

7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Verwendung von biokompatiblen Copolymeren aus Poly-(ethylenoxid) und Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure als neue Beschichtungsmaterialien in der Medizin zu untersuchen. Es konnte anhand von Modell-Nanopartikeln aus Eisenoxid gezeigt werden, dass die Polymere unterschiedliche Stabilisierungseigenschaften besitzen und es möglich ist, unter physiologischen Bedingungen stabile Partikel mit unterschiedlichem Zetapotential herzustellen. Der Einsatz der beschichteten Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie wurde in Tierversuchen getestet. Außerdem wurde auf Aspekte der Synthese der Copolymere eingegangen und die Komplexbildung mit einem Arzneistoff untersucht.

Die verwendeten Eisenoxid-Nanopartikel wurden durch Ausfällung mit Ammoniumhydroxid aus einer Eisen(II)-Eisen(III)-chlorid-Lösung hergestellt. Durch die Kombination von Mössbauer-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Nanopartikeln ausschließlich um Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) handelte. Dabei betrug die Größe einer Maghemit-Domäne jeweils 12 nm.

Die Verwendung von α -Methoxy- ω -amino-poly-(ethylenoxid) (PEO) als Makroinitiator wurde bei der ringöffnenden Polymerisation von N-Carboxyanhydriden (NCA) der γ -Benzylglutaminsäure bzw. β -Benzylasparaginsäure untersucht. Es sollten dabei Blockcopolymere mit enger Molekulargewichtsverteilung und definierter molekularer Struktur synthetisiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine enge Molekulargewichtsverteilung durch den Einsatz der Ammoniumchlorid-Methode erreicht wird, indem $\text{PEO-NH}_3^+\text{Cl}^-$ als Makroinitiator verwendet wurde. Durch eine Erhöhung der Reaktions-temperatur und die Verwendung einer Mischung von $\text{PEO-NH}_3^+\text{Cl}^-$ und PEO-NH_2 konnten bei einer verminderten Reaktionsdauer Blockcopolymere mit enger Molekulargewichtsverteilung synthetisiert werden.

Die Untersuchung der Stabilisierung von Nanopartikeln aus Maghemit durch Homopolymere aus Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure sowie Block- und Pfropfcopolymeren aus PEO und Poly-(glutaminsäure) bzw. Poly-(asparaginsäure) zeigten deutliche Unterschiede in den Stabilisierungseigenschaften der Polymere. Es wurden die Stabilität der Partikel unter physiologischen Bedingungen und der Einfluss der Molekülarchitektur auf die Partikelgröße und das Zetapotential der beschichteten Partikel getestet. Außerdem wurde die Frage untersucht, ob sich mit diesen Polymeren unter

physiologischen Bedingungen stabile Partikel mit unterschiedlichen Zeta-potentialen gezielt herstellen lassen.

Mit allen verwendeten Polymeren wurden unter physiologischen Bedingungen stabile Maghemit-Partikel im Größenbereich von 50 bis 160 nm hergestellt. Es zeigte sich, dass Homopolymere aus Glutaminsäure und Asparaginsäure Maghemit-Partikel stabilisieren können und in 0.154 molarer NaCl-Lösung bei pH 7.4 stabile Partikel-Dispersionen entstehen. Dabei waren die beschichteten Partikel unabhängig von der Art der Aminosäure und der Kettenlänge des Homopolymers ab einer Konzentration $c_{\text{Aminosäure}} = 3 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$ stabil und wiesen auch bei höheren Konzentrationen an Aminosäuren konstante Zeta-potentiale im Bereich von -70 mV auf. Es war daher mit diesen Polymeren nicht möglich, unter physiologischen Bedingungen stabile Partikel mit verschiedenen Zetapotentialen herzustellen.

Die Verwendung von Blockcopolymeren aus PEO und Poly-(aminosäure)_n zur Beschichtung der Maghemit-Partikeln führte zu einer verbesserten Stabilisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu den Homopolymeren. Durch eine Veränderung der Länge des anionischen Poly-(aminosäure)-Blocks und der Menge der zur Beschichtung verwendeten Copolymere war es möglich, unter physiologischen Bedingungen stabile Partikel mit unterschiedlichem Zetapotentialen im negativen Bereich zu erhalten.

Es zeigte sich, dass bei Copolymeren aus PEO und Glutaminsäure die Stabilität der entstehenden Partikel durch die PEO-Blöcke bestimmt wird. Unabhängig von der Art des Copolymers (Block- oder Pfropfcopolymer) und der Anzahl der PEO-Ketten im Polymer benötigte eine effektive Stabilisierung der Maghemit-Partikel eine Konzentration an PEO zwischen $1 - 2 \times 10^{-7} \text{ mol g}^{-1}$. Es konnte auch gezeigt werden, dass auch PEO-Ketten mit einer sehr geringen Anzahl an Glutaminsäure-Einheiten (2 bzw. 6 Einheiten Glutaminsäure) effektiv Eisenoxid-Partikel stabilisieren. Die Glutaminsäure-Einheiten fungieren dabei offensichtlich als „Anker“ für die PEO-Ketten, um sie auf der Oberfläche der Partikel zu fixieren. Für die Aminosäure Asparaginsäure konnten keine derartigen Aussagen gemacht werden, da nur zwei Polymere mit Asparaginsäure zur Verfügung standen.

