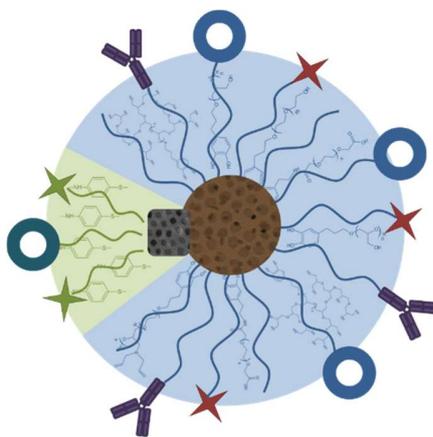


Entwicklung und Biofunktionalisierung von metallischen Nanostrukturen für die Anwendung in der Krebsimmuntherapie



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Heiko Bauer

geboren in Worms

Mainz, 2014

Dekan:

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 23.04.2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2011 bis April 2014 unter der Betreuung von [REDACTED] an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie angefertigt.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ut omnes unum sint

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken, für die Möglichkeit dieses interessante Forschungsgebiet zum Thema meiner Doktorarbeit gemacht haben zu dürfen und für seine unterstützenden Ratschläge.

[REDACTED] möchte ich für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen im Rahmen der Polymerkooperationen danken, durch die ein Großteil dieser Arbeit entstehen konnte.

Betreffend der Polymerkooperationen sei folgenden Personen besonderer Dank ausgesprochen, da ohne die Zurverfügungstellung ihrer entwickelten Polymerstrukturen die Anwendung im Rahmen meiner Arbeit bei weitem nicht so vielfältig gewesen wäre:

[REDACTED]

[REDACTED] sei gedankt für viele Erklärungen und die Vertiefung meiner Kenntnisse der Immunologie und die Anwendung der von mir entwickelten Nanopartikel. Gleichmaßen möchte ich [REDACTED] für die Durchführung der FACS-Analysen danken.

[REDACTED] möchte ich an dieser Stelle danken, dass ich die Viabilitätstests größtenteils in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte, und [REDACTED] für die Unterstützung bei der Durchführung der Tests.

Für die Hilfe bei der Auswertung der Röntgendiffraktogramme möchte ich [REDACTED] danken.

Den Korrekturlesern, insbesondere [REDACTED] möchte ich für die Opferung vieler Stunden für die Durchforstung meiner Arbeit nach

Fehlern danken, sowie [REDACTED]
[REDACTED]

Nicht zuletzt sei all meinen Freunden ein großes Dankeschön ausgesprochen für Diskussionen, Hilfen, nötigen Ablenkungen und Kaffeepausen, vor allem [REDACTED] und [REDACTED]

Als wichtigste Person möchte ich allerdings noch einmal [REDACTED] danken, die mich in allen Situationen und Lebenslagen unterstützt hat. Ohne dich wäre mir alles um ein Vielfaches schwerer gefallen!

Abstract in Deutsch

Die Anwendung nanopartikulärer Strukturen für biomedizinische Aufgaben gewinnt immer größer werdendes Interesse. Die Vorteile liegen in der Möglichkeit, durch Funktionalisierungen einen zielgerichteten Transport im Organismus zu bewirken. Dieses *cell targeting* verringert die Nebenwirkungen der, gerade in der Krebstherapie verwendeten Wirkstoffe, da diese größtenteils nicht mehr global wirken, sondern bevorzugt im Zielgewebe. Durch die konzentriertere Darbietung des Wirkstoffes auf der Partikeloberfläche wird an den adressierten Zellen eine erhöhte Zahl an Rezeptoren aktiviert, was, verglichen mit separat bindenden Wirkstoffen, zur deutlich verbesserten Zellaufnahme und dortigen Wirkung führt. Um den Einsatz metallischer Nanopartikel *in vivo* zu ermöglichen, muss der Organismus vor toxischen Effekten der Partikel geschützt werden. Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass die Partikel nicht vorzeitig vom Immunsystem erkannt werden und aus dem Blutstrom entfernt werden. Unter dem Begriff des *stealth effects* wird die Kombination der beiden Anforderungen verstanden. Dieser Effekt kann durch eine hoch biokompatible Ligandenhülle um die Partikel ermöglicht werden. Langkettige wasserlösliche Polymere bieten sich hierbei an, welche über hochaffine Ankergruppen wie Catechole an die metallische Partikeloberfläche binden können und somit eine langzeitstabile Dispersion im wässrigen Medium ermöglichen. Gleichzeitig wird die Möglichkeit der Freisetzung von toxischen Ionen aus den Partikeln deutlich minimiert und durch Verwendung von multifunktionellen Polymeren ist die Anbindbarkeit von Wirkstoffen gewährleistet.

Abstract in english

The application of nano particulate structures for biomedical tasks is receiving increasing interest. Significant benefits are effected by specific functionalization and a targeted transport within the organism. This so-called *cell targeting* reduces the side effects of cancer therapy agents because they do not act globally, but rather show preference for the target tissue. Due to the concentrated presentation of the drug on a particle's surface, an increased number of receptors are activated on the addressed cells. Compared with separately binding substances, the cellular uptake and induced effects are significantly improved. To allow the use of metallic nanoparticles *in vivo*, the organism must be protected from the toxic effects of the particles. At the same time, it must be ensured that the particles do not underlie a clearance by the immune system and are removed from the blood stream. The combination of these two requirements is called the *stealth effect*. This effect can be created by using a highly biocompatible ligand shell around the particles. Long-chain water-soluble polymers are widely used to bind to the metallic particle's surface via high affinity anchor groups, such as catechols, thus enabling a long-term, stable dispersion in an aqueous medium. At the same time the possibility of the release of toxic ions from the particles is significantly reduced, and the use of multifunctional polymers ensures the connection of drugs and targeting agents.

Inhalt

1	Motivation.....	1
2	Grundlagen.....	3
2.1	Nanopartikel.....	3
2.1.1	Allgemeines	3
2.1.2	Synthese durch thermische Zersetzung	5
2.1.3	Modell zu Keimbildung und Keimwachstum.....	5
2.2	Nanomagnetismus.....	7
2.2.1	Superparamagnetismus	7
2.3	Tomographische Methoden.....	8
2.3.1	Magnetresonanz-Tomographie (MRT).....	8
2.3.2	Computertomographie (CT)	12
2.3.3	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	13
2.4	Krebs	14
2.4.1	Definition.....	14
2.4.2	Krebsentstehung	14
2.4.3	Krebsbehandlung	15
2.5	Biomedizinische Anwendung von Nanopartikeln	15
2.5.1	Passives <i>cell targeting</i>	16
2.5.2	Aktives <i>cell targeting</i>	17
3	Isotrope Nanopartikel.....	19
3.1	Theorie	19
3.1.1	Einführung	19
3.1.2	Ausnutzung physikalischer Eigenschaften prominenter Nanopartikel.....	20
3.1.3	Manganoxidnanopartikel	21
3.1.4	Platin-Nanowürfel.....	22
3.1.5	Eisen-Platin-Nanowürfel	24
3.2	Ergebnisse und Diskussion	26

3.2.1	Herstellung von Manganoxidnanopartikeln (MnO).....	26
3.2.2	Herstellung von Platin-Nanowürfeln.....	28
3.2.3	Herstellung von FePt-Nanowürfeln.....	30
3.3	Experimenteller Teil	31
3.3.1	Chemikalien.....	31
3.3.2	Allgemeines.....	31
3.3.3	Standardverfahren zur Aufreinigung von Nanopartikeln aus Synthesen der thermischen Zersetzung und der Biofunktionalisierung (Kapitel 3, 4 und 5) ..	32
3.3.4	Manganoxidnanopartikel (ca. 19 nm)	32
3.3.5	Platin-Nanowürfel (ca. 5 nm).....	32
3.3.6	FePt-Nanowürfel (ca. 6-8 nm).....	33
3.4	Zusammenfassung	33
4	Herstellung und Entwicklung von anisotropen Nanostrukturen.....	35
4.1	Theorie.....	35
4.1.1	Einführung.....	35
4.1.2	Heterodimere (keimvermittelt).....	38
4.1.3	Heterodimere (<i>in situ</i>)	41
4.1.4	Nanodrähte	41
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	48
4.2.1	Heterodimere (keimvermittelt).....	48
4.2.2	Heterodimere (<i>in situ</i>)	50
4.2.3	Nanodrähte	50
4.2.4	Platin-Nanodrähte im Mikroreaktor	58
4.2.5	FePt@Fe _x O-Nanodrähte.....	61
4.2.6	Pt@MnO-Nanoketten.....	62
4.3	Experimenteller Teil	66
4.3.1	Chemikalien.....	66
4.3.2	Allgemeines.....	66
4.3.3	Pt@MnO- und FePt@MnO-Heterodimere (11 nm oder 17 nm MnO-Domäne, keimvermittelt)	66
4.3.4	FePt@Fe _x O-Heterodimere (<i>in situ</i>).....	67

4.3.5	Platin-Nanodrähte	67
4.3.6	FePt@Fe _x O-Nanodrähte	67
4.3.7	Pt@MnO-Ketten	68
4.3.8	Parameter für Mikroreaktor	68
4.4	Zusammenfassung	69
5	Biofunktionalisierung und Anwendung von anorganischen Nanopartikeln	71
5.1	Theorie	71
5.1.1	Einführung	71
5.1.2	Die Catecholankergruppe	77
5.1.3	Die Dopaminankergruppe	79
5.1.4	Zur Herstellung von Dopa-PEG und Dopa-PEG-Amin	81
5.1.5	Zur Herstellung von Catechol-PEG und Catechol-PEG- <i>b</i> -PGA	83
5.1.6	Zur Herstellung von linearen und hyperverzweigten Catechol Polyglycerolen (C-PG; <i>lin, hb</i>)	85
5.1.7	Zur Anbringung von C-PEG und C-PG auf nanopartikuläre Oberflächen	88
5.1.8	Anwendung beider Polymere auf unterschiedliche Partikelsysteme	89
5.1.9	Funktionalisierung von intermetallischen Nanopartikeln	93
5.1.10	Zur Herstellung von amphiphilen Molekülen mit Polymerrückgrat	94
5.1.11	Funktionalisierung von Pt@MnO-Ketten	96
5.1.12	Zum Anbringen einer Silicahülle auf oxidische Nanopartikel	98
5.1.13	Anwendung polymerfunktionalisierter Nanopartikel	99
5.2	Ergebnisse und Diskussion	104
5.2.1	Allgemeines	104
5.2.2	Die Funktionalisierung mit Dopa-PEG	106
5.2.3	C-PEGs und PGs in verschiedenen Längen	107
5.2.4	C-PEG-Funktionalisierung	108
5.2.5	Polymeranbindung an Pt@MnO-Nanoketten	114
5.2.6	Anbindung von Pt@MnO-Nanoketten auf Silicaoberflächen mittels Polymerlinker	116
5.2.7	Biomedizinische Anwendungen	121
5.2.8	C-PG-Funktionalisierung	128

5.2.9	Funktionalisierung von Partikeln mit amphiphilen Molekülen.....	132
5.2.10	Serumstabilität von C-PEG- und C-PG-funktionalisierten Nanopartikeln	136
5.2.11	Lichtstreuung an C-PEG- und C-PG-funktionalisierten Nanopartikeln.....	138
5.2.12	T_1 -Relaxation von Pt@MnO-C- <i>lin</i> PG-Heteropartikeln	143
5.2.13	HU-Werte von Pt@MnO.....	144
5.3	Experimenteller Teil	146
5.3.1	Chemikalien.....	146
5.3.2	Generelles Aufreinigungsverfahren für polymerbeschichtete Nanopartikel..	146
5.3.3	Vorbereitung von C-PEG, C-PEG- <i>b</i> -PGA, Ch- <i>lin</i> PG und TD-PEG ₅₇ -PGG ₁₂	146
5.3.4	Vorbereitung von C- <i>lin</i> PG, C-PEG- <i>hb</i> PG und C- <i>hb</i> PG	147
5.3.5	Herstellung C-PEG- und C-PEG- <i>b</i> -PGA-funktionalisierter Nanopartikel	147
5.3.6	Herstellung C- <i>lin</i> PG und C- <i>hb</i> PG-funktionalisierter Nanopartikel	147
5.3.7	Herstellung Dopa-PEG-funktionalisierter Nanopartikel	148
5.3.8	Herstellung Ch- <i>lin</i> PG und TD-PEG ₅₇ -PGG ₁₂ funktionalisierter Nanopartikel	148
5.3.9	Herstellung Silica-funktionalisierter Nanopartikel	149
5.3.10	Herstellung C-PEG- <i>hb</i> PG funktionalisierter Nanopartikel und Nanodrähten	149
5.3.11	Herstellung MnO-C-PEG- <i>hb</i> PG-SiO ₂ und Pt@MnO-Ketten-C-PEG- <i>hb</i> PG- SiO ₂	150
5.3.12	Antikörperbindung an C-PEG- <i>b</i> -PGA-funktionalisierte NP.....	150
5.4	Zusammenfassung	151
6	Toxizität von biofunktionalisierten Nanopartikeln.....	153
6.1	Theorie.....	153
6.1.1	Einführung.....	153
6.1.2	Toxizität von Nanopartikeln.....	154
6.1.3	Die getesteten Nanopartikelsysteme	155
6.1.4	Verwendete Zelllinie	156
6.2	Ergebnisse und Diskussion.....	156
6.2.1	Zellkultur	156
6.2.2	Viabilitätsassays	157

6.2.3	Toxizität von MnO-Dopa-PEG.....	158
6.2.4	Toxizität der Polymere	159
6.2.5	Einfluss der Polymermenge auf die Toxizität	160
6.2.6	Toxizität von C-PEG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln	162
6.2.7	Toxizität von C- <i>lin</i> PG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln	163
6.2.8	Toxizität von Heterodimeren.....	164
6.3	Experimenteller Teil	167
6.3.1	Allgemeines	167
6.3.2	Kultivieren der Zellen.....	167
6.3.3	Passagieren der Zellen	167
6.3.4	Cytotoxizitätstests (AlamarBlue®)	168
6.4	Zusammenfassung.....	169
7	Zusammenfassung und Ausblick	171
7.1	Zusammenfassung.....	171
7.2	Ausblick	172
8	Material und Methoden.....	175
8.1	Chemikalien	175
8.2	Methoden	177
8.2.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	177
8.2.2	UV-Vis-Spektroskopie (UV-Vis).....	177
8.2.3	Pulverröntgendiffraktometrie (XRD)	177
8.2.4	Dynamische Lichtstreuung Zetasizer (DLS)	178
8.2.5	Winkelabhängige Dynamische Lichtstreuung (<i>w</i> DLS).....	178
8.2.6	Microwell Plate Reader für 96- <i>well</i> -Platten	179
8.2.7	Sterilfiltration.....	179
	Anhang.....	I
A.	Literaturverzeichnis.....	I
B.	Abkürzungsverzeichnis	VIII
C.	Abbildungsverzeichnis	XII
D.	Tabellenverzeichnis.....	XXI

Kapitel 1

Motivation

Die Behandlung von Krebs ist eine der größten Herausforderungen für die heutige pharmazeutische und medizinische Forschung. Krebs beschreibt die krankhafte Mutation einer Zelle, die u.a. die Befähigung verloren hat, den eigenen programmierten Zelltod (Apoptose) auszulösen. Die Teilung der Zellen erfolgt somit immer weiter, oft mit verringerter Kontaktinhibition (Stopp des Wachstums in eine Richtung durch vorhandenes Gewebe). Krebszellen werden daher als immortalisiert, als unsterblich angesehen. Durch voranschreitende, weitere Mutationen ist es schließlich selbst für das körpereigene Abwehrsystem, das Immunsystem, schwierig bis unmöglich, Krebs zu erkennen und zu bekämpfen. Als Folge tritt das großflächige Wachstum von Tumoren auf und durch dessen Wucherung die Verdrängung oder Zerstörung von gesundem Gewebe. Die Mutation kann viele Ursachen haben, wie genetische Prädisposition oder bestimmte Umwelteinflüsse. Die operative Entfernung eines Tumors, wenn möglich, führt oft nicht zur Heilung aufgrund von bereits erfolgter Metastasierung oder nicht vollständiger Entfernung des krankhaften Gewebes. Viele Behandlungsmethoden bringen eine hohe Belastung für den Patienten mit sich, so zum Beispiel sind die starken Nebenwirkungen von Chemotherapeutika zu nennen

und die teils hohe Strahlenbelastung bei gängigen diagnostischen Methoden. Die besten Chancen, die Krebserkrankung zu überleben bieten sich für den Patienten, wenn die Diagnose möglichst frühzeitig erfolgt. Hierzu müssen die diagnostischen Methoden verbessert werden, damit auch kleinste Zellwucherungen bereits erkannt und behandelt werden können. Ebenfalls kann durch Immuntherapeutika das Abwehrsystem unterstützt werden, Krebszellen zu erkennen und abzutöten. Es ist möglich eine gezielte Programmierung des Immunsystems spezifisch auf das erkrankte Gewebe zu erreichen, welches sonst nur noch vermindert als fremdartig erkannt wird. Durch Kombination mit gewöhnlichen Chemotherapeutika und sonstigen Therapien ist so eine Verbesserung der Behandlung ermöglicht worden. Die Problematik, dass Therapeutika global auf den Organismus wirken, erschwert dennoch die Genesung des Patienten. Dies kann in gewissem Maße umgangen werden, wenn ein nanopartikuläres Transportsystem mit spezifischen Zielvektoren verwendet wird, welches den Wirkstoff idealerweise zum Großteil erst im erkrankten Gewebe freisetzen kann. Die Dimensionen solcher Nanosysteme sind gering genug, dass sie sich in den kleinsten kapillaren Gefäßen des Organismus bewegen können und somit ungehindert zum adressierten Ort gelangen können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung dieser Systeme, die bestimmte Voraussetzungen erfüllen müssen: Gezielter Transport potenter Krebs- und Immuntherapeutika durch angebrachte Zielvektoren auf der Oberfläche bei gleichzeitiger niedriger Toxizität und hoher Serumstabilität. Hierzu bieten sich funktionalisierbare Polymere an, welche beide Hauptvoraussetzungen erfüllen können: Eine hohe Biokompatibilität und die Möglichkeit Zielstrukturen und Therapeutika zu binden. Zusätzlich zum zielgerichteten Wirkstofftransport werden Nanopartikel heute zur Kontrasterhöhung in tomographischen Methoden verwendet, wodurch die Diagnostik deutlich verbessert wird und die Untersuchungsdauer und Strahlenexposition auf ein geringeres Maß angepasst werden kann. Diese multifunktionalen, nanopartikulären Systeme bieten vielversprechende, neue Wege in der Krebstherapie. Die dazu erforderliche Grundlagenforschung zur Erschaffung eines solch stabilen, funktionellen und nicht-toxischen Systems ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Nanopartikel

2.1.1 Allgemeines

Der Begriff Nanopartikel umfasst im Allgemeinen die Zusammenlagerung mehrerer 100 bis 1000 Atome zu einem Festkörper, dessen Ausmaße 100 nm nicht übersteigt. Diese Richtlinie wird allerdings nicht als absolute Definition gesehen. So werden zum Teil in der medizinischen und pharmazeutischen Anwendung Partikelsysteme im Bereich von 100 nm bis 1 μm ebenfalls mit dem Präfix „nano“ beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass ein Nanopartikel zwar sehr viel kleiner als der makroskopische Festkörper (Bulk) des jeweiligen Materials ist, aber dennoch die Dimensionen von Molekülen um ein Vielfaches übersteigt, ergeben sich physikalische und chemische Eigenschaften, die weder denen der Moleküle, noch denen des Bulks entsprechen. Gerade bezogen auf den Übergangsbereich zwischen Molekül und Festkörper sind die elektronischen Eigenschaften der Nanopartikel zu erwähnen. Da keine definierten Energieniveaus mehr und noch keine komplett ausgebildeten Bandstrukturen existieren, kommt es zu größenabhängigen Quanteneffekten (engl.: *quantum*

size effects).^[1] So sind zum Beispiel die optischen Eigenschaften von Nanopartikeln wie die größenabhängige Verschiebung der Plasmonenresonanz bei Goldpartikeln bekannt.^[2] Die große spezifische Oberfläche eines nanopartikulären Materials ist ebenfalls für veränderte Eigenschaften verantwortlich, da die Oberflächenenergien enorm hoch sind und damit die Reaktivität um ein Vielfaches gesteigert ist. Hieraus resultieren oberflächenabhängige Partikeleigenschaften, wie der höhere Stoffumsatz bei der Anwendung von Partikeln als Katalysatoren^[3] oder der Lotuseffekt^{[4], [5]} bei schmutzabweisenden Oberflächen. Des Weiteren sollen die rein größen-abhängigen Eigenschaften nanopartikulärer Materialien erwähnt werden: Durch die sehr geringen Abmessungen können zum Beispiel bei Beschichtungen mit Nanopartikeln besondere Interferenzeffekte erzielt werden, wie zum Beispiel in *Bragg-stacks* und photonischen Kristallen.^{[6], [7]} Ebenso sind die magnetischen Eigenschaften metallischer oder metalloxidischer Nanopartikel zu nennen, da sich der weiter unten genauer beschriebene Effekt des Superparamagnetismus (SPM) besonders in der biomedizinischen Anwendung, wie zum Beispiel der Magnetresonanztomographie (MRT), ausnutzen lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wird hauptsächlich auf metalloxidische Partikel eingegangen, deren SPM kombiniert mit einem gezielten Wirkstofftransport *in vivo* ausgenutzt werden soll. Diese Art der Anwendung macht es essentiell, dass die Partikelsysteme im wässrigen System „löslich“ sind. Wird von Nanopartikellösungen gesprochen, ist damit generell keine Lösung, wie sie von ionischen oder polaren/apolaren Verbindungen bekannt ist, gemeint, da die Größe der Partikel eine wirkliche Lösung unmöglich macht. Vielmehr ist es richtig, in einer Flüssigkeit verteilte Nanopartikel als Dispersion zu bezeichnen. Die Oberfläche der Partikel kann hierbei allerdings effektiv funktionalisiert sein. Sie kann Moleküle tragen, die ihrerseits im polaren oder unpolaren Medium löslich sind, sodass die Partikeldispersion als stabil oder kontinuierlich bezeichnet wird. Die in dieser Arbeit vorgestellten nanopartikulären Systeme entstammen ausschließlich aus der Synthese durch thermische Zersetzung, bei welcher das Partikel die erwähnte unpolare Hülle aus Molekülen reaktionsbedingt erhält. Im Weiteren wird genauer auf die Herstellung der Partikelsysteme eingegangen.^[8]

2.1.2 Synthese durch thermische Zersetzung

Die thermische Zersetzung, hier eine Flüssigphasensynthese, ist eine sogenannte *bottom-up*-Methode, im Gegensatz zur *top-down*-Methode, bei der durch Mahl- oder Ablationsprozesse ebenfalls Material im Nanometerbereich erhalten wird, allerdings in hoher Polymorphie/Polydispersität und ohne die erwähnten Oberflächenmoleküle. Bei der *bottom-up*-Methode ist es essentiell, das Wachstum eines Keims zum Partikel abzufangen, bevor das Material in den Bulk-Bereich wächst. Entropisch ist es um ein Vielfaches günstiger, einen ausgedehnten Festkörper zu bilden als mehrere kleine Partikel. Hierfür stehen während der Synthese im hochsiedenden, organischen Lösungsmittel die *capping agents* (organische, langkettige Moleküle) zur Verfügung, die sich nach Bildung der Keime um die wachsenden Partikel anordnen. So wird ein Zusammenwachsen und eine Zusammenlagerung (Agglomeration) verhindert. Ebenfalls ist durch die *capping agents* die Form der Partikel kontrollierbar. Die thermische Zersetzung eines metallischen Vorläufermoleküls (Precursor) findet meist zusammen mit einer Reduktion oder Oxidation des Metalls statt. Das Reaktionsgemisch zeigt oft eine starke farbliche Veränderung, sobald die Keimbildung eingesetzt hat (z.B. tiefe Schwarzfärbung bei der Bildung von Platinpartikeln). Am Ende der Synthese wird das Gemisch noch eine bestimmte Zeit bei hoher Temperatur (200 bis 300°C) gehalten, um einerseits die vollständige Zersetzung des Precursors zu garantieren und andererseits den Prozess der Ostwaldreifung ablaufen zu lassen. Hierbei handelt es sich um das energetisch getriebene Phänomen, dass sich kleinere Partikel zu Gunsten größerer wieder auflösen und die gelösten Stoffe auf die größeren Partikel aufwachsen. Bis zu einem gewissen Zeitpunkt wird so der Erhalt hochmonodisperser Proben begünstigt. Wird allerdings die Synthese nicht abgebrochen, wachsen die Partikel weiter und die Dispersität nimmt zu.

2.1.3 Modell zu Keimbildung und Keimwachstum

Entwickelt im Jahr 1950 von LaMer und Dinegar beschreibt das Modell den Mechanismus der Bildung von monodispersen kolloidalen Dispersionen. ^[9] *Abbildung 1* zeigt das dazugehörige Diagramm.

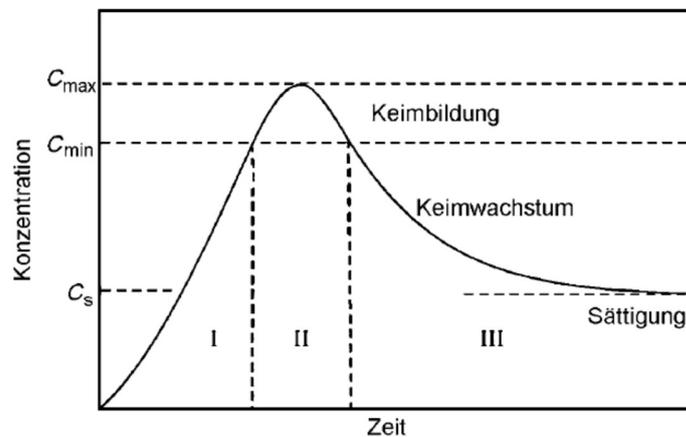


Abbildung 1: Modell von LaMer und Dinegar zur Unterscheidung der Phasen der Keimbildung und des Keimwachstums.^[8]

LaMer geht davon aus, dass die Bildung von Keimen in Lösung ein endothermer Prozess ist, da unter anderem Solvations- und Bindungsenergien überwunden werden müssen. In *Abbildung 1* ist dieser Prozess der Bindungsspaltung der Ausgangsmoleküle in Phase 1 dargestellt. In dieser Phase steigt die Konzentration der gebildeten Monomere, bis sie einen Schwellenwert erreicht, der mit C_{\min} im Diagramm gekennzeichnet ist. Ab diesem Punkt ist es möglich, dass sich Keime bilden, zu sehen in Phase 2 ab C_{\min} bis C_{\max} . Fällt dadurch die Monomerkonzentration wieder unter C_{\min} , setzt die Wachstumsphase, Phase 3, ein. LaMer fordert diese Trennung von Keimbildung und Keimwachstum für die Entstehung monodisperser Partikel. Beeinflusst werden kann dies durch die Induktion einer schlagartig einsetzenden Keimbildung, möglich zum Beispiel durch die Heißinjektionsmethode entwickelt von Murray *et al.*^[10] Hier wird das Lösungsmittel aufgeheizt und per Injektion eine Precursorlösung zum Gemisch gegeben. Ebenfalls kann durch langsames Aufheizen der Precursorlösung eine allmähliche Übersättigung an Monomeren erreicht werden, die sofort in die Keimbildung übergeht. Voraussetzung für das weitere monodisperse Wachstum der Keime sind die im Reaktionsgemisch vorhandenen *capping agents*, die die wachsenden Keime abfangen und formkontrollierend wirken.

2.2 Nanomagnetismus

Eine wichtige größenabhängige Eigenschaft von Nanopartikeln ist der Magnetismus. Während Festkörper als Bulk gewöhnlich in die Kategorien des Paramagnetismus und Diamagnetismus eingeordnet werden, unterschreiten Partikel ab einer bestimmten Größe das sogenannte superparamagnetische Limit und das Einzeldomänenlimit. Die dadurch ausnutzbaren Effekte werden im Folgenden vorgestellt.

2.2.1 Superparamagnetismus

Unter den besonderen Formen des Magnetismus von Nanopartikeln soll hier der Superparamagnetismus (SPM) vorgestellt werden. Wird ein ferro- oder ferrimagnetischer Festkörper so weit verkleinert, dass seine Ausmaße unterhalb des stoffspezifischen Einzeldomänen-Limits liegen, besteht das entsprechende Partikel aus einer einzigen magnetischen Domäne. Des Weiteren wird es für die Spins mit Unterschreiten einer bestimmten Partikelgröße möglich, frei die Orientierung zu wechseln. Erklärbar ist dies durch die folgende Betrachtung: Die magnetische Anisotropieenergie pro Partikel $E(\Theta)$ verhält sich proportional zur Anisotropiekonstanten multipliziert mit dem Partikelvolumen $K_a V$. Diese Energiebarriere verhindert ein freies Bewegen der magnetischen Spins. Wird die Partikelgröße in einem Maße verringert, sodass sich $K_a V$ der, für gewöhnlich deutlich niedrigeren, thermischen Energie $k_b T$ annähert, kann die Energiebarriere überwunden werden und die Spins können sich frei orientieren. Die erforderliche Partikelgröße stellt das superparamagnetische Limit dar. Dadurch verhält sich eine Ansammlung von solchen Partikeln als Paramagnet, weist jedoch eine hohe Magnetisierung beim Anlegen eines externen Feldes auf. Charakteristisch ist die sigmoidale Magnetisierungskurve. Diese zeigt allerdings keine Hysterese, da die einzelnen Atome innerhalb des Partikels ihren geordneten Zustand zueinander beibehalten. Ebenfalls wird bei der Entfernung des externen Feldes keine Remanenzmagnetisierung erhalten. SPM liegt in einem Temperaturbereich oberhalb

einer Blockierungstemperatur T_B vor, da die Partikel sich im angelegten Feld frei ausrichten können. Da sich die Partikel in diesem Zustand wie paramagnetische Spins mit einem magnetischen „Supermoment“ verhalten, wird von Superparamagnetismus gesprochen. ^[11] Die prominentesten super-paramagnetischen Nanopartikel sind die SPIONs (engl.: superparamagnetic iron oxide nanoparticles). Zusätzlich zu ferromagnetischen Materialien wie Eisenoxid ist SPM allerdings auch bei klassischen Paramagneten festgestellt worden. Wird ein solches Material unterhalb des superparamagnetischen Limits auf die magnetischen Eigenschaften untersucht, kann die typische Magnetisierungskurve beobachtet werden. Für MnO-Nanopartikel wurde beispielsweise ein signifikanter SPM berichtet, resultierend aus der großen Zahl an unkompensierten Oberflächenspins der Partikel. ^[12] Im Vergleich zu SPIONs weisen MnO-Nanopartikel allerdings ein sehr viel schwächeres magnetisches Supermoment auf. Gerade dieser Befund macht sie zu einem idealen T_1 -Kontrastmittel in der MRT, worauf im Weiteren genauer eingegangen wird. ^[13]

2.3 Tomographische Methoden

2.3.1 Magnetresonanz-Tomographie (MRT)

Die MRT beruht auf dem Prinzip der kernmagnetischen Resonanz (NMR) und ist ein bildgebendes Verfahren zum Darstellen von Schnittbildern des untersuchten Gewebes im Organismus. Als nicht-invasive Methode bietet sie vielversprechende Möglichkeiten in der Früherkennung von Tumoren und deren Metastasen. Die grundlegenden physikalischen Prinzipien werden im Folgenden kurz erläutert.

2.3.1.1 Physikalische Grundlagen

Die Protonenspins (^1H) des untersuchten Gewebes liegen ohne angelegtes Magnetfeld statistisch orientiert vor. Wird ein Feld B_0 angelegt, richten sie sich parallel oder antiparallel

danach aus. Die parallele Ausrichtung ist hierbei energetisch stabiler, was zu einer Magnetisierung M_z (B_0 -Achse) führt, wodurch die Messmethode erst möglich wird. Die Kerne präzidieren dabei mit der Lamorfrequenz ω um die Achse von B_0 . Wird orthogonal zu B_0 ein zweites Feld angelegt, für gewöhnlich in Form einer gepulsten Radiofrequenz, die der Lamorfrequenz entspricht, werden die Protonen aus der z-Richtung in die xy-Ebene gezwungen. Dadurch wird die Magnetisierung $M_z=0$ und $M_{xy}=\max$. Bei Entfernen des zweiten Feldes beginnen zwei Relaxationsprozesse und die Protonenspins bewegen sich zurück in z-Richtung. Als longitudinale Relaxation (T_1) wird hierbei der Prozess des Wiederaufrichtens des Spins betrachtet, als transversale Relaxation (T_2) der Verlust der Phasenkohärenz, also die wieder beginnende Präzessionsbewegung um die z-Achse. Bei dem im zweiten Fall vorliegenden Dephasieren wird die kleiner werdende Magnetisierung M_{xy} gemessen, beim Aufrichten der Spins die größer werdende Magnetisierung M_z . [14]

Die Bildgebung beruht auf den unterschiedlichen Relaxationszeiten der Protonenspins in verschiedenen Gewebearten des Organismus. Generell gilt, dass Gewebe mit hohem Wasseranteil einen höheren Kontrast liefern als solche mit geringerem Anteil. Zur Bildgebung wird das Gewebe in einen Magnetfeldgradienten gebracht. In Richtung dieses Gradienten verändert sich die Resonanz der Protonen aufgrund unterschiedlicher Feldstärken. Bei der NMR-Spektroskopie wird mit sehr viel höherer Auflösung gearbeitet, wodurch chemisch nicht-äquivalente Protonen unterschieden werden können. Da die Auflösung in der MRT niedriger ist, erscheinen alle Protonen bei derselben Frequenz. Das Resonanzsignal als Funktion der Frequenz ergibt die Protonenverteilung als Funktion des Ortes. [15] Verbessert werden kann die MRT durch Kontrasterhöhung. Hierzu werden Kontrastmittel eingesetzt, die die T_1 - und T_2^* -Relaxationszeiten der Protonen beschleunigen.

2.3.1.2 Kontrastmittel für die MRT

Werden die beiden Relaxationsmechanismen beschleunigt, wird eine Aufhellung des Bildes im Falle der T_1 -Zeit und eine Abdunklung im Falle der T_2^* -Zeit erhalten. Werden die angeregten Kerne durch lokale Magnetfeldinhomogenitäten beeinflusst und ihre longi-

itudinale Relaxation durch Spin-Spin-Wechselwirkung verkürzt, führt dies zur Signalauslöschung und somit zur Abdunklung des Bildes. Die magnetische Information des Kerns kann durch die Inhomogenität aufgenommen werden. Die hierfür nötigen T_2^* -Kontrastmittel müssen diese Inhomogenität erzeugen können, daher kommen nur Materialien mit einem hohen magnetischen Moment in Frage. Wie bereits erwähnt, eignen sich hierzu SPIONs. Durch sie wird ebenfalls die T_1 -Relaxation beeinflusst, allerdings nur schwach. Soll eine Aufhellung erzielt werden, eignen sich paramagnetische Materialien, wie zum Beispiel Gadoliniumkomplexe, Manganverbindungen und -komplexe, sowie Gadolinium markierte Partikelsysteme. ^{[16], [17], [18]} Diese können eine Spin-Gitter-Relaxation begünstigen, sobald sich ein angeregter Kern in räumlicher Nähe zur entsprechenden Verbindung befindet. Begründet liegt das in der Eigenschaft dieser Metallzentren, eine hohe Zahl an ungepaarten Elektronen aufzuweisen. Dadurch ist es möglich, das Wiederaufrichten des Protonenspins in Richtung des B_0 -Feldes zu beschleunigen. Aufgrund des sehr viel kleineren magnetischen Momentes im Vergleich zu SPIONs ist zwar ein leichter Effekt auf die T_2^* -Relaxation möglich, allerdings sehr gering ausgeprägt. Da Gadolinium und Mangan als freie Ionen im Organismus toxisch wirken würden, müssen sie als stabile Komplexe zum Einsatz kommen. Ein Nachteil hierbei ist, dass die für die T_1 -Relaxationsbeschleunigung nötige räumliche Nähe zum Metallzentrum eingeschränkt ist. Verbessert werden kann dies durch die Benutzung von biokompatiblen superparamagnetischen MnO-Nanopartikeln. Durch die geringe Größe weist das (super-)paramagnetische Material eine hohe Zahl an unkompensierten Oberflächenspins auf, die idealerweise für eine Kontrasterhöhung sorgen. Zwar muss ein solches Partikel ebenfalls durch *capping agents* umhüllt und geschützt werden, doch anders als beim Metallkomplex liegt eine sehr viel größere Zahl an Atomen vor, die den Einfluss der ungepaarten Elektronen erhöhen.

Nettomagnetisierung bei para- und ferromagnetischen Nanopartikeln
bei Verringerung des Durchmessers

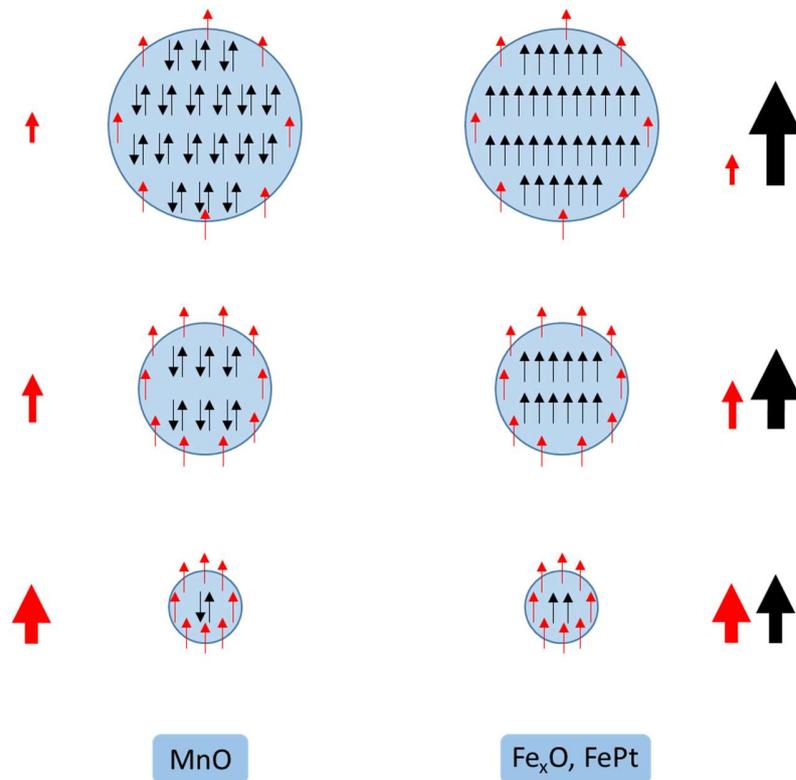


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nettomagnetisierung und der unkompensierten Oberflächenspins bei paramagnetischen (links) und ferromagnetischen Nanopartikeln (rechts) unterhalb des Einzeldomänenlimits und des SPM-Limits.

In *Abbildung 2* ist die schematische Darstellung von MnO-Partikeln als paramagnetische Substanz und eisenhaltigen Partikeln als ferromagnetisches Material gezeigt. In beiden Fällen nimmt die Anzahl der unkompensierten Oberflächenspins mit abnehmendem Partikeldurchmesser zu. Im Falle von MnO wächst dadurch das Nettomoment des Partikels (rote Pfeile), da das paramagnetische Material selbst keine Magnetisierung hat. Bei Eisenoxiden oder Eisenlegierungen verhält es sich umgekehrt: Trotz ebenfalls erhöhter Zahl an unkompensierten Spins fällt das Gesamtmagnetische Moment des Partikels, da weniger ferromagnetisches Material vorliegt (schwarze Pfeile). SPIONs bewirken daher bei

kleinerem Durchmesser etwas verschlechterte T_2^* -Zeiten verglichen mit größeren Partikeln des gleichen Materials und gleichzeitig leicht beschleunigte T_1 -Zeiten. ^{[17], [19]}

2.3.2 Computertomographie (CT)

Ebenfalls ein bildgebendes Verfahren, bei dem Schnittbilder der untersuchten Gewebe erhalten werden, ist die Computertomographie. Das Prinzip beruht auf der Röntgentomographie, bei der aus verschiedenen Richtungen Röntgenbilder aufgenommen werden und per Computer zu einem Schnittbild verrechnet werden. Röntgenstrahlung entsteht durch stark beschleunigte Elektronen, die auf Metallkerne hoher Masse treffen und dabei die charakteristische Röntgenstrahlung aussenden (Wellenlänge zwischen 10^{-8} und 10^{-12} m). Der Kontrast wird bei dieser Methode durch die Dichte der durchstrahlten Substanz beeinflusst. Je dichter das Gewebe, desto höher ist die Absorption der Strahlung und desto höher der Kontrast. Bei einer gewöhnlichen zweidimensionalen Röntgenaufnahme wird das Gewebe durchdrungen und der erhaltene Kontrast auf einem Schirm abgebildet. Hierbei kann zwischen zwei denkbaren Erklärungen für hohen Kontrast nicht klar abgegrenzt werden. Da die durchdrungenen Gewebe überlagert werden, kann der Kontrast durch hohe Dichte zustande kommen oder durch hintereinanderliegende Gewebe geringerer Dichte. Durch die Berechnung verschiedener Schnittbilder wird dieses Problem umgangen. Vorteil bei der Verwendung der CT sind die gute Darstellbarkeit von Knochenstrukturen und Frakturen und der vergleichsweise geringere Untersuchungsaufwand im Gegensatz zur MRT. Ein wesentlicher Nachteil gegenüber der MRT ist die Strahlungsbelastung des Patienten und die schlechtere Unterscheidung verschiedener weicher Gewebe. Die CT kommt daher nicht ohne Kontrastmittel aus, die Weichgewebe erst darstellbar machen. Ein Kontrastmittel für die CT muss somit eine hohe (Elektronen-)Dichte aufweisen um die Röntgenstrahlung genügend zu schwächen. Heutzutage hauptsächlich gebräuchlich sind hierfür ionische und nicht-ionische Iodverbindungen sowie Bariumsulfat. ^[20]

2.3.3 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Als dritte Tomographieart wird hier die PET vorgestellt und kurz erläutert. Wie der Name vermuten lässt, ist es eine Methode, die auf dem radioaktiven Zerfall eines Isotops und dessen Lokalisierung im Organismus beruht. Durch den β^+ -Zerfall des Nuklids und die Kollision dabei entstehender Positronen mit Elektronen entsteht Gammastrahlung. Es handelt sich dabei um hochenergetische Photonen die sich in einem Winkel von nahezu 180° voneinander entfernen und von zwei Detektoren aufgenommen werden. Dadurch ist die Lokalisierung des Zerfalls möglich. Die Detektion gestaltet sich aufgrund der hochenergetischen Gammastrahlung als schwierig, da diese kaum in Wechselwirkung mit Materie tritt. Ein weiteres Problem der PET ist die im Vergleich zur CT relativ geringe Ortsauflösung. Die Bildgebung der PET wird beeinflusst von verschiedenen Streueinflüssen, die durch Wechselwirkungen der Strahlung mit dem Gewebe oder der falsch-positiven Detektion verursacht werden. Da die PET im wesentlichen Gewebe hohen Stoffwechsels darstellt (hohe SUV-Werte, Abkürzung für *standardized uptake value*) und die CT einen hohen Gewebekontrast ermöglicht, wird heute fast ausschließlich die Kombination der PET/CT verwendet, neben der auch die PET/MRT bekannt ist. ^{[21], [22]} Durch die Kombination verbessert sich die Auflösung der Bildgebung maßgeblich. Wie bei der CT besteht für den Patienten eine Strahlenbelastung. Da die PET sowie die CT in der Krebsdiagnostik angewendet werden, muss eine Abwägung der Gefahren und Nutzen einer Untersuchung getroffen werden, die individuell auf den Patienten abgestimmt wird. ^[23]

2.4 Krebs

2.4.1 Definition

Der Begriff Krebs behandelt die krankhafte und unkontrollierte Wucherung von Zellen. Die Benennung erfolgte aufgrund des krebsartigen Aussehens eines Brusttumors. Bei der Krebserkrankung wird durch die Tumorbildung gesundes Gewebe aufgrund fehlender Kontaktinhibition verdrängt oder zerstört. Neben dem Wachstum solcher Tumoren ist die Verteilung im Organismus durch den Blutstrom möglich, was als Metastasierung bezeichnet wird. Hier lösen sich krankhafte Zellen vom eigentlichen malignen (bösartigen) Tumor ab, gelangen in den Blutkreislauf und können schließlich weitere Tumoren bilden. ^[24]

2.4.2 Krebsentstehung

Krebsgewebe besteht aus Zellen, deren Gleichgewicht zwischen Proliferation (Zellwachstum und Teilung) und Apoptose (programmierter Zelltod) zu Gunsten der Proliferation fehlreguliert ist. Unter anderem für die Regulation der Apoptose sind einige Enzyme zuständig, die ab einem bestimmten Alter der Zelle oder einem irreparablen Schaden den kontrollierten Abbau der Zelle einleiten. Die Genorte, auf denen diese Enzyme kodiert sind, werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Erfolgt an diesen Genorten eine Mutation, kann es zur Bildung uneffektiv arbeitender Tumorsuppressoren kommen und die Zelle teilt sich weiter, statt in die Apoptose zu gehen. Dadurch wird die Mutation an die Folgezellen weitergegeben. Als einer der wichtigsten Tumorsuppressoren wird das Enzym p53 angesehen. In über 50% aller Tumoren ist das Gen für p53 mutiert, und das eigentliche Enzym arbeitet nicht korrekt. Durch den Verlust der Befähigung der Zelle in die Apoptose gehen zu können, werden maligne Zellen als immortalisiert (unsterblich) bezeichnet. Ein weiteres Problem besteht in der Tatsache, dass das Immunsystem als Abwehrsystem maligne Zellen zwar aufspüren und bekämpfen kann, dies aber durch die nach wie vor körpereigenen Zellen erheblich erschwert wird. Wird eine Zellwucherung dadurch zu spät erkannt, ist es durch die

körper eigene Abwehr nicht mehr möglich, die Tumorbildung zu verhindern. Weiterhin kann Tumorgewebe nach einer bestimmten Zahl an Zellteilungen und weiteren Mutationen zusätzliche Eigenschaften „zum Schutz“ erlangen. So zum Beispiel kann ein Tumor eine eigene Blutversorgung aufbauen und ein immunsuppressives Milieu erschaffen (Immunevasion).

2.4.3 Krebsbehandlung

Die Krebstherapie wird oft durch die Kombination aus drei Hauptmethoden begonnen. Zum einen wird versucht, den Tumor operativ zu entfernen, wobei das Gewebe allerdings oft nicht vollständig entfernt werden kann oder vollständig inoperabel ist. Zusätzlich wird eine Chemotherapie angefangen, bei der durch die Gabe von Medikamenten mit oft hoher Nebenwirkung auch gesundes Gewebe betroffen ist. Ebenso bei der Strahlentherapie wird nicht malignes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen. Ein weiterer Ansatz kann über das Immunsystem erfolgen. Durch gezielte Vakzinierung (Impfung) wird dem Immunsystem „beigebracht“, welche Zellen angegriffen werden müssen. Das so ermöglichte Immunzell-*targeting* wird im Weiteren genauer behandelt (siehe Kapitel 5).

2.5 Biomedizinische Anwendung von Nanopartikeln

Anwendungen wie Wirkstofftransport, Bildgebung und Therapien von verschiedenen Krankheiten sind die bekanntesten biomedizinischen Einsatzorte für Nanopartikel. Die Kombination aus Therapie und Diagnostik – weithin bekannt als *Theranostik* – erlangt einen immer größer werdenden Stellenwert.^[25] Die in dieser Arbeit vorgestellten Nanopartikel und deren Funktionalisierung zielen auf eine möglichst effektive Kombination von Diagnostik und Therapie ab. Um die Prozesse und Hürden zu verstehen, die die angewendeten Partikel in einem Organismus nehmen müssen, werden einige wichtige Punkte hier kurz erläutert. Das Prinzip einen Wirkstoff im Körper gezielt zu einem bestimmten Kompartiment oder

Organ zu bringen, wird mit dem Begriff *cell targeting* beschrieben, was sinngemäß übersetzt „Ansteuern von Zellen“ bedeutet. Die Verwendung von Nanopartikeln als Wirkstoff- und Vektorträger (Vektor entspricht der adressierenden Substanz) verbessert die Effektivität des *cell targetings* signifikant. Durch die geringe Größe der Partikel ist einerseits der Transport durch die kleinsten Blutgefäße möglich, aber auch eine effektivere Bindung an die Zielzelle verglichen mit einem nicht-nanopartikulären Wirkstoff/Vektor-System zu vermerken. Dies ist begründbar durch folgende Überlegung: Nanopartikelgebundene Vektoren oder Zielstrukturen treten konsequenterweise in höherer Dichte mit der Zelle und deren Rezeptoren in Wechselwirkung als die Zielstruktur alleine. Dadurch wird der gewünschte Effekt auf die Zelle, wie die Aufnahme des Partikels oder das Auslösen einer Signalkaskade, um ein Vielfaches verstärkt. Es werden zwei Varianten nachfolgend diskutiert, die des passiven und des aktiven *cell targetings*.

2.5.1 Passives *cell targeting*

Beim passiven *cell targeting* werden Prozesse ausgenutzt, die nicht von spezifischen Strukturen auf der Nanopartikeloberfläche beeinflusst werden. Vielmehr ist das umgebende Milieu und Gewebe selbst ausschlaggebend für die beobachteten Effekte. Aufgrund eines Konzentrationsgradienten diffundieren Partikel aus dem Blutstrom (nach intravenöser Injektion) heraus in die extrazelluläre Matrix oder das Lymphsystem. Nach unspezifischer Bindung können solche Partikel in Zellen aufgenommen werden und sich dort ansammeln. Dieser Prozess ist offensichtlich nicht kontrollierbar und geschieht im Organismus im Mittel überall gleich häufig. Allerdings wird für Tumorgewebe eine bei weitem höhere Permeabilität und Diffusionsgeschwindigkeit berichtet als für gesundes Gewebe. Dieser Effekt wird EPR-Effekt genannt (engl.: enhanced permeability and retention). Der beschriebene Weg der diffundierenden Partikel läuft in Tumorgewebe somit schneller ab und führt zu einer höheren Anreicherung, die zu einer häufigeren Zellaufnahme der Partikel in solchen Gewebe führt.

Ebenfalls unter den Begriff des passiven *targetings* fällt die Bildung einer Proteinkorona um die injizierten Partikel.^[26] Die sich auf- und abbauende Hülle aus Serumproteinen führt zu einer Verschiebung der Partikeldiffusion in Richtung bestimmter Zellkompartimente, da durch partikelgebundene Proteine die Retention der Partikel in diesen Geweben erhöht ist. Im Vergleich zum EPR-Effekt ist die Proteinkorona eher kontraproduktiv, da die Partikel nicht wie gewünscht im Tumorgewebe angereichert werden.^[17] Dies macht deutlich, wie wichtig eine effektive Umhüllung der Partikel ist, um bestmöglich zu vermeiden, dass sich eine Proteinkorona bildet. Die Eigenart von Partikeln, die nicht stark oder idealerweise gar nicht von Serumproteinen umhüllt werden, wird als *stealth effect* (engl.: Tarnkappeneffekt) bezeichnet. Jüngste Forschungen zielen auf die Aufklärung der Bildung einer Korona und der Verbesserung des Tarnkappeneffektes ab.^[27] Die Erkennung und Aufnahme der Partikel durch das reticuloendotheliale System (RES; Umhüllung der Partikel durch Opsonine) zählt zusätzlich zum passiven *cell targeting*. Der dadurch ablaufende Prozess der Opsonisierung, also der Entfernung des fremdartigen Nanopartikels aus dem Blutstrom, unterstreicht die Notwendigkeit der Erschaffung eines *stealth effects*.^[28]

2.5.2 Aktives *cell targeting*

Im Gegensatz zum passiven *cell targeting*, welches nicht direkt beeinflusst werden kann, ist die aktive Variante eine Möglichkeit zum spezifischen *targeting* auf verschiedene Zellkompartimente. Während durch den EPR-Effekt zwar von einer stärkeren Ablagerung von Partikeln in Tumorgewebe ausgegangen werden kann, ist dennoch ein gezieltes *targeting* auf einzelne Gewebe nicht möglich. Da maligne Zellen oft eine deutliche Überexpression an bestimmten Rezeptoren aufweisen, stellen diese ideale Zielstrukturen dar. Durch die Anbringung von speziell zur Zielstruktur passenden Molekülen auf die Oberfläche der Nanopartikel können zwei Verbesserungen erreicht werden: Die Bindung der Partikel an Zellen mit überexprimierten Zielstrukturen ist viel höher als in gesundem Gewebe und die Aufnahme der Partikel ist durch die rezeptorvermittelte Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade wahrscheinlicher als bei unspezifischer Bindung. Solche speziellen Moleküle,

zur Anbringung auf Nanopartikel sind zum Beispiel Folsäure, Antikörper, kleinere Proteine und DNA/RNA-Fragmente. ^[29] Weiterhin ist bei aktivem *cell targeting* die eigentliche Anwendung des Partikels, wie Wirkstofftransport, molekulares *imaging* oder Hyperthermie im Gegensatz zum passiven *targeting* deutlich verbessert. ^[30] Der Wirkstoff wird direkt am Wunschort freigesetzt und die hohe Anreicherung der Partikel im Gewebe wird für das *imaging* ausgenutzt.

Kapitel 3

Isotrope Nanopartikel

3.1 Theorie

3.1.1 Einführung

Seit mehreren Jahrzehnten ist die Verwendung symmetrischer, isotroper Nanopartikel gebräuchlich. Vielfältige Einsatzgebiete existieren: Oberflächenbeschichtungen (Lotuseffekt, Anti-Fouling), magnetische Flüssigkeiten, magnetisch schaltbare Partikel, Sonnencremes, Katalysatoren, um nur einige zu nennen. Eines der wohl interessantesten Gebiete ist das der biomedizinischen und pharmazeutischen Anwendung. Hier sollen die Partikel und deren physikalische und chemische Eigenschaften ausgenutzt werden, um in einem Organismus bestimmte Orte anzusteuern und dort eine bestimmte Aufgabe zu erfüllen. Im Allgemeinen wird dies als passives und aktives *cell targeting* bezeichnet, wie bereits in Kapitel 2 beschrieben. Hierfür ist die Verwendung von isotropen Nanopartikeln die simpelste Methode, da symmetrische Partikel am einfachsten möglichst monodispers herzustellen und

homogen zu funktionalisieren sind. Die erforderliche Biofunktionalisierung, in Kapitel 5 beschrieben, ist mit den hier vorgestellten Partikeln reproduzierbar durchzuführen.

3.1.2 Ausnutzung physikalischer Eigenschaften prominenter Nanopartikel

Heutzutage sind vor allem drei Partikelarten hauptsächlich bekannt. Neben den „Quantum Dots“ sind wohl Goldnanopartikel die gebräuchlichsten. Hier wird besonderes Augenmerk auf die Ausnutzung deren Oberflächenplasmonenresonanz gelegt und dabei die relativ niedrige Toxizität ausgenutzt, um Goldpartikel in biomedizinischen Aufgabenstellungen beispielsweise zum dualen *imaging* zu verwenden. Hervorzuheben ist hier der Vorteil, dass recht kleine Größen (unter 10 nm) relativ einfach zu erreichen und monodisperse Nanopartikel in hohen Ausbeuten zu erhalten sind. Goldnanopartikel sind heutzutage für verschiedenste Anwendungen kommerziell erhältlich, so zum Beispiel funktionalisiert mit Polymeren wie PEG und/oder gekoppelt an bioaktive Moleküle wie spezifische Antikörper. Im letzteren Fall wird beim *cell targeting* ausgenutzt, dass die Partikel sich um oder im betreffenden Gewebe ansammeln und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen wie TEM oder Cryo-TEM einen sehr hohen Kontrast bieten.

Eine zweite Partikelart, die ebenfalls aufgrund ihrer nicht bzw. kaum vorhandenen Toxizität oft genannt wird, ist die der Silicapartikel. Diese bestehen aus einem Netzwerk aus kondensierten Kieselsäuren, welches biokompatibel ist und keine toxischen Schwermetallionen enthält. Silicananopartikel finden daher oft Anwendung im Wirkstofftransport bei aktivem und passivem *cell targeting*. Sie können aufgrund ihrer amorphen Struktur porös gestaltet werden, was die einfache Aufnahme und Abgabe eines Wirkstoffes ermöglicht. Gleichzeitig kann unter Anbindung einer zweiten Struktur auf die Oberfläche ein gezielter Transport garantiert werden. ^{[31], [32]} Als besondere Form ist hier die Umhüllung von Nanopartikeln mit SiO₂ zu nennen, nach welcher ein Partikel nach außen hin Silica zeigt, aber die Eigenschaften des Kerns weiterhin relativ uneingeschränkt genutzt werden können. Solche Partikel sind meist Metalloxide, wobei Eisenoxid wohl das prominenteste Beispiel ist.

Fe_3O_4 - oder $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikel sind ebenfalls etablierte Kandidaten, die den Weg in die klinische Anwendung gefunden haben. Oft als „SPIONs“ (engl.: superparamagnetic iron oxide nanoparticles) bezeichnet, ergibt sich bereits aus dem Namen die bevorzugte Ausnutzung der magnetischen Eigenschaften. ^[33] Wie in Kapitel 2 erläutert, werden die superparamagnetischen Eigenschaften in der MRT ausgenutzt, wobei Eisenoxid durch die Erschaffung lokaler Magnetfeldinhomogenitäten eine Verkürzung der T_2^* -Relaxation schafft, wodurch Gewebe mit SPIONs im resultierenden Schnittbild der MRT dunkler erscheinen als Gewebe ohne Nanopartikel. Bei SPIONs ist ein schlechterer Einfluss auf die T_2^* -Relaxation zu verzeichnen, wenn der Partikeldurchmesser reduziert wird, da hier das magnetische Moment des ferromagnetischen Materials abnimmt.

