



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Verbesserung der Kontrasteigenschaften von Gd-hältigen PLGA-Nanopartikeln für die Magnetresonanztomografie durch verschiedene Aminospacer und Komplexbildner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Julia Lonkai
Matrikel-Nummer: 0400466
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): A449 – Pharmazie
Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Wien, im Frühjahr 2010

Ich danke

Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für die Bereitstellung meines Themas, die Unterstützung bei der Verfassung meiner Diplomarbeit und die Möglichkeit die Arbeit mit Nanopartikeln kennen zu lernen sowie der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Gerda Ratzinger für ihre engagierte Betreuung.

Meinen Studienkollegen, von denen viele mittlerweile meine Freunde sind, für die schöne gemeinsame Zeit sowie die gegenseitige Unterstützung und Aufmunterung während eines langen und arbeitsintensiven Studiums.

Meinen Freunden, die während des Studiums meine Launen und Sorgen ausgehalten haben und mich immer wieder aufgemuntert oder tatkräftig mitgeschimpft haben.

Meiner Familie, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht, mich nie unter Druck gesetzt hat und mir immer motivierend zur Seite gestanden ist.

| | |
|--|-----------|
| <u>Vorwort</u> | <u>4</u> |
| <u>Einleitung</u> | <u>6</u> |
| Nanopartikel | 6 |
| Magnetresonanztomografie | 7 |
| Kontrastmittel | 8 |
| Größenbestimmung mittels Dynamic Light Scattering | 9 |
| Zetapotential..... | 10 |
| Diafiltration | 12 |
| Osmometrie | 13 |
| Optische ICP-Emissionsspektrometrie | 14 |
| Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA) | 14 |
| EDAC..... | 15 |
| NHS | 15 |
| Aminospacer | 16 |
| DOTA..... | 17 |
| DTPA..... | 18 |
| Pluronic F68 | 20 |
| <u>Methoden</u> | <u>21</u> |
| Herstellung von PLGA-Nanopartikeln | 21 |
| Modifikation der Partikeloberfläche | 21 |
| Alternative Stabilisierungsmöglichkeiten für Gd-hältige PLGA-Nanopartikel..... | 33 |
| Einbau von Phospholipiden in PLGA-Nanopartikel..... | 39 |
| <u>Zusammenfassung</u> | <u>52</u> |
| <u>Appendix A: Abkürzungen & Materialien</u> | <u>55</u> |
| <u>Appendix B: Quellen</u> | <u>57</u> |
| <u>Appendix C: Curriculum Vitae</u> | <u>59</u> |
| <u>Appendix D: Publikation</u> | <u>62</u> |

Vorwort

Magnetresonanztomografie (MRT) ist ein bildgebendes diagnostisches Verfahren, das es ermöglicht, innere Strukturen und Körperfunktionen besser zu verstehen, beziehungsweise Fehlfunktionen wie neurologische oder kardiovaskuläre Störungen damit zu diagnostizieren oder auch Tumore von anderen Geweben zu unterscheiden.

Die Protonen der Wassermoleküle im menschlichen Organismus ordnen sich im Magnetfeld des MRT-Geräts an. Durch einen hochfrequenten Radioimpuls werden die Protonen vorübergehend aus ihrer Position ausgelenkt und fallen anschließend wieder in die Ursprungsposition zurück. Dabei geben sie Signale ab, die mit Hilfe von Detektorspulen erfasst und digitalisiert an Computer weitergegeben werden, wo sie in kontrastreiche Schnittbilder umgesetzt werden. Im Gegensatz zu anderen bildgebenden diagnostischen Verfahren wie Röntgenverfahren oder Computertomografie wird während des Prozesses keine ionisierende, schädliche Strahlung abgegeben.

Durch die Gabe von Kontrastmitteln wird der Effekt dieses Zurückfallens in den Ausgangszustand, die sogenannte Relaxation, verstärkt und die Magnetresonanzbilder können durch die höheren Farb- und Helligkeitsunterschiede zwischen den verschiedenen Geweben und Flüssigkeiten leichter gedeutet werden.

Die zurzeit am häufigsten angewendeten Kontrastmittel basieren auf wasserlöslichen Chelatkomplexen von Gadolinium, das zu den Metallen seltener Erden gehört. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gadolinium-Chelate zur Kontrastverstärkung eingesetzt.

Während der letzten 30 Jahre entwickelte sich die Nanotechnologie in rasendem Tempo[1]. In der pharmazeutischen Technologie werden in wässriger Lösung suspendierte Polymernanopartikel als kolloidale Wirkstoff-Trägersysteme erforscht. Diese können über das Blut transportiert werden und aufgrund ihrer kleinen Größe sogar kleinste Kapillaren passieren. .

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden Nanopartikel aus dem biokompatiblen und bioabbaubaren Polymer Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA) hergestellt und deren Oberfläche kovalent mit Gadolinium-Chelaten markiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst Aminospacer (Polyethylenimin, Tetramethyldiamin und Octamethyldiamin) an der Partikeloberfläche immobilisiert, um die Kopplung der Komplexbildner 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und Diethylentriamin-pentaessigsäure (DTPA) zu ermöglichen. Die

oberflächengebundenen Chelatoren wurden schließlich mit Gadolinium-Ionen beladen, die im MRT den Bildkontrast verstärken.

Einleitung

Nanopartikel

Nanopartikel stellen kolloidale Trägersysteme dar und lassen sich in Nanosphären und –kapseln einteilen [2]. Während Nanosphären aus einer durchgängigen Polymermatrix bestehen, besitzen Nanokapseln, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, einen Kern und eine Hülle. Wirkstoffe können in der Matrix oder im Kern eingeschlossen oder an der Oberfläche immobilisiert sein.

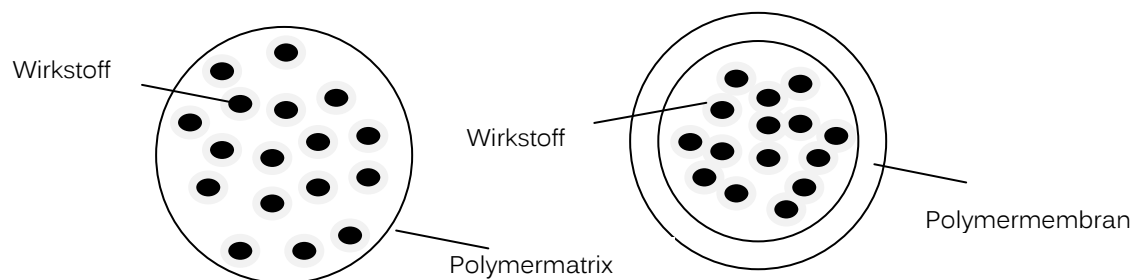


Abb.1 – Schemata von Nanosphäre und Nanokapsel

Nanopartikel sind durch eine Partikelgröße im Nanometerbereich und eine große Oberfläche charakterisiert [2]. Durch die Abschirmung des Wirkstoffes im partikulären „Carrier“ (Träger) wird eine vorzeitige Verstoffwechslung durch Abbau und Ausscheidung verhindert. Zusätzlich können eine kontrollierte Wirkstoff-Freisetzung und eine Anreicherung am Zielgewebe erreicht werden. Man bezeichnet diese gewebspezifische Wirkstoffabgabe als „drug targeting“.

Diese Anwendung als Wirkstoffträger erfordert eine geeignete Matrix wie zB. PLGA (siehe unten) und physikalische Parameter, um einen stabilen Transport und eine optimale Freisetzung zu gewährleisten. Für eine intravenöse Applikation muss das Trägermaterial bioabbaubar und untoxisch sein. Um die Blutwege nicht zu verstopfen und eventuell biologische Membranen passieren zu können, dürfen die kolloidalen Partikel nicht größer als 400nm sein [2]. Weiters dürfen sie nicht vorzeitig durch das körpereigene Abwehrsystem, das retikuloendotheliale System, aus dem Blut eliminiert werden.

Nanopartikel können in der Medizin als Träger für verschiedene Stoffklassen wie Cytostatica, Hormone, Antihypertensiva, Immunmodulatoren und Kontrastmittel dienen, aber auch als Vehikel für Makromoleküle wie Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und Antikörper. Beispielsweise zeigt eine Studie, dass die orale Applikation von Insulin-beladenen Nanokapseln eine Alternative zur subkutanen Injektion darstellt, die die Lebensqualität von Diabetes mellitus-Patienten deutlich

verbessert [3]. Eine andere Studie mit Ampicillin-beladenen Polyisohexylcyanacrylat-Nanopartikeln ergab gegenüber freiem Ampicillin bei der Behandlung von Infektionen mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* deutliche Vorteile [4].

Magnetresonanztomografie

Die Magnetresonanztomografie (MRT, Magnetic Resonance Imaging, MRI, Kernspintomografie) ist neben Röntgenverfahren, Computertomografie, oder Ultraschall ein bildgebendes Verfahren der medizinischen Diagnostik.

Wasserstoffkerne besitzen einen Eigendrehimpuls (Spin), wodurch sie sich mit immer gleicher Frequenz um ihre eigene Achse drehen. Gleichzeitig besitzen sie eine positive elektrische Ladung. Durch die Kombination von Spin und Ladung verhalten sie sich wie kleine Magnete und sind durch äußere Magnetfelder und elektromagnetische Wellen beeinflussbar [5].

Wird nun ein statisches Magnetfeld angelegt, so richten sich die vorher in alle Richtungen weisenden Rotationsachsen der Kerne entlang dessen Feldrichtung aus.

Kurze Radiofrequenzimpulse mit festgelegter Wellenlänge und Stärke stören diese Ausrichtung und bewirken ein Kippen der Kerne aus ihrer Rotationsachse im statischen Magnetfeld. Die Kerne reagieren dabei mit einer sogenannten Präzessionsbewegung, das heißt, die Achse der Spins rotiert mit gleicher Frequenz um die Feldrichtung des statischen Magnetfeldes, vergleichbar mit einem Kreisel.

Werden die Impulse wieder abgeschaltet, fallen die Kerne nach und nach in ihren Ursprungszustand zurück und rotieren wieder parallel zum angelegten äußeren Magnetfeld. Die Zeit, die sie dafür brauchen, wird Relaxationszeit genannt. Dabei senden sie selbst Signale aus, die in der Empfangsspule des Geräts registriert und von einem Computer in Hell-Dunkel-Bilder umgewandelt werden.

Bei der Relaxation finden gleichzeitig zwei voneinander unabhängige Vorgänge statt:

- Spin-Gitter Relaxation (longitudinale Relaxation)

Beim Zurückfallen der Spins in das statische Magnetfeld geben die Spins Energie an ihre Umgebung ab. Die dafür nötige Dauer wird als T1-Relaxationszeit bezeichnet.

- Spin-Spin-Relaxation (transversale Relaxation)

Bei der transversalen Relaxation beeinflussen die Spins andere Spins. Während der Anregung präzessieren sie synchron – in Phase. Durch den Energieaustausch untereinander verlieren die Spins diese sogenannte Phasenkohärenz. Die T2-Relaxationszeit gibt daher die Dauer des Verlustes des MR-Signals nach Anregung an und ist unabhängig von der Stärke des Magnetfeldes.

Der Kontrast der Schnittbilder ist von drei Parametern abhängig: Protonendichte, T1- und T2-Relaxationszeit. Je nach Gewebe und Messbedingungen differieren diese Parameter stark, wodurch unterschiedlich helle und dunkle Bilder entstehen.

Die entstehenden Schnittbilder (Abbildung 2) bestehen aus verschiedenen Graustufen, die keinen absoluten Bezug enthalten. Sie werden durch Kontrastvergleich mit bekannten Geweben interpretiert [5].



Abb. 2- Sagittale Schnittebene eines fünfjährigen, gesunden Schädels [6]

Kontrastmittel

Die durch MR-Kontrastmittel bewirkte Kontrastanhebung verbessert die diagnostische Aussagekraft von MR-Bildern. Diese Arbeit behandelt potentiell intravasal applizierbare Nanopartikel, deren Größe unter der des Kapillardurchmessers von Blutgefäßen liegen muss, um Embolien auszuschließen.

Kontrastmittel agieren entweder direkt durch Änderung der Protonendichte eines Gewebes oder indirekt durch Änderung des auf die Gewebe wirkenden Magnetfeldes, also durch T1 und T2-Relaxation.

Das Ändern des lokalen Magnetfeldes führt zu einer Wechselwirkung zwischen den ungepaarten Elektronenspins der Kontrastmittel und den umliegenden Wasserstoffatomen der verschiedenen Moleküle im Gewebe [5].

Die üblichen Kontrastmittel besitzen entweder ferromagnetische oder paramagnetische Eigenschaften. Ferromagnetische Substanzen wie Eisenoxid

besitzen ein permanentes magnetisches Moment durch ihre Atomverbände und stellen dadurch selbst einen Magneten dar. Gadoliniumkomplexe, Mangan- oder Eisenverbindungen sind paramagnetisch. Sie enthalten ein bis mehrere ungepaarte Elektronen, erzeugen daher ein kontinuierliches magnetisches Moment, relaxieren nach Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes selbst und verstärken dabei die Rotationsgeschwindigkeit der benachbarten Protonen. Hauptsächlich angewendete Kontrastmittel sind neben Eisenoxidpartikeln wasserlösliche Gadolinium-Chelate. Diese können mit verschiedenen Trägern wie Dendrimeren, Dextranen und Latex-Nanopartikeln assoziiert werden. Das Lanthanid Gadolinium enthält sieben freie Elektronen und besitzt daher äußerst großes Potential als Kontrastmittel.

Gadolinium kann durch seine hohe Toxizität und unerwünschte Biodistribution nicht in ionischer Form appliziert werden. Durch Komplexierung mit DTPA, DOTA, etc. erzielt man eine bessere Verträglichkeit. Die Komplexbildung verläuft grundsätzlich reversibel, da ein Gleichgewicht zwischen freier und gebundener Form vorliegt. Daher kann je nach pH-Wert, Temperatur und konkurrierenden Ionen wie Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Protonen im Magen saft, Gadolinium teilweise freigesetzt werden. Die freigesetzte Menge ist jedoch so gering, dass keine sichtbaren toxischen Erscheinungen auftreten. Als zusätzliche Sicherheitsmaßnahme wird ein freier Komplexbildner wie DTPABA im Überschuss zugesetzt, sodass frei werdendes Gadolinium frühzeitig abgefangen wird. Durch Einsatz der klinisch und auch in dieser Arbeit verwendeten Komplexbildner DTPA und DOTA sind die Komplexe so stark, dass kaum eine Freisetzung von Gadolinium erfolgt.

Die Toxizität von freiem Gadolinium beruht auf dem gleichen Ionendurchmesser wie Calciums, wodurch es an Calciumkanäle binden und diese blockieren kann. Als Folge werden wichtige Funktionen wie Zellatmung, Muskelkontraktionen und Blutgerinnung negativ beeinflusst [7].

Größenbestimmung mittels Dynamic Light Scattering

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) kann mittels dynamischer Lichtstreuung unter Berücksichtigung der Brown'schen Bewegung der Nanopartikel auf deren Größe geschlossen werden. Dabei findet die Stokes-Einstein-Gleichung Anwendung:

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

r = Radius der Teilchen

k = Boltzmannkonstante

T = absolute Temperatur

η = dynamische Viskosität

D = Diffusionskoeffizient

Laserlicht wird durch einen Partikel gestreut. Legt man nun einen Schirm hinter die Teilchen, so wird dieser durch das gestreute Licht beleuchtet. Befinden sich viele Partikel vor dem Schirm, dann entsteht ein Muster von schwarzen Flecken darauf. Durch die Brown'sche Molekularbewegung oszillieren die Nanopartikel in der Suspension, wobei kleine eine schnellere, große eine langsamere Bewegung ausführen. Daher steht das Muster auf dem Schirm nicht still.

Diese zeitliche Schwankung der Streulichtintensität wird gemessen und in die entsprechende Größe umgerechnet. Ermittelt werden hierbei der mittlere Teilchendurchmesser und der Polydispersitätsindex (PDI), der ein Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung darstellt.

Dispersionen mit einem PDI kleiner 0,15 besitzen eine enge Partikelgrößenverteilung. Ein PDI über 0,50 bedeutet eine zu breite Partikelgrößenverteilung und damit ein unbrauchbare Charge [8].

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde zur Größenmessung der Partikel der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Großbritannien) verwendet. Jede Probe wurde mindestens drei Mal analysiert. Aus den einzelnen Messungen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Zetapotential

Die Stabilität von Dispersionen wird wesentlich durch elektrostatische Abstoßung zwischen den einzelnen Teilchen bestimmt.

Befinden sich dissozierbare, protonenabgebende Gruppen an der Oberfläche von Partikeln, werden diese negativ geladen. Wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, befinden sich die positiven Gegenionen im umgebenden Medium und sind teilweise durch Adsorption an Partikel angelagert, wodurch diese nach Außen hin neutral erscheinen. Diese umgebende, positiv geladene Schicht wird als Stern-Schicht bezeichnet [9]. Eine weitere Schicht diffus beweglicher Gegenionen umringt die Stern-Schicht.

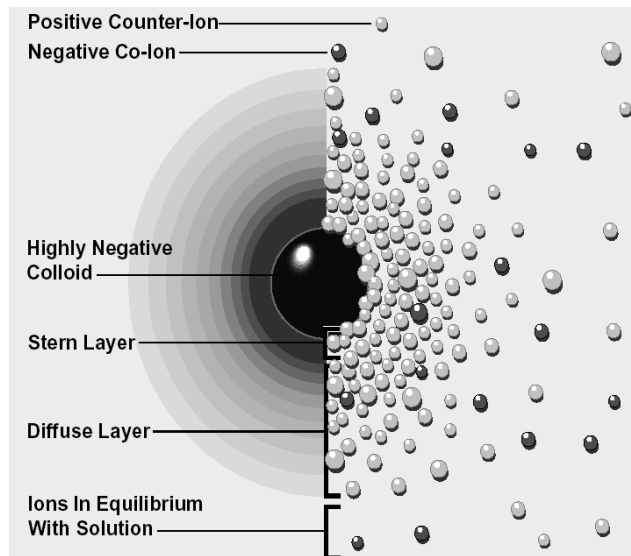


Abb.3 - Stern-Schicht und diffuse Schicht [10]

Je weiter die Gegenionen von der Teilchenoberfläche entfernt sind, desto geringer wird die Konzentration an positiven und desto höher die an negativen Ionen bis ein Ladungsausgleich vorliegt und die diffuse Schicht endet. An dieser Stelle beträgt die Spannung bzw. das Potential null, wie die Abbildung 4 deutlich zeigt. Spannung (Potential) bezeichnet die Ladungsdifferenz zwischen zwei definierten Punkten.[11]

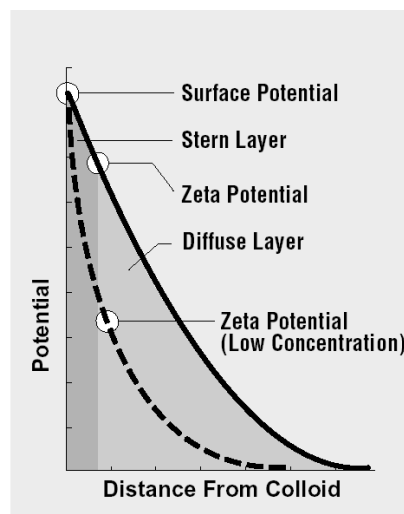


Abb.4 - Relation zwischen Zeta Potential und Oberflächenspannung [10]

Bei Bewegung wird ein Teil der diffusen Schicht durch Reibung abgeschert, die zur Kompensation nötigen Gegenionen stehen nicht länger zur Verfügung und das Partikel erscheint elektrisch geladen.

Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Teilchen in der Dispersion gemäß ihrer Ladung zur entsprechend entgegengesetzt geladenen Elektrode. Negativ geladene Teilchen bewegen sich zur Anode, wobei das elektrische Feld diese Wanderung beschleunigt. Während die Teilchengeschwindigkeit steigt, wird immer mehr der diffusen Schicht abgestreift bis die erreichte Teilchengeschwindigkeit der

dagegen wirkenden Reibungskraft entspricht. Dann bleibt die adhärenente diffuse Schicht konstant. Die Messung des Zetapotentials erfolgt bei dieser konstanten Geschwindigkeit.

Das Zetapotential ist daher das Potential an der Scherebene zwischen fixer und abstreifbarer diffuser Schicht. Unter geeigneten Bedingungen ist dadurch ein Rückschluss auf das Oberflächenpotential und daher auf die Stabilität der Dispersion möglich.

Besitzen die Partikel ein hohes Nernst-Potential, sind sie stark geladen und weisen daher eine hohe elektrostatische Abstoßungskraft auf. Diese Partikel neigen nicht zur Aggregation und die Dispersion ist somit stabil.

Ein Zetapotential zwischen -80 und -100mV verspricht eine extrem hohe Stabilität, während Werte zwischen -5 und $+3\text{mV}$ maximale Ausflockung bewirken [11].

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde zur Größenmessung der Partikel der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Großbritannien) verwendet. Jede Probe wurde mindestens drei Mal analysiert. Aus den einzelnen Messungen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Diafiltration

Als Diafiltration wird ein Prozess bezeichnet, bei dem eine Moleküle verschiedener Größe enthaltende Flüssigkeit unter Druck an der Oberfläche einer semipermeablen Membran entlang läuft. Entsprechend dem Porendurchmesser der Membran treten kleine Moleküle und Salze sowie zum Teil das Lösungsmittel selbst durch die Poren der Membran, während größere zurück gehalten werden. Der filtrierte Teil des Lösungsmittels samt durchgepressten Molekülen und Salzen wird als Filtrat oder Permeat bezeichnet, der zurück gebliebene Anteil als Konzentrat oder Retentat [12]. Damit eignet sich die Diafiltration besonders zur Konzentrierung oder Aufreinigung einer Probe.

Die Kenngröße für die Eignung einer Membran zur Diafiltration ist deren MWCO, (Molecular Weight Cut-Off). Er gibt die Trenngrenze in Dalton an, die durch das Molekulargewicht eines zurückgehaltenen Moleküls ausgedrückt wird. Der MWCO der Membran sollte ungefähr das 4-5fache Molmasse der Moleküle sein, die entfernt werden sollen und etwa 4-5mal kleiner sein als die Molmasse jener Moleküle, die die Membran nicht passieren sollen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Polyethersulfon-Membran mit einem MWCO von $100\,000$ Dalton verwendet.

Bei der kontinuierlichen Diafiltration wird das Filtrat laufend durch frisches Dispersionsmedium ersetzt, während bei der diskontinuierlichen Diafiltration die Probe abwechselnd eingeeengt und durch frisches Dispersionsmedium verdünnt wird, bis die Probe entsprechend gereinigt ist.

In dieser Arbeit wurden PLGA-Nanopartikel Suspensionen mittels der Filtrationskassette Vivaflow 50 (100 000 MWCO PES, Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany) durch diskontinuierliche Diafiltration gereinigt. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung einer diskontinuierlichen Diafiltration.

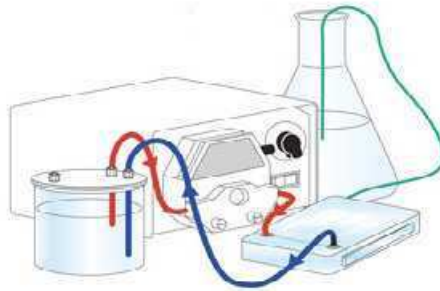


Abb.5 - Diafiltration [13]

Osmometrie

Als Osmose bezeichnet man die Diffusion von Lösungsmittelmolekülen durch eine semipermeable Membran. Dies erfolgt so lange, bis der Konzentrationsunterschied der Lösungsmittelmoleküle zwischen beiden Flüssigkeiten ausgeglichen ist. Der osmotische Druck ist jener Druck, den die in der Lösung befindlichen Teilchen während der Diffusion auf eine undurchlässige Wand ausüben würden [14]. Hypotone Lösungen haben eine geringere Konzentration im Gegensatz zu den hypertonen Lösungen auf der anderen Seite der Membran. Nach Ausgleich der Konzentrationsunterschiede sind beide Lösungen isoton. Zur parenteralen Applikation von größeren Volumina sollten Blut-isotone Lösungen eingesetzt werden, da hypo- bzw. hypertone Lösungen zu Schäden wie zB. Platzen oder Schrumpfen von Zellen führen können.

Die Stoffmengenkonzentration der osmotisch aktiven Teilchen nennt man Osmolarität mit der Einheit Osmol/l beziehungsweise Osmolalität mit der Einheit Osmol/kg.

Durch das Vorhandensein von unterschiedlichen Ionen und Molekülen in Intrazellulär-, Extrazellulär- und Intravasalraum tritt abhängig von deren

Konzentration ein osmotischer Druck auf. Die Zellmembranen des Körpers sind für Wasser und bestimmte darin gelöste Stoffe permeabel.

Die Erniedrigung des Gefrierpunktes einer Lösung ist proportional dem osmotischen Druck in einer Lösung. Während Wasser bei 0°C gefriert, besitzt eine Lösung mit der Konzentration 1osmol/kg einen Gefrierpunkt von -1,858°C.

