

**Synthese von Dextran-umhüllten
Eisenoxid-Nanopartikeln
als Kontrastmittel
für die MR-Tomographie**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Reiner Ernst Beringer
aus Bamberg

Würzburg 2012

**Synthese von Dextran-umhüllten
Eisenoxid-Nanopartikeln
als Kontrastmittel
für die MR-Tomographie**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Reiner Ernst Beringer
aus Bamberg

Würzburg 2012

Eingereicht am:.....
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. W. A. Schenk
2. Gutachter:.....
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. W. A. Schenk
2. Prüfer:.....
3. Prüfer:.....
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Kenntnisstand	3
2.1. Grundlagen der Magnetresonanztomographie	3
2.2. Gadolinium (Gd^{3+}) -Komplexe als T_1 -Kontrastmittel	8
2.3. Eisenoxid-Nanopartikel	9
2.3.1. Magnetische Eigenschaften	9
2.3.2. Wirkungsweise, Einsatz und Aufbau als MR-Kontrastmittel	12
2.3.3. Dextran-umhüllte Eisenoxid-Nanopartikel	13
2.3.4. Verwendung von Monomeren als Hüllmaterialien	21
2.3.5. PEG-Derivate als Hüllmaterial.....	23
3. Aufgabenstellung	24
4. Diskussion der Ergebnisse	25
4.1. Optimierung der Synthese von SPIO	25
4.2. Optimierung der Synthese von Amino-CLIO (CLIO-NH ₂)	33
4.2.1. Trennung von Verlinkung und Aminierung der SPIO	33
4.2.2. Darstellung von CLIO-NH ₂ in einer Eintopfsynthese	37
4.2.3. Alternierende Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak	42
4.3. Modifikation der Kolloide mit niedermolekularen Substanzen	53
4.4. Fluoreszenzmarkierung von Eisenoxid-Nanopartikeln	63
4.5. Umsetzung von Kolloiden mit bioaktiven Molekülen.....	84
4.6. Spektroskopische und <i>in vivo</i> Eigenschaften der Kolloide	95
4.6.1. Relaxivitäten der Eisenoxid-Nanopartikel.....	95
4.6.2. Hydrodynamischer Durchmesser von Eisenoxid-Nanopartikeln.....	97
4.6.3. <i>In-vivo</i> -Verteilung von Eisenoxid-Nanopartikeln.....	97
5. Experimenteller Teil	106
5.1. Arbeitsmethoden	106
5.1.1. Generelle Versuchsdurchführung.....	106
5.1.2. Analytische Methoden	107
5.1.3. Spektroskopische Methoden	107
5.1.4. Lösungsmittel und Ausgangsverbindungen	108
5.2. Synthesen	109

6. Zusammenfassung	190
7. Summary	201
8. Literaturverzeichnis.....	212
Anhang A: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	220
Anhang B: Verzeichnis der Verbindungen	221
Anhang C: Strukturtafeln	224
Danksagung	229

1. Einleitung

Im Jahre 2006 wurden erstmals mehr Menschen wegen Herzversagens in deutsche Krankenhäuser eingewiesen als wegen jeder anderen Krankheit. Ebenso ist Herzinsuffizienz die dritthäufigste Todesursache in Deutschland, weshalb dieses Krankheitsbild schon jetzt hohe Kosten für das Gesundheitssystem verursacht.^[1] Die Anzahl der herzschwachen Patienten wird sich in den kommenden Jahren durch die Veralterung der Gesellschaft und die verbesserte medizinische Behandlung von Herzinfällen noch enorm steigern.^[2-5]

Bei der Herzinsuffizienz beeinträchtigt eine strukturelle oder funktionelle Störung das Herz bei seiner Aufgabe als Blutpumpe.^[6] Meist kann hierbei eine Relaxationsstörung des linken Ventrikels (diastolische Dysfunktion) bzw. eine systolische Pumpfunktionsstörung nachgewiesen werden.^[7]

Zur Diagnostik werden verschiedene Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel Elektrokardiographie, Röntgenstrahlen,^[8] Computertomographie (CT), Positronenemissionstomographie (PET)^[9,10] und single photon emission computed tomography (SPECT)^[11,12] herangezogen.^[2,6,13] Am häufigsten wird ein zweidimensionales Echocardiogramm^[14] verwendet, das einfach und kostengünstig ist,^[5] aber dennoch Aufschlüsse über anatomische Fakten des Herzens wie Volumen, Masse oder der Herzwandbewegung geben kann.^[2] Diese Ergebnisse basieren jedoch auf einer vorgegebenen Herzgeometrie, was bei der **cardio**vaskulären **Magnet**resonanz (CMR) nicht nötig ist.^[14] Bei dieser kann man ohne theoretische Parameter Aussagen über das linke und rechte ventrikuläre Volumen, den gesamten Funktionsbereich, regionale Wandbewegungen, Herzmuskelmasse und -dicke treffen.^[2,14] Im direkten Vergleich übertrifft die CMR das Echocardiogramm in allen Diagnostikaspekten sowie in allen Versuchsgruppen,^[9] weshalb sie als Goldstandard in der Angiographie angesehen wird.^[2,15]

Die **Magnet**resonanztomographie (MRT) ist ein vielseitiges, nachvollziehbares, nicht invasives Diagnostikverfahren, das kontrastreiche, detaillierte zwei- und dreidimensionale Aufnahmen selbst von tiefliegendem Gewebe liefern kann und im Gegensatz zu PET, SPECT oder CT ohne ionisierende Strahlung durchgeführt wird.^[2,16,17,18] Aus diesen Gründen wird sie nicht nur in der vaskulären Bildgebung eingesetzt,^[19] sondern kann als eine universelle Untersuchungsmethode in der modernen Medizin für alle Körperregionen benutzt werden.^[18,20,21]

Die Anwendung der Magnetresonanz als modernes Diagnoseverfahren wurde durch die Arbeiten von Lauterbur^[22] und Mansfield^[23] in den 70er Jahren ermöglicht, wofür beide 2003 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten.^[24] Der Einsatz von linearen Magnetfeldgradienten und das Prinzip des „Echo planar imaging“ (EPI) zur Verkürzung der Messzeit bilden das Grundgerüst, um NMR-Signale als Bilder auswerten zu können.^[25]

Bei der MRT werden die Protonen von Wasser im menschlichen Körper abgebildet, wobei die unterschiedlichen Signalintensitäten durch die intrinsischen Eigenschaften des einzelnen Gewebes bedingt werden.^[26] So konnte schon 1971 Damadian unterschiedliche Relaxationszeiten bei der Untersuchung von gesundem und Tumorgewebe beobachten.^[27]

Eine Verstärkung des Bildkontrastes ist durch die Gabe von Kontrastmitteln möglich, die die Relaxationszeit der Wasserprotonen beeinflussen. In der Medizin werden gegenwärtig hauptsächlich zwei Grundtypen verwendet: paramagnetische Gadoliniumkomplexe und superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO: **s**uper**p**aramagnetic **i**ron **o**xide).

Es gibt eine Vielzahl gadoliniumhaltiger Kontrastmittel, wie zum Beispiel Magnevist® (Gd-DTPA), Dotarem® (Gd-DOTA), Omniscan® (Gd-DTPA-BMA), Gadovist® (Gd-DO3A-butrol),^[28] bei denen das Lanthanid als Zentralatom von verschiedenen Chelatliganden komplexiert wird. Mit Resovist®, Sinerem® und Endorem® werden drei Arten von Eisenoxid-Nanopartikeln klinisch genutzt,^[29] während mit Teslascan® (Mn-DPDP) nur ein Manganchelatkomplex als Leberkontrastmittel fungiert.^[30]

2. Kenntnisstand

2.1. Grundlagen der Magnetresonanztomographie

Die Kernspintomographie beruht auf dem von Purcell^[31] und Bloch^[32] 1946 entdeckten Phänomen der magnetischen Kernresonanz, bei der Objekte in einem permanenten Magnetfeld durch Einstrahlung von hochfrequenten Radiowellen charakteristische Signale liefern. Durch den Einsatz von zeitlich variablen, linearen Feldgradienten, die das angelegte homogene Magnetfeld überlagern, können diese räumlich zugeordnet und ein orts aufgelöstes Bild in Abhängigkeit von der Signalintensität erstellt werden.^[33]

Stern und Gerlach konnten in einem Experiment nachweisen, dass Elektronen einen Drehimpuls von $\frac{1}{2}$ besitzen. Diese Rotation um die eigene Achse ist eine Eigenschaft aller Elementarteilchen und kann Werte von $\frac{1}{2}$ (Elektronen, Protonen, Neutronen) oder 1 (z.B. Photonen) annehmen. In einem Atomkern addieren sich diese Einzelspins zu der Kernspinquantenzahl I . Hierbei resultiert für eine gerade Anzahl an Protonen und Neutronen (gg) $I = 0$, für ungerade (uu) dagegen ganzzahlige Werte ($I = 1, 2, 3, \dots$). Für gu- und ug-Kerne nimmt I halbzahlige Werte von $\frac{1}{2}$ bis maximal $\frac{9}{2}$ an. Der Kernspindrehimpuls I unterliegt der Quantenmechanik und kann sich beim Einbringen in ein äußeres Magnetfeld in $I = 2I + 1$ Richtungen orientieren.^[34]

Für ein Wasserstoffatom mit $I = \frac{1}{2}$ ergeben sich somit zwei Möglichkeiten: parallel und antiparallel zum angelegten Magnetfeld. Aufgrund ihres Eigendrehimpulses präzedieren die Spins hierbei mit der Larmorfrequenz ν_L um B_0 . Die parallele Ausrichtung zum angelegten Magnetfeld ist nach der Näherung der Boltzmannverteilung (Gleichung 2.1) bei Raumtemperatur nur minimal begünstigt und von der Stärke des Magnetfeldes abhängig, wodurch sich eine effektive Magnetisierung M_z (Längsmagnetisierung) in Feldrichtung aufbaut (Abbildung 2.1a).^[34,35]

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_b T} \quad \text{mit } \Delta E = \gamma \hbar B_0$$

Gleichung 2.1: Näherung der Boltzmannverteilung für die Ausrichtung parallel oder antiparallel zur Magnetfeldrichtung. Die Besetzungsunterschiede sind direkt proportional zur Feldstärke.

Wird nun kohärente elektromagnetische Strahlung eingebracht, die der Larmor-

frequenz entspricht, kommt es zur Resonanz und zur Anregung der Spins. Durch geeignete Länge und Leistung des Pulses kann eine Gleichbesetzung der Energieniveaus (Sättigung) und ein „Umklappen“ der Längsmagnetisierung um 90° in die xy -Ebene erreicht werden, wodurch ein transversaler Vektor M_{xy} generiert wird (Abbildung 2.1b).^[26]

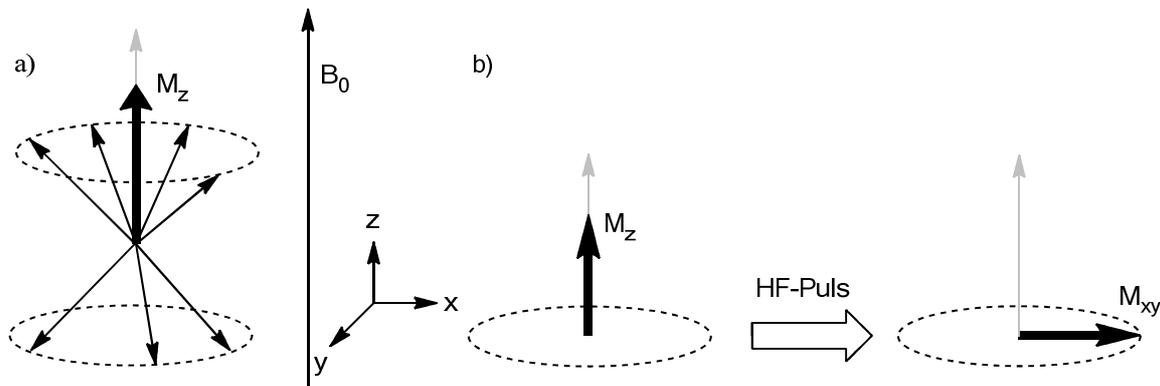


Abbildung 2.1: a) Ausrichtung der Kernspins im äußeren Magnetfeld (B_0), woraus eine Längsmagnetisierung (M_z) resultiert; b) Auslenkung des M_z -Vektors um 90° durch Einstrahlung eines elektromagnetischen Pulses unter Ausbildung der Transversalmagnetisierung M_{xy} .

Nach Beendigung der Anregung kehrt das Spinsystem unter Einfluss des äußeren Magnetfeldes B_0 in den Ausgangszustand zurück. Der Abfall der transversalen Magnetisierung M_{xy} wird als FID (free induction decay) bezeichnet und ergibt nach einer Fouriertransformation das eigentliche MR-Signal. Für den Zerfall der in der xy -Ebene kreisenden Magnetisierung sind zwei unabhängige Vorgänge verantwortlich, deren Dauer durch die Relaxationszeiten T_1 und T_2 angegeben wird.^[36]

Bei der Spin-Gitter-Relaxation geben die Spins Energie an ihre Umgebung (Gitter) ab, während der Beitrag des Vektors M_z langsam zunimmt. Da sich dieser Vorgang ausschließlich längs der z -Achse abspielt, spricht man auch von der longitudinalen Relaxation. Die dazugehörige Relaxationszeit T_1 ist abhängig von der Stärke des Magnetfeldes und spiegelt die Zeit wider, nach der das Spinsystem in den Ausgangszustand zurückgekehrt ist (Abbildung 2.2).^[26]

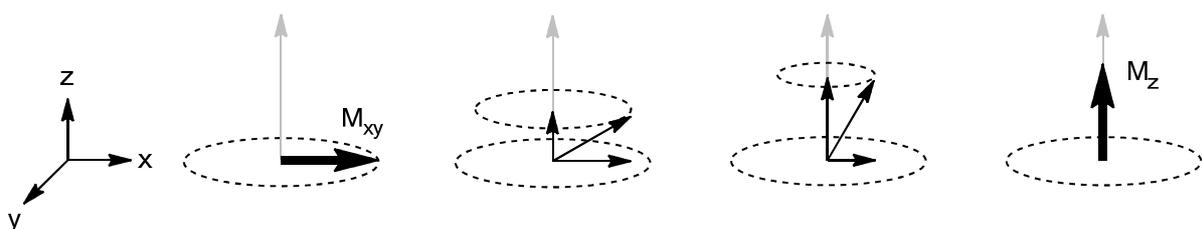


Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der Spin-Gitter-Relaxation: Rückkehr der transversalen Magnetisierung M_{xy} in Magnetfeldrichtung M_z unter Abgabe von Energie an das Gitter.

Im Gegensatz hierzu verläuft die transversale Relaxation magnetfeldunabhängig. Nach der Auslenkung in die xy -Ebene befinden sich die Einzelspins in Phasenkohärenz zueinander. Durch ihren eigenen Drehimpuls beeinflussen sie das lokale Magnetfeld benachbarter Spins, was eine Dephasierung bewirkt. Durch diesen Energieaustausch der Spins untereinander (Spin-Spin-Relaxation) nimmt die transversale Magnetisierung M_{xy} mit der Relaxationszeit T_2 ab (Abbildung 2.3). Ein zusätzlicher Beitrag zur Dephasierung der Spins wird durch die Inhomogenitäten des äußeren Magnetfeldes eingebracht, wodurch die transversale Relaxation nicht mit der Zeit T_2 , sondern mit Zeitkonstante T_2^* verläuft (Gleichung 2.2).

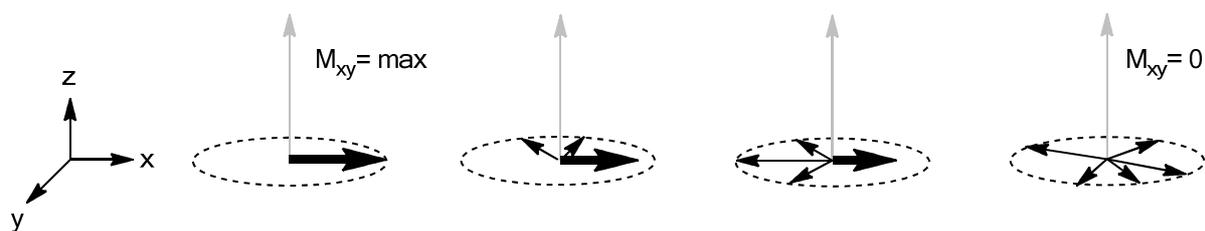


Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf der Spin-Spin-Relaxation: Dephasierung der Spins aufgrund der lokalen Magnetfelder einzelner Spins (Spin-Spin-Relaxation), sowie durch Inhomogenitäten des äußeren Magnetfeldes B_0 . Diese werden hauptsächlich durch Gewebegrenzflächen hervorgerufen.^[26]

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'}$$

Gleichung 2.2: Die transversale Relaxation T_2 und Magnetfeldinhomogenitäten T_2' erzeugen T_2^* .

Beide Relaxationsmechanismen verlaufen zeitgleich und unabhängig voneinander ab. Da die T_2 -Zeit (100-300 ms) aber wesentlich kürzer ist als die T_1 -Zeit (0.5-5 s), ist der FID und somit der Abfall des MR-Signals nur von der Relaxationszeit T_2^* abhängig.^[26]

Bei der MRT müssen zur Bilderzeugung die Wasserprotonen einer Körperschicht mehrmals hintereinander angeregt und gemessen werden. Protonendichte und Dauer der T_1 - bzw. T_2 -Relaxation bestimmen hierbei als gewebespezifische Faktoren im Wesentlichen den Bildkontrast in einer Messsequenz, der durch Anpassung der zwei Messparameter Repetitionszeit (TR) und Echozeit (TE) variiert werden kann.

Die Repetitionszeit gibt die Dauer zwischen zwei Anregungen an und beeinflusst den T_1 -Kontrast, indem durch ihr festgelegt wird, wie viele Spins sich in Richtung M_z des äußeren Magnetfeldes zurückorientiert haben und für eine erneute Anregung vorhanden sind. Bei einem T_1 -gewichteten MR-Bild wählt man eine kurze TR, so

dass sich nach dem Einstrahlen eines HF-Pulses nur die Spins mit einer schnellen T_1 -Zeit wieder in Magnetfeldrichtung ausgerichtet haben (Abbildung 2.4). Diese können ein erneutes Signal liefern und das Gewebe erscheint hell, während sich bei Gewebe mit langsamer T_1 -Relaxation wenig Längsmagnetisierung aufgebaut hat, was zu wenig Intensität und einem dunklen Erscheinungsbild führt.

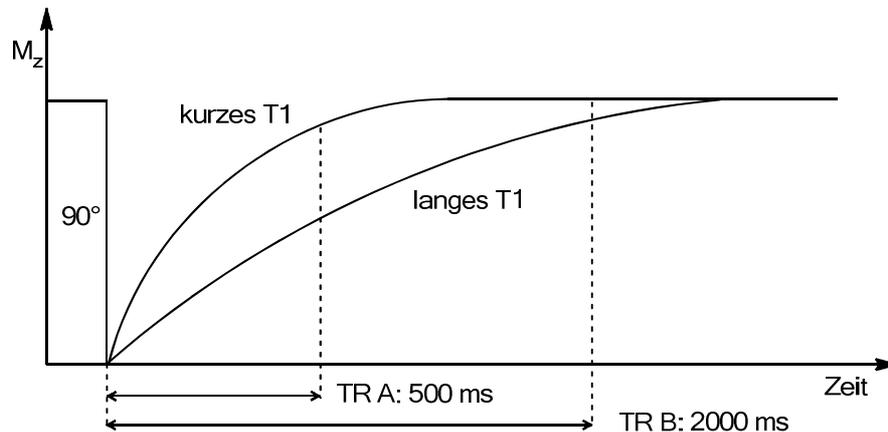


Abbildung 2.4: Nach Anregung mit einem 90° -Puls baut sich die Längsmagnetisierung bei Gewebe mit kurzen T_1 wieder schnell auf und man erhält ein starkes Signal bei der nächsten Anregung. Durch eine kurze Repetitionszeit (TR A) ergibt sich ein starker T_1 -gewichteter Kontrast, während bei einer langen TR die longitudinale Relaxation keinen Einfluss auf den Bildkontrast hat (TR B).

Als Echozeit TE bezeichnet man die Zeit zwischen Anregung und Messung des Signals. Wird TE lang gewählt, so können nur die Spins zum Signal beitragen, die eine lange transversale Relaxation haben. Spins mit kurzer T_2 -Zeit liefern keinen Beitrag mehr und erscheinen im T_2 -gewichteten MR-Bild dunkel (Abbildung 2.5).^[26,37]

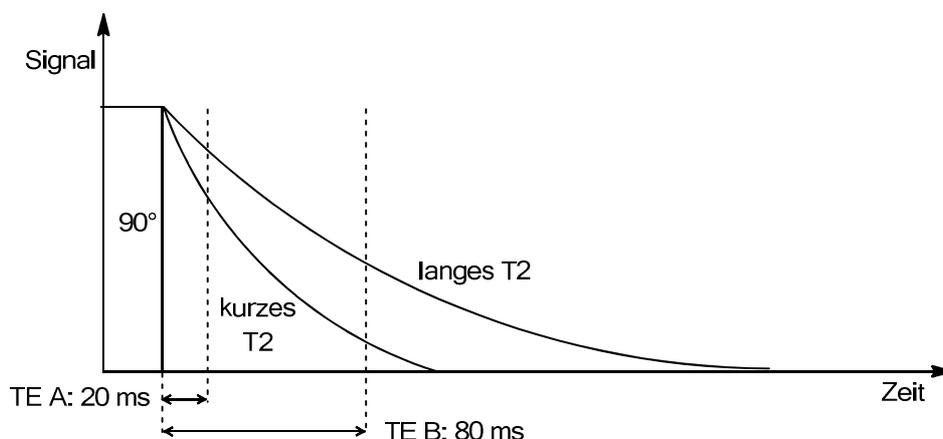


Abbildung 2.5: Wird nach einem 90° -Puls die Echozeit kurz gewählt, sind die Intensitätsunterschiede noch gering (TE A). Mit langer TE erhält man ein T_2 -gewichtetes MR-Bild, in dem Gewebe mit langer T_2 -Zeit hell erscheint (TE B).