3.1.3 Manganoxidnanopartikel

Die beschriebenen drei wohl bekanntesten Nanopartikelarten isotroper Form können durch eine Reihe verschiedener, anderer Partikelsysteme ergänzt werden, die im Folgenden behandelt werden. So zum Beispiel stellen Manganoxidnanopartikel (MnO) eine in der MRT einsetzbare Alternative für gängige Gadoliniumkomplexe dar. Mit diesen Komplexen wird die T_1 -Relaxation beschleunigt und damit eine Aufhellung des Gewebes erzielt. MnO eignet sich aufgrund seines Superparamagnetismus dazu, vergleichbar mit Eisenoxid. Im Gegensatz zu diesem kann MnO aufgrund fehlender ferromagnetischer Eigenschaften allerdings keine Inhomogenität im Magnetfeld erzeugen, eine Spin-Spin-Relaxation (T_2) kann also durch MnO nicht erfolgen, da das gesamt-magnetische Moment nicht hoch genug ist. Die T_1 -Relaxation, welche auf der Spin-Gitter Relaxation beruht, wird allerdings bedeutend durch die unkompensierten Oberflächenspins des Manganoxids beeinflusst. Deren Zahl wird mit abnehmender Partikelgröße relativ zum Volumen größer. Kleinere MnO-Partikel weisen somit ein höheres magnetisches Moment auf als größere, womit kleinere Partikel zu einer effektiveren Beschleunigung der T_1 -Relaxation führen. Vergleichbar mit den Gadoliniumkomplexen, welche zum gleichen Zweck ausgenutzt, ungepaarte Elektronen aufweisen, stellen MnO-Nanopartikel eine vielversprechende Alternative als

T_1 -Kontrastmittel dar. ^[12] Die Partikel werden in einer Synthese durch thermische Zersetzung hergestellt, in welcher ein Manganprecursor in einem hochsiedenden organischen Lösungsmittel bei hohen Temperaturen (250-300°C) zersetzt wird. Die Partikel werden in ihrem Wachstum von einem *capping agent* stabilisiert. Dieser ist für Manganoxid idealerweise Ölsäure. Um in der Synthese Precursor und *capping agent* gleichzeitig zur Verfügung zu stellen und keine anderen störenden Gegenionen wie z.B. Cl^- oder $(\text{acac})^-$ zu haben, wird das Metallion vorher mit der Ölsäure komplexiert und dadurch ein Mangan(II)-Oleat Komplex erhalten. ^[34] Die Verwendung dieses Komplexes vereinfacht die Synthese und verbessert die Morphologie der Partikel, was in *Abbildung 3* zu sehen ist.

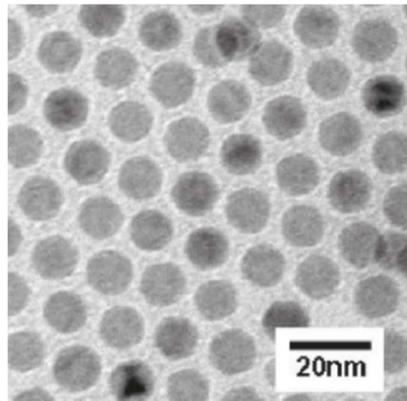


Abbildung 3: TEM-Aufnahme von Manganoxidnanopartikeln. ^[34]

3.1.4 Platin-Nanowürfel

Edelmetallnanopartikel finden Anwendung in Gebieten wie Elektronik ^[35], optischer Materialien ^[35], ^[36], Katalysatoren ^[37], aber auch in der Biomedizin ^[38]. Die Tatsache, dass Platin einen sehr hohen Röntgenstrahlenabsorptionskoeffizienten hat, macht Platin-Nanopartikel zu idealen Kandidaten für die Computertomographie. Voraussetzung für den Einsatz der Nanopartikel ist die Biokompatibilität. Während metalloxidische Partikel reaktive Sauerstoffspezies in einer Zelle bilden können, wird für Platin dieser Effekt weniger berichtet als die Eigenschaft DNA-Schäden zu induzieren. ^[39] Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit hauptsächlich Wert darauf gelegt, Platin-Nanowürfel zur keimvermittelten

Synthese von Heterodimeren wie Pt@MnO herzustellen, wie in Kapitel 4 berichtet wird. Da die Anwendung des Platins auf seiner physikalischen Eigenschaft beruht und nicht auf einer chemischen, für die die Oberfläche des Partikel hätte frei zugänglich sein müssen, kann das Platinpartikel mit einem Metalloxid teilweise umhüllt werden, ohne die Anwendbarkeit einzuschränken. Gleichzeitig werden aber Heterodimere und keine Kern-Schale-Strukturen hergestellt, um eine orthogonale Funktionalisierung zu ermöglichen. Bei dieser Art der Funktionalisierung werden die zwei, sich gegenüberliegenden, unterschiedlichen Oberflächen der Heterodimere mit verschiedenen Ankern angesteuert und besetzt. In diesem Kapitel soll auf die nötigen Voraussetzungen eingegangen werden, monodisperse Platinwürfel zu erhalten. Die Synthese ist vergleichbar mit der beschriebenen Synthese des MnO, eine Synthese durch thermische Zersetzung kombiniert mit der Heißinjektion die in einem organischen Lösungsmittel unter Verwendung eines Metallprecursors und passender *capping agents* durchgeführt wird. Als Precursor wird Platinacetylacetonat (Pt(acac)₂) verwendet und als *capping agent* ein Gemisch aus Ölsäure und Oleylamin. Hierbei ist das Oleylamin der für das eher Pearson-weichere Platin, wichtigere *capping agent*. Ölsäure ist bei der Herstellung von Platinwürfeln nur ein formkontrollierender Faktor aufgrund der schwächeren Bindungsfähigkeit der Carboxylgruppe zur Platinoberfläche. Wird keine Ölsäure verwendet, wachsen die Partikel in sphärischer Morphologie. Ebenfalls essentiell für die LaMer geforderte schlagartige Keimnukleation ist eine Spurenmenge an Eisenpentacarbonyl (Fe(CO)₅).^[40] Wang *et al.* berichten von keiner messbaren Menge an Eisen in den gebildeten Partikeln, was die Schlussfolgerung zulässt, dass das Eisen nicht maßgeblich am Aufbau des Partikels beteiligt ist, sondern wohl durch Komplexbildung mit Oleylamin, lediglich die Keime bildet, an denen die Platinnukleation stattfindet. Zusätzlich wird in der Literatur berichtet, dass andere Metallcarbonyle oder sogar reines Kohlenmonoxid als Gas den gleichen kontrollierenden Effekt erzielen, was die Vermutung aufkommen lässt, dass das Carbonylmolekül selbst den beobachteten Effekt bewirkt.^[41] Im Rahmen dieser Arbeit wurde Eisenpentacarbonyl als Initiator gewählt. *Abbildung 4* zeigt die nach von Wang *et al.* beschriebenen Methode dargestellten, monodispersen Platin-Nanowürfel. In diesem Kapitel wird eine leicht veränderte Methode beschrieben, um Platin-Nanowürfel für das keimver-

mittelte Aufwachsen von Manganoxid zu erhalten. In *Abbildung 5* ist die Synthese von Platinpartikeln unter Verwendung von Spuren Mengen $\text{Fe}(\text{CO})_5$ dargestellt.

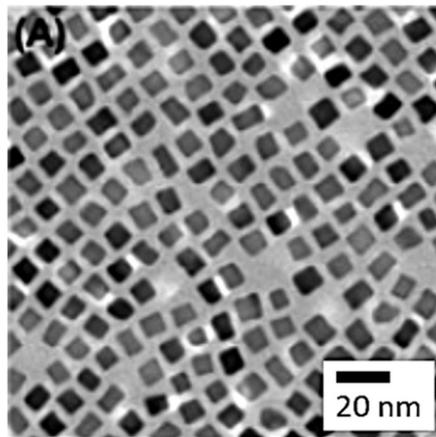


Abbildung 4: TEM-Aufnahme von Platin-Nanowürfeln nach Wang *et al.* [40]

3.1.5 Eisen-Platin-Nanowürfel

Für eine Kombination aus magnetischen und katalytischen Eigenschaften bietet sich die Legierung aus Eisen und Platin, im weiteren FePt genannt, an. [38] Der biomedizinische Einsatz in der MRT aufgrund des vorhandenen Superparamagnetismus in Kombination mit der CT aufgrund der Elektronendichte des Platins ist ebenfalls möglich. Zwar sind sie, bezogen auf die HU-Werte (engl.: Hounsfield units) von gebräuchlichen Iodverbindungen, erst bei hohen Konzentrationen von 100 mM vergleichbar effektiv, doch kann die Toxizität durch ihren Einsatz geringer sein. [42] Für FePt-Nanopartikel wird auch von der Funktion als Eisenreservoir berichtet und die dadurch ermöglichte kontrollierte Eisensfreisetzung im Organismus. Da die hergestellten FePt-Partikel eine ungeordnete *fcc* Struktur aufweisen, ist es leichter, Eisenionen bei niedrigen pH-Werten herauszulösen, als aus Partikeln mit geordneter *fcc* Struktur. Werden nun die FePt-Partikel mit einem Molekül versehen, welches die Partikel zum aktiven *cell targeting* befähigt, kann beispielsweise Tumorgewebe angesteuert werden und dort nach Zellaufnahme und Erreichen des Lysosoms (Zellorganell

niedrigen pH Werts) kontrolliert Eisen abgegeben werden. Hierdurch kann die Zersetzung von H_2O_2 in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) katalysiert werden (Fenton-Reaktion), welche das Gewebe zerstören. ^[43] Die *fcc* Struktur ist über Behandlung bei hohen Temperaturen (über 550°C) zu erreichen und resultiert in Partikeln mit einem größeren magnetischen Moment verglichen mit der *fcc* Struktur. ^[44] Die Synthese der FePt-Nanowürfel ist in fast allen Punkten der der Platinwürfel entsprechend. Wichtig ist hier allerdings die Reihenfolge der zugegebenen *capping agents*. Der Platinprecursor formt aufgrund der kubischen Struktur würfelförmige Keime, die von Ölsäure eher schwach besetzt werden. Der Eisenprecursor tendiert dazu sich auf der [100]-Fläche abzusetzen, was zum weiteren würfelförmigen Wachstum führt. Ist von Beginn an Oleylamin vorhanden, bildet dieses Komplexe mit dem Platin und es werden sphärische Partikel erhalten. ^[45] Ein weiterer Unterschied ist die äquimolare Verwendung des Initiators $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Zwar ist das Eisencarbonyl hier, wie auch bei reinen Platinwürfeln, formkontrollierend, führt aber in größeren Mengen zu einer statistischen Verteilung der Fe-Atome im Platinkristall. *Abbildung 5* zeigt die Herstellung der FePt-Nanowürfel unter Zersetzung der Precursor-moleküle. Eine TEM-Aufnahme von FePt-Würfeln ist in *Abbildung 6* gezeigt.

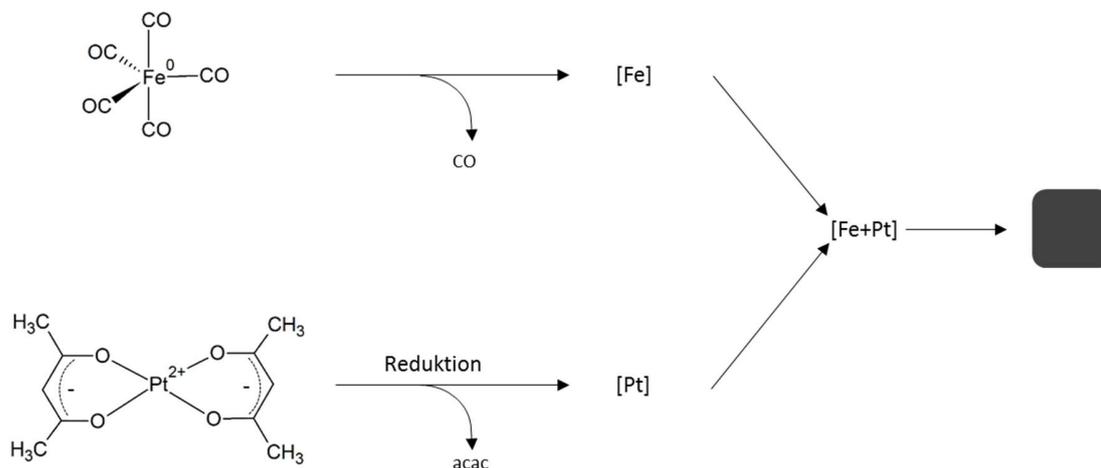


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung von Platin- bzw. FePt-Nanowürfeln unter Verwendung der beiden Precursormoleküle $\text{Pt}(\text{acac})_2$ und $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Die verwendete Menge des Eisencarbonyls liegt im äquimolaren Verhältnis zum Platin-Precursor für FePt- und im Spurenbereich für Platinwürfel. Abbildung angepasst nach Liu *et al.* ^[38]

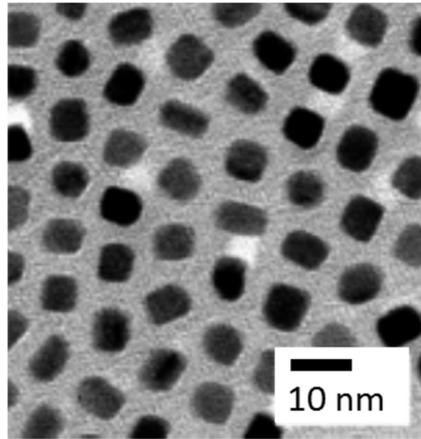


Abbildung 6: TEM-Aufnahme von FePt-Nanowürfeln nach Schladt *et al.* [46]

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Herstellung von Manganoxidnanopartikeln (MnO)

Die literaturbekannte Synthese der MnO-Nanopartikel [34] aus Mangan(II)-Oleat wurde in dieser Arbeit angewendet um monodisperse MnO-Partikel herzustellen, die später als Keime für die in Kapitel 4 vorgestellten Pt@MnO- oder FePt@MnO-Heterodimere fungieren. Eine Größenkontrolle wurde über gezieltes Ansteuern einer Höchsttemperatur während der Synthese in 1-Octadecen erreicht. So wurden ca. 19 nm große Partikel bei einer Temperatur von 317°C erhalten und entsprechend kleinere Partikel bei niedrigeren Temperaturen, wie zum Beispiel ca. 10 nm große Partikel bei 250°C Höchsttemperatur. Bei der Herstellung von 19 nm großen Partikeln konnte ein Effekt während der Synthese beobachtet werden, der oft ein Indiz für hoch monodisperse Partikel war. So konnte bei erreichter Höchsttemperatur eine grünliche Färbung ohne Trübung des Reaktionsgemisches festgestellt werden, wie in *Abbildung 7* gezeigt. Beim Abkühlen wurde die Lösung wieder braun, wie zu Beginn der Keimbildung der Nanopartikel. Dieser Effekt trat nicht immer auf und konnte noch nicht aufgeklärt werden.



Abbildung 7: Aufnahme der Synthese von MnO-Nanopartikeln nach Erreichen der Höchsttemperatur von 317°C. Die klare Lösung mit grünlicher Färbung ist oft ein Zeichen für eine hochmonodisperse Probe.

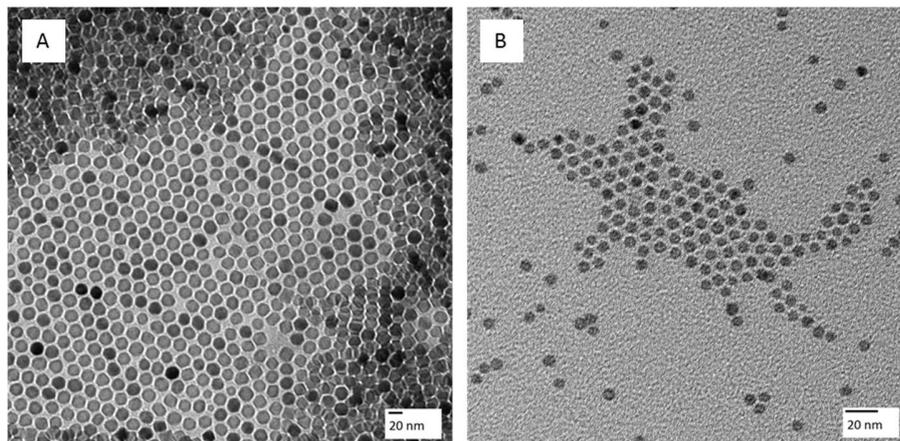


Abbildung 8: TEM-Aufnahme von (A) ca. 19 nm MnO-Nanopartikeln und (B) ca. 8 nm MnO-Nanopartikeln.

In *Abbildung 8 A* und *B* sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von MnO-Nanopartikeln unterschiedlicher Größen gezeigt. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie wurde bestätigt, dass es sich bei den Partikeln um phasenreines MnO handelt (*Abbildung 9*). Das Diffraktogramm zeigt die charakteristischen Reflexe von Manganoxid, welches in NaCl-Struktur in der Raumgruppe $Fm-3m$ kristallisiert. ^[47]

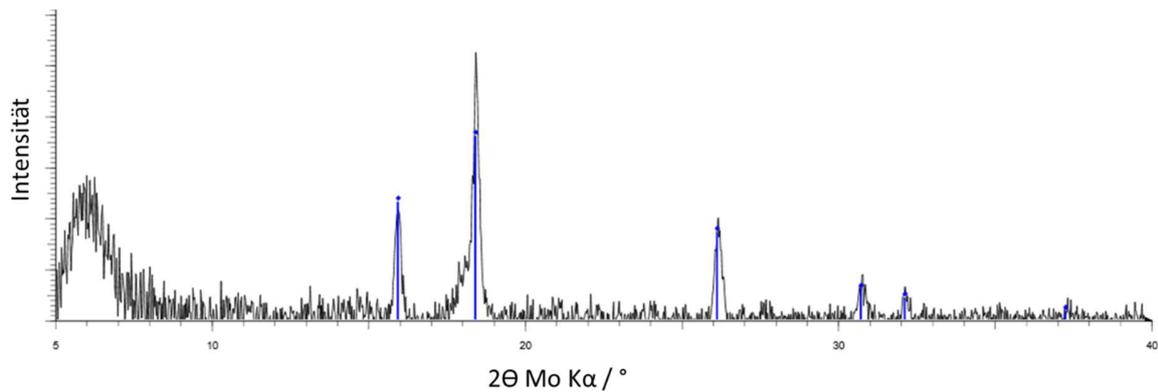


Abbildung 9: Pulverröntgendiffraktogramm von MnO-Nanopartikeln.

3.2.2 Herstellung von Platin-Nanowürfeln

Bei der Herstellung von Platinwürfeln musste die genaue Menge des Initiators $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ermittelt werden, da in der Literatur nur ungenaue Angaben gemacht werden, die Synthese aber sehr empfindlich auf Eisencarbonyl reagiert. Wird zu wenig Eisencarbonyl benutzt, wird keine schlagartige Keimbildung induziert, was zu polydispersen Partikeln führt. Wird eine zu hohe Menge verwendet, nähert sich die Zusammensetzung der Partikel der der FePt-Würfel an. Nach mehreren Testreihen wurde eine Menge von 50 μL einer 10-prozentigen Lösung des $\text{Fe}(\text{CO})_5$ in 1-Octadecen als ideal angesehen und für die Herstellung der Platinwürfel verwendet. In *Abbildung 10* ist eine TEM-Aufnahme monodisperser Platinwürfel gezeigt.

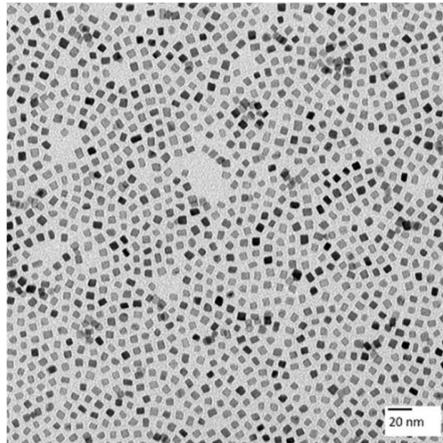


Abbildung 10: TEM-Aufnahme von ca. 5 nm Platinwürfeln.

Abbildung 11 zeigt das Pulverröntgendiffraktogramm von Platin-Nanopartikeln. Durch die Verfeinerung wurde eine Gitterkonstante von $3,906 \text{ \AA}$ ermittelt, welche durch die nanokristalline Form vom Wert der Bulkverbindung leicht abweicht ($3,998 \text{ \AA}$). Die ermittelte mittlere Größe der kohärent streuenden Bereiche der Partikel betrug $4,514 \text{ nm}$, was verglichen mit den TEM-Aufnahmen zeigt, dass nahezu alle Partikel monokristallin sind. Wesentlich ist hier die Tatsache, dass das Diffraktogramm keine Spuren von Eisen zeigt, was bewiesen werden sollte.

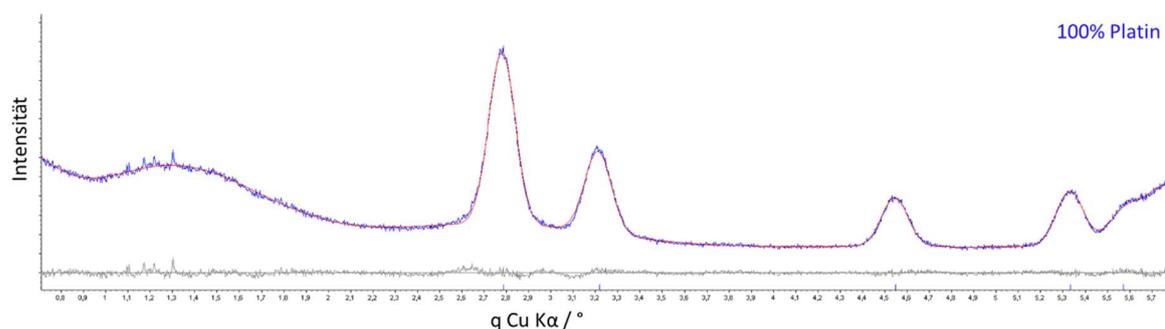


Abbildung 11: Pulverröntgendiffraktogramm mit Rietveldverfeinerung von Platin-Nanopartikeln (blau: Experiment, rot: Verfeinerung, grau: Differenz).

3.2.3 Herstellung von FePt-Nanowürfeln

Um anstelle von Platinwürfeln eine Legierung aus Eisen-Platin zu erhalten, muss die Synthese mit äquimolaren Mengen an $\text{Fe}(\text{CO})_5$ durchgeführt werden. Wie in 3.1.5 beschrieben muss dabei die Reihenfolge der zugegebenen *capping agents* eingehalten werden. Demnach erfolgte vor der Injektion des Carbonyls die Zugabe von Ölsäure und einen bestimmte Zeit nach Injektion die Oleylaminzugabe, um das Wachstum der FePt-Würfel positiv zu beeinflussen. Im Vergleich zu reinem Platin als Nanopartikel ist die hier zu erhaltene Form ebenfalls würfelförmig, jedoch mit stärker abgerundeten Ecken. Dies ist wohl eine Folge des enthaltenen Eisens, welches nicht zur kubischen Kristallisation neigt. *Abbildung 12* zeigt die TEM-Aufnahme der synthetisierten FePt-Würfel, zu erkennen ist die nicht monomorphe Struktur. Die Anwendbarkeit der Partikel war dadurch allerdings nicht negativ beeinflusst, wie in Kapitel 4 zu sehen ist. In *Abbildung 13* sind zwei zusätzliche TEM-Aufnahmen gezeigt, in *Abbildung 13 A* ist eine Monolage der Partikel auf dem TEM-Grid zu sehen sowie in *13 B* die Anordnung mehrerer Lagen und der Bildung von Überstrukturen der Partikel.

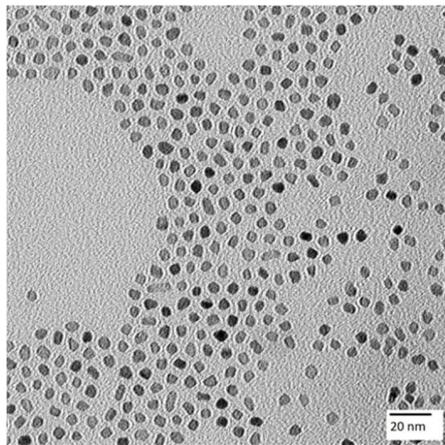


Abbildung 12: TEM-Aufnahme von ca. 6-8 nm FePt-Würfeln.

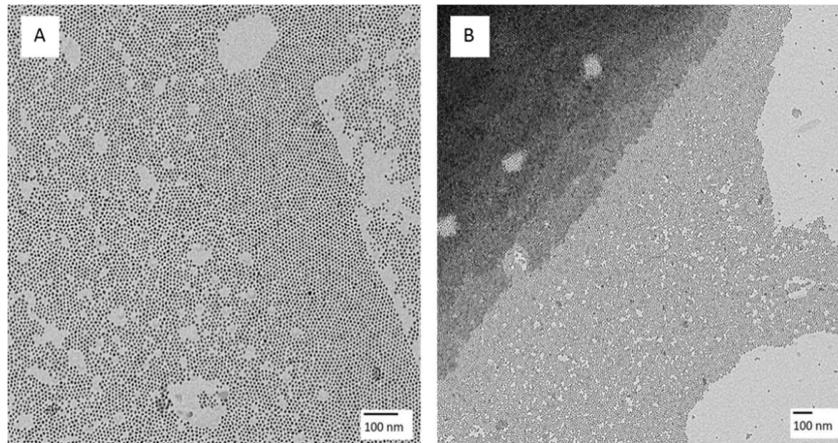


Abbildung 13: TEM-Aufnahme von (A) FePt-Würfeln in Monolage und (B) FePt-Würfeln in Überstrukturen.

3.3 Experimenteller Teil

3.3.1 Chemikalien

Die in diesem Kapitel verwendeten Chemikalien sind in Kapitel 8 tabellarisch aufgeführt.

3.3.2 Allgemeines

Alle Synthesen zur thermischen Zersetzung wurden unter Schlenkbedingungen mit Argon als Inertgas durchgeführt. Zu Beginn wurde mehrfach bei $3 \cdot 10^{-2}$ mbar und 60°C sekuriert. Die hergestellten Partikel wurden in 10 mL Hexan gelöst bei 4°C gelagert.

3.3.3 Standardverfahren zur Aufreinigung von Nanopartikeln aus Synthesen der thermischen Zersetzung und der Biofunktionalisierung (Kapitel 3, 4 und 5)

Zur Aufreinigung wurde die mehrfache Fällung, Zentrifugation und Redisperion der Partikelprobe durchgeführt. Die Partikel lagen nach beendeter Reaktion in organischem Lösungsmittel dispergiert vor, die Fällung erfolgte somit durch polare Reagenzien die mit dem Lösungsmittel mischbar waren, wie zum Beispiel Ethanol, Isopropanol oder Aceton. Für die Fällung wurde mindestens das äquivalente Volumen an Fällungsmittel benötigt, bei Nanonadeln die doppelte Menge. Für hydrophile Partikel gilt das umgekehrte Aufreinigungsprinzip. Als Fällungsmittel wurde Hexan benutzt um Partikel aus Ethanol oder Aceton auszufällen, oder THF für Nanopartikel in Wasser. Die Zentrifugation erfolgte generell über 10 min bei 9000 rpm.

3.3.4 Manganoxidnanopartikel (ca. 19 nm)

Für die Synthese von MnO-Nanopartikeln wurden 1,236 g Mangan(II)-Oleat in 10 mL 1-Octadecen gelöst und sekuriert. Anschließend wurde mit einer Heizrate von 2°C pro Minute auf eine Endtemperatur von 317°C geheizt und diese für 30 min gehalten. Nach dieser Zeit wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgereinigt.

3.3.5 Platin-Nanowürfel (ca. 5 nm)

Für die Synthese von Platinwürfeln wurden 500 µL Ölsäure, 500 µL Oleylamin und 100 mg Pt(acac)₂ in 10 mL 1-Octadecen gelöst und sekuriert. Die Lösung wurde auf 120°C geheizt und bei dieser Temperatur 50 µL eines 10 % Gemisches Fe(CO)₅ in 1-Octadecen durch ein Septum injiziert. Danach wurde die Temperatur mit einer Heizrate von 1-2°C auf 200°C erhöht und 1 h gehalten bevor abgekühlt wurde und das standardisierte Verfahren zur Aufreinigung durchgeführt wurde.

3.3.6 FePt-Nanowürfel (ca. 6-8 nm)

Für die Synthese von FePt-Würfeln wurden 882 μL Ölsäure und 100 mg $\text{Pt}(\text{acac})_2$ in 15 mL 1-Octadecen gelöst und sekuriert. Die Lösung wurde auf 130°C geheizt und bei dieser Temperatur 131 μL $\text{Fe}(\text{CO})_5$ durch ein Septum injiziert. 5 min nach Injektion erfolgte die Zugabe von 1,175 mL Oleylamin. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 180°C geheizt und 1 h bei dieser Temperatur gehalten, bevor abgekühlt wurde und die Aufreinigung nach oben beschriebenem Verfahren erfolgte.

3.4 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel vorgestellten isotropen Nanopartikel stellen die Ausgangssubstanzen für die im Weiteren hergestellten Heterodimere in Kapitel 4 dar. Es konnten für MnO, Platin und FePt reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, die von hoher monodisperser und monomorpher Natur waren und sich damit zur Weiterverarbeitung eigneten. Für das Aufwachsen einer zweiten Komponente auf die hier hergestellten Partikel ist die Monodispersität eine wichtige Grundvoraussetzung, was im folgenden Kapitel genauer erklärt wird. In Kooperationen wurden FePt-Partikel genauer auf deren magnetische Eigenschaften untersucht. Dazu wurden Kleinwinkelstreuungsexperimente von Dr. Sabrina Disch (Universität Köln, AG Schmidt) und Alice Klapper (JCNS-2, Prof. Dr. Thomas Brückel) durchgeführt.

Kapitel 4

Herstellung und Entwicklung von anisotropen Nanostrukturen

4.1 Theorie

4.1.1 Einführung

Anisotrope, also asymmetrische Strukturen können im Gegenteil zu isotropen Strukturen unterschiedliche Oberflächen und Eigenschaften liefern. ^{[48], [49]} Als bekannte anisotrope Partikel sind „patchy particles“ (patchy: engl.: ungleichmäßig), Janus-Partikel, Nanodrähte (engl.: nanorods/nanowires) und Heterodimere zu nennen. Der Begriff Janus-Partikel (nach dem römischen Gott Janus mit zwei Gesichtern) ist allerdings nicht klar für eine einzige Partikelsorte definiert, sondern beschreibt lediglich die Verschiedenheit zweier sich gegenüberliegender Domänen eines Partikels. So werden unter anderem Janus-Partikel als spezielle Form der *patchy particles* angesehen, aber auch Heterodimere als Janus-artig oder „nicht-sphärische Janus-Partikel“ bezeichnet, wie am Beispiel der CdSe-Au Dimere in *Abbildung 14* zu sehen. ^{[50], [51]}

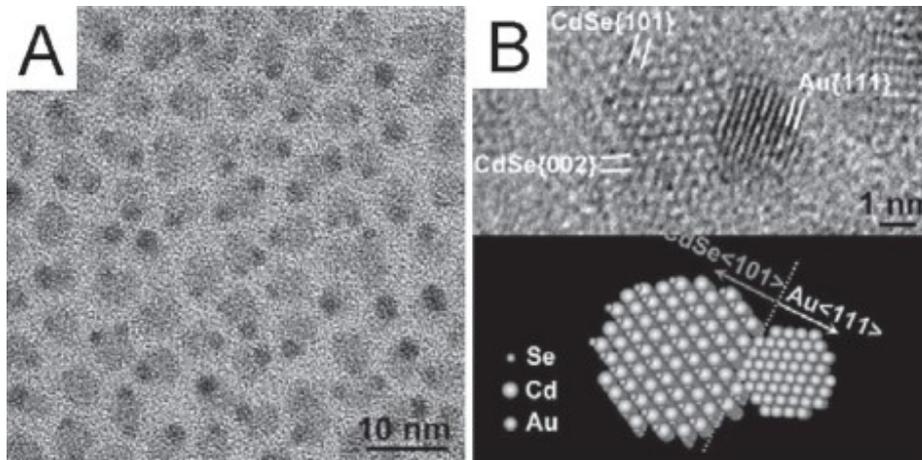


Abbildung 14: (A) TEM-Aufnahme von CdSe-Au "nicht-sphärischer" Janus-Partikel, (B) HRTEM-Aufnahme und schematische Darstellung von CdSe-Au-Partikeln. ^[48]

Während gewöhnliche (isotrope) Nanopartikel, wie MnO, Platin oder FePt, durch Funktionalisierung der Oberfläche unterschiedlich zur Anwendung gebracht werden können und ansonsten durch die Materialeigenschaft des Kerns prädestiniert für bestimmte Einsatzgebiete sind, liefern Heteropartikel direkt zwei Kernmaterialien und dadurch zwei verschiedene, funktionalisierbare Oberflächen. Die so ermöglichte einfache Art der Doppelfunktionalisierung kann bei biomedizinischen Anwendungen deutliche Vorteile bringen. Eine Seite des Heteropartikels kann eine Erkennungssequenz für ein bestimmtes Zellkompartiment tragen (*cell targeting*), die andere Seite den Wirkstoff, welcher im angestrebten Kompartiment benötigt wird. Ebenfalls verdoppeln die zwei Kernmaterialien die Möglichkeiten, das Partikel *in vitro* oder *in vivo* zu verfolgen. ^[52] So können beispielsweise die optischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln (Plasmonenresonanz) mit der MRT-Aktivität von MnO oder Fe₃O₄ gepaart werden. Ebenso kann ein katalytisch aktives Platinpartikel mit erwähnten Komponenten verbunden werden. Auch die Polarität der zwei Seiten des Partikels kann unterschiedlich sein. Wird die eine Seite unpolar, die andere polar funktionalisiert, können „gigantische Amphiphile“ erhalten werden, an welchen unter anderem die Eigenschaften der Eigenanordnung (engl.: self assembly) der Partikel als Mizellen oder Monolagen studiert werden können. Die Verbindung der zwei Domänen

liefert einzigartige Eigenschaften, betreffend Magnetismus, Optik oder Katalyse. ^[49] Der Einfluss der Domänen aufeinander wird häufig in der Literatur diskutiert, wobei viele Ansätze aufgeführt werden. So zum Beispiel werden die durch die jeweils strukturfremde Domäne verursachten Fehlstellen oder der Elektronentransfer über die Verbindungsstelle für Änderungen der Materialeigenschaften verantwortlich gemacht. Pt@Fe₃O₄-Partikel zeigen beispielsweise eine gesteigerte Kohlenstoffmonooxidkatalyseaktivität gegenüber reinen Platinpartikeln. ^[53] Für FePt@Fe₃O₄-Core-Shell-Partikel wurde eine direkte magnetische Kopplung berichtet, begründet in der Verbindung der zwei Materialien. ^[54]

Ebenfalls ist es möglich ein Partikel eines Materials anisotrop wachsen zu lassen. Hierzu ist Kenntnis über die Verwendung geeigneter *capping agents* von Nöten, da sich so gezielt bestimmte Kristallflächen bevorzugt besetzen lassen und das Partikelwachstum in diese Richtung gehemmt wird. Ebenfalls diskutiert werden neben dieser Methode der orientierten Besetzung bestimmter Kristallflächen die der templat- oder ligandenkontrollierten Synthese von Nanodrähten. Diese drei Methoden bringen Vor- und Nachteile mit sich. So liefert das templatvermittelte Wachstum beispielsweise durch Zeolithe, mesoporöse Materialien, Polymere oder Mizellen, nur geringe Ausbeuten, allerdings von hoher Monodispersität. Der ligandenkontrollierte Weg, bei dem das Wachstum durch den *capping agent* beeinflusst wird, liefert höhere Ausbeuten mit einem ebenfalls höheren Grad an Verunreinigungen. Bei der orientierten Besetzung und gewünschter Kontrolle der Wachstumsrichtung ist der eindeutige Vorteil, dass die Form in gewissem Maße vorhersagbar ist, die Ausbeute aber auch hier gering bleibt und mit Verunreinigungen zu rechnen ist. Die drei beschriebenen Wege und deren Vor- und Nachteile wurden von L. Cademartiri und G. Ozin vorgestellt und diskutiert. ^[55] Auf diese Weise entstehen beispielsweise statt kubischen Partikeln stäbchen- bis nadelförmige Strukturen. Diese sogenannten 1D-anisotropen Strukturen weisen oft veränderte physikalische Eigenschaften auf, wie z.B. einen gesteigerten oder verringerten Magnetismus. ^[56] Des Weiteren ist es analog zur Heterostruktur Pt@MnO möglich auf Nanodrähte ein Metalloxid aufwachsen zu lassen. Hierdurch entsteht eine perlenkettenartige Struktur, welche die Vorteile von anisotropen Strukturen und Heterodimeren vereint. Diese

neuartige Nanostruktur wird im Folgenden und deren weitere Verwendung in Kapitel 5 vorgestellt.

4.1.2 Heterodimere (keimvermittelt)

Bei der Synthese von Heterodimeren, auch „dumbbell-like“ (engl. für hantelartig) genannt, wird das epitaxiale Aufwachsen einer zweiten Domäne auf ein vorgefertigtes Partikel, bestehend aus einem edleren Metall, kontrolliert. In der Literatur wird auch häufig von „snowman-like particles“ gesprochen, wenn es um Dimere geht, deren beider Domänen nicht gleichgroß sind. Es existiert aber keine einheitliche Benennungsvorschrift. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher generell von *dumbbell-like* gesprochen um die Heterodimere zu beschreiben. Die zweite, auf das Edelmetall aufgewachsene Domäne, besteht meist, wie auch hier vorgestellt, aus einem Metalloxid der 3d-Übergangsmetalle. Hierbei sollte die Kristallstruktur des schon vorhandenen Partikels möglichst mit der des aufwachsenden Materials übereinstimmen. Ebenfalls muss gewährleistet sein, dass die kritische Keimbildungskonzentration des Precursors der zweiten Domäne nicht überschritten wird. Andernfalls wäre die Bildung separater Partikel im Gegensatz zu einem Aufwachsen begünstigt. Um genau eine metalloxidische Domäne auf einem (edel)metallischen Nanopartikel aufwachsen zu lassen, müssen bestimmte synthetische Kriterien erfüllt werden. Das als Keim fungierende Edelmetallpartikel stellt auf seiner Oberfläche Elektronendichte zur Verfügung, die benötigt wird um das Aufwachsen zu ermöglichen. Wird die Elektronendichte durch eine einzige Domäne nicht genügend verringert, besteht die Möglichkeit, dass weitere Domänen aufwachsen. *Abbildung 15* zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von erfolgreich synthetisierten Heterodimeren. Oft gelingt es durch die Standardreaktionsführung nicht, solche Heterodimere zu erhalten. Daher muss ein anderer Weg gefunden werden, um die Elektronendichte zu beeinflussen. Diese kann auch durch die Wahl des Lösungsmittels weiter beeinflusst werden, wie zum Beispiel durch die Verwendung eines möglichst langkettigen Alkans, welches, im Gegensatz zu 1-Octadecen,

selbst nicht mehr den geringen π -Elektronenanteil aufweist und daher nahezu keine abgezogene Elektronendichte ausgleichen kann.

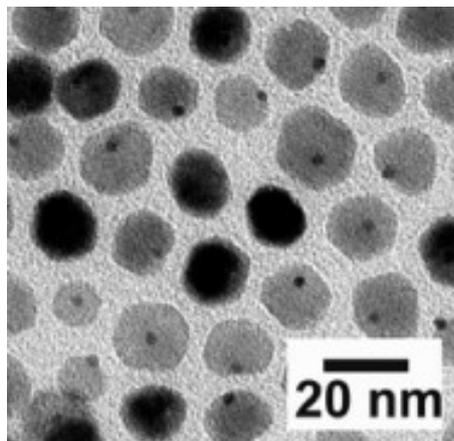


Abbildung 15: TEM-Aufnahme von FePt@MnO-Heterodimeren. ^[50]

Ist das Ziel der Synthese das Aufwachsen mehrerer Domänen, reicht dazu die Elektronendichte allerdings nicht aus, kann diese mit Hilfe eines polarerer Lösungsmittels erhöht werden. Wird zum Beispiel das häufig eingesetzte ODE durch den schwach polaren Dibenzylether ersetzt, werden Partikel in Form von Nanoblumen erhalten. Diese wurden bereits ausführlich in der Literatur beschrieben ^{[57], [58]} und sind in *Abbildung 16* dargestellt.

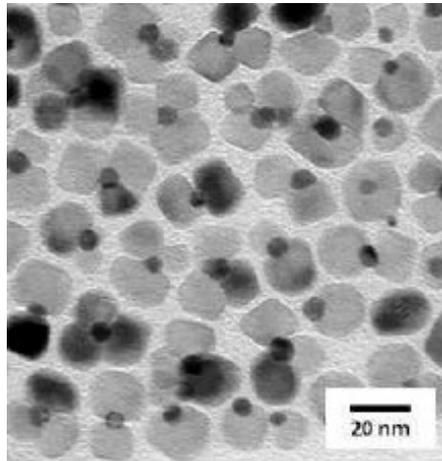


Abbildung 16: TEM-Aufnahme von Au@MnO-Blumen ^[58]

Wie schon in Kapitel 4 beschrieben, kann als Precursor für metalloxidische Partikel ein Metalloleat verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Manganoxid als metalloxidische Komponente gewählt, als Precursor also Mangan(II)-Oleat verwendet. Als Edelmetallkomponente wurde Platin, beziehungsweise eine Legierung aus Eisen und Platin (50:50), verwendet. Der Wahl liegt der angestrebte Einsatz in der Computertomographie zu Grunde, bei der Platin die nötige Kontrasterhöhung liefern soll. Pt@MnO-Heterodimere sind ein Kompromiss aus zwei Überlegungen. Wie in Kapitel 3 erwähnt, muss zum Einsatz von Platin als CT-Kontrastmittel eine gute Biokompatibilität erreicht werden, was mit der Anbringung einer oxidischen Hülle aus MnO erleichtert wird, da diese einfach zugänglich für bestimmte, wasserlösliche Polymere ist (siehe Kapitel 5). Da für den Einsatz in der CT nicht die Platinoberfläche benötigt wird, sondern nur die Elektronendichte des Platins selbst, kann ein Großteil mit dem Metalloxid besetzt sein. Allerdings ist es praktikabel, eine offene Platinseite zu erhalten, da so die doppelte Funktionalisierbarkeit gegeben bleibt, wie für den Einsatz der Heterodimere in der Biomedizin gefordert. So kann später die oxidische Domäne entsprechend funktionalisiert, deren Toxizität eingeschränkt und die kleinere Platindomäne ebenfalls mittels eines Thiols angesteuert werden, unter tolerierbaren toxischen Effekten des Platins. Die Heterodimere FePt@MnO zeigen mit FePt@Fe₃O₄ vergleichbar veränderte magnetische Eigenschaften, hervorgerufen durch die magnetische Kopplung der beiden Materialien. ^[50]

4.1.3 Heterodimere (*in situ*)

Heterodimere können ebenfalls, doch weniger häufig, durch die Bildung der ersten Komponente, gefolgt von direktem Aufwachsen der zweiten Komponente hergestellt werden.^[59] Diese *in situ* Methode vereinfacht den synthetischen Prozess, da nur ein einziger Reaktionsaufbau für die Fertigung der Partikel nötig ist. Trotzdem ist während der Synthese die Bildung der ersten Komponente von der Bildung der zweiten zeitlich getrennt. So berichten Figuerola *et al.*^[59] von der Synthese monodisperser FePt@Fe₃O₄-Dimere, bei der im ersten Schritt der Reaktion die Temperatur unter 200°C gehalten wird. Die eingesetzten Precursor, Platinacetylacetonat und Eisenpentacarbonyl bilden hier FePt-Nanowürfel in Anwesenheit von Ölsäure und Oleylamin als *capping agents*. Durch ein Verhältnis größer 4:1 (Fe(CO)₅:Pt(acac)₂) ist gewährleistet, dass bei einem weiteren Heizen auf 295°C das überschüssige Eisencarbonyl auf den vorhandenen Keimen nukleiert und zu Fe₃O₄ oxidiert wird. FePt, wie in Kapitel 3 berichtet, hat aufgrund der ungeordneten *fcc* Struktur eine recht kleine Gesamtmagnetisierung. Neben der Herangehensweise durch Tempern die *fcc*-Struktur in eine *fcc*-Struktur umzulagern, berichten Figuerola *et al.* von einer magnetischen Kopplung zwischen den Domänen FePt und aufgewachsenem Fe₃O₄ und den daraus resultierenden verbesserten magnetischen Eigenschaften.

4.1.4 Nanodrähte

Wie in Kapitel 3 beschrieben, wird für die Synthese von FePt- oder Pt-Nanowürfeln ein Gemisch aus zwei *capping agents* verwendet, die bei FePt notwendigerweise nacheinander zum Reaktionsgemisch gegeben werden und bei Platin lediglich beide vorhanden sein müssen.^[60] Oleylamin ist der für das Drahtwachstum wichtigere Zusatz, wie weiter unten erklärt wird, während Ölsäure, mit einer eher geringen Bindungsaffinität der COOH-Gruppe zu Platin, ein formkontrollierender Faktor ist. Da sowohl bei der Synthese von FePt, als auch von Platin immer Fe(CO)₅ zum Einsatz kommt, muss die Rolle dessen bei der Entstehung von Nanowürfeln erklärt werden. Die Oberflächenenergien einzelner Kristallflächen im Platinkristallgitter folgen dem Trend (111) < (100).^[61] Ein Würfel wächst in dem Moment,

in dem die eisenreiche Komponente dazu kommt und bevorzugt die (100)-Fläche besetzt. Im Falle von FePt ist dieser Effekt deutlicher ausgeprägt, als bei der Platinpartikelsynthese, bei der nur sehr geringe Mengen an $\text{Fe}(\text{CO})_5$ zum Einsatz kommen. Dennoch ist die Anwesenheit von Eisenpentacarbonyl essentiell, da es formkontrollierend ist. Ist zuvor eine ausreichende Menge an Oleylamin vorhanden, wachsen eher Sphären als Würfel, was vermuten lässt, dass Oleylamin stabile Komplexe mit dem Platinprecursor eingeht und eine Nukleation von Fe erschwert. ^[62] Kubisch kristallines Platin hat als Nanowürfel also die (100)-Fläche als Oberfläche, wodurch theoretisch kein anisotropes Wachstum zu erwarten sein sollte, soweit von einer orientierten Kristallflächenbesetzung ausgegangen wird, da alle Flächen gleichwertig sind. Wird die FePt- und Platin-Nanopartikelsynthese allerdings bei sehr hohen Oleylamin zu Lösungsmittel Verhältnissen und ohne Ölsäure im Reaktionsgemisch durchgeführt, können durch unterschiedliche Reaktionstemperaturen verschieden lange Nanodrähte erhalten werden. ^[63] Die Nukleation wird analog mit der Injektion von $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ausgelöst (äquimolare Verhältnisse für FePt und Spurenmengen für Platin). Offenbar muss es sich hier also um eine templat- oder ligandenkontrollierte Entstehung der anisotropen Struktur handeln. Es ist bis heute nicht gut verstanden, wie die Nukleation für Nanostäbchen vonstattengeht. Für das Wachstum eines Nanostäbchens gibt es etablierte Modelle, doch für den ersten initialen Schritt in Richtung anisotropes Wachstum existieren lediglich Mutmaßungen. Für Goldnanostäbchen oder Nanodrähte, deren Wachstumsmechanismus mit der Bildung von Mizellen aus CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) beschrieben wird, findet sich viel Literatur, wie auch für Legierungen des Platins wie FePt, CoPt oder PtPb. ^[63], ^[64] Für reines Platin gibt es hingegen wenige Synthesevorschläge betreffend Nanodrähten. Die Synthese in Oleylamin wirft die Frage auf, ob der Mechanismus dem der Goldnanostäbchen ähnlich ist. Bao *et al.* ^[65] und Wang *et al.* ^[63] beschreiben analog eine Mizellenbildung des Oleylamins sowohl für $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ als auch für FePt-Nanodrähte. Das mizellare Modell für das anisotrope Wachstum von $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ und das für FePt ist leicht abgewandelt in *Abbildung 17* dargestellt. Generell spielt die Abwesenheit von Ölsäure bei Oleylaminmizellen scheinbar eine wichtige Rolle, da diese unidentate Komplexe mit dem Eisenprecursor bilden kann und damit die mizellare Struktur des Oleylamins zerstört. Nach dieser Theorie sollten dann wieder bevorzugt sphärische anstatt nadelförmiger

Partikel wachsen. Bao *et al.* berichten auch für die Stabilität der Ölsäuremizelle die Notwendigkeit der Abwesenheit von freier Ölsäure aus den erläuterten Gründen. ^[65] Verhindert wird dies durch die Mischung von Eisenoleat mit Natriumoleat. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine Synthese von reinen Platin-Nanodrähten, analog der in der Literatur vorgestellten Mechanismen, entwickelt werden und wie die Reaktion beeinflusst werden kann um möglichst wenig freie Ölsäure im Gemisch vorliegen zu haben.

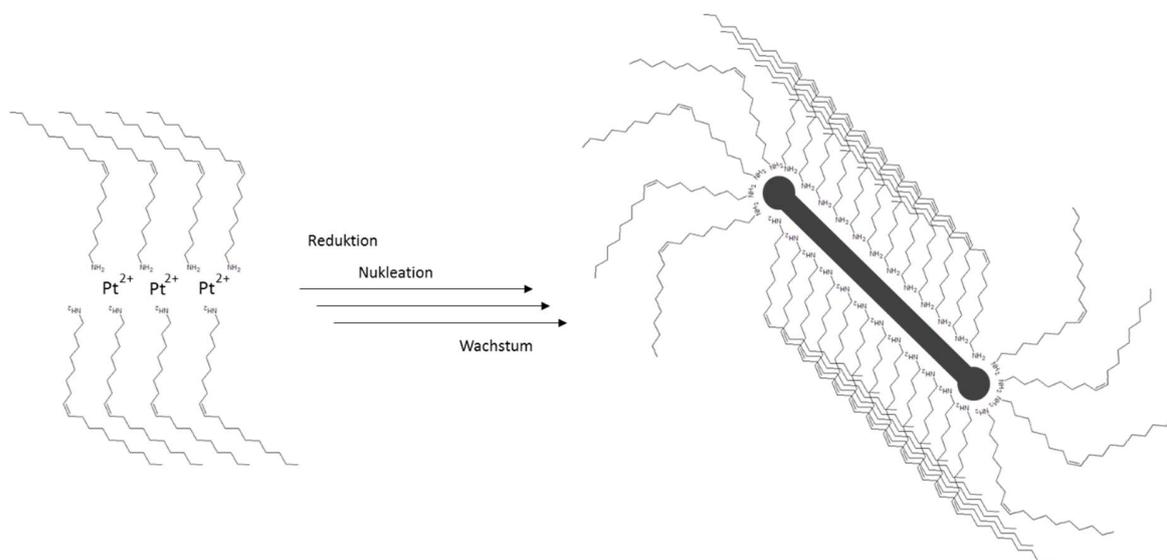


Abbildung 17: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Mizellenbildung von Oleylamin um Platin nach Komplexierung des Platinprecursors und dessen Reduktion bzw. Nukleation. Abbildung angepasst nach ^[65].

Analog zum in *Abbildung 17* gezeigten Mechanismus, nach dem Oleylamin stabile Komplexe mit dem Platinprecursor eingeht und sich dabei zu länglichen Mizellen zusammenlagert, wird der Mechanismus für FePt und Platin vorgeschlagen. In *Abbildung 18* ist eine elektronen-mikroskopische Aufnahme zu sehen, die hergestellte FePt-Drähte zeigt. Die verdickten Enden der Drähte sind durch die dort geringere Dichte an Oleylaminketten, aufgrund der starken Krümmung der Oberfläche, zu erklären. ^[63]

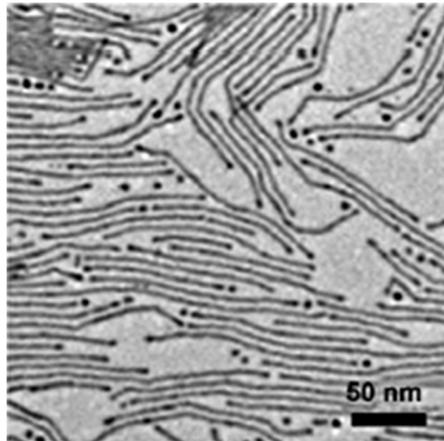


Abbildung 18: TEM-Aufnahme von FePt-Nanodrähten. ^[63]

Ebenfalls zu erkennen sind einzelne, sphärische Partikel, welche zeigen, dass die Synthese nicht perfekt anisotrop abläuft. Dieser Effekt tritt stärker auf, wenn das Verhältnis Oleylamin zu Lösungsmittel kleiner wird, was die Schlussfolgerung zulässt, dass zu wenig Oleylamin zur Verfügung steht, um den Precursor zu komplexieren. Dieser Effekt, welcher bei Platindrähten verstärkt auftritt, wird in der Literatur nicht oder nur unzureichend diskutiert und bedarf somit genauerer Aufklärung. Auf diese Problematik und deren entsprechenden Lösungsansätzen wurde in diesem Kapitel besonderes Augenmerk gelegt. Xiao *et al.* ^[66] berichten über eine ähnliche Synthese von reinen Platindrähten. Verwendet wird hier allerdings kein $\text{Fe}(\text{CO})_5$, sondern $\text{Cr}(\text{CO})_6$. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Initiierung des Drahtwachstums nicht vom Metallkern des zugegebenen Carbonylkomplexes abhängt, sondern vielmehr vom Kohlenstoffmonooxid. Dessen Einfluss wird ebenfalls in der Literatur diskutiert. ^[41] Auch wird gezeigt, dass in Abwesenheit von $\text{Cr}(\text{CO})_6$ Pt-Polypods entstehen (*Abbildung 19*), was in diesem Kapitel für die Abwesenheit von $\text{Fe}(\text{CO})_5$ bestätigt werden kann.

Wang *et al.* berichten für ihre synthetisierten FePt-Drähte von Abständen der Gitterebenen parallel zur Drahtwachstumsrichtung von 0,198 nm, was für die kubisch flächenzentrierte Struktur des FePt zur (100)-Ebene passt. *Abbildung 20* zeigt die entsprechenden hochaufgelösten elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Offenbar wachsen die Nanodrähte entlang der (111)-Richtung, was Xiao *et al.* ^[66] ebenfalls vorschlagen.

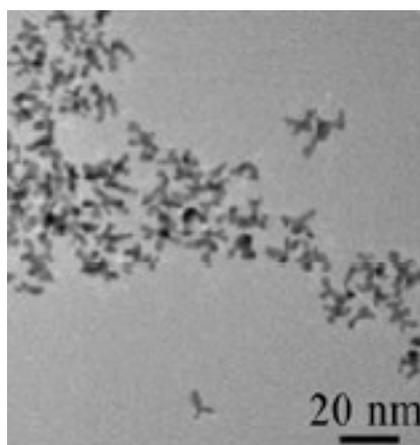


Abbildung 19: TEM-Aufnahme der Platinpolypods in Abwesenheit von $\text{Cr}(\text{CO})_6$. ^[66]

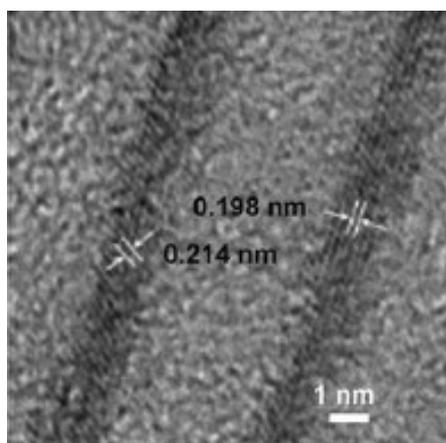


Abbildung 20: HRTEM-Aufnahme der FePt-Nanodrähte mit gemessenen Gitterabständen; links: (111)-Ebenenabstand, rechts: (100)-Ebenenabstand. ^[63]

Sowohl bei der Verwendung von Eisencarbonyl als auch von Chromcarbonyl werden bei röntgenkristallographischen Untersuchungen keine Spuren von Eisen oder Chrom gefunden.

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass nicht das verwendete Metall ausschlaggebend für die Initiation der Reaktion sein könnte, sondern das Carbonyl selbst. Als Wachstumsprozess wird von Xiao *et al.* eine Pränukleation einer hantelartigen Struktur vorgeschlagen, wie in *Abbildung 21* zu sehen ist. Eine Minute nach Injektion des Carbonyls sind auf den TEM-Aufnahmen scheinbar erste zusammengewachsene Strukturen erkennbar, die nach weiterem Fortschreiten der Reaktion zu Nanodrähten werden. *Abbildung 21* zeigt ebenfalls den vorgeschlagenen Mechanismus des Wachstums.

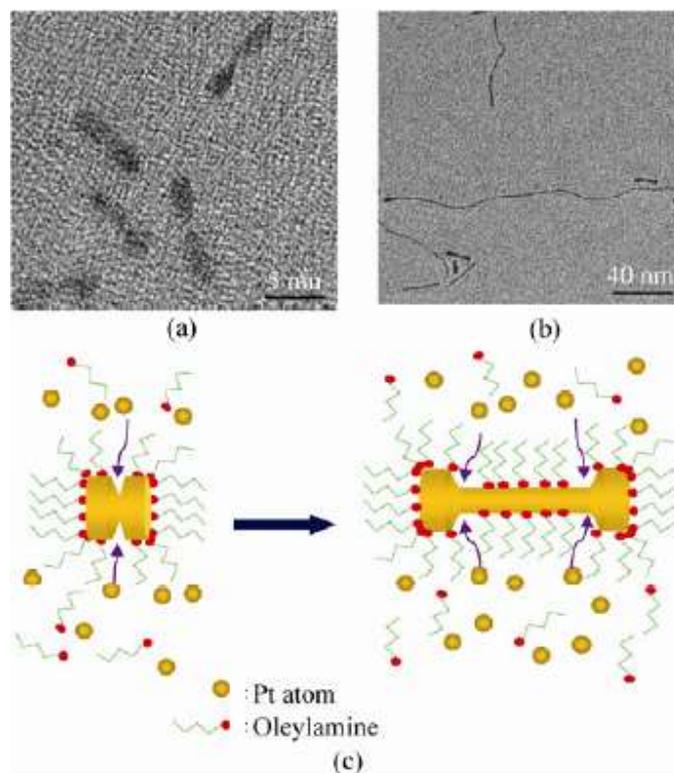


Abbildung 21: TEM-Aufnahmen von hantelartigen Strukturen nach (a) 1 min Reaktionszeit und (b) 3 min Reaktionszeit. (c): Illustration des Wachstumsmechanismus von Platin-Nanodrähten. ^[66]

Der postulierte Mechanismus der Mizellenbildung wird in der Literatur allerdings nur unzureichend erklärt. So ist es nicht vollständig klar, warum die Verwendung von Oleylamin zu einer länglichen Mizelle führt. Grund hierfür könnte die Unreinheit des Oleylamins sein. Xiao *et al.* verwenden technisches Oleylamin mit einem Reinheitsgrad von etwa 70%.

Mögliche Verunreinigungen könnten Gegenionen zu Ammoniumsalzen sein, die Ionomere bilden, welche für die zylindrische Mizelle verantwortlich sein könnten. Ebenfalls wird die Reduktion des Metallprecursors nach Komplexierung durch das Oleylamin selbst diskutiert. ^[55] Es ist also möglich, dass es sich bei dem betrachteten Mechanismus um einen Hybrid aus Templat- und Ligandenkontrolle handelt, also eine ligandenkontrollierte Mizelle. Untersuchungen zu der mizellaren Struktur des Oleylamins, während der Komplexierung des Platinprecursors und dem späteren Wachstum von Platin-Nanodrähten im Inneren der Mizellen, können über die dynamische Lichtstreuung erfolgen. Zuvor muss dennoch eine Untersuchung des Oleylamins erfolgen, um den tatsächlichen Ursprung des Mizellenwachstums zu verstehen.