Zur Bestimmung der Osmolarität wird ein Halbmikro-Osmometer (Automatisches Halbmikro-Osmometer Nr. A0300, Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin) verwendet, wobei 150µl der Probe gefroren werden. Delta T bezeichnet die Gefrierpunktserniedrigung gegenüber Wasser und ist ein Maß für die Osmolarität dieser Lösung, die am Gerät abgelesen werden kann.

Optische ICP-Emissionsspektrometrie

Zur quantitativen Bestimmung von Elementen werden verbreitet emissionsspektroskopische Verfahren herangezogen. Bei der optischen ICP-Emissionsspektrometrie (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) werden die Proben zerstäubt und durch ein sehr heißes Argon-Plasma angeregt, wobei sie einen energetisch hohen Zustand erreichen. Bei der Rückkehr in den ursprünglichen energetischen Zustand geben sie eine charakteristische elektromagnetische Strahlung ab (optische Emission) [15]. Diese Methode wurde zur Bestimmung der Konzentration an freiem, toxischem Gadolinium der Proben nach Reinigung durch Diafiltration und zur Ermittlung des Gadoliniumgehaltes in den Nanopartikelsuspensionen nach Auflösung der Partikelmatrix eingesetzt. Weitere Angaben dazu sind im beigefügten Manuskript auf Seite 9 im Appendix D zu finden.

Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (PLGA)

Poly(D,L-laktid-co-glykolid) (Abb. 6) ist ein von der FDA zugelassenes, lineares, biokompatibles und bioabbaubares Co-Polymer. Beim unspezifischen hydrolytischen Abbau werden die Esterbindungen gespalten und es entstehen Milchsäure und Glykolsäure, die endogene Stoffwechselprodukte im menschlichen Körper darstellen [16]. Die im Handel befindlichen Produkte unterscheiden sich im Verhältnis der Glykolid- und Laktatanteile. Häufig werden PLGA-Polymere mit einem Verhältnis von 50% Laktid und 50% Glykolid angewendet. Sie zeigen eine raschere Hydrolyse als solche mit unausgeglichem Verhältnis der beiden Anteile. In vorliegender Arbeit wurde Resomer® RG 503H (Boehringer Ingelheim, Ingelheim,

Deutschland) zur Nanopartikelherstellung mittels Solvent Evaporation Technik eingesetzt. Die Polymerketten enthalten eine endständige Carboxylgruppe, die für die weitere Kopplung nötig ist.

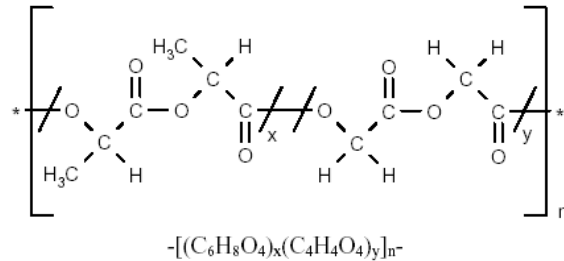


Abb. 6 – Strukturformel von PLGA [24]

EDAC

Das wasserlösliche Carbodiimid 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (Abbildung 7) kann eingesetzt werden, um Amidbindungen zwischen Carboxylgruppen und Aminen zu induzieren. N-substituierte Carbodiimide reagieren mit einer Carbonsäure zu einem hoch reaktiven Zwischenprodukt, welches mit einem primären Amin ein Amid bildet (Abbildung 8).

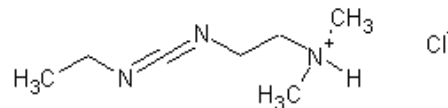


Abb. 7 – Strukturformel von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid [17]

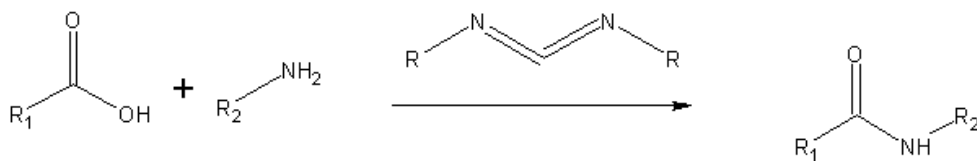


Abb. 8 – Schema der Carbodiimid-vermittelten Amidbildung [17]

Oft wird N-Hydroxysuccinimid (NHS) zugesetzt, um durch Bildung eines hochreaktiven Zwischenproduktes die Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen sowie eventuelle Nebenreaktionen zu unterdrücken [17].

NHS

N-Hydroxysuccinimid (Abbildung 9) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um eine Carboxylgruppe in einen aminoreaktiven NHS-Ester umzuwandeln [17].

Das bei der Reaktion von Carbodiimid mit einer Carbonsäure entstandene Zwischenprodukt ist in wässriger Lösung instabil. Da dieses zu einer Rückreaktion zur ursprünglichen Carbonsäure neigt, wird N-Hydroxysuccinimid zugesetzt. Dieses reagiert mit dem Zwischenprodukt und bildet einen stabileren aktivierten NHS-Ester, welcher im neutralen Milieu bevorzugt mit einem primären Amin unter Ausbildung einer Amidbindung reagieren kann.

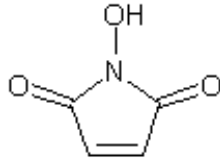


Abb. 9 – Strukturformel von N-Hydroxysuccinimid [17]

Aminospacer

Tetramethyldiamin

Tetramethyldiamin (Putrescin, 1,4-Diaminobutan) ist ein biogenes Amin mit vier Kohlenstoffatomen und zwei Aminogruppen (Abbildung 10), das bei der Fleischfäulnis beziehungsweise im lebenden Organismus aus Ornithin durch Decarboxylierung entsteht.



Abb. 10 - Strukturformel von 1,4-Diaminobutan

Octamethyldiamin

1,8-Diaminooctan ist ein biogenes Amin mit acht Kohlenstoffatomen und zwei Aminogruppen (Abbildung 11).

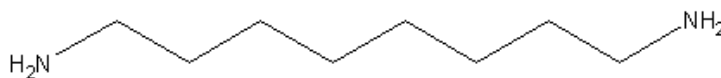


Abb.11 - Strukturformel von 1,8-Diaminooctan

Polyethylenimin (PEI)

Polyethylenimin (PEI) ist ein stark basisches Polymerisationsprodukt von Ethyleniminen (Abbildung 12) und besteht dementsprechend vorwiegend aus NH-Gruppen, die durch zwei Methylengruppen voneinander getrennt vorliegen. Im Handel ist PEI als lineares oder verzweigtes Molekül mit unterschiedlichem Molekulargewicht erhältlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde verzweigtes PEI mit primären, sekundären und tertiären Aminogruppen im Verhältnis 1:2:1. verwendet.

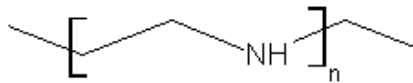


Abbildung 12 - Strukturformel von Polyethylenimin

DOTA

DOTA

1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) ist – wie DTPA (siehe unten) – ein bifunktionaler Chelator, der mit Gadolinium einen stabilen Komplex bildet. Es besitzt eine cyclische Struktur aus 12 Atomen inklusive vier Stickstoffatomen, die wiederum insgesamt vier Acetatreste tragen (Abbildung 13). Dieses Molekül verfügt über acht Bindungsstellen, Gadolinium aber neun oder zehn, wodurch ebenso wie bei DTPA ein Wasseraustausch mit Gadolinium gewährleistet wird [18].

Weitere Informationen sind in dem beigegeführten Manuskript auf Seite 17 im Appendix D zu finden.

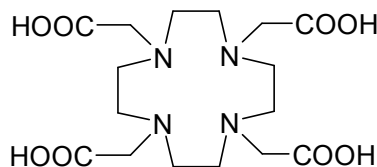


Abb. 13 - Strukturformel von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure

DOTA-NHS

Wie bereits oben erwähnt wurde, besitzen die Partikel durch PLGA endständige Carboxylgruppen, die für eine negative Oberflächenladung sorgen. Zur Kondensation dieser Carboxylgruppen mit primären Aminen werden Carbodiimide

verwendet (siehe Seite 17), die zur Amidbildung führen. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu unterdrücken wird NHS eingesetzt, das die Kopplungseffizienz wesentlich verbessert.

Die Vorstufe DOTA-NHS (Abbildung 14) wird durch ihre Fähigkeit zur Reaktion mit Aminogruppen genutzt. Nach Entfernung von überschüssigen Kopplungsreagenzien wird dieser Aktivester mit den Aminogruppen des Spacers (siehe Abbildung 15) amidartig verknüpft.

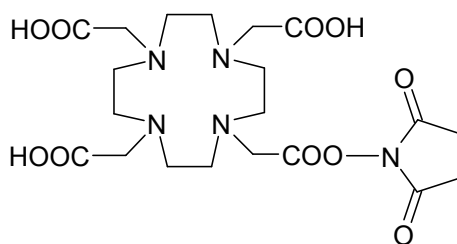


Abb. 14 - Strukturformel von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure-N-Hydroxysuccinimid

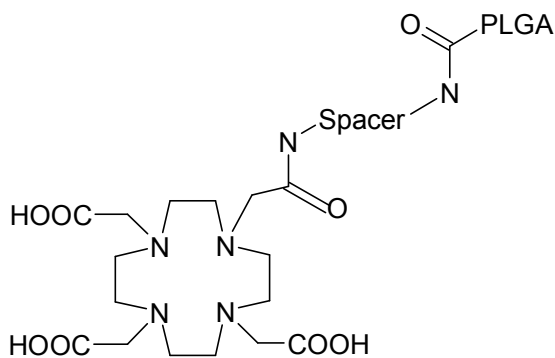


Abb. 15 – Konjugat aus DOTA-NHS, Spacer und Partikel

DTPA

DTPA

Bei DTPA handelt es sich um den linearen, bifunktionalen Komplexbildner Diethylentriaminopentaessigsäure. Auch hier steht nach Bindung von Gadolinium³⁺ an die drei Stickstoffatome und fünf Sauerstoffatome eine Bindungsstelle für den Austausch mit Wasserstoffprotonen zur Verfügung, wodurch der Bildkontrast stark verbessert wird [18].

Durch seine lineare Konformation ist DTPA weniger thermodynamisch und kinetisch stabil als das makrozyklische DOTA [19], wird aber bereits als Magnevist®

(Gd-DTPA, Gadepentetat Dimeglumin), das erste zugelassene Kontrastmittel für Magnetresonanztomografie, klinisch verwendet [20].

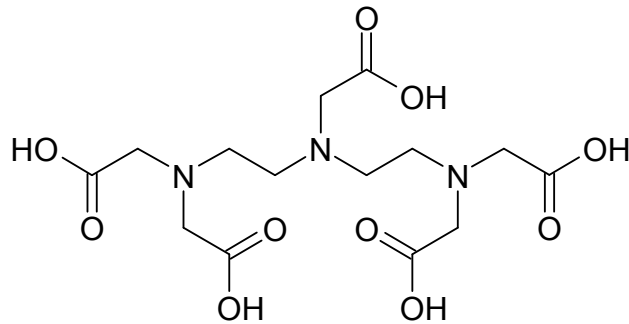


Abb. 16 - Strukturformel von Diethylentriaminpentaessigsäure

DTPABA

DTPABA (Diethylentriaminopentaacetanhydrid-bisanhydrid, Abbildung 17) wird als Vorstufe von DTPA genutzt. Zur Kopplung des Komplexbildners Diethylentriaminopentaessigsäure an die Partikeloberfläche werden zunächst die freien Aminogruppen des Spacers mit DTPABA derivatisiert, wobei eine kovalente Bindung ausgebildet wird. Durch die Anwesenheit von Wasser werden die Anhydrid-Strukturen hydrolysiert und somit die Carboxylgruppen generiert, welche die Komplexbildung mit Gadolinium ermöglichen (Abb. 18).

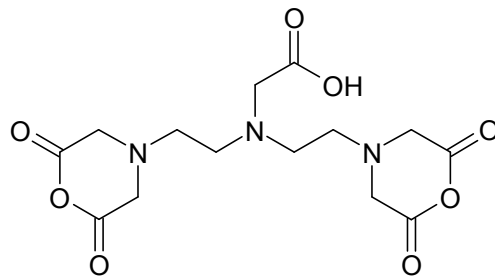


Abb. 17 – Strukturformel von Diethylentriaminopentaacetanhydrid-bisanhydrid

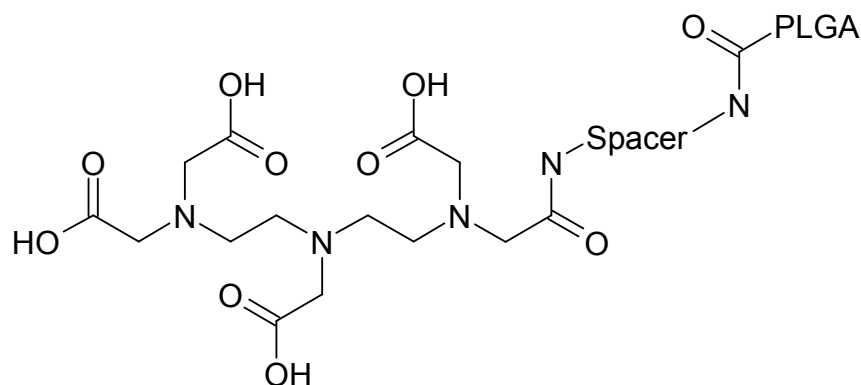


Abb. 18 – Konjugat aus DTPA, Spacer und Partikel

Pluronic F68

Pluronic F68® (Poloxamer 188) mit einer mittleren Molekularmasse von 8350 Da ist ein oberflächenaktives, nichttoxisches Blockcopolymer aus der Reihe der Poloxamere. [11]. Der hydrophile Anteil dieses nichtionischen Tensids besteht aus 75 Ethylenoxid-Einheiten, der hydrophobe aus 30 Propylenoxid-Einheiten. Das Polymer wird an die Partikeloberfläche adsorbiert und verändert deren Eigenschaften. Der zentral gelegene Polyoxypropylenblock bindet dabei bevorzugt an die hydrophobe Partikeloberfläche, die hydrophilen endständigen Polyoxyethylenbausteine orientieren sich in Richtung wässriges Medium. Dadurch wird eine Annäherung anderer Partikel verhindert und die Partikelsuspension sterisch stabilisiert.

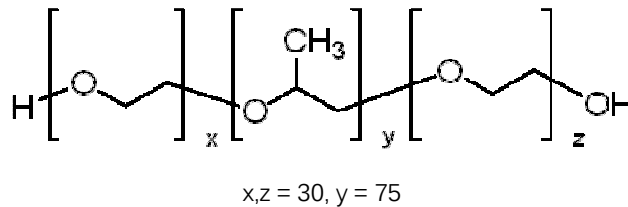


Abb. 19 – Strukturformel von Pluronic F68® [21]

Methoden

Herstellung von PLGA-Nanopartikeln

Siehe Manuskript im Appendix D Seite 6

Modifikation der Partikeloberfläche

Die Oberfläche von PLGA-Nanopartikeln wurde unter Einsatz von verschiedenen Aminospacern (Tetramethylendiamin, Octamethylendiamin, PEI) mit Komplexbildnern (DTPA, DOTA) modifiziert, die mit Gadoliniumionen beladen wurden.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kopplungsmethoden untersucht:

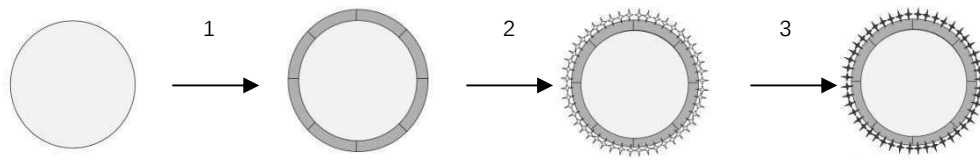
Bei der sogenannten „Zweischrittmethode“ wurde in einem ersten Schritt der jeweilige Spacer kovalent an der Partikeloberfläche immobilisiert. Im zweiten Schritt wurde der jeweilige Komplexbildner an den Spacer gebunden. Die Partikel wurden anschließend mit einer Gadoliniumcitratlösung inkubiert, um die oberflächengebundenen Komplexbildner mit dem kontrastgebenden Ion zu beladen.

Bei der „Einschrittmethode“ wurde zuerst ein wasserlösliches Konjugat aus Spacer und Komplexbildner synthetisiert. Dieses wurde in einem einzigen Kopplungsschritt an der Partikeloberfläche immobilisiert. Analog zur Zweischrittmethode wurden schließlich die partikelgebundenen Chelatoren mit Gadolinium beladen.

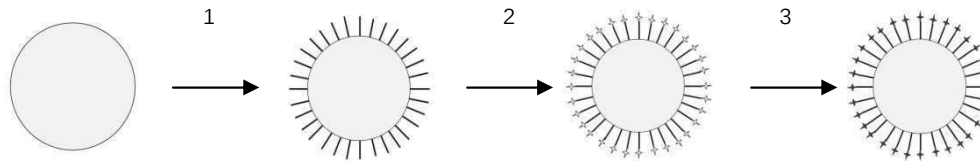
Um die Gesamtdauer der Partikeloberflächenmodifikation möglichst zu verkürzen, wurde als weitere Alternative versucht, das lösliche Spacer-Komplexbildner-Konjugat bereits vor der Kopplung an die Partikel mit Gadolinium zu beladen.

Zweischrittmethode

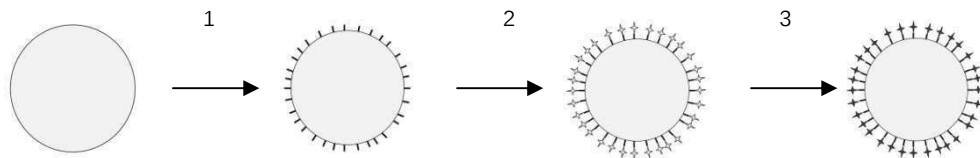
Wie oben beschrieben, wurde bei der Zweischrittmethode zunächst die Aminkomponente (PEI, Tetramethylendiamin oder Octamethylendiamin) an die Oberfläche der aktivierten PLGA-Nanopartikel gebunden, anschließend der Komplexbildner (DOTA oder DTPA) immobilisiert, und schließlich mit Gadoliniumcitratlösung inkubiert (Abbildung 20).



Kopplung des Nanopartikels mit PEI (Schritt 1), mit den Komplexbildnern (Schritt 2) und Beladung mit Gadolinium (Schritt 3)



Kopplung des Nanopartikels mit Octamethylendiamin (Schritt 1), Bindung mit den Komplexbildnern (Schritt 2) und Beladung mit Gadolinium (Schritt 3)



Kopplung des Nanopartikels mit Tetramethylendiamin (Schritt 1), Bindung mit den Komplexbildnern (Schritt 2) und Beladung mit Gadolinium (Schritt 3)

Abb. 20 – Schematische Darstellung der Zweischnittmethode

In der Publikation am Ende dieser Arbeit sind ab Seite 6 die Herstellung und Ergebnisse dieser Methode detailliert beschrieben. Siehe Appendix D

Einschrittmethode

Die beschriebene Zweischnittmethode hat den Nachteil, dass sie zahlreiche Reinigungsschritte der Partikelsuspension erfordert. Diese sind fehleranfällig sowie zeit- und arbeitsintensiv. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die PLGA-Nanopartikel im Zuge der langwierigen Reinigung bereits durch hydrolytische Abbauprozesse angegriffen werden. Daher wurde versucht, Methoden zu finden, die die Zahl der Modifikationsschritte, die direkt in der Nanopartikelsuspension stattfinden, zu reduzieren. Zu diesem Zweck sollten vorgefertigte Spacer-Komplexbildner-Konjugate eingesetzt werden.

Bei der Einschrittmethode wurden, wie in der alternativen Kopplungsmethode (siehe unten), Aminokomponente mit Komplexbildner verknüpft und das

Kopplungsprodukt an den voraktivierten Nanopartikeln immobilisiert. Abschließend wurden die modifizierten Partikel mit Gadolinium beladen.

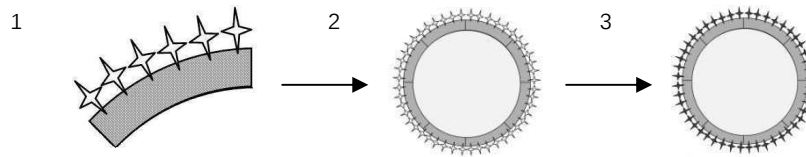


Abb. 21 –Schematische Darstellung der Einschrittmethode

Bindung des Komplexbildners an den Spacer (Schritt 1), Kopplung an den Nanopartikel (Schritt 2) und Beladung mit Gadolinium (Schritt 3)

Da sich bei der alternativen Kopplungsmethode (siehe unten) herausgestellt hat, dass es bei der Inkubation von PEI mit DTPABA häufig zur Bildung voluminöser Niederschläge kommt, wurde in den folgenden Versuchen nur DOTA-NHS verwendet.

Herstellung von (DOTA-PEI):

Zur Kopplung von DOTA an PEI wurden 100mg DOTA-NHS (200 μ mol) mit 80mg PEI (66 μ mol), jeweils in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 1ml Aqua destillata gelöst, in einem 50ml Greiner-Reaktionsgefäß, vereinigt, mit 1M NaOH auf pH 7,5-8,5 eingestellt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

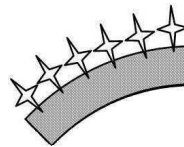


Abb. 22 - Schematische Darstellung von (DOTA-PEI)

Kopplung von (DOTA-PEI) an PLGA-Nanopartikel:

In zwei parallelen Ansätzen wurden jeweils 12ml aktivierte und gereinigte PLGA-Nanopartikelsuspension mit der resultierenden (DOTA-PEI)-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

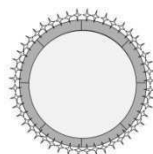


Abb. 23 - Schematische Darstellung eines (DOTA-PEI)-PLGA-Nanopartikels

Der nächste Schritt bestand aus zwei Dialysen von ca. 8 Stunden gegen jeweils 500ml 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 8 in einem Becherglas zum Umpuffern und Entfernen von überschüssigen, ungebundenen Reagentien wie PEI,

DOTA-NHS und freiem DOTA.

Beladen der (DOTA-PEI)-PLGA-Nanopartikel mit Gadolinium:

1,4868g Gadoliniumchloridhexahydrat (4mmol) in 10ml Aqua destillata wurden in einem Becherglas gelöst, 2,3056g Zitronensäure (12mmol) als Feststoff zugefügt und mit 1M NaOH auf pH 8 eingestellt. Die resultierenden 15ml Lösung wurden mit Aqua destillata auf 20ml aufgefüllt. Die modifizierten Partikel wurden in 50ml Greiner-Reaktionsgefäßen mit je 10 ml 0,2M Gadolinium/0,6M Citrat/NaOH-PufferpH 8,0 zu jeweils 10ml zu den beiden (DOTA-PEI)-PLGA-Nanopartikel-Suspensionen zugesetzt und drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

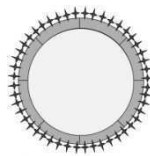
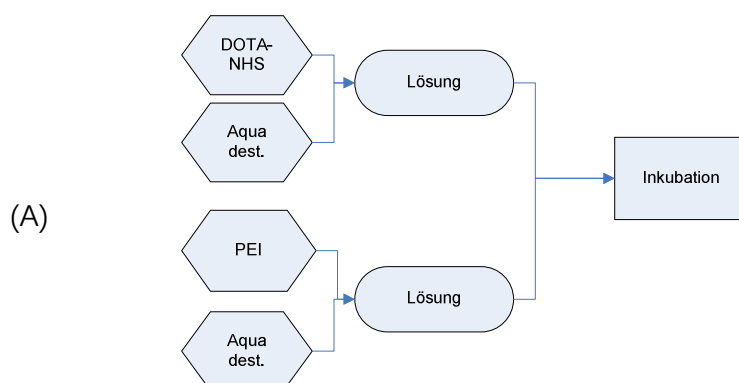


Abb. 24 - Schematische Darstellung eines Gd-(DOTA-PEI)-PLGA-Nanopartikels

Reinigung der Partikelsuspension:

Anschließend folgte, wie auch bei den anderen Kopplungsmethoden, eine Endreinigung durch Dialyse in einem Becherglas über vier Tage, in denen die modifizierten Partikel je sieben Mal acht bzw. 16 Stunden gegen je 500 ml 0,1% Pluronic/0,1M Citratpuffer pH5 und beim achten Mal 16 Stunden lang gegen 0,1% Pluronic/0,1M Citratpuffer pH7,4 am Magnetrührer dialysiert wurden.

Auch dieser Teil ist im beigefügten Manuskript auf Seite 7 detailliert beschrieben.