Bei einer langen Repetitionszeit und einem kurzen Echo sind die T_1 - und T_2 -Effekte minimalisiert und man erhält ein protonengewichtetes MR-Bild.^[26] Somit ist es möglich, durch geeignete Wahl der Messparameter TR und TE MR-Aufnahmen ein- und desselben Gewebes mit unterschiedlichen Kontrasten zu erhalten (Abbildung 2.6^[38]).

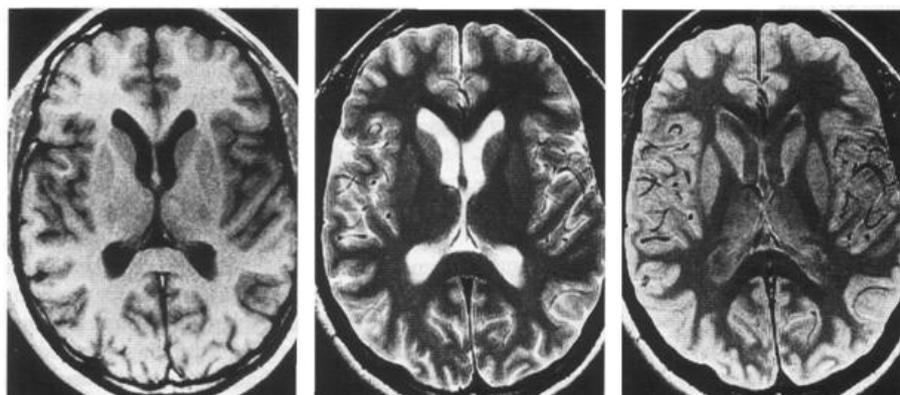


Abbildung 2.6: Axiale Schnittbilder eines menschlichen Gehirns mit unterschiedlichen Gewichtungen: T_1 -gewichtet (links), T_2 -gewichtet (Mitte), protonengewichtet (rechts).^[38]

Eine Vergrößerung der Signalunterschiede kann durch die Gabe von Kontrastmitteln erreicht werden. Eine geringe Toxizität, Bioverträglichkeit, spezifische *in vivo* Verteilung sowie Stabilität und eine zügige Ausscheidung bzw. Abbaubarkeit stellen die allgemeinen Anforderungen an ein Kontrastmittel dar.^[39,40]

So kann durch die Gabe von Substanzen wie Bariumsulfat^[41], Fettemulsionen oder perfluorierten Kohlenwasserstoff (z.B. Perfluorooctylbromid PFOB^[42,43]), die Protonendichte im Gewebe verringert und ein verstärkter Signalverlust bei MR-Scans bewirkt werden.^[26] Letztgenannte werden auch in der ^{19}F -MRT genutzt,^[44] bei der anstatt der Wasserprotonen die ^{19}F -Kerne ($I = \frac{1}{2}$) angeregt werden. Die Signalstärke ist dadurch direkt von der Konzentration des Kontrastmittels abhängig, weshalb sich die Forschung auf Systeme konzentriert, bei denen möglichst viele chemisch äquivalente ^{19}F -Atome vorliegen, so dass man nur eine scharfe Resonanzlinie erhält.^[45]

Hauptsächlich jedoch werden in der MRT para-, ferro-, oder superparamagnetische Substanzen benutzt, die durch das magnetische Moment ihrer ungepaarten Elektronen die Relaxation der benachbarten Wasserprotonen beschleunigen und dadurch einen erhöhten Bildkontrast bewirken können. Je nachdem welcher Mechanismus am meisten beeinflusst wird, kann man in T_1 - und T_2 -Kontrastmittel unterteilen. Da die einen eine Aufhellung, die anderen jedoch eine Verdunkelung des Gewebes im MR-Bild bewirken, spricht man auch von positiven bzw. negativen

Kontrastmitteln. Ein Maß für die Stärke sind die Relaxivitäten r_1 und r_2 , die die Änderung der Relaxationszeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Kontrastmittels angeben (Gleichung 2.3).^[28,46]

$$r = \frac{\Delta^{1/T}}{M} \text{ in } L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Gleichung 2.3: Die Relaxivität r eines Kontrastmittels ist durch die Änderung der Relaxationszeit T der Protonen in Abhängigkeit von dessen Konzentration M definiert.

2.2. Gadolinium (Gd^{3+})-Komplexe als T_1 -Kontrastmittel

Gadolinium mit der Elektronenkonfiguration $4f^7 5d^1 6s^2$ gehört zur Gruppe der Lanthaniden. In seiner stabilsten Oxidationsstufe Gd^{3+} besitzt es eine halbvoll besetzte Außenschale mit 7 ungepaarten Elektronen, woraus ein symmetrischer elektronischer Grundzustand von $^8S_{7/2}$ resultiert. Diese magnetischen Eigenschaften ermöglichen den Einsatz von Gadolinium als MR-Kontrastmittel, da die hohe Anzahl an ungepaarten Elektronen ein großes magnetisches Moment bewirkt. Dieses kann aufgrund der langsamen elektronischen Relaxationsrate, die sich im Gegensatz zu Dysprosium (Dy^{3+}) und Holmium (Ho^{3+}) aus dem symmetrischen Grundzustand ergibt, mit den Protonenkernen des Wassers in Wechselwirkung treten.^[28,47] Jedoch wirkt Gadolinium toxisch und ist u.a. ein Kalziumantagonist^[28,48], weshalb es in einen kinetisch und thermodynamisch stabilen Komplex eingebunden werden muss.^[47] Am besten geeignet hierfür erweisen sich auf Polyaminocarbonsäuren basierende, octadentate Chelatliganden. Ausgehend von den beiden Grundstrukturen DTPA (offenkettig) und DOTA (ringförmig) konnten eine Vielzahl von Chelatliganden synthetisiert werden (Abbildung 2.7).^[49,50,51]

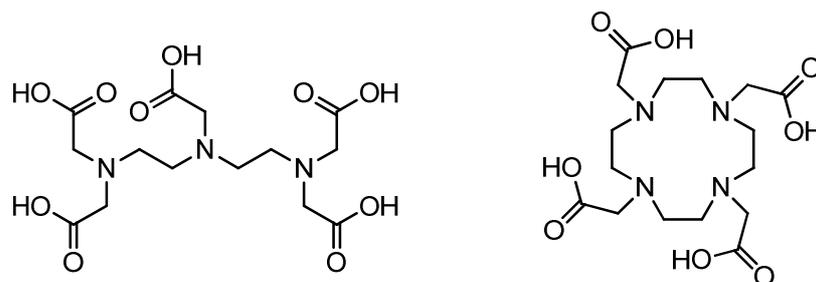


Abbildung 2.7: Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA).

Die verbleibende freie 9. Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül okkupiert, wodurch dessen Relaxation durch das Gd^{3+} in einer dipolaren Wechselwirkung beeinflusst werden kann.^[52] Die fluktuierende Bindung von Wasser als Ligand ist entscheidend für die Verkürzung der Relaxation. Die Parameter wie Austauschrate, Anzahl der gebundenen Wassermoleküle oder Relaxationszeit der Elektronenspins, die diesen Prozess der *inner-sphere* Koordination bestimmen, werden mit der Solomon-Bloembergen-Morgan-Theorie beschrieben.^[40,53]

Im derzeitigen Fokus der Wissenschaft liegt die Optimierung dieser Faktoren durch Substitution und Veränderung der Chelatliganden^[40,46] sowie die Anbindung an Makromoleküle oder die Spezifizierung der Gd-Komplexe mit Peptiden.^[54,55,56]

2.3. Eisenoxid-Nanopartikel

2.3.1. Magnetische Eigenschaften

Die in der MRT eingesetzten Eisenoxid-Nanopartikel, sogenannte SPIO (**s**uper**p**aramagnetic **i**ron **o**xides), sind aus einer organischen Hülle und einem superparamagnetischen Eisenoxidkern aufgebaut. Dieser kann aus den zwei Eisenoxidmodifikationen Magnetit Fe_3O_4 oder Maghemit $\gamma-Fe_2O_3$ bestehen. Magnetit kristallisiert in einer kubisch inversen Spinellstruktur $[Fe^{III}]_T [Fe^{III}Fe^{II}]_O O_4$ mit oktaedrisch (Fe^{3+} und Fe^{2+}) und tetraedrisch (Fe^{3+}) koordinierten Teilgittern in der Raumgruppe $Fd3m$, wobei sich die O^{2-} -Ionen in einem kubisch flächenzentrierten Gitter befinden (Abbildung 2.8).^[36,57]

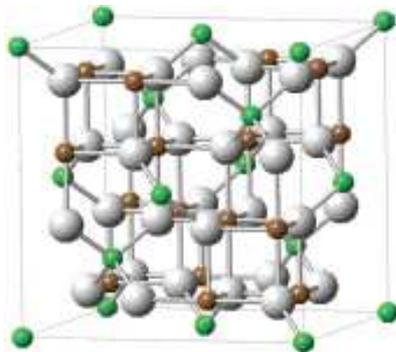


Abbildung 2.8: Kristallstruktur von Magnetit Fe_3O_4 mit Fe^{2+} (grün), Fe^{3+} (braun) und O^{2-} (weiß) mit einer tetraedrischen und oktaedrischen Anordnung der Sauerstoffatome um das Eisen.^[57]

Durch diese Anordnung kann ein ständiger Elektronenaustausch zwischen den Eisenatomen in den tetraedrisch und oktaedrisch besetzten Teilgittern stattfinden.^[47] Das durch Oxidation von Magnetit erhältliche Maghemit kristallisiert analog in einer Defektspinellstruktur $[Fe^{III}]_T [Fe_{5/3}^{III}\Delta_{1/3}]_O O_4$ mit Leerstellen im Oktaederteilgitter.^[58,59] Beide Modifikationen haben nahezu identische magnetische Eigenschaften, die sich aus ihrer ferrimagnetischen Natur ergeben. In den einzelnen Teilgittern erfolgt eine parallele Kopplung der Elektronenspins des Eisens, während sich die Gesamtspins der tetraedrischen und oktaedrischen Anordnung antiparallel zueinander anordnen. Hieraus resultiert bei Magnetit ein magnetisches Moment aufgrund von nicht kompensierten oktaedrischen Fe^{2+} -, bei Maghemit hingegen durch Fe^{3+} -Ionen.^[47,59] Eisenoxid-Nanopartikel mit einem Durchmesser unter 20 nm sind kleiner als die Weisschen Bezirke, in denen eine spontane, parallele Orientierung ungepaarter Spins erfolgt.^[36] Hieraus ergibt sich eine Gesamtmagnetisierung des Kolloids aus den effektiven Einzelspins der Eisenatome, wodurch sich die Eisenoxid-Nanopartikel wie große paramagnetische Teilchen mit einem sehr starken magnetischen Moment verhalten.^[47,60] Dieses Phänomen in Verbindung mit dem Fehlen von Hysterese und dem Auftreten einer hohen Sättigungsmagnetisierung und Suszeptibilität wird Superparamagnetismus genannt.^[36,61]

Der große Unterschied im Vergleich zu paramagnetischen Ionen liegt zum einen in dem viel größeren magnetischen Moment, das aus dem Volumen der Partikel resultiert, und zum anderen im Relaxationsverhalten der Elektronen, das in einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung die Relaxation der Wasserprotonen beeinflusst. Die Relaxation τ der Elektronen des Kolloids setzt sich aus Beiträgen der Neel- und der Brownschen Relaxation zusammen (Gleichung 2.4).

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B}$$

Gleichung 2.4: Zusammensetzung der Elektronenrelaxation in Eisenoxid-Nanopartikeln aus Neel- und Brownscher Relaxation.

Da die thermische Energie die anisotrope Energiebarriere überwiegt, kann das magnetische Moment ohne ein äußeres Feld entlang der anisotropen Achsen fluktuieren, so dass sich keine effektive Magnetisierung ergibt.^[60] Bei der Neel-Relaxation^[60] orientieren sich die magnetischen Momente innerhalb eines superpara-

magnetischen Partikels in diese Richtung wieder zurück, nachdem sie durch den Einfluss eines äußeren Feldes ausgelenkt wurden (Gleichung 2.5a).^[47,61,62]

Demgegenüber gibt die Brownsche Relaxation die Rotation des Kolloids im Lösungsmittel unter dem Einfluss eines äußeren Magnetfeldes wieder (Gleichung 2.5b).^[47,58,62] Die Wasserprotonen werden einerseits durch das fluktuierende magnetische Moment der Elektronen aufgrund der Neel-Relaxation und andererseits durch die Diffusion in das nichtfluktuierende inhomogene Magnetfeld, das durch das magnetische Moment des Partikels hervorgerufen wird, beeinflusst (Abbildung 2.9).^[47] Welcher der beiden Relaxationsmechanismen überwiegt, ist von der Größe des Eisenoxidkerns abhängig. Ein Durchmesser von 7.5 nm wird als Grad für den Wechsel des dominierenden Effektes angesehen (Abbildung 2.9).^[47,62]

$$a) \tau_N = \tau_0 e^{KV_K/k_B T} \text{ mit } KV_K = E_\alpha \qquad b) \tau_B = \frac{3V_{hyd}\eta}{k_B T}$$

Gleichung 2.5: a) Gleichung für die Neel-Relaxation der Elektronen nach Entfernen des Magnetfeldes mit τ_0 (Faktor der anisotropen Energie), K (anisotrope Energiekonstante), V_K (Volumen des Eisenoxidkerns) und E_α (magnetische anistrophe Energie); b) Abhängigkeit der Brownschen Relaxation vom hydrodynamischen Durchmesser der Partikel (Hülle und Kern) und der Viskosität η der umgebenden Flüssigkeit.

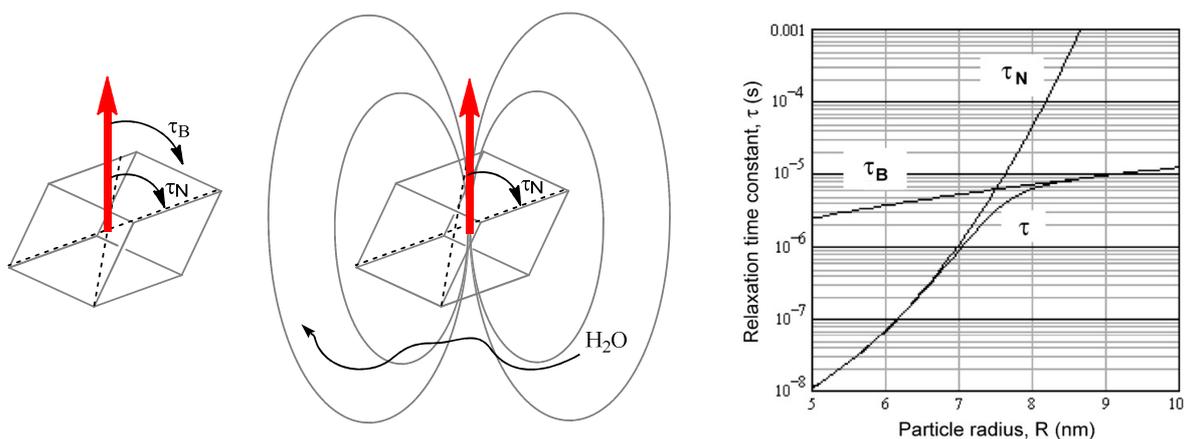


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der inneren Neel-Relaxation (τ_N) zu den anisotropen Achsen und der Brownschen Bewegung (τ_B) des Kolloids (links); Beeinflussung der Protonenrelaxation durch die Neel-Relaxation und Diffusion durch ein inhomogenes Magnetfeld (Mitte); Einfluss der Neel- und Brownschen Relaxation in Abhängigkeit vom Durchmesser des Eisenoxidkerns (rechts).^[62]

2.3.2. Wirkungsweise, Einsatz und Aufbau als MR-Kontrastmittel

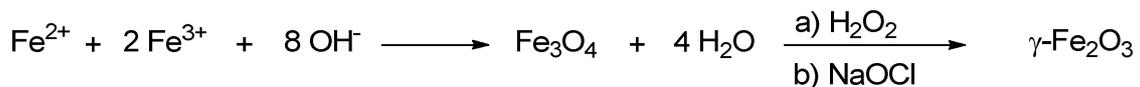
Diese lokalen Magnetfeldinhomogenitäten verkürzen in einem outer-sphere-Prozess die T_1 - und T_2 -Relaxation der Wasserprotonen.^[47,60] Hierbei kann man zwischen der Hydrathülle und Wassermolekülen, die am Kolloid vorbei diffundieren, unterscheiden. Hauptsächlich wirken Eisenoxid-Nanopartikel als negatives Kontrastmittel, da ihr Effekt auf die transversale Relaxation deutlich größer ist als auf die longitudinale Relaxation. Sie beschleunigen durch ihre lokalen Magnetfelder die Dephasierung der Protonenspins und lassen damit Gewebe im MR-Bild dunkel erscheinen.^[26]

Die Größe der Partikel ist ebenso entscheidend für die *in vivo* Verteilung des Kontrastmittels.^[60] So werden Partikel (Resovist®, Endorem®) mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 50-100 nm zur Bildgebung in Leber und Milz verwendet, da sie sehr schnell nach intravenöser Gabe durch Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) aus der Blutbahn entfernt, in die Organe des Mononukleären Phagozytierenden Systems (MPS) abgelagert und in den körpereigenen Eisenpool überführt werden.^[47,63] Kleinere Kolloide (Sinerem®), sogenannte USPIO (**ul**trasmall **s**uperparamagnetic **i**ron **o**xides), im Größenbereich von 20 nm weisen eine differenzierte Organverteilung auf und befinden sich in der Prüfung für die Lymphknotendiagnostik und zur Darstellung von instabilen atherosklerotischen Plaques. Aufgrund ihrer geringen Größe zeigen VSOP (**v**ery small **s**uperparamagnetic iron oxide **p**articles) wie Supravist® mit einem Gesamtdurchmesser von 7-10 nm eine verstärkte T_1 -Relaxivität und eine verlängerte intravasale Zirkulationszeit auf und werden neben Resovist^[64] als Blutpool-Kontrastmittel für die MR-Angiographie erprobt.^[29]

Die magnetischen Eigenschaften und die spezifische Gewebeverteilung werden auch durch die Hülle, die die Eisenoxid-Nanopartikel umgibt und aus zahlreichen Materialien bestehen kann, beeinflusst.^[39,65] Die Hülle ist ein wichtiger Bestandteil der Kolloide, da sie die dauerhafte Suspension und Stabilität^[66] der Partikel gewährleistet, vor Agglomeration schützt und an ihr eine weitere Funktionalisierung durchgeführt werden kann.^[67] In zahlreichen Übersichtsartikeln werden Darstellungs- und Charakterisierungsmethoden sowie die weiteren Anwendungsgebiete für Eisenoxid-Nanopartikel beschrieben.^[39,63,65,68] Die derzeit in der MRT verwendeten SPIO besitzen eine Hülle aus Dextran (Endorem®, Sinerem®), einem auf Glucose basierenden organischen Polymer, und dessen Carboxyderivat (Resovist®).

2.3.3. Dextran-umhüllte Eisenoxid-Nanopartikel

Die am meisten benutzte und präparativ einfachste Methode der Eisenoxid-Nanopartikelherstellung ist die alkalische, nasschemische Fällung von Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzen im Beisein des organischen Polymers,^[67,69,67,71] wobei das Partikelwachstum mit Hilfe der Ostwaldreifung beschrieben werden kann.^[36] Da hierbei Magnetit entsteht, das schon meist durch Maghemit verunreinigt ist, können die Nanopartikel durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid oder Natriumhypochlorit^[67] vollständig in das stabilere Maghemit überführt werden (Gleichung 2.6).^[58]



Gleichung 2.6: Darstellung von Magnetit durch Fällung von Eisensalzen und Oxidation zu Maghemit.

Die Fällung wird unter Verwendung eines großen Überschusses an Hüllmaterial durchgeführt, so dass das Eisenoxid an der Agglomeration gehindert wird. Größe und Zusammensetzung der Kolloide können durch Parameter wie den eingesetzten Eisensalzen, dem pH-Wert, Reaktionsvolumina^[36] oder auch anhand der Menge und Länge des eingesetzten Polymers^[69,70] gesteuert werden.^[72] Als organisches Polymer kann Dextran, dessen Derivate^[63,67] oder auch Stärke^[66] verwendet werden. Dextran, das aus Glucosemonomeren aufgebaut ist, die 1,6-glycosidisch miteinander verknüpft sind,^[73] kann in verschiedenen definierten Molmassen im kDa-Bereich verwendet werden (Abbildung 2.10).^[67,69,71]

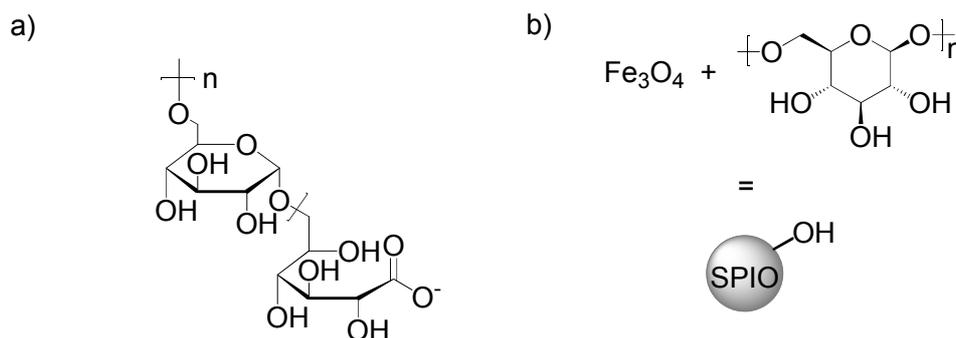


Abbildung 2.10: a) Alkalisch behandeltes Carboxydextran mit endständiger Carboxylgruppe in Haworth-Schreibweise,^[74] b) Zusammensetzung von SPIO aus Maghemit (Kern) und Dextran (Hülle); dargestellt ist eine Monomereinheit des Dextrans.

