

Multifunktionelle Poly(organosiloxan)- Nanopartikel als Modellsystem für biomedizinische Anwendungen

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Olga Koshkina
aus Moskau

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Arne Thomas
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Maskos
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Gradzielski

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. Februar 2014

Berlin 2014

*IF WE KNEW WHAT IT WAS WE WERE DOING,
IT WOULD NOT BE CALLED RESEARCH, WOULD IT?*

Albert Einstein

Kurzfassungen

Multifunctional Poly(organosiloxane) Nanoparticles as a Model System for Biomedical Applications

Polymeric nanomaterials offer a wide range of biomedical applications especially in the fields of drug delivery and cancer research. However, suitable model systems are still required to gain deeper knowledge of interactions of nanoparticles with biological systems. This study reports on the synthesis and characterization of multifunctional, fluorescent poly(organosiloxane) core-shell nanoparticles with tunable surface properties.

The core-shell approach allows the independent functionalization of different compartments. Thus, rhodamine b-labeled monomer was efficiently incorporated into the core during polycondensation. By introduction of charged groups on the surface, electrostatic stabilization of the particles was achieved. Alternatively, grafting of polymers (e.g. thermo-responsive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) or poly(ethylene glycol)) leads to sterically stabilized, biocompatible nanoparticles. Finally biotin was introduced on the surface allowing the immobilization of further ligands such as antibodies or enzymes on the particle's surface.

The nanoparticles were characterized by electron microscopy, multi-angle dynamic light scattering (DLS), asymmetrical flow field-flow fractionation (AF-FFF) and zeta potential measurements. The spectroscopic properties were studied by fluorescence spectroscopy, including the determination of absolute fluorescence quantum yields.

Due to their modular structure and the variety of possible functionalizations, the poly(organosiloxane) system is suitable for diverse biomedical applications, e.g. imaging methods, specific targeting and drug delivery. The cellular uptake of nanoparticles *in vivo* is often determined by the formation of a protein corona. Therefore, the behavior of nanoparticles with different surface characteristics was compared under physiological conditions and in presence of serum proteins using DLS and AF-FFF.

Besides the synthesis and the physico-chemical characterization, cell experiments are performed where nanoparticles are applied to lung tissue models. These experiments demonstrate differences in the uptake behavior of electrostatically and sterically stabilized nanoparticles.

Multifunktionelle Poly(organosiloxan)-Nanopartikel als Modellsystem für biomedizinische Anwendungen

Polymere Nanomaterialien finden bereits ein sehr breites Anwendungsspektrum in der Biomedizin, speziell in Bereichen des Wirkstofftransports und der Krebsforschung. Dennoch ist die Synthese geeigneter Modellsysteme für ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit biologischen Systemen notwendig. Diese Studie berichtet über die Synthese und Charakterisierung multifunktionaler, fluoreszenzmarkierter Poly(organosiloxan)-Kern-Schale-Nanopartikel mit veränderbaren Oberflächeneigenschaften.

Die Kern-Schale-Architektur erlaubt eine unabhängige Funktionalisierung unterschiedlicher Partikelkompartimente. So wurde der Kern der Partikel während der Polykondensation mit Rhodamin B-Monomer markiert. Durch Einführung geladener Gruppen in der Partikelschale wurden elektrostatisch stabilisierte Partikel erhalten. Alternativ führt das Aufpfropfen von Polymeren (thermorensitives Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) oder Poly(ethylenglykol)) auf die Oberfläche zu sterisch stabilisierten, biokompatiblen Nanopartikeln. Schließlich wurde Biotin an die Partikeloberfläche gekuppelt, um die Immobilisierung weiterer Liganden wie Antikörper oder Enzyme auf der Partikeloberfläche zu ermöglichen.

Die Nanopartikel wurden mittels Elektronenmikroskopie, winkelabhängiger dynamischer Lichtstreuung (DLS), asymmetrischer Fluss Feld-Fluss Fraktionierung (AF-FFF) und ζ -Potential-Messungen charakterisiert. Die spektroskopischen Eigenschaften wurden mit der Fluoreszenzspektroskopie untersucht, einschließlich der Bestimmung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten.

Auf Grund ihrer modularen Struktur und Vielfalt an möglichen Funktionalisierungen eignet sich das Poly(organosiloxan)-System für diverse biomedizinische Anwendungen, wie z. B. Abbildungsmethoden, spezifisches Targeting und Wirkstofftransport. Die zelluläre Aufnahme der Nanopartikel *in vivo* wird oft durch die Bildung einer Proteinkorona beeinflusst, deshalb wurde weiterhin das Verhalten unterschiedlich funktionalisierter Partikel unter physiologischen Bedingungen und in Anwesenheit von Serumproteinen mittels DLS und AF-FFF untersucht.

Neben der Synthese und physikochemischen Charakterisierung wurden auch Zellaufnahmeexperimente durchgeführt, in denen die Wechselwirkung der Nanopartikel mit Lungengewebemodellen erforscht wurde. Diese Versuche zeigen Unterschiede in der zellulären Aufnahme der elektrostatisch und der sterisch stabilisierten Partikel.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	5
2.1	Kolloide und Nanopartikel	5
2.1.1	Allgemeine Einführung.....	5
2.1.2	Stabilität kolloidaler Dispersionen.....	7
2.2	Wechselwirkung der Nanopartikel mit biologischen Systemen.....	13
2.2.1	Einleitung.....	13
2.2.2	Zelluläre Aufnahmemechanismen	14
2.2.3	Verteilung der Nanopartikel im Körper	16
2.2.4	Wechselwirkung der Nanopartikel mit Proteinen.....	20
2.3	Poly(organosiloxan)-Nanopartikel allgemein	22
2.3.1	Einleitung.....	22
2.3.2	Hydrolyse und Kondensation der Alkoxysilane	22
2.3.3	Synthese der hydrophoben Kern-Schale-Systeme	25
2.3.4	Funktionalisierte Nano-Netzwerke	29
3	Charakterisierungsmethoden	32
3.1	Lichtstreuung.....	32
3.1.1	Allgemeine Einführung.....	32
3.1.2	Dynamische Lichtstreuung	33
3.1.3	Dynamische Lichtstreuung unter physiologischen Bedingungen.....	36
3.2	Bestimmung des ζ-Potentials.....	39
3.3	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss Fraktionierung	40
3.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	42
3.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	43
4	Fluoreszenzmarkierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel.....	45
4.1	Einleitung	45
4.2	Darstellung und Charakterisierung der Rhodamin B-markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel.....	47
4.3	Modifikation der Partikelgröße	50
5	Elektrostatisch stabilisierte Partikel durch Verwendung der funktionellen Silan-Monomere.....	54
5.1	Einleitung und allgemeine Synthesestrategie.....	54
5.2	Carboxy-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel	56
5.2.1	Synthese und Charakterisierung.....	56

5.2.2	Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen	59
5.3	Amino-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel	63
5.3.1	Synthese und Charakterisierung	63
5.3.2	Transfer in wässrige Lösung und Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen	64
6	Sterisch stabilisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel.....	69
6.1	Einleitung.....	69
6.2	Verwendete Polymere	70
6.2.1	Poly(ethylenglykol)	70
6.2.2	Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)	71
6.3	Grafting von PEG an die carboxy-funktionalisierten Nanopartikel.....	73
6.3.1	Synthese und Charakterisierung	73
6.3.2	Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen	79
6.4	Thermoresponsive Nanopartikel durch Kupplung von Poly(2-isopropyl-2- oxazolin).....	83
6.4.1	Synthese und Charakterisierung	83
6.4.2	Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen	86
6.5	Grafting von PEG an die amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)- Nanopartikel.....	92
6.5.1	Synthese und Charakterisierung	92
6.5.2	Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen	95
6.6	Biofunktionalisierung der sterisch stabilisierten Poly(organosiloxan)- Nanopartikel.....	98
6.6.1	Darstellung der biotinylierten Nanopartikel	98
6.6.2	Bindung von Streptavidin	102
7	Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche.....	105
7.1	Einleitung.....	105
7.2	Partikel mit quaternären Ammoniumgruppen ohne zusätzliche sterische Stabilisierung.....	106
7.2.1	Synthese und Charakterisierung	106
7.2.2	Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen	111
7.3	Dual-funktionalisierte, quaternisierte und PEGylierte Partikel	114
7.3.1	Modifizierung der amino-funktionalisierten Partikel	114
7.3.2	Modifizierung der carboxy-funktionalisierten Partikel	119
8	Wechselwirkung der Poly(organosiloxan-Nanopartikel) mit Lungenzellkulturmodellen	125

9 Zusammenfassung und Ausblick.....	129
9.1 Zusammenfassung	129
9.2 Ausblick.....	132
10 Materialien und Methoden	133
10.1 Chemikalien und Lösungsmittel	133
10.2 Synthese.....	134
10.2.1 Fluoreszenzmarkierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel	134
10.2.2 Oberflächenfunktionalisierung während der Polykondensation	136
10.2.3 Sterisch stabilisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel	138
10.2.4 Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche.....	143
10.2.5 Zellulären Aufnahmestudien	146
10.3 Geräte und Probenpräparation	146
10.3.1 Lichtstreuung	146
10.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	147
10.3.3 Asymmetrische Fluss-Feld Fluss Fraktionierung (AF-FFF).....	147
10.3.4 ζ -Potential-Messungen	148
10.3.5 UV/Vis-Spektroskopie	148
10.3.6 Fluoreszenzspektroskopie	148
10.3.7 Thermogravimetrische Analyse	149
10.3.8 MALDI-TOF Massenspektrometrie	149
10.3.9 IR Spektroskopie.....	149
10.3.10 Fluoreszenzmikroskopie	149
11 Abkürzungen und Symbole.....	150
11.1 Abkürzungen	150
11.2 Symbole	151
12 Anhang.....	153
12.1 Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI 1640.....	153
12.2 Zusätzliche Daten	155
12.2.1 Kapitel 5: Elektrostatisch stabilisierte Partikel durch Verwendung der funktionellen Silan-Monomere	155
12.2.2 Kapitel 6: Sterisch stabilisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel.....	156
12.2.3 Kapitel 7: Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche	164
Literatur	167
Danksagung	174

1 Einleitung und Zielsetzung

Nanopartikel natürlicher Herkunft begleiten die Menschheit schon seit Beginn der Evolution. Kolloidale Teilchen werden beispielsweise bei den Waldbränden und bei den Vulkaneruptionen freigesetzt.¹⁻³ Nanopartikel sind Teilchen mit einer Größe von 1 nm bis 100 nm, weshalb ihre Eigenschaften zwischen denen von Atomen und makroskopischen Festkörpern eingeordnet werden können. Vor allem ihre im Verhältnis zum Volumen sehr große spezifische Oberfläche macht die Nanopartikel für eine Vielzahl von unterschiedlichen industriellen oder medizinischen Anwendungen sehr interessant. Das hatte bereits im letzten Jahrhundert eine sehr rasante Entwicklung der Nanotechnologie zur Folge, so dass der Anteil an künstlich-hergestellten Nanopartikeln stark gestiegen ist.¹ Mittlerweile finden Nanopartikel in sehr vielen Bereichen des täglichen Lebens Anwendung, unter anderem in Bau-, Bekleidungs-, und Lebensmittelindustrie.⁴⁻⁶

Auch in vielen Bereichen der medizinischen Forschung bietet die Nanotechnologie sehr vielversprechende Ansätze. Beispielsweise werden Eisenoxid-Nanopartikel als Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie eingesetzt.⁷ Die aktuelle Krebsforschung beschäftigt sich intensiv mit den polymeren Nanopartikeln: Durch die Verkapselung der Medikamente im Inneren der Partikel und die gezielte Adressierung der Partikel mit spezifischen, an die Partikeloberfläche gebundenen Liganden soll der gerichtete Transport von hydrophoben, wasserunlöslichen Wirkstoffen zu den Krebszellen gewährleistet und die Schädigung der gesunden Zellen durch das Medikament weitestgehend reduziert werden.⁸⁻¹⁰

Sowohl bei den industriellen als auch bei den medizinischen Anwendungen kommen Nanopartikel in Kontakt mit menschlichem Organismus und können abhängig von ihren Eigenschaften unterschiedliche, erwünschte, oder auch unerwünschte Reaktionen hervorrufen.¹¹ Das Wissen über die Wechselwirkungsmechanismen der Nanopartikel mit den biologischen Systemen ist noch immer unvollständig sowohl auf der Ebene einzelner Biomoleküle, als auch auf der Ebene komplexerer Systeme wie z. B. Organe. Das tiefere Verständnis der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen ist zur Abschätzung möglicher Gefahren wie auch beim gezielten Einsatz in der Nanomedizin dringend notwendig und kann vor allem im medizinischen Bereich einen wesentlichen Beitrag zur Effizienzverbesserung der verwendeten Systeme leisten.^{1,12-14}

Meistens sind es die physikochemischen Charakteristika der Nanopartikel, wie ihre Größe, Form und Material- bzw. Oberflächeneigenschaften, die für die Antwort des Organismus auf eine Nanopartikelexposition ausschlaggebend sind.^{12,13,15} So können beispielsweise zwei gleich große Partikel, die aus verschiedenen Materialien bestehen, völlig unterschiedlich Reaktionen des Körpers hervorrufen. Dies gilt genauso für zwei unterschiedlich große Partikel des gleichen Materials. Auf Grund der vielen unterschiedlichen Herkunftsquellen und somit der unterschiedlichen Eigenschaften der Nanopartikel und der hohen Komplexität der biologischen Systeme ist eine Vereinheitlichung der Erkenntnisse oft nur bedingt oder gar nicht möglich.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Entwicklung eines auf den Poly(organosiloxanen) basierenden Modellsystems, das in weiterführenden Studien zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen anhand der *in vitro* Modelle verwendet werden soll. In diesen biologischen Studien steht vor allem die Wechselwirkung der Nanopartikel mit der Lunge im Vordergrund. Diese stellt ein mögliches Portal dar, durch das die Nanopartikel in den Körper gelangen können. Darüberhinaus werden die Wechselwirkungen der Nanopartikel mit den Endothelzellen der Blutgefäße untersucht, um die Wiederaufnahme der Nanopartikel, die bereits in die Blutbahn gelangt sind, zu erforschen.

Die Poly(organosiloxane) sind besonderes gut als Modellsystem geeignet, da sie im nicht-modifiziertem Zustand nicht toxisch sind und chemisch weitgehend inert, so dass das Poly(dimethyldisiloxan) beispielsweise als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen ist.¹⁶ Gleichzeitig ist durch die hohe Flexibilität der Silan-Chemie eine relativ einfache Modifikation von unterschiedlichen Eigenschaften der Partikel und Darstellung eines multifunktionellen modular-aufgebauten Systems möglich. Dadurch wird eine voneinander unabhängige Veränderung der verschiedenen Partikelbausteinen ermöglicht, die die Untersuchung der Rolle der unterschiedlichen Partikelcharakteristika bei den Wechselwirkungen mit biologischen Systemen zulässt.

Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Aufbau des in dieser Arbeit darzustellenden Modellsystems mit seinen unterschiedlichen Bestandteilen. Es sollen multifunktionelle Kern-Schale-Partikel synthetisiert werden, deren Größen ca. 10-20 nm im Radius betragen. Die Partikel in diesem Größenbereich werden vorwiegend über den endocytotischen Transport in die Zellen aufgenommen.¹⁷ Somit soll die Erforschung der vesikulären Aufnahmemechanismen der Nanopartikel in die Zelle ermöglicht werden. Für

die Verfolgung der zellulären Aufnahmeexperimente an lebenden Zellen ist eine Fluoreszenzmarkierung notwendig, welche im Partikelkern eingeführt wird. Gleichzeitig soll die Partikeloberfläche mit sterisch- oder elektrostatisch-stabilisierenden Gruppen während der eigentlichen Partikelsynthese oder durch anschließende post-synthetische Funktionalisierung nach der Grafting Onto-Methode modifiziert werden, um den Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf die Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen zu untersuchen.

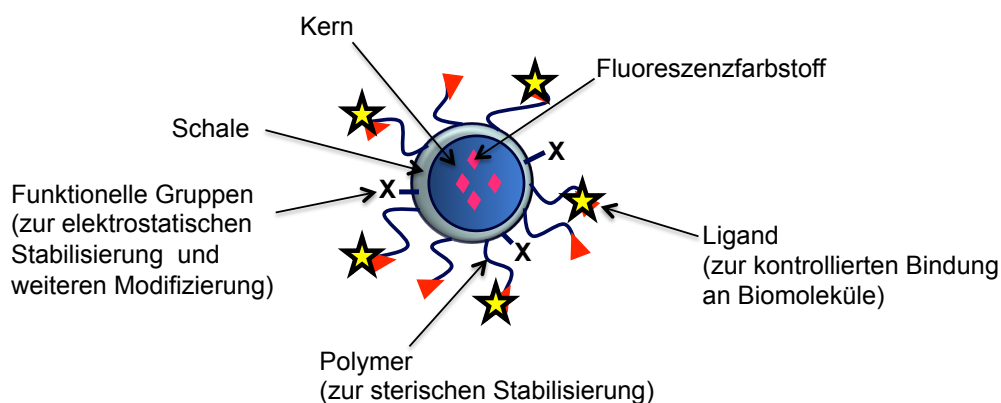


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des Poly(organo-siloxan)-Modellsystems zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit verschiedenen biologischen Systemen.

Im Fall der elektrostatisch stabilisierten Partikel sollen positiv und negativ geladene Partikel synthetisiert und ihre kolloidale Stabilität gegenübergestellt werden. Bei der sterischen Stabilisierung soll zunächst Poly(ethylenglykol) (PEG) verwendet werden, das dafür bekannt ist, die Proteinadsorption und Zelladhäsion der Nanopartikel zu reduzieren.¹⁸ Als mögliche Alternative sollen auch Partikel, die mit thermoresponsiven Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (PIPOX) funktionalisiert sind, dargestellt und ihre Eigenschaften mit den Eigenschaften der PEGylierten Partikel verglichen werden. Anschließend sollen auch Liganden auf der Partikeloberfläche eingeführt werden, die spezifische Bindung von weiteren Biomolekülen ermöglichen und somit die Kontrolle über die Partikel-Rezeptor-Wechselwirkungen bei den Zellaufnahmestudien zulassen.

Um ein tieferes Verständnis der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit biologischen Systemen zu erlangen, ist neben der rationalen Synthese der Nanopartikel-

Modelle mit variablen Eigenschaften auch eine präzise Charakterisierung dieser Systeme enorm wichtig. Die physikochemischen Eigenschaften der Partikel müssen bekannt sein, um Wechselwirkungen der Partikel mit biologischen Medien zu verstehen. Der Eintritt der Nanopartikel in biologische Medien hat oft eine Veränderung der Partikeleigenschaften zur Folge: Im Serum z. B. findet oft die Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche statt, die eine Veränderung der Größe und der Oberflächeneigenschaften der Partikel hervorruft. Letztendlich ist es die Identität der Partikel in der biologischen Umgebung, die über die Verteilung der Nanopartikel im Körper entscheidet, weshalb auch eine genaue Charakterisierung der Partikel unter den physiologischen Bedingungen, in Anwesenheit der Serumproteine durchgeführt werden muss.

Die in dieser Arbeit synthetisierten Modellsysteme mit unterschiedlichen, variablen Oberflächeneigenschaften sollen deshalb zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Serumproteinen eingesetzt werden. Hierbei soll vor allen das Agglomerationsverhalten der Nanopartikel in Anwesenheit des Serums mit verschiedenen physikochemischen Methoden untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen eine Grundlage für weiterführende Studien bilden, in denen die Abhängigkeit der Beschaffenheit der Proteinkorona von den Partikeleigenschaften sowie die Rolle der Proteinkorona bei der zellulären Aufnahme der Nanopartikel und die möglichen Effekte der Korona im Bezug auf die Nanotoxizität untersucht werden. Aus diesen Studien soll tieferes Verständnis der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen erlangt werden, das später die Darstellung der Nanopartikel ermöglichen sollte, dessen zelluläre Aufnahme präzise gesteuert und verfolgt werden kann. Dadurch könnte beispielsweise die Erhöhung der Erfolgsquote bei Adressierung und Transport der in Nanopartikel verkapselten Medikamente, die heutzutage noch relativ niedrig ist, erzielt werden.¹²

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Kolloide und Nanopartikel

2.1.1 Allgemeine Einführung

Der Begriff “Kolloide“ (von *griech.* „kollan“ = leimen) wurde zum ersten Mal von Thomas Graham im Jahr 1861 eingeführt. Er bezeichnete damit Stoffe, die in Lösungen unsichtbar sind, aber bei der Dialyse trotzdem nicht durch Membranen diffundieren. Als kolloidale Systeme, werden nach IUPAC-Definition die Systeme bezeichnet, deren Größe im dispergierten Zustand mindestens in einer Dimension zwischen 1 nm und 1 μ m liegt.^{19,20}

Die Einteilung der Kolloide nach Stoffklassen hat sich nicht durchgesetzt. Hermann Staudinger führte die Klassifizierung der Kolloide in Dispersionskolloide, Molekülkolloide und Assoziationskolloide ein. Die Dispersionskolloide sind meist thermodynamisch instabile, zweiphasige Systeme hydrophober Kolloide, die aus Dispersionsmittel und disperser Phase bestehen. Dazu gehören neben den Emulsionen (beide Phasen flüssig) und Dispersionen (disperse Phase fest, kontinuierliche Phase flüssig) auch Schäume und Aerosole. Die Molekülkolloide stellen dagegen einphasige Dispersionen makromolekularer Stoffe und Biopolymere dar. Diese Lösungen sind echte Lösungen im Sinne der Thermodynamik. Die Partikelgröße wird durch die Größe des gelösten Makromoleküls vorgegeben, dass in der Lösung beispielsweise als Knäuel vorliegt. Die Assoziationskolloide entstehen durch die spontane und reversible Assoziation von Tensiden zu kolloidal-dimensionierten Gebilden, wie z. B. Mizellen. Zu dieser Klasse gehören auch viele Biokolloide, deren grundsätzliche Eigenschaften auf dem Prinzip der Selbstorganisation beruhen, beispielsweise Proteine, die sich zu einer Quartärstruktur zusammenlagern.^{20,21}

Neben dem Begriff Kolloide wird seit den letzten Jahrzehnten der Begriff Nanopartikel immer häufiger verwendet. Hierbei handelt es sich um kolloidale Teilchen mit einem Durchmesser von 1-100 nm (IUPAC-Empfehlung für Gel-Nanopartikel).²² Es wird also lediglich eine kleinere Größendimension von dem Begriff Nanopartikel erfasst. Im Gegensatz zu den Kolloiden werden Nanopartikel in der Literatur meist nach ihren

Ursprungsquellen (natürliche oder künstlich hergestellte) und ihren Materialeigenschaften (organisch, anorganisch) eingeteilt.²

Auch wenn die meisten Biomoleküle, wie DNA und Proteine, zu den Kolloiden bzw. Nanopartikeln gehören, sind die Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen und kolloidalen Teilchen bzw. Nanopartikeln des nicht biologischen Ursprungs oft komplizierter als die Wechselwirkungen der letzteren untereinander: Biomoleküle sind meist inhomogen aufgebaut, bestehen oft aus mehreren Komponenten und enthalten unterschiedliche Domänen, die die Wechselwirkungen beeinflussen können. Für die Erläuterung der Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen Nanopartikel und biologischen Systemen, der so genannten Nano-Bio-Grenzfläche, können trotzdem oft Konzepte aus der klassischen Kolloidchemie und -physik herangezogen werden.¹⁴

Für die Synthese nanopartikulärer Modellsysteme, die zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit biologischen Systemen verwendet werden sollen ist vor allem die kolloidale Stabilität der Teilchen von besonderer Bedeutung. Es ist bekannt, dass die kolloidale Stabilität der Partikel, die in einer kontinuierlichen Phase dispergiert sind, nur dann erhalten bleibt, wenn Partikel durch repulsive Kräfte auseinander gehalten werden. Wenn hingegen die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Teilchen überwiegen, findet Agglomeration der Teilchen und somit ein Übergang in den makroskopischen Zustand und der Verlust der kolloidalen Eigenschaften statt. Derzeit sind drei verschiedene Stabilisierungsmechanismen der Partikel in Lösung bekannt:²⁰

- elektrostatische
- sterische
- Verarmungsstabilisierung

Für das in dieser Arbeit synthetisierte System sind vor allem die ersten beiden Stabilisierungsmechanismen relevant und werden im nächsten Unterabschnitt 2.1.2 genauer erläutert. Die Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und biologischen Systemen werden im Abschnitt 2.2 (S. 13) im Detail diskutiert.

2.1.2 Stabilität kolloidaler Dispersionen

2.1.2.1 Elektrostatische Stabilisierung

Dispersionen geladener Teilchen werden durch die elektrostatischen Kräfte stabilisiert. Sind auf der Oberfläche der Teilchen Ladungen vorhanden, so werden sie durch die Gegenionen, die eine diffuse Ionenschicht um das Teilchen bilden, ausgeglichen. Die Dispersion wird durch die Abstoßung zwischen diesen diffusen Ionenschichten stabilisiert.^{20,21}

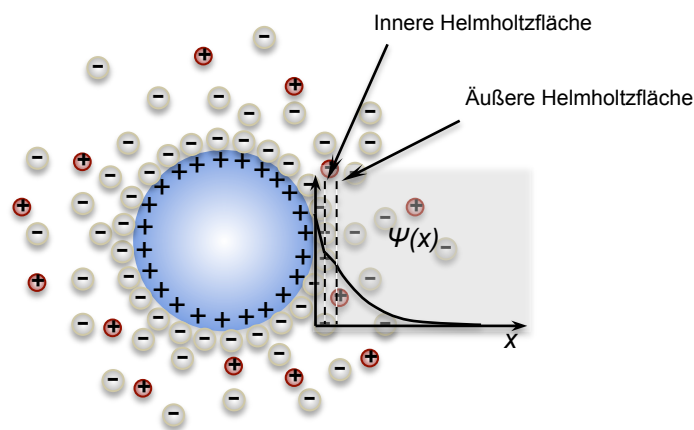


Abbildung 2.1: Stern-Modell einer Gegenionenschicht um ein kolloidales Teilchen und Verlauf des elektrischen Potentials $\psi(x)$ als Funktion des Abstands x . Modifiziert nach Lyklema.²³

Zur Beschreibung der diffusen Ionenschicht wurden verschiedene Modelle entwickelt. Das älteste Modell von Helmholtz geht davon aus, dass die Oberfläche dicht mit Gegenionen besetzt ist. Das Potential nimmt innerhalb der Schicht linear ab. Die Bewegung der Gegenionen und das Konzentrationsgefälle, welches mit dem zunehmenden Abstand von der Oberfläche entsteht, werden von diesem Modell nicht berücksichtigt. Eine genauere Beschreibung liefert das Gouy-Chapman-Modell²⁴, das die Ionenschicht als diffuse Doppelschicht beschreibt. Nach diesem Modell nimmt das elektrische Potential mit dem zunehmenden Abstand von der Teilchenoberfläche exponentiell ab. Die Ionen werden beim Gouy-Chapman-Modell als Punktladungen angesehen. Ein weiteres Modell von Stern berücksichtigt auch die räumliche Ausdehnung der Ionen (Abbildung 2.1).²⁵

Nach Stern-Modell wird die Ionenschicht in zwei Bereiche unterteilt. Die innere Schicht, die als Stern-Schicht bezeichnet wird, besteht aus Ionen, die an der Oberfläche adsorbiert sind und entspricht demnach der Helmholtz-Doppelschicht. Die äußere Schicht entspricht der diffusen Schicht, die von dem Gouy-Chapman-Modell beschrieben wird.²⁴ Die Stern-Schicht kann weiter in zwei verschiedene Regionen unterteilt werden: Die innere Helmholtz-Schicht, die zwischen der Partikeloberfläche und der inneren Helmholtzfläche liegt sowie die äußere Helmholtz-Schicht, die sich zwischen der inneren und äußeren Helmholtzfläche befindet. Der Bereich zwischen der Oberfläche und der inneren Helmholtzfläche ist frei von Ladung. Die äußere Helmholtzfläche beschreibt den Übergang von der fest gebundenen inneren Schicht zur diffusen Ionenschicht. Das elektrische Potential zwischen der inneren und äußeren Helmholtzfläche fällt linear ab. Das Potential an der äußeren Helmholtzfläche wird als Potential der diffusen Schicht bezeichnet.^{9,10} Im Bereich der diffusen Doppelschicht findet analog zum Gouy-Chapman-Modell der exponentielle Abfall des Potentials Ψ mit Abstand x statt. Zur mathematischen Beschreibung wird die Poisson-Boltzmann-Gleichung verwendet. Für kugelförmige harte Teilchen mit Radius a gilt folgende Lösung:^{20,23,26,27}

$$\Psi = \Psi_0 \frac{a}{a+x} \exp(-\kappa x) \quad (2-1)$$

Der reziproke Debye-Hückel-Parameter $1/\kappa$ ist ein Maß für die Dicke der Doppelschicht und bezeichnet den Abstand von der Partikeloberfläche, bei dem das Potential auf $1/e$ abgefallen ist.

Ähnlich wie zwischen Atomen wirken auch zwischen Kolloidteilchen neben den repulsiven Kräften die attraktiven Van-der-Waals Kräfte V_A . Für zwei kugelförmige Teilchen mit Radius a , die sich im Abstand H voneinander befinden gilt:²⁰

$$V_A = -\frac{A}{6} \left(\frac{2}{s^2 - 4} + \frac{2}{s^2} + \ln \frac{s^2 - 4}{s^2} \right) \quad (2-2)$$

mit

$$s = \frac{H}{a} + 2 \quad (2-3)$$

Hierbei ist A die Hamaker-Konstante.

Für gleich große Teilchen, die sich in sehr kleinem Abstand voneinander befinden ($a \gg H$) resultiert folgende Näherung:

$$V_A = -\frac{A}{12} \cdot \frac{a}{H} \quad (2-4)$$

Die Stärke der Van-der-Waals-Wechselwirkungen wird bei einer gegebenen Geometrie allein durch die Hamaker-Konstante A bestimmt. In erster Näherung ist A unabhängig von dem Abstand zwischen den Teilchen und dem Elektrolytgehalt der Dispersion.²⁰

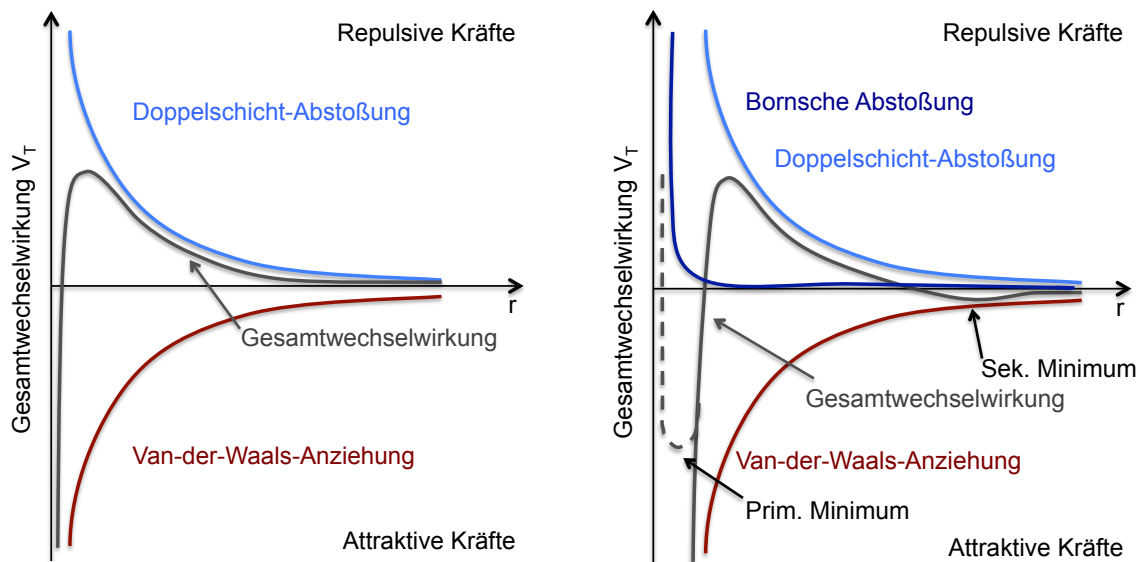


Abbildung 2.2: DLVO-Theorie zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen kolloidalen Teilchen. Links: — Gesamtpotential setzt sich aus — elektrostatischer Abstoßung und — Van-der-Waals-Anziehung zwischen Teilchen zusammen. Rechts: Verlauf des Gesamtpotentials mit zusätzlicher Berücksichtigung der — Bornschen Abstoßung.

Eine quantitative Theorie zur Beschreibung der Gesamtwechselwirkung zwischen kolloidalen Partikeln wurde in den 1940er Jahren von Derjaguin und Landau²⁸ sowie von Verwey und Oberbeek^{29,30} entwickelt. Diese Theorie ist heutzutage unter dem Namen DLVO-Theorie bekannt. Die potentielle Energie zwischen den Teilchen ergibt sich nach der DLVO-Theorie aus der Überlagerung der attraktiven und repulsiven Kräfte zwischen den Teilchen, also aus der Überlagerung der elektrostatischen Abstoßung und Van-der-

Waals-Anziehung (Abbildung 2.2, links). Für kleine Abstände sind die attraktiven Kräfte deutlich stärker als die repulsiven Kräfte, wodurch ein Potentialmaximum entsteht. Für den direkten Kontakt zwischen den Teilchen muss weiterhin die Bornsche Abstoßung berücksichtigt werden (Abbildung 2.2, rechts). Es liegt ein primäres Minimum der Gesamtwechselwirkungsenergie vor. Unter bestimmten Umständen kann weiterhin auch ein flaches, sekundäres Minimum der Wechselwirkungsenergie auftreten. Dieser Vorgang wird als Flokkulation bezeichnet. Die Flukulation ist ein reversibler Vorgang, im Gegensatz zur irreversiblen Koagulation.²⁰

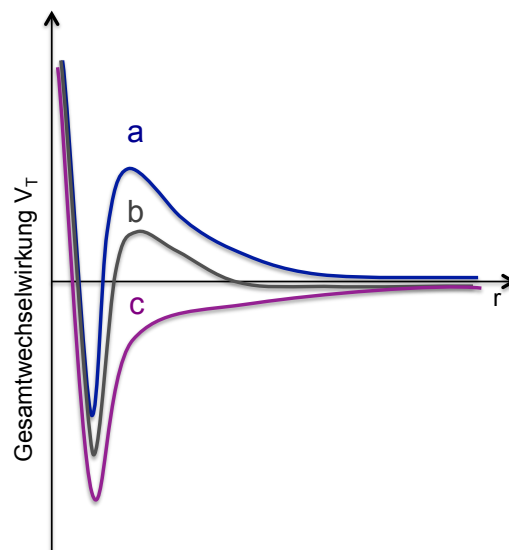
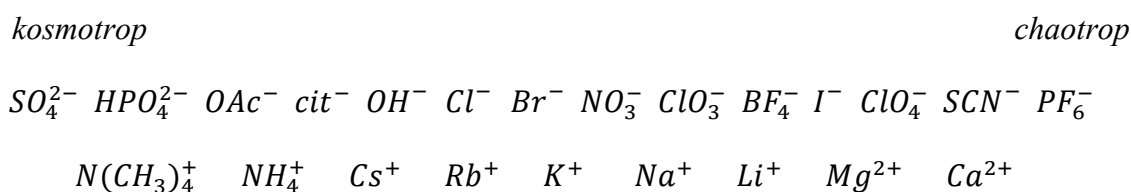


Abbildung 2.3: Abhängigkeit der Gesamtwechselwirkungsenergie von Elektrolytkonzentration. Salzkonzentration steigt von a bis c.

Die Stabilität einer kolloidalen Dispersion ist abhängig von der Elektrolytkonzentration (Abbildung 2.3, Elektrolytkonzentration steigt von a bis c). Bei einer niedrigen Salzkonzentration (a) ist die elektrische Doppelschicht dick, so dass ein ausgeprägtes Maximum der potentiellen Energie vorliegt und die Dispersion meta-stabil ist. Bei einer Erhöhung der Salzkonzentration nehmen die Dicke der elektrischen Doppelschicht und somit auch die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Teilchen ab, weshalb das Maximum weniger ausgeprägt ist (b) oder ganz verschwindet (c). Die Dispersion ist instabil und koaguliert. Diese Salzkonzentration wird als kritische

Koagulationskonzentration bezeichnet und hängt vor allem von der Wertigkeit der Gegenionen ab.²⁰

Neben der Salzkonzentration beeinflussen auch die spezifischen Ioneneffekte die kolloidale Stabilität der Teilchen. Der Einfluss der Gegenionen auf die Stabilität einer Dispersion wird von der Hofmeister-Reihe, auch lyotrope Reihe genannt, beschrieben, die auf einer Untersuchung der proteinfällenden Wirkung von verschiedenen Salze basiert.^{20,31,32} Die Salze wurden nach Konzentration angeordnet, die zur Fällung von Proteinen benötigt wird.^{20,32,33} In der aktuellen Literatur findet man meistens folgende Reihenfolge:³¹



Die kosmotropen Ionen, die in der Reihe weiter links stehen, stabilisieren die Proteinstruktur und fördern die Proteinkristallisation. Sie wirken also als Fällungsmittel. Die chaotropen Ionen, die weiter rechts in der Reihe stehen, wirken dagegen denaturierend und fördern die Löslichkeit der Proteine. Ähnliche Effekte werden oft auch bei den Lösungen makromolekularer Stoffe und bei den Tensid-Mizellen beobachtet.³¹⁻³⁴

2.1.2.2 Sterische Stabilisierung

Werden Nanopartikel durch kovalent oder adsorptiv an die Oberfläche gebundenes Polymer in Lösung stabilisiert, so spricht man von der sterischen Stabilisierung.^{20,21}

Die Stabilität der sterisch stabilisierten kolloidalen Teilchen wird durch die Wechselwirkungen des Polymers mit dem Lösungsmittel maßgebend bestimmt. Makromoleküle liegen in der Lösung als Knäuel vor. Die Größe wird dabei durch das mittlere Trägheitsradiusquadrat beschrieben, das in einer Beziehung zum mittleren quadratischen Fadenendenabstand der Gaus-Kette steht.^{35,36}

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{6} nl^2 \quad (2-5)$$

Mit der Anzahl der Segmente n und der Segmentlänge l .

Befindet sich ein mit Polymer umhülltes Partikel in einem für dieses Polymer guten Lösungsmittel, dann tritt die sterische Stabilisierung auf. Eine Beschreibung der sterischen Stabilisierung wurde von Napper in den 1970er entwickelt.^{20,37-39}

Bei Näherung zweier sich im Abstand H befindenden Teilchen mit Konturlänge der makromolekularen Hülle δ kann man dabei zwischen drei verschiedenen Fällen unterscheiden (Abbildung 2.4):

- Fall A: $H > 2\delta$: Es tritt keine Wechselwirkung zwischen den Hüllen auf.
- Fall B: $\delta < H < 2\delta$: Die Polymerschichten dringen ineinander ein.
- Fall C: $H < \delta$: Die Polymerschichten dringen ineinander ein und werden komprimiert.

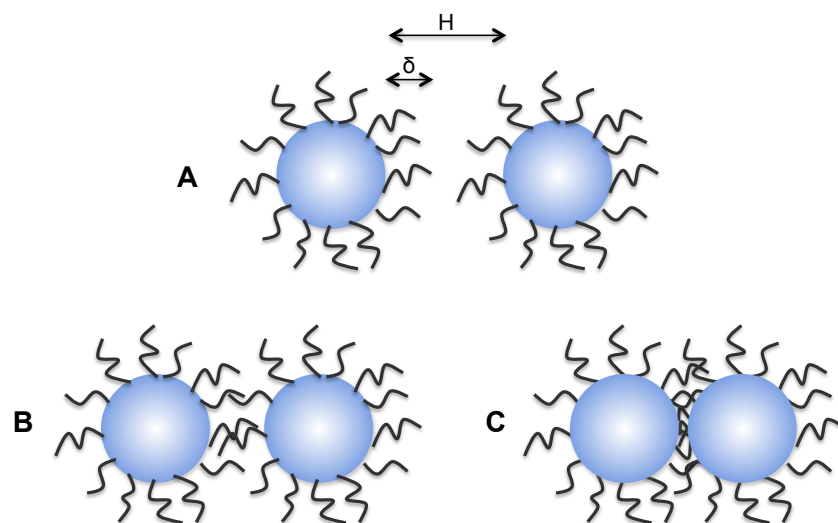


Abbildung 2.4: Sterisch stabilisierte Partikel. A: Keine Wechselwirkung zwischen Polymerhüllen; B: Durchdringung und C: Durchdringung und Kompression der Polymerhüllen.

Bei einer Verzahnung erhöht sich die Dichte der Segmente. Es findet eine Entmischung der Polymersegmente und des Lösungsmittels statt. In einem guten Lösungsmittel ist die Entmischung thermodynamisch ungünstig, in einem schlechten wird sie hingegen begünstigt. Diese Komponente der sterischen Stabilisierung wird als Mischungsterm bezeichnet. In Fall C, muss auch der elastische Term berücksichtigt

werden, der unabhängig von der Lösungsmittelgüte ist. Die Gesamtenthalpie des Systems ΔG setzt sich dann aus Mischungskomponente ΔG_{mix} und elastischen Komponente ΔG_{el} zusammen:

$$\Delta G = \Delta G_{mix} + \Delta G_{el} \quad (2-6)$$

Das Vorzeichen der Mischungsenthalpie hängt hierbei von Lösungsmittel ab, das Vorzeichen des Entropieterms ist hingegen immer positiv. Das Eintreten der Destabilisierung einer Dispersion durch Flockung wird durch die Vorgänge bei einsetzender Verzahnung bestimmt, das bedeutet, dass im Prinzip nur der Mischungsterm hierfür entscheidend ist.²⁰

2.2 Wechselwirkung der Nanopartikel mit biologischen Systemen

2.2.1 Einleitung

Die Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit biologischem Material an der Nano-Bio-Grenzfläche sind im Allgemeinen viel komplexer als die Wechselwirkungen der Kolloide untereinander. Biomoleküle sind meist inhomogen aufgebaut. So besitzen Proteine unterschiedliche Domänen, die an der Steuerung verschiedener biologischer Vorgänge beteiligt sind. Viele biochemische Prozesse sind auf Veränderungen der Proteinstruktur, z. B. die Faltung bzw. Entfaltung der Proteine, zurückzuführen. Auch Lipidmembranen sind asymmetrisch aufgebaut und unterliegen ständigen Veränderungen, die durch Signale hervorgerufen werden, welche sowohl aus dem Zellinneren als auch aus dem extrazellulären Raum kommen können. Die meisten biochemischen Prozesse laufen in Form von komplexen Signalkaskaden ab, d. h. auf Stimuli-induzierte Veränderungen einer Zellkomponente erfolgt schließlich eine Kettenreaktion.

Bei Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Biomolekülen sind physikochemische Eigenschaften sowohl des Nanopartikels als auch des jeweiligen Biomoleküls sowie die Beschaffenheit der Umgebung (Salzkonzentration, pH) entscheidend dafür, welche Kräfte bevorzugt zwischen den beiden Systemen wirken und welche Folgen für beide Systeme dadurch hervorgerufen werden können. Dieser Abschnitt gibt einen kurzen Überblick

über die Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen. Zunächst werden in den Unterabschnitten 2.2.2 und 2.2.3 die zellulären Aufnahmemechanismen und die Transportmechanismen der Nanopartikel im Körper erläutert. In Unterabschnitt 2.2.4 wird die Wechselwirkung der Nanopartikel mit Proteinen genauer vorgestellt.

2.2.2 Zelluläre Aufnahmemechanismen

Eine Zelle ist durch ihre Zellmembran von der extrazellulären Matrix getrennt. Die Zellmembran besteht aus einer dynamischen Lipiddoppelschicht, in die integrale (membrandurchdringende) Proteine eingebettet und periphere (membranassoziierte) Proteine aufgelagert sind. Die Proteine sind dabei keineswegs fest in der Membran verankert. Stattdessen findet eine ständige Diffusion der Membrankomponenten innerhalb der Membran statt. Der Membranaufbau wird durch das „fluid mosaik“ Modell beschrieben.^{40,41} Die Aufgabe der Zellmembran ist die Aufrechterhaltung des inneren Milieus der Zelle.⁴² Kleinere Moleküle, wie Zucker, Aminosäuren und Salze werden aktiv oder passiv durch Ionenkanäle transportiert, die aus integralen Membranproteinen aufgebaut sind. Für die Aufnahme von Makromolekülen, die zu groß sind, um durch Kanäle zu diffundieren, hat die Zelle verschiedene, streng regulierte Aufnahmemechanismen entwickelt, die unter dem Begriff „Endocytose“ zusammengefasst werden. Allgemein kann die Endocytose, die eine anfängliche Einstülpung der Zellmembran und anschließend die Abschnürung der Transportvesikel ins Zellinnere erfordert, in Phagocytose und Pinocytose unterteilt werden (Abbildung 2.5).¹⁷

Die Phagocytose dient der Beseitigung von festen Stoffen (körperfremde Partikel, Zellen) im Organismus und wird von spezialisierten Zellen des Immunsystems durchgeführt, wie z. B. Makrophagen oder Monocyten. Als Pinocytose bezeichnet man dagegen die Aufnahme von Flüssigkeiten, bzw. darin gelösten Substanzen in die Zelle. Endocytotische Prozesse können unspezifisch oder auch spezifisch, d. h. Rezeptorvermittelt ablaufen. Während des Endocytosevorgangs werden aufzunehmende Stoffe in Membranvesikel eingeschlossen und ins Zellinnere befördert. Im Zellinneren reifen die Vesikel zu Lysosomen heran und können auf ihrer intrazellulären Route mit weiteren Endosomen fusionieren oder als Exosom die Zelle wieder verlassen. Je nach Aufnahmemechanismus unterscheidet man zwischen Makropinocytose, Clathrin-

vermittelter Endocytose, Caveolin-vermittelter Endocytose und Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Endocytose. Die endocytotischen Aufnahmewege unterscheiden sich dabei nach dem zu transportierenden Cargo-Molekül, Größe der Vesikel und Mechanismus der Vesikelbildung.^{17,42}

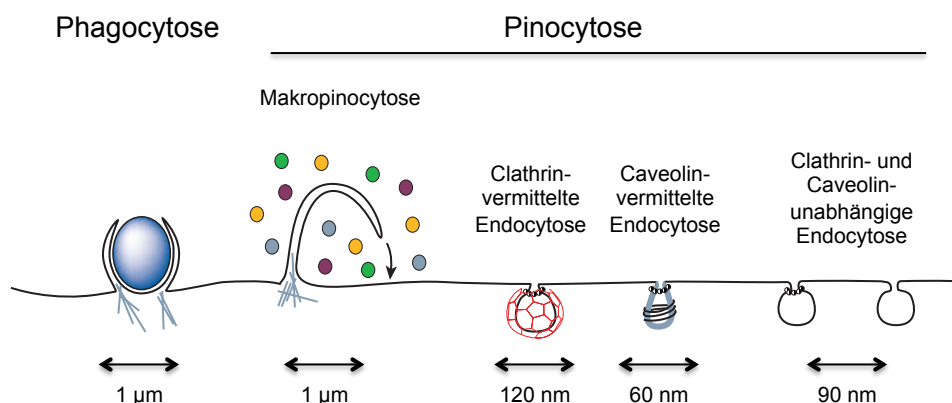


Abbildung 2.5: Aufnahme von Stoffen in die Zelle. Der Aufnahmemechanismus variiert je nach Größe des aufzunehmenden Makromoleküls. Abbildung modifiziert nach Conner & Schmid.¹⁷

Die physikochemischen Eigenschaften der Partikel, wie Ladung, Größe, Material und Form entscheiden über den Aufnahmeweg, die intrazelluläre Route und das weitere Schicksal der Partikel in der Zelle.^{14,43} Die Zellmembran ist von außen überwiegend negativ geladen. Deshalb können positiv geladene Partikel allgemein besser an die Zellmembran andocken und werden schneller aufgenommen. Die positive Ladung kann jedoch zur Schädigung der Zellmembran führen. Auch in der Zelle haben positiv geladene Partikel oft toxische Wirkung, da sie u. a. die Funktion der Protonenpumpe im Lysosom stören können.^{13,44}

Das Material der Partikel spielt hinsichtlich der potentiellen Toxizität eine wichtige Rolle. Nanopartikel können nach ihren Materialeigenschaften in drei Klassen unterteilt werden: bioabbaubare Partikel (aus bioabbaubaren Polymeren), lösliche Partikel (z. B. Silber, Kupfer) und nicht-lösliche und nicht-bioabbaubare Partikel (z. B. Graphen, Gold). Die bioabbaubaren Partikel werden nach Aufnahme durch die Zellen im Lysosom abgebaut. Im Anschluss daran können die Abbauprodukte in den Zellmetabolismus gelangen und diesen negativ beeinflussen. Dagegen sind lösliche Partikel in der Lage, toxische Metall-Ionen freizusetzen. Diese Ionen können z. B. die Aktivität der

Protonenpumpen erheblich beeinträchtigen. Auch eine Hemmung der Enzymaktivität durch Metall-Ionen ist möglich.^{11,13} Die Toxizität der Partikel hängt allerdings nicht nur von dem Material sondern auch von der Größe der Partikel ab. Studien mit amorphen Silica-Nanopartikel unterschiedlicher Größen, die an Lungenepithel- und Endothelzellen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass Partikel mit einem Durchmesser von 30 nm eine stärkere Cytotoxizität aufweisen als 70 nm, bzw. 300 nm große Partikel.⁴⁵

Es muss jedoch vermerkt werden, dass das Ausmaß von Aufnahme und Toxizität der Nanopartikel auch vom Zelltyp und der jeweiligen Zellzyklusphase abhängig ist.^{13,46}

Eine gezielte Beeinflussung der zellulären Aufnahmemechanismen durch Anbringen bestimmter Liganden auf der Partikeloberfläche ist möglich. Es sollte jedoch bedacht werden, dass das Partikel, sobald es sich in einem biologischen Medium befindet, umgehend von einer komplexen Proteinkorona umgeben wird, die dem Partikel unter Umständen eine veränderte Identität verleihen kann. Diesem Problem kann begegnet werden, indem die Oberflächeneigenschaften des Partikels so eingestellt werden, dass nur wenige Proteine daran adsorbieren. Denn die Zelle sieht letztendlich nicht das nackte Partikel sondern ausschließlich dessen Proteinkorona, deren Zusammensetzung vom biologischen Medium abhängt und dementsprechend variabel sein kann (Vgl. Abschnitt 2.2.4, Seite 20).^{13,44}

2.2.3 Verteilung der Nanopartikel im Körper

2.2.3.1 *Transportwege der Nanopartikel durch den Körper*

Nanopartikel aus der Umgebung können auf verschiedenen Wegen in den Körper gelangen. So treten Partikel aus der Atmosphäre hauptsächlich durch Inhalation, über die Haut oder auch oral und dadurch über den Magen-Darm Trakt in den Organismus ein.¹ Bei der Verwendung von Nanopartikeln für den Transport der Medikamente werden diese meist durch periphere intravenöse Injektion und seltener oral verabreicht.^{12,47} Auch der pulmonale Aufnahmeweg, der keinen invasiven Eingriff erfordert, wird immer öfter verwendet, um Wirkstoffe gezielt in die Lunge zu befördern.⁴⁸

Bei einer intravenösen Injektion werden Nanopartikel zunächst zum Herzen und dann weiter zur Lunge transportiert. Im Blutkreislauf kommen Nanopartikel mit verschiedenen

Blutproteinen in Berührung, die Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Zellen bzw. Organen auf unterschiedliche Weise beeinflussen können. So führt z.B. die Adsorption von Albumin an die Partikeloberfläche zu einer verminderten Aufnahme der Partikel durch Endothelzellen. Albumin kann des Weiteren als Dysopsonin fungieren und dadurch die Sichtbarkeit der Partikel gegenüber Immunzellen reduzieren. Die Adsorption von Antikörpern oder von Komponenten des Komplementsystems führt dagegen zur Aktivierung des Immunsystems und Eliminierung der Nanopartikel durch verschiedene Abwehrmechanismen.^{12,49,50} Die Wechselwirkungsmechanismen von Partikeln mit Proteinen und die Rolle der Proteinkorona werden später im Abschnitt 2.2.4 (Seite 20) im Detail diskutiert.

Die Zirkulationszeit von Nanopartikeln im Blut ist nicht nur von der Zusammensetzung der Proteinkorona abhängig, sondern wird auch von den physikochemischen Eigenschaften der Partikel, wie z. B. der Größe beeinflusst. So werden sehr kleine Partikel (Durchmesser < 5-6 nm) von der Niere filtriert und ausgeschieden, während größere Teilchen zurückgehalten werden. Auch bei der Aufnahme durch die Leber spielen Größe und Oberflächenbeschaffung der Partikel eine entscheidende Rolle. Partikel mit einer Größe über 200 nm werden durch Kupffer-Zellen in die Leber aufgenommen. Die Erkennung durch Makrophagen wird meist durch Opsonine vermittelt.⁵⁰ Alternativ kann die Aufnahme über sogenannte Scavenger-Rezeptoren erfolgen. Partikel mit einer Größe unter 150 nm sind zwar in der Lage, die Aufnahme durch Kupffer-Zellen zu umgehen, werden jedoch durch Hepatocyten mittels Rezeptor-vermittelter Endocytose aufgenommen. Partikel zwischen 2 und 200 nm, die von der Leber auf Grund ihrer Oberflächeneigenschaften nicht zurückgehalten wurden, können schließlich über die Gallenblase ausgeschieden werden. Die Milz stellt ein weiteres Organ dar, das Nanopartikel nach ihrer Größe sortieren und solche zurückhalten kann, die größer als 200 nm sind.^{12,43,51,52}

2.2.3.2 *Besonderheiten bei Inhalation der Nanopartikel*

Die Lunge ist das zentrale Atmungsorgan des Menschen und besitzt mit ca. 100-140 m² eine sehr große Oberfläche. Sie besteht aus zwei Lungenflügeln, die in Lungenlappen unterteilt sind. Abbildung 2.6 (links) zeigt den schematischen Aufbau der menschlichen Lunge. Das luftleitende System der Lunge besteht aus zwei

Hauptbronchien, die sich wiederum in feinere Strukturen -die Bronchiolen- bis hin zur 23. Teilungsgeneration aufteilen. Die bronchiale Oberfläche ist durch eine Schleimhaut bedeckt, die einerseits für eine ausreichende Luftbefeuchtung, andererseits für die Entfernung von Fremdkörpern aus dem Atemtrakt sorgt. Ab der 17. Teilungsgeneration der Bronchiolen kommt zu der luftleitenden Funktion auch die Atmungsfunktion hinzu, d. h. es treten bereits vereinzelt Alveolen auf. Diese gehen ab der 20. Generation in die Alveolargänge über. Die Alveolen (Abbildung 2.6, rechts) bestehen aus Endothelzellen, dem Interstitium und den Pneumocyten, die nach ihrer Form und Funktion in Typ I- und Typ II-Pneumocyten unterteilt werden. Typ II-Pneumocyten produzieren das Lungensurfactant, dessen Hauptfunktion die Herabsetzung der Oberflächenspannung an der Wasser-Luft-Grenzfläche während des Atmungsvorgangs ist.⁵³⁻⁵⁵

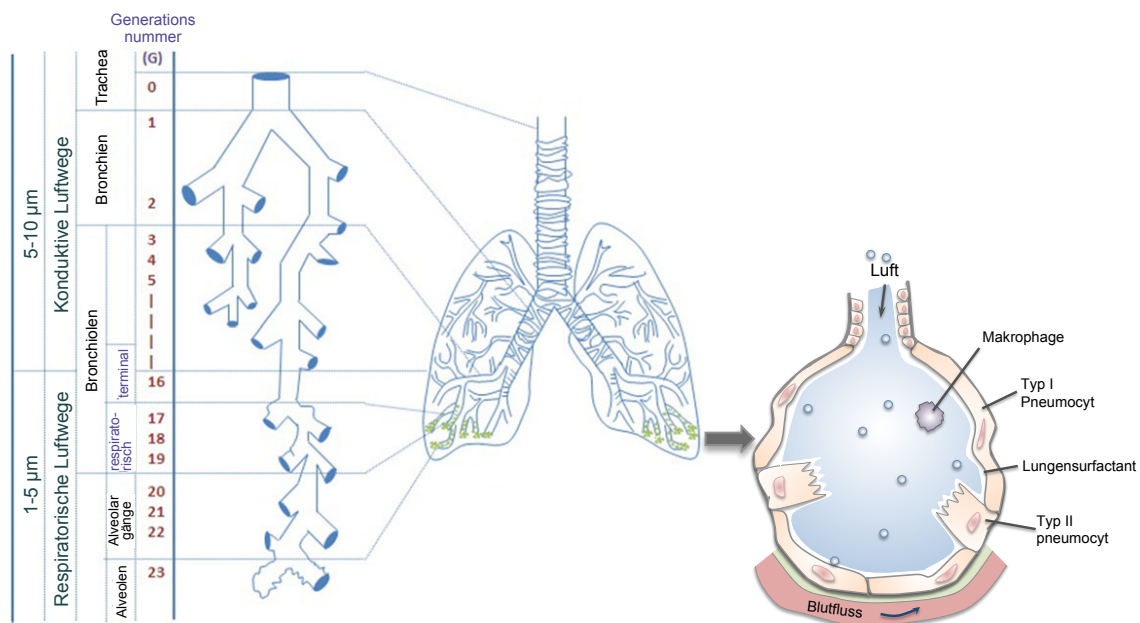


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau der menschlicher Lungen. Links: Teilung der Luftwege in verschiedene Abschnitte.⁵⁶ Rechts: Aufbau von Alveolen.

Die große äußere Oberfläche der Lunge stellt auf Grund der möglichen Inhalation von schädlichen Stoffen aus der Atmosphäre ein potentielles Gesundheitsrisiko dar. Durch die industrielle Entwicklung in den letzten zwei Jahrhunderten ist der Ausstoß kolloidaler Teilchen in die Atmosphäre stark gewachsen, was die Untersuchung des Gefahrenpotentials von Nanopartikeln bei der Inhalation notwendig macht.¹ Gleichzeitig

kann über die Inhalation auch eine gezielte, nicht-invasive Verabreichung von Medikamenten ermöglicht werden. Kleine Moleküle werden allerdings durch die Schleimhaut festgehalten und aus der Lunge eliminiert. Da dieses Problem durch den Einsatz von Nanopartikel möglicherweise überwunden werden könnte, ist das Interesse an der Entwicklung von nanopartikulären Transportsystemen während der letzten Jahre ständig gewachsen.^{48,56,57}

Das Verbleiben der Nanopartikel in verschiedenen Bereichen der Atemwege hängt von den physikochemischen Eigenschaften der Partikel, den Bedingungen während der Atmung und der Geometrie der Atemwege ab.^{1,58} Partikel mit bestimmten Eigenschaften können beispielsweise in der Schleimhaut festgehalten werden und erreichen dadurch nicht die tieferen Regionen der Lunge.