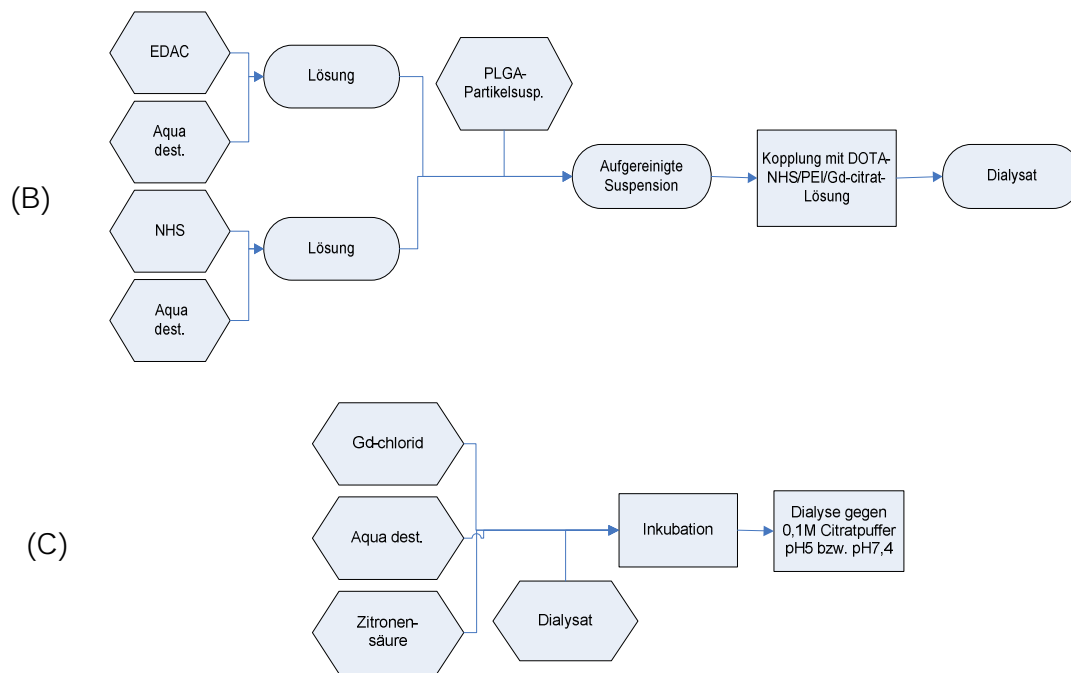


Abb. 25 - Flussdiagramm – Schematische Darstellung der Einschrittmethode im Flussdiagramm

Herstellung von (DOTA-PEI) (A), Kopplung von (DOTA-PEI) an PLGA-Nanopartikel (B), Beladen der (DOTA-PEI)-PLGA-Nanopartikel mit Gadolinium und Endreinigung der Partikelsuspension (C)

Ergebnisse:

Partikelgröße und Zetapotential:

Die Größe der nach der Einschrittmethode derivatisierten Partikel wurde nach der Endreinigung mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmt (Tabelle 1). Die durchschnittliche Größe betrug 153.3nm (Gd-(DOTA-PEI)-NP 1) bzw. 161.7nm (Gd-(DOTA-PEI)-NP 2). Der PDI war kleiner als 0,1. Dies weist auf eine enge Partikelgrößenverteilung hin (Erklärungen zum PDI siehe S.12). Das Zetapotential von etwa -7mV zeigt eine geringe negative Ladung der Partikel, die für eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel zu gering ist, sodass Ausflockungen auftreten könnten.

| | Größe [nm] | PDI | Zeta Potential [mV] | Leitfähigkeit [mS cm ⁻¹] |
|------------------------|---------------|---------------|------------------------|---|
| Gd-(DOTA-PEI)- NP 1 | 153.3 ± 1.0 | 0.095 ± 0.024 | -7.1 ± 0.4 | 0.579 ± 0.012 |
| Gd-(DOTA-PEI)- NP 2 | 161.7 ± 1.7 | 0.089 ± 0.024 | -7.4 ± 0.7 | 0.624 ± 0.010 |

Tab. 1 – Größencharakteristika von Gd-hältigen Nanopartikeln, die nach der Einschrittmethode hergestellt wurden.

Gadolinium- und PLGA-Gehalt der Gd-(DOTA-PEI)-Nanopartikelsuspensionen:

| | PLGA [mg/ml] | Gd [mg/l = µg/ml] | Gd [mM] | Gd [µM] | µg Gd/mg PLGA |
|------------------------|-----------------|----------------------|---------|----------|------------------|
| Gd-(DOTA-PEI)- NP 1 | 2,7 | 138,087 | 0,878 | 878,139 | 51,143 |
| Gd-(DOTA-PEI)- NP 2 | 2,79 | 158,131 | 1,006 | 1005,605 | 56,678 |

Tab. 2 – Gadoliniumgehalt von modifizierten Nanopartikeln, die nach der Einschrittmethode hergestellt wurden

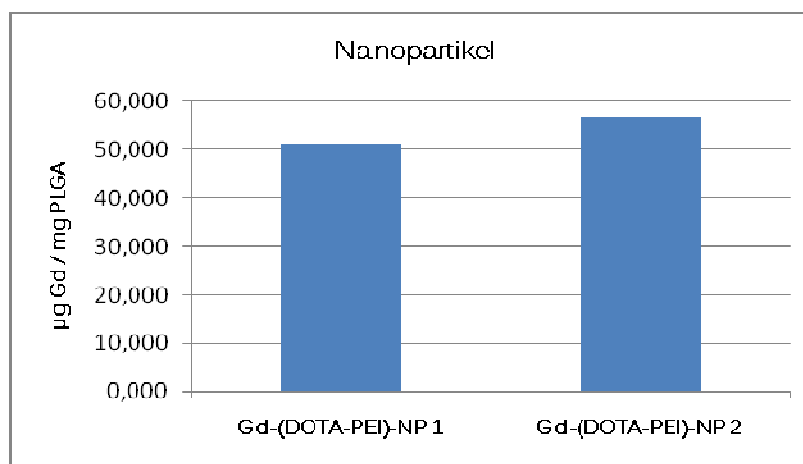


Abb. 26–Vergleich des Gadoliniumgehaltes von zwei Parallelansätzen von modifizierten Nanopartikeln

Dokumentation der Reinigung der modifizierten Nanopartikel:

| | mg Gd in 500 ml Dialysat | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|---------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Dialyseschritt | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Gd-(DOTA-PEI)- NP 1 | 148,767 | 123,733 | 12,020 | 12,450 | 2,576 | 1,822 | 0,648 | 0,644 |
| Gd-(DOTA-PEI)- NP 2 | 148,833 | 120,767 | 13,467 | 13,433 | 3,050 | 2,602 | 1,009 | 0,905 |

Tab. 3 –Gehalt von Gadolinium in den Dialysaten während der Reinigung von nach der Einschrittmethode hergestellten modifizierten Nanopartikeln

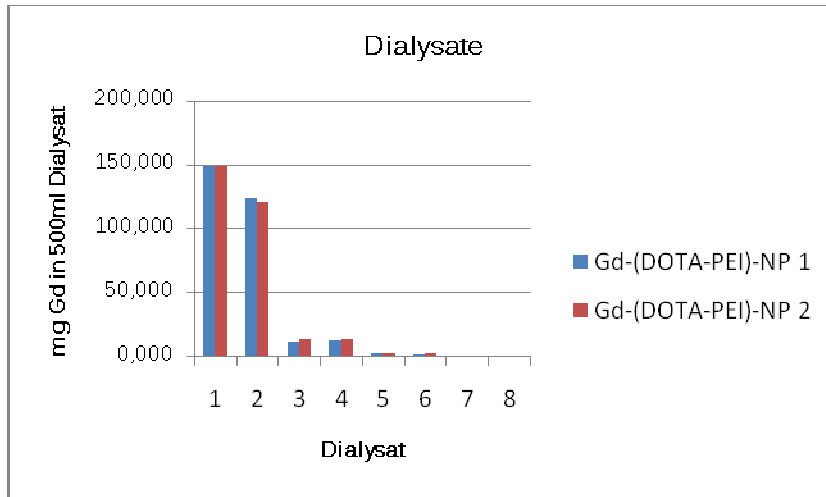


Abb. 27 – Gehalt von Gadolinium in den Dialysaten während der Reinigung von nach der Einschrittmethod hergestellten modifizierten Nanopartikeln

Tabelle 3 und Abb. 27 zeigen den Gadoliniumgehalt der Dialysate. Um nicht-komplexiertes Gadolinium aus der Suspension zu entfernen, wurde acht Mal gegen Citratpuffer dialysiert. Man sieht deutlich die Abnahme der Gadoliniummenge mit jedem weiteren Dialyseschritt. Ab der 5. Dialyse wurden nur noch Spuren von Gadolinium im Dialysat detektiert. Dies beweist die effiziente Reinigung der Partikelsuspension durch die wiederholte Dialyse.

Freies Gadolinium ist toxisch, da es in den Calciumstoffwechsel des Körpers eingreift, wo es sich durch seinen dem Calcium ähnlichen Ionendurchmesser in Knochen und Leber einlagert und auch die Muskelkontraktilität und das Gerinnungssystem beeinflusst [7].

Bestimmung des Gadolinium-Gehalts nach Auflösen der Partikel:

Um auf den Gehalt von Gadolinium in den Partikeln zu bestimmen, wurde 1ml der Partikelsuspension mit 65%iger Salpetersäure zur Zerstörung der organischen Matrix versetzt, mehrmals zur Trockene gebracht, der Trockenrückstand mit 2ml 6M HNO₃ ergänzt und auf 10,0ml mit Aqua bidestillata aufgefüllt. Die Quantifizierung von Gadolinium erfolgte mittels ICP-OES.

| | Gd-Gehalt [µg/ml] |
|--------------------|----------------------|
| Gd-(DOTA-PEI)-NP 1 | 138,087 |
| Gd-(DOTA-PEI)-NP 2 | 158,131 |

Tab. 4 –Gadoliniumgehalt von modifizierten PLGA-Nanopartikeln, die nach der Einschrittmethod hergestellt wurden

Die Gadoliniummenge wurde auf die PLGA-Menge bezogen, um herauszufinden, wieviel freies und partikulär gebundenes Gadolinium vorlag (siehe Tabelle 2).

Ein Vergleich mit Zweischrittmethode und Alternativer Kopplungsmethode folgt.

Alternative Kopplungsmethode

Als mögliche Alternative wurde eine andere Reihenfolge der Kopplungen untersucht (Abbildung 28): Nach Kopplung des Komplexbildners an den Aminospacer wurde das resultierende lösliche Konjugat zuerst mit Gadolinium beladen. Anschließend sollten die Nanopartikel in einem einzigen Schritt mit dem (Gd-Komplex-Spacer)-Konjugat modifiziert werden.

Für diesen Ansatz wurde als Spacer ausschließlich PEI verwendet.

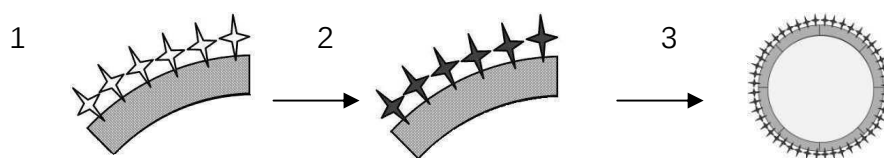


Abb. 28 – Schematische Darstellung der „Alternativen Kopplungsmethode“

Bindung des Komplexbildners an den Spacer (Schritt 1), Beladung mit Gadolinium (Schritt 2) und Kopplung an den Nanopartikel (Schritt 3)

Herstellung von (DTPA-PEI):

200mg DTPABA (560 μ mol) wurden in 400 μ l Dimethylsulfoxid DMSO in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß suspendiert und mit einer Lösung von 224mg PEI (187 μ mol) in 1,6ml Aqua destillata versetzt. Der pH-Wert der Mischung betrug aufgrund des stark basischen Charakters von PEI 10-11 und wurde mit 1M HCl auf pH ~ 8,5 eingestellt. Komplexbildner und PEI wurden im molaren Verhältnis 3:1 eingesetzt, da jedes PEI-Molekül sieben primäre NH₂-Gruppen enthielt. Von diesen sollten maximal drei mit dem Komplexbildner gekoppelt werden und mindestens vier für die Kopplung an die Partikeloberfläche frei bleiben. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Herstellung von (DOTA-PEI):

100mg DOTA-NHS (200 μ mol) wurden in 1ml Aqua destillata in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gelöst. Eine Lösung von 80mg PEI (67 μ mol) in 1ml Aqua destillata wurde zugesetzt und wie oben beschrieben über Nacht bei Raumtemperatur in einem 50ml Greiner-Reaktionsgefäß inkubiert.

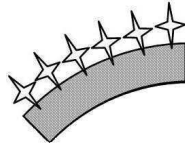


Abb. 29 - Schematische Darstellung des Komplexbildner-Spacer-Konjugats (DTPA-PEI)

Inkubation von (DTPA-PEI) und (DOTA-PEI) mit Gadoliniumcitrat zur Herstellung von (Gd-DTPA-PEI) bzw. (Gd-DOTA-PEI):

Zur Herstellung der Gadoliniumcitratlösung wurden in 20ml Aqua destillata zunächst 2,97g Gadoliniumchloridhexahydrat (0,2mmol Gd) und nach langsamer, vollständiger Lösung anschließend 4,611g Zitronensäure (6mmol) zugesetzt und gelöst. Anschließend wurde die stark saure Lösung mit NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und mit Aqua destillata auf 56ml aufgefüllt.

Das (DTPA-PEI) Konjugat wurde in zwei 50ml Greiner Reaktionsgefäßen zu gleichen Teilen mit jeweils 14ml 0,2M Gadolinium/0,6M Citrat/NaOH pH 8 versetzt und daraufhin drei Tage lang am Schüttler bewegt, um für eine optimale Durchmischung zu sorgen.

Analog dazu wurde ebenfalls in zwei Parallelansätzen das (DOTA-PEI)-Konjugat mit je 14 ml Gadoliniumcitratlösung inkubiert.

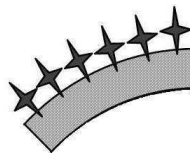


Abb. 30 - Schematische Darstellung von Gd-DTPA-PEI

Kopplung von (Gd-DTPA-PEI) und (Gd-DOTA-PEI) an PLGA-Nanopartikel:

Nach drei Tagen wurden, analog zur Zweischrittmethode (siehe Publikation im Appendix, S.6), PLGA-Nanopartikel mit EDAC und NHS aktiviert.

Je 12ml der aktivierten und von überschüssigen Aktivierungsreagentien gereinigten Partikelsuspension wurden in 50 ml Greiner-Reaktionsgefäßen mit (Gd-DTPA-PEI) oder mit (Gd-DOTA-PEI)-Lösung versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur am Schüttler inkubiert.

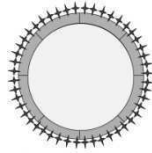


Abb. 31- Schematische Darstellung von Gd-hältigen PLGA-Nanopartikeln, die nach der „alternativen Kopplungsmethode“ hergestellt wurden

Zur Entfernung von nicht DTPA- bzw. DOTA-gebundenen Gadoliniumionen wurden die oberflächenmodifizierten PLGA-Nanopartikel durch wiederholte Dialyse gereinigt. Insgesamt wurde 7 Mal gegen 500 ml 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 5 und am Ende ein Mal gegen 500 ml 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 7,4 dialysiert. Das Außenmedium wurde abwechselnd alle 8 bzw. 16 Stunden ausgetauscht.

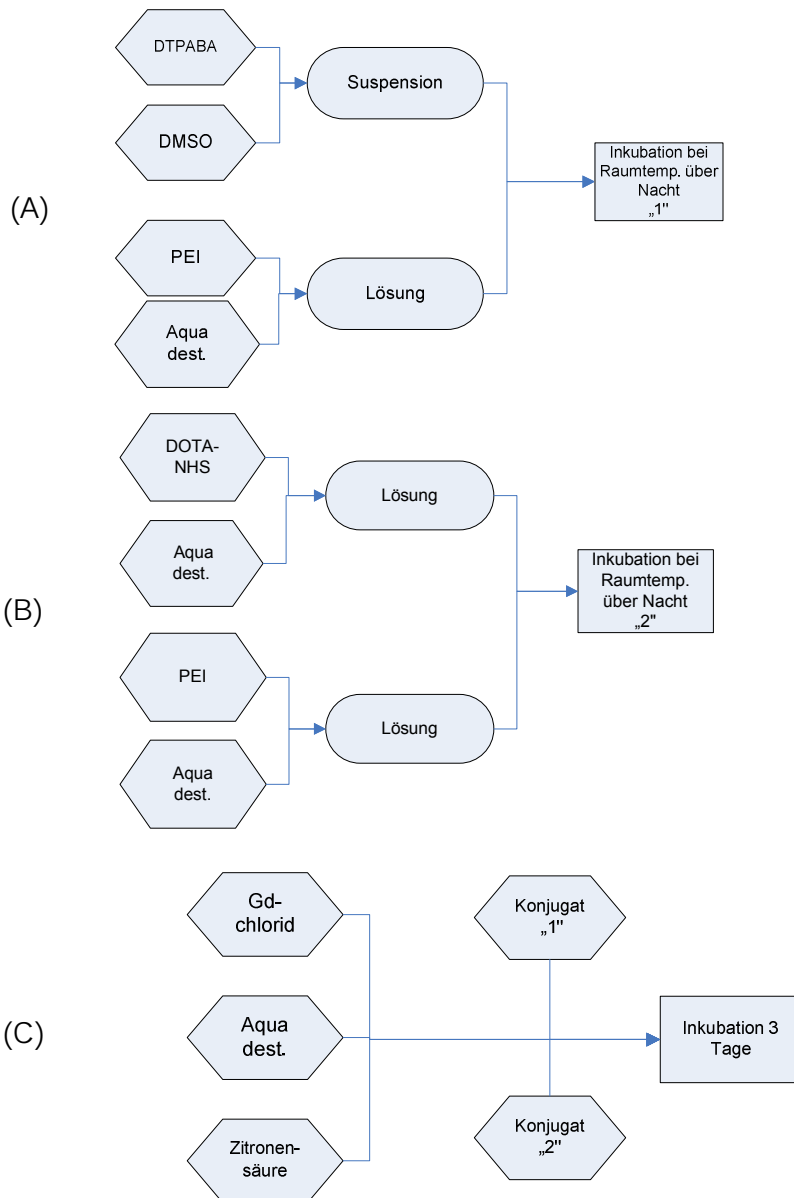


Abb. 32 - Schematische Darstellung der „Alternativen Kopplungsmethode“ im Flussdiagramm – Herstellung von (DTPA-PEI) (A) und (DOTA-PEI) (B), Inkubation von von (DTPA-PEI) und (DOTA-PEI) mit Gadoliniumcitrat

Ergebnisse:

Gd-(DTPA-PEI):

Beim ersten Ansatz wurde bei der Reaktion von DTPABA mit PEI wie erwartet eine klare farblose Lösung erhalten. Allerdings bildete sich bei der darauffolgenden Inkubation mit der Gadoliniumcitrat-Lösung innerhalb von wenigen Minuten ein weißer flockiger Niederschlag.

Bei einem erneuten Ansatz war die Kopplung von DTPABA, suspendiert in DMSO, und PEI, gelöst in Aqua destillata, nicht mehr möglich. Die Lösung bzw. Suspendierung im jeweiligen Lösungsmittel war problemlos, die Mischung beider Phasen jedoch nicht durchführbar. Auch ein weiterer Ansatz zeigte das gleiche Ergebnis.

Gd-(DOTA-PEI):

Die Kopplung von DOTA-NHS an PEI und die anschließende Beladung mit Gadolinium verliefen zunächst ohne Schwierigkeiten, jedoch entstand nach wenigen Tagen ebenfalls ein flockiger weißer Niederschlag, der durch Schütteln zu einer starken Trübung der Suspension führte, dann aber wieder sedimentierte.

Aufgrund der wiederholt beobachteten Stabilitätsprobleme wurde die alternative Kopplungsmethode nicht weiter verfolgt.

Vergleich der Kopplungsmethoden:

Ein Vergleich der drei Methoden zeigt mehrere Unterschiede: Obwohl die Ein- und Zweischrittmethode (siehe Publikation Seite 12 im Appendix) vergleichbare Partikelgrößen von 153nm und 162nm (Einschrittmethode) und 199nm (Zweischrittmethode) und Polydispersitätsindices ergaben, aber auch Zetapotential und Leitfähigkeit in einem ähnlichen Bereich lagen, konnte mit Hilfe der Zweischrittmethode die dreifache Menge Gadolinium (51 und 57µg Gadolinium pro mg PLGA) an den Partikel immobilisiert werden.

Zusätzlich stellte sich heraus, dass mit dem Aminospacer PEI modifizierte Nanopartikel mit einem Zetapotential von durchschnittlich -8mV unabhängig vom Komplexbildner eine deutlich weniger stark negativ geladene Partikeloberfläche aufwiesen als mit Tetramethyldiamin (-36mV) und Octamethylendiamin (-32mV).

Das niedrige Zetapotential weist auf eine geringe elektrostatische Stabilisierung und somit eine unzureichende Stabilität der Partikelsuspension hin.

Darüber hinaus war die Partikel-gebundene Gadoliniummenge unterschiedlich: mit Octamethyldiamin und Tetramethyldiamin als Spacer wurden an den Partikeln nur 0,2-1,3µg Gadolinium pro mg PLGA immobilisiert, während Partikel mit PEI als Spacer mit durchschnittlich 147-220µg Gadolinium pro mg PLGA bei der Zweischriffmethode und ca. 54µg Gadolinium pro mg PLGA bei der Einschriffmethode enthielten. Verzweigtes PEI enthält sieben primäre Aminogruppen, sodass nach Kopplung an die Partikeloberfläche immer noch sechs Aminogruppen für die Bindung der Komplexbildner zur Verfügung stehen, während unverzweigtes Octamethyldiamin und Tetramethyldiamin diese Vorteile nicht bieten können.

Um die Gesamtdauer der Partikeloberflächenmodifikation möglichst zu verkürzen, wurde eine alternative Kopplungsmethode erprobt, wobei das lösliche Spacer-Komplexbildner-Konjugat bereits vor der Immobilisierung an die Partikeloberfläche mit Gadolinium beladen werden sollte. Aufgrund mangelnder Stabilität und Präzipitation war dies jedoch nicht möglich.

Alternative Stabilisierungsmöglichkeiten für Gd-hältige PLGA-Nanopartikel

Änderung des Puffers zur Lagerung

Um im Hinblick auf eine zukünftige parenterale Applikation einen möglichst verträglichen Puffer zu finden, wurde nach Alternativen zum bisher verwendeten unphysiologischen 0,1% Pluronic in 0,1M Citrat/NaOH-Puffer gesucht.

Außerdem sind einige, bereits etablierte Untersuchungsmethoden mit Citrat inkompatibel. Eine wesentliche Fragestellung bei der Entwicklung von Gd-Komplexen als Kontrastmittel ist die Freisetzung von Gadolinium in Gegenwart anderer, im Blut vorkommender Ionen. Diese sogenannten Transmetallierungstests [22] basieren auf der Präzipitation von freigesetztem Gadolinium. In Anwesenheit von Citrat, das selbst einen Komplexbildner darstellt, ist dies nicht möglich.

Methoden:

Um die Stabilität der PLGA-Nanopartikel auch in anderen Puffern als den für die Dialyse verwendeten 0,1M Citrat/NaOH-Puffer/0,1% Pluronic zu erfassen, wurden 0,1M Lösungen von Betain, Taurin und Malonsäure jeweils mit 0,1% Pluronic-Gehalt hergestellt.

Jeweils 1ml einer Suspension mit entsprechend der Zweischrittmethode DOTA-PEI dotierten PLGA-Nanopartikel wurden gegen 500ml 0,1% Pluronic/0,1M Betainlösung, 0,1% Pluronic/0,1M Malonsäure-Lösung beziehungsweise 0,1% Pluronic/0,1M Taurinlösung bei einem pH von 8 in einem Becherglas dialysiert.

Ergebnis:

Bei der Dialyse gegen die Betain- und Taurinlösungen trat bereits während der ersten Dialyse eine weißliche Trübung auf und bei der zweiten Dialyse bildeten sich voluminöse Niederschläge in den Dialyseschläuchen.

Da bei der Dialyse gegen Malonsäure anfänglich kein Niederschlag zu erkennen war, wurde insgesamt fünfmal dialysiert. Jedoch entstand während der Lagerung der Partikelsuspension bei 4°C innerhalb von sechs Tagen auch hier ein klumpiger Niederschlag.

Demnach sind weder Betain, noch Taurin oder Malonsäure zur Stabilisierung der modifizierten Nanopartikel geeignet.

Unspezifische Bindung von Gd an PEI-modifizierte PLGA-NP

Da Gadolinium in freier Form im Organismus große Schäden anrichten kann (siehe Seite 9), ist es wichtig, dass die an den Nanopartikeln immobilisierten Gadoliniumionen in Form fixer Komplexe vorliegen. Eine unspezifische Adsorption von Gadolinium³⁺ oder Gadoliniumcitrat wäre unerwünscht, da Gadolinium im Körper freigesetzt und schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen würde.

Um die unspezifische Bindung an die Spacer-gekoppelten Partikel näher zu untersuchen, wurden die Komplexbildner DOTA und DTPA nicht eingesetzt. Bis zur Kopplung von PEI und der anschließenden Reinigung wurde nach der Zweischrithmethode vorgegangen. Im Anschluss wurden die Partikel wie bisher mit der Gadoliniumcitratlösung inkubiert und schließlich freies Gadolinium durch wiederholte Dialyse entfernt.

Inkubation von PEI-PLGA-Nanopartikeln mit Gadoliniumcitratlösung

24ml mit EDAC und NHS aktivierte Nanopartikelsuspension wurden mit 206mg PEI (171,4µmol), gelöst in einem Eppendorf-Gefäß in 1ml 0,1% Pluronic/PBS pH 7,3, versetzt, mit 1M HCl auf pH 8,5 eingestellt und über Nacht bei Raumtemperatur in 50ml Greiner-Reaktionsgefäßen am Schüttler inkubiert.

