



# Abschlussbericht

## **NIMINI-MMRI**

Förderkennzeichen: 01EZ0815

Norbert Buske / Christoph Dunmann

**Capsulation Pharma AG**

Volmerstraße 7b

D-12489 Berlin

Germany

# 0. Inhaltsverzeichnis

0.	Inhaltsverzeichnis.....	2
1.	Kurzzusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse .....	3
2.	Projektablauf .....	4
3.	Ergebnisse .....	6
3.1	Eingesetzte Kontrastmittel auf Basis magnetischer Eisenoxid nano (MION) Teilchen .....	6
3.2	Ergebnisse zur Herstellung und Charakterisierung von ultra-smal-paramagnetic iron-oxide (USPIO)-Kontrastmitteln bei Capsulation 2010/2011 .....	8
3.2.1	Der 2-Stufen-Prozess.....	8
3.2.2	Der 1-Stufen-Prozess:.....	10
3.2.3	Ausfällung der Teilchen im extremen Überschuss des Stabilisators. ....	12
4.	Ansätze zur Funktionalisierung der magnetischen Nanopartikel .....	14
4.1	Analytische Bestimmung des IgG-Gehaltes .....	14
4.2	Proteinbestimmung .....	15
4.2.1	Quantitative Bestimmung des Proteingehalts mittels Färbetests .....	15
4.2.2	UV-Vis-Spektroskopie .....	17
4.3	Modifizierung der magnetischen Nanopartikel mit IgG .....	19
4.3.1	Vorversuche mit IgG from rat serum .....	19
4.3.2	Beladung mit Anti CD68 und Collagen VI.....	21
4.3.3	Beladung mit AntiCD68 .....	22
4.3.4	Beladung mit pAB anti-Collagen Type VI antibody.....	23
4.3.5	Untersuchungen zur biochemischen Adsorption von Antikörpern an Ferucarbotran und Feraheme.....	24
4.4	Messwerte und Diskussion zur magnetischen Charakterisierung ausgewählter MF-MRI-Muster 25	
4.4.1	Bewertung der Ergebnisse .....	27
4.4.2	FERAHEME (Muster Nr. 7a,7b,8,9) .....	27
4.4.3	PAA-Muster 1-4.....	27
4.4.4	Magnetit-Hydrosol 5-7.....	27
4.4.5	Die Citrat-MF 10 wurde aus dem Hydrosol 5 hergestellt. ....	27
4.5	Einsatz der Milthenyi-Separatoren .....	28
5.	Zusammenfassung aller Ergebnisse .....	29
6.	Ausblick.....	31
7.	Literatur zur Herstellung von MION-Kontrastmitteln .....	32

## 1. Kurzzusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Zunächst wurden stark negativ geladene Teilchen mit Hüllen aus Citrat und Polyasparagat bei Capsulation entwickelt und histologisch untersucht. Diese zeigten allerdings weder bei hydrodynamischen Teilchengrößen  $> 50$  nm als auch  $< 50$  nm einen positiven Effekt (Anreicherung im modifizierten Mausherzen).

Auch ungeladene, mit Dextran umhüllte Teilchen aus dem Institut für Medizintechnik in Lübeck, führten nicht zu den erhofften Resultaten. Ein ähnlich negatives Ergebnis wurde von Ferucarbotran (Meito, Japan) mit hydrodynamischen Teilchengrößenfraktionen von 74, 55 und 28nm erhalten.

Somit kann man davon ausgehen, dass weder die hydrodynamische Teilchengröße der stark negativ geladenen Teilchen noch die geringe Oberflächenladung der 28-74 nm (mit Dextran umhüllten) Teilchen aus Lübeck und von Meito einen positiven Einfluss auf die Anreicherung der Teilchen im modifizierten Mausherzen ausübt (Wechselwirkung zu Makrophagen).

Obwohl es ferner gelang, Antikörper nachweislich an Ferucarbotran zu koppeln (Institut für Pharmazie, Greifswald), gab es keinen positiven Anreicherungseffekt am modifizierten Mausherzen.

Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen an FERAHAME (AMAG, USA), zusammengesetzt aus Maghemitkernteilchen von ca. 7 nm und Hüllen aus "polyglucose sorbitol carboxymethylether (PSC)", mit hydrodynamischen Durchmessern von 25 nm und einem Zetapotenzial nahe Null bis leicht negativ, die besten Ergebnisse für den Anwendungsfall; sowohl eine MRT-Kontrastverbesserung im menschlichen Herzen als auch eine Teilchenanreicherung im Mausherzen ist ein erster wichtiger Schritt im Rahmen der gestellten Projektaufgabe.

Es zeichnet sich somit ab, dass die Ursache für den positiven Effekt (starke Wechselwirkung zu Makrophagen infizierter Mäuse) die chemische Zusammensetzung der Hülle ist. Diese Hülle soll nach Angaben des Herstellers schnell durch Makrophagen phagozytiert und die „nackten“ Eisenoxidteilchen in die Organe eingelagert werden. Beweise für diesen Mechanismus sind jedoch noch nicht bekannt.

## 2. Projektablauf

Ziel des Projektes **NIMINI-MMRI** (**N**on-**i**nvasive **m**yo**c**ardial **i**n**f**lammation **i**maging based on new **m**olecular **m**agnetic **r**esonance **i**maging contrast agents and methods) war die Visualisierung von Myocarditis-Zellen mit MRT bei Nutzung von magnetischen Kontrastmitteln (Magnetflüssigkeiten).

Capsulation hatte in diesem Projekt die Aufgabe, geeignete Kontrastmittel auf Eisenoxidbasis (MION) zur Verfügung zu stellen und diese chemisch-physikalisch zu charakterisieren. Projektstart für Capsulation war März 2009. Gemäß Absprache wurde umgehend das folgende Kontrastmittel auf Basis magnetischer Eisenoxide (MION) gekauft: Ferucarbotran von Meito (Japan), ein Vorprodukt für RESOVIST (Bayer-Schering). Zusätzlich zum eigentlichen Ferucarbotran wurden zwei weitere Teilchengrößenfraktionen käuflich erworben.

Zum 1. Projekttreffen wurde bereits eine Magnetflüssigkeit auf Citrat-Basis (310309) von Capsulation zur Verfügung gestellt.

Im weiteren Verlauf wurden Magnetflüssigkeiten mit hydrodynamischen Teilchengrößen um die 100 nm (auch als superparamagnetische Eisenoxid-Teilchen oder SPIO) mit Citrathüllen, später auch mit Polyasparaginsäurehüllen (PAA) hergestellt. Diese Produkte waren in ausreichend hoher Fe-Konzentration mausverträglich, doch es konnte kein klinischer Anreicherungseffekt im modifizierten Mausherzen nachgewiesen werden, das gleiche galt auch für Meito 511, nur ein geringer Effekt wurde bei sehr kleinen Eisenoxidteilchen, den USPIO, mit Meito 097 ermittelt. Als Ursache wurde zunächst die gegenüber FERAHEME zu geringe Halbwertszeit der Teilchen im Blutkreislauf angenommen, vgl. 1. Zwischenbericht von Capsulation.

Daraufhin wurde das Herstellverfahren für Citrat und Polyasparagat-Hüllteilchen modifiziert, um zu Teilchen mit hydrodynamischen Teilchendurchmessern < 50 nm (USPIO) zu kommen, was sich als aufwendig erwies.

Zwischendurch wurde zur analytischen Bestimmung des Eisen (Fe)-Gehaltes der Substanzen eine spektroskopische Methode der Firma Merck derart modifiziert, dass ein UV-VIS Gerät eingesetzt werden konnte, die Empfindlichkeit der Methode lag bei einigen µg Fe/ml Lösung, also ähnlich wie bei der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS), s. Bericht dazu.

Unterdessen wurde von Capsulation versucht, das Ferucarbotran mit Antikollagen VI zu modifizieren, wobei für dessen Adsorption elektrostatische Wechselwirkungen (unterschiedliche Ladungen der beiden Komponenten) genutzt wurden. Doch ein positiver Adsorptionseffekt konnte nicht nachgewiesen werden.

Daraufhin wurde von Dr. Glöckl (Greifswald) die Machbarkeit zur Modifizierung von Meito 511 mit Antikollagen VI über die Magnetit@Streptavidin-biotinylierte Antikörper-Methode durchgeführt, mit einem positiven extracorporalen Nachweis auf die Antikörper-Antikörper-Reaktion, doch die histologischen Untersuchungen waren auch hier negativ.

Im weiteren Projektverlauf wurde ein neues, für den amerikanischen Markt zugelassenes, Kontrastmittel mit dem Namen FERAHEME mit ungeladenen USPIO-Maghemit-Teilchen untersucht, was sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen die mit Abstand besten Anwendereigenschaften aufwies.

Es gelang, von diesem Produkt unterschiedliche Teilchengrößen durch magnetische Teilchensortierung nach der Milthenyi-Methode zu erreichen, wobei zwei Teilchenfraktionen (einmal um die 20 nm und zum anderen um die 50 nm) sowohl von Dr. Glöckl als auch bei Capsulation hergestellt werden konnten.

Die Modifizierung der Teilchen von Feraheme mit Antikörpern stieß zum einen allein technisch auf Schwierigkeiten, weil die Milthenyi-Methodik zur Reinigung der modifizierten Produkte nicht angewandt werden kann. Andererseits ist die exakte Zusammensetzung der Hülle weitgehend unbekannt (der Hersteller gibt lediglich als Hauptkomponente Sorbitolether an). Ankopplungsmechanismen an solche Hüllen sind in der Literatur nicht beschrieben, so dass entsprechende Versuche ohne Einbindung des Herstellers schwierig sein dürften.