Je nach den gewählten stöchiometrischen Parametern variieren die Kerngrößen unter den unterschiedlichen Synthesen zwischen 5-15 nm und die hydrodynamischen Durchmesser zwischen 40-70 nm.^[67,69,70] Noch kleinere MION (**monodisperse iron oxide nanoparticles**, Kern: 3-5 nm, Hülle: 5-10 nm) können durch Erhöhung des Dextran-/Eisenverhältnisses synthetisiert werden.^[69]

Die Behandlung der Kolloide mit Epichlorhydrin und Ammoniak führt zu einer inter- und intramolekularen Quervernetzung des Dextrans und dient zur Einführung primärer Aminogruppen.^[69] Nach Anbindung des Epichlorhydrins über eine Chlorsubstitution an den Alkoholgruppen des Dextrans kann eine Epoxidringöffnung durch ein weiteres Dextranmolekül oder durch Ammoniak erfolgen (Abbildung 2.11). Das zuvor lose um den Kern angeordnete Hüllpolymer wird dadurch zu einem Netz umfunktioniert, das das Eisenoxid fest einschließt.^[75] Die so erhaltenen CLIO-NH₂ (**crosslinked iron oxides**) besitzen eine erhöhte Stabilität und die Möglichkeit zur weiteren Modifikation an den Aminoheiten. Die magnetischen Eigenschaften sowie Durchmesser bleiben annähernd konstant.^[69,75]

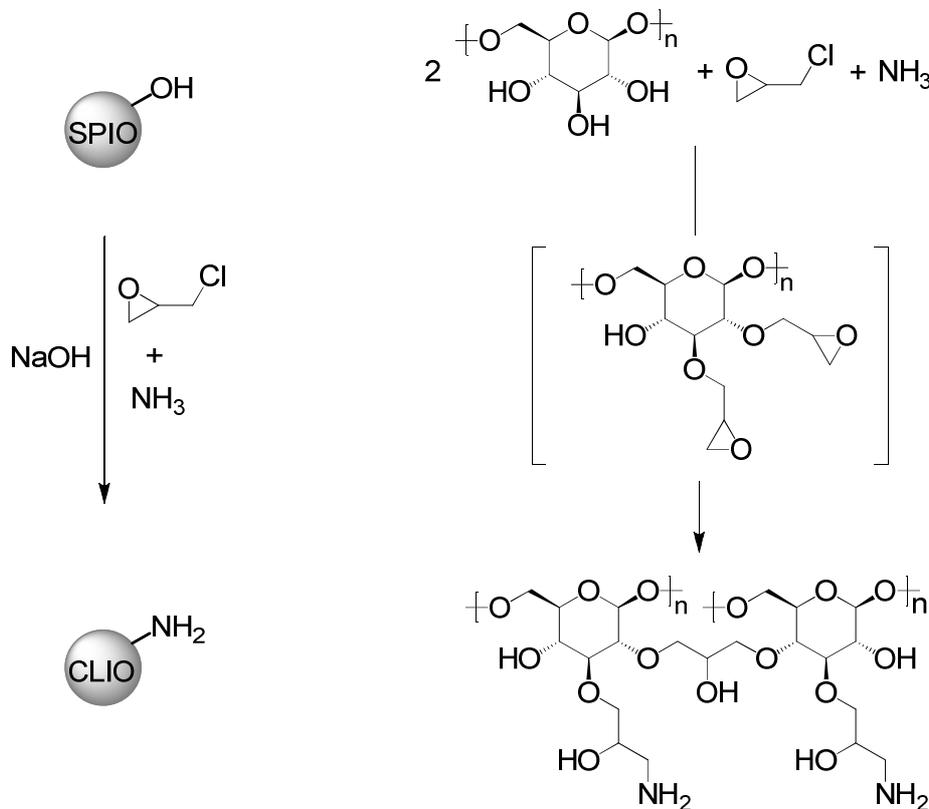


Abbildung 2.11: Umsetzung von SPIO zu CLIO-NH₂ (linke Spalte); schematische Vernetzung der Dextranhülle und Einführung von Aminogruppen (rechte Spalte).

Alternativ können funktionelle Gruppen am Nanopartikel durch die Derivatisierung des Dextrans vor der Synthese von Eisenoxid-Nanopartikel oder am fertigen Kolloid eingeführt werden. Die zweite Methode wird meist bevorzugt, da bei der Synthese der Nanopartikel das meiste Polymer bei der Aufreinigung wieder abgetrennt wird.^[76] Prinzipiell kann man unterscheiden zwischen Substitutionsreaktionen an den Alkoholfunktionen, oder Ringöffnungsreaktionen, die mit einer größeren Veränderung der Struktur einhergehen.

Eine Möglichkeit zur Darstellung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Aminofunktionen ist die ringöffnende Oxidation des Dextrans mit Natriumperodat, anschließende Kondensation mit Ethylendiamin und Reduktion des intermediären Imins (Abbildung 2.12a).^[77] Wird die Modifizierung vor der SPIO-Synthese durchgeführt, wird das Aminodextran neben Underivatisiertem als Hüllmaterial eingesetzt.^[77] Bei einer nachträglichen Umsetzung können analog zum Diamin auch Proteine wie Transferrin^[78,79] oder *Staphylococcus aureus* Protein A^[71] an das Kolloid angebracht werden.

Dextran mit Carboxylgruppen kann neben der Verwendung von Carboxydextran durch die Umsetzung des organischen Polymers mit Chloressigsäure hergestellt werden (Abbildung 2.12b).^[67,80] Der Vorteil der beiden Carboxyderivate gegenüber Dextran liegt in der erhöhten Stabilität der Partikel, die sich durch den Ausbau einer Bindung zwischen den Eisenatomen und der Carboxylgruppe bei der Fällung ergibt.^[81]

Durch den Einsatz von Dextransulfat kann ebenfalls eine anionische Hülle generiert werden (Abbildung 2.12c). Allerdings wird hier das derivatisierte Polymer wiederum nur als Additiv in geringen Mengen hinzugegeben, da es die Bildung der Eisenoxid-Nanopartikel stört. Durch die anionische Oberfläche erhofft man sich einerseits eine verbesserte Stabilität und andererseits einen Einsatz in der kardiovaskulären Bildgebung durch die erhöhte Verweildauer im Blut, da die Aufnahme der Kolloide in das RES aufgrund der veränderten Hülle verzögert wird.^[72] Eine verbesserte Stabilität der Partikel erzielt man auch durch die Reduzierung der endständigen Aldehydfunktionen mit Natriumborhydrid, wodurch gleichzeitig eine Verminderung des Polymer/Eisenverhältnisses bei gleichbleibender Partikelgröße bewirkt wird. Weitere Untersuchungen legen die Theorie nahe, dass Dextran und dessen Derivate in einem frühen Stadium der Synthese Einfluss auf das Partikelwachstum nehmen, indem sie die Bildung von Magnetit aus den Eisenhydroxiden hemmen.^[76]

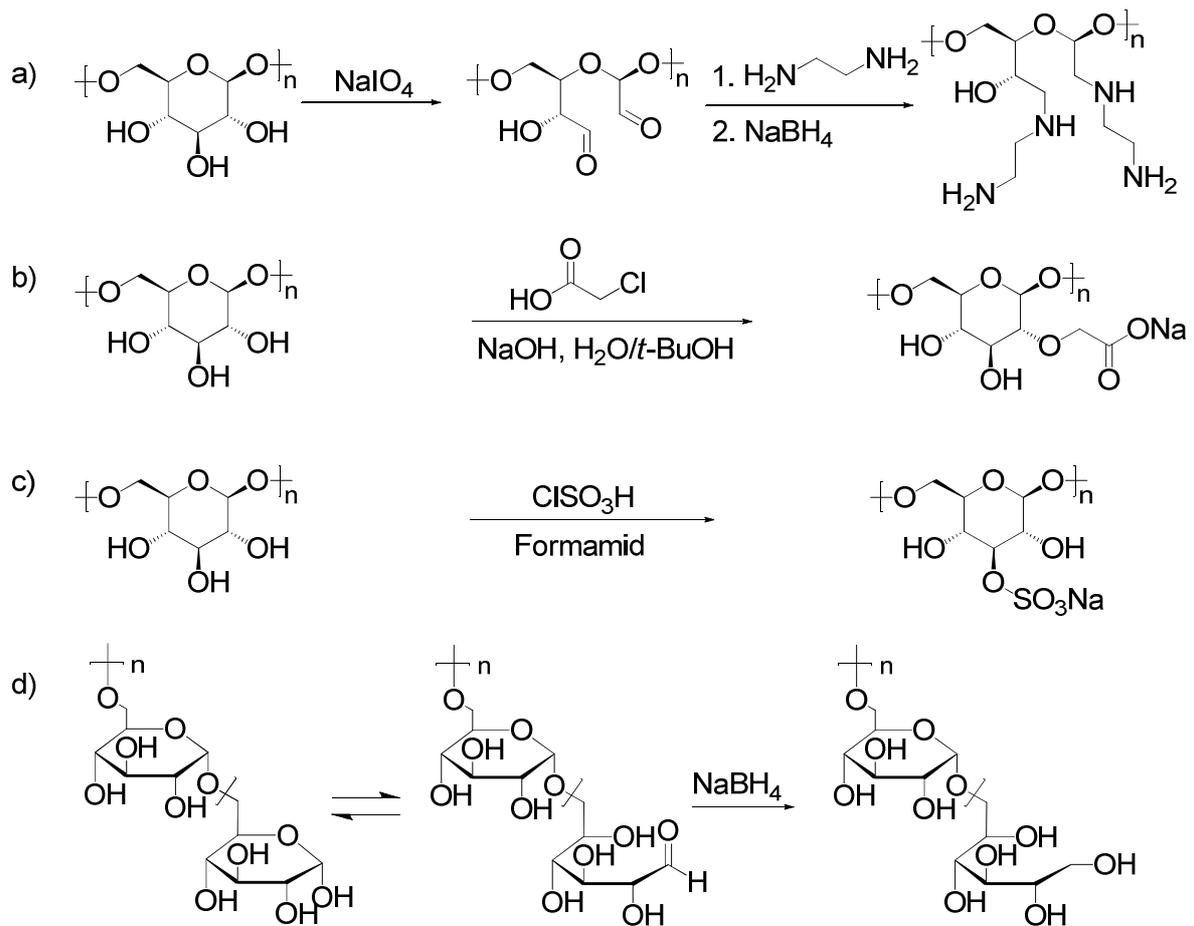


Abbildung 2.12: a) Oxidation des Dextrans unter Ringspaltung. Die entstandenen Aldehydfunktionen ergeben mit 1,2-Diaminoethan ein Imin, das mit Natriumborhydrid reduziert wird. b) Anbringen einer anionischen Carboxyleinheit durch die Umsetzung von Dextran mit Chloressigsäure in einem Wasser/*t*-BuOH-Gemisch; c) Darstellung von Dextransulfat mit Chlorschwefelsäure in Formamid;^[73] d) Die Glucoseendgruppen liegen im Gleichgewicht als offenkettige Aldehyde vor. Diese können zum Alkohol reduziert werden.

Ausgehend vom CLIO-NH₂-Grundgerüst können an den Aminogruppen kleine organische Liganden über unterschiedliche Funktionalitäten eingebracht werden. Diese besitzen im Gegensatz zu Peptidsequenzen zwar keine biologische Aktivität, können aber durch die Änderung der Partikeloberfläche dennoch zu einer veränderten Zellaufnahme und Gewebeverteilung führen. Zur Umsetzung müssen die Aminofunktionen durch geeignete, wasserlösliche Reagenzien aktiviert und mit den Substraten in einem gepufferten Medium umgesetzt werden.^[82] Die Umsetzung mit Carbonsäureanhydriden erfolgt unter leicht basischen Bedingungen, bei der die Aminofunktionen am CLIO-NH₂ in unprotonierter Form vorliegen (Abbildung 2.13a).

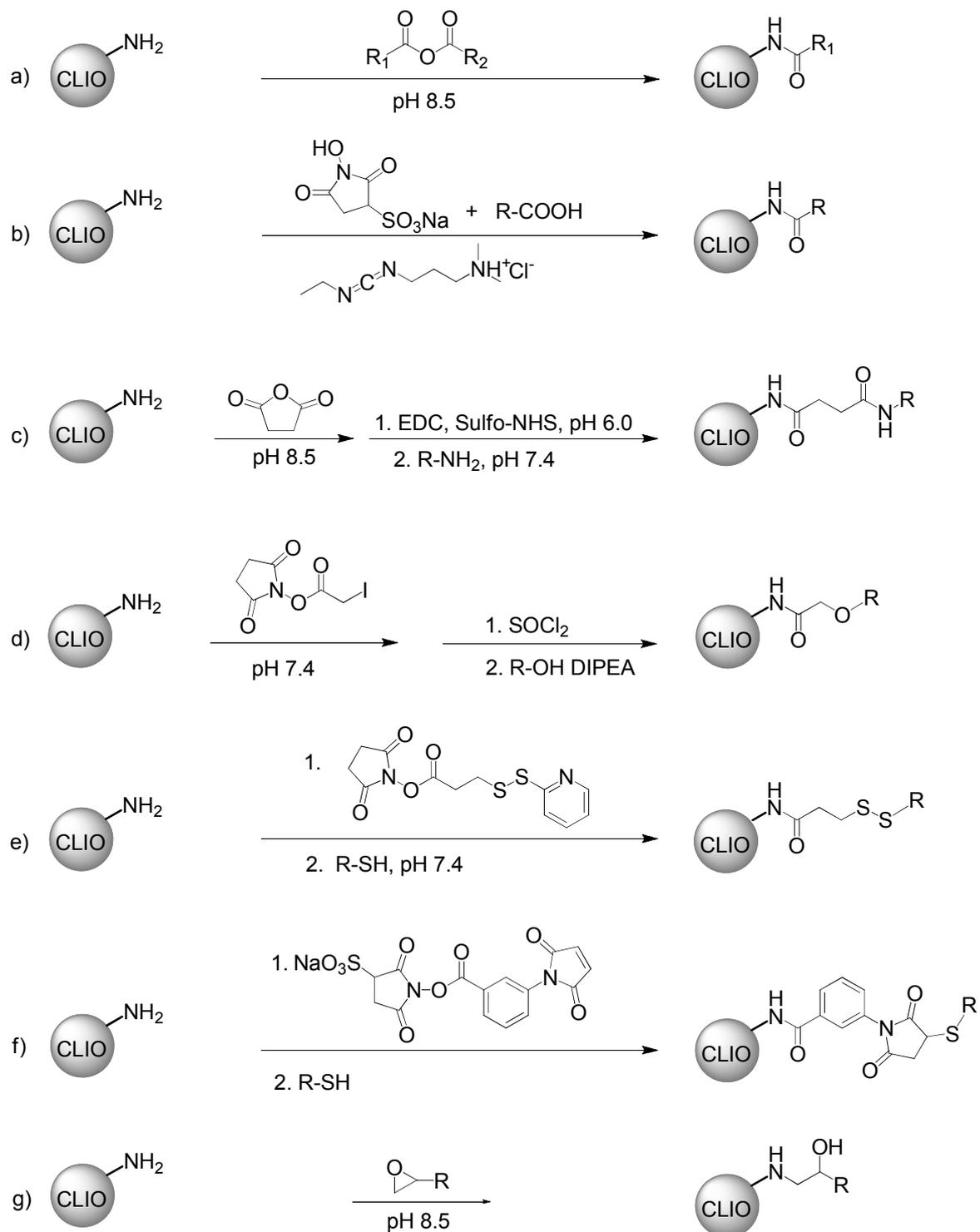


Abbildung 2.13: Umsetzung von CLIO-NH₂ mit verschiedenen funktionellen Gruppen: a) einem Carbonsäureanhydrid; b) einer Carboxylfunktion; c) einem primären Amin; d) einem Alkohol; e,f) einem Thiol; g) einem Epoxid.

Im Gegensatz zu den Anhydriden verfügen Carbonsäuren über keine Abgangsgruppe, so dass sie mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und mit N-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (Sulfo-NHS) aktiviert werden müssen.

Der so entstandene reaktive NHS-Ester kann anschließend mit dem Kolloid zum Amid umgesetzt werden (Abbildung 2.13b). Die Derivatisierung mit primären Aminen wird mit Hilfe der gerade beschriebenen Reaktionen durchgeführt. Zuerst werden mittels Bernsteinsäureanhydrid Carboxyleinheiten auf der Partikeloberfläche generiert. Die Amidbindung kann wiederum mit EDC und Sulfo-NHS erfolgen (Abbildung 2.13c). Zur Einführung eines Alkohols werden die CLIO-NH₂ im ersten Schritt mit N-Succinimidylodoacetat (SIA) behandelt. Der Linker bindet sich über den NHS-Ester an die Hülle, während das Iodid im wässrigen Medium durch eine Hydroxylgruppe substituiert wird. Diese wird mit Thionylchlorid aktiviert und reagiert in Gegenwart von DIPEA mit dem gewünschten Alkohol (Abbildung 2.13d). Die Anbindung von Thiolen findet über eine Disulfidbrücke statt, bei der N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) als Linker verwendet wird und Pyridin-2-thion (P2T) als Abgangsgruppe in einer Thiolaustauschreaktion fungiert (Abbildung 2.13e). Die dabei entstandene Disulfidbrücke ist jedoch anfällig für Reduktionsmittel und somit unter *in vivo* Bedingungen leicht spaltbar. Alternativ können Thiole durch den m-Maleimidobenzoessäure-N-hydroxysulfo-succinimidester (Sulfo-MBS) eingeführt werden.^[83] Die Anbindung des Linkers an das Kolloid erfolgt wiederum über den NHS-Ester, während das Thiol in einer Michael-Addition die Doppelbindung der Maleinimid-Gruppe angreift (Abbildung 2.13f). Epoxide werden mit den Partikeln in Analogie zu den Anhydriden ohne weitere Reagenzien im basischen Milieu umgesetzt, da sie eine interne Abgangsgruppe besitzen. Hierbei wird in einer S_N2-artigen Substitution der β-Alkohol gebildet (Abbildung 2.13g).

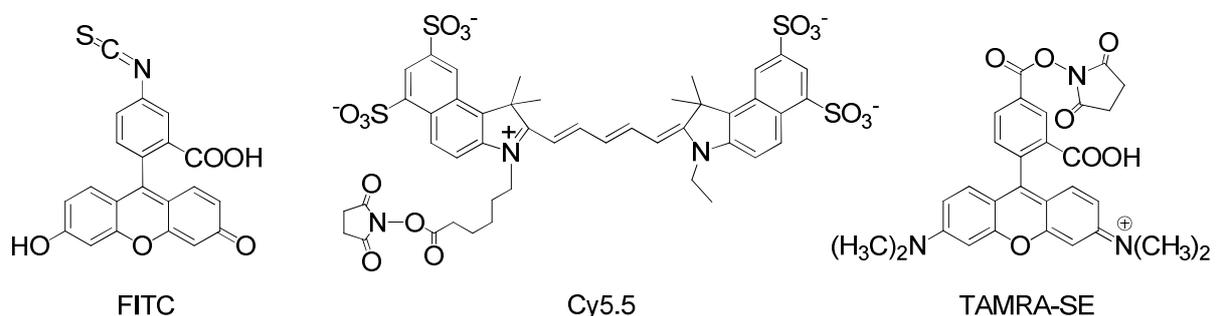


Abbildung 2.14: Strukturen häufig verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe: Fluoresceinisothiocyanat (links), Cy5.5 (Mitte), Carboxytetramethylrhodamin-Succinimidylester (rechts).

Zur Untersuchung der *in vivo* Verteilung sowie deren Nachweis in Zellen werden Eisenoxid-Nanopartikel häufig mit Fluoreszenzmarkern versehen. Damit besteht die

Möglichkeit, sowohl MR- als auch Fluoreszenzbildgebung mit einem einzigen Kontrastmittel zu betreiben. Als Fluoreszenzfarbstoffe haben sich Fluorescein-(FITC),^[82] Rhodamin- (TAMRA-SE)^[84] und Cyaninfluorophore (Cy5.5)^[85,86] in den biomedizinischen Anwendungsgebieten etabliert (Abbildung 2.14). Alle drei besitzen in Isothiocyanat bzw. Succinimidylester eine reaktive Gruppe, die unter Thiocarbamid- oder Amidbildung mit den Aminofunktionen der CLIO-NH₂ umgesetzt werden können. Die Fluoreszenzmerkmale und Grad der Markierung sind in Tabelle 2.1 angegeben.

