

## 4. Stabilisierung von Maghemit-Nanopartikeln mit Poly-(ethylenimin) und Poly-(ethylenoxid)-*block-poly*-(glutaminsäure)

### 4.1. Einleitung

Superparamagnetische Partikel finden heutzutage als Diagnostika und Therapeutika eine immer breitere Anwendung in der Medizin. Als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) werden sie zur Verbesserung der Diagnose von Lebermetastasen oder Metastasen der Lymphknoten (Resovist<sup>®</sup>, Sinerem<sup>®</sup>) eingesetzt. Im Gegensatz zum Ferromagnetismus treten Wechselwirkungen zwischen superparamagnetischen Partikeln nur auf, solange ein äußeres magnetisches Feld auf sie einwirkt. Die Magnetisierung superparamagnetischer Partikel folgt dabei dem äußeren Magnetfeld ohne Hysterese. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel werden hinsichtlich ihrer Größe eingeteilt in SPIO (*superparamagnetic iron oxide*)-Partikel mit einem Partikeldurchmesser  $\geq 30$  nm und in USPIO (*ultra small superparamagnetic iron oxide*)-Partikel mit einem Durchmesser  $\leq 30$  nm.<sup>1</sup>

Eine maßgeschneiderte Oberfläche spielt eine große Rolle bei der Weiterentwicklung von superparamagnetischen Partikeln zur *in-vivo*-Anwendung. Die Oberfläche sollte (1.) eine Stabilisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen ermöglichen, (2.) funktionelle Gruppen zur weiteren Derivatisierung der Partikel besitzen (z. B. zur Einführung von Rezeptor-Liganden) und (3.) einer schnellen Erkennung und Aufnahme der Partikel durch das Retikuloendotheliale System (RES) entgegenwirken.

Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten der Stabilisierung von superparamagnetischen Partikeln<sup>2</sup>, eine der zurzeit am intensivsten untersuchten ist die Stabilisierung mit biokompatiblen Polymeren.<sup>3</sup> Verwendung finden dabei sowohl synthetische Polymere wie Poly-(alkylcyanoacrylate), Poly-( $\epsilon$ -caprolactone) und Poly-(milchsäure), als auch natürlich vorkommende Polymere wie Polysaccharide und Proteine. Unbekannt ist zurzeit noch, ob synthetische Polymere, die auf Poly-(aminosäuren) basieren, und deren Blockcopolymeren mit Polyethylenoxid (PEO) für die Entwicklung von SPIO-Partikeln mit definierten Oberflächeneigenschaften geeignet sind.

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die *layer-by-layer*-Technik<sup>4,5,6,7,8,9</sup> für die Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln verwendet werden kann, um Partikel-Dispersionen mit den oben genannten Anforderungen zu entwickeln. Zur Beschichtung der Partikel wird dabei verzweigtes Poly-(ethylenimin) (PEI,

$M_w = 40000 \text{ g mol}^{-1}$ ) und das Blockcopolymer Poly-(ethylenoxid)-*block*-poly-(glutaminsäure)<sub>13</sub> (PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>) mit 13 Einheiten Glutaminsäure verwendet. Die chemische Struktur der Polymere und die Darstellung eines möglichen Partikel-Aufbaus zeigt Abbildung 4.1.

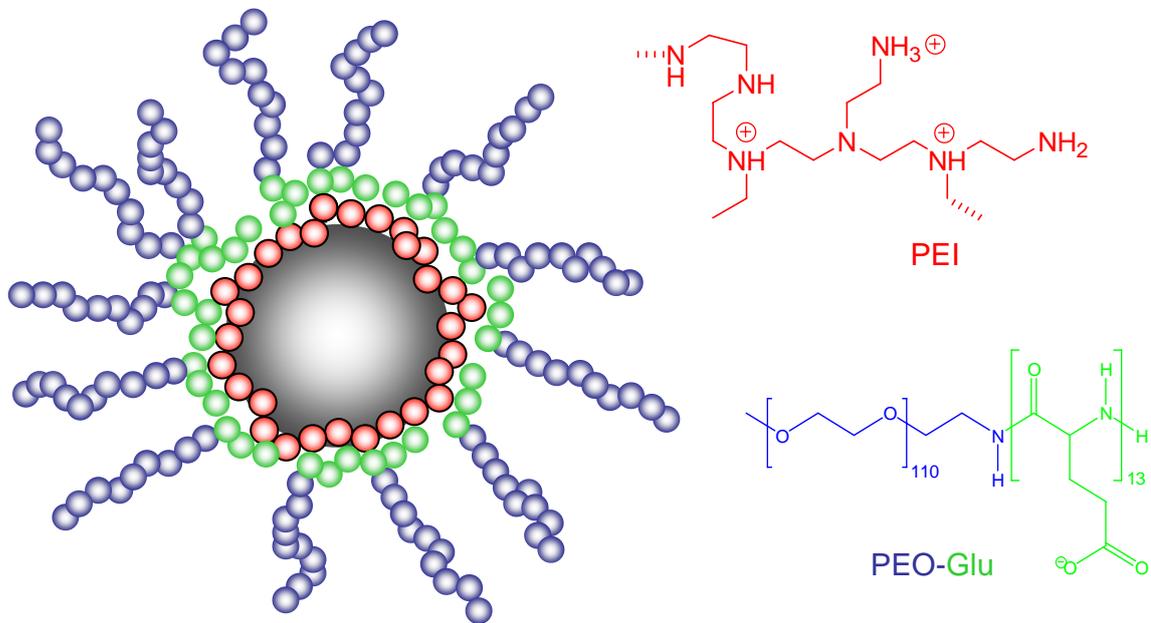


Abbildung 4.1 Möglicher Partikelbau eines mit der *layer-by-layer*-Technik beschichteten Nanopartikels und die chemische Struktur der verwendeten Polymere.

## 4.2. Ergebnisse und Diskussion

### 4.2.1. Partikelgröße und Stabilität

Der hydrodynamische Durchmesser ( $D_H$ ) ist ein geeigneter Parameter, um die einzelnen Schritte der Partikelherstellung zu kontrollieren und ein Strukturmodell für die dabei entstehenden Nanopartikel zu entwickeln. Aus diesem Grund wurde der  $D_H$  der Partikel nach jedem Schritt der Präparation mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

Zuerst wurde der magnetische Kern der Partikel durch Kopräzipitation von Eisen(II)- und Eisen(III)chlorid in Wasser durch Zugabe von Ammoniumhydroxid hergestellt.<sup>4</sup> Dabei waren keine organischen Stabilisatoren wie Dextran oder Carboxydextran anwesend.<sup>1</sup> Die daraus resultierende Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 4.2 zu sehen. Dargestellt ist die Volumenverteilung unbeschichteter magnetischer Partikel in Wasser (Abbildung 4.2, Kurve 1), mit PEI beschichteter Partikel in Wasser (Abbildung 4.2, Kurve 2), mit PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteter Partikel in Wasser (Abbildung 4.2, Kurve 3) und von

mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikeln in 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung mit einem pH-Wert von 7.4 (Abbildung 4.2, Kurve 4). Die Konzentration des PEI betrug dabei  $4.4 \times 10^{-8} \text{ mol g}^{-1}$  und die Konzentration an PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>  $2 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$ , was bezogen auf die Anzahl der Glutaminsäure-Einheiten einer Konzentration von  $c_{\text{Glutaminsäure}} = 2.6 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$  entspricht.

