	30372 µmol/ l
Appl. Volumen (ml)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Appl. Dosis	6,07 µmol	6,07 µmol	6,07 µmol
Dosis mmol/ kg KG	25,6 µmol/ kg KG	24,8 µmol/ kg KG	25,7 µmol/ kg KG

Tab. 9: Übersicht applizierte Dosis Leberhalbwertszeit MRT

8.4 Messparameter

8.4.1 MALDI-ToF-MS

Die Matrix-assistierte Laser-Desorptions/ Ionisations-Massenspektrometrie wurde an einem *Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-ToF*-Massenspektrometer der Firma Perseptive Biosystems, Inc. Framingham, MA, USA, gemessen. Die Proben wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/ ml in Methanol gelöst. Dann wurde 1 µl dieser Lösung mit 1 µl *a*-Cyano-4-Hydroxymizsäure-Matrix-Lösung (10 mg/ ml in 0,3% TFA in Methanol/ Acetonitril (1:1) (V/ V)) gemischt. 1 µl von diesem Gemisch wurde auf einen Probenträger aufgetragen und bei 24°C getrocknet. Die Beschleunigungsspannung bei der Messung betrug 20 mV. Jedes Spektrum entspricht dem Mittel aus 250 Beschüssen mit dem Laser.

8.4.2 $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$

Für $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung wurde das Polymer in DMSO-d_6 gelöst und bei Raumtemperatur in einem Bruker DPX400 bei 400 MHz gemessen. Das Lösemittelsignal wurde als interner Standard verwendet. Die Spektren wurden mit dem Programm Win-NMR, Bruker, ausgewertet.

8.4.3 *Simulation der Struktur des Polymers*

Die Struktur des Polymers wurde mit MS Modeling 3.1 im COMPASS Kraftfeld simuliert.

8.4.4 *Röntgendiffraktion*

Für Röntgendiffraktionsmessungen (*XRD, x-ray diffraction*) wurden die Eisenoxidnanopartikel aus ethanolischer Suspension getrocknet und homogenisiert. Die Proben wurden im Transmissionsmodus (Co $\text{K}\alpha$ Strahlung, λ : 1,79 Å) auf einem STOE STADI MP mit IP-PSD Bildplatten-Detektor untersucht. Die Berechnung der Partikelgröße d erfolgte über die Scherrer Gleichung:

$$d = \frac{0,9 \cdot \lambda}{B \cos \theta} \quad \text{Gl. 20}$$

λ : Wellenlänge

B: Breite des Peaks, auf Höhe des halben Maximums

θ : Bragg Winkel

8.4.5 *Transmissionselektronenmikroskopie*

Die Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop Omega 912 der Firma Zeiss bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV angefertigt. Die Probelösungen wurden 1:200 bis 1:1000 mit Reinstwasser oder Ethanol verdünnt. Jeweils ein Tropfen wurde mit Glasstab oder Eppendorff Pipette auf ein mit Kohlenstoff bedampften Probenträger aus Kupfer aufgetragen. Die Messung erfolgte nach Verdampfen des Lösemittels bei Raumtemperatur.

8.4.6 Hochauflösende TEM

Hochauflösende TEM, *high resolution TEM*, wurde mit einem Philips CM200-FEG Mikroskop (200 kV, $C_S = 1.35$ mm) aufgenommen.

8.4.7 Kraftmikroskopie

Kraftmikroskopie (*AFM, atomic force microscopy*) wurde im *Tapping* Modus mit einem *Nanoscope IIIa*, Veeco Instruments, Santa Barbara, USA gemessen. Die Probe der polymerstabilisierten Partikel wurde verdünnt, eine Woche gegen gereinigtes Wasser dialysiert und anschließend auf einen *Mica* Probenträger durch *Spincoating* aufgetragen. Für die Messung wurden handelsübliche *Silica* Spitzen (NRC-W) mit einem Radius von 6 – 10 nm verwendet. Die Kraftkonstante betrug 42 Nm^{-1} und die Resonanzfrequenz 285 kHz. Die Bilder wurden mit einem $10 \times 10 \text{ }\mu\text{m}$ e-Scanner aufgenommen. Z betrug 80 mV.

8.4.8 Dynamische Lichtstreuung

Zur Partikelgrößenbestimmung wurden die Partikelsuspensionen 1:400 mit gereinigtem Wasser verdünnt und auf einem *Zetasizer Nano ZS*, Malvern Instruments vermessen. Die Auswertung erfolgte durch *Contin-Software*.