	FITC	TAMRA-SE	Cy5.5
Extinktionskoeffizient (M ⁻¹ cm ⁻¹)	73000	65000	250000
Absorption (nm)	494	555	675
Emission (nm)	515	580	694
Anzahl n pro Partikel	2	-	1.8

Tabelle 2.1: Extinktionskoeffizienten, Anregungs- und Emissionswellenlänge der Farbstoffe mit der durchschnittlichen Beladung des Kolloids.^[82,86] Die Daten für TAMRA beziehen sich auf einen Dextran-gebundenen Rhodaminfarbstoff (Dextran-TAMRA).^[91]

Am besten geeignet für den Einsatz in der Biomedizin erweist sich der Sulfoindocyaninfarbstoff Cy5.5. Die Absorptions- und Emissionsmaxima befinden sich aufgrund der Länge des konjugierten Systems in einem Bereich oberhalb von 600 nm, in dem die Autofluoreszenz von biologischem Gewebe gering ist.^[87] Weiterhin sind der sehr große Extinktionskoeffizient und seine durch die anionischen Sulfogruppen bedingte gute Wasserlöslichkeit von Vorteil.^[88] Während in zahlreichen Artikeln SPIO mit FITC markiert werden, ist die Benutzung von Rhodaminfluorophoren in Verbindung mit Eisenoxid-Nanopartikel nur bei Hüllen aus Silica^[89] und Poly-(amidoamin)-Dendrimeren (PAMAM)^[90] bekannt.

Eine verbesserte definierte *in vivo* und *in vitro* Aufnahme erreicht man durch das Labeln der Partikel mit substratspezifischen Proteinen oder Antikörpern, was oftmals über die vorher beschriebenen Linkersysteme durchgeführt wird. Beide Eigenschaften von Fluoreszenz- und Proteinmarkierung können miteinander kombiniert werden, indem die Farbstoffe direkt an das Kolloid gebunden^[82,86] oder als Bestandteil eines Polypeptids in die Hülle eingebracht werden.^[92] Bei letzterem wird der Farbstoff meist mit einer aminoreaktiven Komponente versehen, was eine

Fluoreszenzmarkierung am oft vorhandenen Lysinbestandteil oder am N-Terminus des Polypeptids ermöglicht.^[85,87] Wichtig hierbei ist, dass die Bioaktivität der Proteine durch die Modifizierungen nicht beeinträchtigt wird.^[86] Deshalb erscheint es vorteilhafter, fluoreszenzmarkierte Nanopartikel mit den Proteinen umzusetzen, da dadurch das Polypeptid nur an einer Position verändert wird.

Für eine spezifische *in vivo* Anlagerung können CLIO-NH₂ mit Annexin V versehen werden. Dieses menschliche Protein kann nur an einer Lysineinheit pro mol Polypeptid mit dem bimodalen N-Succinimidyl-S-Acetyl-thioacetat (SATA) über dessen NHS-Ester-Funktion derivatisiert werden, ohne dass seine biologische Aktivität beeinträchtigt wird. Das Protein bindet stark spezifisch an Phosphatidylserin, das ein frühes Anzeichen für Apoptose darstellt. Über den SATA-Linker kann Annexin V anschließend mit SPDP aktivierten CLIO-NH₂ unter Ausbildung einer Disulfidbrücke umgesetzt werden (Abbildung 2.15).^[86]

Mit demselben Mechanismus können Kolloide mit dem F(ab')₂-Fragment, das Bestandteil eines E-Selektin-spezifischen Antikörpers ist, versehen werden. E-Selektin spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese und bei der Bildung von atherosklerotischem Plaque.^[93]

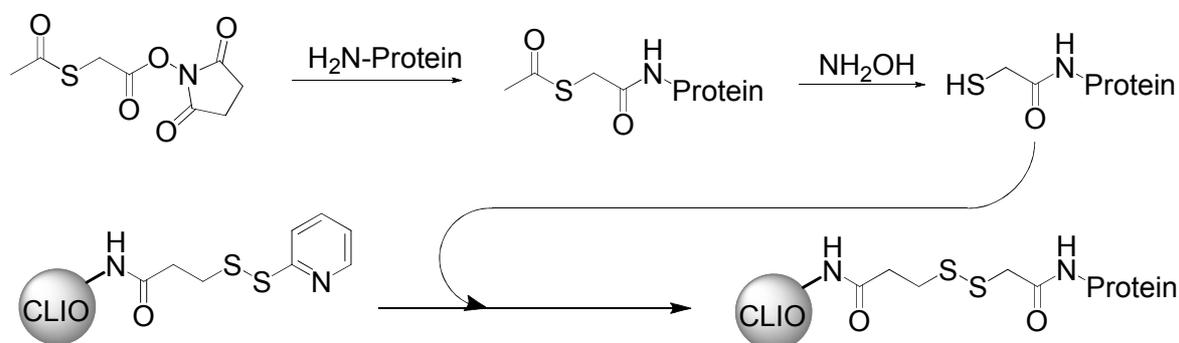


Abbildung 2.15: Schematische Verknüpfung von Nanopartikel und Protein (Annexin V und F(ab')₂-Fragment) mit Hilfe von SATA und SPDP. Vor dem Thiolaustausch in der Disulfidbindung muss die Acetylenschutzgruppe am SATA-Linker mit Hydroxylamin entfernt werden.

Die erhöhte Aufnahme von Eisenoxid-Nanopartikeln in Zellen (z.B. menschliche CD34⁺-Zellen) kann durch die Sequenzen 48-57 des Tat-proteins stark verbessert werden, da diese kurze Polypeptidkette als „membran translocating signal“ fungiert und durch zelluläre und Kernmembranen wandern kann.^[94] Hierbei können FITC-Derivate des Peptids über einen SPDP- oder SIA-Linker an den CLIO-NH₂ angebracht werden.^[94-96]

2.3.4. Verwendung von Monomeren als Hüllmaterialien

Neben den oben behandelten SPIO befinden sich mit dem niedermolekularen Monomer Citrat umhüllte Eisenoxid-Nanopartikel in klinischen Tests.^[29] Aufgrund ihrer geringen Größe (Kerndurchmesser 5 nm, hydrodynamischer Durchmesser 8 nm) eignen sie sich für die MR-Angiographie, da sie in großen Mengen und kurzer Zeit von Macrophagen aufgenommen werden.^[97,98] Die elektrostatische Stabilisierung der Partikel resultiert aus einer Komplexbindung des Eisenoxids durch die ca. 75 anionischen, niedermolekularen Monomere.^[99,100] Durch dieselbe Eigenschaft können mit dem positiv geladene Polypeptid Protamin versehene bio- oder fluoreszenzaktive Moleküle an der Oberfläche angebracht werden.^[100]

Bei der Einhüllung der Eisenoxid-Nanopartikel mit Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) entsteht ebenfalls eine negativ geladene Oberfläche.^[58] Die Herstellung der Eisenoxid-Nanopartikel kann auf verschiedene Weisen erfolgen, da sie erst nachträglich mit den Chelatliganden durch eine Bindung der Carboxylatgruppen an der Eisenoxidoberfläche versehen werden. Verstärkt wird die Hülle-Kern-Bindung im Falle von DMSA durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Liganden.

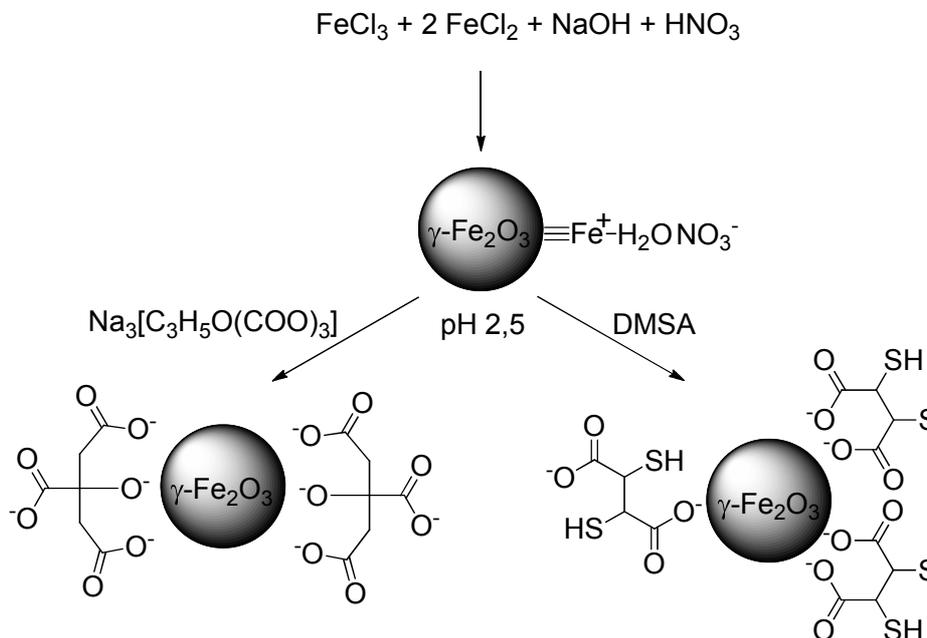


Abbildung 2.16: Vom kationischen Precursor ausgehend können Eisenoxid-Nanopartikel mit Hüllen aus Citrat (links) und DMSA (rechts) synthetisiert werden. Eine Funktionalisierung ist an den freien Carboxylat- bzw. Thiolgruppen möglich.

Die einfachste Methode ist die schon beschriebene alkalische nasschemische Fällung von Eisen(II)- und Eisen(III)-Chloriden, jedoch ohne die Verwendung von Hüllmaterial. Durch Zugabe von Salpetersäure erhält man als Precursor ein acidisches Ferrofluid (pH 2-3), bei dem das durch Oxidation entstandene, positiv geladene Maghemit mit dem Nitrat als Gegenion vorliegt. Die anschließende Einhüllung kann entweder mit Citrat oder Dimercaptobernsteinsäure erfolgen (Abbildung 2.16).^[65,101] Allerdings variiert bei dieser Syntheseroute der Durchmesser des Oxidkerns zwischen 3-15 nm.^[58]

Alternativ können durch die thermische Zersetzung von Eisenacetylacetonat in einem organischen Solvent kristalline Magnetite mit monodispersen Durchmessern im Bereich von 3-20 nm hergestellt werden.^[102] Durch eine anschließende Ligandenaustauschreaktion von Ölsäure mit DMSA wird die Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität der Partikel erzielt.^[103,104] In einem anderen Hochtemperaturverfahren können ebenso Ölsäure umhüllte, monodisperse Nanopartikel aus Eisen(III)-chlorid und Natriumoleat mit einem ähnlichen Größenbereich gewonnen werden (Abbildung 2.17).^[105,106]

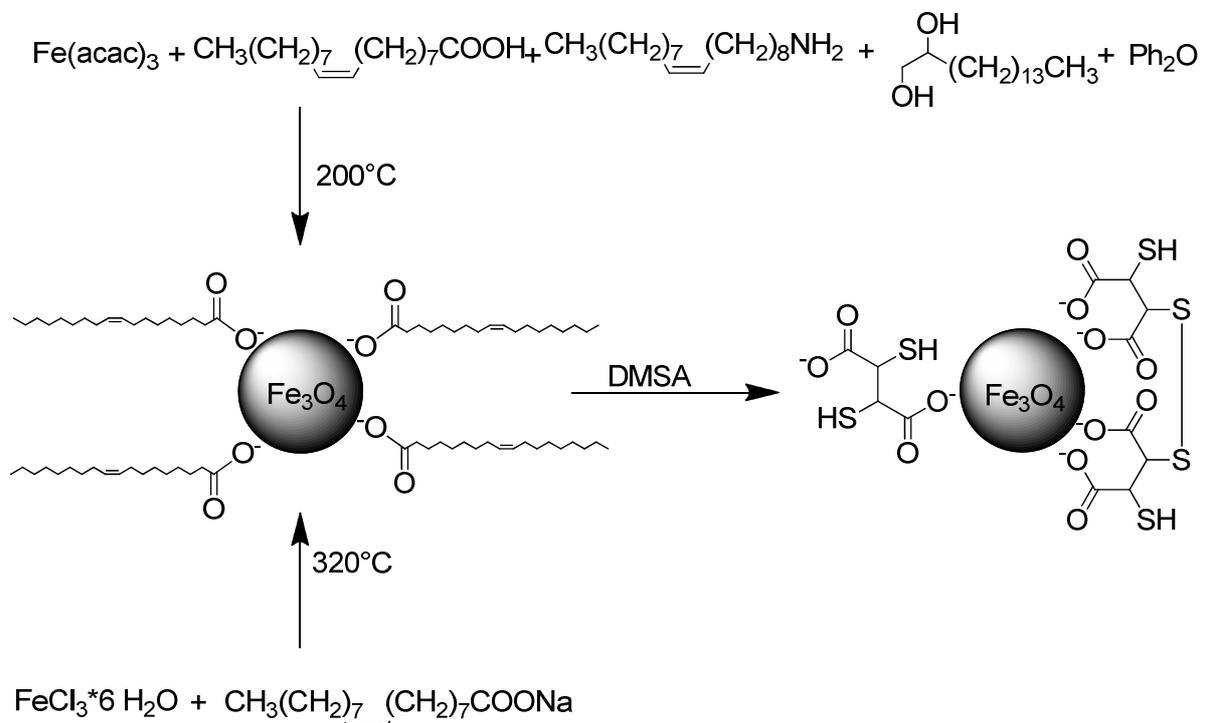


Abbildung 2.17: Thermische Verfahren zur Herstellung von Ölsäure-umhüllten, hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln. Durch Austausch der Hülle mit DMSA erhält man MRT-geeignete Partikel.

2.3.5. PEG-Derivate als Hüllmaterial

Der Gebrauch von Polyethylenglykolketten (PEG-Ketten) ist in der Biomedizin weit verbreitet. Da PEG proteinresistent ist und keine antigenen Eigenschaften besitzt, wird es langsamer von Macrophagen aufgenommen und sorgt dadurch für eine verlängerte Blutzirkulationszeit.^[107] Für den Einsatz als Eisenoxidhüllmaterial wird es meist an den Endgruppen funktionalisiert, um zum einen die Bindung zum Kern und damit die Stabilität des Partikels zu vergrößern, und zum anderen, um bioaktive Moleküle oder Fluorophore an der Oberfläche einfügen zu können.^[108,109] Die Einhüllung mit PEG kann auf verschiedene Arten geschehen. Am häufigsten werden Ölsäure-umhüllte Partikel als Precursor genutzt, deren hydrophobe Hülle vollständig mit PEG ersetzt wird^[110] oder bei denen PEG als Copolymer zugesetzt wird.^[106] Auch ist die nasschemische Fällung mit längerem PEG (30-70 kDa) möglich.^[111] Die weitere Funktionalisierung erfolgt mit den in der Biochemie üblichen Methoden an den in das PEG eingeführten Amin-^[108] oder Carboxylgruppen^[109]. Die Wechselwirkung zum Kern wird unterdessen mit chelatisierenden Gruppen bewerkstelligt. Dies können Carboxy-,^[106] Triamin-,^[112] Phosphorsäure-^[113] oder Siloxangruppen^[108] sein. Als Beispiel für ein PEG-Derivat, das für auf Eisenoxid basierende MRT-Kontrastmitteln konzipiert wurde, soll das in Abbildung 2.18 dargestellte und im Arbeitskreis Schenk synthetisierte Molekül dienen.^[114]

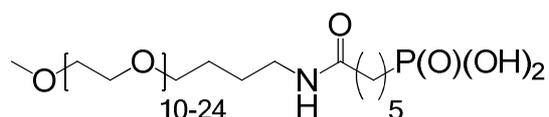


Abbildung 2.18: PEG-Derivat mit einer Phosphonsäure, die über ein Amid an das PEG gebunden wurde. Die unterschiedliche PEG –Kettenlänge bedingt die Löslichkeit in Wasser.

Dieses Molekül besteht aus einem hydrophilen Abschnitt (PEG), der die Suspension der Partikel in einer isotonischen Lösung gewährleistet, einem hydrophoben Teil, der für eine dichte Packung der Hüllmoleküle sorgt und einer Phosphonsäure, die eine stabile Bindung zum Eisenoxidkern bildet.^[114]

3. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und weitere Modifikation Dextran-umhüllter Eisenoxid-Nanopartikel für die MR-Angiographie. Aufbauend auf den Ergebnissen der Diplomarbeit^[36] sollte die Synthese von SPIO in Hinsicht auf die Stabilität und das Mengenverhältnis Kern/Hülle optimiert werden. Hierzu wurde Dextran unterschiedlicher Kettenlänge zur Einhüllung der Eisenoxide verwendet. Ein weiterer Aspekt war die Entwicklung einer Aufreinigungsmethode, mit der die umhüllten Nanopartikel vollständig von dem überschüssigen Dextran abgetrennt werden konnten.

In Anlehnung an das Patent von L. Josephson et al.^[69] wurde die Dextranhülle der erhaltenen SPIO verlinkt und aminiert. Dadurch sollte das Eisenoxid so fest in das Polymer eingebunden werden, dass weder Agglomeration noch Hüllverlust bei der weiteren Verwendung auftraten. Ebenso sollten die CLIO-NH₂ einen Stickstoffgehalt von ca. 1% der Kolloidmasse zur weiteren Modifikation aufzeigen.

Die Einführung von Fluoreszenzmolekülen sowie Antikörpern an den Amineinheiten über die in Kapitel 2 erwähnten Kupplungsreaktionen gehörten ebenso zur Zielsetzung wie die Charakterisierung der synthetisierten Derivate.

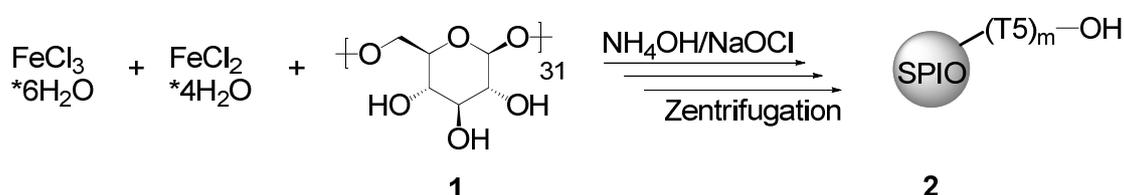
Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der magnetischen Eigenschaften, insbesondere die Messung der Relaxivitäten, und des *in vivo* und *in vitro* Verhaltens der Partikel in Zusammenarbeit mit dem SFB 688 und dem deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz Würzburg (DZHI Würzburg).

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Optimierung der Synthese von SPIO

In Fortsetzung der Diplomarbeit^[36] wurden mit Dextran umhüllte SPIO (**s**uper**p**aramagnetic iron **o**xides) nach Josephson^[69] hergestellt. Die Partikel sollten hierbei eine minimale Hüllmenge und trotzdem eine gute Suspendierbarkeit in wässriger Lösung aufweisen. Ausgehend von einem 8.5 nm großen Magnetikern, der sich aus den Ergebnissen der Diplomarbeit^[36] ergab, konnte die Anzahl an Polymermolekülen je Eisenoxidkern aus den Kohlenstoff- und Wasserstoffwerten der Elementaranalysen berechnet werden. Der bestimmende Schritt zur Abtrennung des überschüssigen, freien Dextrans in den ersten Versuchen war die Isolierung der Kolloide als schwarzer Bodensatz durch Zentrifugation.

So konnten in der Diplomarbeit^[36] unter Verwendung von 9-10 g Dextran T5 (**1**) aus 3.9 g Eisensalzen in einem Gesamtvolumen von 36 ml durch Zugabe von 6%iger Ammoniaklösung Eisenoxid-Nanopartikel SPIO-T5 (**2a***) mit rund 100 Dextranmolekülen dargestellt werden (Gleichung 4.1). Dieser Wert ist im Vergleich zur Literatur mit 25 ± 6 Molekülen T10^[115] pro Kern relativ hoch, aber da das verwendete T5 mit 31 Monomereinheiten deutlich kürzer ist, noch annehmbar. Die wiederholte Zentrifugation ergab eine Anzahl von 52 Hüllmolekülen bei **2a**. Bei einer erneuten Synthese konnte der Dextrananteil bei **2b** auf etwa 70 Moleküle je Kern durch die zweimalige Zentrifugation verringert werden. Hierdurch sank jedoch die Ausbeute auf 38 %, da viele Partikel in der Zentrifugatlösung suspendiert blieben.



Gleichung 4.1: Allgemeine Synthese für die Darstellung von SPIO mit Dextran T5.

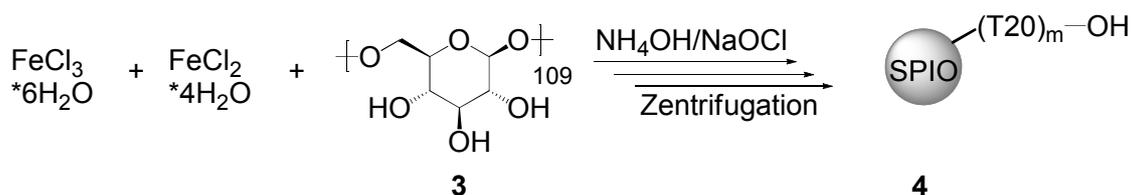
Ein weiterer Versuch mit einer vor der Zentrifugation verdünnten SPIO-T5-Lösung zeigte, dass die Abtrennung des Dextrans konzentrationsabhängig ist. Hier wurde schon bei der 1. Zentrifugation derselbe Wert wie bei der vorherigen Synthese von

2b erhalten. Durch Wiederholung des Auftrennungsschrittes sank der Hüllanteil erneut und es wurden SPIO-T5 (**2c**) in einer guten Ausbeute von 73 % erhalten. Allerdings konnten die Kolloide nur mit lang andauernder Ultraschallbehandlung in Wasser resuspendiert werden, was für eine verminderte Stabilität von **2c** spricht. Tabelle 4.1 zeigt die Zusammensetzung mit Dextran T5-ummantelten Eisenoxid-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Konzentration und der Anzahl der Aufreinigungsschritte.