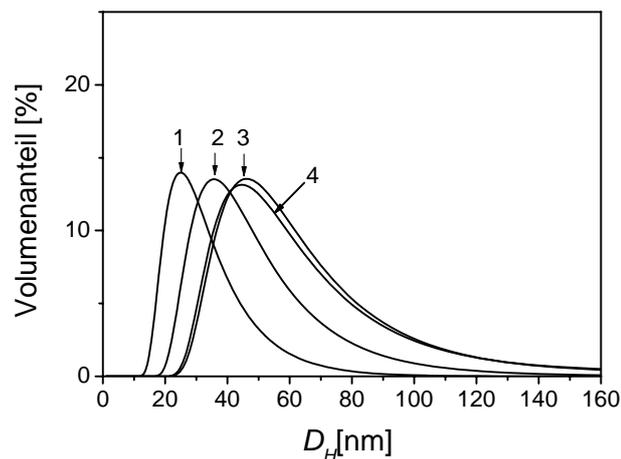


Abbildung 4.2 Volumenverteilung der magnetischen Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung. Die Ziffern kennzeichnen die Nanopartikel nach den einzelnen Herstellungsschritten: (1) unbeschichteter Eisenoxid-Kern in Wasser pH 2, (2) nach Beschichtung mit PEI, (3) nach Beschichtung mit PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> in Wasser pH 7.4, (4) nach Beschichtung mit PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> in 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung pH-Wert 7.4.

Das Maximum des Durchmessers der unbeschichteten magnetischen Partikel liegt bei  $D_H = 25 \text{ nm}$ , wobei 95 % der Partikel einen  $D_H$  zwischen 15 nm und 52 nm besitzen. Die Zugabe des ersten Polymers (PEI) führt zu einer Erhöhung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers um 10 nm auf  $D_H = 35 \text{ nm}$ , dabei besitzen 95 % der Partikel einen  $D_H$  zwischen 18 nm und 82 nm. Nach Zugabe des zweiten Polymers (PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>) zu den mit PEI beschichteten Partikeln beträgt  $D_H = 46 \text{ nm}$  und 95 % der Partikel befinden sich im Größenbereich von 25 nm bis 100 nm. Die Überführung der PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel von Wasser in 0.154 molare NaCl-Lösung (pH-Wert 7.4) reduziert die mittlere Partikelgröße um 3 nm, die Breite der Partikelgrößenverteilung bleibt gleich.

Ein Vergleich der Veränderung des Zetapotentials und des hydrodynamischen Durchmessers durch die schrittweise Zugabe von PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> zeigt Abbildung 4.3. Deutlich sind ein kontinuierliches Anwachsen der Partikelgröße und ein Wechsel des Zetapotentials zwischen positiven und neutralen Werten zu erkennen. Der Wechsel des Zetapotentials durch die schrittweise Zugabe der Polymere zeigt den für die *layer-by-layer*-Technik typischen Verlauf.

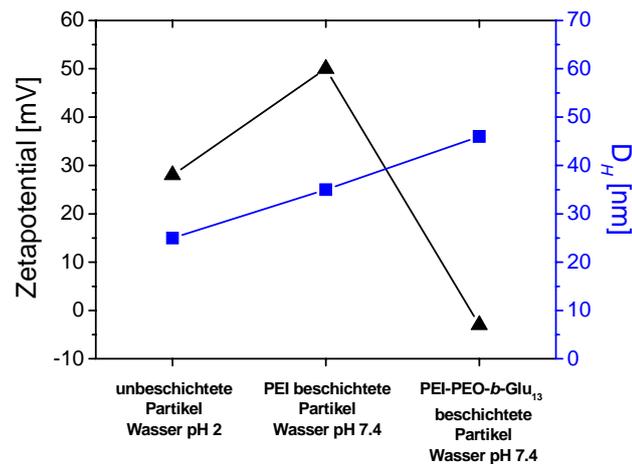


Abbildung 4.3 Verlauf des Zetapotentials und des hydrodynamischen Durchmessers  $D_H$  während der Herstellung beschichteter Partikel. Angegeben ist das Zetapotential (▲) und  $D_H$  (■) unbeschichteter Partikel in Wasser, nach Beschichtung mit PEI und nach Beschichtung mit PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> in Wasser, pH-Wert 7.4.

Das Ansteigen sowohl der Größe der Partikel um 10 nm als auch des Zetapotentials um einen Betrag von 22 mV auf  $\zeta = 50$  mV nach Zugabe des PEI kann als Folge der Adsorption des kationischen PEI auf die Oberfläche der magnetischen Partikel interpretiert werden. PEI ist zwar wie die Oberfläche der unbeschichteten magnetischen Partikel kationisch, trotzdem ist bekannt, dass PEI auch an positiv geladenen Oberflächen adsorbiert und dadurch zu einer weiteren Erhöhung der Oberflächenladung beiträgt.<sup>10</sup> PEI ist der kationische Polyelektrolyt mit der höchsten bekannten Ladungsdichte, jedes dritte Atom im Polymer-Rückgrat ist prinzipiell in der Lage, eine positive Ladung zu tragen. PEI kann dadurch innerhalb eines breiten pH-Bereichs an sehr unterschiedlichen Oberflächen adsorbieren.

Durch die Zugabe von PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> steigt die Partikelgröße weiter auf 45 nm. Gleichzeitig fällt das Zetapotential um 53 mV in den leicht negativen Bereich auf  $\zeta = -3$  mV. Dieses Verhalten kann durch die Adsorption des anionischen PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> auf das kationische PEI an der Partikeloberfläche erklärt werden. Die Adsorption des PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> führt zu einem Ausgleich der Ladungen und zu einer leichten Umkehrung der Oberflächenladung der Partikel. Dieses Phänomen ist bei der Beschichtung von Partikeln mit Hilfe der *layer-by-layer*-Technik bekannt.<sup>11</sup> Aus dem Verlauf des Zetapotentials und dem kontinuierlichen Ansteigen der Partikelgröße kann gefolgert werden, dass sich die magnetischen Partikel mit PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> in zwei Schichten mit Hilfe der *layer-by-layer*-Technik beschichten lassen. Die vorher elektrostatisch stabilisierten Partikel sind nun durch die PEO-Ketten des PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> zusätzlich sterisch stabilisiert. Die mit der dynamischen Lichtstreuung

bestimmten Polydispersitätsindizes (PDI) liegen bei 0.14 (unbeschichtete magnetische Partikel), 0.22 (PEI-Beschichtung), 0.16 (PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichtete Partikel in Wasser) und 0.15 (PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichtete Partikel in 0.154 molarer NaCl-Lösung). Durch die Beschichtung der Partikel wurde die ursprüngliche Breite der Partikelgrößenverteilung nicht verändert und auch in physiologischer Natriumchlorid-Lösung wurde keine Veränderung beobachtet. Dies zeigt eindeutig, dass die magnetischen Partikel in zwei Lagen durch die verwendeten Polymere beschichtet wurden. Eine Aggregation zu größeren Agglomeraten konnte nicht beobachtet werden, dabei würde sowohl der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Partikel als auch der PDI der Partikelgrößenverteilung deutlich anwachsen.