Zu Projektende wurden erfolgreich experimentelle Labortests gestartet, um USPIO-Magnetit@Dextran-Teilchen herzustellen und als wässrige Dispersion zu stabilisieren. Die Teilchenoberfläche kann z.B. über die Bildung einer Aldehydgruppe modifiziert werden, doch wurden solche Untersuchungen aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Eingesetzte Kontrastmittel auf Basis magnetischer Eisenoxid nano (MION) Teilchen

Folgende Kontrastmittel auf wässriger Basis (bekannt auch unter dem Namen Magnetflüssigkeiten) wurden gekauft, oder hergestellt, charakterisiert und teilweise von den Partnern untersucht.

**Tabelle 1:** Liste und Hersteller von käuflichen Kontrastmitteln

Handelsname, Firma	Zertifiziert	Magnet. Teilchen	Hüllkomponente/ Zetapotenzial	SPIO/ USPIO/ nm	Fe-Konz. mg/ml
Ferucarbotran 511 [Meito, Japan]	als RESOVIST, ab 2010 vom Markt	Maghemit	Carboxyl. Dextran -15 bis -20mV	55	53,9
Ferucarbotran, ATDM 097		Maghemit	Maghemit	28	15,3
Ferucarbotran, ATDM 064		Maghemit	Maghemit	74	15,4
FERAHEME [AMAG, USA]	nur in USA	Maghemit	Sorbitol-ethylether, um 0 mV, nicht eindeutig	25	32
Feridex [AMAG]	USA, Lizenz für Bayer	Magnetit	Dextran	< 50	11,2
Sinorem/Combixidex/ [Guerbet, FR]	ab 2007 vom Markt	Maghemit	Dextran	20-40	
MION Dispersionen [NanoPET, D]	nicht zugelassen Resovist?	Maghemit	?	10-100	
MION [Ferropharm]	nicht zugelassen	Magnetit	Citrat, negativ geladen	10-60	
MION [Innovent e.V., Jena]	nicht zugelassen	Magnetit	Carboxyliertes Dextran, auch Modifikationen	>80	
MION mit Goldhülle [Lifegen.com, XIAN, China]	nicht zugelassen	10nm-Magnetitkern, 20 nm gesamt	Gemäß Goldoberflächenchemie	unbekannt	1

**Tabelle 2:** Von Capsulation Pharma AG entwickelte MF-Laborprodukte (alle auf Basis von Magnetit-Teilchen)

Produkt	Hülle	Z(ave)	Zetapotenzial	pH-Bereich	Maus-tauglich	Modifizier-fähig
als Zwischenprodukt	ohne Hülle, Hydrosol	25-150	+15 bis +60	3-6	nein	ja
	ohne Hülle, Hydrosol	25-150	-20 bis -50	>10	nein	ja
MION-Dispersion	Citrat	25-100	-20 bis -60	6.5-8	ja	nein
MION-Dispersion	Polyasparagat (PAA)	25-150	-30 bis -60	6-8	ja	ja
MION-Dispersion	Dextran T10	<50	etwa 0	6-8	ja	ja

**Tabelle 3:** Laborprodukt aus dem Institut für Medizintechnik, Lübeck: Frau Dr. Lüttke-Buzug, Magnetit-MF

Magnetit-MF	Hülle	Z(ave)	Zeta-potenzial	pH-Bereich	Maus tauglich
Wasserbasis	Dextran T 40?	ca.50	0	6-8	

Weitere Forschergruppen entwickeln klinisch geeignete MF für den eigenen Gebrauch, z.B. Gruppe Prof. Hilger (Uniklinik, Jena), Gruppe Prof. Alexiou (Magnetic carrier, Uni-Klinik Erlangen).

## **3.2 Ergebnisse zur Herstellung und Charakterisierung von ultra-smal-paramagnetic iron-oxide (USPIO)-Kontrastmitteln bei Capsulation 2010/2011**

Zwei Strategien wurden bei der Verfahrensentwicklung verfolgt:

### **3.2.1 Der 2-Stufen-Prozess**

Es erfolgt zunächst die Herstellung eines USPIO-Zwischenprodukts, das ist ein Magnetit-Hydrosol, welches keine organischen Bestandteile enthält. Die Teilchen dieses Zwischenprodukts werden in einem zweiten Schritt mit den gewünschten biokompatiblen organischen Substanzen umhüllt, gewaschen und dann in der wässrigen Phase stabilisiert. Das Zwischenprodukt ist damit vorteilhaft für die Herstellung aller anderen MION-Dispersionen geeignet.

#### **Ergebnisse zu 2.2.1**

Das Hydrosol wurde nach dem beschriebenen Rezept hergestellt, hatte den optimalen pH-Wert-Bereich von 3-5 und die geringe elektrische Leitfähigkeit von 100-400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , und wurde dann in der folgenden Weise weiterverarbeitet:

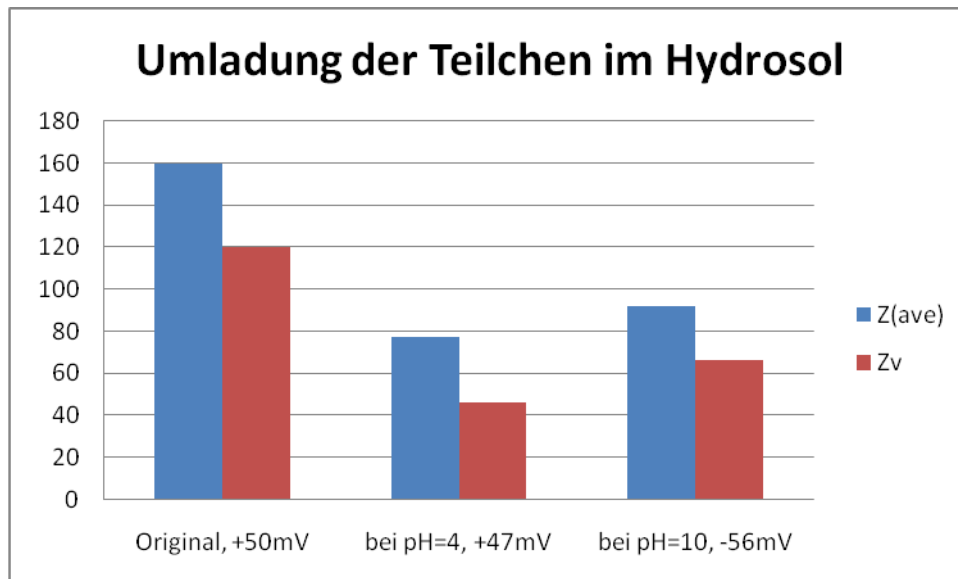
- > Filtration durch ein Glaswolle, um gröbere Bestandteile zu entfernen,
- > Ultraschalleinwirkung auf die Dispersion (nur die Sonotrode von Balduin hatte die nötige Power), um Agglomerate möglichst vollständig zu zerstören,
- > Zentrifugation bei bis zu 10000 x g,
- > magnetische Filtration durch einen Magnetfeldgradienten,
- > und/oder magnetische Filtration nach Milthenyi-Technik.

Z(ave)-Werte der Magnetithydrosole um die 50 nm waren noch mit genügend hoher Teilchenkonzentration zu erreichen, die USPIO-Sole waren nur noch gering konzentriert, eine Aufkonzentrierung durch Wasserentzug wurde nicht versucht, sollte aber mit Problemen verbunden sein. Auf jeden Fall sind getrocknete Teilchen nicht mehr redispergierbar.

Die Teilchen dieser Sole hatten ein positives Ladungsvorzeichen.

Neu ist, dass es gelang, das Ladungsvorzeichen zu ändern (umzuladen), ohne das Z(ave) zu ändern, indem man eine schnelle pH-Änderung in einem pH-Bereich > 10 durch Laugenzusatz bewirkte. Auch diese Sole waren kolloidal langzeitstabil, wurden aber im weiteren Projektverlauf nicht verwendet.





**Abbildung 1:** Ergebnis Teilchenumladung: Das Originalhydrosol mit einem pH-Wert von 4 und einer elektrischen Leitfähigkeit von ca. 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Dieses Sol wurde 60 h lang auf einen starken Seltenerdenmagneten gestellt (gradH etwa  $10^{10}\text{A}/\text{m}^2$ ). Der Überstand enthielt die kleineren Teilchenagglomerate (positiv geladen, Säule 2), nach ihrer Umladung erhielt man Säule 3 mit den negativ geladenen Teilchen, beide MF waren langzeitstabil.

In Tabelle 4 sind die bisher kleinsten Z(ave) und Z(v) gelistet, hier vom Hydrosol 020910, mit pH=4, elektrische Leitfähigkeit: 270  $\mu\text{S}/\text{cm}$

**Tabelle 4:** Eigenschaften der Hydrosole

Behandlung	Z(ave)	PI	Z(v)
US-Sonotrode, Zentrifugation bei 5000x g, Überstand	74,6	0,184	52,7
GradH 60 h, Überstand	47	0,155	32

## Ergebnis

Die magnetische Separation erwies sich als einzige Methode, doch kleinere Werte als die angegebenen Z(ave)-Werte wurden nicht erhalten, die Eisenkonzentration im Überstand war zudem sehr gering. Eine Aufkonzentrierung ist außerdem sehr zeitaufwendig.

Modifizierung der positiv geladenen Teilchen der Hydrosole mit Citrat und Polyasparagat:

Ergebnis: Die Modifizierung war zwar bei allen Beispielen erfolgreich, doch konnte kein kleinerer Z(ave)-Wert erreicht werden, als vor der Modifizierung, auch nicht mit Hilfe von bekannten Dispergiermethoden.