Haben die Partikel schließlich das Lungenepithel erreicht, wechselwirken sie zuerst mit dem Lungensurfactant und werden aus der Gasphase in die wässrige Phase verlagert. Die Studien mit verschiedenen Tiermodellen haben gezeigt, dass die Retentionszeit der Partikel in der Lunge sowohl von dem Abscheidungsort der Partikel als auch von der Art der Wechselwirkungen der Partikel mit der Lungenoberfläche abhängt. Die Dauer der Akkumulation der Partikel in der Lunge korreliert hauptsächlich mit deren Größe. So akkumulieren Partikel, die größer als 100 nm sind, zu 80% auf der Zelloberfläche. Kleinere Partikel können dagegen in die Epithelschicht aufgenommen werden. Hier gibt es allerdings erhebliche Unterschiede zwischen den verwendeten Tiermodellen. So werden durch Ratten zwar Nanopartikel, jedoch keine Mikropartikel aufgenommen. Größere Tiere, wie Kaninchen nehmen dagegen bei Langzeitexposition auch Mikropartikel auf. Nicht-aufgenommene Partikel werden durch Makrophagen eliminiert. Außerdem können solche Partikel, die zunächst zwar in die Epithelschicht aufgenommen wurden, diese wieder verlassen, was anschließend wiederum zur Eliminierung durch Makrophagen führen kann.^{1,58}

Zur Exposition der menschlichen Lunge gegenüber Nanopartikeln stehen bisher keine ausführlichen Langzeitstudien zur Verfügung. Die Studien an Zellkulturmodellen aus Lungenepithel- und Endothelzellen von J. Kasper und C. J. Kirkpatrick haben gezeigt, dass sowohl Silica-Nanopartikel (30 nm Durchmesser) als auch Mikropartikel (300 nm) von den Zellen aufgenommen werden.⁴⁵

Für die Entwicklung von Modellsystemen stellt die Anatomie der Lunge eine Herausforderung dar, weil Partikel zwei zusätzliche Barrieren überwinden müssen, um mit Zellen wechselwirken zu können, nämlich die Schleimschicht mit ihren Eliminierungsmechanismen und die Lungensurfactantschicht. Das in dieser Arbeit entwickelte Nanopartikel-Modellsystem soll zunächst an den von J. Kasper entwickelten Trikulturmodellen getestet werden um zelluläre Aufnahmemechanismen für Nanopartikel durch verschiedene Lungenzellen zu untersuchen. Parallel sollen auch Studien zur Wechselwirkung der Nanopartikel mit Lungensurfactant erfolgen.

2.2.4 Wechselwirkung der Nanopartikel mit Proteinen

Die Zirkulationszeit von Nanopartikeln im Blut ist für biomedizinische Anwendungen *in vivo* von enormer Bedeutung. Wie in Abschnitt 2.2.3 (S. 16) erläutert, wird die Aufnahme der Partikel in verschiedene Organe durch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel beeinflusst, wie z. B. die Größe und Oberflächenladung. Dies steht auch in direktem Zusammenhang mit den verschiedenen zellulären Aufnahmemechanismen, die ihrerseits von den beschriebenen Partikeleigenschaften abhängen (Vgl. Abschnitt 2.2.2, S. 14).^{13,59}

Kommt ein Partikel mit einem biologischen, proteinhaltigen Medium in Kontakt, wie z. B. Blut, so findet normalerweise eine Adsorption der Proteine an die Oberfläche dieses Partikels statt.⁶⁰⁻⁶² Die Proteinadsorption wird durch unterschiedliche Charakteristika der Partikel und der Proteine im jeweiligen Medium gesteuert und geht oft mit der Denaturierung und Veränderung der Struktur der adsorbierten Proteine einher.¹⁴ Die Bildung der Proteinkorona führt wiederum zu Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Partikel. So kann eine Adsorption von bestimmten Proteinen zur Bindung der Partikel an zellspezifische Rezeptoren führen und dadurch die Aufnahme der Partikel in entsprechende Zellen vermitteln. Auch die Bildung größerer Nanopartikel-Protein-Cluster, die in Folge des Größenzuwachses zu einer phagocytotischen Aufnahme durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems führt, ist möglich.⁶²

Um eine biologische Antwort hervorrufen zu können, müssen die jeweiligen Proteine in richtiger Orientierung an das Partikel binden. Beispielsweise muss eine Rezeptorbindestelle an einem partikelgebundenen Protein in richtiger Konformation

vorliegen, um mit dem entsprechenden Rezeptor wechselwirken zu können. Auch der zeitliche Aspekt ist von Bedeutung: das Protein muss mindestens genauso lange an das Partikel gebunden bleiben, wie der jeweilige biologische Vorgang dauert.⁶¹

Die Zusammensetzung der Korona wird weitgehend durch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel beeinflusst. So unterscheidet sich die Zusammensetzung der Korona bei aus verschiedenen Materialien bestehenden Partikeln bzw. auch bei Partikeln, die verschiedene funktionelle Gruppen auf der Oberfläche tragen.^{63,64}

Die Proteinkorona ist sehr fest, aber nicht irreversibel an das Partikel gebunden. Sie wird deshalb als harte Korona („hard corona“) bezeichnet. Diese harte Korona ist in der Regel mit einer weiteren Proteinschicht, der sogenannten weichen Korona („soft corona“) assoziiert, die weniger stark an das Partikel gebunden ist.^{61,62,64-66} Die Komplexe aus Nanopartikel und der harten Korona können durch mehrere Waschstufen von den Plasmaproteinen isoliert werden und bleiben dann dauerhaft stabil. Wird allerdings Plasma durch ein anderes proteinhaltiges Medium ersetzt, so kann ein partieller Austausch der Proteine in der harten Korona beobachtet werden.⁶⁷

Die kinetischen Studien der Proteinadsorption wurden von Vroman in den 1960er und 1970er Jahren für die Adsorption von Proteinen an ein flaches Silica-Substrat beschrieben.^{62,68-72} Nach dem Vroman-Modell binden Proteine mit einer höheren Diffusionsrate zuerst an das Substrat und werden später durch Proteine ersetzt, die eine höhere Affinität zum Partikel und eine niedrigere Diffusionsrate aufweisen. Da die Einflüsse der Partikelgröße und Oberflächenkrümmung auf die kinetischen Änderungen der Korona-Zusammensetzung von diesem Modell nicht berücksichtigt werden, ist dieses Modell nur näherungsweise zur Beschreibung der Adsorption der Proteine an Nanopartikel anwendbar.

Die Größe und die Oberflächenkrümmung der Partikel haben oft Auswirkungen auf die Korona-Zusammensetzung.^{63,65} So variiert diese bei unterschiedlich großen Partikeln gleichen Materials. Entgegen den Erwartungen, dass kleine Proteine bevorzugt an kleinere Partikel binden und umgekehrt, konnte in Studien mit Silica-Partikeln und humanem Serum keine Korrelation zwischen den Größen der Proteine und Nanopartikel gefunden werden.⁶⁵ Ferner wurde gezeigt, dass die Größe der Partikel und deren Oberflächenkrümmung auch die Funktionalität der adsorbierten Proteine, wie z. B. ihre enzymatische Aktivität, beeinflussen können.⁷³

Die Oberflächenladung ist ein weiterer Faktor, der neben der Partikelgröße eine wichtige Rolle für die Zusammensetzung der Korona spielt. So binden negativ geladene Silica-Partikel bevorzugt negativ geladene Proteine, was zunächst überraschend erscheint. Wahrscheinlich kommt es hierbei zu Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Proteindomänen und der negativ-geladenen Nanopartikeloberfläche. Ebenso ist es möglich, dass die Adsorption der negativ-geladenen Proteine durch die positiv geladenen Proteine vermittelt wird. Demnach wird zunächst eine erste Schicht, die vorwiegend aus positiv geladenen Proteinen besteht, an die Partikeloberfläche adsorbiert. Diese positiv geladene Schicht führt anschließend zur Adsorption der negativ-geladenen Proteine.⁶⁵

2.3 Poly(organosiloxan)-Nanopartikel allgemein

2.3.1 Einleitung

Poly(organosiloxane), auch Silikone genannt, sind Polymere, welche Einheiten der allgemeinen Struktur $R_1-Si(R_2)_2-O$ enthalten. R_1 ist hierbei ein organischer Rest, so dass eine Kohlenstoff-Silicium-Bindung vorliegt. Die Darstellung derartiger Polymere erfolgt durch Polykondensation der Organosilanole oder Organochlorsilane unter Abspaltung von Wasser oder Chlorwasserstoff.⁷⁴

Wird die Polykondensation der Alkoxysilane in wässriger Emulsion durchgeführt und anschließend mit einem monofunktionalen Monomer abgebrochen, so erhält man hydrophobe, sphärische Nanonetzwerke- sogenannte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel.

In diesem Abschnitt werden der Mechanismus der Polykondensation und die Synthese der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel im Allgemeinen beschrieben.

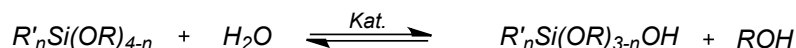
2.3.2 Hydrolyse und Kondensation der Alkoxysilane

Die Darstellung der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel aus verschiedenen Alkoxysilanen verläuft mechanistisch nach einem Sol-Gel-Prozess. Im ersten Schritt erfolgt die Hydrolyse der Alkoxyreste gefolgt von der Kondensation der Hydrolyseprodukte. Schema 2.1 fasst die einzelnen Schritte des Sol-Gel-Prozesses zusammen. Die Synthese der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel erfolgt in wässriger

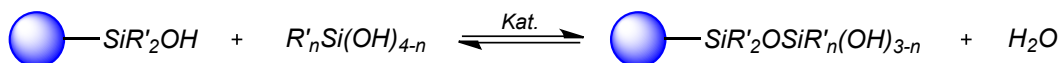
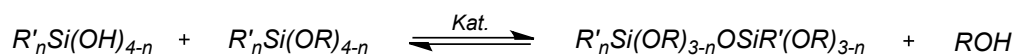
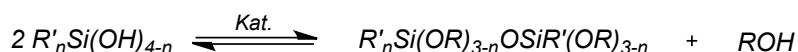
Emulsion, im Gegensatz zu der Synthese der Silica-Nanopartikel in einem Sol-Gel-Prozess, die auf Grund der Nicht-Mischbarkeit der Alkoxysilane mit Wasser in Alkoholen durchgeführt wird.

1. Hydrolyse:

$n=1, 2, 3$



2. Kondensation:



Schema 2.1: Hydrolyse und Kondensation der Alkoxysilane: Reaktionsgleichungen.

Während der Hydrolyse erfolgt der nucleophile Angriff des Sauerstoff-Atoms des Wassermoleküls am Silicium-Atom unter Abspaltung des jeweiligen Alkohols. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse hängt vom pH-Wert des Reaktionsmediums ab und erreicht unter neutralen Bedingungen ihr Minimum. Somit kann die Hydrolyse sauer oder basisch katalysiert werden.⁷⁵⁻⁷⁷

Die Reaktionsmechanismen unter sauren bzw. basischen Bedingungen unterscheiden sich leicht voneinander. Unter sauren Bedingungen erfolgt als erstes die Protonierung der Alkoxygruppe, die zu der Erniedrigung der Elektronendichte am Silicium-Atom führt. Es folgt der nucleophile Angriff des Wasser unter der Abspaltung der Alkoxygruppe. Für die Struktur des Übergangszustands gibt es in der Literatur mehrere Vorschläge. Ein möglicher Ablauf ist der $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionsmechanismus. Bei der Substitution einer guten Abgangsgruppe durch Wasser findet normalerweise eine Inversion der Konfiguration am Silicium-Atom statt. Wird eine schlechte Abgangsgruppe durch Wasser substituiert, so kann die Substitution in Abhängigkeit von Katalysator und Lösemittel auch unter einer Retention der Konfiguration verlaufen. Auch ein $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus unter Bildung eines Siliconium-Ions wurde diskutiert, konnte aber nicht belegt werden.⁷⁵

Unter basischen Bedingungen verläuft die Hydrolyse nach einem S_N2 -Mechanismus. Es findet der nucleophile Angriff der Hydroxylionen am Siliciumatom statt, der zur Bildung eines fünfgliedrigen, trigonal-bipyramidalen Übergangszustands führt. Schließlich folgt die Abspaltung des Alkohols unter Inversion der Konfiguration.^{75,76}

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird neben dem pH-Wert auch von der Kettenlänge und -struktur der Abgangsgruppe beeinflusst. So kann bei ausreichender Kettenlänge die Reaktionsgeschwindigkeit auf Grund der sterischen Hinderung herabgesetzt werden. Auch induktive Effekte beeinflussen die Hydrolysegeschwindigkeit. Im sauren Milieu steigt die Hydrolysegeschwindigkeit mit der Anzahl der elektronenschiebenden Substituenten wie z. B. der Alkylreste da diese Substituenten die positive Partialladung am Silicium stabilisieren. Im basischen Milieu wird die umgekehrte Tendenz beobachtet. Daraus resultiert, dass die Reaktion unter sauren Bedingungen mit steigendem Hydrolysegrad langsamer abläuft. Unter basischen Bedingungen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit hingegen zu.⁷⁵

In zweiten Schritt des Sol-Gel-Prozesses findet die Kondensation der während der Hydrolyse entstandenen Silanole mit Alkoxysilanen oder anderen Silanolen statt. Diese verläuft nach einem S_N2 -Mechanismus unter Abspaltung von Wasser bzw. Alkohol. Bei der Reaktion findet der nucleophile Angriff der Silanol-Gruppe am Silicium-Atom statt, wobei die Silanol-Gruppe, abhängig von der Acidität des jeweiligen Moleküls, protoniert oder deprotoniert vorliegen kann. Die Kondensationsgeschwindigkeit weist einen pH-abhängigen Verlauf auf mit einem Geschwindigkeitsminimum bei pH 3-4, bedingt durch den isoelektrischen Punkt (IEP) von Silica, der zwischen pH 1.5 und 4.5 variiert. Der isoelektrische Punkt von Silica wird von dem Vorschritt der Kondensation beeinflusst: Die Substitution der Hydroxy- und Alkoxygruppen durch Silylester (OSi) führt zu einer Abnahme der Elektronendichte am Silicium-Atom und somit zu einer Erhöhung der Acidität der noch verbleibenden Silanol-Gruppen. Dadurch wird die Kondensation der höher kondensierten Siloxane mit weniger hoch kondensierten bevorzugt. Auch induktive Effekte der weiteren organischen Substituenten am Silicium-Atom haben Einfluss auf die Lage des IEPs von Siloxanen. Elektronenschiebende Substituenten, wie z. B. Alkyl-Gruppen, bewirken die Erniedrigung der Acidität des entstehenden Silanols, was die Verlagerung des IEPs zu höheren pH-Werten zur Folge hat.⁷⁸ Der Fortschritt der Kondensation und Art der Organosubstituenten am Silicium-Atom bestimmen somit, ob die Kondensation nach dem sauren oder basischen Mechanismus verläuft. Bedingt durch

den IEP von Silica weist die Kondensationsgeschwindigkeit einen pH-abhängigen Verlauf auf mit einem Geschwindigkeitsminimum bei pH 3-4.⁷⁵⁻⁷⁷

Der gesamte Sol-Gel-Prozess lässt sich in zwei pH-Bereiche einteilen. Im Säuren (pH = 2-5) ist die Hydrolysereaktion bevorzugt. Die Kondensation ist somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Aus elektronischen Gründen finden unter diesen Bedingungen die Reaktionen bevorzugt an terminalen Silicium-Atomen statt. Es entstehen Gele mit einem niedrigen Verzweigungsgrad. Dahingegen ist unter basischen Bedingungen die Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Kondensation findet bevorzugt am zentralen Silicium-Atom einer Oligomer-Einheit statt, wodurch ein höheres Verzweigungsgrad erreicht wird.^{75,79}

2.3.3 Synthese der hydrophoben Kern-Schale-Systeme

Die Synthese der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in wässriger Emulsion wurde von F. Baumann und M. Schmidt in den 1990er Jahren entwickelt.⁸⁰⁻⁸³ Bei der Polykondensation werden hydrophobe Alkoxysilane Trimethoxymethylsilan (**T**) und Diethoxydimethylsilan (**D**) verwendet (Abbildung 2.7 links und Mitte). Das monofunktionelle Monomer Ethoxytrimethylsilan (**M**, Abbildung 2.7 rechts) wird zur Deaktivierung der nach der Polykondensation noch vorhandenen reaktiven Gruppen, dem so genannten Endstoppen, eingesetzt.

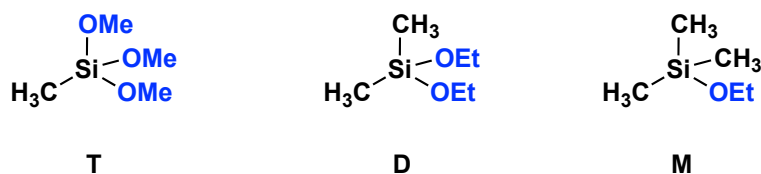


Abbildung 2.7: Monomere bei der Synthese der Poly(organosiloxan)-Nanonetzwerke. Trimethoxymethylsilan (**T**, links) fungiert als Vernetzer und Diethoxydimethylsilan (**D**, Mitte) als Kettenbildner. Das monifunktionelle Monomer Ethoxytrimethylsilan (**M**, rechts) wird als Endstopper verwendet.

Die Monomertröpfchen werden durch Tenside stabilisiert. Wie im vorherigen Abschnitt 2.3.2 beschrieben, können Hydrolyse und Kondensation der Alkoxysilane sowohl unter basischen als auch unter sauren Synthesebedingungen durchgeführt werden.

Im Säuren wird Dodecylbenzolsulfonsäure als Tensid und Katalysator eingesetzt (Abbildung 2.8 links). Im Basischen wird Benzethoniumchlorid als Tensid verwendet (Abbildung 2.8 rechts). Der pH-Wert wird mit Natronlauge eingestellt.

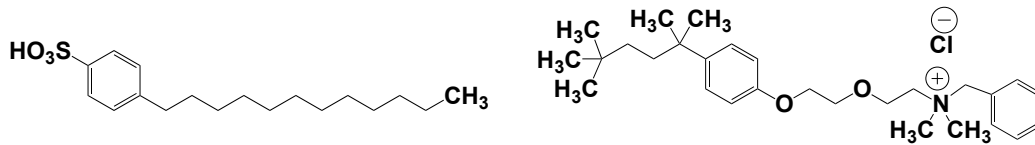


Abbildung 2.8: Tenside für bei der Synthese der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel. Links: Dodecylbenzolsulfonsäure (DBS), rechts: Benzethoniumchlorid (Bzt-Cl).

Die Größe der entstehenden Partikel hängt, ähnlich wie bei einer Polymerisation in Mikroemulsion, vom Flottenverhältnis S ab (Gleichung (2-7)), also vom Verhältnis der Masse des Tensids (m_{Tensid}) zu Masse des Monomers ($m_{Monomer}$).

$$S = \frac{m_{Tensid}}{m_{Monomer}} \quad (2-7)$$

Zur Beschreibung der Polymerisation in Mikroemulsion existieren zur Zeit zwei verschiedene Modelle. Das ältere, von Antonietti⁸⁴ vorgeschlagene Modell geht davon aus, dass die Alkylketten des Tensids nicht in das zu stabilisierende Ölpartikel integriert sind und dass das Tensid eine Monoschicht um das Partikel bildet.

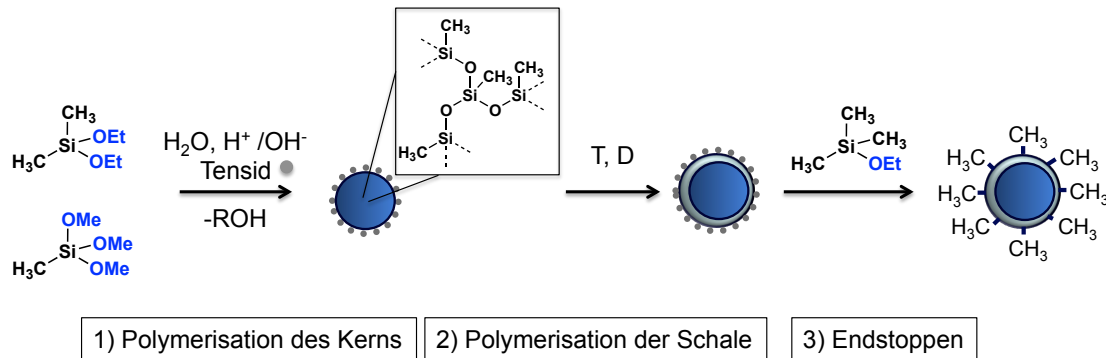
Das Modell von Wu⁸⁵ ist eine Weiterentwicklung Antoniettis Modells. Es postuliert, dass die Alkylketten des Tensid-Moleküls in das Partikel hineinragen. Somit liefert nur die Kopfgruppe des Tensids einen Beitrag zu dem hydrodynamischen Radius des Partikels. Es resultiert ein linearer Zusammenhang zwischen dem Partikelradius R und dem Kehrwert des Flottenverhältnisses S^{-1} :

$$S^{-1} = \frac{N_A \rho_P}{3M_T} a_0 R + C \quad (2-8)$$

Hierbei ist N_A die Avogadro-Konstante, ρ_P die Partikeldichte in Lösung, M_T die Molmasse des Tensids, a_0 der Platzbedarf der Tensidkopfgruppe und C eine von der Schichtdicke des Tensids abhängige Konstante.

Die Mikroemulsionsmodelle von Antonietti⁸⁴ und Wu⁸⁵ lassen sich nur bedingt auf die Polykondensation der Alkoxysilane anwenden. Es wird zwar oft, ähnlich wie bei einer Polymerisation in der Mikroemulsion ein linearer Zusammenhang zwischen dem Kehrwert des Flottenverhältnisses und der Größe der Partikel beobachtet, allerdings werden für die Fläche der Tensidkopfgruppe oft zu hohe und für die Dicke der Tensidschicht teilweise auch negative Werte erhalten.^{81,86} Dies ist ein Hinweis dafür, dass bei dem Poly(organosiloxan)-System weitere Effekte berücksichtigt werden müssen. Mit fortschreitender Reaktion werden die hydrophoben Monomere in der Nähe der Grenzfläche hydrolysiert, wodurch die Hydrophilie des Systems zunächst steigt und neben der Stabilisierung durch das Tensid auch eine Art von Selbststabilisierung auftritt. Mit weiterem Fortschreiten der Kondensation werden die polaren Gruppen umgesetzt und die Hydrophilie des Systems sinkt wieder. Unter bestimmten Bedingungen können die teilweise polymerisierten Ketten auch als Ultrahydrophob fungieren, wodurch das System auch Elemente einer Miniemulsion enthält.^{87,88} Nach Vollendung der Polykondensation weisen die Partikel hydrophobe und hydrophile Domänen auf ihrer Oberfläche auf. Die hydrophoben Domänen müssen durch das Tensid stabilisiert werden, wohingegen die hydrophilen Domänen nicht mit Tensid bedeckt sind. Im Gegensatz zu Polymerisation in der Mikroemulsion wird somit keine vollständige Belegung der Oberfläche mit Tensid erreicht, was zu hohe experimentelle Werte für den Platzbedarf der Tensidkopfgruppe erklärt.^{81,89}

Neben der Größe können auch weitere Partikeleigenschaften direkt während der Polykondensation variiert werden. So ermöglicht beispielsweise die Änderung des Verhältnisses von dem vernetzenden **T** und dem kettenbildenden **D** die Synthese von Partikeln unterschiedlicher Dichten und Porengrößen. Durch eine sequenzielle Monomerzugabe können Kern-Schale-Partikel dargestellt werden.^{80-83,87,88}



Schema 2.2: Synthese der Poly(organosiloxan)-Kern-Schale Systeme. Als erstes erfolgt die Polykondensation des Kern in wässriger Emulsion. Durch eine sequenzielle Zugabe der Monomere für die Schale werden Kern-Schale-Partikel aufgebaut, die von Tensid stabilisiert sind. Nach Endstoppen der reaktiven OH- und O⁻-Gruppen auf der Partikeloberfläche mit monofunktionellem Endstopper erhält man die hydrophoben Nanonetze.

Bei der Partikelsynthese (Schema 2.2) wird die Monomermischung zunächst langsam mit konstanter Geschwindigkeit zur Tensid-Lösung zugegeben. Nach Polykondensation des Kerns erfolgt, wenn gewünscht, die Zugabe der Monomere für die Partikelschale, die dann ebenfalls polymerisiert wird. Anschließend enthält man Partikel, die durch das Tensid stabilisiert sind und zum Teil reaktive Hydroxy- oder Alkoxy-Gruppen auf ihrer Oberfläche enthalten. Diese Gruppen können durch interpartikuläre Reaktionen irreversible Aggregation der Partikel verursachen. Um dies zu verhindern folgt nach der Polykondensation eine Art Abbruchsreaktion, das sogenannte Endstoppen (Endcapping) der Partikeloberfläche. Während des Endstoppens werden die fertigen Netzwerke mit dem monofunktionellen Monomer Ethoxytrimethylsilan (**M**, Abbildung 2.7 rechts) über zwei Stufen umgesetzt. Der erste Schritt erfolgt in einem Zwei-Phasen-System bestehend aus der wässrigen Partikeldispersion und dem nicht-wasserlöslichen Endstopper. Man erhält Partikel, deren Oberflächen nur teilweise mit hydrophoben Gruppen abgesättigt sind. Um das Endstoppen zu vervollständigen wird das Produkt in ein unpolares Lösungsmittel überführt und erneut mit Endstopper umgesetzt. Nach dem Endstoppen enthält man hydrophobe Partikel, die auch nach Trocknung in den meisten unpolaren Lösungsmitteln redispersierbar sind.⁸³

2.3.4 Funktionalisierte Nano-Netzwerke

Das Polykondensationsverfahren erlaubt den Aufbau von Partikeln mit verschiedenen kugelförmigen Topologien. Durch sequenzielle Monomerzugabe können Systeme aufgebaut werden, die aus Kern und mehreren Schalen bestehen. Wird für die Polykondensation des Kerns nur das kettenbildende Monomer **D** verwendet und die Polymerisation von den entstehenden PDMS-Ketten durch Zusatz von **M** vor der Zugabe der Schale abgebrochen, so können die PDMS-Ketten nach dem Endstoppen der Partikel bei ausreichend niedriger Netzwerkdichte der Schale durch Ultrafiltration entfernt werden. Es entstehen Partikel mit Hohlkugelarchitektur.^{82,83,86-88,90,91}

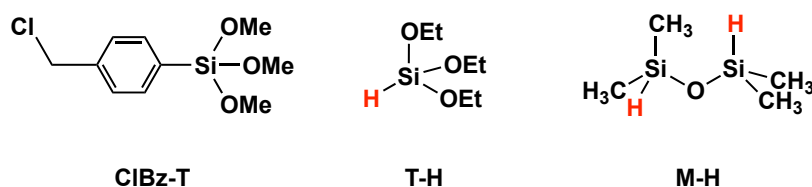


Abbildung 2.9: Funktionalisierte Monomere *p*-Chloromethylphenyl-trimethoxysilan (CIBz-T, links), Triethoxysilan (T-H, Mitte) und Tetramethyldisiloxan (M-H, rechts).

Die flexible Alkoxysilan-Chemie ermöglicht weiterhin auch chemische Modifikation der Nano-Netzwerke durch Verwendung von unterschiedlichen funktionellen Bauelementen. So konnten in den vergangenen Jahren verschiedene hydrophobe Monomere in das Poly(organosiloxan)-System eingebaut werden (Abbildung 2.9).

Mit dem Einbau von *p*-Chloromethylphenyl-trimethoxysilan (**CIBz-T**) werden im Kern der Partikel reaktive Gruppen eingeführt, die anschließend umfunktionalisiert werden können. Ausgehend von Chlorobenzyl-funktionalisierten Netzwerken können beispielsweise fluoreszenzmarkierte Partikel durch die nachträgliche Markierung des Kerns nach der Partikelsynthese dargestellt werden.⁹²⁻⁹⁴ Auch die Synthese von Partikeln mit amphiphilem Partikelinneren wurde durch Umsetzung der Chlorobenzylgruppen in einer Quaternisierungsreaktion mit Dimethylaminoethanol realisiert.^{90,91} Solche amphiphilen Netzwerke können nicht-kovalent mit hydrophilen, in unpolaren Lösemitteln unlöslichen Farbstoffen beladen werden.^{90,95} Des Weiteren können solche amphiphilen Partikel auch als Phasentransferkatalysatoren und Nanoreaktoren bei der Synthese von Metallkolloiden verwendet werden.^{90,96} Auch die Verwendung von Triethoxysilan (**T-H**)

bei der Polykondensation des Kerns und die dadurch erreichte Funktionalisierung des Kerns mit Siliciumhydridgruppen erlaubt die Verwendung der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel als Nanoreaktoren bei der Synthese von Goldkolloiden.⁹⁷

Alle oben genannten Funktionalisierungen wurden an Partikeln mit einer hydrophoben, nicht-reaktiven Oberfläche durchgeführt, also an nicht biokompatiblen Partikeln. Werden während der Polykondensation der Schale oder durch die Verwendung des hydridofunktionalisierten Endstoppers Tetramethyldisiloxan (**M-H**) die Siliciumhydridgruppen auf der Partikeloberfläche eingeführt, so kann die Partikeloberfläche anschließend nach der Grafting-to-Methode weiter modifiziert werden.⁹⁸⁻¹⁰⁵

Während der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit wurden die ersten Untersuchungen zur Synthese der fluoreszenzmarkierten und biokompatiblen Poly(organosiloxan)-Nanopartikel durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung des Partikelkerns wurde durch Cokondensation mit Fluorophor-Monomeren erzielt (Vgl. Kapitel 4, S. 45). Gleichzeitig wurden in der Partikelschale Siliciumhydridgruppen eingeführt. Die anschließende Reaktion mit dem heterobifunktionellen α -Allyl- ω -carboxy-Poly(ethylenglykol) (PEG) in einer Hydrosilylierungsreaktion lieferte wasserlösliche und biokompatible Partikel.^{100,101}

S. Utech verwirklichte die Verkapselung ladungsstabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel in das Poly(organosiloxan)-System während der Polykondensation. Auch diese Partikel konnten mit Fluorophor-Monomer im Kern markiert und mit Siliciumhydridgruppen auf der Partikeloberfläche funktionalisiert werden. Durch anschließende PEGylierung wurden wasserlösliche, magnetische Nanokomposite erhalten.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Die Hydrosilylierungsreaktion wird durch Karstedt-Katalysator, ein Platin-Divinyltetramethyldisiloxan-Komplex katalysiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen haben gezeigt, dass während der Hydrosilylierungsreaktion Platinkolloide gebildet werden, die nicht vollständig von den wasserlöslichen Poly(organosiloxan)-Nanopartikel abgetrennt werden können. Die von S. Utech durchgeführte Emissionsmessungen sowie die Bestimmung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten zu Beginn dieser Arbeit zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität bzw. der absoluten Quantenausbeuten nach der Oberflächenfunktionalisierung. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Reabsorption von Fluoreszenzlicht durch die als

Nebenprodukt entstandene Platinkolloide sein.¹⁰⁸ Auch eine teilweise Zerstörung des Farbstoffs durch den Katalysator kann nicht ausgeschlossen werden.

Durch den Rückgang der Fluoreszenzquantenausbeuten und das Verbleiben der Platinkolloide in Lösung sind die in einer Hydrosilylierungsreaktion PEGylierten Poly(organo)siloxan) nur bedingt als Modellsystem zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen einsetzbar, was die Erarbeitung neuer Synthesewege zur Oberflächenmodifizierung notwendig erscheinen ließ.

3 Charakterisierungsmethoden

3.1 Lichtstreuung

3.1.1 Allgemeine Einführung

Die Lichtstreuung ist eine Methode zur Analyse der kolloidalen Teilchen in Lösung und liefert Informationen über die statischen und dynamischen Eigenschaften der Partikel.

Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau einer Lichtstreuapparatur. Bei einem Lichtstreuexperiment wird das Laserlicht hoher Intensität auf eine mit der Probe gefüllte Küvette fokussiert. Dadurch werden die Elektronen zu Schwingungen angeregt und ein oszillierendes Dipolmoment induziert. Die induzierten Dipole emittieren schließlich das Licht als ungerichtetes Streulicht, das in Phase und Frequenz mit dem Primärstrahl übereinstimmt. In einer winkelabhängigen Messung erfolgt die Detektion von Streulicht schließlich bei verschiedenen Winkeln θ , die in der Regel zwischen 15° und 150° liegen.

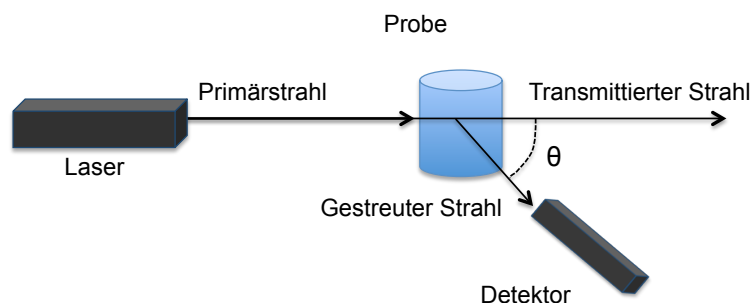


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuapparatur.

Oft wird nicht der Streuwinkel sondern der Betrag des Streuvektors q angegeben:

$$q = \frac{4\pi n \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (3-1)$$

mit dem Brechungsindex des Lösungsmittels n , der Wellenlänge des einstrahlenden Laserlichts λ und dem Streuwinkel θ .

In der statischen Lichtstreuung (SLS) wird die gemittelte Streuintensität bei unterschiedlichen Streuwinkeln und Konzentrationen der Probe gemessen. Die Auswertung liefert anschließend, das Gewichtsmittel des Molekulargewichts M_w , das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats $\langle R_g^2 \rangle_z$ und den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks A_2 . Für Teilchen, die größer sind als $\lambda/20$, erhält man aus der Winkelabhängigkeit auch die Information über die Form der Teilchen. In der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird dagegen die zeitliche Fluktuation der Streuintensität beobachtet. Man erhält Informationen über die dynamischen Eigenschaften der Probe. Aus dem z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z wird der hydrodynamische Radius R_h ermittelt.

3.1.2 Dynamische Lichtstreuung

In der dynamischen Lichtstreuung¹⁰⁹ wird die zeitliche Fluktuation der Streuintensität $I(t)$ gemessen, die durch die Brownsche Molekularbewegung der Teilchen verursacht wird. Die Diffusionsgeschwindigkeit hängt von der Größe der Partikel ab. Kleine Teilchen, die einen großen Diffusionskoeffizienten aufweisen, führen zu stärkeren Fluktuationen der Streuintensität, als größere Partikel. Bei der dynamischen Lichtstreuung werden die detektierten Photonen nicht über einen Zeitraum gemittelt, sondern mit sich selbst korreliert. Das Streusignal wird in die normierte Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ transformiert:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(\tau) * I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (3-2)$$

In der Autokorrelationsfunktion (AKF) wird die Streuintensität zum Zeitpunkt t mit der Streuintensität zu einem späteren Zeitpunkt der $t + \tau$ multipliziert. Dieser Vorgang wird für unterschiedliche Startzeiten durchgeführt und anschließend über alle Werte gemittelt. Das Quadrat der Streuintensität $\langle I^2 \rangle$ wird als Maximalwert der Autokorrelationsfunktion erhalten. Wenn die Korrelationszeit zunimmt, fällt die Funktion bis auf den Wert $\langle I \rangle^2$ ab (Abbildung 3.2).

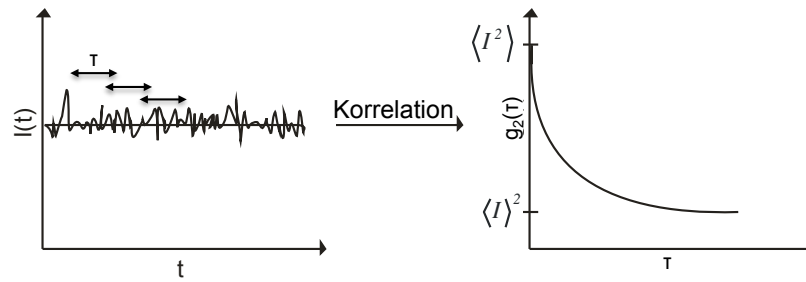


Abbildung 3.2: Zeitabhängige Fluktuation der Streuintensität und Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$.

Die Umrechnung der Autokorrelationsfunktion der Streuintensität $g_2(\tau)$ in die Autokorrelationsfunktion der Streuamplitude $g_1(\tau)$ erfolgt mit der Siegert-Relation:

$$g_1(\tau) = \sqrt{g_2(\tau) - 1} \quad (3-3)$$

Für kleine, monodisperse Teilchen fällt $g_1(\tau)$ monoexponentiell ab:

$$g_1(\tau) = \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_D}\right) \quad (3-4)$$

mit Relaxationszeit τ_D :

$$\tau_D = \frac{1}{q^2 D} \quad (3-5)$$

D ist der translatorische Diffusionskoeffizient und q der Streuvektor.

Die Autokorrelationsfunktion eines polydispersen Systems ergibt sich aus einer Überlagerung der Exponentialfunktionen der einzelnen Komponenten i nach einer Wichtung mit der Verteilungsfunktion $P(D)$, die von der Anzahl der Partikel, der Masse M_i und den Partikelformfaktor $P_i(q)$ abhängt.

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} P(D) \exp(-q^2 D \tau) dD \quad (3-6)$$

Die Autokorrelationsfunktion eines polydispersen Systems kann oft durch eine biexponentielle Fitfunktion angenähert werden. Dabei wird das polydisperse System als Mischung aus zwei monodispersen Komponenten betrachtet:

$$g_1(\tau) = a_1 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{D1}}\right) + a_2 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{D2}}\right) \quad (3-7)$$

Die Parameter $a_{1,2}$, die den Beitrag der einzelnen Komponenten zur Streuintensität beschreiben sowie die Relaxationszeit τ_D werden durch die Anpassung der experimentellen Daten ermittelt.

Oft wird auch das Kumulantenverfahren zur Annäherung der Autokorrelationsfunktion eines polydispersen Systems verwendet:

$$\ln g_1(\tau) = -\mu_1 \tau + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \tau^3 + \dots + \frac{\mu_n (-1)^n}{n!} \tau^n \quad (3-8)$$

Aus dem ersten Kumulanten μ_1 wird der Diffusionskoeffizient D ermittelt. Für harte Kugeln ist der zweite Kumulant μ_2 mit der Polydispersität der Verteilungsfunktion des Diffusionskoeffizienten σ_D verknüpft:

$$\sigma_D = -\frac{\sqrt{(\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2)}}{\langle D \rangle} = \sqrt{\frac{\mu_2}{\mu_1^2}} \quad (3-9)$$

Die μ_2 -Werte bei $\theta = 90^\circ$ liegen für engverteilte Proben typischerweise zwischen 0.05 und 0.1. Werte größer als 0.1 weisen auf polydisperse Systeme hin.

Der Diffusionskoeffizient eines polydispersen Systems, in dem keine Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten auftreten, hängt oft von dem Streuvektor q ab, weshalb es als apparenter Wert bezeichnet wird:

$$D_{app}(q) = \frac{\sum n_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum n_i M_i^2 P_i(q)} \quad (3-10)$$

mit der Anzahl der Partikel n_i , der Masse M_i und den Partikelformfaktor $P_i(q)$.

Aus Extrapolation des apparenten Diffusionskoeffizienten $q^2 \rightarrow 0$ wird das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten $\langle D \rangle_z$ ermittelt. Der hydrodynamische Radius kann anschließend mit der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet werden:

$$\langle R_h \rangle_{z^{-1}} = \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} = \frac{kT}{6\pi\eta \langle D \rangle_z} \quad (3-11)$$

3.1.3 Dynamische Lichtstreuung unter physiologischen Bedingungen

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung der Nanopartikel, die als Modellsysteme zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Lungenzellen verwendet werden sollen. Die Größe und der Aggregationszustand der Nanopartikel werden oft sehr stark von dem verwendeten Lösungsmittel beeinflusst. Das hat zur Folge, dass die Größe der Nanopartikel in den komplexen physiologischen Medien sich von der in Wasser oder in einem anderen Lösungsmittel gemessenen Größe unterscheiden kann. Deshalb ist die Charakterisierung der Partikel unter den gleichen Bedingungen, wie in den zellulären Aufnahmeexperimenten, notwendig. Bei den *in vitro* Studien wird das Zellkulturmedium RPMI 1640ⁱ, das unter anderem isotonische Natriumchloridlösung sowie verschiedene Zucker und Aminosäuren enthält, als das Nährmedium für die Zellen und das Lösungsmittel für die Nanopartikel verwendet. Um in den *in vitro* Studien die Bedingungen einer Nanopartielexposition *in vivo* möglichst genau zu reproduzieren wird dem Zellkulturmedium das fetale Kälberserum (FCS) zugesetzt. Letzteres enthält unterschiedliche Serumproteine und weist deshalb eine multimodale Größenverteilung auf. Die Mischung aus den Nanopartikel und dem Serum stellt es sich somit ein komplexes System dar, dass aus mehreren, polydispers verteilten Komponenten besteht.

Das Verfahren zur Untersuchung der polydispersen Multikomponentensysteme mit DLS wurde vor Kurzem von K. Rausch und M. Schmidt beschrieben.^{110,111}

Die Autokorrelationsfunktion eines polydispersen Systems wird in der Regel durch eine multiexponentielle Fitfunktion beschrieben, der sich als Summe der Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Komponenten formulieren lässt (3-6). Analog kann die Autokorrelationsfunktion einer Mischung $g_{I,M}(\tau)$, die aus zwei polydispersen, nicht mit einander wechselwirkenden Systemen A und B mit unterschiedlichen Brechungsindizes n besteht, als Summe der Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Komponenten $g_{I,A}(\tau)$ und $g_{I,B}(\tau)$ angepasst werden:

$$g_{1,M}(\tau)_M = f_A g_{1,A}(\tau)_A + f_B g_{1,B}(\tau)_B \quad (3-12)$$

ⁱ genaue Zusammensetzung Tabelle 12.1, S. 159

Die Parameter $f_{A,B}$ sind die Streuintensitätsbeiträge der jeweiligen Komponenten zu der Autokorrelationsfunktion der Mischung. Die Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Komponenten A und B können durch separate Messungen der einzelnen Komponenten ermittelt werden. Anschließend werden aus der Messung der Mischung aus A und B die Intensitätsbeiträge f der beiden Komponenten zu der Autokorrelationsfunktion der Mischung bestimmt.

K. Rausch^{110,111} wandte die Multikomponentenanalyse der DLS-Daten zur Untersuchung der Interaktion von unterschiedlichen Nanopartikeln mit Blutserum an. Die Nanopartikel-Protein-Mischung wurde dabei als ein System betrachtet, das aus Nanopartikeln ohne Proteinkorona, Serumproteine und Nanopartikel-Protein-Aggregate besteht. Um die Aggregation der Nanopartikel zu berücksichtigen wurde die Gleichung (3-12). um ein weiteres Term erweitert:

$$g_{1,M}(\tau) = f_S g_{1,S}(\tau) + f_{NP} g_{1,NP}(\tau) + f_{Agg} g_{1,Agg}(\tau) \quad (3-13)$$

mit den Autokorrelationsfunktionen der Mischung $g_{1,M}(\tau)$, des reinen Serums $g_{1,S}(\tau)$, der Nanopartikel ohne Proteine $g_{1,NP}(\tau)$ und der Nanopartikel-Protein-Aggregate $g_{1,Agg}(\tau)$ sowie den Intensitätsbeiträgen f der jeweiligen Komponenten.

Die Nanopartikel und Serumproteine wurden zunächst getrennt voneinander charakterisiert, um die einzelnen Autokorrelationsfunktionen $g_{1,S}(\tau)$ und $g_{1,NP}(\tau)$ zu ermitteln. Mit den bekannten Parametern der einzelnen Autokorrelationsfunktionen wurden dann der Diffusionskoeffizient der Aggregate sowie die Streuintensitätsbeiträge f der einzelnen Mischungskomponenten nach Gleichung (3-13) berechnet. Die Autokorrelationsfunktion der Aggregate $g_{1,Agg}(\tau)$ wurde dabei mit einer monoexponentiellen Anpassung beschrieben. Als Kriterium für die Güte der Anpassung wurde das Residuum betrachtet.^{110,111}

Die Aggregation der Partikel in Anwesenheit der Serumproteine liefert einen Hinweis darauf, dass die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den Nanopartikeln auftreten und Proteinadsorption an die Partikeloberfläche stattfindet. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ist die Konzentration der Serumproteine deutlich höher, als die Konzentration der Nanopartikel. Falls Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln und den Proteinen auftreten, ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass in einem Nanopartikel-Protein-Gemisch neben den Nanopartikel-Protein-Agglomeraten

tatsächlich noch Nanopartikel ohne Proteinkorona in einer detektierbaren Menge vorliegen. Die von K. Rausch entwickelte Methode musste deshalb modifiziert werden.

Eine Mischung aus den Nanopartikel und den Serumproteinen kann als ein Gemisch aus den Serumproteinen und den Nanopartikel-Protein-Komplexen betrachtet werden. Die Autokorrelationsfunktion der Mischung $g_{l,M}(\tau)$ setzt sich in diesem Fall deshalb aus der Autokorrelationsfunktion des Serums $g_{l,S}(\tau)$ und der Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Protein-Komplexe $g_{l,P-NP}(\tau)$ unter Berücksichtigung der Intensitätsbeiträge f zusammen:

$$g_1(\tau)_m = f_S g_{1,S}(\tau)_S + f_{P-NP} g_{1,P-NP}(\tau)_{P-NP} \quad (3-14)$$

mit dem Amplitudenanteil des Serums f_S und dem Amplitudenanteil der Nanopartikel-Protein-Komplexe f_{P-NP} .

Die Autokorrelationsfunktion des Serums $g_{l,S}(\tau)$ wird durch eine triexponentiellen Fitfunktion beschrieben:

$$g_{1,S}(\tau) = a_{1,S} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{D1,S}}\right) + a_{2,S} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{D2,S}}\right) + a_{1,S} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{D3,S}}\right) \quad (3-15)$$

Zur Beschreibung Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Protein-Komplexe wird die biexponentielle Anpassung angewendet:

$$g_{1,P-NP}(\tau) = a_{1,P-NP} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{1,P-NP}}\right) + a_{2,P-NP} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{2,P-NP}}\right) \quad (3-16)$$

Die Parameter a_S und $\tau_{D,S}$ aus der Autokorrelationsfunktion des Serums werden durch eine separate Messung ohne Nanopartikel ermittelt. Anschließend wird die Mischung aus den Nanopartikel und Proteinen charakterisiert. Bei der Auswertung der Mischung werden die nun bekannten Parameter $a_{l,S}$ und $\tau_{D,S}$ aus der Autokorrelationsfunktion des Serums in Gleichung (3-14) eingesetzt und konstant gehalten. Aus der Fitfunktion erhält man dann die Streuintensitätsbeiträge des Serums f_S und der Nanopartikel-Protein-Komplexe f_{P-NP} sowie den apparenten Diffusionskoeffizienten $D_{h,App}$ der Nanopartikel-Protein-Komplexe. Der z-Mittelwert des Diffusionskoeffizienten wird anschließend durch Extrapolation $q \rightarrow 0$ ermittelt.

3.2 Bestimmung des ζ -Potentials

Geladene Partikeln werden durch elektrostatische Kräfte in Lösung stabilisiert. Ein geladenes Teilchen in Lösung ist umgeben von einer Schicht aus den Gegenionen. Die repulsiven Kräfte, die zwischen den Ionenhüllen zweier Teilchen wirken, verhindern die Aggregation der Partikel (Vgl. Abschnitt 2.1.2.1, S. 7). Die Ionenschicht wird in zwei Bereiche unterteilt: die Stern-Schicht (innere Schicht) und die diffuse Ionenschicht (äußere Schicht). Die Grenze zwischen der Stern-Schicht und der diffusen Schicht wird als äußere Helmholtzfläche bezeichnet. Das Potential an der äußeren Helmholtzfläche nennt man Potential der diffusen Schicht Ψ^d (Vgl. Abschnitt 2.1.2.1, S. 7 sowie Abbildung 2.1 S. 7).

Wird durch ein elektrisches Feld oder durch eine mechanische Kraft die tangentielle Bewegung der Flüssigkeit entlang der Teilchenoberfläche erzeugt, so bleibt eine dünne Flüssigkeitsschicht an die Teilchenoberfläche gebunden und bewegt sich nicht. Die Grenze zwischen beweglicher und nicht-beweglicher Flüssigkeit wird als hydrodynamische Scherfläche bezeichnet. Das Potential an dieser Fläche nennt man das elektrokinetische Potential oder das ζ -Potential. Die Scherfläche befindet sich in der Nähe der äußeren Helmholtzfläche. Die genaue Lage ist unbekannt, da beide Grenzen in der Realität nicht scharf definiert sind. Es ist wahrscheinlich, dass in der fest gebundenen inneren Ionenschicht keine Bewegung der Flüssigkeit stattfindet, sondern dass die Flüssigkeitsbewegung erst in der diffusen Ionenschicht beginnt. Demnach gilt: $|\zeta| \leq |\Psi^d|$.^{23,26}

Bei der Flüssigkeitsbewegung unterscheidet man zwischen Elektroosmose und Elektrophorese. In dieser Arbeit wurde das ζ -Potential mittels der elektrophoretischen Lichtstreuung bestimmt. Bei der elektrophoretischen Lichtstreuung wird ein äußeres elektrisches Feld angelegt, in dem sich das Teilchen auf Grund ihrer Oberflächenladung bewegt. Auf Grund des Doppler-Effekts erfährt das von dem Partikel gestreute Licht eine Frequenzverschiebung.

Für $\kappa a \gg 1$ (a : Partikelradius; κ : Debye-Hückel-Parameter) besteht nach der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung ein Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Geschwindigkeit des Teilchens v_e und dem ζ -Potential:²⁶

$$v_e = \frac{\varepsilon_{rs} \varepsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (3-17)$$

Mit der Dielektrizitätskonstante im Lösungsmittel ε_{rs} , der Dielektrizitätskonstante im Vakuum ε_0 , der Viskosität des Lösungsmittels η und der elektrischen Feldstärke E .

Für die elektrophoretische Mobilität u_e gilt folgender Zusammenhang:

$$u_e = \frac{v_e}{E} \quad (3-18)$$

Das ζ -Potential kann anschließend aus der elektrophoretischen Mobilität berechnet werden.

3.3 Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss Fraktionierung

Die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) ist eine Methode zur Separation von kolloidalen Teilchen bei der die Trennung der Partikel nach ihrem hydrodynamischen Radius in einem Kanal mit einem parabolischen Flussprofil erfolgt. Im Gegensatz zu den chromatographischen Methoden, wie beispielsweise der Gelpermeationschromatographie, wird in der FFF keine stationäre Phase zur Trennung der Partikel verwendet. Somit entstehen auch keine Wechselwirkungen zwischen den Partikel und der stationären Phase. Zur Separation der Teilchen wird stattdessen ein äußeres Feld angelegt, in dem die Teilchen anhand ihres hydrodynamischen Verhaltens getrennt werden. Bei dem äußeren Feld handelt es sich bei den üblichen FFF-Geräten um ein elektrisches Feld, einen Temperatur-, oder Sedimentationsgradienten oder, wie bei der in dieser Arbeit verwendeten asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss Fraktionierung (AF-FFF), einen zweiten Lösungsmittelstrom, den Querfluss.^{112,113} In Abbildung 3.3 ist der Aufbau der AF-FFF schematisch dargestellt.

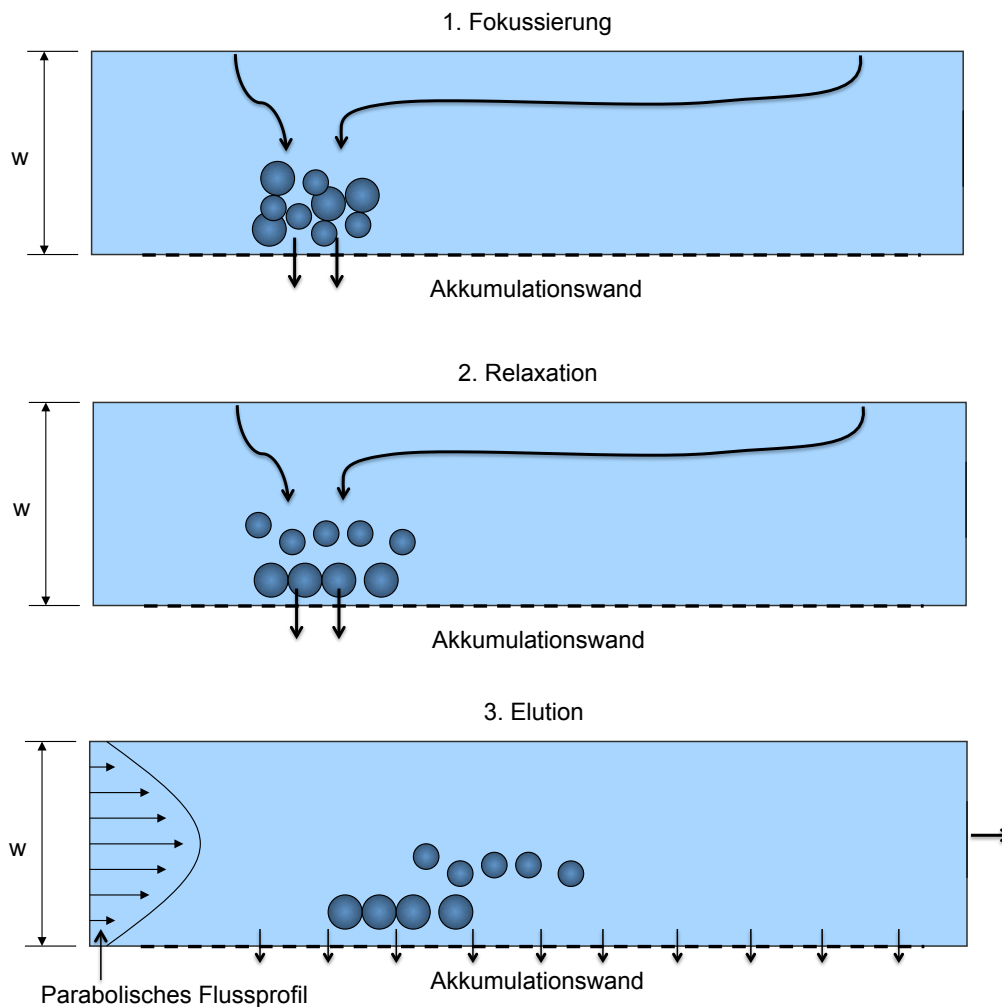


Abbildung 3.3: Schematischer Ablauf der AF-FFF-Messung. Die Probe wird durch den Querfluss an der semipermeablen Akkumulationswand fokussiert (1). Anschließend erfolgt auf Grund eines Konzentrationsgefälles die Relaxation der Teilchen (2) gefolgt von der Elution der Teilchen im parabolischen Flussprofil (3).

Der Ablauf der AF-FFF-Messung lässt sich in drei Phasen unterteilen: Fokussierung, Relaxation und Elution. Nach der Injektion in den Kanal wird die Probe zunächst durch das Anlegen von zwei Kanalströmen an der aus einer semipermeablen Membran bestehenden Akkumulationswand fokussiert. Dabei wird das Lösungsmittel sowohl durch den Kanaleingang, als auch durch den Kanalausgang in den Kanal gepumpt und verlässt den Kanal nur durch den Querflussausgang. Die Geschwindigkeiten der beiden Teilströme werden so zu einander eingestellt, dass sich die Fronten unterhalb des Probeneinlasses treffen. Bei der Fokussierung wird somit ein Konzentrationsgradient erzeugt, der die Diffusion der Teilchen in die entgegengesetzte Richtung bewirkt bis zu einer Gleichgewichtseinstellung. Dieser Vorgang wird als Relaxation bezeichnet. Bei der

Relaxation sammeln sich die kleineren Moleküle weiter im Inneren des Kanals auf Grund des höheren Diffusionskoeffizienten. Während der anschließenden Elution werden die Moleküle entsprechend ihrem Abstand von der Akkumulationwand mit parabolischem Flussprofil zum Kanalausgang transportiert. Die kleineren Teilchen eluieren zuerst, während die größeren Partikel höhere Retentionszeiten aufweisen. Die Detektion der Teilchen erfolgt mit UV-, Lichtstreu- und Fluoreszenzdetektor.

3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie¹¹⁴ (TEM) ermöglicht die Abbildung sehr kleiner Strukturen mit Hilfe eines Elektronenstrahls. Die Wellenlänge eines Elektrons, die nach De Broglie von seiner Geschwindigkeit abhängt, ist mit ca. 0.05-0.02 nm wesentlich kürzer, als die Wellenlänge des sichtbaren Lichts. Dadurch kann mit TEM eine deutlich höhere Auflösung im Vergleich zum Lichtmikroskop erreicht werden. Die Auflösung der modernen, hochauflösenden Elektronenmikroskopen liegt typischerweise bei etwa 0.1 nm.

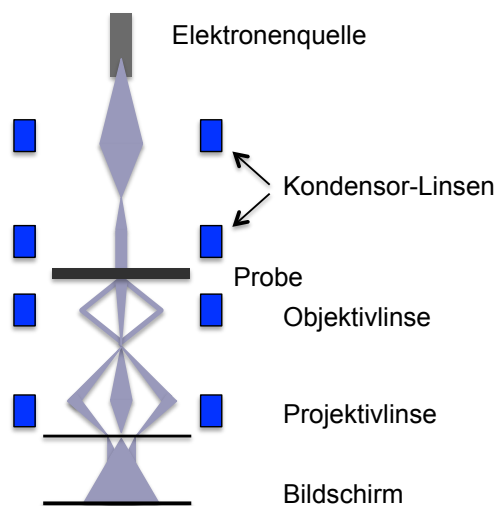


Abbildung 3.4: Strahlengang eines Elektronenmikroskops.