8.4.9 Zetapotentialmessung

Das Zetapotential wurde auf einem *Zetasizer 3000 HS*, Malvern Instruments, gemessen. Dafür wurde die Probe zuvor 1:400 mit gereinigtem Wasser verdünnt.

8.4.10 Analytische Ultrazentrifugation

Für Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) wurden die Polymerstabilisierten Partikel in Ethanol oder Wasser dispergiert und bei 3000 U/min in einer Beckman Optima XL-I Zentrifuge, Beckman/ Coulter, Palo Alto, USA, mit *Scanning* Absorptionsoptik und *online-Rayleigh-Interferometer* gemessen.

8.4.11 Thermogravimetrische Analyse

Thermogravimetrische Analyse (TGA) wurde auf einem Netzsch TG 209 F1 aufgezeichnet. Die Messung wurde mit einer Heizrate von 10 K/ min von Raumtemperatur bis 1000°C durchgeführt.

8.4.12 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT-Experimente wurden an einem MRT Allegra, Siemens, mit einer Feldstärke von 3 Tesla durchgeführt.

8.4.13 NMR-Relaxivitätsmessungen

Die NMR-Relaxivitäten wurden bei 37°C und einer Feldstärke von 1,41 Tesla an einem MiniSpec mq60 NMR Analyzer, Bruker gemessen.

8.4.14 Mössbauerspektroskopie

Mössbauerspektroskopie wurde in einem konventionellen Transmissionsspektrometer mit ⁵⁷Co Quelle in einer Rh Matrix gemessen. Die Kalibrierung erfolgte durch Messung einer 25 µm Folie bei 300 K. Die Spektren wurden mit *NORMOS Software* gefittet.

8.4.15 SQUID

Die Magnetisierung im Magnetfeld wurde durch ein kommerzielles *Quantum Design SQUID (Supra conducting quantum interference device)* Magnetometer, ausgerüstet mit einem supraleitenden Magneten einer Feldstärke von 5 Tesla.

8.4.16 Elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie

Die Elektronenparamagnetischen Resonanz-Spektren (EPR) wurden mit einem 9,4 GHz Benchtop X-Band EPR-Spektrometer Miniscope, Magnetech GmbH, Berlin aufgenommen. Die Proben wurden zuvor 1:200 mit gereinigtem Wasser verdünnt und bei Raumtemperatur gemessen.

8.4.17 *Hochtemperatur-EPR*

Die Hochtemperatur-EPR-Spektren wurden im X-Band (9,4 GHz) auf einem selbst konstruierten Spektrometer gemessen, das mit einer Mikrowellen Brücke (Varian E-101) ausgestattet ist. Für temperaturabhängige Messungen wurde ein Kryogen-System mit kontinuierlichem He-Fluss (Oxford ESR 900) verwendet. Die Temperaturstabilität war dabei genauer als 0.1 K.

8.4.18 *NMR-Imaging*

NMR-Imaging wurde in einem 20 MHz *Benchtop-Imager*, Oxford Instruments, gemessen. Dazu wurden die unverdünnten Proben in eine Hydrogelmatrix gestellt. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: $P_{90} = 37 \mu\text{s}$, $T_E = 9 \text{ ms}$, $T_R = 150 \text{ ms}$, 128*128 Punkte für 40 mm* 40 mm, Schichtdicke 10 mm, 8 Wiederholungen, Gesamtmessdauer 306 s.

8.4.19 *Fluxgate - Magnetometer (Förster Sonde)*

Die Partikelsuspension wurde mit Mannitlösung verdünnt (Fe_3O_4 Gehalt 1% (V/V)) und gefriergetrocknet. Die Proben wurden an einem differentiellen *fluxgate MRX* gemessen. Die Partikel wurden durch eine Helmholtzspule mit Feldstärken von bis zu 2 mT magnetisiert. Das Feld kann mit einem linearen Abfall von 100 μs abgeschaltet werden. Um die Magnetisierungsdynamik aufzunehmen, d.h. um das minimale Streufeld der Partikel im Magnetfeld zu messen, sind die *Fluxgate* – Magnetometer mit ihren empfindlichen Achsen rechtwinklig zum homogenen Magnetisierungsfeld angeordnet. Als Magnetometer dienen kommerziell erhältliche *Fluxgate* – Magnetometer, Fa. Barrington, mit einem Grundrauschen von $3 \text{ pT}/\text{Hz}^{1/2}$ und einer Bandweite von 3 kHz. Aufgrund der begrenzten Bandweite wurde die Datenanalyse erst 300 μs nach Anschalten und Abschalten durchgeführt.

