

2. Grundlagen

2.1. Poly-(ethylenoxid)

Abbildung 2.1 zeigt die am häufigsten verwendete Form eines linearen Poly-(ethylenoxid) (PEO) mit Hydroxylgruppen an den Kettenenden.

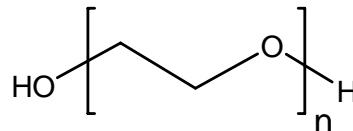


Abbildung 2.1 Strukturformel von PEO.

In Lösung verhält sich PEO so, als ob es ein 5- bis 10-mal größeres Molekulargewicht besäße. Dieses Verhalten wird durch die hohe Flexibilität der PEO-Ketten und die Eigenschaft des PEO, in Lösung 2 bis 3 Moleküle Wasser pro Ethylenoxid-Einheit zu binden, verursacht.¹ Dies wird auch als Grund dafür angesehen, dass PEO Proteine ausfällt², es an Oberflächen die Adsorption von Proteinen und Zellen verhindert³, die Immunogenität und Antigenität verringern kann⁴ und Peptide vor einem enzymatischen Abbau schützt.⁵

Die Adsorption von Proteinen auf mit PEO beschichteten Oberflächen ist vom Molekulargewicht des verwendeten PEO abhängig. Bei Partikeln aus Polymilchsäure (PLA) mit einer Größe von 160 bis 200 nm wurde die geringste Proteinadsorption auf Partikeln gefunden, die mit PEO $M_w = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ beschichtet worden waren.⁶ Eine Erhöhung des Molekulargewichts der PEO-Ketten bis auf $20.000 \text{ g mol}^{-1}$ hatte keine weitere signifikante Verringerung der Proteinadsorption zur Folge. Dagegen zeigten Partikel mit einer Beschichtung aus PEO $M_w = 2000 \text{ g mol}^{-1}$ eine deutlich größere Proteinadsorption. Auch an Oberflächen aus Poly-(ethylenterephthalat) (PET) sinkt die Proteinadsorption mit zunehmender Länge der PEO-Ketten bis zu einem Molekulargewicht des PEO von 3.500 g mol^{-1} .⁷ Eine weitere Erhöhung des Molekulargewichts führte auch hier nicht zu einer weiteren Verringerung der Proteinadsorption.

PEO ist sowohl in Wasser und als auch in vielen organischen Lösungsmitteln gut löslich und wird als toxikologisch unbedenklich eingestuft. Bis zu einem Molekulargewicht von 20 kg mol^{-1} wird das unveränderte PEO schnell über die Niere eliminiert.^{1,8} Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit der oberen Grenze für die freie glomeruläre Filtration in der Niere von Substanzen aus dem Blut, die bei ca. 15 kg mol^{-1} bzw. einer Größe der zu filtrierenden Substanzen von 2 nm bis 4 nm liegt.⁹

PEO findet Verwendung in Arzneimitteln, Lebensmitteln und Kosmetika. Örtliche Reizerscheinungen an normaler und ungeschädigter Schleimhaut wurden bisher nicht beobachtet.¹⁰

2.2. Peptide

Peptide sind Polymere, die aus Aminosäuren bestehen. Es gibt 20 unterschiedliche Aminosäuren, die in allen lebenden Organismen vorkommen. Mit Ausnahme des achiralen Glycins liegen diese Aminosäuren in ihrer L-Konfiguration vor. Nur in einigen wenigen durch Bakterien produzierten Peptiden kommen auch D-Aminosäuren vor.¹¹ Die Aminosäuren sind durch eine Peptidbindung zwischen dem α -Carbonyl-Kohlenstoff einer Aminosäure und der α -Aminogruppe der nächsten Aminosäure miteinander verknüpft. Diese Peptidbindung besitzt mit 132 pm einen kurzen Bindungsabstand und ist durch Resonanzstrukturen in der Rotationsmöglichkeit sehr beschränkt und nahezu planar.

Die Aminosäuresequenz stellt die Primärstruktur eines Peptids dar und bestimmt die Bildung weiterer Überstrukturen durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuren. Die sekundäre Struktur ist die Konformation der Peptidkette, die durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Es kann zwischen Helix-, Faltblatt- und Knäuel-Konformation unterschieden werden. Die helikale Struktur, die in der Natur am häufigsten vorkommt, ist die rechtsgängige α -Helix. Zwischen jeder vierten Aminosäure bilden sich Wasserstoffbrücken so aus, dass eine Windung der α -Helix aus 3.6 Aminosäuren gebildet wird. Die Ganghöhe dieser Helix beträgt 0.35 bis 0.5 nm, je nach Wechselwirkung zwischen den übereinander liegenden Aminosäuren. Für die Ausbildung einer α -Helix muss eine Mindestanzahl von 20 Aminosäuren vorhanden sein.^{12,13} Die weitere Faltung der Peptid-Kette führt zur Ausbildung der tertiären Struktur, die durch Wechselwirkungen zwischen weit voneinander entfernten Aminosäuren stabilisiert wird. Die räumliche Anordnung der Proteine untereinander ist als quartäre Struktur klassifiziert.

Durch die Zerstörung ihrer Wasserstoffbrückenbindungen wandelt sich die sekundäre Struktur der Peptide von einer α -Helix reversibel zur Knäuel-Konformation um. Dies kann entweder durch Temperaturerhöhung, stark saure Lösungsmittel (Dichloressigsäure, Trifluoressigsäure) oder bei ionischen Polypeptiden durch eine Erhöhung des Ionisierungsgrades der Seitengruppen geschehen. Bei ionischen Polypeptiden sind es die abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren, die die Wasserstoffbrücken und damit die sekundäre Struktur destabilisieren und die Umwandlung in die Knäuel-Konformation bewirken.

2.3. Poly-(glutaminsäure) und Poly-(asparaginsäure)

L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure sind als in Proteinen vorkommende nichtessentielle Aminosäuren weit in der Natur verbreitet. L-Glutaminsäure spielt im Körper bei dessen Entgiftung von Ammoniak und der Säureelimination durch die Nieren eine wichtige Rolle.¹⁴ Im Nervensystem sind L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure als erregende Neurotransmitter an der chemisch-synaptischen Signalübertragung beteiligt.¹⁵ Abbildung 2.2 zeigt die Strukturformeln von L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure.

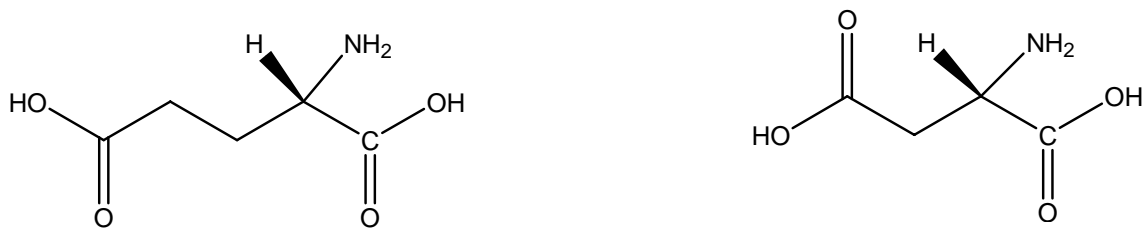


Abbildung 2.2 Strukturformeln von L-Glutaminsäure (links) und L-Asparaginsäure (rechts).