4.1.4.1 Pt@MnO-Nanoketten

Wird erneut der Mechanismus des Aufwachsens eines Metalloxides auf ein vorgefertigtes Edelmetallnanopartikel betrachtet, ist zu vermuten, dass dieser unter Verwendung von Nanodrähten als Keime ähnlich verlaufen sollte. In diesem Kapitel wird, nach unserer Kenntnis, eine neue Struktur vorgestellt: Platin-Nanodrähte mit aufgewachsenen Manganoxidomänen. Die so gebildeten Nanostrukturen, im weiteren Pt@MnO-Ketten genannt, bieten ein vielversprechendes Potential für Anwendungen in vielen Bereichen, zum Beispiel der Katalyse. Eine Schwierigkeit ist die effektive Anbindung anisotroper Strukturen auf Oberflächen, die hier erleichtert werden kann, indem die stäbchenförmigen Strukturen über ihre aufgewachsenen Metalloxidomänen auf Oberflächen gebunden werden und dabei nicht unnötig die potentiell katalytisch aktive Edelmetalloberfläche mit adhäsiven Molekülen blockiert. Ausgenutzt wird dabei die bekannte Stabilität der Verbindung des Catecholankers mit einem Metalloxid, die in Kapitel 5 eingehend diskutiert wird.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Heterodimere (keimvermittelt)

Bei der Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels für die Synthese von Heterodimeren wurde mit dem Alkan n-Heptadecan das beste Ergebnis erzielt. Mit n-Heptadecan kann die elektronendichtereduzierende Eigenschaft mit weiteren Anforderungen, wie möglichst hohem Siedepunkt und dennoch flüssigem Zustand bei Raumtemperatur, kombiniert werden. Damit sind die oben aufgeführten nötigen Bedingungen für eine *Bottom-Up*-Synthese gewährleistet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die erfolgreiche Synthese von Pt@MnO-Dimeren (*Abbildung 22*). Die hier abgebildeten Partikel bestehen aus einer Platindomäne (Keim) und einer aufgewachsenen Manganoxidomäne (MnO). Für FePt@MnO-Dimere konnten ebenfalls sehr gute Ergebnisse erzielt werden, zu sehen in *Abbildung 23*.

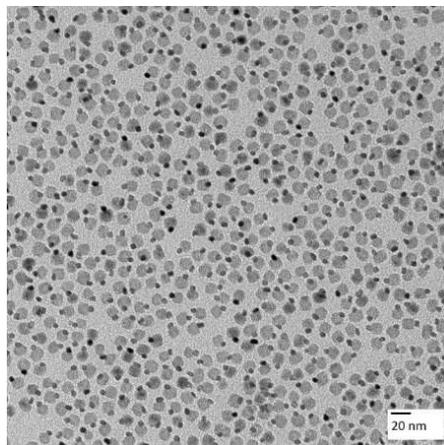


Abbildung 22: TEM-Aufnahme von Pt@MnO-Dimeren.

Abbildung 23 zeigt TEM-Aufnahmen von monodispersen FePt@MnO-Nanopartikeln. Bei der Synthese wurde als Lösungsmittel Heptadecan verwendet, worauf die zu einem Großteil als Dimere gewachsenen Partikel zurückzuführen sind. Die Monodispersität ist hoch genug, sodass stellenweise sogar eine hexagonale Anordnung erkennbar ist.

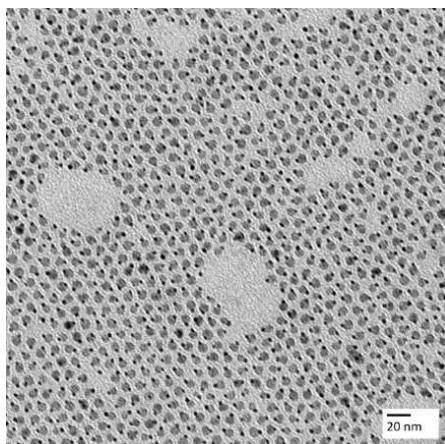


Abbildung 23: TEM-Aufnahme von FePt@MnO-Dimeren.

Die FePt@MnO-Heterodimere wurden mit zwei verschieden großen MnO-Domänen synthetisiert. Dies ist möglich über die Variation der Endtemperatur. Mangan(II)-Oleat zersetzt sich ab ca. 240°C. Wird die Endtemperatur der Synthese auf 260°C erhöht, können Dimere mit einer oxidischen Domäne von 11 nm erhalten werden. Bei einer Endtemperatur von ca. 300°C wächst diese Domäne auf 18 nm an. Beide Heterodimere sind in *Abbildung 24 (A)* und *(B)* zu abgebildet.

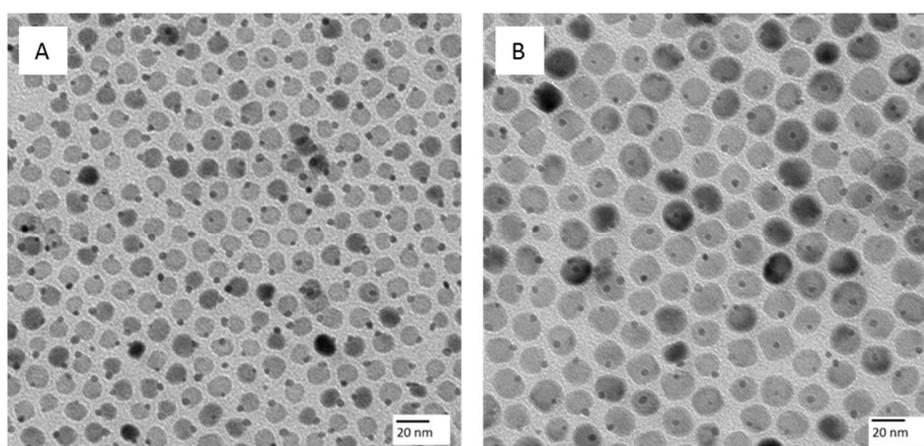


Abbildung 24: TEM-Aufnahme von (A) FePt@MnO-Dimeren, MnO-Domäne 11 nm. (B) FePt@MnO-Dimere, MnO-Domäne 18 nm.

4.2.2 Heterodimere (*in situ*)

Nach der Methode des *in situ*-Aufwachsens von überschüssigem $\text{Fe}(\text{CO})_5$ auf gebildete FePt-Nanowürfel wurden monodisperse FePt- Fe_xO -Partikel erhalten. In *Abbildung 25* ist die TEM-Aufnahme abgebildet, die in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen die Partikelprobe zeigt.

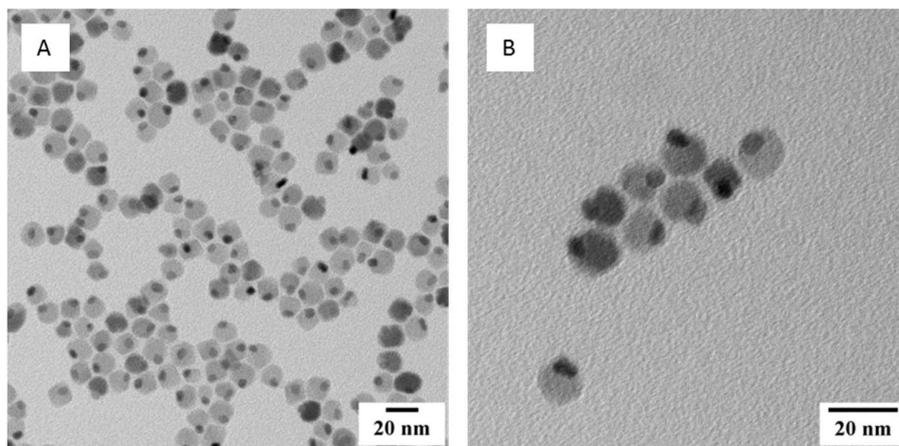


Abbildung 25: TEM-Aufnahmen von (A+B) FePt@ Fe_xO -Heterodimeren in unterschiedlicher Vergrößerung.

Die FePt@ Fe_xO -Heterodimere wurden von Kristina Wichmann, Universität Mainz, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, AK Tremel zur Verfügung gestellt.

4.2.3 Nanodrähte

4.2.3.1 Einfluss der Temperatur und der Oleylaminmenge

Abbildung 26 A zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von Platinpartikeln, hergestellt nach der in Kapitel 3 beschriebenen Methode für Pt-Würfel unter Verwendung der doppelten Menge Oleylamin als *capping agent* und ohne Zugabe von Ölsäure (Standardbedingung für Platinwürfel: Ölsäure zu Oleylamin 1:1, jeweils 1 mL). Das Fehlen

der Ölsäure macht sich in der sphärischen Konformation der Platinpartikel, neben den schon entstandenen Nanorods, bemerkbar. Offenbar reicht die leicht erhöhte Menge an Oleylamin bereits aus, um die beschriebenen länglichen Mizellen zu bilden und somit einen kleinen Teil stäbchenförmig wachsen zu lassen. Die Länge der Stäbchen liegt zwischen 20 und 30 nm, was teilweise durch die Endtemperatur der Reaktion (200°C) kontrolliert wird. In diesem Fall wurde bis 200°C geheizt. Generell wird die Endtemperatur 30 min gehalten, um eine vollständige Zersetzung des Precursors zu garantieren.

Der Effekt des überschüssigen Oleylamins wurde weiter verfolgt, indem ein Verhältnis von Oleylamin zum Lösungsmittel ODE von 4:6 gewählt wurde und auf den Zusatz von Ölsäure als zusätzlicher *capping agent* verzichtet wurde. Das Ergebnis ist in *Abbildung 26 B* gezeigt. Die Endtemperatur betrug unverändert 200°C, wodurch die zu erwartenden 30 nm langen Stäbchen entstanden. Dennoch entstehen neben der anisotropen Form noch weitere, isotrope Platinpartikel, die ein Hinweis darauf sind, dass das gewählte Synthesegemisch nicht ausschließlich die in der Theorie beschriebenen, stäbchenförmigen Mizellen bildet. Gründe hierfür könnten die Unreinheit des Oleylamins (70% Reinheit) sein, ein störender Einfluss des Lösungsmittels 1-Octadecen oder die hohe Temperatur, die die Bildung von Mizellen durch zu hohe molekulare Bewegung erschwert. Es muss vermutlich von einer Kombination der vorgeschlagenen, störenden Einflüsse ausgegangen werden.

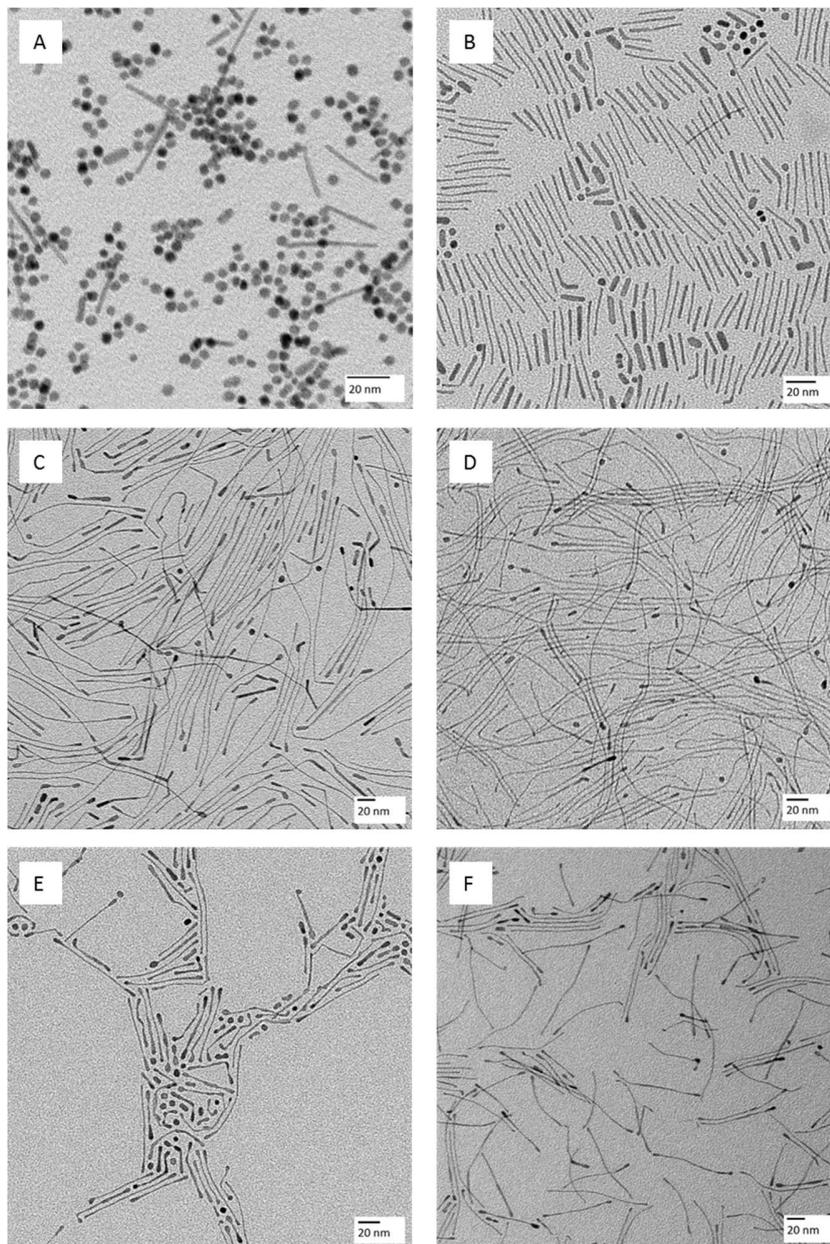


Abbildung 26: TEM-Aufnahmen von: (A) Platin-Nanopartikel ohne zugesetzte Ölsäure und doppelter Menge Oleylamin (2 mL) verglichen mit der Standard Platinpartikelsynthese. (B) Platin-Nanorods, ca. 30 nm, mit sphärischen Verunreinigungen, 4:6 Gemisch von 1-Octadecen und Oleylamin. (C) Platin-Nanodrähte aus Synthese in purem Oleylamin, 200°C Endtemperatur. (D) Platin-Nanodrähte aus Synthese in purem Oleylamin, 130°C Endtemperatur. (E) Entsprechend D, nochmaliges Heizen auf 200°C, leichte Zersetzung. (F) Platin-Nanodrähte bei Idealbedingungen (30 mL Oleylamin, 130°C Endtemperatur, 30 min Halten der Endtemperatur).

Um die erzielten Resultate zu verfeinern und die Störgröße auszumachen, wurde die Synthese in purem Oleylamin durchgeführt, alle anderen Parameter wurden beibehalten. Die Ergebnisse zeigen den wichtigen Einfluss der gewählten Oleylaminmenge. Die zugehörige TEM-Aufnahme ist in *Abbildung 26 C* dargestellt. Gut zu erkennen ist ein deutlicher ausgeprägtes Wachstum in die Länge, bis zu etwa 200 nm. Daher wird hier von Nanodrähten gesprochen. Die Abschätzung der Länge ist aufgrund der stark geknickten Struktur der Drähte schwierig. Nach wie vor ist die Verunreinigung durch sphärische Partikel vorhanden. Wie in der Literatur beschrieben ^[66], wachsen hantelförmige Strukturen (in *Abbildung 26 C* unten links), die scheinbar die Vorstufe zum Drahtwachstum darstellen. Dass diese Struktur zusammen mit voll ausgebildeten Nanodrähten vorkommt, spricht für eine unsaubere Trennung von Keimbildung und Keimwachstum, wie durch das Modell von LaMer gefordert. Dies kann zustande kommen durch zu langsames Injizieren der $\text{Fe}(\text{CO})_5$ -Lösung bei 120°C , oder eine ungleichmäßige Temperatur im Reaktionsgefäß. Des Weiteren kann hier klar eine Verdickung der Enden der Nanodrähte festgestellt werden, ein Resultat der wie in 4.1.4 beschriebenen geringeren Oleylamindichte an den Enden der ausgebildeten Mizelle. Die recht unkontrollierte Anordnung der bei 200°C in purem Oleylamin hergestellten Nanodrähte resultiert aus den teils starken Abknickungen. *Abbildung 26 D* zeigt die analoge Synthese unter der Variation der Endtemperatur, die von 200 auf 130°C angepasst wurde. Die Länge der Nanodrähte bleibt hierbei nahezu unverändert, was zeigt, dass die Temperatur eine untergeordnete Rolle beim Längenwachstum spielt. Wird die Endtemperatur allerdings nach der standardisierten halben Stunde bei 130°C auf 190°C erhöht, werden leicht verkürzte Nanodrähte erhalten, wie in *Abbildung 26 E* zu sehen. Ebenfalls lässt die Form der Drähte scheinbar darauf schließen, dass die erhöhte Temperatur die gebildeten Strukturen leicht abbaut und wieder mehr sphärische Partikel entstehen. Daher wurde im Weiteren die Endtemperatur von 130°C als ideal für uniformes Wachstum angesehen und beibehalten. Das absolute Volumen des Oleylamins in Synthesen, welche mit purem Oleylamin durchgeführt wurden, betrug 30 mL. Dieses Volumen führte zum besten Ergebnis, bei Verwendung von weniger oder auch mehr Oleylamin waren keine Verbesserungen zu vermerken. Daher wird neben der Idealtemperatur ein ideales Lösungsmittelvolumen von

30 mL festgehalten. In *Abbildung 26 F* ist eine nach geforderten Idealbedingungen synthetisierte Probe gezeigt.

4.2.3.2 Einfluss des Metallcarbonyls

Der Einfluss des zum Reaktionsstart benötigten Carbonyls, hier $\text{Fe}(\text{CO})_5$, wurde sukzessive untersucht. In den *Abbildung 27 A, B* und *C* sind drei TEM-Aufnahmen leicht variiertes Synthesen gezeigt, bei denen $\text{Fe}(\text{CO})_5$ gänzlich fehlt. Durch den fehlenden Starter der Reaktion musste das Gemisch auf 170°C geheizt werden, um eine Keimbildung zu erzielen. Im in *Abbildung 27 A* gezeigten Experiment wurde purem Oleylamin als Lösungsmittel verwendet, *Abbildung 27 B* und *C* zeigen Experimente mit Oleylamin zu 1-Octadecen Verhältnissen von 7:3, bzw. 3:7. Auffällig ist, dass eine höhere Menge an 1-Octadecen dazu führt, dass die Partikel weniger verzweigt sind. Insgesamt bestätigen diese Versuche die Notwendigkeit des Carbonyls für die Synthese von Nanodrähten. Ein weiterer Einfluss, der zur Aufklärung gebracht wurde, ist der des im Synthesegemisch vorhandenen Carbonyls. Hierzu wurde der Synthese nicht bei 120°C die standardisierte Menge an $\text{Fe}(\text{CO})_5$ zugefügt, sondern war von Anfang an vorhanden. Das Ergebnis, in *Abbildung 27 D* zu sehen, zeigt einen erhöhten Grad an Verunreinigung durch sphärische Platinpartikel. Dies könnte an der nicht schlagartig erfolgten Keimbildung liegen. Wird das Pentacarbonyl hingegen erst bei 150°C dem Gemisch zugefügt, entstehen keine nadelförmigen Strukturen, was aufgrund der vorherigen Erkenntnisse zu erwarten war (nicht abgebildet).

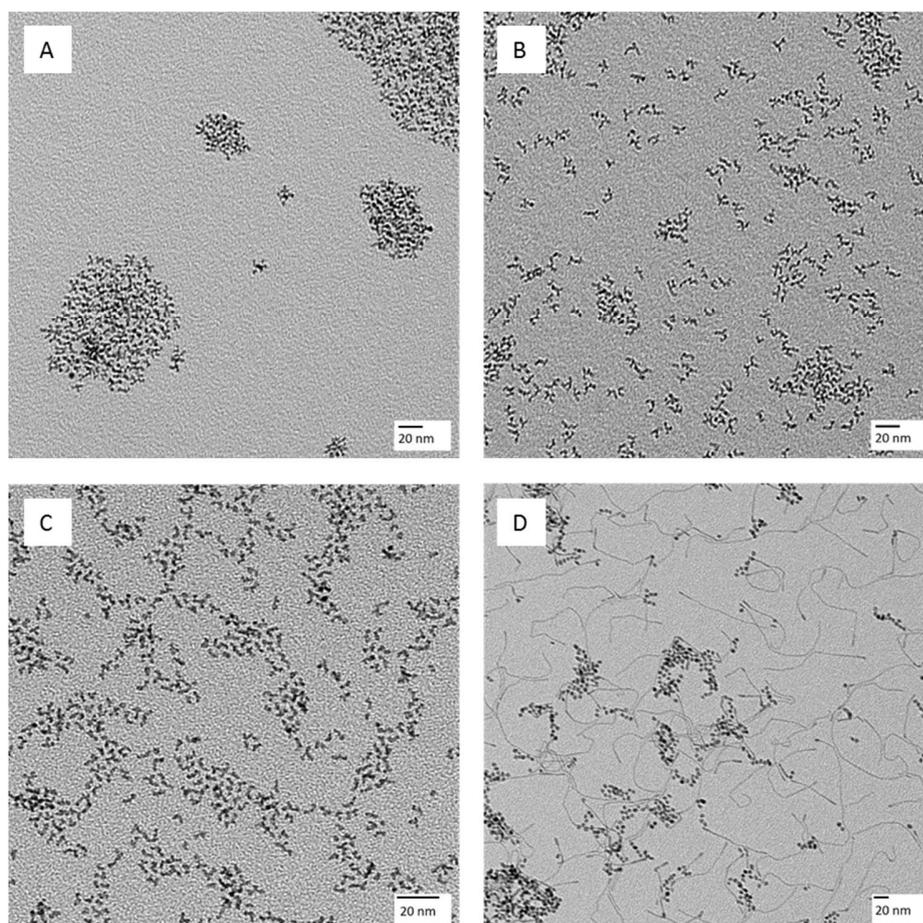


Abbildung 27: TEM-Aufnahmen von: (A) Synthese nach Bedingungen für Platin-Nanodrähte ohne $\text{Fe}(\text{CO})_5$ in purem Oleylamin. (B) Entsprechend A in 7:3 Gemisch von Oleylamin und 1-Octadecen. (C) Entsprechend A in 3:7 Gemisch von Oleylamin und 1-Octadecen. (D) Synthese mit schon im Gemisch vorhandenen $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (keine Injektion) und anschließendem Heizen auf 130°C .

4.2.3.3 Einfluss der Reaktionszeit

Durch Betrachtung des Einflusses der Zeit, die die Reaktion bei der Höchsttemperatur von 130°C belassen wurde, konnten wertvolle Einblicke in den Prozess des Wachstums der stäbchenförmigen Strukturen gewonnen werden. Wurde zum Beispiel die Reaktion direkt bei Injektion des Eisenpentacarbonyls abgebrochen, sind zunächst folgende Beobachtungen zu nennen: Die Lösung verfärbte sich nicht tiefschwarz, sondern wies eine dunkelgrüne

Färbung auf und behielt ihre Transparenz. Das Ausfällen im anschließenden Aufreinigungsverfahren gestaltete sich als schwieriger als im Normalfall, es musste mit einem großen Überschuss an Fällungsmittel (Isopropanol) gearbeitet werden um eine Präzipitation herbeizuführen. Wird die entsprechend aufgereinigte Probe auf einem TEM-Grid präpariert, sind auf der anschließenden Abbildung fadenartige Strukturen erkennbar, die aus einzelnen Nanoclustern, scheinbar noch nicht zusammengewachsen, bestehen (*Abbildung 28 A*). Es wird nicht davon ausgegangen, dass es sich hierbei um einen Eintrocknungseffekt auf dem mit Kohlenstoff bedampften Kupfergrid handelt. Tanaka *et al.* berichten von sehr kleinen Platin-Nano-strukturen (Pt_8 -Nanocluster), die eine grüne Emission zeigen. ^[67] Die hier beobachtete entsprechende Farbgebung lässt den Schluss zu, dass sich im Reaktionsgemisch bereits die abgebildeten fadenartigen Anordnungen befinden. Offenbar lassen sich zu diesem Zeitpunkt der Reaktion die ersten Schritte des Wachstums der Nanodrähte in der Mizelle einfrieren und abbilden. Wird das Reaktionsgemisch nach Injektion des $\text{Fe}(\text{CO})_5$ auf 130°C geheizt, diese Temperatur für nur eine Minute gehalten, dann abgebrochen und aufgereinigt, sind bereits zusammenwachsende Nanodrähte zu erkennen (*Abbildung 28 B*). Die Tatsache, dass hier schon die Entstehung sphärischer Strukturen neben den Drähten zu beobachten ist, verdeutlicht die Schwierigkeit, Platindrähte sauber zu synthetisieren.

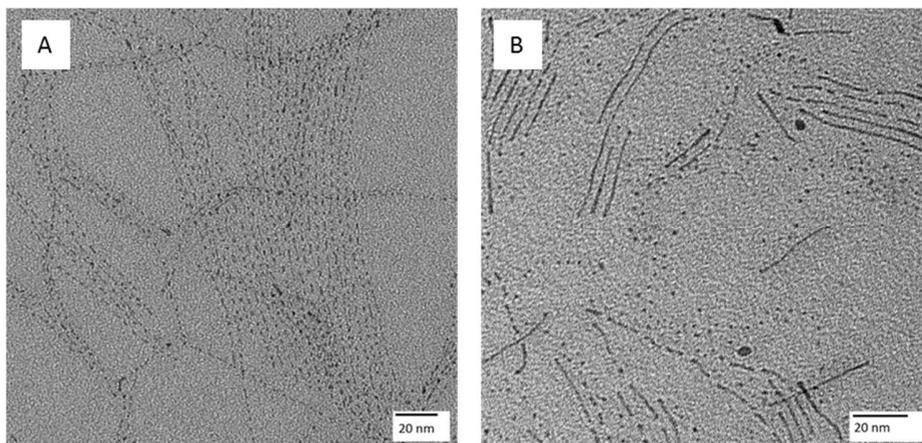


Abbildung 28: TEM-Aufnahmen von: (A) Synthese von Platin-Nanodrähten bei Idealbedingungen, direkt abgebrochen nach $\text{Fe}(\text{CO})_5$ -Injektion bei 120°C und erster Farbänderung. (B) Entsprechend A, Abbruch nach 1 min bei 130°C .

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Synthese von Pt-Nanodrähten idealerweise bei einer Precursorkonzentration von 3,3 mg/mL in Oleylamin durchgeführt wird, die Injektion der 10% Lösung des $\text{Fe}(\text{CO})_5$ in Oleylamin bei 120°C erfolgen und die Endtemperatur 30 min bei 130°C gehalten werden sollte. Die auf diese Weise zu erhaltenden Nanodrähte haben eine Länge von 100 bis 150 nm und eine Dicke von ca. 3 nm. Die Verunreinigung durch entstehende sphärische Platinpartikeln wird weitestmöglich unterdrückt, woraufhin die Platindrähte für die geplante Anwendung eingesetzt werden können. Ein Pulverröntgendiffraktogramm dient zur Bestätigung, dass die Drähte kein Eisen enthalten, das über der Erfassungsgrenze liegt. *Abbildung 29* zeigt abschließend die in hoher Ausbeute und Reinheit hergestellten Platindrähte in uniformer Morphologie.

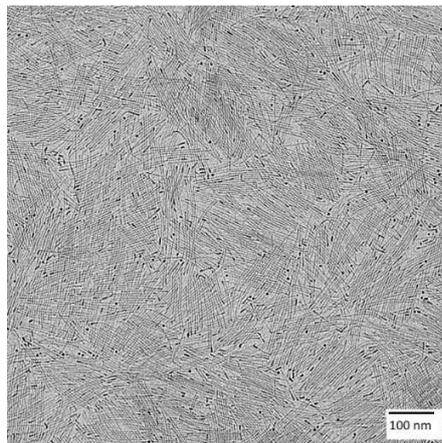


Abbildung 29: TEM-Aufnahme von Platin-Nanodrähten durch Synthese bei Idealbedingungen mit hoher Ausbeute und Reinheit, nahezu ohne Verunreinigung durch sphärische Platinpartikel.

Die Platin-Nanodrähte wurden mit der Röntgendiffraktometrie untersucht, das zugehörige Diffraktogramm ist in *Abbildung 30* gezeigt. Wie auch bei Platinwürfeln sind hier keine Spuren von Eisen nachweisbar. Aufgrund der anisotropen Struktur der Nadeln wurde zum Fitten des Diffraktogramms eine Funktion zur Anpassung an die bevorzugte Orientierung genutzt. Aufgrund von Literaturdaten wurde von einer Ausrichtung in die (111)-Richtung ausgegangen. Dies wurde durch die erfolgreiche Verfeinerung bestätigt. Die Verfeinerung

ergab eine Gitterkonstante von 3,895 Å, was durch die Nanokristallinität von der Bulkverbindung leicht abweicht (3,998 Å). Die Größe der kohärent streuenden Bereiche wurde ermittelt und betrug 3,639 nm. Dies entspricht der gemessenen Dicke der Nanodrähte (ca. 3 nm), ermittelt aus TEM-Aufnahmen. Die Nadeln sind somit im Querschnitt monokristallin.

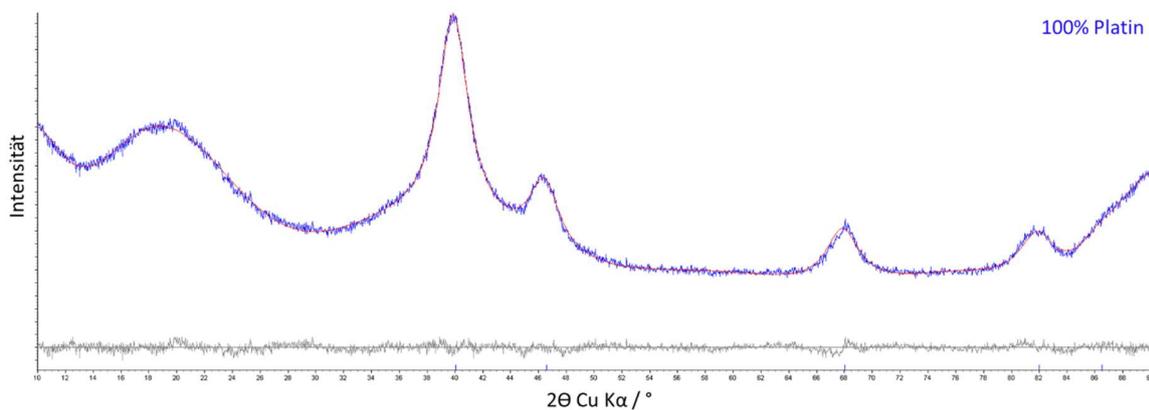


Abbildung 30: Pulverröntgendiffraktogramm mit Rietveldverfeinerung von Platin-Nadeln (blau: Experiment, rot: Verfeinerung, grau: Differenz).

4.2.4 Platin-Nanodrähte im Mikroreaktor

Als zusätzliche Methode zur weiteren Aufklärung des Drahtwachstums und der kontinuierlichen Gewinnung von Nanopartikeln wurde die Synthese der Platin-Nanodrähte für eine Mikroreaktorsynthese in der Kapillare angepasst. Hierdurch sollte einerseits überprüft werden, ob die Methode generell vom Kolben in die Kapillare übertragbar ist, andererseits kann bei erfolgreicher Anpassung die Reaktionskontrolle genauer erfolgen, da durch Flussrateneinstellung etc. die Reaktionsparameter sehr viel feiner justiert werden können. Die hier vorgestellten, ersten Vorversuche erfolgten in einer Kapillare, die über ein PEG-Bad beheizt wurde. In Zukunft soll die Synthese im fest installierten Mikroreaktor durchgeführt werden können. Prinzipiell erfolgte die Vorbereitung der Precursor und Lösungsmittel in einer Stickstoff-Glovebox, da bei der Kapillarsynthese kein Sekurieren der Chemikalien möglich ist. So wurde Pt(acac)₂ in Oleylamin unter leichtem Erwärmen gelöst

und innerhalb der Glovebox in eine Spritze überführt. Ebenso wurde für das Eisenpentacarbonyl vorgegangen. Die Konzentrationen der Edukte entsprachen dabei genau den in der Kolbensynthese verwendeten. Die beiden Spritzen wurden in jeweils eine Spritzenpumpe eingespannt und mittels Schlauch mit einem Splitsystem zur Vermischung verbunden, welches an die eigentliche Reaktionskapillare angeschlossen war. Die Kapillare wurde mit einem beheizten PEG-Bad auf 130°C gebracht. Durch die vorzeitige Vermischung des Platinprecursors mit der $\text{Fe}(\text{CO})_5$ Lösung (was in der Kolbensynthese zu Problemen führte) war hier kein negativer Einfluss auf die Reaktion zu bemerken. Dies ist erklärbar durch das schlagartige Aufheizen der kurz zuvor vermischten Flüssigkeiten in der Kapillare. Die Durchflussrate wurde so eingestellt, dass die mittlere Verweilzeit des Reaktionsgemisches die in der Kolbensynthese üblichen 30 min betrug. Das Produkt wurde in Form einer schwarzen, viskosen Flüssigkeit aufgefangen und aufgereinigt. Der schematisch dargestellte Aufbau ist in *Abbildung 32* und die TEM-Aufnahmen der ersten Ergebnisse in *Abbildung 31* dargestellt.

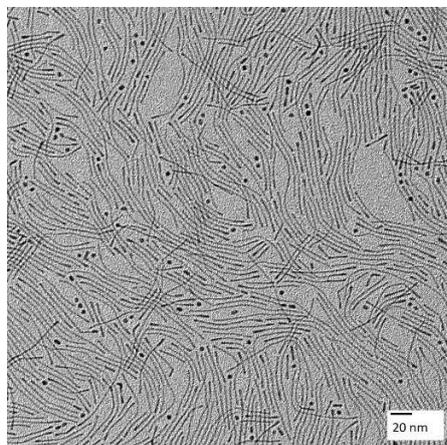


Abbildung 31: TEM-Aufnahme von Platin-Nanodrähten gewonnen aus der Kapillarsynthese.

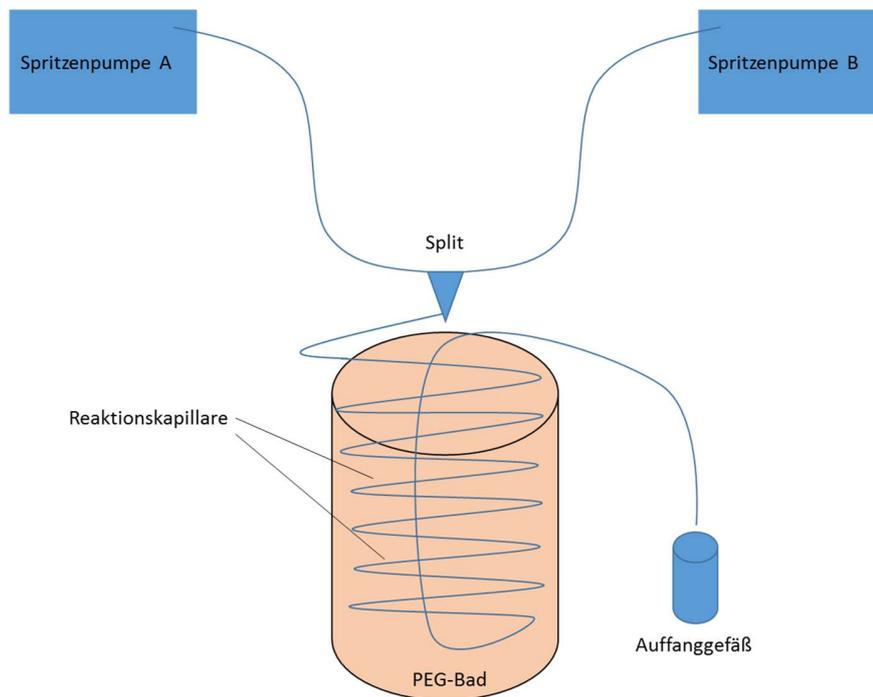


Abbildung 32: Schematischer Aufbau der Synthese in einer Kapillare als Vorversuch zur Mikroreaktorsynthese von Platin-Nanodrähten.

Wie in *Abbildung 31* zu erkennen ist, war die Kolbensynthese optimal auf die Kapillarsynthese übertragbar und die Idealbedingungen für die Entstehung der Platindrähte sind die gleichen. Als weitere Schritte sind Anpassungen der Parameter wie Verweilzeiten und Durchfluss-geschwindigkeiten geplant, um die Entstehung der Nanostruktur genauer verstehen zu können. Weiterhin sollte es möglich sein andere Nanopartikelarten, wie isotrope MnO-, Platin- und FePt-Partikel, aber auch anisotrope Arten wie Pt@MnO im Mikroreaktor wachsen zu lassen. Für letzteres muss nach erfolgter Bildung der Keime ein zweiter Mischungspunkt (Split) angeschlossen werden und die Keime mit dem Precursor der zweiten Domäne in einer weiteren Kapillare zur Reaktion gebracht werden. Neben genauerer Reaktionskontrolle ist ein Vorteil die kontinuierliche Synthese der gebräuchlichen Nanopartikelsysteme.

4.2.5 FePt@Fe_xO-Nanodrähte

Analog zur Synthese der Platin-Nanodrähte ist es möglich FePt-Nanodrähte zu synthetisieren, die, wie ausführlich von Sun *et al.* beschrieben, magnetisch schaltbar sind und somit für Massenspeichermedien in Frage kommen können. [68] Wang *et al.* [63] beschreiben die Synthese der FePt-Drähte analog zur oben aufgeführten Synthese für Platin-Nanodrähte unter Verwendung von äquimolaren Mengen an Fe(CO)₅, was laut Literatur zu einer Verteilung von 50% Eisen und 50% Platin führt. Kombiniert mit der *in situ* Methode für FePt@Fe_xO-Heterodimere, können FePt-Drähte mit einer aufgewachsenen Hülle aus Eisenoxid gewonnen werden in dem die Endtemperatur so kontrolliert wird, dass sich überschüssiges Fe(CO)₅ als Oxid auf die Drähte abscheidet. Die entsprechend hergestellten FePt-Nanodrähte sind in *Abbildung 33 A* und *B* zu sehen. Deutlich zu erkennen ist auf beiden Vergrößerungen die komplette Einhüllung der Partikel mit einer Eisenoxidschicht. Diese stellt eine sehr günstige Oberfläche für die Anbindung von catecholhaltigen Polymeren dar. Bekanntermaßen und ausführlich in Kapitel 5 diskutiert, können Catechol-initiierte Polymere auf Übergangsmetalloxidische Oberflächen binden. Eine Wasserlöslichkeit sollte aufgrund der stark anisotropen Struktur zwar schwieriger zu erreichen, aber nicht unrealisierbar sein. Im Gegensatz zu den im weiteren Verlauf dieses Kapitels beschriebenen Pt@MnO-Nanodrähten, ist bei FePt@Fe_xO-Nanodrähten keine freie Platinoberfläche mehr vorhanden, wodurch sich die katalytische Aktivität des Platins nicht mehr ausnutzen lässt. Hingegen ist die Anwendung als magnetisch schaltbare Partikel mit einer hydrophilisierbaren Hülle vielversprechend und sollte fortgeführt werden. Die biomedizinische Anwendung wird hier ebenfalls vorgeschlagen, da sich aufgrund des hohen Aspektverhältnisses eine Größere Zahl an bioaktiven Molekülen koppeln lassen kann und damit ein *cell targeting* effektiver gestaltet werden könnte. [65]

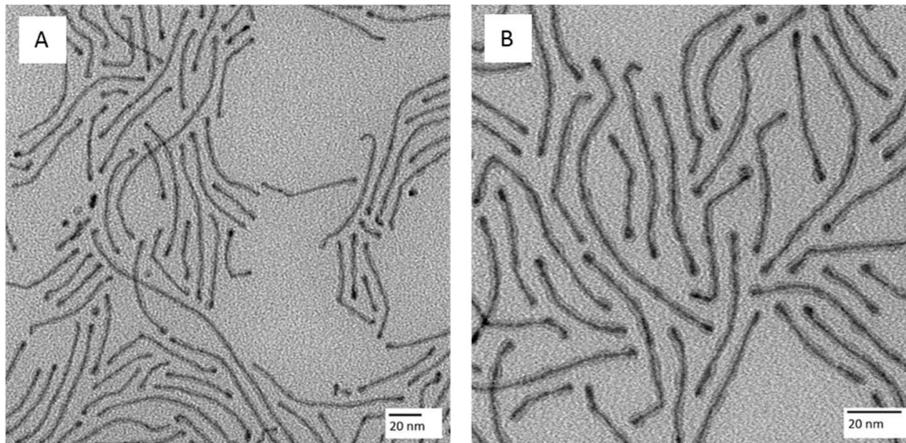


Abbildung 33: TEM-Aufnahmen von: (A) FePt@Fe_xO-Nanodrähten. (B) Entsprechend A, stärkere Vergrößerung.

4.2.6 Pt@MnO-Nanoketten

Die reinen Platin-Nanodrähte (neben isotropen Platinpartikeln) sollten über eine Katalyseaktivität verfügen, die in der Literatur oft vorgeschlagen wird, um unter anderem als Katalysator in Brennstoffzellen Anwendung zu finden.^[69] Eine Schwierigkeit hierbei ist die zuverlässige Anbindung nanostrukturierter Materialien an eine Oberfläche. Wie in dieser Arbeit ebenfalls ausführlich bearbeitet, soll gezeigt werden, dass Manganoxid sowohl auf isotropen Partikeln, als auch auf Platin-Nanodrähten aufwächst. Dies konnte in einer zur Herstellung von Pt@MnO-Heterodimeren analogen Synthese bewiesen werden. Die Schwierigkeit dabei stellen die Verunreinigungen der Nanodrähte mit sphärischen Partikeln dar, da die metalloxidische Domäne scheinbar schwieriger auf anisotropen Strukturen aufwächst als auf isotropen. Erklärbar ist dies über die weniger dichte Oleylaminhülle auf der sehr viel stärker gekrümmten Oberfläche der Sphären. Dort kann das verwendete Mangan(II)-Oleat besser auf der Platinoberfläche aufwachsen. Dieser Effekt ist in *Abbildung 34 A* zu sehen, hier wurde die Synthese mit einem zu hohen Grad an Verunreinigung durch sphärische Partikel durchgeführt. Da allerdings die Platin-Nanodrahtsynthese so verbessert wurde, dass sphärische Partikel nur noch zu einem sehr geringen Prozentsatz entstehen, konnte die neuartige Struktur der Pt@MnO-, „Nanoketten“

aufgrund der perlenkettenartig aufgereihten MnO-Domänen entwickelt werden. Auf einem ca. 100 nm langen Nanodraht wachsen zwei bis fünf Manganoxiddomänen mit einem Durchmesser von ca. 15 nm auf. *Abbildung 34 B - F* zeigt die zugehörigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Ein Röntgendiffraktogramm ist in *Abbildung 35* gezeigt. Das besondere an dieser Struktur sind die freie Platinoberfläche und die dennoch leicht mit Catecholverbindungen adressierbaren MnO-Domänen. Auf diese Weise sollte es möglich sein, Pt@MnO-Ketten über ein catecholtragendes Polymer mithilfe eines zweiten, zur Catecholfunktion orthogonalen Ankers am selben Polymer auf eine Oberfläche anzubinden und somit einen fixierten Platinkatalysator zu erhalten. Die Anbindung der Nanoketten auf eine Oberfläche wird im Kapitel 5 beschrieben.

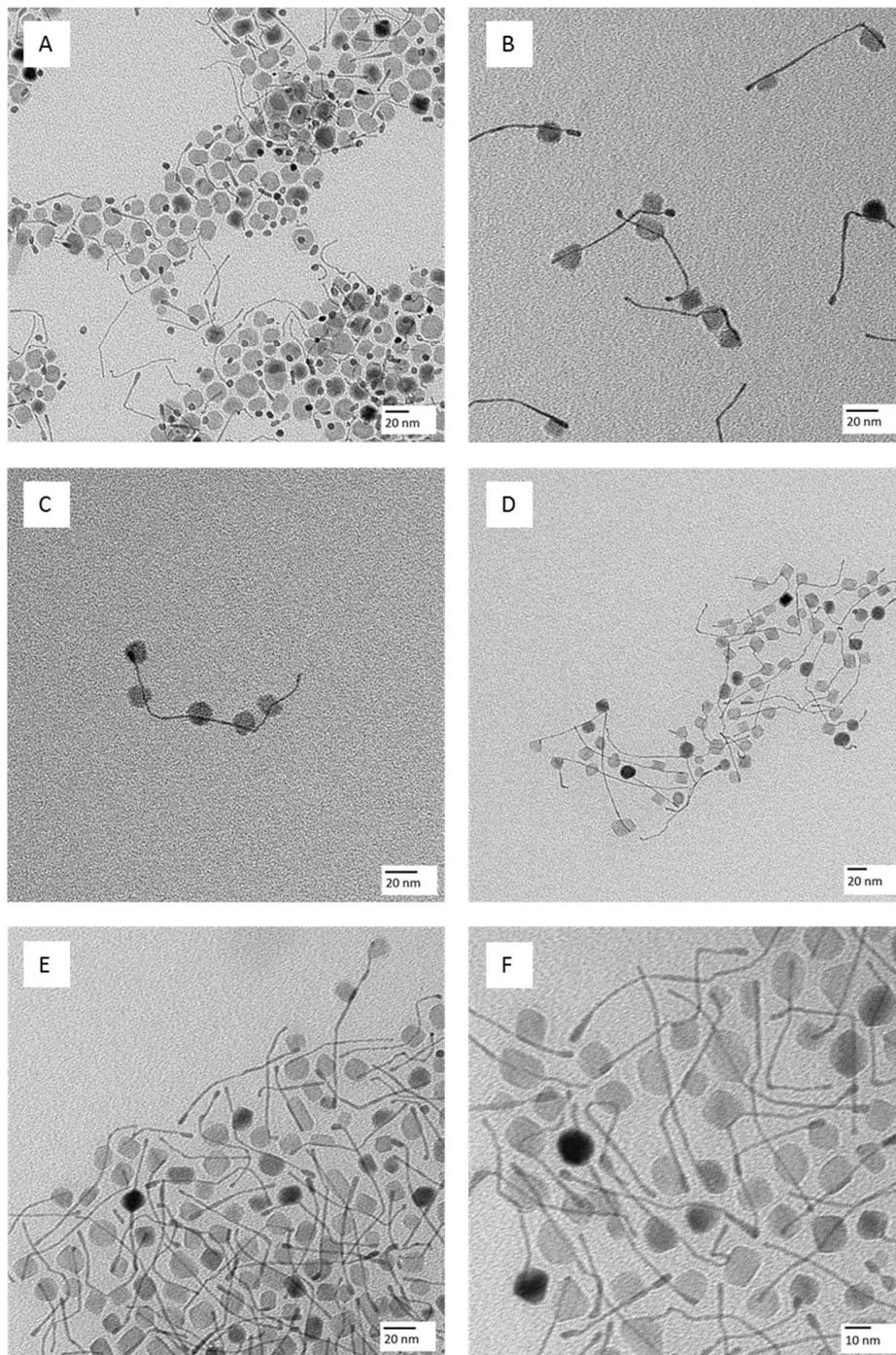


Abbildung 34: TEM-Aufnahmen von: (A) Synthese von Pt@MnO-Nanoketten bei zu hohem Anteil an sphärischen Platinpartikeln. (B) bis (F) Synthese von Pt@MnO-Nanoketten, unterschiedliche Bereiche und Anordnungen bei verschiedenen Vergrößerungen.

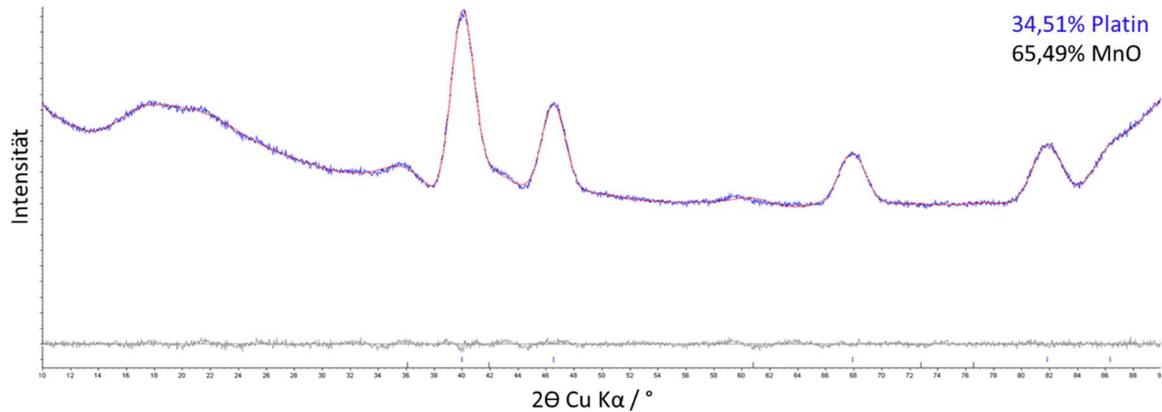


Abbildung 35: Pulverröntgendiffraktogramm mit Rietveldverfeinerung von Pt@MnO-Nanoketten (blau: Experiment, rot: Verfeinerung, grau: Differenz).

Das Diffraktogramm zeigt die Zusammensetzung der Pt@MnO-Nanodrähte. Bei Platin wurden die gleichen Werte für die Kristallitgröße und die Gitterkonstante ermittelt wie in 4.2.3. für MnO wurde durch die Verfeinerung eine Gitterkonstante von 4,306 Å erhalten, die des Bulkmaterials ist 4,445 Å. Die Abweichung ist durch die nanokristalline Probe begründbar. Die ermittelte mittlere Größe der kohärent streuenden Bereiche bei MnO betrug 2,600 nm, somit sind die MnO-Domänen der Nanoketten nicht monokristallin (Abmessung in TEM-Aufnahmen: 10-15 nm).

4.3 Experimenteller Teil

4.3.1 Chemikalien

Die in diesem Kapitel verwendeten Chemikalien sind in Kapitel 8 tabellarisch aufgeführt.

4.3.2 Allgemeines

Alle Synthesen zur thermischen Zersetzung wurden unter Schlenkbedingungen mit Argon als Inertgas durchgeführt. Zu Beginn wurde mehrfach bei $3 \cdot 10^{-2}$ mbar und 60°C sekuriert. Die hergestellten Partikel wurden in 10 mL Hexan gelöst bei 4°C gelagert.

4.3.3 Pt@MnO- und FePt@MnO-Heterodimere (11 nm oder 17 nm MnO-Domäne, keimvermittelt)

Zur Herstellung von Pt@MnO-Dimeren wurde der Mechanismus des keimvermittelten Wachstums ausgenutzt. Hierzu wurden 10 mg an zuvor hergestellten Pt- bzw. FePt-Nanowürfeln (siehe Kapitel 3) in einem Dreihals-Rundkolben zusammen mit 50 mg Mn(II)-Oleat vorgelegt. Als Lösungsmittel wurden 10 mL Heptadecan verwendet. Weiterhin wurden dem Gemisch 656 μL Oleylamin und 318 μL Ölsäure zugesetzt und sekuriert. Anschließend wurde auf 295°C geheizt und bei dieser Temperatur für eine Stunde belassen, um eine 17 nm große MnO-Domänen zu erhalten. Um die MnO-Domäne auf nur 11 nm wachsen zu lassen, wurde die Endtemperatur auf 250°C beschränkt. Die anschließenden Aufreinigungsschritte entsprachen dem oben beschriebenen Standardverfahren (siehe Kapitel 3).

4.3.4 FePt@Fe_xO-Heterodimere (*in situ*)

Bei der Herstellung von FePt@Fe_xO-Dimeren wurde die *in situ* Methode angewendet. Hierbei wurden 100 mg Pt(acac)₂ in 10 mL 1-Octadecen vorgelegt und 30 min bei 60°C sekuriert. Nach weiterem Heizen auf 130°C wurden 882 µL Ölsäure zugegeben, gefolgt von der sofortigen Zugabe von 131 µL Fe(CO)₅. 5 min später wurden 1,175 mL Oleylamin zugegeben und mit einer Heizrate von 8°C/min auf 185°C geheizt. Die Temperatur wurde eine Stunde gehalten, bevor sie mit gleicher Heizrate auf 295°C erhöht wurde und ebenfalls für eine Stunde gehalten wurde. Anschließende Aufreinigung erfolgte nach beschriebenem Standard-verfahren.

4.3.5 Platin-Nanodrähte

Zur Herstellung von Platin-Nanodrähten wurde analog zur Platin-Nanowürfel-Synthese (siehe Kapitel 3) verfahren, unter Beachtung folgender Variationen: Es wurden 100 mg Pt(acac)₂ in 30 mL Oleylamin gelöst und sekuriert. Bei 120°C wurde 50 µL eines 10 % Gemisches Fe(CO)₅ in Oleylamin durch ein Septum zugegeben. Anschließend wurde die Temperatur auf 130°C erhöht und diese für 30 min gehalten. Abschließende Aufreinigungsschritte entsprachen dem oben beschriebenen Standardverfahren unter Verwendung von Isopropanol als Fällungsmittel.

4.3.6 FePt@Fe_xO-Nanodrähte

Die Synthese von FePt@Fe_xO-Nanodrähten war eine Kombination aus den Synthesen der FePt@Fe_xO-Heterodimere und der Pt@MnO-Ketten. 100 mg Pt(acac)₂ wurden in 30 mL Oleylamin vorgelegt und sekuriert. Bei 120°C wurden 131 µL reines Fe(CO)₅ zu dem Reaktionsgemisch zugefügt, um die Reaktion zu starten. Anschließend wurde für 30 min auf 130°C geheizt, bevor das Standardverfahren zur Aufreinigung angewendet wurde.

4.3.7 Pt@MnO-Ketten

Die Synthese von Pt@MnO-Ketten entsprach der Synthese von Pt@MnO-Heterodimeren. Als Keime dienten 10 mg der zuvor hergestellten Platin-Nanodrähte die in 10 mL Heptadecan zusammen mit 318 μL Ölsäure und 656 μL Oleylamin vorgelegt und bei 60°C sekuriert wurden. Anschließend wurde die Temperatur auf 295°C erhöht und eine Stunde gehalten. Die Aufreinigungsschritte wurden nach dem beschriebenen Standardverfahren durchgeführt, unter Verwendung von Aceton als Fällungsmittel.

4.3.8 Parameter für Mikroreaktor

Die verwendete Kapillare war eine „Fused Silica“ Kapillare mit einem Innendurchmesser von 530 μm , einer Länge von 10 m und einem Probenvolumen von 2,206 mL. In Spritzenpumpe A wurde eine 20 mL Spritze eingespannt, die unter Inertgas mit einer 8,5 mM Lösung von Pt(acac)₂ in Oleylamin befüllt wurde. In Spritzenpumpe B wurde eine 20 mL Spritze eingespannt, die unter gleichen Bedingungen mit einer 1,85 μM Lösung von Fe(CO)₅ in Oleylamin befüllt wurde. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Pt(acac)₂ und Fe(CO)₅ war somit entsprechend dem in der Kolbensynthese (4.3.5). Die Flussrate der beiden Spritzenpumpen betrug 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die mittlere Verweilzeit der Lösung in der auf 130°C beheizten Kapillare betrug somit 11 min. Um eine Einstellung des Flussprofils zu gewährleisten wurde die Probe nach 30 min aufgefangen und nach dem Standardverfahren aufgereinigt.

4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte erfolgreich gezeigt werden, wie Platin- und FePt-Nanopartikel dazu eingesetzt werden können, Heterodimere durch keimvermitteltes Wachstum von Manganoxid zu erzeugen. Des Weiteren wurde eine Methode entwickelt Platin- und FePt-Nanodrähte mit hohen Aspektverhältnissen herzustellen und die Verunreinigung der Probe durch sphärische Platinpartikel nahezu zu unterdrücken. Die noch nicht vollständig geklärten Wachstumsmechanismen für diese Struktur wurden mit aktuellen Erkenntnissen verglichen und diskutiert. Die Synthese wurde gleichzeitig für eine Synthese in einer Mikroreaktor kapillare angepasst und erste, erfolgreiche Experimente konnten präsentiert werden. Als Weiterverwendung wurden die Platin-Nadeln benutzt um ihrerseits ein keimvermitteltes Aufwachsen von MnO zu induzieren, entsprechend der Pt@MnO-Heterodimersynthese. Die so erhaltenen Pt@MnO-Ketten stellen eine neuartige Struktur dar, die in weiterführenden Experimenten genauer charakterisiert werden soll.

Kapitel 5

Biofunktionalisierung und Anwendung von anorganischen Nanopartikeln

5.1 Theorie

5.1.1 Einführung

In diesem Kapitel wird genauer auf die Biofunktionalisierung der in Kapitel 3 und 4 hergestellten Partikel und Hybridpartikel eingegangen. Prinzipiell ist der erste Schritt, um eine Nanostruktur biofunktionell zu machen, die Wasserlöslichkeit. Nanopartikel werden häufig in organischen Lösungsmitteln dargestellt, gerade die in dieser Arbeit verwendeten Partikel sind Produkte aus thermischen Zersetzungen von Metallausgangsverbindungen unter Verwendung organischer Lösungsmittel und *capping agents* wie Ölsäure und Oleylamin. Die hydrophobe Hülle des Nanopartikel muss also effektiv und stabil gegen eine hydrophile Hülle ausgetauscht werden. Weiterhin muss diese Hülle noch mehrere wichtige Kriterien erfüllen, die die biomedizinische Anwendung ermöglichen. Dazu zählt eine möglichst gute

Stabilität der Partikel in biologischen Medien, um die Zirkulationszeit im Blutstrom möglichst hoch zu halten. Gleichzeitig muss die Hülle den Organismus zuverlässig vor dem meist toxischen Material der Nanopartikel schützen. Bekanntermaßen entwickelt wohl jedes *in vivo* eingesetzte Partikel eine Proteinkorona.^[26] Das Ziel ist es also, diese möglichst klein zu halten und somit die Partikel vor der Erkennung durch das reticuloendotheliale System (RES) und vor den von diesem System ausgehenden Prozess der Opsonisierung zu schützen. Generell gebräuchlich sind heute das Anbringen einer Hülle aus Silica,^[70] einer Hülle aus geeigneten Zuckermolekülen wie Dextran,^[71] die Verwendung eines Amphiphils zur Einlagerung in den hydrophoben *capping agent* mit herausragendem hydrophilen Teil („amphiphile Mizelle“),^[72] sowie einer Umhüllung mit wasserlöslichen Blockcopolymeren mit mehreren spezifischen Ankern pro Block, bzw. einem einzigen Anker pro Polymer.^[17] Die fünf beschriebenen Varianten sind in *Abbildung 36* zusammengestellt.

