

1. Einleitung und Zielstellung

Ferrofluide finden in unterschiedlichsten Bereichen Anwendung als Dichtungen, Kühlung von Lautsprechern oder in der Sensortechnik. Neben diesen technischen Einsatzmöglichkeiten stellt die Anwendung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln und Ferrofluiden sowohl in der medizinischen Diagnostik und Therapie als auch für biochemische Anwendungen ein immer bedeutenderes Einsatzgebiet dar.

Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel sind sphärische Teilchen, deren Größe im Bereich von ca. 5 bis 30 nm liegt und die ein permanentes magnetisches Dipolmoment besitzen. Eisenoxid-Partikel, die sich im Magnetfeld ähnlich wie ein Ferromagnet stark magnetisieren lassen, im Gegensatz zum Ferromagneten jedoch nach Abschalten des Magnetfeldes keine Restmagnetisierung aufweisen, werden als superparamagnetisch bezeichnet.¹ Liegen superparamagnetische Eisenoxid-Partikel in einer Trägerflüssigkeit vor, wird diese Dispersion auch Ferrofluid genannt.

In der Biochemie hat sich die Anwendung von mit Antikörpern markierter superparamagnetischer Partikel in Immunoassays oder zur Separation und Aufreinigung von Zellen, Zellbestandteilen und *messenger*-Ribonukleinsäure zu gängigen Verfahren entwickelt.

Am Menschen kommen superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie zum Einsatz. Sie werden oral zur Kontrastierung des Magen-Darm-Traktes² (Abdoscan[®], Lumirem[®]) oder parenteral zur Darstellung von Metastasen und Primärtumoren der Leber³ (Resovist[®], Ferridex[®]) appliziert. Andere klinische Anwendungen von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln haben sich bis jetzt noch nicht etablieren können.

Die Magnetresonanz-Tomographie (MRT) ist ein modernes bildgebendes Diagnoseverfahren, das in der Medizin vielfältig eingesetzt wird. Die Vorteile der MRT sind zum einen, dass zur Erzeugung der Bilder keine Röntgenstrahlung gebraucht wird, zum anderen lassen sich ohne einen Eingriff in den Körper computergestützt Schnittbilder erzeugen, die den Körper oder einzelne Organe aus jedem beliebigen Winkel darstellen.

Bei Einführung der MRT in die medizinische Diagnostik schien zuerst die Anwendung von Kontrastmitteln nicht nötig zu sein. Es zeigte sich aber, dass durch geeignete Kontrastmittel die Aussagekraft der MRT-Bilder um ein Vielfaches gesteigert wird. Diese Kontrastmittel auf Basis von Eisenoxiden sind gut verträglich und ermöglichen eine deutliche Darstellung von Metastasen in der Leber (Resovist[®], Ferridex[®]). Im Vergleich zum Körpereisenpool sind

diagnostische Dosierungen von ca. 0.01 bis 0.05 mmol Eisen pro Kilogramm Körpergewicht gering und entsprechen ca. 5 bis 10 % der Gesamteisenmenge des Körpers. Nach intravenöser Injektion werden die Nanopartikel abgebaut und das Eisen in den Körpereisenpool überführt.⁴

Das Anwendungsspektrum der bisher entwickelten und in der Klinik routinemäßig verwendeten eisenoxidhaltigen MRT-Kontrastmittel ist allerdings immer noch eng. Die Partikel werden fast vollständig von Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) der Leber aufgenommen und eignen sich zurzeit nur für die Unterscheidung gesunder Leberzellen von Lebermetastasen. Intensiv wird die Anwendung magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel für die Therapie von Tumoren mittels Hyperthermie^{5,6} untersucht. Weitere zurzeit intensiv erforschte Einsatzgebiete stellen zum Beispiel die magnetische Zellmarkierung in der Stammzelltherapie,^{7,8} die spezifische Diagnose von Tumoren durch Kopplung der Partikel mit Antikörpern⁹ oder die Verwendung als Träger und Marker für die Kontrolle einer Gentherapie¹⁰ dar.

Eisenoxid-Nanopartikel eignen sich theoretisch ebenfalls als Träger für Arzneistoffe, die auf der Oberfläche der Partikel gebunden werden könnten. Um die arzneistoffbeladenen Partikel in das Zielgewebe zu bringen und dort gezielt anzureichern, kommen externe starke Magnetfelder oder die zusätzliche Anbindung spezifischer, im Zielgewebe bindender Moleküle wie Antikörper oder Rezeptor-Liganden in Frage. Für biochemische Applikationen und die intravenöse Injektion am Menschen müssen die Partikel unter physiologischen Bedingungen stabil bleiben und dürfen nicht agglomerieren. Die Stabilisierung der Eisenoxid-Partikel wird bisher durch eine Beschichtung mit Polymeren wie Dextran (Ferridex[®]), Carboxydextran (Resovist[®]), Albumin¹¹ und Stärke¹², durch Citrat¹³ oder eine liposomale Umhüllung¹⁴ erreicht.