Die aus L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure bestehenden Homopolymere Poly-(L-glutaminsäure) und Poly-(L-asparaginsäure) sind bioabbaubar, biokompatibel und wasserlöslich und können durch ihre freien Carbonsäure-Gruppen Arzneistoffe komplexieren. Die beim Abbau der Homopolymere entstehenden Monomere (L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure) sind ebenfalls toxikologisch unbedenklich und biokompatibel.¹⁶

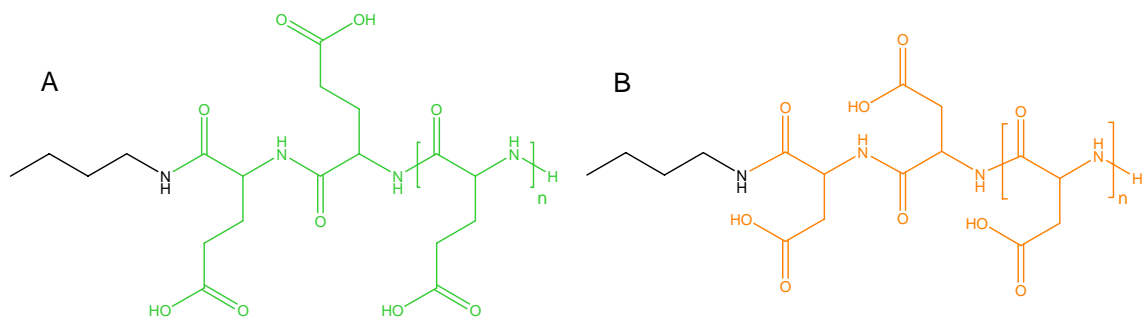


Abbildung 2.3 Strukturformeln von Homopolymeren aus Glutaminsäure (grün) und Asparaginsäure (orange). **A** Poly-(glutaminsäure) und **B** Poly-(asparaginsäure) mit n-Butylamin (schwarz) als Initiator der Polymerisationsreaktion.

Poly-(asparaginsäure) findet zum Beispiel Anwendung in Dialysemembranen, orthopädischen Implantaten, künstlicher Haut und als Zusatzstoff in Wasch- und Reinigungsmitteln.¹⁷ Die Eignung von Poly-(glutaminsäure) als biologischer Klebstoff und zum *drug delivery* wird zurzeit intensiv untersucht, ein Überblick dazu findet sich bei Richard¹⁸ und Shih¹⁹. Es hat sich gezeigt, dass die Bindung von Poly-(glutaminsäure) an ein Zytostatikum bei gleich bleibender oder

verstärkter Antitumorwirkung die Toxizität des Arzneistoffs verringert. Dieser Effekt konnte im Tier für die Zytostatika Taxol,²⁰ Camptotecin,²¹ und Doxorubicin²² an verschiedenen Tumormodellen gezeigt werden.

Die Sekundärstruktur von Poly-(L-glutaminsäure) und Poly-(L-asparaginsäure) lässt sich leicht durch die Änderung des pH-Wertes beeinflussen. In Abhängigkeit vom pH-Wert kommt es zu einem Knäuel-Helix-Übergang. Liegen die Seitenketten bei pH 4 ungeladen vor, bildet sich eine α -Helix aus, sind sie dagegen bei pH 8 geladen, eine Knäuel-Konformation.²³

Synthetisch können Poly-(L-glutaminsäure) und Poly-(L-asparaginsäure) durch die ringöffnende Polymerisation der N-carboxyanhydride (NCA) der entsprechenden Aminosäuren hergestellt werden. Die Synthese der NCA erfolgt über eine Phosgenierung der Benzylester der Aminosäuren.²⁴ Überblicke zur Synthese und Polymerisation von Poly-(aminosäuren) geben Kricheldorf²⁵ und Deming.²⁶

2.4. Blockcopolymere aus Poly-(ethylenoxid), Poly-(glutaminsäure) und Poly-(asparaginsäure)

Blockcopolymere sind Makromoleküle, die aus mindestens zwei unterschiedlichen kovalent verknüpften Homopolymer-Blöcken bestehen. Blockcopolymere können systematisch nach Anzahl der unterschiedlichen Homopolymer-Blöcke (Di-, Tri-, Multiblockcopolymere) oder nach der Art der Verknüpfung der Blöcke (linear, sternförmig, gepropft) unterschieden werden (Abbildung 2.4). Die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Blockcopolymeren lassen sich durch die Eigenschaften der Monomere, die Anzahl und Länge der Blocksegmente und deren Verknüpfung gezielt variieren.²⁷

Ein Sonderfall sind Blockcopolymere, bei denen beide verwendete Blöcke wasserlöslich sind. Diese doppelhydrophilen Blockcopolymere können zum Beispiel aus einem Poly-(ethylenoxid)-Block (PEO) und einem Poly-(glutaminsäure)-Block aufgebaut sein, wobei der Poly-(glutaminsäure)-Block mit Oberflächen und Arzneistoffen interagieren kann, während das PEO für eine Stabilisierung der gebildeten Strukturen sorgt. Zusätzlich bieten doppelhydrophile Blockcopolymere die Möglichkeit, durch Veränderungen der Ionenstärke, Temperatur oder des pH-Wertes einen der beiden Blöcke gezielt zu beeinflussen, so dass aus dem zuvor hydrophilen Block ein hydrophober Block entsteht. Die hydrophoben Eigenschaften bleiben dabei so lange bestehen, bis durch eine erneute Veränderung der Ionenstärke, Temperatur oder des pH-Wertes beide Blöcke wieder hydrophilen Charakter aufweisen.²⁸

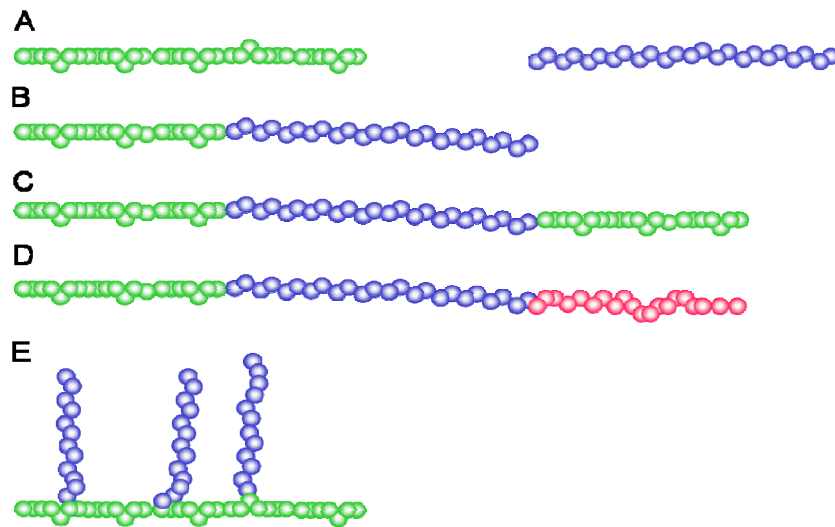


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung verschiedener Polymere. **A** Zwei Homopolymere aus unterschiedlichen Monomeren (grün und blau). **B** Diblockcopolymer mit der Struktur A-B. **C** Diblockcopolymer der Struktur A-B-A. **D** Triblockcopolymer der Struktur A-B-C. **E** Pfropfcopolymer (Graftcopolymer) mit 3 gepfropften Ketten (blau).