8.4.20 *ICP - AES*

Die Messung wurde mittels eines *ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)*, *TJA IRIS Advantage HR* durchgeführt. Die Aufarbeitung des Probenmaterials wurde bereits unter dem Punkt Tierexperiment behandelt.

8.4.21 UV/Vis-Spektroskopie

Nach Auflösung der Partikel in konzentrierter HCl wurden das Eisen mit Hydroxylamin*HCl (10% (m/ V) in Wasser) Lösung quantitativ zu Fe^{3+} oxidiert. Fe^{3+} bildet mit Phenantrolin einen orangefarbenen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei $\lambda = 510 \text{ nm}$ UV-spektrometrisch gegen einen handelsüblichen Eisenstandard, Fa. Merck, gemessen wurde. Die Phenantrolinlösung wurde hergestellt indem 1 g Phenantrolin*HCl, 14 g Eisessig und 21,7 g Natriumacetat* $3\text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml Reinstwasser aufgelöst wurden. Die Messung der Absorption erfolgte an einem UV/Vis-Spektrometer Lambda 2, Perkin Elmer.

8.5 Abkürzungen

<i>AFM</i>	Rasterkraftmikroskop, <i>Atomic Force Microscope</i>
BA	Benzylalkohol
Boc	tert-Butoxycarbonyl
cRGD	zyklisches RGD (<i>cyclic RGD</i>),
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig Base
DLS	Dynamische Lichtstreuung
dm	diamagnetisch
DMF	Dimethylformamid
DVB	Divinylbenzol
EPR	Elektronen Paramagnetische Resonanz
<i>EPR</i>	<i>Enhanced Permeability and Retention</i> Effekt
Fe(AcAc) ₃	Eisen(III)acetylacetonat
Fe ₃ O ₄	Magnetit
γ-Fe ₂ O ₃	Maghemit
Fmoc-	Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium- hexafluorophosphat
HF	hochfrequent
HoAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HRTEM	Hochauflösende (<i>high resolution</i>) TEM
HuHF	Humanes <i>H</i> -Ferritin
<i>ICP-AES</i>	Induktiv gekoppeltes Plasma-Atom Emissions-Spektrometrie, (<i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i>)
KG	Körpergewicht
<i>MALDI – ToF – MS</i>	Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Time-of-Flight Massenspektrometrie
MRT	Magnetresonanztomographie
<i>MWCO</i>	<i>Molecular weight cut-off</i> , Ausschlussgröße nach Molekulargewicht
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear magnetic Resonance</i>)
NSF	nephrogene systemische Fibrose

PEO	Polyethylenoxid
pm	paramagnetisch
PyAop	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
RF	Radiofrequenz
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
<i>SQUID</i>	Supraleitende Quanteninterferenzeinheit, (<i>Supraconducting Quantum Interference Device</i>)
<i>SPIO</i>	Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (<i>Superparamagnetic Iron oxide Particles</i>)
spm	superparamagnetisch
<i>SPPS</i>	Festphasenpeptidsynthese, <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
<i>Tentagel[®] PAP</i>	<i>Tentagel[®] PEO attached product</i>
<i>TFA</i>	Trifluoressigsäure, <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TMSBr	Trimethylsilylbromid
-trityl	Triphenylmethyl

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Markus Antonietti und Prof. Dr. Karsten Mäder für die Möglichkeit, diese Arbeit in einem spannenden Umfeld am Max-Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung und der Universität Halle durchzuführen. Ich bedanke mich für ihren fachlichen Rat und die tatkräftige Unterstützung bei dieser fachübergreifenden Arbeit.

Bei Prof. Dr. Markus Niederberger möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Nanopartikelsynthese bedanken. Dr. Hans Börner gilt mein großer Dank für die Hilfe und Planung der Polymersynthese. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Katharina Ostwald und Jessica Brandt für die Durchführung und Unterstützung bei der Polymersynthese bedanken.

Bei Dr. Andreas Briel und seiner Arbeitsgruppe (Bayer Schering Pharma AG, TRG Diagnostica) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts ‚Eisenherz‘ und die Möglichkeit Messungen durchzuführen bedanken. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Gunnar Schütz für die Planung und Durchführung der Tierversuche, sowie für die tatkräftige Hilfe durch Claudia Heyer, Ines Heinzemann und Andrea Baumgart. Dankeschön Jessica Lohrke und Dr. Nicole Gehrke für zahlreiche Diskussionen und die Durchführung und Unterstützung bei NMR-Relaxivitäts- und ICP-Messungen. Auch bei Dr. Danielle Franke, Violetta Sudmann und Dr. Erik Blazek möchte ich mich für hilfreiche Diskussionen bedanken. Durch die Unterstützung von Dr. Jörg Auernheimer (TU München, Eisenherz-Projekt) konnten in-vivo *Targeting* Versuche durchgeführt werden. Vielen Dank hierfür.