Anschließend folgten drei Dialyseschritte von ca. 8 Stunden gegen 500ml 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 8 zur Entfernung überschüssiger Kopplungsreagentien, analog zur Zweischrithmethode (siehe Publikation Seite 7 im Appendix). Nach der letzten Dialyse wurde die Suspension halbiert, jeweils mit dem halben Volumen einer Lösung von 1,4868g Gadoliniumchloridhexahydrat (4mmol) und 2,3056g Zitronensäure (12mmol) als Feststoff in 5ml Aqua destillata, versetzt, mit 1M NaOH auf pH 8 eingestellt, mit Aqua destillata auf 12ml aufgefüllt und drei Tage bei Raumtemperatur in 50ml Greiner-Reaktionsgefäßen am Schüttler inkubiert.

Die abschließende Reinigung der Suspension durch acht Dialyseschritte wurde bei den pH-Werten 3, 5, 7,4 und abwechselnd 3 und 8, beginnend bei 3, durchgeführt, um einen möglichen Einfluss eines pH-Wechsels auf die Effizienz der Reinigung zu eruieren.

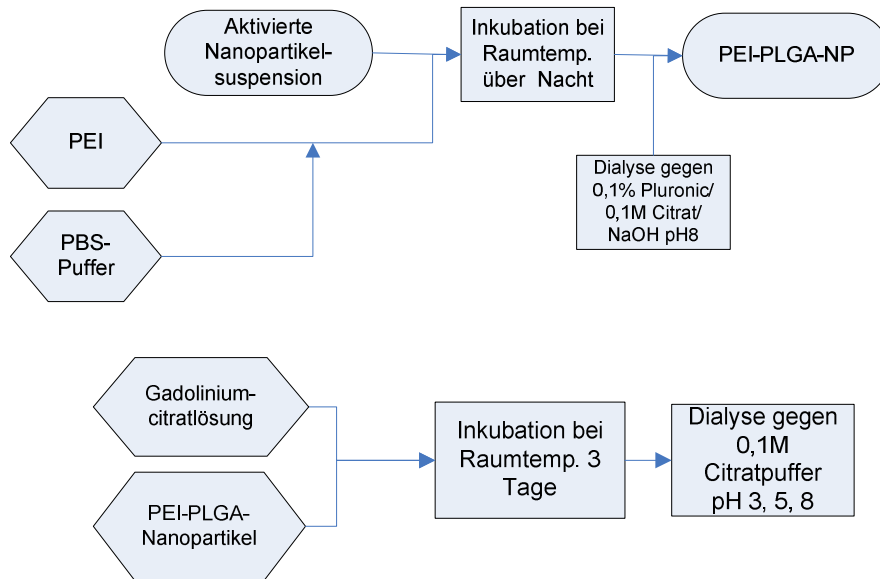


Abb. 33 - Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur Erfassung der unspezifischen Bindung von Gd an PEI-modifizierte PLGA-Nanopartikel im Flussdiagramm

Ergebnisse:

Kopplung von PEI an PLGA-Nanopartikel:

Der Versuch zeigte die Wichtigkeit des richtig gewählten pH-Werts der Proben, da die Kopplung der aktivierten PLGA-Nanopartikel mit PEI mehrmals neu begonnen werden musste, nachdem die PLGA-Nanopartikel bereits am zweiten Tag während der ersten Dialyse gegen 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 8 in feinen, weißen Flocken mit klarem Überstand ausfielen. Es stellte sich dabei im Nachhinein heraus, dass der pH-Wert der 0,1% Pluronic/0,1M Citrate/NaOH-Puffer aufgrund eines technischen Fehlers statt bei pH 8 bei pH 8,5 gelegen war. Dadurch war bei dem sonst problemlos verlaufenden Arbeitsschritt die Stabilität der Suspension offenbar beeinträchtigt.

Kopplung verschiedener Mengen PEI an aktivierte PLGA-Nanopartikel:

Im Zuge dessen wurde auch die PEI-Menge variiert und neue, bisher nicht bekannte Erfahrungen wurden gesammelt: Während eine Partikelsuspension mit der zehnfachen Menge (2060mg, 1714 μ mol) des üblichen PEI-Volumens schon binnen der ersten Dialyse gegen 500ml 0,1M Citrat/NaOH-Puffer/0,1% Pluronic pH 5 ausfiel, zeigte die Probe mit einem Zehntel (20,6mg, 17,14 μ mol) an PEI-Volumen eine deutlich höhere Stabilität.

Dialyse der Gd-PEI-PLGA-Nanopartikel:

Bei der Endreinigung durch 8 Dialyseschritte über jeweils 8 Stunden wurde je ein Viertel der Suspension mit der üblichen Menge von 206mg (171,4µmol) PEI gegen 250ml 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 3, 5, 7,4 und abwechselnd 3 und 8, beginnend bei 3, dialysiert. Bereits während der ersten Dialyse fielen die Aliquote, die bei pH 3 und 7,4 dialysiert wurden, aus. Die Dialyse bei pH 5 verlief dagegen problemlos. Auch nach einem wiederholten Versuch blieb wieder nur die bei pH 5 dialysierte Suspension stabil. Deren letzte Dialyse erfolgte bei pH 7,4.

Die Dialyse der Suspension mit einem Zehntel der PEI Menge (20,6mg, 17,14µmol) erfolgte sieben Mal gegen 500ml 0,1% Pluronic/0,1M Citrat/NaOH-Puffer pH 5, das achte Mal wurde gegen das gleiche Puffersystem mit pH 7,4 dialysiert.

| | Größe [nm] | PDI |
|---|---------------|------------|
| Gd-PEI-PLGA-NP (206 mg PEI) nach Dialyse bei pH 5 | 140,4 ± 2,4 | 0,10 ± 0,0 |
| Gd-PEI-PLGA-NP (20,6 mg PEI) nach Dialyse bei pH 5 | 147,8 ± 2,2 | 0,09 ± 0,0 |

Tab. 6 – Größe und PDI von Gd-PEI-PLGA-Np synthetisiert mit 206mg oder 20,6mg PEI

| | PLGA [mg/ml] | Gd [mg/l = µg/ml] | Gd [mM] | Gd [µM] | µg Gd/mg PLGA |
|---|-----------------|----------------------|------------|------------|---------------|
| Gd-PEI-PLGA-NP (206 mg PEI) nach Dialyse bei pH 5 | 2,140 | 30,179 | 0,192 | 191,917 | 14,102 |
| Gd-PEI-PLGA-NP (20,6 mg PEI) nach Dialyse bei pH 5 | 3,750 | 16,789 | 0,107 | 106,767 | 4,477 |

Tab. 7 – Verhältnis von Gadolinium zu PLGA von Gd-PEI-PLGA-Np synthetisiert mit 206mg oder 20,6mg PEI nach Oberflächenmodifikation und Endreinigung

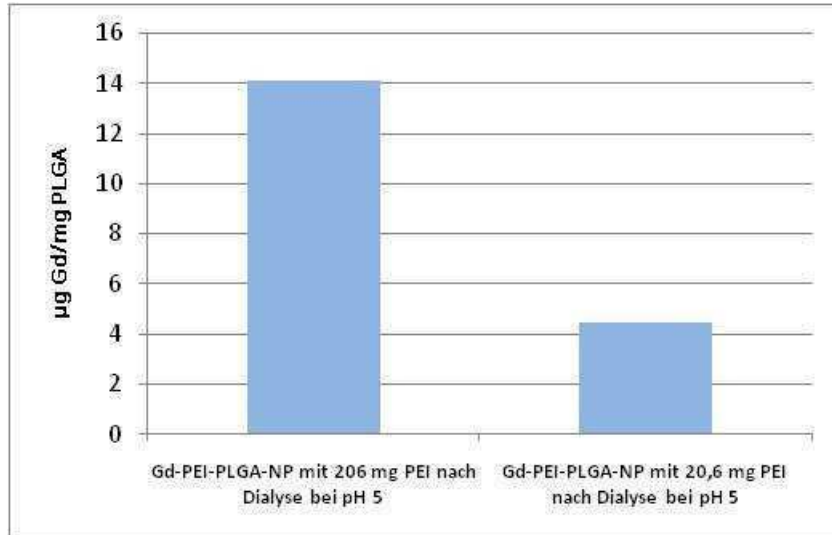


Abb. 34 – Verhältnis von Gadolinium zu PLGA von Gd-PEI-PLGA-Np synthetisiert mit 206mg oder 20,6mg PEI nach Oberflächenmodifikation und Endreinigung

| Dialyseschritt | mg Gd in 500 ml Dialysat | | | | | | | |
|---|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Gd-PEI-PLGA-NP (206 mg PEI) Dialyse bei pH 5 | 212,392 | 72,194 | 8,368 | 7,840 | 1,824 | 2,751 | 1,083 | 1,155 |
| Gd-PEI-PLGA-NP (20,6 mg PEI) Dialyse bei pH 5 | 207,375 | 65,364 | 8,065 | 7,277 | 1,491 | 2,461 | 0,947 | 0,067 |

Tab. 8 – Gadoliniumgehalt der einzelnen Dialysate von Gd-PEI-PLGA-Np synthetisiert mit 206mg oder 20,6mg PEI

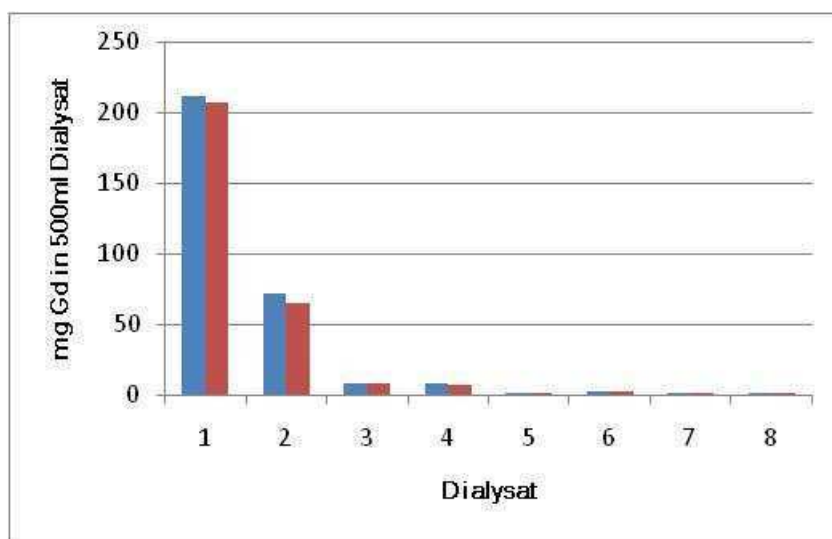


Abb. 35 – Gadoliniumgehalt der einzelnen Dialysate (blau Gd-PEI-PLGA-NP mit 206 mg PEI Dialyse bei pH 5, rot Gd-PEI-PLGA-NP mit 20,6 mg PEI Dialyse bei pH 5)

Tabelle 8 und Abbildung 35 zeigen die Abnahme der Gadoliniummenge bei jedem weiteren Dialyseschritt.

Größe, Polydispersitätsindex sowie der Gehalt an freiem Gadolinium in den Dialysaten zeigten kaum Unterschiede zu den zuvor beschriebenen PLGA-Nanopartikeln. Während in Anwesenheit eines Komplexbildners PEI-gebundene Nanopartikel eine Gadoliniummenge von ca. 54µg pro mg PLGA bei der Einschrittmethode und 147-220µg pro mg PLGA bei der Zweischrittmethode aufwiesen, wurden bei diesem Versuch 14mg Gadolinium pro mg PLGA bei der üblichen Menge PEI und 4mg pro mg PLGA bei einem Zehntel dieser Menge an PEI gemessen.

Das Ziel dieses Versuches war, kein Gadolinium nach der Enddialyse mehr vorzufinden. Wie Abbildung 35 und Tabelle 8 zeigen, sank der Gadoliniumgehalt zwar deutlich ab, war nach acht Dialysen jedoch immer noch mittels ICP-OES messbar. Dies zeigte ein gewisses Ausmaß an unspezifischer Bindung von Gadolinium bzw. Gadoliniumcitrat an PEI-PLGA-Nanopartikel, das jedoch mit jedem weiteren Waschvorgang reduziert wurde.

Der Versuch machte die starke Abhängigkeit der Stabilität vom pH-Wert deutlich: nur bei einem pH-Wert von 5, der bereits bei den vorherigen Methoden verwendet wurde, blieben die Proben stabil.

Einbau von Phospholipiden in PLGA-Nanopartikel

Einbau von DSPE in PLGA-Nanopartikel

Die Anwendungsmöglichkeiten für Nanopartikel umfassen die Inkorporation lipophiler oder hydrophiler Arzneistoffe, die mittels PLGA-Nanopartikel geschützt an ihrem Zielort durch oberflächengebundene Targeter freigesetzt würden.

Daher wurde die Doppelemulsions (W/O/W) Solvent Evaporation Technik angewendet, um hydrophile Komponenten in PLGA-Nanopartikel einzubauen.

Mittels Ultraschall wurde zuerst eine stabile W/O Emulsion erzeugt und anschließend zu einer W/O/W Doppelemulsion weiterverarbeitet.

Methoden:

Einer lipophilen Lösung aus 400mg Polymer RG 503H in 2g Ethylacetat wurden 4mg DSPE (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin), ein Phospholipid, zugesetzt und im Kühlschrank auf dem Magnetrührer 20 Minuten gerührt. Da keine vollständige Lösung erkennbar war, wurde die Suspension anschließend dreimal eine Minute mit Ultraschall behandelt, wobei einminütige Pausen zwischen den Ultraschallbehandlungen eine zu starke Erwärmung der Suspension verhindern sollte.

Zusätzlich wurden eine 10% Pluroniclösung, bestehend aus 0,6g Pluronic, aufgefüllt auf 6,0g mit Aqua destillata, und eine 1% Pluroniclösung mit 1,0g Pluronic in einer Glasschale, aufgefüllt mit Aqua destillata auf 100,0g, hergestellt und am Magnetrührer gerührt.

Nachdem 400µl Aqua destillata in die Polymerlösung am Gefäßrand eingebracht wurden, folgte zur Emulgierung eine Beschallung von 60 Sekunden, wobei gleichzeitig durch ein Wasserbad gekühlt wurde. Somit lag eine primäre W/O Emulsion vor.

Wie oben beschrieben wurde die 10% Pluroniclösung seitlich über den Gefäßrand zugesetzt und weitere 50 Sekunden beschallt.

Die entstandene Doppelemulsion wurde rasch in die 1% Pluroniclösung gegossen und eine Stunde bei 600rpm auf dem Magnetrührer gerührt.

Nachfolgend wurde das Lösungsmittel zunächst 30 Minuten lang bei 100mbar dann 30 Minuten lang bei Vollvakuum, 170 rpm und Raumtemperatur im Sinne der Solvent Evaporation am Rotavapor entfernt. Die entstandene Suspension wurde mit einer Spritze durch einen 1,0µm Glasfaser Vorfilter (Milipore®) filtriert und anschließend durch Dynamic Light Scattering die Größe bestimmt.

Zum Abschluss wurde die Probe viermal in einem Becherglas gegen 500ml 0,1%ige wässrige Pluronic-Lösung dialysiert.

Für Vergleichszwecke wurde ein analoger Ansatz jedoch mit 40mg DSPE hergestellt.

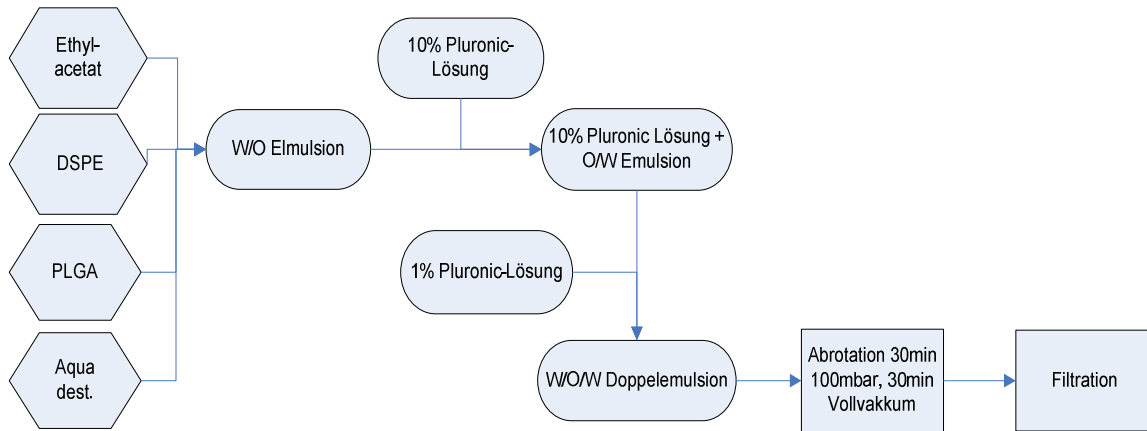


Abb. 36 -Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zum Einbau von Phospholipiden in PLGA-Nanopartikel im Flussdiagramm

Ergebnisse:

Nanopartikel mit 4mg DSPE:

| | Größe [nm] | PDI | Zetapotential [mV] | Leitfähigkeit [mS/cm] |
|----------------------|---------------|-------------|-----------------------|--------------------------|
| Nach der Herstellung | 245,86 ± 3,35 | 0,13 ± 0,01 | -24,03 ± 0,77 | 0,04 ± 0,00 |
| Nach 4 Dialysen | 175,23 ± 0,65 | 0,11 ± 0,01 | -23,33 ± 0,28 | 0,01 ± 0,00 |

Tab. 9 – Größenverteilung und Zetapotential von DSPE-hältigen PLGA-Nanopartikeln (4mg DSPE)

Größe und Polydispersitätsindex zeigten ähnliche Werte wie bei den vorherigen Chargen, wobei allerdings die Dialyseschritte zu einer Abnahme des Nanopartikeldurchmessers führten. Das Zetapotential von -24mV bei einer Leitfähigkeit von 0,0467mS/cm wies auf eine hohe Stabilität hin, da eine geringe Leitfähigkeit eine geringe Zahl an Ionen in der Lösung voraussetzt. Je weniger Ionen in der Lösung sind, desto weniger Ionen lagern sich an der geladenen Partikeloberfläche an und beeinflussen bzw. verfälschen das tatsächliche Zetapotential nur geringfügigst.

Nanopartikel mit 40mg DSPE:

| | Größe [nm] | PDI | Zetapotential [mV] | Leitfähigkeit [mS/cm] |
|-------------------------|----------------|-------------|-----------------------|--------------------------|
| Nach der Herstellung | 274,66 ± 10,16 | 0,16 ± 0,01 | -24,53 ± 0,40 | 0,02 ± 0,00 |
| Nach 4 Dialysen | 192,56 ± 0,81 | 0,14 ± 0,03 | -24,06 ± 0,85 | 0,01 ± 0,00 |

Tab. 10 – Größenverteilung und Zetapotential von DSPE-hältigen PLGA-Nanopartikeln (40mg DSPE)

Auch hier zeigten Größe und Polydispersitätsindex ähnliche Werte wie bei den vorangegangenen Chargen sowie eine Abnahme des gemessenen Nanopartikeldurchmessers durch die Dialyse [23]. Das Zetapotential von -24mV bei einer Leitfähigkeit von 0,0424mS/cm wies auch hier auf eine ausreichende Stabilität hin.

Herstellung von fluoreszenzmarkiertem DSPE

Um Stabilitätsuntersuchungen an den mittels Doppalemulsionstechnik hergestellten DSPE-PLGA-Nanopartikeln zu ermöglichen, wurden diese mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) fluoreszenzmarkiert. Wie nachfolgend beschrieben wurden zwei verschiedene Protokolle zur Herstellung der Partikel erprobt. Durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Dialysate sollte auf die Freisetzung von Fluorescein und damit auf die Stabilität der Partikel geschlossen werden.

Die Fluoreszenzintensität wurde bei 485nm (Excitation) – 525nm (Emission) und einem Gain (Verstärkung) von 150 im Mikrotiterfluorimeter (Micro Plate Fluor Reader, Infinite® M200, Tecan, Grödig, Austria) ermittelt. Pro Well der 96-Well-Mikrotiterplatte (Iwaki, Bertoni, Wien, Österreich) wurden 100µl der Fluorescein-hältigen Nanopartikel-Suspension eingebracht und vermessen.

Löslichkeitsuntersuchungen von DSPE

Zu Beginn wurde die Löslichkeit von DSPE näher untersucht: Eine Spatelspitze DSPE in 1ml Aqua destillata zeigte eine sehr schlechte Benetzbarkeit und war nach 15 Minuten noch immer kaum löslich, sodass mit Ultraschall der übrige Rest gelöst wurde und eine Trübung, wahrscheinlich durch Mizellbildung, zu beobachten war. Das Einbringen der gleichen Menge DSPE in 1ml Ethylacetat führte zur sofortigen

Trübung. Nachdem nach 15 Minuten keine vollständige Lösung erfolgte, wurde die Dispersion mit Ultraschall behandelt, wodurch eine trübe Lösung resultierte. Nach Zugabe von 10µl Aqua destillata verstärkte sich die Trübung, nach einem weiteren Zusatz von 500µl bildeten sich zwei Phasen, wobei die untere die Wasser- und die obere die Ethylacetatphase darstellte. Durch Schütteln vermischten sich die Phasen, trennten sich allerdings nach wenigen Minuten wieder. In Folge wurden 500ml Methanol zugesetzt, das als Lösungsvermittler die Wasser- und Ethylacetatphasen vereinen sollte. Die verwendete Menge an Methanol reichte jedoch nicht aus, nur das Volumen der beiden Phasen nahm zu.

In einem weiteren Versuch sollte die für eine homogene Dispersion notwendige Menge an Methanol ermittelt werden. Eine Mischung aus 9ml Ethylacetat und 5ml eines Methanol-Wassergemisches wurden in einer Epruvette vereinigt und ergab eine homogene Lösung. Da für die spätere Reinigung der DSPE-hältigen PLGA-Nanopartikel zwar zwei Phasen von Vorteil gewesen wären, um mit Abtrennung der wässrigen Phase wasserlösliche, überschüssigen Komponenten zu entfernen, aber für die anschließende Kopplung von FITC an DSPE eine einheitliche Phase und pH 7 nötig ist, wurde der pH-Wert durch Zusatz von 50µl 1M NaOH von pH 4 auf pH 7 gestellt. Die weitere Zugabe von 2200µl 0,01 M NaOH (= 22µl 1M NaOH) bewirkte wieder eine Entmischung durch den erhöhten Wasseranteil der stark verdünnten Lauge statt.

Herstellung von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln (Methode1)

Bei dieser Methode sollte ein das nicht gereinigte Umsetzungsprodukt aus DSPE und FITC direkt in PLGA-Nanopartikel inkorporiert werden. Dazu wurden 2ml Ethylacetat und 20µl 1M NaOH in einem HPLC-Fläschchen am Vortex-Schüttler vermischt. Nach Zusatz von 20mg DSPE und 15mg FITC (Fluoresceinisothiocyanat) mit Hilfe eines Wägeschiffchens wurde die Dispersion mittels Ultraschallstab bei voller Leistung zehn Minuten lang homogenisiert. Die ungelösten Anteile von DSPE waren nach einer Minute Beschallung vollständig, die ungelösten FITC-Partikel nach zehnmaliger Beschallung mit Unterbrechungen von jeweils einer Minute nicht vollständig gelöst. Im Anschluss wurde die Probe über Nacht auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurden Nanopartikel mittels Doppulemulsionstechnik, wie auf Seite 43 beschrieben, mit 40mg DSPE hergestellt, wobei ein Milliliter des Inkubats zu 2g PLGA-Lösung zusetzt wurde; der ungelöste Anteil des DSPE-FITC Inkubates blieb im Fläschchen zurück. Der entstandenen leicht gelben, klaren Flüssigkeit wurden 400µl Aqua destillata zugefügt, wodurch sich auf der Oberfläche ein Wassertropfen bildete. Anschließend wurde mit dem Ultraschallstab beschallt und abrotiert. Somit entstanden fluoreszenzmarkierte PLGA-DSPE-Nanopartikel.

Ein 5ml Aliquot der Suspension (Gesamtvolumen 94ml) wurde neun Mal gegen 500ml Aqua destillata/0,1% Pluronic in einem Becherglas dialysiert. Durch unregelmäßige Dialysezeiten von 8 Stunden bis 4 Tagen entstanden keine repräsentativen Ergebnisse. Deshalb wurde der Versuch wiederholt, wobei das Aliquot dreimal gegen 500ml Aqua destillata / 0,1% Pluronic dialysiert wurde.

Zur Analyse wurden Aliquote von nicht-dialysierten und dreimal dialysierten Nanopartikeln im Verhältnis 9+1 (V/V) mit 4M NaOH aufgelöst und durch Fluoreszenzmessung auf die eingebaute Menge an Fluorescein rückgeschlossen. Auch die Dialysate wurden fluorimetrisch analysiert.