Blockcopolymer aus PEO und einer Poly-(aminosäure) sind für die Anwendung in der Medizin besonders interessant, da sie aus toxikologisch unbedenklichen Bausteinen (PEO und natürliche Aminosäuren) bestehen und die Auswahl der jeweiligen Aminosäuren eine Funktionalisierung der Blockcopolymer erlaubt. Die Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure bieten durch ihre zusätzlichen Carbonsäure-Funktionen in der Seitenkette die Möglichkeit, andere Substanzen (Arzneistoffe) zu komplexieren und über die Anzahl der Aminosäuremoleküle im Polymer und den pH-Wert Oberflächenladungen gezielt einzustellen.

In der Literatur finden sich bislang keine Untersuchungen zur Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Block- oder Pfropfcopolymeren aus PEO und Poly-(asparaginsäure)- bzw. (glutaminsäure)-Blöcken. Es gibt Untersuchungen zu linearen Blockcopolymeren aus PEO und einem Poly-(asparaginsäure)-Block (PEO-*b*-Asp), die zum *drug delivery* für Zytostatika, zum Schutz von Enzymen oder zum Gentransfer verwendet wurden. Doxorubicin (Adriamycin) wurde kovalent an die Asparaginsäure-Einheiten von PEO-*b*-Asp gebunden. Dieses Polymer bildet Mizellen und hat *in vivo* eine hohe Aktivität gegen verschiedene solide Tumoren und P388-Leukämie gezeigt.^{29,30} Das Zytostatikum Cisplatin komplexiert mit den Asparaginsäure-Einheiten des PEO-*b*-Asp und bildet mit diesem zusammen Mizellen.³¹ Aus dem kationischen Enzym Lysozym und PEO-*b*-Asp bilden sich Mizellen, in deren Inneren das Lysozym eingeschlossen wird.³² Als Vektoren für den nicht-viralen Gentransfer entwickelten Kataoka *et al.* Nanopartikel, die aus PEO-*b*-Asp beschichteten Calciumphosphat-Partikeln bestehen und in deren Kern sich RNA oder Oligodesoxyribonukleotide be-

finden.³³ Diese Partikel zeigten eine verstärkte intrazelluläre Aufnahme und Expression der RNA im Luciferase-Test. Außerdem wurde das Komplexierungsverhalten von PEO-*b*-Asp mit PEO-*b*-poly-(lysin)³⁴ und Poly-(lysin)³⁵ untersucht. Sowohl PEO-*b*-poly-(lysin) als auch Poly-(lysin) bilden mit PEO-*b*-Asp Polyionenkomplex-Mizellen mit einer 1:1-Stöchiometrie der beiden beteiligten Aminosäuren.

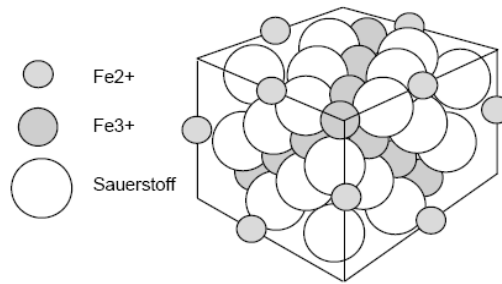
Das Blockcopolymer PEO-*b*-poly-(glutaminsäure) (PEO-*b*-Glu) bildet mit dem schlecht wasserlöslichen Cisplatin-Analogen DACHPt (Dichloro(1,2-diaminocyclohexan)platin(II)) 40 nm große Mizellen, die bei *in-vitro*-Tests an C-26 Kolonkarzinomzellen von Mäusen eine geringere Toxizität aufwiesen als das freie DACHPt.³⁶ Die kovalente Bindung eines Antikörpers gegen Rezeptoren des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor*, EGF) an das Polymer-Arzneistoffkonjugat PEO-*b*-Glu-Doxorubicin führte zu einem rezeptorvermitteltem *drug delivery* des Zytostatikums mit einer verstärkten Wirkung auf humane Epidermoidzellen A 431 im Vergleich zu freiem Doxorubicin.³⁷ Boulmedais *et al.* entwickelten antimikrobielle Polyelektrolyt-Beschichtungen aus Poly-(lysin) und dem Pfropfcopolymer Poly-(glutaminsäure)-*g*-PEO.³⁸ Es konnte gezeigt werden, dass diese Beschichtung Oberflächen vor der Adhäsion von Bakterien schützen kann.

Die Synthese von Blockcopolymeren kann über eine kovalente Verknüpfung von fertigen Homopolymersegmenten, durch sequentielle Polymerisation unterschiedlicher Monomere oder durch die Initiierung der Polymerisation mittels polymerer Makroinitiatoren erfolgen.

2.5. Eisenoxid-Nanopartikel

Eisenoxide kommen in der Natur in vielen verschiedenen Zusammensetzungen und mit unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften vor. Für die medizinische Anwendung sind besonders die ferromagnetischen Eisenoxide Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) interessant. Sie besitzen ähnliche physikalische Eigenschaften und Kristallstrukturen und kristallisieren als inverse Spinelle.³⁹

Beim Magnetit besetzen die Eisenionen die Hälfte der vorhandenen Oktaederlücken und ein Achtel der vorhandenen Tetraederlücken. Die Aufteilung der zwei- und dreiwertigen Ionen erfolgt nach dem Muster des inversen Spinells. Eine Hälfte der dreiwertigen Eisenionen besetzt die Tetraederlücken und die andere Hälfte besetzt zusammen mit den zweiwertigen Eisenionen die Oktaederlücken (Abbildung 2.5).

Abbildung 2.5 Kristallstruktur von Magnetit.⁴⁰

Maghemit leitet sich von der Struktur des Magnetits ab, im Unterschied zum Magnetit sind aber alle vorkommenden Eisenionen dreiwertig. Zum Ladungsausgleich existieren beim Maghemit deshalb Leerstellen auf den Oktaederplätzen.³⁹

Bei der Herstellung von Maghemit- bzw. Magnetit-Partikeln entstehen leicht Gemische beider Eisenoxide, wenn die Reinheit und richtige Stöchiometrie der Reagenzien nicht gewährleistet ist. Bei höheren Temperaturen (200-300°C) oxidieren Magnetit und Maghemit zum thermodynamisch stabilen Hämatit ($\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$), das nur sehr schwach ferromagnetisch ist. Bei vorsichtiger Oxidation und niedrigeren Temperaturen entsteht aus Magnetit aber nicht Hämatit, sondern das metastabile Maghemit, das nur eine etwas geringere Magnetisierbarkeit als Magnetit besitzt.