Als nächstes wurde die Fragestellung untersucht, ob sich die Eigenschaften der beschichteten Partikel gezielt verändern lassen. Dazu wurde die Veränderung des Zetapotentials und des hydrodynamischen Durchmessers durch Variation der Menge an zugegebenem PEI bei konstanter Konzentration an Glutaminsäure verfolgt. In Abbildung 4.4 sind die Zetapotentiale mit PEI beschichteter Partikel und mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteter Partikel in Wasser bei pH 7.4 als Funktion der PEI-Konzentration abgebildet, sowie die Zetapotentiale von unbeschichteten Partikeln und von nur mit PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikeln. Die Konzentration an PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> war bei dieser Versuchsreihe konstant  $2 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$ , was bezogen auf die Anzahl der Glutaminsäure-Einheiten einer Konzentration von  $c_{\text{Glutaminsäure}} = 2.6 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$  entspricht.

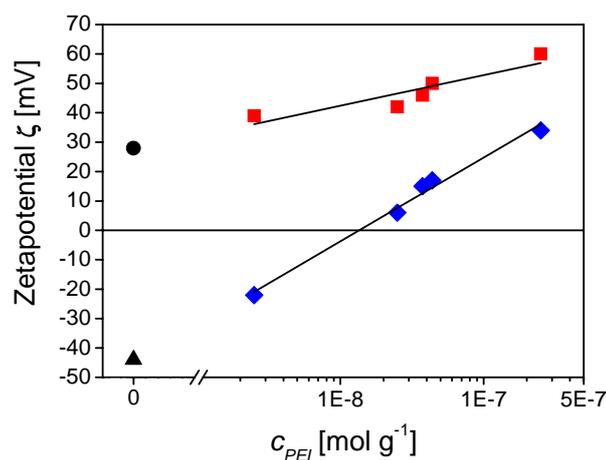


Abbildung 4.4 Zetapotentiale mit PEI beschichteter Partikel (■) und mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteter Partikel (◆) in Wasser bei pH 7.4 als Funktion der PEI Konzentration. Die durchgezogenen Linien stellen die berechneten Regressionsgraden dar. Zusätzlich sind die Zetapotentiale von unbeschichteten Partikeln (●) und nur mit PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel (▲) zu sehen.

Das Zetapotential der unbeschichteten Partikel ( $\zeta = 28$  mV) steigt in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge PEI kontinuierlich an. Wird sowohl zu den unbeschichteten Partikeln als auch zu den mit PEI beschichteten Partikeln jeweils die gleiche Menge PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> hinzugegeben, sinkt das Zetapotential bei allen Proben ab (Abbildung 4.4).

Für beide Messreihen wurden Regressionsgeraden mit der Geradengleichung  $y = a + b \cdot \log(x)$  berechnet. Für mit PEI beschichtete Partikel ergibt die Anpassung einen Regressionskoeffizienten von  $R^2 = 0.83291$  mit  $a = 125.641$  mV und  $b = 10.407$  mV g mol<sup>-1</sup>, für PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichtete Partikel ist  $R^2 = 0.98818$  mit  $a = 224.328$  mV und  $b = 28.508$  mV g mol<sup>-1</sup>.

In Abbildung 4.5 ist die Größe der mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel als Funktion der Konzentration an PEI zu sehen. Durch die Beschichtung nimmt die Größe der unbeschichteten Partikel ( $D_H = 35$  nm) zu und liegt im Bereich von 50 nm bis 55 nm, eine Abhängigkeit der Partikelgröße von der zugesetzten Menge an PEI lässt sich nicht erkennen. Das deutet darauf hin, dass PEI sich sehr eng an die Partikeloberfläche anlagert und keinen mit der dynamischen Lichtstreuung detektierbaren Anteil an der Größenzunahme der Partikel hat. Die Größenzunahme der Partikel wird dann nur durch PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> hervorgerufen.

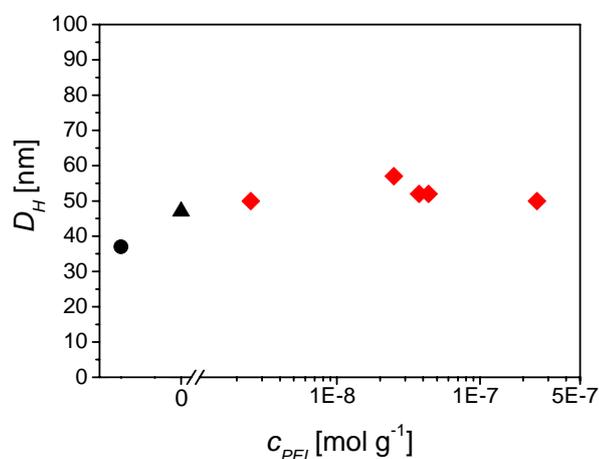


Abbildung 4.5 Hydrodynamischer Durchmesser  $D_H$  unbeschichteter Partikel (●), mit PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteter Partikel (▲) und mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteter Partikel (◆) als Funktion der PEI-Konzentration in Wasser (pH-Wert 7.4) bei konstanter Konzentration an Glutaminsäure-Einheiten ( $c_{Glutaminsäure} = 2 \times 10^{-7}$  mol g<sup>-1</sup>).

Es ist somit möglich, das Zetapotential der beschichteten Partikel in Abhängigkeit von der zusetzten Menge PEI gezielt zu verändern. Die Größe der beschichteten Partikel bleibt dabei konstant. Auch ohne die Verwendung von PEI

lassen sich die magnetischen Partikel mit PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichten, so dass stabile beschichtete Partikel entstehen.

Ein wesentlicher Punkt in der Entwicklung magnetischer Partikel im Hinblick auf ihre Anwendung *in vivo* ist deren Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der sterisch stabilisierten Partikel in physiologischer Natriumchlorid-Lösung ( $c_{NaCl} = 0.154 \text{ mol l}^{-1}$ ) bei pH 7.4 untersucht. Dabei zeigten die Partikel keine Instabilität. In physiologischer Natriumchlorid-Lösung traten keine signifikanten Veränderungen des hydrodynamischen Durchmessers auf.