Somit schied diese Verfahrensvariante zur Herstellung von modifizierten USPIO-Teilchen aus.

### 3.2.2 Der 1-Stufen-Prozess:

Alle Komponenten, inklusive der Eisensalze und der biokompatiblen Bestandteile für die Hüllen, werden in Wasser aufgelöst, und die Synthese der Teilchen erfolgt in dieser Mischung durch Zusatz von Alkalien.

Ergebnisse zu 2.2.2, Hülle besteht aus Polyasparaginsäure

Dieses 1-Stufenverfahren wurde mit Polyasparaginsäure als Hüllvariante getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Modifizierung der Teilchen in den stabilen SPIO und USPIO Hydrosolen mit Adsorbentien

Tab. 5: Eigenschaften der dispergierten Magnetit@Polyasparagat-Teilchen

Bezeichnung: Herstellungstag/ hydrodyn. Teilchen größe [nm]	Art des Eisenoxids	Extinktion der Verdünnungen; Verdünnungs- faktor	Fe-Konzentr. im Original, über Eichkurve ermittelt [mg/ml]	Fe-Konzentr. in den Mustern [µg/ml], Verdünnungs- faktor des Originals	Z(ave) [nm] 25.01. 2011	PI
PAA121210-<30	Magnetit	zu wenig		Nicht verdünnt	25	?
PAA121210-36	Magnetit	0,56 1:100	1,08	2,16 1:50	37	0,209
PAA121210-56	Magnetit	1,79 1:1000	3,44	34,4 1:100	54	0,240

Verfahrensbeschreibung:

Die Herstellung dieser MF erfolgte nach dem 1-Stufenverfahren, d.h. die Magnetitteilchen wurden in Gegenwart von PAA in der alkalischen wässrigen Phase synthetisiert, mit dest. Wasser gewaschen und danach sofort bei einem pH-Wert von 7 stabilisiert.

Danach erfolgte eine Abtrennung größerer Teilchen durch Sedimentation über Nacht, Ultraschalleinwirkung mit anschließender 30-minütiger Zentrifugierung bei 5000 U/Min (etwa 2300 g), und teilweiser Dispergierung der Aggregate des Überstandes mittels Ultraschall (Sonotrode von BANDELIN) und nochmaliger Zentrifugation.

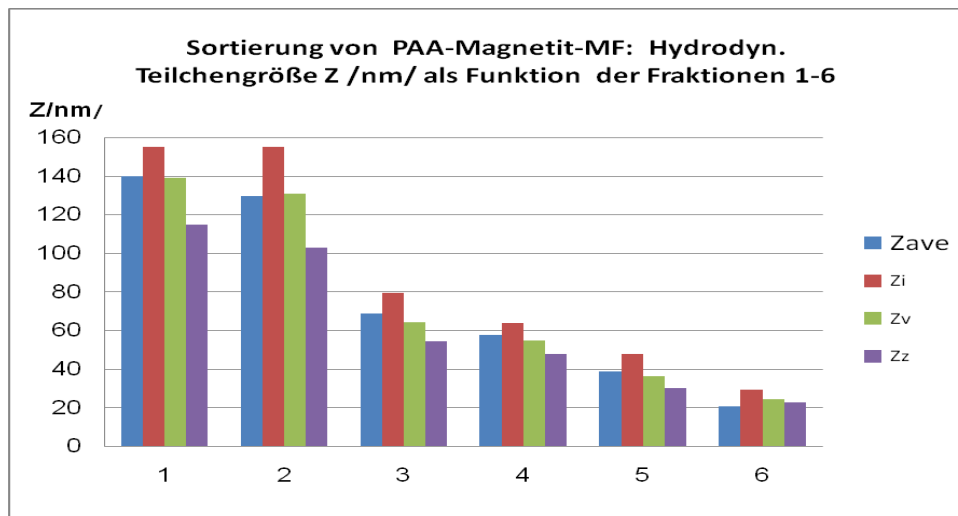
Erst danach erfolgte die eigentliche Teilchensortierung, deren Ergebnisse im Diagramm dargestellt sind.

Die hydrodynamische Teilchengröße Z wurde mittels hydrodynamischer Lichtstreuung am Zetasizer 3000 (MALVERN) nach einem festgelegten Algorithmus an den stark verdünnten Mustern gemessen. Das Messgerät zeigt 4 Messwerte an: einmal Z(ave), weiterhin ein berechneter Durchschnittswert aus den nach der Streulichtintensität (Zi), dem Teilchenvolumen (Zv) und der Teilchenzahl (Zz) gewichteten Werte, die ebenfalls im Diagramm eingetragen wurden. Je enger die Messwerte zusammenliegen, umso enger ist die Teilchengrößenverteilung. Die absoluten Messwerte ergeben sich aus der Stärke der Brownschen Bewegung der Teilchen, wobei auch die Teilchenform und die Hüllgröße (einschließlich Hydratation, Durchlässigkeit, Festigkeit, usw.) eingehen. Der absolute Wert ist ein Richtwert, doch bei gleicher Teilchenzusammensetzung kann man schon Rückschlüsse durch den Vergleich der Messwerte der einzelnen Fraktionen erhalten.

Die Teilchensortierung erfolgte zum Teil unter intensiven Bedingungen. So wurde die Sonotrode bei einer Leistung von 90-95% über wenigstens 1 Minute benutzt (dabei kann das Becherglas kaputt

gehen, die Plasterröhrchen können schmelzen!), wobei die MF fast Siedetemperatur erreichte. Doch die Teilchen hielten das aus, die Hülle wurde nicht von der Teilchenoberfläche desorbiert.

Die Teilchen überstanden auch Zentrifugationsgeschwindigkeiten bis zu 10 000 U/Min (etwa das 10200-fache der Erdbeschleunigung  $g$ ) über 30 Minuten, oder überstanden auch starke Magnetfeldgradienten über mehrere Tage und sogar Wochen, wobei die dabei agglomerierten Teilchen schon durch Schütteln wieder vollständig redispergiert werden konnten, durchaus eine Überraschung. Überhaupt erwiesen sich alle Fraktionen als lagerstabil. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Teilchenkonzentration zu erhöhen, lediglich die letzte Fraktion 6 ist stark verdünnt, und wohl für Mausuntersuchungen zu dünn. Die Ergebnisse sind in der Abb. 2 zusammengefasst:



**Abbildung 2:** Teilchensortierung mittels Zentrifuge

Es ist bereits nachgewiesen, dass die Teilchenhüllen mit Antikörpern modifiziert werden können (im Gegensatz zu den Citrat-MF), doch entsprechende Untersuchungen wurden nicht durchgeführt, weil schon die Originale keinen Anreicherungseffekt zeigten.

### 3.2.3 Ausfällung der Teilchen im extremen Überschuss des Stabilisators.

Die Kristallsynthese und insbesondere das Kristallwachstum sind stark eingeschränkt, die Bildung von Agglomeraten ist damit ausgeschlossen. Allerdings ist die Säuberung der Dispersion, insbesondere von den organischen Bestandteilen aufwendig und erfolgt über Dialyse. Oft ist die Teilchenkonzentration sehr gering, so dass diese aufkonzentriert werden müssen. Das geschieht durch Entfernung des Lösungsmittels oder Instabilität mittels Lösungsmittelzusatz, z.B. Methanol, welches allerdings danach zu 100 % entfernt werden muss (Dialyse).

Ergebnisse zu 2.2.3, Teilchen mit Hüllen aus neutralem Dextran, Zetapotenzial etwa 0

Das Verfahren ist im US-Patent zur FERAEME-Herstellung bzw. vor kurzem auf der Website von Prof. Moser, Uni Wien beschrieben, allerdings nicht im Detail, vgl.:

[aeccc.univie.ac.at/.../Fachbereichsarbeiten/.../FBA\\_Poremba\\_Synthese\\_Nanopartikels.pdf](http://aeccc.univie.ac.at/.../Fachbereichsarbeiten/.../FBA_Poremba_Synthese_Nanopartikels.pdf).

Vier Tests wurden durchgeführt und zwar mit Dextran T40 (MG 40000) und **Dextran T 9-11** (MG: 9000-11000, Hersteller: SIGMA-ALDRICH).

Herstellung von Muster 110411 mit Dextran T 9-10 (Sigma-Aldrich):

25 g Dextran wurden bei 50 °C in dest. Wasser unter Rühren mittels Magnetprüher vollständig gelöst, eine viskose Lösung wurde erhalten. Außerdem wurden 2,0 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  und 5,4 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 10 ml dest. Wasser gelöst, durch einen Hartpapierfilter filtriert und der Dextranlösung bei Raumtemperatur unter Rühren zugesetzt.

Sodann wurden unter Rühren 10 ml konzentrierte Ammoniumhydroxidlösung (25 %) 1-ml-weise hinzugesetzt, nach dem 5. Milliliter bildete sich eine Schwarzfärbung (Ausfällung der Magnetitteilchen), danach ein Gel, der Magnetprüher rührte nicht mehr durch, wohl ein Fehler!

Diese Lösung wurde 1 Stunde bei 80-85 °C unter Rühren mit einem Magnetprüher erwärmt, abgekühlt und durch Glaswolle filtriert. Ausbeute 100 ml, agglomeratfrei, gute Farbe. Die Dispersion wurde dann in einen Bio-Dialyseschlauch eingefüllt und wenigstens 10 Tage gegen dest. Wasser dialysiert, wobei das Wasser anfangs stundenweise, dann tageweise ausgetauscht wurde. Es befand sich immer noch reichlich Dextran in der Lösung, außerdem war die Dispersion stark verdünnt. Sie wurde durch Glaswolle, Hartfilter filtriert und danach durch einen 0,45 µm Nylon-Filter gedrückt. Der Filtriereffekt war gering!