In wässrigen Systemen reagieren die oberflächlichen Eisen-Ionen des Magnetits oder Maghemits mit Wasser-Molekülen und bilden eine mit Hydroxyl-Gruppen funktionalisierte Eisenoxid-Oberfläche aus.³⁹

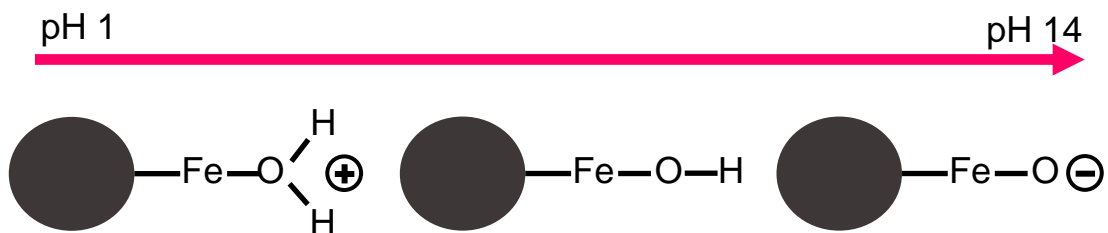


Abbildung 2.6 Änderung der Oberflächenladung von Maghemit-Partikeln bei einer Veränderung des pH-Werts.

Die Eisenoxid-Partikel weisen durch die amphoteren Hydroxyl-Gruppen abhängig vom pH-Wert eine positive, negative oder neutrale Oberflächenladung auf. Die Oberflächenladung ist im sauren pH-Bereich positiv und wird zu basischen pH-Werten hin immer negativer. Der isoelektrische Punkt wird bei

einem pH-Wert von 4 bis 6 durchlaufen. Um ein unter physiologischen Bedingungen stabiles Ferrofluid zu erhalten, müssen die Maghemit- oder Magnetit-Partikel stabilisiert werden. Dies kann durch eine elektrostatische Stabilisierung, zum Beispiel mit Citrat, oder durch eine sterische Stabilisierung mit Polymeren erreicht werden. Die elektrostatische Stabilisierung ist pH-sensitiv und besonders bei Anwendung der Partikel unter physiologischen Bedingungen nur begrenzt verwendbar.

Ferromagnetische Substanzen werden superparamagnetisch, wenn die einzelnen Partikel eine kritische Größe unterschreiten. Bei Magnetit und Maghemit ist die kritische Größe bei Raumtemperatur ca. 20 nm, das heißt, die Partikel müssen kleiner 20 nm sein, damit Superparamagnetismus auftritt. Die kritische Kristallgröße ist dabei abhängig von der Temperatur.

Bei einer Reduktion der Partikelgröße nimmt die Anzahl der Weißschen Bezirke in einem ferromagnetischen Partikel ab (Abbildung 2.7). Weißsche Bezirke sind die magnetisierten Domänen in den Kristallen eines ferromagnetischen Materials. Die magnetischen Momente der Atome sind innerhalb dieser Bezirke parallel ausgerichtet. Unterhalb einer kritischen Größe stellt jedes Teilchen eines Ferrofluids eine eigene Domäne dar, das heißt, alle magnetischen Momente dieses einen Partikels sind parallel angeordnet. Eine stabile Ausrichtung der magnetischen Momente aller Partikel in einem Ferrofluid ist dann nicht mehr möglich, da die thermische Energie ausreicht, um die Ausrichtung der magnetischen Momente zu verhindern. Die magnetischen Momente der einzelnen Partikel im Ferrofluid heben sich nach außen auf.

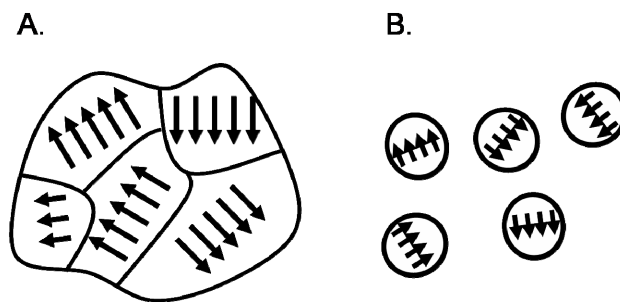


Abbildung 2.7 A. Ferromagnetisches Partikel, bestehend aus 5 Weißschen Bezirken. B. Fünf superparamagnetische Partikel.

In einem Magnetfeld richten sich die magnetischen Domänen, das heißt, die einzelnen superparamagnetischen Partikel, in Feldrichtung aus. Das Ferrofluid verhält sich paramagnetisch (Abbildung 2.8). Dieses Verhalten der Partikel bei einem angelegten Feld entspricht dem paramagnetischen Verhalten von Molekülen, die ein permanentes Dipolmoment besitzen. Wird das externe Magnetfeld entfernt, so verliert das Ferrofluid durch die erneute zufällige

Ausrichtung der Partikel sein magnetisches Gesamtmoment und ist nach außen nicht mehr magnetisch.

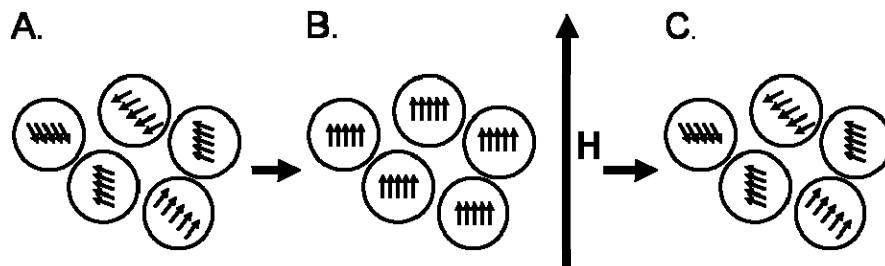


Abbildung 2.8 Verhalten superparamagnetischer Partikel in einem Ferrofluid ohne Magnetfeld (A), in einem äußeren Magnetfeld (B) und nach Entfernung des Magnetfeldes (C).

Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel werden in der Medizin zur Kontrastverstärkung bei Untersuchungen mit Hilfe der MRT verwendet. Sie führen zu einer Abschwächung der Signalintensität und damit im MRT-Bild zu einer Verdunklung der Gewebe, in denen sich die Partikel befinden.

2.6. Diminazen

Diminazen ist ein aromatisches Diamidin aus zwei Amidinophenyl-Strukturen, die über eine Triazenbrücke verbunden sind (Abbildung 2.9). Diminazen ist ein geruchloses, gelbes Pulver, das relativ gut wasserlöslich, in organischen Lösungsmitteln aber schlecht löslich ist.⁴¹

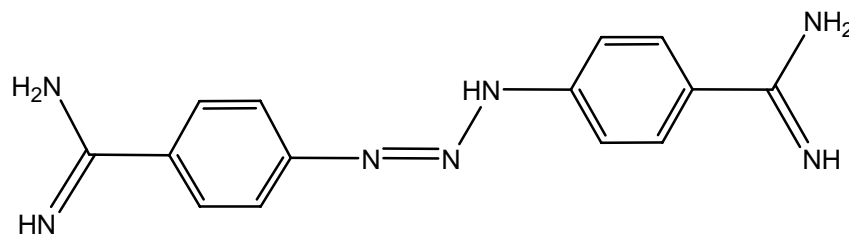


Abbildung 2.9 Strukturformel von Diminazen.