Für eine potentielle Anwendung der Nanopartikel ist ihre Langzeitstabilität unter physiologischen Bedingungen wichtig. Viele nanopartikuläre Systeme, die durch Polyelektrolyte stabilisiert sind und mit der *layer-by-layer*-Technik hergestellt werden, sind in Wasser stabil, aggregieren aber schnell bei Zugabe von Natriumchlorid.<sup>7,8,12</sup> Die Struktur und Eigenschaften der stabilisierenden Polyelektrolyt-Schicht wird stark durch die in ihrer Umgebung befindlichen Ionen beeinflusst. Natriumchlorid verringert konzentrationsabhängig die elektrostatische Abstoßung der beschichteten Partikel, was zu einer Aggregation der Partikel führt. Die hohe Konzentration an Natriumchlorid in physiologischer Kochsalz-Lösung stellt daher eine besondere Anforderung an die Langzeitstabilität der beschichteten Partikel dar. Aus diesem Grund wurden die mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel in physiologischer Natriumchlorid-Lösung, bei einem pH-Wert von 7.4 und bei Raumtemperatur gelagert und der hydrodynamische Durchmesser der Partikel zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

In Abbildung 4.6 ist der mittlere hydrodynamische Durchmesser des Maximums der Volumenverteilung von unbeschichteten magnetischen Partikeln in Wasser und von mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikeln in Wasser und in physiologischer Natriumchlorid-Lösung ( $c_{NaCl} = 0.154 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7.4) als Funktion der Lagerungszeit bei 25° C aufgetragen. Es wurde innerhalb von 30 Tagen keine Instabilität der mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel in Wasser bzw. in 0.154 mol l<sup>-1</sup> Natriumchlorid-Lösung beobachtet. Die Partikelgröße bleibt über diesen Zeitraum hinweg konstant. Auch nach 6 Monaten Lagerung der Partikel bei Raumtemperatur zeigte sich keine Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel.

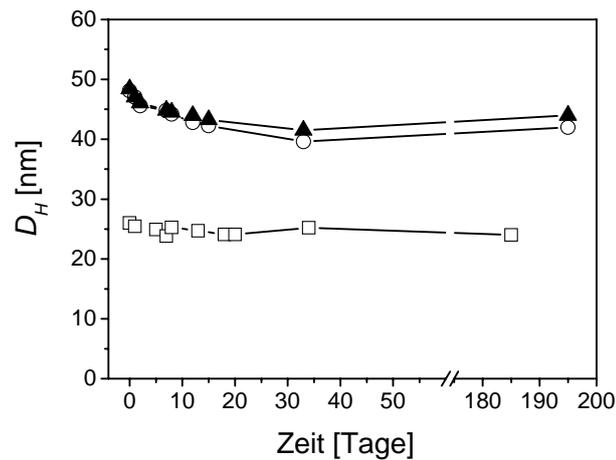


Abbildung 4.6 Hydrodynamischer Durchmesser (Maximum der Volumenverteilung) der unbeschichteten magnetischen Partikel in Wasser (□) und der PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel in Wasser (▲, pH 7.4) und in 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung (○,  $c_{\text{NaCl}} = 0.154 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7.4) als Funktion der Lagerungszeit bei 25° C.

Durch die angewandte *layer-by-layer*-Technik und die Verwendung von PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> sind also Nanopartikel herstellbar, die auch während einer Lagerung in physiologischer Natriumchlorid-Lösung bei pH 7.4 stabil bleiben.

#### 4.2.2. Bestimmung der magnetischen Phase

Eisenoxide kommen in großer Vielfalt mit unterschiedlicher Zusammensetzung vor und besitzen auch unterschiedliche magnetische Eigenschaften. Die am intensivsten untersuchten Eisenoxide sind Magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) und Maghemit (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), die beide ferromagnetisch sind. Während der Herstellung von Magnetit- bzw. Maghemit-Partikeln kann es zu einer Bildung von Hämatit (α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kommen. Hämatit ist nur schwach ferromagnetisch, deshalb ist eine Verunreinigung des stärker ferromagnetischen Maghemit bzw. Magnetit mit Hämatit unerwünscht.

Durch Untersuchung der unbeschichteten und beschichteten magnetischen Nanopartikel mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie und der Mössbauer-Spektroskopie wurde die genaue Zusammensetzung des Eisenoxid-Kerns der Nanopartikel bestimmt. Dabei ist es leicht, durch Röntgendiffraktometrie Hämatit von Maghemit bzw. Magnetit zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu ist die Unterscheidung zwischen Nanopartikeln aus Maghemit und Magnetit nicht möglich. Maghemit und Magnetit besitzen eine sehr ähnliche inverse Spinellstruktur. Maghemit mit der Strukturformel  $\text{Fe}_{21.33}^{3+} \square_{2.67} \text{O}_{32}^{2-}$  kann als eine Eisen-Mangelform des Magnetits angesehen werden. Dabei bedeutet  $\square_{2.67}$  eine Zahl

von 2.67 Leerstellen auf oktaedrischen Gitterplätzen des Spinells.<sup>13</sup> Aus diesem Grund sind sowohl die Reflexpositionen als auch die –intensitäten für Maghemit und Magnetit sehr ähnlich. Bei Nanopartikeln ist es nicht möglich, durch Röntgendiffraktometrie zwischen Maghemit- und Magnetit-Nanopartikeln zu unterscheiden, da es durch die geringe Größe der Kristallite zu einer Verbreiterung der Reflexe kommt. Um zu entscheiden, ob die magnetischen Nanopartikel aus Maghemit oder Magnetit bestehen, wurden die Partikel daher mit der Mössbauer-Spektroskopie untersucht. Die Mössbauer-Spektroskopie ist eine geeignete Methode, um den Oxidationszustand des Eisens zu bestimmen. In Abbildung 4.7 sind die Mössbauer-Spektren für PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichtete Nanopartikel bei 78 K (linke Abbildung) und 293 K (rechte Abbildung) zu sehen. Die Spektren zeigen die für die Mössbauer-Spektroskopie typischen Sextetts und Dubletts, die nach der Methode von Prene *et al.* ausgewertet wurden.<sup>14</sup> Das linke Spektrum in Abbildung 4.7 wurde bei 78 K aufgenommen und zeigt ein magnetisches Muster, an das ein Sextett angepasst wurde. Aus der Anpassung ergibt sich eine Isomerieverschiebung von  $0.44 \text{ mm s}^{-1}$ , eine Quadrupolaufspaltung von  $0.009 \text{ mm}^{-1}$  und ein Hyperfeinfeld von 50 Tesla. In diesem Fall liegt das gesamte vorhandene Eisen der Nanopartikel als Eisen(III) in Form von Maghemit vor.<sup>15</sup>