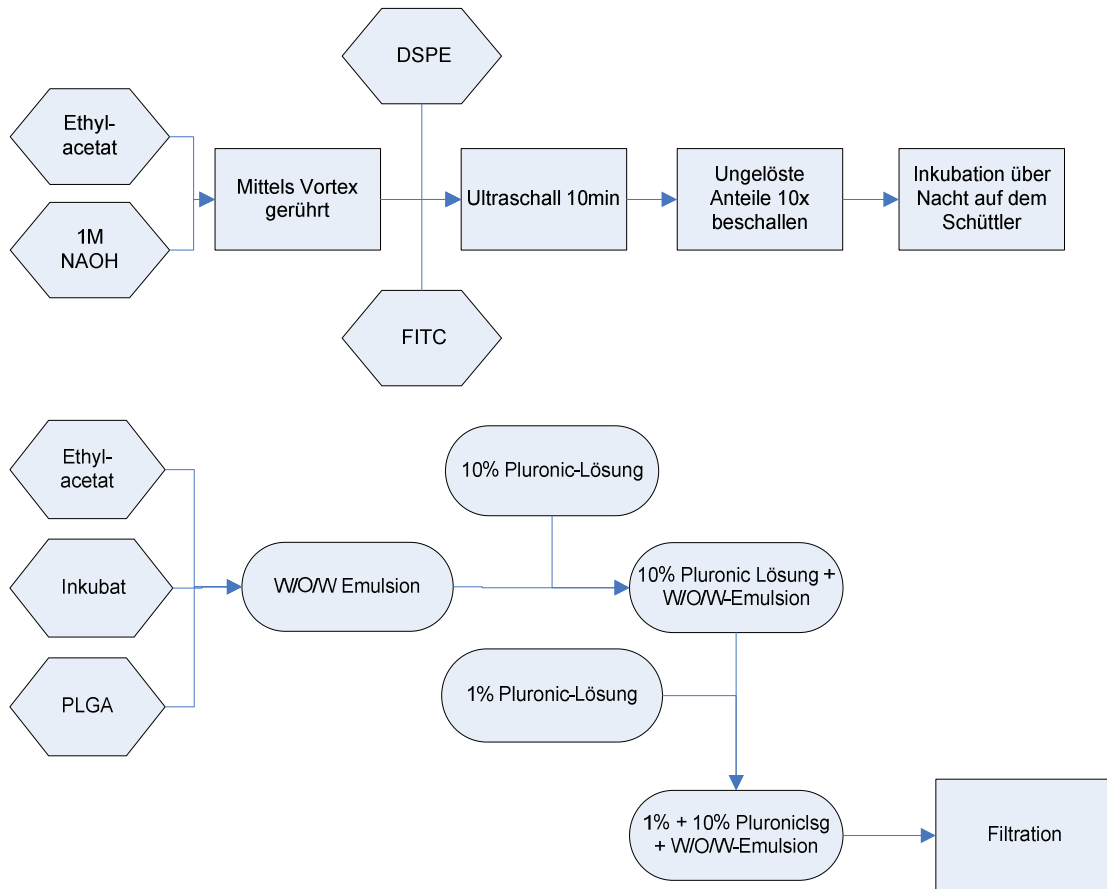


Abb. 37 - Schematische Darstellung der Herstellung von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode1 im Flussdiagramm

Ergebnisse:

| | Durchmesser [nm] | PDI |
|-------------------------|---------------------|-------------|
| Nach der Herstellung | 153,73 ± 21,13 | 0,10 ± 0,02 |
| Nach 3 Dialysen | 117,16 ± 7,47 | 0,14 ± 0,01 |

Tab. 11 – Durchmesser und PDI von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode1 hergestellt

Nach dreimaliger Dialyse nahm der Durchmesser der Partikel nur geringfügig ab, während der Polydispersionsindex geringfügig zunahm. Aufgrund des kleinen PDI dürften immer noch stabile Partikel vorliegen sein (Erklärungen zu Polydispersionsindex Seite 11).

Methode 1:

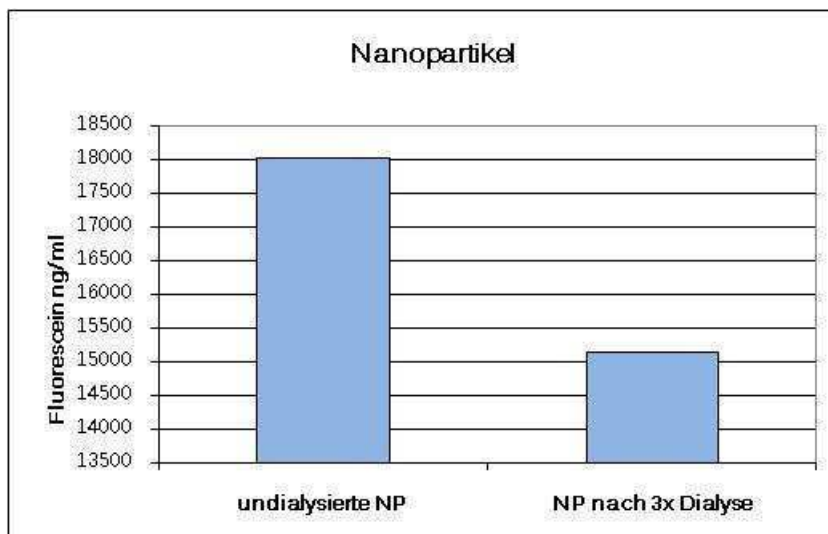


Abb. 38 – Fluoresceingehalt von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode1 hergestellt (Gain 150, 485/525nm)

Undialysierte Fluorescein-DSPE-Nanopartikel enthielten ca. 18µg Fluorescein/ml Partikelsuspension. Durch dreimalige Dialyse wurde dieser Wert um 3µg auf ca. 15µg Fluorescein/ml Partikelsuspension reduziert.

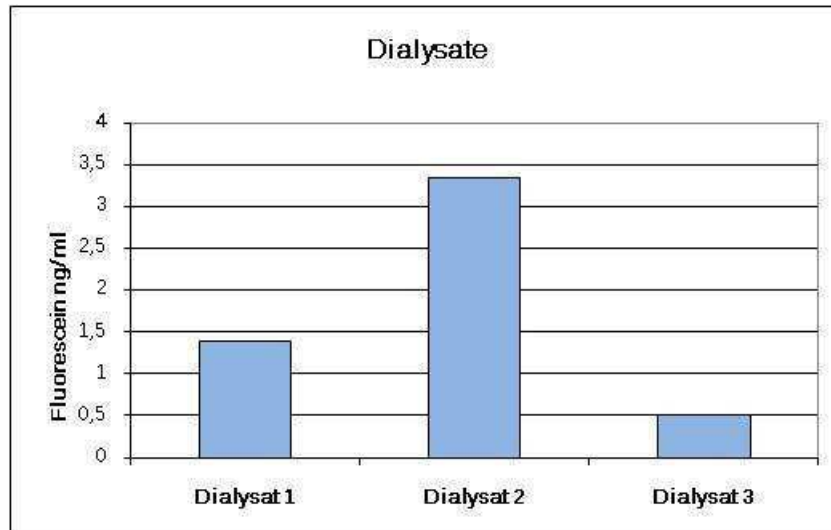


Abb. 39 – Fluoresceingehalt der Dialysate von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode1 hergestellt (Gain 150, 485/525nm, Dialysate D1 und D3 8h, D2 16h dialysiert)

Nach der ersten Dialyse enthielt das Dialysat ca. 1,4ng Fluorescein/ml. Im Dialysat 2 ist die Konzentration auf ca. 3,3ng Fluorescein/ml Dialysat deutlich erhöhet, wobei die Dialyse über Nacht stattfand und somit über eine längere Zeitspanne verlief. Das Dialysat 3 zeigte eine Konzentration von ca. 0,5ng Fluorescein/ml Dialysat. Die Abbildungen 38 und 39 verdeutlichen, dass die Fluorescein-DSPE-Nanopartikel nach dreimaliger Dialyse noch immer nennenswerte Mengen an Fluorescein enthielten. Dies weist darauf hin, dass FITC an DSPE gekoppelt bzw. als Fluorescein-DSPE-Konjugat in die Partikel eingebaut wurde.

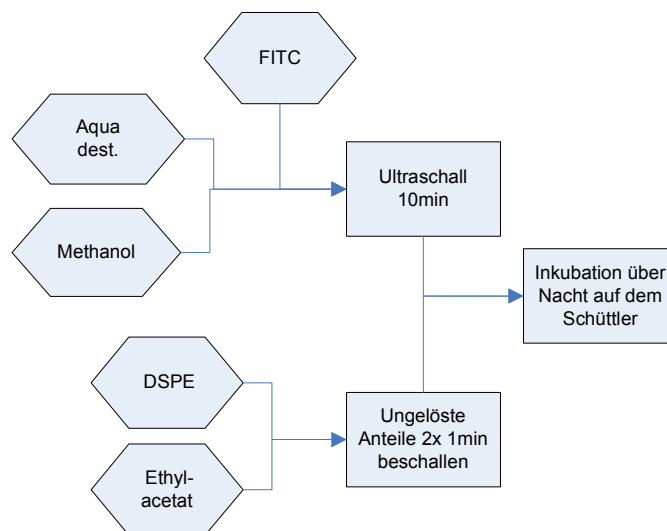
Herstellung von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln (Methode 2)

Für das zweite Herstellungsprotokoll unter Einsatz eines vorgereinigten DSPE-FITC-Konjugates wurde zunächst eine Lösung von 20mg DSPE in 3,2ml Ethylacetat und eine Lösung von 15mg FITC in einem Gemisch aus 144,64µl Aqua destillata und 1625µl Methanol in einem Becherglas hergestellt und jeweils im Ultraschallbad bei voller Leistung zehn Minuten und bei einer Wassertemperatur von maximal 40° Celsius gelöst. Die ungelösten Anteile von DSPE wurden mit einem Ultraschallstab zweimal eine Minute mit einer einminütigen Pause beschallt. Nach vollständiger Lösung wurden beide Lösungen in einem HPLC-Fläschchen vereinigt, mit 1M NaOH auf pH 7 gestellt und unter Lichtschutz auf dem Schüttler bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

In einem Scheidetrichter wurde unter Lichtschutz mit 25ml-Aliquoten von Aqua destillata ausgeschüttelt, um ungebundenes FITC quantitativ zu entfernen, wobei zu Beginn 35ml zugefügt wurden, um eine Phasentrennung zu gewährleisten. Nach jedem Ausschütteln wurden 25ml der Wasserphase gesammelt und erneut 25ml Aqua destillata zugegeben, bis die Wasserphase keine gelbe Verfärbung

mehr zeigte und somit als vollständiges Auswaschen der Ethylacetatphase zu deuten war. Die Ethylacetatphase wurde in einem Spitzkolben bei Vollvakuum abrotiert und lyophilisiert. Der Trockenrückstand wurde in Ethylacetat gelöst und in ein Becherglas eingebracht. Das Lösungsmittel wurde auf 2ml eingengt und damit wurden Nanopartikel mittels Solvent Evaporation Technik ohne Doppemulsion hergestellt. Die entstandenen Nanopartikel wurden mit 4M NaOH in einem Verhältnis von 9 + 1 aufgelöst, wobei vorher Aliquote von 5ml zweimal oder fünfmal gegen 500 ml PBS-Puffer/0,1% Pluronic dialysiert wurden. Analog zur ersten Methode wurde durch Fluoreszenzmessung der Fluoresceingehalt der Partikelsuspension und der Dialysate sowie in einem nicht dialysiertem Aliquot bestimmt.

Auch die entnommenen Wasserphasen wurden mit 4M NaOH in einem Verhältnis von 9 + 1 (V/V)verdünnt und die Fluoreszenzintensität gemessen.



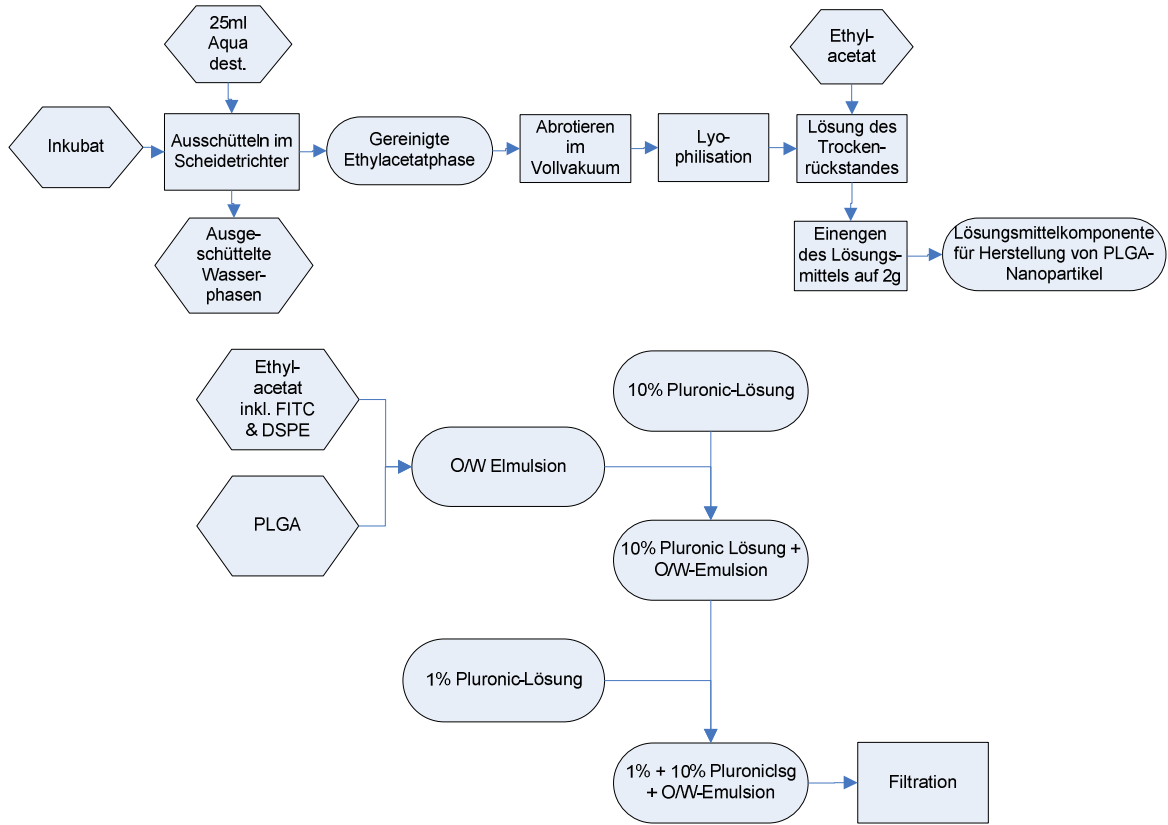


Abb. 40 - Schematische Darstellung der Herstellung von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode2 im Flussdiagramm

Ergebnisse:

| | Durchmesser [nm] | PDI |
|---------------------|------------------|-------------|
| Undialysierte NP -1 | 135,26 ± 4,57 | 0,10 ± 0,00 |
| Undialysierte NP -2 | 141,40 ± 2,95 | 0,10 ± 0,01 |
| Nach 2 Dialysen | 129,70 ± 3,20 | 0,12 ± 0,00 |
| Nach 5 Dialysen | 119,53 ± 4,40 | 0,14 ± 0,00 |

Tab. 12 – Durchmesser und PDI von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode2 hergestellt

Nach dreimaliger und fünfmaliger Dialyse war eine Abnahme der Größe beziehungsweise Verschlechterung des Polydispersionsindex zu erkennen. Die

Partikel waren jedoch immer noch stabil, da die PDI-Werte unter 0,15 (siehe Seite 11) lagen.

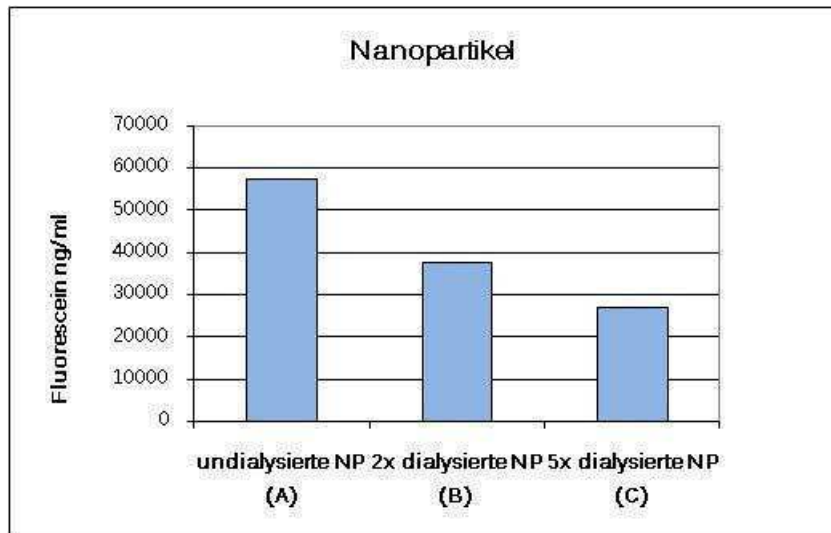


Abb. 41 – Fluoresceingehalt von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode2 hergestellt (Gain 150, 485/525nm)

Die nicht-dialysierten Fluorescein-DSPE-PLGA-Nanopartikel (Préparation nach Methode 2) enthielt ca. 57µg Fluorescein/ml Partikelsuspension. Nach dreimaliger Dialyse nahm die Fluoresceinmenge auf ca. 36µg Fluorescein/ml und nach fünfmaliger Dialyse von 26µg Fluorescein/ml ab, was einen den Reinigungseffekt durch Dialyse bestätigt.

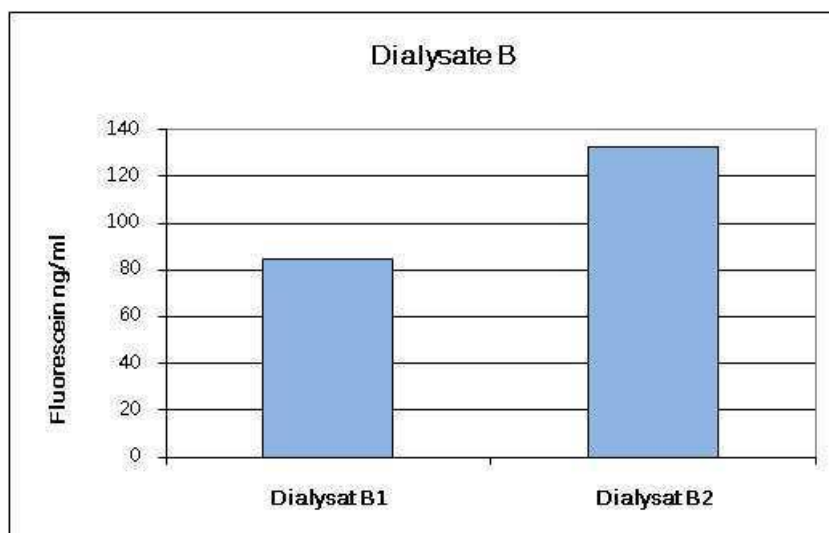


Abb. 42 – Fluoresceingehalt der Dialysate nach zweimaliger Dialyse von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode2 hergestellt (Gain 150, 485/525nm, Dialyse B1 8h, Dialyse B2 16h)

Nach der ersten Dialyse konnte eine Konzentration von ca. 80ng Fluorescein/ml Dialysat gemessen werden. Dialysat 2 zeigte eine deutliche Erhöhung der Konzentration auf ca. 130ng Fluorescein/ml Dialysat, wobei die Dialyse über Nacht stattfand und somit über eine längere Zeitspanne erfolgte.

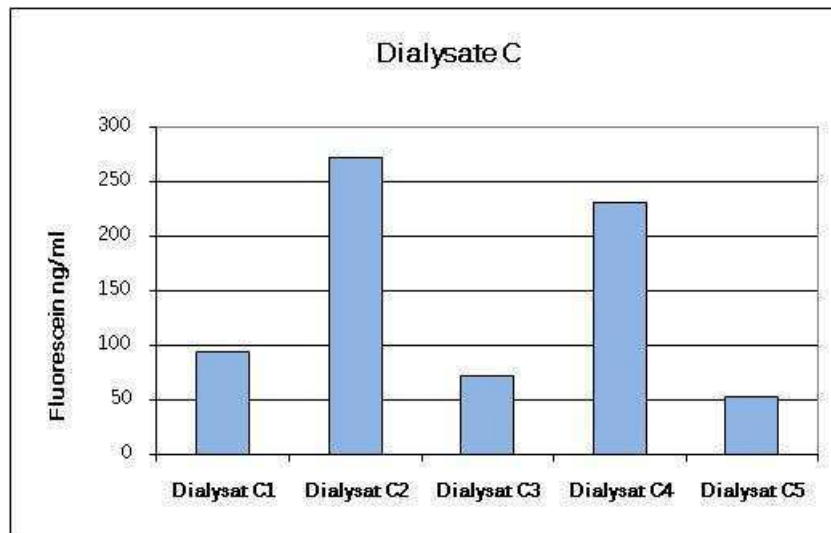


Abb. 43 – Fluoresceingehalt der Dialysate nach fünfmaliger Dialyse von DSPE-FITC hältigen PLGA-Nanopartikeln nach Methode2 hergestellt (Gain 150, 485/525nm, Dialyse C1, C3, C5 8h, Dialyse C2, C4 16h)

Nach dem ersten Dialyseschritt enthielt das Dialysat ca. 90ng Fluorescein/ml Dialysat, nach dem zweiten Dialyseschritt betrug diese ca. 270ng Fluorescein/ml, wobei die Dialyse über Nacht stattfand und daher die Exposition doppelt so lang wie die achtstündigen Dialysen erfolgte. Nach der dritten Dialyse enthielt das umgebende Medium ca.70ng Fluorescein/ml; nach der vierten Dialyse, die wieder über Nacht ablief, ca. 230ng Fluorescein/ml. Dialysat 5 enthielt ca. 50ng Fluorescein/ml Dialysat.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, sank der Fluoresceingehalt der Nanopartikelpräparationen mit steigender Anzahl der Dialysierschritte. Da die Nanopartikel-Präparation nach dem fünften Dialyseschritt (Abb. 43) immer noch 26µg Fluorescein enthält, kann auch hier wie bei Ansatz 1 auf die Kopplung zwischen FITC und DSPE und den Einbau des Konjugates in die Partikel rückgeschlossen werden.

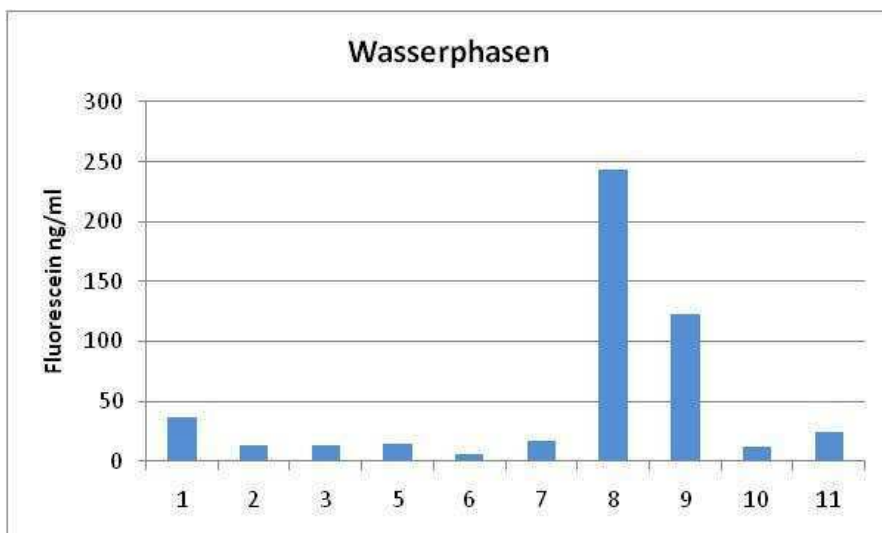


Abb. 44 – Fluoresceingehalt der Wasserphasen beim Ausschütteln während der Herstellung von DSPE-FITC nach Methode2 (Gain 150, 485/525nm)

Bis zum siebenten Ausschütteln nahm der Fluoresceingehalt der Wasserphasen kontinuierlich ab, danach verschlechterte sich die Phasentrennung durch verflüchtigtes Ethylacetat und die daraus resultierende Änderung des pH-Wertes. Zudem war eine Verdunkelung der Wasserphasen war zu beobachten. Durch Zugabe von 10ml Ethylacetat konnte die Phasentrennung wieder verbessert werden. Nach 10maligem Ausschütteln war die Wasserphase farblos, obwohl ein Fluoresceingehalt von ca. 20ng/ml ermittelt wurde. Wie in Abbildung 44 zu sehen ist, sank der Gehalt an FITC in der wässrigen Phase, sodass ein Konjugat zwischen FITC und DSPE in der lipophilen Phase vorgelegen sein dürfte.

Bei Methode 1 wurde ein ungereinigtes DSPE-FITC-Konjugat (Ethylacetat/ Methanol mit DSPE und FITC) mittels Doppalemulsionsmethode in PLGA-Nanopartikel eingebaut. Bei Methode 2 wurden distinkte Lösungen von FITC in Methanol und DSPE in Ethylacetat eingesetzt und nach Inkubation ungebundenes FITC im Scheidetrichter mit der wässrigen Phase ausgewaschen. Die Ethylacetatphase mit dem DSPE-Fluorescein-Konjugat wurde abrotiert, zur endgültigen Abtrennung der Wasserphase lyophilisiert. Dieses vorgereinigte DSPE-FITC-Konjugat wurde anschließend wieder in Ethylacetat gelöst, um es mittels Solvent Evaporation Technik in PLGA-Nanopartikeln einzubauen.