Diminazen wird als Antiprotozoikum zur Behandlung eines Trypanosomenbefalls verwendet. Trypanosomen lösen bei Menschen und Tieren die Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) aus, die unbehandelt tödlich verläuft. Diminazen wird hauptsächlich zur Behandlung der Trypanosomiasis von Rindern verwendet.

Der exakte Wirkungsmechanismus und das Verhalten von Diminazen *in vivo* sind noch nicht bekannt.⁴² *In-vitro*-Versuche zeigten, dass sich Diminazen mit hoher Affinität an die Desoxyribonukleinsäure (DNS) bindet und damit die DNS-

Replikation hemmt. Auch eine Hemmung der mitochondrialen Typ-II-Topoisomerase wird diskutiert.^{43,44} Trypanosomen, die Diminazen ausgesetzt werden, zeigen unter anderem folgende Veränderungen: Aggregation und Verlust der Ribosomen, Modifikation der Lysosomen und der zytoplasmatischen Membran, Hemmung des Aminosäuretransportes und eine Hemmung der DNA- und RNA-Polymerasen.⁴³ Auf diesem Weg wird das Wachstum der sich schnell teilenden Trypanosomen nachhaltig blockiert.⁴⁴ Diminazen wirkt *in vitro* in einer Konzentration von $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ trypanozid.⁴⁵

2.7. Charakterisierungsmethoden

2.7.1. Dynamische Lichtstreuung

Eine verbreitete Methode zur Charakterisierung kolloidaler Systeme ist die dynamische Lichtstreuung (DLS). Dabei wird eine kolloidale Dispersion mit Laserlicht bestrahlt und die Schwankung der Intensität des gestreuten Lichtes detektiert. Die Intensitätsschwankungen werden durch die Brownsche Molekularbewegung der Partikel verursacht. Die Geschwindigkeit, mit der die Partikel ungerichtet durch das Dispersionsmedium diffundieren, bestimmt die Schwankung der Streulichtintensität. Je größer die Partikel sind, desto langsamer bewegen sie sich im Dispersionsmedium und desto geringer wird die Schwankung der Streulichtintensität. Tritt zusätzlich zur Diffusion eine Sedimentation der Partikel auf, ist die obere Messgrenze der DLS erreicht, da durch die gerichtete Bewegung der Sedimentation das Messergebnis verfälscht wird. Im wässrigen Medium eignet sich die DLS zur Größenbestimmung von Partikeln zwischen 5 nm und ca. $5 \mu\text{m}$.⁴⁶

Aus den zeitlichen Schwankungen der Streulichtintensität wird mit Hilfe eines Korrelators eine Autokorrelationsfunktion erstellt und an diese gemessene Autokorrelationsfunktion eine theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ angepasst:

$$g(\tau) = e^{-2DK^2\tau} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

mit τ Verzögerungszeit
 D Diffusionskoeffizient
 K Betrag des Streulichtvektors

Aus dem mit Hilfe der theoretischen Korrelationsfunktion $g(\tau)$ bestimmten Diffusionskoeffizienten D wird über die Stokes-Einstein-Gleichung die Partikelgröße berechnet. Über die Stokes-Einstein-Gleichung ist der Zusammenhang zwischen der Partikelgröße r und der Diffusionskonstante D beschrieben:

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Gleichung 2.2

mit	r	Partikelradius
	k	Boltzmann-Konstante
	T	absolute Temperatur
	D	Diffusionskoeffizient
	η	dynamische Viskosität

Bei Anpassung einer exponentiellen Korrelationsfunktion an die gemessene Autokorrelationsfunktion liefert die DLS als Ergebnis den mittleren intensitätsgewichteten Partikeldurchmesser (*z-average*) und den Polydispersitätsindex (PDI). Der PDI beschreibt mathematisch den Unterschied der gemessenen Autokorrelationsfunktion zur angepassten Korrelationsfunktion und ist ein Maß für die Breite der Verteilung (Cumulanten Analyse, ISO 13321). Um eine Partikelgrößenverteilung zu erhalten, werden mehrfach Exponentialfunktionen an die Autokorrelationsfunktion angepasst (Methode nach CONTIN).

Bei der Messung nicht-sphärischer Partikel muss beachtet werden, dass der durch die DLS berechnete hydrodynamische Durchmesser, der Durchmesser eines sphärischen Partikels ist, das den gleichen Diffusionskoeffizienten besitzt wie das vermessene Partikel.

2.7.2. $^1\text{H-NMR}$

Eine wichtige Methode zur Bestimmung des zahlenmittleren Molekulargewichts M_n von Blockcopolymeren ist die Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$). Aus dem Flächenverhältnis charakteristischer Signale zweier Monomereinheiten A und B können die Zusammensetzung des Blockcopolymers und damit die entsprechenden Molenbrüche der beiden Blöcke berechnet werden. Ist das Molekulargewicht des einen Blocks bekannt, kann M_n des Blockcopolymers berechnet werden

$$M_n = \left(1 + \frac{M_B \cdot f_B}{M_A \cdot f_A} \right) \cdot M_n^{\text{Precursor}}$$

Gleichung 2.3

mit	M_A	Molmasse der Monomereinheiten A
	M_B	Molmasse der Monomereinheiten B
	f_A	Molenbruch des Monomers A
	f_B	Molenbruch des Monomers B

2.7.3. Röntgendiffraktometrie

Bei der Röntgendiffraktometrie treten Röntgenstrahlen mit den Elektronenhüllen von Festkörperatomen in Wechselwirkung. Besitzt der Festkörper eine periodische Atomanordnung, treten charakteristische Interferenzmuster als Folge dieser Wechselwirkungen auf.

Geeignete Beugungsgitter für Röntgenstrahlen sind die regelmäßigen Gitterstrukturen von Kristallen, da hier die Gitterkonstante der Kristalle und die Wellenlänge der Röntgenstrahlung von ähnlicher Größenordnung sind (Wellenlänge $\lambda = 0,1 \text{ pm bis } 10 \text{ nm}$).

Im elektromagnetischen Feld der einfallenden Röntgenstrahlung werden die Elektronen der Atome zu erzwungenen Schwingungen angeregt und strahlen nun selbst Röntgenstrahlen gleicher Frequenz ab. Die konstruktive und destruktive Interferenz der von den Atomen abgestrahlten Röntgenstrahlung erzeugt die Beugungserscheinungen.

Bei der Kristallstrukturanalyse werden Röntgenstrahlen an Kristallen gebeugt und daraus die räumliche Anordnung der Atome im Kristall abgeleitet. Die Bragg-Gleichung ist die zugrunde liegende mathematische Beziehung

$$2d \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda \quad \text{Gleichung 2.4}$$

mit λ Wellenlänge
 d Netzebenenabstand
 n Ordnung des Beugungsmaximums
 θ Winkel des einfallenden Röntgenstrahls

Die zu untersuchende Substanz wird mit einem monochromatischen Röntgenstrahl bestrahlt. Bei einem Netzebenenabstand d wird dieser Strahl um 2θ abgelenkt, wenn der einfallende Strahl in einem Winkel von θ eingefallen ist. Aus den Größen n , λ und θ wird der gesuchte Netzebenenabstand d_{hkl} berechnet. hkl bezeichnet die Gesamtzahl aller parallelen Netzebenen mit den Millerschen Indizes. Aus dem Netzebenenabstand d_{hkl} lassen sich die Gitterkonstanten der Elementarzelle ableiten.