Zur Konzentrierung wurde in Methanol umgefällt, das Methanol bei 80 °C wieder verdampft und durch einen 0,45 µm oder 0,22 µm-Filter filtriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 (→ siehe nächste Seite) zusammengestellt:

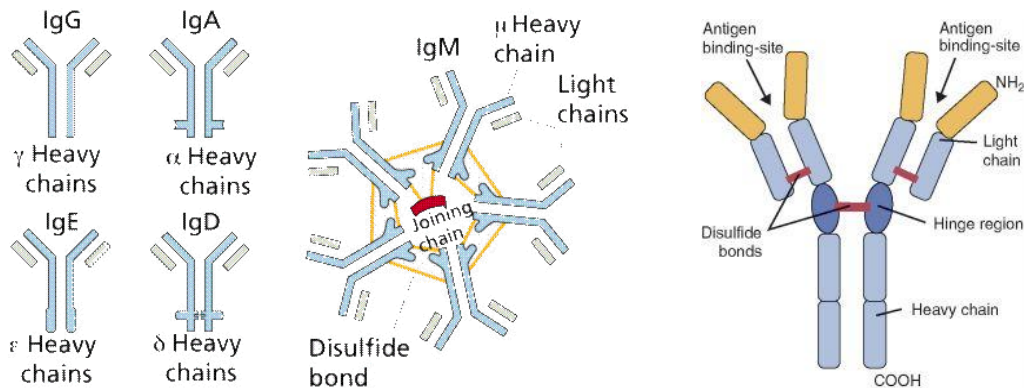
**Tab. 6:** Versuche mit Dextran, Zusatz im großen Überschuss

<b>Muster</b>	<b>Dextran-Hülle</b>	<b>pH</b>	<b>Zeta [mV]</b>	<b>Z(ave) [nm]</b>	<b>Zv [nm]</b>	<b>Fe- Konz. [mg/ml]</b>
080311 nach Patent	T40	7	0	14	8	sehr gering
290311 nach Website	T40	7	0	79	51	1.0
250311 nach Website, kleiner Ansatz	T9-T11	7	0 ...+3	45	19	1.1
110411 nach Website	T9-T11	7	0 ...+3	74	41	2.85

## 4. Ansätze zur Funktionalisierung der magnetischen Nanopartikel

Um die erhaltenen magnetischen Partikel mit einem Antikörper (AK) zu funktionalisieren, müssen die Oberfläche der Magnetitteilchen und der Antikörper selbst elektrische Ladungen aufweisen, damit die auf Elektrostatik basierende LBL-Technologie zur Anwendung kommen kann.

Wegen der intensiven Kosten des eigentlich zu verwendenden Antikörpers Antikollagen VI wurden zunächst Versuche mit einem Modell-AK durchgeführt, Immunglobulin G (IgG). IgG ist ein Glykoprotein und eigentliches Immunglobulin des Blutes, es weist die höchste Serumkonzentration aller Immunglobuline auf und hat die stärkste Abwehrwirkung aller Immunglobuline gegen fremde Substanzen im Blut. Das Molekulargewicht beträgt ca. 144 kD, die Form des AK ist typisch Y-förmig: ein Tetramer aus zwei langen („schweren“) und zwei kurzen („leichten“) Proteinketten. (Abb. 3) Die Bindungsstellen, die an Antigene (Fremdkörper, zum Beispiel spezifische Oberflächenstrukturen von Bakterienzellen) oder Haptene binden können, befinden sich an den kurzen Enden des „Y“.



**Abbildung 3:** Aufbau eines Antikörpers mit der charakteristischen Y-Form. Die Bindungsstellen

Die Vorversuche wurden mit „IgG from rat serum“ durchgeführt, bezogen über Sigma Aldrich, Deutschland.

### 4.1 Analytische Bestimmung des IgG-Gehaltes

Zunächst wurden Löslichkeitsuntersuchungen in Wasser (H<sub>2</sub>O), isotonischem H<sub>2</sub>O (154 mM NaCl) und salinem Phosphatpuffer (PBS) durchgeführt. Dies geschah sowohl mit und auch ohne Anwesenheit magnetischer Partikel, um über anschließende Partikelgrößenmessung Aufschluss über den Zusammenhang IgG-Konz.-Salzkonz.-Teilchenaggregation zu erhalten. Als Resultat dieser Untersuchungen ist nur mit sehr niedrig konzentriertem IgG zu arbeiten, da aufgrund der zunehmenden Partikelgröße bei ansteigender Salzkonzentration

Analyse der Lösungen hinsichtlich Partikelgröße → steigt bei Salzzugabe, kann aber bei hinreichend geringer Konzentration vernachlässigt werden, daher Arbeiten bei c↓.

## 4.2 Proteinbestimmung

In biochemischen und biologischen Laboren muss häufig eine Proteinbestimmung durchgeführt werden. Hierzu können zwei Methoden angewendet werden: 1. quantitative Aminosäureanalyse oder 2. die Gewichtsbestimmung des reinen Proteins als Feststoff (Lottspeich, 2006). Letztere kann sowohl nach der Vakuumgefrieretrocknung oder nach der Hitzetrocknung bei 104 bis 106°C durchgeführt werden. Jedoch sind beide Verfahren für die Proteinbestimmung in Flüssigkeiten sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

Oft reicht es aus, den ungefähren Proteingehalt mithilfe eines Standards und zugehöriger Kalibrierung kalorimetrisch zu ermitteln. Je nach Eigenschaften der Proteine, können verschiedene Farbreaktionen oder spektroskopische Methode verwendet werden.

### 4.2.1 Quantitative Bestimmung des Proteingehalts mittels Färbetests

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts erfolgt meist durch Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine durch farbstoffbildende Reagenzien.

Die Höhe der Konzentration der reagierenden Gruppe gibt die Intensität des Farbstoffes an und kann in einem Spektralphotometer direkt gemessen werden.

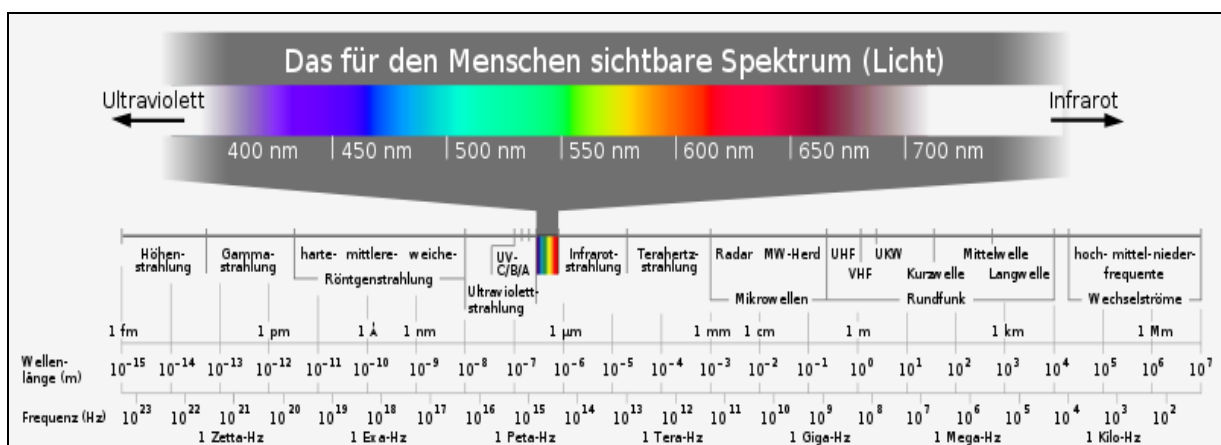


Abbildung 4: Elektromagnetisches Spektrum [<http://www.violettglas.biz>]

Folgende unterschiedliche Färbemethoden wären zur Analyse denkbar:

#### Biuret-Assay (Wellenlänge: 540-550 nm)

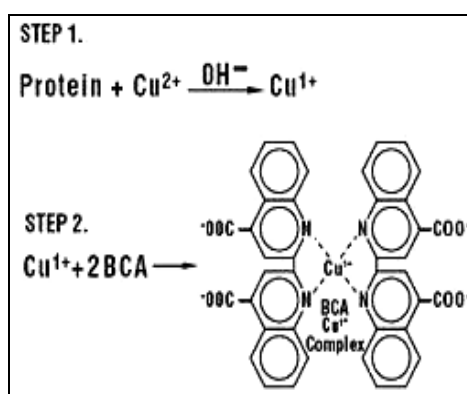
Die Farbreaktion des Biuret-Assays beruht auf die Reaktion von Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat in wässriger alkalischer Lösung. Das Reaktionsprodukt ist ein rotvioletter Farbkomplex zwischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und je zwei Biuretmolekülen. Diese Reaktion entsteht bei mindestens zwei CO-NH-Gruppen und wird dadurch für den Nachweis von Proteinen und Peptiden verwendet. Auch Tyrosinreste tragen dazu bei, dass diese Farbreaktion entstehen kann. Der Biuret-Assay gilt als einer der unempfindlichsten Assays im Vergleich zu weiteren Farbttests (Lottspeich, 2006).