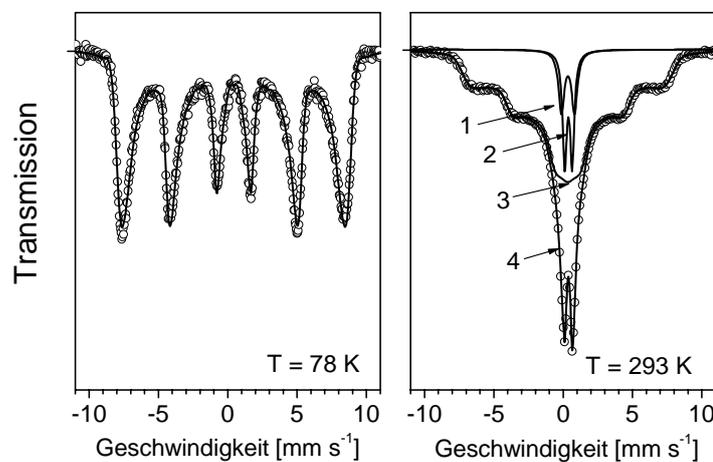


Abbildung 4.7 Mössbauer-Spektren für mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichtete Partikel bei 78 K (linke Abbildung) und 293 K (rechte Abbildung). Die Symbole ( $\circ$ ) bezeichnen die gemessenen Daten, die durchgezogenen Linien (–) die daraus berechneten Kurvenverläufe. Das bei niedriger Temperatur aufgenommene Spektrum wurde an ein Sextett angepasst. Das bei Raumtemperatur gemessene Spektrum wurde an zwei Dubletts (Kurve 1 und 2) und an ein Sextett (Kurve 3) angepasst. Kurve 4 stellt die daraus resultierende Summenkurve dar.

Wird die Messung bei Raumtemperatur (Abbildung 4.7, rechts) durchgeführt, ergibt sich ein anderes Spektrum. Dieses Spektrum stellt sich in Form von zwei

Dubletts und einem Sextett dar, die für superparamagnetische Partikel typisch sind. Das Spektrum ist sehr ähnlich dem Mössbauer-Spektrum von kommerziell erhältlichen SPIO-Partikeln (Resovist<sup>®</sup>, Lawaczeck *et al.*).<sup>1</sup> Die beste Anpassung an das bei Raumtemperatur gemessene Spektrum ergibt die (Abbildung 4.7, Kurve 4) aus der Kombination von zwei Dubletts (Abbildung 4.7, Kurve 1 und 2) und einem Sextett (Abbildung 4.7, Kurve 3) resultierende Kurve.

Die Auswertung der Mössbauer-Spektren zeigt, dass das Eisen zu 100 % als Eisen(III) vorliegt. Durch die geringe Größe der Partikel kommt es bei höherer Temperatur zu einer verringerten ferromagnetischen Kopplung zwischen den Partikeln und dadurch zu einem Auftreten des paramagnetischen Dubletts bei Raumtemperatur verglichen mit der Messung bei 78 K. Bei Raumtemperatur beträgt der Anteil an paramagnetischem Eisen(III) 17 %, die restlichen 83 % sind magnetisch geordnet (Tabelle 4.1).

Mössbauer-Hyperfein-Parameter	78 K	293 K
Isomerenverschiebung	0.44 mm s <sup>-1</sup>	0.38 mm s <sup>-1</sup> (Dublett, Kurve 1) 0.35 mm s <sup>-1</sup> (Dublett, Kurve 2) 0.33 mm s <sup>-1</sup> (Sextett, Kurve 3)
Quadrupolaufspaltung	0.009 mm s <sup>-1</sup>	0.54 mm s <sup>-1</sup> (Dublett, Kurve 1) 0.94 mm s <sup>-1</sup> (Dublett, Kurve 2) 0.03 mm s <sup>-1</sup> (Sextett, Kurve 3)
Hyperfeinfeld	50 Tesla	44 Tesla (Sextett, Kurve 3)
Gehalt an Eisen(III)	100 % magnetisch geordnet	10 % paramagnetisches Eisen(III) (Dublett, Kurve 1) 7 % paramagnetisches Eisen(III) (Dublett, Kurve 2) 83 % magnetisch geordnetes Eisen(III) (Sextett, Kurve 3)

Tabelle 4.1 Mössbauer-Parameter der mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Nanopartikel bei 78 K und 293 K. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 4.7 gezeigt.

Die Phasenanalyse wurde ebenfalls mit der Röntgendiffraktometrie durchgeführt. Die Positionen der gemessenen Reflexe in Abbildung 4.8 stimmen mit den für Maghemit bekannten Reflexen überein (Tabelle 4.2). Es kann kein Unterschied für die zu Maghemit gehörigen Reflexe bei unbeschichteten und beschichteten Partikeln festgestellt werden (Abbildung 4.8, Kurve a und c). Bei den Reflexionen 511 und 440 des Maghemits kommt es zu keiner Überlappung mit Reflexionen des Polymers. Diese Reflexionen wurden verwendet, um genauere Informationen über den Maghemit-Kern der Partikel zu bekommen.

Um die Größe eines Kristallits zu bestimmen, wurden Analysen nach Scherrer und nach Williamson-Hall durchgeführt. Die Methode nach Scherrer berücksichtigt die Verbreiterung der Reflexionen durch die geringe Größe der Kristallite, während die Williamson-Hall-Analyse zusätzlich zur Verbreiterung durch die Kristallitgröße auch die Verbreiterung der Reflexion durch Dehnungseffekte einbezieht. Die Kristallgröße beträgt sowohl für die unbeschichteten als auch für die PEI- bzw. PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel  $12 \pm 0.5$  nm.

hkl	Netzebenenabstände <i>d</i> aus JCPDS Daten [nm]	Berechnete Netzebenenabstände <i>d</i> [nm]
111	0.4852	0.4835
220	0.2967	0.2959
311	0.2532	0.2524
400	0.2099	0.2089
422	0.1714	0.1744
511	0.1615	0.1610
440	0.1484	0.1475

Tabelle 4.2 Netzebenenabstände *d* berechnet aus den Messungen der Röntgendiffraktometrie der Maghemit-Partikel ( $d = 2\pi/q_{\max}$ ) und für Maghemit aus der JCPDS Datenbank (*Joint Committee for Powder Diffraction Studies*), sowie die Millerschen Indices (hkl) für Maghemit.

Durch die Lagerung der Partikel in Wasser und 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung bei pH 7.4 konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Es wurden keine Anzeichen gefunden, dass Dehnungseffekte die Struktur der Kristallite beeinflussen.