Wie aus den oben präsentierten Ergebnissen zu erkennen ist, ergaben beide Methoden auch nach mehrmaliger Dialyse einen nennenswerten Gehalt von Fluorescein in den Partikeln, wobei Methode 2 bei gleicher Ausgangsmenge einen höheren Fluoresceingehalt ergab. Während bei Methode 1 ein unlöslicher Anteil an FITC im Reaktionsgefäß zurückblieb, konnte bei Methode 2 die gesamte Menge an FITC verarbeitet werden. Bei beiden Ansätzen blieben die PLGA-Partikel auch nach

mehrmaliger Dialyse und unterschiedlicher Verarbeitung bis zum Ende des Versuchs stabil. Somit könnten nach Methode 2 DSPE-FITC-hältige PLGA-Nanopartikel hergestellt werden, wobei eine nähere Charakterisierung und Optimierung weiterführende Arbeiten erfordert.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass PLGA-Nanopartikel mit Gadoliniumkomplexen für die Kontrastverstärkung von Bildschnitten der Magnetresonanztomografie beladen werden konnten. Zur Modifizierung der Partikeloberflächen wurden drei verschiedene Aminospacer, Tetramethyldiamin, 1,8-Diaminooctan und Polyethylenimin (PEI) sowie die Komplexbildner 1,4,7,10-Tetra-azacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und Diethylentriaminopentaessigsäure (DTPA) eingesetzt, die stabile Chelate mit dreiwertigen Gadoliniumionen ausbilden, um schwerwiegende Nebenwirkungen durch freies, toxisches Gadolinium zu vermeiden.

Bei der ersten Methode - in der vorliegenden Arbeit als „Zweischrittmethode“ bezeichnet – wurden die PLGA-Nanosphären zuerst mit der Aminokomponente (Tetramethyldiamin, Octamethyldiamin oder PEI), danach mit den Komplexbildnern DOTA-NHS oder DTPABA konjugiert und schließlich mit Gadolinium beladen. Bei der „Einschrittmethode“ wurde zunächst DOTA-NHS mit PEI konjugiert. Dieses Konjugat wurde anschließend an die Nanopartikeloberfläche gebunden und die modifizierten Partikel zuletzt mit Gadolinium beladen. Bei einer weiteren Methode, der sogenannten „alternativen“ Kopplungsmethode, sollte zuerst der Spacer mit dem Komplexbildner konjugiert, das Konjugat mit Gadolinium beladen und dieser MRI-funktionelle Ligand an die Partikeloberfläche gekoppelt werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass diese Vorgangsweise nicht zielführend ist.

Der Vergleich der Charakteristika der Nanopartikel, die nach der Ein- und Zweischrittmethode hergestellt wurden, zeigt kaum Unterschiede im Durchmesser, Polydispersitätsindex und Zetapotential der Nanopartikel (siehe Publikation S.31/32 im Appendix). Im Vergleich zur Einschrittmethode konnte mit der Zweischrittmethode sogar die dreifache Gadoliniummenge an die Partikel gebunden werden.

Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der Zweischrittmethode, dass die Wahl des Spacers für die Gadoliniumbelastung und damit für die Kontrastverstärkung entscheidend ist: Die Bestimmung des Gadoliniumgehaltes mittels ICP-OES und des PLGA-Gehaltes mittels HPLC ergibt, dass PEI zu bis zu 250-fachen höheren Konzentrationen (Gd-DTPA-PEI 215 µg Gadolinium/mg PLGA, Gd-DOTA-PEI 147 µg Gadolinium/mg PLGA) an assoziiertem Gadolinium verglichen mit den beiden anderen Spacern Octamethyldiamin (Gd-DTPA-OMD 1 µg Gadolinium/mg PLGA, Gd-DOTA-OMD 1 µg Gadolinium/mg PLGA) und Tetramethyldiamin (Gd-DTPA-TMD 0,2 µg Gadolinium/mg PLGA, Gd-DOTA-TMD 0,3 µg Gadolinium/mg PLGA)

führt. Die hohe Gadolinium-Beladung von PEI beruht auf den sieben primären Aminogruppen des stark verzweigten Moleküls, sodass nach Kopplung an die Oberfläche des Nanopartikels immer noch 6 freie Aminogruppen für die Bindung des Komplexbildners zur Verfügung stehen. Darüber hinaus zeigten diese Gd-Nanopartikel auch besonders hohe T1-Relaxationszeiten und damit MRI-Kontrastverstärkung (Publikation Seite 32). Im Gegensatz dazu sind Octamethyldiamin und Tetramethyldiamin unverzweigt und bifunktionell, sodass nach Kopplung an die Partikeloberfläche jeweils nur eine Aminogruppe für die Bindung des Komplexbildners zur Verfügung steht.

Zusätzlich besitzen PEI-funktionalisierte Nanopartikel eine weitaus geringere negative Oberflächenladung als Octamethyldiamin- oder Tetramethyldiamin-assoziierte Partikel. Je negativer diese Oberfläche geladen ist, desto stabiler ist die Partikelsuspension, da sich die einzelnen Partikel stärker von einander abstoßen und daher nicht aggregieren.

Die modifizierten Nanopartikel besitzen eine enge Größenverteilung im Bereich von 150nm bis 200nm (Abbildungen in der Publikation auf Seite 28) und wurden mittels Dynamic Light Scattering (siehe Seite 11) und cryo-TEM (siehe Publikation Seite 10) charakterisiert.

Ein Hauptproblem der Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanopartikeln ist die mangelnde Stabilität. Aus instabilen Komplexen mit gesteigerten Dissoziationsraten kann Gadolinium freigesetzt und durch endogene Metallionen oder Calcium ersetzt werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Transmetallisierung [22]. In Anwesenheit von Citrat, das selbst einen Komplexbildner darstellt, ist dieser Transmetallisierungsprozess nicht möglich. Um stabilisierende, aber zudem auch physiologische Puffer zu finden, wurden nach der Zweischnittmethode hergestellte DOTA-PEI-PLGA-Nanopartikel gegen Betain-, Malonsäure- und Taurinlösung dialysiert. Jedoch war keine der drei Lösungen zur Stabilisierung der Partikel geeignet.

Da freies Gadolinium im Organismus schwere Schäden anrichten kann, wurde ein Reinigungsprotokoll für die Nanopartikelsuspensionen unter Einsatz von Dialyse bei unterschiedlichen pH-Werten, der sich nachhaltig auf die Stabilität der Partikel auswirkt, erarbeitet. Während die physikalischen Charakteristika der Nanopartikel kaum beeinflusst wurden, konnte durch eine achtmalige Dialyse gegen pH 5 der Gehalt an freiem Gadolinium drastisch reduziert werden, war aber mittels ICP-OES noch immer nachweisbar. Somit dürfte eine geringe Menge an Gadolinium unspezifisch an der Partikeloberfläche gebunden sein.

Um einerseits die Dichte der Aminliganden an der Partikeloberfläche, andererseits das Tensid bei der Herstellung zu ersetzen, wurde das Phospholipid DSPE (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) in die PLGA-Nanopartikel mittels Doppulemulsionstechnik eingebaut. Die physikalischen Charakteristika wie Größenverteilung und PDI entsprachen den modifizierten PLGA-Nanopartikeln. Um zusätzlich Stabilitätsuntersuchungen an doppelt-markierte Nanopartikel für multiple diagnostische Fragestellungen zu ermöglichen, wurde ein neu synthetisiertes DSPE-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Konjugat direkt und in vorgereinigter Form erstmals in PLGA-Nanopartikel eingebaut und durch Dialyse gereinigt. Während die physikalischen Charakteristika durch den Einbau des Markers nicht verändert wurden, führte die Verwendung eines vorgereinigten DSPE-FITC-Konjugates zu deutlich höherer Fluoreszenzmarkierung.

Ziel weiterführender Studien wären weitere Untersuchungen zur Stabilität und in Folge Toxizitätstests und in-vivo-Studien. Entsprechend dem „Theranostics-Konzept“, der Vereinigung von Therapeutikum und Diagnostikum in einer Arzneiform, wäre der zusätzliche Einbau von Wirkstoffen in die nanopartikuläre Matrix eine Zukunftsvision. Ein erster Schritt auch in Richtung gleichzeitiger Anwendung unterschiedlicher bildgebender Untersuchungsmethoden war die Inkorporation von fluoreszierenden Phospholipiden, wozu noch weiterführende Arbeiten notwendig sind.

Appendix A: Abkürzungen & Materialien

Abkürzungen

| | |
|--------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ca. | Circa |
| d | Tage |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOTA-NHS | 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure NHS-ester |
| DSPE | 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin |
| DTPABA | Diethylentriaminpentaessigsäurebisanhydrid |
| EDAC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid- hydrochlorid |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| Gd | Gadolinium |
| h | Stunden |
| M | Molar |
| mmol | Millimol |
| MRT | Magnetresonanztomografie |
| mS/cm | Millisiemens pro Centimeter |
| mV | Millivolt |
| MWCO | Molecular Weight Cut-Off |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| O/W- Emulsion | Öl in Wasser Emulsion |
| O/W/O- Emulsion | Öl in Wasser in Öl Emulsion |
| OMD | 1,8-Diaminooctan |
| osmol/kg | Einheit der Osmolalität |
| osmol/l | Einheit der Osmolarität |
| Partikelsusp. | Partikelsuspension |
| PDI | Polydispersitätsindex |
| PEI | Polyethylenimin |
| PLGA | Poly(D,L-laktid-co-glykolid) |
| RT | Raumtemperatur |

| | |
|-----|------------------------|
| Rpm | Umdrehungen pro Minute |
| sec | Sekunden |
| TMD | Tetramethyldiamin |

Materialien

| | |
|--|---------------------------------------|
| 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure | Macrocyclics, USA |
| 1,8-Diaminooctan 98% | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Diethylenetriaminpentaessigsäure-anhydrid | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Fluorescein-5-isothiocyanat | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Gadolinium (III) chlorid hexahydrat 99,99% | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid, Commercial Grade | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Natriumcitrat tribasisch Dihydrat | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| N-Hydroxysuccinimid 98% | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Pluronic F-68 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Polyethylenimin 99% MW 1200, verzweigt | Polysciences Inc., USA |
| Resomer RG 503 Poly(D,L-lactide-co-glycolide), 50:50 Laktid/Glykolid, inhärente Viskosität 0.32-0.44 dL g ⁻¹ , Säurezahl > 3 mg KOH g ⁻¹ | Boehringer Ingelheim, Deutschland |
| Tetramethyldiamin 98% | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Österreich |
| Zitronensäure, wasserfrei, Griessform | Riedel-de Haën, Deutschland |

Alle anderen verwendeten Materialien waren von analytischer Reinheit.

Appendix B: Quellen

- [1] P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease, *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No. 7, July 2006
- [2] J. Kreuter, *Colloidal Drug Delivery Systems*, Dekker, New York, 1994
- [3] M. Aboubakar, P. Puisieux, Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization, *International J. of Pharm.*, 183,63-66, 1999
- [4] Forestiera, Gerrierb, Effect of nanoparticle-bound ampicillin on the survival of *Listeria monocytogenes* in mouse peritoneal macrophages, *J Antimicrob Chemother*, 1992
- [5] Weißhaupt, Köchli, Marincek, *Wie funktioniert MRI?*, Springer, 5. Auflage, Berlin, 2006
- [6] http://www.radiologie-hamborn.de/Untersuchungen/MRT/MRT_Schaedel_T2_sagittal.jpg 15.05.2010
- [7] Moran, Pekar, An Investigation of the Toxicity of Gadolinium Based MRI Contrast Agents, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 10, 2002
- [8] Müller, Schuhmann, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1. Auflage, Stuttgart, 1996
- [9] Kirby, Hasselbrink Jr., Zeta potential of microfluidic substrates, *Electrophoresis*, 25, 187–202, 2004
- [10] Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes, Zeta-Meter.Inc. www.zeta-meter.com/5min.pdf 28.04.09
- [11] Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996
- [12] Olson, *Separations technology: pharmaceutical and biotechnology applications*, Interpharm Press, USA, 1995
- [13] <http://www.bioexpress.com/prodimages/groups/F-2911-3c.jpg> 29.04.09
- [14] Ammon, *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter, 9. Auflage, Berlin, 2004
- [15] Schwedt, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley-Vch, 2. Auflage, Weinheim, 2008
- [16] Van de Weert, Protein Instability in Poly(Lactic-co-GlycolicAcid) Microparticles, *Pharmaceutical Research*, Vol. 17, No. 10, 2000
- [17] Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, 2.Auflage, London, 2008
- [18] Krause, *Contrast agents: magnetic resonance imaging*, Springer Verlag, Band 221, 2002, Berlin

- [19] Morcos SK. Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability, Eur J Radiol 2008;66:175-9, 2008
- [20] Laurent S, Elst LV, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI Paramagnetic Contrast Media. A Proton Relaxometric Protocol for Transmetallation Assessment. Investig Radiol 2001;36(2):115-22., 2001
- [21] <http://www.sigmaaldrich.com/thumb/structureimages/49/mfcd00082049.gif>
14.05.2010
- [22] Hak S, Sanders HM, et al. A high relaxivity Gd(III)DOTA-DSPE-based liposomal contrast agent for magnetic resonance imaging., Eur J Pharm Biopharm. 2009 Jun;72(2):397-404. Epub 2008 Oct 10.
- [23] C. Fillafer, M. Wirth, F. Gabor. Stabilizer-Induced Viscosity Alteration Biases Nanoparticle Sizing via Dynamic Light Scattering, Langmuir, 23 (17), 8699-8702, 2007
- [24] [www.boehringer-
ingelheim.com/corporate/download/ic/resomer/controlled-
release/rg_503_h.pdf](http://www.boehringer-
ingelheim.com/corporate/download/ic/resomer/controlled-
release/rg_503_h.pdf) 11.5.09

Appendix C: Curriculum Vitae

CURRICULUM VITAE



Persönliche Daten

Name: Julia Lonkai

Geburtsdatum/-ort: 10.10.1986, Wien

Staatsangehörigkeit: Österreich

Akademische Ausbildung

2004-dato: Universität Wien - Studium der Pharmazie

Wintersemester/
Sommersemester 09: Diplomarbeit

Berufliche Tätigkeiten

seit 10/2008: Tutor am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Fakultät für Lebenswissenschaften, Universität Wien

09/2009 – 11/2009: Schranz & Cerwinka OEG

07/2008 – 08/2009: Pfizer Corporation Austria Gesellschaft m.b.H., Abteilung Human Resources

| | |
|--------------------|---|
| 03/2008 – 06/2008: | Akademie der Ärzte, Österreichische Ärztekammer, Abteilung Facharztprüfung |
| 02/2008: | St. Martin Apotheke (1170 Wien) |
| 07/2007: | St. Martin Apotheke (1170 Wien) |
| 08/2006: | Apotheke zum heiligen Bartholomäus (1170 Wien) |
| 08/2004 – 11/2005: | Armonia Apotheke (1170 Wien) |
| 07/2001: | Investkreditbank, Personalabteilung |

Periodische Studentenjobs:

- Promotion für ORF bei F & S
- Minopolis, die Stadt der Kinder
Kinderanimation & -betreuung
- Englisch-Nachhilfe

Sprachaufenthalte

| | |
|----------|---------|
| 07/2003: | USA |
| 05/2003: | Irland |
| 07/2000: | England |

Schulbildung

| | |
|---------------|---|
| 1996 – 2004: | Bundesgymnasium Kloostergasse (1180 Wien) |
| 1992 – 1996 : | Volkschule Knollgasse (1170 Wien) |

Sonstige Fähigkeiten und Kurse

| | |
|-------------------|---|
| Sprachkenntnisse: | Englisch (fließend in Wort und Schrift) |
|-------------------|---|

Computerkenntnisse: MS Office (Word, Excel, Power Point)

Führerschein: B

Excel-Kurs bei SPC

„Erfolgreich kommunizieren und telefonieren“ bei Gabriele Cerwinka, Schranz & Cerwinka OEG

Interessen

Reisen

Musik

Bücher

Appendix D: Publikation

Siehe nächste Seite

High-relaxivity contrast agents for MRI: Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA

Gerda Ratzinger ^a, Prashant Agrawal ^b, Wilfried Körner ^c, Julia Lonkai ^a, Honorius M.H.F. Sanders ^{b,d}, Enzo Terreno ^e, Michael Wirth ^a, Gustav J. Strijkers ^b, Klaas Nicolay ^b, Franz Gabor ^{a*}

^a *Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090, Vienna, Austria*

^b *Biomedical NMR, Department of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology, PO Box 513, 5600 MB, Eindhoven, The Netherlands*

^c *Department of Environmental Geosciences, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090, Vienna, Austria*

^d *CryoTEM Research Unit, Department of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology, PO Box 513, 5600 MB, Eindhoven, The Netherlands*

^e *Department of Chemistry, IFM and Molecular Imaging Center, University of Torino, Via P. Giuria 7, I-10125 Torino, Italy*

*Corresponding author. Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria. Tel.: (+43)-1-4277-55406; fax: (+43)-1-4277-9554. E-Mail address: franz.gabor@univie.ac.at

Abstract

The preparation of novel particulate contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) based on biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanocarriers is reported. By spacer-aided covalent surface-grafting of the prominent chelating ligands diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), respectively, up to 236 μg gadolinium per mg PLGA can be immobilized in a stable manner. Due to the localisation at the particle surface, water protons may effectively interact with the gadolinium chelates and the modified particles exhibit high proton relaxivities as confirmed by T1 relaxivities of up to 17.5 $\text{mm}^{-1}\text{s}^{-1}$ (25 °C, 1.41 T) in case of Gd-DOTA-functionalized carriers and also supported by NMRD profiles. The obtained values compare favorably with marketed low-molecular weight contrast agents and thus suggest suitability for in vivo use.

Keywords: Nanoparticle, MRI (magnetic resonance imaging), Surface modification, PLGA, Gd-DOTA, Gd-DTPA, contrast agent.

1. Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) is becoming an increasingly versatile and significant diagnostic method. Recent advances are not only caused by the development of high-tech scanners, but also motivated by the growing range of sophisticated contrast agents. The images are generated by measuring the signal intensities of separate volume elements exploiting the principles of proton nuclear magnetic resonance (NMR). The signal intensities depend on intrinsic factors that are based on the composition of a certain tissue and on extrinsic factors that are determined by instrument and measurement parameters. MRI contrast agents (CA) influence the intrinsic characteristics of a tissue by interacting with surrounding protons. Their efficacy is expressed by their r_1 and r_2 relaxivities, which describe their capability to shorten the T1 and T2 relaxation times of water protons, respectively. CAs are classified according to their chemical composition, their magnetic properties, their biodistribution and the resulting applications [1]. To date, most clinically used contrast agents are either water soluble gadolinium (Gd) complexes or iron oxide nanoparticles [2]. While iron oxide particles predominantly increase T2-relaxivity and thus provide negative contrast on T2-weighted images, gadolinium chelates are often used for T1-weighted scans as they accelerate T1-relaxation and thus cause positive contrast changes. The range of applications of low-molecular weight gadolinium complexes is determined by their pharmacokinetics. Upon intravenous application, they rapidly diffuse from the blood vessels to the interstitial fluids in all tissues, except for the brain. By contrast, high molecular weight or particulate contrast agents remain in the vascular system for a longer period, and may thus provide a longer imaging window and a more favorable signal-to-noise ratio for several applications, e.g. for blood pool imaging or the detection of capillary lesions. Thus, particulate CAs with the magnetic properties of gadolinium chelates are promising tools in contrast-enhanced MRI. Polymeric gadolinium complexes based on dextrans, polylysine derivatives, or dendrimers as

well as Gd-chelate grafted latex nanoparticles, liposomes, and micelles have been successfully employed [1,3,4]. Especially multifunctional CAs are demanded, because they might potentiate the informative value of medical examinations [5,6]. Multi-labeled particles might allow for combining the advantages of different diagnostic methods such as MRI, positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT), and computed tomography (CT), while targeted carriers should selectively highlight certain tissues depending on the respective biorecognitive interactions [7].

In the last years, poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) particles have aroused great interest as carriers of therapeutic agents [8,9]. The biocompatible and biodegradable PLGA is approved by the FDA for drug delivery purposes. Lipophilic drugs can be efficiently incorporated into the PLGA matrix [10] and even hydrophilic substances may be encapsulated by a double emulsion solvent evaporation technique. Moreover, the polymer may be functionalized either before or after particle formation with a broad range of different substances including ligands for active targeting. Innumerable combinations of incorporated drugs, labels and surface functionalization strategies are possible making PLGA particles a fascinating platform for the development of multifunctional devices. Concerning MRI, two different approaches have been tested so far. First, iron oxide nanoparticles have been successfully encapsulated into submicron PLGA particles for enhanced negative contrast [11,12]. Second, PLGA particles with encapsulated Gd-DTPA have been prepared aiming at enhanced positive contrast [13,14,15]. In the latter systems, hydrophilic low molecular weight gadolinium chelates were incorporated into the matrix of PLGA microspheres. Unfortunately, the contrast-generating chelates were rapidly released from the particles [15]. As premature release causes a severe deterioration of the contrast generating ability of the particles, this is highly unfavorable. However, the main drawback of the above encapsulation procedure is the restricted access of water to the PLGA-encapsulated gadolinium [13]. If water protons cannot

effectively interact with the paramagnetic gadolinium ions, the relaxivity r_1 will be strongly diminished.

Therefore, the present work aimed at an alternative gadolinium labeling procedure for the preparation of a high-relaxivity PLGA-based contrast agent. By contrast to the encapsulation approach, we herein report the immobilization of gadolinium chelates at the particle surface to enable unrestricted water access. Using different spacers, the two well-established chelators diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), respectively, were covalently coupled to the particle surface and subsequently loaded with gadolinium. The modified particles were characterized as to their gadolinium content and proton relaxivities, which are key factors in determining their applicability for contrast enhanced MRI.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Resomer RG503H (PLGA; 50:50 lactide/glycolide, inherent viscosity 0.32-0.44 dL g⁻¹, acid number > 3 mg KOH g⁻¹) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). DOTA-NHS-ester was obtained from Macrocyclics (Dallas, USA). Polyethyleneimine (PEI; branched, MW 1.2kDa) was purchased from Polysciences (Warrington, USA). Pluronic F68, 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), diethylenetriaminepentaacetic acid bisanhydride (DTPABA) and Gadolinium(III) chloride hexahydrate were bought from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). All other chemicals were of analytical purity.

2.2. Particle preparation

PLGA nanoparticles were prepared by an oil-in-water solvent evaporation technique as previously described [16]. Briefly, a solution of PLGA (400 mg) in ethyl acetate (2 g) was emulsified in an aqueous solution of 10% (w/w) Pluronic F68 (6 g) by sonication for 50 s (sonifier: Bandelin electronic UW 70/HD 70, tip: MS 72/D, Berlin, Germany). The resulting o/w-emulsion was poured into a solution of 1% (w/w) Pluronic (100 mL) and stirred for 1 h at room temperature and atmospheric pressure to allow for the evaporation of the organic solvent. Subsequently, residues of ethyl acetate were removed under reduced pressure. The resulting suspension was filtered (1 µm pore-size).

2.3. Covalent surface modification with DTPA via a 2-step procedure

The nanoparticle suspension (48 mL) was concentrated fourfold on a tangential flow filtration system (Vivaflow 50; 100 000 MWCO PES, Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany). EDAC (720 mg) and NHS (30 mg), each dissolved in distilled water

(1 mL), were added to the resulting concentrate (12 mL) and incubated for 2 h at room temperature. In order to remove excess coupling reagents, the suspension was washed by two cycles of diafiltration with 0.1% (w/w) Pluronic/PBS pH 7.3 (24 mL) and finally concentrated to 12 mL. In the first step, tetramethylene diamine (TMD; 53 mg; 600 μ mol), octamethylene diamine (OMD; 87 mg; 600 μ mol), or PEI (206 mg, 171.4 μ mol), dissolved in 0.1% (w/w) Pluronic/PBS pH 7.3 (1 mL), were added in order to immobilize the amines at the particle surface. After adjusting the pH to 8.5, the suspension was end-over-end incubated at room temperature overnight. Excess amine was removed by two cycles of dialysis (dialysis tubing cellulose membrane MWCO 12 000) against 0.1% (w/w) Pluronic/PBS pH 7.3 (500 mL). DTPABA (200 mg, 560 μ mol) was dispersed in dimethyl sulfoxide (DMSO; 400 μ L). While the pH of the nanoparticle suspension was kept between 8-9 with NaOH, the complexing agent was slowly added. The suspension was end-over-end incubated at room temperature overnight. Excess reagents were removed by dialysis against 0.1% Pluronic/0.1M Citrate/NaOH pH 8.0 (500 mL).

2.4. Covalent surface modification with DOTA-NHS via a 2-step procedure

A solution of DOTA-NHS (100 mg, 200 μ mol) in 0.1% (w/w) Pluronic/PBS pH 7.3 (1 mL) was added stepwise (100 μ L) to the purified amine-grafted nanospheres while the pH was repeatedly adjusted to 8.5 with 1M NaOH. Subsequently, the suspension was incubated and purified as described above.