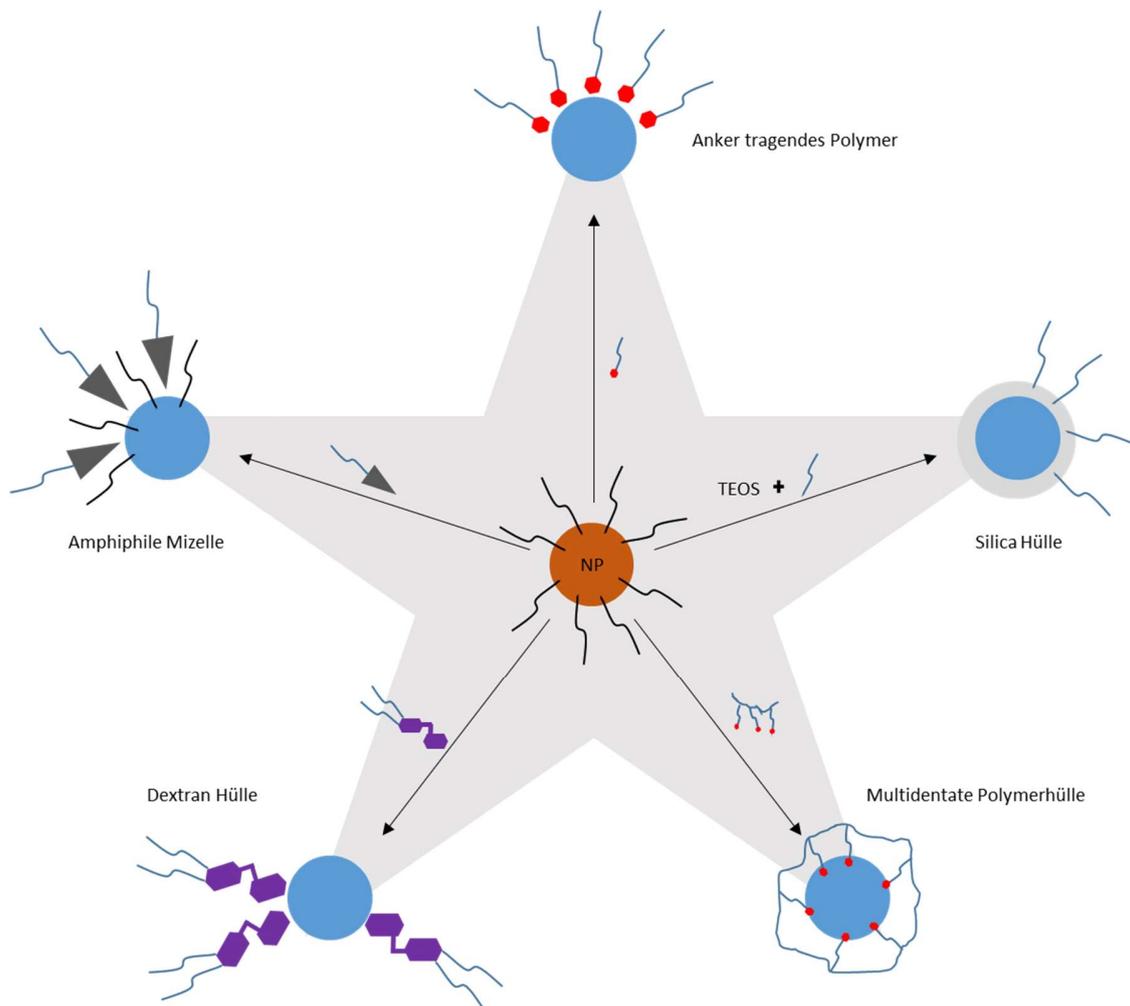


Abbildung 36: Fünf Mechanismen der Biofunktionalisierung. *Oben:* Verwendung eines ankertragenden, hydrophilen Polymers, welches den hydrophoben Liganden des Partikels per Ligandenaustausch verdrängt. *Mitte links:* Verwendung eines amphiphilen Moleküls, meist mit hydrophilem Polymerrückgrat und lipophilen Anker zur Einlagerung in die hydrophobe Hülle des Partikels. *Mitte rechts:* Anbringung einer Silicahülle über Polykondensation eines Siliciumalkoxides (TEOS: Tetraethylorthosilicat) auf das Partikel unter Zusatz eines hydrophilen Polymers mit Silananker. *Unten links:* Umhüllung eines Partikels mit Dextran-molekülen, meist mit zusätzlichen hydrophilen Seitenketten. *Unten rechts:* Umlagerung eines Partikels durch multidentate Polymerhülle, einer Polymerstruktur mit mehreren, für das Partikelmaterial spezifischen Ankergruppen.

Auf die Verwendung von ankertragenden Polymeren wird im Rahmen dieser Arbeit besonderes Augenmerk gelegt. Des Weiteren wird kurz auf die Anbringung einer Silicahülle eingegangen und die Einlagerung eines Amphiphils in die hydrophobe Hülle des Nanopartikels sowie die daraus gebildete amphiphile Mizelle um das Partikel beschrieben.

Im Bereich der Polymere gibt es weitreichend etablierte Systeme wobei vor allem die Verwendung des biokompatiblen Polyethers Poly(ethylenglykol) (PEG) zu nennen ist. In der Literatur wird häufig die Verwendung dieses gut erprobten Polymers beschrieben, um Nanopartikel stabil in Wasser bzw. Serum zu lösen. Hierbei werden beispielsweise die guten „Stealth“ Eigenschaften genannt, welche unter anderem die vermiedene Erkennung durch das Immunsystem *in vivo* beschreiben.^[27] Des Weiteren finden PEG und dessen Derivate verstärkt Anwendung in einer Vielzahl von Fachgebieten wie zum Beispiel in der Kosmetik, als nichtionisches Tensid oder in der Textilindustrie, als Bestandteil von Funktionsbekleidung.^[73] Als wichtigste Eigenschaften des PEGs sind die einzigartige Wasserlöslichkeit und die nahezu nicht vorhandene Toxizität zu nennen. Eine solche Wasserlöslichkeit ist bei gewöhnlichen aliphatischen Polyethern, wie Poly(oxymethylen) (POM) oder Poly(propylenoxid) (PPO) nicht vorhanden. Zusätzlich wurde für PEG-beschichtete Partikel eine verstärkte Aufnahme in Zellen berichtet.^[74] Die Wasserlöslichkeit wird mit dem Abstand der Sauerstoffatome im PEG-Rückgrat begründet. Dieser entspricht weitestgehend dem Abstand der Sauerstoffatome in flüssigem Wasser. Somit ermöglicht die Polymerkette ein großes Netzwerk von Wasserstoffbrücken, und eine ausgedehnte Hydrathülle kann sich ausbilden.^[73] Es existiert allerdings eine kritische Entmischungstemperatur (LCST; engl: lower critical solution temperature) oberhalb derer PEG keine effektive Hydrathülle mehr ausbilden kann und daher unlöslich wird. Diese Temperatur liegt für Poly(ethylenglykol) bei ca. 100°C, die biomedizinische Anwendung bei 37°C ist daher nicht betroffen.^[75] Häufig wird PEG mit einer für die Zieloberfläche spezifischen Ankergruppe ausgestattet, die die Anbindung effektiver macht. Die mannigfaltig eingesetzte Gruppe des Catecholankers ist besonders interessant, da die Affinität zu einer metall-oxidischen Oberfläche (am häufigsten auf Oxide der 3d-Übergangsmetalle angewendet) bemerkenswert hoch ist. So ist die Komplexbildungskonstante von Catecholen zu

Fe³⁺-Ionen bei Werten von über $K=10^{40}$ einzuordnen. [76] Für die hohe Stabilität verantwortlich sind mehrere, wohl in Kombination wirkende Effekte. Zwar ist noch nicht vollständig geklärt, wie die enorm hohe Stabilitätskonstante zustande kommt, dennoch sind die im Folgenden aufgeführten Effekte wohl ausschlaggebend. Zum einen stellt der Benzolring mit den in *ortho*-Position zueinander stehenden Hydroxylgruppen einen bidentaten Chelatliganden dar, der ein Metallion generell effektiver komplexiert als ein unidentater Ligand. Zum anderen sind die Oberflächenatome von Nanopartikeln aufgrund des starken Symmetriebruchs häufig unterkoordiniert, durch die Anbindung des Catechols kann diesen Ionen die energetisch günstige, in den meisten Fällen oktaedrische Umgebung ermöglicht werden. (*Abbildung 37*) Ebenfalls wird argumentiert, dass das relativ „harte“ Catechol - nach Pearsons Konzept der „hard and soft acids and bases“, (HSAB) - mit den ebenfalls, aufgrund ihrer höheren Ladung, eher härteren Metalloxidionen stabile Verbindungen eingeht. Nicht zuletzt ist der ausgebildete 5-Ring (*Abbildung 37*) zwischen Metallion und Catechol eine sterisch und energetisch stabile Struktur. Des Weiteren liegt ein Redoxgleichgewicht zwischen teilweise oxidiertem Catechol (Semichinon) und partiell reduziertem Ion vor, was auch aufgrund des im Catecholring vorhandenen Mesomeriegleichgewichtes zur Stärkung der Bindung beiträgt. Im Gegensatz zum vorhandenen *capping agent* wie Ölsäure oder Oleylamin ist das Catechol ein wirkungsvollerer Ligand für die Partikeloberfläche.

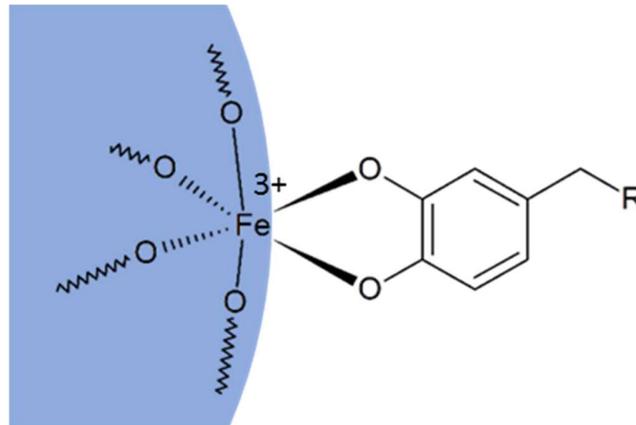


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Bindung des Catecholankers an die oft unterkoordinierte Oberfläche eines metalloxidischen Nanopartikels.

Somit wird klar, wie effizient der Ligandenaustausch von der Carboxylgruppe der Ölsäure zur Catecholgruppe auf der Partikeloberfläche von Statten geht. Außerdem wird deutlich, dass eine Umhüllung mit Polymeren ohne spezifische endständige Ankergruppe zu einem weniger effektiven *capping*-Effekt führt. Werden Blockcopolymer verwendet, deren unterschiedliche Blöcke verschiedene funktionelle Gruppen oder Anker tragen können (Abbildung 36, unten rechts), ordnet sich das Polymer um das Partikel herum an. Im Gegensatz dazu richtet sich ein Polymer mit endständigem Anker auf dem Partikel wie ein Haar auf, erzwingt somit eine größere Distanz zwischen den einzelnen Partikeln und vermeidet effektiver eine Agglomeration. Nicht vernachlässigt werden darf die Möglichkeit, dass ein solches Blockcopolymer mit mehreren Ankergruppen mehrere Partikel einschließen kann und dadurch für Agglomerate sorgen kann. Durch die starke Anbindung und Komplexierung der Oberfläche und der daraus resultierenden stabilen Hülle wird zusätzlich erwartet, dass sich potentiell toxische Metallionen weniger leicht aus dem Partikel herauslösen können. Als eine der wenigen Methoden, die besser geeignet ist das Herauslösen zu verhindern als eine Polymerhülle, muss die Silica-Ummantelung erwähnt werden. Diese im weitesten Sinne „anorganische Polymerisation“ des Silicaprecursors, meist ein Alkoxid wie beispielsweise Tetraethylorthosilicat (TEOS), ist die wohl toxikologisch am besten verträgliche Funktionalisierung. Die Erklärung hierfür ist die größere Dichte des amorphen

Silicas verglichen mit der Ligandenhülle aus Polymeren. Allerdings gibt es bei der Verwendung der Silicahülle Einschränkungen, die es bei der Polymerhülle nicht oder weniger ausgeprägt gibt. Im Polymer kann die funktionelle Gruppe bereits enthalten sein. Das heißt, orthogonal zur Ankergruppe kann am Polymer zum Beispiel eine Aminfunktion sitzen, die über Amidkopplungen für eine große Reihe an biologisch funktionellen Molekülen ansteuerbar ist. Ebenfalls sind „Klickreaktionen“ zu verwirklichen, sobald das Polymer am Ende die dafür nötige Mehrfach-bindung aufweist. Bei einer Silicahülle muss zwangsweise eine weitere Reaktion angefügt werden, um die Biofunktionalisierung zu erreichen. Auch potentielle Anwendungen in der Magnetresonanztomographie (MRT) können eingeschränkt sein, da die T_1 -Zeit (bei Manganoxidnanopartikeln) abhängig von der Entfernung des Protons vom Resonanzmittel ist. Hierzu ist eine dicke Silicahülle kontraproduktiv und muss daher unter synthetischem Aufwand möglichst dünn gehalten werden.

5.1.2 Die Catecholankergruppe

Wie oben bereits erklärt, ist die Catecholgruppe der in dieser Arbeit eingesetzte Anker für die Anbringung einer Polymerhülle. Die vorrangige Anwendung der hergestellten Nanopartikel auf Manganoxidbasis ist die der T_1 -Kontrastmittel in der MRT, daher eignet sich eine dünne, aber stabile Polymerhülle (neben der dünnen Silicahülle) am besten. Die potentiell höhere Gefahr toxischer Effekte wird in diesem Kapitel diskutiert und ebenfalls in Kapitel 6 unter Verwendung verschiedener Polymerlängen ausführlich untersucht. Als Inspiration für dieses effektive, einzigartige Anker-molekül wird heute am häufigsten die Aminosäure L-DOPA (*Abbildung 38*) genannt, die als Bestandteil von adhäsiven Muschelproteinen (MAP; engl.: mussel adhesive protein) bekannt ist und diese befähigt selbst unter Wasser an metallhaltigen Gesteinen oder Schiffen erstaunlich festen Halt zu finden.^{[77], [78]} L-DOPA ist eine Zwischen-stufe in der Biosynthese des Adrenalins und wird durch Hydroxylierung eines Moleküls Tyrosin durch die Tyrosin-Hydroxylase erhalten. Für gewöhnlich ist L-DOPA allerdings eine nicht proteinogene Aminosäure, was deren

Vorkommen in MAPs umso interessanter macht. Im Weiteren wird durch einen Decarboxylierungsschritt das, unter anderem als Neuro-transmitter bekannte L-Dopamin hergestellt (weiterhin als Dopamin bezeichnet). Dopamin ist in der beschriebenen Biosynthese die direkte Vorstufe zu Noradrenalin und schließlich Adrenalin.

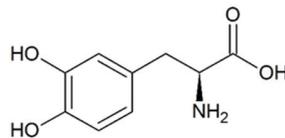


Abbildung 38: Strukturformel der Aminosäure L-DOPA.

Interessanterweise kann die Catecholgruppe noch in weiteren Fällen in der Natur gefunden werden, an dieser Stelle sollen ins besondere die Siderophore hervorgehoben werden. Siderophore sind Eisentransportmoleküle von Mikroorganismen, die an die Umgebung abgegeben werden, Eisen komplexieren und als Komplex wieder aufgenommen werden. Viele Moleküle dieser Familie tragen Catecholgruppen, um Fe^{3+} effektiv zu binden und zurück in die Produzentenzelle zu bringen. Beispielsweise trägt Enterobactin drei Catecholgruppen im Molekül, wodurch ein Eisenion oktaedrisch umgeben werden kann (*Abbildung 39*).^[76] Der Grund für diesen Eisenaufnahmemechanismus von Bakterien und Mikroorganismen ist die geringe Bioverfügbarkeit des Eisens in der Natur, da dieses Metall meist als unlöslicher Hydroxokomplex vorliegt. Wird allerdings ein Chelator angeboten, der einen noch stabileren Komplex mit Eisen(III) eingeht, wird das Metall herausgelöst und im Siderophor aufgenommen. Intrazellulär findet eine Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} statt, zu welchem das Catecholsystem des Siderophors eine deutlich geringere Bindungsaffinität und Komplexbildungskonstante aufweist als zur höher oxidierten Form, wodurch das Metall schließlich freigegeben und dem Organismus zur Verfügung gestellt wird.

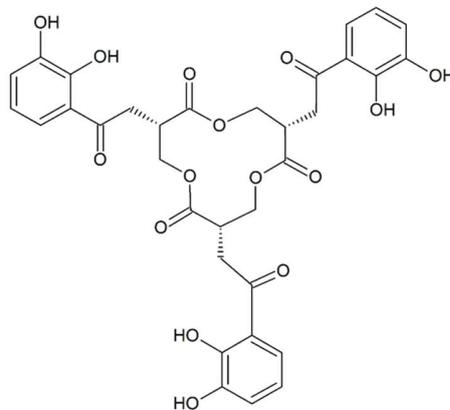


Abbildung 39: Gestreckte Form des Siderophors Enterobactin mit drei Catecholfunktionen zur oktaedrischen Koordination eines Fe³⁺-Moleküls.

5.1.3 Die Dopaminankergruppe

Durch die beschriebene Bindungsaffinität eignet sich das Catecholsystem ideal zur Bindung an die Oberfläche metalloxidischer Nanopartikel. Bei der Verwendung von Dopamin als Anker werden allerdings einige Schwierigkeiten diskutiert, die potentiell dazu führen können, dass Biofunktionalisierung und Stabilität nicht ausreichend gut zu erzielen sind. Der Verankerungsmechanismus am Metalloxid selbst läuft wie oben beschrieben ab, die Problemstellen tauchen im weiteren Aufbau des hydrophilen Rückgrats auf. Eine erste Einschränkung besteht in der Länge der PEG-Kette, welche an die Dopamineinheit angehängt werden soll. Kommerziell erhältlich ist nur eine begrenzte Anzahl an PEG-Kettenlängen. Ebenfalls muss in einem zusätzlichen synthetischen Schritt das zu verwendende PEG unter aufwändiger Schutzgruppenchemie und Amidkopplung auf das Dopamin angebracht werden. Eine mögliche Verunreinigung des erhaltenen Dopa-PEGs ist ein Molekül Dopamin, an dessen Stickstoffatom zwei Säure-PEG Ketten gebunden haben. Der Einbau und die Verankerung dieses zweikettigen Moleküls in die Ligandenhülle auf der Partikeloberfläche zusammen mit dem gewünschten einkettigen Molekül führt vermutlich zum Verlust der Homogenität und zu erhöhter Instabilität der Ligandenhülle. Die beschriebenen Probleme tauchen nicht bei jedem Versuch der Funktionalisierung auf, wodurch teilweise über Monate hinweg in Wasser stabile Partikeldispersionen erhalten

werden, aber auch die Stabilität nach wenigen Minuten zusammenbrechen kann. In einem zweiten Ansatz der Herstellung des Dopa-PEGs, wie weiter unten genauer beschrieben, wird als Catecholkomponente ein Zimtsäurederivat verwendet. Das hier zur Peptidkopplung aminogruppentragende PEG bringt das Problem mit sich, seinerseits von zwei Molekülen Zimtsäure angegriffen werden zu können, was ebenfalls eine Verunreinigung darstellen kann, und zum Stabilitätsverlust beitragen könnte. Da somit die Reproduzierbarkeit nicht vollständig gegeben ist, wurde nach einer Methode gesucht, die diese Probleme umgeht und die Stabilität zuverlässig reproduzierbar macht. Hierzu wurde von Wilms *et al.* ein catecholinitiiertes PEG entwickelt, wobei direkt vom Catecholanker weg polymerisiert wird.^[79] Die hierzu verwendete, anionisch-ringöffnende Polymerisation verhilft dazu, dass metalloxidische Nanopartikel stabil und reproduzierbar funktionalisiert werden und teilweise über Jahre stabil dispergiert bleiben. Wie bereits erwähnt besteht bei der Herstellung von Dopa-PEG ein weiterer Nachteil, der ebenfalls durch die Möglichkeit die Polymerisation direkt vom Anker weg durchzuführen umgangen werden kann. Die Länge der Kette ist sehr gut kontrollierbar und auch die Endgruppenfunktion ist je nach Einsatzgebiet anpassbar. So ist die Funktionalisierung nicht mehr durch die kommerziell erwerblichen Produkte eingeschränkt. Multifunktionale PEGs (*mf*-PEGs) sind ebenfalls möglich wodurch der Nachteil der geringen Funktionalität von PEG umgangen werden kann. Beispielsweise kommt PEG-*b*-PGA (PEG-*block*-Poly(glycidylamin)) zum Einsatz, welches ein Blockcopolymer aus einer PEG-Kette, gefolgt von einem Block Poly(glycidylamin) darstellt. Hierdurch werden die benötigten Aminogruppen für die Anbindung vieler biochemisch aktiver Moleküle erhalten. Ebenfalls kann das PGA statistisch im Polyether verteilt sein um weitere Aminogruppen in der Ligandenhülle unterzubringen.^[80] Die im Weiteren C-PEG bzw. C-PEG-*b*-PGA genannten Catechol-PEGs und Catechol-PEG-*b*-PGAs werden in diesem Kapitel als herausragende Möglichkeit vorgestellt stabile Dispersionen von metalloxidischen Nanopartikeln und Hybridnanopartikeln zu erzeugen.

5.1.4 Zur Herstellung von Dopa-PEG und Dopa-PEG-Amin

Es existieren zwei Wege, Dopa-PEG herzustellen. Beide führen zu dem catecholankertragenden Molekül mit PEG-Seitenkette, welches als Dopa-PEG bezeichnet wird, die jedoch einen geringfügig anderen, für die Funktion des Moleküls vorrangig unwichtigen Aufbau haben. Der Unterschied liegt in den beiden Ausgangsverbindungen begründet. So kann die Catecholkomponente durch das Molekül 3-Hydroxytyramin (Dopamin) oder durch 1,3-Dihydroxyhydrozimsäure gestellt werden. Das jeweilig eingesetzte PEG muss die zur Peptidkopplung nötige zweite Komponente liefern. So kommen ein aminogruppentragendes PEG mit dem Zimtsäurederivat zur Reaktion und ein säuregruppentragendes PEG mit dem Dopamin. Die Herstellung des Dopa-PEG-Amins beinhaltet einige aufwändige Schritte der Peptidkopplungen, Schutzgruppenchemie und Aufreinigungen. Als PEG-Precursor wird $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ einseitig Boc-geschützt. Ausgehend von 3,4-Dihydroxyzimtsäure und N-Boc-PEG-NH_2 wird über DCC-Kopplung unter Verwendung von NHS, HOBt und DIPEA ein Dopa-PEG-Amin Molekül erhalten, welches nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe eine freie Aminofunktion am Ende der Kette trägt.^[12] Wird von Dopamin ausgegangen, kommt ein PEG-Disäure-Molekül zum Einsatz (*Abbildung 40*). *Abbildung 41* zeigt die ebenfalls vereinfachte Synthese des Dopa-PEGs mit einer Carboxylgruppe als Endfunktion.^[81] Diese kann anschließend reaktiv aufgearbeitet werden und somit eine Hydroxylgruppe erhalten werden.

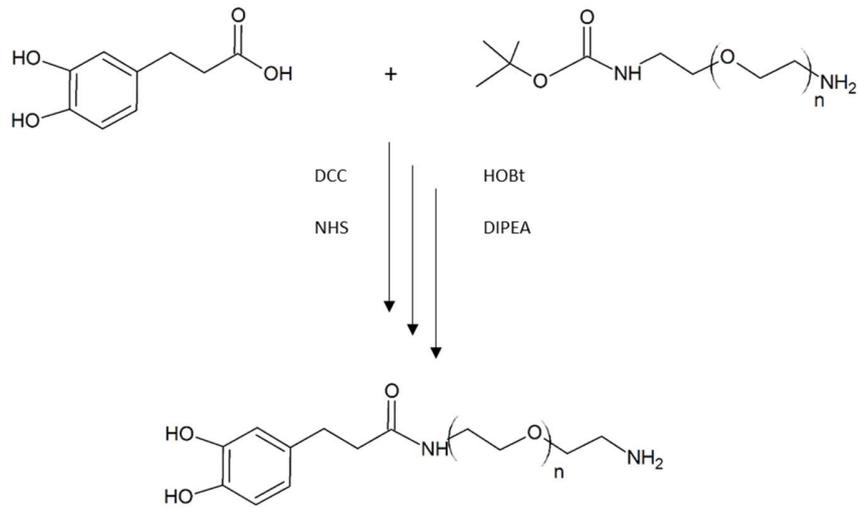


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Synthese des Dopa-PEG mit endständiger Aminofunktion, ausgehend von einem einseitig geschützten Diamino-PEG und 3,4-Dihydroxyhydrozimisäure.

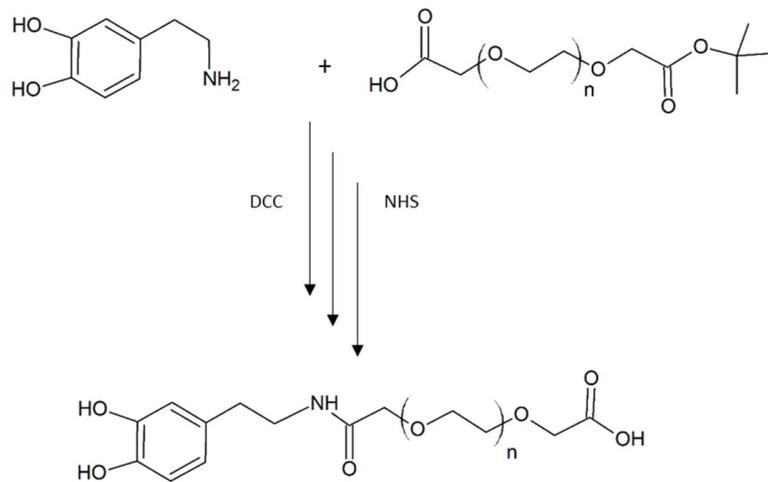


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Synthese des Dopa-PEG mit endständiger Säurefunktion, ausgehend von einem Disäure-PEG und Dopamin.

Kerstin Koll beschrieb in ihrer Dissertation unter anderem die Herstellung und Verwendung verschiedener auf Dopa-PEG basierender Polymersysteme zur Funktionalisierung anorganischer Nanopartikel. ^[82] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll Bezug auf zuvor erlangte Kenntnisse über Synthese, Stabilität, Toxizität und Anwendung genommen werden und somit das Dopasystem mit dem Catecholinitiatorsystem verglichen werden.

5.1.5 Zur Herstellung von Catechol-PEG und Catechol-PEG-*b*-PGA

Die Herstellung der beiden Strukturen beruht auf der anionisch-ringöffnenden Polymerisation (AROP) von Ethylenoxid (EO). (*Abbildung 42*) Die Relevanz der anionischen Polymerisationsmethode resultiert aus dem „lebenden Charakter“ dieser Reaktion, die eine hervorragende Kontrolle des Molekulargewichts durch das Monomer zu Initiator Verhältnis ermöglicht, sowie niedrige Polydispersitäten (PDI).

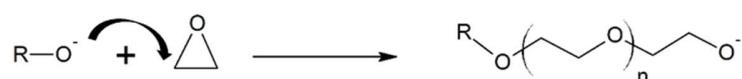


Abbildung 42: Schematische Darstellung der anionisch-ringöffnenden Polymerisation von Ethylenoxid (EO).

Der Rest *R* in *Abbildung 42* ist im Falle der Herstellung der Catechol-PEGs ein acetalgeschützter Catecholinitiator (2,2-Dimethyl-1,3-Benzodioxol-5-Propanol; CA-OH). (*Abbildung 43*, Mitte) In *Abbildung 43*, Reaktionsweg B ist die Polymerisation des EO ausgehend von CA-OH und anschließender Schutzgruppenabspaltung unter Erhaltung des C-PEGs gezeigt. In Weg A wird die Synthese des aminogruppentragenden PEGs unter analoger Verwendung von EO und einer geringeren Menge N,N-Diallylglycidylamin (DAGA) dargestellt. Erhalten wird hierbei das Blockcopolymer C-PEG-*b*-PGA. Die Deprotonierung des CA-OH Initiators erfolgt mit Cäsiumhydroxid (CsOH x H₂O), gefolgt von der Polymerisation von EO und anschließend von DAGA, falls Blockcopolymere erwünscht sind.

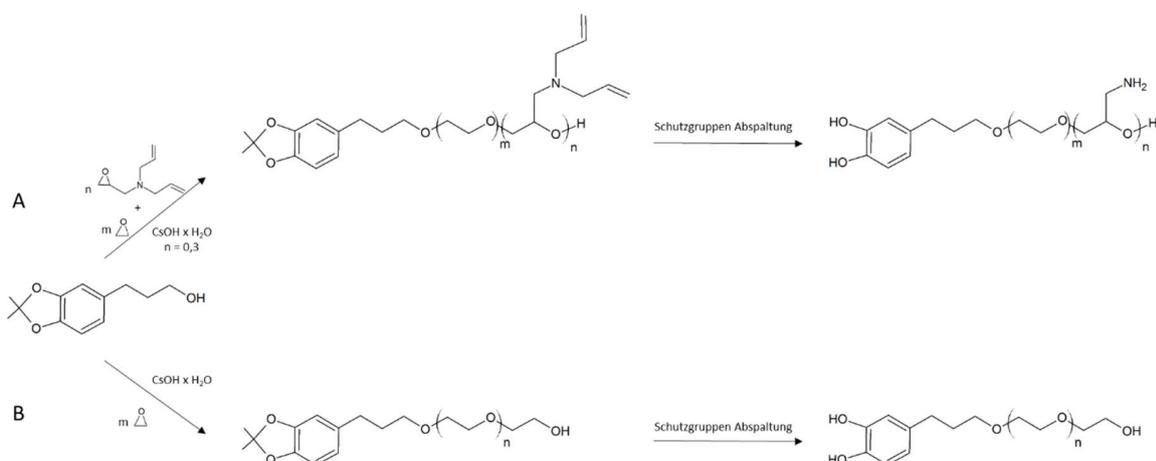


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Synthese von catecholinitiiertem PEG. (A) Herstellung des Blockcopolymeren C-PEG-*b*-PGA aus EO und DAGA. Hierbei können Catechol und PGA-Block selektiv geschützt werden (B) Herstellung des monofunktionellen C-PEGs aus EO.

Die Synthese der beiden C-PEG-Moleküle ist zeitsparender und dennoch kontrollierter durchzuführen als die zuvor beschriebene Synthese eines entsprechenden Dopa-PEGs. Der Bereitstellung des Initiators CA-OH gehen zwei wichtige synthetische Schritte voraus, die in *Abbildung 44* aufgezeigt sind. Ausgehend von 3,4-Dihydroxyhydrozimtsäure wird eine Acetalschutzgruppe eingeführt um die orthoständigen Hydroxylgruppen am Benzolring in einem stabilen Fünfring zu schützen. Hierzu kommt 2,2-Dimethoxypropan mit katalytischen Mengen an *para*-Toluolsulfonsäure zum Einsatz. Die beiden resultierenden Moleküle sind die acetalgeschützte Säure (CA-COOH) und der entsprechende Methyl ester (CA-COOME), welche mit einem Überschuss an LiAlH_4 zum jeweiligen Alkohol (CA-OH) reduziert werden und somit die für die anionisch ringöffnenden Polymerisation nötige, deprotonierbare Hydroxylgruppe liefern (*Abbildung 44*).^[79]

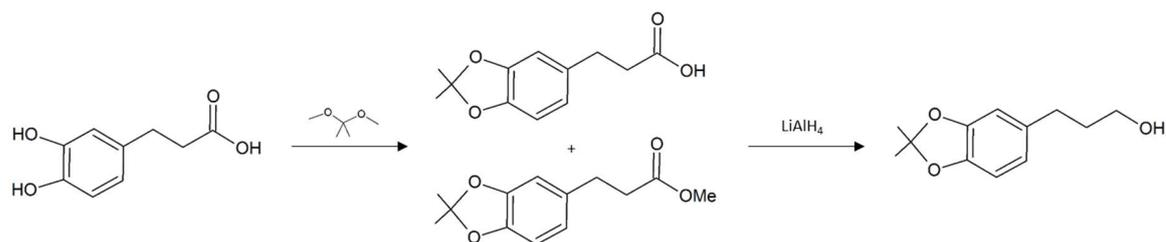


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Gewinnung des Initiatormoleküls (CA-OH) aus 3,4-Dihydroxyhydrozimsäure.

5.1.6 Zur Herstellung von linearen und hyperverzweigten Catechol Polyglycerolen (C-PG; *lin, hb*)

Da Poly(ethylenglykol) zwar ausgezeichnete Parameter liefert, um in pharmazeutischen und biomedizinischen Gebieten Anwendung zu finden, aber doch eine eher geringe Anzahl an funktionellen oder funktionalisierbaren Gruppen bietet, wurde viel Arbeit auf dem Gebiet der multifunktionellen PEGs (*mf*-PEGs) geleistet. Bei dieser vielseitiger einsetzbaren Polymerstruktur kommt erneut die anionische Polymerisation von Ethylenoxid zum Einsatz. Mit Hilfe der Copolymerisation eines zweiten geeigneten Comonomers, werden ausgehend von EO neue funktionelle Gruppen eingeführt. ^[83] Die oben beschriebene Diblockstruktur des C-PEG-*b*-PGA ist eine aus diesem Prinzip resultierende multifunktionelle Variante des gewöhnlichen PEGs. Polyglycerole (PGs) bieten sehr gut mit PEG und *mf*-PEG vergleichbare Eigenschaften bezüglich ihrer Toxizität, Biokompatibilität und Wasserlöslichkeit, die nicht zuletzt durch die erhöhte Anzahl an Hydroxylgruppen bedingt ist. ^{[84], [85]} Die Verwendung von Polyglycerolen für die Funktionalisierung von anorganischen Nanopartikeln ist bereits literaturbekannt. Hierbei gibt es mehrere Mechanismen: Das „*grafting from*“, das „*grafting to*“ und das nicht kovalente Anbringen einer PG-Hülle. ^{[86], [87], [88]} Besonders bei *grafting from* Mechanismen, sind die stark limitierten Möglichkeiten der Polymercharakterisierung von Nachteil. Bei beiden Mechanismen, *grafting from* und *grafting to*, ist die Vorbereitung der Nanopartikelprobe für das Aufwachsen des Polymers sehr aufwändig. Weiterhin werden hohe Anforderungen an die Nanopartikel gestellt bezüglich deren Stabilität unter den stark basischen Bedingungen der anionisch-

ringöffnenden Polymerisation. ^[85] Diese einschränkenden Punkte zeigen einmal mehr die Vorzüge der Verwendung des Catecholankers auf, welcher analog zur Herstellung der catecholinitiierten PEGs bei den PGs zum Einsatz kommen kann. Das Initiator-molekül ist ebenfalls das acetalgeschützte Zimtsäurederivat CA-OH, welches zur Herstellung von linearem C-PG (C-*lin*PG) mit dem Monomer Ethoxyethyl-Glycidylether (EEGE) zur Reaktion gebracht wird (Abbildung 45).

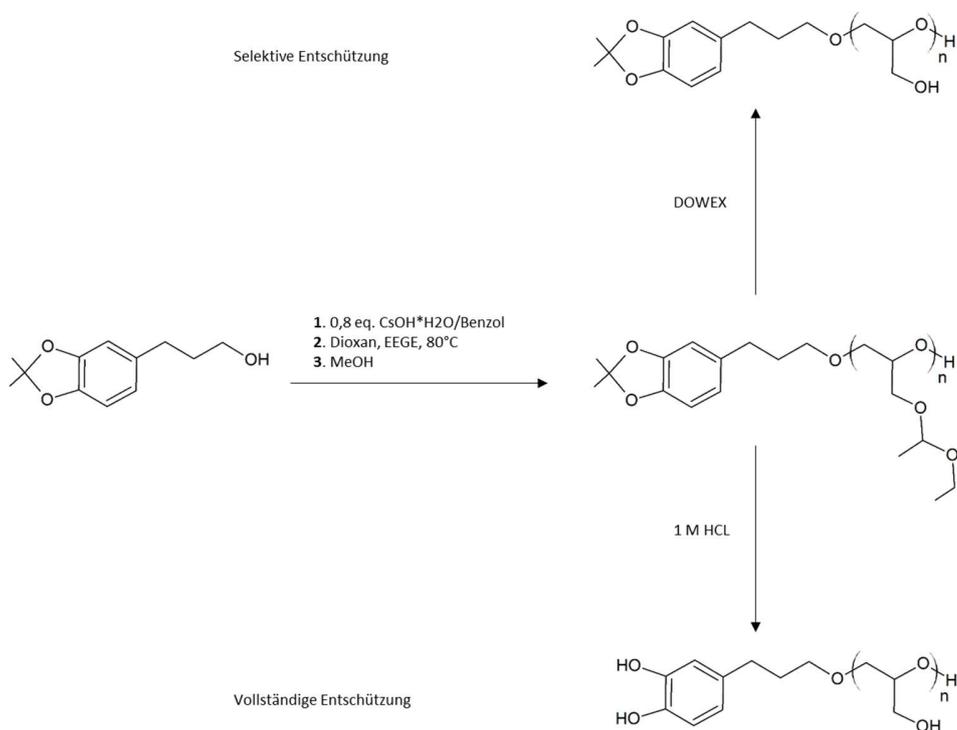


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Synthese des C-PGs (linear). Rechts Mitte: Vollständig geschütztes C-*lin*PG. Rechts Oben: Teilweise entschütztes C-PG (CA-*lin*PG), die Catecholfunktion bleibt geschützt durch die Verwendung von einem sauren Ionentauscher (DOWEX). Rechts Unten: Vollständige Entschützung des C-*lin*PGs (C-PG).

Die während der Polymerisation ebenfalls acetalgeschützten Hydroxylgruppen des EEGEs können nach beendeter Reaktion mit DOWEX, einem sauren Ionenaustauscherpolymer, unter Erhalt des acetalgeschützten Catecholankers (CA-*lin*PG) selektiv abgespalten werden (Abbildung 45). Die so erhaltene Struktur stellt die Ausgangssubstanz für hyperverzweigte Polyglycerole mit einer einzigen Catecholfunktion dar, die über die ringöffnende, multiverzweigende Polymerisation (ROMBP) erhalten werden. (Abbildung 46) Durch die große Zahl der Hydroxylgruppen des C-*hb*PG muss die Frage gestellt werden, ob die Effektivität des Catecholankers dadurch behindert wird. Dies kann in diesem Kapitel mit einem Experiment beantwortet werden, in dem das am Anker geschützte Molekül (CA-*hb*PG) verwendet wird um Nanopartikel zu funktionalisieren.

Im Rahmen dieses Kapitels wird aufgeklärt, ob die in großer Anzahl Hydroxylgruppen tragenden Polymere nur durch die Anbindung über die Catecholfunktion solubilisierend wirken, oder ob die Hydroxylgruppen selbst einen Einfluss besitzen. Hierzu wird die Synthese mit einem an der Catecholseite acetalgeschützten Polymer durchgeführt und anschließend die Wasserlöslichkeit untersucht.

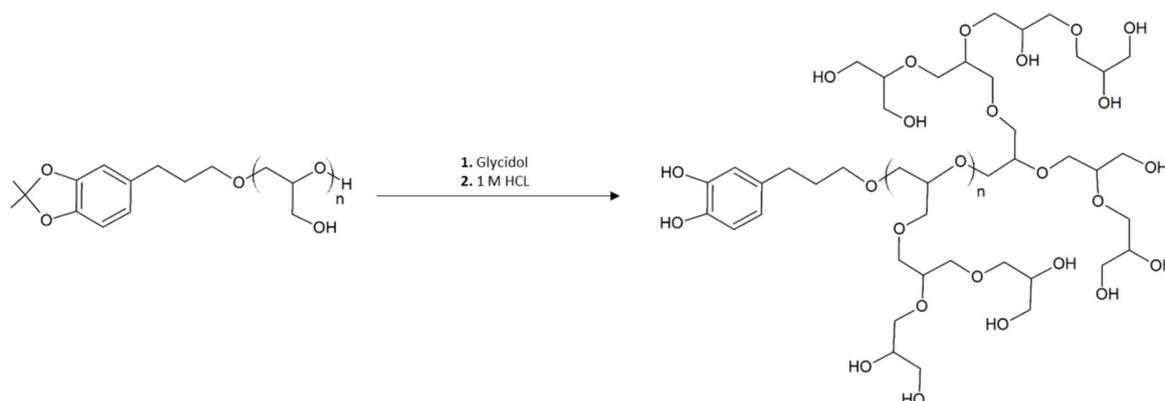


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Synthese des hyperverzweigten C-PGs (C-*hb*PG) ausgehend vom acetalgeschütztem Catechol Initiator (CA-OH) mit anschließender Entschützung.

5.1.7 Zur Anbringung von C-PEG und C-PG auf nanopartikuläre Oberflächen

5.1.7.1 Funktionalisierung mit C-PEG/C-PEG-*b*-PGA

Die Anbringung eines catecholhaltigen Polymers, bzw. des C-PEGs/C-PEG-*b*-PGAs auf ein metalloxidisches Nanopartikel wie MnO oder Fe_xO verläuft prinzipiell synthetisch wenig aufwändig. Beide Komponenten müssen stabil gelöst bzw. dispergiert sein, wobei hierbei generell Chloroform für die Partikel in Frage kommt. Nicht für alle Polymere universell, aber dennoch für C-PEG/C-PEG-*b*-PGA einsetzbar ist ebenfalls Chloroform, wodurch die Aufreinigung zusätzlich vereinfacht wird. Die vereinigten Lösungen werden bei Raumtemperatur mehrere Stunden gerührt um den Ligandenaustausch vollständig ablaufen zu lassen. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt und die Partikel in Ethanol dispergiert, überschüssiges Polymer und sonstige Verunreinigungen wie dem ursprünglichen *capping agent* der Partikel werden durch mehrfaches Fällern und Redispersieren dem Gemisch entzogen. Zum Abschluss folgt die Aufnahme der Partikel in Wasser, was die Hauptbestätigung liefert, dass ein erfolgreicher Ligandenaustausch stattgefunden hat. Des Weiteren wird mittels UV-Vis Spektroskopie der Beweis geführt, dass sich das Polymer auf den Partikeln befindet. Hierbei werden für das Polymer charakteristische Absorptionsbanden aufgezeichnet. Die Untersuchung zur Stabilität der Partikel erfolgt einerseits optisch, wobei beobachtet wird, ob und wie schnell sich bei einer unbewegten Probe ein Bodensatz bildet. Andererseits wird über dynamische Lichtstreuung untersucht, ob sich mit der Zeit Agglomerate bilden. Die zuverlässigste Methode um den umhüllenden Effekt des Polymers zu untersuchen und damit das Polymer als zuverlässigen *capping agent* zu beschreiben, ist die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), da diese zeigt ob die Partikel getrennt voneinander vorliegen oder agglomerieren. Der nächste Schritt nach der erfolgreichen Überführung der Partikel in Wasser ist die Stabilitätsprüfung in biologischen Medien. Hierzu wird oft mit Pufferlösungen wie phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) begonnen, um die Auswirkung einer höheren Ionenstärke kennen zu lernen. Im Weiteren bieten sich „*simulated body fluids*“ (SBF) an, die in ihrer Zusammensetzung weitestgehend dem tatsächlichen biologischen Medium ent-

sprechen. Zusätzlich wird Blutserum verwendet, wobei hier auf Serum mit aktivem Komplementsystem zurückgegriffen werden kann, oder auf solches nach Hitzeinaktivierung. Der Unterschied ist, dass nach Hitzeinaktivierung kaum Einflüsse des Immunsystems vorhanden sind. So kann schrittweise an die tatsächliche spätere Mediumzusammensetzung herangegangen werden.

5.1.7.2 Funktionalisierung mit C-PG (*lin/hb*)

Die Verwendung des oben beschriebenen catecholinitiierten Polyglycerols anstelle des C-PEGs gestaltet sich schwieriger. C-PG ist nicht in Chloroform löslich, weshalb ein Lösungsmittel gefunden werden muss, welches gleichzeitig das Polymer löst und sich mit der Partikel-Chloroform-Dispersion zusammen verwenden lässt. Die Verwendung dieses Zweikomponentensystems erschwert die Aufreinigung bzw. das vollständige Entfernen des Lösungsmittels nach beendeter Reaktion. Trotzdem ist es möglich, den Ligandenaustausch entsprechend der oben geschilderten Synthese in einem Gemisch aus Chloroform und Dimethylformamid (DMF) durchzuführen. Die Aufreinigung und Überführung ins wässrige Medium erfolgt entsprechend. Auch hier soll die Fähigkeit des Polymers, isotrope sowie anisotrope Partikel stabil in wässriger Lösung zu halten getestet werden. Ebenfalls sollen Tests mit hyperverzweigtem C-PG durchgeführt werden. Die durch die Verzweigung der Polymere größere Anzahl an Hydroxylgruppen sollte Einfluss auf Löslichkeit und Stabilität haben.

5.1.8 Anwendung beider Polymere auf unterschiedliche Partikelsysteme

Die in Kapitel 3 und 4 hergestellten Nanopartikel wurden größtenteils dazu verwendet, die Anbindung der hier beschriebenen Polymere zu entwickeln und danach die resultierende Toxizität zu bestimmen. Es ist nicht verwunderlich, dass isotrope Partikel von dem Polymer komplett umhüllt werden, und daher die Löslichkeit der zuvor hydrophoben Partikel in Wasser gewährleistet wird. Abgesehen von isotropen Nanopartikeln wie Fe_xO und MnO ist

es interessant, wie sich die Polymerfunktionalisierung mit C-PEG und C-PG auswirkt, wenn anisotrope Partikel verwendet werden. Insbesondere Heterodimere wie Pt@MnO, FePt@MnO oder FePt@Fe_xO wurden entsprechend dem oben geschilderten Prozess getestet. Da Heterodimere keine homogene Oberfläche und Form haben, sondern aus zwei Domänen aufgebaut sind, ist es interessant herauszufinden, ob die Benetzung der oxidischen Domäne mit Polymer ausreicht, um das Partikel trotzdem stabil in wässriger Lösung zu halten. Die Edelmetalldomäne, bzw. deren Legierung sollte laut Theorie nicht oder weniger gut vom Catechol komplexiert werden (s.o.). Dies ist sogar erwünscht, da Heterodimere, abgesehen von ihren besonderen physikalischen Eigenschaften, in der biomedizinischen Anwendung dazu gedacht sind orthogonal und damit doppelt funktionalisiert zu werden. Diese angestrebte Eigenart der Heterodimere bringt allerdings die Gefahr mit sich, dass die noch frei liegende Domäne des Edelmetalls stark toxische Effekte zeigen könnte. Ein weiterer interessanter Punkt ist wie die Toxizität der Partikel durch das Polymer beeinflusst wird. In Kapitel 6 soll die Länge und die Menge des eingesetzten Polymers in Bezug auf die hervorgerufene Toxizität an einer Zellkulturlinie getestet werden. Zu erwarten ist, dass eine längere Polymerkette eine größere Hülle um das Partikel aufbaut und daher die Freisetzung von potentiell toxischen Ionen aus dem Partikelkern erschwert.

In *Abbildung 47* ist ein schematischer Aufbau von funktionalisierten isotropen Nanopartikeln, hier MnO, und der Ligandenaustausch mit C-PEG, C-PEG-*b*-PGA und C-PG gezeigt. Daraus resultierend werden Partikel mit einer homogenen hydrophilen Ligandenhülle erhalten.

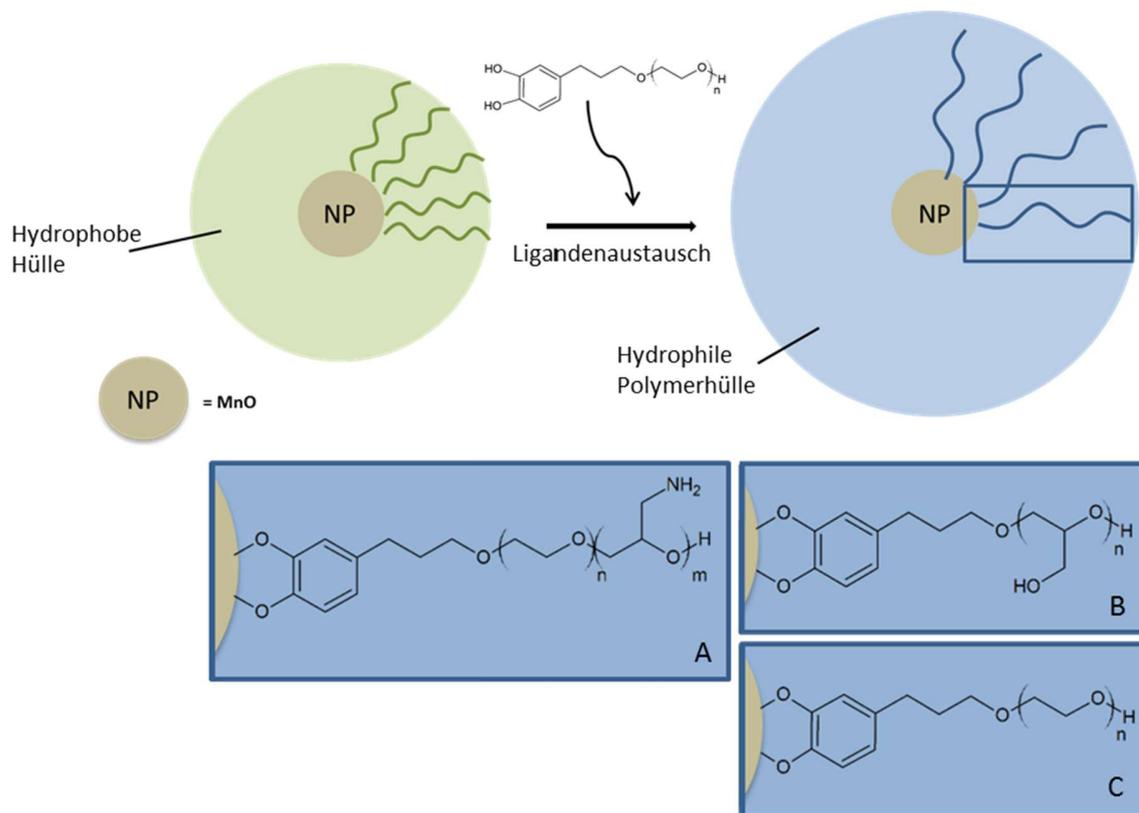


Abbildung 47: Ligandenaustausch bei isotropen Nanopartikeln mit (A) C-PEG-*b*-PGA, (B) C-PG und (C) C-PEG.

Die Verwendung von anisotropen Strukturen, hier Heterodimeren, ist in *Abbildung 48* dargestellt. Nach dem Ligandenaustausch auf der oxidischen Domäne bleibt ein nach wie vor hydrophober Teil des Partikels übrig, der in geringerer Dichte noch die ursprünglichen *capping agents* trägt.

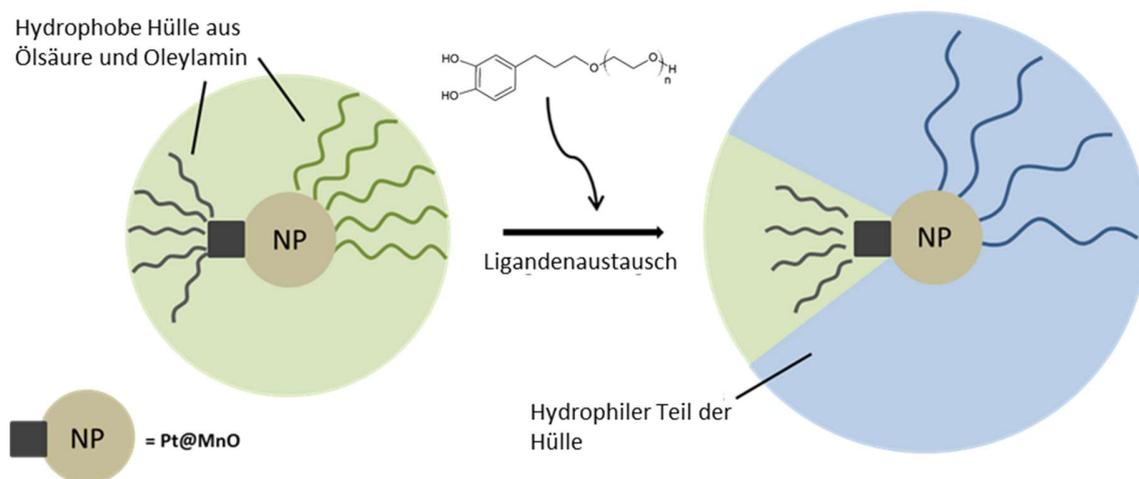


Abbildung 48: Ligandenaustausch bei Heterodimeren, beispielsweise Pt@MnO mit C-PEG.

Die noch nicht funktionalisierte Edelmetalldomäne kann nach erfolgreicher Hydrophilisierung der oxidischen Domäne schließlich mit einer Thiolgruppen tragenden Struktur angesteuert werden, um die gewünschte orthogonale Funktionalisierung zu erhalten. Um dies nachzuweisen werden die beiden Seiten des Partikels mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Hierzu bieten sich die beiden Farbstoffe Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Rhodamin-B-Isothiocyanat (RITC) an. Da beide Farbstoffe an Aminogruppen binden, muss der jeweilige *capping agent* bereits vor Anbindung an das Partikel markiert und freie Farbstoffmoleküle entfernt werden. In *Abbildung 49* wird ein auf diese Weise doppelt markiertes Heterodimer gezeigt. Die Edelmetalldomäne wurde mit einem FITC-markierten 4-Mercaptoanilin (4-ATP) funktionalisiert, die oxidische Domäne mit einem RITC-markierten C-PEG-*b*-PGA. Ebenfalls in *Abbildung 49* dargestellt ist die eigentlich angestrebte Funktionalisierung einer der beiden Domänen mit einem bioaktiven Molekül.

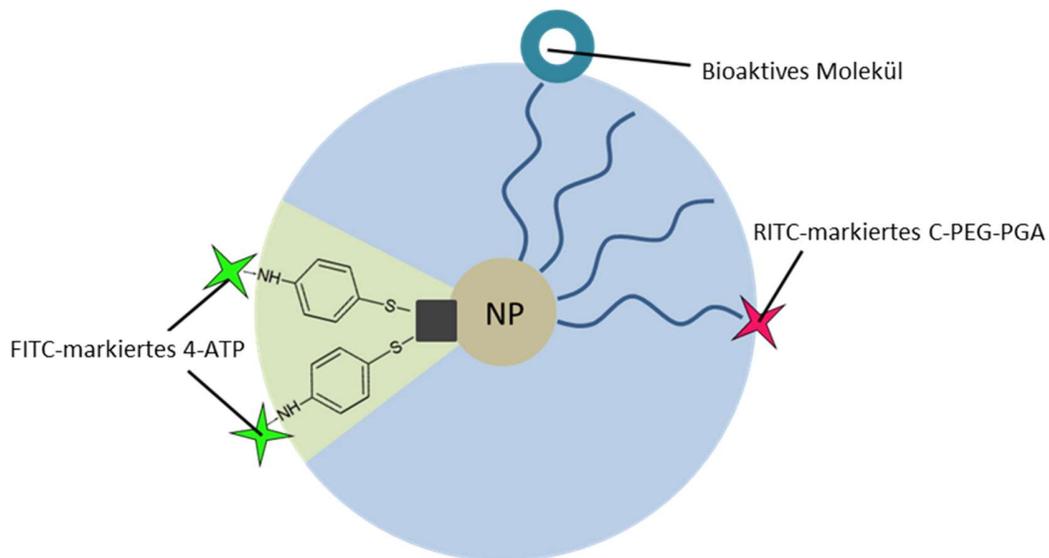


Abbildung 49: Doppelt funktionalisiertes Heterodimer mit zwei verschiedenen Farbstoffen orthogonal zueinander sowie an C-PEG-*b*-PGA gebundene bioaktive Moleküle.

Die beiden Farbstoffe sollten bei Aufnahme eines UV-Vis Spektrums klare Absorptionsmuster zeigen, die aufgrund der unterschiedlichen Maxima (FITC: 495 nm, RITC: 555 nm) voneinander getrennt im Absorptionsspektrum auftauchen sollten.

5.1.9 Funktionalisierung von intermetallischen Nanopartikeln

Bekanntermaßen eignet sich der Catecholanker am besten für die Anbindung auf metalloxidische Oberflächen, doch hat dieser auch eine Affinität für die entsprechenden Metalle im nicht oxidierten Zustand. Dieser Fall tritt auf, wenn intermetallische Verbindungen funktionalisiert werden sollen, wie Legierungen des Platins, beispielsweise FePt.^[89] Hier kann der Catecholanker an die vorhandenen Eisenatome binden. Eine ausreichende Hydrophilisierung kann so allerdings nicht erreicht werden, da nur ca. 50% der Atome Eisenatome sind und die Oberfläche somit nicht ausreichend von dem Polymer bedeckt ist. Das gleiche Ergebnis liefert die alleinige Verwendung eines Polymers mit Thiolanker, welcher zwar nach Pearson effektiv an die vorhandenen Platinatome bindet, aber ebenfalls nur ca. 50% der Atome stabil binden kann. Erst eine Kombination aus beiden

Polymeren, eines mit Catecholanker, das andere mit Thiolanker führte zur Stabilität im wässrigen Milieu.^[89]

5.1.10 Zur Herstellung von amphiphilen Molekülen mit Polymerrückgrat

Trotz der mannigfaltigen Vorteile der Verwendung von Polymeren mit einer definierten Catecholankerfunktion für die Biofunktionalisierung von Nanopartikeln kann es mitunter günstig sein, bestimmte Moleküle nicht kovalent und damit lockerer an ihren Carrierpartikel zu binden. Die Einlagerung von amphiphilen Verbindungen in eine Schicht aus polaren oder unpolaren Molekülen ist eine weitere Methode, Oberflächen mit bestimmten Fähigkeiten auszustatten. Eine Hauptanwendung solcher Strukturen liegt in der Synthese von Mizellen und Liposomen, bestehend aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten, die in ihrem Inneren, ähnlich zum Partikel-Carrier-System einen Wirkstoff *in vivo* transportieren können. Um die Löslichkeit und die Stabilität solcher Liposomen zu verbessern, wird ein Gemisch aus PEG-funktionalisierten und konventionellen (Phospho-)Lipiden in definierten Verhältnissen verwendet.^[90] Die Verwendung von multifunktionalen amphiphilen Polymeren werden von Hofmann *et al.* vorgestellt und die so hergestellten Liposomen als vielversprechende Wirkstofftransporter vorgeschlagen.^[91] Mit die ersten nicht polymeren Nanopartikel, die über diese Methode wasserlöslich gemacht wurden, waren anorganische magnetische Partikel.^[72] Vom Prinzip her ähnlich wie bei Liposomen wird hier das PEG-Lipid in die lipophile Ligandenhülle eines Nanopartikel eingelagert. Eine biomedizinische Anwendung wurde durch diese Art der Funktionalisierung ebenfalls vorgeschlagen.^[92] Das Prinzip ist simpel: Der hydrophobe Teil des Amphiphils soll sich über van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen die hydrophoben Reste des *capping agents* der Partikel, meist Ölsäure oder Oleylamin einlagern. Daraus resultierend zeigen die hydrophilen „Köpfe“ des Moleküls vom Partikel weg und bilden somit eine zweite Sphäre um das Partikel. Auf diese Weise erhält das ehemals wasserunlösliche Partikel eine hydrophile Ligandenhülle in einer Art Mizelle. Vorteilhaft ist hier, dass auch solche Partikel funktionalisiert werden können, die durch catecholhaltige Polymere nicht adressierbar sind, wie rein edelmetallische Partikel.