Das Komplexierungsverhalten des Arzneistoffs Diminazen wurde mit Blockcopolymeren aus PEO und der Aminosäure Glutaminsäure (PEO-*b*-Glu) untersucht. Die Anzahl der Glutaminsäure-Monomere im Poly-(glutaminsäure)-Block betrug dabei 6, 10, 16, 20 und 25, der PEO-Block blieb konstant. Durch Komplexierung und Selbstorganisation von Diminazen mit PEO-*b*-Glu bildeten sich Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 32 nm und

einem Polydispersitätsindex von 0.1. Diminazen band dabei nur mit einer seiner beiden möglichen Bindungsstellen an PEO-*b*-Glu mit einer Bindungskonstanten K in der Größenordnung von 10^4 M^{-1} . Der Anteil an gebundenem Diminazen lag bei einem molaren Verhältnis von Glutaminsäure zu Diminazen von 8:1 nahe 100 %.

Durch die Komplexbildung mit Diminazen wurde die pH-abhängige Umwandlung der α -Helix des Poly-(glutaminsäure)-Blocks in die Knäuel-Konformation deutlich von pH 5 auf pH 12 verschoben. Diminazen stabilisierte effektiv die Sekundärstruktur der Poly-(glutaminsäure) und induzierte durch die Komplexbildung mit den Copolymeren die Bildung der α -Helix des Poly-(glutaminsäure)-Blocks bei pH-Werten, an denen der Poly-(glutaminsäure)-Block ohne Diminazen in der Knäuel-Konformation vorliegt. Außerdem blieb der Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplex über das gesamte untersuchte Verhältnis von Diminazen zu Copolymer stabil in Lösung. Dieser stabilisierende Effekt des Diminazens könnte durch Ausbildung einer schützenden Schicht aus PEO-Ketten als äußere Hülle bei Formierung der Nanopartikel entstehen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der PEO-Block des Blockcopolymeren bei der Komplexbildung mit Diminazen keinen Einfluß auf die Konformationsänderung der Poly-(glutaminsäure) hat. Es ist daher zu vermuten, dass Diminazen ebenfalls die Sekundärstruktur von Peptiden mit einem großen Anteil an α -Helices bei Veränderung des pH-Wertes stabilisieren kann.

Mit Hilfe der *layer-by-layer*-Technik wurden Maghemit-Nanopartikel mit einer ersten Schicht aus Poly-(ethylenimin) (PEI) und einer zweiten Schicht aus Poly-(ethylenoxid)-*b*-poly-(glutaminsäure) (PEO-*b*-Glu₁₃) stabilisiert. Die entstehenden Nanopartikel besaßen ein leicht negatives Zetapotential und waren in 0.154 molarer Natriumchlorid-Lösung bei pH 7.4 über einen Zeitraum von 6 Monaten stabil.

Das Zetapotential der PEI-PEO-*b*-Glu₁₃-Partikel konnte bei konstanter Menge an PEO-*b*-Glu₁₃ 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*-Glu₁₃ entstanden 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 mit negativem, neutralem und positivem Zetapotential herzustellen, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind. Die Größe der resultierenden Partikel blieb dabei unabhängig von der verwendeten Menge an PEI konstant.

Die Anwendung der mit PEI-PEO-*b*-Glu₁₃ beschichteten Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) wurde *in vivo* untersucht. Die Ergebnisse der ersten Versuche an Ratten zeigten, dass die Partikel einen starken Kontrast in der MRT geben und eine gute Biokompatibilität besitzen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Copolymere aus PEO und Peptid-Böcken aus Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure in der Lage sind, Maghemit-Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen effektiv zu stabilisieren. Die Partikelgröße und die Stabilität der entstehenden Partikel-Dispersionen erlauben dabei eine intravenöse Applikation der Partikel.

Außerdem können mit diesen Copolymeren gezielt Partikel mit unterschiedlichen Ladungen (Zetapotential) hergestellt werden. Damit ergibt sich 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 und zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften von Partikeln und deren Verhalten in biologischen Systemen beizutragen.

Durch eine Kombination der Komplexierungs- und Stabilisierungseigenschaften der untersuchten Blockcopolymere wird die Herstellung eines arzneistoffhaltigen Kontrastmittels ermöglicht. Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können somit zur Entwicklung eines arzneistoffbeladenen MRT-Kontrastmittels beitragen.