Um sich in anderen Organen als Leber und Milz anreichern zu können, müssen die nanopartikulären Systeme vor einer Erkennung durch die Zellen des RES geschützt werden. Die Maskierung der Partikel kann durch eine geeignete Beschichtung erreicht werden, die gleichzeitig auch für eine Stabilisierung der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen sorgen sollte. Idealerweise sollte eine derartige Beschichtung auch die Möglichkeit der Partikelmodifikation durch Einbindung eines Arzneistoffs oder Kopplung eines spezifischen Liganden bieten und biokompatibel sein.

Die Entwicklung neuer Beschichtungsmaterialien für superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel stellt damit einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung der Diagnose und Therapie von Krankheiten dar. Für die erfolgreiche Entwicklung organspezifischer MRT-Kontrastmittel ist es unerlässlich, ein grundlegendes Verständnis für die Zusammenhänge zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Partikeln und deren Verhalten im menschlichen Körper zu bekommen. Zusätzlich könnte ein arzneistoffhaltiges

organspezifisches Kontrastmittel die Diagnose und Therapie einer Krankheit in einem Schritt miteinander verknüpfen und durch eine spezifische Anreicherung des Arzneistoffs am Zielorgan mögliche Nebenwirkungen der Therapie verringern. Die zur Stabilisierung der intravenös applizierten Partikel verwendeten Materialien sollten bioabbaubar bzw. biokompatibel sein. Biologisch abbaubare Substanzen werden im menschlichen Körper zu nicht-toxischen Produkten abgebaut und vom Körper ausgeschieden bzw. metabolisiert. Biokompatible Materialien sind für Mensch und Tier harmlos und nicht toxisch, ihre Anwendung führt zu keiner klinisch relevanten Reaktion des Körpers, dabei können sie auch zusätzlich im Körper biologisch abbaubar sein.^{15,16}

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung und Untersuchung neuer Beschichtungsmaterialien und nanopartikulärer Systeme zur Anwendung in der Medizin. Dazu sollen Copolymere aus biologisch abbaubaren und biokompatiblen Bestandteilen synthetisiert sowie deren Eigenschaften hinsichtlich der Beschichtung und der Bildung von Nanopartikeln untersucht werden. Die Polymere sollen aus Poly-(ethylenoxid) (PEO) und Peptid-Blöcken bestehen und wurden bislang noch nicht zur Stabilisierung von Nanopartikeln verwendet (siehe Abschnitt 2.4).

Durch die Abschirmung antigener Strukturen verhindert PEO die Erkennung von körperfremden Oberflächen (z. B. intravenös applizierter partikulärer Systeme) durch Zellen des RES und die damit verbundene schnelle Entfernung der Partikel aus dem Blut und ihre Anreicherung in Leber und Milz.¹ Da PEO mit einem Molekulargewicht $M_w = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ sowohl eine deutliche Verringerung der Proteinadsorption auf Oberflächen zeigt als auch biokompatibel ist und frei über die Niere eliminiert werden kann, wurde in dieser Arbeit für alle Untersuchungen ein PEO mit einem Molekulargewicht von $M_w = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ verwendet (siehe auch Abschnitt 2.1).

Als zu stabilisierende Nanopartikel werden Eisenoxid-Nanopartikel synthetisiert und nach Beschichtung deren Eignung als Kontrastmittel in der MRT getestet.

Im Hinblick auf die spätere Entwicklung von arzneistoffbeladenen Nanopartikeln, soll die Komplexbildung der Polymere mit einem Modellarzneistoff untersucht werden. Als Modellarzneistoff wurde dafür Diminazen ausgewählt. Diminazen weist durch seine Amidin-Gruppen strukturelle Ähnlichkeiten zu Zytostatika auf und wird zur Behandlung der Schlafkrankheit eingesetzt. Zusätzlich sollen Aspekte der Polymer-Synthese untersucht werden.

Im Einzelnen lässt sich diese Arbeit in folgende Aufgabenbereiche gliedern:

1. Synthese und Charakterisierung von Homo-, Block und Pfropf-copolymeren aus Poly-(ethylenoxid) und Peptid-Blöcken und Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit diesen Polymeren. Dabei soll der Einfluss der Polymerarchitektur auf die Stabilisierung der entstehenden Nanopartikel untersucht und unter physiologischen Bedingungen stabile Nanopartikel hergestellt werden.
2. Anwendung der *layer-by-layer*-Methode zur Herstellung von polymerbeschichteten Nanopartikeln, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind sowie unterschiedliche Zetapotentiale aufweisen. Dies soll an Hand eines Blockcopolymeren durchgeführt werden.
3. Erste *in-vivo*-Tests von polymerbeschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln.
4. Komplexierung des Modellarzneistoffs Diminazen mit Blockcopolymeren und Untersuchung der Eigenschaften der entstehenden Arzneistoff-Polymer-Komplexe.
5. Untersuchung der Synthese von Blockcopolymeren mit enger Molekulargewichtsverteilung durch die ringöffnende Polymerisation von N-Carboxyanhydriden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