SPIO-T5	Elementaranalyse in Massenprozent	m	Ausbeute
2a*	13.65 (C) 2.34 (H)	100	83 %
2a	8.75 (C) 1.70 (H)	52	70 %
2b	10.91 (C) 2.34 (H)	70	38 %
2c	8.53 (C) 1.69 (H)	50	73 %

Tabelle 4.1: Daten der Elementaranalyse, mit denen das Kern-/Hüllverhältnis m der SPIO-T5 (**2a-c**) berechnet wurde und dazugehörige Ausbeuten der Versuche.^[36]

Analog wurde die Synthese von SPIO-T20 (**4**) mit verschiedenen Mengen an Dextran T20 durchgeführt (Gleichung 4.2). Da das Polymer laut Herstellerangaben eine Molmassenverteilung zwischen 15 und 20 kDa aufweist, wurde der Mittelwert von 17.5 kDa, der 109 Monomereinheiten entspricht, als Basis für die Auswertung der Versuche herangezogen (Tabelle 4.2).



Gleichung 4.2: Allgemeine Synthese für die Darstellung von SPIO (**4**) mit Dextran T20 (**3**).

Bei der Herstellung von SPIO-T20 (**4a**) wurde nur 1.0 g Dextran T20 auf 3.9 g der Eisenchloride eingesetzt, um möglichst wenig Hüllmaterial am SPIO zu erhalten. Anhand der niedrigen Ausbeute von 13 % zeigte sich jedoch, dass ein Großteil des Eisenoxids bei der Aufreinigung Mangels Dextran T20 als Agglomerat abgetrennt wurde. Auch durch die Verdoppelung des eingesetzten Polymers konnte die Ausbeute bei **4b** nur auf 30 % erhöht werden. Ebenso stieg die Anzahl m der

Hüllpolymere von **4a** zu **4b** auf 28 Moleküle pro Kern an. Bei der Verwendung von 3.0 g Dextran T20 zur Darstellung von **4c** wurde eine befriedigende Ausbeute von 67 % erzielt, wobei die Anzahl der Hüllmoleküle im Bereich von **4b** lag. Die Abtrennung durch Zentrifugation gelang hierbei nur durch eine starke Verdünnung der Suspension. Unter dem Einsatz der gleichen Menge an Dextran T20 (9.0 g) wie bei der Synthese von T5-umhüllten Nanopartikeln veränderte sich das Verhalten der SPIO-T20 von **4d**. Die Ausbildung einer zähen Masse während der Fällung blieb aus. Außerdem konnten die Partikel auch nach Verdünnung nicht durch Zentrifugation isoliert werden, was beides ein Indiz für eine erhöhte Stabilität der Partikel unter diesen Reaktionsbedingungen darstellte. Allerdings wiesen SPIO-T20 (**4d**) ohne diesen Reinigungsschritt einen sehr hohen Dextrananteil auf, so dass die Abtrennung mit alternativen Methoden versucht wurde (Tabelle 4.2).

	Dextran in g	Elementaranalyse in Massenprozent		m	Ausbeute
4a	1.0	9.10 (C)	1.74 (H)	16	13 %
4b	2.0	13.88 (C)	2.39 (H)	28	30 %
4c	3.0	12.28 (C)	2.15 (H)	24	67 %
4d	9.0	34.65 (C)	5.57 (H)	218	-

Tabelle 4.2: Ergebnisse der SPIO-T20-Synthese (**4a-d**) mit verschiedenen Eduktmengen an Dextran T20 und Isolierung der Partikel durch Zentrifugation.

Durch die literaturbekannte Größenausschlusschromatographie mit Sephadex (**4e**) sowie durch eine magnetische Auftrennung (**4f**), die in der magnetischen Zellseparation^[77] verwendet wird (Abbildung 4.1 links), konnte keine Reduzierung des Dextrangehaltes von **4d** erzielt werden. In ähnlicher Weise wurden von Colvin et. al. Eisenoxid-Nanopartikel durch Anlegen eines Magnetfeldes aus einer wässrigen Lösung separiert (Abbildung 4.1 rechts).^[116] Durch diese Fällungstechnik konnten jedoch erst nach Zusatz von Ethanol, durch das die Suspensierbarkeit der Partikel herabgesetzt wurde, Kolloide als schwarzer Bodensatz gewonnen werden. Allerdings wiesen auch diese einen zu hohen Dextrananteil auf. (Tabelle 4.3).

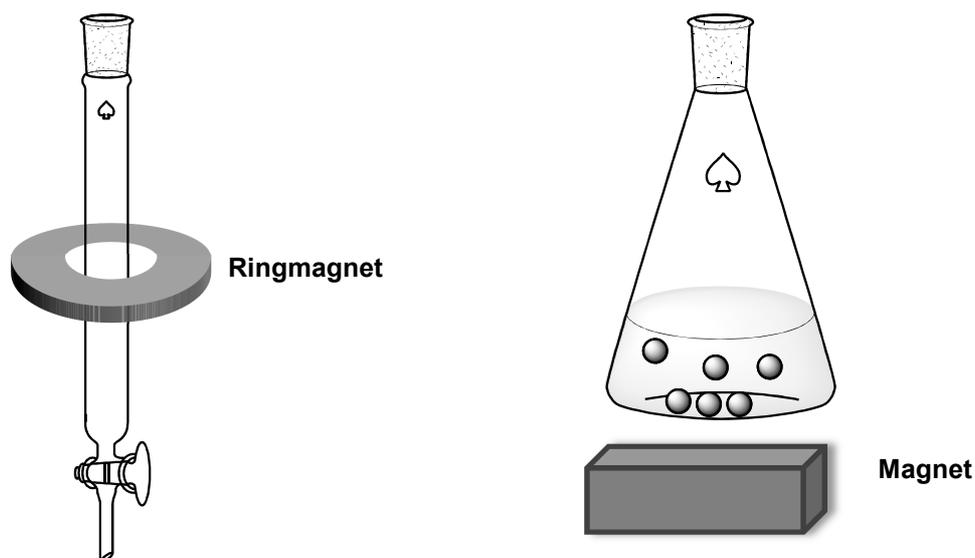


Abbildung 4.1: Simpler Aufbau der magnetischen Trennung: Die Kolloide werden in der Ebene des Ringmagneten gesammelt und das freie Dextran kann herausgewaschen werden (links). Schematische Darstellung der magnetischen Fällung: die ausgefällten Partikel können mit einem starken Magneten am Kolbenboden isoliert werden (rechts).

	Elementaranalyse in Massenprozent	m
4e	33.82 (C) 5.57 (H)	190
4f	33.71 (C) 5.73 (H)	190
4g	34.71 (C) 5.61 (H)	218

Tabelle 4.3: Die Elementaranalysen von SPIO-T20 (**4e-f**) weisen keine erhebliche Verbesserung des Dextran-Kern-Verhältnisses m im Vergleich zur Ausgangssubstanz **4d** auf.

Während bei der Größenausschlußchromatographie und der magnetischen Durchflussmethodik jeweils nur ein geringer Teil der SPIO-Lösung eingebracht werden konnte, ist die magnetische Fällungsmethodik zur Aufreinigung der gesamten Lösung geeignet (Abbildung 4.1 rechts). Die Abtrennung des überschüssigen Dextrans von den synthetisierten SPIO wurde durch eine magnetische Fällung in verschiedenen Wasser/DMSO/EtOH-Systemen und oftmals mit abschließender Zentrifugation durchgeführt (Tabelle 4.4).

Die Bildung von weißen Schlieren bei SPIO-T5 (**5a**) deutete darauf hin, dass neben den Kolloiden auch das ungebundene Dextran bei der Zugabe reinen Ethanol ausfiel. Dies konnte durch die Versetzung mit einem Ethanol/DMSO-Gemisch

unterbunden werden. Bei den isolierten Partikeln von **5a** konnten 86 Dextranmoleküle pro Kern und eine Ausbeute von 75 % festgestellt werden. Bei der Verwendung von DMSO anstelle von Ethanol musste mehr Lösungsmittel hinzugegeben werden. Ebenso verlängerte sich die Fällungsdauer von einigen Minuten auf 72 h, während sich die Ausbeute und das Verhältnis m von SPIO-T5 (**5b**) nochmals verbesserten. Die einmalige Fällung mit einem DMSO/EtOH-Gemisch im Verhältnis 2:1 führte zu einem zu hohen Dextrangehalt und zu einer Verunreinigung durch DMSO bei SPIO-T5 (**5c**). Die stufenweise Herabsetzung des DMSO-Gehaltes bei der Isolierung von SPIO-T5 (**5d**), SPIO-T20 (**5e-f**) und SPIO-T40 (**5g**) erwies sich hierbei als der ideale Mittelweg. So konnten SPIO mit kurzen (T5), mittleren (T20) und langen (T40) Dextranderivaten durch diese Gradiententechnik isoliert werden (Gleichung 4.3). Eine zusätzliche Reinigung fand durch Dialyse und Zentrifugation statt. Die Ausbeuten und Dextran/Kern-Verhältnisse liegen allesamt in einem guten Bereich.

SPIO	Lösungsmittel	Fällungsdauer	Ausbeute	m
5a	EtOH 2*DMSO/EtOH 1:1 2*EtOH	10 min	75 %	86
5b	DMSO	72 h	80 %	47
5c	DMSO/EtOH 2:1	10 min	75 %	75
5d	2*DMSO/EtOH 2:1 5*EtOH	10 min	92 %	50
5e	DMSO/EtOH 2:1 DMSO/EtOH 1:1 2*EtOH	10 min	82 %	30
5f	2*DMSO/EtOH 2:1 3*EtOH	10 min	89 %	25
5g	DMSO/EtOH 3:1 DMSO/EtOH 1:1 5*EtOH	10 min	85 %	8

Tabelle 4.4: Ergebnisse der SPIO-Synthesen unter Verwendung von Dextran T5 (1), T20 (3) und T40 (6) und verschiedener Lösemittelgemische bei der magnetischen Fällung. SPIO-T5: **5a-d**, SPIO-T20: **5e-f**, SPIO-T40: **5g**

Bei der allgemeinen Synthesemethode zur Darstellung von SPIO (**7-9**) werden durch die magnetische Fällungsmethode (MF) über 85 % des eingesetzten Hüllpolymers abgetrennt (Tabelle 4.5). Hierdurch kann die Aufreinigung durch Zentrifugation leichter bewerkstelligt werden, bei der der Dextranwert nochmals um etwa 40 % im Vergleich zu den dialysierten Partikeln und insgesamt um etwa 90 % verringert werden kann. Bei der Verwendung von Dextran T5 werden sogar nur 3 % des eingesetzten Polymers zur Einhüllung der Partikel benötigt, was eventuell auf einen zu großen Überschuss an Polymer bei der alkalischen Eisensalzfällung hinweist.

	SPIO-T5 (7)	SPIO-T20 (8)	SPIO-T40 (9)
Dextran eingesetzt in g	7.5 (T5)	3.0 (T20)	1.5 (T40)
Dextran abgetrennt durch MF	95 %	75 %	81 %
durch Zentrifugation	38 %	44 %	45 %
Dextranabtrennung (insge.)	97 %	86 %	89 %
m	50	17-25	6
Monomereinheiten	1550	2180	1488
Ausbeute	88 %	76-89 %	59 %

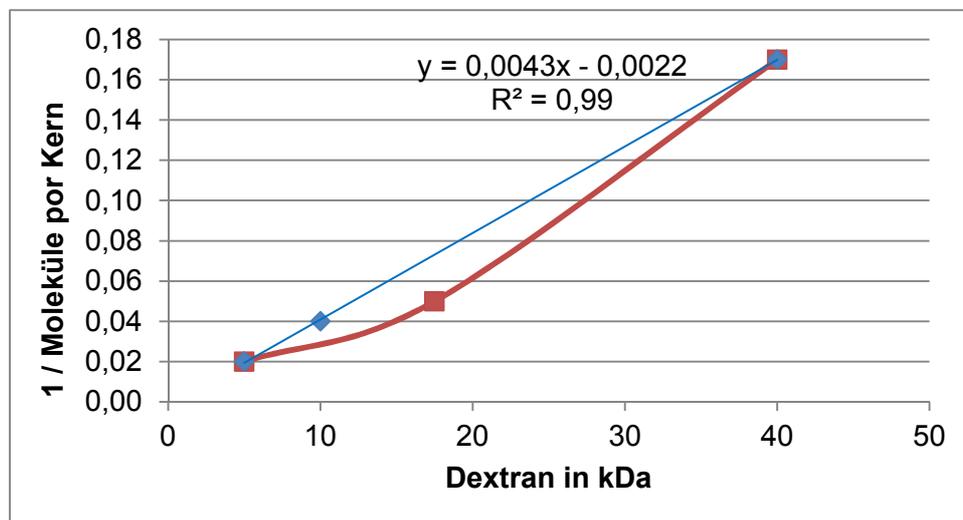
Tabelle 4.5: Untersuchung der Dextranabtrennung bei der optimierten SPIO-Darstellung und Eigenschaften der synthetisierten Nanopartikel.

Die Kohlenstoffwerte der Elementaranalysen befinden sich im Bereich von 9-14 %, woraus ein Eisenmassengehalt der Nanopartikel von etwa 50 % resultiert. Da sich mit Dextran T20 umhüllte SPIO (**8**) am stabilsten in den darauf folgenden Reaktionen erweisen, wurden mehrere Synthesen von **8** durchgeführt. Hierbei variierten die Ausbeuten zwischen 76-89 % und die Anzahl der Hüllpolymere von 17-25. Ausschlaggebend hierfür war in erster Linie die Verdünnung der SPIO-T20 vor der Zentrifugation bei 13000 g.

Die Anzahl m der Hüllpolymere pro Eisenkern sinkt erwartungsgemäß mit steigender Dextrankettenlänge. Aus den Berechnungen ergibt sich in etwa dieselbe Anzahl an Monomeren bei Dextran T5 und T40, während eine größere Anzahl bei der Verwendung von T20 vorliegt. Der indirekt proportionale Zusammenhang zwischen Dextranlänge und -anzahl bei SPIO-T5 (**7**) und SPIO-T40 (**9**) sowie bei SPIO-T10 von Weissleder^[115] lässt sich unter Verwendung des reziproken Wertes der Hüllmolekülanzahl anhand einer Funktion darstellen. Der aus der Molmasse (17.5

kDa) von Dextran T20 und dem aus den Versuchen gemittelten Verhältnis m (20) erhaltene Wert bei SPIO-T20 (8) liegt hierbei deutlich unter der Geraden, deren Gleichung ein Verhältnis von 13.7 Molekülen pro Kern bei Dextran T20 ergeben würde (Abbildung 4.2).

Dass dieser Wert bei den Versuchen nicht erreicht werden konnte, lässt auf eine verstärkte Wechselwirkung zwischen dem Eisenoxidkern und dem Dextran T20 schließen, woraus die um theoretisch 32 % vergrößerte Anzahl an Hüllmolekülen bei SPIO-T20 (8) resultiert. Dies führt zu einer besseren sterischen Abschirmung der Eisenoxidkerne und somit zu einer erhöhten Stabilität von 8 im Vergleich zu SPIO-T5 (7) und SPIO-T40 (9).



4.2 Abbildung: Reziproker Wert der Polymeranzahl bei SPIO (7-9) und SPIO-T10 von Weissleder^[115] in Abhängigkeit von der Dextranlänge. Theoretische, indirekt proportionale Beziehung von Anzahl und Länge des Dextrans bei SPIO-T5 (7) und SPIO-T40 (9) (blau); tatsächlicher, experimenteller Verlauf der Werte mit Dextran T20 (rot).

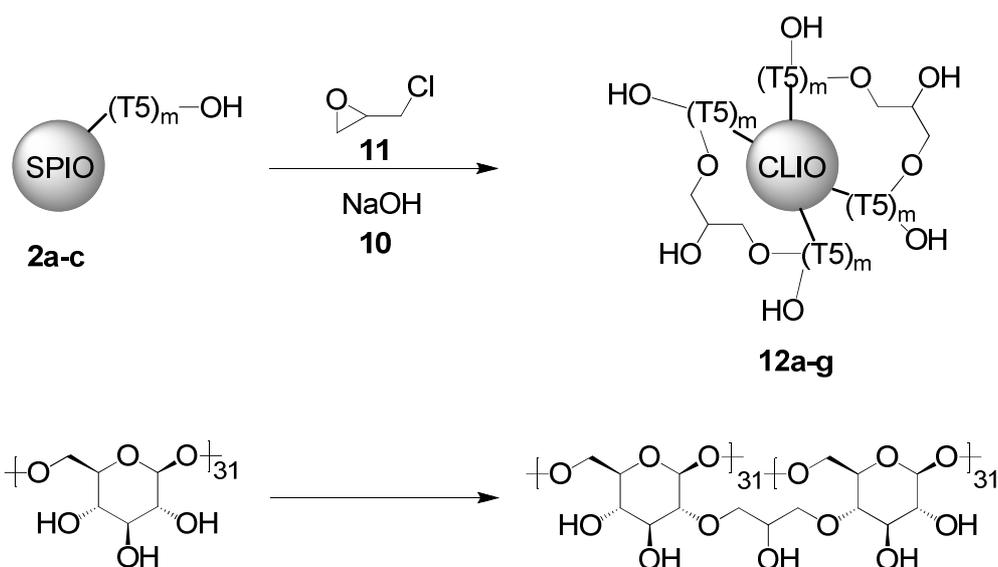
4.2. Optimierung der Synthese von Amino-CLIO (CLIO-NH₂)

CLIO-NH₂ (cross linked iron oxides) wurden nach der von Josephson^[69] entwickelten Methodik durch Vernetzung der Dextranhülle mit Epichlorhydrin und Aminierung mit Ammoniak synthetisiert. Zur Berechnung der Ansatzgröße wurde hierbei die Menge an Dextran am Nanopartikel herangezogen. Um auch SPIO mit verschiedenen Dextranskettenlängen miteinander vergleichen zu können, wurden die Eduktverhältnisse anhand der Stoffmenge der Glucosemonomereinheiten berechnet.

Die CLIO-NH₂-Synthese ist von entscheidender Bedeutung für die weitere Arbeit, da sie über die Stabilität und weitere Modifizierbarkeit der Partikel entscheidet. Als Anhaltsgröße für den Erfolg der Synthese wurde die Auswertung der Elementaranalysen gewählt. Ein weiterer Aspekt für eine gelungene Darstellung war die Reproduzierbarkeit der CLIO-NH₂-Synthesen.

4.2.1. Trennung von Verlinkung und Aminierung der SPIO

Die in der Diplomarbeit hergestellten Kolloide konnten nicht mit Fluoreszenzmolekülen an den Aminoheiten markiert werden. Deshalb wurde zu Beginn dieser Arbeit die Herstellungsmethodik der CLIO-NH₂ eingehender untersucht, indem die Verlinkung mit Epichlorhydrin (**11**) (Gleichung 4.5) und die Funktionalisierung mit primären Aminogruppen voneinander getrennt durchgeführt wurden.



Gleichung 4.5: Schematische Darstellung der Synthese von CLIO-T5 aus SPIO-T5 (oben); hierbei wird die Dextranhülle mit Epichlorhydrin vernetzt (unten).

Die Vernetzung von SPIO mit einem großen Überschuss von Epichlorhydrin^[69] (350:1, bezogen auf die Monomereinheiten der Dextranhülle) führte wie erwartet zu einer beträchtlichen Erweiterung und Verlinkung der Hülle. Dadurch sank der Massenanteil an Eisen beim Produkt **12a** auf ca. 10 %, weit weniger als die erstrebten 50 %.