#### Lowry-Assay (Wellenlänge: 750, 650 oder 540 nm)

Der Lowry-Assay ist eine Kombination aus Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich hier ein Kupfer-Protein-Komplex. Dieser unterstützt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat durch Tyrosin, Tryptophan und in geringen Mengen auch Cystein, Cystin und Histidin des Proteins. Dabei wird vermutlich  $\text{Cu}^{2+}$  im Kupfer-Protein-Komplex zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Das  $\text{Cu}^+$  reagiert dann mit dem Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagens. Diese zusätzliche Reaktion steigert die Intensität der blauen Färbung, im Vergleich zu dem einfachen Biuret-Assay, und somit steigt die Sensitivität des Tests.

#### Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) (Wellenlänge: 565 nm)

Der BCA-Assay ist eine Kombination aus Biuret-Reaktion mit dem selektiven Bicinchoninsäurekomplex und basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und Peptidbindungen. BCA bildet spezifisch mit dem entstandenen  $\text{Cu}^+$  einen Farbkomplex. Dieses Redoxverhalten der beteiligten Gruppen ist temperaturabhängig. Der BCA-Assay kann somit für gewünschte Sensitivität über die Temperatur variiert werden. Bei Standardproteinen (z.B. Rinderserumalbumin, Chymotrypsin oder Immunglobulin G) ist der BCA-Assay vergleichbar mit dem Lowry-Assay. Große Abweichungen gibt es mit Avidin, einem Glykoprotein des Hühnereiweiß. Vorteile gegenüber dem Lowry-Assay sind jedoch die einfache Durchführung, die beeinflussbare Sensitivität und eine gute zeitliche Stabilität des gebildeten Farbkomplexes. Nachteilig sind allerdings die höheren Kosten, die durch das teure Natriumsalz der Bicinchoninsäure entstehen.



**Abbildung 5:** Funktionsweise des Bicinchoninsäure-Assay in zwei Schritten [www.media.wiley.com]

#### Bradford-Assay (Wellenlänge: 595 nm)

Bei diesem Assay sind keine Kupfer-Ionen für die Färbung der Probe verantwortlich, sondern der blaue Säurefarbstoff, der als Coomassie-Brillantblau bezeichnet wird. Dieser bindet sich unspezifisch an



kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Am wichtigsten ist die Wechselwirkung mit Arginin, weniger die mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Der Bradford-Assay ist um den Faktor 2 sensitiver als der Lowry- und BCA-Assay. Somit ist er der empfindlichste quantitative Färbeassay und auch der einfachste. Die Stammlösung besteht aus dem Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure. Größter Nachteil dieses Assays ist, dass bei gleichen Mengen an verschiedenen Standardproteinen erhebliche Differenzen in den jeweiligen Absorptionskoeffizienten verursacht werden können. Dies soll durch eine Verbesserung des Reagens, Coomassie Plus-Reagent, behoben werden. Bei dem Coomassie Plus-Assay ist die Empfindlichkeit des Reagens herabgesetzt, womit Schwankungen von Protein zu Protein viel geringer ausfallen.

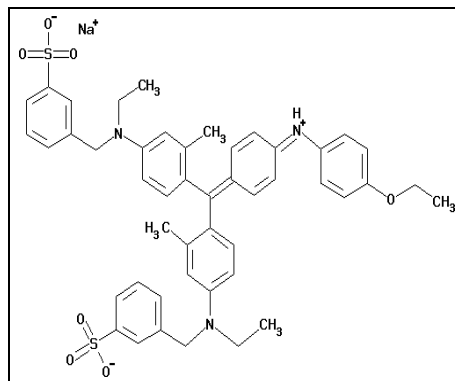
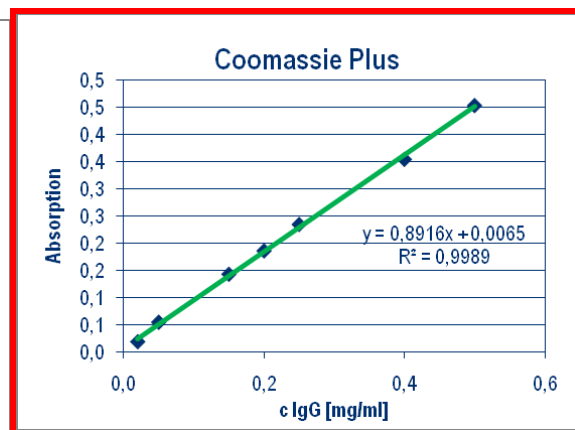
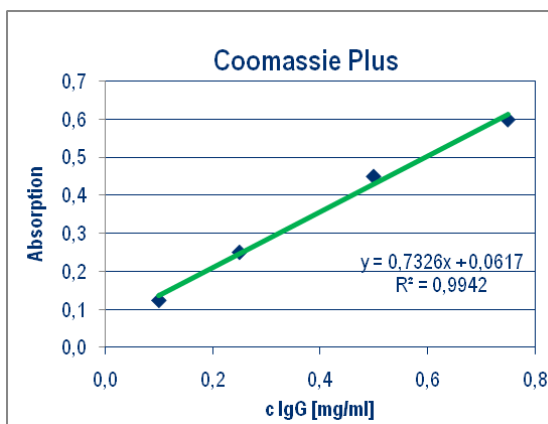
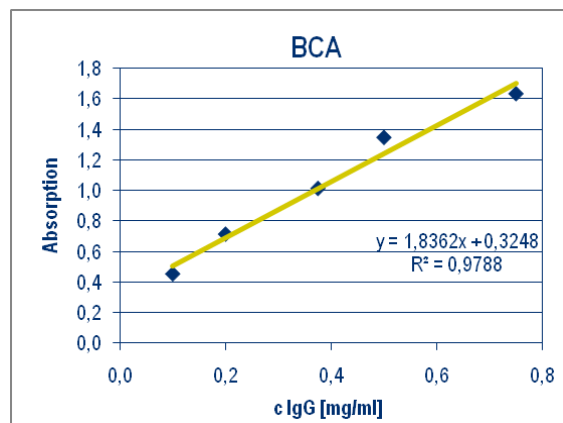
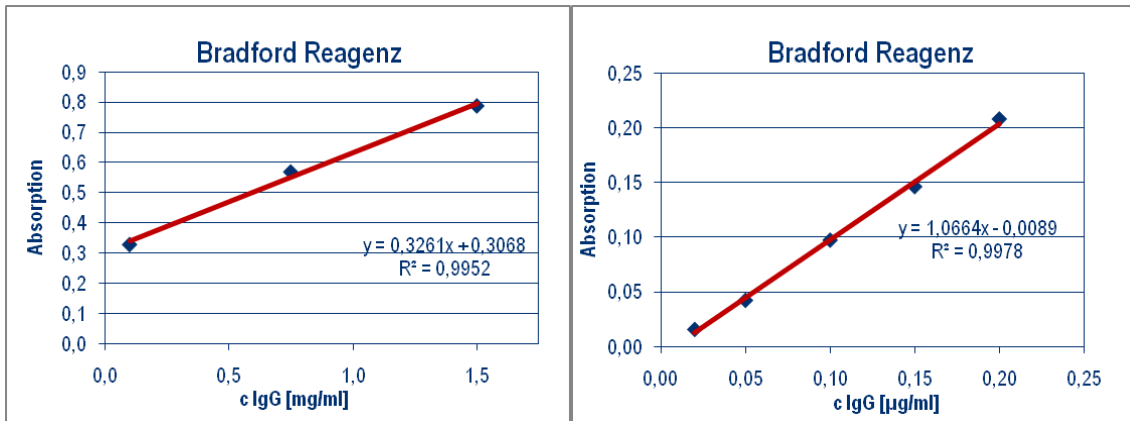


Abbildung 6: Coomassie-Brillantblau [www.merck-chemicals.de]

#### 4.2.2 UV-Vis-Spektroskopie

Das Prinzip der UV-Visual-Spektroskopie beruht darauf, dass die Moleküle mit elektromagnetischen Wellen im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Lichts bestrahlt und dabei Valenzelektronen angeregt werden. Das heißt, sie werden in ein höheres Energieniveau angehoben. Um ein Elektron beispielsweise von einem besetzten (HOMO) auf ein unbesetztes, höheres Orbital (LUMO) anzuheben, muss die Energie des absorbierten Photons genau der Energie Differenz zwischen den beiden Energieniveaus entsprechen. Die Funktion des Zweistrahlphotometers ist in der Abbildung 7 dargestellt. Die Lichtquelle (Xenon- oder Deuteriumlampe) sendet den Messlichtstrahl durch den Monochromator, wo dann die Wellenlänge des Lichtstrahls bestimmt wird. Daraufhin wird Lichtstrahl von einem Strahleiter in einen Referenz- und einen Probestrahl geteilt. Der Strahl durchsetzt die Probe bzw. die Referenzküvette und wird zu einem Detektor registriert (Lottspeich, 2006). Die Art der angeregten Elektronen sind die Valenzelektronen. Sie liegen in den äußersten Orbitalen und sind an den Bindungen („Valenzen“) zwischen den Atomen beteiligt.

Für alle o.g. genannten Methoden wurden Kalibriergeraden am UV-Vis-Spektrometer erstellt und verglichen. Letztendlich wurde der Coomassie-Plus-Test für alle Folgeuntersuchungen ausgewählt, da neben der besten Kalibriergeraden (Abbildung 7 → siehe nächste Seite, roter Kasten) auch die relativ einfache Handhabbarkeit dieser Methode für deren Anwendung sprechen.