Mein Dank gilt auch Rona Pitschke und Dr. Anna Fischer für TEM Aufnahmen. Ich bedanke mich bei Heidi Zastrow für Zetapotential-Messungen und hilfreiche Diskussionen. Danke Olaf Niemeyer und Jens Hentschel für NMR-Messungen, Anne Heilig für AFM-Messungen und Dr. Eberhard Krause (FMP Berlin) für *MALDI-ToF-MS*.

Dr. Helmut Cölfen und Antje Völkel möchte ich für AUZ Messungen und hilfreiche Diskussionen danken. Weitergebracht haben mich auch die Diskussionen mit Dr. Reinhard Sigel hinsichtlich der Lichtstreuexperimente.

Dankeschön Dr. Helena Kaper für TGA-Messungen und Dr. Igor Djerdj (ETH Zürich) für HRTEM-Messungen. Danke Dr. Jens Weber für MS-Modelling. Für XRD-Messungen und zahlreiche Eisenoxiddiskussionen bedanke ich mich bei Dr. Nicola Pinna (Univ. de Aveiro). Auch die Eisenoxiddiskussionen mit Elena Taboada (ICMA Barcelona) waren sehr

inspirierend, Dankeschön. Dr. Hendrik Metz danke ich für die EPR- und NMR-*Imaging*-Messungen gute Tipps und hilfreiche Diskussionen.

Dankeschön Dr. Lluís Casas (UA Barcelona) für Mössbauer-Messungen, Prof. Dr. Denis Arcon, Dr. Marko Jagodic und Dr. Matej Preglej (IJS, Ljubljana) für *SQUID* und HT-EPR-Messungen und Dr. Frank Ludwig (TU Braunschweig) für Fluxgate-Messungen.

Ein herzliches Dankeschön meinen zahlreichen Korrekturlesern besonders Dr. Laura Hartmann, Dr. Melanie Schüppel, Dr. Jens Weber, Cornelia Lux, Thomas Trill und Jessica Lohrke.

Meiner Arbeitsgruppe in Halle danke ich für die freundliche Aufnahme während der kurzen Begegnungen. Für die gute Zusammenarbeit und die gute Unterstützung in der ‚heißen Phase‘ möchte ich meinen neuen Kollegen bei Bayer Schering Pharma danken.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen meinen Kollegen, Freunden und meiner Familie bedanken, die mich unterstützt haben und diese sicherlich nicht ganz einfache Zeit so schön und spannend gemacht haben. Ihr seid toll!

Für wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen aller Art, viel Engagement, Kickern und die nette Atmosphäre möchte ich mich bei meiner ‚Kaffeecke‘ bedanken. Danke Dr. Laura Hartmann für wissenschaftliche Hilfe und Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und für ihre Freundschaft. Danke Prof. Dr. Georg Garnweitner und Dr. Jens Weber für die für zahlreiche Diskussionen und die schöne gemeinsame Zeit.

Für die angenehme Büroatmosphäre und die zuverlässigen Versorgung mit Tee und Nervennahrung möchte ich mich besonders bei Dr. Cécile Huin und Jens Hentschel bedanken. Bei Regina Rothe, Jessica Brandt, Katharina Ostwald, Dr. Jens Weber und Ines Below bedanke ich mich für den richtigen Laborgeist und natürlich für die richtige Musik.

Danke für Unterstützung und die notwendige Ablenkung Dr. Anna Fischer, Michael Bojdys, Dr. Helena Kaper, Dr. Frédéric Goettmann, Dr. Antonio Stocco, Dr. Renate Müller, Dr. Michaela Eder, Dr. John Dunlop, Dr. Barbara Aichmayer, Cornelia Lux, Dr. Melanie Schüppel, Katina Hahn, Christina Görden, Ulrike Langenbahn, Svenja Mies.

Herzlichen Dank meiner großartigen Familie, Annelore Maier-Stier, Dr. Klaus Maier und Vera Maier, die immer für mich da war.