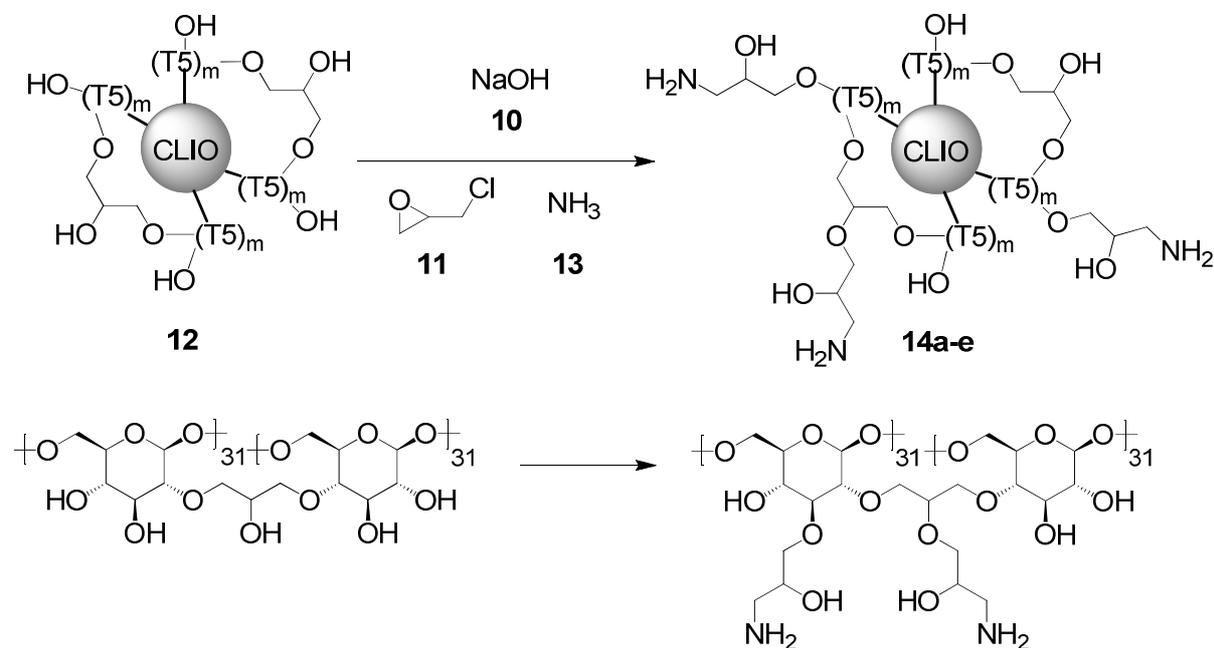
Eine Verringerung des Überschusses an Epichlorhydrin auf 35:1 ergab CLIO-T5 (**12b**), deren Elementaranalyse jedoch nicht den erwarteten Zuwachs des Kohlenstoffgehalts zeigte. Weitere Veränderungen der Versuchsbedingungen hinsichtlich der Menge an Base und Epichlorhydrin, Zugabe der Reagenzien (einmalig oder in kleineren Anteilen) sowie Aufarbeitung durch Zentrifugieren oder Grössenausschlusschromatographie an Sephadex führten schließlich zu den in Tabelle 4.6 zusammengefassten Ergebnissen.

CLIO-T5	Überschuss an Epichlorhydrin	Zugabe von Epichlorhydrin	Aufreinigung	Hüllveränderung
12a	354	einmalig	Chromatographie	++
12b	35	einmalig	Chromatographie	0
12c	50	einmalig	Chromatographie	+
12d	40	mehrmals	Zentrifugation	+
12e	30	mehrmals	Zentrifugation	-
12f	30	einmalig	Zentrifugation	0
12g	40	einmalig	Zentrifugation	0

Tabelle 4.6: Übersicht der durchgeführten Synthesen der CLIO-T5 (**12a-g**). Aufgeführt sind der eingesetzte Überschuss und die Zugabeweise von Epichlorhydrin, sowie die Aufreinigungsart und die sich daraus ergebende Hüllveränderung in Bezug auf das Ausgangsmaterial (+ Zunahme, 0 konstant, - Abnahme / Ausfall).

Hieraus ist ersichtlich, dass mindestens ein vierzig- bis fünfzigfacher Überschuss an Epichlorhydrin eingesetzt werden muss. Auffällig ist die scheinbar große Hüllzunahme bei **12c**, woraus man schließen könnte, dass die Kolloide nicht vollständig von locker assoziiertem Dextran in der Lösung mittels Grössenausschlusschromatographie abgetrennt wurden. Deshalb erwies sich die Zentrifugation als bessere Alternative, bei der nur das fest am Eisenoxidkern gebundene Dextran als Hüllmaterial zurückblieb.

Die Einführung der reaktiven Amineinheiten an diesen Partikeln erfolgte in einer analogen Umsetzung mit Epichlorhydrin und unter Verwendung von Ammoniak (**13**) (Gleichung 4.6). Dieser wurde in einem hohen Überschuss eingesetzt, um die Bildung sekundärer Aminofunktionen bei CLIO-NH₂-T5 (**14a-e**) zu vermeiden.



Gleichung 4.6: Schematische Darstellung der Einführung primärer Aminogruppen an der vernetzten Oberfläche der CLIO-NH₂-T5 (**14a-e**).

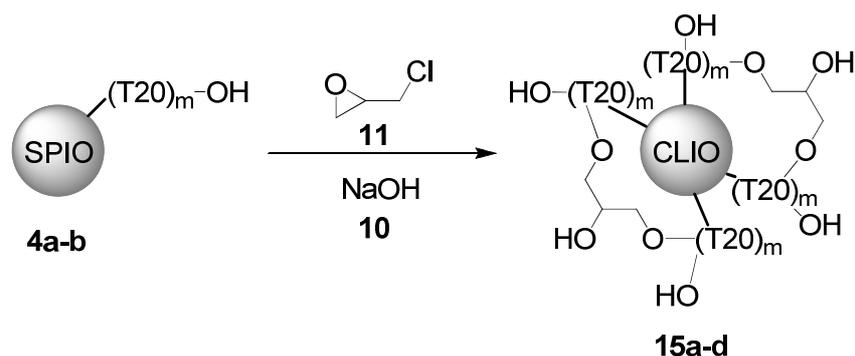
Die Menge an Dextran an den Partikeln konnte aufgrund der vorausgegangenen Verlinkungsreaktionen nur bei einer geringen Vernetzung anhand der Elementaranalyse der Edukte abgeschätzt werden. Bei einer starken Vernetzung der Hülle wurde als Berechnungsgrundlage der Dextrangehalt der zuvor eingesetzten SPIO-T5 (**2a-c**) gewählt. Da das bei **14a** eingesetzte Kolloid **12a** einen starken Hüllanteil am Gesamtkolloid aufwies, wurde ein hoher Aminierungsgrad von 6.58 % durch die zeitgleiche Zugabe von Epichlorhydrin (**11**) und Ammoniak (**13**) festgestellt. Allerdings konnte nach der chromatographischen Aufreinigung ein signifikanter Abfall des Stickstoffwertes um 26 % beobachtet werden, während der Kohlenstoffanteil annähernd konstant blieb. Dem entsprechend verringerte sich die Aminierung bei **14b** unter Verwendung eines geringfügig verlinkten CLIO-T5 (**12b**) auf zwei Massenprozent. Durch eine Verdoppelung der Menge an Natronlauge, Epichlorhydrin und Ammoniak stieg bei demselben Edukt dieser Wert auf 3 % (**14c**). Bei der weiteren Umsetzung zeigten **14b** und **14c** jedoch einen starken Hüllverlust, der anhand der Abnahme des Stickstoffgehaltes quantifiziert werden konnte. Mit einer Abnahme von 20 % erwies sich **14c** als das geringfügig stabilere Derivat gegenüber **14b** (35 %).

Die Verwendung eines nur geringen Überschusses an NH_3 führte bei **14d** zu keiner nennenswerten Aminierung. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wurden durch eine Verzehnfachung des Ammoniak Einsatzes bei **14e** eine leichte Erhöhung des Kohlenstoffwertes und eine mäßige Aminierung erreicht, erkennbar an einem Stickstoffgehalt von 0.77 %, einer erhöhten Stabilität sowie einem etwas basischeren pH-Wert im Vergleich zu **14d**. Tabelle 4.7 zeigt eine Übersicht der verwendeten Eduktverhältnisse und die Elementaranalysen der synthetisierten Partikel **14a-e**.

Überschuss an	10	11	13	Elementaranalyse in Massenprozent
14a	-	128	377	43.80 (C), 7.32 (H), 4.86 (N)
14b	29	37	180	14.33 (C), 2.82 (H), 1.98 (N)
14c	57	73	360	17.64 (C), 3.23 (H), 2.97 (N)
14d	10	48	9.5	8.71 (C), 1.65 (H), 0.18 (N)
14e	10	48	95	9.83 (C), 1.82 (H), 0.77 (N)

Tabelle 4.7: Überschuss der eingesetzten Edukte Natronlauge (**10**), Epichlorhydrin (**11**) und Ammoniak (**13**) bezogen auf eine Monomereinheit des Dextrans und die daraus resultierenden Elementaranalysen von **14a-e**.

Bei der Verwendung von SPIO-T20 (**4a** und **4b**) als Ausgangsmaterial wurde vor allem der Einfluss der Basenkonzentration auf die CLIO-Synthese (**15a-d**) untersucht, während Epichlorhydrin bei allen Versuchen im fünfzigfachen Überschuss in Bezug auf eine Monomereinheit eingesetzt wurde (Gleichung 4.7). Bei **15a** und **15b** konnten keine Unterschiede zwischen der Verwendung eines großen Überschusses an Natronlauge und dem Einsatz im Verhältnis 2:1 zu der Anzahl der Hüllmonomereinheiten festgestellt werden. Bei beiden Umsetzungen sank der Kohlenstoffwert im Produkt. Mit **4a** wurde hierbei ein SPIO-T20 mit einer geringen Anzahl an Hüllmolekülen ($m = 16$) eingesetzt. Der Wechsel zu einem stärker eingehüllten Kolloid **4b** ($m = 28$) führte bei **15c** und **15d** ebenso wenig zu der gewünschten Hüllvermehrung (Tabelle 4.8). Bei allen Versuchen der Synthese von CLIO-T20 (**15a-d**) lagen die Ergebnisse der Elementaranalyse im selben niedrigen Bereich mit prozentual größeren Hüllverlusten bei **15c** und **15d**. Aufgrund dieser Instabilität wurden weitere Versuche mit CLIO-T20 eingestellt.



Gleichung 4.7: Verlinkung der Dextran T20 Hülle mit Epichlorhydrin und Natronlauge.

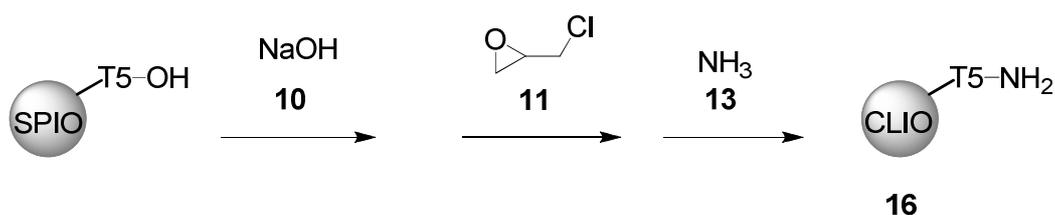
CLIO-T20	Überschuss an NaOH	Elementaranalyse in Massenprozent
15a (aus 4a)	23	8.62 (C), 1.57 (H)
15b (aus 4a)	2	8.27 (C), 1.50 (H)
15c (aus 4b)	0.4	8.23 (C), 1.52 (H)
15d (aus 4b)	43	8.52 (C), 1.56 (H)

Tabelle 4.8: Überschuss der eingesetzten Natronlauge bezogen auf eine Monomereinheit des Dextrans am SPIO-T20 (**4a-b**) und die Elementaranalysen der CLIO-T20 (**15a-d**).

4.2.2. Darstellung von CLIO-NH₂ in einer Eintopfsynthese

Nach der literaturbekannten Darstellungsmethode^[69] wurden CLIO-NH₂-T5 (cross linked iron oxides) aus SPIO-T5 durch Zugabe von Natronlauge, Epichlorhydrin und Ammoniak in einem Reaktionsschritt synthetisiert (Gleichung 4.8). Durch Variation der Eduktverhältnisse und Reaktionsdauern sollte ein stabiler Stickstoffgehalt von 1-2 % für weitere Modifikationen der Hülle erhalten werden.

Bei ersten Versuchen wurden SPIO-T5 (m = 57) mit einer ähnlichen Zusammensetzung wie **2a** eingesetzt. Bei einer wiederholten Zentrifugation zeigte sich an den Kohlenstoff- und Stickstoffwerten der Elementaranalyse, dass sich die Dextranhülle bei jedem Aufreinigungsschritt teilweise von CLIO-NH₂-T5 (**16a**) löste (Tabelle 4.9).



Gleichung 4.8: Skizzierung der allgemeinen Umsetzung von SPIO-T5 zu CLIO-NH₂-T5 (**16**). Der detaillierte Reaktionsverlauf ist in Abbildung 2.11, Seite 14 abgebildet.

<i>Überschuss an</i>	10	11	13	Elementaranalyse in Massenprozent
16a	8	10	95	10.07 (C), 1.91 (H), 0.94 (N) 8.99 (C), 1.78 (H), 0.59 (N)
16b	11	12	23	24.26 (C), 4.70 (H), 4.00 (N) 9.21 (C), 1.73 (H), 0.50 (N) 12.31 (C), 2.17 (H), 0.50 (N)
16c	19	20	22	10.69 (C), 2.02 (H), 1.06 (N) 10.92 (C), 2.10 (H), 0.76 (N) 9.29 (C), 1.94 (H), 0.51 (N)
16d	9	46	11	10.64 (C), 1.93 (H), 0.23 (N)
16e	9	45	115	12.64 (C), 2.27 (H), 1.31 (N)
16f	18	116	460	8.38 (C), 1.75 (H), 0.18 (N)
16g	21	133	421	10.18 (C), 1.93 (H), 0.75 (N), 1.01 (S)
16h	22	58	460	9.19 (C), 1.78 (H), 0.95 (N)
16i	21	412	155	8.77 (C), 1.58 (H), 0.20 (N)

Tabelle 4.9: Übersicht der Synthesen von CLIO-NH₂ (**16**) unter einmaliger Zugabe der Verlinkungsreagenzien Natronlauge (**10**), Epichlorhydrin (**11**) und Ammoniak (**13**).

Eine Verdopplung der Menge an Ammoniak bewirkte bei **16b** keine Verbesserung des Stickstoffanteils. Auch hier zeigte sich eine starke Verringerung des Dextrangehalts durch die Zentrifugation nach der Dialyse, während die Verwendung unterschiedlicher Säulendurchmesser bei der Größenausschlusschromatographie keine Auswirkung auf den Stickstoffgehalt des gereinigten Produkts hatte. Anscheinend war die Anbindung des Epichlorhydrins noch nicht vollständig, so dass der Ammoniak mit ungebundenen Epichlorhydrin reagierte. Durch die Verdopplung der Zugabemengen von Base und Epichlorhydrin und durch eine längere Vernetzungszeit sollte das Ausmaß der Quervernetzung der Dextranhülle erhöht werden. Es konnte aber wie bei den vorangegangenen Versuchen ein Hüllverlust durch Zentrifugation und Chromatographie bei **16c** beobachtet werden. Bei der Darstellung der Kolloide **16d** und **16e** konnte eine Abhängigkeit des Stickstoffgehalts und der Hüllzunahme von der Menge des eingesetzten Ammoniaks beobachtet werden. Bei einem geringen Überschuss an NH₃ von 1:11 fanden sich nur wenige Aminoheiten am Partikel, während bei der zehnfachen Menge ein geeigneter Wert von 1.31 % erhalten wurde. Ebenso nahm der Kohlenstoffgehalt im Vergleich zum

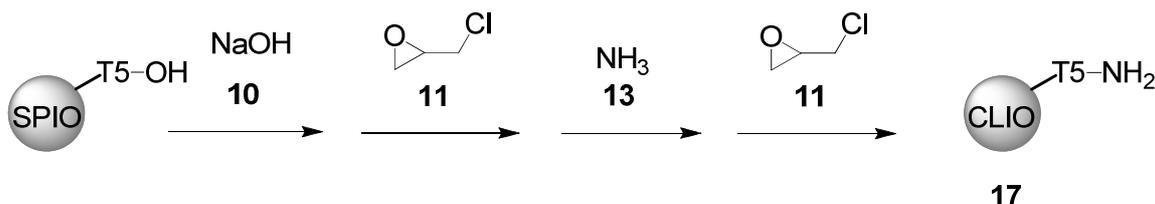
Edukt und **16d** um 2 % zu. Eine weitere Erhöhung des Überschusses von Epichlorhydrin und Ammoniak bei **16f-16h** erbrachte keine Verbesserung der Hüllmodifikation. Hierbei wurde ebenfalls untersucht, in wieweit die Dauer zwischen Epichlorhydrin- und Ammoniakzugabe die Aminierung der Dextranhülle beeinflusst (Tabelle 4.10). Bei der zeitgleichen Zugabe ergab sich nur eine geringe Aminierung. Schon ein Zeitraum von 15 min bewirkte einen Stickstoffgehalt von 0.75 %, der durch die Verlängerung der Reaktionszeit von SPIO und Epichlorhydrin auf fast 1 % erhöht werden konnte. Der Schwefelanteil bei **16g** zeigte, dass eine Dialyse ohne eine zuvor durchgeführte Waschung der Kolloide mit Ethanol nicht ausreichend ist, um das DMSO aus der Lösung zu entfernen.

CLIO-NH ₂ -T5	Dauer zwischen Zugabe (min)	N in Massenprozent
16f	0	0.18
16g	15	0.75
16h	300	0.95

Tabelle 4.10: Bei der Synthese von CLIO-NH₂ muss zuerst das Epichlorhydrin an das Hüll-dextran gebunden werden, bevor Ammoniak hinzugegeben werden kann.

Eine erhöhte Stabilität der Partikel bei **16i** resultierte aus dem Wechsel zu einem großen Überschuss an Epichlorhydrin und einem geringem Überschuss an NH₃. Diese Kolloide zeigten zwar einen niedrigen Stickstoffwert, konnten aber nach der Zentrifugation ohne Mühe resuspendiert werden. Da sich die Hüllen der Kolloide **16a-i** allesamt nicht als vollständig stabil erwiesen und der Stickstoffgehalt der Partikel bei der Aufreinigung bzw. der weiteren Umsetzung sank, wurden die durch die einmalige Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel in den darauf anschließenden Modifikationsreaktionen allgemein als **16** beziffert. Die Kolloide besaßen zwar etwas unterschiedliche Werte in den Elementaranalysen, zeigten aber nahezu das gleiche chemische Verhalten. Dennoch wurde in diesen Versuchen deutlich, dass mit einem Überschuss an NH₃ von 20:1 eine genügend große Aminierung von 1 % bewirkt werden kann. Dies legt im Vergleich zu den nur mit Epichlorhydrin durchgeführten Verlinkungsreaktionen von **12** und vor allem **15** die Vermutung nahe, dass auch der Ammoniak bei der Vernetzung der Dextranhülle eine Rolle spielt. Hierdurch würden dann nicht nur primäre Amine entstehen, sondern auch sekundäre oder tertiäre.

Deshalb wurde versucht, analog zu den Darstellungen von **16** zuerst mit Epichlorhydrin und Ammoniak Aminoheiten an der Dextranhülle einzufügen, um an diesen durch eine wiederholte Umsetzung mit Epichlorhydrin eine verstärkte Vernetzung der Hülle zu bewerkstelligen (Gleichung 4.9). Durch geeignete Wahl der stöchiometrischen Eduktverhältnisse sowie der Dauer der einzelnen Teilreaktionen sollte so eine stabile Dextranhülle, aber auch eine genügende Anzahl primärer Amine für eine weitere Modifizierung erzielt werden (Tabelle 4.11).



Gleichung 4.9: In den ersten Reaktionsschritten werden mit Natronlauge, Epichlorhydrin und Ammoniak Aminoheiten an der Oberfläche der Kolloide eingeführt. An diesen wird die Dextranhülle durch erneute Umsetzung mit Epichlorhydrin quervernetzt.

Überschuss an	10	11	13	11	Zugabe
17a	15	50	250	55	mehrmalig
17b	25	30	150	25	mehrmalig
17c	45	40	280	30	einmalig
17d	10	10	25	5	einmalig
17e	25	20	50	10	einmalig
17f	15	35	170	15	mehrmalig
17g	15	35	175	18	mehrmalig

Tabelle 4.11: Gerundeter Überschuss der Verlinkungsreagenzien NaOH, Epichlorhydrin und Ammoniak bezogen auf eine Monomereinheit des Hüllpolymers Dextran T5. Für eine zusätzliche Vernetzung an den Aminoheiten wird zuletzt nochmals Epichlorhydrin eingesetzt. Die Edukte wurden einmalig oder portionsweise hinzugegeben.

Bei der Synthese von **17a** wurde ein zu großes Verhältnis der Edukte gewählt, was sich in der starken Zunahme des Dextrananteils am Kolloid widerspiegelt. Auch eine Halbierung des Überschusses bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen führte zu demselben Ergebnis bei **17b**. Ebenso konnte bei beiden ein starker Rückgang des organischen Anteils am Partikel durch Chromatographie im Vergleich zur dialysierten Suspension beobachtet werden. Die Verdoppelung des gesamten Ansatzes bei **17c**

fürte durch die einmalige Zugabe von Epichlorhydrin im letzten Reaktionsschritt zu einem Stickstoffgehalt von 1 % in der Elementaranalyse und einer leichten Zunahme der Gesamthülle (Tabelle 4.12).

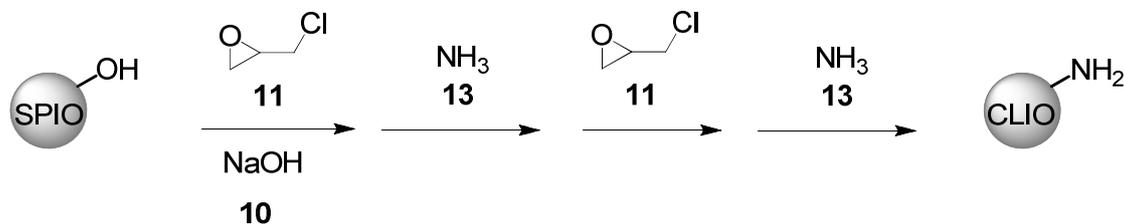
Produkt	Elementaranalyse in Massenprozent		Edukt
17a	22.99 (C), 4.43 (H), 5.30 (N)	10.91 (C), 2.34 (H)	2b
17b	22.16 (C), 4.47 (H), 4.79 (N)	10.91 (C), 2.34 (H)	2b
17c	10.15 (C), 1.97 (H), 0.98 (N)	8.53 (C), 1.69 (H)	2c
17d	10.00 (C), 2.01 (H), 1.06 (N)	9.34 (C), 1.87 (H)	2a'
17e	8.67 (C), 1.70 (H), 0.70 (N)	8.75 (C), 1.70 (H)	2a
17f	10.03 (C), 2.00 (H), 0.94 (N)	8.75 (C), 1.70 (H)	2a
17g	11.23 (C), 2.13 (H), 1.69 (N)	8.53 (C), 1.69 (H)	2c

Tabelle 4.12: Elementaranalyse der CLIO-NH₂-T5 (**17a-g**) und Werte der jeweiligen Edukte.