In seiner makroskopischen Form ist Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) eine metastabile Modifikation des  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , die sich bei Temperaturen über 300 °C in Hämatit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) umwandelt.<sup>16</sup> In nanokristallinen Materialien ist es aber möglich, dass die makroskopisch metastabile Form thermodynamisch stabil wird.<sup>17</sup> In einer Untersuchung des Überganges von nanokristallinem Maghemit zu Hämatit wurde gezeigt, dass Maghemit bei einer Kristallitgröße unter 16 nm stabiler ist als Hämatit.<sup>18</sup> Die Größe der hergestellten Hämatit-Kristalle betrug dabei über 35 nm, ein Anwachsen der Maghemit-Kristalle konnte nicht beobachtet werden. Ein weiterer Hinweis auf die Stabilisierung des Maghemits in nanokristalliner Form ist die Tatsache, dass mit der Inversen-Mizell-Methode bei einer Kristallgröße unter 30 nm nur Maghemit-Partikel entstehen und bei einer Größe über 30 nm nur Hämatit.<sup>19</sup> Auch wenn der abschließende Beweis einer thermodynamischen Stabilität von Maghemit im Allgemeinen noch nicht erbracht wurde, kann angenommen werden, dass nanokristallines Maghemit gegenüber Temperatureinflüssen stabiler ist als makroskopisch vorliegendes Maghemit.<sup>20</sup>

Die Raman-Spektroskopie in Rückstreugeometrie an getrockneten Nanopartikeln wurde zur Bestätigung der Ergebnisse der Mössbauer-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie angewendet.

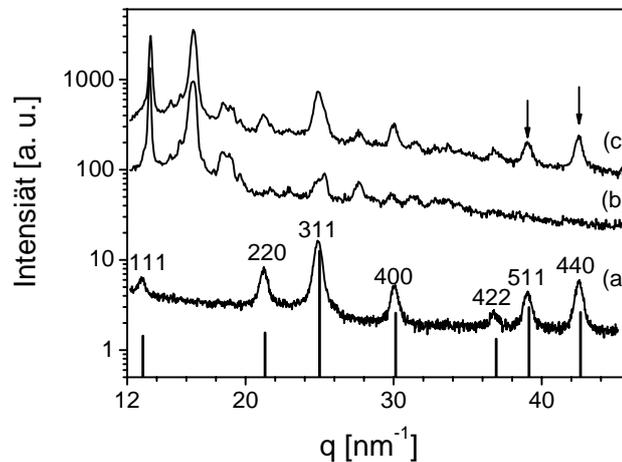


Abbildung 4.8 Diagramm der Weitwinkel-Röntgenstreuung der unbeschichteten Partikeln (a), des Blockcopolymers PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> (b) und der Maghemit-Nanopartikel stabilisiert mit PEI(PEO-PGA) (c). Die Größe der Maghemit-Kristalle beträgt  $12.0 \pm 0.5$  nm in (a) und (c) (vor und nach Beschichtung). Die Positionen der zwei Indices (511 und 440), die für die Berechnung der Kristallgröße verwendet wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das Raman-Spektrum der unbeschichteten Maghemit-Partikel zeigt breite Banden bei  $350 \text{ cm}^{-1}$ ,  $500 \text{ cm}^{-1}$  und  $700 \text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4.9), die für Maghemit typisch sind und nicht bei anderen Formen des Eisenoxids (z.B. Magnetit, Hämatit) vorkommen.<sup>21</sup> Ebenso sind die sehr breiten Banden bei  $1400 \text{ cm}^{-1}$  und  $1580 \text{ cm}^{-1}$  charakteristisch für Maghemit.<sup>22</sup> Dies bestätigt die mit der Mössbauer-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie erhaltenen Ergebnisse, dass die magnetischen Nanopartikel nur aus Maghemit bestehen.

Das Raman-Spektrum der beschichteten Partikel ist komplexer als das der unbeschichteten Nanopartikel. Es treten neben den zum Maghemit gehörigen Signalen zusätzliche Banden auf. Vergleicht man diese Banden mit dem Spektrum des Blockcopolymers PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>, können die Banden bei  $278 \text{ cm}^{-1}$ ,  $831 \text{ cm}^{-1}$ ,  $859 \text{ cm}^{-1}$ ,  $930 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1057 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1123 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1228 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1279 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1394 \text{ cm}^{-1}$  und  $1481 \text{ cm}^{-1}$  dem PEO-Block zugeordnet werden. Die Positionen der Banden entsprechen den aus der Literatur bekannten Daten für PEO.<sup>23,24</sup> Die Amid-I-Bande der Glutaminsäure befindet sich bei ca.  $1670 \text{ cm}^{-1}$  und entspricht in ihrer Position und Form der Bande für ein Homopolymer aus Glutaminsäure mit Carboxylat-Gruppen.<sup>25</sup>

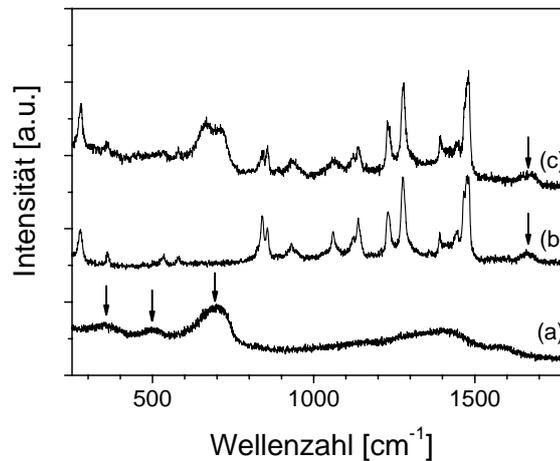


Abbildung 4.9 Raman-Spektren von unbeschichteten Nanopartikeln (a), PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> (b) und beschichteten Partikeln (c) im Bereich von 270 cm<sup>-1</sup> bis 1800 cm<sup>-1</sup>. Die Pfeile in Kurve (a) bezeichnen die für Maghemit charakteristischen Banden von 350 cm<sup>-1</sup>, 500 cm<sup>-1</sup> und 700 cm<sup>-1</sup>. Die Bande bei 1660 cm<sup>-1</sup> in den Kurven (b) und (c) ist die C=O Streckschwingung der adsorbierten Carboxylat-Gruppen des PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>.

Die breite Bande der beschichteten Partikel bei 1670 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 4.9, Kurve (c), Pfeil) ist ein Indiz dafür, dass das Blockcopolymer PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> auf der Oberfläche der Partikel adsorbiert ist. Die anderen Banden der Glutaminsäure sind durch den hohen Anteil an PEO zu gering in ihrer Intensität, um detektiert werden zu können. PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> weist selber keine Banden im Bereich von 700 cm<sup>-1</sup> auf. An dieser Stelle ist die intensivste Bande des Maghemits zu finden. Im Spektrum der beschichteten Nanopartikel ist die Bande des Maghemits an dieser Stelle in zwei Banden bei 665 cm<sup>-1</sup> und 710 cm<sup>-1</sup> aufgespalten. Diese Aufspaltung der Maghemit-Bande kann auch bei reinem Maghemit beobachtet werden<sup>22</sup> und wird nicht durch die Beschichtung verursacht.

In den Raman-Spektren sind aufgrund der geringen Menge an zugegebenem PEI keine Banden zu erkennen, die dem PEI zugeordnet werden können.