10 Lebenslauf

Persönliches

Name	Julia Maier
Geboren am	16.08.1978
in	Koblenz
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Ausbildung

03/2005 – 10/2007	Max-Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Abteilung Kolloidchemie, Potsdam und Martin-Luther Universität Halle, Institut für Pharmazie, Halle; Promotionsstudium
11/2004	Apothekerkammer Rheinland-Pfalz, Mainz; 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
10/2003	Johannes-Gutenberg Universität, Mainz; 2. Staatsexamen
09/2001 – 03/2002	Université de Bourgogne, Dijon, Frankreich; Pharmaziestudium, Schwerpunkte: Biochemie, Pharmakognosie
04/2001	Johannes-Gutenberg Universität, Mainz; 1. Staatsexamen
04/1999 – 10/2003	Johannes-Gutenberg Universität, Mainz; Pharmaziestudium
11/1998 – 03/1999	Lahn-Apotheke, Lahnstein; Ausbildung zur Pharmazeutisch Kaufmänn. Angestellten
06/1998	Gymnasium Lahnstein, Lahnstein; Abitur

Berufserfahrung

Seit 11/2007	Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Pharmazeutische Entwicklung, Early Development; PostDok ‚Nanopartikuläre Drug Delivery Systeme‘
03/2005 – 10/2005	Arcaden-Apotheke, Berlin; Apothekerin
12/2004	Schering AG, Berlin, Pharmazeutische Entwicklung, Drug Delivery Systems; Wissenschaftliche Beraterin
05/2004 – 10/2004	Witzleben-Apotheke and Bahnhof-Apotheke, Berlin; Pharmaziepraktikantin
11/2003 – 04/2004	Schering AG, Berlin, Pharmazeutische Entwicklung, Drug Delivery Systems; Pharmaziepraktikantin
03/2003 – 04/2003 07/2002 – 09/2002 09/2000	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim Pharmazeutische Entwicklung, Consumer Health Care; Famulantin und Werksstudentin
08/1999 – 09/1999	Gautor-Apotheke, Mainz; Famulantin
07/1998 – 09/1998	Keramchemie, Siershahn; Praktikantin

11 Veröffentlichungen

“New Peptide-*block*-PEO coated Iron Oxide Nanoparticles for MRI”, Posterpräsentation, Controlled Release Society Meeting 2007, Long Beach, Juli 2007

“Synthesis and Characterisation of Iron Oxide Nanoparticles Coated by a New Peptide - Poly(Ethylene Oxide) Block Copolymer”, Posterpräsentation, PolyPharma 2006, Halle, September 2006.

“New Polymer coated Iron Oxide Nanoparticles for MRI”, Posterpräsentation, PhDnet Workshop ‘Global Changes’, Köln, August 2006.

“A Novel Non-aqueous Synthesis for Iron Oxide Nanoparticles”, Posterpräsentation, International Symposium on Inorganic Interfacial Engineering, Stockholm, Juli 2006.

12 Literatur

1. Torchilin, V.P., *Multifunctional Nanocarriers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006(58): p. 1532-1555.
2. Pridgen, E.M., Langer, R., Farokhzad, O. C., *Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy*. Nanomedicine, 2007. **2**(5): p. 669-680.
3. Gupta, A.K., Naregalkar, R. R., Vaidya, V. D., Gupta, M., *Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical application*. Nanomedicine, 2007. **2**(1): p. 23-39.
4. Berry, C.C., Curtis, A. S. G., *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal Of Physics D-Applied Physics, 2003. **36**: p. R198-R206.
5. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
6. Schillinger, U., Brill, T., Rudolph, C., Huth, S., Gersting, S., Krötz, F., Hirschberger, J., Bergemann, C., Plank, C., *Advances in magnetofection next term—magnetically guided nucleic acid delivery*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **293**(1): p. 501-508.
7. Taupitz, M., Schmitz, S., Hamm, B., *Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen*. RöFo, 2003. **175**: p. 752-765.
8. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal Of Physics D-Applied Physics, 2003. **36**(13): p. R167-R181.
9. Martina, M.S., Fortin, F. P., Ménager C., et al., *Generation of Superparamagnetic Liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agent for In Vivo Imaging*. J. Am. Chem. Soc., 2005(127): p. 10676-10685.
10. Corot, C., Robert, P., Idée, J.M., Port, M., *Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**: p. 1471-1504.
11. Rosenzweig, R.E., *Ferrohydrodynamics*. 1998.
12. Discher, D.E. and A. Eisenberg, *Polymer Vesicles*. Science, 2002. **297**: p. 967-972.
13. Stolnik, S., Illum, L., Davis, S. S., *Long circulating microparticle drug carriers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995(16): p. 195 - 214.
14. Holleman-Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 1995(101., verbesserte und stark erweiterte Auflage).
15. Wang, Y.X.J., S.M. Hussain, and G.P. Krestin, *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. European Radiology, 2001. **11**(11): p. 2319-2331.
16. Leslie-Pelecky, D.L., Rieke, R. D., *Magnetic Properties of Nanostructured Materials*. Chem. Mater., 1996(8): p. 1770-178.
17. Néel, L., *Theorie du trainage magnetique des ferromagnetiques en grains fins avec applications aux terres cuites*. Ann. Geophys., 1949. **5**: p. 99-136.
18. Brown, W.F.J., *Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle*. Phys. Rev., 1963. **130**(5): p. 1677 - 1686.
19. Mansfield, P., Maudsley, A. A., *Medical imaging by NMR*. The British Journal of Radiology, 1977. **50**(591): p. 188-194.
20. Lauterbur, P.C., *Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance*. Nature, 1973. **242**: p. 190-191.
21. Winter R., N.F., *Methoden der biophysikalischen Chemie*. 1998.
22. Schild, H.H., *MRI made easy (well almost)*. 1994.
23. <http://www.revisemri.com/>.
24. <http://www.medical.siemens.com>.