2.5. Covalent surface modification with DOTA-NHS via a 1-step procedure

500 μ l of a freshly prepared aqueous solution of 100 mg mL⁻¹ DOTA-NHS (50 mg; 100 μ mol) was added to 500 μ l of an aqueous solution of 80 mg mL⁻¹ PEI (40 mg; 33 μ mol) and incubated end-over-end overnight at room temperature. PLGA nanoparticles were prepared and activated as described above. After removing excess EDAC and NHS, the (DOTA-PEI)-

conjugate was added to the suspension and incubated overnight at room temperature. Subsequently, the suspension was dialysed against 0.1% Pluronic/0.1 M Citrate/NaOH pH 8.0 (500 mL), and loaded with gadolinium.

2.6. Loading with gadolinium

Upon dissolution of gadolinium(III) chloride hexahydrate (743 mg, 2 mmol) and citric acid (1153 mg, 6 mmol) in water the pH was adjusted to 8.0 with NaOH and the volume was filled up to 10 mL. The resulting 0.2 M gadolinium/0.6 M citrate/NaOH pH 8.0 (10 mL) solution was added to the particle suspension. After end-over-end incubation for three days at room temperature, excess gadolinium was removed by eight cycles of dialysis (alternately for 8 and for 16 h each) against 0.1% (w/w) Pluronic/0.1 M citrate/NaOH pH 5 (500 mL; cycles 1-7) or 0.1% (w/w) Pluronic/0.1 M citrate/NaOH pH 7.4 (500 mL; cycle 8).

2.7. Determination of non-specific binding

In order to assess the extent of non-specific binding of gadolinium to PLGA nanoparticles and in order to evaluate the applied dialysis purification procedure, a fourfold concentrated nanoparticle suspension (12 mL) was dialysed against 0.1% Pluronic/0.1M Citrate/NaOH pH 8.0 (500 mL). Without any further modification, the particles were incubated with 0.2 M gadolinium/0.6M citrate/NaOH pH 8.0 (10 mL) for three days and then dialyzed as described above.

2.8. Particle size and zeta potential analysis

The mean particle size and the polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS). DLS and zeta potential analyses were performed using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). All measurements were performed in triplicate. For size

measurements, the samples were diluted 1:10 with PBS pH 7.3. For zeta potential analysis, the samples were diluted 1:50 with double distilled water.

2.9. Gadolinium quantification

The gadolinium loading of the NP and the gadolinium concentration in the dialysates were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) on an Optima 5300 DV (Perkin Elmer, Waltham, USA). The dialysis solutions were measured without further sample preparation. The modified nanoparticles were dissolved in nitric acid prior to analysis. Briefly, the particle suspension (1000 μ L) was hydrolyzed with concentrated nitric acid (65%; 3mL). Subsequently, the solvents were evaporated under a hood. Once again, the residues were dissolved in 3 mL of concentrated nitric acid and dried again. Upon addition of 6 M nitric acid (2 mL) the sample was filled up with water to a final volume of 10.0 mL. Rhodium was used as an internal standard. The detection limit was 0.02 mg L⁻¹ gadolinium (error \pm 10%).

2.10. Quantification of PLGA

Determination of the PLGA content in the particle suspension was performed using a modified derivatisation/HPLC protocol established in our lab [36]. In brief, an aliquot of particle suspension was subjected to alkaline hydrolysis under harsh conditions yielding the corresponding monoacids, followed by conversion to an ester derivative with enhanced UV absorption. Quantification was carried out on a RP-HPLC system (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a gradient flow elution protocol and detection at 254 nm. PLGA content was calculated by comparison to standard calibration curves.

2.11. Cryo-TEM

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) was performed on an FEI Tecnai 20, type Sphera TEM instrument equipped with a LaB6 filament operating at 200 kV. Images were recorded with a bottom-mounted 1k x 1k Gatan CCD camera. A Gatan cryoholder operating at ~ -170 °C was used for the cryo-TEM measurements. The sample vitrification procedure was carried out using an automated vitrification robot (FEI Vitrobot Mark III). TEM grids, R2/2 Quantifoil Jena grids, were purchased from Aurion. The Quantifoil grids were surface plasma treated using a Cressington 208 carbon coater operating at 5 mA for 40 s prior to the vitrification procedure.

2.12. Determination of the relaxivity

Longitudinal and transverse relaxation time measurements were performed using a Bruker Minispec mq60. Longitudinal relaxation rates ($R1 = 1/T1$) at 60 MHz (1.41 T) and 25°C or 37°C were determined using an inversion recovery sequence. Ten inversion times ranging from 5 ms to at least 5 times the T1 of the solution in an exponential fashion were used. The relaxation delay was set to at least 5 times the T1 of the solution and the number of averages was 4. T1 was obtained from a mono-exponential fit. Transverse relaxation rates ($R2 = 1/T2$) at 60 MHz and 25°C or 37°C were measured using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence. Acquisition parameters were: echo spacing = 1 ms, number of echoes = 1024, number of averages = 16, and recycle delay = 1 s. T2 was obtained from a mono-exponential fit of signal intensity as function of echo time. Relaxivity $r1$ and $r2$ were determined by linear fits of R1 and R2 versus [Gd] using at least 4 concentrations.

2.13. Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion (NMRD)

^1H NMRD profiles were measured on a Stellar Spinmaster FFC-2000 fast-field cycling relaxometer (Mede, Italy) in a magnetic field range from 2.4×10^{-4} to 1.6 T (corresponding to 0.01-70 MHz of proton Larmor frequencies). The T1 relaxation times were acquired by the

standard inversion recovery method with typical 90° pulse width of $3.5 \mu\text{s}$, using 16 experiments of 4 scans each. The T1 reproducibility was within 5%. The temperature was controlled with a Stellar VTC-91 airflow heater equipped with a calibrated copper constantan thermocouple (precision of $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$). Measurements were performed at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (room temperature) and $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (physiological temperature). The NMRD profiles were analyzed according to the Solomon-Bloembergen-Morgan equations modified according to the Lipari-Szabo model free approach [18]. In line with previous reports [19], the water exchange correlation time (τ_m), the number of coordinating water molecules (q), the water proton - paramagnetic center distance (r), the distance of closest approach (a) and the diffusion coefficient (D) were kept constant at $\tau_m = 250 \text{ ns}$, $q = 1$, $r = 3.1 \text{ \AA}$, $a = 3.8 \text{ \AA}$ and $D = 2.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The global and local rotational correlation times (global and local τ_r), the correlation time for electronic relaxation (τ_v), the order parameter (S^2) and the square of the transient of the zero field splitting of the electronic spin states (Δ^2) were allowed to vary.

3. Results and Discussion

3.1. Influence of different spacers on size and zeta potential

To introduce primary amines necessary for the conjugation of DTPA bisanhydride or DOTA-NHS, the PLGA carboxylate groups at the nanoparticle surface were covalently coupled with three different spacers (Scheme 1). For this, tetramethylene diamine (TMD) and octamethylene diamine (OMD) were chosen. They differ in length and hydrophobicity, which was supposed to influence their interaction with the rather hydrophobic particle surface as well as the accessibility of the introduced amine group for further modification. The third tested spacer was a branched polyethyleneimine (PEI) containing multiple primary, secondary, and tertiary amine groups. For this purpose, a low molecular weight PEI (MW 1.2 kDa) was chosen to enable purification via dialysis.

The mean particle size, size distribution and zeta potential of the PLGA-NP were measured before and after surface modification (Table1). While the plain particles had a mean diameter of 170 nm, the size of the Gd-labeled particles amounted to about 150 to 170 nm except for Gd-DOTA-PEI-NP, which had a mean diameter of nearly 200 nm. Although DLS analyses were performed upon 1:10 dilution, the respective Pluronic F68 amount in the suspension influenced the calculated hydrodynamic diameter by contributing to the sample viscosity and by adsorption to the particle surface. Considering the higher sample viscosity of the unmodified particle suspension (~ 1.065 mPas) in the Stokes-Einstein equation, the corrected particle size of unmodified particles amounted to ~ 160 nm [20]. However, the main finding is that all of the presented particle suspensions had a narrow size distribution. All PDI values were well below 0.15, which points to favorable stability throughout the modification procedure.

Due to the low glass transition temperature of PLGA (~ 40°C) electron microscopic evaluation of PLGA particles is a tedious task. Cryo-TEM is often the only method to evaluate

the exact morphology of nanoparticles and therefore also a valuable tool when studying PLGA-based nanoparticle systems. Figure 1 shows representative cryoTEM images of the different formulations of PLGA-DOTA nanoparticles. The PLGA-DOTA nanoparticle formulation and preparation method resulted in the formation of spherical particles. The morphology of the PLGA nanoparticle was very similar to that described in the literature [21]. Cryo-TEM images showed relatively uniform PLGA nanoparticles, and little aggregation. This confirmed the DLS finding that the PLGA particles are sufficiently sterically stabilized by the Pluronic coating to prevent extensive aggregation after preparation.

The unmodified nanoparticles were highly stable due to the PLGA carboxylates exposed on their surface that led to a zeta potential of -47 mV in distilled water (Table 1). As the modified particles were dispersed in a citrate solution at pH 7.4, the samples still had a rather high conductivity of 0.6 mS cm^{-1} upon 1:50 dilution with distilled water. This biases the measured zeta potential values. However, while the Gd-chelate-TMD-NPs and Gd-chelate -OMD-NPs had a clearly negative surface charge as represented by a zeta potential of about -35 mV, Gd-chelate-PEI-NPs were only slightly negative with values ranging from -5 to -11 mV. Altogether, the introduction of the spacers resulted in a shift of the zeta potential towards positive values (data not shown). As expected, this effect was most pronounced in case of PEI, which does not only introduce multiple primary amines, but additionally contains strongly alkaline secondary and weakly alkaline tertiary amines. Upon introduction of the strongly acidic chelators and the use of citrate, the zeta potential of the Gd-labeled particles was shifted again to the negative range.

3.2. Influence of different spacers and coupling procedures on the gadolinium loading capacity

The spacer-modified PLGA nanoparticles were further conjugated with either DTPA bisanhydride via the cyclic dianhydride method or with DOTA-NHS active ester. It should be

stressed that upon replacement of one of the DOTA carboxylate groups by another side chain the resulting derivative may also be referred to as DO3A. The ligand-coupled particles were then incubated with gadolinium citrate to allow an exchange of the lanthanide ion from the very weak chelator citrate to the strong complexing agents at the particle surface. To remove all the gadolinium that had not been complexed by DTPA or DOTA, the suspension was purified by extensive dialysis against sodium citrate solution. The gadolinium content of the modified particles was quantified via ICP-OES analysis and related to the PLGA content of the purified suspensions (Table 1). The variations in the PLGA concentrations as determined by HPLC were primarily due to a different degree of dilution in the course of dialysis (Table 2).

With both types of chelator, the diamine spacers resulted in very low amounts of particle-associated gadolinium of only 0.2 to 1.3 μg per mg PLGA. By contrast, branched PEI enabled very high gadolinium loads. The maximum was achieved with 236 μg gadolinium per mg PLGA for DTPA-PEI-conjugated PLGA-NPs, while Gd-DOTA-PEI-NP contained up to 150 $\mu\text{g mg}^{-1}$. These favorable results might be mainly attributed to two factors. First of all, the applied PEI contains seven primary amines per molecule on average. Upon surface-conjugation of PEI via one of these groups, up to six potential binding sites for the chelators are still available multiplying the number of potential binding sites. However, as the differences between the diamines, which offer only one remaining amine group upon surface-conjugation, and the applied PEI are by far more pronounced, strongly different coupling efficiencies may be expected. For amine coupling to the activated PLGA carboxylates, similar concentrations of primary amine groups were used (1200 μmol per batch), corresponding to 600 μmol of the diamines or 171.4 μmol of PEI. Nevertheless, the strongly positive charge of PEI might have caused an electrostatic interaction with the particle surface. The higher local concentration of PEI might thus have enabled a higher coupling efficiency. Additionally, the alkaline microclimate of PEI might have enforced the nucleophilic character of the reactive

amines. Furthermore, it may not be ruled out that in addition to the covalently bound PEI a certain degree of binding might be based on electrostatic interactions. A similar mechanism has been widely studied for gene delivery purposes, where polycations such as PEI are adsorbed onto the particle surface via ionic interactions to allow for the immobilization of negatively charged DNA [22].

Besides the discussed 2-step procedure for sequential coupling of PEI to the PLGA-NPs and DOTA to PEI-modified NPs, a slightly modified 1-step alternative was tested, which should be less time-consuming as several purification steps can be omitted. At this, DOTA-NHS was first allowed to react with PEI, and subsequently the (DOTA-PEI)-conjugate was directly grafted onto PLGA-NPs using carbodiimide chemistry. However, this way only one third of the gadolinium amount could be immobilized as compared to the 2-step procedure. A maximum of chelating ligands should be conjugated to PEI, but at the same time a sufficient number of primary amines has to remain free for subsequent grafting to the PLGA-NPs. Moreover, these remaining amines must not be sterically hindered from interacting with the particle surface. Thus, the 2-step procedure seems to be preferable.

3.3. Evaluation of the purification procedure to remove free Gd^{3+}

Most gadolinium salts are poorly soluble. To provide Gd^{3+} for the chelation by surface-immobilized ligands, it was thus necessary to prepare a solution of weakly complexed gadolinium allowing for an exchange with the stronger ligands. For this purpose, the method described by Jaszberenyi et al. for the loading of DOTA-modified PAMAM dendrimers with gadolinium citrate was adopted [23]. Subsequently, excess gadolinium was removed by extensive dialysis against citrate solution to keep it in a soluble form and prevent the precipitation of insoluble $Gd(OH)_3$. As free Gd^{3+} ions are highly toxic, their complete elimination is essential. Thus, the dialysis solutions were monitored concerning their gadolinium content via ICP-OES analysis (Figure 2).

To detect a possible non-specific interaction of free gadolinium or gadolinium citrate with plain PLGA nanoparticles, unmodified particles were incubated with gadolinium citrate solution and then purified via dialysis similar to the surface-modified suspensions. After five cycles of dialysis, the gadolinium concentration in the dialysis solutions was below the detection limit of the ICP-OES method. Moreover, the gadolinium content of the purified PLGA nanoparticles was also below the detection limit, which confirms the efficiency of the applied purification procedure. For the dialysis solutions obtained during purification of surface-functionalized particles, the main portion of unbound gadolinium was eliminated in the first two purification steps. After the fourth step, only trace amounts of gadolinium were released. Aiming at sufficient purification, some further four cycles were performed. Hereby, trace amounts of gadolinium were also found in the latter dialysates. This might be explained by some release of surface-immobilized Gd-chelate-spacer conjugates with or without PLGA residues due to beginning degradation of the NPs during the long-lasting dialysis (8-16 h per cycle). Unfortunately, ICP-OES cannot distinguish between free and chelated gadolinium, and a spectrophotometric assay for the determination of free Gd^{3+} based on the complexometric indicator xylenol orange was not applicable due to the presence of amines and citrate in the dialysates [24]. However, as long as gadolinium is not released from its chelator, it is considered non-toxic. Similar considerations are also necessary regarding systemic administration. One of the most essential requirements for a successful CA is efficient elimination. Hydrophilic low-molecular weight gadolinium chelates are known to be quickly excreted via renal elimination. However, glomerular filtration has an upper size limit of ~ 40 kDa. As PLGA is fully biodegradable, the size of the remaining conjugates of one PEI molecule and up to six Gd-chelates should not exceed ~ 5 kDa, which is far below the filtration limit [1].

3.4. DTPA versus DOTA

For gadolinium-based contrast agents, toxicological considerations are crucial. Gd^{3+} ions may interfere with calcium-dependent processes [25], form insoluble $Gd(OH)_3$ that may accumulate in bones, liver and spleen [1], and they have been related to the pathogenesis of nephrogenic systemic fibrosis (NSF) [26]. However, in spite of millions of applications per year, adverse effects are very rare and essentially restricted to patients with severely impaired renal function.

The first contrast agent approved for in vivo use was Gd-DTPA (Gadopentate dimeglumine; Magnevist[®]), which is still among the most frequently applied CAs [27]. Macrocyclic ligands such as DOTA and DO3A have an even higher thermodynamic and kinetic stability than the linear ligands. For Gd^{3+} to be released from a macrocyclic chelate five to six coordination sites would have to be broken simultaneously and thus they are remarkably stable [26]. Therefore, DTPA and DOTA representing the two most popular ligands also for clinical use were chosen for the present study. With regard to the gadolinium load, Gd-DTPA-PEI-NPs contained the highest amounts with up to $236 \mu\text{g mg}^{-1}$ (Table 2). However, for some applications the even more stable DOTA chelates might be preferred. The present results demonstrate the feasibility of both modification strategies. While for gadolinium both types of chelating ligands should be applicable, the additional choice between linear and macrocyclic ligands might in the future also enable the immobilization of other ions, e.g. for PET.

3.5. Relaxivity measurements

PLGA content, Gd content and MRI relaxation properties of the modified PLGA nanoparticles are shown in Table 2. In general the longitudinal relaxivity r_1 of the Gd-DOTA-PEI-NPs normalized to the Gd content was higher than that of Gd-DTPA-PEI-NPs. The transverse relaxivity r_2 was only moderately higher than the longitudinal relaxivity for all formulations, resulting in r_2/r_1 ratios between 1.1 and 1.3, making all the formulations presented in Table 2 excellently suited to provide positive contrast on T1 weighted MR

images. The Gd to PLGA content ratio was highest for the Gd-DTPA-PEI-NPs (up to $\sim 236 \mu\text{g mg}^{-1}$), while this ratio was lowest for the one step modified Gd-(DOTA-PEI)-NPs (51 and $57 \mu\text{g mg}^{-1}$). Nevertheless, for all nanoparticles the Gd content was sufficiently high to prove them powerful MR contrast agents. On the other hand, Gd-DTPA-TMD-NPs, Gd-DTPA-OMD-NPs, Gd-DOTA-TMD-NPs, and Gd-DOTA-OMD-NPs displayed a very low Gd to PLGA content ratio ($< 1 \mu\text{g mg}^{-1}$), rendering them essentially unsuitable for MRI purposes.

The high relaxivity r_1 observed for the Gd-chelates incorporated in the PLGA nanoparticles is supposed to primarily originate from an increased rotational correlation time associated with the slower rotation of a larger nanoparticle in solution [27]. Both r_1 and r_2 relaxivity decreased with increasing temperature (Table 2), which indicates that water access is not a limiting factor for the relaxivity. We therefore think that the here-used PEI spacer was effective in exposing the Gd-chelates to water surrounding the nanoparticles. The beneficial effect of such a spacer on relaxivity has also been previously reported by Winter et al. [28,29].

To gain further insights into the mechanisms of longitudinal relaxivity, the r_1 of Gd-DOTA-PEI-NP1 was recorded at 25°C and 37°C as function of resonance frequency resulting in a so-called Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion (NMRD) profile (Figure 3) [30]. The data are characterized by a relaxivity maximum centered around 40 MHz which is typical for Gd complexes with a restricted rotational motion [31]. A detailed analysis of the NMRD profiles was performed by fitting the high field portion of the profile [32], using the classical Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) model extended with the Lipari-Szabo formalism in order to take into account the occurrence of fast local motions of the paramagnetic chelate (correlated to the presence of the flexible spacer) concurrent to the slower rotational motion of the PLGA nanoparticles as a whole [33]. Temperature-dependent

parameters were assumed to follow the Arrhenius law and are therefore described by activation energies.

The structural and dynamic parameters were obtained from the simultaneous best fitting of the two NMRD profiles at 25 °C and 37 °C. It is beyond the scope of this paper to discuss all the parameters in detail, but for completeness and future reference they are listed in Table 3. The correlation time of local motion is approximately one order of magnitude smaller than the global rotational correlation time of the system, whereas the value of the order parameter S2 indicates a good coupling between the two motions. Order parameter S2 is higher than reported for Gd complexes attached to dendrimers [34,35], micelles [36], and inorganic nanoparticles [37] and only slightly smaller than for a Mn(II)-based metal complex non covalently bound to serum albumin [32]. The residence lifetime for the coordinated water is just below the microsecond, as previously observed for several macrocyclic DOTA-monoamide derivatives [38,39]. In summary, the parameters obtained are consistent with those expected for a macrocyclic DOTA-like chelate non-rigidly linked to a nanoparticle and therefore fully in line with the structure of the PLGA nanoparticles that is schematically displayed in scheme 1.

4. Conclusions

In summary, biodegradable PLGA nanospheres have been successfully labeled with gadolinium chelates for contrast enhancement in MRI. Aided by three different types of spacers the two important chelating ligands DTPA and DOTA, respectively, were covalently coupled to the particle surface and loaded with the Gd^{3+} . The modified nanoparticles were of spherical shape with mean diameters of 150 - 200 nm and narrow size distributions as determined by DLS and cryo-TEM. By contrast to the tested linear diamine spacers, branched polyethyleneimine enabled the immobilization of high amounts of gadolinium at the particle surface. ICP-OES analysis of the gadolinium content and HPLC examination of the PLGA content revealed up to 150 μg gadolinium per mg PLGA for Gd-DOTA-PEI-modified particles and even 236 $\mu g\ mg^{-1}$ for Gd-DTPA-PEI-modified particles. The particles were characterized by high relaxivities of up to 17.5 $mM^{-1}s^{-1}$ at 25°C and 1.41 T for Gd-DOTA-PEI-PLGA-NPs, rendering them powerful T1 lowering contrast agents. Nuclear magnetic relaxation dispersion profiles confirmed that the Gd-chelates are non-rigidly linked to the exterior of the nanoparticle.

By combining the present approach with existing strategies for the encapsulation of drugs or labels and for surface modification, multifunctional PLGA carriers might be designed that include multilabeled particles for simultaneous imaging with different imaging modalities as well as targeted contrast agents for site-specific imaging. Moreover, similar strategies might be adopted for the immobilization of radioactive ions for PET. Thus, new and refined diagnostic insights might become reality.

Acknowledgements

Part of this work was funded by the European Commission FP6-projects MediTrans (project number NMP4-CT-2006-026668) and DiMI (project number LSHB-CT-2005-512146). Parts of these studies were performed in the framework of the European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research (COST) D38 Action Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications.

References

- [1] Geraldес CFGC, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol Imaging* 2009;4:1-23.
- [2] Yan G-P, Robinson L, Hogg P. Magnetic resonance imaging contrast agents: overview and perspectives. *Radiography* 2007;13:e5-e19.
- [3] Paschkunova-Martic I, Kremser C, Mistlberger K, Shcherbakova N, Dietrich H, Talasz H, et al. Design, synthesis, physical and chemical characterisation, and biological interactions of lectin-targeted latex nanoparticles bearing Gd-DTPA chelates: an exploration of magnetic resonance molecular imaging (MRMI). *Histochem Cell Biol* 2005;123:283-301.
- [4] Mulder WJM, Strijkers GJ, Tilborg GAF, Griffioen AW, Nicolay K. Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. *NMR Biomed* 2006;19:142-64.
- [5] Vlerken LE, Amiji MM. Multifunctional polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2006;3(2):205-16.
- [6] Sosnovik DE, Weissleder R. Emerging concepts in molecular MRI. *Curr Opin Biotech* 2007;18:4-10.
- [7] Strijkers GJ, Mulder WJM, Tilborg GAF, Nicolay K. MRI contrast agents: current status and future perspectives. *Anti-cancer Agents Med Chem* 2007;7(3):291-305.
- [8] Bala I, Hariharan S, Kumar MNVR. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Therap Drug Carrier Syst* 2004;21(5):387-422.
- [9] Ratzinger G, Fillafer C, Kerleta V, Wirth M, Gabor F. The role of surface functionalization in the design of PLGA micro- and nanoparticles. *Crit Rev Ther Drug Carrier Sys* 2010, In Press.