Der prinzipielle Aufbau eines Elektronenmikroskops ist dem Aufbau eines Lichtmikroskops sehr ähnlich (Abbildung 3.4). Als Elektronenquelle dient meistens eine Glühkathode oder eine Feldemissionskathode. Die Elektronen werden durch Anlegen

einer Spannung von 100-400 kV zu der durchbohrten Anode beschleunigt und schließlich mit magnetischen Feldern, die als Elektronenlinsen fungieren, auf die Probe fokussiert. Um eine Streuung der Elektronen durch die Luft zu vermeiden, wird die Messung im Hochvakuum durchgeführt. Beim Durchdringen der Probe wird der Elektronenstrahl an den Stellen mit höherer Elektronendichte stärker gestreut. Dadurch erscheinen dickere Strukturen und Atome mit hoher Ordnungszahl dunkler als die Bereiche, auf denen sich weniger Materie befindet.

3.5 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopie ist eine spektroskopische Methode bei der die Emission der elektromagnetischen Strahlung gemessen wird.

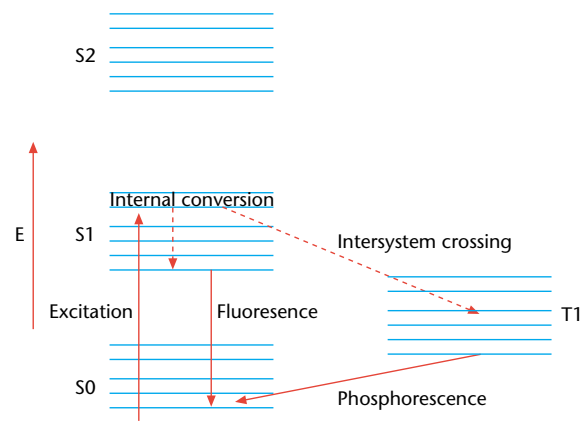


Abbildung 3.5: Jablonski-Diagramm der möglichen Relaxationsprozesse nach der Anregung eines Fluorophors.¹¹⁵

Wird ein Molekül mit der elektromagnetischen Strahlung angeregt, so versucht es die aufgenommene Energie wieder abzugeben. Es findet eine Relaxation in den Grundzustand statt (Abbildung 3.5). Auf Grund einer Energielücke zwischen dem angeregten Zustand und dem Grundzustand kann ein Fluorophor die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abgeben, so dass die Fluoreszenz beobachtet wird. Im Vergleich zur Absorption ist die Fluoreszenz ein relativ langsamer Vorgang (ca. 10^{-8} s). Das Fluoreszenzlicht ist im Vergleich zum absorbierten Licht rot verschoben, da sowohl

die Anregung als auch die Emission nach dem Frank-Condon-Prinzip ablaufen und somit ein Teil der absorbierten Energie in Form von Schwingungsenergie abgegeben wird.

Die Energieabgabe erfolgt nicht ausschließlich durch die Emission der elektromagnetischen Strahlung. In Konkurrenz zur Fluoreszenz stehen auch weitere Prozesse, wie z. B. die innere Umwandlung (Internal Conversion), Interkombination (Intersystem Crossing) oder Förster-Energietransfer (Abbildung 3.5).^{114,115}

Bei einer statischen Emissionsmessung wird die Probe mit monochromatischem Licht kontinuierlich bestrahlt. Das emittierte Licht wird senkrecht zu der Anregungsstrahlung mit einem Photomultiplier detektiert. Gleichzeitig kann auch die Absorption der Probe gemessen werden.

Die Quantenausbeute Q_F wird aus der Intensität des absorbierten (I_A) und emittierten (I_F) Lichts ermittelt:

$$Q_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (3-19)$$

Während dieser Arbeit wurden die absoluten Quantenausbeuten der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in Zusammenarbeit mit Dr. Ute Resch-Genger (BAM, Fachbereich 1.10) durch die Fluoreszenzmessungen mit einer Ulbricht-Kugel bestimmt, um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Streuung zu vermeiden.¹¹⁶

4 Fluoreszenzmarkierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

4.1 Einleitung

Das Poly(organosiloxan)-System, das in dieser Arbeit synthetisiert wurde, soll unter anderem in Studien über mögliche Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Lungenzellen verwendet werden. Da die Poly(organosiloxan)-Nanopartikel zu einem hohen Anteil aus organischem Material bestehen, wird die Beobachtung der zellulären Aufnahme beispielsweise mittels Transmissionselektronenmikroskopie auf Grund der Kontrastschwäche erheblich erschwert. Für die Verfolgung der Zellaufnahmeexperimente ist deshalb eine Fluoreszenzmarkierung erforderlich. Außerdem ist auch die Visualisierung der Aufnahme fluoreszenzmarkierter Partikel durch lebende Zellen möglich, so dass auch Zell-Targeting-Experimente verfolgt werden könnten.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Eine Fluoreszenzmarkierung der Poly(organosiloxan)-Partikel mit Kern-Schale-Architektur kann in verschiedenen Partikelkompartimenten durchgeführt werden. Es können z. B. funktionelle Gruppen direkt auf der Partikeloberfläche eingeführt und anschließend an einen Fluoreszenzfarbstoff gekuppelt werden. Diese Methode wird oft bei der Markierung der amorphen Silica-Nanopartikel angewendet, hat jedoch den Nachteil, dass die Wechselwirkungen des Farbstoffs mit der Umgebung der Partikel nicht ausgeschlossen werden können.¹²⁰

Bei einer Fluoreszenzmarkierung des Kerns hingegen können die Wechselwirkungen des Farbstoffs mit der Umgebung des Partikels durch die Schale weitgehend verhindert werden.¹²¹ Die netzwerkartige Multikompartiment-Struktur der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ermöglicht unterschiedliche Vorgehensweisen bei einer Markierung des Kerns: Die nachträgliche Markierung nach der Polykondensation und die Monomer-Markierung während der Polykondensation. Die nachträgliche Markierung wurde von C. Graf und C. Diehl ausführlich beschrieben.^{92-94,98,99} Bei dieser Methode werden Chlorobenzyl-Gruppen während der Polykondensation im Kern der Partikel eingeführt. Nach der anschließenden Polykondensation der Schale und dem Transfer ins organische Medium erfolgt die Veresterung der Chlorobenzyl-Gruppen mit den

Fluoreszenzfarbstoffen. Im Falle einer zusätzlichen Oberflächenfunktionalisierung garantiert diese Methode allerdings keine vollständige Verkapselung des Farbstoffs im Kern, da die funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche evtl. auch mit Farbstoff wechselwirken könnten. So wurde z. B. gezeigt, dass die basenlabilen Siliciumhydrid-Gruppen im Zuge der Markierung mit Cäsiumsalz des Farbstoffs auch angegriffen werden.¹²² Eine elegantere Alternative zur Fluoreszenzmarkierung des Kerns ist die Markierung mit den Fluorophor-Monomeren bereits während der Polymerisation der Partikel. Auch diese Strategie wird oft zur Markierung polymerer Nanopartikel während der Emulsionspolymerisation angewendet, wie z. B. zur Markierung von Polystyrol-Nanopartikel, und auch bei der Stöber-Synthese amorpher Silica-Partikel.^{118,123-127}

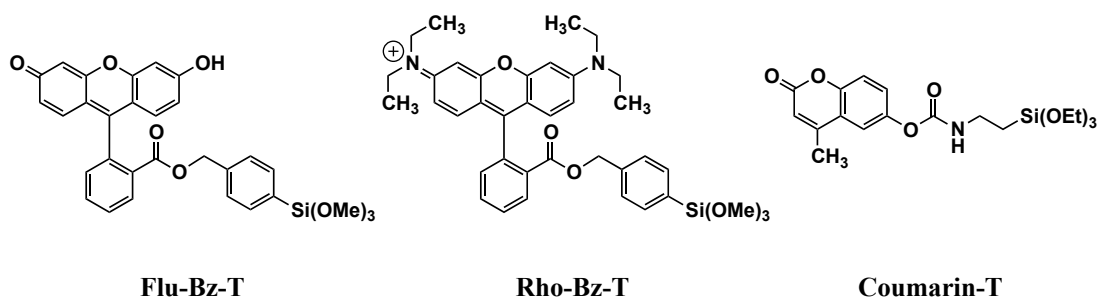


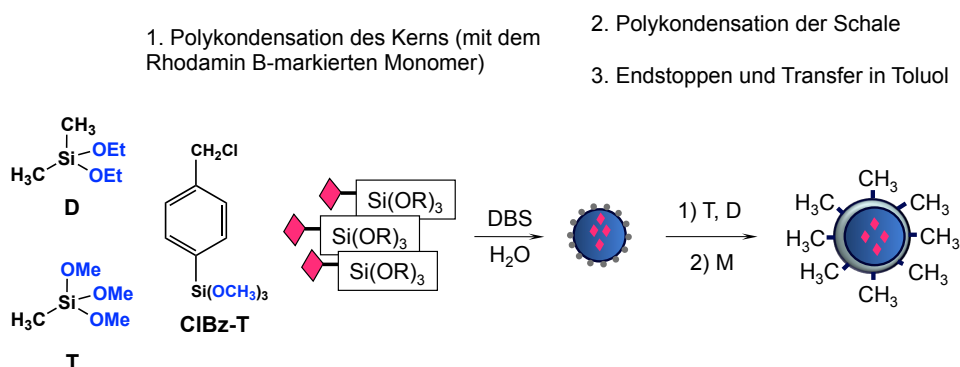
Abbildung 4.1: Fluoreszenzmarkierte Monomere: Fluorescein-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (Flu-Bz-T, links), Rhodamin B-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (Rho-Bz-T, Mitte) und *O*-4-Methylcoumarinyl-*N*-[3-(triethoxysilyl)-propyl]-carbammat (Coumarin-T, rechts).

Während der dieser Arbeit vorangehenden Diplomarbeit konnten bereits fluoreszenzmarkierte Monomere Fluorescein-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (**FluBz-T**) und Rhodamin B-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (**RhoBz-T**) dargestellt und in das Poly(organosiloxan)-System eingebaut werden. Des Weiteren wurde auch der Einbau eines kommerziell erhältlichen Coumarin-Monomers untersucht (Abbildung 4.1).^{100,101}

Während dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Polykondensation der Rhodamin B-markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel genauer untersucht und die unterschiedlichen Syntheseparameter weiter optimiert.

4.2 Darstellung und Charakterisierung der Rhodamin B-markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

Rhodamin B-markierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit Kern-Schale-Topologie werden durch Cokondensation des Rhodamin B-markierten Monomers Rhodamin B-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (**Rho-Bz-T**) mit Trimethoxymethylsilan (**T**), Diethoxydimethylsilan (**D**) und *p*-Chlormethylphenyl-trimethoxysilan (**CIBz-T**) dargestellt (Schema 4.1.). Die Synthese des Kerns erfolgt auf Grund der geringen Löslichkeit von **Rho-Bz-T** in **T** und **D** in zwei Schritten: Als erstes wird das Monomer **Rho-Bz-T** in **CIBz-T** gelöst und innerhalb 30 min zur Tensidlösung zugegeben gefolgt von anschließender Zugabe von **T** und **D** innerhalb einer Stunde. Nach fünftägiger Polykondensation des Kerns erfolgt die Zugabe der Monomermischung für die hydrophobe Schale, die aus **T** und **D** besteht.



Schema 4.1: Synthese der Rhodamin B-markierten Kern-Schale-Nanopartikel. Fluoreszenzmarkierung erfolgt durch Zusatz des Rhodamin B-markierten Monomers während der Polykondensation des Kerns. Anschließend wird in einem weiteren Polykondensationsschritt eine hydrophobe, aus **T** und **D** bestehende Schale aufgebaut, die den Farbstoff von der Umgebung abschirmt. Das Endstoppen der Partikel erfolgt mit monofunktionellem Ethoxytrimethylsilan **M**.

Nach Vollendung der Polykondensation des Kerns und der Schale werden die Partikel mit dem monofunktionellen Monomer Ethoxytrimethylsilan **M** geendstoppt. Es werden Partikel mit einer hydrophoben Oberfläche erhalten, die im Toluol gelöst werden. Bei einem Flottenverhältnis von 0.02 erhält man typischerweise Partikel von ca. 10 nm im

Radius (bestimmt im trockenen Zustand mittels TEM). Die Polydispersität liegt durchschnittlich bei etwa 20%.

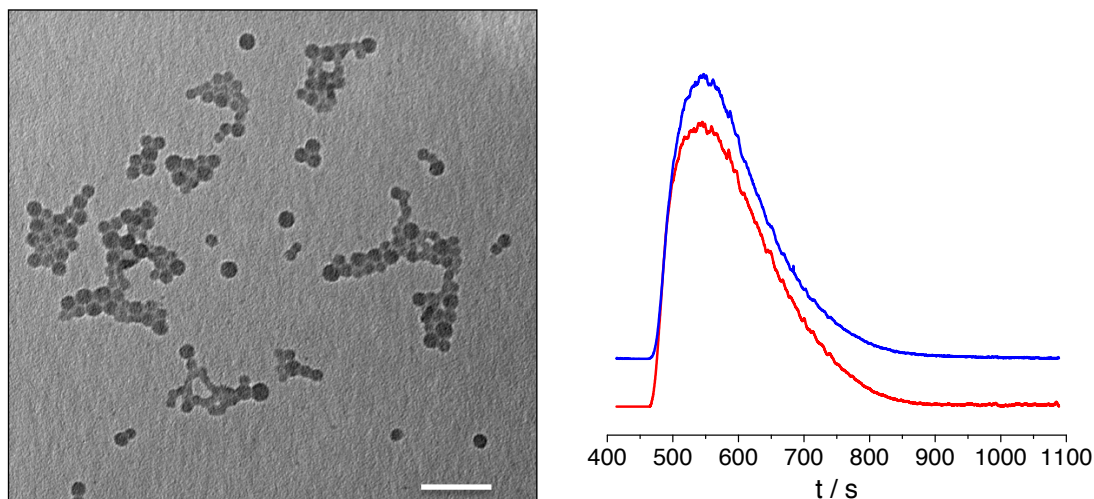


Abbildung 4.2. Links: TEM-Aufnahme der Rhodamin B-markierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel $Rho_{0.02}$ (getrocknet aus wässriger Dispersion). Maßstabsbalken entspricht 100 nm. Rechts: AF-FFF-Elugramm (Eluent: Wasser mit 100 mg/L SDS). — UV / Vis-Detektor, — Fluoreszenzdetektor.

In Abbildung 4.2 sind die TEM-Aufnahme (getrocknet aus wässriger Dispersion der Partikel) und das AF-FFF-Elugramm der fluoreszenz-markierten Kern-Schale-Partikel $Rho_{0.02}$ exemplarisch dargestellt. Auf der TEM-Aufnahme erkennt man einzeln vorliegende Partikel sowie die wahrscheinlich durch die Trocknung während der Probenpräparation entstandene Agglomerate. Die Fraktionierung mit der AF-FFF liefert nur eine Partikelfraktion, die mit UV/Vis-Detektor (Absorption bei 560 nm) und mit Fluoreszenzdetektor (Anregung bei 540 nm, Detektion bei 580 nm, also bei den Absorptions- und Emissionswellenlängen von Rhodamin B) detektiert werden kann. Der hydrodynamische Radius beträgt 11.4 nm (bestimmt am Peak-Maximum durch Kalibrierung mit Polystyrol-Standard). Das Tailing der Elutionskurve deutet jedoch auch auf das Vorliegen der Agglomerate in der Probe hin. Der mit TEM durch Ausmessen von 62 Partikeln bestimmte Radius der trockenen Probe fällt mit $10.5 \text{ nm} \pm 14.6\%$ etwas kleiner aus, da die Probe auf Grund ihrer netzwerkartigen Struktur sich während der Trocknung zusammenzieht. Es soll generell erwähnt werden, dass die Ergebnisse der Größenbestimmung mit TEM als Richtwerte betrachtet werden sollen, da TEM keine

Ensemble-Methode darstellt und die Partikel bei der Größenbestimmung manuell vermessen werden.

Die Größenbestimmung nach dem Endstoppen in Toluol erfolgt mittels DLS bei Streuwinkel $\theta = 26^\circ$ - 150° . Zur Auswertung wird auf Grund der möglichen Polydispersität der Probe die biexponentielle Anpassung der Autokorrelationsfunktionen verwendet.¹⁰⁹ Der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ der Partikel in Toluol liegt bei 16.4 nm ($\mu_2 = 0.17$, bestimmt aus dem Kumulanten-Fit bei 90°). Nach dem Endstoppen, in Toluol wird somit mit der DLS ein höherer hydrodynamischer Radius bestimmt als vor dem Endstoppen, in Wasser mit der AF-FFF. Die Größenzunahme könnte durch den Lösemittelwechsel und das dadurch verursachte Schwellen der Partikel verursacht werden. Auch die allgemeinen Unterschiede in der Detektionsweise der beiden Methoden können die leichte Diskrepanz der gemessenen Radien verursachen. Die Lichtstreuung wird deutlich stärker durch die leichte Polydispersität der Partikel und die Anwesenheit der größeren Partikel oder Aggregaten in sehr niedriger Konzentration beeinflusst als die AF-FFF-Messung: Die größeren Partikel fallen bei der DLS-Messung wegen der R^6 -Abhängigkeit der Streuintensität stärker ins Gewicht als die kleinen.¹⁰⁹ In der AF-FFF wird die Probe hingegen fraktioniert und der Radius am Peak-Maximum ermittelt. Ist die Konzentration an größeren Teilchen nur sehr niedrig und der Radienunterschied zu der Hauptfraktion nur gering, so wird durch die größeren Teilchen lediglich eine leichte Asymmetrie des Peaks verursacht. Als Ergebnis für den Radius erhält man am Peak-Maximum die Größe der kleineren Hauptfraktion.

Die spektroskopischen Eigenschaften der Rhodamin B-markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel wurden mittels Fluoreszenz- und der UV / Vis-Absorptionsspektroskopie untersucht. Absorptions- und Emissionsspektren des Rhodamin B-markierten Monomers und der markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel zeigen einen für Rhodamin B typischen Verlauf mit Absorptionsmaxima bei 560 nm und Emissionsmaxima bei 575 nm (Abbildung 4.3). Die leichte Signalverbreiterung des in die Partikel eingeschlossenen Fluorophors im Vergleich zum Fluorophor in Lösung könnte durch Anisotropie der Umgebung des Fluorophors verursacht werden.

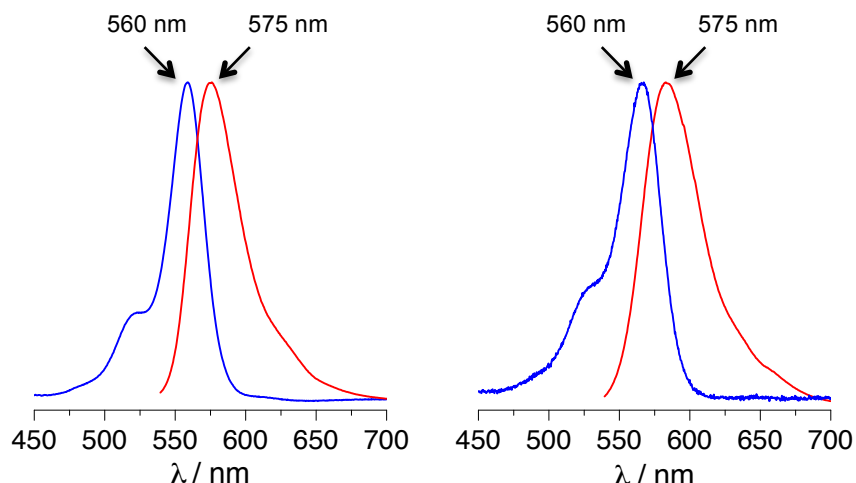


Abbildung 4.3: Normierte — Absorptions- und — Emissionsspektren des Rhodamin B-markierten Monomers (in Dichlormethan, links) und Rhodamin B-markierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Probe Rho_{0,02} in Toluol, rechts). Anregung bei 526 nm.

Die Bestimmung der absoluten Quantenausbeuten wurde durch Messungen mit einer Ulbricht-Kugel durchgeführt. Die absoluten Quantenausbeuten wurden zu $51 \pm 3\%$ für Rhodamin B-markierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel und zu $53 \pm 4\%$ für das Monomer bestimmt. Die Quantenausbeute des nicht-modifizierten Farbstoffs liegt bei 65% in basischem Ethanol.¹²⁸ Die Änderung der Quantenausbeute kann unter Umständen neben der chemischen Modifizierung des Farbstoffs durch die Veresterung mit **CIBz-T** auch auf Lösungsmittelwechsel und Änderung der Umgebung des Fluorophors durch Verkapselung zurückgeführt werden.¹²⁹

4.3 Modifikation der Partikelgröße

Die Größe der Nanopartikel ist eine der entscheidenden Faktoren, die die Aufnahme der Nanopartikel und die Verteilung der Nanopartikel im Körper sowie die zellulären Aufnahmemechanismen beeinflussen (vgl. Abschnitt 2.2, S. 13). Bei der pulmonalen Aufnahme wechselwirken die Nanopartikel nach der Passage durch die luftleitenden Kanäle der Lunge zunächst mit dem Lungensurfactant, der sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche befindet. Der Lungensurfactant besteht aus einem Monolayer mit vielen elastischen Membran-Ausstülpungen, die für die Aufrechterhaltung der Oberflächenspannung der Lunge zuständig sind.^{55,130} Die Studien der Wechselwirkung

des Lungensurfactants mit den hydrophoben Poly(organosiloxan)-Nanopartikeln (durchschnittlicher Radius 10 nm) haben gezeigt, dass die Funktionen des Lungensurfactants durch die Nanopartikel beeinträchtigt werden können.¹³⁰ Daher wurden die Syntheseparameter variiert, um die Größe der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel zu verändern.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Partikelgröße durch Änderung des Flottenverhältnisses variiert werden kann. Die Synthese der hydrophoben, nicht-markierten Partikel unterschiedlicher Größen wurde sowohl für sauer- als auch für basisch-katalysierte Synthese bereits weitgehend untersucht.^{86-88,90,91} In dieser Arbeit konnten auch die fluoreszenzmarkierten Partikel durch die Änderung des Flottenverhältnisses in ihrer Größe modifiziert werden.

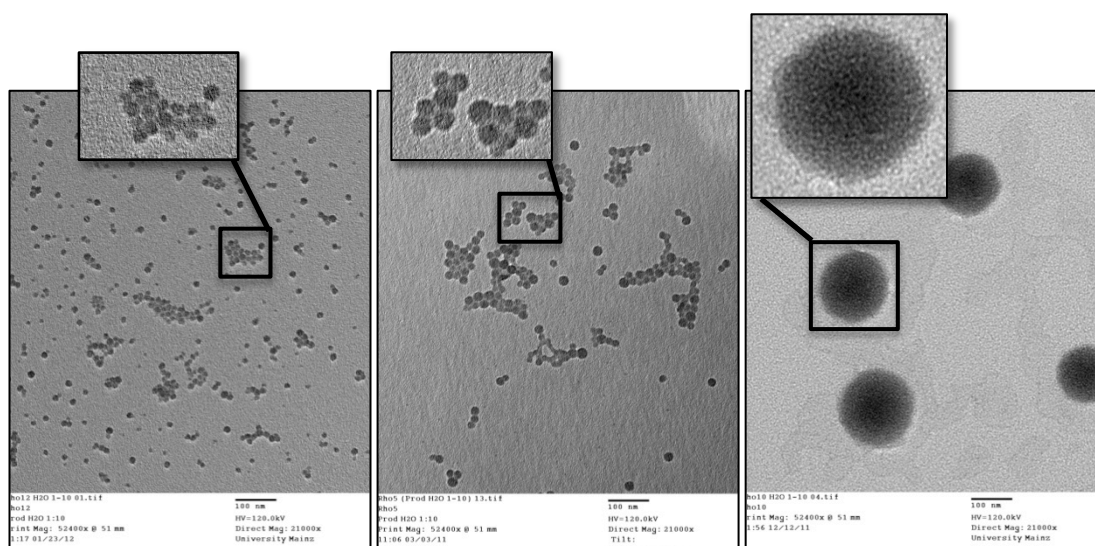


Abbildung 4.4: TEM-Aufnahmen der Rhodamin B-markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die bei verschiedenen Flottenverhältnissen dargestellt wurden (getrocknet aus der wässrigen Dispersion). Links: $S = 0.3$ (Partikel $Rho_{0,3}$); Mitte: $S = 0.02$ (Partikel $Rho_{0,02}$); Rechts: $S = 0.001$ (Partikel $Rho_{0,001}$). Maßstabsbalken 100 nm. Der Bereich in Rechteck wurde 2.4fach vergrößert.

Die Partikel mit durchschnittlichem Radius von 10 nm können im sauren Milieu bei einem Flottenverhältnis $S = 0.02$ dargestellt werden (Abschnitt 4.2). Für die Synthese der kleineren Partikel wurde der basisch katalysierte Syntheseweg ausgewählt, da unter basischen Bedingungen normalerweise Partikel mit einer höheren Netzwerkdicke und einer niedrigeren Polydispersität entstehen.^{79,90} Bei einem Flottenverhältnis von 0.3

gelingt die Synthese der Partikel **Rho**_{0,3} mit einer monomodalen Größenverteilung. Bei Flottenverhältnissen zwischen 0.02 und 0.3 entstehen hingegen multimodal-verteilte Partikel (Daten nicht gezeigt). Die Synthese der größeren Partikel wurde im sauren Milieu analog zu der von C. Scherer beschriebenen Synthesevariante der großen monodispersen Partikel mit PDMS-Kern durchgeführt.^{87,88} Bei einem Flottenverhältnis $S = 0.001$ wurde ein System **Rho**_{0,001} dargestellt. Dieses System ist aus einem PDMS Kern, einer inneren fluoreszenzmarkierten Schale und einer äußeren hydrophoben Schale, die nur aus **T** und **D** besteht, aufgebaut.

Tabelle 4.1: Vergleich der bei den unterschiedlichen Flottenverhältnissen S dargestellten Partikel. Die TEM-Radien wurden durch die Ausmessung der aus wässriger Dispersion getrockneter Partikel bestimmt. Die Partikel **Rho_{0,3} und **Rho**_{0,001} wurden in THF und **Rho**_{0,02} in Toluol bei einer Konzentration von 1-2 mg/mL in der DLS vermessen. Für die DLS-Messungen der wässrigen Dispersion wurde die Lösung der Partikel **Rho**_{0,3} 250fach und der Partikel **Rho**_{0,001} 1000fach nach der Synthese verdünnt. Die genauen Konzentrationen sind auf Grund der Anwesenheit des Tensids unbekannt. $T = 296$ K.**

Bezeichnung (S)	Topologie	R / nm (TEM)	$\langle R_h \rangle_{z^{-1}} / \text{nm}$ ($\mu 2$) wässrige Dispersion	$\langle R_h \rangle_{z^{-1}} / \text{nm}$ ($\mu 2$) nach Endcapping
Rho _{0,3} (0.3)	Kern (markiert)- Schale	$6.3 \pm 19.7\%$	7.8 (0.11)	8.9 (0.08)
Rho _{0,02} (0.02)	Kern (markiert)- Schale	$10.5 \pm 14.6\%$	11.4 (AF-FFF)	16.4 (0.17)
Rho _{0,001} (0.001)	Kern (PDMS)- Schale (markiert)- Schale	$76.2 \pm 20.6\%$	70.9 (0.05)	110 (0.06)

Nach der Synthese wurden die Partikel mit TEM visualisiert. Abbildung 4.4 zeigt die TEM-Aufnahmen der Partikel, die bei verschiedenen Flottenverhältnissen dargestellt wurden, einschließlich der 10 nm Partikel **Rho**_{0,02} (Vgl. auch Abschnitt 4.2). Die TEM-Aufnahmen zeigen, dass alle Partikel monomodal verteilt sind. Die Radien der Partikel wurden durch manuelles Ausmessen von ca. 60-80 Partikeln bestimmt. Die hydrodynamischen Radien der Tensid-stabilisierten Partikel in wässriger Dispersion und der hydrophoben Partikel nach Endcapping in organischen Lösungsmitteln wurden mit

der DLS ermittelt. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der Größenbestimmung mit TEM und DLS sowie den Vergleich mit den 10 nm Partikeln **Rho**_{0.02}. Ähnlich wie bei den Partikel **Rho**_{0.02} fallen auch die hydrodynamischen Radien der kleineren Partikel **Rho**_{0.3} ($S = 0.3$) sowohl in wässriger Dispersion als auch in THF größer aus, als der Radius, der mit TEM bestimmt wurde. Dieses Verhalten könnte durch das Schrumpfen des Siloxan-Netzwerks während der TEM-Trockenpräparation oder durch leichte Polydispersität der Probe verursacht worden sein. Eventuell könnten auch die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln die Ergebnisse der DLS beeinflussen: Bei der Synthese wurde gleichzeitig die Menge an Tensid erhöht und die Monomermenge reduziert. Somit wurde auch eine dünnere Schale aufgebaut, die den positiv geladenen Farbstoff möglicherweise nicht ausreichend abschirmt, wodurch Wechselwirkungen zwischen den Partikeln entstehen könnten. Ferner könnten die Messergebnisse der Partikeln in wässriger Dispersion durch die Anwesenheit des Tensids beeinflusst werden. Die DLS Messungen wurden allerdings in verdünnter, wässriger Lösung bei einer Benzethoniumchlorid-Konzentration von 0.2 mM durchgeführt. Die verwendete Konzentration an Benzethoniumchlorid liegt somit unterhalb der kritischen Micellenkonzentration ($CMC = 1.78 \text{ mM}$).¹³¹ In THF nimmt der hydrodynamische Radius der Partikel leicht zu, was höchstwahrscheinlich durch das Schwellen des Siloxan-Netzwerks im organischen Lösungsmittel erklärt werden kann. Der μ_2 -Wert liegt mit 0.08 in dem für monodisperse Teilchen typischen Bereich. Dennoch kann auch in THF eine reversible Agglomeration der Partikel, die zu einer Erhöhung des hydrodynamischen Radius führt nicht ausgeschlossen werden.

Die großen, fluoreszenzmarkierten Partikel **Rho**_{0.001}, die bei $S = 0.001$ dargestellt wurden, weisen ebenfalls eine monomodale Größenverteilung auf. Die Radienbestimmung mit TEM ergibt untypischerweise einen höheren Wert, als die DLS-Messungen in wässriger Dispersion. Da die Partikel aus einem elastischen Netzwerk bestehen, ist die Abflachung der Partikel während der Trocknung eine mögliche Ursache für diese Radienzunahme.^{86,87} In THF findet, genauso wie bei den kleineren Partikeln eine Zunahme des hydrodynamischen Radius statt, die wieder auch das Schwellen des Netzwerks sowie auf leichte Agglomeration der Probe zurückgeführt werden kann.

5 Elektrostatisch stabilisierte Partikel durch Verwendung der funktionellen Silan-Monomere

5.1 Einleitung und allgemeine Synthesestrategie

Nanopartikel können sterisch durch das Aufpfropfen der Polymere auf die Partikeloberfläche oder elektrostatisch durch Einführung der geladenen Gruppen in wässriger Lösung stabilisiert werden. Die Größe und der Agglomerationszustand der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen werden vor allem von den Oberflächeneigenschaften der Partikel beeinflusst. Deshalb wurden Nanopartikel mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften synthetisiert und ihre Charakteristika unter physiologischen Bedingungen miteinander verglichen.

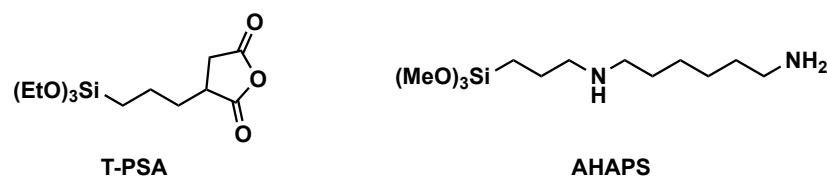
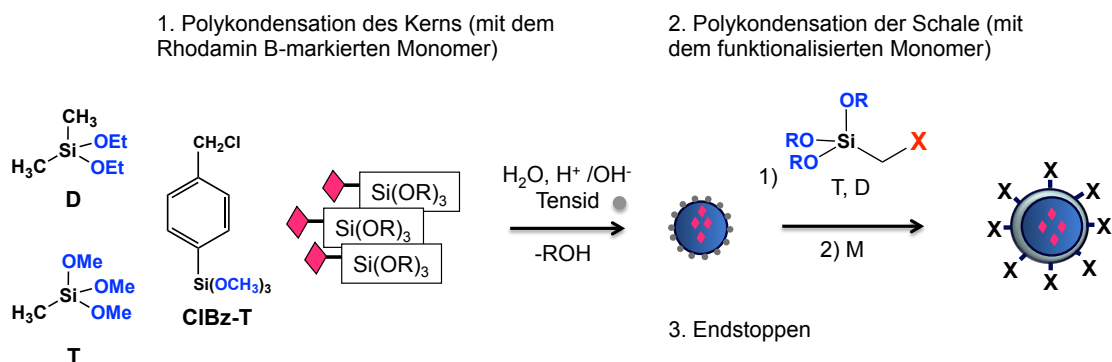


Abbildung 5.1: Funktionalisierte Monomere 3-Triethoxysilyl-propylbernsteinanhydrid (T-PSA, links) und *N*-(6-Aminoethyl)-aminopropyltrimethoxysilan (AHAPS, rechts).

Die Kern-Schale-Architektur der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel erlaubt die unabhängige Funktionalisierung des Kerns und der Schale der Partikel während der Polykondensation direkt nacheinander ohne den Wechsel des Reaktionsmediums oder zusätzlicher Reinigungsschritte. Dadurch ist es bereits während der Polykondensation möglich, zusätzlich zu einer Fluoreszenzmarkierung im Kern auch funktionelle Gruppen in der Partikelschale einzuführen. So wurde die Partikeloberfläche mit Carboxy- und Aminogruppen modifiziert, um Oberflächenfunktionalisierung zu erhalten, die nicht nur die elektrostatische Stabilisierung der Partikel durch die positive bzw. die negative Ladung gewährleistet, sondern auch eine weitere Funktionalisierung der Partikeloberfläche nach der Grafting Onto Methode ermöglicht. Letztere wird im nachfolgenden Kapitel 6 erläutert.

Zur Einführung der Carboxygruppen wurde Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisiertes Monomer 3-(Triethoxysilyl)-propylbernsteinsäureanhydrid (**T-PSA**, Abbildung 5.1, links) und zur Einführung der Aminogruppen *N*-(6-Aminoethyl)-aminopropyltrimethoxysilan (**AHAPS**, Abbildung 5.1, rechts) verwendet.



Schema 5.1: Oberflächenfunktionalisierung während der Polykondensation. Nach der Polykondensation des fluoreszenzmarkierten Kerns werden während der Polymerisation der Schale funktionelle Gruppen auf der Partikeloberfläche eingeführt.

Schema 5.1 zeigt die Synthese der elektrostatisch stabilisierten, Rhodamin B-markierten Partikel. Im ersten Polykondensationsschritt erfolgt die Synthese des Rhodamin b-markierten Kerns, der aus den Monomeren Trimethoxymethylsilan (**T**), Diethoxydimethylsilan (**D**), *p*-Chlormethylphenyl-trimethoxysilan. (**CIBz-T**) sowie dem Rhodamin B-markierten Monomer Rodamin B-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (**RhoBz-T**) besteht. Anschließend wird die Monommischung für die Schale zugegeben, die neben hydrophoben Trimethoxymethylsilan (**T**) und Diethoxydimethylsilan (**D**) ein weiteres Monomer mit einem funktionellen organischen Rest enthält. Nach Vollendung der Polykondensation werden die Partikel mit monofunktionellem Ethoxytrimethylsilan (**M**) umgesetzt.

5.2 Carboxy-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

5.2.1 Synthese und Charakterisierung

Die Einführung der Carboxygruppen erfolgt während der Polykondensation der Schale im sauren Milieu. Nach Polykondensation des Kerns erfolgt die Zugabe der Monomere für die Schale in der ein Teil von **T** durch **T-PSA** ersetzt wird. Nach Vollendung der Polykondensation werden die Partikel mit **M** geendstoppt. Die basisch-katalysierte Synthesevariante kann nicht angewandt werden, da die Bernsteinanhydrid-Gruppe während der Polykondensation ebenfalls hydrolysiert wird. Das unter basischen Bedingungen entstehende Carboxylat-Anion wirkt destabilisierend auf die basische Dispersion.

Nach dem Endstoppen mit **M** können die Partikel mittels Dialyse in polare organische Lösungsmittel wie Methanol und DMF überführt werden. Diese Änderung der Löslichkeit im Vergleich zu den nicht-funktionalisierten Partikel, welche für gewöhnlich durch Zusatz von Methanol ausgefällt werden, liefert den ersten Hinweis auf die erfolgreich verlaufene Funktionalisierung. In wässriger Lösung sind, die Partikel ohne zusätzliche Stabilisatoren erst bei $\text{pH} \approx 10$ und höheren pH-Werten löslich (pH-Einstellung mit Natronlauge). Bei niedrigeren pH-Werten bildet sich sofort ein Niederschlag. Durch Zusatz von Glycin wird eine Stabilisierung der Partikel im physiologischen pH-Bereich erreicht. Wahrscheinlich koordinieren dabei mehrere Glycin-Moleküle an eine Carboxy-Gruppe, wodurch die Anzahl der Oberflächenladungen erhöht und die Abschirmung der unpolaren Netzwerksegmente durch geladene Gruppen verbessert wird. Dadurch können die Partikel aus der methanolischen Lösung in wässrige 0.1 mM Glycin-Lösung ($\text{pH} \approx 7-8$) und in wässrigen Glycin-Puffer ($\text{pH} = 8.4$) überführt werden.

Die Einführung der Carboxygruppen kann mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 5.2, links). Im IR-Spektrum ist, neben den Signalen des Siloxan-Netzwerks zwischen 400 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} , ein für die C=O-Valenzschwingung der Carboxygruppe typisches Signal bei 1740 cm^{-1} zu erkennen.

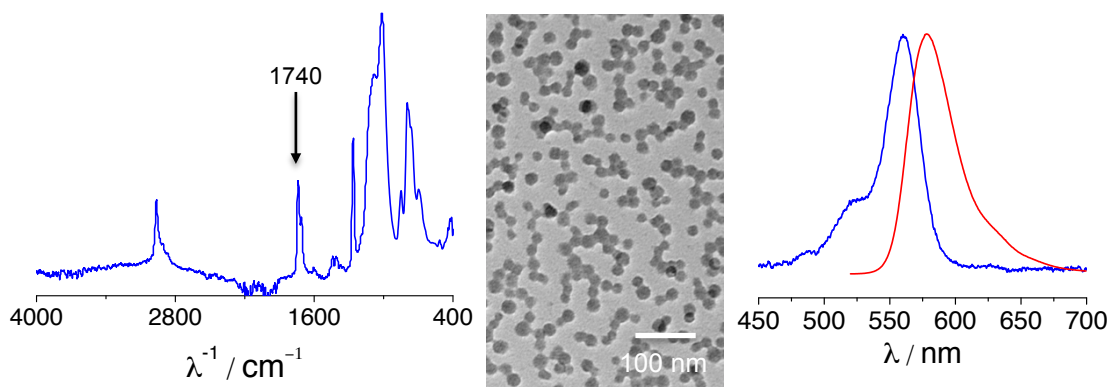


Abbildung 5.2: Charakterisierung der carboxy-funktionalisierten, Rhodamin B-markierten Partikel POS-COOH. Links: IR-Spektrum mit dem typischen Carboxyl-Signal bei 1740 cm^{-1} . Mitte: TEM-Aufnahme, getrocknet aus Methanol nach Endstoppen. Maßstabsbalken entspricht 100 nm . Rechts: — Absorptions- und — Fluoreszenzspektren zeigen keine Änderung im Vergleich zu den hydrophoben, Rhodamin B-markierten Partikel.

Die Partikel wurden mit TEM visualisiert. Die Charakterisierung der Partikel in Lösung wurde mittels DLS und ζ -Potential-Messungen durchgeführt. Die spektroskopischen Eigenschaften wurden mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. In Tabelle 5.1 sind alle Daten zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Charakterisierung der carboxy-funktionalisierten, Rhodamin B-markierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel POS-COOH.

Carboxy-funktionalisierte, Rhodamin B-markierte Partikel POS-COOH	
R (TEM; Probe getrocknet aus MeOH)	$9.1\text{ nm} \pm 19\%$
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ ($c = 1.5\text{ mg/mL}$ 5 mM KBr in MeOH mit 5 mM KBr) ($\mu 2$)	$17.0\text{ nm} (0.12)$
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ ($c = 0.9\text{ mg/mL}$ in 10 mM Glycin-Lsg. mit 5 mM NaCl) ($\mu 2$)	$14.9\text{ nm} (0.09)$
ζ -Potential ($c = 0.9\text{ mg/mL}$ in 10 mM Glycin-Lsg. mit 5 mM NaCl , $\text{pH} \approx 7-8$)	$(-32 \pm 2)\text{ mV}$
Absolute Quantenausbeute (MeOH)	$(63 \pm 4)\%$

Die TEM-Aufnahmen (Abbildung 5.2, Mitte) zeigen Partikel **POS-COOH**, deren Radius bei $9.1 \text{ nm} \pm 19\%$ liegt. Die Funktionalisierung der Oberfläche lässt somit die Größe und die Polydispersität der Teilchen im Vergleich zu den hydrophoben Partikel weitestgehend unbeeinflusst. Der hydrodynamische Radius der Partikel **POS-COOH** in Methanol mit 5 mM Kaliumbromid wurde mit der DLS zu 17.0 nm ($\mu_2 = 0.12$) bestimmt. Kaliumbromid wurde bei den Messungen zugesetzt, um die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln abzuschwächen. Nach Überführung der Partikel in 0.1 mM Glycin-Lösung beträgt der hydrodynamische Radius 14.9 nm ($\mu_2 = 0.09$). Die leichte Radienabnahme nach Überführung der Partikel aus Methanol in die wässrige Glycin-Lösung, die mit der leichten Abnahme des μ_2 -Wertes einhergeht, kann auf eine bessere Stabilisierung der Partikel durch Glycin zurückgeführt werden. Da sich das Poly(organosiloxan)-Netzwerk während der Trockenpräparation der Probe für TEM zusammenzieht, fällt auch bei den carboxy-funktionalisierten Partikeln der mit der DLS bestimmte hydrodynamische Radius größer aus als der mittels TEM ermittelte Radius. Auch die Anwesenheit von Agglomeraten, die wahrscheinlich durch vorwiegend reversible Wechselwirkungen zwischen den Partikeln entstanden sind, könnte eine Verschiebung der hydrodynamischen Radien zu höheren Werten hin verursachen.

Das ζ -Potential der carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** wurde zu $(-32 \pm 2) \text{ mV}$ in wässriger 10 mM Glycin-Lösung mit 5 mM Natriumchlorid bestimmt ($\text{pH} \approx 7-8$). Das Natriumchlorid wurde bei der ζ -Potential-Bestimmung zugesetzt, da es auch unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration von etwa 100 mM vorliegt und somit auch unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich als Gegenion fungiert. Das negative ζ -Potential der carboxy-funktionalisierten Partikel ist auf Grund der pKs-Werte der Bernsteinsäure ($\text{pK}_1 = 4.0$, $\text{pK}_2 = 5.2$) zu erwarten, die unterhalb der pH-Wertes der Lösung ($\text{pH} \approx 7-8$) liegen und mit den pKs-Werten der Carboxy-Gruppen auf der Partikeloberfläche vergleichbar sein sollten.¹³²

Absorptions- und Fluoreszenz-Spektren der carboxy-funktionalisierten, Rhodamin B-markierten Partikel zeigen einen für Rhodamin B typischen Verlauf. Es ist kein Unterschied im Verlauf der Spektren im Vergleich zu den hydrophoben Partikel (Vgl. Abschnitt 4.2) zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass die Oberflächenfunktionalisierung die Farbstoffmarkierung im Kern nicht beeinflusst. Die absolute Quantenausbeute liegt bei $(63 \pm 4)\%$ und fällt sogar etwas höher aus, als die

Quantenausbeute hydrophober Partikel, was evtl. auf den Lösungsmittelwechsel zurückgeführt werden kann.¹¹⁴

5.2.2 Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

Im Hinblick auf die *in vitro* Studien, welche mit den Poly(organosiloxan)-Nanopartikel durchgeführt werden, sind die Eigenschaften der Partikel unter physiologischen Bedingungen von besonderer Bedeutung. Deswegen wurde die kolloidale Stabilität der carboxy-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen mit der DLS untersucht. Die Ergebnisse der DLS-Messungen werden mit den Ergebnissen aus den AF-FFF Messungen verglichen, die Thomas Lang während seiner Promotion durchgeführt hat.¹³³ Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde versucht die Bedingungen bei den Zellexperimenten soweit wie möglich zu reproduzieren, um Auskunft über Oberflächenbeschaffenheit und Agglomerationszustand der Partikel während der Aufnahmestudien zu erhalten. Es wurden Messungen in dem während der zellulären Aufnahmeexperimente verwendeten Zellkulturmedium RPMI 1640 und in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% des fetalen Kälberserums (FCS) durchgeführt. Letztere ermöglichen auch Rückschlüsse über das mögliche Verhalten der Partikel in der Blutbahn.

In Abbildung 5.3 (links) ist die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radian $1/R_{h,z}$ der carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** in Zellkulturmedium RPMI 1640 und in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS sowie die Winkelabhängigkeit der reziproken Radian des fetalen Kälberserums ohne Nanopartikel gezeigt. Die Autokorrelationsfunktion der Partikel in RPMI 1640 kann wegen leichter Polydispersität der Probe gut mit der biexponentiellen Fitfunktion beschrieben werden. Der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ der Partikel im Zellkulturmedium RPMI wurde zu 15.8 nm ($\mu_2 = 0.13$) bestimmt und weicht somit nur gering von dem Radius der gleichen Probe in 5 mM Natriumchlorid-Lösung ($\langle R_h \rangle_z^{-1} = 14.9$ nm, $\mu_2 = 0.09$) ab. Für die Auswertung der Autokorrelationsfunktion der Partikel in RPMI 1640 mit FCS wurde zunächst die triexponentielle Fitfunktion verwendet, um generelle Informationen über den Aggregationszustand der Probe zu bekommen. Die triexponentielle Anpassung ist allerdings nur bedingt für die Auswertung der Nanopartikel-Serumprotein-Gemische geeignet: Das Serum enthält mehrere Protein-Größenfraktionen, weshalb für die

Anpassung der Autokorrelationsfunktion des Serums ohne Nanopartikel bereits eine triexponentielle Fitfunktion benötigt wird. Der hydrodynamische Radius wird durch Extrapolation der inversen Radien $q^2 \rightarrow 0$ zu 26.7 nm ermittelt und nimmt somit um ca. 11 nm zu im Vergleich zum Radius der Partikel im serumfreien Medium.

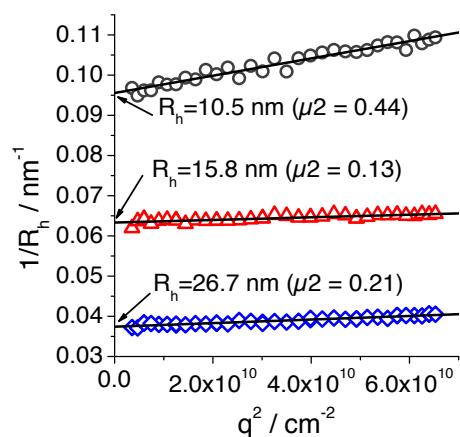


Abbildung 5.3: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien $1/R_{h,z}$ der carboxy-funktionalisierten Partikel (Probe POS-COOH, $c = 1.3 \text{ mg/mL}$) in verschiedenen physiologisch-relevanten Lösungsmitteln (Δ NPs in RPMI 1640, \diamond NPs in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS) und Vergleich mit Serumproteinen (\circ RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). $T = 296 \text{ K}$.

Der Verlauf der inversen Radien zeigt keine ausgeprägte Winkelabhängigkeit. Größere Agglomerate würden das Messergebnis wegen der R^6 -Abhängigkeit der Streuintensität dominieren, falls sie in der Probe vorhanden wären.¹⁰⁹ Bei der hier untersuchten Probe wird die Größenzunahme also höchstwahrscheinlich durch die Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche und Bildung einer Proteinkorona verursacht. Die Anwesenheit einzelner größerer Nanopartikel-Protein-Agglomerate ist unwahrscheinlich, kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die detailliertere Auswertung der Lichtstreudaten der Mischung erfolgt mit Hilfe der Multikomponentenanalyse nach Gleichung (3-14) mit der biexponentiellen Anpassung der Nanopartikel-Protein-Komplexe und der triexponentiellen Anpassung der Serumproteine, da bei der hier vorliegenden Partikel-Protein-Mischung es sich um ein Gemisch aus Serumproteinen und Nanopartikeln mit Proteinkorona handelt. Bei der Multikomponentenanalyse nach Gleichung (3-14) werden deshalb die Parameter aus der

Autokorrelationsfunktion des Serums durch eine separate Messung ermittelt und anschließend in die Gleichung (3-14) eingesetzt und konstant gehalten. Die Auswertung liefert den Radius der Nanopartikel-Protein-Komplexe.

Abbildung 5.4 (links) zeigt die Autokorrelationsfunktion der carboxy-funktionalisierten Nanopartikel in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS bei $\theta = 26^\circ$ mit Fitfunktion nach Gleichung (3-14) und Residuum, das als Kriterium für die Güte der Fitfunktion verwendet wird. Die Werte des Residuums liegen alle etwa bei Null, die verwendete Fitfunktion nach Gleichung (3-14) ist somit geeignet um die Autokorrelationsfunktion statistisch gut anzupassen.

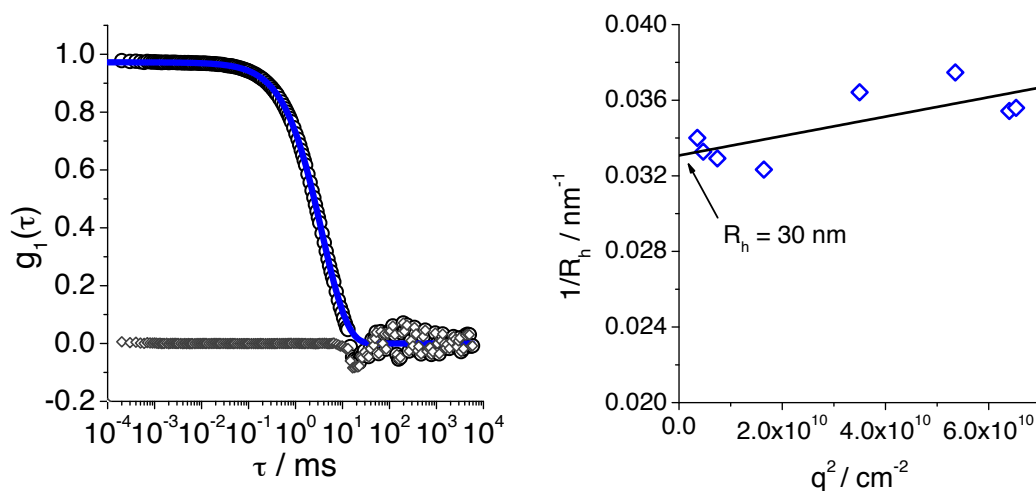


Abbildung 5.4: Links: \circ Autokorrelationsfunktion der carboxy-funktionalisierten Nanopartikel ($c = 1.3 \text{ mg/mL}$) in RPMI mit 5 Gew.-% FCS bei $\theta = 26^\circ$, — Fit der AKF nach Auswertung mit (3-14), \diamond Residuum. Rechts: Winkelabhängigkeit der inversen hydrodynamischen Radien. $T = 296 \text{ K}$.

Der inverse hydrodynamische Radius zeigt allerdings einen winkelabhängigen Verlauf (Abbildung 5.4, rechts), was auf die Polydispersität in der Größenverteilung der Nanopartikel-Protein-Komplexe hinweist. Die Extrapolation der Regressionsgeraden für $q^2 \rightarrow 0$ ergibt für Nanopartikel-Protein-Komplexe den hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 30 nm, also einen höheren Radius als nach triexponentieller Anpassung. Die Proteinmischung hat einen kleineren hydrodynamischen Radius als die Partikel in Wasser und als die Nanopartikel-Protein-Komplexe. Deshalb verursachen die Proteine bei Anpassung der Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Proteinmischung mit der

triexponentiellen Fitfunktion, wie sie zunächst angewendet wurde, eine Verschiebung des hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ zu kleineren Werten. Nach Berücksichtigung der nicht an die Partikel gebundenen Proteine bei der Anpassung mit Multikomponentenanalyse nach Gleichung (3-14) wird deswegen ein etwas höherer Wert des hydrodynamischen Radius der Nanopartikel-Protein-Komplexe erhalten.

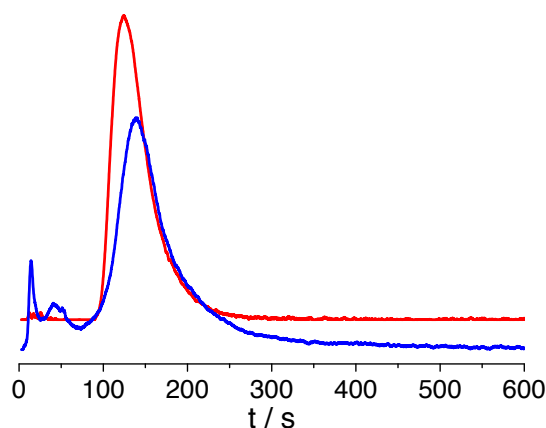


Abbildung 5.5: AF-FFF-Elugramm carboxy-funktionalisierter Partikel mit und ohne Proteine. Als Proben wurden verwendet — Partikel POS-COOH in 0.1 M Glycin-Puffer und — Partikel in RPMI + 5 Gew.-% FCS. Eluent: Wasser. UV / Vis-Detektor.

Die AF-FFF (Abbildung 5.5) bestätigt nur teilweise die Ergebnisse der DLS. Sowohl die Fraktionierung der carboxy-funktionalisierten, Glycin-stabilisierten Partikel als auch die Fraktionierung der Nanopartikel-Protein-Mischung liefern jeweils nur eine Fraktion. Das Signal der Nanopartikel-Protein-Mischung ist zu höheren Retentionszeiten verschoben, was einem Größenzuwachs im Vergleich zu reinen Nanopartikel entspricht. Die Bildung der Nanopartikel-Protein-Komplexe wird also mit der AF-FFF bestätigt. Die Größenbestimmung nach Kalibrierung mit Silica-Standard liefert deutlich kleinere Werte der hydrodynamischen Radien als die DLS. Ohne Proteine wird der hydrodynamische Radius R_h von 14 nm ermittelt. Nach Inkubation der Partikel mit Serum wird eine Fraktion mit R_h von 16 nm erhalten. Der mit der DLS bestimmte hydrodynamische Radius ist somit doppelt so hoch, wie der Radius aus der AF-FFF. Die Ergebnisse der DLS werden durch Anwesenheit größerer Teilchen deutlich stärker beeinflusst als die AF-FFF, wegen der R^6 -Abhängigkeit der Streuintensität.¹⁰⁹ Bei einer polydispersen Probe, wie sie auch in Fall von Nanopartikel-Protein-Komplexen vorliegt, verursacht das

oft eine Verschiebung der hydrodynamischen Radien aus der DLS zu höheren Werten hin. Allerdings kann auch eine teilweise Zerstörung der Agglomerate durch die Scherkräfte im AF-FFF-Kanal nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5.3 Amino-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

5.3.1 Synthese und Charakterisierung

Die Polymerisation der amino-funktionalisierten Partikel wurde unter basischen Bedingungen mit Benzethoniumchlorid als Tensid und Natronlauge als Katalysator durchgeführt. Die Synthese unter sauren Bedingungen ist nicht möglich, da die Aminogruppe die saure Dispersion destabilisiert.

Nach Polymerisation des Rhodamin b-markierten Kerns erfolgt die Zugabe der Monomermischung für die Schale in der ein Teil von **T** durch **AHAPS** ersetzt wird, analog zur Synthese carboxy-funktionalisierter Partikel. Nach der Polymerisation mit anschließendem Endstoppen mit **M** erhält man Partikel, die in polaren, organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder THF löslich sind. Es wird also wieder eine Änderung der Löslichkeit im Vergleich zu den nicht-funktionalisierten Nanopartikeln beobachtet, die in Methanol unlöslich sind.