25. Bulte, J.W.M., Kraitchman, D. L., *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*. NMR In Biomedicine, 1994. **17**: p. 484-499.
26. Weissleder, R., *Molecular Imaging in Cancer*. Science, 2006. **312**: p. 1168 - 1171.
27. Rhyner, M.N., Smith, A. M., Gao, X., Mao, H., Yang, L., Nie, S., *Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging*. Nanomedicine, 2006. **1**(2): p. 209-217.
28. Zhang, C., et al., *Specific Targeting of Tumor Angiogenesis by RGD-Conjugated Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles Using a Clinical 1.5-T Magnetic Resonance Scanner*. Cancer Research, 2007. **67**(4): p. 1555-1562.
29. *ROTE LISTE - Arzneimittelsverzeichnis für Deutschland*. 2008.
30. Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F., Duguet, E., *Magnetic nanoparticle design for diagnosis and therapy*. Journal of Materials Chemistry, 2004(14): p. 2162-2175.
31. Heinrich, M., Uder, M., *Nephrogene systemische Fibrose nach Anwendung gadoliniumhaltiger Kontrastmittel - ein Statuspapier zum aktuellen Stand des Wissens*. Fortschr Röntgenstr, 2007. **179**: p. 613-617.
32. Grobner, T., *Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?* Nephrol Dial Transplant., 2006. **4**: p. 1104-8.
33. *Magnetic Resonance Technology Information Portal, MRI online Database*, www.mr-tip.com.
34. Schwertmann, U., Cornell, R. M., *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterisation*. 1991.
35. Lawaczeck, R., Menzel, M., Pietsch, H., *Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging*. Applied Organometallic Chemistry, 2004(18): p. 506-513.
36. Kopp, A.F., Laniado, M., Dammann, F., Stern, W., Groenewaeller, E., et al, *MR Imaging of the Liver with Resovist: Safety, Efficacy and Pharmacodynamic Properties*. Radiology, 1997. **204**: p. 749-756.
37. Taupitz, M., Schnorr, J., Abramjuk, C., Wagner, S., Pilgrimm, H., Hünigen, H., Hamm, B., *New Generation of Monomer-Stabilized Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles (VSOP) as Contrast Medium for MR Angiography: Preclinical Results in Rats and Rabbits*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2000. **12**: p. 905-911.
38. Taupitz, M., Schnorr, J., Wagner, S., Abramjuk, C., Pilgrimm, H. et al., *Coronary MR Angiography: Experimental Results with a Monomer-stabilized Blood Pool Contrast Medium*. Radiology, 2002. **222**: p. 120–126.
39. Schellenberger, E., Schnorr, J., Reutelingsperger, C., Ungethüm, L., Meyer, W., *Linking Proteins with Anionic Nanoparticles via Protamine: Ultrasmall Protein-Coupled Probes for Magnetic Resonance Imaging of Apoptosis*. Small, 2008. **4**(2): p. 225-230.
40. Reimer, P., Tombach, B., *Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions*. Eur Radiol, 1998(8): p. 1198-1204.
41. Owens, D.E.r., Peppas, N. A., *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **307**(1): p. 93-102.
42. Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.-P., *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 4356–4373.
43. Roser M., F.D., Kissel T., *Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **46**(3): p. 255-263(9).