Ein häufig verwendetes amphiphiles Molekül ist das PEG-Phospholipid (*Abbildung 50*), grundlegend inspiriert durch die natürlichen Phospholipide zum Aufbau von Zellmembranen. In diesem Kapitel wird Bezug auf erste Erkenntnisse betreffend der Verwendung eines neuartigen Amphiphils basierend auf linearem Polyglycerol (*linPG*) genommen. Ebenso wird ein Blockcopolymer bestehend aus einer Kette PEG und einem Block Poly(glycidylglyceryl) (PGG), was den hydrophilen Teil ausmacht, vorgestellt. Der aliphatische Teil kann aus einem Molekül Cholesterol bestehen oder langkettige Alkylreste tragen (*Abbildung 51*).

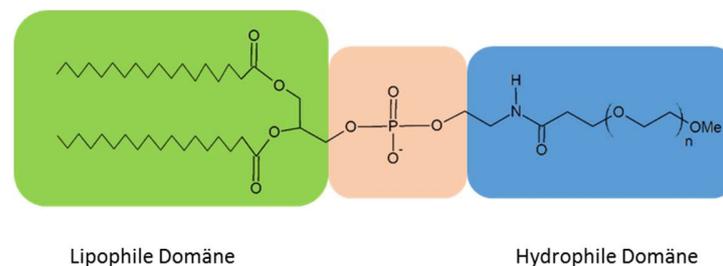


Abbildung 50: Schematische Darstellung des amphiphilen PEG-Phospholipids unter Anfärbung der Zonen unterschiedlicher Löslichkeit.

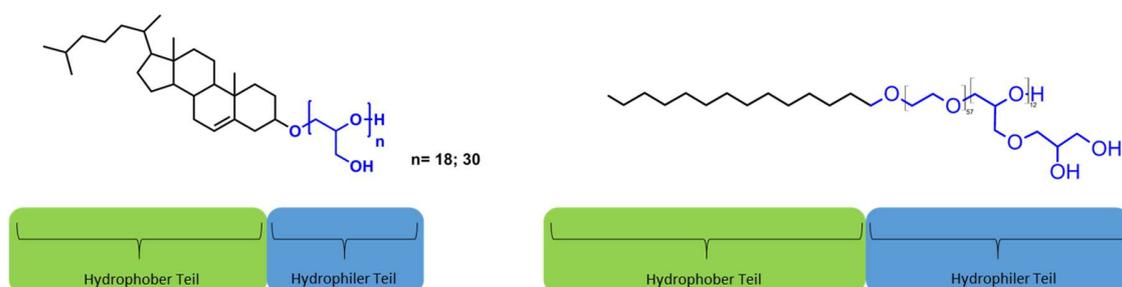


Abbildung 51: Schematische Darstellung des amphiphilen Cholesterol-Polyglycerols (*Ch-linPG_n*, links) in linearer Form und des Tetradecanol-PEG₅₇-PGG₁₂.

5.1.11 Funktionalisierung von Pt@MnO-Ketten

In Kapitel 4 wurde ausführlich auf die erfolgreiche Synthese von Pt@MnO-Ketten (Pt-Nadeln mit zwei bis fünf aufgewachsenen MnO-Domänen) eingegangen. Hier kann gezeigt werden, dass mit catecholinitiierten Polymeren nach wie vor zuverlässig die metalloxidische Domäne angesteuert werden kann. Eine Biokompatibilität ist so zunächst unwahrscheinlich, da die freiliegende Platin-Nadel nicht vom Catechol benetzt wird. Ebenfalls sollte die stark anisotrope Struktur eher Nachteile als Vorteile mit sich bringen, wenn in der Zellkultur oder sogar *in vivo* angewendet, da der mechanische Stress auf die Zellwand zu hoch wäre. Trotzdem ist die Anbindung eines Polymers auf die MnO-Domäne einer solchen kettenartigen Struktur von Interesse, da diese so auf eine zur Verfügung gestellte Oberfläche anbringbar wäre. Um dies zu erreichen, muss das verwendete Polymer orthogonal zur Catecholfunktion eine weitere Spezifität besitzen. Sun *et al.* berichten von der Anbindung V-förmiger Polymere, die am abgelenkten Teil des Polymers mehrere Hydroxylgruppen tragen, auf eine SiO₂ Oberfläche. Diese besteht aus angeordneten Silicananopartikeln, die zuvor mit Thionylchlorid funktio-nalisiert wurden um die Anbindung über Hydroxylgruppen des Polymers zu erleichtern.^[93] Mit dieser V-förmigen Struktur als Inspiration, soll hier versucht werden, Pt@MnO-Ketten über ein für diesen Zweck synthetisiertes Polymer auf eine Silicaoberfläche zu binden, die zuvor mit Thionylchlorid behandelt wurde. Als passendes Polymer wird hierfür ein Blockcopolymer vorgeschlagen, welches nach dem Catecholinitiator eine bestimmte Einheit PEG trägt und dann als zweiten Block hyperverzweigtes PG. Auf diese Weise sollte das Polymer, wie zuvor beschrieben, auf der Platindomäne „stehen“ können, außerdem trägt es am Ende die zahlreichen zur Anbindung nötigen Hydroxylgruppen. *Abbildung 52* zeigt die vorgeschlagene Polymer-Struktur und *Abbildung 53* den Aufbau des Projektes. Das Ziel ist es, wie in Kapitel 4 beschrieben, die katalytische Eigenschaft des Platins auszunutzen und dabei die Nano-Struktur fest auf einer Oberfläche fixiert zu haben. Der Vorteil wäre hierbei eine kovalente aber dennoch flexible Bindung und eine nach wie vor frei ansteuerbare Platinfläche. Würde über ein schwefelhaltiges Molekül die Pt-Nadel auf einer Oberfläche gebunden, würde ein großer Teil der katalytisch aktiven Fläche besetzt werden und damit verloren gehen.

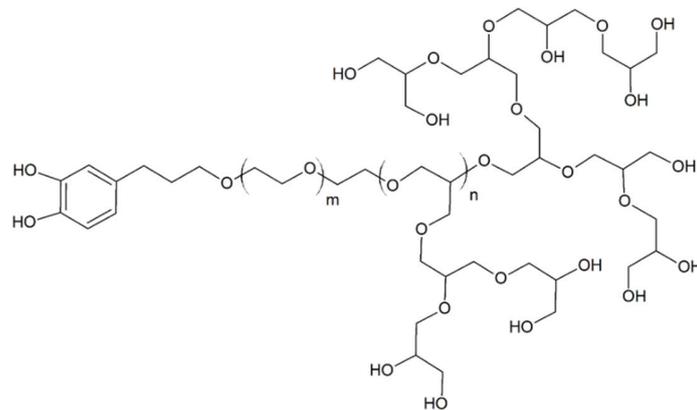


Abbildung 52: Schematische Darstellung eines Blockcopolymer C-PEG-*b*-hbPG mit einem Block PEG direkt am Catecholinitiator und darauf folgendes hyperverzweigtes PG.

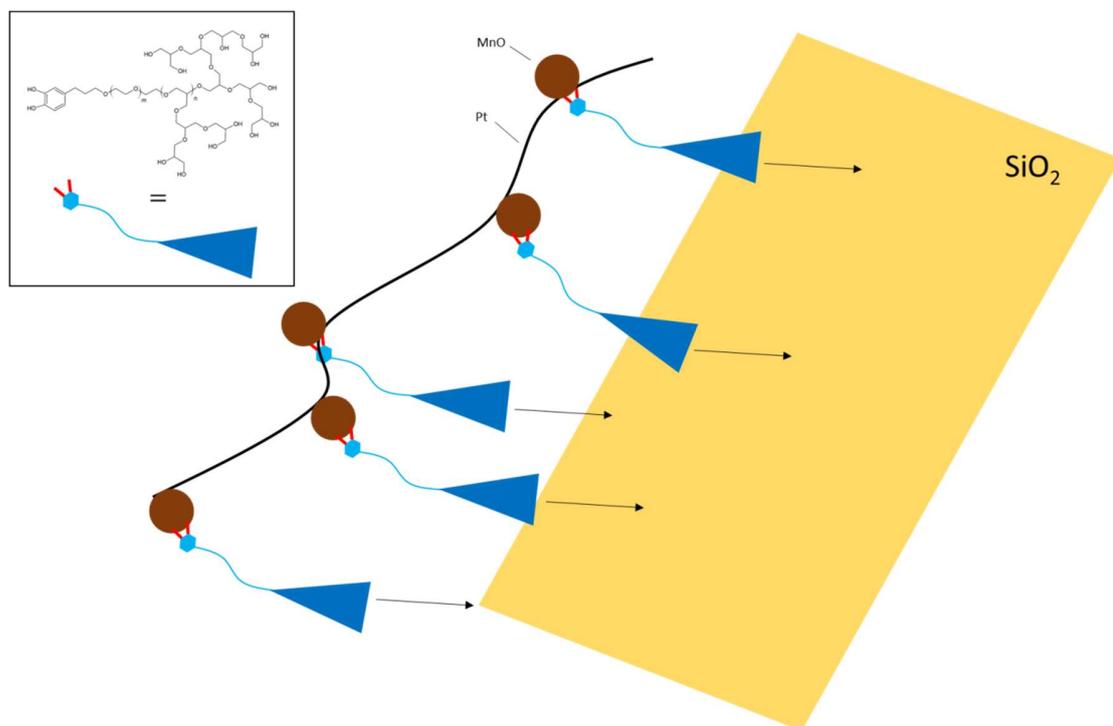


Abbildung 53: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Anbindung von Pt@MnO-Ketten auf eine mit Thionylchlorid funktionalisierte Silicaoberfläche unter Verwendung des Blockcopolymer C-PEG-*b*-hbPG.

5.1.12 Zum Anbringen einer Silicahülle auf oxidische Nanopartikel

Wird eine dichte Hülle aus einem „anorganischen Polymer“ um ein Partikel aus toxischen Material gelegt, ist die Möglichkeit des Freisetzens von Ionen an die Umgebung unwahrscheinlicher als bei einer weniger dichten Polymerhülle. Das Aufkondensieren von SiO_2 geschieht durch eine basisch-katalysierte Reaktion, die nach einer modifizierten Stöber-Methode abläuft. ^[94] Die Synthese selbst findet in Mikrotröpfchen einer reversen Mikroemulsion statt, das heißt in einer Wasser-in-Öl Emulsion. ^[95] Durch die basische Katalysation und die Formkontrolle der Mizelle lagert sich das gebildete Silica dicht um das Partikel herum an und bildet so eine Hülle. Bei saurer Katalyse würde bekanntermaßen ein weit vernetztes Silicagel entstehen, was hier nicht erreicht werden soll. Die Löslichkeit des mit Silica ummantelten Partikels ist in Wasser nicht sehr hoch, es wird generell eine metastabile Dispersion erhalten. Um diese Dispersion zu stabilisieren werden silan-ankertragende Polymere, meist Silan-PEGs, an die Silicahülle angebracht. Um biofunktionelle Moleküle anzuhängen, wird hier ein ebenfalls mit Silananker ausgestattetes Molekül verwendet, das Aminopropyltriethoxysilan (APS). Ein weiterer Vorteil eines Silica-ummantelten Partikels ist die Farbstoffeinbettung in die Hülle. Hierzu muss der einzubauende Farbstoff während der Aufkondensation im Reaktionsgemisch vorhanden sein. Die spektroskopischen Eigenschaften des Farbstoffmoleküls sind nun vor einem raschen Ausbleichen besser geschützt als bei der Anbringung am Ende einer Polymerkette. Auch die oft toxischen Eigenschaften eines solchen Farbstoffes sind so zu umgehen, da das Molekül keinen Kontakt mit dem umgebenen Medium hat. *Abbildung 54* zeigt den Aufbau einer solchen multifunktionalen Hülle. Schladt *et al.* berichten von der Herstellung hochlöslicher $\text{MnO}@\text{SiO}_2$ -Nanopartikel und deren niedrigen toxischen Eigenschaften. ^[70] Im Allgemeinen kommen silicafunktionalisierte Partikel zum Einsatz um beim *cell targeting* möglichst effektiv einen Farbstoff in das adressierte Gewebe zu bringen und dadurch die Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen.

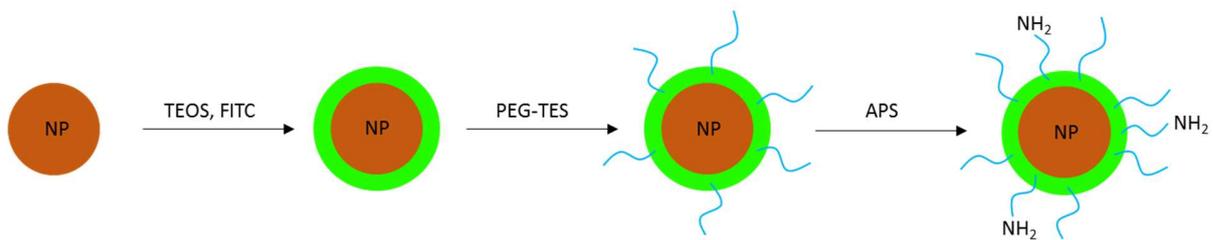


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Umhüllung eines Nanopartikels mit SiO₂ unter Verwendung des Precursors TEOS. Im zweiten Schritt erfolgt die Aufkondensation eines PEG-Silans (PEG-TES), welches die Wasserlöslichkeit von SiO₂-Partikeln erhöht. Ebenfalls ist die Einlagerung des eines Farbstoffes in die Hülle gezeigt (hier FITC) und die Anbringung von Aminofunktion durch das Aminosilan APS.

5.1.13 Anwendung polymerfunktionalisierter Nanopartikel

5.1.13.1 Radioaktive Markierung von polymerfunktionalisierten Nanopartikeln für die kombinierte PET/CT und PET/MRT

Einen radioaktiven Marker an ein Nanopartikel zu binden und somit die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zielspezifischer und gleichzeitig kombinierbar mit einer weiteren Tomographieart zu machen, findet seit einigen Jahren größer werdendes Interesse. Gelingt es markierte Partikel in das Zielgewebe zu bringen, ist es möglich einen lokalisierten Zerfall des Nuklids zu erreichen und damit gezielte DNA-Schäden zu bewirken. Durch die Unfähigkeit maligner Zellen DNA-Schäden effizient zu reparieren, führt der Zerfall und die damit entstehenden α - oder β -Strahler potentiell zum Zelltod (Apoptose).^[96] Die Heterostruktur FePt@Fe_xO wurde verwendet um die bekannten MR-contrastverstärkenden Eigenschaften des Eisenoxides auszunutzen und durch entsprechende Funktionalisierung für die Anwendung zu hydrophilisieren. Gleichzeitig soll ein Chelatormolekül anbindbar sein, welches bei der späteren Behandlung ein radioaktives Isotop, hier 68-Gallium, aufnimmt. Die Anforderung an das Partikelsystem ist somit nicht trivial: Hohe Dispersionsstabilität mit möglichst geringer Toxizität sollen gepaart werden mit der guten Anbindbarkeit eines Chelatormoleküls und später mit einem für ein Zellkompartiment spezifischen Molekül zum

aktiven *cell targeting*. Gleichzeitig muss verhindert werden, dass eine zu hohe unspezifische Bindung des ^{68}Ga geschieht, da dieses so nicht lange am Carrierpartikel haften bleibt und somit kein *cell targeting* möglich ist. Im Rahmen dieses Kapitels wurde eine Funktionalisierung entwickelt, die eine stabile Anbindung des Chelators DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) (Abbildung 55) und anschließend die erfolgreiche Komplexierung des Galliumisotops ermöglicht.

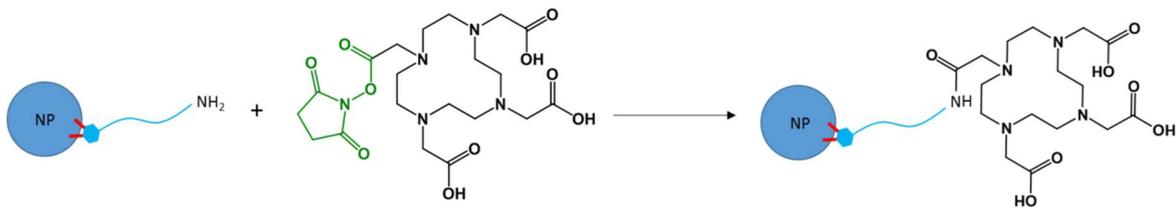


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Anbindung des DOTA-NHS-Esters an ein aminofunktionalisiertes Nanopartikel unter Erhalt eines chelatortragenden Partikels.

Im Rahmen dieser Funktionalisierung wird ermittelt, welcher Anteil des Polymers, mit dem das Partikel umhüllt ist, Aminogruppen tragen muss, um eine Anbindung des Chelators und spätere Detektierbarkeit in der PET zu ermöglichen. Da die PET sehr hohe Auflösungsgrenzen hat, reicht ein geringer Teil an markiertem Gallium aus, im Rückschluss also auch eine geringe Aminogruppenzahl auf der Partikeloberfläche.

5.1.13.2 Anbindung spezifischer Antikörper für Tumor- und Immunzell-*targeting* in der Krebsimmuntherapie

Wie in Kapitel 2 beschrieben ist ein Ziel dieser Arbeit, die hergestellten Partikeltypen in der Krebsimmuntherapie zu verwenden. Hierbei werden Zellen des Immunsystems systematisch angesteuert und spezifisch aktiviert. Das Immunsystem, die Waffe des Organismus gegen körperfremde Substanzen, kann über Nanopartikel in eine bestimmte Richtung gelenkt werden um gegen Krankheiten, insbesondere Krebs, wirksam zu werden. Maligne Zellen werden aufgrund mehrerer Evasionsmechanismen vom Immunsystem oft nicht als krankhaft

erkannt („Immunevasion“: Durch Mutationen hervorgerufene Befähigung der adaptiven und innaten Immunantwort zu entgehen). Zum Beispiel bildet sich um ein Tumorgewebe oft eine epidermale Schicht, die das Eindringen von Immunzellen und Antikörpern blockiert. ^[97] Ebenfalls wird von einer immunsuppressiven Umgebung des Tumorgewebes berichtet, beispielsweise vermittelt durch regulatorische T-Zellen (*Tregs*). ^[98] Es wird die Verwendung des EGFR-Antikörpers (engl.: epidermal growth factor receptor) als ein möglicher Mechanismus Tumorgewebe anzusteuern vorgestellt und damit eine direkte Tumor-Adressierung: Der EGF-Rezeptor findet sich auf allen Zellen des Organismus und ist nach der Bindung von Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- β verantwortlich für das Auslösen einer Signalkaskade, die in der Proliferation oder der Differenzierung der betreffenden Zelle endet. Malignes Gewebe weist für gewöhnlich eine deutliche Überexprimierung dieses Rezeptors auf, was unter anderem ein Grund für die unkontrollierte Wucherung von Tumorgewebe ist. ^{[99], [100]} Die den Tumor umhüllende zelluläre Schicht exprimiert EGF-Rezeptoren besonders hoch. Wird ein für den EGFR-spezifischer Antikörper mit einem Carriersystem wie einem Nanopartikel verbunden, kann aktives Tumor-*targeting* betrieben und eine Anreicherung des Partikels im Tumorgewebe erreicht werden. Des Weiteren kann das Partikel im adressierten Gewebe zusätzlich Wirkstoffe freisetzen oder über Bestrahlung und Hyperthermie das Tumorgewebe schädigen. ^[101] Das Partikel kann ebenfalls für die Kontrast-verstärkung in der MRT genutzt werden und somit in der Früherkennung sich bildender Tumoren deutliche Vorteile bringen.

Ein weiterer, indirekter Weg Tumorgewebe zu zerstören, ist die gezielte „Programmierung“ des Immunsystems und die dadurch bessere Erkennung des malignen Gewebes durch das Immunsystem. Ausgenutzt wird hierbei, dass Tumoren sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAAs) tragen, die allerdings vom Immunsystem nicht oder nur unzureichend als fremdartig erkannt werden. Wird nun professionellen antigenpräsentierenden Zellen dieses TAA zugetragen, können TAA-spezifische T-Zellen aktiviert werden. Diese T-Zellen können zum einen Tumorzellen direkt abtöten oder B-Zellen darin unterstützen, TAA-spezifische Antikörper mit tumorizider Wirkung zu bilden. Geschehen kann dies ebenfalls über ein Nanopartikel als Carrier, welches durch aktives *cell targeting* dendritische Zellen

(DCs) als die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems ansteuert. Hierbei kann die DC über einen Antikörper adressiert werden, der spezifisch für einen hauptsächlich auf DCs exprimierten Oberflächenrezeptor ist, wie beispielsweise der DEC205 Rezeptor. Dieser Rezeptor wird vor allem von $CD8^+$ DCs exprimiert, welche in hohem Maße zur Kreuz-präsentation fähig sind und damit auch partikelabgeleitete Antigene über MHC I $CD8^+$ T-Zellen präsentieren können.^[102] Dadurch findet gleichzeitig eine CTL-Induktion statt und die damit verbundene CTL-vermittelte Lyse (CTL für cytotoxische T-Lymphozyten). Das Partikelsystem muss also mit dem TAA und dem DEC205-Rezeptor-Antikörper ausgestattet werden, um effektiv von DCs aufgenommen werden zu können. *Abbildung 56* zeigt die vereinfacht dargestellten folgenden Prozesse im Immunsystem.

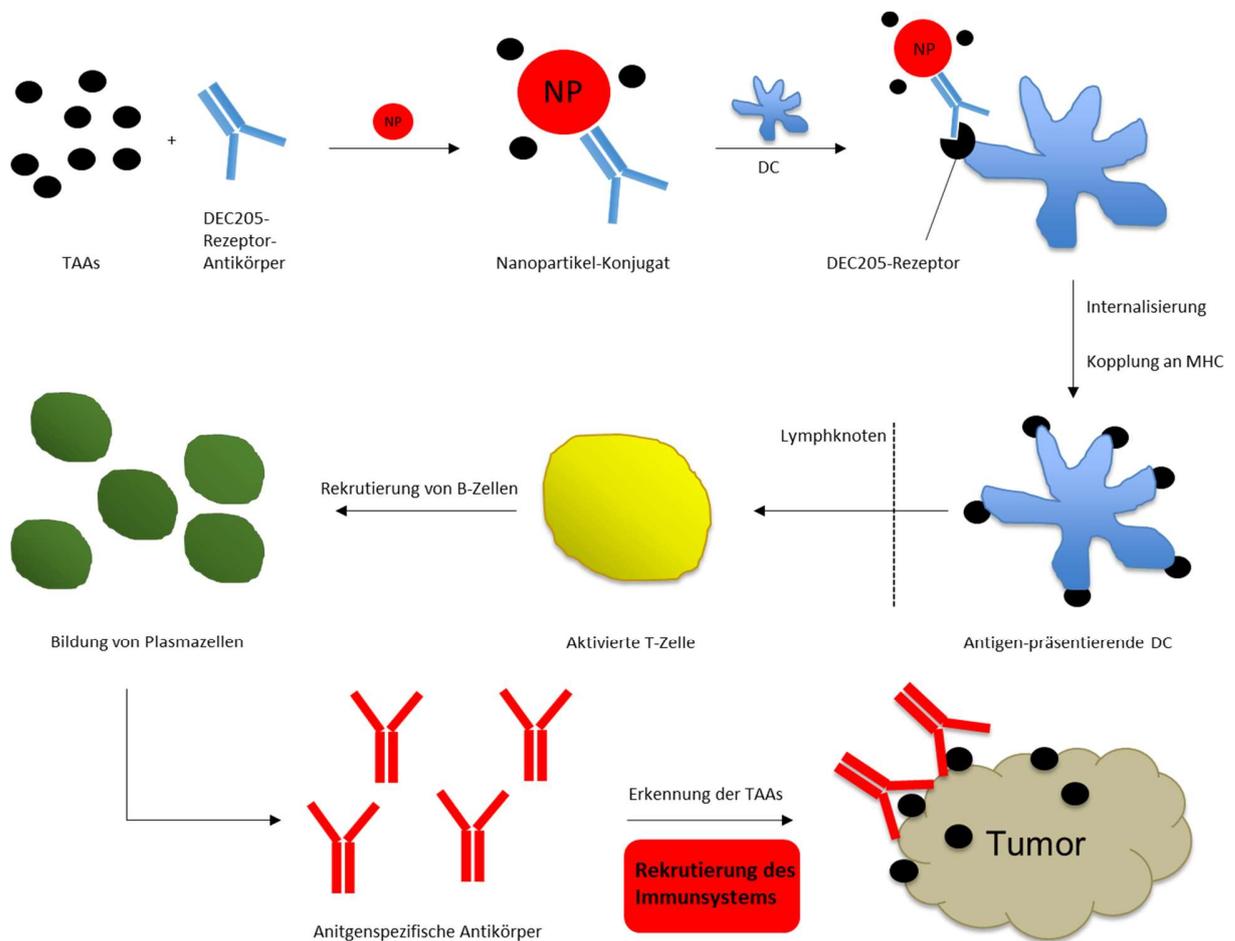


Abbildung 56: Schematische Darstellung des Prozesses der Induktion einer adaptiven anti-Tumorimmunantwort nach Aufnahme antigenbeladener Nanopartikel in eine dendritische Zelle. Die DC internalisiert die TAA-tragenden, DEC205-adressierenden Partikel und präsentiert die Antigene auf ihrer Oberfläche. Durch die Präsentation werden T-Zellen aktiviert, die ihrerseits B-Zellen rekrutieren, die im aktivierten Zustand als Plasmazellen den TAA-spezifischen Antikörper bilden. Wird der tumorgebundene Antikörper von Fc-Rezeptor-tragenden Immunzellen (z.B. Makrophagen) erkannt, wird die Tumorzelle phagozytiert.

Da nicht aktivierte DCs toleranzinduzierend wirken, müssen Adjuvanzen über das Nanopartikel in die DC eingebracht werden. Dafür bieten sich zum Beispiel CpG-Oligonucleotide sowie ssRNA und dsRNA („ss“ für single stranded, „ds“ für double stranded) an, um immunogene Wirkung zu haben. Solche Strukturen dienen natürlicherweise der Erkennung von Mikroben, werden von intrazellulären *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) als fremd erkannt und stimulieren so beispielsweise DCs. Erste Kopplungsversuche des DEC205-Rezeptor-Antikörpers an polymerfunktionalisierte Nanopartikel und die Untersuchungen der Aktivierung der DCs werden in diesem Kapitel vorgestellt. Ebenfalls wird von der Kopplung des EGFR-Antikörpers an Silica-umhüllte Fe₃O₄-Partikel berichtet.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Allgemeines

Prinzipiell ist festzuhalten, dass die Funktionalisierung mit catecholinitiierten Polymeren deutliche synthetische Erleichterung mit sich bringt, verglichen mit der Verwendung des Dopa-PEGs. Waren beim letzteren noch aufwändige Schritte des Extrahierens mittels Ausschütteln nötig, kann der beendete Ligandenaustausch bei C-PEG und C-PG funktionalisierten Partikeln durch einfaches Entfernen des Lösungsmittels und anschließendem Redispergieren abgeschlossen werden. Eine stabile Dispersion von MnO-, FePt@Fe_xO- oder Pt@MnO-Partikeln zeichnet sich generell durch eine klare, meist bräunliche Flüssigkeit ab. Die Stabilität und Effektivität des hydrophilen *capping agents* wird hier mittels TEM-Aufnahmen, UV-Vis-Spektroskopie, und dynamischer Lichtstreuung (DLS) aufgeklärt. Die Synthese bzw. der Ligandenaustausch findet bei Raumtemperatur statt und wird meist über Nacht durchgeführt. Da der Ligandenaustausch durch die hohe Komplexbildungskonstante allerdings sehr schnell geschieht, muss bei der Vereinigung sichergestellt werden, dass immer genug ungebundenes Polymer vorhanden ist, um die dazukommenden Partikel abzufangen. Hierzu wird die Hälfte des gelösten Polymers im

Kolben vorgelegt und die zweite Hälfte simultan mit der Partikeldispersion langsam zugegeben. Auf diese Weise wird die Polymerkonzentration konstant gehalten bis die beiden Flüssigkeiten vereinigt sind. *Abbildung 57* zeigt den standardisierten Aufbau der Synthese bei (bereits erfolgreicher) Zugabe.

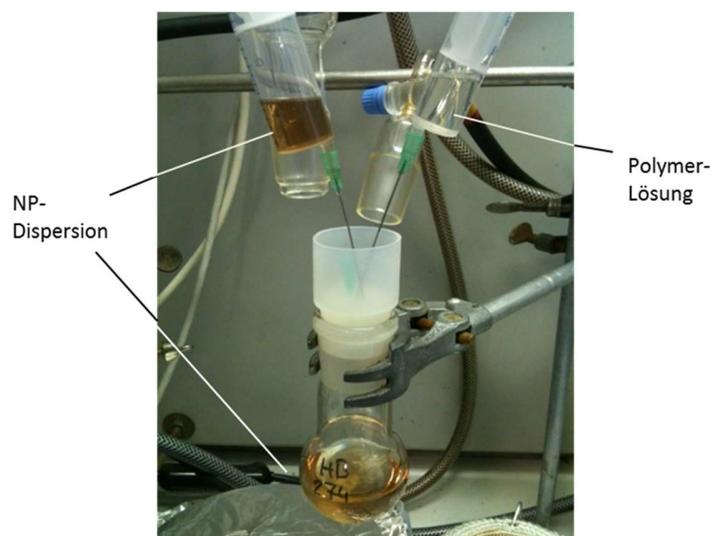


Abbildung 57: (Laufender) Ligandenaustausch und Hydrophilisierung von Nanopartikeln. Gleichzeitige Injektion von in CHCl_3 dispergierten Partikeln und ebenfalls in CHCl_3 gelöstem Polymer. Die Gesamtmenge des Polymers wurde vor erfolgter Injektion gesplittet und die Hälfte im Kolben vorgelegt um dessen Konzentration beim Injektionsprozess gleich zu halten.

Abbildung 58 zeigt die Partikellöslichkeit vor und nach der Funktionalisierung mit dem Catecholpolymer. Die unterschiedliche Farbstärke der Lösung ist auf den Konzentrationsunterschied der Partikel zurückzuführen.

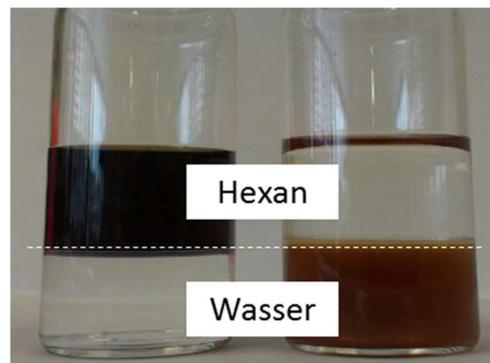


Abbildung 58: Aufnahme zur Verdeutlichung der Löslichkeit vor (links) und nach (rechts) der Funktionalisierung durch ein hydrophiles Polymer. Die Farbunterschiede treten durch unterschiedliche Konzentrationen auf.

5.2.2 Die Funktionalisierung mit Dopa-PEG

Die unten beschriebene Synthese des Partikel-Dopa-PEG-Systems birgt an sich einen kritischen Schritt. Bei der Aufreinigung der Partikel kann es schwierig sein, das zweiphasige System sauber zu trennen und damit die Phase mit funktionalisierten Partikeln verlustfrei zu erhalten. Ebenfalls ist die Stabilität nicht vollkommen reproduzierbar. Vermutlich hängt es von oben beschriebenen Verunreinigungen des Polymers ab, ob sich eine homogene Ligandenhülle bilden kann und diese eine stabile Dispersion bewirken kann.

Zur Herstellung werden die Nanopartikel in Chloroform dispergiert, die dreifache Menge an Dopa-PEG ebenfalls in Chloroform gelöst und langsam zugetropft. Analog zum oben beschriebenen Vorgehen wird hier ebenfalls die Hälfte des Polymers im Kolben vorgelegt. Die aufwändige Aufreinigung kann eine Quelle des Ausbeuteverlustes sein, da sich bei der Flüssig-Flüssigextraktion die beiden Schichten nicht klar trennen und somit Material verloren gehen kann. Nach Einengen des Lösungsmittels werden die funktionalisierten Partikel schließlich in Wasser aufgenommen und filtriert.

5.2.3 C-PEGs und PGs in verschiedenen Längen

Die in diesem Kapitel vorgestellten Polymere wurden in verschiedenen Längen hergestellt und verwendet. In *Tabelle 1* ist aufgeführt, welches Polymer in welcher Länge zur Anwendung kam. Die Länge bzw. das mittlere Molekulargewicht (M_n) wurde durch Größenausschluss-chromatographie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt.^{[79], [85]} DP_n gibt den durchschnittlichen Polymerisationsgrad an. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere wurden von Jana Herzberger, Sophie Müller, Dr. Valerie Wilms und Dr. Anja Thomas, Universität Mainz, Institut für Organische Chemie, AK Frey, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Catechol-Polymere in unterschiedlichen Längen.

Polymer	M_n^{theo} / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	DP_n	Lösungsmittel
C-PEG	440	7	CHCl_3
C-PEG	900	17	CHCl_3
C-PEG	1640	34	CHCl_3
C-PEG	3400	74	CHCl_3
C-PEG	4500	100	CHCl_3
C-PEG- <i>b</i> -PGA	6400	128+10	CHCl_3
C-PG	900	10	DMF
C-PG	1400	17	DMF
C-PG	2400	29	DMF
C-PG	4700	57	DMF

5.2.4 C-PEG-Funktionalisierung

Die Verwendung des C-PEGs in verschiedenen Längen zur Funktionalisierung von Nanopartikeln verläuft reproduzierbar. Die Synthese wurde in Chloroform durchgeführt, was die Aufreinigung durch Entfernung des Lösungsmittels direkt im Anschluss an die Reaktionszeit vereinfacht. Die Stabilität der erhaltenden Nanopartikellösungen ist bemerkenswert hoch. Selbst Proben, die bei 4°C gelagert wurden, zeigten über mehrere Monate keinen Bodensatz und sind (teilweise bis zum aktuellen Zeitpunkt) stabil dispergiert. UV-Vis-spektroskopische Messungen zeigen die erfolgreiche Anbringung des C-PEGs auf die Oberfläche der Partikel. Es kann bereits zuvor rein optisch festgestellt werden, ob die Funktionalisierung erfolgreich war: Es wurde eine bräunliche Nanopartikellösung mit einer nahezu farblosen Polymerlösung zur Reaktion gebracht, die resultierende Dispersion in Wasser war von ähnlicher Braunfärbung wie zuvor, daher muss ein Austausch der Ligandenhülle des Partikels stattgefunden haben. Da zum Zeitpunkt der ersten Aufnahme in ein polares Lösungsmittel davon auszugehen ist, dass sich noch überschüssiges Polymer im Gemisch befindet, wird durch wiederholte Fällung und Redispersion aufgereinigt. Diese Schritte zur vollständigen Entfernung von ungebundenem Polymer validieren die UV-Vis-spektroskopischen Daten, die in der Absorptionskurve der erhaltenen und aufgereinigten Partikellösung ein klares, dem Polymer entsprechendes Signal zeigen. Zur Verdeutlichung sind in *Abbildung 59 (A)* die UV-Vis-Absorptionen der Polymere aufgetragen und entsprechend in *Abbildung 59 (B)* die der Partikel mit gebundenem Polymer. Die stärkere Steigung der Kurven der funktionalisierten Nanopartikel ist ein partikelhervorgerufener Effekt. Durch die starke Streuung durch nanopartikuläre Proben wird die Absorption mit steigender Wellenlänge erhöht. Ebenfalls wurde mit MnO-Nanopartikeln die Anbindung des Blockcopolymers C-PEG-*b*-PGA getestet und zum Beweis, dass sich dadurch freie Aminogruppen auf der Oberfläche des Partikels befinden, eine FITC-Markierung durchgeführt und nach mehrmaligem Aufreinigen ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen. Gleichzeitig wurde das Experiment mit C-PEG als Negativkontrolle durchgeführt.

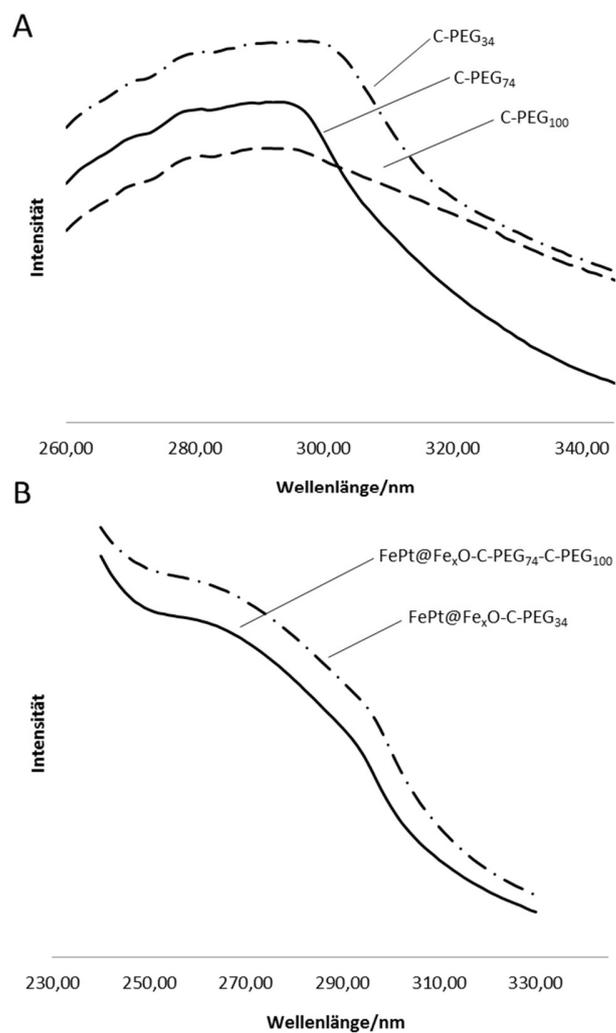


Abbildung 59: (A) UV-Vis-Spektrum dreier C-PEGs unterschiedlicher Längen, ungebunden. Signifikante Absorptionsbanden zwischen 260 und 300 nm (PEG). (B) UV-Vis-Spektrum zweier Partikelchargen, hier Heterodimere, funktionalisiert mit C-PEG bzw. einem C-PEG-Gemisch. Erkennbare Absorptionsbande des PEGs. Die stärkere Steigung der Kurven verglichen mit den Polymeren selbst ist auf die starke Absorption der Partikel durch Streuung zurückzuführen.

Zum Vergleich sind in *Abbildung 60* die Absorptionskurven von FITC in Wasser, Partikeln mit FITC und ohne FITC gezeigt.

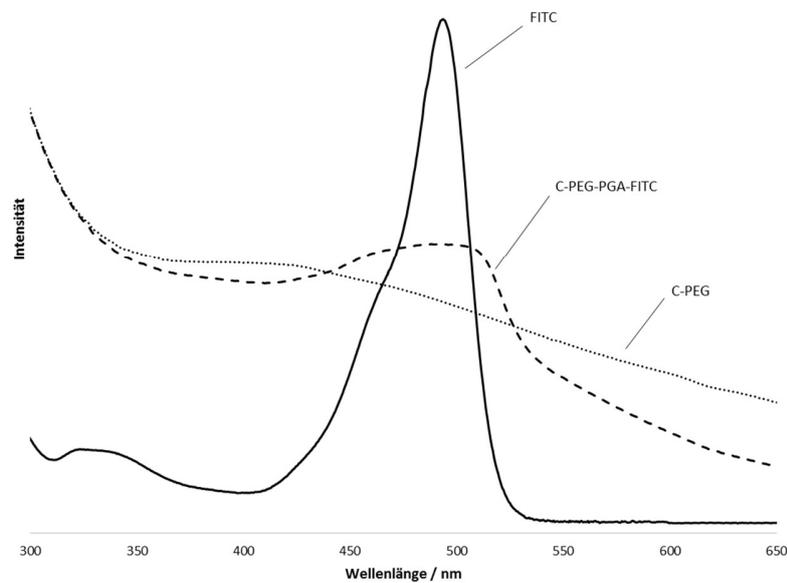


Abbildung 60: UV-Vis-Spektrum von FITC, C-PEG-*b*-PGA und C-PEG. Beide Polymere wurden mit FITC versetzt und anschließend aufgereinigt um die Anwesenheit von freiem FITC auszuschließen. Die Bindung erfolgte wie zu erwarten nur an das C-PEG-*b*-PGA.

Wie oben erwähnt, eignen sich Nanoheteropartikel zur orthogonalen Funktionalisierung. Um dies zu beweisen, wurde das in *Abbildung 49* illustrierte Partikel synthetisiert und die beiden Farbstoffe FITC und RITC per UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen (*Abbildung 61*). Im Spektrum sind beide Absorptionsbanden des RITC bzw. FITC zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Anbindung schließen lässt. FITC ist an ein Molekül 4-ATP gebunden und damit an die FePt-Domäne gekoppelt und RITC wurde an die C-PEG-*b*-PGA tragende MnO-Domäne angebunden.

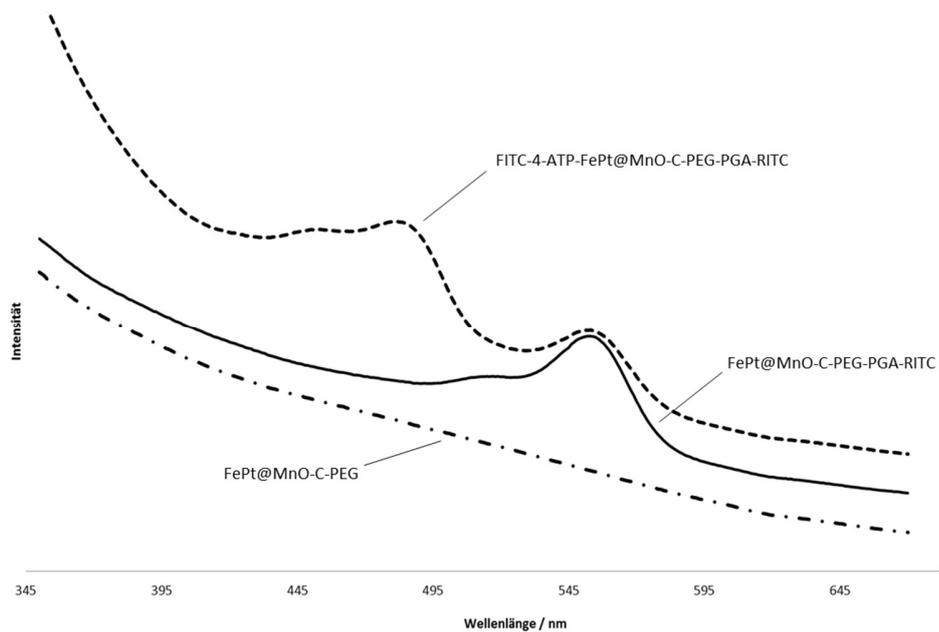


Abbildung 61: UV-Vis-Spektrum von polymerfunktionalisierten Heterodimeren ohne Farbstoff mit RITC markierter MnO-C-PEG-Domäne und freier FePt-Domäne und mit FITC und RITC markierten Domänen.

Abbildung 62 zeigt die klare Dispersion der C-PEG-tragenden Partikel, die nach Filtrierung durch einen 0,2 μm Filter in Wasser gelöst wurden. Die Filtrierbarkeit ist ein erster Hinweis auf nicht aggregierte Partikel. Um genauer zu überprüfen, wie eine mögliche Aggregation aussieht, müssen Filter mit kleineren Poren verwendet werden. Für gewöhnlich wird als kleinster Filter ein 20 nm Filter (Anotop) benutzt und die erhaltene Lösung per Lichtstreuung untersucht.



Abbildung 62: Aufnahme der klaren Dispersion der NP-C-PEG.

5.2.4.1 Einfluss der Länge und der Menge des Polymers auf die Dispersionsstabilität

Längenabhängige Unterschiede bezüglich der Dispersionsstabilität zwischen den fünf unterschiedlichen verwendeten PEG-Ketten, von denen die längste als zusätzliche Funktion eine Aminogruppe am Ende trug (C-PEG-*b*-PGA), konnten nicht beobachtet werden. Daher wurde versucht aufzudecken, wie viel Polymer tatsächlich mindestens benötigt wird, um die Partikel stabil zu dispergieren. Ausgehend von einem zuvor berichteten Verfahren zur Polymerfunktionalisierung wurde die Synthese mit einem dreifachen Überschuss an Polymer durchgeführt. Es wurde versucht die Polymermenge weitestgehend zu reduzieren. Nach mehreren Testsynthesen zeigte sich, dass die untere Grenze einem 1:2 Verhältnis von Partikeln und Polymer entspricht. Bereits bei diesem Verhältnis war kein Zusammenbrechen der Dispersion mehr zu verzeichnen. Das Verhältnis von 1:5 führt zu vergleichbaren Ergebnissen wie ein 1:2 und ein 1:3,5 Verhältnis, lediglich die Aufreinigung dauert länger, wenn hohe Verhältnisse vorlagen. In Kapitel 6 wird der Einfluss der unterschiedlichen Verhältnisse an Partikel zu Polymer noch einmal aufgegriffen und diskutiert, ob Unterschiede in der Toxizität zu verzeichnen sind. *Abbildung 63* zeigt die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit C-PEG-funktionalisierten Partikel. Sowohl bei den Aufnahmen (A) und (C), die MnO zeigen, als auch bei (B), FePt@Fe_xO-Heterodimere, ist ein definierter Abstand zwischen allen Partikeln zu erkennen, was die Anwesenheit eines effektiven *capping agents* unterstreicht. In Bild (C) ist sogar teilweise hexagonale Anordnung der Partikel zu erkennen, was für hydrophile Partikel bei Aufbringung auf das hydrophobe TEM-Grid eher ungewöhnlich und selten zu beobachten ist.

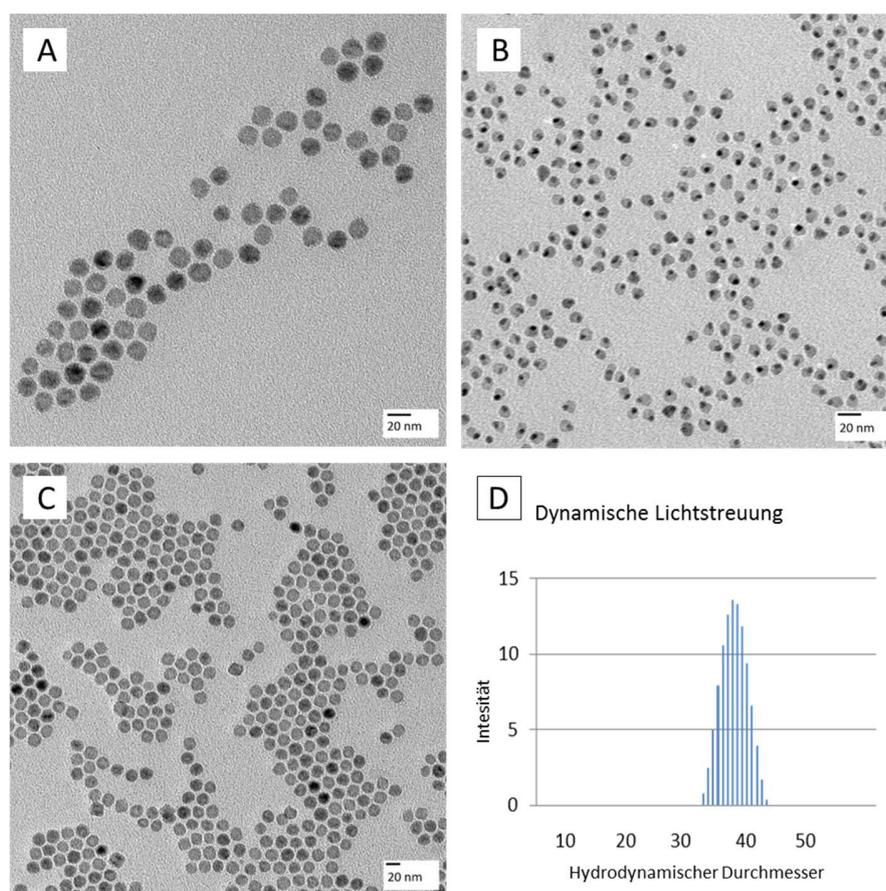


Abbildung 63: TEM-Aufnahmen von C-PEG-funktionalisierten (A)/(C) MnO- und (B) FePt@Fe_xO- Nanopartikeln. (D): Diagramm der Größenverteilung von MnO-Nano-partikeln mit C-PEG₇-Hülle. Verwendetes Gerät war ein Zetasizer Nano.

Die in *Abbildung 63* gezeigte Größenverteilung der MnO-Nanopartikel (DLS) scheint der am TEM ermittelten Größe der Partikel zu widersprechen: Wird auf den Aufnahmen eine Größe von ca. 19 nm ermittelt, zeigt die Lichtstreuung eine Gauss-Verteilung mit Maximum bei ca. 39 nm. Werden längere Polymerketten verwendet, kann dieser Wert bis auf über 50 nm ansteigen. Dieser Effekt wurde in der Literatur diskutiert.^[81] Hier wird für einen ca. 11 nm großen Fe₃O₄-Partikel unter Verwendung eines 600 g/mol PEG-Moleküls ein hydrodynamischer Durchmesser von ca. 40 nm ermittelt. Da das hier verwendete 440 g/mol schwere PEG auf ein größeres Partikel angebracht wurde, kann das Ergebnis die von Xie *et al.* gemachten Beobachtungen unterstützen. Ein möglicher Grund für die ungewöhnliche

Diskrepanz zwischen den ermittelten Größen ist die sehr große Hydrathülle, die durch das PEG hervorgerufen wird. In diesem Kapitel soll dennoch weitere Aufklärung der ungewöhnlich großen, durch DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmesser, betrieben werden.

5.2.5 Polymeranbindung an Pt@MnO-Nanoketten

Um die oben beschriebenen Pt@MnO-Nanoketten mit einem Catecholpolymer ansteuern zu können und damit später auf eine Silicaschicht anzubinden, wurde zunächst ein lineares C-PEG verwendet und der Ligandenaustausch analog der hier beschriebenen Synthese durchgeführt. Da bei dem hohen Anteil von Platinoberfläche an der Kettenstruktur nicht zwangsläufig davon auszugehen ist, dass die Partikel durch funktionalisierte MnO-Domänen wasserlöslich werden, wurde die zur Trockne eingedampfte Partikelmasse zunächst in Ethanol aufgenommen. Die Dispersion war klar und von grau-brauner Farbe, was auf eine stabile Dispergierbarkeit hinweist. In *Abbildung 65* ist die Dispersion nach einigen Tagen gezeigt. Sie behält somit ihre Stabilität. *Abbildung 64* zeigt die TEM-Aufnahme der Ethanol-Dispersion, auf der zu sehen ist, dass die Nanoketten nach wie vor nicht agglomerieren und offenbar stabil voneinander getrennt vorliegen. Die Vermutung, dass das catecholhaltige Polymer aufgrund des eingesetzten Eisens auch auf das Platinrückgrat bindet, kann ausgeschlossen werden aufgrund folgender Erkenntnisse: Ein Röntgendiffraktogramm der Platinnadeln weist keine Eisenreflexe auf, was zeigt, dass Eisen nur in so geringer Menge vorhanden sein kann, dass diese nicht ausreichend ist, um Angriffsfläche für die Catecholenden der Polymere darzustellen (vgl. *Abbildung 35*). Das Absorptionsspektrum der C-PEG-funktionalisierten Partikel ist in *Abbildung 66* dargestellt und zeigt eine schwache Bande, die dem Polymer zugeordnet werden kann.

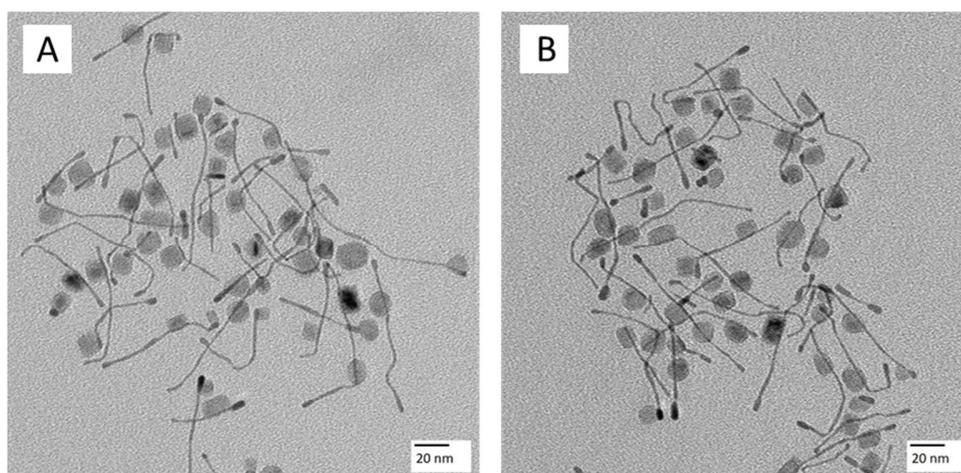


Abbildung 64: TEM-Aufnahmen von Pt@MnO-C-PEG-Nanoketten, stabil dispergiert in Ethanol.

Die Befähigung des C-PEGs eine stark anisotrope und teilweise hydrophobe Struktur stabil in einem hydrophilen Lösungsmittel zu dispergieren, verdeutlicht die universelle Einsetzbarkeit des Polymers für Metalloxide der 3d-Übergangsmetalle wie Mangan und Eisen.



Abbildung 65: Aufnahme der stabilen Dispersion von C-PEG-funktionalisierten Pt@MnO-Nanoketten in Ethanol. Die Aufnahme erfolgte drei Tage nach der Funktionalisierung.

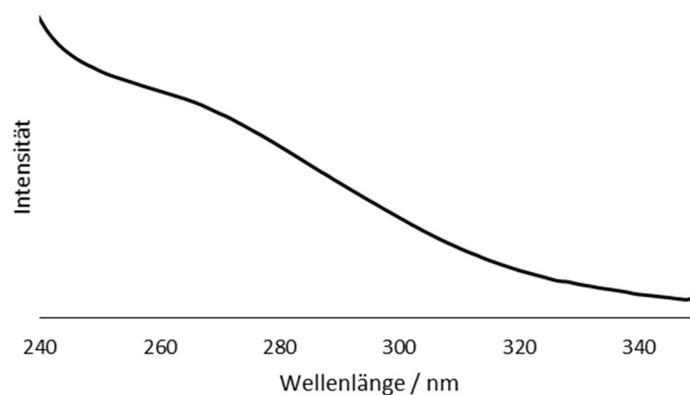


Abbildung 66: UV-Vis-Spektrum von C-PEG funktionalisierten Pt@MnO-Nanoketten. Die PEG-Bande zwischen 260 und 300 nm ist zu erkennen. Die leichte Verschiebung zu kleineren Wellenlängen verglichen mit der Absorption von purem PEG ist ein Streueffekt der Partikel, der hier besonders stark auftritt.

5.2.6 Anbindung von Pt@MnO-Nanoketten auf Silicaoberflächen mittels

Polymerlinker

Das vorgeschlagene Modell der Anbringung der polymerfunktionalisierten Pt@MnO-Nanoketten (Abbildung 53) wird auf Realisierbarkeit überprüft, indem zunächst Silicananopartikel (80-100 nm) mit Thionylchlorid behandelt werden, um die Oberfläche mit Chloridgruppen zu funktionalisieren. Diese stellen die Ankerpunkte für das verwendete Polymer dar, welches über die zahlreichen Hydroxylgruppen des *hbPG*-Blocks binden kann. Bei dem hier verwendeten Polymerlinker handelt es sich um ein Blockcopolymer mit einem Block PEG und einem zweiten Block linearem PG, auf den weitere Glyceryleinheiten durch *grafting* angebracht wurden. Dadurch wird eine Struktur mit „baumähnlicher“ Form erhalten, die dazu befähigen sollte, die Ketten flexibel, aber auch stabil an eine Silicaoberfläche zu binden. Das Polymer wird folgendermaßen bezeichnet: C-PEG₃₆-*b*-linPG₁₀-*graft*-hbPG₅₈ (kurz: C-PEG-*linPG*-*hbPG*). Wie in (5.2.5) gezeigt wurde, sind die MnO-Domänen mit dem Catechol-polymer adressierbar. Als Vortest wurden zunächst sphärische MnO-Nanopartikel mit funktionalisierten Silicapartikeln zur Reaktion gebracht, später soll dieser Versuch mit den Ketten durchgeführt werden. Auch wurde das Experiment auf zwei verschiedenen

Wegen angegangen. In *Variante 1* wurden MnO-Partikel mit Polymer funktionalisiert und mit Silica-partikeln, die zuvor mit Thionylchlorid behandelt wurden, vermischt. In *Variante 2* wurden zuerst die Silicapartikel mit dem Polymer zur Reaktion gebracht und danach mit unfunktionalisierten MnO-Partikeln vermischt. Die Ergebnisse zur ersten Variante sind in den TEM-Aufnahmen (*Abbildung 67*) zu sehen.

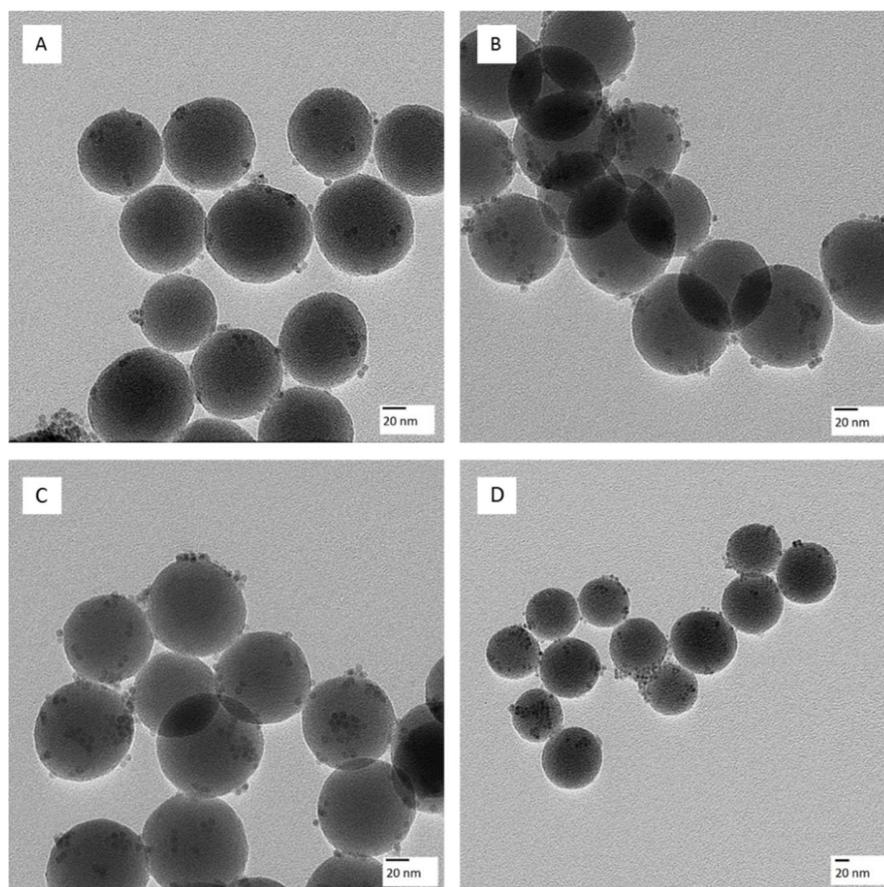


Abbildung 67: TEM-Aufnahmen von MnO-C-PEG-linPG-hbPG-Nanopartikeln gebunden auf chloridfunktionalisierten Silicapartikeln (*Variante 1*).