**Abbildung 7:** Kalibriergeraden am UV-Vis-Spektrometer für verschiedenen Färbemethoden und IgG-Konzentrationen

## 4.3 Modifizierung der magnetischen Nanopartikel mit IgG

### 4.3.1 Vorversuche mit IgG from rat serum

Da IgG sehr kostenintensive Substanzen sind, wurden erste Versuche zunächst mit der Modellschubstanz IgG from rat serum (Sigma Aldrich) (einem polyklonalen Antikörper) durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen der IgG-Lösungen lagen dabei zwischen 0,02 und 0,15 mg·ml<sup>-1</sup>. Beladung und Analyse der zu modifizierenden Magnetitteilchen erfolgte dabei nach folgender Abfolge:

1. Beladung 24 Stunden über Nacht bei T = 4 °C
2. Vorlage der Partikeldispersion
3. Zugabe der IgG-Lösung
4. Partikelgrößenmessung
5. anschließend 10 min Zentrifugation zur Separation der Partikel
6. dreimaliges Waschen des erhaltenen Pellets mit separater Analyse des Waschwassers
7. Bestimmung der IgG-Restkonzentration im Überstand mittels UV-Vis

Die erhaltenen Resultate sind in den folgenden Tabellen 7-9 zusammengetragen:

**Tabelle 7:** Ergebnisse für Probe MK271109

<b>Überstand 1</b>	0,006	0,008	0,006	IgG [mg/ml]
<b>Überstand 2</b>	0,000	0,000	0,000	
<b>Überstand 3</b>	0,000	0,000	0,000	
<b>c<sub>0</sub> IgG</b>	<b>0,020</b>	<b>0,050</b>	<b>0,150</b>	IgG [mg/ml]
<b>IgG auf Partikeln</b>	0,014	0,042	0,144	
<b>Prozentual</b>	<b>69</b>	<b>85</b>	<b>96</b>	<b>%</b>

**Tabelle 8:** Ergebnisse für FERAHEME

<b>Überstand 1</b>	0,022	0,059	0,156	IgG [mg/ml]
<b>Überstand 2</b>	0,000	0,000	0,001	
<b>Überstand 3</b>	0,000	0,000	0,000	
<b>c<sub>0</sub> IgG</b>	<b>0,020</b>	<b>0,050</b>	<b>0,150</b>	IgG [mg/ml]
<b>IgG auf Partikeln</b>	0,000	0,000	0,000	
<b>Prozentual</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>%</b>

**Tabelle 9:** Ergebnisse für Ferucarbotran

<b>Überstand 1</b>	0,010	0,006	0,015	IgG [mg/ml]
<b>Überstand 2</b>	0,000	0,000	0,002	
<b>Überstand 3</b>	0,000	0,000	0,000	
<b>c<sub>0</sub> IgG</b>	<b>0,020</b>	<b>0,050</b>	<b>0,150</b>	IgG [mg/ml]
<b>IgG auf Partikeln</b>	0,010	0,044	0,132	
<b>Prozentual</b>	<b>50</b>	<b>88</b>	<b>88</b>	<b>%</b>

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die höchste Beladung bei MK271109 und der höchsten Ausgangskonzentration an IgG (c<sub>0</sub> max.) auftrat. Eine noch relativ hohe Beladung konnte bei Ferucarbotran erzielt werden. Dies generell für höhere c<sub>0</sub>. An Feraheme konnte das für diese Vorversuche eingesetzte IgG nicht gebunden werden, was sich u.a. damit erklären lässt, dass Feraheme, bedingt durch dessen chemischen Aufbau, keine Gruppen für elektrostatische Wechselwirkungen zur Verfügung stellt.

Der Coomassie Plus Test ist jedoch als eine geeignete Nachweismethode für die Bindung von AK an die magnetischen Nanoteilchen anzusehen.

### 4.3.2 Beladung mit Anti CD68 und Collagen VI

Die eigentlichen Beladungsversuche von magnetischen Nanopartikeln mit Antikörpern wurden mit folgenden, vom Projekt-Konsortium vorgeschlagenen, zwei Substanzen durchgeführt:

AntiCD68 = IgG-Flu488 (from rat)

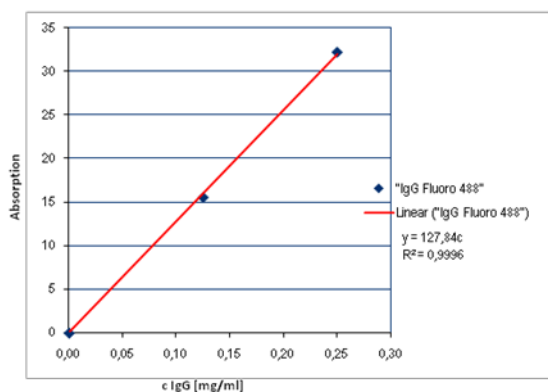
- AbD Serotec (a division of MorphoSys) UK
- Katalog MCA341A488
- monoklonaler Antikörper
- farbstoffmarkiert mit Alexa Fluor® 488
- IgG-Konzentration 50 µg/ml in PBS-Puffer,

pAB anti-Collagen Type VI antibody (from rabbit) 1,2 mg/ml

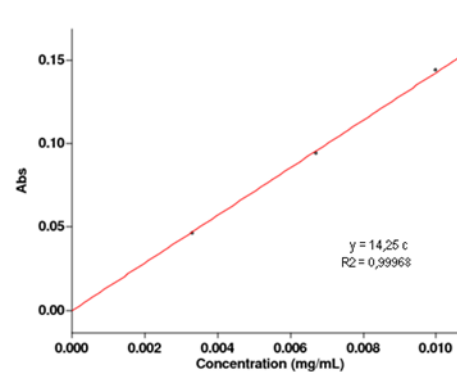
- NOVUS Biologicals USA
- Katalog NB120-6588
- polyklonaler Antikörper
- aC-Konzentration 1,2 mg/ml (83 µl).

Abbildung 3 zeigt die für beide Antikörper aufgenommenen Kalibriergeraden am UV-Vis, mittels derer die Beladung der Magnetsuspensionen analysiert wurden.

➤ IgG-Flu488 (AntiCD68)



➤ Anti Collagen VI



**Abbildung 8:** Kalibriergeraden am UV-Vis-Spektrometer für IgG-Flu488 (li) und aC VI (re)

### 4.3.3 Beladung mit AntiCD68

Die Beladung der Proben MF-Citrat 141109, Feraheme und Ferucarbotran mit dem AK IgG-Flu488 erfolgte nach folgendem Versuchsschema:

1. Partikeldispersionen 1:10 mit Wasser verdünnt
2. IgG-Lösungskonzentration  $c_0 = 1,25 \mu\text{g/ml}$
3. Zugabe 1:1 von IgG-Lösung zu der Partikeldispersion
4. Beschichtungszeit: 24 Stunden
5. Abzentrifugieren der Partikel (in Vorversuchen gezeigt, dass kein AK im ÜS verbleiben)
6. Überstandsmessung am Fluorimeter auf Restgehalt an AK

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Analyse zusammengetragen.

**Tabelle 10:** Ergebnisse Beladung von MF-Citrat 141109, Feraheme und Ferucarbotran mit AntiCD68

Partikel	Konzentr. IgG-Flu488	Emission IgG-Flu488-Lösung	Emission Überstand abzentrifugierter Proben	Prozent IgG-Flu im ÜS	Prozent Beladung IgG-Flu	Size [nm]	Zeta [mV]
<b>Ferucarbotran</b>	1,25 $\mu\text{g/ml}$	155,49	44,484*	<b>27,89 %</b>	<b>72,11 %</b>	$Z_{(ave)}$ <b>54,0</b>	<b>-30,2</b>
<b>Feraheme</b>	1,25 $\mu\text{g/ml}$	155,49	55,568*	<b>35,74 %</b>	64,26	$Z_{(ave)}$ 56,3	-29,3
<b>MF-Citrat 141109</b>	1,25 $\mu\text{g/ml}$	155,49	63,329	<b>40,73 %</b>	59,27	$Z_{(ave)}$ 83,5	-38,8

#### Auswertung

Aus der Rückrechnung aus der IgG Flu488-Konzentration in den Überständen wurden die Beladungen der Partikel mit dem Antikörper berechnet, die höchste Beladung ist bei Ferucarbotran zu verzeichnen (72%), gefolgt von Feraheme und den MF-Citrat-Partikeln, die mit 64% bzw. 59% nah beieinander liegen. Das Zetapotential ist für alle verwendeten Partikel mittel bis stark negativ, was für eine ausreichende Belegung der Partikeloberflächen spricht. Der für die Partikelgrößencharakterisierung herangezogene  $Z_{ave}$ -Wert der PCS-Messung führt zu dem Ergebnis, dass es eine leichte Zunahme der Werte gegenüber den unbeladenen Partikeln gibt, jedoch liegen diese weiter im extrem kleinen Nanometerbereich. Damit ist ausgeschlossen, dass es zu Aggregation gekommen ist, die beladenen Partikel in Suspension sind demzufolge weiterhin stabil.

#### 4.3.4 Beladung mit pAB anti-Collagen Type VI antibody

Die Beladung der Proben MF-Citrat 141109, Feraheme und Ferucarbotran mit pAB anti-Collagen Type VI antibody erfolgte nach folgendem Versuchsschema:

1. Partikeldispersionen 1:10 mit Wasser verdünnt
2. IgG-Lösungskonzentration  $c_0 = 0,2 \text{ mg/ml}$
3. Zugabe 1:1 von IgG-Lösung zu der Partikeldispersion
4. Beschichtungszeit: 3 Tage
5. Abzentrifugieren der Partikel
6. Überstandsmessung mit Coomassie-Test (UV-Vis)

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Analyse zusammengetragen.