Eine starke Herabsetzung der Eduktverhältnisse und eine Verkürzung der Reaktionsdauer der ersten Anbindung von Epichlorhydrin an das Hüllpolymer erbrachte bei **17d** dasselbe Ergebnis mit etwas geringerer Zunahme der Hüllmenge im Vergleich zum jeweiligen Edukt. Die CLIO-NH₂ von **17e** zeigten trotz des verdoppelten Überschusses an NaOH, Epichlorhydrin und Ammoniak keine Verbesserung, da keine Hüllzunahme und ein niedriger Stickstoffgehalt beobachtet werden konnte. Die portionsweise Zugabe der jeweiligen Edukte bei **17f** bewirkte eine Erhöhung aller Werte gegenüber **17e**. Ebenso sollte durch einen größeren Ammoniaküberschuss die Anzahl primärer Aminogruppen erhöht werden. Eine starke Vermehrung des Hüllanteils ergab sich bei dem Wechsel zu **2c** als Edukt. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wurde mehr Ammoniak an der Oberfläche gebunden und man erhielt einen Stickstoffgehalt von 1.69 % mit einer um 1 % größeren Zunahme des Kohlenstoffwertes. Jedoch führten die weiteren Umsetzungen von **17g** zu einem starken Hüllverlust. Demgegenüber zeigte sich **17c** weitaus stabiler. Die besten Ergebnisse erhielt man bei der weiteren Modifikation von **17f**, bei der alle Werte in der Elementaranalyse zunahmen.

4.2.3. Alternierende Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak

Aufbauend auf der Synthese von CLIO-NH₂-T5 (**17**) sollte durch die nochmalige Zugabe von Ammoniak als letztem Reaktionsschritt die Eigenschaften der Amino-CLIO weiter verbessert werden (Gleichung 4.10).



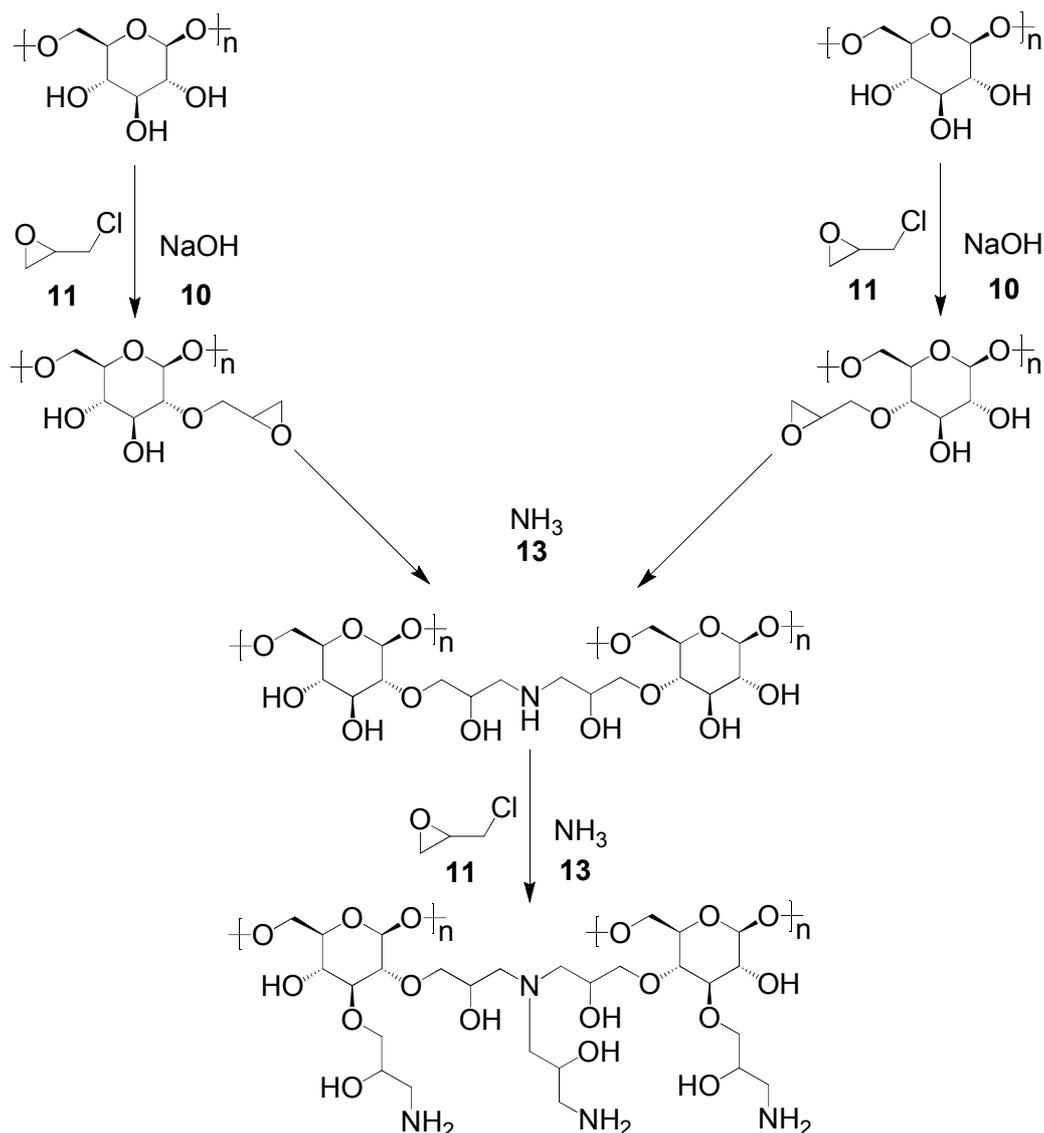
Gleichung 4.10: Schematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte bei der Synthese von CLIO-NH₂ durch alternierende Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak.

Die grundlegende Idee hierbei war, im ersten Schritt unter Ausbildung sekundärer und tertiärer Amine die Dextranhülle zu vernetzen. An den so stabilisierten Kolloiden sollten darauf folgend primäre Amine zur weiteren Modifikation an der Oberfläche der Partikel generiert werden (Gleichung 4.11). Inwieweit die zweite Zugabe von Epichlorhydrin zur Verlinkung des Dextrans beiträgt, ist vermutlich von der Reaktionsdauer und den Eduktverhältnissen im ersten Teil der Synthese abhängig.

Erste Synthesen wurden analog zu **17f** mit denselben Eduktmengen an NaOH, Epichlorhydrin und Ammoniak durchgeführt, wobei zusätzlich ein großer Überschuss an NH₃ als letzter Reaktionsschritt verwendet wurde. Die SPIO-T5 aus **2c** und **5b** unterschieden sich nur unwesentlich, jedoch konnte bei CLIO-NH₂-T5 (**18b**) im Gegensatz zu **18a** keine Probe für die Elementaranalyse gewonnen werden, da die Fällungsmethode noch nicht ausgereift war.

Ebenso wies dieses Ergebnis daraufhin, dass die Fällung der CLIO-NH₂-T5 ohne eine Zentrifugation zur vollständigen Trennung nicht ausreichte. Die weitere Umsetzung der Partikel zeigte, dass beide eine ähnliche Zusammensetzung mit einer nicht vollständig stabilen Hülle aufwiesen.

Die Menge der eingesetzten Natronlauge hatte nur geringen Einfluss auf die Vernetzung der Dextranhülle oder die Aminierung der Partikel. Bei einem Unterschuss an Base ergab sich eine geringere Zunahme des Kohlenstoffwertes, während bei einem zwanzig- bzw. vierzigfachen Überschuss der Hüllanteil am Kolloid stärker anstieg (Tabelle 4.13).



Gleichung 4.11: Im ersten Schritt der CLIO-NH₂-Synthese wird Epichlorhydrin an die Dextranhülle gebunden. Durch Ammoniak wird die Hülle vernetzt bevor durch eine erneute Reaktion mit Epichlorhydrin und NH₃ primäre Aminoeinheiten eingeführt werden.

CLIO-NH ₂	Überschuss an NaOH	Elementaranalyse in Massenprozent
18c	0.5	9.49 (C), 1.89 (H), 1.07 (N)
18d	20	13.13 (C), 2.89 (H), 0.96 (N)
18e	40	10.71 (C), 2.11 (H), 1.49 (N)

Tabelle 4.13: Die Variation des Überschusses an Natronlauge bezogen auf eine Monomereinheit der Dextranhülle erbrachte keine signifikanten Unterschiede bei den Elementaranalysen.

Der große Wert bei **18d** kann auch auf die Aufarbeitung ohne Zentrifugation zurückgeführt werden. Um dennoch eine hohe Substitution der Dextranhülle mit Epichlorhydrin im ersten Schritt der Synthese zu erreichen, wurde ein Verhältnis NaOH / Monomer von 20:1 als Standard bei den folgenden CLIO-NH₂-Synthesen gewählt. Die Kolloide wiesen alle einen zufriedenstellenden Stickstoffgehalt auf, zeigten aber in den weiteren Reaktionen einen Stickstoffverlust von bis zu 60 %.

Um die Auswirkung der Ammoniakzugabe auf die Vernetzung der Hülle zu untersuchen, wurde bei der Synthese von CLIO-NH₂-T5 (**19**) der Überschuss an Ammoniak im ersten Reaktionsschritt variiert (Tabelle 4.14). Unter Einsatz von **5c** (m = 75) zeigten sich bei **19a** und **19b** keine Unterschiede bei den verwendeten Ammoniak / Dextran-Verhältnissen. Auch eine gesamte Verdoppelung der Menge an Ammoniak und Epichlorhydrin verbunden mit einem Wechsel zu **5b** (m = 47) und einer verlängerten Reaktionsdauer erbrachte bei **19c** und **19d** keine Verbesserung der Werte, da der Stickstoffgehalt zu niedrig war.

CLIO-NH ₂ -T5	Edukt	Überschuss an NH ₃	Elementaranalyse
19a	5c	6	8.13 (C), 1.64 (H), 0.80 (N)
19b	5c	80	8.41 (C), 1.95 (H), 0.83 (N)
19c	5b	55	8.73 (C), 2.01 (H), 0.67 (N)
19d	5b	230	9.37 (C), 2.01 (H), 0.86 (N)

Tabelle 4.14: Bei der Darstellung von **19a-d** wurde der Überschuss an Ammoniak bezogen auf eine Monomereinheit des Dextrans bei der ersten Zugabe variiert. Sowohl die Kohlenstoff- als auch die Stickstoffwerte der Elementaranalysen blieben in einem niedrigen Bereich.

In Hinblick auf die Vernetzung der Hülle war auch von Bedeutung, inwieweit die Reaktion des Dextrans mit Epichlorhydrin vorangeschritten sein musste, um das Polymer anschließend durch Zugabe von Ammoniak zu stabilisieren. Deshalb wurde bei der Darstellung von **20a-c** bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen der Zeitraum zwischen den ersten Umsetzungen mit Epichlorhydrin und Ammoniak variiert (Tabelle 4.15). Es konnte jedoch keine Auswirkung anhand der Elementaranalysen festgestellt werden.

CLIO-NH ₂ -T5	1. Zugabe von NH ₃	Elementaranalyse
20a	2 h	10.51 (C), 2.15 (H), 0.70 (N)
20b	4 h	10.61 (C), 2.06 (H), 0.63 (N)
20c	6 h	10.22 (C), 2.14 (H), 0.80 (N)

Tabelle 4.15: Ergebnisse der Elementaranalysen in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer der Dextranhülle mit Epichlorhydrin und der ersten Umsetzung mit Ammoniak.

Die Verdopplung der Ansatzgröße bei gleichbleibender Reaktionsdauer führte bei CLIO-NH₂-T5 (**21a**) zu einer stärkeren Modifikation der Dextranhülle, da die Kohlenstoff- und Stickstoffwerte im Vergleich zu **20a-c** stark zunahmten (Tabelle 4.16). Unter denselben Versuchsbedingungen konnte auch bei Verwendung von **5c** ein Stickstoffgehalt von 1.75 % bei **21b** erhalten werden. Die Wahl des geeigneten Reaktionsvolumens ist jedoch auch von den eingesetzten Eduktverhältnissen abhängig, wie **21c** und **21d** zeigen. Bei diesen Synthesen wurde ein geringeres Verhältnis von Epichlorhydrin und Ammoniak bezogen auf die Menge des am Eisenoxidkerns gebundenen Dextrans gewählt.

CLIO-NH ₂ -T5	Ansatzgröße	Elementaranalyse in Massenprozent
21a	10.0 ml von 5a	12.06 (C), 2.45 (H), 1.69 (N)
21b	10.0 ml von 5c	10.81 (C), 2.10 (H), 1.75 (N)
21c	9.1 ml von 5a	10.04 (C), 2.07 (H), 0.69 (N)
21d	20.0 ml von 5a	13.83 (C), 2.51 (H), 2.05 (N)
21e	20.0 ml von 5d	10.81 (C), 2.12 (H), 1.54 (N)

Tabelle 4.16: Ergebnisse der Elementaranalysen in Abhängigkeit von der Ansatzgröße. Das geeignete Reaktionsvolumen ist vom Verhältnis der eingesetzten Edukte abhängig.

Hierdurch erhält man bei der Umsetzung von 9.1 ml einer Suspension von **5a** einen niedrigen Stickstoffgehalt (**21c**), während die Werte bei 20.0 ml SPIO-T5-Lösung im Bereich von **21a** und **21b** liegen. Auch bei der Verwendung von **5d** ($m = 50$) unter den Bedingungen bei **21b** wurden geeignete Werte erzielt. Der etwas geringere Massenanteil kann mit dem Verhältnis m des eingesetzten SPIO-T5 erklärt werden. Die Kolloide **21a-e** wiesen in den weiteren Umsetzungen eine stabile Zusammensetzung auf. Als letzter Parameter wurde der Effekt der zweiten Zugabe von

Epichlorhydrin untersucht. Tabelle 4.17 zeigt die Elementaranalysen von CLIO-NH₂-T5 (**22a-c**) in Abhängigkeit von dem Überschuss an Epichlorhydrin. Hieraus ist der Trend einer höheren Aminierung der Partikel bei einem größeren Verhältnis von Epichlorhydrin zur Dextranhülle ersichtlich. Der niedrige Kohlenstoffwert bei **22b** ergibt sich aus der Zentrifugation der Kolloide. Das beste Ergebnis wurde mit einem etwa 120-fachen Überschuss erzielt, jedoch konnte auch hier ein Hüllverlust bei der weiteren Umsetzung beobachtet werden.

CLIO-NH ₂ -T5	Überschuss an Epichlorhydrin	Elementaranalyse
22a	35	11.03 (C), 2.26 (H), 0.87 (N)
22b	45	9.90 (C), 2.05 (H), 0.97 (N)
22c	115	11.34 (C), 2.42 (H), 1.49 (N)

Tabelle 4.17: Ergebnisse der Elementaranalyse in Folge der Variation des Überschusses an Epichlorhydrin bei der zweiten Zugabe.

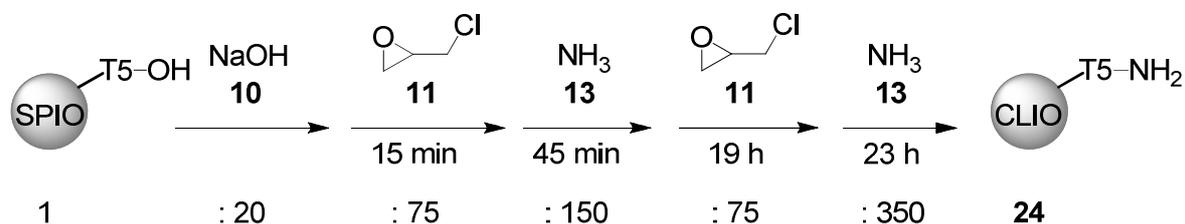
Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen wurden mehrere CLIO-NH₂-T5-Synthesen mit verschiedenen SPIO-T5, Eduktverhältnissen und Reaktionsdauern durchgeführt (**23a-e**). Hierbei zeigte einzig **23e** eine Zunahme des Kohlenstoffwertes und einen hohen Stickstoffgehalt (Tabelle 4.18).

CLIO-NH ₂ -T5	Elementaranalyse in Massenprozent	Edukt
23a	8.44 (C), 1.70 (H), 0.82 (N)	5c
23b	10.34 (C), 2.23 (H), 1.73 (N)	5c
23c	9.97 (C), 1.81 (H), 1.43 (N)	5d
23d	10.06 (C), 1.91 (H), 1.43 (N)	5d
23e	11.60 (C), 2.24 (H), 1.99 (N)	5d

Tabelle 4.18: Ergebnisse der Elementaranalysen bei verschiedenen Synthesen von CLIO-NH₂-T5. Ein Vergleich mit den Werten der eingesetzten SPIO-T5 zeigte, dass nur bei **23e** eine Zunahme des Kohlenstoffwertes und ein hoher Stickstoffgehalt erreicht wurden.

Dies spiegelte sich auch in den weiteren Umsetzungen wider, bei denen sich diese CLIO-NH₂-T5 aus **23e** als stabil erwiesen. Der Gesamtüberschuss des eingesetzten Epichlorhydrin und Ammoniak lag in dem Bereich der ebenfalls erfolgreichen

Synthesen von **21a-e**, ist jedoch im Hinblick auf den Zeitpunkt der Eduktzugabe einfacher zu gestalten. Deshalb wurde die Synthese von **23e** als **AAV 4** für die Darstellung von CLIO-NH₂-T5 (**24**) verwendet (Gleichung 4.12, Tabelle 4.19).

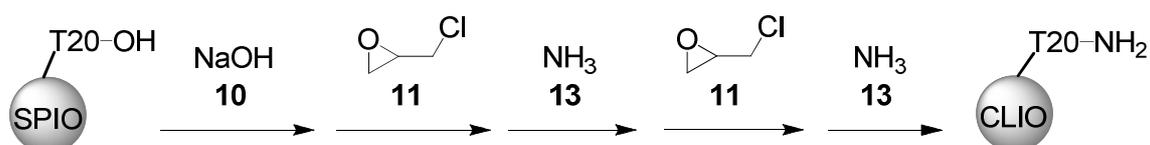


Gleichung 4.12: Optimierte Synthese **AAV 4** für CLIO-NH₂-T5 nach **23e**. Angegeben sind die Zeiten der Eduktzugabe sowie die eingesetzten Mengen von NaOH, Epichlorhydrin und NH₃ im Verhältnis zu einer Monomereinheit des Hülldextrans.

CLIO-NH ₂ -T5	Elementaranalyse in Massenprozent	Ausbeute	Edukt
24a	10.40 (C), 2.02 (H), 1.62 (N)	82 %	7a
24b	10.85 (C), 2.34 (H), 1.51 (N)	78 %	7a
24c	9.39 (C), 1.81 (H), 1.06 (N)	78 %	7a
-	8.13 (C), 1.68 (H)	-	7a

Tabelle 4.19: Durchführung von **AAV 4** zur Darstellung von CLIO-NH₂-T5 (**24a-c**). Angegeben ist ebenso die Elementaranalyse des Edukts **7a**.

Bei ersten Versuchen zur Synthese von CLIO-NH₂-T20 nach Gleichung 4.13 wurde die Menge an Natronlauge variiert. Der Einsatz eines Unterschusses an Natronlauge (**10**) führte bei CLIO-NH₂-T20 (**25a**) zu einer zu hohen Aminierung, während ein vierzigfacher Überschuss einen geeigneten Stickstoffgehalt von 1.63 % bei **25b** ergab (Tabelle 4.20). Um die Synthesen von CLIO-NH₂-T5 und CLIO-NH₂-T20 zu vereinheitlichen wurde auch bei den folgenden Umsetzungen ein Verhältnis der eingesetzten Natronlauge zu einer Monomereinheit des Dextrans T20 von etwa 20:1 gewählt.



Gleichung 4.13: Schematische Darstellung von CLIO-NH₂-T20.

CLIO-NH ₂ -T20	Überschuss an NaOH	Elementaranalyse in Massenprozent
25a	0.4	15.65 (C), 2.76 (H), 3.04 (N)
25b	35	12.78 (C), 2.33 (H), 1.63 (N)

Tabelle 4.20: Die Darstellung von CLIO-NH₂-T20 **25a** und **25b** ist bei sonst unveränderten Bedingungen von der Menge an eingesetzter Natronlauge (**10**) abhängig. Ein Unterschuss an **10** bewirkt eine zu hohe Aminierung der Partikel.