44. Bonnemain, B., *Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review.* Journal of Drug Targeting, 1998. **6**(3): p. 167-74.
45. Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Compton, C. C., White, D. L., Jacobs, P., Lewis, J., *Superparamagnetic Iron Oxide: pharmacokinetics and toxicity.* AJR, 1989. **152**: p. 167.
46. Feynman, R.P., *There's Plenty of Room at the Bottom - An Invitation to Enter a New Field of Physics.* Engineering and Science magazine, 1960. **XXIII**,(5).
47. Faraday, M., Philos. Trans. R. Soc. London, 1857(147): p. 145.
48. Poole, C.P.j., Owens, F. J., *Introduction to Nanotechnology.* 2003.
49. Kumar, M.N.V.R., Kumar, N., Domb, A. J., Arora, M., *Pharmaceutical Polymeric Controlled Drug Delivery Systems.* Advances in Polymer Science, 2002. **160**: p. 45-117.
50. Niederberger, M., Garnweitner, G., *Organic Reaction Pathways in the Nonaqueous Synthesis of Metal Oxide Nanoparticles.* Chem. Eur. J., 2006. **12**: p. 7282-7302.
51. Rubahn, H.-G., *Nanophysik und Nanotechnologie.* 2002.
52. Baraton, M.-I., *Synthesis, Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles.* 2003.
53. P. M. Harrison, P.A., *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation.* Biochimica et Biophysica Acta, 1996. **1275**: p. 161 - 203.
54. Lawson, D.M., et al., *Solving The Structure Of Human H-Ferritin By Genetically Engineering Intermolecular Crystal Contacts.* Nature, 1991. **349**(6309): p. 541-544.
55. *Ferritin - Molecule of the month.* www.pdb.org, 2002.
56. *H Ferritin.* <http://160.114.99.91/astrojan/protein/pictures/ferritin.jpg>.
57. Meldrum, F.C., B.R. Heywood, and S. Mann, *Magnetoferritin - Invitro Synthesis Of A Novel Magnetic Protein.* Science, 1992. **257**(5069): p. 522-523.
58. Meldrum, F.C., et al., *Synthesis Of Inorganic Nanophase Materials In Supramolecular Protein Cages.* Nature, 1991. **349**(6311): p. 684-687.
59. Uchida, M., et al., *Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles.* Journal Of The American Chemical Society, 2006. **128**(51): p. 16626-16633.
60. Douglas, T. and V.T. Stark, *Nanophase cobalt oxyhydroxide mineral synthesized within the protein cage of ferritin.* Inorganic Chemistry, 2000. **39**(8): p. 1828-1830.
61. Klem, M.T., et al., *Synthetic control over magnetic moment and exchange bias in all-oxide materials encapsulated within a spherical protein cage.* Journal Of The American Chemical Society, 2007. **129**(1): p. 197-201.
62. Ueno, T., et al., *Size-selective olefin hydrogenation by a Pd nanocluster provided in an apo-ferritin cage.* Angewandte Chemie-International Edition, 2004. **43**(19): p. 2527-2530.
63. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide.* J. Am. Chem. Soc., 1963(85): p. 2149.
64. Chan, W.C., White, P. D., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach.* 2000.
65. Carpino, L.A., Han, G. Y., *The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group.* Journal of Organic Chemistry, 1972. **37**(22): p. 3404.
66. *Römpp Online Chemie Lexikon.* 2007.
67. Müller, R.H., Schuhmann, R., *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis.*
68. Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C.-J., *Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2003(257): p. 113-118.
69. Jun, Y.W., Huh, Y.M., Choi, J.S., Lee, J. H., Song, H.T., Kim, S., Yoon, S., Kim, K.S., Shin, J.S., Suh, J.S., Cheon, J., *Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals*