Wie in *Abbildung 67* zu sehen, lagern sich die polymertragenden Partikel um die Silicapartikel an. Da auch durch Fällen und Redispersieren der Probe in Ethanol die Partikel nicht getrennt voneinander vorliegen, wird vermutet, dass eine kovalente Bindung stattgefunden hat. Die Probe bleibt stabil dispergiert und die TEM-Aufnahmen zeigten kaum

Tendenz zur Agglomeration. Im Gegensatz zu dem gezeigten Ergebnis wird ein anderes Resultat erzielt, werden die Partikel mit *Variante 2* versucht zu kombinieren. Die entsprechenden Aufnahmen sind in *Abbildung 68* gezeigt.

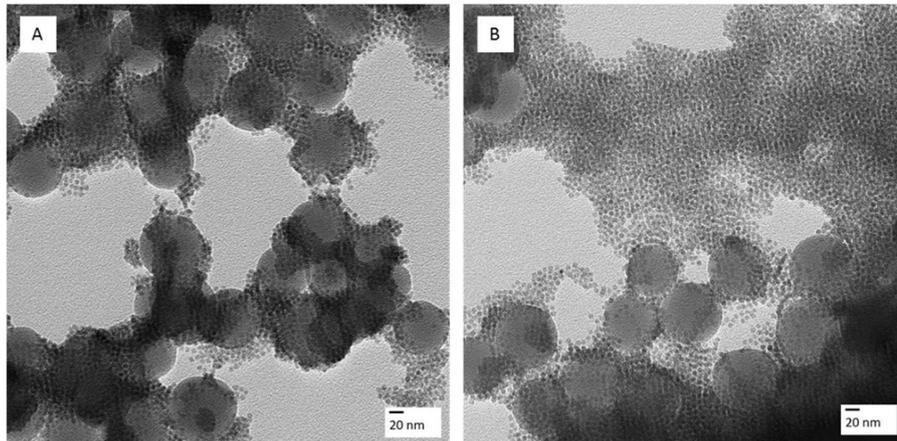


Abbildung 68: TEM-Aufnahmen von MnO-Nanopartikeln auf C-PEG-*lin*PG-*hb*PG funktionalisierten SiO₂-Cl-Nanopartikeln (*Variante 2*).

In *Abbildung 68* ist deutlich eine unkontrollierte Anordnung der MnO-Partikel um die SiO₂-Partikel zu erkennen. Während nach *Variante 1* polymertragende MnO-Partikel durch Kontakt mit der Silicaoberfläche an diese gebunden wurden, verläuft dies durch *Variante 2* zwar ähnlich, aber weniger effektiv. Die hier polymertragenden Silicapartikel binden die MnO-Partikel zwar auf die vermutete Weise, dennoch gelangen nicht alle Partikel zur Silicaoberfläche. Als Grund wird vermutet, dass es für die hier in Chloroform gelösten, unfunktionalisierten MnO-Partikel keine Triebkraft gibt ihr Lösungsmittel zu verlassen und auf die Silicaoberfläche zu binden. Wenn nach beendeter Reaktionszeit per Zentrifugation die Partikelmasse gewonnen und in Ethanol redispersiert wird, fehlt den nicht gebundenen MnO-Partikeln ein geeignetes Lösungsmittel und sie agglomerieren als Folge des für Partikel typischen Prozesses der Oberflächenminimierung. Die Dispersion ist, dieser Theorie folgend, nicht stabil und fällt schnell aus. Negativproben zeigen, dass sich die MnO-Partikel unfunktionalisiert nicht auf ebenfalls unfunktionalisierte Silicapartikel absetzen

(Abbildung 69). Um eine Übersicht über die verschiedenen Positiv- und Negativproben zu geben, wurden die getesteten Systeme in *Tabelle 2* zusammengestellt.

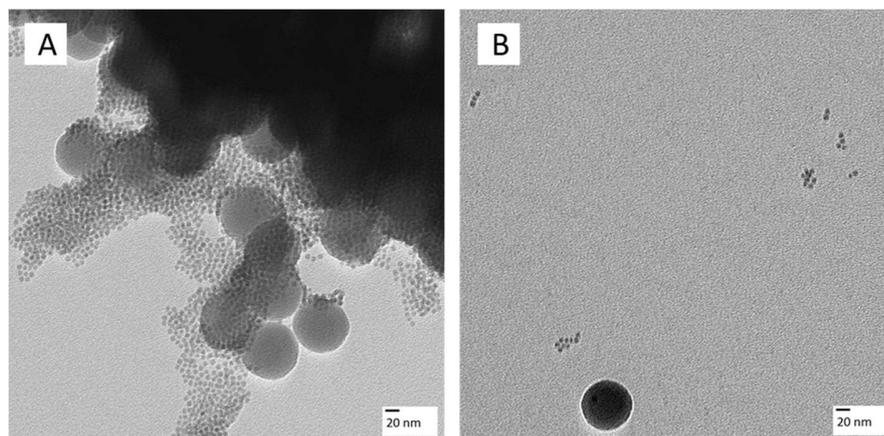


Abbildung 69: TEM-Aufnahmen von Negativtests zur Anbindung von MnO auf Silicapartikel. (A): MnO-Partikel mit Polymer agglomerieren zusammen mit unbehandelten Silicapartikeln. (B): Unbehandelte MnO-Partikel liegen frei neben chloridfunktionalisierten Silicapartikeln vor.

Tabelle 2: Zusammenstellung verschiedener Positiv- und Negativtests für die Kombination von MnO- und Silicapartikeln.

	MnO-Partikel-Funktionalisierung	Silicapartikel-Funktionalisierung	Lösungsmittel für die Kombination	Dispergierbarkeit	TEM-Ergebnis
Positiv, Variante 1	Polymer	Chlorid	CHCl ₃ /MeOH	Stabil	Einzelne Partikel auf Silicaoberfläche
Positiv, Variante 2	Keine	Chlorid + Polymer	CHCl ₃ /MeOH	Instabil	Agglomerierte Partikel auf Silicaoberfläche
Negativ	Keine	Chlorid	CHCl ₃ /MeOH	Instabil	Agglomerierte Partikel auf Silicaoberfläche
Negativ	Polymer	keine	CHCl ₃ /MeOH	Instabil	Agglomerierte Partikel auf Silicaoberfläche

Die Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit des Funktionalisierens der MnO-Partikel mit dem Polymer, bevor die Zugabe zur Silicaprobe erfolgt. Auch die Chloridfunktionalisierung des

Silicas ist essentiell für eine effektive Anbindung. Daher wurde *Variante 1* verwendet um das Experiment mit Pt@MnO-Nadeln durchzuführen. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 70* zu sehen.

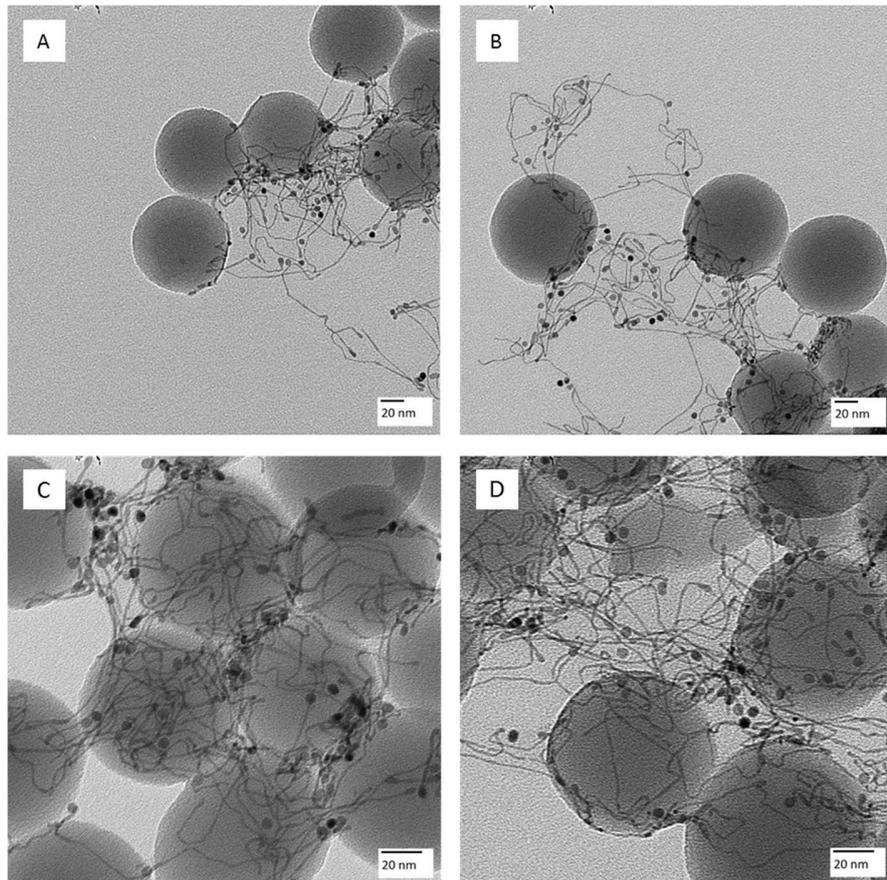


Abbildung 70: TEM-Aufnahmen von Pt@MnO-C-PEG-*lin*PG-*hb*PG-Nanoketten gebunden auf chloridfunktionalisierten Silicapartikeln (*Variante 1*).

Wie die TEM-Aufnahmen in *Abbildung 70* zeigen, ist es möglich Pt@MnO-Ketten auf die Silicapartikel zu binden. Eindeutig ist, dass die Ketten über die MnO-Domänen an die Silicapartikel gebunden haben. Es liegen keine freien Ketten auf dem TEM-Grid vor. Als problematisch stellte sich allerdings heraus, dass die Ketten die Partikel mitunter quervernetzen da sich die Ketten ineinander verfangen. Vom Silicapartikel teilweise abstehende Ketten ohne MnO-Domänen sind hierfür mitverantwortlich. Daher muss in zukünftigen Experimenten versucht werden Pt@MnO-Ketten einheitlicher zu synthetisieren

um möglichst viele MnO-Domänen auf den Platin-Nadeln zu garantieren. Weiterhin muss das Verhältnis der Ketten zu den Silicapartikeln angepasst werden, um so die Quervernetzung zu minimieren. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es mit einem catecholinitiierten Polymerlinker mit orthogonalem *hbPG*-Block möglich ist, metall-oxidische Nanopartikel auf chloridfunktionalisierte Oberflächen zu binden.

5.2.7 Biomedizinische Anwendungen

Die Anbindbarkeit eines Isothiocyanates an die Aminogruppen des C-PEG-*b*-PGA zeigt die potentielle Einsetzbarkeit der funktionalisierten Partikel zur Anwendung im Wirkstofftransport. Hierzu wurden die Partikel für drei verschiedene Projekte verwendet. Einerseits wurde die Anbindung eines Chelatormoleküls zur Aufnahme des radioaktiven Gallium-isotopes ^{68}Ga und somit die Verwendung des Partikels als Carrier eines PET-Kontrastmittels durchgeführt. Erste Ergebnisse werden hier präsentiert. Des Weiteren einerseits zur Anbindung eines Antikörpers (DEC205) für das aktive *cell targeting* auf dendritische Zellen des Immunsystems, andererseits zur Anbindung des EGFR-Antikörpers zum *targeting* auf epidermales Tumorgewebe.

5.2.7.1 Chelatoranbindung an FePt@Fe_xO-C-PEG₇₄-C-PEG₁₂₈-*b*-PGA

Da der oben beschriebene Chelator DOTA ein sterisch anspruchsvolles Molekül ist, wurde ein Gemisch aus einem C-PEG₇₄ und dem Aminogruppen tragenden C-PEG₁₂₈-*b*-PGA gewählt. Das Verhältnis beider Polymere zueinander lag bei 9:1 (PEG zu PEG-*b*-PGA). Der Grund hierfür ist einerseits die Erwartung, dass das zu 90% vorhandene kleinere C-PEG₇₄ für die Löslichkeit verantwortlich sein wird und das längere zu 10% vorhandene C-PEG₁₂₈-*b*-PGA antennenähnlich aus dem kleineren PEG herausragt und somit dem anzubindenden Chelator genug Platz lässt. Andererseits konnte in ersten Tests festgestellt werden, dass Partikel, die 100% C-PEG₁₂₈-*b*-PGA tragen, eine hohe unspezifische Bindung des Gallium-Isotops zeigen, was durch die Reduktion des Aminogruppenanteils ebenfalls

eingeschränkt werden soll. *Abbildung 71* verdeutlicht die Struktur eines solchen Partikels. Die gewählten Heterodimere bleiben zunächst nur einseitig funktionalisiert, können aber bekanntermaßen mit einer zweiten Funktion angesteuert werden.

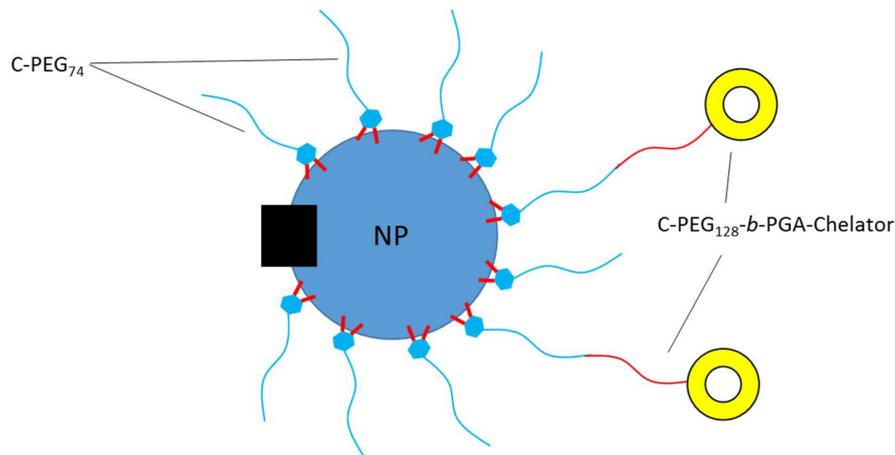


Abbildung 71: Schematische Darstellung eines Heterodimers mit einem Gemisch aus C-PEG₇₄ und C-PEG₁₂₈-b-PGA-DOTA.

Um die Anbindung des Chelators zu überprüfen, wird nach der radioaktiven Markierung die Dünnschichtchromatographie (DC) verwendet. Nach Auftragung der markierten Probe und beendeter Laufzeit wird die DC mittels *Instant Imager* auf lokale Radioaktivität überprüft. Hierbei läuft überschüssiges Gallium mit der Front, wie in *Abbildung 72* links zu sehen. Bei einem Retentionsfaktor von ca. 0,4 wird der nicht am Partikel gebundene Gallium-DOTA Komplex gefunden, am Punkt der Probenauftragung wird die Aktivität der markierten Probe verzeichnet. Zeigt nur der Auftragungspunkt Radioaktivität, wie in *Abbildung 72* rechts zu sehen, ist die Probe ausreichend aufgereinigt.

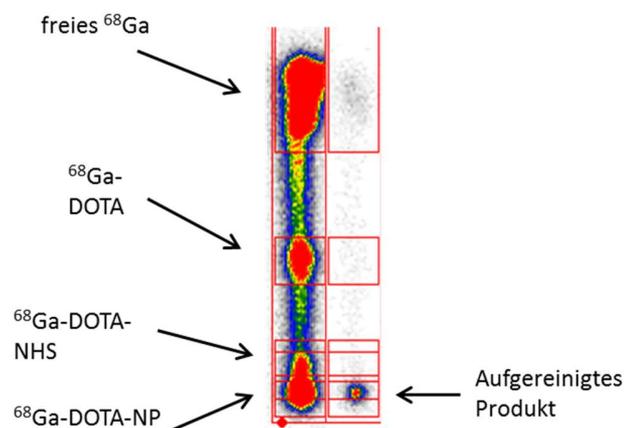


Abbildung 72: Dünnschichtchromatographie von zwei ^{68}Ga markierten DOTA-Nanopartikelproben nach Auswertung mittels *Instant Imager* zur Visualisierung lokaler, radioaktiver Zonen.

Die geplante Anwendung der markierten Partikel ist das kombinierte Verfahren der PET/MRT oder der PET/CT wobei der radioaktive Anteil für die PET benötigt wird und die metalloxidische Komponente wie Eisenoxid oder Manganoxid für die MRT. Das ebenfalls verwendete Platin bzw. FePt stellt ein potentielles CT-Kontrastmittel dar.

Die Experimente zur Kopplung des Chelators und der ^{68}Ga -Markierung wurden von Katharina Stockhofe, Universität Mainz, Institut für Kernchemie, AK Rösch, durchgeführt.

5.2.7.2 C-PEG-*b*-PGA-Funktionalisierung und DEC205-Rezeptor-Antikörper-Kopplung

Die Experimente an dendritischen Zellen betreffend Aktivierung und Bindung/Aufnahme wurden an BMDCs durchgeführt (engl.: bone marrow derived dendritic cells). Die Zellen werden mit Anti-Maus *CD11c*-Antikörpern behandelt welche mit einem Farbstoff markiert sind um aktivierte DCs (*CD11c*+) von nicht aktivierten unterscheiden zu können.

Um eine erfolgreiche Bindung des DEC205-Rezeptor-Antikörpers (im weiteren DEC205) an die Nanopartikel zu überprüfen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hier werden Zellen im Durchfluss auf bestimmte Eigenschaften untersucht und sortiert (hier nach der Expressierung von *CD11c*). In einem spezielleren Aufbau können fluoreszenzmarkierte Zellen beispielsweise durch Bindung oder Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln nach der Stärke der Fluoreszenz sortiert werden. Geräte mit einem solchen Fluss-Sortierer werden als FACS bezeichnet (engl.: fluorescence-activated cell sorting). Neben den (FITC)-fluoreszenzmarkierten $\text{FePt}@Fe_x\text{O-C-PEG}_{74}\text{-C-PEG}_{128}\text{-PGA-DEC205}$ -Partikeln wurden als Kontrollen Partikel mit einem Isotyp des DEC205-Rezeptor-Antikörpers funktionalisiert und Partikel ohne Antikörper verwendet. Die Kontrollen sollen zeigen ob schon eine unspezifische Bindung erfolgt, sowohl bei „nackten“ Partikeln als auch bei Partikeln mit einem unspezifischen Antikörper. In *Abbildung 73* ist das Diagramm zur FACS-Analyse abgebildet. Nach Inkubationszeiten von 1 und 4 h ist kein Unterschied für die Bindung/Aufnahme zu erkennen, nach 24 h hingegen zeichnet sich der Trend ab, dass die DEC205 gekoppelten Partikel stärker von den Zellen gebunden oder aufgenommen wurden. Im Totalen ist dennoch eine Bindung/Aufnahme von lediglich 9 % relativ gering, allerdings wurde hier mit einer zunächst niedrigen Dosis an Partikeln gearbeitet und kann in Folgeexperimenten deutlich erhöht werden. Weiterhin ist es interessant, dass bei den beiden Kontrollen nach 4 h offenbar Sättigung eingetreten ist, betreffend der Zellbindung/Aufnahme. Bei der DEC205-Probe ist die Steigung der Geraden nach 4 h deutlich höher, was für einen anlaufenden Prozess der Partikelbindung/Aufnahme spricht. Auch die Bindungsaffinität der antikörpertragenden Partikel muss in weiteren Experimenten erhöht werden. Das Verhältnis von C-PEG zu C-PEG-*b*-PGA auf den hier zur Anwendung gekommenen Partikeln war 10:1, da wie für die Chelatorkopplung (siehe oben) vermutet wurde, dass der Antikörper ähnlich sterisch anspruchsvoll ist und somit ein Partikelsystem wie in *Abbildung 71* dargestellt, verwendet werden sollte. Die Anpassung des Polymerverhältnisses auf 10:2 oder 10:5 könnte das erfolgte *cell targeting* verbessern.

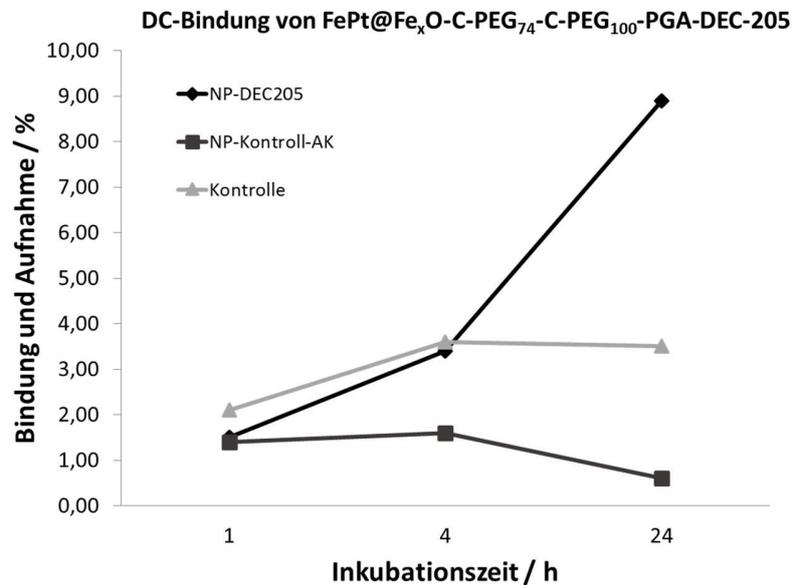


Abbildung 73: FACS-Analyse der Bindung/Aufnahme von FITC-markierten Nanopartikeln mit DEC205-Antikörper (schwarz), Isotyp-Antikörper (hellgrau) und ohne Antikörper (dunkelgrau). Die verwendeten Zellen waren *CD11c*+ BMDCs.

Zusätzlich zu der gezeigten FACS-Analyse wurde eine Toxizitätsstudie durchgeführt, die zeigen soll ob die Partikel nach Antikörperkopplung toxische Effekte zeigen. Weitere Toxizitätsstudien werden in Kapitel 6 vorgestellt. Um die Viabilität der beladenen und unbeladenen Partikel zu ermitteln wurde ein MTT-Assay (abweichend zum in Kapitel 6 verwendeten Assay) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf dem Umsatz des Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blau-violetten Formazan welches UV-Vis-spektroskopisch nachgewiesen wird. Der Umsatz erfolgt durch stoffwechseltätige (lebende) Zellen, was durch Vergleich mit unbehandelten Zellen zur prozentualen Viabilität führt. In *Abbildung 74* ist klar zu erkennen, dass die beiden Partikel mit Antikörper sogar zur leichten Verbesserung der Biokompatibilität führen.

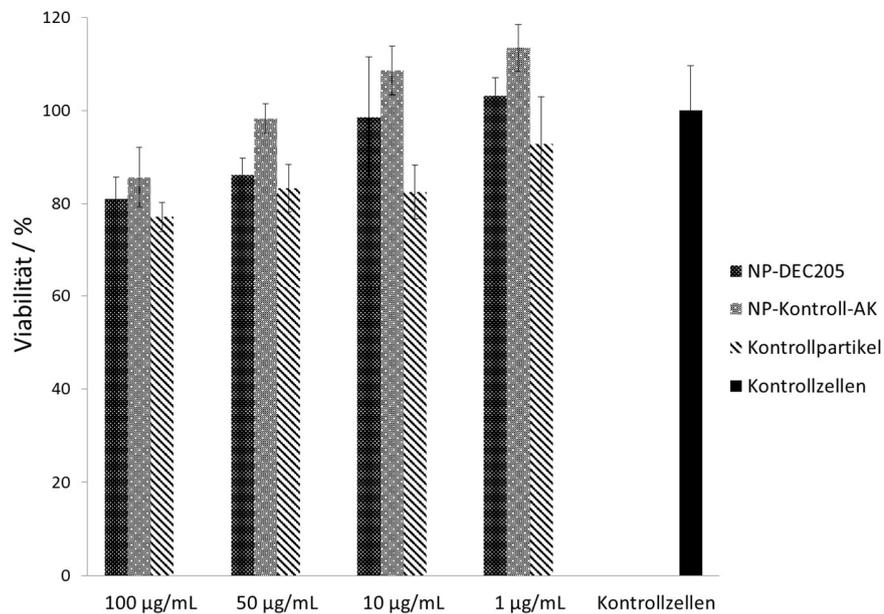


Abbildung 74: Viabilitätsassay (MTT) von $\text{FePt@Fe}_x\text{O-C-PEG}_{74}\text{-C-PEG}_{128}\text{-PGA}$ -Partikeln funktionalisiert mit DEC205 Rezeptorantikörper, Isotyp (Kontroll-)Antikörper und ohne Antikörper.

In weiterführenden Experimenten soll getestet werden ob Partikel ohne Antikörper bereits die adressierten dendritischen Zellen aktivieren. Im Idealfall sollte eine solche Partikelprobe keinen Einfluss auf die Aktivität von Immunzellen haben.

Die hier gezeigten Ergebnisse der FACS-Analysen und des MTT-Assays wurden von Monika Bednarczyk, Universitätsmedizin Mainz, Hautklinik, AG Grabbe, durchgeführt.

5.2.7.3 SiO₂-Funktionalisierung und EGFR-Antikörper-Kopplung

Die Antikörperkopplung an Silicananopartikel erfolgte nach Funktionalisierung der Partikel mit APS, um Aminogruppen auf der Oberfläche zur Anbindung zur Verfügung zu stellen. Danach wurde mittels EDC/NHS-Kopplung der Antikörper auf die Oberfläche gebunden. Die Reaktion wurde über 24 h bei 4°C auf einem Eppendorf-Mixer durchgeführt. Nach beendeter Reaktionszeit und erfolgter Aufreinigung wurde per ELISA-Blotting überprüft ob und wieviel Antikörper auf den Partikeln gebunden hat. Erste Ergebnisse betätigen hier einerseits die erfolgreiche Bindung des Antikörpers an die Partikel und es kann eine Antikörper-Konzentration von 473,5 ng/mL Partikeldispersion angegeben werden. Die Dispersion hatte eine Konzentration von 1 mg/mL bezogen auf die Masse an Partikeln.

Die Experimente zur Bestimmung der Antikörperkonzentration auf den verwendeten Nanopartikeln wurden von Dr. Matthias Bros, Universitätsmedizin Mainz, Klinische Forschergruppe Allergie der Hautklinik und Poliklinik durchgeführt.

5.2.8 C-PG-Funktionalisierung

Zur C-PG-Funktionalisierung verschiedener Partikelsysteme wurde ebenfalls per UV/Vis-Spektroskopie bewiesen, dass die verwendeten Polymere tatsächlich auf der Partikeloberfläche kovalent gebunden haben. *Abbildung 75 A* und *B* zeigen die Absorptionskurven der freien Polymere und der Polymer tragenden Partikel.

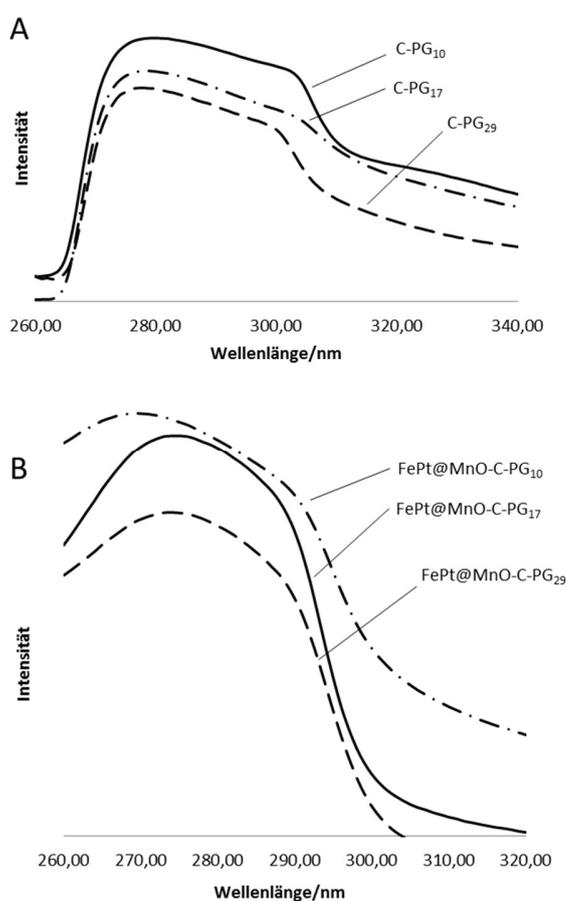


Abbildung 75: UV-Vis-Spektren von: (A) Ungebundenen C-PGs in drei verschiedenen Längen mit Absorptionsbanden zwischen 265 und 310 nm. (B) An Nanopartikel gebundene C-PGs in verschiedenen Längen mit entsprechenden leicht verschobenen Absorptionsbanden, was auf Partikeleffekte zurückzuführen ist.

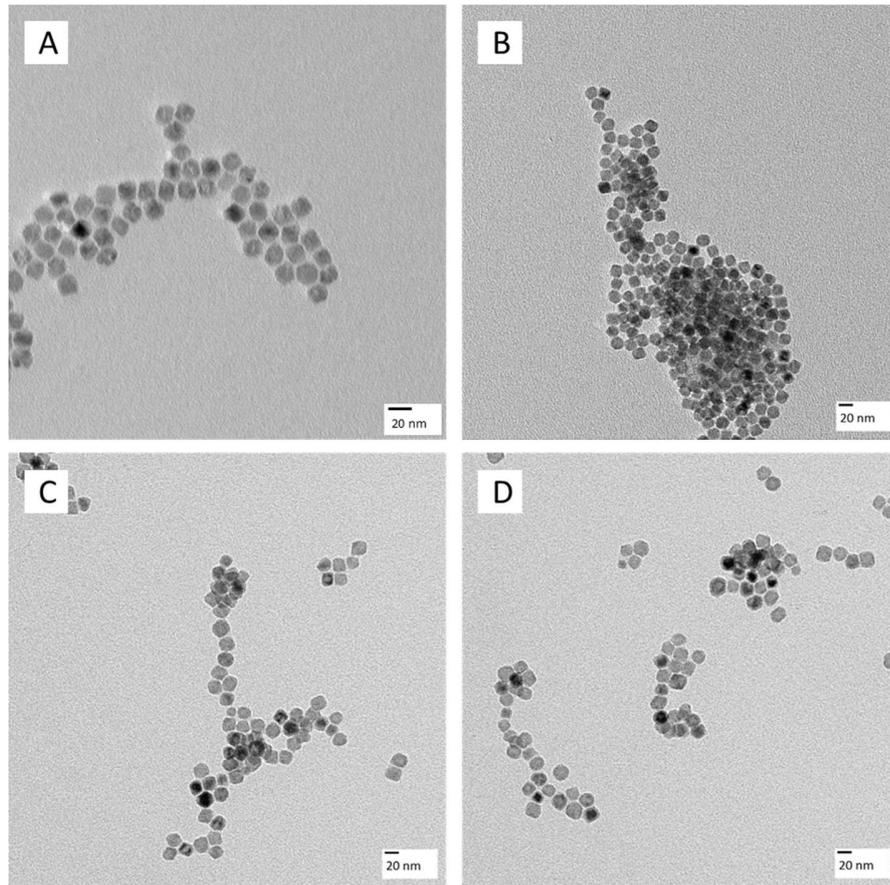


Abbildung 76: TEM-Aufnahmen von: (A) - (D) Mit C-PG-funktionalisierte MnO-Nanopartikel, leichte bis mittlere Aggregation, dennoch klare Abtrennung zwischen einzelnen Partikeln erkennbar.

Die in *Abbildung 76* gezeigten TEM-Aufnahmen zeigen die mit C-PG-funktionalisierten MnO-Nanopartikel. Im Gegensatz zu den C-PEG-umhüllten Partikeln, die sich, wie in *Abbildung 63 A* und *C* zu sehen, hexagonal anordnen und keine „Gruppen“ bilden, muss hier von leichter Aggregation gesprochen werden. Zwar werden auf dem TEM-Grid eher Partikelinseln, als bedeckte Flächen beobachtet, jedoch sind die einzelnen Partikel klar voneinander abgegrenzt. Dies spricht für einen effektiven *capping agent*, was auch durch die zahlreichen erfolgreichen Versuche, Nanopartikel mit C-PG in die wässrige Phase zu überführen, bestätigt wird. Erklärt werden kann dies durch die weit höhere Hydrophilie des verwendeten C-PGs. Im Gegensatz zum Poly(ethylenglykol) weist Poly(glycerol) eine

bedeutend höhere Anzahl an Hydroxylgruppen auf. Das mit Kohlenstoff bedampfte TEM-Grid, seinerseits völlig unpolar, treibt die Partikel dazu, sich in einer Art „hydrophilem Kollaps“ zusammenzulagern. Das dies beim ebenfalls hydrophilen C-PEG nicht passiert liegt an der aliphatischen Etherstruktur, die hauptsächlich in Wasser ihre volle Hydrophilie ausbildet. Wird nun eine wässrige Probe an C-PEG-funktionalisierten Partikeln auf einem TEM-Grid eingetrocknet, ist es dem aliphatischen Ether-Rückgrat besser als den C-PG-tragenden Partikeln möglich, sich auf dem TEM-Grid anzuordnen. Zur generellen Löslichkeit der C-PG-funktionalisierten Partikel wurde die Beobachtung gemacht, dass die Partikel in entionisiertem oder normalem Wasser nicht löslich sind. Wird die aus der Synthese und Aufreinigung gewonnene Partikelmasse in Wasser dispergiert, bildet sich eine nur kurzzeitig stabile, trübe Dispersion, die sich mit der Zeit komplett absetzt. Begründbar ist dies ebenfalls durch die hohe Zahl an Hydroxylgruppen und deren Fähigkeit untereinander Wasserstoffbrücken zu bilden. Aus energetischer bzw. entropischer Sicht ist die Zusammenlagerung der Partikel durch Wasserstoffbrückenbildung stabiler als einzelne Partikel. Dies kann bestätigt werden, sobald anstatt Wasser gesättigte Kochsalzlösung oder in manchen Fällen PBS oder Serum verwendet wird. Durch die hohe Ionenstärke wird die Tendenz Wasserstoffbrücken zu bilden weit genug herabgesetzt um schließlich eine stabile Dispersion der Partikel in (Salz-)Wasser zu ermöglichen. Ein erstaunlicher Effekt der Funktionalisierung mit C-PG ist die Färbung der erhaltenen Partikeldispersion. Wird bei PEG-funktionalisierten MnO- oder auch Fe_xO-Partikeln eine bräunliche, klare Dispersion erhalten, ist die Dispersion bei C-PG-Verwendung leicht violett. Von einem Auflösen der Partikel kann abgesehen werden, nachdem der pH-Wert des Polymers vor der Reaktion adäquat angepasst (ca. pH 7) und die Unversehrtheit der Partikel durch Lichtstreuung und TEM-Aufnahmen bestätigt wurde. In *Abbildung 77* ist der farbliche Unterschied zwischen einer C-PEG- und einer C-PG-funktionalisierten Probe zu sehen.



Abbildung 77: Aufnahme von bräunlichen NP-C-PEG (links) und violetten NP-C-PG (rechts).

Eine weitere Frage, die sich stellt, ist ob die beiden Catechol-Polymere tatsächlich auf die Ankerfunktion angewiesen sind um auf eine Partikeloberfläche binden zu können. Hierzu wurden zwei Ansätze miteinander verglichen, bei denen im einen Fall vollständig entschütztes Polymer und im anderen Fall das Polymer mit noch acetalgeschützter Catecholfunktion zum Einsatz kam. *Abbildung 78* zeigt (in Bild A und B) die Resultate der beiden Tests, wobei in Bild B die Probe mit geschütztem Polymer zu sehen ist. Die Partikel agglomerieren direkt und zeigen keine Tendenz, in die überstehende wässrige Phase zu gehen. Demnach ist davon auszugehen, dass das Polymer nur an die Partikeloberfläche bindet, wenn eine Abspaltung der Schutzgruppe des Catechols stattgefunden hat. Diese Überprüfung wurde mit C-PEG, C-*lin*PG und C-*hb*PG durchgeführt und das gleiche Ergebnis erhalten. Somit wird die Frage beantwortet, ob die Polymere ohne die Ankerfunktion des Catechols solubilisierend wirken können. Ebenfalls in *Abbildung 78* zu sehen ist eine Aufreihung von verschiedenen C-PEG- bzw. C-PG-funktionalisierten Partikeln (Bild C). Es zeigt die hervorragend solubilisierenden Eigenschaften der beiden Polymere. Die gezeigten Dispersionen sind langzeitstabil und nach der Funktionalisierung steril filtrierbar (Merck Millipore-GS; 0,22 μm , MCE-Membran). Die C-PG-funktionalisierten Partikel weisen oft einen etwas höheren Filtrationsverlust auf als die C-PEG-funktionalisierten, wodurch die hellere Farbgebung der linken Probe in *Abbildung 78* Bild C zustande kommt. Dies könnte mit der stärkeren Tendenz zu agglomerieren erklärt werden.

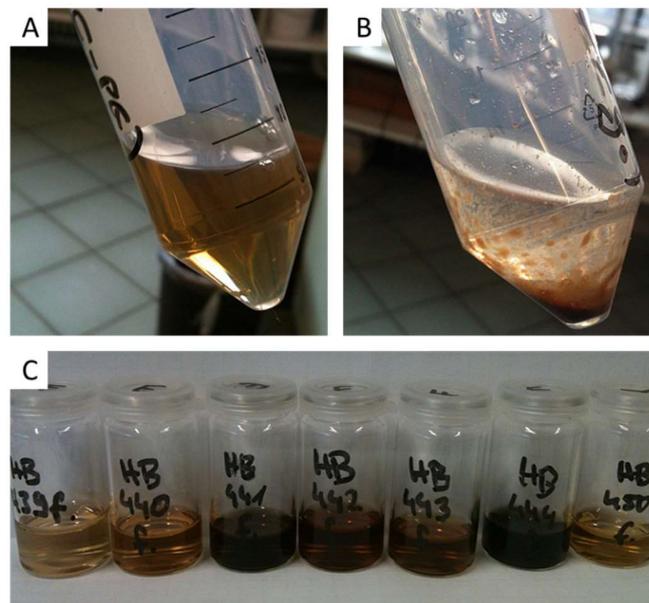


Abbildung 78: (A) Aufnahme von stabil dispergierten Nanopartikeln, funktionalisiert mit Catechol-Polymer. (B) Aufnahme von ausgefallenen Nanopartikeln nach Verwendung des noch acetalgeschützten Catechol-Polymers als Beweis für die ausschließliche Anbindung des Polymers über die Catecholfunktion. (C) Aufnahme verschiedener Proben von polymerfunktionalisierten Nanopartikeln, stabil dispergiert und filtriert durch 0,2 µm Filter.

5.2.9 Funktionalisierung von Partikeln mit amphiphilen Molekülen

Die Bildung einer Art Mizelle aus amphiphilen Molekülen um ein Partikel ist ein schwierigerer Prozess als die kovalente Verankerung eines Polymers, da die Anbindung lediglich über hydrophobe Wechselwirkung zwischen der lipophilen Partikelhülle und dem unpolaren Teil des Amphiphils stattfindet. Bei diesem Vorgang geschieht kein Austausch der Liganden. Die Partikel besitzen eine dichte Hülle aus Ölsäure oder Oleylamin, also einer Kette aus 18 C-Atomen mit einer mittleren Doppelbindung, die dem *capping agent* Stabilität verleiht. Für die Einlagerung des hydrophoben Teils eines amphiphilen Moleküls in diese Schicht, muss eine Triebkraft vorhanden sein. Solange das vorhandene Lösungsmittel noch zur Genüge solubilisierend wirkt, besteht für das Amphiphil kein energetischer Gewinn darin, in die Hülle der Partikel eingelagert zu werden. Wird allerdings dem gelösten Amphiphil langsam das Lösungsmittel entzogen, wird es gezwungen sich in ein anderes

„Lösungsmittel“ – die hydrophobe Partikelhülle – einzulagern. Alternativ könnte dieser Effekt auch über die Zugabe eines Lösungsmittels erreicht werden, welches nur für den polaren Teil des Amphiphils geeignet ist. Hier wird die erstere Möglichkeit verwendet. Um den Prozess zu erleichtern kann die Hülle des Partikels geschwächt oder gelockert werden. Es ist bekannt, dass Partikel-dispersionen an Stabilität verlieren, je öfter sie durch Fällung und Redispersion aufgereinigt werden. Dies wird erklärt durch den teilweisen Verlust einiger Moleküle des *capping agents*. Der sonst unerwünschte Effekt kann hier ausgenutzt werden, um dem Amphiphil die Einlagerung zu erleichtern. Die in ihrer Dispergierbarkeit geschwächten Nanopartikel werden somit zusammen mit dem amphiphilen Polymer gelöst und das Lösungsmittel bei leicht erhöhter Temperatur (ca. 75°C) langsam entfernt. Dies wird später mittels Rotations-verdampfer fortgeführt, bis nahezu kein Lösungsmittel mehr vorhanden ist und (theoretisch) eine Einlagerung stattgefunden haben sollte. Getestet wird dies zunächst rein qualitativ, indem ein polares Lösungsmittel zu den Partikeln gegeben wird und deren Dispergierbarkeit im neuen Lösungsmittel zeitlich aufgelöst dokumentiert wird. Für gewöhnlich wird hierbei nicht direkt mit Wasser, sondern mit schwächer polaren Lösungsmitteln wie Aceton oder Ethanol begonnen, da die Hydrophilisierung per Einlagerung in die Hülle als weniger effektive Methode angesehen wird um Partikel polar löslich zu machen. Weist die erhaltene Partikelmasse eine Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln auf, wird zur Verwendung von Wasser übergegangen. Im Fall vom oben beschriebenen Cholesterol-PG (Ch-*lin*PG) ist nach beendeter Synthese eine signifikante Hydrophilisierung zu verzeichnen. *Abbildung 79* zeigt die Stabilitätsreihe der in Wasser dispergierten Partikel. Über einen Zeitraum von 20 Minuten setzen sich die Partikel allerdings deutlich ab. Wird anstatt entionisiertem Wasser eine gesättigte Kochsalzlösung verwendet, wie es bei der Verwendung von C-*lin*/hbPG ebenfalls nötig ist, kann die Dispersion über etwa 12 Stunden aufrecht gehalten werden. Die Probleme, Partikel mittels Ch-*lin*PG stabil in wässrigen Systemen zu lösen, hängen vermutlich mit der Sterik des Cholesterol-„Ankers“ zusammen, der sich in die Ölsäureschicht einlagern soll. Durch das starre polycyclische System liegt nicht genügend Flexibilität vor, um mit der Ölsäureschicht effektiv in Wechselwirkung treten zu können. Stattdessen kann das Polymer selbst Mizellen bilden und interagiert nicht mit dem Partikel.

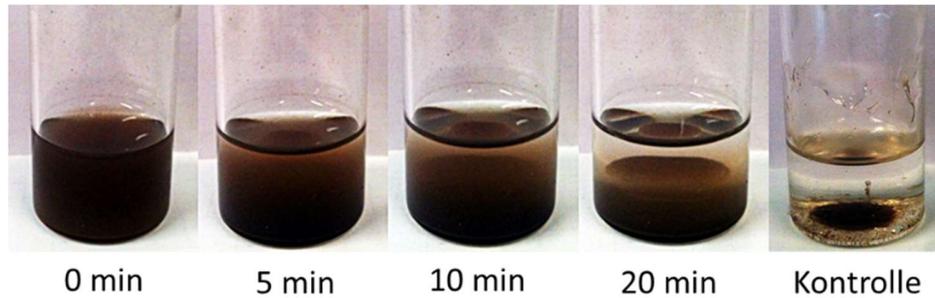


Abbildung 79: Aufnahme einer Stabilitätsreihe von Cholesterol-*lin*PG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln in Wasser. Nach 20 min sind ca. 50% der Dispersion abgesetzt. Zum Vergleich unfunktionalisierte MnO-Partikel in Wasser im Kontrollbild.

Um die Effektivität des Amphiphils zu erhöhen, wurde statt des Cholesterols ein langkettiger Alkylrest (Tetradecan-1-ol, Myristylalkohol, C14) als hydrophober Anker verwendet. Hier wurde Tetradecanol-PEG₅₇-PGG₁₂ eingesetzt. (Im Weiteren mit TD-PEG₅₇-PGG₁₂ abgekürzt). Es wird vermutet, dass die flexiblere und weniger sterisch anspruchsvolle Alkylkette besser geeignet ist, um sich in die Schicht des *capping agents* einzulagern. Die Synthese hierzu wurde entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen durchgeführt und es wurde ein deutliches Ergebnis erhalten. Die Dispergierbarkeit der Partikel ist rein optisch an der klaren braunen Lösung zu erkennen (*Abbildung 80*).



Abbildung 80: Aufnahme von stabil dispergierten MnO-Nanopartikeln in wässriger Kochsalzlösung, funktionalisiert mit TD-PEG₅₇-PGG₁₂. Die Aufnahme erfolgte drei Tage nach der Funktionalisierung.

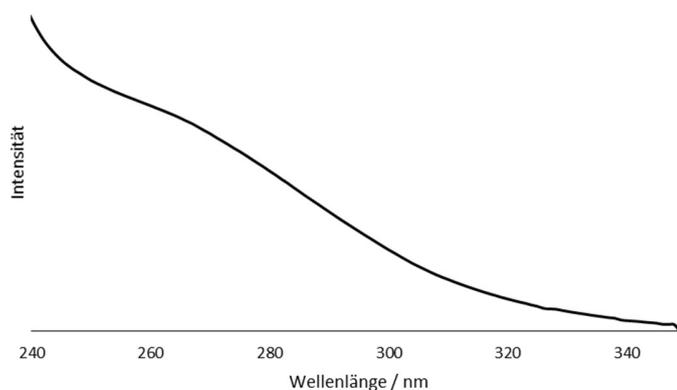


Abbildung 81: UV-Vis-Spektrum von TD-PEG₅₇-PGG₁₂-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln. Die schwache Absorptionsbande zwischen 260 und 300 nm entspricht dem längeren PEG-Teil des verwendeten Polymers.

Nach Aufreinigung wird durch UV-Vis-spektroskopische Messung die charakteristische Bande des PEGs bzw. PGGs die erfolgreiche Anbringung des Polymers bestätigt (*Abbildung 81*). TEM-Aufnahmen zeigen ebenfalls die nicht agglomerierten Partikel in Lösung (*Abbildung 82*). Die so erreichte Dispersion ist über mehrere Wochen (und bis zum aktuellen Zeitpunkt) stabil.

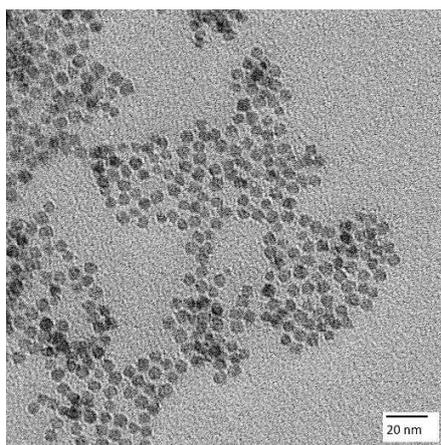


Abbildung 82: TEM-Aufnahme von TD-PEG₅₇-PGG₁₂-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln.

5.2.10 Serumstabilität von C-PEG- und C-PG-funktionalisierten Nanopartikeln

Um die Stabilität der polymerfunktionalisierten Nanopartikel in biologischen Medien zu untersuchen, wurde zunächst hitzeinaktiviertes humanes Blutserum verwendet, welches von einem gesunden Probanden erhalten wurde. Durch die Hitzeinaktivierung ist das Komplementsystem (Immunsystem) nicht mehr aktiv, das heißt eine Opsonisierung ist nicht möglich. In diesem Vortest soll lediglich der Einfluss des Serums selbst auf die Partikelstabilität untersucht werden. In weiteren Tests muss unbehandeltes (nicht-inaktiviertes) Serum verwendet werden um die Effekte des Immunsystems und sonstiger Proteine auf die Partikel aufzuklären. Die Partikel wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Serum gelöst und über einen Zeitraum von 15 Tagen unbewegt beobachtet und Veränderungen dokumentiert. Gleichzeitig wurde per Lichtstreuung (Zetasizer) pro Beobachtungstag eine Messung durchgeführt, die die Bildung von Agglomeraten schneller aufzeigen kann als die rein optische Kontrolle. In *Abbildung 83* sind die Aufnahmen der im Serum gelösten Partikel nach 1, 4, 8, 12 und 15 Tagen gezeigt. Die obere Reihe enthält die mit C-PEG-funktionalisierten MnO-Partikel, die untere entsprechend C-PG-funktionalisierte. Die Aufnahmen zeigen bei C-PEG beschichteten Partikeln keinen Bodensatz mit Ausnahme nach 15 Tagen. Bei den C-PG beschichteten Partikeln ist selbst nach 15 Tagen kein Bodensatz erkennbar. Dies deutet auf eine bessere Löslichkeit von C-PG in Serum hin, was durch die Tatsache, dass C-PG-funktionalisierte Partikel nur bei höheren Ionenstärken löslich sind, unterstützt wird.

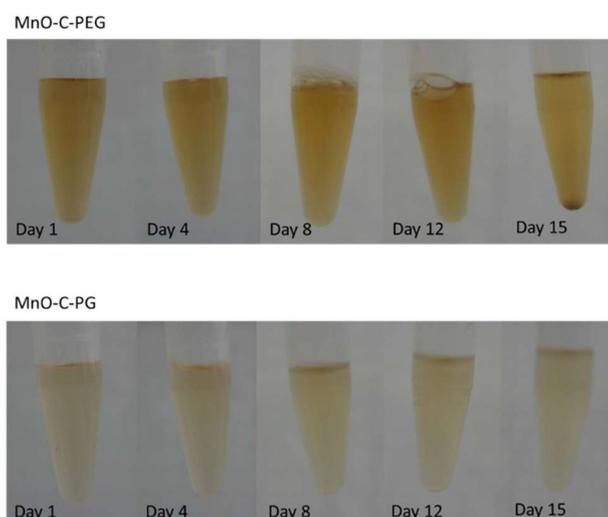


Abbildung 83: Aufnahmen von MnO-C-PEG-funktionalisierten Nanopartikeln (oben) und entsprechenden Partikeln mit C-PG auf der Oberfläche, gelöst in Serum, dokumentiert über einen Zeitraum von 15 Tagen.

Zur Untersuchung auf Agglomerate (per Lichtstreuung) wurde die Probe nach erfolgter Fotoaufnahme in eine Küvette überführt und am Zetasizer vermessen. Da die Partikel in Serum keine symmetrische Größenverteilung aufgrund diverser zusätzlicher Streuzentren aufweisen, wurde jeweils bei einem definierten Wert des errechneten Durchmessers die zugehörige Volumenintensität beobachtet. Über den Zeitraum von 15 Tagen konnten in den DLS-Daten keine Änderungen festgestellt werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Partikel über diesen Zeitraum und für die Messmethode nicht erkennbar agglomerieren.

Es kann somit festgehalten werden, dass die polymerbeschichteten Nanopartikel in hitzeinaktiviertem Blutserum sehr stabil sind. Eine Zirkulationszeit von wenigstens 24 Stunden sollte erreicht werden können. Diese Zeit ist ausreichend für ein *cell targeting* und den Wirkstofftransport. In zukünftigen Experimenten muss die Stabilität in unbehandeltem Serum erfolgen und später Zirkulationszeiten und Organablagerungen *in vivo* bestimmt werden.

5.2.11 Lichtstreuung an C-PEG- und C-PG-funktionalisierten Nanopartikeln

Generell wurden im Rahmen dieser Arbeit die Partikelproben per Elektronenmikroskopie auf deren Form und Agglomerationstendenz untersucht. Allerdings liefert die TEM-Aufnahme wenig Aussage darüber, wie die Partikel in Lösung vorliegen. Gerade Partikel, die einen hydrophilen *capping agent* tragen, wie die in diesem Kapitel verwendeten C-PEGs und C-PGs, bilden in Wasser eine Hydrathülle aus, die den effektiven Durchmesser dieser Partikel größer werden lässt. Um die Ausmaße des gebildeten hydrodynamischen Durchmessers zu bestimmen bietet sich die dynamische Lichtstreuung (DLS) als Methode an. Verglichen mit den TEM-Aufnahmen, die von getrockneten Proben aufgenommen und somit lediglich die Partikelkerne abgebildet werden, können sich einige Nanometer Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden ergeben. Dynamische Lichtstreuung wird für gewöhnlich bei verschiedenen Winkeln der Probe zum eindringenden Lichtstrahl durchgeführt, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen und eine eventuelle Winkelab- oder unabhängigkeit des errechneten Durchmessers zu erhalten. Wird bei nur einem einzigen Winkel gemessen, wie es bei dem hier (hauptsächlich) verwendeten Gerät, einem *Zetasizer ZS Nano*, der Fall ist, werden möglicherweise bestimmte Teile der Probe weniger stark gewichtet. Somit ist der *Zetasizer* kein geeignetes Gerät um Partikeldispersionen ausreichend gut zu charakterisieren, und so tatsächlich die Aussage treffen zu können, dass die jeweiligen Partikel monodispers sind. Daher wird der *Zetasizer* in dieser vorliegenden Arbeit nur verwendet, um Trends zu untersuchen. Beispielsweise ist es interessant, wie der hydrodynamische Durchmesser sich ändert, wenn Polymere verschiedener Längen verwendet werden (um die Partikel wasserlöslich zu machen). Zwei repräsentative Ergebnisse sind in *Abbildung 84* dargestellt. Auffallend ist der große Unterschied des bestimmten Durchmessers der Partikel durch eine TEM-Aufnahme und durch die Lichtstreuung. Selbst das längste verwendete C-PEG₁₂₈-*b*-PGA (6400 g/mol) sollte nicht mehr als 2-3 nm zusätzlich zum Durchmesser beitragen. Allerdings zeigen ca. 19 nm große Partikel mit C-PEG₁₇ in der DLS einen hydrodynamischen Durchmesser von über 50 nm und für C-PEG₁₂₈-*b*-PGA schon knapp über 100 nm (*Abbildung 84*). Dieser Effekt wird in der Literatur ebenfalls für PEG berichtet. ^[81] Xie *et al.* berichten von einem

hydrodynamischen Durchmesser von Dopa-PEG-tragenden Partikeln von 60 bis 80 nm bei verwendeten 11 nm großen Kernen und PEG-Längen zwischen 3000 und 6000 g/mol. Um hier den Zetasizer als mögliche Fehlerquelle zu beseitigen, wurden die Experimente zunächst für C-PEG₁₇-Verwendung an einem Setup zur winkelabhängigen Lichtstreuung wiederholt. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 3* aufgeführt. Erstaunlicherweise sind die Ergebnisse mit denen vom Zetasizer erhaltenen vergleichbar. Die Durchmesser sind noch immer im Bereich von 50 nm, was schließlich für eine sehr große Hülle aus Hydratwasser um die Partikel spricht. Diese bestätigt die außerordentlichen Eigenschaften des PEGs bezüglich Löslichkeit in Wasser und dessen *Stealth*-Eigenschaften.

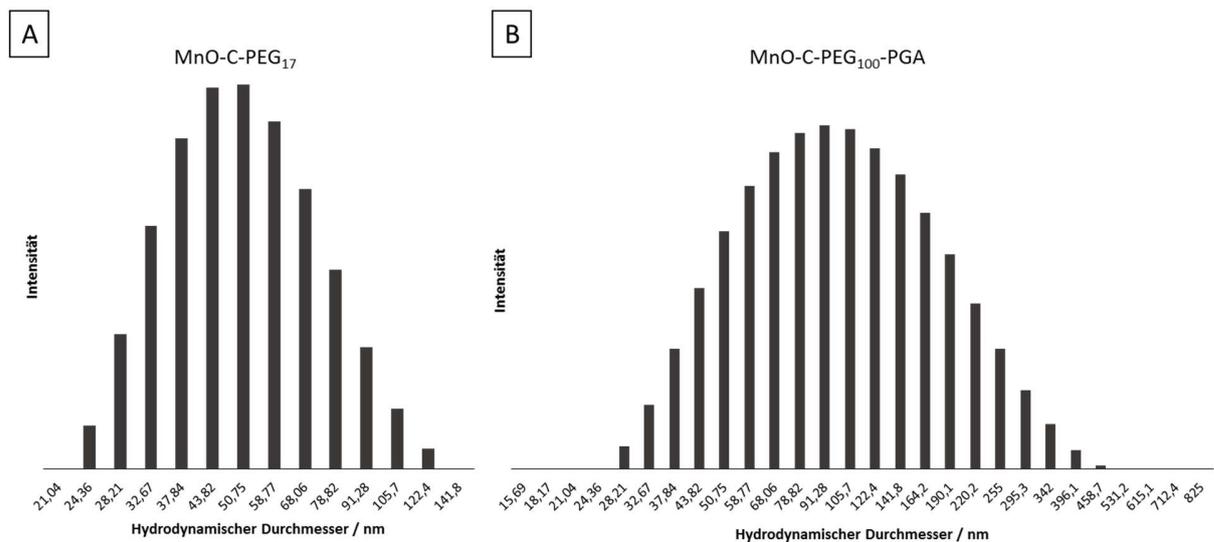


Abbildung 84: Größenverteilung von (A) C-PEG₁₇ und (B) C-PEG_{128-b}-PGA funktionalisierten MnO-Nanopartikeln (Zetasizer).

Tabelle 3: Ergebnisse der winkelabhängigen Lichtstreuung für C-PEG-funktionalisierte MnO-Partikel im Vergleich mit unfunktionalisierten Partikeln.