**Tabelle 11:** Ergebnisse Beladung von MF-Citrat 141109, Feraheme und Ferucarbotran mit aC Type VI

Partikel	Konzentr. pAB aC VI	Theor. max. pAB aC IV - Konzentration (Coomassie)	Gemessene Konzentration pAB aC VI im ÜS	Prozent pAB aC VI im ÜS	Prozent Beladung IgG-Flu
MF-Citrat 141109	200 µg/ml	6,7 µg/ml	2,4 µg/ml	35,82 %	64,18 %
Ferucarbotran	200 µg/ml	6,7 µg/ml	6,2 µg/ml	92,54 %	7,46
Feraheme	200 µg/ml	6,7 µg/ml	6,7 µg/ml	100 %	0

#### Auswertung

Aus der Messung des aC-VI-Gehaltes in den Überständen wurden die Beladungen der Partikel mit dem Antikörper berechnet, die höchste Beladung ist für die MF-Citrat-Partikel zu verzeichnen (64%), wohingegen bei Ferucarbotran und den Feraheme-Partikeln, die mit nur 7,5% bzw. 0% eine ähnliche Größenordnung aufweisen, kaum bzw. keine Beladung möglich zu sein scheint. Zusammenfassend kann man ausführen, dass die Antikörper bei Feraheme und Ferucarbotran so gut wie vollständig im Überstand nachgewiesen wurden, also keine Adsorption an die Teilchen erfolgte. Bei der Citrat-MF hingegen wurden 64% der Antikörper adsorbiert, was einer sehr guten Beladung entspricht und in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Beladung von Ferucarbotran mit IgG-Flu488.

#### **4.3.5 Untersuchungen zur biochemischen Adsorption von Antikörpern an Ferucarbotran und Feraheme**

Die folgenden Untersuchungen wurden von Dr. Glöckl (Uni Greifswald) durchgeführt. Alle Experimente folgten einer Standardmethode, die an der Universität entwickelt wurde. Einzelheiten wurden nicht mitgeteilt.

Prinzipiell wurde Streptavidin über einen Aktivester an die Carboxylgruppen der Feraheme-Teilchen chemisch fixiert und anschließend der ausgewählte biotinylierte Antikörper pAB anti-Collagen Type VI antibody (from rabbit) über die Streptavidin-Biotin-Kopplung an die Teilchenhülle chemisch angekoppelt.

Die erfolgreiche Ankopplung wurde standardisiert über die Vergrößerung des hydrodynamischen Teilchendurchmessers nachgewiesen, wenn das Antikollagen VI mit dem spezifisch wechselwirkenden Collagen VI Protein. Während beim Ferucarbotran dieser Test positiv war, konnte er beim Feraheme aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. (Das Waschen der Teilchen in der Milthenyi-Kolumne war hierbei nicht möglich, weil die sehr viel kleineren Teilchen des Ferahemes im Vergleich zu Ferucarbotran magnetisch nicht fixierbar waren.)



#### 4.4 Messwerte und Diskussion zur magnetischen Charakterisierung ausgewählter MF-MRI-Muster

Die magnetische Charakterisierung der in der Liste zusammengestellten Entwicklungsmuster für MRI-Anwendungen wurde von Dr. S. Dutz, Institut für **Nanobiophotonik**, Jena, durchgeführt.

**MF-Teilchengrößenfraktionen** (alle Muster langzeitstabil, im Dunkeln aufzubewahren!)

**Tab.12:** Muster zur magnetischen Charakterisierung

Lfd. Nr.	Bezeichnung: Herstellungstag und hydrodyn. Teilchengröße [nm]	Art des Eisenoxids	Extinktion der Verdünnungen / Verdünnungsfaktor	Fe-Konz. im Original, über Eichkurve ermittelt [mg/ml]	Z(ave) [nm]	PI [-]
1	PAA121210-20	Magnetit	Zu wenig		<30	?
2	PAA121210-36	Magnetit	0,56 1:100	1.08	37	0,209
3	PAA121210-56	Magnetit	1,79 1:1000	3.44	54	0,240
4	PAA121210-70	Magnetit	1,37 1:1000	2.58	70	0,165
5	Hydrosol 150910-48	Magnetit	0,49 1:1000	0.94	46,5	0,192
6	Hydrosol 150910-70	Magnetit	0,53 1:1000	1.02	65	0,240
7a,7b	FERAHEME Original, 25nm	Maghemit	1,65 1:1000	3,2	25	0,305
8	FERAHEME-Fraktion 16nm	Maghemit	(0.8 bei CAPS) 1:250	verdünnt	15,8	0,198
9	FERAHEME-Fraktion 51nm	Maghemit	(0.58 bei CAPS) 1:250	verdünnt	50,9	0,368
10	Citrat-020910-56	Magnetit	2,9 1:1000	5,7	57,9	0,169
11	Gold-MAG-CS aus Xian	Magnetit mit AU-Hülle			<100	

PI ... Polydispersitätsindex

Die magnetischen Werte der Muster aus Tab. 12 sind in der Tabelle 13 zusammengestellt (→ siehe nächste Seite):

Tab.13: Magnetische Charakterisierung der Muster (siehe Tab. 7)

Probe	Ms	Hc	Mr/Ms	D - magn.	D - XRD	C
als MF	[emu/g]	[Oe]	-	[nm]	[nm]	[m%]
1	0,392	5,906	0,0101	9,7	-	0,56
2	0,445	1,187	0,0027	10,9	-	0,64
3	2,796	1,127	0,0039	10,1	-	3,99
4	2,036	0,82	0,003	10,3	-	2,91
5	0,717	1,107	0,0045	10,6	-	1,02
6	1,093	1,535	0,006	10,1	-	1,56
7a		2,1		8,5		
7b	0,273	6,1	0,0101	9	8	0,39
wie 7b, Ultraschall		4,5		7,8		
8	0,072	-	-	9,7	-	0,10
9	0,056	0,773	0,0065	-	-	0,08
10	0,524	0,304	0,0011	11,6	-	0,75
11	0,22	2,647	0,0059	8,6	Kern10nm, Kern + Hülle:20nm	0,31
Meito 511	0,21	0,006	0,014	8,75		

**Rot:** FERAHEME

**Blau:** Messwert der Meito-Probe stammt vom 15.01.2010

Ms spezifische Sättigungsmagnetisierung (zur so normal angegebene Sättigungsmagnetisierung muss ein Berechnungsfaktor berücksichtigt werden, dazu muss die Dichte der MF bekannt sein)

Hc Koerzitivfeldstärke

Mr/Ms Remanenz

D<sub>mag</sub> berechneter Kernteilchendurchmesser nach Chantrell

D<sub>XRD</sub> Kernteilchendurchmesser

C Konzentration der magnetischen Komponente

#### 4.4.1 Bewertung der Ergebnisse

Erhofft wurden deutliche Änderungen von Hc und Mr/Ms auf die hydrodynamische Teilchengröße, doch liegen dieser Werte meist in der Messfehlergrenze.

#### 4.4.2 FERAHEME (Muster Nr. 7a,7b,8,9)

- a) Die Werte vom Original-FERAHEME (Nrn. 7a und 7b) zeichnen sich gegenüber denen von [Meito 511](#) durch ein hohes Hc aus.
- b) Der D-Wert müsste bei Muster 8 unter dem des Originals Nr. 7 liegen.

#### 4.4.3 PAA-Muster 1-4

- a) dieses Muster wurde sehr viel gewaschen, womöglich ist die Hülle nicht mehr vorhanden, trotzdem wäre der hohe Hc-Wert als Messfehler zu betrachten.
- b) alle anderen Werte der Muster liegen im Fehlerbereich, da die MF so hergestellt wurden, dass schon während der Herstellung die Hülle erzeugt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Hülle während der Fraktionierungsprozesse erhalten geblieben ist.

#### 4.4.4 Magnetit-Hydrosole 5-7.

Hier können Teilchenhüllen nicht entstehen, da die Muster keine organischen Bestandteile enthalten. Die Teilchen in den Aggregaten sind im direkten Kontakt, was zu einer Erhöhung von Hc und Mr/Ms führt.

#### 4.4.5 Die Citrat-MF 10 wurde aus dem Hydrosol 5 hergestellt.

Hc und Mr/Ms sind aber gestiegen, als ob die Citrathülle teilweise von der Teilchenoberfläche abgelöst wurde, wäre denkbar!

Insgesamt kann man feststellen, dass die magnetische Charakterisierung der hier vermessenen, sehr kleinen Teilchen doch einen größeren Aufwand wegen der geringen Messeffekte benötigt, müsste also wiederholt werden in direkter Absprache der Bearbeiter.

#### 4.5 Einsatz der Milthenyi-Separatoren

Diese dienen dazu, die SPIO-Teilchen über magnetische Kräfte zu fixieren, so dass diese gewaschen werden können, ohne selbst ausgetragen zu werden. Nach Ausschalten des Magnetfeldes werden die nun gereinigten Teilchen aus den Separatoren heraus gespült.

Es wurde festgestellt, dass diese Separatoren auch zur Teilchensortierung – aber nur von USPIO – geeignet sind, s. Tabelle 14. Das Verfahren ist aber diskontinuierlich, d.h. es funktioniert nur für jede einzelne Füllung, nicht im Durchfluss.