2.7.4. Mössbauer-Spektroskopie

Bei der Mössbauer-Spektroskopie untersucht man mit Hilfe von γ -Strahlung Übergänge zwischen unterschiedlichen Kern-Energieniveaus. Das am häufigsten verwendete Isotop ist ^{57}Fe , das durch radioaktiven Zerfall von ^{57}Co entsteht.

Die von der Strahlungsquelle ausgesandten γ -Quanten durchdringen die Probe, die ebenfalls ^{57}Fe enthält, und erreichen dann einen Detektor. Gemessen werden bei der Mössbauer-Spektroskopie kleine Unterschiede der Übergangsenergien zwischen der Quelle und der Probe. Diese Unterschiede kommen durch Hypereinwechselwirkungen zwischen den Kernen und ihrer Umgebung zustande und geben Informationen über die Umgebung der absorbierenden Kerne.

Bei Aufnahme der Mössbauer-Spektren macht man sich neben dem Mössbauer-Effekt den Doppler-Effekt zu nutze. Eine hyperfeine Modulation eines Gammastrahlers wird erzeugt, indem man ihn während der Messung mechanisch bewegt. So lassen sich in einem Hyperfeinspektrum γ -Quanten mit verschiedenen Energiepotentialen erzeugen.

Die Mössbauer-Spektroskopie gibt unter anderem Informationen über den Oxidationszustand, Bindungseigenschaften und die magnetischen Eigenschaften der untersuchten Substanz.

2.7.5. Circular dichroismus-Spektroskopie

Unter Circular dichroismus (CD) versteht man die unterschiedliche Absorption von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht im UV-VIS-Bereich durch optisch aktive Moleküle.⁴⁶

Proteine eignen sich besonders gut für Untersuchungen mit Hilfe der CD-Spektroskopie in wässriger Lösung. Alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren, mit Ausnahme des Glycins, besitzen ein asymmetrisch substituiertes α -Kohlenstoffatom und absorbieren zirkular polarisiertes Licht. Zusätzlich zur intrinsischen optischen Aktivität der Aminosäuren trägt auch die Ausbildung der individuellen Konformation eines Peptids zur Form des CD-Spektrums bei. CD-Spektren von Proteinen sind deshalb ebenso spezifisch wie die Faltung einer Peptidkette.

Die Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R für links- bzw. rechtspolarisiertes Licht unterscheiden sich für optisch aktive Substanzen. Die Differenz

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \qquad \text{Gleichung 2.5}$$

kann negativ oder positiv sein, das heißt, der links- oder rechtszirkular polarisierte Strahl kann stärker absorbiert werden. Die Differenz $\Delta\varepsilon$ ist die eigentliche Messgröße in der CD-Spektroskopie.

In der praktischen CD-Spektroskopie wird die Elliptizität Θ_λ gemessen, die definiert ist als

$$\tan \Theta_{\lambda} = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L}$$

Gleichung 2.6

mit I_R Intensität des rechtszirkular polarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang

I_L Intensität des linkszirkular polarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang

Über das Lambert-Beersche Gesetz

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d}$$

Gleichung 2.7

mit I_0 Intensität des Lichts vor dem Absorptionsvorgang

I Intensität des Lichts nach dem Absorptionsvorgang

ε Extinktionskoeffizient

c Konzentration

d Schichtdicke

ist die Intensität des Lichtes mit dem Extinktionskoeffizienten ε verknüpft. Man erhält daraus näherungsweise für die Elliptizität Θ_{λ}

$$\Theta_{\lambda} = \ln 10 \cdot \frac{180^{\circ}}{4\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2.8

Durch Normierung auf die Konzentration c und die Schichtdicke d erhält man die spezifische Elliptizität $[\Theta]_{\lambda}$

$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{\Theta}{c \cdot d}$$

Gleichung 2.9

Bei Polymeren und Proteinen ist es auch üblich, die molare Elliptizität $[\Theta_M]_{\lambda}$ anzugeben, die sich auf die mittlere Molmasse der optisch aktiven Monomereinheiten bezieht

$$[\Theta_M]_{\lambda} = \frac{[\Theta]_{\lambda} \cdot M}{100}$$

Gleichung 2.10

mit M mittlere Molmasse der optisch aktiven Monomere

Θ_{λ} Elliptizität

Der Faktor 100 entspringt historischen Konventionen.

Die CD-Spektren von Proteinen geben Aufschluss über deren Sekundärstrukturen (α -Helix, β -Faltblatt, Knäuel-Konformation) und lassen sich in zwei charakteristische spektrale Bereiche aufteilen. Der Peptidbereich bei 160 nm bis 230 nm ist empfindlich für die Detektion von Sekundärstrukturen und wird verwendet, um Änderungen in der Konformation der Peptidkette zu verfolgen. Zum Beispiel liegen die Chromophore bei einer α -Helix in einer chiralen Umgebung eng beisammen und es kommt zu einer Verstärkung der Signalintensität. Dadurch geben α -Helices sehr gute Signale bei einer Wellenlänge $\lambda = 222$ nm. In einem Wellenlängenbereich oberhalb von 230 nm (230 nm bis 300 nm) absorbieren vor allem die aromatischen Aminosäuren.

Die wenigsten Proteine haben nur ein Sekundärstrukturelement, meist liegen mehrere Sekundärstrukturen gleichzeitig in einem Protein vor, so dass das gemessene CD-Spektrum sich aus einer Überlagerung der einzelnen Strukturen ergibt.

Eine einfache Methode zur Ermittlung des Anteils einer Konformation an der Sekundärstruktur eines Polypeptids geht von einem halbempirischen Ansatz aus, bei dem sich das CD-Spektrum einer Verbindung additiv aus den Beiträgen der einzelnen Strukturelemente zusammensetzt. Grundlage der Berechnungen sind die molaren Elliptizitäten $[\Theta_M]_\lambda$ bei Wellenlängen, die für die jeweiligen reinen Konformationen charakteristisch sind. Zur Abschätzung des α -helikalen Anteils an der Sekundärstruktur eines Peptids können die molaren Elliptizitäten $[\Theta_M]_\lambda$ bei einer Wellenlänge $\lambda = 222$ nm herangezogen werden. Bei dieser Wellenlänge sind die Beiträge des β -Faltblatts und der Knäuel-Konformation zur Gesamte elliptizität am geringsten.

2.7.6. Zetapotential

Das Zetapotential ζ ist ein Maß für die Oberflächenladung von Partikeln und kann durch Messung der elektrophoretischen Mobilität bestimmt werden. Eine ausführliche Darstellung der Theorie findet sich bei Müller.⁴⁷

Geladene Partikel sind in Lösung von einer ladungskompensierenden Schicht umgeben. An der Oberfläche geladener Partikel bildet sich durch Adsorption von Gegenionen eine relativ fest mit den Teilchen verbundene elektrische Doppelschicht (Stern-Schicht). Diese wird umgeben von der beweglichen diffusen Gouy-Chapman-Schicht. Diese diffuse Schicht geht dann in das elektrisch neutrale Lösungsmittel über. Somit nimmt das elektrische Potential innerhalb der diffusen Schicht mit zunehmendem Abstand von der Partikeloberfläche exponentiell ab. Die räumliche Ausdehnung der diffusen Schicht

hängt unter anderem von der Oberflächenladung und der Ionenkonzentration in der Lösung ab.