Die Charakterisierung der Partikel nach Endstoppen und Transfer in Methanol durch Dialyse erfolgt mittels TEM und DLS. In Abbildung 5.6 sind TEM-Aufnahme aus Methanol getrockneter Partikel **POS-NH₂** (links) sowie die DLS-Daten mit der Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der Partikel in Methanol (mit 5 mM KBr) (rechts) dargestellt. Auf der TEM-Aufnahme sind hauptsächlich Partikel mit einem Radius von ca. 10 nm und vereinzelte kleinere Partikel zu erkennen. Der Radius der getrockneten TEM-Probe liegt bei $7.8 \text{ nm} \pm 17\%$ (bestimmt durch Ausmessung von 60 Partikeln). Der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Radius fällt mit 17.7 nm ($\mu_2 = 0.17$) deutlich höher aus. Der hydrodynamische Radius weist außerdem einen winkelabhängigen Verlauf auf. Bei Streuwinkel $\theta = 150^\circ$ beträgt der apparente hydrodynamische Radius $R_{h,App} = 16.8 \text{ nm}$. Diese leichte Winkelabhängigkeit des hydrodynamischen Radius sowie der relativ hohe Wert des zweiten Kumulanten μ_2

deuten auf eine breite Größenverteilung der Partikel in Lösung hin. Da der hydrodynamische Radius mehr als doppelt so groß ist, wie der Radius, der mit TEM bestimmt wurde, kann eine leichte Agglomeration der Partikel in methanolischer Lösung nicht ausgeschlossen werden. Letztere könnte eventuell durch Wechselwirkung der Aminogruppe mit den Silicium-Atomen im Siloxan-Netzwerk, welche im Vergleich zu Kohlenstoff eine höhere Reaktivität gegenüber harten Basen wie Aminen aufweisen, verursacht werden.¹³⁴

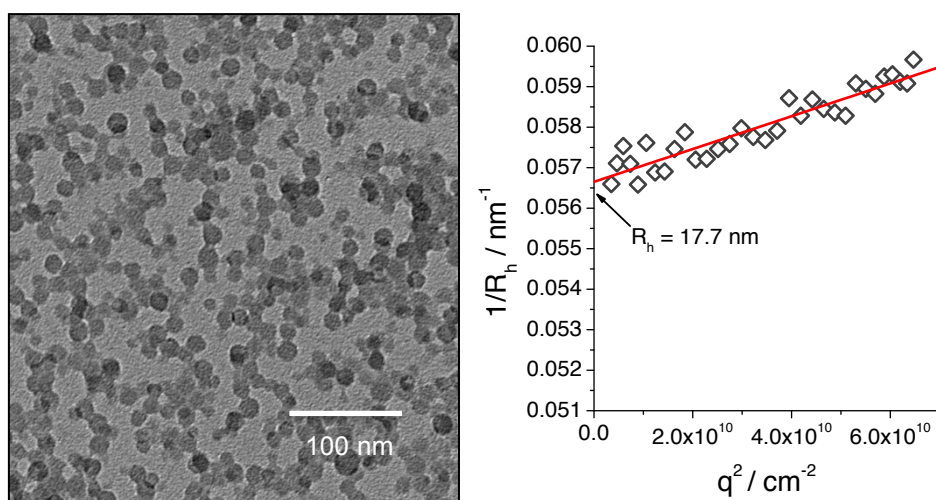


Abbildung 5.6: Links: TEM-Aufnahme der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Probe POS-NH₂1) getrocknet aus Methanol. Maßstabsbalken entspricht 100 nm. Rechts: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Probe POS-NH₂1, 5mM KBr in Methanol, 1.9 mg/mL) nach der biexponentiellen Anpassung der AKF mit — Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$, $\theta = 26^\circ$ - 150° . $T = 296$ K

5.3.2 Transfer in wässrige Lösung und Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

Ähnlich wie die carboxy-funktionalisierten Partikel zeigen auch die amino-funktionalisierten Partikel ein pH-abhängiges Löslichkeitsverhalten in wässriger Lösung. Die amino-funktionalisierten Partikel aggregieren unter neutralen Bedingungen sofort, sind aber in saurer wässriger Lösung löslich ($\text{pH} < 3$, eingestellt mit Salzsäure). Die Degradation der Partikel durch Säure kann auf Grund von TEM-Messungen

ausgeschlossen werden (Anhang, Abbildung 12.2, S. 156). Wird der pH-Wert an Stelle von Salzsäure mit 0.1 N MES-Puffer (Abbildung 5.7, links) eingestellt, so sind die Partikel auch bei etwas höheren pH-Werten von 5-6 löslich und können mittels Dialyse in den MES-Puffer überführt werden. MES fungiert anscheinend bei dem Lösevorgang der Partikel ähnlich wie ein kurzkettiges Tensid und trägt so zur Stabilisierung der Partikel in wässriger Lösung bei. Außerdem kann auch ein möglicher Gegenioneneffekt die Löslichkeit der Partikel in MES beeinflussen, da die Sulfonatgruppe von MES ein deutlich weiches Gegenion darstellt als Hydroxid-Anionen, die in reinem Wasser wahrscheinlich als Gegenion fungieren.

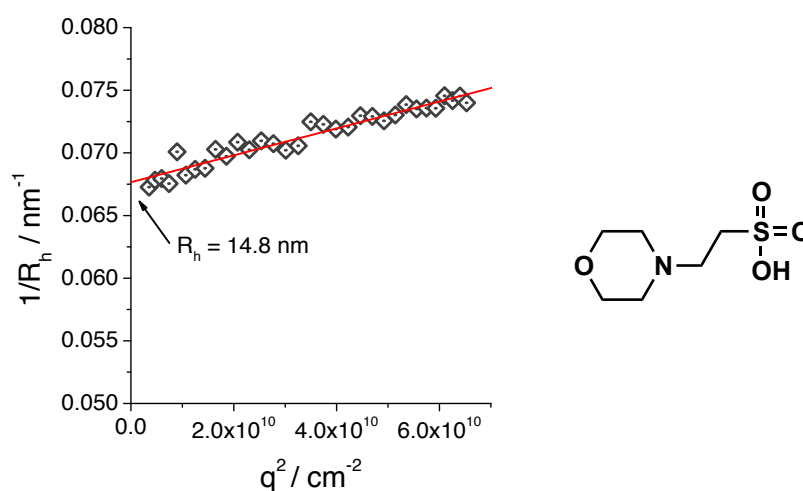


Abbildung 5.7: Links: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach Transfer aus Methanol in 0.1 M MES-Puffer und 10facher Verdünnung mit 5 mM Natriumchloridlösung (Probe POS-NH₂1, $c = 1.0 \text{ mg/mL}$) nach der biexponentiellen Anpassung der Autokorrelationsfunktionen sowie — Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$. $T = 296 \text{ K}$. Rechts: 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES).

Das ζ -Potential der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (POS-NH₂1) wurde bestimmt zu $(31 \pm 3) \text{ mV}$ in 0.1 M MES-Puffer mit 5 mM Natriumchlorid ($\text{pH} \approx 5-6$) und ist positiv, da die Aminogruppe protoniert vorliegt.¹³⁵

Die Größenbestimmung der Partikel in Lösung nach Transfer in MES-Puffer aus Methanol durch Dialyse wurde mittels DLS durchgeführt. Abbildung 5.7 zeigt die Winkelabhängigkeit der inversen hydrodynamischen Partikelradien. Der hydrodynamische Radius der Partikel wurde bestimmt zu 14.8 nm ($\mu_2 = 0.24$). Bei der

Messung mussten die Partikel mit Natriumchlorid verdünnt werden, um die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln abzuschwächen. Der hydrodynamische Radius der Partikel in MES-Puffer mit Natriumchlorid fällt kleiner aus als in Methanol. Dennoch zeigt auch die mit MES stabilisierte Probe eine leichte Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien ($R_{h,App}(\theta = 150^\circ) = 13.5 \text{ nm}$) und hat einen hohen $\mu 2$ -Wert, was wieder auf Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln und eine Tendenz der Partikel zur Agglomeration hindeutet.

Die amino-funktionalisierten Partikel sind nicht in Wasser bei physiologischen pH-Werten von 7-8 löslich und können nicht aus Methanol mittels Dialyse direkt in Wasser überführt werden. Nach dem Transfer aus Methanol in den wässrigen MES-Puffer mittels Dialyse ist allerdings auch der Transfer in reines Wasser in einem weiteren Dialyseschritt möglich. Anscheinend bleibt eine Restmenge MES adsorptiv an das Siloxan-Netzwerk gebunden und trägt zur Stabilisierung der Nanopartikel in wässriger Lösung bei.

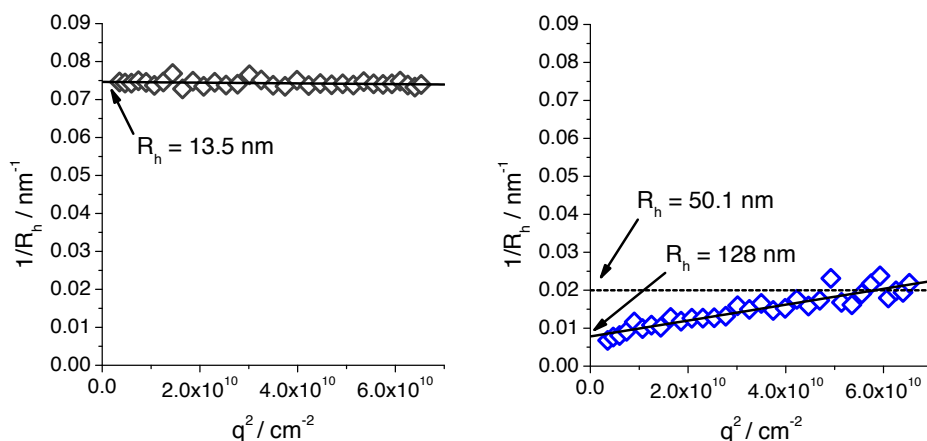


Abbildung 5.8: Winkelabhängigkeiten der reziproken hydrodynamischen Radien $1/R_{h,z}$ amino-funktionalisierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ($c = 0.04 \text{ mg/mL}$) nach Transfer aus MES-Puffer ins Wasser. Links: \diamond In Wasser. Rechts: \diamond In RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS. — Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ bei $\theta = 26\text{-}150^\circ$. - -Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ bei $\theta = 114^\circ\text{-}150^\circ$. $T = 296 \text{ K}$.

Die gegen Wasser dialysierten Partikel wurden ebenfalls mit der DLS vermessen. In Abbildung 5.8 ist der Verlauf der reziproken hydrodynamischen Radien in Abhängigkeit

des Quadrats des Streuvektors q^2 dargestellt. Der hydrodynamische Radius der Partikel in Wasser wurde durch Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ zu 13.5 nm ($\mu_2 = 0.11$) bestimmt. Die Lösung wurde bei sehr niedriger Partikelkonzentration $c = 0.04$ mg/mL vermessen. Bei dieser Partikelkonzentration wird ein winkelunabhängiger Verlauf der inversen hydrodynamischen Radien beobachtet. Auch der μ_2 -Wert nimmt nach Transfer der Partikel aus MES-Puffer in Wasser von 0.24 auf 0.11 ab. Die Partikel in MES-Puffer vor Transfer in reines Wasser wurden bei einer höheren Konzentration $c = 1.0$ mg/mL vermessen als die gegen Wasser dialysierten Partikel. Durch Verdünnung der Partikel werden die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln abgeschwächt, was die Abnahme des μ_2 -Wertes zur Folge hat. Die Vermutung, dass die hohen Werte des zweiten Kumulanten μ_2 und die damit verbundene breite Verteilung der Partikelradien in MES-Puffer durch eine reversible Interaktion zwischen den Partikel verursacht werden, wird dadurch bestätigt. Es liegen demnach einzelne Partikel und evtl. wenige Agglomerate in wässriger Lösung nach der Dialyse gegen Wasser vor.

Die adsorptive Bindung von MES ist nicht ausreichend, um Partikel im Zellkulturmedium RPMI 1640 zu stabilisieren. Bei der Zugabe der Partikel zum Medium bilden sich sofort mit bloßem Auge sichtbare Agglomerate. Durch die hohe Salzkonzentration im Zellkulturmedium wird die für die elektrostatische Stabilität der Partikel notwendige Abstoßung zwischen den Partikel aufgehoben, was die unmittelbare Aggregation der Probe zur Folge hat.

Im serumhaltigen Zellkulturmedium bleiben die Partikel gelöst. Sie bilden allerdings Agglomerate mit einem hydrodynamischen Radius von 128 nm (Abbildung 5.8, rechts). Die Abschirmung der Partikeloberfläche durch die adsorbierten Proteine führt zur Stabilisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen. Es entsteht eine Art Interpolyelektrolyt-Komplex zwischen den positiv geladenen Partikel und den negativ geladenen Proteinen.¹³⁶ Die gebildeten Nanopartikel-Protein-Komplexe weisen hohe Polydispersitäten auf, was durch die Winkelabhängigkeit der hydrodynamischen Radien veranschaulicht wird: Die Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ der inversen Radien bei allen Winkeln ergibt einen hydrodynamischen Radius von 128 nm. Wird die Extrapolation nur mit den großen Winkel $\theta = 114^\circ$ - 150° durchgeführt, so wird ein kleinerer Wert von 50.1 nm bestimmt. Eine genaue Größenbestimmung mit der DLS ist somit auf Grund der starken Polydispersität der Nanopartikel-Protein-Komplexe nicht möglich.

Amino-funktionalisierte Partikel zeigen somit ein völlig anderes Verhalten unter physiologischen Bedingungen auf als die carboxy-funktionalisierten Teilchen, die auf Grund ihrer negativen Ladung auch unter physiologischen Bedingungen kolloidal stabil bleiben.

Das Verhalten der amino-funktionalisierten Partikel zeigt, dass die Oberflächeneigenschaften der Teilchen sich nach dem Kontakt mit den Serumproteinen deutlich verändern können. Die Rolle der Oberflächenfunktionalisierung im Bezug auf mögliche Wechselwirkungen der Nanopartikel mit lebenden Organismen und die Bedeutung der Proteinkorona sollen in weitergehenden Studien mit komplexen Zellkulturmodellen untersucht werden.

6 Sterisch stabilisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

6.1 Einleitung

Sterisch stabilisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel konnten in früheren Arbeiten bereits durch Kupplung von Poly(ethylenglykol) (PEG) an die hydrophoben, hydrido-funktionalisierten Partikel in einer Hydrosilylierungsreaktion dargestellt werden.^{99-101,105} Die Oberflächenfunktionalisierung mit PEG führt zu einer Erhöhung der Hydrophilie der Partikeloberfläche, wodurch der Transfer der Partikel aus organischen Lösungsmitteln ins Wasser und in biologische Media ermöglicht wird. Zu Beginn dieser Arbeit wurden Versuche zur Oberflächenmodifizierung der fluoreszenzmarkierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in einer Hydrosilylierungsreaktion durchgeführt, die durch den Karstedt-Katalysator, ein Platin-Divinyltetramethyldisiloxan-Komplex katalysiert wird. Allerdings wurde bei dieser Reaktion die Entstehung sehr kleiner kolloidaler Teilchen ($R < 3-4$ nm) mit TEM beobachtet, bei denen es sich wahrscheinlich um Platinkolloide handelt. Die Abtrennung dieser Teilchen von den Poly(organosiloxan)-Nanopartikel erwies sich als problematisch. Außerdem wurde auch eine deutliche Abnahme der absoluten Quantenausbeuten nach der Oberflächenfunktionalisierung festgestellt (Vgl. Anhang, S. 128, Tabelle 12.1), die möglicherweise durch die Reabsorption von Fluoreszenzlicht durch Platinkolloide oder auch eine teilweise Zerstörung des Farbstoffs im Zuge der Oberflächenfunktionalisierung verursacht wurde. Da eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel notwendig ist, um die zellulären Aufnahmestudien visualisieren zu können, mussten neue Strategien zur sterischen Oberflächenfunktionalisierung erarbeitet werden.

Als Grundgerüst für die Oberflächenmodifizierung werden fluoreszenz-markierte, carboxy-funktionalisierte Partikel **POS-COOH** bzw. amino-funktionalisierte Partikel **POS-NH₂** verwendet, deren Synthese in Kapitel 5 bereits erläutert wurde. Diese Partikel werden mit Poly(ethylenglykol) oder Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (PIPOX) umgesetzt. Die erhaltenen sterisch stabilisierten Partikeln werden in wässriger Lösung und unter physiologischen Bedingungen, die später auch bei den Zellversuchen angewandt werden sollen, charakterisiert.

6.2 Verwendete Polymere

6.2.1 Poly(ethylenglykol)

Poly(ethylenglykol) (**PEG**), auch sehr oft als Poly(ethylenoxid) (**PEO**) bezeichnet, ist ein lineares Polymer, das zur Klasse der Polyether gehört. Es wird durch lebende anionische Polymerisation von Ethylenoxid hergestellt und weist deshalb eine enge Größenverteilung auf.¹³⁷⁻¹³⁹

PEG weist eine Reihe von verschiedenen Eigenschaften auf, die es geeignet machen für verschiedene biomedizinische Anwendungen. Dazu gehören von allem sehr niedrige Toxizität, niedrige Bindungsaffinität zu Proteinen und Amphiphilie mit der damit verbundenen Löslichkeit sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösemitteln. Deshalb wird PEG sehr oft zur Oberflächenmodifizierung unterschiedlichster Nanopartikel eingesetzt und hilft oft die Blutzirkulationszeit der Partikel zu verlängern.^{14,18,52,140,141}

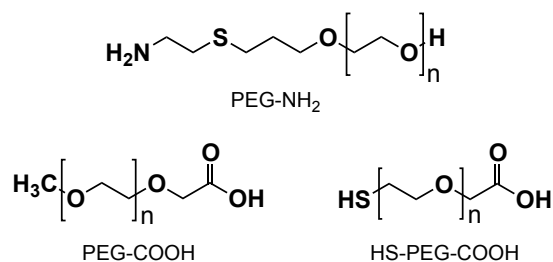


Abbildung 6.1: Für die Oberflächenfunktionalisierung verwendete PEG-Derivate.

In Abbildung 6.1 sind die für die Oberflächenfunktionalisierung verwendete PEG-Derivate gezeigt. Die Synthese des heterobifunktionellen α -Amino- ω -hydroxy-PEGs (**PEG-NH₂**) erfolgte ausgehend von α -Allyl- ω -hydroxy-PEG, das zuvor in anionischer Polymerisation mit Allylalkoholat (deprotoniert mit Phosphazenenbase) als Initiator hergestellt wurde.¹⁴² Die anschließende Einführung der Aminogruppen wurde mit Cysteamin-Hydrochlorid in einer AIBN-katalysierten Thiol-En-Reaktion durchgeführt.¹⁴³ Das für die Kupplung an amino-funktionalisierte Partikel verwendete α -Methoxy- ω -carboxy-PEG (**PEG-COOH**) wurde ausgehend von α -Methoxy- ω -hydroxy-PEG mittels einer selektiven Oxidation dargestellt.¹⁴⁴ α -Thio- ω -carboxy-PEG (**HS-PEG-COOH**) wurde kommerziell erhalten.

Für die Oberflächenfunktionalisierung wurde PEG mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 g/mol und 3000 g/mol verwendet. Die genauen Molekulargewichte der verwendeten Polymere sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Die Synthesevorschriften sind in Abschnitten 10.2.3.1 sowie 10.2.3.2 (S. 138) und MALDI-Tof Spektren im Anhang 12.2.2.2 (S. 157) aufgeführt.

Tabelle 6.1: Eigenschaften verwendeter PEG-Derivate. Die Massenmittelwerte wurden mit MALDI-Tof ermittelt.

PEG	Bezeichnung	M _n	M _w	PDI
α-Amino-ω-hydroxy-PEG	PEG-NH ₂	2331	2368	1.02
α-Thio-ω-carboxy-PEG ⁱ	HS-PEG-COOH	2021		1.03
α-Methoxy-ω-hydroxy-PEG	PEG-COOH	1975	1999	1.01

6.2.2 Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)

Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (**PIPOX**) gehört zu Polymerklasse der Poly(2-oxazoline) (POX). Poly(2-oxazoline) können durch kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Alkyloxazolinen dargestellt werden.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Auf Grund ihrer Strukturanalogie zu Polyaminosäuren werden Poly(2-oxazoline) oft als Pseudopeptide bezeichnet.¹⁴⁶

Poly(2-oxazoline) haben in den letzten Jahren auf Grund ihrer vielseitigen Eigenschaften stark an Bedeutung für biomedizinische Anwendungen gewonnen und werden als Alternative zu Poly(ethylenglykol) diskutiert.^{145,147-151} Poly(2-alkyl-2-oxazoline) mit kurzen Alkyl-Seitenketten, wie z. B. Methyl-, Ethyl- oder Isopropyl-, sind ähnlich wie PEG neben vielen hydrophilen und hydrophoben organischen Lösungsmitteln auch in Wasser löslich und weisen eine hohe Biokompatibilität auf.^{139,145-151} Poly(2-oxazoline) bieten weitere Vorteile gegenüber PEG: sie zeigen keine Organakkumulation und werden nahezu vollständig aus dem Körper ausgeschieden.¹⁵⁰ Des Weiteren bilden sie keine toxischen Peroxide.¹⁵⁰

ⁱ Datenblatt des Herstellers (Jenkem technology, www.jenkemusa.com)

Wie auch andere nicht-geladene Polymere weisen Poly(2-oxazoline) thermoresponsives Verhalten auf. Die untere Entmischungstemperatur (LCST) kann dabei über die Monomerzusammensetzung der (Block-co-)Polymere gesteuert werden und wird auch von Salz-Effekten gemäß der Hofmeister-Reihe beeinflusst.^{139,145,146,152,153} Einige Poly(2-oxazoline), u. a. Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (PIPOX), haben ferner auch die Eigenschaft bei Temperaturen höher als die untere Entmischungstemperatur zu kristallisieren und kristalline Mikropartikel zu bilden.^{154,155} PIPOX ist besonders interessant für biomedizinische Anwendungen, da seine Phasenseparationstemperatur bei etwa 37 °C liegt, also sehr nah an die Körpertemperatur.

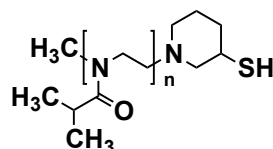


Abbildung 6.2: ω -Thio-poly(2-isopropyl-2-oxazolin), das für die Oberflächenmodifizierung der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel verwendet wurde.

Für die Oberflächenfunktionalisierung der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel wurde in dieser Arbeit ein Thiol-terminiertes Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) **PIPOX-SH** mit ca. 67 Wiederholungseinheiten verwendet (Abbildung 6.2). Das Polymer wurde von C. Diehl am MPI Golm in einer ringöffnenden kationischen Polymerisation von 2-Isopropyl-2-oxazolin mit Methyltosylat als Initiator synthetisiert. Für die Abbruchsreaktion wurde Diallylamin verwendet. Die Thiolgruppe wurde durch UV-katalysierte Addition der Thioessigsäure an die terminalen Doppelbindungen mit der anschließenden Abspaltung von Acetat eingeführt. Die Mittelwerte des Molekulargewichts des **PIPOX-SH** sind in Tabelle 6.2 gezeigt.

Tabelle 6.2: Charakterisierung des in dieser Arbeit verwendeten ω -Thio-poly(2-isopropyl)-2-oxazolins mit MALDI-TOF.

PIPOX	Bezeichnung	M_n	M_w	PDI
ω -Thio-poly(2-isopropyl)-2-oxazolin	PIPOX-SH	7772	7810	1.005

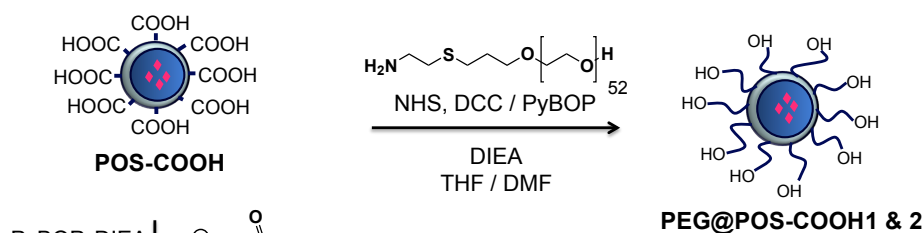
6.3 Grafting von PEG an die carboxy-funktionalisierten Nanopartikel

6.3.1 Synthese und Charakterisierung

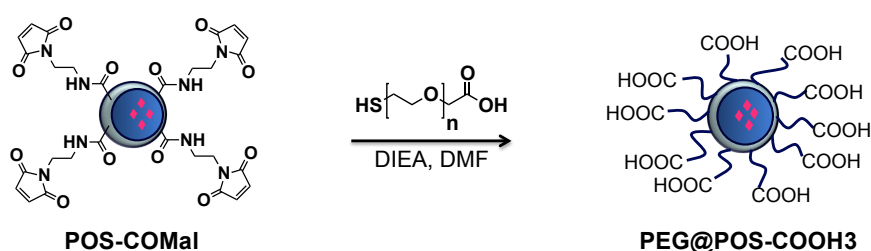
Fluoreszenz-markierte, carboxy-funktionalisierte Partikel können durch Verwendung funktionalisierter Monomere bei der Polykondensation dargestellt werden (Kapitel 5). Die Einführung der Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche erlaubt die weitere Funktionalisierung der Oberfläche mittels Amid-Kupplung. Die bereits sehr ausführlich erforschte Peptidchemie ermöglicht hierbei den Einsatz verschiedenster Kupplungsreagenzien, wie z. B. unterschiedliche Carbodiimide (EDC, DCC) und Aktivester (NHS, PyBOP). Die Reaktionsführung ist sowohl in unpolaren als auch in polaren Lösungsmitteln möglich, einschließlich auch in Wasser, unter Verwendung verschiedener Basen als Katalysatoren. Die Reaktionsbedingungen können demzufolge optimal auf das zu funktionalisierende System abgestimmt werden.^{134,156}

In dieser Arbeit wurden verschiedene PEGylierungs-Routen getestet (Schema 6.1). Als Ausgangspartikel für die Funktionalisierung wurden die carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** (Vgl. Abschnitt 5.2 S. 56) nach Transfer in THF verwendet. Die Carboxygruppe kann nach der Aktivierung mit dem Aktivester mit **PEG-NH₂** umgesetzt werden (Schema 6.1, I). Diese PyBOP-vermittelte Kupplung wird in THF mit *N,N*-Ethyl-diisopropylamin (DIEA) als Base durchgeführt.¹⁵⁷ Gleichzeitig können Thiolreaktive Partikel **POS-COMal** durch Einführung der Maleinimidgruppen in einer PyBOP-vermittelten Kupplungsreaktion mit *N*-(2-Aminoethyl)-maleinimid dargestellt werden (Schema 6.1, II). Die Maleinimidogruppe reagiert mit Thiolen in einer Thiol-En Reaktion (auch „Thio-Click“ genannt) mit nahezu 100% Ausbeute.^{158,159} Da die Reaktion mit Thiolen selektiv verläuft, kann die Umsetzung mit den Polymeren, die neben der Thiol-Gruppe weitere funktionelle Gruppen enthalten, ohne Verwendung von Schutzgruppen durchgeführt werden kann. So konnten die maleinimido-funktionalisierten Partikel mit heterobifunktionellem **HS-PEG-COOH** umgesetzt werden. Dieses PEG-Derivat enthält neben der Thiol-Gruppe noch eine freie Carboxy-Gruppe, die beispielsweise für die Konjugation von Biomolekülen an die PEGylierten Partikel verwendet werden kann.

I. Aufpfropfen von Aminen



II. Aufpfropfen von Thiolen



Schema 6.1: Oberflächenfunktionalisierung der carboxy-modifizierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit PEG.

Sowohl die PEGylierung der Aktivester-aktivierten, als auch der maleinimido-funktionalisierten Partikel liefern Partikel, die ohne Zusatz weiterer Stabilisatoren wasserlöslich sind. Nach Dialyse gegen Wasser können die Partikel mit TEM und Cryo-TEM visualisiert werden. In Abbildung 6.3 sind Cryo-TEM- (links) und TEM-Aufnahmen (rechts) wasserlöslicher, PEGylierter Partikel gezeigt. Die Cryo-TEM-Aufnahme gibt den Zustand der Partikel in Lösung wieder, die durch eine PyBOP-vermittelte Kupplungsreaktion mit **PEG-NH₂** funktionalisiert wurden (Probe **PEG@POS-COOH1**). Auf der Aufnahme sind hauptsächlich Einzelpartikel mit dem durchschnittlichen Radius von $10.7 \text{ nm} \pm 14\%$ und keine Agglomerate zu erkennen. Da die Elektronendichte der PEG-Hülle zu niedrig ist, liefert PEG nicht ausreichend Kontrast zur Abbildung mit Cryo-TEM. Somit ist auf der Aufnahme nur das Poly(organosiloxan)-Grundgerüst zu erkennen. Eine genaue Ausmessung der Partikel ist deshalb eigentlich nicht möglich. Der Radius des Poly(organosiloxan)-Gerüsts **POS-COOH** aus dem Cryo-TEM ist niedriger, als der mit der DLS bestimmte hydrodynamische Radius, der 14.9 nm in wässriger Glycin-Lösung mit 5 mM Natriumchlorid beträgt (Vgl. Abschnitt 5.2.1, S. 57). Dieser leichte Unterschied kommt höchstwahrscheinlich durch die Anwesenheit

der Agglomerate in sehr niedriger Konzentration zustande. Diese wurden nicht mit Cryo-TEM abgebildet, beeinflussen aber dennoch das Ergebnis der DLS-Messung. Die Cryo-TEM-Aufnahmen wurden bei relativ hoher Probenkonzentration von 0.9 mg/mL gemacht. Aus diesem Grund liegen die Partikel vergleichsweise dicht gepackt in regelmäßigen Abständen von durchschnittlich 17 nm vor. Mit der Annahme, dass die Partikel mit ihren gequollenen Polymerhüllen nahezu aneinander angrenzen, kann auch der hydrodynamische Radius berechnet werden. Dieser resultiert aus der Summe der Radien des Poly(organosiloxan)-Grundgerüsts und der halben Abstände zwischen den Partikeln und liegt bei etwa $19 \text{ nm} \pm 10\%$.

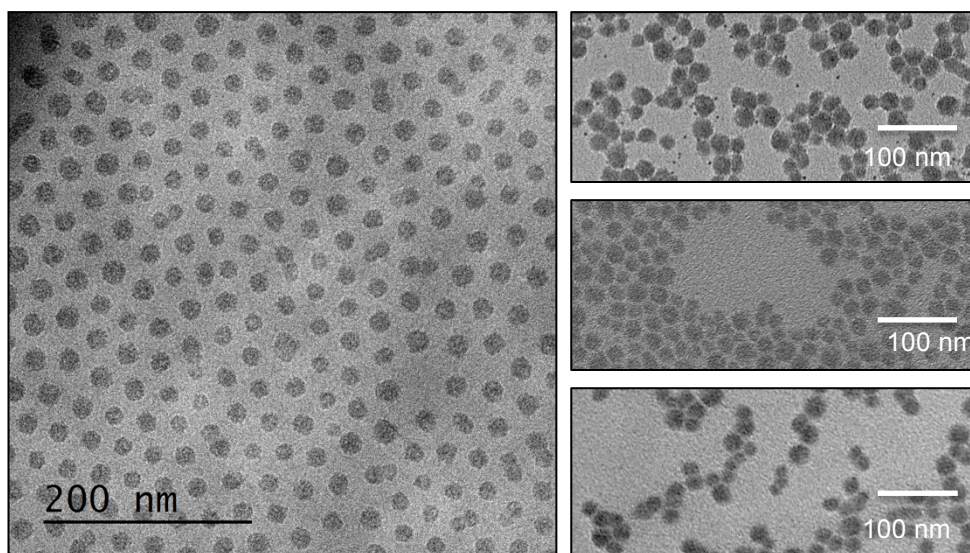


Abbildung 6.3: Links: Cryo-TEM Aufnahme der Partikel PEG@POS-COOH1, die durch Grafting von PEG-NH₂ an Aktivester (PyBOP) carboxyfunktionalisierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel dargestellt wurden. Maßstabsbalken entspricht 200 nm. Rechts: TEM-Aufnahmen PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel getrocknet aus Wasser. Rechts oben: Partikel PEG@POS-COOH1. Rechts Mitte: Partikel PEG@POS-COOH2, synthetisiert durch Kupplung von PEG-NH₂ an NHS-Ester carboxyfunktionalisierter Partikel. Rechts unten: Partikel PEG@POS-COOH3 nach Grafting von HS-PEG-COOH an maleinimido-funktionalisierter Partikel. Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Die TEM-Aufnahmen (Abbildung 6.3, rechts) zeigen wasserlösliche Partikel, die auf verschiedenen Routen PEGyliert wurden: nach PyBOP-vermittelten (rechts oben, Probe PEG@POS-COOH1) und nach NHS-vermittelten Kupplung von PEG-NH₂ (rechts Mitte, Probe PEG@POS-COOH2) sowie nach Kupplung von HS-PEG-COOH an die

maleinimido-funktionalisierte Partikel (rechts unten, Probe **PEG@POS-COOH3**). Im Gegensatz zu den Cryo-TEM-Aufnahmen sind auf den TEM-Aufnahmen hauptsächlich Agglomerate zu erkennen, welche während der TEM-Trockenpräparation entstanden sind. Auch mit dem TEM ist die Abbildung der PEG-Hülle wegen des niedrigen Kontrasts zum Kohlefilm ohne Zusatz von Kontrastmitteln nicht möglich. Bei der Größenbestimmung mit den TEM-Aufnahmen wurden erneut nur Poly(organosiloxan)-Kern und -Schale ausgemessen. Die aus TEM bestimmten Radien der getrockneten Partikel, die nur als die ungefähren Richtwerte für die Größenbestimmung dienen, sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst. Die durchschnittlichen Radien liegen zwischen 11 nm und 12 nm. Der Radius der Partikel (Probe **POS-COOH**), die als Ausgangspartikel für die Funktionalisierung eingesetzt wurden, beträgt $9.1 \text{ nm} \pm 19\%$ nach Präparation aus methanolischer Lösung und $9.9 \text{ nm} \pm 20\%$ nach Präparation aus wässriger Dispersion vor dem Endstoppen. Die TEM-Radien der PEGylierten Partikel fallen geringfügig höher aus, liegen aber trotzdem im Fehlerbereich der Werte vor der Funktionalisierung, so dass keine signifikante Größenänderung festgestellt werden kann. Außerdem könnte auch die kollabierte PEG-Hülle, die auch den schwächeren Kontrast der Proben zu Folge hat, diese leichte Zunahme der Radien der getrockneten Partikel verursachen.

Die hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ der Partikel in wässriger Lösung wurden mit winkelabhängiger DLS bestimmt und liegen im Durchschnitt bei 22-27 nm ($\mu 2$ ca. 0.1; Tabelle 6.3). Der Radius der Partikel **PEG@POS-COOH1** beträgt 22.6 nm und ist mit dem hydrodynamischen Radius aus Cryo-TEM (19 nm) vergleichbar. Es kann somit eine Zunahme der hydrodynamischen Radien nach PEGylierung festgestellt werden. Die Radienzunahme ist vor allem bei der Probe **PEG@POS-COOH3** zu hoch, um alleine durch Kupplung von PEG verursacht worden zu sein. Neben den Einzelpartikeln liegen in dieser Probe wahrscheinlich auch einige Agglomerate vor. Diese leichte Präagglomeration der Partikel könnte beispielsweise durch Bildung der Wasserstoffbrücken zwischen PEG-Ketten zustande kommen.

Die ζ -Potentiale der Partikel, die mit **PEG-NH₂** modifiziert wurden und somit mit Hydroxygruppen an dem äußeren PEG-Ende funktionalisiert sind, liegen bei -12 mV bzw. -10 mV. Für **HS-PEG-COOH**-modifizierte Partikel wird ein negativerer Wert von -21 mV erhalten, der durch Carboxygruppen am PEG verursacht wird (in 5 mM Natriumchloridlösung, $\text{pH} \approx 7$); Tabelle 6.3). Insgesamt lässt sich eine Abnahme der Oberflächenladung im Vergleich zu den Edukt-Partikeln **POS-COOH** beobachten, die

durch die Umsetzung der Carboxygruppen während der Oberflächenfunktionalisierung verursacht wird.

Tabelle 6.3: Charakterisierung der PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel. Die DLS-Messungen wurden in Wasser bei 296 K durchgeführt. Zur Auswertung der AKF wurde die biexponentielle Anpassung verwendet. Die ζ -Potentiale wurden in 5 mM Natriumchlorid-Lösung ($\text{pH} \approx 7$) bei 295 K bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen sind im Anhang in Tabelle 12.3 aufgelistet.

Syntheseweg (Probenbezeichnung)	R / nm (TEM)	$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm (DLS)	μ_2	ζ -Potential / mV
Edukt-Partikel (POS-COOH in Glycin-Lösung)	$9.9 \pm 20\%^i$	14.9	0.09	-32 ± 2
PyBOP-vermittelte PEGylierung mit PEG-NH ₂ (PEG@POS- COOH1)	$11.3 \pm 16\%$	22.6	0.13	-12 ± 1
Kupplung von PEG-NH ₂ an NHS-Ester (PEG@POS- COOH2)	$10.3 \pm 13\%$	25.6	0.15	-10 ± 1
Kupplung von HS-PEG-COOH an Maleinimid (PEG@POS- COOH3)	$12.0 \pm 17\%$	27.1	0.10	-21 ± 1

Die Bestimmung der Pflropfdichte wurde mit der thermisch-gravimetrischen Analyse (TGA) durchgeführt.^{160,161} Der Vergleich mit den nicht-PEGylierten Edukt-Partikel **POS-COOH** ergibt einen durchschnittlichen PEG-Anteil von ca. 46 Gew.-% für die Partikel, die über die NHS-Ester-Route dargestellt wurden. Für PEGylierte Partikel, die über die Maleinimid-Route synthetisiert wurden, werden höhere Werte von durchschnittlich 75 Gew.-% bestimmt (alle TGA-Kurven befinden sich im Anhang, Abschnitt 12.2.2.3, S. 159). Die Kupplung von PEG an Maleinimid verläuft anscheinend effizienter als die Kupplung an NHS-Ester. Der PEG-Anteil nach Maleinimid-Kupplung erscheint relativ hoch. Es werden ca. 1.5 mmol PEG pro 1 g Edukt-Partikel umgesetzt. Der genaue Gewichtsanteil der funktionellen Gruppen in Edukt-Partikeln konnte mit TGA bzw. TG-FTIR und TG-MS nicht bestimmt werden. Geht man von einem

ⁱ Probe getrocknet aus wässriger Dispersion

vollständigen Einbau des Monomers **T-PSA** in die Partikelschale während der Polykondensation aus, so enthält die Schale maximal 2.6 mmol/g Carboxygruppenⁱ. Der daraus resultierende maximal mögliche PEG-Gewichtsanteil beträgt 83 Gew.-%. Der PEG-Anteil liegt somit unterhalb der theoretisch möglichen, maximalen Menge. Es kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des Polymers nicht kovalent sondern nur adsorptiv an die Oberfläche bereits PEGylierter Partikel angebunden ist. Eine rein adsorptive Bindung zwischen Partikel und PEG kann ausgeschlossen werden, da diese nicht ausreicht, um Partikel in Wasser zu stabilisieren. Die Partikel fallen dann im Zuge der Dialyse aus. Es wäre allerdings möglich, dass freie PEG-Ketten durch Van-der-Waals-Kräfte bzw. Wasserstoffbrücken an die kovalent angebundene PEG-Ketten adsorptiv binden.

Tabelle 6.4: Vergleich der absoluten Quantenausbeuten vor und nach der Oberflächenmodifizierung. Es kann keine signifikante Änderung der Quantenausbeuten nach der Funktionalisierung festgestellt werden.

Probe	Absolute Fluoreszenzquantenausbeute
Rhodamin B-markiertes Monomer	54 ± 4%
Carboxy-funktionalisierte Partikel POS-COOH nach Endstoppen	63 ± 4%
PEGylierte Partikel (Synthese über NHS-Ester, Probe PEG@POS-COOH2b)	54 ± 3%

Die spektroskopischen Eigenschaften der Partikel nach der Oberflächenfunktionalisierung wurden mit Absorptions- und Emissionsmessungen mit der Ulbricht-Kugel untersucht. Tabelle 6.4 zeigt den Vergleich der absoluten Quantenausbeuten Rhodamin B-markierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel vor und nach PEGylierung mit der Quantenausbeute des markierten Monomers. Wie im Abschnitt 5.2 (S. 56) bereits erwähnt, fällt die Quantenausbeute der Partikel nach dem Endstoppen in Methanol etwas höher aus als die Quantenausbeute des markierten Monomers. Die

ⁱ Bei der Partikelsynthese wurden 25 Gew.-% T-PSA eingesetzt. Bei vollständiger Hydrolyse und Kondensation der Ethoxy-Gruppen ergibt sich der Molekulargewicht der funktionellen Gruppen wie folgt: $M(\text{PSA}) = M(\text{T-PSA}) - 3xM(\text{Ethyl}) - 1.5xM(\text{O}) = 196 \text{ g/mol}$; $n(\text{COOH}) = 2xn(\text{PSA})$

Quantenausbeute der Partikel nach Oberflächenfunktionalisierung wurde zu $54 \pm 3\%$ bestimmt und unterscheidet sich demnach nicht von der Quantenausbeute des markierten Monomers. Die Oberflächenmodifizierung mit PEG unter den Bedingungen einer Peptidkupplung führt zu keiner bemerkenswerten Änderung der spektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors im Gegensatz zu Hydrosilylierungsreaktion, die in früheren Arbeiten zur Oberflächenfunktionalisierung eingesetzt wurde.^{100,101,105}

6.3.2 Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

Die Stabilität der Partikel in physiologisch-relevanten Lösungsmitteln wurde mit der winkelabhängigen DLS untersucht. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den AF-FFF-Messungen verglichen, die Thomas Lang im Rahmen seiner Promotion durchgeführt hat.¹⁶² Die genaue Vorgehensweise bei der Charakterisierung von Nanopartikel-Protein-Gemischen mit der DLS wurde in den Abschnitten 3.1.3 (S. 36) und 5.2.2 (S. 59) bereits erläutert.

In Abbildung 6.4 (links) ist die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien $1/R_{h,z}$ der PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel gezeigt, die in einer NHS-Ester-vermittelten Kupplungsreaktion mit **PEG-NH₂** umgesetzt wurden (Probe **PEG@POS-COOH2**). Im Zellkulturmedium RPMI 1640 sind die inversen Radien nahezu unabhängig von Detektionswinkel. Darüber hinaus ist eine leichte Abnahme des hydrodynamischen Radius von 25.6 nm in reinem Wasser auf 22.6 nm im Zellkulturmedium zu beobachten. Möglicherweise werden die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln durch Salze und weitere Bestandteile des Mediums abgeschwächt, was zu einer Abnahme des Radius führt. Dies wird auch durch die Abnahme des μ_2 -Wertes von 0.15 in Wasser auf 0.08 im Zellkulturmedium verdeutlicht. Der kleinere μ_2 -Wert weist auf eine Zunahme der Monodispersität der gelösten Partikel hin.

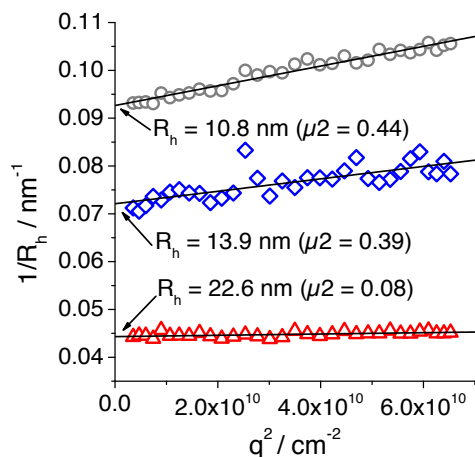


Abbildung 6.4: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Probe PEG@POS-COOH₂, $c = 0.14$ mg/mL) in verschiedenen physiologisch-relevanten Lösungsmitteln (Δ NPs in RPMI 1640, \diamond NPs in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS) und Vergleich mit Serumproteinen (\circ RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). $T = 296$ K.

Für die Auswertung der Mischung aus den Nanopartikeln und den Proteinen wird zunächst eine triexponentielle Anpassung der Autokorrelationsfunktion verwendet. Auch wenn diese nur bedingt geeignet ist, um die Autokorrelationsfunktion der Partikel im Serum zu beschreiben, liefert sie trotzdem allgemeine Informationen über den Agglomerationszustand der Partikel. Die inversen Radien der Nanopartikel-Protein-Mischung zeigen einen leicht winkelabhängigen Verlauf, der durch die breite Größenverteilung der Serumproteine verursacht werden könnte. Der hydrodynamische Radius der Partikel in Serum wurde zu 13.9 nm ermittelt. Der Vergleich mit fetalem Kälberserum ohne Nanopartikel im Zellkulturmedium zeigt, dass die Radien der Partikel-Protein-Mischung zwischen den Radien der Partikel in serumfreien RPMI 1640 und den Radien der Mischung der Serumproteine liegen. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass keine größeren Agglomerate in der Mischung vorliegen.

Die Multikomponentenanalyse der Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Protein-Mischung erfolgt mit der triexponentiellen Anpassung des Serums und der biexponentiellen Anpassung der Nanopartikel-Protein-Komplexe nach Gleichung (3-14). Abbildung 6.5 zeigt die Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Protein-Mischung mit Fitfunktion nach Gleichung (3-14) und Residuum (links) sowie die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien $1/R_{h,z}$ (rechts). Das Residuum zeigt keine Abweichungen von Null, die verwendete Fitfunktion ist demnach

gut zur Beschreibung der Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Protein Mischung geeignet. Aus der Winkelabhängigkeit wird der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 24 nm bestimmt.

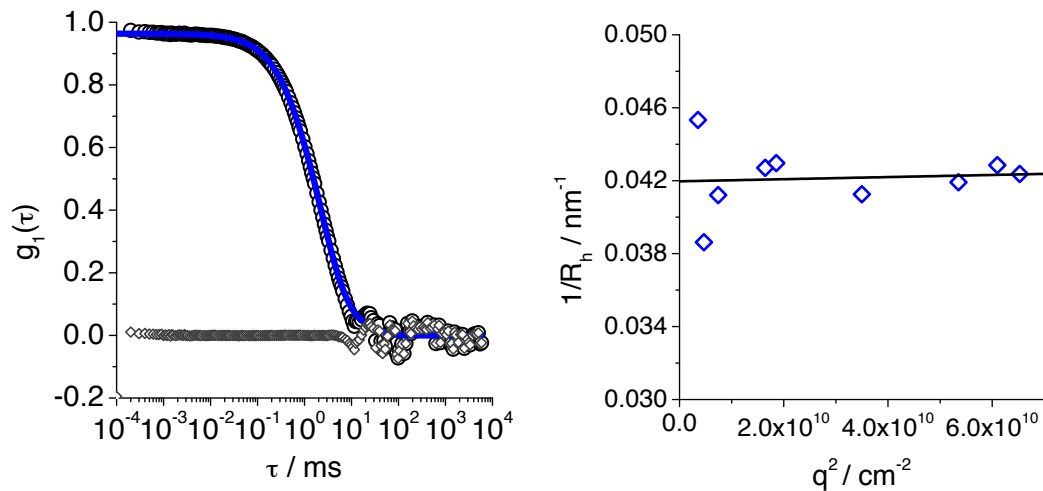


Abbildung 6.5: Links: \circ Autokorrelationsfunktion der PEGylierten Partikel (Probe PEG@POS-COOH₂, $c = 0.14 \text{ mg/mL}$) in RPMI mit 5 Gew.-% FCS bei $\theta = 26^\circ$, — Fit der AKF nach Anpassung mit (3-14), \diamond Residuum. Rechts: Winkelabhängigkeit der inversen hydrodynamischen Radien. $T = 296 \text{ K}$.

Durch die niedrige Konzentration der Partikel im Vergleich zu der Konzentration der Serumproteine und den relativ geringen Größenunterschied zwischen den Nanopartikeln und den Proteinen, wird die Trennung der Autokorrelationsfunktion der Partikel von der Autokorrelationsfunktion der Proteine bei der Multikomponentenanalyse erheblich erschwert. Auch die Streuung der Werte um die Regressionsgerade, vor allem bei kleinen Winkeln, verdeutlicht dieses Verhalten. Der leichte Unterschied zwischen den Partikelradien in dem serumfreien und dem serumhaltigen RPMI-Medium ist somit auf den Fehler bei der Bestimmung der Radien in Anwesenheit der Proteine zurückzuführen. Die Partikel adsorbieren nach der PEGylierung kaum Proteine im Gegensatz zu den carboxy-funktionalisierten Edukt-Partikeln **POS-COOH**, die mit den Serumproteinen Nanopartikel-Protein-Komplexe mit $\langle R_h \rangle_z^{-1} = 30 \text{ nm}$ bilden (Vgl. Abschnitt 5.2.2, S. 59).

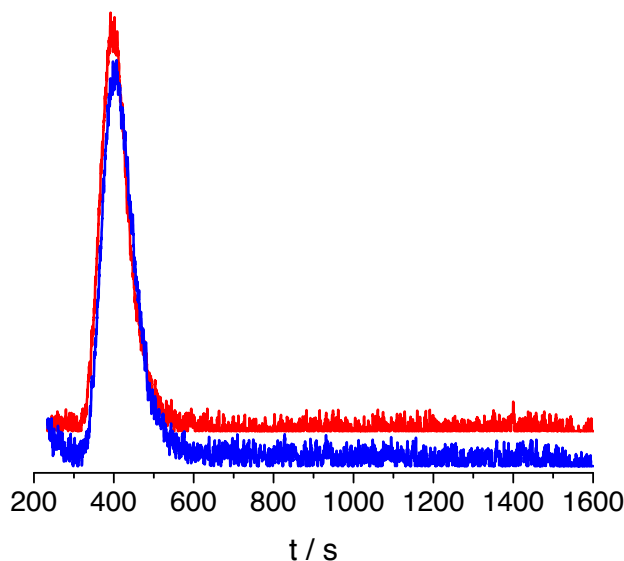


Abbildung 6.6: AF-FFF-Eluogramm: Fraktionierung der PEGylierten Nanopartikel mit und ohne Serumproteine. Als Probe wurden verwendet: Partikel PEG@POS-COOH2 — in Wasser und — in RPMI + 5 Gew.-% FCS. Eluent: Wasser. Fluoreszenz-Detektor.

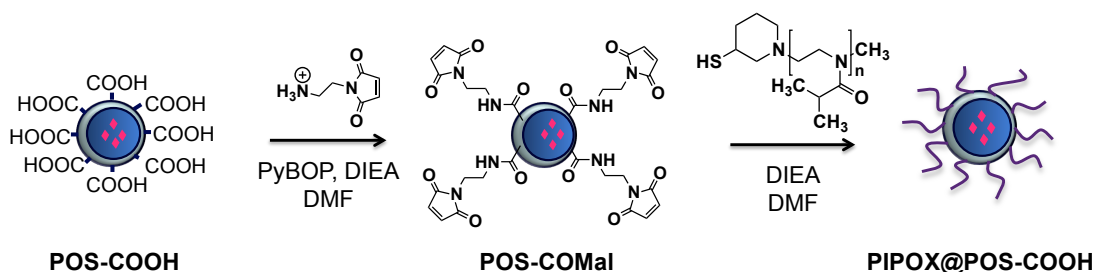
Die Fraktionierung der Nanopartikel und Proteine nach ihrer Größe wurde mit der AF-FFF durchgeführt. Abbildung 6.6 zeigt AF-FFF-Eluogramme der PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel und einer Mischung aus PEGylierten Partikeln und fetalem Kälberserum. Die Fraktionierung beider Proben liefert jeweils nur eine Fraktion. Die starke Fluktuation des Signals wird durch die niedrige Probenkonzentration verursacht. Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius R_h anhand einer Kalibrierung mit Silica-Standard ergibt für reine Partikel 24 nm und für Nanopartikel-Protein-Komplexe 25 nm. Die Radien unterscheiden sich nur wenig von den Radien aus der DLS. Der leichte Unterschied der Ergebnisse aus der DLS und der AF-FFF kommt durch die höhere Empfindlichkeit der DLS gegenüber großen Teilchen zustande. Außerdem werden mit der DLS und der AF-FFF unterschiedliche Mittelwerte ermittelt.

In Anwesenheit der Proteine ist auch mit AF-FFF nur eine geringe Zunahme des hydrodynamischen Radius zu beobachten. Somit zeigen die AF-FFF-Messungen, dass die Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche nach der PEGylierung deutlich reduziert wird und keine größeren Nanopartikel-Protein-Agglomerate gebildet werden.

6.4 Thermoresponsive Nanopartikel durch Kupplung von Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)

6.4.1 Synthese und Charakterisierung

Das Aufpfropfen von ω -Thio-poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (**PIPOX-SH**) erfolgt analog zur Kupplung von **HS-PEG-COOH** an die Rhodamin B-markierten, maleinimido-funktionalisierten Partikel **POS-COMal** in einer Thiol-En-Reaktion (Schema 6.2). Als Produkt werden wasserlösliche Partikel erhalten.



Schema 6.2: Grafting von ω -Thio-poly(2-isopropyl-2-oxazolin) an carboxy-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel.

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ mit der DLS ergibt einen Wert von 31.1 nm ($\mu_2 = 0.13$; Probe **PIPOX@POS-COOH**) in wässriger Lösung. Der Radius der PIPOXYlierten Partikel fällt somit etwas höher aus als die Radien der PEGylierten Partikel (Vgl. Abschnitt 6.3, S. 73). Dies kann auf das höhere Molekulargewicht des eingesetzten Polymers (**PIPOX-SH**, $M_n \approx 7772$ g/mol) und somit den höheren Trägheitsradius zurückgeführt werden. Auch eine leichte Präagglomeration der Probe bereits bei Raumtemperatur auf Grund der reversiblen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln kann die Zunahme des Radius nach der PIPOXYlierung verursachen.

Das ζ -Potential der Partikel beträgt (-4 ± 1) mV in 5 mM Natriumchloridlösung ($\text{pH} \approx 7$). Die Oberflächenladung ist somit niedriger als die der Ausgangspartikel, ähnlich wie bei der PEGylierung.

Der PIPOX-Anteil wurde mit der TGA zu 93 Gew.-% bestimmt. Dies entspricht dem Umsatz von ca. 1.7 mmol PIPOX pro 1 g Edukt-Partikel. Der Umsatz der PIPOXYlierung ist also mit PEGylierung (1.5 mmol PEG / 1 g Edukt-NPs) vergleichbar.

Der Trübungspunkt der Partikel in Wasser wurde auf 34 °C ermittelt (Abbildung 6.7). Als Trübungspunkt wird hier die Temperatur angegeben, bei der die Transmission beim Erhitzen auf 80% sinkt (rote Kurve). Der Trübungspunkt von reinem PIPOX liegt bei 37 °C, es findet eine geringe Änderung des Phasenverhaltens nach Aufpfropfen des Polymers an die Nanopartikel statt.^{155,163} Beim Kühlen der Probe nimmt die Transmission wieder zu (blaue Kurve). Es wird ein typischer Verlauf mit einer Hysterese beobachtet, die leichte Schulter in der Kühlkurve bei ca. 35 °C kommt wahrscheinlich durch zu schnelles Kühlen der Probe zustande.

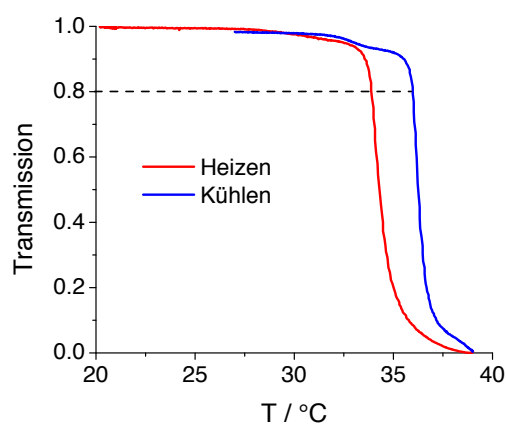


Abbildung 6.7: Bestimmung des Trübungspunktes PIPOX-funktionalisierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in Wasser (c = 0.25 mg/mL) mit Trübungsphotometer. Der Trübungspunkt bei 80% Transmission liegt bei 34°C. Heizrate 1 K/min. Detektion bei $\lambda = 599$ nm.

Zusätzlich zur Bestimmung des Trübungspunktes wird das temperaturabhängige Agglomerationsverhalten der Partikel mit der DLS untersucht.

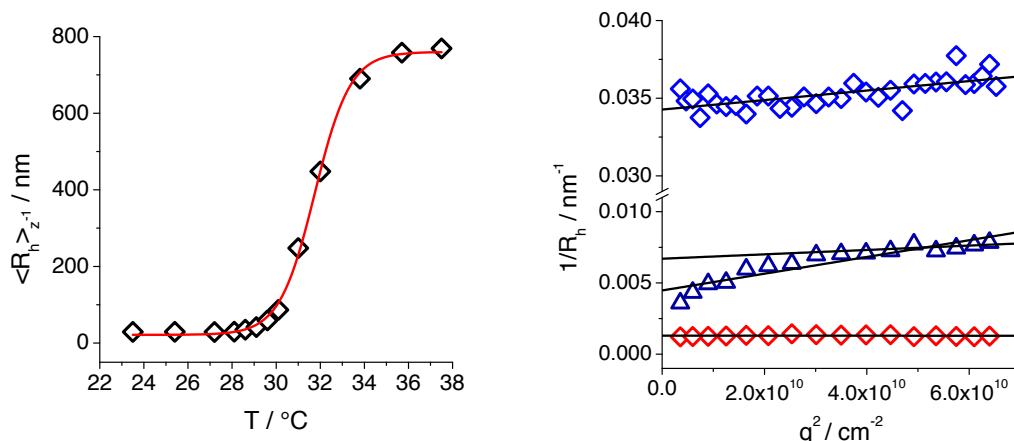


Abbildung 6.8: Links: temperaturabhängiges Agglomerationsverhalten PIPOX-modifizierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ($c = 0.25 \text{ mg/mL}$). \diamond $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen mit — Boltzmann-Fit. Rechts: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien \diamond bei $23.5 \text{ }^\circ\text{C}$ vor dem Erhitzen, $\color{red}\diamond$ bei $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$, \triangle nach Abkühlen auf $23.5 \text{ }^\circ\text{C}$.

In Abbildung 6.8 (links) ist die Temperaturabhängigkeit des hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ gezeigt ($c = 0.25 \text{ mg/mL}$). Wie erwartet steigt der hydrodynamische Radius sigmoidal mit steigender Temperatur. Die Zunahme des Radius und somit die durch Phasenseparation des PIPOXs verursachte Agglomeration der Partikel beginnt bereits bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$, also unterhalb des mit Turbidimetrie bestimmten Trübungspunktes. Bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ liegen Agglomerate von 760 nm vor. Bei der weiteren Temperaturerhöhung findet keine signifikante Zunahme des Radius statt. Die leichte Diskrepanz der mit DLS und Trübungsphotometrie bestimmten Temperaturen ist auf die jeweils detektierten Messgrößen zurückzuführen. Bei der Trübungsphotometrie wird die Transmission der Probe und bei der DLS der hydrodynamische Radius gemessen. Durch die leichte Zunahme des hydrodynamischen Radius, wie er zwischen $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und $30 \text{ }^\circ\text{C}$ stattfindet, wird noch keine Abnahme der Transmission verursacht. Ein weiterer Grund liegt in der Durchführung der Messung: während der trübungsphotometrischen Untersuchung wird die Temperatur kontinuierlich erhöht, ohne die Probe bei bestimmten Temperaturen zu inkubieren. So wird die für den Wärmeaustausch benötigte Zeit nicht berücksichtigt. Es wird die Temperatur des Heizblocks und nicht die eigentliche Temperatur der Probe detektiert, was eine Verschiebung zu höheren Messwerten zur Folge hat. Bei der DLS-Messung wird die Probe hingegen mindestens fünf Minuten vor Beginn der Messung im

Toluol-Bad der DLS-Anlage inkubiert, um die temperaturbedingten Größenänderungen während der DLS-Messung soweit wie möglich zu vermeiden.