#### 4.2.3. MRT-Kontrastgebung der Partikel *in vivo*

Um die mögliche Anwendung der beschichteten Maghemit-Partikel als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) zu testen, wurden *in-vivo*-Untersuchungen an 2 Gruppen mit je 5 Ratten durchgeführt. In der Versuchsgruppe wurden Maghemit-Partikel verwendet, die mit Hilfe der *layer-by-layer*-Methode in Wasser mit PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichtet und durch Zusatz von 1 molarer HCl und Natriumchlorid auf physiologische Bedingungen eingestellt

wurden ( $c_{NaCl} = 0.154 \text{ mol l}^{-1}$ , pH-Wert 7.4). Den anästhesierten Ratten wurden die Partikel intravenös appliziert.

Es wurden MRT-Aufnahmen der Ratten vor und 10 Minuten nach Applikation der Partikel gemacht. Als Vergleich wurde in der Kontrollgruppe ein handelsübliches MRT-Kontrastmittel (Resovist<sup>®</sup>) verwendet. Die injizierte Dosis der Partikel betrug 0.6 mg Eisen / kg Körpergewicht und entspricht der üblichen Dosierung von Resovist<sup>®</sup>. In Abbildung 4.10 sind die Aufnahmen vor und nach Applikation der PEI und PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikel und Resovist<sup>®</sup> zu sehen.

Bei den PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Partikeln zeigte sich 10 Minuten nach Applikation eine starke Verminderung der Signalintensität des Leberparenchyms in der T2 gewichteten Sequenz (Abbildung 4.10, A und B), vergleichbar mit der des Resovist<sup>®</sup> (Abbildung 4.10, C und D).

Nach Beendigung der Versuche erwachten alle Ratten aus der Narkose und wurden anschließend über einen Zeitraum von 2 Wochen nach Applikation beobachtet. Die Tiere zeigten keine Gewichtsveränderungen, ein natürliches Verhalten und ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Diese Parameter für Leiden, Schmerzen und Schäden am Versuchstier wiesen keinerlei Unterschiede bei den behandelten Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe auf. Das deutet auf eine dem Resovist<sup>®</sup> vergleichbare und gute Verträglichkeit der intravenös injizierten PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Maghemit-Partikel in beschriebener Dosierung hin bei vergleichbaren bildgebenden Eigenschaften.

Unkomplexiertes PEI wird vielfach zur Herstellung von Kosmetika verwendet, besitzt jedoch bei parenteraler Anwendung auf Grund seiner hohen kationischen Ladung ein toxisches Potential.

PEI befindet sich aber zurzeit in intensiver Untersuchung als Genvektor für den nicht-viralen Gentransfer. Dabei komplexiert PEI die DNA und soll die Effektivität des Gentransfers erhöhen.<sup>26</sup> Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PEO in der Lage ist, die Toxizität des PEI bei der Verwendung als nicht-viraler Genvektor zu erniedrigen.<sup>27,28</sup> Bei Anwendung der *layer-by-layer*-Methode wird das PEI durch PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> komplexiert und liegt ebenfalls nicht frei vor. Gleichzeitig wird das PEI durch die PEO-Ketten der äußeren Schicht des Blockcopolymers von der Umgebung abgeschirmt. Dieser Aufbau der beschichteten Maghemit-Partikel und die ersten Ergebnisse der Tierversuche lassen vermuten, dass die Verwendung von PEI kein erhöhtes Toxizitätsrisiko darstellt. Um die Toxizität der beschichteten Partikel genauer zu bestimmen, werden zurzeit weitere Untersuchungen in Zellkultur und am Tier vorgenommen.

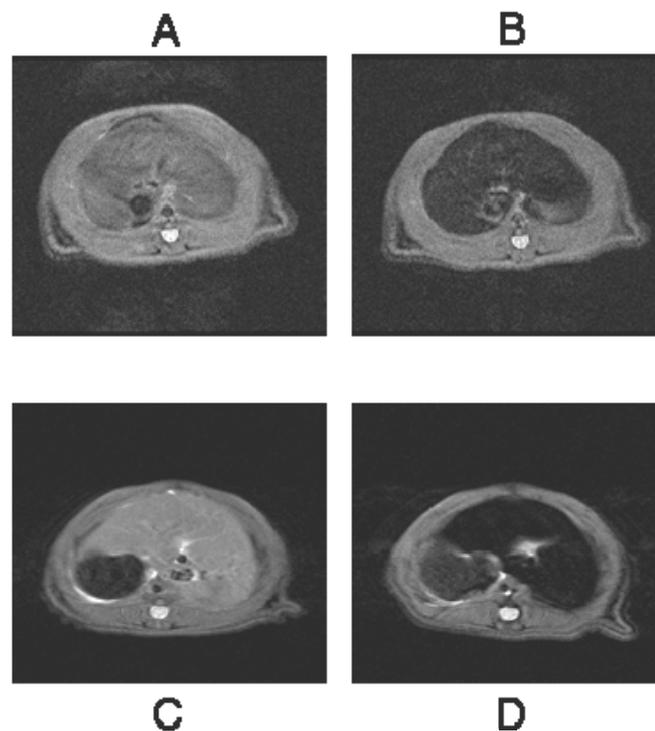


Abbildung 4.10 MRT-Aufnahmen in der T2-gewichteten Sequenz von Ratten vor Applikation von PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Maghemit-Partikeln (A) und 10 Minuten nach intravenöser Applikation von PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Maghemit-Partikeln (B). Als Vergleich wurde Resovist® verwendet und ebenfalls Aufnahmen vor (C) und 10 Minuten nach der Applikation (D) gemacht. Die Dosis an applizierten Partikeln entsprach dabei jeweils 0.6 mg Eisen/kg Körpergewicht.

Es ist also möglich, die mit Hilfe der *layer-by-layer*-Methode beschichteten Maghemit-Partikel durch ihre Kontrastverstärkung im MRT sichtbar zu machen. Damit können diese Partikel zum Beispiel als Kontrastmittel für MRT-Untersuchungen oder in Zellkulturen verwendet werden.

### 4.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass mit Hilfe der *layer-by-layer*-Technik magnetische Nanopartikel mit einer ersten Schicht aus Poly-(ethylenimin) (PEI) und einer zweiten Schicht aus Poly-(ethylenoxid)-*b*-poly-(glutaminsäure) (PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>) stabilisiert werden können. Dabei wird durch die Beschichtung die Breite der Partikelgrößenverteilung nicht verändert, d.h., es tritt keine Aggregation auf. Die entstehenden Nanopartikel besitzen ein leicht negatives Zeta-potential und sind in 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung bei pH 7.4 über einen Zeitraum von 6 Monaten stabil.