**Tab.14:** Teilchensortierung mit der Milthenyi-Technik

Muster		Art des Eisenoxids	Extinktion der Verdünnungen, Verdünnungsfaktor	Fe-Konz. im Original, über die Eichkurve ermittelt [mg/ml]	PI [-]
7	FERAHEME Original, 25nm	Maghemit	1,65 1:1000	32	0,305
8	FERAHEME-Fraktion 16nm	Maghemit	(0.8 bei CAPS) 1:250	2,2	0,198
9	FERAHEME-Fraktion 51nm	Maghemit	(0.58 bei CAPS) 1:250	1,46	0,368

## 5. Zusammenfassung aller Ergebnisse

Dieser Abschnitt betrifft sowohl die käuflich erworbenen Produkte Ferucarbotran mit zwei zusätzlichen Modifikationen und Feraheme, als auch die Labormuster. Die physikalisch-chemische Charakterisierung als auch die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und der MRI-Charakterisierung können wie folgt zusammengefasst werden.

> die vom Hersteller angegebenen Daten zur hydrodynamischen Teilchengröße, Fe-Konzentration, kolloidalen Stabilität, magnetische Kennwerte wurden durch eigene Messungen bestätigt. Ferucarbotran (Z(ave) 55 nm) ist ein Produkt mit superparamagnetischen Eisenoxiden (SPIO) und negativem Zetapotenzial (-20 mV), FERAHEME (Z(ave) 25 nm) ist eine USPIO-Dispersion, weitgehend ohne geladene Oberfläche (Zetapotenzial tendiert zu Null).

> Etablierung einer Methode zur Ermittlung m der Fe-Konzentration der Dispersionen über einen Farbkomplex (Merck-Methode) mittels UV-VIS-Technik. Fe-Empfindlichkeit im µg/ml-Bereich, ähnlich wie bei der Atomabsorptionsspektroskopie.

> Die Verfahrensentwicklung der Labor-MF für vorklinische Untersuchungen führte zu Magnetit-SPIO-Teilchen, wobei als Hüll-Komponente zuerst Citronensäure, später auch Polyasparaginsäure verwendet wurde, dabei lag zunächst die hydrodynamische Teilchengröße (Z(ave)) im Bereich von 100-150 nm, die Teilchen hatten ein hohes negatives Zetapotential von -40 bis -50 mV.

Ein gutes MRI-Kontrastverhalten dieser Labormuster wurde zwar festgestellt, doch keinerlei Anreicherung der Teilchen im infizierten Mauseherz.

> Daraufhin begann die Entwicklung von Labormustern mit USPIO-Teilchen mit vorerst den oben genannten gleichen Hüllen.

Doch auch hier erfolgte keine Anreicherung der Teilchen im Mauseherzen.

> Beladung von Ferucarbotran, Feraheme und MF-Citrat mit Modell-IgG und zwei weiteren IgGs prinzipiell möglich → **13 verschiedene Proben nach Würzburg geliefert**

> Erneute Musterherstellung (max. Beladungen laut Vorversuchen) → **Proben zu gleichen Teilen nach Würzburg und Tübingen gesendet**

Resultate liegen bislang nicht vor

> Daraufhin wurden von Herrn Dr. Glöckl (Uni Greifswald, Lehrstuhl Pharmazie) freundlicherweise Ferucarbotran-Teilchen mit Anticollagen VI erfolgreich nachweislich modifiziert.

Trotzdem zeigten die histologischen Untersuchungen in Tübingen auch bei diesen Proben keine Teilchenanreicherung im modifizierten Mauseherzen.

> Inzwischen wurde histologisch und klinisch gezeigt, dass FERAHEME gegenüber allen anderen MF sowohl eine extrem hohe Halbwertszeit im Blut hat als auch die bisher besten Kontrastwerte im Herzen liefert.

Es wird vermutet, dass die Ursache für diese positiven Ergebnisse sowohl die USPIO-Eigenschaft als auch die Ladungsneutralität der Hülle ist.

> Daraufhin begann die Entwicklung von USPIO-Magnetit-Teilchen mit Dextranhüllen nach einer modifizierten Verfahrensvariante, wobei die Bildung von Teilchenaggregaten von vornherein

ausgeschlossen werden konnte. Eine gute Blutverträglichkeit ist laut Literatur durch die Gegenwart von Dextran gewährleistet. Zeitaufwändig ist die Entfernung überschüssigen Dextrans, die momentan nur durch Dialyse möglich ist.

Erste Tests ergaben je nach Dextranmodifikation sowohl kolloidal stabile SPIO als auch USPIO-MF. Histologische Untersuchungen stehen noch aus.

> Gleichzeitig wurden vom Institut für Medizintechnik in Lübeck Magnetit-MF mit SPIO@Dextran-Teilchen mit ungeladener Oberfläche bezogen und nach Tübingen weitergeleitet.

Die histologischen Untersuchungen führten zu keinem signifikant positiven Ergebnis, so dass die Ladungsneutralität als Anreicherungskriterium nicht bewiesen werden konnte.

Noch ungeklärte Fragen:

a) zur Herstellung:

> die Reaktionskinetik und die chemische Zusammensetzung der USPIO-MION-Dextran-Kontrastmittel ist weitgehend unklar, so wird u.a. das Produkt bei 80 °C in stark alkalischen Lösungen wenigstens eine Stunde erhitzt, was passiert dabei?

> die Reproduzierbarkeit der Produkteigenschaften ist laut bisheriger Untersuchungen begrenzt, sind die physikalischen Herstellungsparameter ausreichend optimiert?

> Sind Citrat-USPIO-Kontrastmittel wirklich nicht geeignet, man beachte die positiven Ergebnisse in der Habilitationsschrift von Dr. Taupitz!

> Sollte die Aufrechterhaltung der biologischen Antikörper-Antikörper-Wechselwirkung vor den in-vivo-Tests immer über einen ELISA-Test kontrolliert werden?

> Wohl beste Methode zurzeit ist die Anbindung mit Streptavidin-modifizierten Teilchenhüllen über biotinylierte Antikörper. Ist bei den zahlreichen anderen Alternativen die Erhaltung der Bioaktivität sichergestellt?

b) Eigenschaften im Blut

> Welche Pufferlösungen sollten bei der in-vivo-Applikation verwendet werden? Muss überhaupt ein Elektrolyt-Puffer eingesetzt werden? (laut Literatur reicht allein ein Zusatz von Dextran von 7 Gew% zur kolloidalen Stabilisierung aus)

> Sicherung einer möglichst langen Halbwertszeit der Teilchen im Blutkreislauf, wovon hängt diese ab, auch von der Oberflächenladung?

> Sicherung einer ausreichenden Kontaktzeit der Teilchen am Bindungsort im Organ, ist dabei eine magnetische Fixierung von außen sinnvoll? (bei USPIO ist aufgrund der geringen Teilchengröße nur ein sehr geringer Effekt zu erwarten!)

## 6. Ausblick

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse mit Feraheme zeigten sowohl eine MRT-Kontrastverbesserung im menschlichen Herzen als auch eine Teilchenanreicherung im Mausherzen, was als erster wichtiger Schritt im Rahmen der gestellten Projektaufgabe anzusehen ist.

Aufgrund der aussichtsreichen Ergebnisse mit Feraheme bietet sich eine Kooperation mit dem Hersteller des Produktes in den USA an. Es ist zu klären, wie sich die einzelnen Partner in welchem Umfang an den weiteren Entwicklungskosten beteiligen sollen.

Eine Weiterentwicklung der klinischen Anwendung von MF in Deutschland bzw. im Rahmen eines EU-Projektes erfordert einen hohen Organisationsaufwand und die Teilnahme geeigneter Partner, vorrangig mit Universitäts-Hospitälern. EU-Projekte haben zurzeit nur eine Chance, wenn der Antragsteller nicht aus Deutschland kommt, GUERBET aus FR wäre womöglich ein potentieller Antragsteller.

Zur Weiterführung des Projektes im bisherigen Rahmen sollte Capsolution die weitere Entwicklung und Herstellung der Kontrastmittel letztendlich vollständig übernehmen und diese auch vermarkten, falls in der 2. Entwicklungsperiode ein marktfähiges Produkt zur Verfügung steht. Allerdings sind dazu zusätzliche Investitionsmittel und geeignete Arbeitskräfte zu beschaffen. Dies betrifft auch eine Kooperation mit dem Hersteller Milthény!

## 7. Literatur zur Herstellung von MION-Kontrastmitteln

### FEREHEME Herstellung

E.V. Groman et al. US 6599498

### US Patent References:

Polysaccharide derivative/magnetic metal oxide composite

Maruno et al. – 6165378

Contrast agents for MRI using a manganese compound and kojic acid

Golman et al. – 5985245

Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids

Palmacci et al. – 5262176

Organic magnetic complex

Maruno et al. – 5204457

Filter sterilization for production of colloidal, superparamagnetic MR contrast agents

Josephson et al. - 5160726

### Weitere US Patent References:

5128121	<a href="#">Mixture of a positive and negative contrast agent for magnetic resonance imaging</a>	Berg et al.	424/9
5102652	<a href="#">Low molecular weight carbohydrates as additives to stabilize metal oxide compositions</a>	Groman et al.	424/9
5055288	<a href="#">Vascular magnetic imaging method and agent comprising biodegradable superparamagnetic metal oxides</a>	Lewis et al.	424/9
4827945	<a href="#">Biologically degradable superparamagnetic materials for use in clinical applications</a>	Groman et al.	128/6 53
4770183	<a href="#">Biologically degradable superparamagnetic particles for use as nuclear magnetic resonance imaging agents</a>	Groman et al.	128/6 54

### Ferucarbotran:

DE 69229150 (2005), Meito Sanyo

### Magnetische Teilchen mit Doppelhülle Fettsäure + Pluronic:

US 0264199 (2007)