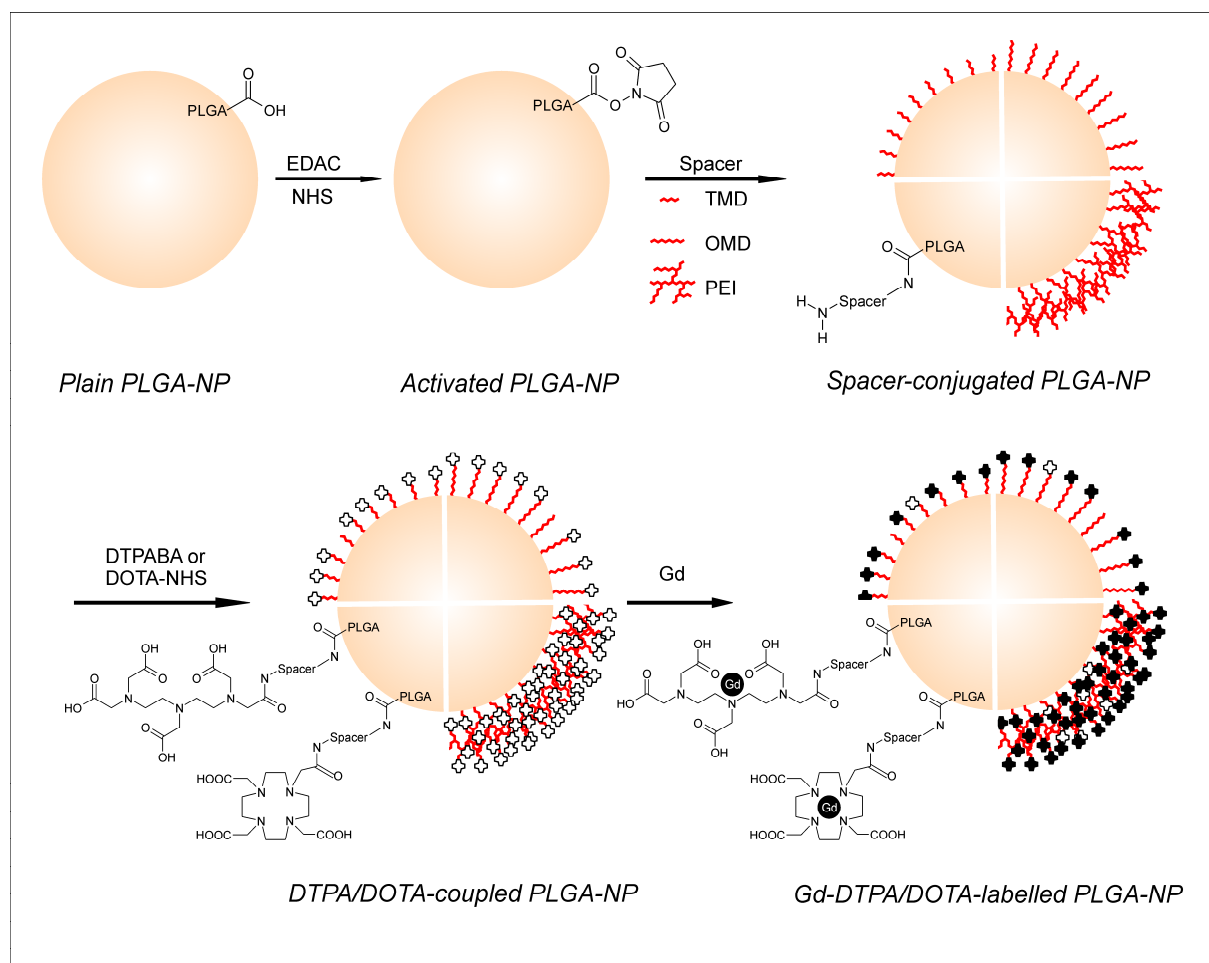
- [10] Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm* 2008;364:298-327.
- [11] Lee SJ, Jeong J-R, Shin S-C, Kim J-C, Chang Y-H, Chang Y-M, et al. Nanoparticles of magnetic ferric oxides encapsulated with PLGA and their application as MRI contrast agent. *J Magnetism Magn Mat* 2004;272-76:2432-33.
- [12] Wang Y, Ng YW, Chen Y, Shuter B, Yi J, Ding J, et al. Formulation of superparamagnetic iron oxides by nanoparticles of biodegradable polymers for magnetic resonance Imaging. *Adv Funct Mat* 2008;18(2):308-18.
- [13] Faranesh AZ, Nastley MT, Perez de la Cruz C, Haller MF, Laquerriere P, Leong KW, et al. In vitro release of vascular endothelial growth factor from gadolinium-doped biodegradable microspheres. *Magn Reson Med* 2004;51:1265-71.
- [14] Chen HH, Le Visage C, Qiu B, Du X, Ouwerkerk R, Leong KW, et al. MR imaging of biodegradable polymeric microparticles: A potential method of monitoring local drug delivery. *Magn Reson Med* 2005;53(3):614-20.
- [15] Doiron AL, Chu K, Ali A, Brannon-Peppas L. Preparation and initial characterization of biodegradable particles containing gadolinium-DTPA contrast agent for enhanced MRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(45):17232-7.
- [16] Fillafer C, Friedl DS, Wirth M, Gabor F. Fluorescent bionanoprobes to characterize cytoadhesion and cytoinvasion. *Small* 2008;4(5):627-33.
- [17] Ratzinger G, Länger U, Neutsch L, Pittner F, Wirth M, Gabor F. Surface Modification of PLGA Particles: The interplay between stabilizer, ligand size, and hydrophobic interactions. *Langmuir* 2010;26(3):1855-1859.
- [18] Rudovsky J, Botta M, Hermann P, Hardcastle KI, Lukes I, Aime S. PAMAM dendrimeric conjugates with a Gd-DOTA phosphinate derivative and their adducts with polyaminoacids: The interplay of global motion, internal rotation, and fast water exchange. *Bioconjugate Chem* 2006;17:975-87.

- [19] Aime S, Botta M, Cravotto G, Frullano L, Giovenzana GB, Crich SG, et al. Gadolinium(III) complexes of dota-derived N-sulfonylacetamides (H₄(dota-NHSO₂R)=10-{2-[(R)sulfonylamino]-2-oxoethyl}-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid): A new class of relaxation agents for magnetic resonance imaging applications. *Helv Chim Acta* 2005;88:588-603.
- [20] Fillafer C, Wirth M, Gabor F. Stabilizer-induced viscosity alteration biases nanoparticle sizing via dynamic light scattering. *Langmuir* 2007;23:8699-702.
- [21] Cai C, Bakowsky U, Rytting E, Schaper AK, Kissel T. Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:31-42.
- [22] Trimaille T, Pichot C, Delair T. Surface functionalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2003;221:39-48.
- [23] Jaszberenyi Z, Moriggi L, Schmidt P, Weidensteiner C, Kneuer R, Merbach AE, et al. Physicochemical and MRI characterization of Gd³⁺-loaded polyamidoamine and hyperbranched dendrimers. *J Biol Inorg Chem* 2007;12:406-20.
- [24] Barge A, Cravotto G, Gianolio E, Fedeli F. How to determine free Gd and free Ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Med Mol Imaging* 2006;1:184-8.
- [25] Idee J-M, Port M, Raynal I, Schaefer M, Le Greneur S, Corot C. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol* 2006;20:563-76.
- [26] Morcos SK. Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability. *Eur J Radiol* 2008;66:175-9.
- [27] Laurent S, Elst LV, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI Paramagnetic Contrast Media. A Proton Relaxometric Protocol for Transmetallation Assessment. *Investig Radiol* 2001;36(2):115-22.

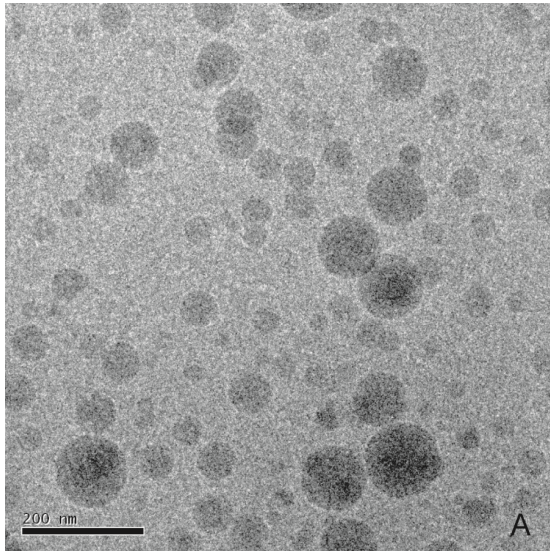
- [28] Winter PM, Athey P, Kiefer G, Gulyas G, Frank K, Fuhrhop R, et al. Improved paramagnetic chelate for molecular imaging with MRI. *J Magn Magn Mater* 2005;293(1):540–5.
- [29] Winter PM, Caruthers SD, Yu X, Song SK, Chen J, Miller B, et al. Improved molecular imaging contrast agent for detection of human thrombus. *Magn Reson Med* 2003;50(2):411–6.
- [30] Aime S, Botta M, Terreno E. Gd(III)-based contrast agents for MRI. *Adv Inorg Chem* 2005;57:173-237.
- [31] Caravan P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem Soc Rev* 2006;35:512-23.
- [32] Troughton JS, Greenfield MT, Greenwood JM, Dumas S, Wiethoff AJ, Wang J, et al. Synthesis and evaluation of a high relaxivity manganese(II)-based MRI contrast agent. *Inorg Chem* 2004;43:6313-23.
- [33] Toth E, Helm L, Merbach AE. Relaxivity of MRI contrast agents. *Top Curr Chem* 2002;221:61-101.
- [34] Laus S, Sour A, Ruloff R, Toth E, Merbach AE. Rotational dynamics account for pH-dependent relaxivities of PAMAM dendrimeric, Gd-based potential MRI contrast agents. *Chem Eur J* 2005;11:3064-76.
- [35] Torres S, Martins JA, Andre JP, Geraldés CFGC, Merbach AE, Toth E. Supramolecular assembly of an amphiphilic Gd(III) chelate: tuning the reorientational correlation time and the water exchange rate. *Chem Eur J* 2006;12:940-8.
- [36] Carniato F, Tei L, Dastru W, Marchese L, Botta M. Relaxivity modulation in Gd-functionalised mesoporous silicas. *Chem Commun* 2009;10:1246-8.
- [37] Lee TM, Cheng TH, Ou MH, Chang CA, Liu GC, Wang YM. Physicochemical characterization of the dimeric lanthanide complexes $[\text{en}\{\text{Ln}(\text{DO3A})(\text{H}_2\text{O})\}_2]$ and

[$\pi\{\text{Ln}(\text{DTTA})(\text{H}_2\text{O})\}_2\text{]}^{2-}$: a variable-temperature ^{17}O NMR study. *Magn Reson Chem* 2004;42:329-36.

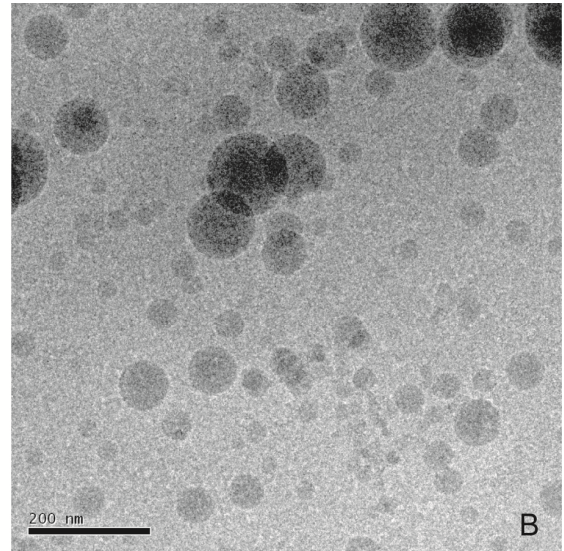
Schemes, Figures, and Tables



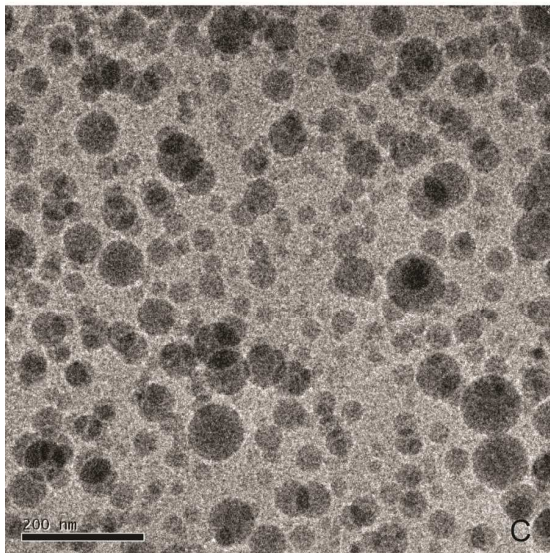
Scheme 1. Schematic representation of Gd-labeled PLGA nanoparticles.



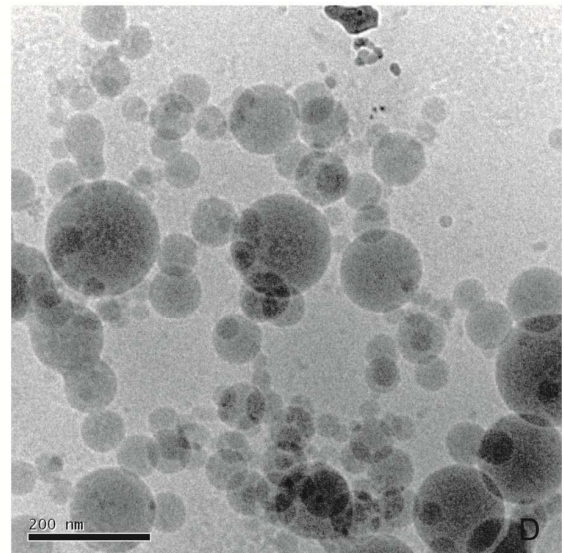
Gd-DOTA-TMD



Gd-DOTA-OMD



Gd-DOTA-PEI



Gd-(DOTA-PEI)

Figure 1. Cryo-TEM images of Gd-DOTA-modified PLGA nanoparticles.

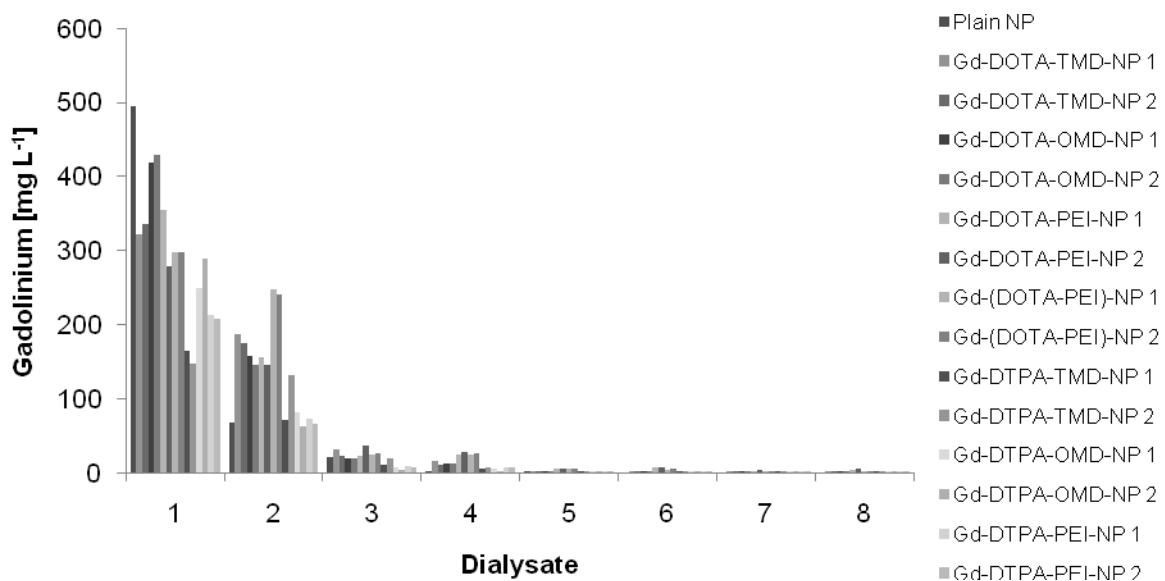


Figure 2. Evaluation of the purification procedure: Gadolinium content of the dialysates as determined by ICP-OES (detection limit 0.02 mg L^{-1}). Plain PLGA nanoparticles were incubated with Gadolinium citrate to examine non-specific binding.

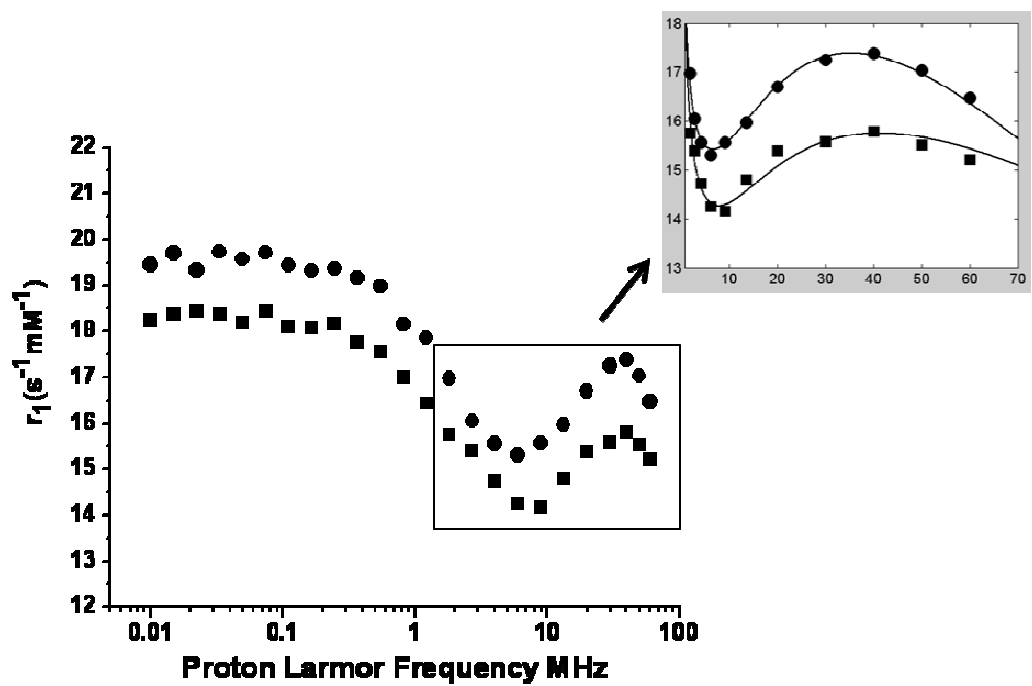


Figure 3. NMRD profiles registered at 25 °C (circles) and 37 °C (squares) for a suspension of Gd-DOTA-PEI-NP1 containing 1.64 mM of Gd(III) centers. The data were normalized to 1 mM of Gd(III). The inset displays the best curves obtained by fitting the high field (> 1 MHz) portion of the profile.

Table 1. Mean particle size and PDI of unmodified and Gd-labeled PLGA nanospheres; 1:10 dilution with PBS.

Zetapotential and conductivity; 1:50 dilution with water. Gadolinium content of the modified nanospheres.

| Modification | Spacer | Batch | Mean particle size [nm] | PDI | Zeta potential [mV] | Conductivity [mS cm ⁻¹] | Gd/PLGA [$\mu\text{g mg}^{-1}$] | |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| unmodified | | NP | 170.5 ± 4.4 | 0.142 ± 0.010 | -47.0 ± 0.0 | 0.006 ± 0.002 | - | |
| DTPA | linear, C ₄ | Gd-DTPA-TMD-NP 1 | 158.2 ± 2.6 | 0.086 ± 0.022 | -36.9 ± 0.7 | 0.556 ± 0.013 | 0.20 | |
| | linear, C ₄ | Gd-DTPA-TMD-NP 2 | 160.5 ± 1.0 | 0.111 ± 0.010 | -35.9 ± 1.9 | 0.560 ± 0.012 | 0.20 | |
| | linear, C ₈ | Gd-DTPA-OMD-NP 1 | 142.8 ± 10.0 | 0.124 ± 0.005 | -29.5 ± 0.3 | 0.578 ± 0.013 | 1.28 | |
| | linear, C ₈ | Gd-DTPA-OMD-NP 2 | 135.7 ± 3.1 | 0.130 ± 0.014 | -35.8 ± 0.9 | 0.743 ± 0.014 | 0.53 | |
| | branched | Gd-DTPA-PEI-NP 1 | 166.0 ± 2.9 | 0.118 ± 0.011 | -10.9 ± 0.9 | 0.625 ± 0.016 | 235.98 | |
| | branched | Gd-DTPA-PEI-NP 2 | 163.1 ± 3.5 | 0.124 ± 0.013 | -11.4 ± 0.6 | 0.587 ± 0.015 | 205.80 | |
| | | | | | | | | |
| DOTA | 2-step method | linear, C ₄ | Gd-DOTA-TMD-NP 1 | 158.8 ± 3.2 | 0.116 ± 0.016 | -36.4 ± 3.4 | 0.625 ± 0.017 | 0.41 |
| | | linear, C ₄ | Gd-DOTA-TMD-NP 2 | 151.9 ± 2.4 | 0.101 ± 0.004 | -35.9 ± 1.9 | 0.618 ± 0.012 | 0.30 |
| | | linear, C ₈ | Gd-DOTA-OMD-NP 1 | 158.9 ± 1.8 | 0.111 ± 0.014 | -32.5 ± 0.4 | 0.673 ± 0.011 | 0.84 |
| | | linear, C ₈ | Gd-DOTA-OMD-NP 2 | 157.4 ± 0.3 | 0.113 ± 0.006 | -33.5 ± 1.3 | 0.617 ± 0.019 | 1.00 |
| | | branched | Gd-DOTA-PEI-NP 1 | 199.5 ± 4.3 | 0.130 ± 0.013 | -5.3 ± 0.0 | 0.624 ± 0.015 | 149.91 |
| | | branched | Gd-DOTA-PEI-NP 2 | 199.6 ± 2.7 | 0.116 ± 0.004 | -7.9 ± 0.1 | 0.631 ± 0.004 | 146.86 |
| | 1-step method | Branched | Gd-(DOTA-PEI)-NP 1 | 153.3 ± 1.0 | 0.095 ± 0.024 | -7.1 ± 0.4 | 0.579 ± 0.012 | 51.14 |
| | | Branched | Gd-(DOTA-PEI)-NP 2 | 161.7 ± 1.7 | 0.089 ± 0.024 | -7.4 ± 0.7 | 0.624 ± 0.010 | 56.68 |

Table 2. PLGA content, Gd content, and relaxation properties at 1.41 T (60 MHz) of the Gd-labeled PLGA nanospheres.

| Batch | PLGA [mg mL ⁻¹] | Gd [μg mL ⁻¹] | Gd [mM] | Gd/PLGA [μg/mg] | r1 @ 25°C [mM ⁻¹ s ⁻¹] | r1 @ 37°C [mM ⁻¹ s ⁻¹] | r2 @ 25°C [mM ⁻¹ s ⁻¹] | r2 @ 37°C [mM ⁻¹ s ⁻¹] | r2/r1 @ 25°C | r2/r1 @ 37°C |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|------------|--------------------|--|--|--|--|--------------|--------------|
| Gd-DTPA-PEI-NP 1 | 1.06 | 250.1 | 1.59 | 236.0 | 12.9 | 11.9 | 14.3 | 15.4 | 1.1 | 1.3 |
| Gd-DTPA-PEI-NP 2 | 1.25 | 257.3 | 1.64 | 205.8 | 17.3 | 16.0 | 19.1 | 20.8 | 1.1 | 1.3 |
| | | | | | | | | | | |
| Gd-DOTA-PEI-NP 1 | 1.72 | 257.9 | 1.64 | 149.9 | 17.5 | 16.0 | 21.3 | 19.4 | 1.2 | 1.2 |
| Gd-DOTA-PEI-NP 2 | 1.88 | 276.1 | 1.76 | 146.9 | 17.0 | 15.6 | 20.5 | 18.6 | 1.2 | 1.2 |
| Gd-(DOTA-PEI)-NP 1 | 2.70 | 138.1 | 0.88 | 51.1 | 15.1 | 15.0 | 18.4 | 17.3 | 1.2 | 1.2 |
| Gd-(DOTA-PEI)-NP 2 | 2.79 | 158.1 | 1.01 | 56.7 | 15.6 | 14.6 | 18.6 | 17.4 | 1.2 | 1.2 |

Table 3. Structural and dynamic parameters obtained from fittings of the NMRD profiles of Gd-DOTA-PEI-PLGA-NP1.

| Parameter | Symbol | Value@25°C |
|--|--|-----------------|
| Mean square zero-field-splitting (ZFS) energy | $\Delta^2 \times 10^{19} [\text{s}^{-2}]$ | 0.81 ± 0.07 |
| ZFS correlation time | $\tau_V [\text{ps}]$ | 11.8 ± 1.7 |
| ZFS activation energy | $E_V [\text{kJ mol}^{-1}]$ | 0.4 ± 0.3 |
| Local rotational correlation time | $\tau_{R \text{ loc}} [\text{ps}]$ | 166 ± 27.1 |
| Local rotation activation energy | $E_{R \text{ loc}} [\text{kJ mol}^{-1}]$ | 8.6 ± 1.9 |
| Global rotational correlation time | $\tau_{R \text{ glob}} [\text{ns}]$ | 1.95 ± 0.5 |
| Global rotation activation energy | $E_{R \text{ glob}} [\text{kJ mol}^{-1}]$ | 4.6 ± 2.0 |
| Square of order parameter describing degree of spatial restriction of motion | S^2 | 0.64 ± 0.15 |
| Residence lifetime of coordinated water | $\tau_M [\text{ns}]$ | 712 ± 153 |
| Activation energy for exchange of coordinated water | $E_M [\text{kJ mol}^{-1}]$ | 2.4 ± 0.7 |
| Water proton - paramagnetic center distance | $r [\text{Å}]$ | 2.96 ± 0.01 |
| Distance of closest approach | $a [\text{Å}]$ | 3.69 ± 0.07 |
| Water diffusion constant | $D \times 10^{-5} [\text{cm}^2 \text{s}^{-1}]$ | 2.14 ± 0.04 |
| Activation energy for water diffusion | $E_D [\text{kJ mol}^{-1}]$ | 0.6 ± 0.4 |

Running Headline

PLGA-based Contrast Agent for MRI