Nach dem Abkühlen der Probe sinkt der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ wieder (Abbildung 6.8, rechts). Es liegen nach dem Abkühlen allerdings größere Partikel vor, als vor dem Erhitzen der Probe. Der hydrodynamische Radius wurde durch Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ der reziproken Radien bei allen Winkeln zu 224 nm ($\mu_2 = 0.31$) bestimmt. Die Radien zeigen außerdem einen winkelabhängigen Verlauf: Durch die Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ der inversen hydrodynamischen Radien bei den großen Winkeln $\theta = 122^\circ$ - 146° erhält man einen kleineren hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 149 nm. Die Agglomeration der Probe könnte durch die Verzahnung der PIPOX-Segmente oberhalb der Phasenseparationstemperatur und die damit einhergehenden Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben PIPOX-Ketten bzw. zwischen PIPOX-Ketten und POS-Kern verursacht worden sein. Der detaillierte Agglomerationsmechanismus wurde nicht untersucht. Denkbar wäre, dass hier, ähnlich wie bei der Kristallisation des PIPOXs, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Isopropyl-Resten sowie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Amid-Gruppen auftreten.¹⁶⁴ Diese Wechselwirkungen bleiben anscheinend auch nach dem Abkühlen der Partikel zumindest teilweise bestehen, weshalb die Größe der Partikel nach dem Abkühlen nicht auf den Ursprungswert sinkt. Eine mögliche Beeinflussung des Agglomerationsverhaltens durch die spezifischen Ioneneffekte oder den pH-Wert wurde nicht weiter untersucht.

6.4.2 Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

Die Größenbestimmung unter physiologischen Bedingungen im Zellkulturmedium RPMI 1640 mit und ohne FCS wurde mit DLS durchgeführt. Eine Fraktionierung der Probe mit AF-FFF war auf Grund zu niedriger Probenkonzentration nicht möglich.

Abbildung 6.9 zeigt die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien $1/R_{h,z}$ der Partikel in verschiedenen Medien sowie den Vergleich mit RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS. Zur Auswertung der Autokorrelationsfunktionen wurde in RPMI 1640 die biexponentielle Anpassung und in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS die triexponentielle Anpassung verwendet. Der Radius der Partikel in RPMI 1640 wurde zu 30.9 nm ($\mu_2 = 0.14$) bestimmt, die Änderung des Radius beim Wechsel des Mediums von Wasser

zu RPMI ist sehr gering und liegt somit im Fehlerbereich der beiden Messwerte. Die leichte Winkelabhängigkeit weist auf eine mögliche Präsenz größerer Agglomerate in der Probe hin. In RPMI mit 5 Gew.-% FCS erhält man nach der triexponentiellen Anpassung den Mittelwert aus dem Radius der Partikel und dem Radius der Proteinmischung, ähnlich wie im Fall der PEGylierten Nanopartikel (Vgl. Abschnitt 6.3.2, S. 79). Die triexponentielle Anpassung zeigt hier jedoch auch, dass keine größeren Agglomerate nach Zusammenmischen der Partikel mit den Serumproteinen entstehen.

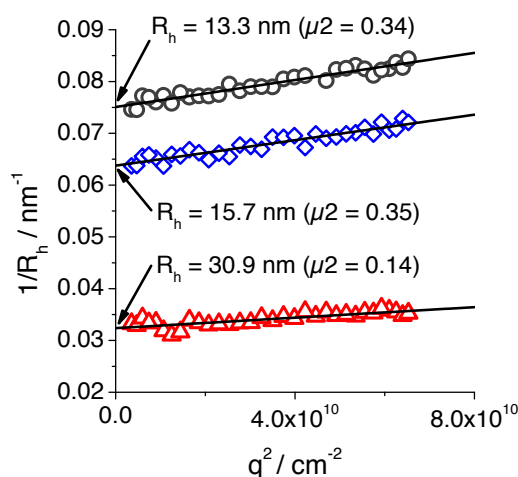


Abbildung 6.9: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien PIPOXYlierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Partikel PIPOX@POS-COOH, $c = 0.25 \text{ mg/mL}$) Δ in Zellkulturmedium RPMI 1640, \diamond in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (triexponentielle Anpassung der AKF) und \circ Vergleich mit Serumproteinen (RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). $T = 296 \text{ K}$.

Die Multikomponentenanalyse der Autokorrelationsfunktionen der Partikel und des Serums wurde mit triexponentieller Anpassung des Serums und biexponentieller Anpassung der Partikel nach Gleichung (3-14) durchgeführt. Abbildung 6.10 zeigt die Autokorrelationsfunktion der Partikel-Protein-Mischung mit der Fitfunktion und Residuum (links) sowie die Winkelabhängigkeit der inversen Partikelradien (rechts). Der resultierende hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ beträgt 39 nm und nimmt zu im Vergleich mit den Partikeln in RPMI. Der Größenunterschied zwischen den Partikel im serumfreien und serumhaltigen Medium fällt größer aus im Vergleich zu den PEGylierten Partikel, die im serumhaltigen Medium einen R_h -Zuwachs von lediglich 1.4 nm zeigen. Eine mögliche Ursache wäre die Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche, die durch die Änderung der Oberflächeneigenschaften bewirkt wird. Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)

weist auf Grund der hydrophoben Isopropyl-Seitenketten eine niedrigere Hydrophilie auf als PEG. Die Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Hydrophilie des für die Oberflächenfunktionalisierung verwendeten Polymers ist in der Literatur durchaus bekannt.⁶² So hängt beispielsweise die Adsorption von Fibronectin auf einem mit Poly(2-alkyl-2-oxazolin)-Bürsten beschichteten Siliconsubstrat von der Hydrophilie der Seitenketten ab.¹⁶⁵ Ein mit Poly(2-methyl-2-oxazolin)-beschichtetes Substrat adsorbiert nur wenige Proteine, während das hydrophobere Poly(2-*n*-propyl-2-oxazolin) deutlich mehr Fibronectin bindet. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass der hydrodynamische Radius der PIPOXYlierten Partikel in serumhaltigen Medium im Vergleich zu den PEGylierten Partikel stärker zunimmt. Als weiterer Grund für die Zunahme der hydrodynamischen Radien in Anwesenheit der Proteine sind auch die Verarmungseffekte zu nennen, die zu einer Destabilisierung der Partikel in Anwesenheit der Proteine führen und so die Agglomeration der Probe verursachen könnten.

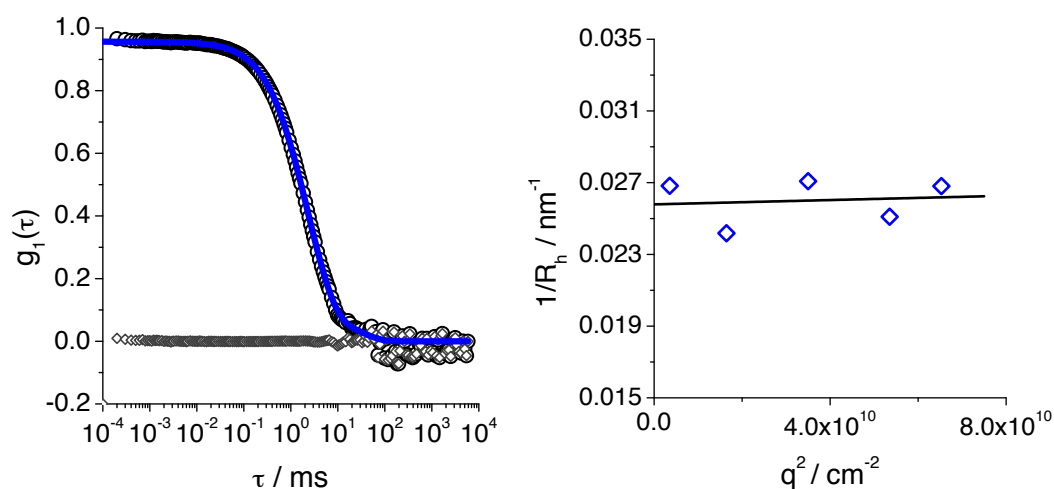


Abbildung 6.10: Links: \circ Autokorrelationsfunktion PIPOX-funktionalisierter Partikel ($c = 0,25 \text{ mg/mL}$) in RPMI mit 5 Gew.-% FCS bei $\theta = 26^\circ$, — Fit der AKF nach Anpassung mit (3-14), \diamond Residuum. Rechts: Winkelabhängigkeit der inversen hydrodynamischen Radien. $T = 296 \text{ K}$.

Auch das Phasenverhalten PIPOX-modifizierter Partikel unter physiologischen Bedingungen wurde mit der DLS untersucht. In Abbildung 6.11 ist die Temperaturabhängigkeit des hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ in serumfreiem RPMI 1640 (links) und in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (rechts) gezeigt. Die Autokorrelationsfunktion der Partikel in RPMI wurde biexponentiell angepasst. Für die

Auswertung der Autokorrelationsfunktion der Partikel in serumhaltigem RPMI 1640 wurde die triexponentielle Fitfunktion verwendet. Es handelt sich bei den gezeigten Radien somit um Mittelwerte aus den Radien der Nanopartikel-Protein-Komplexe und der Radien der nicht an die Partikel gebundenen Serumproteine. Bei der linearen Regression der Winkelabhängigkeit der Partikel in RPMI mit 5 Gew.-% FCS bei Temperaturen höher als 31.5 °C wurden nur kleine Winkel $\theta = 26^\circ$ - 50° berücksichtigt. Bei den größeren Winkeln verursacht die Anwesenheit des Serums die Detektion kleinerer hydrodynamischen Radien (Vgl. auch Abbildung 6.12). Es soll weiterhin vermerkt werden, dass bei weiterer Temperaturerhöhung über 36 °C im serumhaltigen Medium eine weitere Zunahme des Radius auf ca. 5000 nm stattfindet. Allerdings ist die verwendete triexponentielle Fitfunktion nur bedingt für die Anpassung der Autokorrelationsfunktion geeignet und die inversen hydrodynamischen Radien weisen eine sehr stark ausgeprägte Winkelabhängigkeit auf, so dass eine genaue Größenangabe auf Grund der starken Polydispersität der Agglomerate nicht mehr möglich ist (Daten nicht gezeigt).

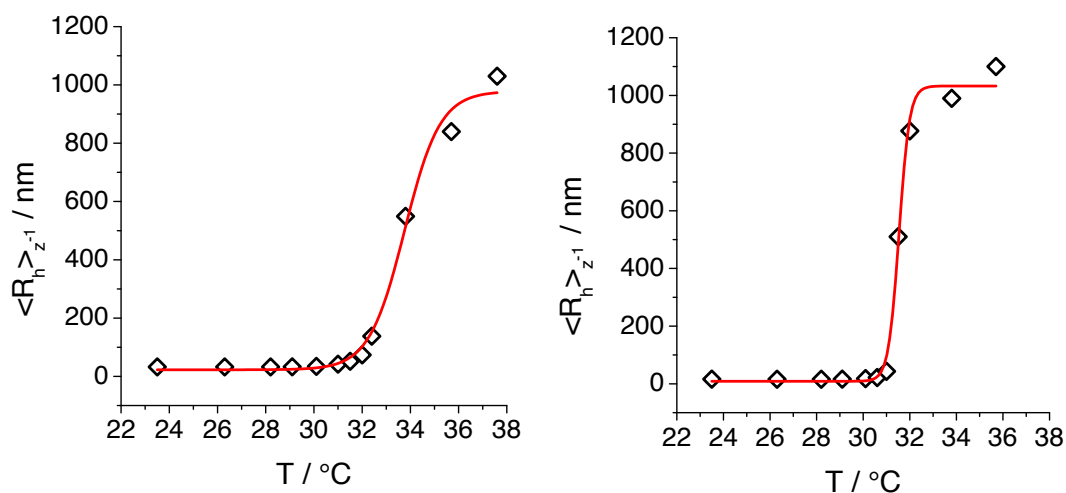


Abbildung 6.11: Temperaturabhängiges Agglomerationsverhalten PIPOX-modifizierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ($c = 0.25 \text{ mg/mL}$) in RPMI 1640 (links) und RPMI1640 + 5 Gew.-% FCS (rechts). \diamond $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen, — Boltzmann-Fit.

In beiden Medien beginnt die Zunahme des hydrodynamischen Radius zwischen 29 °C und 30 °C. Der Phasenübergang ist, entgegen den Erwartungen, im Vergleich zu reinem Wasser geringfügig zu höheren Temperaturen hin verschoben. RPMI 1640 besteht aus der isotonischen Natriumchloridlösung mit verschiedenen Zuckern und Aminosäuren. Normalerweise üben die Chlorid-Ionen einen kosmotropen, aussalzenden Effekt auf die Phasenseparation von PIPOX und von weiteren thermoresponsiven Polymeren (u.a. PNIPAM) aus, so dass der Trübungspunkt in der Regel in Anwesenheit von Natriumchlorid zu tieferen Temperaturen verschoben wird.^{152,166} Dieser aussalzende Effekt, der auf eine Destabilisierung der Wasserstoffbrücken zwischen Wasser und polaren Gruppen des Polymers basiert, wird anscheinend durch Wirkung weiterer Bestandteile des Zellkulturmediums aufgehoben, so dass eine leichte Verschiebung der Phasenseparationstemperatur zu höheren Werten resultiert.

In Anwesenheit der Proteine verläuft die Agglomeratbildung deutlich schneller als im serumfreien Medium. Vergleicht man die hydrodynamischen Radien bei 31.5 °C, so zeigen Partikel im serumfreien Medium nur einen vergleichsweise kleinen Radiuszuwachs auf 51.9 nm. In Anwesenheit der Proteine wird dagegen bei vergleichbarer Inkubationszeit der Probe ein starker Radiuszuwachs auf 510 nm beobachtet. Hierbei wird der Einfluss der Hydrophobie bzw. Hydrophilie der Oberfläche auf die Proteinadsorption besonders deutlich.^{18,62} Während bei niedriger Temperatur unterhalb der Phasenseparationstemperatur das PIPOX einen hydrophilen Charakter aufweist, bleibt die Menge adsorbierter Proteine vergleichsweise niedrig. Bei Temperaturen oberhalb der Phasenseparationstemperatur weist das Polymer hingegen einen deutlich hydrophoberen Charakter auf. Die durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingte Proteinadsorption findet oberhalb der Phasenseparationstemperatur des PIPOXs anscheinend verstärkt statt, was die Bildung größerer Nanopartikel-Protein-Agglomerate zur Folge hat (Vgl. Abschnitt 2.2, S. 13).

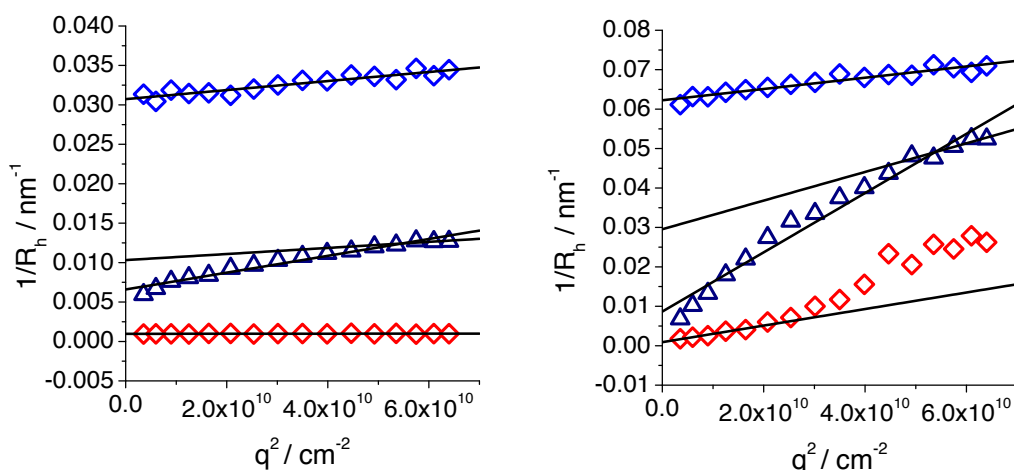


Abbildung 6.12: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien PIPOX-modifizierter Partikel in RPMI (links) und RPMI und 5 Gew.-% FCS (rechts) bei verschiedenen Temperaturen \diamond bei 23.5 °C vor dem Erhitzen, \diamond bei 37.6 °C in RPMI bzw. bei 35.7 °C in RPMIFCS, \triangle nach Abkühlen auf 23.5° C. c (NP) = 0.25 mg/mL

Nach Abkühlen der Partikel nimmt der hydrodynamische Radius wieder ab (Abbildung 6.12). Ähnlich wie in Wasser fällt dieser allerdings nicht auf den Ursprungswert zurück (Vgl. Abschnitt 6.4.1 S. 83). In RPMI 1640 ergibt sich aus der linearen Regression der inversen Radien bei allen Winkeln und Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ ein hydrodynamischer Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 152 nm ($\mu_2 = 0.24$; Abbildung 6.12, links). Werden für die Radiusbestimmung nur die Werte bei den großen Winkel verwendet, so erhält man einen kleineren $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 97 nm. Analog zu Wasser liegt also auch im Zellkulturmedium nach Abkühlen der Probe eine Mischung aus polydispersen Agglomeraten und evtl. auch einzelnen Partikel vor. Der Radius sinkt nach dem Abkühlen auf kleinere Werte als in reinem Wasser ($\langle R_h \rangle_z^{-1} = 224$ nm nach Abkühlen). Dadurch wird die Vermutung bekräftigt, dass Mediumbestandteile das Phasenseparationsverhalten des PIPOXs beeinflussen könnten.

In serumhaltigem Zellkulturmedium liegen nach Abkühlen der Probe größere Partikel vor als im proteinfreien Medium (Abbildung 6.12, rechts). Mit der triexponentiellen Anpassung der Autokorrelationsfunktion und anschließender linearen Regression inverser Radien mit Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ bei allen Winkel erhält man einen hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 115 nm. Die Auswertung mit 4 kleinen Winkeln ($\theta = 26^\circ - 50^\circ$) ergibt einen größeren Radius von 386 nm.

Die Auswertung mit der Multikomponentenanalyse nach Gleichung (3-14) ergibt bei $\theta = 26^\circ$ einen Radius von 394 nm, also einen ähnlichen Wert wie mit triexponentieller Fitfunktion. Bei $\theta = 122^\circ$ erhält man einen kleineren Wert von 152 nm. Beide Autokorrelationsfunktionen mit Anpassung sind im Anhang gezeigt (Abbildung 12.14, S. 163). Im serumhaltigen Medium liegen also nach Abkühlen der Probe größere Agglomerate vor. Eine denkbare Ursache für dieses Verhalten wäre, dass die auf der Oberfläche adsorbierten Proteine bei der Agglomeration der Partikel mit hydrophoben Segmenten an die PIPOX-Ketten binden und bei Abkühlen der Probe den Hydratationsvorgang stören.

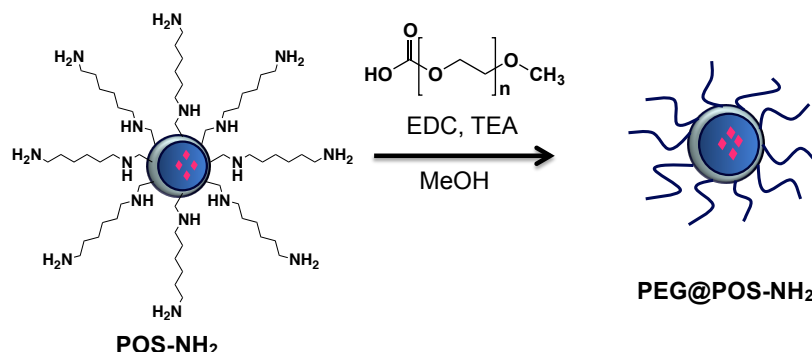
Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Kupplung von PIPOX an die Partikeloberfläche die sterische Stabilisierung der Partikel in wässriger Lösung und im Zellkulturmedium gewährleistet. In Anwesenheit der Serumproteine findet die Bildung einer Proteinkorona oder eine leichte Agglomeration der Partikel statt. Die etwas stärkere Adsorption der Proteine im Vergleich zu PEGylierten Partikeln ist auf Grund der etwas niedrigeren Hydrophilie von PIPOX auch zu erwarten. Bei Temperaturen oberhalb der Phasenseparationstemperatur wird die Bildung größerer Nanopartikel-Proteinagglomerate beobachtet, die nur teilweise reversibel ist. Es kann auch ein Zusammenhang zwischen der temperaturabhängigen Hydrophilie bzw. Hydrophobie der Partikeloberfläche und der Proteinadsorption beobachtet werden.

6.5 Grafting von PEG an die amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

6.5.1 Synthese und Charakterisierung

Die sterisch stabilisierten, PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel können auch ausgehend von den amino-modifizierten Partikeln **POS-NH₂** dargestellt werden. Durch Einführung der Aminogruppen in der Partikelschale während der Polykondensation wird die Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit carboxy-funktionalisierten Liganden durch eine Amid-Kupplung ermöglicht. Analog zu der Funktionalisierung der carboxy-funktionalisierten Partikel können auch für die Modifizierung der amino-

funktionalisierten Partikel nach der Grafting To-Methode unterschiedliche Kupplungsreagenzien eingesetzt werden.



Schema 6.3: Kupplung von ω -Carboxy-PEG an die amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in einer EDC-Kupplungsreaktion.

Für die Oberflächenmodifizierung wurde das carboxy-funktionalisierte **PEG-COOH** mit einem Molekulargewicht von ca. 2 kDa verwendet (Tabelle 6.1, Abbildung 6.1). Die Kupplung von PEG an die amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** in einer EDC-vermittelten Kupplungsreaktion ist in Schema 6.3 dargestellt. Die Kupplung wurde in Anwesenheit einer katalytischen Menge von Triethylamin (TEA) direkt in Methanol durchgeführt. Anschließend können die PEGylierten Partikel (**PEG@POS-NH₂**) ins Wasser überführt werden und sind ohne zusätzliche Stabilisatoren wasserlöslich im Gegensatz zu der amino-funktionalisierten Vorstufe **POS-NH₂**.

Die Größenbestimmung der Partikel in wässriger Lösung wurde mit der DLS durchgeführt. Der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ wurde mit der biexponentiellen Anpassung und der Extrapolation der inversen Radien $q^2 \rightarrow 0$ bei allen Messwinkeln zu 33.0 nm bestimmt. Der hydrodynamische Radius der PEGylierten Partikel **PEG@POS-NH₂** ist somit deutlich höher als der hydrodynamische Radius der Ausgangspartikel **POS-NH₂** in Methanol ($\langle R_h \rangle_z^{-1} = 17.7$ nm). Abbildung 6.13 zeigt die Winkelabhängigkeit der Partikel in wässriger Lösung. Es ist eine deutliche Zunahme der inversen hydrodynamischen Radien mit steigendem Winkel erkennbar. Die Extrapolation $q^2 \rightarrow 0$ der reziproken Radien bei kleinen Winkeln ($\theta = 26\text{-}54^\circ$) ergibt einen hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 41.5 nm. Bei großen Winkeln ($\theta = 98^\circ\text{-}150^\circ$) erhält man dagegen einen wesentlich kleineren Wert von 22.2 nm. Anscheinend sind nach PEGylierung noch immer Wechselwirkungen zwischen einzelnen Partikeln vorhanden,

was eine Polydispersität der hydrodynamischen Radien zur Folge hat und auch durch den hohen Wert des zweiten Kumulanten ($\mu_2 = 0.33$) bestätigt wird.

Das ζ -Potential der Partikel nach der PEGylierung beträgt (14 ± 1) mV in 5 mM Natriumchloridlösung ($\text{pH} \approx 7$) und nimmt auf Grund der Umsetzung der Aminogruppen im Verlauf der Funktionalisierung ab, im Vergleich zu den Edukt-Partikeln **POS-NH₂**, deren ζ -Potential auf (31 ± 3) mV in 0.1 M MES-Puffer mit 5 mM Natriumchlorid ermittelt wurde. Die vorhandene Restladung wird wahrscheinlich durch noch vorhandene nicht-umgesetzte primäre Aminogruppen sowie durch sekundäre Aminogruppen verursacht. Diese Restladung könnte auch eine Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Partikeln verursachen und stellt deshalb eine mögliche Ursache für die Agglomeration der Partikel in wässriger Lösung dar.

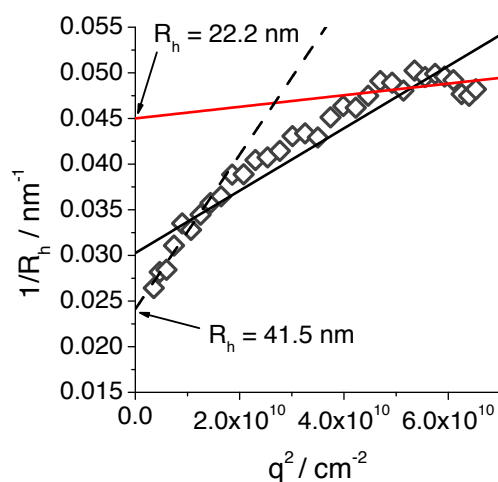


Abbildung 6.13: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Probe PEG@POS-NH₂, $c = 0.17$ mg/mL) in Wasser. — Biexponentielle Anpassung aller Winkel; -- biexponentielle Anpassung bei $\theta = 26^\circ$ - 54° ; — biexponentielle Anpassung bei $\theta = 98^\circ$ - 150° . $T = 296$ K.

Der PEG-Anteil der PEGylierten Partikel wurde mit der TGA bestimmt und liegt bei 43 Gew.-%. Der Gewichtsanteil an PEG ist somit vergleichbar mit dem Gewichtsanteil, der bei der PEGylierung der carboxy-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel über die NHS-Ester-Route erreicht wurde. Er liegt allerdings deutlich niedriger als die Pfpfdichte nach PEGylierung über die Maleinimid-Route.

6.5.2 Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

Die Charakterisierung der amino-funktionalisierten PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen wurde mit der winkelabhängigen DLS durchgeführt.

Abbildung 6.14 zeigt die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel im serumfreien und serumhaltigen Zellkulturmedium RPMI 1640 sowie den Vergleich mit fetalem Kälberserum im Zellkulturmedium ohne Partikel.

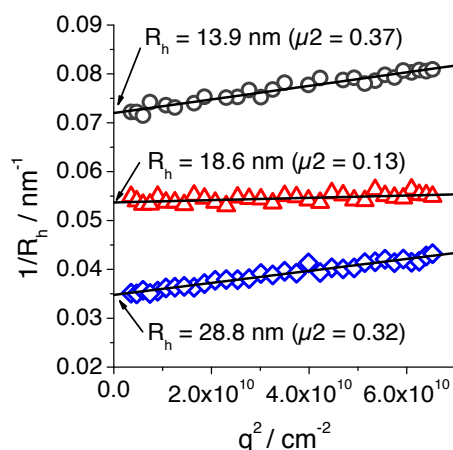


Abbildung 6.14: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel (Probe PEG@POS-NH₂, c = 0.17 mg/mL) \blacktriangle in Zellkulturmedium RPMI 1640, \blacklozenge in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (triexponentielle Anpassung der AKF) und \circ Vergleich mit Serumproteinen (RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). T = 296 K.

Für die Auswertung der Autokorrelationsfunktion der Partikel in Zellkulturmedium wurde die biexponentielle Anpassung verwendet. Der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ in RPMI 1640 wurde bestimmt zu 18.6 nm ($\mu_2 = 0.13$). Sowohl die Größe der Partikel als auch der Wert des zweiten Kumulanten μ_2 und somit die Polydispersität nehmen im Zellkulturmedium deutlich ab im Vergleich zu den Ergebnissen der Partikel in wässriger Lösung. Die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln, die in wässriger Lösung zur Agglomeration der Partikel geführt haben, werden höchstwahrscheinlich durch die im Medium erhaltenen Salze (u. a. 100 mM Natriumchlorid) weitgehend abgeschwächt. Die

sterische Stabilisierung durch PEG-Ketten gewährleistet somit die Stabilität der Partikel im Medium. Auch eine zusätzliche Stabilisierung durch die weiteren Mediumkomponenten könnte eventuell zu der Partikelstabilisierung beitragen.

Die Auswertung der Autokorrelationsfunktionen der Partikel in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS wurde zunächst mit der triexponentiellen Anpassung durchgeführt, um Informationen über den Agglomerationszustand der Probe zu erhalten, analog zu Abschnitt 5.2.2 (S. 59). Es ist eine leichte Winkelabhängigkeit der Radien des Partikel-Proteingemisches zu erkennen, die jedoch wahrscheinlich hauptsächlich durch die breite Größenverteilung der Serumproteine verursacht wird. Die Größenbestimmung nach der triexponentiellen Anpassung ergibt einen hydrodynamischen Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 28 nm. Die triexponentielle Anpassung liefert hier den ersten Hinweis für die Bildung der Nanopartikel-Protein-Komplexe.

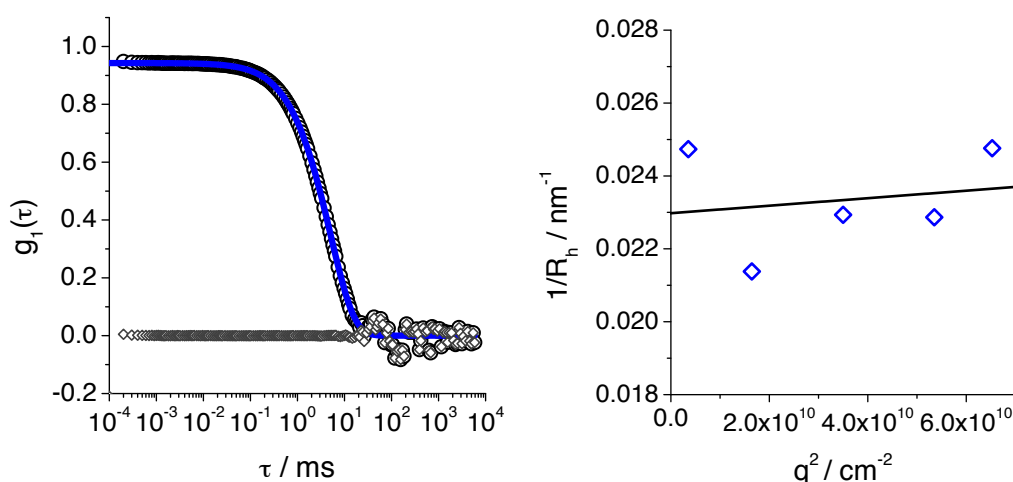


Abbildung 6.15: Links: \circ Autokorrelationsfunktion amino-funktionalisierter PEGylierter Partikel (Probe PEG@POS-NH₂, $c = 0.17 \text{ mg/mL}$) in RPMI mit 5 Gew.-% FCS bei $\theta = 26^\circ$, — Fit der AKF nach Anpassung mit (3-14), \diamond Residuum. Rechts: Winkelabhängigkeit der inversen hydrodynamischen Radien. $T = 296 \text{ K}$.

Wird die Autokorrelationsfunktion der Serumproteine von der Autokorrelationsfunktion der Nanopartikel-Protein-Agglomerate mit Hilfe der Multikomponentenanalyse nach Gleichung (3-14) getrennt, so erhält man mit dem hydrodynamischen Radius von 44 nm einen dreifach höheren Wert als im serumfreien Medium. In der Mischung liegen anscheinend nicht nur von Proteinkorona umhüllte

Einzelpartikel, sondern auch evtl. größere Agglomerate aus mehreren Partikel und Proteinen vor. Derartige Cluster können z. B. entstehen wenn ein Protein unspezifisch an mehrere Partikel gleichzeitig bindet. Es wäre weiterhin auch möglich, dass bestimmte Serumproteine, die einen höherer Durchmesser aufweisen, beispielsweise auf Grund ihrer Oberflächeneigenschaften bevorzugt an die Partikeloberfläche adsorbiert werden und so den höheren Radius der Nanopartikel-Protein-Agglomerate verursachen.

Durch die PEGylierung der amino-funktionalisierten Partikel wird somit die Stabilität dieser Partikel unter physiologischen Bedingungen erreicht. Die PEGylierung verhindert untypischerweise nicht die Adsorption der Proteine auf der Partikeloberfläche. Es findet eine Agglomeratbildung statt, die evtl. durch die noch vorhandene Restladung der Partikel verursacht werden könnte.

Tabelle 6.5: Vergleich der verschiedenen sterisch stabilisierten Nanopartikel.

	PEGylierte Carboxy-NPs PEG@POS-COOH2	PIPOXylierte Carboxy-NPs PIPOX@POS-COOH	PEGylierte Amino- NPs PEG@POS-NH₂
ζ -Potential (5 mM NaCl, pH \approx 7)	(-10 ± 1) mV	(-4 ± 1) mV	(14 ± 1) mV
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (μ 2) in H ₂ O	25.6 nm (0.15)	31.1 nm (0.13)	33 nm (0.33) ⁱ
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (μ 2) in RPMI 1640	22.6 nm (0.08)	30.9 nm (0.14)	18.6 nm (0.13)
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (μ 2) in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS	24 nm (0.39)	39 nm (0.35)	44 nm (0.32)

Tabelle 6.5 zeigt den Vergleich zwischen den PEGylierten Partikeln **PEG@POS-NH₂** und weiteren sterisch stabilisierten Partikeln: Den PEGylierten Partikeln

ⁱ $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ wurde aus linearer Regression mit allen Winkel bestimmt. Wegen der starken Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien werden nur zwei signifikante Stellen angegeben.

PEG@POS-COOH₂ und den PIPOXYlierten Partikeln **PIPOX@POS-COOH**, die in den vorherigen Unterabschnitten 6.3 und 6.4 bereits ausführlich diskutiert wurden.

Im Gegensatz zu den Partikeln **PEG@POS-NH₂** adsorbieren die PEGylierten Partikel, die aus den carboxy-funktionalisierten Partikeln **POS-COOH** dargestellt wurden, nur sehr wenige Serumproteine. Der hydrodynamische Radius erhöht sich in Anwesenheit der Serumproteine lediglich um 1-2 nm. Bei der Verwendung von dem etwas hydrophoberen PIPOX als Pfropfpolymer anstelle von PEG wird eine Zunahme der Proteinadsorption bzw. Agglomeration beobachtet.

Mit den amino-funktionalisierten Partikeln **POS-NH₂** als Edukt-Partikel erhält man Nanopartikel, die nach PEGylierung in Anwesenheit der Serumproteine agglomerieren. Es entstehen Nanopartikel-Protein-Agglomerate, die fast dreimal so groß sind wie die Partikel selbst. PEG ist scheinbar nicht alleine entscheidend für die Art und Stärke der Wechselwirkungen, die zwischen Nanopartikeln und Serumproteinen vorliegen. Die Proteinadsorption wird auch durch die nach außen „sichtbare“ Ladung der Partikel beeinflusst.

Um eine bessere Kenntnis über die Proteinadsorption zu erlangen ist eine detaillierte Untersuchung der Proteinzusammensetzung der Proteinkorona notwendig, die über den Rahmen dieser Arbeit hinausgeht und von D. Docter in Rahmen seiner Dissertation an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wird.

6.6 Biofunktionalisierung der sterisch stabilisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

6.6.1 Darstellung der biotinylierten Nanopartikel

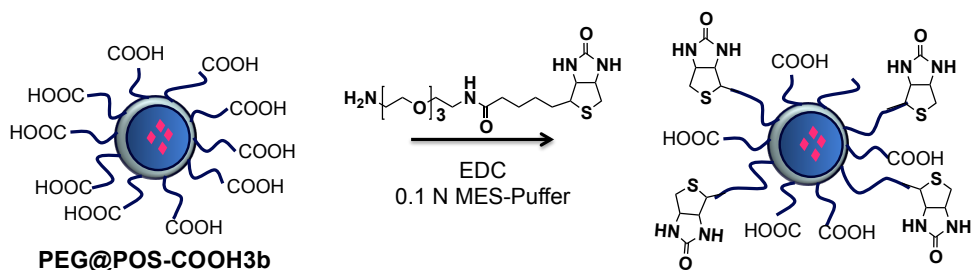
Biofunktionalisierung von Nanopartikeln mit unterschiedlichen Liganden wird oft verwendet, um die Rezeptor-kontrollierte Aufnahme der Partikel durch verschiedene Zellen zu vermitteln. Eine Grundvoraussetzung für das spezifische Targeting bzw. die Adressierung der Nanopartikel ist, dass der Ligand auf der Partikeloberfläche für den zellulären Rezeptor sichtbar ist und nicht durch die Proteinkorona verdeckt wird. Auch eine unspezifische Aufnahme durch die nicht als Ziel gedachten Zellen muss verhindert

werden. Deshalb werden bei der Adressierung der Nanopartikel an bestimmte Zellen oft PEGylierte Nanopartikel eingesetzt, die für gewöhnlich nur eine geringe Proteinadsorption und unkontrollierte Zelladhäsion aufweisen.^{14,18}

Zur Biofunktionalisierung der sterisch-stabilisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel wird in dieser Arbeit Biotin, auch Vitamin B7 genannt, verwendet. Biotin, spielt eine bedeutende Rolle im Kohlenhydratmetabolismus, in dem es bei der Glyconeogenese als Coenzym der Pyruvatcarboxylase fungiert und aktiviertes CO₂ transportiert.⁴²

Für die Biofunktionalisierung der Nanopartikel ist vor allem die Eigenschaft von Biotin eine spezifische Bindung zu den Glykoproteinen Avidin und Streptavidin aufzubauen besonders interessant.¹⁶⁷ So könnten Streptavidin-konjugierte Biomoleküle auf der Oberfläche der biotinylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel immobilisiert werden. Streptavidin besteht aus vier Untereinheiten und kann somit bis zu vier Moleküle Biotin binden. Durch diese Eigenschaft wird auch eine nicht-kovalente Weitermodifizierung der Oberfläche der biotinylierten Partikel mit biotinylierten Biomolekülen möglich, bei der Streptavidin als eine Art Linker fungiert. Denkbar wäre beispielsweise die Bindung von Antikörpern oder Enzymen an die Partikeloberfläche. Schließlich könnten auch komplexere supramolekulare Strukturen aufgebaut werden, die aus den biotinylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, Streptavidin und weiteren biotinylierten Biomolekülen oder synthetischen Polymeren bestehen.

Auch in der Onkologie könnten die biotinylierten Nanopartikel eine Anwendung finden. Der Biotin-Rezeptor ist bei vielen Krebsarten, vor allem bei den Leberkarzinomen oft überexprimiert. Somit könnten die biotinylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach einer Funktionalisierung mit Krebsmedikamenten für den gezielten Wirkstofftransport zu Tumorzellen eingesetzt werden.¹⁶⁸



Schema 6.4: Darstellung biotinylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel. Die Kupplung von Biotin erfolgt an PEGylierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in einer EDC-vermittelten Kupplungsreaktion.

Die Modifizierung der Partikeloberfläche mit Biotin erfolgt ausgehend von PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikeln **PEG@POS-COOH3b**, die zuvor durch Umsetzung der maleinimido-funktionalisierten Partikel **POS-COMal** mit heterobifunktionellem **HS-PEG-COOH** hergestellt wurden (Vgl. Abschnitt 6.3, S. 73). Als Biotinylierungsreagenz wird amino-funktionalisiertes Biotin mit einem kurzen PEG-Linker eingesetzt. Die Kupplung von Biotin erfolgt in 0.1 M MES-Puffer ($\text{pH} \approx 4\text{-}6$) in einer EDC-vermittelten Kupplungsreaktion (Schema 6.4).¹⁶⁷

Tabelle 6.6: Vergleich der ζ -Potentiale der biotinylierten Nanopartikel mit den Edukt-Partikeln und Blindprobe bei verschiedenen pH-Werten. Messung in wässriger Natriumchloridlösung oder wässrigem Glycin-Puffer mit 5 mM Natriumchlorid (saurer Puffer mit Salzsäure bzw. basischer mit Natronlauge). $T = 295\text{ K}$.

	Edukt-Partikel PEG@POS-COOH3b	Biotinylierte Partikel	Blindprobe
ζ -Potential (Glycin-Puffer, $\text{pH} \approx 3.0$)	-1 ± 0	8 ± 1	6 ± 0
ζ -Potential (5 mM NaCl, $\text{pH} \approx 7$)	-12 ± 1	-7 ± 1	-10 ± 2
ζ -Potential (Glycin-Puffer, $\text{pH} \approx 8.5$)	-15 ± 2	-14 ± 2	-21 ± 2

Der Erfolg der Kupplungsreaktion kann mit ζ -Potential-Messungen überprüft werden. Tabelle 6.6 zeigt den Vergleich der ζ -Potentiale der biotinylierten Partikel mit der nicht-

biotinylierten, PEGylierten Vorstufe **PEG@POS-COOH3b** und der Blindprobe, die ohne den Zusatz von EDC unter den sonst gleichen Bedingungen wie die biotinylierten Partikel hergestellt wurde. Die ζ -Potentiale der biotinylierten Partikel sind deutlich höher als die Potentiale der Edukt-Partikel, was generell für den erfolgreichen Verlauf der Funktionalisierung spricht. Allerdings weist auch die Blindprobe, die ohne Zusatz von EDC hergestellt wurde, ebenfalls höhere ζ -Potentiale auf als die Edukt-Partikel. Es müssen höchstwahrscheinlich adsorptive Wechselwirkungen zwischen den Poly(organosiloxan)-Nanopartikeln und Biotin vorliegen, da bei der Blindprobe eine kovalente Bindung zwischen Biotin und den Partikel ausgeschlossen werden kann. Die ζ -Potentiale der Blindprobe sind allerdings etwas niedriger als die ζ -Potentiale der biotinylierten Nanopartikel. Dies lässt die Annahme zu, dass bei der in Anwesenheit von EDC dargestellten Probe sowohl kovalente als auch adsorptive Bindungen zwischen dem Biotin und den Partikeln vorliegen, während die in Abwesenheit von EDC dargestellte Blindprobe Biotin über eine rein adsorptive Bindung bindet. Die Menge des an die Partikel gebundenen Biotins konnte anhand der vorliegenden Daten nicht ermittelt werden.

Tabelle 6.7: Ergebnisse der Bestimmung der hydrodynamischen Radien der biotinylierten Partikel ($c=0.09$ mg/mL) in Wasser und im serumfreien sowie serumhaltigen Zellkulturmedium RPMI 1640 mit DLS und Vergleich mit den Edukt-Partikel ($c = 0.11$ mg/mL). T = 296 K.

	Biotinylierte Partikel	Edukt-Partikel PEG@POS-COOH3b
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (H ₂ O) / nm ($\mu 2$)	22.2 (0.10)	22.5 (0.09)
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (RPMI 1640) / nm ($\mu 2$)	20.5 (0.07)	20.3 (0.12)
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (RPMI 1640 + 5 Gew.-% FCS) / nm ($\mu 2$)	19 (0.34)	23 (0.34)

Der Einfluss der Funktionalisierung auf die Löslichkeit der Partikel in verschiedenen Medien und auf die Wechselwirkung der Nanopartikel mit den Serumproteinen wurde mittels DLS untersucht. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der DLS-Messungen der

biotinylierten Partikel und einen Vergleich mit den Edukt-Partikeln **PEG@POS-COOH3b**. Die Radien der Partikel vor und nach der Biotinylierung in Wasser und in serumfreiem Zellkulturmedium unterscheiden sich kaum voneinander. In Anwesenheit der Serumproteine wird nach der Biotinylierung ein etwas kleinerer Wert ermittelt als vor der Biotinylierung. Auf Grund der niedrigen Konzentration der Nanopartikel, die durch Verdünnung während der Reinigung der Probe mittels Dialyse verursacht wurde, ist die Trennung der Autokorrelationsfunktionen der Nanopartikel und der Serumproteine voneinander nur bedingt möglich, so dass eine leichte Abnahme des Radius detektiert wird. Eine erhöhte unspezifische Adsorption der Serumproteine an die Oberfläche der biotinylierten Partikel, die zur Agglomeration der Partikel führt, kann auf Grund der höheren Empfindlichkeit der DLS gegenüber größeren Teilchen mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Adsorption der Serumproteine an die Partikeloberfläche wird demnach -wenn überhaupt- nur wenig von der Biotinylierung beeinflusst.

6.6.2 Bindung von Streptavidin

Wie im vorherigen Abschnitt 6.6.1 bereits erwähnt, bindet Biotin selektiv an das Protein Streptavidin. Streptavidin ist ein Glykoprotein, das in Bakterium *Streptomyces Avidinii* vorkommt. Es besteht aus vier Untereinheiten und kann bis zu vier Moleküle Biotin binden.¹⁶⁷

Die Bindung von Streptavidin an biotinylierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel wurde mit dynamischer Lichtstreuung untersucht. Hierbei wurden die in Wasser gelösten Partikel in einer Lichtstreuöküvette vorgelegt ($c = 0.09 \text{ mg/mL}$) und mit der Streptavidin-Lösung ($c = 0.111 \text{ mg/mL}$) titriert. Die Massenanteile von Streptavidin wurden durch das Wiegen der Küvette nach der Streptavidin-Zugabe bestimmt. Als Vergleichsexperiment wurden auch die Titrations der Blindprobe und der Edukt-Partikel mit Streptavidin durchgeführt.

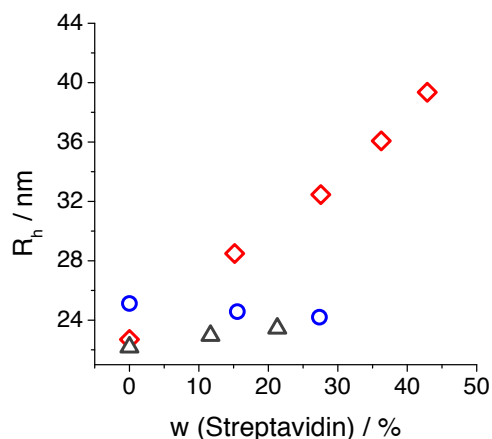


Abbildung 6.16: Bindung von Streptavidin an die biotinylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel. Aufgetragen sind hydrodynamische Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ \diamond der biotinylierten Partikel ($c_0 = 0.09$ mg/mL), \triangle der PEGylierten Edukt-Partikel **PEG@POS-COOH3b** ($c_0 = 0.11$ mg/mL) \circ der Blindprobe ($c_0 = 0.09$ mg/mL) gegen den prozentuellen Gewichtsanteil von Streptavidin. $T = 296$ K.

Abbildung 6.16 zeigt die hydrodynamischen Radien der biotinylierten Partikel mit Streptavidin in Abhängigkeit von dem Gewichtsanteil des Streptavidins sowie den Vergleich mit der Blindprobe und den nicht-biotinylierten Edukt-Partikel. Der hydrodynamische Radius der biotinylierten Partikel steigt beinahe linear mit dem steigenden Gewichtsbruch von Streptavidin. Es entstehen Nanopartikel-Streptavidin-Komplexe von bis zu 40 nm Radius. Der hydrodynamische Radius von Streptavidin wurde zu 3.7 nm ($\mu_2 = 0.12$) bestimmt. Die Zunahme des hydrodynamischen Radius kann deshalb nicht alleine durch die Bildung der Streptavidin-Korona zustande kommen. Anscheinend bindet ein Streptavidin-Molekül, das bis zu vier Moleküle Biotin binden kann, gleichzeitig an mehrere Nanopartikel, so dass vernetzte Strukturen aus mehreren Partikel und Streptavidin entstehen. Im Gegensatz zu den biotinylierten Partikeln zeigen sowohl die nur mit PEG funktionalisierten Edukt-Partikel **PEG@POS-COOH3b** als auch die Blindprobe keine bemerkenswerten Änderungen der hydrodynamischen Radien mit steigender Streptavidin-Menge, was bedeutet, dass anscheinend kein Streptavidin an die Oberfläche der nicht-biotinylierten Partikel bindet.

Im vorherigen Abschnitt 6.6.1 wurde gezeigt, dass die ζ -Potentiale der Blindprobe bei verschiedenen pH-Werten sich nur wenig von den ζ -Potentialen der biotinylierten Partikel unterscheiden. Die Titration mit Streptavidin demonstriert allerdings, dass die Blindprobe ebenso wie die nicht-biotinylierten Edukt-Partikel kein Streptavidin bindet. Dadurch wird

die Vermutung bestätigt, dass bei der Blindprobe nur eine adsorptive Wechselwirkung zwischen dem Biotin und dem Poly(organosiloxan)-Netzwerk vorliegt. Da die Oberfläche der Blindprobe mit PEG umhüllt ist, sind die Biotin-Moleküle, die an das Poly(organosiloxan)-Netzwerk adsorptiv gebunden sind, nicht zugänglich für Streptavidin. Deshalb findet keine Bindung von Streptavidin an die Blindprobe statt. Im Fall der biotinylierten Partikel ist Biotin kovalent an die Carboxygruppen an den freien Enden PEG-Ketten angebunden und kann folglich mit Streptavidin wechselwirken. Allerdings kann auch hier eine zusätzliche adsorptive Wechselwirkung zwischen Biotin und dem Siloxan-Netzwerk nicht ausgeschlossen werden. Eine derartige adsorptive Bindung könnte z. B. durch die Wechselwirkungen der freien Elektronenpaare an den beiden Stickstoffatomen des Biotins mit dem Siloxan-Netzwerk entstehen. Generell zeigt die Möglichkeit die PEGylierten Poly(organosiloxan)-Systeme adsorptiv zu beladen das Potential solcher Systeme als Transporter für Medikamente.

7 Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche

7.1 Einleitung

Der Vergleich zwischen den positiv- und negativ-geladenen Poly(organosiloxan)-Nanopartikeln ist von einer besonderen Bedeutung, um die Erkenntnisse über die Interaktionen der Kolloide mit biologischen Systemen zu erlangen.

Die positiv geladenen, ladungsstabilisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die durch Verwendung des amino-funktionalisierten Monomers **AHAPS** während der Polykondensation dargestellt wurden, verlieren unter physiologischen Bedingungen ihre kolloidale Stabilität (Abschnitt 5.3). Die nachträgliche Modifizierung der Oberfläche mit quaternären Ammoniumgruppen, könnte eine mögliche alternative Synthesestrategie darstellen, um positiv geladene, unter physiologischen Bedingungen stabile Partikel zu erhalten. Außerdem ist bekannt, dass die Quaternisierung die Toxizität der Nanopartikel beeinflussen kann. Quaternisiertes Poly(ethylenimin) (PEI) beispielsweise ist weniger toxisch, als nicht-quaternisiertes.¹⁶⁹ Bei Chitosan wurde hingegen die umgekehrte Tendenz beobachtet.¹⁷⁰

Die quaternisierten Partikel wurden durch die nachträgliche Funktionalisierung der Oberfläche der fluoreszenzmarkierten amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** und carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** dargestellt. Es wurde hierbei sowohl eine Monofunktionalisierung der Partikeloberfläche mit quaternären Ammoniumgruppen als auch eine duale Oberflächenmodifizierung mit den quaternären Ammoniumgruppen und dem sterisch stabilisierenden PEG realisiert.

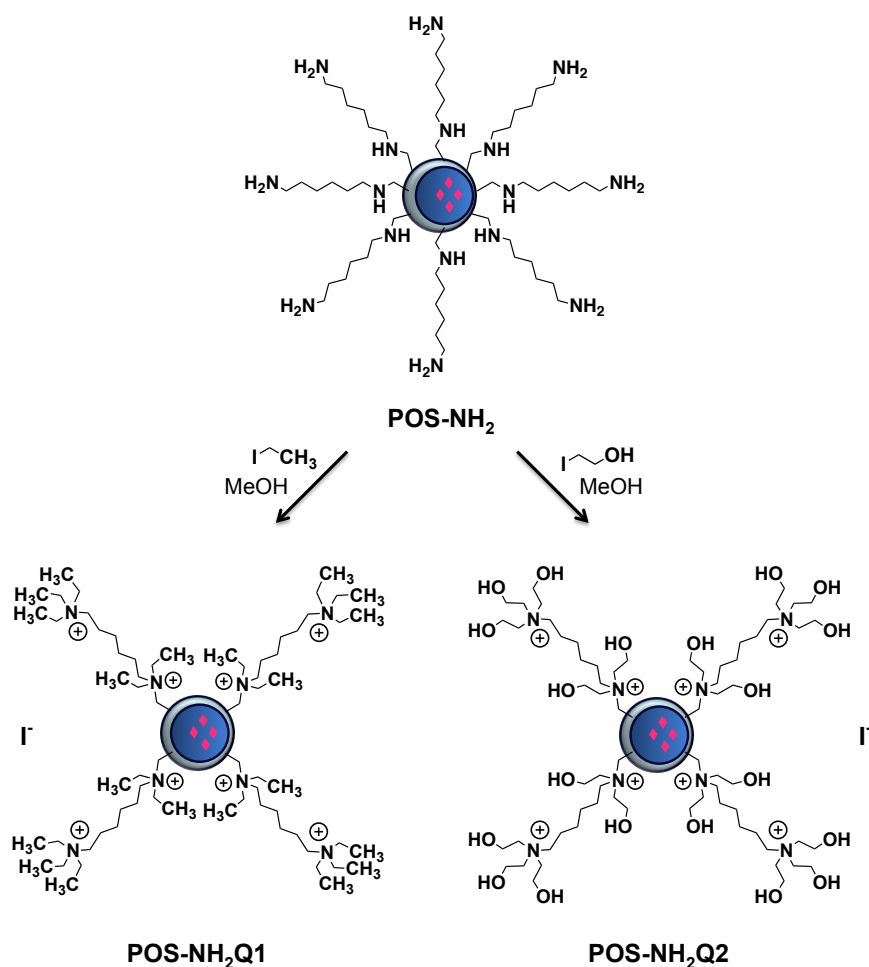
Die quaternisierten Partikeln wurden unter physiologischen Bedingungen, in dem serumfreien und serumhaltigen Zellkulturmedium, das später auch bei den Zellversuchen verwendet werden soll, mittels DLS charakterisiert. Zur Analyse des Agglomerationsverhaltens der Partikel in Anwesenheit der Serumproteine mit DLS wurde die Multikomponentenanalyse angewendet.

7.2 Partikel mit quaternären Ammoniumgruppen ohne zusätzliche sterische Stabilisierung

7.2.1 Synthese und Charakterisierung

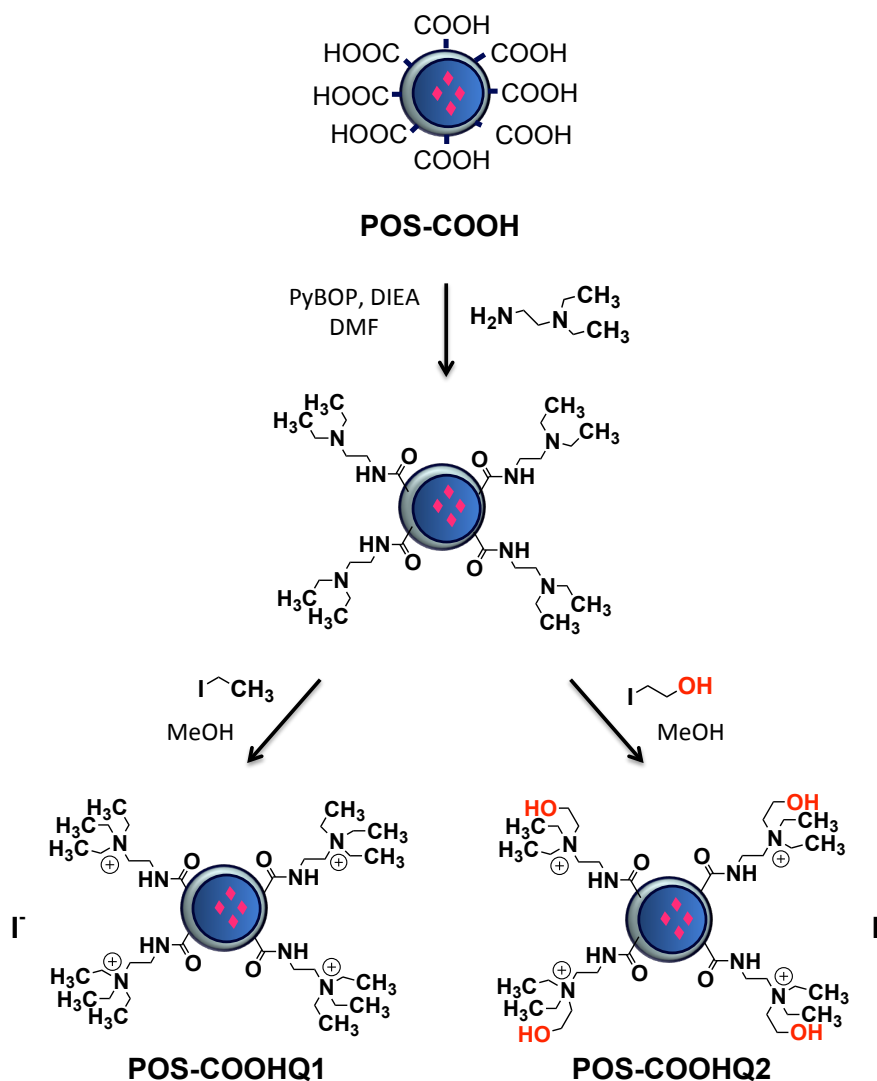
Die Synthese der quaternisierten Partikel erfolgt nach zwei verschiedenen Varianten ausgehend von den fluoreszenzmarkierten, amino-funktionalisierten Partikeln **POS-NH₂** oder carboxy-modifizierten Partikeln **POS-COOH**.

In der ersten Synthesevariante werden die amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** direkt mit Anwendung der Alkylierungsmittel Ethyliodid bzw. 2-Iodoethanol in Methanol zu den quaternisierten Partikeln **POS-NH₂Q1** bzw. **POS-NH₂Q2** umgesetzt (Schema 7.1).



Schema 7.1: Alkylierung der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel POS-NH₂ mit Ethyliodid zu den Partikel POS-NH₂Q1 (links) und 2-Iodoethanol (rechts) zu den Partikel POS-NH₂Q2.

Alternativ können die quaternisierten Partikel aus den carboxy-funktionalisierten Partikeln **POS-COOH**, in zwei Synthesestufen dargestellt werden (Schema 7.2). Hierbei erfolgt im ersten Schritt die Umsetzung der Carboxygruppen mit *N,N*-Diethylethylendiamin in DMF. Anschließend werden die nun amino-funktionalisierten Partikel in Methanol überführt und zu den quaternisierten Partikeln **POS-COOHQ1** mit Ethyliodid oder **POS-COOHQ2** mit 2-Iodoethanol umgesetzt.



Schema 7.2: Darstellung der quaternisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ausgehend von den carboxy-funktionalisierten Partikel. Im ersten Syntheseschritt werden in einer Amidkupplung von *N,N*-Diethylethylendiamin die sekundären Aminogruppen in der Partikelschale eingeführt. Es folgt die Alkylierung mit Ethyliodid bzw. 2-Iodoethanol.

Als Produkt aus beiden Synthesevarianten erhält man unabhängig vom verwendeten Alkylierungsmittel positiv geladene, wasserlösliche Nanopartikel.