Wird ein elektrisches Feld angelegt, so bewegen sich die Partikel und ihre Gegenionen jeweils in entgegengesetzte Richtungen. Durch die Bewegung der Teilchen im elektrischen Feld wird ein Teil der diffusen Doppelschicht abgestreift und es bildet sich eine Scherebene. Die Potentialdifferenz an der Scherebene wird als Zetapotential ζ bezeichnet und ist bei maximaler Abstreifung der diffusen Schicht gleich dem Stern-Potential. Ein Abstreifen der Stern-Schicht ist nicht möglich, da die Ionen in der Stern-Schicht fest adsorbiert sind.

Die Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit der Partikel werden bei der Messung des Zetapotentials durch Lichtstreuverfahren gemessen. Bei einer gegebenen Salzkonzentration und einem definierten angelegten elektrischen Feld ist das Zetapotential proportional zur elektrophoretischen Mobilität der Partikel. Aus der Partikelgeschwindigkeit und der angelegten Feldstärke wird die elektrophoretische Mobilität der Partikel berechnet und kann mit Hilfe verschiedener Gleichungen (Helmholtz-Smoluchowski-, Henry-, Debye-Hückel-Gleichung) in das Zetapotential umgerechnet werden.

2.7.7. Größenausschlusschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatographie*, SEC) ist eine Methode zur Bestimmung von Molekulargewichten und -verteilungen von Polymeren.

Im Gegensatz zur Affinitätschromatographie erfolgt die Trennung nicht durch eine Adsorption der Moleküle an die stationäre Phase sondern durch Größenausschluss in den Poren des Säulenmaterials. Die Polymere werden dabei nach ihrem hydrodynamischen Volumen aufgetrennt. Zuerst eluieren Polymere, deren hydrodynamisches Volumen das Volumen der Poren übersteigt. Polymere, die in die Poren des Säulenmaterials hinein diffundieren können, werden später eluiert. Entscheidend für eine gute Trennung ist bei der GPC, dass nur entropische und keine enthalpischen Wechselwirkungen zwischen den Polymermolekülen und dem Säulenmaterial auftreten. Die GPC ist eine Relativmethode, daher ist für die Bestimmung des Molekulargewichts eine geeignete Kalibrierung erforderlich.

Als Ergebnis der Messung erhält man in einem Elugramm die Konzentration der Polymerfraktion c_i in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen V_e . Mit Hilfe einer Eichkurve aus gleichartigen eng verteilten Standardpolymeren mit bekannter

Molmasse können den Elutionsvolumina entsprechende Molmassen zugeordnet werden.

Für die Detektion der Polymerfraktionen werden meist RI- und UV-Detektoren eingesetzt. RI-Detektoren liefern ein zur Masse des gelösten Stoffes proportionales Signal. Für die UV-Detektion gibt es zwei unterschiedliche Modi: Ist die Wellenlänge auf das Absorptionsmaximum der Monomereinheit eingestellt, erhält man die gleiche Information wie beim RI-Detektor. Misst man beim Absorptionsmaximum chromophorer Endgruppen, erhält man ein zur Anzahl der Polymer-Ketten proportionales Signal. Zusätzlich können molmassenspezifische Detektoren wie beispielsweise Lichtstreu- und Viskositäts-Detektoren verwendet werden, die die Bestimmung absoluter Molekulargewichte und -verteilungen ermöglichen.^{53, 54}

2.7.8. UV-VIS-Spektroskopie

Die UV-VIS-Spektroskopie gehört zu den Elektronenanregungs-Methoden. Dabei werden Wellenlängenbereiche von 190 nm bis ca. 700 nm verwendet, um Elektronen aus besetzten n- oder π -Orbitalen in ein unbesetztes Orbital anzuheben. Atomgruppen eines Moleküls, die Licht des UV-VIS-Wellenlängenbereichs absorbieren können, sind zum Beispiel ungesättigte Gruppen, wie Doppelbindungen und aromatische Systeme.

Gemessen wird das Absorptionsspektrum einer Substanz, das heißt, die Intensität des nicht absorbierten Lichtes in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ . Das aus der Lichtquelle tretende Licht wird dabei im Monochromator nach Wellenlängen zerlegt und danach in zwei gleiche Lichtstrahlen geteilt. Diese durchlaufen jeweils eine Mess- und eine Vergleichsküvette. Der Absorptionsunterschied wird im Detektor registriert und danach als wellenlängenabhängiges Spektrum aufgezeichnet. Charakteristisch in einem Absorptionsspektrum einer Substanz sind die Absorptionsmaxima und die Wellenlängen, bei der die Maxima auftreten.

Die Absorption erfolgt für verdünnte Lösungen und monochromatisches Licht nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

2.7.9. Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie liefert ähnlich wie die Infrarot-Spektroskopie Informationen über Schwingungs- und Rotationszustände von Molekülen. Die physikalischen Grundlagen und die Anregung der Probe sind jedoch unterschiedlich.

Bei der Raman-Spektroskopie werden die Wellenlängen und Intensitäten von gestreutem Licht unter Ausnutzung des Raman-Effekts gemessen. Der Raman-Effekt entsteht durch die Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der Elektronenhülle der Moleküle. Zur Anregung der Moleküle wird eine intensive monochromatische Laser-Strahlung auf die Probe gerichtet. Der größte Teil des Laserlichtes durchstrahlt die Probe, ein sehr kleiner Anteil wird von der Substanz in alle Raumrichtungen gestreut (Rayleigh-Streuung, gleiche Frequenz wie der Laser). Ein noch viel geringerer Anteil des eingestrahnten Lichts wird mit einer Frequenzverschiebung gestreut (Raman-Streuung). Verantwortlich dafür ist die Deformierbarkeit der Elektronenhülle (Polarisierbarkeit) des Moleküls während des Schwingungsvorgangs. Der Raman-Effekt tritt nur auf, wenn sich die Polarisierbarkeit des Moleküls im Verlauf der Kernschwingung ändert. Wenig polare Bindungen oder Moleküle mit leicht deformierbaren Elektronenhüllen (zum Beispiel S-H, C=C) sind stark Raman-aktiv.

Die Wellenzahldifferenz zwischen der Raman-Streustrahlung und der eingestrahnten Anregungsstrahlung wird in einem Raman-Spektrum den angeregten Molekülschwingungen zugeordnet.