Das Zetapotential der PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub>-Partikel konnte bei konstanter Menge an PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> durch Variation der PEI-Menge gezielt verändert werden, so dass Partikel mit einem Zetapotential im Bereich von -22 mV bis +34 mV entstanden. Durch eine Beschichtung der Nanopartikel nur mit PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> entstehen ebenfalls unter physiologischen Bedingungen stabile Nanopartikel mit einem deutlich negativeren Zetapotential von -44 mV. Es ist somit möglich, durch eine Variation der PEI-Konzentration gezielt Nanopartikel sowohl mit negativem, neutralem als auch positivem Zetapotential herzustellen, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind. Die Größe der resultierenden Partikel blieb dabei unabhängig von der verwendeten Menge an PEI konstant.

Durch die Kombination von Mössbauer-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie konnte gezeigt werden, dass es sich bei den magnetischen Nanopartikeln ausschließlich um Maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) handelt. Dabei beträgt die Größe einer Maghemit-Domäne jeweils 12 nm.

Zusätzlich wurde die Anwendung der mit PEI-PEO-*b*-Glu<sub>13</sub> beschichteten Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) *in vivo* untersucht. Die vorläufigen Ergebnisse an Ratten zeigen, dass die Partikel in der MRT einen starken Kontrast geben und eine gute Biokompatibilität besitzen.

Damit ergibt sich mit diesen Partikeln die Möglichkeit, die Verteilung und Aufnahme von Partikeln im Tier und in der Zellkultur in Abhängigkeit vom Zetapotential bei konstanter Größe und konstanter äußerer Beschichtung zu untersuchen.

## Referenzen

- <sup>1</sup> Lawaczeck, R.; Menzel, M.; Pietsch, H., Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Applied Organometallic Chemistry* **2004**, 18, (10), 506-513.
- <sup>2</sup> Kim, D. K.; Mikhaylova, M.; Zhang, Y.; Muhammed, M., Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2003**, 15, (8), 1617-1627.
- <sup>3</sup> Neuberger, T.; Schopf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; von Rechenberg, B.; Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of magnetism and Magnetic Materials* **2005**, 293, 1, 483-496
- <sup>4</sup> Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J., Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, 210, (1-2), 831-835.
- <sup>5</sup> Decher, G.; Eckle, M.; Schmitt, J.; Struth, B., Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1998**, 3, (1), 32-39.
- <sup>6</sup> Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Lichtenfeld, H.; Knippel, E.; Knippel, M.; Budde, A.; Mohwald, H., Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, 137, (1-3), 253-266.
- <sup>7</sup> Schonhoff, M., Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, 8, (1), 86-95.
- <sup>8</sup> Vinogradova, O. I., Mechanical properties of polyelectrolyte multilayer microcapsules. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2004**, 16, (32), R1105-R1134.
- <sup>9</sup> Caruso, F., Nanoengineering of particle surfaces. *Advanced Materials* **2001**, 13, (1), 11-20.
- <sup>10</sup> Schneider, M.; Brinkmann, M.; Mohwald, H., Adsorption of polyethylenimine on graphite: An atomic force microscopy study. *Macromolecules* **2003**, 36, (25), 9510-9518.
- <sup>11</sup> Shi, X. Y.; Shen, M. W.; Mohwald, H., Polyelectrolyte multilayer nanoreactors toward the synthesis of diverse nanostructured materials. *Progress in Polymer Science* **2004**, 29, (10), 987-1019.

- <sup>12</sup> Kovacevic, D.; van der Burgh, S.; de Keizer, A.; Stuart, M. A. C., Kinetics of formation and dissolution of weak polyelectrolyte multilayers: Role of salt and free polyions. *Langmuir* **2002**, 18, (14), 5607-5612.
- <sup>13</sup> Ferguson, G. A.; Hass, M., Magnetic Structure and Vacancy Distribution in Gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by Neutron Diffraction. *Physical Review* **1958**, 112, (4), 1130-1131.
- <sup>14</sup> Prene, P.; Tronc, E.; Jolivet, J. P.; Dormann, J. L. In *Mössbauer spectra of gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*, ICAME-95 Conference Proceedings, 1996; 1996; pp 485-488.
- <sup>15</sup> Shenoy, G. K.; Wagner, F. E., *Mössbauer Isomer Shifts*. North-Holland: Amsterdam, 1978.
- <sup>16</sup> Cornell, R. M.; Schwertmann, U., *The Iron Oxides*. VCH: Weinheim, 1996.
- <sup>17</sup> Garvie, R. C., Stabilization of the Tetragonal Structure in Zirconia Microcrystals. *The Journal of Physical Chemistry* **1978**, 82, 218-224.
- <sup>18</sup> Schimanke, G.; Martin, M., In situ XRD study of the phase transition of nanocrystalline maghemite (gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to hematite (alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). *SOLID STATE IONICS* **2000**, 136, 1235-1240.
- <sup>19</sup> Ziolo, R. F.; Giannelis, E. P.; Weinstein, B. A.; Ohoro, M. P.; Ganguly, B. N.; Mehrotra, V.; Russell, M. W.; Huffman, D. R., Matrix-Mediated Synthesis of Nanocrystalline Gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - a New Optically Transparent Magnetic Material. *Science* **1992**, 257, (5067), 219-223.
- <sup>20</sup> Ye, X. S.; Lin, D. S.; Jiao, Z. K.; Zhang, L. D., The thermal stability of nanocrystalline maghemite Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of Physics D-Applied Physics* **1998**, 31, (20), 2739-2744.
- <sup>21</sup> deFaria, D. L. A.; Silva, S. V.; deOliveira, M. T., Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. *Journal of Raman Spectroscopy* **1997**, 28, (11), 873-878.
- <sup>22</sup> Sousa, M. H.; Tourinho, F. A.; Rubim, J. C., Use of Raman micro-spectroscopy in the characterization of M(II)Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Zn) electric double layer ferrofluids. *Journal of Raman Spectroscopy* **2000**, 31, (3), 185-191.
- <sup>23</sup> Kozielski, M.; Muhle, M.; Blaszcak, Z.; Szybowicz, M., Raman and Rayleigh scattering study of crystalline polyoxyethyleneglycols. *Crystal Research and Technology* **2005**, 40, (4-5), 466-470.
- <sup>24</sup> Begum, R.; Matsuura, H., Conformational properties of short poly(oxyethylene) chains in water studied by IR spectroscopy. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **1997**, 93, (21), 3839-3848.

- <sup>25</sup> Mikhonin, A. V.; Myshakina, N. S.; Bykov, S. V.; Asher, S. A., UV resonance Raman determination of polyproline II, extended 2.5(1)-helix, and beta-sheet psi angle energy landscape in poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (21), 7712-7720.
- <sup>26</sup> El-Aneed, A., An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* **2004**, 94, (1), 1-14.
- <sup>27</sup> Laus, M; Sparnacci, K.; Ensoli, B.; Butto, S.; Capito, A.; Mantovani, I.; Zuccheri, G; Samori, B.; Tondelli, L.; *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition* **2001**, 12, 2, 209-228
- <sup>28</sup> Sieverling, N.; Kationische Copolymere für den rezeptorvermittelten Gentransfer, Dissertation **2005**, 70-71