- Kapitel 4. Stabilisierung von Maghemit-Nanopartikeln mit Poly-(ethylenimin) und Poly-(ethylenoxid)-*block*-poly-(glutaminsäure):
Maghemite Nanoparticles protectively coated with poly(ethylene oxide)-*block*-poly(glutamic acid).
A. F. Thünemann, D. Schütt, L. Kaufner, U. Pison, H. Möhwald; Langmuir (2006), 22, 2351-2357
- Kapitel 5. Komplexe aus Diminazen und Poly-(ethylenoxid)-*block*-poly-(glutaminsäure):
Complexes of poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-glutamate) and diminazene.
A. F. Thünemann, D. Schütt, R. Sachse, H. Schlaad, H. Möhwald; Langmuir (2006), 22, 2323-2328
- Kapitel 6. Synthese von Blockcopolymeren durch Polymerisation von N-Carboxyanhydriden:
Preparation of well defined diblock copolymers with short polypeptide segments via polymerizations of N-carboxyanhydrides.
J. F. Lutz, D. Schütt, S. Kubowicz; Macromolecular Rapid Communications (2005), 26, 23-28

Referenzen

- ¹ Bean, C.P., Jacobs, I.S.: Magnetic granulometry and superparamagnetism. *J. Appl. Phys* **1956**, 27, 1448-1452
- ² Lonnemark, M., Hemmingsson, A., Bach-Gansmo, T., Ericsson, A., Oksendal, A., Nyman, R., Moxnes, A.; Effect of superparamagnetic particles as oral contrast medium at magnetic resonance imaging. A phase I clinical study. *Acta Radiol* **1989**, 30, 193-196
- ³ Kehagias, D.T., Gouliamos, A.D., Smyrniotis, V., Vlahos, L.J.; Diagnostic efficacy and safety of MRI of the liver with superparamagnetic iron oxide particles (SH U 555 A). *J Magn Reson Imaging* **2001**, 14, 595-601
- ⁴ Weissleder, R.; Stark, D.D.; Engelstad, B.L.; Bacon, B.R.; Compton, C.C.; White, D.L.; Jacobs, P.; Lewis, J.; Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol* **1989**, 152, 167
- ⁵ Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fahling, H., Krause, J., Wlodarczyk, W., Sander, B., Vogl, T., Felix, R.; Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int J Hyperthermia* **1997**, 13, 587-605
- ⁶ Jordan, A., Wust, P., Scholz, R., Tesche, B., Fahling, H., Mitrovics, T., Vogl, T., Cervos-Navarro, J., Felix, R.; Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int J Hyperthermia* **1996**, 12, 705-722
- ⁷ Bulte, J.W.M., Duncan, I.D., Frank, J. A.; In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**, 22, 899-907
- ⁸ Franklin, R.J., Blaschuk, K.L., Bearchell, M.C., Prestoz, L.L., Setzu, A., Brindle, K.M., French-Constant, C; Magnetic resonance imaging of transplanted oligodendrocyte precursors in the rat brain. *Neuroreport* **1999**, 10, 3961-3965
- ⁹ Cerdan, S., Lotscher, H.R., Kunnecke, B., Seelig, J.; Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors. *Magn Reson Med* **1989**, 12, 151-163
- ¹⁰ Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E.A., Basilion, J.P.; In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* **2000**, 6; 351-354
- ¹¹ Widder, D.J., Greif, W.L., Widder, K.J., Edelman, R.R., Brady, T.J.; Magnetite albumin microspheres: a new MR contrast material. *Am J Roentgenol* **1987**, 148, 399-404

- ¹² Kreft, B.P., Tanimoto, A., Leffler, S., Finn, J.P., Oksendal, A.N., Stark, D.D.; Contrast-enhanced MR imaging of diffuse and focal splenic disease with use of magnetic starch microspheres. *J Magn Reson Imaging* **1994**, 4, 373-379
- ¹³ Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Kravec I, Pilgrimm H, Bergmann-Fritsch H, Hamm B.; Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* **2004**; 39, 7, 394-405
- ¹⁴ Päuser, S., Reszka, R., Wagner, S., Wolf, K.J., Buhr, H.J., Berger, G.; Liposome-encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI-guided search for tumor-specific drug carriers. *Anticancer Drug Des* **1997**, 12, 125-135
- ¹⁵ Lendlein, A.; Polymere als Implantatwerkstoffe, *Chemie in unserer Zeit* **1999**, 33, 5, 279-295
- ¹⁶ Ikada, Y.; Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications* **2000**, 21, 117-132