Tabelle 7.1: Charakterisierung der quaternisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel in wässriger Lösung (pH \approx 7) und Vergleich mit den Edukt-Partikeln POS-NH₂ (DLS in 0.1 M MES-Puffer, ζ -Potential in 0.1 M MES mit 5 mM NaCl, pH \approx 5-6) und POS-COOH (DLS und ζ -Potential in 0.01 M Glycin-Lösung mit 5 mM NaCl, pH \approx 7-8). DLS: T = 296 K. ζ -Potential: T = 295 K.

Edukt-Partikel				
	Amino-funktionalisierte NP POS-NH₂ (c = 1.0 mg/mL)		Carboxy-funktionalisierte NP POS-COOH (c = 1.3 mg/mL)	
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (μ m)	14.8 (0.24)		14.9 (0.09)	
ζ -Potential	(31 \pm 3) mV		(-32 \pm 2) mV	
Quaternisierte Partikel				
Bezeichnung	POS-NH₂Q1	POS-NH₂Q2	POS-COOHQ1	POS-COOHQ2
Alkylierungsmittel	Ethyljodid	2-Iodoethanol	Ethyljodid	2-Iodoethanol
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ (μ m) (H ₂ O)	15.6 nm (0.29)	15.8 nm (0.27)	15.9 nm (0.09)	16.7 nm (0.12)
ζ -Potential (5 mM NaCl-Lösung)	(27 \pm 1) mV	(32 \pm 1) mV	(32 \pm 1) mV	(29 \pm 1) mV

Die Partikel wurden mittels DLS und ζ -Potential-Messungen in wässriger Lösung charakterisiert. Tabelle 7.1 fasst die Charakteristika der quaternisierten Partikel zusammen und zeigt einen Vergleich mit den Edukt-Partikeln. Sowohl die hydrodynamischen Radien der Partikel **POS-NH₂Q1** und **POS-NH₂Q2**, als auch Radien der Partikel **POS-COOHQ1** und **POS-COOHQ2**, betragen im Durchschnitt ca. 15 - 16 nm. Es ist somit keine signifikante Größenänderung nach der Oberflächenfunktionalisierung feststellbar. Die ζ -Potentiale liegen bei etwa 30 mV in 5 mM wässriger Natriumchloridlösung. Die quaternisierten Partikel **POS-NH₂Q1** und **POS-NH₂Q2**, die direkt aus amino-modifizierten Partikeln dargestellt wurden, weisen

relativ hohe Werte des zweiten Kumulanten μ_2 auf, die auf eine breite Größenverteilung der Partikel in Lösung hindeuten. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei den amino-funktionalisierten Edukt-Partikeln **POS-NH₂** gemacht. Die Partikel **POS-COOHQ1** und **POS-COOHQ2**, die aus den carboxy-funktionalisierten Partikeln **POS-COOH** erhalten wurden, weisen dagegen nach Funktionalisierung mit quaternären Ammoniumgruppen eine relativ enge Verteilung der Radien auf. Ein nachweisbarer Einfluss des Alkylierungsmittels auf die Größe und Polydispersität bzw. auf das ζ -Potential der Partikel in der wässrigen Lösung kann nicht festgestellt werden.

Tabelle 7.2: pH-Abhängigkeit der ζ -Potentiale und der hydrodynamischen Radien der carboxy-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach Quaternisierung. Messung in wässrigem Glycin-Puffer mit 5 mM Natriumchlorid (saurer Puffer mit Salzsäure bzw. basischer mit Natronlauge). Partikel **POS-COOHQ1: $c = 0.18$ mg/mL; Partikel **POS-COOHQ2**, $c = 0.26$ mg/mL. ζ -Potential: $T = 295$ K. DLS: $T = 296$ K.**

Probenbezeichnung / Alkylierungsmittel	pH = 3.3		pH = 8.6	
	ζ -Potential / mV	$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm (μ_2)	ζ -Potential / mV	$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm (μ_2)
POS-COOHQ1 / Ethyljodid	32 ± 1	16.8 (0.13)	-2 ± 0	95 (0.15)
POS-COOHQ2 / 2-Iodoethanol	29 ± 1	16.2 (0.13)	1 ± 0	146 (0.16)

Eine Bestimmung des Quaternisierungsgrads bzw. der Anzahl der funktionellen Gruppen wurde mit der TGA durchgeführt. Diese lieferte allerdings kein zuverlässiges Ergebnis: auf Grund der Anwesenheit anderer funktioneller Gruppen und des daraus resultierenden hohen Anteils des organischen Materials liefert die TGA ein Ergebnis, das innerhalb des Fehlerbereichs der Edukt-Partikel liegt (Anhang, Abbildung 12.15 und Abbildung 12.16). Es wurde jedoch mittels pH-abhängiger ζ -Potential-Messungen untersucht, ob bei der Darstellung der quaternisierten Partikel **POS-COOHQ1** und **POS-COOHQ2** aus den carboxy-funktionalisierten Partikeln eine vollständige Umsetzung aller Carboxygruppen stattfindet. Die mit *N,N*-Diethylethylendiamin funktionalisierte Zwischenstufe ist nur in organischen Lösungsmittel löslich, weshalb mit

der Zwischenstufe keine pH-abhängigen Messungen durchgeführt wurden. Die quaternisierten Partikel konnten dagegen in wässriger Lösung bei verschiedenen pH-Werten vermessen werden. Um eventuelle Schwankungen des pH-Werts zu verhindern wurde in Glycin-Puffer gearbeitet (0.1 mol/L Glycin-Lösung mit 5 mM Natriumchlorid sowie mit Natronlauge bzw. Salzsäure zur pH-Einstellung). Tabelle 7.2 fasst die Ergebnisse der ζ -Potential-Messungen zusammen.

Die ζ -Potentiale der Partikel im sauren Glycin-Puffer liegen bei ca. 30 mV und unterscheiden sich damit kaum von den ζ -Potentialen der Partikel in 5 mM Natriumchlorid-Lösung (pH \approx 7). Im basischen pH-Bereich nimmt der ζ -Potential ab und ist ungefähr gleich Null. Diese Abnahme des ζ -Potentials könnte durch die Deprotonierung der nicht-umgesetzten Carboxygruppen verursacht werden. Es ist ein Indiz für die nicht-quantitative Umsetzung aller Carboxygruppen mit *N,N*-Diethylethylendiamin. *N,N*-Diethylethylendiamin wurde bei der Oberflächenmodifizierung im Überschuss verwendet. Normalerweise verläuft die PyBOP-Aktivierung der Carboxygruppe mit sehr guten Ausbeuten.¹⁷¹ Durch sterische Hinderung (z. B. durch Siloxan-Netzwerk) könnte jedoch ein Teil der Carboxygruppen an der Reaktion gehindert worden sein. Die Abnahme der Partikelladung geht auch mit der Abnahme der kolloidalen Stabilität der Partikel einher (Vgl. Abschnitt 2.1.2, S. 7). Im basischen Milieu entstehen Agglomerate von 95 nm (Partikel **POS-COOHQ1**) bzw. 146 nm (Partikel **POS-COOHQ2**) im Radius. Das verwendete Alkylierungsmittel scheint hierbei die pH-Abhängigkeit nicht zu beeinflussen.

Allerdings kann auch eine Hydrolyse der quaternären Ammoniumgruppen zu Hydroxylgruppen unter basischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Die quaternären Ammoniumgruppen können bereits bei pH \approx 8 durch Basen hydrolysiert werden. Eine Hydrolyse der quaternären Ammoniumgruppen würde ebenfalls eine Abnahme des ζ -Potentials und der kolloidalen Stabilität der Partikel verursachen. Die Hydrolysegeschwindigkeit der quaternären Ammoniumgruppen hängt in der Regel stark von den Eigenschaften der zu hydrolysierenden Spezies und dem Reaktionsmedium ab.¹⁷² Eine weitere Untersuchung der Hydrolysekinetik wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Eine analoge Untersuchung mit den quaternisierten Partikel **POS-NH₂Q1** und **Q2** wurde bei pH = 12, also oberhalb des pK_s-Wertes¹³⁵ der sekundären Aminogruppen, durchgeführt (Anhang, Tabelle 12.4, S. 166). Die Partikel agglomerierten sofort nach der

Verdünnung der Partikellösung mit der wässrigen Natronlauge-Lösung. Es wurden negative ζ -Potential-Werte gemessen, die durch eine Hydrolyse der quaternären Ammoniumgruppen im basischen Milieu erklärt werden können.¹⁷²

7.2.2 Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

7.2.2.1 Quaternisierte Partikel aus den amino-funktionalisierten Partikeln

Die Charakterisierung der quaternisierten Partikel unter physiologischen Bedingungen wurde mittels DLS durchgeführt.

Die amino-funktionalisierten Partikel sind auch nach Quaternisierung instabil im Zellkulturmedium RPMI 1640. Ähnlich wie die amino-funktionalisierten Edukt-Partikel **POS-NH₂** bilden auch die quaternisierten Proben **POS-NH₂Q1** und **POS-NH₂Q2** sofort mit bloßem Auge sichtbare Agglomerate. Dieses Verhalten könnte durch die im Medium enthaltenen Salze verursacht werden. Im serumhaltigen Zellkulturmedium bleiben die Partikel hingegen dispergiert und können mittels DLS charakterisiert werden.

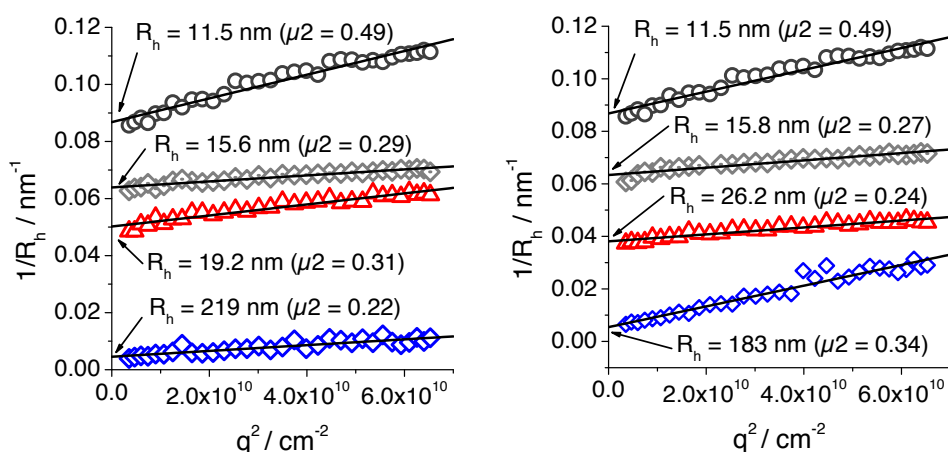


Abbildung 7.1: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach Quaternisierung mit Ethyliodid (links; Probe POS-NH₂Q1, $c = 0.50 \text{ mg/mL}$) und 2-Iodoethanol (rechts; Probe POS-NH₂Q2, $c = 0.71 \text{ mg/mL}$) \diamond in Wasser, \triangle in 5 mM Natriumchloridlösung, \diamond in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (triexponentielle Anpassung der AKF) und \circ Vergleich mit Serumproteinen (RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). T = 295 K.

Abbildung 7.1 zeigt die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach der Quaternisierung mit Ethyliodid (links, Probe **POS-NH₂Q1**) und 2-Iodoethanol (rechts, Probe **POS-NH₂Q2**) in Wasser, 5 mM Natriumchloridlösung und RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS.

Die Messung in 5 mM Natriumchloridlösung demonstriert den Einfluss der Salzkonzentration auf die kolloidale Stabilität der Partikel in Lösung: Der hydrodynamische Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ nimmt von 15.6 nm in Wasser auf 19.2 nm in 5 mM Natriumchloridlösung (Probe **POS-NH₂Q1**) bzw. von 15.8 nm auf 26.2 nm (Probe **POS-NH₂Q2**) zu.

In dem serumhaltigen Zellkulturmedium bilden die quaternisierten Partikel größere Agglomerate, ähnlich wie die nicht-quaternisierte Vorstufe **POS-NH₂** (Vgl. Abschnitt 5.3.2 S. 64). Möglicherweise werden die quaternisierten Nanopartikel durch adsorptive Bindung der Proteine an die Partikeloberfläche stabilisiert und verbleiben als Nanopartikel-Protein-Komplexe in Lösung, ähnlich wie die nicht-quaternisierten Edukt-Partikel. Diese Komplexe weisen eine breite Größenverteilung auf. Die hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ wurden zu 219 nm für die Probe **POS-NH₂Q1** und zu 183 nm für die **POS-NH₂Q2** aus der Winkelabhängigkeit ermittelt. Als Vorbereitung für die Lichtstreuung wurden die Proben mit einem Filter filtriert, dessen Ausschlussgrenze bei 0.45 µm Durchmesser liegt. Es ist somit möglich, dass größere Teilchen während der Filtration abgetrennt wurden. Eine genaue Aussage über die Größe der Nanopartikel-Protein-Komplexe kann deshalb nicht getroffen werden.

7.2.2.2 Quaternisierte Partikel aus den carboxy-funktionalisierten Partikeln

Die quaternisierten Partikel **POS-COOHQ1** und **POS-COOHQ2**, die aus den carboxy-funktionalisierten Nanopartikeln **POS-COOH** dargestellt wurden, zeigen unter physiologischen Bedingungen anderes Verhalten, als die ursprünglich amino-funktionalisierten, quaternisierten Partikel.

Abbildung 7.2 zeigt die Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der Partikel **POS-COOHQ1** (links) und **POS-COOHQ2** (rechts) in Wasser, RPMI 1640 und RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS. Die hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ in Wasser

wurden zu 15.9 nm für Probe **POS-COOHQ1** und 18.9 nm für Probe **POS-COOHQ2** bestimmt. Im Zellkulturmedium nimmt der Partikelradius stark zu, es entstehen Agglomerate von 104 nm (Probe **POS-COOHQ1**) bzw. 186 nm (Probe **POS-COOHQ2**). Die Partikel bleiben im Zellkulturmedium gelöst, allerdings wird die kolloidale Stabilität der Partikel durch die im Medium enthaltene Salze deutlich verringert.

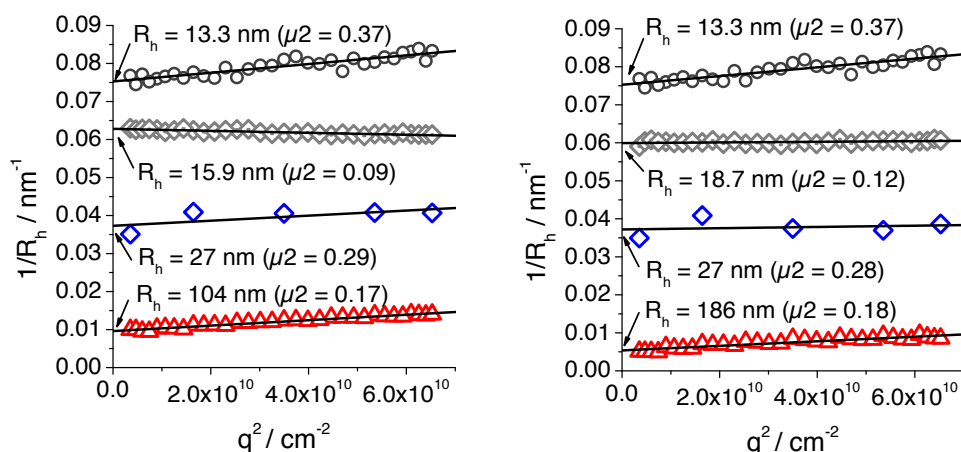


Abbildung 7.2: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der carboxy-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach der Quaternisierung mit Ethyliodid (links; Probe POS-COOHQ1, $c = 0.18$ mg/mL) und 2-Iodoethanol (rechts; Probe POS-COOHQ2, $c = 0.26$ mg/mL) \diamond in Wasser, \triangle in Zellkulturmedium RPMI 1640, \diamond in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (Anpassung der AKF nach Gleichung (3-14)) und \circ Vergleich mit Serumproteinen (RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). $T = 296$ K.

Im serumhaltigen Zellkulturmedium entstehen ebenfalls Agglomerate. Ihre hydrodynamischen Radien sind allerdings deutlich kleiner als im serumfreien Medium. Nach Auswertung der Autokorrelationsfunktionen mit Multikomponentenanalyse nach Gleichung (3-14) wurde der hydrodynamische Radius aus der Winkelabhängigkeit zu 27 nm für beide Proben bestimmt. Es ist somit nur eine leichte Zunahme der hydrodynamischen Radien im Vergleich zu den Partikel in wässriger Lösung feststellbar, die höchstwahrscheinlich auf die Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche verursacht wird. Die entstehenden Nanopartikel-Protein-Komplexe weisen andere Oberflächeneigenschaften auf als die quaternisierten Nanopartikeln und bleiben deshalb im Zellkulturmedium dispergiert. Ähnliche Effekte wurden bereits bei den amino-funktionalisierten Partikeln **POS-NH₂** und **POS-NH₂Q1&2** festgestellt (Vgl. Abschnitt

5.3, S. 63 sowie vorheriges Abschnitt 7.2.2.1, S. 111). Die hydrodynamischen Radien der hier beschriebenen Nanopartikel-Protein Komplexe sind jedoch deutlich kleiner als die Radien der Partikel **POS-NH₂** und **POS-NH₂Q1&2**. Vielmehr liegen sie im gleichen Größenbereich wie der Radius der von den carboxy-funktionalisierten Edukt-Partikel **POS-COOH** gebildeten Nanopartikel-Protein-Agglomeraten ($\langle R_h \rangle_z^{-1} 30$ nm, Vgl. Abschnitt 5.2.2, S. 59).

Inwiefern die Quaternisierung der Oberfläche die genaue Zusammensetzung der Proteinkorona beeinflusst, kann anhand der vorliegenden Messdaten nicht endgültig geklärt werden und geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Eine Untersuchung mit Proteomik, die einen Aufschluss über den Einfluss der Oberflächencharakteristika der Nanopartikel auf die Beschaffenheit der Proteinkorona liefern würde, erfolgt zur Zeit an der Universitätsmedizin Mainz.

7.3 Dual-funktionalisierte, quaternisierte und PEGylierte Partikel

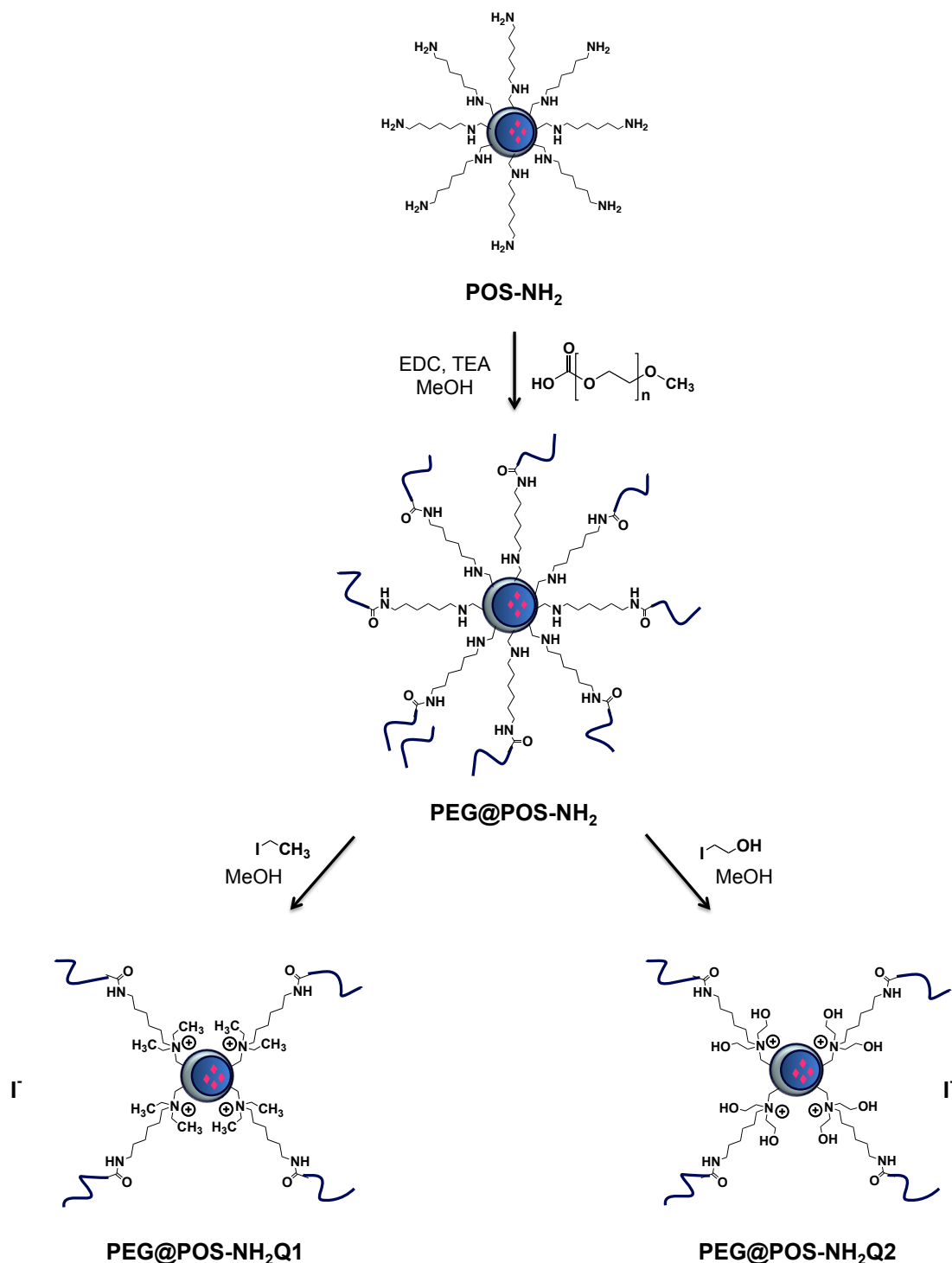
7.3.1 Modifizierung der amino-funktionalisierten Partikel

7.3.1.1 *Synthese und Charakterisierung*

Die durch Quaternisierung erreichte elektrostatische Stabilisierung der Partikel gewährleistet zwar die kolloidale Stabilität der Partikel in reinem Wasser, ist allerdings unzureichend, um die Partikel unter physiologischen Bedingungen zu stabilisieren (Vgl. Abschnitt 7.2). Deshalb wurden durch eine Kombination aus elektrostatischer und sterischer Stabilisierung quaternisierte, unter physiologischen Bedingungen stabile Partikel hergestellt. Bei dieser dualen Modifizierung wurde die Partikeloberfläche mit quaternären Ammoniumgruppen und gleichzeitig mit PEG funktionalisiert.

Schema 7.3 zeigt die Synthese der dual-stabilisierten, quaternisierten und PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ausgehend von den amino-funktionalisierten Partikeln **POS-NH₂**. Im ersten Schritt erfolgt die PEGylierung der primären Aminogruppen auf der Partikeloberfläche (Vgl. Abschnitt 6.5, S. 92). Anschließend werden die noch

vorhandenen sekundären Aminogruppen mit Ethyliodid (Probe **PEG@POS-NH₂Q1**) bzw. 2-Iodoethanol (Probe **PEG@POS-NH₂Q2**) alkyliert.



Schema 7.3: Darstellung der quaternisierten, PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ausgehend von amino-funktionalisierten Partikel. Als erstes wird PEG-COOH in einer EDC-vermittelten Reaktion an die Partikeloberfläche angebunden. Es folgt die Quaternisierung der sekundären Aminogruppen mit Ethyliodid (Partikel **PEG@POS-NH₂Q1**) bzw. 2-Iodoethanol (**PEG@POS-NH₂Q2**).

Als Reaktionsprodukt erhält man die positiv geladenen, wasserlöslichen Partikel. Tabelle 7.3 zeigt die Ergebnisse der DLS- und ζ -Potential-Messungen, sowie den Vergleich mit den PEGylierten Edukt-Partikeln **PEG@POS-NH₂**.

Tabelle 7.3: Bestimmung der Partikelradien und ζ -Potentiale der quaternisierten, PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel **PEG@POS-NH₂Q1 (c = 0.15 mg/mL) und **PEG@POS-NH₂Q2** (c = 0.16 mg/mL), die ausgehend von den amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** dargestellt wurden. ζ -Potential: pH \approx 7, T = 295 K. DLS: T = 296 K.**

Probenbezeichnung	Alkylierungsmittel	$\langle R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm} (\mu 2)$	ζ -Potential / mV
		H ₂ O	(5 mM NaCl)
PEG@POS-NH₂ⁱ	--	33 (0.33)	14 \pm 1
PEG@POS-NH₂Q1	Ethyljodid	18.9 (0.27)	12 \pm 1
PEG@POS-NH₂Q2	2-Iodoethanol	21.4 (0.26)	16 \pm 1

Die Partikelradien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ in Wasser wurden mittels DLS zu 18.9 nm für die mit Ethyljodid alkylierte Probe **PEG@POS-NH₂Q1** und zu 21.4 nm für die mit 2-Iodoethanol Probe **PEG@POS-NH₂Q2** bestimmt. Die hydrodynamischen Radien nehmen somit nach der Quaternisierung ab im Vergleich zu den nicht-quaternisierten Partikeln **PEG@POS-NH₂**. Die quaternisierten, PEGylierten Partikel weisen allerdings in Lösung noch immer eine polydisperse Größenverteilung auf, was aus den hohen $\mu 2$ -Werten deutlich wird.

Bei den ζ -Potentialen ist hingegen keine signifikante Änderung nach Quaternisierung feststellbar. Die ζ -Potentialmessungen wurden in 5 mM wässriger Natriumchloridlösung durchgeführt. Die sekundäre Aminogruppe in den Edukt-Partikel **PEG@POS-NH₂** liegt unter diesen Bedingungen auf Grund ihrer Basizitätⁱⁱ protoniert vor.¹³⁵ Somit verursacht die Quaternisierung der Partikeloberfläche keine Änderungen des ζ -Potentials in 5 mM

ⁱ Vgl. Abschnitt 6.5

ⁱⁱ Der pK_s-Wert der sekundären Aminogruppe von AHAPS ist laut Hersteller unbekannt. Die Basizität sekundärer Aminogruppen ist allgemein recht hoch. So hat Dimethylamin einen pK_b-Wert von 3.39 (pK_s = 10.71).

Natriumchloridlösung. Ferner soll vermerkt werden, dass auch im sauren ($\text{pH} \approx 3\text{-}4$) und basischen Glycin-Puffer ($\text{pH} \approx 8\text{-}9$) keine Änderung des ζ -Potentials sowohl bei Edukt- als auch bei den Produkt-Partikeln ebenfalls auf Grund der Basizität der Aminogruppe stattfindet (Vgl. Anhang, Tabelle 12.5). Eine Bestimmung des Quaternisierungsgrads beispielsweise mit TGA war auf Grund der Anwesenheit der verschiedenen thermisch abbaubaren Gruppen nicht möglich.

7.3.1.1 Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen

Die Charakterisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen wurde mittels DLS durchgeführt. Abbildung 7.3 zeigt die Winkelabhängigkeiten der reziproken hydrodynamischen Radien der quaternisierten, PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel **PEG@POS-NH₂Q1** (links) und **PEG@POS-NH₂Q2** (rechts) im Zellkulturmedium RPMI 1640 und im RPMI 1640 mit FCS sowie einen Vergleich mit den Serumproteinen ohne Nanopartikel.

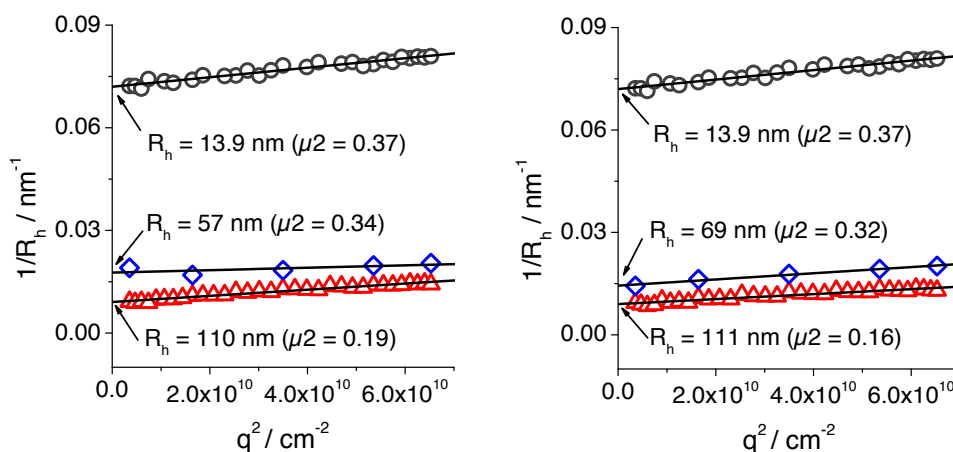


Abbildung 7.3: Winkelabhängigkeit der reziproken hydrodynamischen Radien der amino-funktionalisierten, PEGylierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel nach der Quaternisierung mit Ethyliodid (links; Probe PEG@POS-NH₂Q1, $c = 0.15$ mg/mL) und 2-Iodoethanol (rechts; Probe PEG@POS-NH₂Q2, $c = 0.16$ mg/mL) Δ in Zellkulturmedium RPMI 1640, \diamond in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (Anpassung der AKF nach Gleichung (3-14)) und \circ Vergleich mit Serumproteinen (RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). $T = 296$ °C.

Die dual-funktionalisierten Partikel **PEG@POS-NH₂Q1** und **PEG@POS-NH₂Q2** sind löslich im Zellkulturmedium. Dennoch entstehen unter diesen Bedingungen Agglomerate mit ca. 110 nm im Radius. Die kolloidale Stabilität nach Quaternisierung nimmt somit im Vergleich zu den nicht-quaternisierten, PEGylierten Partikeln **PEG@POS-NH₂**, die keine Agglomerate im serumfreiem Zellkulturmedium bilden, ab (Vgl. Abschnitt 6.5, S. 92).

In den nicht-quaternisierten, PEGylierten Partikeln **PEG@POS-NH₂** liegt die sekundäre Aminogruppe im physiologischen pH-Bereich (pH = 7.4-7.6) protoniert vor, und ist somit positiv geladen. Nach der Quaternisierung ändert sich die Oberflächenladung deshalb nicht. Das Volumen der Aminogruppe mit daran gebundenen Resten nimmt nach Quaternisierung hingegen zu. Dies könnte evtl. zum Aussalzen der Partikel durch die im Medium enthaltenen Salze führen und die Instabilität der PEGylierten, quaternisierten Partikel im Medium erklären.

Im serumhaltigen Medium weisen die dual-funktionalisierten Partikel eine höhere kolloidale Stabilität auf als im serumfreien Medium. Durch die Adsorption der Proteine an die Partikeloberfläche und die Bildung der Nanopartikel-Protein-Komplexe werden die Partikel in der Lösung stabilisiert. Die hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ wurden bestimmt zu 57 nm für die Probe **PEG@POS-NH₂Q1** und zu 69 nm für die Probe **PEG@POS-NH₂Q2**. Die Partikel liegen demnach im serumhaltigen Zellkulturmedium als polydisperse Cluster aus mehreren Nanopartikel und Proteinen vor.

Tabelle 7.4 zeigt einen Vergleich der Partikelgrößen der hier beschriebenen dual-funktionalisierten Partikel **PEG@POS-NH₂Q1** und **PEG@POS-NH₂Q2** mit den monofunktionalisierten, PEGylierten Partikeln **PEG@POS-NH₂** und mit den monofunktionalisierten, quaternisierten Partikeln **POS-NH₂Q1**.

Im serumfreien Zellkulturmedium RPMI weisen die dual-funktionalisierten Partikel **PEG@POS-NH₂Q1** und **PEG@POS-NH₂Q2** eine höhere kolloidale Stabilität auf als die rein elektrostatisch stabilisierten Partikel **POS-NH₂Q1**. Es ist zu erkennen, dass die Nanopartikel-Protein-Agglomerate aus den dual-funktionalisierten Partikel **PEG@POS-NH₂Q1** und **PEG@POS-NH₂Q2** und Serumproteinen deutlich kleiner sind, als die Agglomerate, die aus quaternisierten, nicht-PEGylierten Partikeln **POS-NH₂Q1** mit Serumproteinen entstehen. Die Radien der PEGylierten, nicht-quaternisierten Partikel **PEG@POS-NH₂** in Anwesenheit der Serumproteine sind hingegen etwas kleiner als die

Radien der dual-funktionalisierten Partikel **PEG@POS-NH₂Q1** und **PEG@POS-NH₂Q2**. Die dual-funktionalisierten Partikel werden somit generell durch die PEGylierung im serumhaltigen Zellkulturmedium stabilisiert. Die Quaternisierung führt jedoch anscheinend zu einer Abnahme der kolloidalen Stabilität im serumfreien Zellkulturmedium und zu einer Erhöhung der Proteinadsorption an die Partikeloberfläche im serumhaltigen Zellkulturmedium.

Tabelle 7.4: Vergleich der hydrodynamischen Radien der Nanopartikel-Protein-Komplexe der quaternisierten, PEGylierten Partikel PEG@POS-NH₂Q und mit den quaternisierten, nicht-PEGylierten Partikel POS-NH₂Q und den PEGylierten, nicht-quaternisierten Partikel PEG@POS-NH₂. T = 296 K.

Probe	POS-NH ₂ Q1	PEG@POS-NH ₂	PEG@POS-NH ₂ Q1	PEG@POS-NH ₂ Q2
Oberflächenfunktionalisierung	Q ⁱ	PEG	Q + PEG	Q + PEG
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm in RPMI (μ 2)	—	18.6 (0.13)	110 (0.19)	111 (0.16)
$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm in RPMI + 5 Gew.-% FCS (μ 2)	219 (0.22)	44 (0.32)	57 (0.34)	69 (0.32)

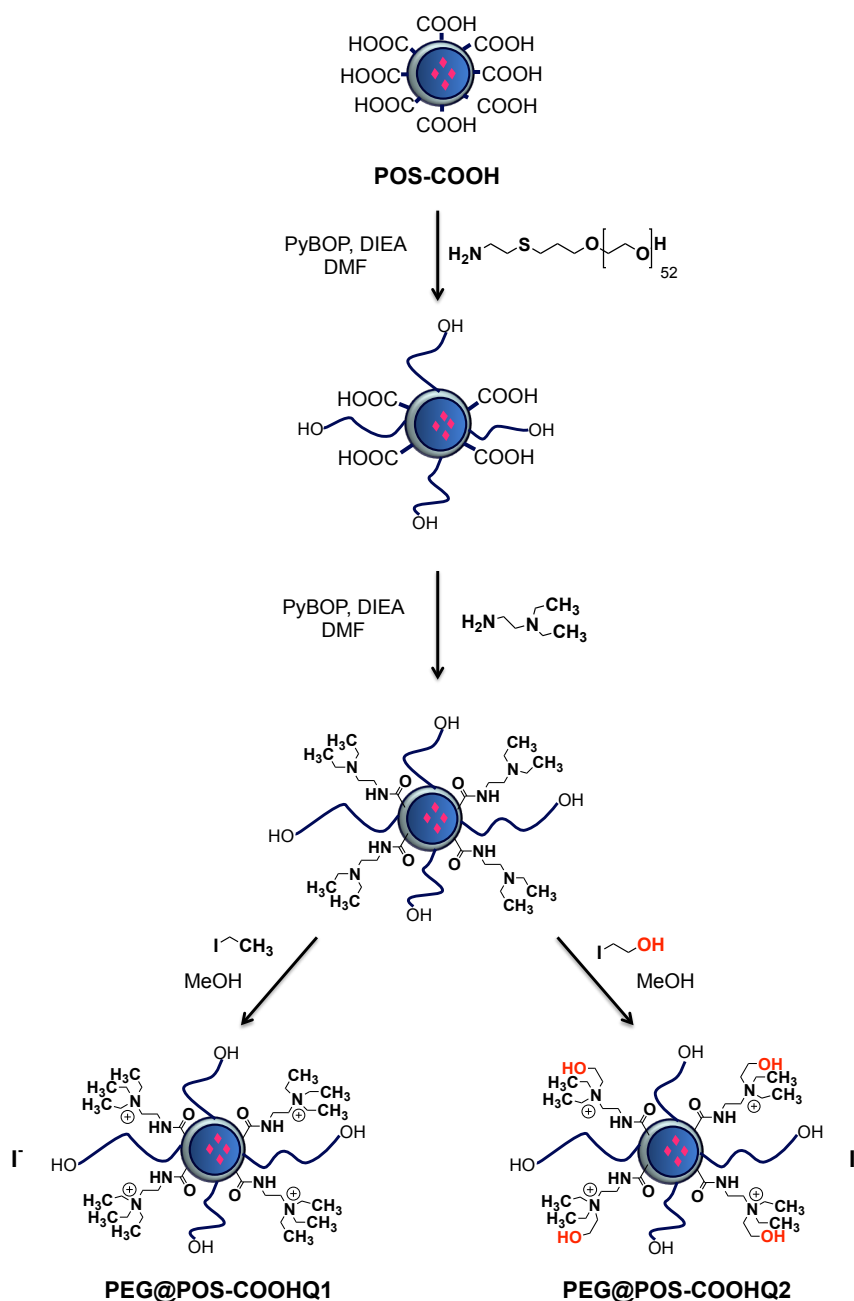
7.3.2 Modifizierung der carboxy-funktionalisierten Partikel

7.3.2.1 Synthese und Charakterisierung

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung der dual-funktionalisierten, quaternisierten und PEGylierten Partikel stellt die Modifizierung der carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** dar. Schema 7.4 zeigt den während dieser Arbeit realisierten Syntheseweg. Im ersten Schritt wird eine geringe Menge **PEG-NH₂** in einer PyBOP-vermittelten Kupplungsreaktion auf die Partikeloberfläche gekuppelt, so dass ein Teil der Carboxygruppen noch frei bleibt. Es werden hierbei nur 10 Gew.-% PEG bei der Synthese eingesetzt. Der tatsächlich umgesetzte Anteil an PEG wurde nicht ermittelt. Im

ⁱ Q = Quaternisierung

zweiten Schritt erfolgt die Umsetzung der noch freien Carboxygruppen mit *N,N*-Diethylethyldiamin. Anschließend wird die sekundäre Aminogruppe mit Ethyliodid (Probe **PEG@POS-COOHQ1**) oder mit 2-Iodoethanol (Probe **PEG@POS-COOHQ2**) alkyliert. Auch diese Funktionalisierung ergibt wasserlösliche, bei neutralem pH positiv geladene Nanopartikel.



Schema 7.4: Darstellung quaternisierter PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel ausgehend von carboxy-funktionalisierten Partikeln. Im ersten Syntheseschritt erfolgt die Kupplung von PEG-NH₂ an die Partikeloberfläche gefolgt von der Kupplung von *N,N*-Diethylethyldiamin. Schließlich wird die sekundäre Aminogruppe mit Ethyliodid bzw. 2-Iodoethanol quaternisiert.

Tabelle 7.5: Bestimmung der Partikelradien und ζ -Potentiale quaternisierter, PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die ausgehend von carboxy-funktionalisierten Partikel dargestellt wurden. PEG@POS-COOHQ1: $c = 0.14$ mg/mL; PEG@POS-COOHQ2 $c = 0.15$ mg/mL. ζ -Potential: $\text{pH} \approx 7$, $T = 295$ K. DLS: $T = 296$ K.

Probenbezeichnung	Alkylierungsmittel	$\langle R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm} (\mu 2)$ (H ₂ O)	ζ -Potential (5 mM NaCl) / mV
PEG@POS-COOHQ1	Ethyljodid	19.8 (0.11)	10 ± 1
PEG@POS-COOHQ2	2-Iodoethanol	19.4 (0.12)	8 ± 1

Die Partikel wurden in wässriger Lösung mittels DLS und ζ -Potential-Messungen charakterisiert (Tabelle 7.5). Für die mit Ethyljodid alkylierten Partikel **PEG@POS-COOHQ1** wurde ein hydrodynamischer Radius $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ von 19.8 nm ($\mu 2 = 0.11$) ermittelt. Der hydrodynamische Radius mit der mit 2-Iodoethanol alkylierten Partikel **PEG@POS-COOHQ2** beträgt 19.4 nm ($\mu 2 = 0.12$). Diese Partikel, die durch die duale Funktionalisierung der Partikel **POS-COOH** erhalten wurden, haben wesentlich kleinere Werte des zweiten Kumulanten $\mu 2$, als die Partikel, die durch Modifizierung der amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** dargestellt wurden (Abschnitt 7.3.1, S. 114). Die duale Funktionalisierung der carboxy-funktionalisierten Partikel ermöglicht somit die Darstellung enger verteilter Partikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche.

Die ζ -Potentiale der quaternisierten, PEGylierten Partikel liegen im positiven Bereich. Mit 10 mV (Probe **PEG@POS-COOHQ1**) bzw. 8 mV (Probe **PEG@POS-COOHQ2**) sind die Werte jedoch deutlich kleiner als die ζ -Potentiale rein ladungsstabilisierter, quaternisierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die bei etwa 30 mV liegen (Vgl. Abschnitt 7.2, S. 106). Dies liegt daran, dass ein Teil der Carboxygruppen im ersten Syntheseschritt PEGyliert wurde und deshalb nicht für die Reaktion mit *N,N*-Diethylethylendiamin und die anschließende Alkylierung zu Verfügung steht (Vgl.

Schema 7.4). Auch eine Abschirmung der Oberflächenladung durch PEG könnte die niedrigeren Werte des ζ -Potentials verursachen.

Tabelle 7.6: pH-Abhängigkeit der ζ -Potentiale und der hydrodynamischen Radien quaternisierter, PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die ausgehend von carboxy-funktionalisierten Partikel dargestellt wurden. Messung in wässrigem Glycin-Puffer mit 5 mM Natriumchlorid (saurer Puffer mit Salzsäure bzw. basischer mit Natronlauge). ζ -Potential: T = 295 K. DLS: T = 296 K.

Probenbezeichnung / Alkylierungsmittel	pH = 3.1		pH = 8.5	
	ζ -Potential / mV	$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm ($\mu 2$)	ζ -Potential / mV	$\langle R_h \rangle_z^{-1}$ / nm ($\mu 2$)
PEG@POS-COOHQ1 (c = 0.14 mg/mL) / Ethyliodid	14 ± 1	18.7 (0.12)	-5 ± 0	29.2 (0.12)
PEG@POS-COOHQ2 (c = 0.15 mg/mL) / 2-Iodoethanol	13 ± 1	18.3 (0.12)	-5 ± 0	23.5 (0.12)

Der genaue Anteil an den quaternären Ammoniumgruppen wurde nicht bestimmt, die positiven ζ -Potentiale zeigen allerdings, dass die Umsetzung generell stattgefunden hat. Um zumindest Hinweise auf die Anwesenheit der nicht-umgesetzten Carboxygruppen zu erhalten wurden auch die Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der ζ -Potentiale und der damit verbundenen kolloidalen Stabilität der Partikel durchgeführt. Tabelle 7.6 zeigt die Ergebnisse der ζ -Potential- und Lichtstreuungsmessungen im sauren und basischen Glycin-Puffer. Die ζ -Potentiale der quaternisierten, PEGylierten Partikeln **PEG@POS-COOHQ1&2** ändern sich mit dem pH-Wert, ähnlich wie die ζ -Potentiale der nicht-PEGylierten, quaternisierten Partikel **POS-COOHQ1&2**. Der Einfluss des pH-Wertes auf die kolloidale Stabilität der Partikel ist bei den dual-funktionalisierten Partikeln hingegen relativ gering. Im sauren Milieu sind die Partikel positiv geladen. Die ζ -Potentiale der beiden Proben sind mit 14 mV (Probe **PEG@POS-COOHQ1**) und 13 mV (Probe **PEG@POS-COOHQ2**) sogar etwas höher als in wässriger 5 mM Natriumchloridlösung. Die hydrodynamischen Radien der Partikel nehmen leicht ab im Vergleich zu reinem Wasser. Im basischen Milieu sind die ζ -Potentiale dagegen

leicht negativ. Es wird auch eine leichte Zunahme der hydrodynamischen Radien im basischen Puffer beobachtet. Diese pH-Abhängigkeit der ζ -Potentiale könnte durch die noch vorhandenen, nicht umgesetzten Carboxygruppen oder auch durch Hydrolyse der quaternären Ammoniumgruppen verursacht worden sein.¹⁷² Die pH-abhängige Größenänderung ist im Vergleich zu den mono-funktionalisierten, quaternisierten Partikeln **POS-COOHQ** deutlich kleiner (Vgl. Abschnitt 7.2.1, S. 106). Die Partikeloberfläche wurde demzufolge ausreichend mit PEG-Ketten funktionalisiert, um sterische Stabilisierung der Partikel bei verschiedenen pH-Werten zu gewährleisten.

7.3.2.2 *Charakterisierung unter physiologischen Bedingungen*

Die Charakterisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen wurde mittels DLS durchgeführt. Abbildung 7.4 zeigt die Winkelabhängigkeiten der reziproken hydrodynamischen Radien der mit Ethyliodid quaternisierten, PEGylierten Partikel **PEG@POS-COOHQ1** (links) und der mit 2-Iodoethanol quaternisierten, PEGylierten Partikel **PEG@POS-COOHQ2** (rechts) im serumfreien und serumhaltigen Zellkulturmedium RPMI 1640 sowie den Vergleich mit Serumproteinen ohne Nanopartikel.

Die hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ in serumfreien RPMI 1640 wurden zu 24.6 nm (Probe **PEG@POS-COOHQ1**) und 22.1 nm (Probe **PEG@POS-COOHQ2**) ermittelt. Im Vergleich zu den Partikeln in wässriger Lösung der Partikel findet bei den Partikeln im Zellkulturmedium nur eine geringe Zunahme der Radien statt. Auch in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS ändert sich die Partikelgröße kaum. Die hydrodynamischen Radien $\langle R_h \rangle_z^{-1}$ im serumhaltigen Medium wurden bestimmt zu 26 nm (Probe **PEG@POS-COOHQ1**) und 22 nm (Probe **PEG@POS-COOHQ2**). Die hohen μ_2 -Werte werden höchstwahrscheinlich durch die Polydispersität der Proteinmischung verursacht.

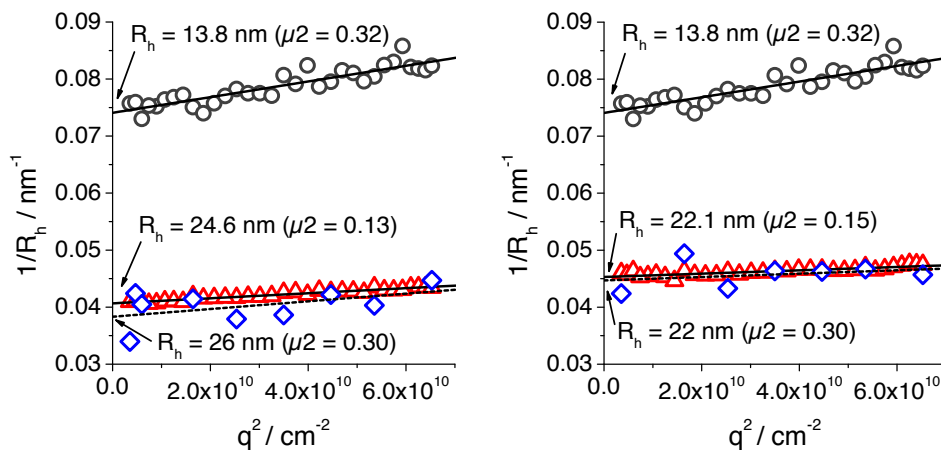


Abbildung 7.4: Winkelabhängigkeit der inversen hydrodynamischen Radien quaternisierter, PEGylierter Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die ausgehend von carboxy-funktionalisierten Partikel dargestellt wurden. Links: Probe PEG@POS-COOHQ1 ($c = 0.15 \text{ mg/mL}$, Quaternisierung mit Ethyliodid), rechts: Probe PEG@POS-COOHQ2 ($c = 0.14 \text{ mg/mL}$, Quaternisierung mit 2-Iodoethanol) \triangle in Zellkulturmedium RPMI 1640, \diamond in RPMI 1640 mit 5 Gew.-% FCS (Anpassung der AKF nach Gleichung (3-14)) und \circ Vergleich mit Serumproteinen (RPMI + 5 Gew.-% FCS ohne NP). $T = 296 \text{ K}$.

Die duale Stabilisierung mit quaternären Ammoniumgruppen und PEG gewährleistet folglich die Stabilität der Partikel unter physiologischen Bedingungen. Die Proteinadsorption wird nach der dualen Oberflächenfunktionalisierung durch PEGylierung sehr stark reduziert. Welchen Einfluss die Einführung der quaternären Ammoniumgruppen auf die Entstehung und Zusammensetzung der Proteinkorona hat, wird zur Zeit an der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen der Promotionsarbeit von D. Docter untersucht.

8 Wechselwirkung der Poly(organosiloxan-Nanopartikel) mit Lungenzellkulturmodellen

Die Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel haben zumeist einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkungen der Nanopartikel mit biologischen Systemen. In vorherigen Abschnitten dieser Arbeit wurden die Synthese des auf Poly(organosiloxanen) basierenden Modellsystems mit unterschiedlichen, variablen Oberflächeneigenschaften und das Verhalten dieses Systems unter physiologischen Bedingungen in Anwesenheit des Serums vorgestellt. Hierbei wurden teilweise erhebliche Unterschiede im Agglomerationsverhalten der Partikel mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalitäten festgestellt. Neben der Charakterisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen, in Anwesenheit des Serums, welche die Rückschlüsse auf das Verhalten der Partikel in der Blutbahn ermöglichen, ist auch eine Untersuchung der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Zellen notwendig, um Informationen über mögliche Aufnahme der Nanopartikel durch den Körper zu erhalten. Eines der möglichen Aufnahmewege der Nanopartikel in den Körper ist die Inhalation der Nanopartikel durch die Lunge. Auf Grund der hohen äußeren Oberfläche der Lunge ist das Gefahrenpotential bei der Inhalation der Nanopartikel im Vergleich zu der Aufnahme über andere Organe, beispielsweise über den Magen-Darm-Trakt, besonders hoch.³ Andererseits bittet die Inhalation aber auch die Möglichkeit zu einer nicht-invasiven Verabreichung der Medikamente, weswegen die Untersuchung der Nanopartikelaufnahme durch die Lunge auch im Hinblick auf die möglichen biomedizinischen Anwendungen von sehr hohem Interesse ist.^{48,56,57,173} Deshalb werden zur Zeit in Zusammenarbeit mit J. Kasper und C. J. Kirkpatrick *in vitro* Studien mit verschiedenen Poly(organosiloxan)-Nanopartikeln durchgeführt, in denen die Wechselwirkungen der Nanopartikel mit Lungenzellkulturmodellen untersucht werden.

In diesem Abschnitt werden die ersten Ergebnisse der von J. Kasper durchgeführten zellulären Aufnahmeexperimente kurz vorgestellt. Bei diesen Studien wurden die elektrostatisch stabilisierten, negativ und positiv geladenen Partikel sowie die sterisch stabilisierten, PEGylierten und PIPOXYlierten Partikel verwendet. Die Charakteristika der Partikel sind in der Tabelle 8.1 zusammengefasst.

Tabelle 8.1: Charakteristika der für die Zellversuche verwendeten Partikel. DLS: T = 296 K; ζ -Potential: pH \approx 7, T = 295 K.

Probe	Oberflächen-funktionalisierung	$\langle R_h \rangle_z^{-1} / \text{nm}$ ($\mu 2$) in RPMI	ζ -Potential / mV in 5 mM NaCl	Verweis zur Synthese
POS-COOH	Carboxygruppen	15.3 (0.12)	-28 ± 2	Abschn. 5.2 S. 56
POS-COOHQ1	Quaternisierung	104 (0.17)	32 ± 1	Abschn. 7.2 S. 106
PEG@POS-COOH3d	PEG	25.3 (0.09)	-14 ± 1	Abschn. 6.3 S. 73
PIPOX@POS-COOH1	PIPOX	31.1 (0.13)	-4 ± 1	Abschn. 6.4 S. 83

Die zellulären Aufnahmestudien wurden mit den Monokulturen der Lungenepithelzelllinien A549 und NCI H441 durchgeführt sowie mit der Monokultur der Lungenendothelzelllinie ISO-HAS1. Die letzteren ähneln den Endothelzellen der Blutgefäße in vielen ihrer Eigenschaften und ermöglichen somit auch die generellen Rückschlüsse auf die Wiederaufnahme der Nanopartikel aus dem Blutkreislauf.¹⁷⁴ Die Aufnahmestudien wurden im serumfreien Zellkulturmedium durchgeführt, um eine mögliche Veränderung der Partikeleigenschaften durch die Adsorption der Serumproteine und die Bildung einer Proteinkorona zu vermeiden und zunächst nur die Aufnahme von „nackten“ Nanopartikeln zu untersuchen. Die Zellen wurden für 24 h mit ca. 20 μg Nanopartikel inkubiert, anschließend mit Methanol fixiert und mit PBS-Puffer gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurde Höchstfarbstoff verwendet.

Abbildung 8.1 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Poly(organosiloxan)-Nanopartikeln. Die carboxy-funktionalisierten, negativ geladenen Partikel **POS-COOH** werden von allen drei Zellkulturen aufgenommen und akkumulieren in vesikulären Strukturen in der Nähe vom Zellkern, wahrscheinlich in späten Endosomen. Die quaternisierten positiv geladenen Partikel **POS-COOHQ1**, die ausgehend von den carboxy-funktionalisierten Partikeln dargestellt wurden, werden ebenfalls von allen drei Zellkulturen internalisiert. Die

Fluoreszenzintensität ist deutlich höher, was auf eine erhöhte zelluläre Aufnahme im Vergleich zu den carboxy-funktionalisierten Partikeln hinweist. Dies könnte durch die Wechselwirkungen der positiv geladenen quaternären Ammoniumgruppen auf der Partikeloberfläche mit der vorwiegend negativ geladenen Zellmembran verursacht werden.^{13,44} Des Weiteren könnte auch die Größe der quaternisierten Partikel im Zellkulturmedium die zelluläre Aufnahme beeinflussen.¹⁷ DLS-Messungen haben gezeigt, dass die quaternisierten Partikel eine Tendenz zur Agglomeration im serumfreien Zellkulturmedium aufweisen. Das könnte zu einer Änderung des Aufnahmemechanismus und zu einer erhöhter Aufnahme der Nanopartikel in Folge dessen führen.

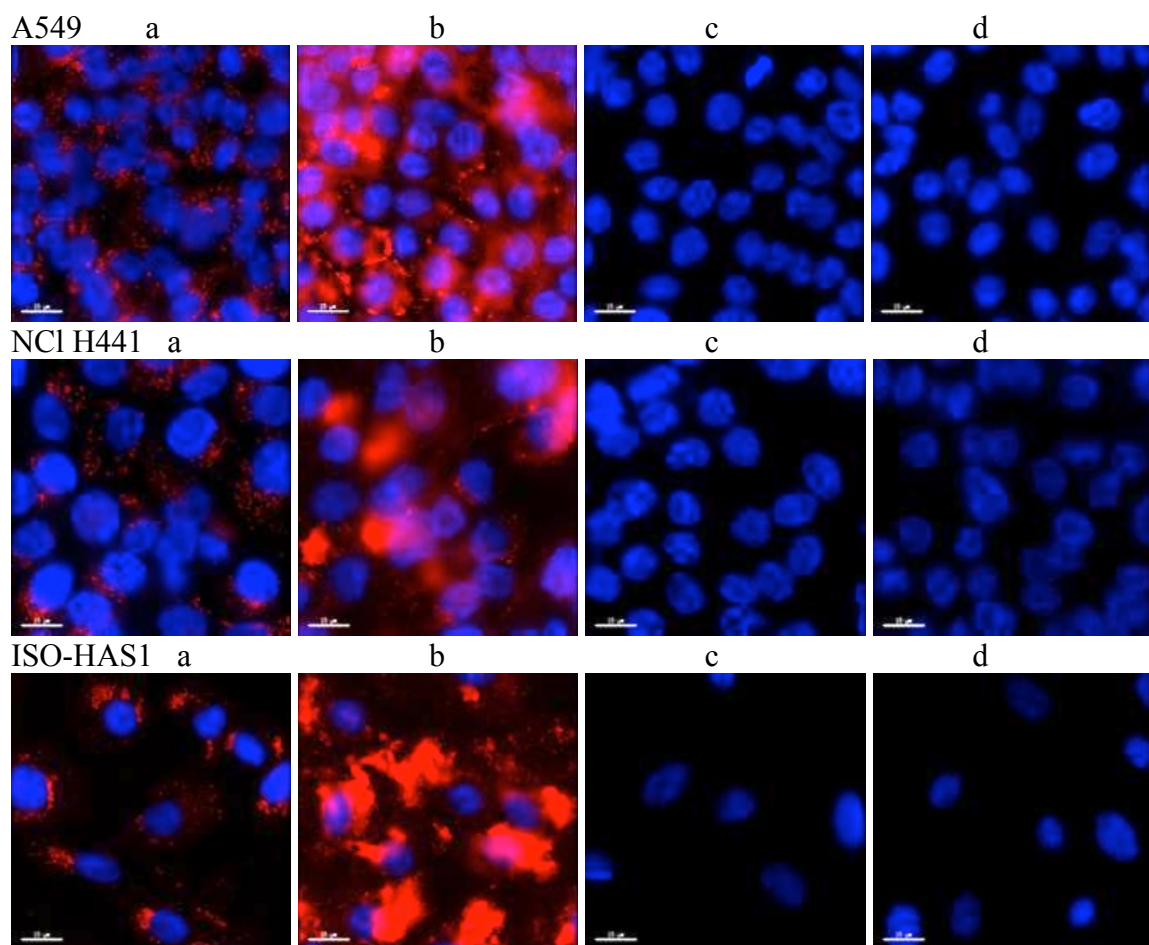


Abbildung 8.1: Lungenzellkulturen nach Inkubation mit verschiedenen Poly(organosiloxan)-Nanopartikel. 1. Reihe: A549-Zellen; 2. Reihe: NCI H441-Zellen; 3. Reihe: ISO-HAS1-Zellen. Inkubation mit: a POS-COOH3, b POS-COOHQ1, c PEG@POS-COOH3d, d PIPOX@POS-COOH1. Die Zellen wurden für 24 h mit jeweils 20 μg Partikel in serumfreiem Zellkulturmedium RPMI 1640 inkubiert. Zellkernfärbung mit Höchst-Farbstoff. Maßstabsbalken 15 μm.