Referenzen

- ¹ Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 459 - 476
- ² Polson, A., A theory for the displacement of proteins and viruses with polyethylene glycol, *Prep. Biochem.* **1977**, 7, 129. 154
- ³ Gombotz, W. R.; Guanghai, W.; Horbett, T. A.; Hoffmann, A. S.; Protein adsorption to and elution from polyether surfaces, *Polyethylene Glycol Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum, New York **1992**, 247 - 261
- ⁴ Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F.; Alteration of immunological properties of bovine serum albumine by covalent attachment of polyethylene glycol, *J- Biol. Chem.* **1977**, 252, 3578 - 3581
- ⁵ Working, P. K.; Newman, M. S.; Jonson, J. et al.; Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives, *Poly(ethylene glycol) chemistry and biological applications*, ACS Books, Washington **1997**, 45 - 57
- ⁶ Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand. M. ; Dellacherie, E. ; Harnisch, S. ; Blunk, T.; Müller, R. H.; Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, 301
- ⁷ Gombotz W. R.; Guanghai, W.; Horbett, T. A.; Hoffman A. S.; Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, **2004**, 25, 12, 1547
- ⁸ Yamaoka, T.; Tabata, Y.; Ikada, Y.; Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J. Pharm. Sci* **1994**, 83, 601–606
- ⁹ Klinke, R.; Pape, H. C.; Silbernagel, S; *Physiologie* **2005**, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 325
- ¹⁰ *Römpp Lexikon Chemie* **1999**, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- ¹¹ Van Holde, K. E.; Johnson, W. C.; Ho, P. S.; Physical Biochemistry **2005**, 38-40
- ¹² Harada, A.; Cammas, S.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1996**, 29, 6183-6188
- ¹³ Rinaudo, M.; Domard, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6360-6364
- ¹⁴ Schmidt, R. F.; Thews G., *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, **1990**, 795

- ¹⁵ Forth W.; Henschler, D.; Rummel W., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban und Fischer **2001**, 122
- ¹⁶ Li, C.; Poly(L-glutamic acid) anti cancer drug conjugates; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 695-713
- ¹⁷ Roweton, S.; Huang, S. J.; Swift, G., Poly(aspartic acid): Synthesis Biodegradation, and Current Applications, *Journal of Environmental Polymer Degradation* **1997**, 5, 3
- ¹⁸ Richard, A.; Margaritis, A.; Poly(glutamic acid) for Biomedical applications.; *Critical reviews in Biotechnology* **2001**, 21, 4, 219 - 232
- ¹⁹ Shih, I. L.; Van, Y. T.; Shen, M. H.; Biomedical Applications of Chemically and Microbiologically Synthesized Poly(Glutamic Acid) and Poly(Lysine); *Mini Rev Med Chem.* **2004**;4, 179
- ²⁰ Li, C.; Price, J. E.; Milas, L.; Hunter, N. R.; Ke, S.; Yu, D. F.; Charnsangavej, C.; Wallace, S.; Antitumor Activity of Poly(L-glutamic acid)-Paclitaxel on Syngeneic and Xenografted Tumors, *Clinical Cancer Research* **1999**, 5, 891–897
- ²¹ Singer, J. W.; Bhatt, R.; Tulinsky, J.; Buhler, K. R.; Heasley, E.; Klein, P., de Vries, P.; Water-soluble poly-(L-glutamic acid)–Gly-camptothecin conjugates enhance camptothecin stability and efficacy in vivo. *Journal of Controlled Release* **2001**, 74, 243
- ²² Hoes, C. J. T.; Grootenk, J., Duncan, R.; Hume, I. C.; Bhakoo, M.; Bouma, J. M. W.; Feijen, J.; Biological properties of adriamycin bound to biodegradable polymeric carriers. *Journal of Controlled Release* **1993**, 27, 37
- ²³ Kimura T.; Takahashi, K.; Akiyama, S.; Uzawa, T.; Ishimori, K.; Morishima, I.; Direct Observation of the Multistep Helix Formation of Poly-L-glutamic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 39, 11596-11597
- ²⁴ Daly, W. H.; Poché, D.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5859
- ²⁵ Kricheldorf, H. R., Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerisation, CRC Press **1990**, Kapitel 1
- ²⁶ Deming, T. J.; *J. Polymer Science A: Polymer Chemistry* **2000**, 38, 3011
- ²⁷ Tieke, B.; *Makromolekulare Chemie* **1997**, VCH Weinheim
- ²⁸ Cölfen; H.; Double-hydrophilic block copolymers: Synthesis and application as novel surfactants and crystal growth modifiers. *Macromolecular Rapid Communication* **2001**; 22, 219

- ²⁹ Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, Y.; Sakurai, K., Inoue, S.; Characterization and anticancer activity of the micelle forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer, *Cancer Research* **1990**, 50, 1693
- ³⁰ Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Ekimoto, Y.; Shibazaki, C., Kataoka, K.; Toxicity and anti-tumor activity against solid tumors of micelles-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Research* **1991**, 51, 3229
- ³¹ Nishiyama, N.; Yokoyama, M.; Aoyagi, T.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **1999**, 15, 377-383
- ³² Harada, A.; Kataoka, K.; Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: Characterization of the micelles prepared at non-stoichiometric mixing ratios. *Langmuir* **1999**, 15, 4208
- ³³ Kakizawa, Y.; Furukawa, S., Kataoka, K.; Block copolymer coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, 97, 345
- ³⁴ Yokoyama, M.; Kwon, G. S.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; *Bioconjug. Chemistry* **1992**, 3, 295
- ³⁵ Harada, A.; Kataoka, K.; *Journal of Macromolecular Science* **1997**, 34, 2119
- ³⁶ Cabrala, H.; Nishiyama, N.; Okazaki, S.; Koyama, H.; Kataoka, K.; Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles. *Journal of Controlled Release* **2005**, 101, 223
- ³⁷ Vega, J.; Ke, S.; Fan, Z.; Wallace, S.; Charsangavej, C.; Li, C.; Targeting Doxorubicin to Epidermal Growth Factor Receptors by Site-Specific Conjugation of C225 to Poly(L-Glutamic Acid) through a Polyethylene Glycol Spacer. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 5, 826
- ³⁸ Boulmedais, F.; Frisch, B.; Etienne, O.; Laval, Ph.; Picart, C.; Ogier, J.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Egles, C.; Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* **2004**, 25, 2003
- ³⁹ Cornell, R. M.; Schwertmann, U.; *The iron oxides* **1996**, VCH Weinheim
- ⁴⁰ Stark, D. D.; Bradley, W. G.; *Magnetic Resonance Imaging* **1992**, Mosby Year Book Inc., St. Louis

- ⁴¹ Brandner G. C. :Antitrypanosome and Antiprotozoal Drugs, in *Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics* **1991**, Baillière Tindall, London ; 564-573
- ⁴² Gummow, B.; Swan, G. E.; Du Preez, J. L.; A bioequivalence and pharmacokinetic evaluation of two commercial diminazene aceturate formulations administered intramuscularly to cattle. *J Vet Res* **1994**, 61, 317-326
- ⁴³ Peregrine, A. S.; Mamman, M.; Pharmacology of diminazene: A review. *Acta Trop* **1993**, 54, 185-203
- ⁴⁴ Steuber, S.; Kroker, R.; Antiprotozoika, in *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren* **1999**, Parey, Berlin, 355-377,
- ⁴⁵ Aliu, Y. O.; Odegaard, S.; Sognen, E.; Diminazene/Berenil: bioavailability and disposition in dairy goats. *Acta Vet Scand* **1984**, 25: 593-596
- ⁴⁶ Winter, R.; Noll, F.; *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, B. G. Teubner, Stuttgart **1998**
- ⁴⁷ Müller, R. H.; *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **1996**