Probe	Lösungsmittel	Konzentration (g/L)	Filter	D (nm)
MnO	CHCl ₃	1,0	Anotop 20 nm	18
MnO-C-PEG ₁₇	H ₂ O	1,0	GHP 200 nm	50
MnO-C-PEG ₁₇	H ₂ O	1,0	GHP 450 nm	52

Ebenso wurde für C-PG-funktionalisierte Partikel ein Vergleich zwischen Ergebnissen am Zetasizer und an der winkelabhängigen Lichtstreuung gezogen. Auffällig war, dass bei allen Proben, die C-PG-tragende Nanopartikel enthielten, die hydrodynamischen Durchmesser bei Weitem höher lagen, als es zu erwarten gewesen wäre. Selbst verglichen mit den höheren Werten der hydrodynamischen Durchmesser der mit C-PEG beschichteten Partikel waren die Werte bei C-PG deutlich höher. So wurden am Zetasizer für MnO-C-*lin*PG₁₀ Werte um rund 200 nm ermittelt und für das größere C-*lin*PG₂₉ sogar rund 250 nm. Beim hyperverzweigten C-*hb*PG waren die Werte mit rund 290 nm ebenfalls reproduzierbar vergleichsweise hoch. Die Größenverteilungen sind in *Abbildung 85* und *Abbildung 86* gezeigt. Es wird an dieser Stelle vermutet, dass sich die Partikel, wie es auf TEM-Aufnahmen ebenfalls zu interpretieren ist, in kleineren, lockeren Aggregaten vorliegen. Die Tatsache, dass C-PG-funktionalisierte Partikel in entionisiertem Wasser nur sehr kurz stabil dispergiert bleiben und erst durch Erhöhung der Ionenstärke (gesättigte Kochsalzlösung) stabil bleiben, zeigt, dass die Partikel vor Salzzugabe noch größere Aggregate bildeten und diese durch höhere Ionenstärke verringert werden. Dies geschieht aufgrund geringerer Befähigung zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen unter den C-*lin*PG- oder C-*hb*PG-Ketten.

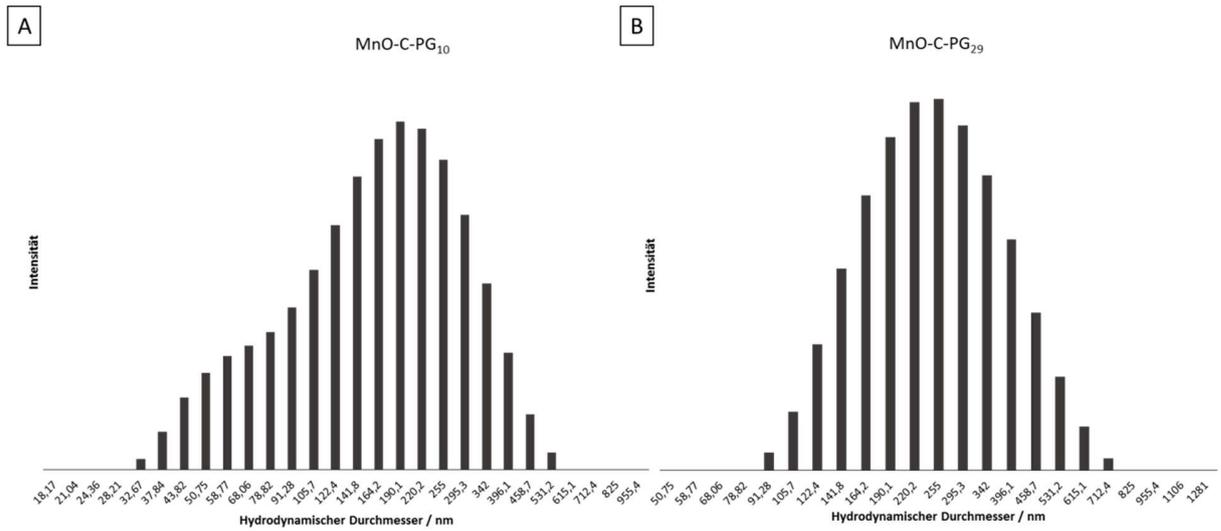


Abbildung 85: Größenverteilung von (A) *C-lin*PG₁₀- und (B) *C-lin*PG₂₉-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln (Zetasizer).

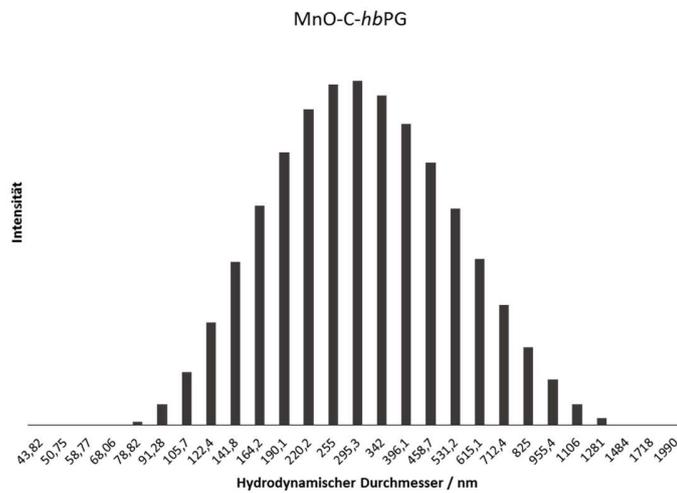


Abbildung 86: Größenverteilung von *C-hb*PG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln (Zetasizer).

Wie auch bei der Verwendung von C-PEG wurde auch bei C-PG-Funktionalisierung die winkelabhängige Lichtstreuung verwendet, um die Werte des Zetasizer zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 4* aufgeführt.

Tabelle 4: Ergebnisse der winkelabhängigen Lichtstreuung für C-PG-funktionalisierte Nanopartikel.

Probe	Lösungsmittel	Konzentration (g/L)	Filter	Dh (nm)
MnO	CHCl ₃	1,0	Anotop 20 nm	18
MnO-C-<i>lin</i>PG₁₀	H ₂ O	10 ⁻²	GHP 200 nm	188
MnO-C-<i>hb</i>PG	H ₂ O	0,25	GHP 200 nm	152

Für C-PG sind die Ergebnisse für die hydrodynamischen Durchmesser ebenfalls im gleichen Bereich erhalten worden, wie durch die Zetasizermessung. Bei der Filtration der C-PG-Partikel tauchen allerdings Probleme auf, weswegen es nicht möglich war, MnO-C-*lin*PG₂₉ zu vermessen. Der Wert für hyperverzweigtes C-*hb*PG liegt hier unter dem für lineares C-*lin*PG₁₀. Da das hyperverzweigte Polymer im Vergleich zum Linearen sich nicht haarartig auf der Partikeloberfläche aufrichtet, sondern eher eine Knäuelstruktur hat, erscheint es logisch, dass der hydrodynamische Durchmesser leicht geringer ist, als der eines linearen Polymers. Verglichen mit den am Zetasizer erhaltenen Werten, bei denen das hyperverzweigte Polymer deutlich größere Durchmesser zeigte, liefern hier die Ergebnisse der winkel-abhängigen Lichtstreuung die plausibleren Daten. Die Theorie der lockeren Aggregation wird somit zwar weiter als Erklärung der erhaltenen Werte angesehen, aber in Zukunft muss nach einem Methodensetup gesucht werden, das die hydrodynamische Hülle von C-PEG- und C-PG-funktionalisierten Partikelsystemen zufriedenstellend aufklären kann. Ebenfalls können jüngste Forschungen zu den Erfassungsgrenzen der Lichtstreuung zeigen, dass die Vermessung einer nicht monodispersen Nanopartikelprobe zu erheblichen Problemen führen kann. ^[103] Durch die starke Streuung von größeren Partikeln oder Agglomeraten können kleinere Partikel bereits nicht mehr oder sehr schlecht detektiert werden. Dieser Effekt tritt schon ab einem Gesamtvolumen von 5% an größeren Partikeln im Gesamtsystem auf. Somit ist es nötig DLS-Messungen von Nanopartikeln kritisch zu

betrachten und die Dispersität der Partikelprobe mit anderen Methoden zusätzlich zu überprüfen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit einer Kombination aus Mikroskopie (TEM), optischer Spektroskopie (UV-Vis) und Lichtstreuung gearbeitet. Erste Versuche, den Ligandenaustausch mit C-PG nicht in dem oben beschriebenen DMF/CHCl₃ Gemisch durchzuführen, sondern in Methanol/CHCl₃ zeigt eine leichte Tendenz zu kleineren Werten für den hydrodynamischen Durchmesser. In Zukunft sollten daher einige Experimente durchgeführt werden, bei denen die Polymerkomponente in Methanol gelöst wird und mit den chloroformgelösten Partikeln zur Reaktion gebracht wird. Es wird vermutet, dass sich durch das DMF oder dessen Verunreinigungen schon vor der Funktionalisierung Agglomerate des Polymers bilden. Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung ist die weitere Erhöhung der Ionenstärke. So könnte zum Beispiel ein Salz zum Einsatz kommen, dessen dissoziiertes Kation höherwertig ist, wie zum Beispiel Magnesium (Mg²⁺).

Die Experimente zur winkelabhängigen Lichtstreuung wurden von Dr. Karl Fischer, Universität Mainz, Institut für Physikalische Chemie, AK Schmidt, durchgeführt.

5.2.12 T_1 -Relaxation von Pt@MnO-C-*lin*PG-Heteropartikeln

Da der hauptsächlich geplante Einsatz der manganoxidhaltigen Partikel in der MRT liegt, wurden Pt@MnO-Partikel auf ihre Fähigkeit getestet, die T_1 -Relaxation zu beschleunigen und damit eine Aufhellung des Schnittbildes an der Stelle der vorliegenden Partikel zu ermöglichen. Funktionalisiert wurde in diesem Fall mit C-*lin*PG zweier Längen, da die T_1 -Relaxation abstandsabhängig von Kontrastmittel ist und eine längere Polymerkette negative Effekte haben könnte. Zum Einsatz kam daher C-*lin*PG₁₀ und C-*lin*PG₂₉. Wie in

Tabelle 5 zu sehen, ist die T_1 -Zeit gegenüber der T_2 -Zeit in beiden Fällen stärker beschleunigt. Ebenfalls ist der Einfluss des längeren Polymers zu erkennen, da beim längeren Polymer eine weniger stark beschleunigte T_1 -Zeit gemessen wurde. Der Unterschied von nur 30 ms ist allerdings sehr gering. Der direkte Vergleich mit Literaturdaten ist schwierig, da hierzu die gleichen Parameter der Messmethode (wie die Stärke des

Magneten, Konzentration, Lösungsmittel, etc.) übereinstimmen müssen. Die hier gezeigten Daten wurden an einem NMR-System mit einem 1,5 T Magneten durchgeführt. In weiteren Experimenten müssen am hier verwendeten System Vergleichsdaten (zum Beispiel von gängigen Iodverbindungen und SPIONs) gewonnen werden und später ebenfalls an klinischen MRT-Systemen getestet werden.

Tabelle 5: T_1 und T_2^* -Relaxationszeiten von Partikel- und Vergleichssystemen.

Partikelprobe	Polymer	Konzentration / mg/mL	T_1 - Relaxationszeit / ms	T_2^* - Relaxationszeit / ms
Pt@MnO	C- <i>lin</i> PG ₁₀	1	220	80
Pt@MnO	C- <i>lin</i> PG ₂₉	1	250	80

5.2.13 HU-Werte von Pt@MnO

Erste Experimente betreffend des Einsatzes der polymerfunktionalisierten Pt@MnO-Partikel in der Computertomographie können hier präsentiert werden. Da prinzipiell die Befähigung der Platinkomponente Röntgenstrahlung zu absorbieren getestet werden sollte, wurde zunächst bei einer einzigen Konzentration der HU-Wert ermittelt (HU für engl.: Hounsfield Units). Auf der HU-Skala ist als Nullpunkt die Röntgenstrahlenabsorption von Wasser definiert. In Folgeexperimenten wird die Konzentrationsabhängigkeit der HU-Werte ermittelt. In *Tabelle 6* ist die erfolgte Messung aufgezeigt. Auch beim Vergleich von CT-Daten ist der Literaturvergleich schwierig aufgrund verschiedener, eventuell nicht reproduzierbarer Parameter. Als Vergleiche wurden hier die heute gebräuchlichen CT-Kontrastmittel Imeron[®] und Ultravist[®] (beides Iodverbindungen) parallel vermessen. Zusätzlich wurde als Vergleichswert eine Au@Fe₃O₄-Heterodimerprobe von Zhu *et al.* aufgeführt.

Tabelle 6: HU-Werte von Partikel- und Vergleichsproben.

Probe	Funktionalisierung	Konzentration / mg/mL	HU-Wert
Pt@MnO	C-PEG ₇₄	0,5	34,43
Imeron [®]	-	30	1692,01
Ultravist [®]	-	30	1307,71
Au@Fe ₃ O ₄ -Dimere ^[104]	TMAOH (Tetramethylammoniumhydroxid)	1	25
Au@Fe ₃ O ₄ -Dimere ^[104]	TMAOH (Tetramethylammoniumhydroxid)	10	390
Au@Fe ₃ O ₄ -Dimere ^[104]	TMAOH (Tetramethylammoniumhydroxid)	30	900

Der geringe HU-Wert für Pt@MnO-Partikel liegt in der niedrigen Konzentration begründet. Verglichen mit der doppelten Konzentration an Au@Fe₃O₄-Partikeln liegt dieser sogar unter dem der platinhaltigen Partikel. Es kann somit vermutet werden, dass nach Aufkonzentration der Pt@MnO-Probe HU-Werte bis 1000 erreicht werden könnten.

Die Messungen erfolgten durch Lisa Haslauer, Universitätsklinikum Jena, Zentrum für Radiologie, AG Hilger.

5.3 Experimenteller Teil

5.3.1 Chemikalien

Die in diesem Kapitel verwendeten Chemikalien sind in Kapitel 8 tabellarisch aufgeführt.

5.3.2 Generelles Aufreinigungsverfahren für polymerbeschichtete Nanopartikel

Um nach beendetem Ligandenaustausch überschüssiges Polymer und sonstige Verunreinigungen abzutrennen, wurden die folgenden Aufreinigungsschritte durchgeführt. Die hydrophilisierten Partikel wurden nach Aufnahme in Ethanol durch die Zugabe des gleichen Volumens an n-Hexan ausgefällt und zentrifugiert (10 min, 9000 rpm). Der klare Überstand wurde verworfen und der Bodensatz unter Verwendung eines Ultraschallbades wieder in Ethanol dispergiert. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt und die Partikel nach dem letzten Abzentrifugieren in Wasser aufgenommen. Hierdurch wird die Abtrennung von freiem, überschüssigem Polymer garantiert.

5.3.3 Vorbereitung von C-PEG, C-PEG-*b*-PGA, Ch-*lin*PG und TD-PEG₅₇-PGG₁₂

Die gereinigten und vakuumgetrockneten Polymere wurden in Chloroform gelöst und die Lösung auf eine Konzentration von 100 mg/mL eingestellt. Vor der weiteren Verwendung musste der pH-Wert geprüft und, falls erforderlich, mit NH₄OH neutralisiert werden. Die Polymerlösung wurde in einem dichten Gefäß bei 4°C gelagert.

5.3.4 Vorbereitung von C-*lin*PG, C-PEG-*hb*PG und C-*hb*PG

Die Polymere wurden in Dimethylformamid gelöst und die Lösung auf eine Konzentration von 100 mg/mL eingestellt. Der pH-Wert wurde überprüft und neutral eingestellt. Die Polymerlösung wurde in einem dichten Gefäß bei 4°C gelagert.

5.3.5 Herstellung C-PEG- und C-PEG-*b*-PGA-funktionalisierter Nanopartikel

Unabhängig von der Länge des Polymers und der verwendeten Partikel (MnO, FePt@MnO, Pt@MnO, FePt@Fe_xO) wurde beim Ansatz zum Ligandenaustausch folgendermaßen vorgegangen: 1,5 mg Partikel und 7,5 mg des Polymers wurden in jeweils 2 mL Chloroform gelöst. Die Hälfte der Polymerlösung wurde im Reaktionsgefäß vorgelegt und die andere Hälfte in eine Spritze aufgezogen. Die Partikellösung wurde komplett in eine zweite Spritze aufgezogen und gleichzeitig mit der Polymerlösung in das Reaktionsgefäß unter Rühren zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über 12 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel bei reduziertem Druck komplett entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL Ethanol aufgenommen und mittels dem oben beschriebenen Verfahren aufgereinigt. Anschließend wurden die Partikel in MilliQ-Wasser aufgenommen und mittels Spritzenfilter (Merck Millipore, Millex-GS; 0,22 µm, MCE Membran) steril filtriert. Für eine Mischung aus C-PEG und C-PEG-*b*-PGA wurde die Gesamtmasse des Polymers aus den beiden zu verwendenden Polymeren vor der Synthese im erforderlichen Verhältnis hergestellt.

5.3.6 Herstellung C-*lin*PG und C-*hb*PG-funktionalisierter Nanopartikel

Unabhängig von der Länge des Polymers und der verwendeten Partikel (MnO, FePt@MnO, Pt@MnO, FePt@Fe_xO) wurde beim Ansatz zum Ligandenaustausch folgendermaßen vorgegangen: 1,5 mg Partikel wurden in 2 mL Chloroform und 7,5 mg des Polymers in 2 mL DMF gelöst. Die Hälfte der Polymerlösung wurde im Reaktionsgefäß vorgelegt und die andere Hälfte in eine Spritze aufgezogen. Die Partikellösung wurde komplett in eine zweite Spritze aufgezogen und gleichzeitig mit der Polymerlösung in das Reaktionsgefäß unter

Rühren zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über 12 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel bei reduziertem Druck komplett entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL Ethanol aufgenommen und mittels dem oben beschriebenen Verfahren aufgereinigt. Anschließend wurden die Partikel in MilliQ-Wasser aufgenommen und mittels Spritzenfilter (Merck Millipore, Millex-GS; 0,22 µm, MCE Membran) steril filtriert.

5.3.7 Herstellung Dopa-PEG-funktionalisierter Nanopartikel

Zur Funktionalisierung mit Dopa-PEG wurden 30 mg einer Nanopartikelprobe in 100 mL Chloroform und die dreifache Menge des Polymers in weiteren 100 mL Chloroform gelöst. Die Hälfte der Polymerlösung wurde in einem Kolben vorgelegt, die andere Hälfte zusammen mit den Nanopartikeln langsam zugetropft und über Nacht gerührt. Danach wurde die Lösung auf etwa 20 mL mittels Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend ein Gemisch aus 33 mL Hexan und 33 mL H₂O zugetropft und 30 min gerührt. Weiterhin wurde die wässrige Phase des zweiphasigen Gemischs mittels Scheidetrichter entfernt und die organische Phase zweimal mit 10 mL H₂O extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden am Rotationsverdampfer auf ca. 10 mL eingeeengt und mittels Spritzenfilter (Merck Millipore, Millex-GS; 0,22 µm, MCE Membran) steril filtriert.

5.3.8 Herstellung Ch-*lin*PG und TD-PEG₅₇-PGG₁₂ funktionalisierter Nanopartikel

Als Vorbereitung der Partikel wurden diese dreimal zusätzlich zum schon erfolgten Aufreinigungsverfahren ausgefällt und redispergiert um die Ligandenhülle aus Ölsäure leicht zu schwächen. Nach beendeter Vorbereitung wurde 1 mg der Partikel gelöst und 5 mg des zu verwendenden Polymers in jeweils 2 mL Chloroform gelöst und langsam vereinigt. Die erhaltene Dispersion wurde unter Rühren langsam auf ca. 75°C erwärmt bei dieser Temperatur für 2 h belassen. Nach beendeter Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel vollständig am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand in Ethanol

dispergiert. Nach erfolgten Aufreinigungsschritten (Standardverfahren) wurde der Rückstand in gesättigter Kochsalzlösung dispergiert.

5.3.9 Herstellung Silica-funktionalisierter Nanopartikel

Zur Herstellung von Silica-ummantelten Nanopartikeln wurden 10 mg Partikel in 1 mL Cyclohexan gelöst und zu einer Lösung von 2 g Igepal in 35 mL Cyclohexan zugegeben. Zur Lösung wurden 150 μL NH_4OH zugetropft, um eine Mikroemulsion zu bilden. Zur Emulsion wurden 150 μL TEOS gegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wurden 128 μL PEG-TES zugesetzt und die nach ca. 2 h ausfallenden Partikel abzentrifugiert und aufgereinigt (Standardverfahren). Um eine Farbstoffmarkierung zu erhalten, wurde der betreffende Farbstoff zusammen mit TEOS zugegeben. Die Partikel wurden nach der Aufreinigung mittels Spritzenfilter (Merck Millipore, Millex-GS; 0,22 μm , MCE Membran) steril filtriert.

5.3.10 Herstellung C-PEG-*hb*PG-funktionalisierter Nanopartikel und Nanodrähte

1,5 mg Partikel (MnO -Partikel oder Pt@MnO -Nanodrähte) wurden in 2 mL Chloroform und 7,5 mg des Polymers in 2 mL Methanol gelöst. Die Hälfte der Polymerlösung wurde im Reaktionsgefäß vorgelegt und die andere Hälfte in eine Spritze aufgezogen. Die Partikellösung wurde komplett in eine zweite Spritze aufgezogen und gleichzeitig mit der Polymerlösung in das Reaktionsgefäß unter Rühren zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über 12 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel bei reduziertem Druck komplett entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL Ethanol aufgenommen und mittels dem oben beschriebenen Verfahren aufgereinigt.

5.3.11 Herstellung MnO-C-PEG-*hb*PG-SiO₂ und Pt@MnO-Ketten-C-PEG-*hb*PG-SiO₂

Zur Anbindung einer C-PEG-*hb*PG-funktionalisierten Partikelprobe auf eine Silicaschicht wurde wie folgt vorgegangen: Die Silicaschicht wurde mittels einer von Natalio *et al.* berichteten Methode chloridfunktionalisiert. ^[105] 100 mg Silicapartikel wurden mit einem Gemisch aus 20 mL Thionylchlorid und 1 mL wasserfreiem DMF bei 70°C über 24 h behandelt. Nach beendeter Reaktion wurden die Partikel durch Zentrifugation (10 min, 9000 rpm) vom gelben Überstand entfernt und zweimal mit wasserfreiem THF redispersiert und zentrifugiert. Die erhaltenen chloridfunktionalisierten Partikel wurden unter Argon bei 4°C aufbewahrt. Zur Weiterverwendung wurden 1 mg der C-PEG-*hb*PG-funktionalisierte Partikel zusammen mit 1 mg der chloridfunktionalisierten SiO₂-Partikel in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Chloroform vereint und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Dispersion zentrifugiert (5 min, 9000 rpm), der farblose Überstand verworfen und die leicht braune Partikelmasse erhalten. Die Partikel wurden in Ethanol redispersiert und unter Anwendung des Standardverfahrens aufgereinigt.

5.3.12 Antikörperbindung an C-PEG-*b*-PGA-funktionalisierte NP

Für die Bindung eines Antikörpers an aminofunktionalisierte Nanopartikel wurden 0,5 mg Partikel in 1 mL Wasser dispersiert, steril filtriert und mit 1 mL einer 0,5 mg/mL Lösung des zu verwendenden Antikörpers oder dessen Isotyps vermischt. Zur Lösung wurden 12 µL einer 1 mg/mL EDC-Lösung, 7 µL einer 1 mg/mL NHS-Lösung und 500 µL Ethanol gegeben. Das Gemisch wurde für 12 h bei 15°C auf einem Schüttler belassen bevor die Aufreinigung erfolgte.

5.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden mit den catecholinitiierten Polymeren C-PEG, C-*lin*PG und C-*hb*PG neue, effektive *coatings* vorgestellt um metallische Nanopartikel stabil im wässrigen Medium zu dispergieren. Elektronenmikroskopische Daten, kombiniert mit dynamischer Lichtstreuung haben ergeben, dass die funktionalisierten Partikel langzeitstabil und größtenteils nicht agglomeriert vorliegen. Weitere Funktionalisierungen, wie die Einlagerung eines amphiphilen Polymers in die hydrophobe Ligandenschicht eines Partikels führten ebenfalls zur erfolgreichen Partikeldispersion in polaren Medien. Als interessante Variante der Nutzung von catecholinitiierten Polymeren wurde eine Anbindung von MnO-Partikeln sowie Pt@MnO-Ketten an Silicananopartikel per Polymerlinker gezeigt. Die erhaltenen Strukturen können in Zukunft für ein verbessertes *cell targeting* (MnO an Silica) oder für nanopartikuläre Katalysatoren (Pt@MnO-Ketten an Silica) verwendet werden. Die biomedizinische Anwendung in der Krebsimmuntherapie wurde mit ersten, Polymer und Antikörper funktionalisierten Heterodimeren gezeigt: FACS-Analysen gaben Hinweise auf ein gerichtetes *targeting* auf dendritische Zellen. Die metallischen Partikelkerne wurden auf ihre Einsetzbarkeit in der MRT, CT und PET getestet. Für MRT und CT wurden erste Werte für die Kontrastverstärkung (T_1 -Relaxation; HU-Werte) gezeigt, für die PET konnte eine erfolgreiche ⁶⁸Gallium-Markierung mit vorheriger Chelatorkopplung an die Partikel berichtet werden. In weiteren Studien soll verstärkt die Aufklärung der hydrodynamischen Hülle der polymerfunktionalisierten Partikel per Lichtstreuung erfolgen, da hier noch Erklärungsbedarf besteht. Allgemein kann aus den Experimenten zur Biofunktionalisierung von Nanopartikeln gefolgert werden, dass der Einsatz von catecholinitiierten Polymeren zu hochgradig stabilen Dispersionen führt und der weitere Einsatz im *cell targeting* und der Krebsimmuntherapie lohnenswert ist.

Kapitel 6

Toxizität von biofunktionalisierten Nanopartikeln

6.1 Theorie

6.1.1 Einführung

Der Begriff Toxizität (aus dem altgriechischen von *toxikón* abgeleitet: Pfeil(gift)) bedeutet Giftigkeit einer Substanz und ist immer unter Angabe einer Konzentration zu verwenden. Viele Substanzen sind in geringen Konzentrationen essentiell für den Organismus, höher konzentriert jedoch stark toxisch. In diesem Kapitel werden die in Kapitel 5 erfolgreich funktionalisierten Nanopartikelsysteme auf ihre toxische Wirkung getestet. Hierfür wurden Tests an einer Zellkultur durchgeführt, die über ein gebräuchliches „Viabilitäts-Assay“ Aussage darüber geben, bei welcher Konzentration die betreffenden Nanopartikel cytotoxisch auf die behandelten Zellen wirken. Im Folgenden werden zunächst die möglichen toxischen Effekte, die für Nanopartikel bekannt sind, diskutiert.

6.1.2 Toxizität von Nanopartikeln

Neben den größenabhängigen toxischen Effekten durch Inhalation oder Aufnahme von Nanopartikeln über die Haut wird in diesem Kapitel nur die Toxikologie *in vitro*, also in der Zellkultur diskutiert, anhand derer abgeschätzt werden kann, wie sich eine Partikelprobe *in vivo* auf die Viabilität des Organismus auswirkt. Da heute nicht ausreichend geklärt ist, welchen Weg ein Nanopartikel im Organismus nimmt, bevor und nachdem die Wirkstoffabgabe erledigt oder eine tomographische Untersuchung erfolgte, muss zunächst außerhalb des Organismus eine erste Einschätzung der Giftigkeit gewonnen werden. Bekannte intrazelluläre toxische Effekte sind beispielsweise die Fenton-Reaktion, die wie schon in Kapitel 3 erwähnt, auch gezielt eingesetzt werden kann. Bei einem aktiven oder passiven *cell targeting* lagern sich in diesem Fall eisenhaltige Nanopartikel im betreffenden Gewebe ab und geben durch Auflösung im Lysosom der Zelle Eisenionen an das Cytosol ab. Hier können reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die den oxidativen Stress auf die Zelle erhöhen. Allgemein liegt bei der Verwendung von metalloxidischen, aber auch edelmetallischen Nanopartikeln die Gefahr vor, dass die Metallionen oder Metallatome aus dem Partikel herausgelöst werden und das empfindliche intra- und extrazelluläre Gleichgewicht stören. Hier ist besonders die komplizierte Aufrechterhaltung der verschiedenen Membranpotentiale der Zelle zu nennen, über welche die Ionenkanäle und Ionenpumpen gesteuert werden. Edelmetalle können ihrerseits auch schädigende Wirkungen haben. Beispielsweise von Platin ist die DNA schädigende Wirkung bekannt.^[39] Besonders Partikel, die Schwermetalle enthalten, sind prädestiniert dafür Vergiftungserscheinungen zu induzieren. Um dies möglichst gut zu verhindern, ist die Erschaffung einer Art dichten „Tarnkappe“ um das Partikel durch biokompatible Liganden nötig, was eine wichtige Aufgabe der in Kapitel 5 vorgestellten Biofunktionalisierung ist. Im Idealfall sind die Nanopartikel so effektiv zu bedecken, dass sie aus dem Organismus ausgeschieden werden ohne toxische Effekte bewirkt zu haben. Diese angestrebte Eigenart wird unter anderem in der Diskussion um den Begriff des *stealth effects* genannt.^[27] Zusätzlich wird durch diesen Effekt aber auch ein Schutz des Partikels vor dem Organismus erzielt, da die Oberflächenfunktionalisierung dafür sorgen soll, dass die Partikel nicht vom Komplement-

system des Körpers erkannt werden und der Opsonisierung unterliegen (siehe Kapitel 2). Die hier verwendeten Nanopartikel enthalten größtenteils Manganoxid. Zwar ist Mangan ein essentielles Element für den Organismus, so zum Beispiel in der Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD) zu finden, doch ist es nur in geringen Mengen vom Körper tolerierbar und muss daher in nanopartikulärer Form besonders effektiv geschützt werden. Ebenfalls würde Eisen und Platin als Partikelmaterial in den Körper eingebracht, die oben erwähnten toxischen Effekte gilt es somit ebenfalls zu unterdrücken.

6.1.3 Die getesteten Nanopartikelsysteme

Die Funktionalisierung, die diese Effektivität erreichen soll, ist die der catecholhaltigen Polymere wie C-PEG und C-*lin*PG. Es soll verglichen werden wie gut beide Polymere geeignet sind Partikel zu funktionalisieren und durch diese die Viabilität unbeeinflusst zu lassen. Hierbei wird auf Ergebnisse von Kerstin Koll Bezug genommen und die durch NP-C-PEG/C-PG erreichten Werte mit denen von Dopa-PEG funktionalisierten Partikeln verglichen. ^[82] Zusätzlich werden die verschiedenen Polymerlängen miteinander verglichen und der Einfluss der Menge des eingesetzten Polymers pro mg Partikel auf die Toxizität berichtet. Neben den MnO-Partikeln selbst werden in diesem Kapitel ebenfalls die Heterodimere FePt@Fe_xO und Pt@MnO auf ihre toxischen Effekte untersucht. Wie in Kapitel 5 erwähnt, ist es möglich FePt-Partikel mit catecholhaltigen Polymeren anzusteuern und somit einen zwar relativ ineffektiven aber doch hydrophilisierend wirkenden *capping agent* auf diese Partikel anzubringen. Hier soll untersucht werden, ob ein Unterschied in der Toxizität von Platin und FePt, durch die theoretisch komplette Bedeckung der FePt@Fe_xO-Dimere mit Catecholpolymer im Gegensatz zu den Pt@MnO-Dimeren, beim Vergleich der beiden Heterodimere auftaucht. Da bei Pt@MnO-Dimeren die Toxizität theoretisch auch von MnO kommen kann, wird vorher durch entsprechende Tests die Biokompatibilität sphärischer MnO-C-PEG und -C-*lin*PG Partikel abgeklärt.

6.1.4 Verwendete Zelllinie

Die verwendeten Zellen für die Zellkulturversuche stammten von einer *Humane Niere Klarzell-Karzinom Zell-Linie* (CaKi-1), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. Langguth, Universität Mainz. Es handelt sich um eine immortalisierte Zelllinie, die in Cytotoxizitätsassays häufig Anwendung findet.^[106]

6.2 Ergebnisse und Diskussion

6.2.1 Zellkultur

Die CaKi-1-Zellen wurden in McCoys 5A Medium kultiviert und wöchentlich gesplittet. Die Zellkultur wurde in den Passagen 4 bis 25 verwendet, in denen keine Morphologieänderung der Zellen festgestellt werden konnte. Repräsentativ ist in *Abbildung 87* eine lichtmikroskopische Aufnahme der Zellkultur gezeigt. Die adhärennten Zellen teilen sich im Schnitt einmal in 24 h und bilden so über einen bestimmten Zeitraum einen Zellrasen aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zelllinie bis zu 90-prozentiger Konfluenz kultiviert, gesplittet und wieder neu ausgesät. Zum Bearbeiten der Kultur und der verwendeten Medien wurde in einer Sterilbank gearbeitet, die eine möglichst keimfreie Umgebung garantiert.

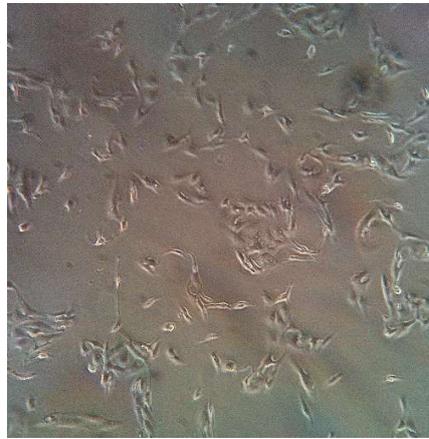


Abbildung 87: Mikroskopische Aufnahme der Zellkultur 24 h nach dem Aussähen. Die Zellen wachsen adhärent und fangen an einen „Zellrasen“ zu bilden.

6.2.2 Viabilitätsassays

Die Viabilitätsassays wurden in einer 96-*well*-Platte durchgeführt und dabei eine Anfangszellzahl von 15000 pro *well* ausgesät. Um Information über die Zellviabilität zu erlangen wird die Fähigkeit der lebenden Zellen ausgenutzt ein bestimmtes Molekül mitochondrial zu einem Farbstoff abzubauen. Je mehr Zellen überleben, desto höher ist die Farbstoffproduktion. Per UV-Vis- oder Fluoreszenzspektroskopie wird im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen die prozentuale Viabilität berechnet. Um eine statistische Aussage über die Ergebnisse treffen zu können, wurden alle getesteten Konzentrationen einer Probe pro Versuch in drei verschiedenen *wells* aufgetragen und aus den daraus erhaltenen Daten ein Mittelwert gebildet. Zusätzlich wurde der Versuch mehrfach wiederholt ($n=3$) und ebenfalls ein Mittelwert gebildet. Dieser Wert wird in den in diesem Kapitel vorgestellten Diagrammen zur Viabilität gezeigt.

6.2.2.1 AlamarBlue[®]-Assay

In dieser Arbeit wurde zur Aufklärung der Viabilität ein AlamarBlue[®]-Assay durchgeführt, bei dem die Zellen das Molekül Resazurin zu dem rot fluoreszierenden Resorufin abbauen.

Für den Abbau, eine Reduktion des Farbstoffes, ist NADH/H⁺ nötig, was durch den Stoffwechsel der lebenden Zelle entsteht. Je weniger Fluoreszenz nach beendeter Inkubationszeit detektiert wird, desto weniger Zellen haben noch aktiven Stoffwechsel. Resazurin und Resorufin werden selbst als nicht-toxisch eingestuft, was die Verwendung als Marker für die Viabilität von Zellkulturen idealisiert. ^[107] Nach erfolgter Zugabe und beendeter Inkubationszeit kann auf einem Fluoreszenzspektrometer über 560EX nm/590EM nm Filter die Fluoreszenz gemessen werden. Alternativ kann die Erfassung der Absorption an einem UV-Vis-Spektrometer bei 570 nm erfolgen.

6.2.3 Toxizität von MnO-Dopa-PEG

Um die Verwendung der neu entwickelten, catecholinitiierten Polymere mit den vorher verwendeten dopaminhaltigen Polymeren (Dopa-PEG) in Hinsicht auf die Toxizität der funktionalisierten Partikel vergleichen zu können, wurden MnO-Nanopartikel mit Dopa-PEG funktionalisiert und das Ergebnis in *Abbildung 88* dargestellt. Die betreffende Probe zeigt zwar bei 50 µg/mL einen geringen Rückgang der Viabilität (ca. 75%), doch zeigen die Konzentrationen von 25 und 100 µg/mL keinerlei Beeinflussung. Es ist zu vermuten, dass bei der mittleren Konzentration ein Artefakt ein falsch-negatives Ergebnis zeigt bzw. relativiert der hohe Fehlerindikator das negative Ergebnis.

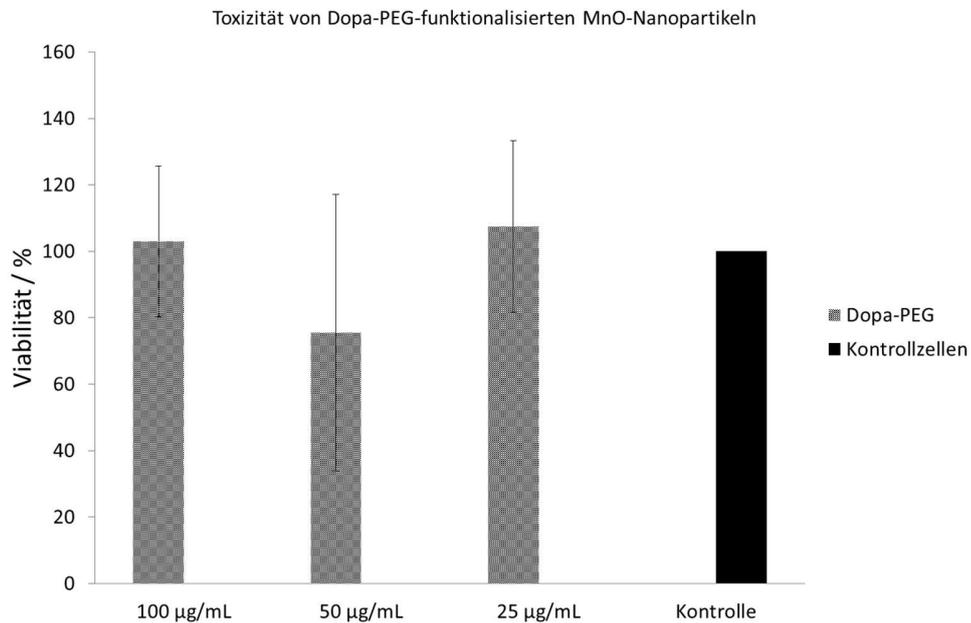


Abbildung 88: Viabilitätsassay (AlamarBlue[®]) von Dopa-PEG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln in drei Konzentrationen.

6.2.4 Toxizität der Polymere

Bevor die einzelnen Partikel auf ihre toxischen Effekte untersucht werden konnten, musste zunächst die Toxizität der Polymere selbst aufgeklärt werden. Hierzu wurden die betreffenden Proben von ihrem Lösungsmittel befreit. Die im Argonstrom getrocknete Probe wurde dann unter Einstellung der zu testenden Konzentrationen in MilliQ-Wasser gelöst und steril filtriert (Merck Millipore, Millex-GS; 0,22 µm, MCE Membran). Die erhaltene Viabilität nach 24 h Inkubation auf der Zellkultur ist in *Abbildung 89* dargestellt.

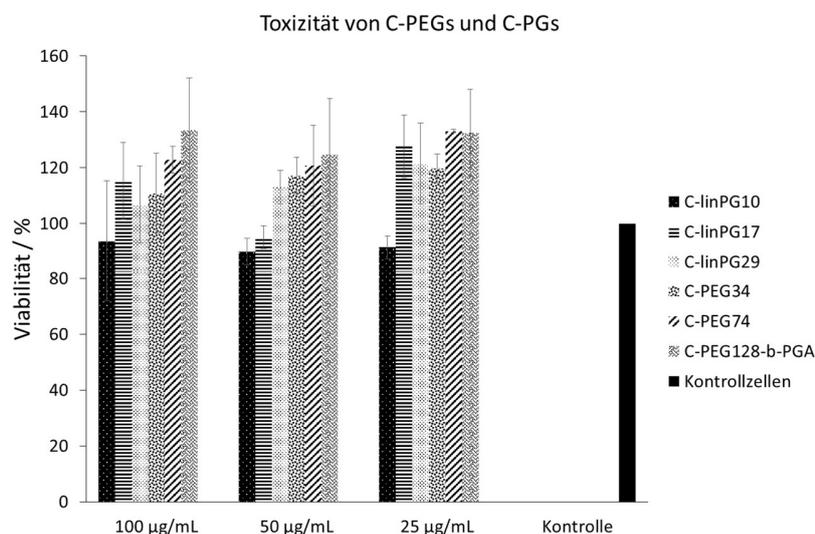


Abbildung 89: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von den unterschiedlichen Längen der Polymere in drei Konzentrationen. Bis auf das C-*lin*PG₁₀ (90% Viabilität) gibt es keine negativen Einflüsse auf das Zellwachstum.

Die Viabilitäten, die für die C-*lin*PG-Proben erhalten wurden, liegen leicht unter denen für C-PEG. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die C-PG Moleküle nicht sauber vom verwendeten Lösungsmittel DMF trennbar sind. Durch die hohe Zahl an Hydroxylgruppen haben die Polymere eine größere Tendenz sich zusammenzulagern (kleben) und können so eventuell kleine Lösungsmittelreste eingeschlossen haben. Die prozentualen Werte der ermittelten Viabilitäten zeigen bei allen Polymeren außer C-*lin*PG₁₀ eine eher wachstumsanregende Wirkung auf die Zellen, als einen toxischen Effekt. Trotzdem liegt die ermittelte Viabilität für die C-*lin*PG₁₀ behandelten Zellen über 90%, wodurch auch hier nicht von einem toxischen Einfluss gesprochen werden kann. Die Polymere sind demnach, wie prognostiziert und literaturbekannt, absolut biokompatibel.

6.2.5 Einfluss der Polymermenge auf die Toxizität

In einem weiteren Vorversuch wurde ermittelt in welchem Verhältnis zur Partikelmasse die des verwendeten Polymers stehen muss, um keine toxischen Effekte zu erzielen. Wie in

Kapitel 5 erwähnt, reichte bereits ein Partikel zu Polymer Verhältnis von 1:2 in der Synthese aus, um die Partikel stabil in wässrige Lösung zu überführen. Dies galt für alle verwendeten C-PEG- und C-PG- Polymere. Weitere Verhältnisse wie 1:3,5 und 1:5 wurden auf die toxischen Auswirkungen getestet. Die Ergebnisse von allen Polymeren waren miteinander vergleichbar, daher werden in *Abbildung 90* repräsentativ die Werte gezeigt, die für C-*lin*PG₂₉-funktionalisierte MnO-Partikel ermittelt wurden.

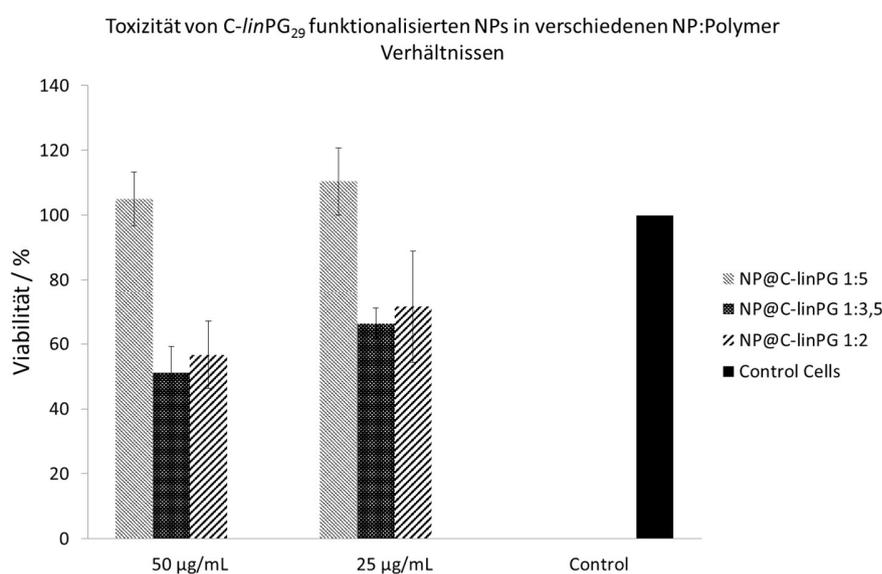


Abbildung 90: Viabilitätsassay (AlamarBlue[®]) von MnO-Nanopartikeln in zwei Konzentrationen, funktionalisiert mit C-*lin*PG₂₉ in verschiedenen NP:Polymer-Verhältnissen.

Anhand der ermittelten Daten kann davon ausgegangen werden, dass bei der Funktionalisierung der Partikel mit jeglichem Catecholverpolymer ein Verhältnis Nanopartikel zu Polymer von 1:5 vorliegen sollte, um bei Konzentrationen bis zu 50 µg/mL eine möglichst hohe Biokompatibilität zu erzeugen. Bei kleineren Verhältnissen ist eine signifikante Reduktion der Viabilität (bis auf 50%) zu verzeichnen. Die Werte beschreiben keine drastische Toxizität, doch es wird deutlich, dass die Biokompatibilität der Partikel beeinflusst wird durch das verwendete Verhältnis. Aus diesem Grund sind alle im Folgenden vorgestellten Partikel-systeme im 1:5 Verhältnis funktionalisiert worden.

6.2.6 Toxizität von C-PEG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln

Im Weiteren wird der Einfluss von C-PEG-funktionalisierten Partikeln auf die Viabilität erörtert. Die verwendeten Partikel waren hierzu zunächst isotrope MnO-Partikel, da hier kein störender Einfluss einer weiteren Domäne vorliegt und die ermittelte Toxizität größtenteils auf Manganoxid zurückzuführen ist. In *Abbildung 91* ist die Verwendung von verschiedenen Längen der Polymere C-PEG und einer Probe mit C-PEG-*b*-PGA dargestellt.

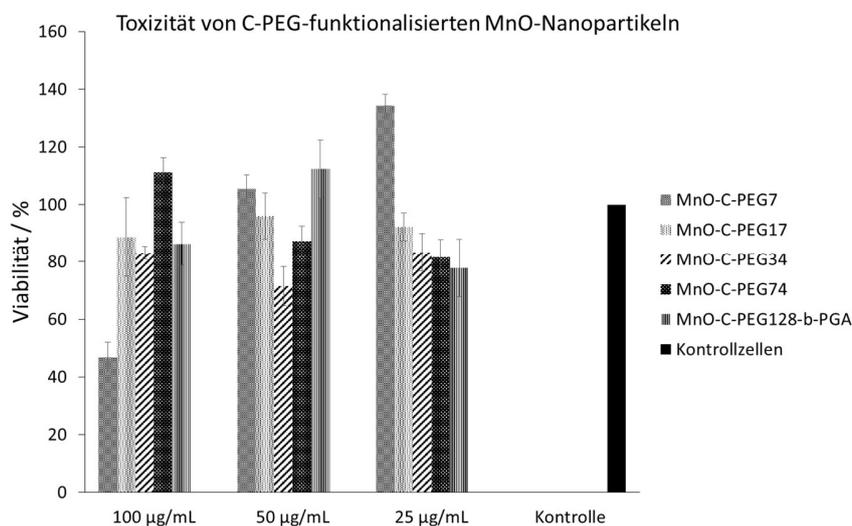


Abbildung 91: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von MnO-Nanopartikeln in drei Konzentrationen, funktionalisiert mit C-PEG in vier verschiedenen Längen und C-PEG-*b*-PGA.

Die Verwendung verschiedener C-PEG-Längen und des C-PEG-*b*-PGA zeigt in der Betrachtung der Viabilität keine eindeutigen Trends. So ist für das kleinste C-PEG (mit sieben Einheiten) bei einer Konzentration von 100 µg/mL eine bedeutende Toxizität zu erkennen, da die Viabilität verglichen mit den Kontrollzellen bei unter 50% liegt. Allerdings zeigt dieses Polymer bei den beiden Konzentrationen von 50, bzw. 25 µg/mL mit die besten Viabilitäten verglichen mit den anderen Polymeren. Schon für C-PEG₁₇ liegt die Viabilität für alle getesteten Konzentrationen bei rund 90%.

Insgesamt kann zu C-PEG-Funktionalisierungen gesagt werden, dass alle Proben bei Konzentrationen von 25 oder 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keine stark toxischen Einflüsse auf die Viabilität haben. Daher wird die Funktionalisierung mit catecholinitiierten Polymeren als ausreichend biokompatibel angesehen.

6.2.7 Toxizität von C-*lin*PG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln

Die gleichen Partikel, die für die C-PEG-Funktionalisierung verwendet wurden, kamen zum Einsatz um die drei C-*lin*PG-Polymere auf ihre Einsatzfähigkeit zu testen die Partikel biokompatibel zu umhüllen. Zu erwarten ist eine Vergleichbarkeit von PEG und PG, da das Grundgerüst ähnlich ist. In *Abbildung 92* ist das Diagramm zum entsprechenden Viabilitätsassay abgebildet. Im direkten Vergleich mit C-PEG-funktionalisierten MnO-Partikeln ist klarer zu erkennen, dass höhere Konzentrationen einen stärkeren, toxischen Einfluss haben. So ergibt die Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für alle drei verwendeten C-*lin*PGs einen Verlust der Viabilität. Zwar liegen die Werte für C-*lin*PG₁₀ und C-*lin*PG₁₇-funktionalisierte Partikel immer noch bei über 70%, aber das längste C-*lin*PG₂₉ zeigt schon Werte von unter 40%. Dies könnte mit der Tendenz des C-PGs leichte Partikel-Agglomerate zu bilden, wie in Kapitel 5 beschrieben, zusammenhängen. Ein längeres Polyglycerol scheint diese Tendenz zu verstärken und dies resultiert in einer gesteigerten Toxizität der funktionalisierten Partikel. Wie sich genau Agglomerate negativ auf die Zellviabilität auswirken ist nicht völlig klar. Vorgeschlagen wird eine mögliche Blockierung der Zellatmung, aufgrund zu großer Ablagerungen auf der Zelle oder mechanische Zerstörung beim Prozess der Internalisierung. Generell kann auch hier gefolgert werden, dass der Einsatz von C-*lin*PG bei Konzentrationen bis zu 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ als biokompatibel angesehen werden kann.

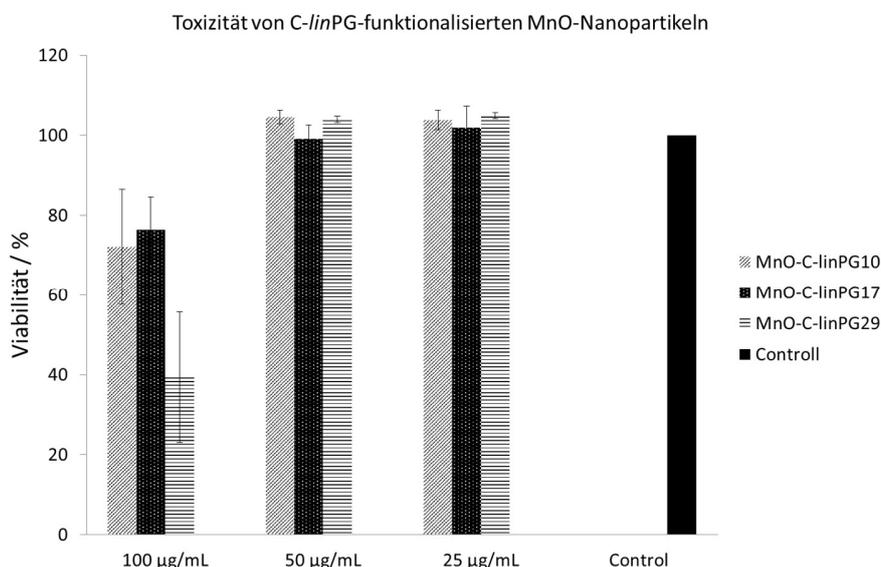


Abbildung 92: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von MnO-Nanopartikeln in drei Konzentrationen, funktionalisiert mit drei verschiedenen C-linPG-Polymeren.

6.2.8 Toxizität von Heterodimeren

Zur Aufklärung der toxischen Effekte der zweiten Domäne eines Heteropartikels wurden FePt@Fe_xO-Partikel mit C-PEG-Varianten funktionalisiert und mit Pt@MnO-C-linPG-Partikeln verglichen. In *Abbildung 93* ist die Viabilität der FePt@Fe_xO gezeigt. Eine Toxizität für die Verwendung von C-PEG₇₄ war wie zu erwarten bei einer Konzentration von 25 µg/mL nicht vorhanden, allerdings wurden für die beiden höheren Konzentrationen nur noch Viabilitäten von knapp 70% für 50 µg/mL, bzw. 55% für 100 µg/mL aufgezeichnet. Dies könnte durch die freiliegende FePt-Domäne verursacht sein. Da allerdings die Catecholfunktion befähigt ist die zu 50% im FePt vorhandenen Eisenatome zu komplexieren, kann argumentiert werden, dass dadurch die Toxizität nicht noch weiter steigt. Dies kann durch zwei Argumente unterstützt werden. Die zweite Probe in *Abbildung 93* war FePt@Fe_xO funktionalisiert mit C-PEG_{128-b}-PGA. Auffällig ist, dass sich die Viabilität konzentrations-unabhängig verhält und bei knapp 130% für alle drei Konzentrationen liegt. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Polymere wie oben

beschrieben auf der FePt- und der Eisenoxidseite binden und zusätzlich ein Teil des Polymers mit der Aminofunktion an die Platinatome im FePt bindet. Damit wären die Partikel vollständig benetzt und ein *stealth effect* wäre erschaffen. Das zweite Argument für eine teilweise besetzte FePt-Domäne wird durch die Messung der Viabilität von C-*lin*PG-funktionalisierten Pt@MnO-Partikeln unterstützt (*Abbildung 94*). Da hier keine Eisenatome vorhanden sind, kann das Catecholpolymer nicht an die platinhaltige Domäne binden, die somit vollkommen frei liegen sollte. Die ermittelte Viabilität unterstützt diese These. Schon bei einer Konzentration von 50 µg/mL fällt diese auf rund 50% für die beiden kürzeren C-*lin*PGs. Lediglich das längste (C-*lin*PG₂₉) erzielt noch einen Wert um 75%. Bei einer Konzentration von 100 µg/mL wird für alle drei Polymerlängen eine Viabilität der Zellen von unter 10% festgestellt. Allerdings ist der direkte Vergleich der beiden Heterodimere kritisch zu betrachten, da sowohl das Partikelmaterial, als auch die Art des zum Einsatz gekommenen Polymers verschieden ist. Die erhaltenen toxischen Effekte können somit auch einen anderen Ursprung als den soeben diskutierten haben. In zukünftigen Experimenten muss eine genaue Gegenüberstellung von Pt@MnO und FePt@MnO statt FePt@Fe_xO erfolgen, funktionalisiert mit derselben Polymerart und -zusammensetzung. Mit einem solchen Experiment kann weitere Aufklärung zu den hier gefundenen toxischen Effekten betrieben werden.

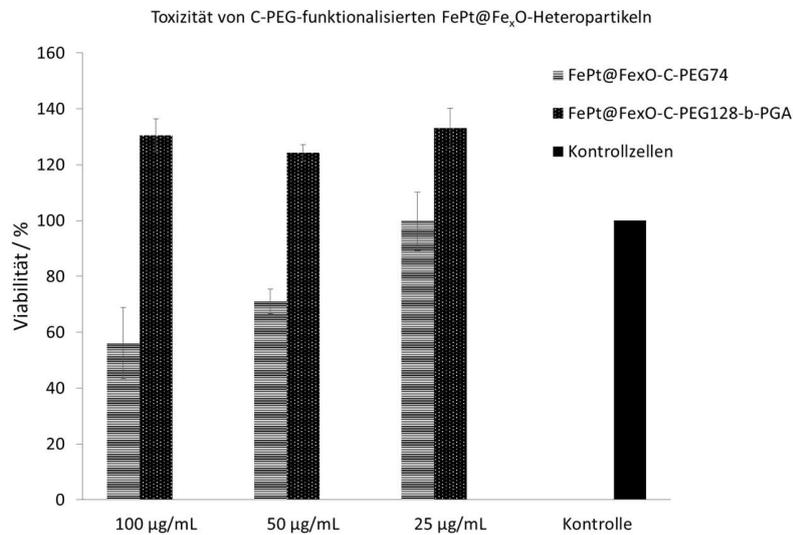


Abbildung 93: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von FePt@Fe_xO-Heterodimeren funktionalisiert mit C-PEG und C-PEG/C-PEG-*b*-PGA in drei Konzentrationen.

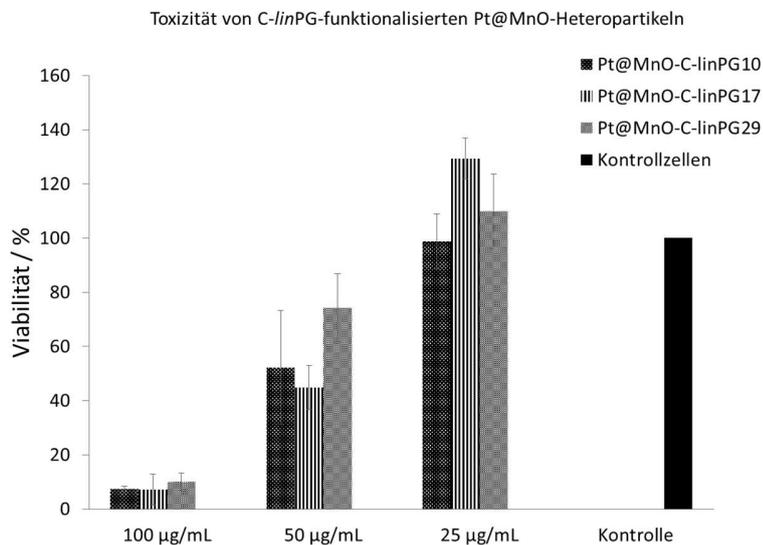


Abbildung 94: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von Pt@MnO-Heterodimeren funktionalisiert mit C-*lin*PG in drei Längen und drei unterschiedlichen Konzentrationen.

6.3 Experimenteller Teil

6.3.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte bezüglich der Zellkultur wurden in einer Sterilbank (Heraeus, Typ HS12) durchgeführt, die vor und nach Benutzen mit 70%igem Ethanol gereinigt wurde. Vor Einbringen von Substanzen und Geräten in die Sterilbank wurden diese ebenfalls mit 70%igem Ethanol desinfiziert oder autoklaviert.

6.3.2 Kultivieren der Zellen

Als Kulturgefäße wurden sterile Zellkulturflaschen mit 75 cm² Bodenfläche verwendet. Die Zelllinie wurde in McCoy's 5A Medium bei 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5% unter folgenden Zusätzen kultiviert: 10% fetales bovines Serum, 1% Penicillin-Streptomycin (PEST, 10000 U/mL Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin), 2mM L-Glutamin, 1 x Mycokill und 1 x MEM NEA (non-essential amino acids). Reinigungsschritte für die Zellkultur wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) durchgeführt.