Die sterisch stabilisierten, sowohl die PEGylierten als auch die PIPOxylierten Partikel werden im Gegensatz zu den ladungsstabilisierten Partikeln von keiner der drei Zellkulturen aufgenommen. Bei den PEGylierten Partikeln kann dies auf die verdeckenden Eigenschaften von PEG, die oft die Zelladhäsion und -Aufnahme unterbinden können, zurückgeführt werden.^{14,18,52}

Die Aufnahme der PIPOxylierten Partikel könnte neben den Oberflächeneigenschaften auch durch die Größe der Partikel verhindert werden. Die Aufnahmeexperimente wurden bei 37 °C und somit oberhalb der Phasenseparationstemperatur der Partikel, die im Zellkulturmedium bei etwa 31 °C liegt, durchgeführt. Bei dieser Temperatur entstehen Agglomerate, dessen Größe bis zu 1 µm beträgt (Vgl. Abschnitt 6.4, S. 83). Die Partikel dessen Größe im µm-Bereich liegt werden für gewöhnlich nicht über Pinocytose sondern über die Phagocytose aufgenommen.^{13,17} Mit vorliegenden Daten kann deshalb nicht geklärt werden, ob die zelluläre Aufnahme durch die Oberflächeneigenschaften der Partikel, wie z. B. das beinahe neutrale ζ-Potential von -4 mV, oder durch die temperaturbedingte Agglomeration der Partikel verhindert wird. Die weiterführenden Untersuchungen mit Lungenmakrophagen werden zur Zeit noch durchgeführt und sollen klären, ob die phagocytotische Aufnahme der Partikel generell stattfinden kann.

Es kann somit festgehalten werden, dass die zelluläre Aufnahme der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit den Oberflächeneigenschaften der Partikel korreliert. Allerdings sollten die detaillierteren Studien des Aufnahmemechanismus und der Verteilung der ladungsstabilisierten Partikel in Zellorganellen durchgeführt werden. Weiterhin sollten die Zellaufnahme in Anwesenheit der Serumproteine sowie der Einfluss der Proteinkorona auf die Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen genauer untersucht werden, um aus den *in vitro* Experimenten Rückschlüsse über die Nanopartikelaufnahme *in vivo* zu erhalten. Um die Nanopartikel später gezielt beispielsweise beim Transport von Wirkstoffen verwenden zu können, sollte auch die Biokompatibilität der Partikel mit Hilfe von verschiedenen Cytotoxizität- und Vitalität-Tests untersucht werden.

9 Zusammenfassung und Ausblick

9.1 Zusammenfassung

Multifunktionelle, biokompatible Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit Kern-Schale-Architektur wurden durch Polykondensation verschiedener Alkoxysilane in der wässrigen Emulsion dargestellt.

Der Partikelkern wurde während der Polykondensation mit Rhodamin B-Monomer markiert. Durch Änderung des Flottenverhältnisses konnte die Größe der Partikel variiert und die Partikel mit einem Radius von 6 nm bis 70 nm dargestellt werden. Auch die Partikelschale konnte während der Polykondensation durch die Verwendung der funktionellen Monomere mit Amino- und Carboxygruppen modifiziert werden. Diese Partikel zeigen ein pH-empfindliches Löslichkeitsverhalten und können durch Zusatz von MES (amino-funktionalisierte Partikel) bzw. Glycin (carboxy-funktionalisierte Partikel) auch unter neutralen pH-Bedingungen dispergiert werden.

Durch Aufpfropfen von Polymeren (PIPOX, PEG) wurden anschließend sterisch stabilisierte Partikel hergestellt. Hierbei konnte amino- bzw. carboxy-funktionalisiertes PEG direkt an die Partikeloberfläche in einer Amid-Kupplung angebunden werden. Alternativ wurden auch Maleinimidogruppen auf der Partikeloberfläche eingeführt, die Kupplung von Thiolen in einer Thiol-En-Reaktion ermöglichen. Diese maleinimido-funktionalisierten Partikel wurden mit heterobifunktionellen α -Thio- ω -carboxy-PEG umgesetzt, das die weitere Biofunktionalisierung der Partikeloberfläche zuließ. So wurden diese Partikel mit Biotin weiter modifiziert, wodurch anschließend auch die nicht-kovalente, selektive Oberflächenmodifizierung mit Streptavidin erreicht werden konnte.

Auch PIPOXylierte Partikel wurden in einer Thiol-En-Reaktion dargestellt. Diese Partikel sind thermoresponsiv in wässriger Lösung und haben einen Trübungspunkt bei 34 °C. Die Agglomeration der Partikel beginnt bereits bei 28 °C.

Als weitere Funktionalisierung wurden die positiv geladenen Partikel mit den quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche dargestellt. Dabei wurden zwei verschiedene Syntheseverfahren realisiert: die direkte Alkylierung der amino-funktionalisierten Partikel und die Umsetzung der carboxy-funktionalisierten Partikel mit

N,N-Diethylethylendiamin mit der anschließenden Alkylierung. Die Partikel aus beiden Syntheseverarianten lösen sich in reinem Wasser ohne Zusatz von weiteren Stabilisatoren, was der Erfolg der Funktionalisierung direkt zeigt. Weiterhin wurde die Synthese der dual-modifizierten Partikel realisiert, die PEG und quaternäre Ammoniumgruppen auf der Oberfläche enthalten. Hierbei wurden ebenfalls zwei verschiedene Syntheseverarianten verwirklicht: Die Quaternisierung der PEGylierten amino-funktionalisierten Partikel und die PEGylierung der carboxy-modifizierten Partikel mit der anschließenden Einführung sekundärer Aminogruppen und Quaternisierung.

Die Wechselwirkungen der verschiedenen Partikel mit Serumproteinen wurden unter physiologischen Bedingungen in dem serumfreien und serumhaltigen Zellkulturmedium mittels DLS und AF-FFF untersucht, wobei teilweise erhebliche Unterschiede zwischen den Partikeln festgestellt wurden.

Die amino-funktionalisierten Partikel sind kolloidal instabil im serumfreien Zellkulturmedium. Im serumhaltigen Medium werden sie durch Adsorption der Proteine stabilisiert und liegen als polydisperse Agglomerate aus mehreren Partikeln und Proteinen in Lösung vor. Die carboxy-modifizierten Partikel behalten dagegen im serumfreien Medium ihre kolloidale Stabilität und bilden lediglich eine Proteinkorona und keine polydispersen Agglomerate in Anwesenheit der Serumproteine.

Die sterisch stabilisierten Partikel weisen generell eine höhere kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen auf als die ladungsstabilisierten Partikel. Die PEGylierten Partikel, die ausgehend von den carboxy-funktionalisierten Partikel dargestellt wurden, adsorbieren nur sehr wenige Proteine. Auch nach der anschließenden Biotinylierung konnte keine Veränderung der Adsorption der Serumproteine festgestellt werden. Die PEGylierten Partikel, die durch die Modifizierung der amino-funktionalisierten Partikel dargestellt wurden, liegen im serumfreien Zellkulturmedium auch als Einzelpartikel vor. Im proteinhaltigen Medium entstehen Nanopartikel-Protein-Agglomerate, was wahrscheinlich durch die nach außen „sichtbare“ positive Ladung der Partikel verursacht wird. Die PIPOXYlierten Partikel liegen im serumhaltigen Zellkulturmedium hauptsächlich auch als Einzelpartikeln vor. Es kann allerdings eine Zunahme des hydrodynamischen Radius in Anwesenheit des Serums beobachtet werden, die auf Bildung einer Proteinkorona oder auf leichte Agglomeration der Partikel zurückgeführt werden kann. Diese Erhöhung der Proteinadsorption wird höchstwahrscheinlich durch die etwas höhere Hydrophobie des PIPOXs im Vergleich zu

PEG verursacht. Das Phasenseparationsverhalten der PIPOXYlierten Partikel wurde unter physiologischen Bedingungen untersucht. Im serumfreien und serumhaltigen Zellkulturmedium beginnt die Agglomeration bzw. die Phasenseparation bei 31 °C bei einer etwas höheren Temperatur als in Wasser. Im serumhaltigen Medium nimmt der Radius bei Temperaturen, die über 31 °C liegen, deutlich schneller zu als im serumfreien Medium, was höchstwahrscheinlich auf die Wechselwirkungen der nun hydrophoben Partikel mit Serumproteinen zurückgeführt werden kann. Nach Abkühlung der Partikel wird wieder eine Abnahme des hydrodynamischen Radius beobachtet, die sehr wahrscheinlich mit einer Desorption der Serumproteine einhergeht allerdings nur teilweise reversibel verläuft.

Die Quaternisierung der Partikeloberfläche gewährleistet nur bedingt die Stabilität der Partikel unter physiologischen Bedingungen. Die ursprünglich amino-funktionalisierten Partikel bleiben nach Quaternisierung weiterhin unlöslich im serumfreien Zellkulturmedium und liegen im serumhaltigen Zellkulturmedium als Nanopartikel-Protein-Agglomerate vor. Die ursprünglich carboxy-funktionalisierten Partikel lassen sich zwar nach der Quaternisierung im Zellkulturmedium dispergieren, bilden dennoch Agglomerate. Im serumhaltigen Medium entstehen Nanopartikel-Protein-Komplexe. Durch zusätzliche PEGylierung der amino-funktionalisierten, quaternisierten Partikel wird die kolloidale Stabilität unter physiologischen Bedingungen etwas verbessert. Die Partikel zeigen allerdings noch immer eine starke Neigung zur Agglomeration. Die ursprünglich carboxy-funktionalisierten, dual-modifizierten Partikel, sind hingegen kolloidal stabil sowohl im serumfreien als auch im serumhaltigen Zellkulturmedium und adsorbieren nur wenige Proteine.

Der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Wechselwirkung der Nanopartikel mit Zellen wurde anhand der Aufnahmestudien mit Zellkulturen der Lungenepithel- und Endothelzellen im serumfreien Zellkulturmedium untersucht. Die carboxy-funktionalisierten Partikel wurden von allen verwendeten Zellkulturen in Vesikeln aufgenommen. Die Einführung der positiv geladenen quaternären Ammoniumgruppen auf der Partikeloberfläche führt zu einer erhöhten Internalisierung der Partikel. Die PEGylierung und die PIPOXYlierung verhindern dagegen die Aufnahme. Die zelluläre Aufnahme korreliert somit mit der Oberflächenfunktionalisierung.

9.2 Ausblick

Durch die Vielfalt der in erzielten Funktionalisierungen des Poly(organosiloxan)-Systems ist ein breites Spektrum an unterschiedlichen Anwendungen dieser Partikel in der Biomedizin vorstellbar. Die positiv geladenen Nanopartikel könnten potentiell bei der Gentransfektion eingesetzt werden, um die Nucleinsäuren durch Bildung der Interpolyelektrolyt-Komplexe von einem Abbau durch die Nucleasen zu schützen. Auf Grund der hohen spezifischen Oberfläche der Poly(organosiloxan)-Nanopartikel wäre es denkbar, dass eine höhere Beladung mit den Nucleinsäuren im Vergleich zu linearen Polymeren erzielt werden kann. In diesem Zusammenhang sollte auch die Quantifizierung der funktionellen Gruppen sowie die Variation des Funktionalisierungsgrads und der Porengröße der Partikel durchgeführt werden.

Die Biotinylierung der Oberfläche ermöglicht weitere nicht-kovalente Oberflächenfunktionalisierung durch die Immobilisierung der biotinylierten Biomoleküle, beispielsweise Antikörper oder Enzyme, mit Streptavidin als Linker. In der Kombination mit der thermoresponsiven Oberflächenmodifizierung mit Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) könnten so auch die supramolekularen, auf den Poly(organosiloxan)-Nanopartikel basierten Bio-Nanomaterialien aufgebaut werden. Allerdings sollte das Phasenseparations- und evtl. das Kristallisationsverhalten der PIPOXYlierten Partikel näher untersucht werden sowie auch die Oberflächenmodifizierung mit anderen Poly(2-alkyl-2-oxazolin), die eine Variation der Phasenseparationstemperatur zulassen sollte.

Die Fluoreszenzmarkierung erlaubt bereits die Abbildung der Partikel mit Fluoreszenzmikroskopie. Dennoch ist auch die Verkapselung der magnetischen Nanopartikel in den Poly(organosiloxan)-Nanopartikel, die neben der magnetischen Detektion auch die magnetische Manipulation ermöglicht, von besonderem Interesse. Ladungsstabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel können während Polykondensation in die hydrophoben Poly(organosiloxan)-Nanopartikel verkapselt werden. Die Verkapselung und die hydrophile Oberflächenfunktionalisierung während Polykondensation konnten bis jetzt auf Grund der Instabilität der Eisenoxid-Partikel in Anwesenheit der funktionalisierten Monomere nicht realisiert werden. Dieses Problem könnte durch die Verwendung der sterisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel umgangen werden.

10 Materialien und Methoden

10.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die folgenden Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trimethoxymethylsilan (**T**), Diethoxydimethylsilan (**D**), Ethoxytrimethylsilan (**M**), *p*-Chlormethylphenyl-trimethoxysilan (**CIBz-T**), 3-(Triethoxysilyl)-propylbernsteinsäureanhydrid (**T-PSA**), *N*-(6-Aminoheptyl)-aminopropyltrimethoxysilan (**AHAPS**), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) stammen von ABCR, 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) von Roth, 2-Iodoethanol von Alpha Aesar. Alle weiteren Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Die Zellkulturmedium RPMI 1640 (Gibco), RPMI 1640 mit L Glutamin (verwendet für die zellulären Aufnahmestudien), Amin-PEG3-Biotin und Streptavidin stammen von Life Technologies und das fetale Kälberserum (FCS Gold) von PAA.

Für die Dialyse wurden Spectra/Por® 6 Dialyse Membrane MWCO 15 kDa aus regenerierter Cellulose verwendet. Die Ultrafiltration wurde mit Millipore® Ultrafiltrations-Membranscheiben aus der regenerierten Cellulose MWCO 30 kDa durchgeführt.

Wasser wurde mit einer Milli-Q Anlage (Sartorius, Deutschland) entionisiert. Die in den Synthesen verwendeten Lösungsmittel wurden in der p. a.-Qualität von Sigma-Aldrich, Roth oder Applichem bezogen. Für die Dialyse und die Ultrafiltration wurde zuerst technisches Lösungsmittel verwendet, der letzte Waschschrift wurde mit einem Lösungsmittel in p. a.-Qualität oder mit einem destillierten Lösungsmittel durchgeführt.

Für die zellulären Aufnahmestudien verwendeten Zelllinien NCI H441 (humane Lungen-Adenokarzinomzelllinie), A549 (humane Lungenkarzinomzelllinie) wurden käuflich erworben bei ATCC, (ATCC-HTB-174, CCL-185, Promochem, Wesel, Germany), die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie ISO-HAS-1 kommt von Universitätsmedizin Mainz.^{174,175}

Die Zellkernfärbung wurde mit Hoechst 33342 von Molecular Probes durchgeführt.

10.2 Synthese

10.2.1 Fluoreszenzmarkierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

10.2.1.1 Rhodamin B-(*p*-trimethoxysilyl)-benzylester (**RhoBz-T**)

In einem 250 mL Dreihalskolben wurden 4.01 g (1 equiv.) Cäsiumsalz des Rhodamin B, 5.46 g (3 equiv.) **CIBz-T**, 2.30 g Cäsiumiodid in THF vorgelegt und mit Stickstoff geflutet. Anschließend wurden 3.4 mL 18-Krone-6 mit Spritze zugegeben, bis kein sichtbarer Niederschlag zu erkennen war. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Tage bei 55 °C unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, drei mal schnell mit Wasser gewaschen, bis die wässrige Phase nahezu farblos blieb und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Als Produkt wurden 11.3 g violettes Öl erhalten. Das erhaltene **RhoBz-T** / **CIBz-T**-Gemisch wurde ohne weitere Aufarbeitung für die Polykondensation der Partikel verwendet.

10.2.1.2 Rhodamin B-markierte Partikel bei $S = 0.02$

In einem Dreihalskolben mit einem KPG-Rührer wurden 125 mL Milli-Q-Wasser und 5 g wässriger, 10 Gew.-% DBS-Lösung vorgelegt. 0.31g **Rho-Bz-T** wurden in 3.13 g **CIBz-T** in einem Ultraschallbad gelöst und mit Spritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 5.9 mL/h unter starkem Rühren zu Tensid-Lösung zugetropft. Direkt danach erfolgte die Zugabe einer Mischung aus 7.05g **T** und 5.02 g **D** mit 9.9 mL/h. Die pinkfarbene Dispersion wurde 5 d gerührt. Anschließend wurde die Monomermischung für die Schale (6.01 g **T**, 3.06 g **D**, 1.03 g **T-H**) innerhalb einer Stunde zur Reaktionslösung zugegeben. Die Dispersion wurde weitere drei Tage gerührt. Die festen Bestandteile wurden durch Filtration entfernt und die Partikeln mit **M** geendstoppt.

Hierfür wurden 12.87 g der wässrigen Partikeldispersion über Nacht mit 2.52 g **M** gerührt. Anschließend wurden weitere 1.26 g **M** zugegeben und das Gemisch weitere 5 h gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 150 mL Methanol gefällt, abzentrifugiert und in 50 mL Toluol gelöst. Die Methanol-Reste wurden am Rotationsverdampfer

entfernt. Die toluolische Partikellösung wurde mit 0.82 g **M** versetzt und erneut über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 30 mL Methanol versetzt und in einer Ultrafiltrationsanlage gewaschen, bis pinkfarbene Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde mittels Zentrifugation isoliert und erneut mit Methanol gewaschen. Normalerweise werden die Partikel in Toluol gelöst. In diesem Fall wurde der Ansatz halbiert. Die Hälfte des Produkts wurde in 20 mL Toluol und die andere Hälfte in 20 mL THF wieder aufgenommen. Es wurden 18.87 g der toluolischen Lösung ($c = 15.8 \text{ mg/mL}$) erhalten.

10.2.1.3 Rhodamin B-markierte Partikel bei $S = 0.3$

0.15 g **RhoBz-T** wurden in 1.64 g **CIBz-T** im Ultraschalbad gelöst und mit 3.01 g **T** und 2.10 g **D** vermischt. Die Monomermischung wurde mit 8.0 mL/h zu einer Lösung von 3.50 g Benzethoniumchlorid und 0.32 g wässriger 10 Gew.-% Natronlauge in 125 mL Wasser unter Rühren zugetropft. Die Dispersion wurde drei Tage lang mit KPG-Rührer gerührt. Anschließend wurden 3.05 g **T** und 1.08 g **D** mit 4.0 mL/h zum Reaktionsgemisch zugegeben. Die Dispersion wurde weitere zwei Tage gerührt. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert. Als Produkt wurde opaleszente, pinkfarbene Partikeldispersion erhalten.

Anschließend wurde ein Teil der Dispersion mit **M** geengstoppt. Hierbei wurden 25.25 g Partikeldispersion mit 5.08 g **M** versetzt und über Nacht gerührt. Folgend wurden weitere 2.53 g **M** zugegeben. Das zweiphasige Gemisch wurde weitere 5 h gerührt, anschließend in einen Dialysebeutel überführt und zwei Mal gegen jeweils 1 L Methanol dialysiert. Der pinkfarbene Niederschlag wurde abzentrifugiert, zwei Mal mit ca. 50 mL Methanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 25 mL Chloroform aufgenommen. Anschließend wurde das Rohprodukt mit 2.10 g **M** versetzt und über Nacht gerührt. Die Partikel wurden mit 100 mL Methanol gefällt und abzentrifugiert. Das Produkt wurde in 40 mL Chloroform wieder aufgenommen. Es wurden 62.7 g pinkfarbene Lösung ($c = 17.1 \text{ mg/mL}$) als Produkt erhalten.

10.2.1.4 Rhodamin B-markierte Partikel bei $S = 0.001$

4.99 g **D** wurden mit 8.0 mL/h zu 0.259 g 10 Gew.-% DBS-Lösung zugespritzt und über Nacht gerührt. 0.124 g **RhoBz-T** wurden in 3.16 g **CIBz-T** gelöst und mit 7.02 g **D** und 2.12 g **T** vermischt. Das Monomergemisch wurde mit 8.0 mL/h zu der aus **D** entstandenen PDMS-Dispersion zugegeben und zwei Tage gerührt. Anschließend wurde die Mischung für die zweite Schale (6.01 g **T**, 2.01 g **D**) mit 8.0 mL/h zugegeben und über Nacht gerührt. Die festen Bestandteile wurden durch Faltenfilter abfiltriert.

Zur weiteren Reinigung wurden 25.34 g der wässrigen Dispersion mit 8.01 g **M** versetzt und 2 d gerührt. Folgend wurden weitere 4.45 g **M** zugegeben und 5 h gerührt. Die Phasen wurden getrennt und organische Phase mit Methanol versetzt wobei pinkfarbener Feststoff ausfiel. Bei Zugabe von Methanol zu der wässrigen Phase fiel hingegen nur sehr wenig Niederschlag aus, der mit dem Niederschlag aus der organischen Phase vereint wurde. Die vereinigten Niederschläge wurden mit 40 mL Methanol gewaschen und abzentrifugiert. Das Produkt wurde in 40 mL Chloroform aufgenommen mit 4.6 g **M** versetzt und über Nacht gerührt. Um Überschuss an **M** zu entfernen wurde das Produkt auf ca. 2/3 des ursprünglichen Volumens eingeeengt und erneut in 20 mL Chloroform aufgenommen. Anschließend wurde die Produktlösung durch einen Faltenfilter filtriert. Es wurden 20 mL der pinkfarbenen Lösung ($c = 5.98 \text{ mg/mL}$) erhalten.

10.2.2 Oberflächenfunktionalisierung während der Polykondensation

10.2.2.1 Carboxy-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel **POS-COOH**

In einem Dreihalskolben wurden 5 g wässriger 10 Gew.-% DBS-Lösung und 125 g Wasser vorgelegt. 0.484 g **RhoBz-T** wurden in 4.19 g **CIBz-T** gelöst. Hierbei wurde zuerst das gesamte **RhoBz-T** in etwa 3 mL **CIBz-T** so weit wie möglich gelöst. Anschließend wurde der ungelöste Rest in übrig gebliebenem **CIBz-T** aufgenommen. Das Monomergemisch wurde mit 5.9 mL/h zu der Tensidlösung zugetropft. Anschließend

wurde eine Mischung aus 7.03 g **T** und 5.07 g **D** mit 9.9 mL/h mit einer Spritzenpumpe zum Reaktionsgemisch zugegeben und 5 d gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von Schale aus 2.01 g **T**, 5.08 g **T-PSA** und 3.04 g **D** mit 9.9 mL/h. Nach der weiteren Polykondensation für 3 d wurde das Reaktionsgemisch mit Faltenfilter filtriert. Es wurde pinkfarbene, opaleszente Dispersion als Produkt erhalten. Ein Teil der Dispersion wurde anschließend mit **M** nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 10.2.2.3 geendstoppt.

10.2.2.2 *Amino-funktionalisierte Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel POS-NH₂*

2.51 g Benzethoniumchlorid wurden in 125 g Wasser gelöst und mit 0.31 g der wässrigen Natronlaugelösung (10 Gew.-%) versetzt. 0.439 g **RhoBz-T** wurden in 4.39 g **CIBz-T** gelöst, dabei wurde zunächst das gesammte **RhoBz-T** in 3.15 g **CIBz-T** so weit wie möglich aufgenommen und anschließend der ungelöste Rest in weiteren 1.24 g **CIBz-T** gelöst. Das Gemisch wurde mit 5.9 mL/h zu der Tensidlösung zugegeben. Direkt hinterher wurde eine Mischung aus 7.05 g **T** und 5.01 g **D** zu der Reaktionslösung mit 9.9 mL/h zugetropft. Die Kerndispersion wurde 5 d lang gerührt. Anschließend wurde die Mischung für die Schale, die aus 7.05 g **AHAPS** und 3.03 g **D** bestand, mit 9.9 mL/h zugetropft. Die Polykondensation wurde weitere zwei Tage gerührt. Folgend wurde von den festen Bestandteilen abfiltriert. Ein Teil der Dispersion wurde mit **M** nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 10.2.2.3 geendstoppt.

10.2.2.3 *Allgemeine Arbeitsvorschrift: Endstoppen der hydrophilen Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel mit Ethoxytrimethylsilan (M)*

25 g der wässrigen Partikeldispersion wurden mit 5 g **M** versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurden weitere 2.5 g **M** zu dem zweiphasigen Gemisch dazu gegeben und das Gemisch für weitere 5 h gerührt. Anschließend wurden die Partikel durch die Zugabe von ca. 80 mL einer Mischung aus Methanol / wässriger gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser (ca. 8:1:1 v:v) gefällt. Der Feststoff wurde abzentrifugiert und in so wenig Methanol, wie möglich (ca. 30-40 mL), wieder gelöst. Die pinkfarbene methanolische Lösung wurde mit Wasser versetzt bis erneut

pinkfarbener Niederschlag ausfiel. Dieser wurde erneut abzentrifugiert und der Waschschrift noch ein weiteres Mal wiederholt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Niederschlag in 40 mL Methanol gelöst und über Nacht gegen 1 L Methanol dialysiert. Hinterher wurden 1.25 g **M** zu der methanolischen Partikellösung zugegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt ultrafiltriert und mehrfach mit Methanol gewaschen oder gegen Methanol dialysiert bis das Ultrafiltrat bzw. das Dialysat farblos waren. Die Partikel wurden nach Reinigung in der methanolischen Lösung aufbewahrt. Die Konzentration wurde gravimetrisch bestimmt. Typischerweise wurden ca. 1-2 g Partikel erhalten.

Wenn notwendig, wurden Partikel mittels Dialyse in ein anderes Lösungsmittel bzw. in die wässrige Glycin-Lösung überführt.

10.2.3 Sterisch stabilisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

10.2.3.1 *α -Allyl- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid)*

An einer ausgeheizten Schlenk-Linie wurden ca. 300 mL THF (getrocknet über K/Na-Schmelze) in einer cryogenen Destillation in den Reaktorkolben überführt. Ethylenoxid wurde in einen Kolben mit Calciumchlorid einkondensiert, 1 h getrocknet, in ein Schlenk-Rohr mit trockenem *n*-BuLi überführt und erneut 1 h getrocknet. 0.67 mL (0.56 g, 0.01 mol, 1 equiv.) Allylalkohol (zuvor getrocknet über Calciumhydrid, destilliert und freeze-entgast) und 3 mL der Phosphazenenbase P_4 -*t*-Bu (1 N in Hexan; 0.03 mol, 3 equiv.) wurden mit einer Spritze in den Reaktorkolben gegeben und auf -40 °C abgekühlt. 28 mL (25 g, 0.57 mol, 57 equiv.) des Ethylenoxids wurden in den Reaktorkolben überkondensiert. Das gelbliche Gemisch wurde für 30 min bei -40 °C gerührt. Anschließend wurde Reaktionslösung auf 40 °C erwärmt und drei Tage lang polymerisiert. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Methanol abgebrochen. Die Lösung wurde eingeeengt und in Chloroform wieder aufgenommen. Die Phosphazenenbase wurde durch Rühren über Ionentauscher (Dowex[®] 50WX4-100) entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser gefriergetrocknet. Es wurden 21.5 g (84% der Theorie) α -Allyl- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid) als farbloser Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: $M_n = 2370$ g/mol, $M_w = 2391$ g/mol, PDI = 1.01

10.2.3.2 α -Amino- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid) (**PEG-NH₂**)

1.0 g (0.4 mmol) α -Allyl- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid) wurden in 10 mL DMF gelöst. Um die Lösung zu entgasen wurde 15-20 min N₂ durch die Lösung geleitet. 1.20 g Cysteaminhydrochlorid (10.5 mmol, 26 equiv.) wurden zu PEO in Stickstoff-Gegenstrom zugegeben. Anschließend wurden 0.088 mg (0.5 mmol, 1.25 equiv.) AIBN in 2 mL DMF gelöst und mit einer Spritze zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 28 h bei 85 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingeeengt und in Isopropanol wieder aufgenommen. PEO wurde durch langsame Zugabe von Petrolether ausgefällt, über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen, um die Kristallisation zu vervollständigen, und abgesaugt. Das Rohprodukt wurde in 25 mL 1 N KOH aufgenommen und fünf Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das gelbe Öl wurde in so wenig Methanol wie möglich aufgenommen. Durch langsame Zugabe von Petrolether wurde das Produkt ausgefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Es wurden 0.46 g (46% der Theorie) des Produkts als farbloser Feststoff erhalten.

MALDI-TOF-MS: $M_n = 2331$ g/mol, $M_w = 2368$ g/mol, PDI = 1.02

10.2.3.3 PyBOP-vermittelte Kupplung von **PEG-NH₂** an **POS-COOH**

15 mg Partikel **POS-COOH** in 1.75 mL THF wurden mit 4 mL DMF vermischt und mit 0.26 g (0.5 mmol) PyBOP und 20 μ L DIEA versetzt und unter Stickstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 5 mL Wasser versetzt. Der ausgefallene, farblose Feststoff wurde durch Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde ein Mal gegen Methanol und dann mehrmals gegen Wasser dialysiert. Es wurden 19 g der pinkfarbenen wässrigen Lösung mit $c = 0.9$ mg/mL erhalten.

10.2.3.4 NHS-Aktivierung der Partikel **POS-COOH** zu **POS-COONHS**

124 mg der Partikel **POS-COOH** in 4 mL THF wurden mit 0.56 g (4.9 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und 1.01 g (4.9 mmol) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)

versetzt und über Nacht unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Das farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit reichlich THF gewaschen, bis es nicht mehr pink gefärbt war. Das Filtrat wurde gegen THF dialysiert. Es wurden 13.3 g der pinkfarbenen Lösung erhalten, die bis zur weiteren Umsetzung im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

*10.2.3.5 Umsetzung der NHS-aktivierten Partikel **POS-COONHS** mit α -Amino- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid) (**PEG-NH₂**) zu **PEG@POS-COOH2***

15 mg der NHS-aktivierten Partikel **POS-COONHS** wurden mit 100 mg **PEG-NH₂** und 10 μ L DIEA versetzt und über Nacht unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser dem Reaktionsgemisch zugefügt, wobei die Lösung klar blieb. Das wasserlösliche Produkt wurde mittels Dialyse gegen Wasser gereinigt (ca. 8-10 mal gegen 1 L) und durch Faltenfilter filtriert. Es wurden 13.9 g der wässrigen Partikellösung mit $c = 2.1$ mg/mL erhalten (Ansatz **PEG@POS-COOH2b**, Ausbeuten aus weiteren Ansätzen liegen in einer vergleichbaren Größenordnung)

*10.2.3.6 Maleinimido-funktionalisierte Partikel **POS-COMal***

120 mg der Partikel **POS-COOH** wurden in 3.86 mL THF vorgelegt. 0.30 g (1.17 mmol, 1 equiv.) *N*-(2-Aminoethyl)-maleinimid und 212 μ L (0.16 g, 1.2 mmol, 1.03 equiv.) DIEA wurden zu den Partikeln zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre versetzt. Anschließend folgte die Zugabe von 0.405 g (1.56 mmol, 1.3 equiv.) PyBOP in 4 mL DMF. Das Reaktionsgemisch wurde 2 d gerührt. Zur Reinigung wurden die Partikel gegen DMF dialysiert. Es wurden 21.9 g der pinkfarbenen Lösung mit $c = 5.7$ mg/mL als Produkt erhalten.

*10.2.3.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift: Umsetzung der maleinimido-funktionalisierten Partikel **POS-COMal** mit α -Thio- ω -carboxy-Poly(ethylenoxid) (**HS-PEG-COOH**) zu **PEG@POS-COOH3***

150 mg (0.075 mmol) **HS-PEG-COOH** wurden in einem Kolben vorgelegt und mit 15 mg der maleinimido-funktionalisierten Partikel **POS-COMal** in 2.6 mL DMF versetzt. Anschließend wurde Stickstoff für 15 min durch die Lösung geleitet, um die Lösung zu entgasen. Nach der Zugabe von 20 μ L DIEA in 1 mL DMF durch das Septum wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Folgend wurden 5 mL Wasser zum Reaktionsgemisch gegeben, wobei die Lösung klar blieb und kein Niederschlag ausfiel, was den Erfolg der Umsetzung zeigte. Die Partikel wurden durch mehrfache Dialyse gegen Wasser gereinigt (8-10 Mal gegen 1 L H₂O). Die klare Lösung wurde durch Faltenfilter filtriert, um mögliche Verunreinigungen abzutrennen. Es wurden 46 g der pinkfarbenen Lösung mit $c = 1.1$ mg/mL als Produkt erhalten (Ansatz **PEG@POS-COOH3b**; Ausbeuten aus anderen Ansätzen liegen in vergleichbarer Größenordnung).

Wenn für weitere Umsetzung notwendig, wurden die Partikel anstelle des Wassers gegen ein anderes Lösungsmittel dialysiert.

*10.2.3.8 Umsetzung der maleinimido-funktionalisierten Partikel **POS-COMal** mit ω -Thio-Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (**PIPOX-SH**) zu **PIPOX@POS-COOH***

150 mg **PIPOX-SH** (0.02 mmol) wurden in 0.5 mL DMF vorgelegt. Nach der Zugabe von 7.5 mg der Partikel **POS-COMal** zu PIPOX wurde die Lösung mit Stickstoff entgast. Folgend wurden 20 μ L DIEA in DMF zu der Reaktionslösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt. Zur Reinigung wurde die Reaktionslösung zwei Mal gegen 1 L THF und nach dem anschließenden Membranwechsel mehrmals gegen Wasser dialysiert. Nach Beendigung der Dialyse wurde die Lösung durch Faltenfilter filtriert, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Es wurden 10.4 g der pinkfarbenen Lösung mit $c = 2.5$ mg/mL erhalten.

10.2.3.9 *ω -Carboxy-Poly(ethylenoxid) (PEG-COOH)*

4 g (2 mmol, 1 equiv.) α -Methoxy- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid) wurden in einer Mischung aus 10 mL Acetonitril und 10 mL Wasser gelöst. 1.98 g (6.15 mmol, 3.1 equiv.) (Diacetoxyiodo)benzol und 60 mg (0.4 mmol, 0.2 equiv.) TEMPO wurden zu der Polymerlösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Öl in 80 mL THF wieder aufgenommen. Anschließend wurde langsam etwas Cyclohexan zu Polymerlösung gegeben, bis sich Schlieren bildeten. Das Produkt wurde über Nacht bei 4-5 °C ausgefällt, abgesaugt, mit Cyclohexan gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Es wurden 3.2 g des Produkts als farblose Kristalle erhalten.

MALDI-TOF-MS: $M_n = 1999$ g/mol, $M_w = 1975$ g/mol, PDI = 1.01

10.2.3.10 *Umsetzung der amino-funktionalisierten Partikel POS-NH₂ mit ω -Carboxy-Poly(ethylenoxid) (PEG-COOH) zu PEG@POS-NH₂*

0.4 g (0.2 mmol, 1 equiv.) PEG-COOH wurden mit 60 mg der amino-funktionalisierten Partikel POS-NH₂ in 3.7 mL Methanol versetzt. Anschließend wurden 0.77 g (4 mmol, 20 equiv.) EDC zum Reaktionsgemisch gegeben gefolgt von 40 μ L TEA in 2 mL Methanol. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch aufgeteilt. 1/3 der Reaktionslösung wurde mehrmals gegen Wasser dialysiert. Es wurden 22.4 g der pinkfarbenen Lösung mit $c = 1.7$ mg/mL erhalten.

Weitere 2/3 der Reaktionslösung wurden mittels Dialyse gegen Methanol gereinigt. Es wurden 8.7 g der methanolischen Partikellösung erhalten, die später in einer Quaternisierungsreaktion umgesetzt wurden (Vgl. 10.2.4.6).

10.2.3.11 *Biotinylierung der PEGylierten Partikel PEG@POS-COOH3b*

15 mg der Partikel PEG@POS-COOH3b in 13.9 mL Wasser wurden mit 1.54 mL des wässrigen 1 M MES-Puffers versetzt. 14 mg (0.03 mmol, 1 equiv.) Amin-PEG3-Biotin wurden in 450 μ L 0.1 M MES-Puffer gelöst und zu der Partikellösung

gegeben. Folgend wurden 0.477 g (2.5 mmol, 83 equiv.) EDC als Feststoff zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach Rühren über Nacht wurden Partikel durch mehrmalige Dialyse gegen Wasser gereinigt. Es wurden 17.2 g der wässrigen Partikellösung erhalten ($c_{\max} = 0.9 \text{ mg/mL}$).

10.2.4 Poly(organosiloxan)-Nanopartikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche

10.2.4.1 Alkylierung der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel **POS-NH₂** mit Ethyliodid

50 mg der amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** in 3.1 mL Methanol wurden mit 48.3 μL (94.3 mg, 0.6 mmol) Ethyliodid versetzt und unter Stickstoffatmosphäre 4 d lang gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Partikel wurden durch mehrfache Dialyse gegen Wasser gereinigt. Es wurden 9.7 g der wässrigen Partikellösung mit $c = 5.0 \text{ mg/mL}$ als Produkt erhalten.

10.2.4.2 Alkylierung der amino-funktionalisierten Poly(organosiloxan)-Nanopartikel **POS-NH₂** mit 2-Iodoethanol

Es wurde analog zu 10.2.4.1 verfahren. Für die Alkylierung wurden 47.2 μL (104 mg, 0.6 mmol) 2-Iodoethanol verwendet. Nach Dialyse gegen Wasser wurden 8.3 g der Partikellösung mit $c = 7.1 \text{ mg/mL}$ erhalten.

10.2.4.3 Umsetzung der carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** mit *N,N*-Diethylethylendiamin

120 mg der carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** wurden in 2.8 mL THF vorgelegt, mit 5 mL DMF verdünnt und mit 30 μL DIEA versetzt. Anschließend wurde der Kolben mit Stickstoff geflutet und mit Septum verschlossen. Es wurden 520 mg (0.38 mmol) PyBOP in 3 mL DMF und direkt hinterher 54 μL (44 mg, 0.38 mmol)

N,N-Diethylethyldiamin in 8 mL DMF mit einer Spritze zur Reaktionslösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d lang gerührt und durch Dialyse gegen Methanol gereinigt. Es wurden 16.9 g der pinkfarbenen Partikellösung als Produkt erhalten, die direkt mit einem Alkylierungsmittel weiter umgesetzt wurden.

*10.2.4.4 Alkylierung der *N,N*-Diethylethyldiamino-funktionalisierten Partikel mit Ethyliodid (**POS-COOHQ1**)*

2.8 mL der methanolischen Partikellösung (entspricht etwa 20 mg Partikel) wurden mit 7.04 μ L (13.7 mg, 0.09 mmol) Ethyliodid in 0.5 mL Methanol versetzt und eine Woche unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 5 mL Wasser verdünnt, mehrmals gegen Wasser dialysiert und durch einen Faltenfilter filtriert. Als Produkt wurden 10.6 g der pinkfarbenen, wässrigen Partikellösung mit $c = 1.8$ mg/mL erhalten.

*10.2.4.5 Alkylierung der *N,N*-Diethylethyldiamino-funktionalisierten Partikel mit 2-Iodoethanol (**POS-COOHQ2**)*

Es wurde analog zu 10.2.4.5 verfahren. Für die Alkylierung wurden 6.87 μ L (15.3 mg, 0.09 mmol) 2-Iodoethanol verwendet. Nach Dialyse gegen Wasser wurden 7.9 g der wässrigen Partikellösung mit $c = 2.6$ mg/mL erhalten.

*10.2.4.6 Dual-funktionalisierte Partikel **PEG@POS-NH₂Q1&2** durch Alkylierung von **PEG@POS-NH₂***

Die Hälfte der methanolischen Partikellösung aus 10.2.3.10 (S. 142) wurde mit 19.3 μ L (37.7 mg, 0.24 mmol) Ethyliodid bzw. mit 18.9 μ L (41.6 mg, 0.24 mmol) 2-Iodoethanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre eine Woche lang gerührt. Anschließend wurden die Partikel mehrmals gegen Wasser dialysiert. Nach Umsetzung mit Ethyliodid wurden 16.9 g der pinkfarbenen Lösung

PEG@POS-NH₂Q1 mit $c = 1.5$ mg/mL erhalten. Umsetzung mit 2-Iodoethanol lieferte 17.8 g der Partikellösung **PEG@POS-NH₂Q2** mit $c = 1.6$ mg/mL.

*10.2.4.7 PEGylierung der carboxy-modifizierten Partikel **POS-COOH** mit der anschließenden Umsetzung mit *N,N*-Diethylethylendiamin*

In einem Kolben wurden 9.7 mg (0.005 mmol, 1 equiv.) **PEG-NH₂** vorgelegt. 100 mg der carboxy-funktionalisierten Partikel **POS-COOH** in 3.2 mL THF wurden in den Kolben gegeben und die Apparatur mit Stickstoff geflutet. Anschließend wurden 7.8 mg (0.015 mmol, 3 equiv.) PyBOP in 1.4 mL DMF und 10 μ L DIEA in 1 mL DMF zu der Reaktionslösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und gegen THF dialysiert. Es wurden 5.3 g der Partikellösung in THF als Zwischenprodukt erhalten. 4.5 g der Partikellösung in THF wurden in einen Kolben gegeben, mit 3 mL DMF verdünnt, mit 20 μ L DIEA in 2 mL DMF versetzt und mit Stickstoff geflutet. Anschließend wurden 147 mg (0.28 mmol, 1.1 equiv.) PyBOP in 2 mL DMF und gleichzeitig 36.6 μ L (30.2 mg, 0.26 mmol, 1 equiv.) *N,N*-Diethylethylendiamin in 8 mL DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 d gerührt. Die Reinigung erfolgte mittels Dialyse gegen Methanol. Es wurden 16.4 g der methanolischen Partikellösung erhalten.

*10.2.4.8 Dual-funktionalisierte Partikel **PEG@POS-COOHQ1&2** durch Alkylierung der PEGylierten, *N,N*-Diethylethylendiaminofunktionalisierten Partikel*

5.1 mL der methanolischen Partikellösung aus 10.2.4.7 wurden in einem Kolben vorgelegt und mit Stickstoff geflutet. Es wurden 7.04 μ L (13.7 mg, 0.09 mmol) Ethyliodid oder 6.87 μ L (15.1 mg, 0.09 mmol) 2-Iodoethanol in 0.5 mL Methanol mit einer Spritze zu der Partikellösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 d lang unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurden 4 mL Wasser zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Partikel wurden mehrmals gegen Wasser dialysiert. Die Umsetzung mit Ethyliodid lieferte 13.9 g der wässrigen, pinkfarbenen Partikellösung

PEG@POS-COOHQ1 mit $c = 1.5 \text{ mg/mL}$. Nach Umsetzung mit 2-Iodoethanol wurden 14.4 g der Partikel **PEG@POS-COOHQ2** mit $c = 1.4 \text{ mg/mL}$ als Produkt erhalten.

10.2.5 Zellulären Aufnahmestudien

Für die Untersuchung der zellulären Nanopartikelaufnahme wurden die Zellkulturen NCI H441, A549 und ISO-HAS-1 verwendet. Die Zellen wurden auf Ibidi-8-well-Objekträger ausgesät und für 48 h bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10 Gew-% FCS und Pen/Strep (100 U/100 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Das Wachstum der Zellkulturen wurde mit einem Lichtmikroskop verfolgt. Anschließend wurden die Zellen 1 Mal mit RPMI-Medium gewaschen, um die Serumproteine zu entfernen und hinterher mit 270 μL Medium bedeckt. Es folgte die Zugabe von 30 μl Nanopartikel-Lösung ($c = 0.7 \text{ mg/mL}$) und erneute Inkubation für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einer Methanol / Ethanol 2:1-Mischung fixiert (20 min, Raumtemperatur). Nach 3-maligem Waschen in PBS erfolgte die Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 für 5 Minuten.

Nach der Färbung wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Applied Precision, Delta Vision) visualisiert.

10.3 Geräte und Probenpräparation

10.3.1 Lichtstreuung

Die Lichtstremessungen wurden mit einer Anlage der Firma ALV durchgeführt. Diese besteht aus einem He-Ne-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) und einem CGS-3 Kompaktgoniometersystem, der mit einem LSE-5004 Digitalkorrelator verbunden ist. Die Messungen erfolgten zwischen 26° und 150° in 4° - oder 8° -Schritten. Die Temperatur betrug 296 K. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software HDRC (bereitgestellt von Prof. Dr. Manfred Schmidt, Institut für physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt, die auf dem Simplex-Algorithmus basiert. Falls nicht

anderes angegeben, wurde die biexponentielle Fitfunktion zur Bestimmung der Radien verwendet. Die μ_2 -Werte wurden mit dem Kumulanten-Fit bei 90° bestimmt.

Die Proben wurden mit einem MilexTM-LCR-Filter (Porengröße 450 nm) in eine mit Aceton staubfrei-gespülte Küvette filtriert. Für die Filtration der amino-funktionalisierten Partikel **POS-NH₂** in wässriger Lösung wurden MilexTM-HV-Filter verwendet. Bei Verdünnung der Partikel mit dem serumfreien bzw. serumhaltigen Zellkulturmedium wurde stets das Medium vorgelegt, die Partikel zum Medium gegeben und anschließend filtriert.

10.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem EM 420-Gerät von Phillips mit einer LaB6-Kathode und einer Slow-scan 1K CCD-Kamera bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV angefertigt. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Auftropfen und Eindampfen der Probe ($c \approx 1\text{-}5 \text{ mg/mL}$) auf kohlebeschichtete Kupfernetze.

Die Cyo-TEM-Aufnahmen wurden mit LIBRA 120 von der Firma Zeiss erstellt.

10.3.3 Asymmetrische Fluss-Feld Fluss Fraktionierung (AF-FFF)

Die AF-FFF-Messungen wurden in einer Anlage der Firma CONSENXUS GmbH mit PMMA-Platte durchgeführt. Diese besteht aus einer constaMETRIC® 3200 Flusspumpe (Thermos Separations), einer Knauer WellChrom Micro-Star K-100 Injektionspumpe, dem Kanal mit 190 μm Spacer, einem Liqui-Flow® von Bronkhorst Hi-Tec, einer Ventilbox, einem Controller von Consensus und einem ERC3114 Degasser. Die Detektion erfolgte mit einem Waters 486-Absorptionsdetektor bei einer Wellenlänge $\lambda = 560 \text{ nm}$ oder Merck F1100- Fluoreszenzdetektor. Hierbei wurden die Rhodamin B-markierten Proben bei einer Wellenlänge $\lambda = 540$ angeregt. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 580 \text{ nm}$. Es wurde eine Membran aus Polyethersulfon (MWCO 10 kDa) verwendet. Der Querflussgradient betrug $2.5 - 0 \text{ mL/min}$ (abfallend über 1250 s) und der

Kanalfluss 1 mL/min. Als Eluent wurde, falls im Text nicht anderes vermerkt Milli-Q-Wasser verwendet.

10.3.4 ζ -Potential-Messungen

Die ζ -Potential Messungen wurden mit einem Zetasizer Nano der Firma Malvern Instruments bei 295 K in einer Dip-Zelle durchgeführt. Falls im Text nicht anders vermerkt, erfolgte die Messung in 5 mM Natriumchloridlösung bei einer Probenkonzentration zwischen 0.1-1 mg/mL.

10.3.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Messungen wurden an einem Spektrometer Cary 300 scan in Quarzküvetten mit der Kennzeichnung QS der Firma Helma durchgeführt. Als Software wurde Win UV Scan Application 9.0 verwendet.

10.3.6 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spektrometer Spex FL3-22 der Firma Jobin Yvon Instruments S.A durchgeführt.

Die Bestimmung der absoluten Quantenausbeuten wurde mit einer selbstgebauten Anlage in der Arbeitsgruppe von Dr. Ute Resch-Genger (BAM, Fachbereich 1.10) durchgeführt. Diese Anlage besteht aus einer Xenon-Lampe, einem Monochromator, einer 6 inch Spectralet-beschichteten Ulbricht-Kugel (Labsphere GmbH) und einem Abbildungs-Spektrographen (Shamrock 303i, Andor Inc.) mit einem Peltier-gekühlten, CCD-Detektor.

Die Konzentration der Proben wurde stets so eingestellt, dass die Absorption weniger unterhalb von 0.1 a u. lag.

10.3.7 Thermogravimetrische Analyse

Die TGA-Messungen wurden mit einer TG/DTA 220-Anlage von Seiko mit einem Platin-Tiegel als Referenz durchgeführt. Zwischen Raumtemperatur und 600 °C wurden die Proben unter Stickstoff mit einer Heizrate 10 °C/min erhitzt. Anschließend wurde die Messung unter synthetischer Luft mit einer Heizrate 20 °C/min zwischen 600 °C und 800 °C fortgesetzt.

10.3.8 MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF-MS-Messungen wurden mit dem Massenspektrometer Autoflex III Smartbeam von Bruker durchgeführt. Für die Messung wurde Software Flex Control Version 3.0 und für die Auswertung Flex Analysis Version 3.0 verwendet.

10.3.9 IR Spektroskopie

Die Transmissionsmessungen wurden mit einem Nicolet 6700-Spektrometer von Thermo aufgenommen. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software Omnic 7.3 von Thermo durchgeführt.

10.3.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit Applied Precision Mikroskop von Delta Vision erstellt.

11 Abkürzungen und Symbole

11.1 Abkürzungen

AF-FFF	Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung
AFM	Atomic Force Microscopy
AHAPS	<i>N</i> -(6-Aminohexyl)- aminopropyltrimethoxysilan
AKF	Autokorrelationsfunktion
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzt-Cl	Benzethoniumchlorid
CIBz-T	<i>p</i> -Chlormethylphenyl-trimethoxysilan
D	Diethoxydimethylsilan
DBS	Dodecylbenzolsulfonsäure
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
IEP	Isoelektroscher Punkt
M	Ethoxytrimethylsilan
M-H	Tetramethyldisiloxan
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Massenspectrometry
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEO	Poly(ethyleoxid)

PDMS	Poly(dimethyldisiloxan)
PNIPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)
PIPOX	Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)
POS	Poly(organosiloxan)
PyBOP	1-Benzotriazoloxypyrrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RhoBz-T	Rodamin B-(<i>p</i> -trimethoxysilyl)-benzylester
T	Trimethoxymethylsilan
T-H	Triethoxysilan
T-PSA	3-(Triethoxysilyl)-propylbernsteinsäureanhydrid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
THF	Tetrahydrofuran
UV	ultraviolett
Vis	visible (<i>engl.</i>) sichtbar

11.2 Symbole

A	Hamakerkonstante
a	Radius
c	Konzentration
D_{app}	apparenter Diffusionskoeffizient
e	Elementarladung
G	Enthalpie
G_{mix}	Mischungsterm der Enthalpie
G_{el}	elastischer Term der Enthalpie
$g_1(\tau)$	Autokorrelationsfunktion der Streuamplitude
$g_2(\tau)$	Autokorrelationsfunktion der Streuintensität
H	Abstand zwischen zwei Teilchen
$I(t)$	Streuintensität
l	Segmentlänge einer Polymerkette

M	Molmasse
n	Stoffmenge
n	Anzahl der Segmente einer Polymerkette
q	Streuvektor
$P(q)$	Formfaktor
$\langle R_g^2 \rangle_z$	Trägheitsradiusquadrat
$\langle R_h \rangle_{z^{-1}}$	z-Mittelwert des hydrodynamischen Radius
S	Flottenverhältnis
T	Temperatur
t	Zeit
V_A	Van-der-Waals Kraft
V_B	Born-Abstoßung
δ	Konturlänge der Polymeren Hülle
θ	Streuwinkel
ζ	Zeta-Potential
η	Viskosität
κ	Debye-Hückel-Parameter
λ	Wellenlänge
μ_2	normalisierter zweiter Kumulant der Autokorrelationsfunktion
τ	Korrelationszeit
τ_D	Relaxationszeit
Ψ	Oberflächenpotential
Ψ^d	Potential der diffusen Schicht

12 Anhang

12.1 Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI 1640

Tabelle 12.1: Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI 1640 (Angaben des Herstellers Gibco, Werte z. T. gerundet).¹⁷⁶

Komponenten	Mol.gew. /g/mol	Konzentration	
		/mg/L	/mmol/L
Aminosäuren Σ		994,0	6,6202
Glycin	75	10	0,133
L-Arginin	174	200	1,15
L-Asparagin	132	50	0,379
L-Asparaginsäure	133	20	0,15
L-Cystin	313	65	0,208
L-Glutaminsäure	147	20	0,136
L-Glutamin	146	300	2,05
L-Histidin	155	15	0,0968
L-Hydroxyprolin	131	20	0,153
L-Isoleucin	131	50	0,382
L-Leucin	131	50	0,382
L-Lysinhydrochlorid	146	40	0,274
L-Methionin	149	15	0,101
L-Phenylalanin	165	15	0,0909
L-Prolin	115	20	0,174
L-Serin	105	30	0,286
L-Threonin	119	20	0,168

L-Tryptophan	204	5	0,0245
L-Tyrosine (Dinatriumsalz)	261	29	0,111
L-Valin	117	20	0,171
Vitamine Σ		43,66	0,2429
Biotin	244	0,2	0,00082
Cholinchlorid	140	3	0,0214
D-Calciumpanthothenat	477	0,25	0,000524
Folsäure	441	1	0,00227
Nicotinamid	122	1	0,0082
p-Aminobenzoessäure	137	1	0,0073
Pyridoxinhydrochlorid	206	1	0,00485
Riboflavin	376	0,2	0,000532
Thiaminhydrochlorid	337	1	0,00297
Vitamin B12	1355	0,005	0,0000037
i-Inositol	180	35	0,194
Anorganische Salze Σ		9349	139,05
Calciumnitrat (Tetrahydrat)	236	100	0,424
Magnesiumsulfat	120	48,84	0,407
Kaliumchlorid	75	400	5,33
Natriumhydrogencarbonat	84	2000	23,81
Natriumchlorid	58	6000	103,45
Natriumhydrogenphosphat	142	800	5,63
Weitere Komponenten			
D-Glucose (Dextrose)	180	2000	11,11
Glutathion (reduziert)	307	1	0,00326

12.2 Zusätzliche Daten

12.2.1 Kapitel 5: Elektrostatisch stabilisierte Partikel durch Verwendung der funktionellen Silan-Monomere

12.2.1.1 Carboxy-funktionalisierte Poly(organosiloxan)-Nanopartikel

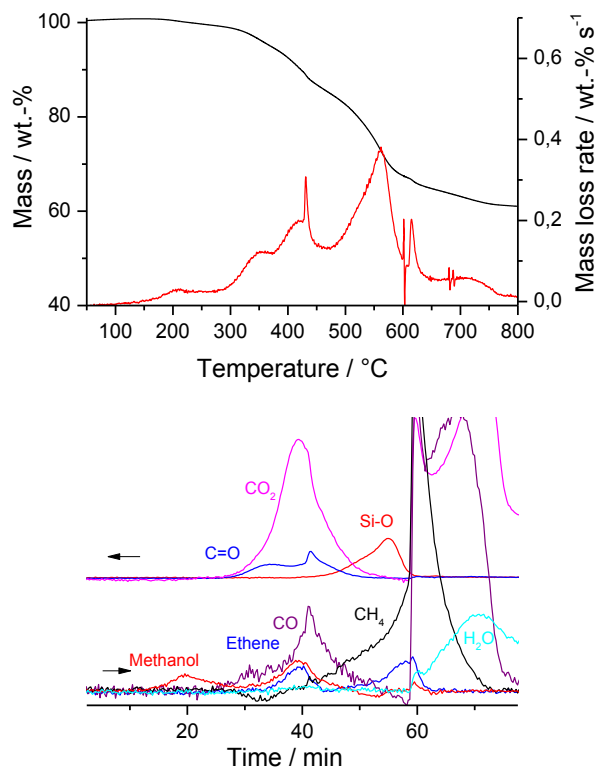


Abbildung 12.1: Oben: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der carboxy-funktionalisierten Partikel POS-COOH₃. Unten: TG-FTIR-Spektrum.

$T < 460^{\circ}\text{C}$ Abbau der Kohlenwasserstoffe: Methanol, Carbonyl-Derivate, CO₂, CO (~15.3 Gew.-%)

$460^{\circ}\text{C} < T < 600^{\circ}\text{C}$: Abbau der Kohlenwasserstoffe und teilweise Abbau des Siloxan-Netzwerks

$T > 600^{\circ}\text{C}$: Thermooxidative Zersetzung

12.2.1.2 Amino-funktionalisierte Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel

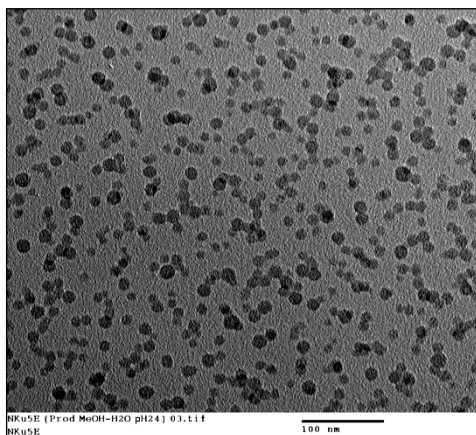


Abbildung 12.2: TEM-Aufnahme amino-funktionalisierter Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel POS-NH₂ getrocknet aus Methanol-Wasser-Gemisch (pH = 2.4) nach Endstoppen. Maßstabsbalken entspricht 100 nm

12.2.2 Kapitel 6: Sterisch stabilisierte Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel

12.2.2.1 Bestimmung der absoluten Quantenausbeuten nach einer Hydrosilylierungsreaktion

Tabelle 12.2: Quantenausbeuten der Rhodamin B-markierten Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel vor und nach der PEG-Funktionalisierung in einer Hydrosilylierungsreaktion.

Probe (Lösungsmittel)	Quantenausbeute
Rhodamin B-markiertes Monomer (in Dichlormethan)	53%
Monomer-markierte Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel nach Endstoppen (in Toluol)	46%
Monomer-markierte Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel nach Kupplung von PEG (in Wasser)	10%
Nachträglich (nach der PEG-Kupplung) markierte Poly(organo-siloxan)-Nanopartikel (in Wasser)	7%

Tabelle 12.3: Konzentrationen der sterisch-stabilisierten Partikel während der Charakterisierung. Ergänzung zu Tabelle 6.3.