- and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging*. Journal Of The American Chemical Society, 2005. **127**(16): p. 5732 -5733.
70. Morales, M.P., *Surface and Internal Spin Canting in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles*. Chem. Mater., 1999. **11**: p. 3058-3064.
 71. Lu, A.-H., Salabas, E. L., Schüht, F., *Magnetic nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*. Angewandte Chemie International Edition, 2007(46): p. 1222-1244.
 72. Pinna, N., et al., *Magnetite nanocrystals: Nonaqueous synthesis, characterization, and solubility*. Chemistry Of Materials, 2005. **17**(11): p. 3044-3049.
 73. Gnanaprakash, G., Mahadevan, S., Jayakumar, T., Kalyanasundaram P., Philip, J., Raj, B., *Effect of initial pH and temperature on iron salt solutions on formation of magnetic nanoparticles*. Materials Chemistry and Physics, 2007. **103**: p. 168.
 74. Jeong, U., Teng, X., Wang, Y., Yang, H., Xia, Y., *Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications*. Advanced Materials, 2007(19): p. 33-60.
 75. Mann, S., *Bioinorganic Chemistry, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. 2001.
 76. Cornell, R.M., Schwertmann, U., *The Iron Oxides - Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. 1996.
 77. Vandenberghe, R.E., Barrero, C. A., Da Costa, G. M., Van San, E., De Grave, E., *Mössbauer characterisations of iron oxides and (oxy)hydroxides: the present state of the art*. Hyperfine Interactions, 2000(126): p. 247-259.
 78. Harrison, P.M., Arosio, P., *Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
 79. Dickson, D.P.E., et al., *Properties of magnetoferritin: A novel biomagnetic nanoparticle*. Nanostructured Materials, 1997. **9**(1-8): p. 595-598.
 80. *periodic chart of amino acids*. www.bachem.com.
 81. Karas, M., Krüger, R., *Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 427-440.
 82. Nölte, J., *ICP Emissionspektroskopie für Praktiker- Grundlagen, Methoden, Anwendungsbeispiele*. 2002(1).
 83. Oleinik, V.S., Maloletov, S. M., Danchuk, V. D., Sherstyuk, V. P., *Theoretical and Experimental Chemistry*, 1994. **29**(5): p. 305-308.
 84. Mykhaylyk, O., Dudchenko, N., Dudchenko, A., *Doxorubicin magnetic conjugate targeting upon intravenous injection into mice: High gradient magnetic field inhibits the clearance of nanoparticles from the blood*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **193**: p. 473-482.
 85. Reimer, P., Blazer, T., *Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications*. Eur Radiol, 2003(13): p. 1266–1276.
 86. Pregelj, M., Umek, P., Drolc, B., Jancar, B., *Synthesis, structure and magnetic properties of iron-oxide nanowires*. Journal of Materials Research, 2006. **21**(11): p. 2955.
 87. Ripka, P., *Magnetic Sensors and Magnetometers*. 2001.
 88. Heim, E., Harling, S., Pöhlige, K., Ludwig, F., Menzel, H., Schilling, M., *Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2006. **311**(1): p. 150-154.
 89. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage, 2001.

90. Roskopf, D., Siegmund, W., Kroemer, H. K., *AI-Arzneimitteltherapie. Therapiehandbuch*, http://www1.us.elsevierhealth.com/THB/chapter_A001.php#sectiona01001, 2007.
91. Lind, K., Kresse, M., Debus, N. P., Müller, R.H., *A Novel Formulation for Superparamagnetic Iron Oxide (SPIO) Particles Enhancing MR Lymphography: Comparison of Physicochemical Properties and The In Vivo Behaviour*. *Journal of Drug Targeting*, 2002. **10**(3): p. 221-230.
92. Matsumura, Y., Maeda, H., *A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs¹*. *Cancer Research*, 1986(46): p. 6387-6392.
93. Duncan, R., *The Dawning Era of Polymer Therapeutics*. *Nature reviews*, 2003. **2**: p. 347 - 360.
94. Hong, S., Leroueil, P. R., Majoros, I. J., Orr, B. G., Baker, J. R. jr., Banaszak Holl, M. M., *The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform*. *Chemistry & Biology*, 2007. **14**(1): p. 107 - 15.
95. Weinmann, H.-J., Ebert, W., Misselwitz, B., Schmitt-Willich, H., *Tissue-specific MR contrast agents*. *European Journal of Radiology*, 2003(46): p. 33-44.
96. Taupitz, M., *Kontrastmittel für die Molekulare Bildgebung*. *Molecular Imaging*, 2006.
97. Nasongkla, N.e.a., *Multifunctional Polymeric Micelles, as Cancer Targeted, MRI-Ultrasensitive Drug Delivery System*. *Nano Letters*, 2006. **6**(11): p. 2427-2430.
98. Kobayashi, H., Lin, C., *Nanotechnology for antiangiogenic cancer therapy*. *Nanomedicine*, 2006. **1**(1): p. 17-22.
99. Montet, X., Funovics, M., Montet-Abou, K., Weissleder, R., Josephson, L., *Multivalent Effects of RGD Peptides Obtained by Nanoparticle Display*. *J. Med. Chem.*, 2006. **49**(20): p. 6087-6093.
100. Pasqualini, R., Koivunen, E., Rouslahti, E., *Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands*. *Nature Biotechnology*, 1997. **15**(6): p. 542-6.
101. Montet, X., Montet-Abou, K., Reynolds, F., Weissleder, R., Josephson, L., *Nanoparticle Imaging of Integrins on Tumor Cells*. *Neoplasia*, 2006. **8**(3): p. 214-222.
102. Lieleg, O., et al., *Specific Integrin Labeling in Living Cells Using Functionalized Nanocrystals*. *Small*, 2007. **3**(9): p. 1560-1565.
103. TVT, A.f.T.i.d.G.-S.u.A.i.d., *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*. 1999.