6.3.3 Passagieren der Zellen

Eine Passage der Zellen wurde durchgeführt, sobald Konfluenz und eine Zellzahl zwischen 2,5 und 4*10⁶ erreicht wurde. Zum Ablösen der adhärenen Zellkultur wurde 2 mL Trypsin/EDTA verwendet. Die Einwirkung erfolgte für 5 min bei 37°C, danach wurden die abgelösten Zellen mit 3 mL Nährmedium versetzt um die Trypsinaktivität zu inhibieren, in einem Zentrifugenrohr gesammelt, zentrifugiert (10 min, 1000 rpm) und das erhaltene Zellpellet in 5 mL Nährmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde über eine Zählkammer (Fuchs-Rosenthal, Marienfeld) mit einer Tiefe von 0,2 mm bestimmt, unter Verwendung folgender Lösung: 20 µL Zellsuspension, 10 µL MilliQ-Wasser und 10 µL Trypanblau. Der

Kammerfaktor der verwendeten Zählkammer war 5000, welcher durch Multiplikation mit der bestimmten Zellzahl und dem Zell-Suspensionsvolumen die tatsächliche Zellzahl wiedergab. Die Zellen wurden in sterile Zellkulturflaschen (75 cm²) überführt (60000 Zellen pro Flasche) und weiter kultiviert.

6.3.4 Cytotoxizitätstests (AlamarBlue®)

Zur Vorbereitung eines Cytotoxizitätstests wurde nach Bestimmung der Zellzahl eine 96-*well*-Platte mit Zellen bestückt (Zelldichte pro *well*: 15000). Hierbei wurden einige *wells* ausgelassen um später mit purem Medium befüllt zu werden, wodurch der Hintergrundeinfluss subtrahiert werden konnte. Das Volumen des Mediums pro *well* war 100 µL. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die adhären Zellen 2 x mit PBS gewaschen bevor die zu testenden Konzentrationen an Nanopartikeln appliziert wurden. Die Nanopartikelproben wurden zuvor auf eine Stammlösungskonzentration von 1 mg/mL gebracht (MilliQ-Wasser, Probe steril filtriert) und durch entsprechende Verdünnung mit Nährmedium auf die Testkonzentrationen von 100, 50 und 25 µg/mL gebracht bei einem Endvolumen von 200 µL/*well*. Die Inkubationszeit betrug weitere 24 h, bevor das Medium/Wasser Gemisch entfernt wurde und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden 20 µL/*well* AlamarBlue®-Lösung (20% des Totalvolumens pro *well*) zugegeben und für 3 h inkubiert.

6.4 Zusammenfassung

Die getesteten nanopartikulären Systeme zeigten vielversprechende Ergebnisse betreffend ihrer Toxizität. Es konnte gezeigt werden, dass sich catecholinitiierte Polymere mit Dopa-Polymeren vergleichbar gut eignen, die Partikeltoxizität einzuschränken und damit die nötige Biokompatibilität zu gewährleisten. Heterodimere wie FePt@Fe_xO und Pt@MnO konnten zusätzlich zu isotropen Partikeln wie MnO als nicht toxisch befunden werden, solange das verwendete Partikel als Edelmetalldomäne FePt enthielt. Im Falle von Platin als einer der Domänen muss eine weitere Funktionalisierung angefügt werden, um dessen toxischen Effekte einzuschränken. Allerdings zielt schon die Verwendung von janusartigen Heterodimeren auf die orthogonale Funktionalisierung ab, sodass sich danach das Problem der Toxizität erübrigen sollte, sobald eine Funktionalisierung der Domäne angefügt wurde. In weiteren Experimenten soll die Toxizität der verwendeten Polymere, insbesondere der C-PGs, noch weiter eingeschränkt werden und damit auch die toxischen Effekte durch die Partikelproben. Erreicht werden kann dies über ein sorgfältiger durchgeführtes Aufreinigungsverfahren und durch den Tausch des Lösungsmittels des C-PGs von DMF zu Methanol. Wie in Kapitel 5 berichtet, wird vermutet, dass die Agglomerationstendenz durch der C-PG-funktionalisierten Partikel mit Lösung in DMF zusammenhängen könnte und daher zu Methanol gewechselt werden sollte. Weiterhin wird vermutet, dass sich DMF schlechter aus den Polymerketten entfernen lässt und daher zu den leichten toxischen Einflüssen führen kann.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei grundlegende Themen behandelt, die miteinander kombiniert wurden um eine effektive Anwendung der erhaltenen Systeme zu garantieren. Es wurde die rein anorganisch-chemische Synthese von metallischen Nanopartikeln wie MnO, FePt, Platin, sowie Heterodimeren wie Pt@MnO und FePt@MnO vorgestellt. Die zu Grunde liegenden Theorien zur Kontrolle des Wachstums dieser Partikel wurden ausführlich diskutiert. Zusätzlich wurde die Synthese der neuartigen Struktur der Pt@MnO-Nanoketten vorgestellt und diskutiert. Hierbei handelt es sich um Platin-Nadeln mit hohen Aspektverhältnissen, auf welche mehrere MnO-Domänen aufwachsen können. Ebenso wurde ausführlich auf die Verwendung neuartiger Polymere zur Funktionalisierung der vorgestellten Nanopartikel eingegangen, die dadurch stabil in wässriger Lösung dispergiert werden konnten. Die verwendeten Polymere basierten auf den Polyethern Poly(ethylenglycol) und Poly(glycerol), welche als Initiatorgruppe eine Catecholfunktion trugen. Die Architektur dieser catecholinitiierten Polymere war eine Weiterentwicklung der Dopa-PEG-Polymere, die am häufigsten eingesetzten Polymere zur effektiven Bindung an

Nanopartikelsysteme der 3d-Übergangsmetalle zum Zwecke der Überführung in Wasser. Die Verwendung der Catecholfunktion zur Anbindung an solche Partikel wurde von der Aminosäure L-DOPA inspiriert, welche in adhäsiven Muschelproteinen vorkommt und so den festen Halt der Muschel auf metallhaltigen Gesteinen und Untergründen ermöglicht. Die hohe Komplexbildungskonstante ist hierbei für die stabile Bindung verantwortlich. Die Weiterentwicklung der Dopa-PEG-Polymere zu catecholinitiierten Polymeren brachte deutliche Verbesserungen in der Syntheseführung und der Produktqualität, was die Verfügbarkeit für die Partikelfunktionalisierung verbesserte. Dadurch konnte die Effektivität der Partikel-funktionalisierung mit den neuartigen Polymeren erhöht werden. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die funktionalisierten Partikelsysteme nur geringe toxische Effekte *in vitro* hervorriefen, was den geplanten Einsatz *in vivo* begünstigt. Die beabsichtigte Anwendung war die des aktiven *cell targetings* auf Tumorgewebe oder Zellen des Immunsystems zur direkten oder indirekten Krebstherapie. In Kombination mit den metallischen Kernen der Partikel konnte zusätzlich die Verbesserung tomographischer Methoden wie MRT und CT durch Kontrasterhöhung getestet werden. Die bio-funktionalisierten Nanopartikel eigneten sich somit für den Einsatz als Carriersystem für die Theranostik: gezielter Wirkstofftransport, geringe Toxizität, hohe Biokompatibilität und gleichzeitige Ausnutzbarkeit physikalischer Eigenschaften.

7.2 Ausblick

Durch die erfolgreichen Funktionalisierungen metallischer Nanopartikel mit diversen catecholinitiierten Polymeren wie C-PEG sind vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt worden. Hervorgehoben werden soll die Möglichkeit *cell targeting* auf Zellen des Immunsystems, dendritische Zellen, durchzuführen. Die ersten hierzu veröffentlichten Ergebnisse zeigen die grundlegende Effektivität der mit einem spezifischen Antikörper funktionalisierten Partikel auf. Daher muss in folgenden Experimenten spezieller auf das erfolgende *targeting* eingegangen werden. So wird zum Beispiel eine dosisabhängige

Aktivierung der DCs durch funktionalisierte Partikel Aufschluss darüber geben, wie hoch die Konzentration tatsächlich sein muss, um eine immunogene Wirkung *in vivo* zu erreichen und dabei möglichst niedrige toxische Effekte zu erzielen. Hierbei kann auf die Erkenntnisse der hier gezeigten Viabilitätsassays zurückgegriffen werden.

Weiterhin wird die Anwendung von Heterodimeren für die Chelatorkopplung zur Isotopenmarkierung weiterentwickelt. Da die PET heute fast ausschließlich als PET/CT-Kombination zum Einsatz kommt, bietet sich die platinhaltige Komponente der Dimere an, den für die CT nötigen Kontrast zu erhöhen.

Die entwickelte neue Struktur der Pt@MnO-Ketten liefert interessante Möglichkeiten der Anwendung, wie die der gezielten Anbindung der Struktur mittels Polymerlinker an Silicaoberflächen. Hier könnte sich das Gebiet der nanostrukturierten Katalysatoren als Zielanwendung anbieten. Dennoch muss der Entwicklung und Synthese dieser Struktur und der zur Synthese nötigen Platindrähte weitere Aufmerksamkeit gegeben werden, um die Herstellung zuverlässig reproduzierbar zu gestalten.

Die Funktionalisierung der Nanopartikel mit catecholinitiierten Poly(glycerolen) bietet im Gegensatz zu PEG mehr Möglichkeiten der Funktionalisierung aufgrund der erhöhten Zahl an Hydroxylgruppen. Besonders hyperverzweigte Strukturen sind hierbei vielversprechend im Hinblick auf verschiedene Biofunktionalisierungen. Die auftretenden Probleme die in dieser Arbeit diskutiert wurden, betreffend Aggregation der PG-funktionalisierten Partikel, zeigen die Notwendigkeit auf, die Synthese zu optimieren. Da davon ausgegangen wird, dass eben die gewünschte hohe Zahl an Hydroxylgruppen zu der verstärkten Agglomeration der Partikel führt, wird in Zukunft mit erhöhten Ionenstärken gearbeitet, um Wasserstoffbrückenbindungen zu minimieren. Ebenfalls zeigten erste Tests, dass das Lösungsmittel zur Lagerung der Polymere verändert werden sollte, da durch dessen Variation die Tendenz zur Aggregation scheinbar verringert wurde.

Kapitel 8

Material und Methoden

8.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in *Tabelle 7* aufgeführt.

Tabelle 7: Alle verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
Pt(acac) ₂ , 98%	abcr	AB121416
Fe(CO) ₅	Sigma	195731
Tetraethylorthosilicat	Aldrich	865716
IGEPAL [®] CO-520	Sigma-Aldrich	238643
PEG-TES	abcr	AB212452
Aminopropyltriethoxysilan, 99%	Aldrich	440140
1-Octadecen, techn., 90%	Sigma-Aldrich	O806
n-Heptadecan	abcr	AB207141
Hexan	Sigma-Aldrich	H/0355/17
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich	33120

Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich	87368
Chloroform	VWR	22711.290
Isopropanol (tech.)	VWR	-
Ethanol (tech.)	VWR	-
Aceton (tech.)	VWR	-
Ölsäure	Fisher	204-207-1
Oleylamin, 80-90%	Acros	129541000
Fluoreszeinisothiocyanat	Sigma-Aldrich	F7250
Rhodamin-B-Isothiocyanat	Sigma-Aldrich	283924
McCoy's 5A Medium	Sigma	M8403
Mycokill	PAA	P11-016
L-Glutamin	Sigma	G7513
Fetal Bovine Serum	Sigma	F7524
Penicillin-Streptomycin	Sigma	P4333
MEM non essential amino acids	Sigma	M7145
AlamarBlue®	Biozol	BZL00727
Trypsin-EDTA, 0,25%	Sigma	T4049
PBS	Sigma	
Natriumchlorid	AnalaR	27810.295

8.2 Methoden

Hier werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte zusammengestellt und auf Probenvorbereitung und Parameter eingegangen.

8.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Untersuchung der hydrophoben Nanopartikel am TEM wurden ca. 50 μL der gelösten NP mit 1 mL Hexan verdünnt und ein Tropfen auf ein TEM-Grid (Graphitbeschichtung) aufgebracht. Wasserlösliche Nanopartikel wurden generell unverdünnt in Wasser aufgebracht, bei hydrophoben Partikeln erfolgte die Auftragung ausschließlich aus Hexan. Die präparierte Probe wurde mit einem Philips Transmissionselektronenmikroskop EM-420 abgebildet. Die Beschleunigungsspannung des Gerätes beträgt 120 kV, das Auflösungsvermögen liegt bei 3,3 nm. Als Elektronenquelle dient eine LaB_6 Kathode. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Slow-scan CCD Kamera (1k · 1k).

8.2.2 UV-Vis-Spektroskopie (UV-Vis)

Die UV/Vis-spektroskopischen Messungen wurden mit einem Cary Varian 5G UV-Vis-NIR-Spektrometer durchgeführt. Als Probengefäß wurde eine Quarzküvette verwendet. Jede Messung wurde hintergrundkorrigiert indem das jeweilige Lösungsmittel als Blindprobe vermessen und von der gemessenen Probe abgezogen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

8.2.3 Pulverröntgendiffraktometrie (XRD)

Die Aufnahmen der Pulverdiffraktogramme von MnO -Partikeln erfolgte an dem Zwei-Kreis-Diffraktometer Bruker AXS D8 Advance mit ungefilterter $\text{Mo-K}\alpha$ -Strahlung, energie-dispersivem Detektor ($\text{MoK}\alpha$ -Dublett) Bruker AXS SolX und 9-fach Probenwechsler in

Bragg-Brentano Geometrie. Die Probenpräparation erfolgte zwischen zwei „Scotch-Tape-Magic-Streifen“. Die Phasenanalyse erfolgte mit Bruker AXS EVA anhand der PDF-2 Datenbank. Die Messung der Diffraktogramme von Platinpartikeln und Platin-Nadeln erfolgte an einem Siemens D5000 Pulverdiffraktometer mit einem Braun M50 sensitiven Detektor und Cu-K α -Strahlung. Die Phasenanalyse erfolgte mittels Rietveldverfeinerung.

8.2.4 Dynamische Lichtstreuung Zetasizer (DLS)

Die Experimente zur Lichtstreuung wurden an einem Malvern Zetasizer Nano ZS durchgeführt. Das Probenvolumen von ca. 800 μ L wurde filtriert (siehe 8.2.7) und in Küvetten überführt (Disposable capillary cell DTS1061, Malvern). Konzentrationsbereich der Partikeldispersion: 0,5 bis 1 mg/mL. Die Messung wurde bei einem Winkel von 173° und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Messung bestand aus 25 Einzelmessungen, aus denen die mittlere Größenverteilung errechnet wurde. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

8.2.5 Winkelabhängige Dynamische Lichtstreuung (ω DLS)

Die Experimente zur winkelabhängigen Lichtstreuung wurden nach dem folgenden Vorgehen durchgeführt: Eine 30° DLS Messung wurde mittels ALV3000 *linear single tau* Korrelator (max. 1024 Kanäle) an einem ALV SP86 Goniometer (ALV GmbH Langen, Lauda Ultrathermostat) bei 20°C durchgeführt. Der verwendete Laser war ein HeNe-Laser (Uniphase 632,8 nm; 25 mW Ausgangsleistung). Die winkelabhängigen Experimente wurden an einem ALV-CGS 8F SLS/DLS 5022F Goniometer mit HeNe-Laser (Uniphase 632,8 nm; 25 mW Ausgangsleistung), acht simultan arbeitenden ALV7004 *multi tau* Korrelatoren und acht QEAPD Avalanche Photodiodendetektoren mit jeweils 17° Abstand zueinander durchgeführt. Für die Messungen der Korrelationsfunktionen wurden die Streuwinkel zwischen 30° und 158° mit 8° und 9° Schritten variiert. Die Feldkorrelationsfunktion wurde mittels Bi-Exponentialfunktion angepasst:

$$g_1(t) = A_1 \cdot \exp(-D_1 \cdot q^2 \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-D_2 \cdot q^2 \cdot t)$$

mit dem Streuvektor $q=4\pi \cdot n \cdot \sin(\Theta/2)$, den Amplituden A_1 und A_2 und den Diffusionskoeffizienten D_1 und D_2 , welche die Berechnung des apparenten z-gemittelten Diffusionskoeffizienten ermöglichen aus:

$$D_{\text{app}} = (A_1 \cdot D_1 + A_2 \cdot D_2) \cdot (A_1 + A_2)^{-1}$$

Der hydrodynamische Radius wurde nach der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet:

$$R_h = \langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = k \cdot T \cdot (6\pi\eta D_{\text{app}})^{-1}.$$

8.2.6 Microwell Plate Reader für 96-well-Platten

Die Ergebnisse der Viabilitätstests unter Verwendung von AlamarBlue® wurden an einem *microplate reader* (Fluoroscan Ascent Microplate reader) erhalten (540 nm Ex, 600 nm Em) und mit den Ergebnissen der Kontrollproben (unbehandelte Zellen und pures Medium) verrechnet.

8.2.7 Sterilfiltration

Alle Filtrations- und Sterilfiltrationsschritte in dieser Arbeit, bis auf die für die wDLS durchgeführten, wurden mit einem Millex-GS Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 μm von Merck Millipore durchgeführt. Die Membran bestand aus gemischten Zelluloseestern (MCE). Der Filter wurde vor Verwendung mit 2 mL MilliQ-Wasser gespült und die entsprechende Probe nach 1 mL Totvolumen aufgefangen.

Anhang

A. Literaturverzeichnis

- [1] E. Roduner, *Nanoscopic Materials: Size-Dependent Phenomena*, Cambridge: RCS Publishing, 2006.
- [2] K. Kelly, E. Coronado, L. Zhao and G. Schatz, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 668-677.
- [3] Y. Xia, H. Yang and C. Campbell, *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46, 1671-1672.
- [4] D. Vollath, in *Nanoparticles - Nanocomposites - Nanomaterials*, Wiley, 2013, pp. 4-5.
- [5] Z. Gu, H. Uetsuka, K. Takahashi, R. Nakajima, H. Onishi, A. Fujishima and O. Sato, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 2003, 42, 894-897.
- [6] S. Colodrero, M. Ocana and H. Miguez, *Langmuir*, 2008, 24, 4430-4434.
- [7] D. Maschke, "Dissertation," Mainz, 2010.
- [8] H. Goesmann and C. Feldmann, *Angewandte Chemie*, 2010, 122, 1402-1437.
- [9] V. LaMer and R. Dinegar, *JACS*, 1950, 72, 4847-4854.
- [10] C. Murray, D. Norris and M. Bawendi, *JACS*, 1993, 115, 8706-8715.
- [11] D. Leslie-Pelecky and R. Rieke, *Chem. Mater.*, 1996, 8, 1770-1783.
- [12] T. Schladt, K. Schneider, M. Shukoor, F. Natalio, H. Bauer, M. Tahir, S. Weber, L. Schreiber, H. Schröder, W. Müller and W. Tremel, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20, 8297-8304.
- [13] A. Lu, E. Salabas and F. Schüth, *Angewandte Chemie*, 2007, 119, 1241-1266.

- [14] H. Zeng and S. Sun, *Advanced Functional Materials*, 2008, 18, 391-400.
- [15] R. Winter and F. Noll, *Methoden der biophysikalischen Chemie*, Stuttgart: Teubner, 1998.
- [16] M. Warsi, R. Adams, S. Duckett and V. Chechik, *Chemical Communications*, 2010, 46, 451-453.
- [17] T. Schladt, K. Schneider, H. Schild and W. Tremel, *Dalton Transactions*, 2011, 40, 6315-6343.
- [18] H. Bin Na, C. Song and T. Hyeon, *Advanced Materials*, 2009, 21, 2133-2148.
- [19] Q. Pankhurst, J. Connolly, S. Jones and J. Dobson, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003, 36, R167-R181.
- [20] E. Ditzendorf, T. Hany, A. Buck, G. von Schulthess and C. Burger, *Journal of Nuclear Medicine*, 2003, 44, 732-738.
- [21] G. Antoch, L. Freudenberg, T. Beyer, A. Bokisch and J. Debatin, *Journal of Nuclear Medicine*, 2004, 45, 56S-64S.
- [22] H. Lee, Z. Li, A. Hsu, C. Xu, J. Xie, S. Sun and X. Chen, *Journal of Nuclear Medicine*, 2008, 49, 1371-1379.
- [23] H. Herzog, *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, 76, 337-342.
- [24] W. Schulemann, *Angewandte Chemie*, 1940, 53, 342-345.
- [25] T. Lammers, S. Aime, W. Hennink, G. Storm and F. Kiessling, *Accounts of chemical research*, 2011, 44, 1029-1038.
- [26] I. Lynch, A. Salvati and K. Dawson, *Nature Nanotechnology*, 2009, 4, 546-547.
- [27] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindmann, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, A. Dawson and S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 2050-2055.
- [28] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée and M. Port, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 2006, 58, 1471-1504.
- [29] A. Smith, H. Duan, A. Mohs and S. Nie, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60,

1226-1240.

- [30] F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo and P. Couvreur, *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16, 1181-1188.
- [31] I. Izquierdo-Barba, A. Martinez, A. Doadrio, J. Pérez-Pariente and M. Vallet-Regí, *Europ. J. of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 26, 365-373.
- [32] M. Vallet-Regí, L. Ruiz-González, I. Izquierdo-Barba and J. González-Calbet, *J. Mater. Chem.*, 2006, 16, 26-31.
- [33] R. Lawaczeck, M. Menzel and H. Pietsch, *Applied Organometallic Chemistry*, 2004, 18, 506-513.
- [34] T. Schladt, T. Graf and W. Tremel, *Chemistry of Materials*, 2009, 21, 3183-3190.
- [35] C. Murray, C. Kagan and M. Bawendi, *Annual Reviews of Materials Science*, 2000, 30, 545-610.
- [36] C. Haynes, A. McFarland, L. Zhao, R. Van Duyne and G. Schatz, *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107, 7337-7342.
- [37] K. Watanabe, D. Menzel, N. Nilius and H. Freund, *Chemical Reviews*, 2006, 106, 4301-4320.
- [38] Y. Liu, D. Li and S. Sun, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 12579-12587.
- [39] J. Pelka, H. Gehrke, M. Esselen, M. Türk, M. Crone, S. Bräse, T. Muller, T. Blank, W. Send, V. Zibat, P. Brenner, R. Schneider, D. Gerthsen and D. Marko, *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22, 649-659.
- [40] C. Wang, H. Daimon, Y. Lee, J. Kim and S. Sun, *JACS*, 2007, 129, 6974-6975.
- [41] J. Wu, A. Gross and H. Yang, *Nanoletters*, 2011, 11, 798-802.
- [42] S. Chou, Y. Shau, P. Wu, Y. Yang, D. Shieh and C. Chen, *JACS*, 2010, 132, 13270-13278.
- [43] C. Xu, Z. Yuan, N. Kohler, J. Kim, M. Chung and S. Sun, *JACS*, 2009, 131, 15346-15351.

- [44] J. Kim, C. Rong, J. Ping Liu and S. Sun, *Advanced Materials*, 2009, 21, 906-909.
- [45] M. Chen, J. Kim, J. Liu, H. Fan and S. Sun, *JACS*, 2006, 128, 7132-7133.
- [46] T. Schladt, T. Graf, O. Köhler, H. Bauer, M. Dietzsch, J. Mertins, R. Branscheid, U. Kolb and W. Tremel, *Chemistry of Materials*, 2012, 24, 525-535.
- [47] T. Schladt, K. Schneider, S. Prüfer, H. Bauer, F. Natalio, O. Dumele, R. Raidoo, S. Weber, L. Schreiber, M. Radsak, H. Schild and W. Tremel, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 9253-9262.
- [48] D. Rodríguez-Fernandez and L. Liz-Marzán, *Part. Part. Syst. Charact*, 2013, 30, 46-60.
- [49] S. Lim, M. Varon, I. Ojea-Jimenez, J. Arbiol and V. Puntès, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 11518-11523.
- [50] T. Schladt, T. Graf, O. Köhler, H. Bauer, M. Dietzsch, J. Mertins, R. Branscheid, U. Kolb and W. Tremel, *Chem. Mater.*, 2012, 24, 525-535.
- [51] J. Hu., S. Zhou, Y. Sun, X. Fang and L. Wu, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 4356-4378.
- [52] C. Kaewsaneha, P. Tangboriboonrat, D. Polpanich, M. Eissa and A. Elaissari, *Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5, 1857-1869.
- [53] C. Wang, H. Yin, S. Dai and S. Sun, *Chem. Mater.*, 2010, 22, 3277-3282.
- [54] H. Zeng, S. Sun, J. Li, Z. Wang and J. Liu, *Applied Physics Letters*, 2004, 85, 792-794.
- [55] L. Cademartiri and G. Ozin, *Adv. Mater.*, 2009, 21, 1013-1020.
- [56] P. Sajjalal, T. Sreeprasad, A. Samal and T. Pradeep, *Nano Reviews*, 2011, 2, 5883-DOI: 10.3402/nano.v2i0.5883.
- [57] H. Yu, M. Chen, P. Rice, S. Wang, R. White and S. Sun, *Nano Letters*, 2005, 2, 379-382.
- [58] T. Schladt, I. Shukoor, K. Schneider, N. Tahir, F. Natalio, I. Ament, J. Becker, F. Jochum, S. Weber, O. Köhler, P. Theato, L. Schreiber, C. Sönnichsen, H. Schröder, W. Müller and W. Tremel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 3976-3980.

- [59] A. Figuerola, A. Fiore, R. Di Corato, A. Falqui, C. Giannini, E. Micotti, A. Lascialfari, M. Corti, R. Cingolani, T. Pellegrino, P. Cozzoli and L. Manna, *JACS*, 2008, 130, 1477-1487.
- [60] C. Wang, H. Daimon, Y. Lee, J. Kim and S. Sun, *JACS*, 2007, 129, 6974-6975.
- [61] Z. Wang, *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, 1153-1175.
- [62] N. Frey and S. Sun, in *Inorganic Nanoparticles - Synthesis, Applications and Perspectives*, Boca Raton, Florida, CRC Press, 2010, pp. 33-68.
- [63] C. Wang, Y. Hou, J. Kim and S. Sun, *Angew. Chem.*, 2007, 46, 6333-6335.
- [64] S. Maksimuk, S. Yang, Z. Peng and H. Yang, *JACS*, 2007, 129, 8684-8685.
- [65] L. Bao, W. Low, J. Jiang and J. Ying, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 7117-7120.
- [66] Q. Xiao, M. Cai, M. Balogh, M. Tessema and Y. Lu, *Nano Res.*, 2012, 5, 145-151.
- [67] S. Tanaka, K. Aoki, A. Marutsugu, H. Ishitobi, T. Jin and Y. Inouye, *Optical Materials Express*, 2013, 3, 157-165.
- [68] B. Terris and T. Thomson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, 38, R199-R222.
- [69] R. Narayanan and M. El-Sayed, *Nano Letters*, 2004, 4, 1343-1348.
- [70] T. Schladt, K. Koll, S. Prüfer, H. Bauer, F. Natalio, O. Dumele, R. Raidoo, S. Weber, U. Wolfrum, L. Schreiber, M. Radsak, H. Schild and W. Tremel, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22, 9253-9262.
- [71] M. Yu, S. Huang, K. Yu and A. Clyne, *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13, 5554-5570.
- [72] L. Shen, P. Laibinis and T. Hatton, *Langmuir*, 1999, 15, 447-453.
- [73] C. Dingels, M. Schömer and H. Frey, *Chemie unserer Zeit*, 2011, 45, 338-349.
- [74] Y. Zhang, N. Kohler and M. Zhang, *Biomaterials*, 2002, 23, 1553-1561.
- [75] M. Ward and T. Georgiou, *Polymers*, 2011, 3, 1215-1242.
- [76] A. Avdeef, S. Sofen, T. Bregante and K. Raymond, *JACS*, 1978, 100, 5362-5370.

- [77] H. Lee, S. Dellatore, W. Miller and P. Messersmith, *Science*, 2007, 318, 426-430.
- [78] J. Waite and M. Tanzer, *Science*, 1981, 212, 1038-1040.
- [79] V. Wilms, H. Bauer, C. Tonhauser, A. Schilman, M. Müller, W. Tremel and H. Frey, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 193-199.
- [80] V. Reuss, B. Obermeier, C. Dingels and H. Frey, *Macromolecules*, 2012, 45, 4581 - 4589.
- [81] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou and S. Sun, *Advanced Materials*, 2007, 19, 3163-3166.
- [82] K. Koll, "Dissertation," Mainz, 2011.
- [83] B. Obermeier, F. Wurm, C. Mangold and H. Frey, *Angewandte Chemie*, 2011, 123, 8136-8146.
- [84] M. Imran ul-haq, B. Lai, R. Chapanian and J. Kizhakkedathu, *Biomaterials*, 2012, 33, 9135-9147.
- [85] A. Thomas, H. Bauer, A. Schilman, K. Fischer, W. Tremel and H. Frey. *to be submitted*.
- [86] L. Zhao, T. Chano, S. Morikawa, Y. Saito, A. Shiino, S. Shimizu, T. Maeda, T. Irie, S. Aonuma, H. Okabe, T. Kimura, T. Inubushi and N. Komatsu, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, 22, 5107-5117.
- [87] M. Li, K. Neoh, R. Wang, B. Zong, J. Tan and E. Kang, *Eur. J. Pharm.*, 2013, 48, 111-120.
- [88] L. Zhou, C. Gao, X. Hu and W. Xu, *Chem. Mater.*, 2011, 23, 1461-1470.
- [89] R. Hong, N. Fischer, T. Emrick and V. Rotello, *Chem. Mater.*, 2005, 17, 4617-4621.
- [90] Z. Amoozgar and Y. Yeo, *Wires Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2012, 4, 219-233.
- [91] A. Hofmann, F. Wurm and H. Frey, *Macromolecules*, 2011, 44, 4648-4657.
- [92] M. Sousa, F. Tourinho, J. Depeyrot, G. da Silva and M. Lara, *Journal of Physical*

- Chemistry B*, 2001, 105, 1168-1175.
- [93] W. Sun, S. Zhou, B. You and L. Wu, *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, 10646-10654.
- [94] W. Stöber, A. Fink and E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, 26, 62-69.
- [95] A. Voigt and K. Sundmacher, *Chemie Ingenieur Technik*, 2007, 79, 229-232.
- [96] Morales-Avila, E.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-Garcia, B.; Ramirez, F.; Radiolabeled Nanoparticles for Molecular Imaging, *Molecular Imaging*, Prof. Bernhard Schaller (Ed.), InTech , 2012, pp. 15-38.
- [97] F. Igney and P. Kramer, *J. of Leuk. Biol.*, 2002, 71, 907-920.
- [98] S. Hori, T. Nomura and S. Sakaguchi, *Science*, 2003, 299, 1057-1061.
- [99] R. Nicholson, J. Gee and M. Harper, *European Journal of Cancer*, 2001, 37, 9-15.
- [100] H. Gong,, L. Sampath, J. Kovar and D. Olive, Targeting EGFR and HER2 for Molecular Imaging of Cancer, *Molecular Imaging*, Prof. Bernhard Schaller (Ed.), InTech, 2012.
- [101] M. Johannsen, B. Thiesen, U. Gneveckow, K. Taymoorian, N. Waldöfner, R. Scholz, S. Deger, K. Jung, S. Loening and A. Jordan, *The Prostate*, 2006, 66, 97-104.
- [102] L.-. Rink, A. Kruse and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag , 2012.
- [103] E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola, B. Tkacz-Szczesna, G. Celichowski, M. Cichomski, W. Szmaja and J. Grobelny, *Journal of Nanomaterials*, 2013, 2013, Article ID 313081, 10 pages, doi:10.1155/2013/313081.
- [104] J. Zhu, Y. Lu, Y. Li, J. Jiang, Z. Liu, L. Guo, Y. Pan and H. Gu, *Nanoscale*, 2014, 6, 199-202.
- [105] F. Natalio, A. Kashyap, S. Lorenz, H. Kerschbaumer, M. Tahir, K. Koynov, H. Duschner, S. Strand, D. Strand and W. Tremel, *Nanoscale*, 2012, 4, 4680-4686.
- [106] N. Glube, A. Giessl, U. Wolfrum and P. Langguth, *Nephron Exp. Nephrol.*, 2007, 107,

e47-e56.

[107] S. Anoopkumar-Dukie, J. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F. van Pelt and A. Allshire, *The British Journal of Radiology*, 2005, 78, 945-947.

B. Abkürzungsverzeichnis

4-ATP	4-Aminothiophenol
APS	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
AROP	Anionic Ring Opening Polymerization

BMDC	Bone Marrow Derived Cell
CA- <i>hb</i> PG	Catechol- Poly(glycerol) , hyperverzweigt, acetalgeschützt
CA- <i>lin</i> PG	Catechol- Poly(glycerol) , linear, acetalgeschützt
CA-OH	Catecholinitiator (2,2-Dimethyl-1,3-Benzodioxol-5-Propanol)
C- <i>hb</i> PG	Catechol- Poly(glycerol) , hyperverzweigt
CHCl ₃	Chloroform
Ch- <i>lin</i> PG	Cholesterol-Poly(glycerol) , linear
C- <i>lin</i> PG	Catechol- Poly(glycerol) , linear
C-PEG	Catechol- Poly(ethylenglycol)
C-PEG- <i>b</i> -PGA	Catechol- Poly(ethylenglycol)-block-Poly(glycidylamin)
C-PG	Catechol- Poly(glycerol)
CT	Computertomographie
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DAGA	N,N- Diallylglycidylamin
DC	Dendritic Cell
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DP _n	Durchschnittlicher Polymerisationsgrad
dsRNA	Double-stranded RNA
EDC	1-Ethyl-3-(3- dimethylaminopropyl)carbodiimid
EEGE	Ethoxyethyl-Glycidylether

EGF	E pidermal G rowth F actor
EGFR	E pidermal G rowth F actor R eceptor
ELISA	E nzyme- L inked I mmunosorbent A ssay
EO	E thylenoxid
EPR	E nhanced P ermeability and R etention
FACS	F luorescence- A ctivated C ell S orting
FITC	F luoreszinisothiocyant
HSAB	H ard and S oft A cids and B ases
HU	H ountsfield U nit
LCST	L ower C ritical S olution T emperature
L-DOPA	L -3,4- D ihydroxyphenylalanin
MAP	M ussel A dhesive P rotein
<i>mf</i> -PEG	Multifunktionales P EG
MHCI	M ajor H istocompatibility C omplex I
MHCII	M ajor H istocompatibility C omplex II
MRT	M agnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5- D imethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NEA	N on- E ssential A mino A cids
NHS	N - H ydroxysuccinimid
NMR	N uclear M agnetic R esonance
NP	N anopartikel
PBS	P hosphate b ufferedsaline
PDI	P olydispersitätsindex

PEG	P olyethy l englycol
PEG-TES	2-[Methoxy(p olyethy l glycol)propyl]trimethoxysilan
PEST	P enicillin- S treptomycin
PET	P ositronenemissionstomographie
PG	P olyglycerol
PGA	P oly(g lycidyl l amin)
PGG	P oly(g lycidyl g lyceryl)
POM	P oly(o xymethylen)
PPO	P oly(p ropylen o xid)
RES	R etikuloendotheliales System
RITC	R hodamin B Isothiocyanat
rME	r everse M ikroemulsion
RNA	R ibonucleic Acid
ROMBP	R ing O pening M ulti B ranch P olymerization
ROS	R eactive O xygen S pecies
SOD	S uper o xid- D ismutase
SPIONs	S uper P aramagnetic I ron O xide Nanoparticles
SPM	S uper p aramagnetismus
ssRNA	S ingle-stranded R NA
TAA	T umor a ssoziiertes A ntigen
TD	T etra d ecanol
TEM	T ransmissionselektronen m ikroskopie
TEOS	T etraethyl o rthosilicat

TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll Like Rezeptor
Tregs	regulatorische T-Zellen
wDLS	winkelabhängige Dynamische Lichtstreuung

C. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell von LaMer und Dinegar zur Unterscheidung der Phasen der Keimbildung und des Keimwachstums. [8].....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nettomagnetisierung und der unkompenzierten Oberflächenspins bei paramagnetischen (links) und ferromagnetischen Nanopartikeln (rechts) unterhalb des Einzeldomänenlimits und des SPM-Limits.	11

Abbildung 3: TEM-Aufnahme von Manganoxidnanopartikeln. [34]	22
Abbildung 4: TEM-Aufnahme von Platin-Nanowürfeln nach Wang <i>et al.</i> [40].....	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung von Platin- bzw. FePt-Nanowürfeln unter Verwendung der beiden Precursormoleküle Pt(acac) ₂ und Fe(CO) ₅ . Die verwendete Menge des Eisencarbonyls liegt im äquimolaren Verhältnis zum Platin-Precursor für FePt- und im Spurenbereich für Platinwürfel. Abbildung angepasst nach Liu <i>et al.</i> [38]	25
Abbildung 6: TEM-Aufnahme von FePt-Nanowürfeln nach Schladt et al. [46].....	26
Abbildung 7: Aufnahme der Synthese von MnO-Nanopartikeln nach Erreichen der Höchsttemperatur von 317°C. Die klare Lösung mit grünlicher Färbung ist oft ein Zeichen für eine hochmonodisperse Probe.	27
Abbildung 8: TEM-Aufnahme von (A) ca. 19 nm MnO-Nanopartikeln und (B) ca. 8 nm MnO-Nanopartikeln.....	27
Abbildung 9: Pulverröntgendiffraktogramm von MnO-Nanopartikeln.	28
Abbildung 10: TEM-Aufnahme von ca. 5 nm Platinwürfeln.	29
Abbildung 11: Pulverröntgendiffraktogramm mit Rietveldverfeinerung von Platin-Nanopartikeln (blau: Experiment, rot: Verfeinerung, grau: Differenz).	29
Abbildung 12: TEM-Aufnahme von ca. 6-8 nm FePt-Würfeln.	30
Abbildung 13: TEM-Aufnahme von (A) FePt-Würfeln in Monolage und (B) FePt-Würfeln in Überstrukturen.	31
Abbildung 14: (A) TEM-Aufnahme von CdSe-Au "nicht-sphärischer" Janus-Partikel, (B) HRTEM-Aufnahme und schematische Darstellung von CdSe-Au-Partikeln. [48]	36
Abbildung 15: TEM-Aufnahme von FePt@MnO-Heterodimeren. [50].....	39
Abbildung 16: TEM-Aufnahme von Au@MnO-Blumen [58].....	40
Abbildung 17: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Mizellenbildung von Oleylamin um Platin nach Komplexierung des Platinprecursors und dessen Reduktion bzw. Nukleation. Abbildung angepasst nach [65].....	43
Abbildung 18: TEM-Aufnahme von FePt-Nanodrähten. [63]	44
Abbildung 19: TEM-Aufnahme der Platin-Polypods in Abwesenheit von Cr(CO) ₆ . [66] ...	45
Abbildung 20: HRTEM-Aufnahme der FePt-Nanodrähte mit gemessenen Gitterabständen; links: (111) Ebenenabstand, rechts: (100)-Ebenenabstand. [63]	45

Abbildung 21: TEM-Aufnahmen von (a) hantelartigen Strukturen nach 1 min Reaktionszeit und von (b) nach 3 min Reaktionszeit. (c): Illustration des Wachstumsmechanismus von Platin-Nanodrähten. [66]	46
Abbildung 22: TEM-Aufnahme von Pt@MnO-Dimeren.	48
Abbildung 23: TEM-Aufnahme von FePt@MnO-Dimeren.	49
Abbildung 24: (A) TEM-Aufnahme von FePt@MnO-Dimeren, MnO-Domäne 11 nm. (B) FePt@MnO-Dimere, MnO-Domäne 18 nm.....	49
Abbildung 25: TEM-Aufnahmen von (A+B) FePt@Fe _x O-Heterodimeren in unterschiedlicher Vergrößerung.	50
Abbildung 26: TEM-Aufnahmen von: (A) Platin-Nanopartikel ohne zugesetzte Ölsäure und doppelter Menge Oleylamin (2 mL) verglichen mit der Standard Platinpartikelsynthese. (B) Platin-Nanorods, ca. 30 nm, mit sphärischen Verunreinigungen, 4:6 Gemisch von 1-Octadecen und Oleylamin. (C) Platin-Nanodrähte aus Synthese in 100% Oleylamin, 200°C Endtemperatur. (D) Platin-Nanodrähte aus Synthese in 100% Oleylamin, 130°C Endtemperatur. (E) Entsprechend D, nochmaliges Heizen auf 200°C, leichte Zersetzung. (F) Platin-Nanodrähte bei Idealbedingungen (30 mL Oleylamin, 130°C Endtemperatur, 30 min Halten der Endtemperatur).....	52
Abbildung 27: TEM-Aufnahmen von: (A) Synthese nach Bedingungen für Platin-Nanodrähte ohne Fe(CO) ₅ in 100% Oleylamin. (B) Entsprechend A in 7:3 Gemisch von Oleylamin und 1-Octadecen. (C) Entsprechend A in 3:7 Gemisch von Oleylamin und 1-Octadecen. (D) Synthese mit schon im Gemisch vorhandenen Fe(CO) ₅ (keine Injektion) und anschließendem Heizen auf 130°C.	55
Abbildung 28: TEM-Aufnahmen von: (A) Synthese von Platin-Nanodrähten bei Idealbedingungen, direkt abgebrochen nach Fe(CO) ₅ -Injektion bei 120°C und erster Farbänderung. (B) Entsprechend A, Abbruch nach 1 min bei 130°C.	56
Abbildung 29: TEM-Aufnahme von Platin-Nanodrähten durch Synthese bei Idealbedingungen mit hoher Ausbeute und Reinheit, nahezu ohne Verunreinigung durch sphärische Platinpartikel.....	57
Abbildung 30: Pulverröntgendiffraktogramm mit Rietveldverfeinerung von Platin-Nanonadeln (blau: Experiment, rot: Verfeinerung, grau: Differenz).....	58

Abbildung 31: TEM-Aufnahme von Platin-Nanodrähten gewonnen aus der Kapillarsynthese.....	59
Abbildung 32: Schematischer Aufbau der Synthese in einer Kapillare als Vorversuch zur Mikroreaktorsynthese von Platin-Nanodrähten.....	60
Abbildung 33: TEM-Aufnahmen von: (A) FePt@Fe _x O-Nanodrähten. (B) Entsprechend A, stärkere Vergrößerung.	62
Abbildung 34: TEM-Aufnahmen von: (A) Synthese von Pt@MnO-Nanoketten bei zu hohem Anteil an sphärischen Platinpartikeln. (B) bis (F) Synthese von Pt@MnO-Nanoketten, unterschiedliche Bereiche und Anordnungen bei verschiedenen Vergrößerungen. ...	64
Abbildung 35: Pulverröntgendiffraktogramm mit Rietveldverfeinerung von Pt@MnO-Nanoketten (blau: Experiment, rot: Verfeinerung, grau: Differenz).	65
Abbildung 36: Fünf Mechanismen der Biofunktionalisierung. <i>Oben:</i> Verwendung eines ankertragenden, hydrophilen Polymers, welches den hydrophoben Liganden des Partikels per Ligandenaustausch verdrängt. <i>Mitte links:</i> Verwendung eines amphiphilen Moleküls, meist mit hydrophilem Polymerrückgrat und lipophilem Anker zur Einlagerung in die hydrophobe Hülle des Partikels. <i>Mitte rechts:</i> Anbringung einer Silicahülle über Polykondensation eines Silicium-Alkoxides (TEOS: Tetraethylorthosilicat) auf das Partikel unter Zusatz eines hydrophilen Polymers mit Silananker. <i>Unten links:</i> Umhüllung eines Partikels mit Dextranmolekülen, meist mit zusätzlichen hydrophilen Seitenketten. <i>Unten rechts:</i> Umlagerung eines Partikels durch multidentate Polymerhülle, einer Polymerstruktur mit mehreren, für das Partikelmaterial spezifischen Ankergruppen.....	73
Abbildung 37: Schematische Darstellung der Bindung des Catecholankers an die oft unterkoordinierte Oberfläche eines metalloxidischen Nanopartikels.....	76
Abbildung 38: Strukturformel der Aminosäure L-DOPA.....	78
Abbildung 39: Gestreckte Form des Siderophors Enterobactin mit drei Catecholfunktionen zur oktaedrischen Koordination eines Fe ³⁺ -Moleküls.	79
Abbildung 40: Schematische Darstellung der Synthese des Dopa-PEG mit endständiger Aminofunktion, ausgehend von einem einseitig geschützten Diamino-PEG und 3,4-Dihydroxyhydrozimsäure.	82

Abbildung 41: Schematische Darstellung der Synthese des Dopa-PEG mit endständiger Säurefunktion, ausgehend von einem Disäure-PEG und Dopamin.	82
Abbildung 42: Schematische Darstellung der anionisch-ringöffnenden Polymerisation von Ethylenoxid (EO).	83
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Synthese von catecholinitiiertem PEG. (A) Herstellung des Blockcopolymers C-PEG- <i>b</i> -PGA aus EO und DAGA. Hierbei können Catechol und PGA-Block selektiv geschützt werden (B) Herstellung des monofunktionellen C-PEGs aus EO.	84
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Gewinnung des Initiatormoleküls (CA-OH) aus 3,4-Dihydroxyhydrozimsäure.	85
Abbildung 45: Schematische Darstellung der Synthese des C-PGs (linear). Rechts Mitte: Vollständig geschütztes C- <i>lin</i> PG. Rechts Oben: Teilweise entschütztes C-PG (CA- <i>lin</i> PG), die Catecholfunktion bleibt geschützt durch die Verwendung von einem sauren Ionenaustauscher (DOWEX). Rechts Unten: Vollständige Entschützung des C- <i>lin</i> PGs (C-PG).	86
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Synthese des hyperverzweigten C-PGs (C- <i>hb</i> PG) ausgehend vom acetalgeschütztem Catechol Initiator (CA-OH) mit anschließender Entschützung.	87
Abbildung 47: Ligandenaustausch bei isotropen Nanopartikeln mit (A) C-PEG- <i>b</i> -PGA, (B) C-PG und (C) C-PEG.	91
Abbildung 48: Ligandenaustausch bei Heterodimeren, beispielsweise Pt@MnO mit C-PEG.	92
Abbildung 49: Doppelt funktionalisiertes Heterodimer mit zwei verschiedenen Farbstoffen orthogonal zueinander sowie an C-PEG- <i>b</i> -PGA gebundene bioaktive Moleküle.	93
Abbildung 50: Schematische Darstellung des amphiphilen PEG-Phospholipids unter Anfärbung der Zonen unterschiedlicher Löslichkeit.	95
Abbildung 51: Schematische Darstellung des amphiphilen Cholesterol-Polyglycerols (Ch- <i>lin</i> PG _n , links) in linearer Form und des Tetradecanol-PEG ₅₇ -PGG ₁₂	95
Abbildung 52: Schematische Darstellung eines Blockcopolymers C-PEG- <i>b</i> - <i>hb</i> PG mit einem Block PEG direkt am Catecholinitiator und darauf folgendes hyperverzweigtes PG.	97

Abbildung 53: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Anbindung von Pt@MnO-Ketten auf eine mit Thionylchlorid funktionalisierte Silicaoberfläche unter Verwendung des Blockcopolymers C-PEG- <i>b</i> -hbPG.....	97
Abbildung 54: Schematische Darstellung der Umhüllung eines Nanopartikels mit SiO ₂ unter Verwendung des Precursors TEOS. Im zweiten Schritt erfolgt die Aufkondensation eines PEG-Silans (PEG-TES), welches die Wasserlöslichkeit von SiO ₂ -Partikeln erhöht. Ebenfalls ist die Einlagerung des eines Farbstoffes in die Hülle gezeigt (hier FITC) und die Anbringung von Aminofunktion durch das Aminosilan APS.....	99
Abbildung 55: Schematische Darstellung der Anbindung des DOTA-NHS-Esters an ein aminofunktionalisiertes Nanopartikel unter Erhalt eines chelatortragenden Partikels.....	100
Abbildung 56: Schematische Darstellung des Prozesses der Induktion einer adaptiven anti-Tumorimmunantwort nach Aufnahme antigenbeladener Nanopartikel in eine dendritische Zelle. Die DC internalisiert die TAA-tragenden, DEC205-adressierenden Partikel und präsentiert die Antigene auf ihrer Oberfläche. Durch die Präsentation werden T-Zellen aktiviert, die ihrerseits B-Zellen rekrutieren, die im aktivierten Zustand als Plasmazellen den TAA-spezifische Antikörper bilden. Wird der tumorgebundene Antikörper von Fc-Rezeptor-tragenden Immunzellen (z.B. Makrophagen) erkannt, wird die Tumorzelle phagozytiert.	103
Abbildung 57: (Laufender) Ligandenaustausch und Hydrophilisierung von Nanopartikeln. Gleichzeitige Injektion von in CHCl ₃ dispergierten Partikeln und ebenfalls in CHCl ₃ gelöstem Polymer. Die Gesamtmenge des Polymers wurde vor erfolgter Injektion gesplittet und die Hälfte im Kolben vorgelegt um dessen Konzentration beim Injektionsprozess gleich zu halten.....	105
Abbildung 58: Aufnahme zur Verdeutlichung der Löslichkeit vor (links) und nach (rechts) der Funktionalisierung durch ein hydrophiles Polymer. Die Farbunterschiede treten durch unterschiedliche Konzentrationen auf.	106
Abbildung 59: (A) UV-Vis-Spektrum dreier C-PEGs unterschiedlicher Längen, ungebunden. Signifikante Absorptionsbanden zwischen 260 und 300 nm (PEG). (B) UV-Vis-Spektrum zweier Partikelchargen, hier Heterodimere, funktionalisiert mit C-PEG bzw. einem C-PEG-Gemisch. Erkennbare Absorptionsbande des PEGs. Die stärkere Steigung der	

Kurven verglichen mit den Polymeren selbst ist auf die starke Absorption der Partikel durch Streuung zurückzuführen.	109
Abbildung 60: UV-Vis-Spektrum von FITC, C-PEG- <i>b</i> -PGA und C-PEG. Beide Polymere wurden mit FITC versetzt und anschließend aufgereinigt um die Anwesenheit von freiem FITC auszuschließen. Die Bindung erfolgte wie zu erwarten nur an das C-PEG- <i>b</i> -PGA...	110
Abbildung 61: UV-Vis-Spektrum von polymerfunktionalisierten Heterodimeren ohne Farbstoff mit RITC markierter MnO-C-PEG-Domäne und freier FePt-Domäne und mit FITC und RITC markierten Domänen.	111
Abbildung 62: Aufnahme der klaren Dispersion der NP-C-PEG.	111
Abbildung 63: TEM-Aufnahmen von C-PEG-funktionalisierten MnO- (A)/(C) und FePt@Fe _x O- (B) Nanopartikeln. (D): Diagramm der Größenverteilung von MnO-Nanopartikeln mit C-PEG ₇ -Hülle. Verwendetes Gerät war ein Zetasizer Nano.....	113
Abbildung 64: TEM-Aufnahmen von Pt@MnO-C-PEG Nanoketten, stabil dispergiert in Ethanol.....	115
Abbildung 65: Aufnahme der stabilen Dispersion von C-PEG-funktionalisierten Pt@MnO-Nanoketten in Ethanol. Die Aufnahme erfolgte drei Tage nach der Funktionalisierung.....	115
Abbildung 66: UV-Vis-Spektrum von C-PEG funktionalisierten Pt@MnO-Nanoketten. Die PEG-Bande zwischen 260 und 300 nm ist zu erkennen. Die leichte Verschiebung zu kleineren Wellenlängen verglichen mit der Absorption von purem PEG ist ein Streueffekt der Partikel, der hier besonders stark auftritt.	116
Abbildung 67: TEM-Aufnahmen von MnO-C-PEG- <i>lin</i> PG- <i>hb</i> PG-Nanopartikeln gebunden auf chloridfunktionalisierten Silicapartikeln (<i>Variante 1</i>).	117
Abbildung 68: TEM-Aufnahmen von MnO-Nanopartikeln auf C-PEG- <i>lin</i> PG- <i>hb</i> PG funktionalisierten SiO ₂ -Cl-Nanopartikeln (<i>Variante 2</i>).....	118
Abbildung 69: TEM-Aufnahmen von Negativtests zur Anbindung von MnO auf Silicapartikel. (A): MnO-Partikel mit Polymer agglomerieren zusammen mit unbehandelten Silicapartikeln. (B): Unbehandelte MnO-Partikel liegen frei neben chloridfunktionalisierten Silicapartikeln vor.	119
Abbildung 70: TEM-Aufnahmen von Pt@MnO-C-PEG- <i>lin</i> PG- <i>hb</i> PG Nanoketten gebunden auf chloridfunktionalisierten Silicapartikeln (<i>Variante 1</i>).	120

Abbildung 71: Schematische Darstellung eines Heterodimers mit einem Gemisch aus C-PEG ₇₄ und C-PEG ₁₂₈ - <i>b</i> -PGA-DOTA.	122
Abbildung 72: Dünnschichtchromatographie von zwei ⁶⁸ Ga markierten DOTA-Nanopartikel-Proben nach Auswertung mittels <i>Instant Imager</i> zur Visualisierung lokaler, radioaktiver Zonen.	123
Abbildung 73: FACS-Analyse der Bindung/Aufnahme von FITC-markierten Nanopartikeln mit DEC205-Antikörper (schwarz), Isotyp-Antikörper (hellgrau) und ohne Antikörper (dunkelgrau). Die verwendeten Zellen waren <i>CD11c</i> + BMDCs.	125
Abbildung 74: Viabilitätsassay (MTT) von FePt@Fe _x O-C-PEG ₇₄ -C-PEG ₁₂₈ -PGA Partikeln funktionalisiert mit DEC205 Rezeptorantikörper, Isotyp (Kontroll-)Antikörper und ohne Antikörper.	126
Abbildung 75: UV-Vis-Spektren von: (A) Ungebundenen C-PGs in drei verschiedenen Längen mit Absorptionsbanden zwischen 265 und 310 nm. (B) An Nanopartikel gebundene C-PGs in verschiedenen Längen mit entsprechenden leicht verschobenen Absorptionsbanden, was auf Partikeleffekte zurückzuführen ist.	128
Abbildung 76: TEM-Aufnahmen von: (A) - (D) Mit C-PG-funktionalisierte MnO-Nanopartikel, leichte bis mittlere Aggregation, dennoch klare Abtrennung zwischen einzelnen Partikeln erkennbar.	129
Abbildung 77: Aufnahme von bräunlichen NP-C-PEG (links) und violetten NP-C-PG (rechts).	131
Abbildung 78: (A) Aufnahme von stabil dispergierten Nanopartikeln, funktionalisiert mit Catechol-Polymer. (B) Aufnahme von ausgefallenen Nanopartikeln nach Verwendung des noch acetalgeschützten Catechol-Polymers als Beweis für die ausschließliche Anbindung des Polymers über die Catecholfunktion. (C) Aufnahme verschiedener Proben von polymer-funktionalisierten Nanopartikeln, stabil dispergiert und filtriert durch 0,2 µm Filter.	132
Abbildung 79: Aufnahme einer Stabilitätsreihe von Cholesterol- <i>lin</i> PG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln in Wasser. Nach 20 min sind ca. 50% der Dispersion abgesetzt. Zum Vergleich unfunktionalisierte MnO-Partikel in Wasser im Kontrollbild.	134

Abbildung 80: Aufnahme von stabil dispergierten MnO-Nanopartikeln in wässriger Kochsalzlösung, funktionalisiert mit TD-PEG ₅₇ -PGG ₁₂ . Die Aufnahme erfolgte drei Tage nach der Funktionalisierung.	134
Abbildung 81: UV-Vis-Spektrum von TD-PEG ₅₇ -PGG ₁₂ -funktionalisierten MnO-Nanopartikeln. Die schwache Absorptionsbande zwischen 260 und 300 nm entspricht dem längeren PEG-Teil des verwendeten Polymers.	135
Abbildung 82: TEM-Aufnahme von TD-PEG ₅₇ -PGG ₁₂ -funktionalisierten MnO-Nanopartikeln.	135
Abbildung 83: Aufnahmen von MnO-C-PEG-funktionalisierten Nanopartikeln (oben) und entsprechenden Partikeln mit C-PG auf der Oberfläche, gelöst in Serum, dokumentiert über einen Zeitraum von 15 Tagen.	137
Abbildung 84: Größenverteilung von (A) C-PEG ₁₇ und (B) C-PEG ₁₂₈ - <i>b</i> -PGA funktionalisierten MnO-Nanopartikeln (Zetasizer).	139
Abbildung 85: Größenverteilung von (A) C- <i>lin</i> PG ₁₀ und (B) C- <i>lin</i> PG ₂₉ funktionalisierten MnO-Nanopartikeln (Zetasizer).	141
Abbildung 86: Größenverteilung von C- <i>hb</i> PG funktionalisierten MnO-Nanopartikeln (Zetasizer).	141
Abbildung 87: Mikroskopische Aufnahme der Zellkultur 24 h nach dem Aussähen. Die Zellen wachsen adhärent und fangen an einen „Zellrasen“ zu bilden.	157
Abbildung 88: Viabilitätsassay (AlamarBlue [®]) von Dopa-PEG-funktionalisierten MnO-Nanopartikeln in drei Konzentrationen.	159
Abbildung 89: Viabilitätsassay (AlamarBlue [®]) von den unterschiedlichen Längen der Polymere in drei Konzentrationen. Bis auf das C- <i>lin</i> PG ₁₀ (90% Viabilität) gibt es keine negativen Einflüsse auf das Zellwachstum.	160
Abbildung 90: Viabilitätsassay (AlamarBlue [®]) von MnO-Nanopartikeln in zwei Konzentrationen, funktionalisiert mit C- <i>lin</i> PG ₂₉ in verschiedenen NP:Polymer-Verhältnissen.	161
Abbildung 91: Viabilitätsassay (AlamarBlue [®]) von MnO-Nanopartikeln in drei Konzentrationen, funktionalisiert mit C-PEG in vier verschiedenen Längen und C-PEG- <i>b</i> -PGA. .	162
Abbildung 92: Viabilitätsassay (AlamarBlue [®]) von MnO-Nanopartikeln in drei Konzentrationen, funktionalisiert mit drei verschiedenen C- <i>lin</i> PG-Polymeren.	164

Abbildung 93: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von FePt@Fe _x O-Heterodimeren funktionalisiert mit C-PEG und C-PEG/C-PEG- <i>b</i> -PGA in drei Konzentrationen.	166
Abbildung 94: Viabilitätsassay (AlamarBlue®) von Pt@MnO-Heterodimeren funktionalisiert mit C- <i>lin</i> PG in drei Längen und drei unterschiedlichen Konzentrationen..	166

D. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Catechol-Polymere in unterschiedlichen Längen	107
Tabelle 2: Zusammenstellung verschiedener Positiv- und Negativtests für die Kombination von MnO- und Silicapartikeln	119
Tabelle 3: Ergebnisse der winkelabhängigen Lichtstreuung für C-PEG-funktionalisierte MnO-Partikel im Vergleich mit unfunktionalisierten Partikeln.	140
Tabelle 4: Ergebnisse der winkelabhängigen Lichtstreuung für C-PG-funktionalisierte Nanopartikel.	142
Tabelle 5: T_1 und T_2^* -Relaxationszeiten von Partikel- und Vergleichssystemen.....	144

Tabelle 6: HU-Werte von Partikel- und Vergleichsproben.	145
Tabelle 7: Alle verwendeten Chemikalien.	175