Syntheseweg (Probenbezeichnung)	TEM c / mg/mL	DLS c / mg/mL	ζ-Potential c / mg/mL
Edukt-Partikel (POS-COOH in Glycin-Lösung)	-	13	13
PyBOP-vermittelte PEGylierung mit PEG-NH ₂ (PEG@POS-COOH1)	0.9	0.09	0.09
Kupplung von PEG-NH ₂ an NHS-Ester (PEG@POS-COOH2)	1.4	0.14	0.14
Kupplung von HS-PEG-COOH an Maleinimid (PEG@POS-COOH3)	1.5	0.15	0.15

12.2.2.2 MALDI-TOF Analyse der verwendeten Polymere

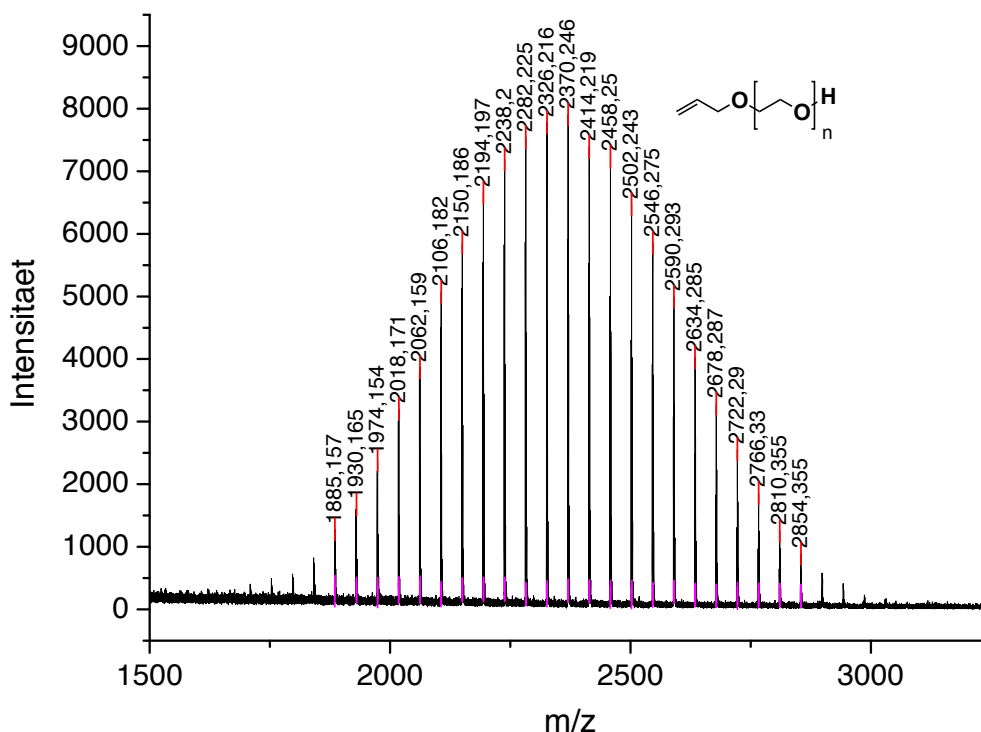


Abbildung 12.3: MALDI-TOF Spektrum von α -Allyl- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid).

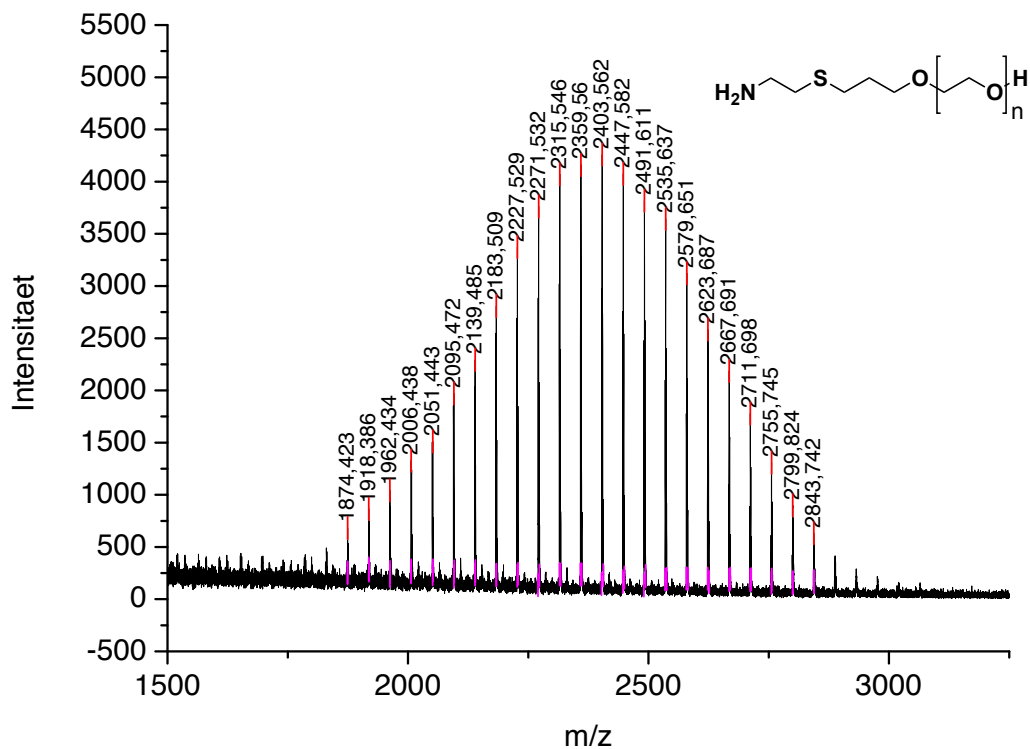


Abbildung 12.4: MALDI-TOF Spektrum von α -Amino- ω -hydroxy-Poly(ethylenoxid) (PEG-NH₂).

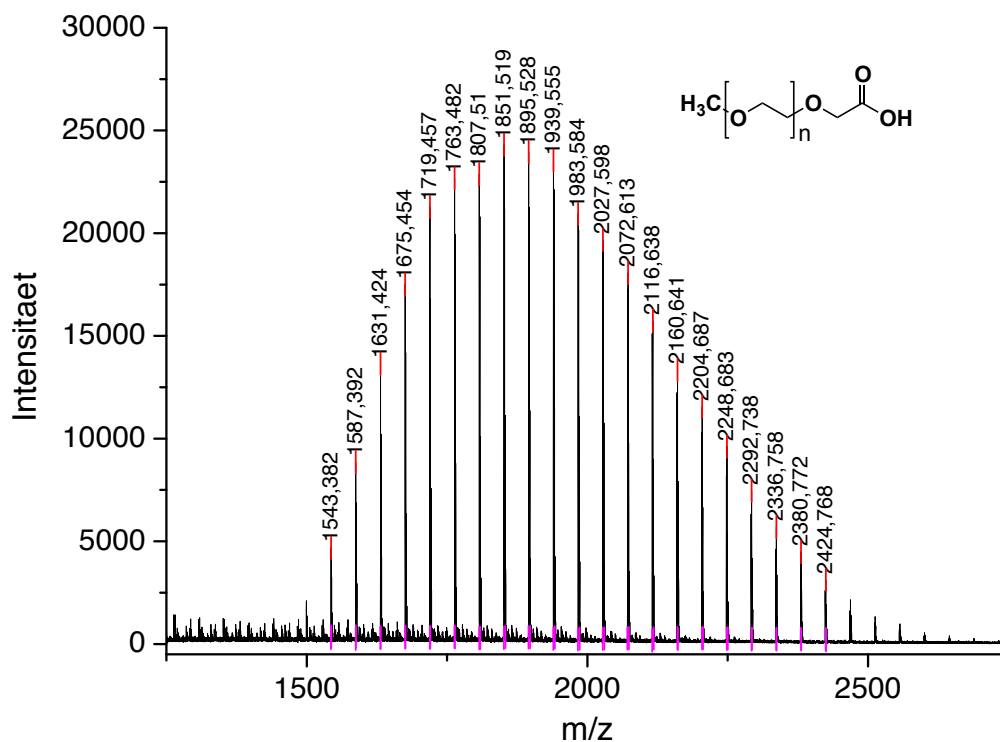


Abbildung 12.5: MALDI-TOF Spektrum von ω -Carboxy-Poly(ethylenoxid) (PEG-COOH).

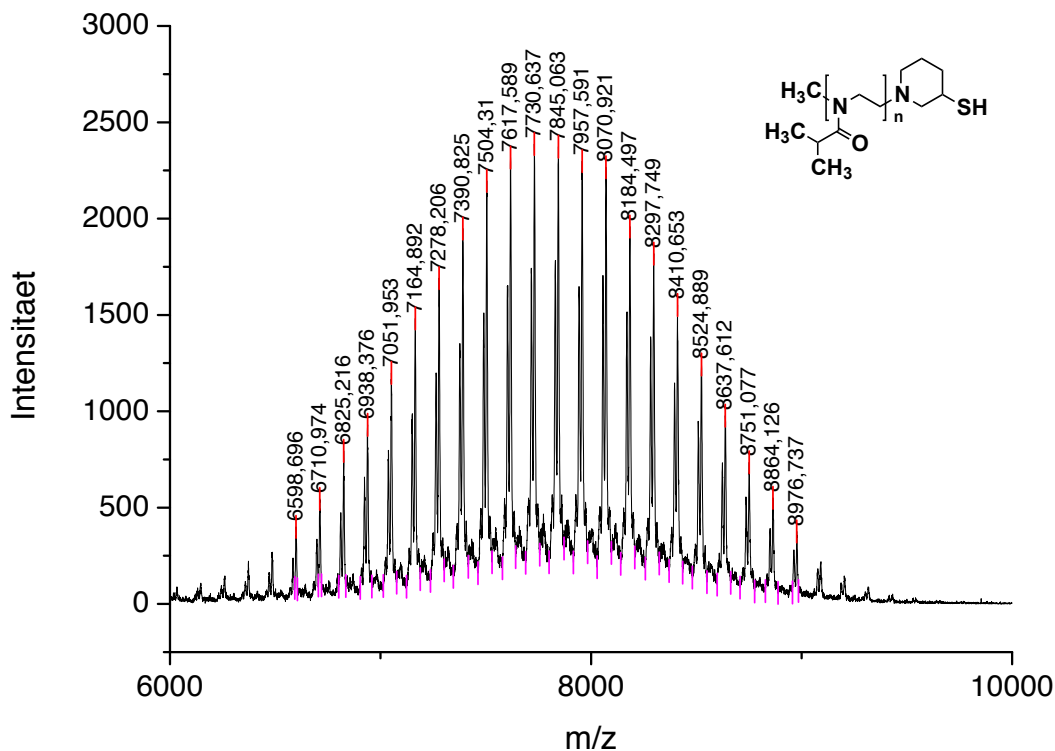


Abbildung 12.6: MALDI-TOF Spektrum von ω -Thio-Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (PIPOX-SH).

12.2.2.3 Bestimmung des Gewichtsanteils an PEG bzw. PIPOX mittels TGA

Der Gewichtsanteil an den an die Partikeloberfläche gebundenen Polymeren kann mittels TGA bestimmt werden. Die TGA-Messungen werden zwischen 25 °C und 600 °C unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Ab 600 °C folgt weitere Zersetzung der Probe unter der synthetischen Luft. Unter diesen Bedingungen kann man davon ausgehen, dass die organischen Reste vollständig zersetzt werden und der Rückstand nur aus der Silica-Matrix besteht. Dabei wird zunächst aus den TGA-Kurven der Edukt-Partikel **POS-COOH** bzw. **POS-NH₂** der Anteil an organischen Gruppen w_{OR} im Poly(organosiloxan)-Netzwerk ermittelt. Der Vergleich mit TGA-Kurven nach PEGylierung bzw. PIPOXylierung liefert dann den Gewichtsanteil des aufgepfropften Polymers w_p . Dabei gilt:

$$w_{OR} = \frac{100\% - w_{SiO}}{w_{SiO}} w_{SiO}^* \quad (12-1)$$

$$w_P = 100\% - w_{SiO}^* - \frac{100\% - w_{SiO}}{w_{SiO}} w_{SiO}^* \quad (12-2)$$

mit w_{SiO} dem Gewichtsanteil der Silica-Matrix in Edukt-Partikel und w_{SiO}^* dem Gewichtsanteil der Silica-Matrix nach Aufpfropfen von PEG bzw. PIPOX.

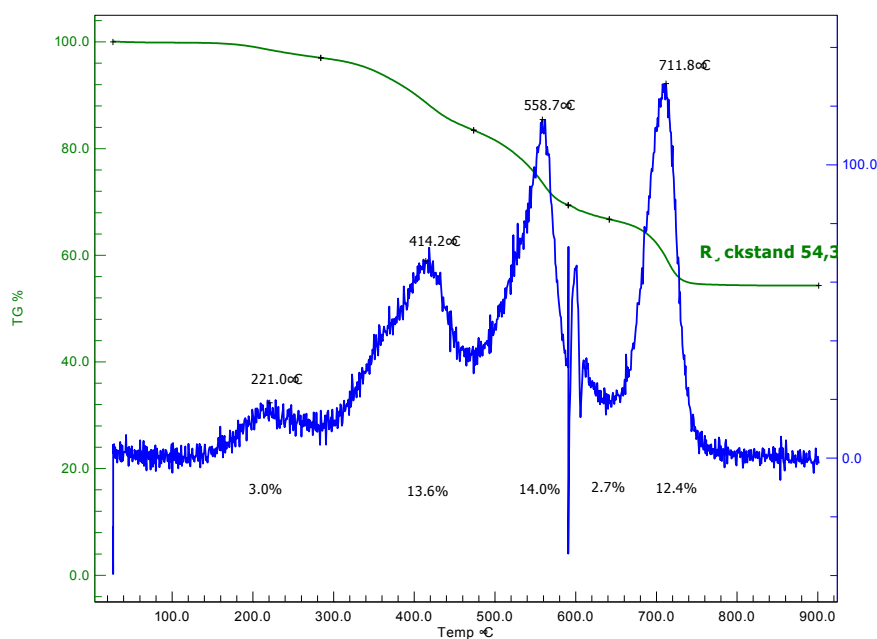


Abbildung 12.7: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der carboxy-funktionalisierten Partikel POS-COOH3. Rückstand: 54 Gew.-%.

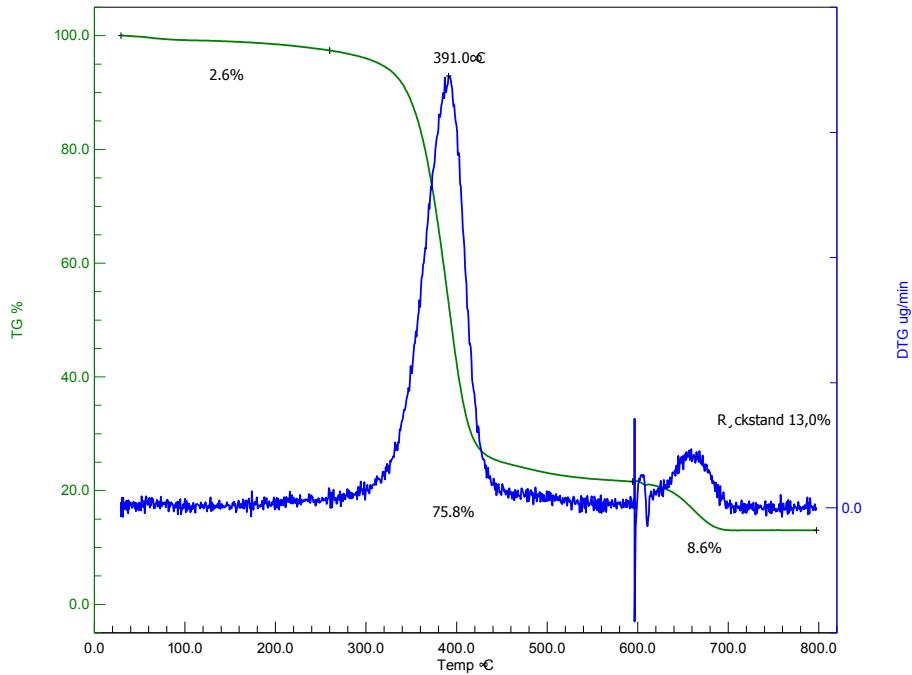


Abbildung 12.8: 12.9: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der PEGylierten Probe PEG@POS-COOH3. Rückstand: 13 Gew.-%.

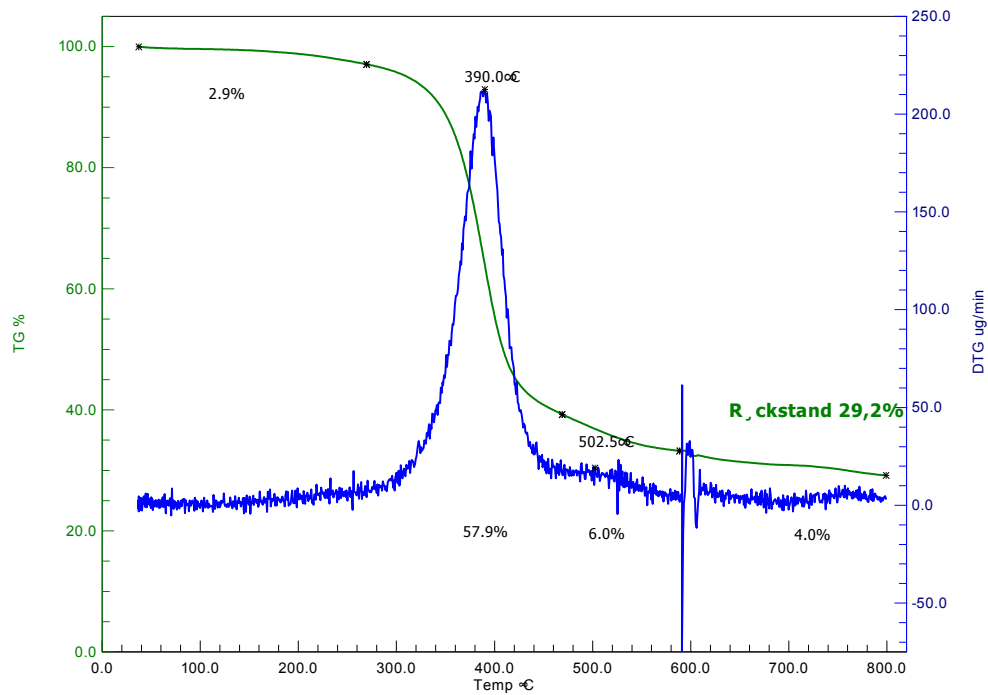


Abbildung 12.10: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der PEGylierten Probe PEG@POS-COOH2. Rückstand: 29 Gew.-%.

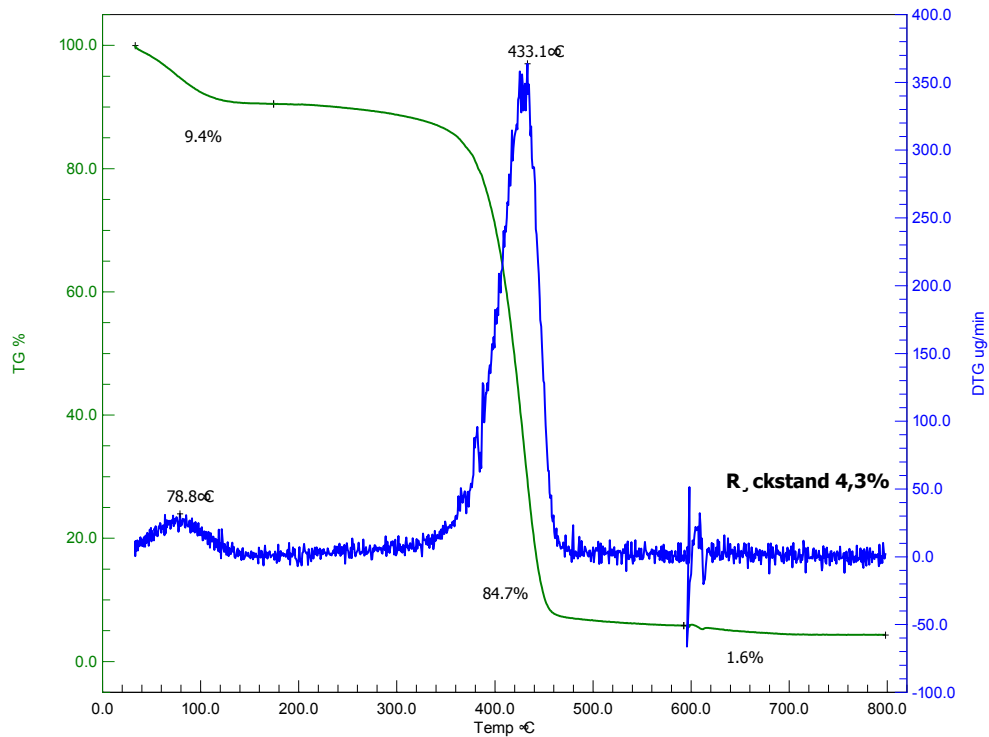


Abbildung 12.11: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der PIPOXylierten Probe PIPOX@POS-COOH1. Rückstand: 4,3 Gew.-%. Der restliche Wassergehalt (Gewichtsrückgang bei 78,8 °C) wurde bei Berechnungen der Pfpfrodichte berücksichtigt.

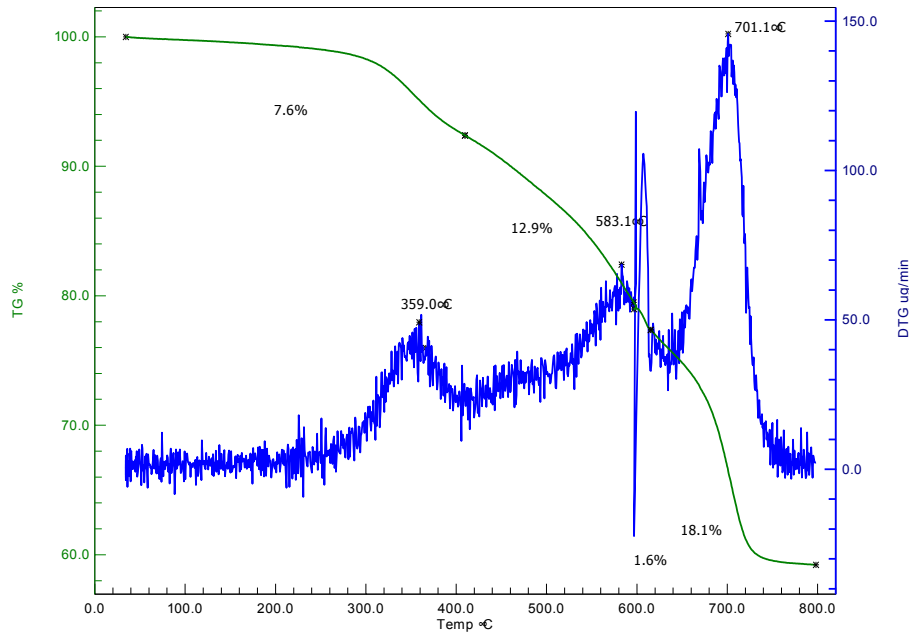


Abbildung 12.12: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der amino-funktionalisierten Partikel POS-NH₂. Rückstand: 60 Gew.-%.

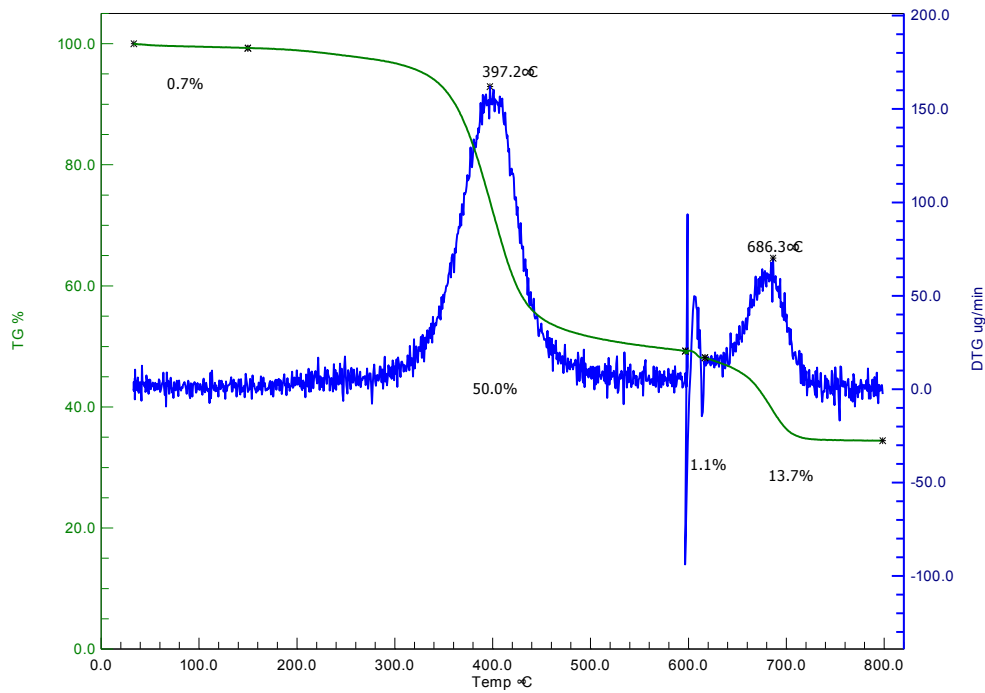


Abbildung 12.13: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der PEGylierten Probe PEG@POS-NH₂. Rückstand: 34 Gew.-%.

12.2.2.1 Zusätzliche DLS-Daten

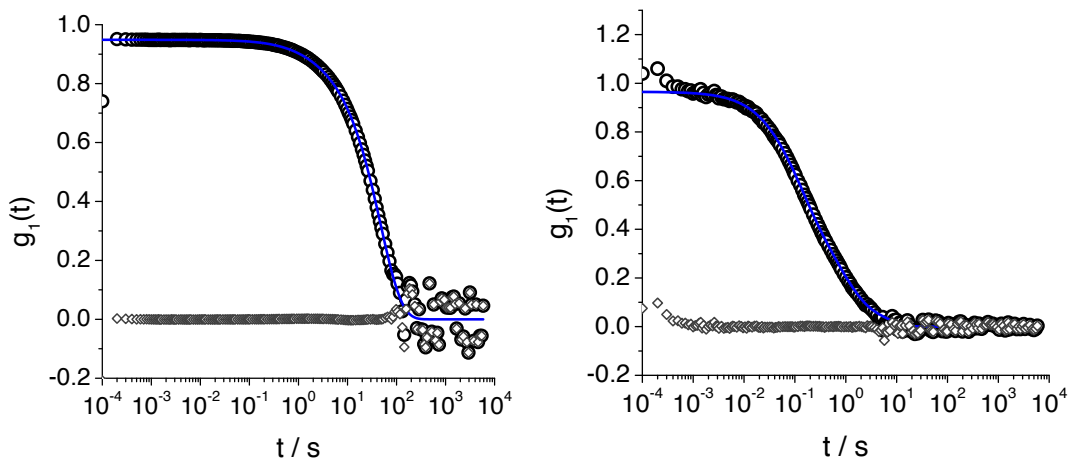


Abbildung 12.14: \circ Autokorrelationsfunktion der PIPOX-funktionalisierten Partikel (Probe MTH10) in RPMI mit 5 Gew.-% FCS nach Abkühlen auf 23.5 °C. Links: bei $\theta = 26^\circ$, rechts: bei $\theta = 122^\circ$. — Fit der AKF nach Anpassung mit (3-14), \diamond Residuum.

12.2.3 Kapitel 7: Poly(organsiloxan)-Nanopartikel mit quaternären Ammoniumgruppen auf der Oberfläche

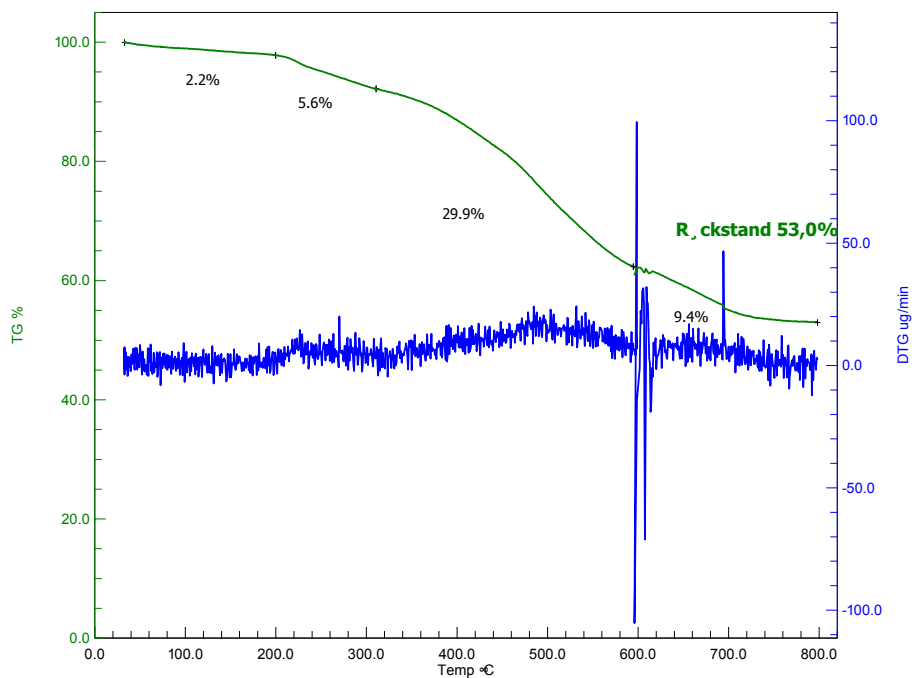


Abbildung 12.15: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der quaternisierten Partikel POS-COOHQ1. Rückstand: 53 Gew.-%.

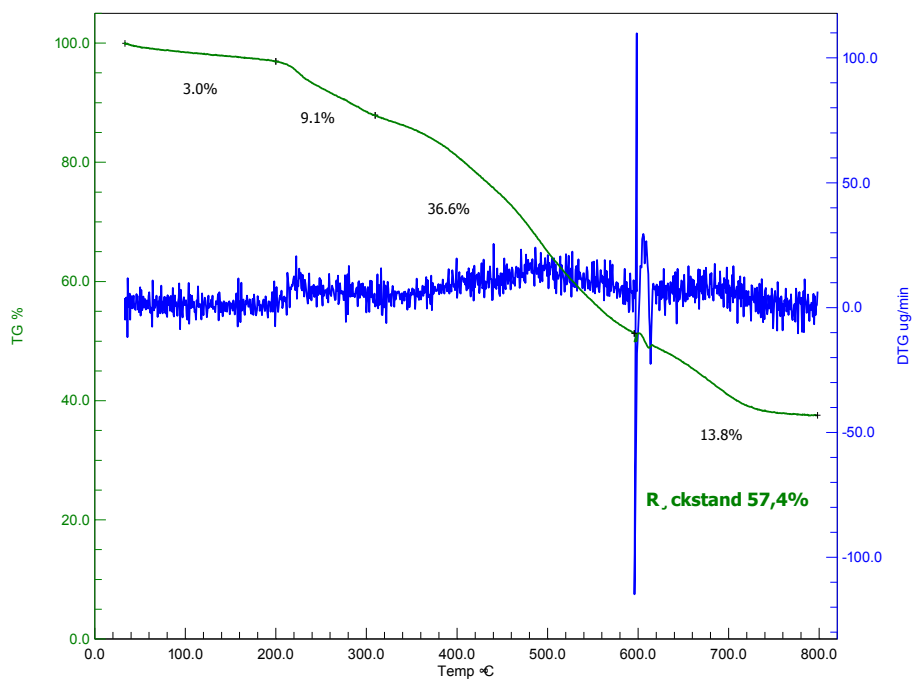


Abbildung 12.16: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der quaternisierten Partikel POS-COOHQ2. Rückstand: 57 Gew.-%.

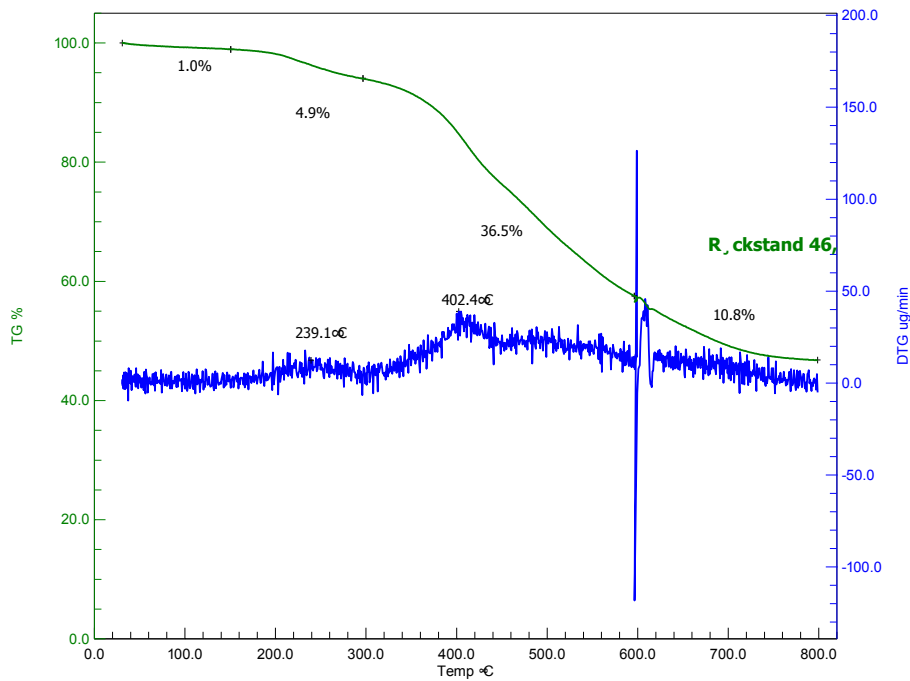


Abbildung 12.17: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der quaternisierten Partikel PEG@POS-COOHQ1. Rückstand: 46 Gew.-%.

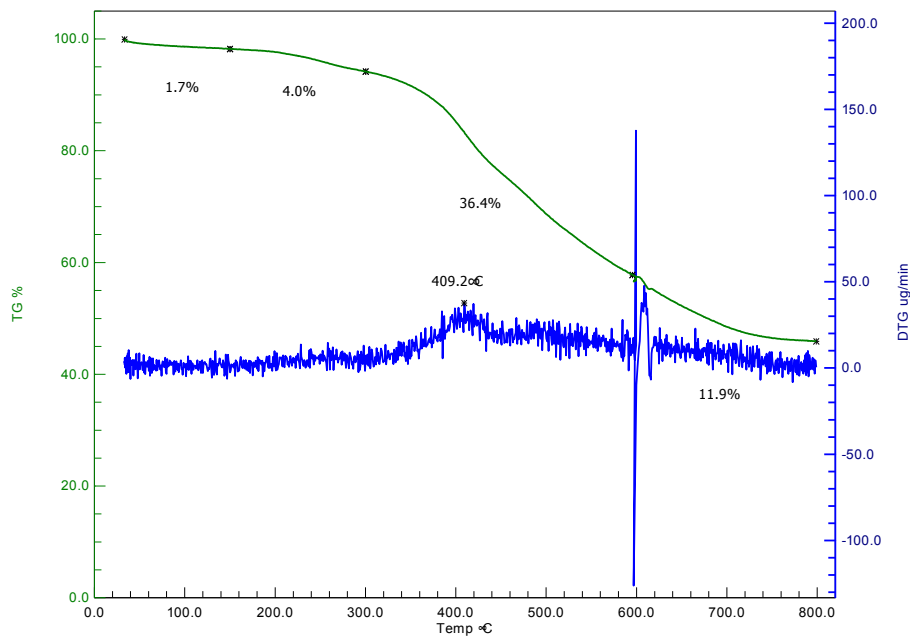


Abbildung 12.18: TGA-Kurve und ihre erste zeitliche Ableitung der quaternisierten Partikel PEG@POS-COOHQ1. Rückstand: 42 Gew.-%.

Tabelle 12.4: ζ -Potentiale der quaternisierte Partikel POS-NH₂Q1 und Q2 bei pH = 12 (in 10 mM NaOH). T = 296 K.

Probenbezeichnung / Alkylierungsmittel	Konzentration / mg/mL	ζ -Potential / mV
POS-NH ₂ Q1 / Ethyliodid	0.3	-32 ± 0
POS-NH ₂ Q2 / 2-Iodoethanol	0.4	-28 ± 1

Tabelle 12.5: ζ -Potentiale der PEGylierten Partikel PEG@POS-NH₂ und der dual-funktionalisierten Partikel PEG@POS-NH₂Q1&2 in saurem und basischen 0.1 m Glycin-Puffer (mit Salzsäure oder Natronlauge zur Einstellung des pH-Wertes und 5 mM Natriumchlorid). T = 296 K.

Probenbezeichnung / Alkylierungsmittel	ζ -Potential / mV	
	pH = 3.1	pH = 8.5
PEG@POS-NH ₂	9 ± 1	11 ± 0
PEG@POS-NH ₂ Q1 / Ethyliodid	11 ± 0	10 ± 1
PEG@POS-NH ₂ Q2 / 2-Iodoethanol	11 ± 1	11 ± 0

Literatur

- (1) Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. *Environmental Health Perspectives* **2005**, *113*, 823.
- (2) Nowack, B.; Bucheli, T. D. *Environmental Pollution* **2007**, *150*, 5.
- (3) Buzea, C.; Pacheco, II; Robbie, K. *Biointerphases* **2007**, *2*, MR17.
- (4) Lee, J.; Mahendra, S.; Alvarez, P. J. J. *Acs Nano* **2010**, *4*, 3580.
- (5) Chaudhry, Q.; Scotter, M.; Blackburn, J.; Ross, B.; Boxall, A.; Castle, L.; Aitken, R.; Watkins, R. *Food Additives and Contaminants* **2008**, *25*, 241.
- (6) Chen, X.; Schluesener, H. J. *Toxicology Letters* **2008**, *176*, 1.
- (7) Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995.
- (8) Mahon, E.; Salvati, A.; Bombelli, F. B.; Lynch, I.; Dawson, K. A. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 164.
- (9) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818.
- (10) Ferrari, M. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 161.
- (11) Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. *Small* **2008**, *4*, 26.
- (12) Bertrand, N.; Leroux, J. C. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 152.
- (13) Zhu, M. T.; Nie, G. J.; Meng, H.; Xia, T.; Nel, A.; Zhao, Y. L. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 622.
- (14) Nel, A. E.; Maedler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nature Materials* **2009**, *8*, 543.
- (15) Pietroiusti, A.; Campagnolo, L.; Fadeel, B. *Small* **2013**, *9*, 1557.
- (16) http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/271.e900_dimethylpolysiloxan.html, Zugriff am 30.09.2013.
- (17) Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, *422*, 37.
- (18) Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Muller, R. H.; Verbavatz, J. M.; Langer, R. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 316.
- (19) Everett, D. H. *Pure and Applied Chemistry* **1971**, *31*, 577.
- (20) Lagaly, G.; Schulz, O.; Zimehl, R. *Dispersionen und Emulsionen*; Steinkopff: Darmstadt, **1997**.
- (21) Dörfler, H.-D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer: Berlin Heidelberg New York, **2002**.
- (22) Jones, R. G.; Ober, C. K.; Hodge, P.; Kratochvil, P.; Moad, G.; Vert, M. *Pure and Applied Chemistry* **2013**, *85*, 463.
- (23) Lyklema, J. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *376*, 2.
- (24) Chapman, D. L. *Philosophical Magazine Series 6* **1913**, *25*, 475.
- (25) Stern, O. *ZEITSCHRIFT FUR ELEKTROCHEMIE UND ANGEWANDTE PHYSIKALISCHE CHEMIE* **1924**, *42*, 508.

-
- (26) Delgado, A. V.; Gonzalez-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *309*, 194.
- (27) Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; General Publishing Company, Ltd: Toronto, **1999**.
- (28) Derjaguin, B.; Landau, L. *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* **1945**, *15*, 663.
- (29) Verwey, E. J. W. *Journal of Physical and Colloid Chemistry* **1947**, *51*, 631.
- (30) Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G. *Journal of Colloid Science* **1955**, *10*, 224.
- (31) Kunz, W. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15*, 34.
- (32) Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9*, 19.
- (33) Zhang, Y.; Cremer, P. S. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 658.
- (34) Collins, K. D. *Methods* **2004**, *34*, 300.
- (35) Sun, S. F. *Physical Chemistry of Macromolecules*; John Wiley & sons, Inc.: New Jersey, **2004**.
- (36) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press: San Diego, **1992**.
- (37) Evans, R.; Smitham, J. B.; Napper, D. H. *Colloid and Polymer Science* **1977**, *255*, 161.
- (38) Napper, D. H. *Journal of Colloid and Interface Science* **1977**, *58*, 390.
- (39) Smitham, J. B.; Napper, D. H. *Colloid and Polymer Science* **1979**, *257*, 748.
- (40) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720.
- (41) Vereb, G.; Szollosi, J.; Matko, J.; Nagy, P.; Farkas, T.; Vigh, L.; Matyus, L.; Waldmann, T. A.; Damjanovich, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 8053.
- (42) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*; 5 ed.; W. H. Freeman: New York, **2002**.
- (43) Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. W. in *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 14*; Yarmush, M. L., Ed.; Annual Reviews: Palo Alto, 2012; Vol. 14, p 1.
- (44) Treuel, L.; Jiang, X. E.; Nienhaus, G. U. *Journal of the Royal Society Interface* **2013**, *10*.
- (45) Kasper, J.; Hermanns, I.; Bantz, C.; Koshkina, O.; Lang, T.; Pohl, C.; Unger, R. E.; Kirkpatrick, J. C. *Archives of Toxicology* **2012**.
- (46) Kim, J. A.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Nature Nanotechnology* **2012**, *7*, 62.
- (47) Plapied, L.; Duhem, N.; des Rieux, A.; Preat, V. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2011**, *16*, 228.
- (48) Beck-Broichsitter, M.; Merkel, O. M.; Kissel, T. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 214.
- (49) Owens, D. E.; Peppas, N. A. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307*, 93.
- (50) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 505.
- (51) Wang, B.; He, X.; Zhang, Z. Y.; Zhao, Y. L.; Feng, W. Y. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 761.
- (52) Dufort, S.; Sancey, L.; Coll, J. L. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 179.
- (53) Waldeyer, A. *Anatomie des Menschen*; Walter de Gruyter: Berlin, **2003**.

-
- (54) Kirsch, J.; May, C. A.; Lorke, D.; Winkelmann, A.; Schwab, W.; Herrmann, G.; Funk, R. *Taschenlehrbuch Anatomie*; Thieme: Stuttgart, **2011**.
- (55) Gay, R.; Despopoulos, A. *Taschenatlas Physiologie*; 8 ed.; Thieme: Stuttgart, **2012**.
- (56) Kunda, N. K.; Somavarapu, S.; Gordon, S. B.; Hutcheon, G. A.; Saleem, I. Y. *Pharmaceutical Research* **2013**, *30*, 325.
- (57) Dombu, C. Y.; Betbeder, D. *Biomaterials* **2013**, *34*, 516.
- (58) Kreyling, W. G.; Semmler-Behnke, M.; Takenaka, S.; Moeller, W. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 714.
- (59) Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4*, 546.
- (60) Lynch, I.; Dawson, K. A. *Nano Today* **2008**, *3*, 40.
- (61) Monopoli, M. P.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Nature Nanotechnology* **2012**, *7*, 779.
- (62) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2780.
- (63) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 14265.
- (64) Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Bombelli, F. B.; Dawson, K. A. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2525.
- (65) Tenzer, S.; Docter, D.; Rosfa, S.; Wlodarski, A.; Kuharev, J.; Rekik, A.; Knauer, S. K.; Bantz, C.; Nawroth, T.; Bier, C.; Sirirattanapan, J.; Mann, W.; Treuel, L.; Zellner, R.; Maskos, M.; Schild, H.; Stauber, R. H. *Acs Nano* **2011**, *5*, 7155.
- (66) Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 5761.
- (67) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Cedervall, T.; Berggard, T.; Flanagan, M. B.; Lynch, I.; Elia, G.; Dawson, K. *Acs Nano* **2011**, *5*, 7503.
- (68) Hirsh, S. L.; McKenzie, D. R.; Nosworthy, N. J.; Denman, J. A.; Sezerman, O. U.; Bilek, M. M. M. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2013**, *103*, 395.
- (69) Jung, S. Y.; Lim, S. M.; Albertorio, F.; Kim, G.; Gurau, M. C.; Yang, R. D.; Holden, M. A.; Cremer, P. S. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 12782.
- (70) Vroman, L.; Adams, A. L. *Surface Science* **1969**, *16*, 438.
- (71) Vroman, L.; Adams, A. L. *Journal of biomedical materials research* **1969**, *3*.
- (72) Vroman, L.; Adams, A. L.; Fischer, G. C.; Munoz, P. C. *Blood* **1980**, *55*, 156.
- (73) Kogler, P.; Clayton, A.; Thissen, H.; Santos, G. N. C.; Kingshott, P. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 1820.
- (74) Lechner, M. D.; Gehrke, K.; Naordmeier, E. H. *Makromolekulare Chemie*; Birkhäuser Verlag: Basel, **2003**.
- (75) Brinker, J. C. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press: San Diego, **1990**; Vol. 1.
- (76) Iler, R. K. *The chemistry of silica*; Wiley-Interscience, **1979**.
- (77) McNeil, K. J.; DiCaprio, J. A.; Walsh, D. A.; Pratt, R. F. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 1859.
- (78) Voronkov, M. G.; Yuzhelevskii, Y. A.; Mileshekevich, V. P. *Russian Chemical Reviews* **1975**, *44*, 355.
- (79) Hüsing, N.; Schubert, U. *Angewandte Chemie* **1998**, *110*, 22.

-
- (80) Baumann, F. Dissertation, Universität Bayreuth, **1995**.
- (81) Baumann, F.; Schmidt, M.; Deubzer, B.; Geck, M.; Dauth, J. *Macromolecules* **1994**, *27*, 6102.
- (82) Baumann, F.; Deubzer, B.; Geck, M.; Dauth, J.; Schmidt, M. *Macromolecules* **1997**, *30*, 7568.
- (83) Baumann, F.; Deubzer, B.; Geck, M.; Dauth, J.; Sheiko, S.; Schmidt, M. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 955.
- (84) Antonietti, M.; Bremser, W.; Schmidt, M. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3796.
- (85) Wu, C. *Macromolecules* **1994**, *27*, 298.
- (86) Scholz, S. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- (87) Scherer, C. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2010**.
- (88) Scherer, C.; Utech, S.; Scholz, S.; Noskov, S.; Kindervater, P.; Graf, R.; Thuenemann, A. F.; Maskos, M. *Polymer* **2010**, *51*, 5432.
- (89) Jungmann, N.; Schmidt, M.; Maskos, M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 8347.
- (90) Jungmann, N. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- (91) Jungmann, N.; Schmidt, M.; Maskos, M.; Weis, J.; Ebenhoch, J. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6851.
- (92) Graf, C. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1999**.
- (93) Graf, C.; Scharl, W.; Fischer, K.; Hugenberg, N.; Schmidt, M. *Langmuir* **1999**, *15*, 6170.
- (94) Graf, C.; Scharl, W.; Maskos, M.; Schmidt, M. *Journal of Chemical Physics* **2000**, *112*, 3031.
- (95) Jungmann, N.; Schmidt, M.; Ebenhoch, J.; Weis, J.; Maskos, M. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 1714.
- (96) Jungmann, N.; Schmidt, M.; Maskos, M. *Macromolecules* **2003**, *36*, 3974.
- (97) Roos, C.; Schmidt, M.; Ebenhoch, J.; Baumann, F.; Deubzer, B.; Weis, J. *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 761.
- (98) Diehl, C. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2007**.
- (99) Diehl, C.; Fluegel, S.; Fischer, K.; Maskos, M. *Surface and Interfacial Forces - from Fundamentals to Applications* **2008**, *134*, 128.
- (100) Koshkina, O. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2010**.
- (101) Koshkina, O.; Bantz, C.; Würth, C.; Resch-Genger, U.; Maskos, M. *Macromolecular Symposia* **2011**, *309-310*, 141.
- (102) Lindenblatt, G.; Scharl, W.; Pakula, T.; Schmidt, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 9340.
- (103) Lindenblatt, G.; Scharl, W.; Pakula, T.; Schmidt, M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 1730.
- (104) Lindenblatt, G. I. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- (105) Utech, S. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.
- (106) Utech, S.; Scherer, C.; Krohne, K.; Carrella, L.; Rentschler, E.; Gasi, T.; Ksenofontov, V.; Felser, C.; Maskos, M. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2010**, *322*, 3519.
- (107) Utech, S.; Scherer, C.; Maskos, M. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, *321*, 1386.

- (108) Hikosaka, K.; Kim, J.; Kajita, M.; Kanayama, A.; Miyamoto, Y. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2008**, *66*, 195.
- (109) Schärfl, W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, **2007**.
- (110) Rausch, K. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, **2013**.
- (111) Rausch, K.; Reuter, A.; Fischer, K.; Schmidt, M. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2836.
- (112) Giddings, J. C. *Science* **1993**, *260*, 1456.
- (113) Giddings, J. C. in *Field-Flow Fractionation Handbook*; Wiley-Interscience: 2000.
- (114) Winter, R.; Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*; B. G. Teuber Stuttgart, **1998**.
- (115) So, P. T. C.; Dong, C. Y. in *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
- (116) Würth, C. G., M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 3431.
- (117) Schulz, A.; McDonagh, C. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2579.
- (118) Holzapfel, V.; Musyanovych, A.; Landfester, K.; Lorenz, M. R.; Mailander, V. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, *206*, 2440.
- (119) Lorenz, M. R.; Holzapfel, V.; Musyanovych, A.; Nothelfer, K.; Walther, P.; Frank, H.; Landfester, K.; Schrezenmeier, H.; Mailander, V. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2820.
- (120) Kehrloesser, D.; Baumann, R. P.; Kim, H. C.; Hampp, N. *Langmuir* **2011**, *27*, 4149.
- (121) Ruedas-Rama, M. J.; Walters, J. D.; Orte, A.; Hall, E. A. H. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *751*, 1.
- (122) Bantz, C. Dissertation in Vorbereitung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2013**.
- (123) Crespy, D.; Landfester, K. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2010**, *6*, 1132.
- (124) Lunov, O.; Syrovets, T.; Loos, C.; Beil, J.; Delecher, M.; Tron, K.; Nienhaus, G. U.; Musyanovych, A.; Mailaender, V.; Landfester, K.; Simmet, T. *Acs Nano* **2011**, *5*, 1657.
- (125) Van Blaaderen, A.; Vrij, A. *Langmuir* **1992**, *8*, 2921.
- (126) Verhaegh, N. A. M.; Vanblaaderen, A. *Langmuir* **1994**, *10*, 1427.
- (127) Burns, A.; Ow, H.; Wiesner, U. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 1028.
- (128) Kubin, R. F.; Fletcher, A. N. *Journal of Luminescence* **1982**, *27*, 455.
- (129) Chang, T. L.; Cheung, H. C. *Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 4874.
- (130) Sachan, A. K.; Harishchandra, R. K.; Bantz, C.; Maskos, M.; Reichelt, R.; Galla, H. J. *Acs Nano* **2012**, *6*, 1677.
- (131) Thies, M.; Hinze, U.; Paradies, H. H. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, *101*, 261.
- (132) Pingoud, A.; Urbanke, K. *Arbeitsmethoden der Biochemie*; De Gruyter: Berlin, **1997**.
- (133) Lang, T., Technische Universität Berlin, **2013**.
- (134) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford university Press: New York, **2001**.
- (135) Klages, F. *Lehrbuch der organischen Chemie*; De Gruyter: Berlin, **1953**; Vol. 1.
- (136) Krohne, K. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.

- (137) Thompson, M. S.; Vadala, T. P.; Vadala, M. L.; Lin, Y.; Riffle, J. S. *Polymer* **2008**, *49*, 345.
- (138) Tieke, B. *Macromolekulare Chemie*; 2 Auflage ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- (139) Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 686.
- (140) Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*, 1980.
- (141) Thiry, M.; Boldt, K.; Nikolic, M. S.; Schulz, F.; Ijeh, M.; Panicker, A.; Vossmeier, T.; Weller, H. *Acs Nano* **2011**, *5*, 4965.
- (142) Schlaad, H.; Kukula, H.; Rudloff, J.; Below, I. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4302.
- (143) Cammas, S.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, *6*, 226.
- (144) Masson, C.; Scherman, D.; Bessodes, M. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2001**, *39*, 4022.
- (145) Schlaad, H.; Diehl, C.; Gress, A.; Meyer, M.; Demirel, A. L.; Nur, Y.; Bertin, A. *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31*, 511.
- (146) Hoogenboom, R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 7978.
- (147) Luxenhofer, R.; Han, Y. C.; Schulz, A.; Tong, J.; He, Z. J.; Kabanov, A. V.; Jordan, R. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33*, 1613.
- (148) Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Filippov, S. K.; Hoogenboom, R.; Hruby, M. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33*, 1648.
- (149) Tong, J.; Yi, X.; Luxenhofer, R.; Banks, W. A.; Jordan, R.; Zimmerman, M. C.; Kabanov, A. V. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 360.
- (150) Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 976.
- (151) Bauer, M.; Lautenschlaeger, C.; Kempe, K.; Tauhardt, L.; Schubert, U. S.; Fischer, D. *Macromolecular Bioscience* **2012**, *12*, 986.
- (152) Bloksma, M. M.; Bakker, D. J.; Weber, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31*, 724.
- (153) ten Brummelhuis, N.; Secker, C.; Schlaad, H. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33*, 1690.
- (154) Diehl, C.; Cernoch, P.; Zenke, I.; Runge, H.; Pitschke, R.; Hartmann, J.; Tiersch, B.; Schlaad, H. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3784.
- (155) Diehl, C.; Dambowsky, I.; Hoogenboom, R.; Schlaad, H. *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32*, 1753.
- (156) Becker, H. G. O.; Berger, W.; Domschke, G. *Organikum*; Wiley VCH: Weinheim, **2004**.
- (157) Cornish, V. W.; Lin, H.; Abide, W. M.; Sauer, R. T. *Biochemistry* **2000**, *39*, 124.
- (158) Wiggins, K. M.; Syrett, J. A.; Haddleton, D. M.; Bielawski, C. W. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 7180.
- (159) Chan, J. W.; Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, M. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381.
- (160) Kar, M.; Vijayakumar, P. S.; Prasad, B. L. V.; Sen Gupta, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 5772.
- (161) Bartholome, C.; Beyou, E.; Bourgeat-Lami, E.; Chaumont, P.; Zydowicz, N. *Macromolecules* **2003**, *36*, 7946.
- (162) Lang, T. Dissertation in Vorbereitung, Technische Universität Berlin, **2013**.

-
- (163) Diehl, C., Persönliche Mitteilung.
- (164) Demirel, A. L.; Meyer, M.; Schlaad, H. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 8622.
- (165) Zhang, N.; Pompe, T.; Amin, I.; Luxenhofer, R.; Werner, C.; Jordan, R. *Macromolecular Bioscience* **2012**, *12*, 926.
- (166) Zhang, Y. J.; Furyk, S.; Bergbreiter, D. E.; Cremer, P. S. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14505.
- (167) Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques*; 2 ed.; Elsevier Inc., **2008**.
- (168) Bu, L.; Gan, L.-C.; Guo, X.-Q.; Chen, F.-Z.; Song, Q.; Qi, Z.; Gou, X.-J.; Hou, S.-X.; Yao, Q. *International journal of pharmaceutics* **2013**, 452.
- (169) Brownlie, A.; Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *274*, 41.
- (170) Kean, T.; Roth, S.; Thanou, M. *Journal of Controlled Release* **2005**, *103*, 643.
- (171) Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205.
- (172) Bogardus, J. B.; Higuchi, T. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1982**, *71*, 729.
- (173) Card, J. W.; Zeldin, D. C.; Bonner, J. C.; Nestmann, E. R. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2008**, *295*, L400.
- (174) Unger, R. E.; Krump-Konvalinkova, V.; Peters, K.; Kirkpatrick, C. J. *Microvascular Research* **2002**, *64*, 384.
- (175) Masuzawa, M.; Fujimura, T.; Hamada, Y.; Fujita, Y.; Hara, H.; Nishiyama, S.; Katsuoka, K.; Tamauchi, H.; Sakurai, Y. *International Journal of Cancer* **1999**, *81*, 305.
- (176) <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/technical-resources/media-formulation.115.html>, Zugriff am 05.12.2013.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Michael Maskos danke ich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, viele anregende Diskussionen und absolute Freiheit beim Experimentieren und Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Michael Gradzielski möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sowie für die intensive Zweitbetreuung innerhalb der TU Berlin bedanken.

Prof. Dr. Andreas Thünemann danke ich für die Möglichkeit die Labore an der BAM zu benutzen und die Arbeit, trotz des offiziellen Umzugs der Arbeitsgruppe nach Mainz, an der BAM zu beenden.

Jun.-Prof. Dr. Annabelle Bertin für ihre Unterstützung bei diversen Fragen auch über die Arbeit hinaus.

Prof. Dr. Helmut Schlaad, Dr. Junpeng Zhao, Dr. Christina Diehl gilt ein ganz besonderer Dank für Darstellung der Polymere sowie für die Möglichkeit die anionische Polymerisation auch selber am MPI Golm durchzuführen.

Dr. Stefen Weidner und Rosemarie Laging danke ich für MALDI und GPC-Messungen. Dr. Ulrike Braun und Dietmar Neubert für TGA-Messungen und die Einweisung in IR-Spektrometrie. Dr. Volker Wachtendorf für die Möglichkeit seine Geräte für diese Arbeit zu benutzen.

Thomas Lang danke ich für die Durchführung der AF-FFF-Messungen sowie für die Einführung in Lichtstreuung und viele hilfreiche Diskussionen.

Dr. Ute Resch-Genger, Christian Würth und Soheil Hatami für die Bestimmung der absoluten Quantenausbeuten.

Rudolph Würfel und Robert Branscheid für die Einführung in die Kunst des TEM-Messens.

Christian Secker für die Trübungsphotometrie-Messungen.

Bei Aneta, Daniel, Soraya, Oliver, Patrick und Alexi bedanke ich mich ganz herzlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und bei Christoph für seine grenzenlose Hilfsbereitschaft bei unterschiedlichsten Problemen.

Jenny und Dominic danke ich für die Durchführung der Bio-Versuche und lustige Zeit auf den SPP-Treffen.

Tina, Tommy und Kerstin für ihre Hilfe bei sämtlichen organisatorischen Fragen.

Natürlich möchte ich mich ganz besonders bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und FB 6.5 für ihre ständige Unterstützung und auch für viele lustige Abende mit Bier und Kickern abseits der Arbeit bedanken- ohne euch hätte ich nie geschafft.

Bei DFG (Schwerpunktprogramm SPP 1313), BAM und IMM bedanke ich mich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Zum Schluss gilt ein ganz großer Dank Semjon und meiner gesamten Familie für ihre grenzenlose Geduld und Unterstützung.

DANKE!!!!!!!!!!!!!!