Bei der Umsetzung mit den Eduktverhältnissen der CLIO-NH₂-T5 (**20a-c**) konnte CLIO-NH₂-T20 (**26**) nicht aus der Reaktionslösung isoliert werden. Eine Aufreinigung durch Zugabe des organischen Lösemittels oder Zentrifugation scheiterte, da sich die Partikel nur minimal als Bodensatz absetzten. Dieser wies eine klebrige, hellbraune Konsistenz auf, der auf eine zu hohe Verlinkung der Dextranhülle hindeutete. Die Halbierung des Überschusses an Ammoniak und Epichlorhydrin erbrachte bei CLIO-NH₂-T20 (**27a**) geeignete Werte in der Elementaranalyse. Dieses Ergebnis erwies sich bei verschiedenen SPIO-T20 und unter leicht veränderten Eduktverhältnissen als reproduzierbar (Tabelle 4.21). Ebenso zeigten alle diese CLIO-NH₂-T20 (**27a-e**) eine hohe Hüllstabilität und eine gute Suspendierbarkeit bei den weiteren Umsetzungen. Allerdings konnte bei der Aufreinigung von **27d** und **27e**, bei denen ein leicht erhöhter Überschuss an Ammoniak und Epichlorhydrin im Vergleich zu **27a** eingesetzt wurde, das Auftreten eines farblosen, zähen Rückstandes beobachtet werden, der auf das Vorhandensein von nicht gebundenem Dextran hinwies. Dies wurde auch durch die im Vergleich zu den Edukten niedrigeren Kohlenstoffwerten der Elementaranalysen bei **27a-f** bestätigt.

CLIO-NH ₂ -T20	Elementaranalyse in Massenprozent	Edukt
27a	12.74 (C), 2.46 (H), 1.55 (N)	4c
27b	13.47 (C), 2.58 (H), 1.76 (N)	4c
27c	12.72 (C), 2.23 (H), 1.33 (N)	4c
27d	13.96 (C), 2.64 (H), 1.46 (N)	5e
27e	14.72 (C), 2.78 (H), 1.67 (N)	5e
27f	11.02 (C), 2.50 (H), 1.03 (N)	5f

Tabelle 4.21: Bei der wiederholten CLIO-NH₂-T20-Synthese nach **27a** wurden mit verschiedenen SPIO-T20 unter annähernd gleichen Bedingungen ähnliche Ergebnisse erzielt.

Somit wurde die Synthese von CLIO-NH₂-T20 mit einem geringeren Überschuss an Ammoniak und Epichlorhydrin durchgeführt. In Anlehnung an die erfolgreiche CLIO-NH₂-T5-Darstellung nach **AAV 4** wurde hierbei dasselbe interne Verhältnis von Ammoniak zu Epichlorhydrin gewählt. Der Überschuss dieser Edukte bezogen auf die Menge an Hülldextran wurde unterdessen bei **28a-e** kontinuierlich angehoben (Tabelle 4.22). Die so synthetisierten CLIO-NH₂-T20 wiesen alle befriedigende Resultate in den weiteren Umsetzungen auf. Die beste Hüllstabilität bzw. –zunahme zeigte sich bei **28d**.

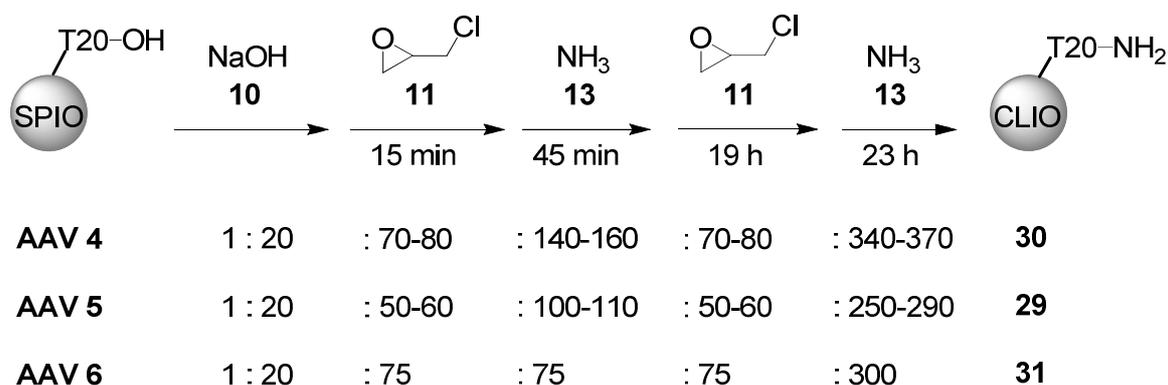
Überschuss an	11	13	11	13	Elementaranalyse
28a	18	35	18	105	13.50 (C), 2.59 (H), 1.25 (N)
28b	27	53	27	123	13.64 (C), 2.62 (H), 1.31 (N)
28c	36	70	36	140	14.15 (C), 2.62 (H), 1.47 (N)
28d	53	105	53	246	14.93 (C), 2.87 (H), 1.94 (N)
28e	60	88	60	280	10.51 (C), 2.32 (H), 0.93 (N)

Tabelle 4.22: Übersicht der gewählten Verhältnisse von Ammoniak (**11**) und Epichlorhydrin (**13**) in Bezug auf die Menge der am SPIO-T20 befindlichen Dextraneinheiten. Bei **28a-d** konnte unter Verwendung von SPIO-T20 (**5e**) eine Erhöhung der Hüllmenge mit steigendem Überschuss von **11** und **13** beobachtet werden.

Die Darstellung von **28d** wurde mit der allgemeinen Arbeitsvorschrift **AAV 5** bei CLIO-NH₂-T20 (**29a-g**) wiederholt. Hierbei wurden Stickstoffwerte zwischen 1-2 % erhalten (Tabelle 4.23). Die Aminierung war hierbei von dem Kern- / Hüllverhältnis m der eingesetzten SPIO-T20 abhängig. Da jedoch bisweilen der Stickstoffgehalt bei der weiteren Modifikation um bis zu 30 % sank, wurde die allgemeine Arbeitsvorschrift **AAV 4** zur Darstellung von CLIO-NH₂-T5 (**24**) angewandt (Gleichung 4.14). Hier lagen die Stickstoffwerte der Elementaranalysen meist bei ca. 1 % und es konnte eine Zunahme des Hüllanteils am Gesamtkolloid gegenüber den eingesetzten SPIO-T20 beobachtet werden (Tabelle 4.24). Allerdings konnte bei **30a** ein weißer Feststoff in der Lösung festgestellt werden. Durch das schnelle Hinzugeben trat auch bei **30f** ein weißer Niederschlag, der bei einem ganz langsamen Hinzutropfen von Epichlorhydrin und Ammoniak bei **30h** nahezu ausblieb. Darüber hinaus wurden dadurch eine große Zunahme aller Werte und ein sehr hoher Stickstoffgehalt erreicht.

CLIO-NH ₂ -T20	Elementaranalyse in Massenprozent	Ausbeute	Edukt
29a	12.19 (C), 2.48 (H), 1.70 (N)	89 %	5f
29b	12.27 (C), 2.36 (H), 1.64 (N)	80 %	5f
29c	11.89 (C), 2.53 (H), 1.34 (N)	72 %	5f
29d	12.59 (C), 2.64 (H), 1.54 (N)	91 %	5f
29e	10.28 (C), 2.20 (H), 0.96 (N)	94 %	8a
29f	11.24 (C), 2.48 (H), 1.07 (N)	78 %	8a
29g	11.01 (C), 2.20 (H), 1.15 (N)	71 %	8a

Tabelle 4.23: Um die Reproduzierbarkeit von **28d** zu überprüfen, wurde die Synthese nach **AAV 5** mehrmals wiederholt. Aus dem niedrigeren Verhältnis m bei **8a** resultiert ein Stickstoffgehalt von nur 1 % gegenüber den Experimenten mit **5f**.



Gleichung 4.14: Synthese von CLIO-NH₂-T20 (**29-31**) nach **AAV 5**, **AAV 4** und **AAV 6**.

CLIO-NH ₂ -T20	Elementaranalyse in Massenprozent	Ausbeute	Edukt
30a	12.23 (C), 2.53 (H), 1.46 (N)	84 %	5f
30b	10.68 (C), 1.99 (H), 1.07 (N)	84 %	8a
30c	11.25 (C), 2.10 (H), 1.18 (N)	99 %	8a
30d	16.52 (C), 3.12 (H), 1.85 (N)	76 %	8b
30e	14.74 (C), 2.60 (H), 1.10 (N)	87 %	8b
30f	13.77 (C), 2.88 (H), 0.93 (N)	86 %	8b
30g	14.14 (C), 2.70 (H), 0.97 (N)	76 %	8b
30h	18.29 (C), 3.62 (H), 3.18 (N)	75 %	8b

Tabelle 4.24: Ergebnisse der nach **AAV 4** synthetisierten CLIO-NH₂-T20 (**30a-h**).

Durch eine Halbierung der ersten Ammoniakmenge im Vergleich zu **AAV 4** konnte bei sonst unveränderten Reaktionsbedingungen bei CLIO-NH₂-T20 (**31a-e**) nach **AAV 6** eine stabile Zunahme der Kohlenstoffwerte beobachtet werden. Ebenso bewegte sich durch den verringerten Einsatz des Ammoniaks der Stickstoffmassenanteil in einem engen Bereich zwischen 1-1.5 % (Tabelle 4.25).

CLIO-NH ₂ -T20	Elementaranalyse in Massenprozent	Ausbeute	Edukt
31a	10.49 (C), 2.14 (H), 1.05 (N)	100 %	8a
31b	14.15 (C), 2.64 (H), 0.94 (N)	95 %	8b
31c	15.32 (C), 2.88 (H), 1.54 (N)	80 %	8b
31d	14.21 (C), 2.92 (H), 1.27 (N)	76 %	8b
31e	10.26 (C), 2.94 (H), 1.22 (N)	88 %	8c

Tabelle 4.25: Durch den verminderten Einsatz bei der ersten Ammoniakzugabe konnten bei **AAV 6** durch eine Verringerung der Nebenreaktionen stabile Kolloide (**31a-e**) synthetisiert werden.

Eine erhöhte Suspendierbarkeit der Partikel konnte durch die Herabsetzung des Verhältnisses auf 60-65:1 bei der Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak erzielt werden. Jedoch besaßen diese Partikel einen zu niedrigen Stickstoffgehalt und konnten nicht genügend an den Aminoeinheiten modifiziert werden (Tabelle 4.26).

CLIO-NH ₂ -T20	Elementaranalyse in Massenprozent	Ausbeute	Edukt
32a	9.12 (C), 1.63 (H), 0.37 (N)	84 %	8a
32b	8.59 (C), 1.72 (H), 0.54 (N)	84 %	8c

Tabelle 4.26: Bei der Verwendung eines einheitlichen Überschusses an Epichlorhydrin und Ammoniak von 60-65:1 konnten CLIO-NH₂-T20 (**32a-b**) mit einer hohen Suspendierbarkeit dargestellt werden.

Bei der Synthese von CLIO-NH₂-T40 (**33a-d**) u.a. nach **AAV 4** und **AAV 5** konnte lediglich eine Abnahme der Dextranhülle in den Elementaranalysen beobachtet werden. Auch folgende Umsetzungen zeigten keine Zunahme der polymeren Hülle. Somit wiesen CLIO-NH₂-T40 (**33**) keine Verbesserung gegenüber den dargestellten CLIO-NH₂-T5 und -T20 auf, so dass keine weiteren Versuche zur Synthese von CLIO-NH₂-T40 durchgeführt wurden.

CLIO-NH ₂ -T40	Elementaranalyse in Massenprozent	Ausbeute
33a	9.37 (C), 1.75 (H), 0.76 (N)	74 %
33b	9.08 (C), 1.93 (H), 0.95 (N)	69 %
33c	9.47 (C), 2.16 (H), 1.09 (N)	73 %
33d	9.20 (C), 1.85 (H), 1.06 (N)	81 %

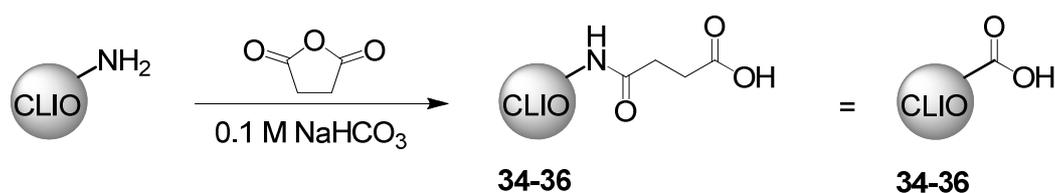
Tabelle 4.27: Elementaranalysen der durchgeführten CLIO-NH₂-T40-Synthesen (**33a-d**).

Somit lassen sich stabile CLIO-NH₂-T5 nach **AAV 4** darstellen, während die Darstellung geeigneter CLIO-NH₂-T40 fehlschlug. Demgegenüber konnten mehrere erfolgreiche Synthesen von CLIO-NH₂-T20 durchgeführt werden. Durch einen möglichst geringen Überschuss an Epichlorhydrin und Ammoniak sollte hierbei die Bildung von vernetztem, freien Dextran vermindert werden. Jedoch spielen bei der Darstellung von CLIO-NH₂ viele Faktoren eine Rolle, so dass kleine Schwankungen in den Produkteigenschaften nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten.

4.3. Modifikation der Kolloide mit niedermolekularen Substanzen

Da die Anbindung von Tetramethylrodamin-succinimidester (TAMRA-SE) an CLIO-NH₂ in der Diplomarbeit^[36] nicht erfolgreich bewerkstelligt werden konnte, wurde nach Weissleder^[82] ein Spacer mit einer endständigen Carboxylgruppe an den Amino-CLIO (CLIO-NH₂) durch die Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid eingefügt (Gleichung 4.15). Da diese Carboxy-CLIO (CLIO-COOH) als Grundbaustein für die weitere Funktionalisierung der Partikel mit Fluoreszenzmarkern und bioaktiven Molekülen (Kapitel 4.4. und 4.5.) dienen, wurde ein Großteil der dargestellten CLIO-NH₂ für deren Synthese eingesetzt. Aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften der CLIO-COOH erfolgte eine grobe Unterteilung der CLIO-COOH nach dem verwendeten Dextran: **34** (T5), **35** (T20) und **36** (T40).

Die Auswertung der Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid mittels Elementaranalysen gestaltete sich schwierig, da die Kohlenstoffwerte oftmals nur geringfügig erhöht wurden. Dies zeigte sich vor allem bei der Synthese von CLIO-COOH-T5 (**34**) und CLIO-COOH-T40 (**36**). Durch die Verwendung der stabileren Kolloide mit Dextran T20 hingegen konnte je nach Aminierungsgrad des Edukts eine leichte (**35a**) bis starke Zunahme (**35b-c**) des Kohlenstoffanteils bei der Darstellung von COOH-T20 (**35**) erreicht werden (Tabelle 4.28).



Gleichung 4.15: Einführung von Carbonsäurefunktionen an der Oberfläche der Kolloide durch Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid.

Charakteristisch für die Generierung von Carboxylgruppen an der Oberfläche der Nanopartikel war der Rückgang der Suspendierbarkeit bis hin zum Ausfall der Kolloide. Aus diesem Grund musste ein Kompromiss zwischen der Anzahl der eingeführten Carboxylgruppen, die durch den eingesetzten Überschuss an Bernsteinsäureanhydrid kontrolliert werden konnte, und der Stabilität der Partikel in einer wässrigen Lösung eingegangen werden. Während Eisenoxid-Nanopartikel mit Dextran T20 mit einem 15-fachen Überschuss behandelt werden konnten, waren die

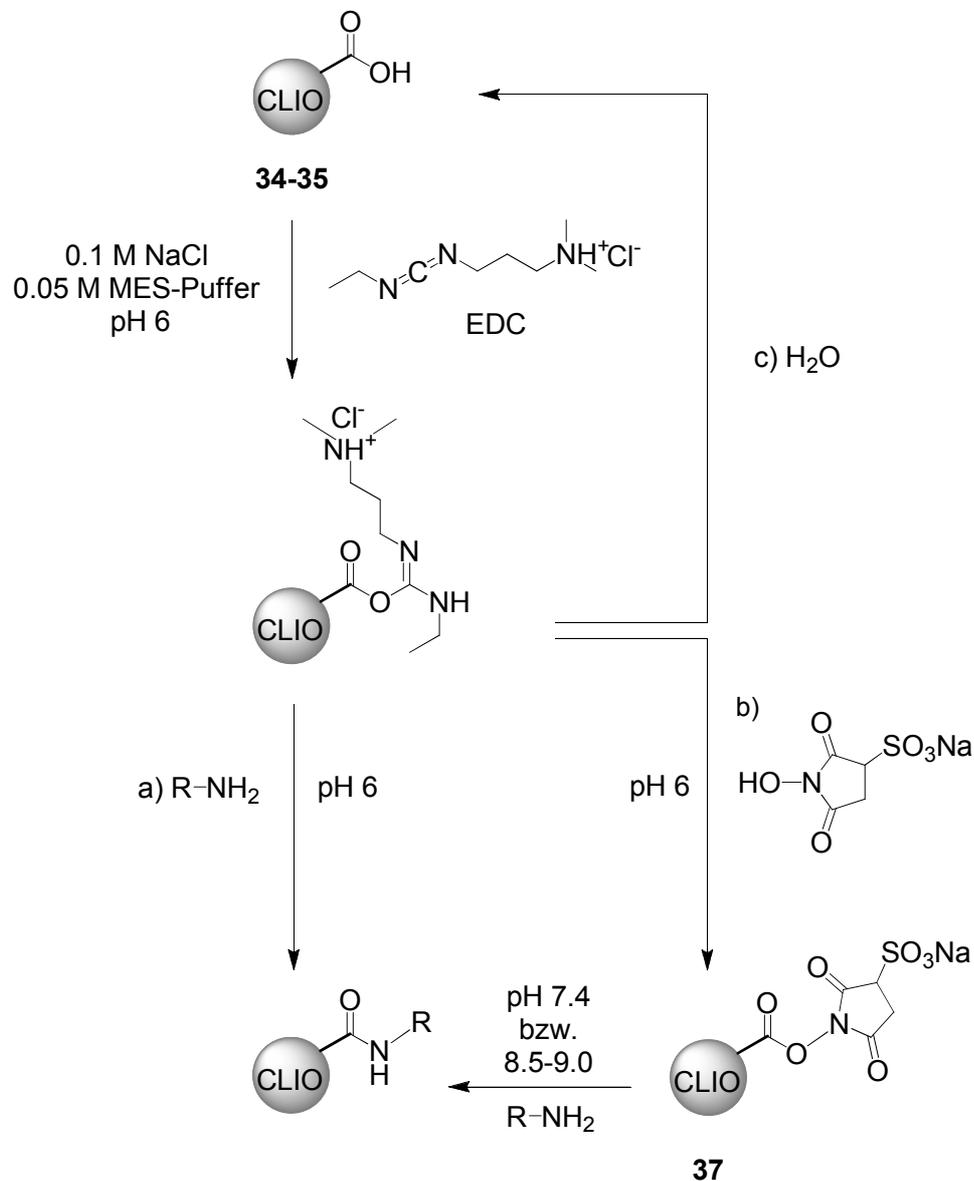
Synthesen von CLIO-COOH-T5 und CLIO-COOH-T40 nur bei einem Einsatz von Bernsteinsäureanhydrid im Verhältnis von etwa 5:1 bezogen auf die Menge an Stickstoff am Nanopartikel erfolgreich.

Dextran	CLIO-COOH	Elementaranalysen in Massenprozent	CLIO-NH ₂
T5	34	11.26 (C), 2.51 (H), 1.38 (N)	24c
		10.85 (C), 2.34 (H), 1.51 (N)	
T20	35a	13.61 (C), 2.57 (H), 1.29 (N)	27d
		13.96 (C), 2.64 (H), 1.46 (N)	
T20	35b	18.29 (C), 3.19 (H), 1.62 (N)	30d
		16.52 (C), 3.12 (H), 1.85 (N)	
T20	35c	20.40 (C), 3.32 (H), 2.39 (N)	30h
		18.29 (C), 3.62 (H), 3.18 (N)	
T40	36	9.66 (C), 2.00 (H), 1.01 (N)	33c
		9.47 (C), 2.16 (H), 1.09 (N)	

Tabelle 4.28: Bei der Darstellung von CLIO-COOH-T5 (**34**) und CLIO-COOH-T40 (**36**) zeigten sich im Vergleich zu den Edukten CLIO-NH₂ annähernd konstante Werte. Dies ist ebenso bei einigen Synthesen von CLIO-COOH-T20 (**35a**) zu beobachten. Mit steigender Stabilität der CLIO-NH₂-T20 jedoch konnte eine signifikante Erhöhung des Kohlenstoffgehalts bei **35b** und **35c** festgestellt werden.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe für die weitere Umsetzung mit Aminen erfolgte mit dem für wässrige Lösungen literaturbekanntem Zero-Length-Crosslinking-System 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (Sulfo-NHS) (Gleichung 4.16).^[82,117] Der intermediär durch die Reaktion mit EDC entstandene, instabile und sehr reaktive O-Acylisoharnstoffester wird hierbei mit Sulfo-NHS abgefangen. Der so gebildete Sulfo-NHS-carboxy-CLIO (**37**, CLIO-COO-sulfo-NHS) ist weniger reaktiv, hydrolysebeständiger^[118] und kann mit einem Amin in einer getrennten Reaktion in das Amid überführt werden. Alternativ kann die Amidbildung durch direkte Umsetzung der CLIO-COOH mit EDC und einem Amin erfolgen. Problematisch ist bei beiden Mechanismen die schnelle Hydrolyserate (2-3 s⁻¹) des O-Acyl-Derivats, durch die es zu einer Regenerierung des Eduktkolloids kommt.^[117] Diese Nebenreaktion sollte bei der Synthese von CLIO-COO-sulfo-NHS (**37a**) aus CLIO-COOH-T5 (**34**) durch die gleichzeitige Zugabe eines Überschuss an EDC und Sulfo-NHS minimiert werden. Nach der Aufreinigung fiel **37a** nach einem

Tag als schwarzer Niederschlag aus. Da die Elementaranalysen von **37a** eine Zunahme des Stickstoff- und Schwefelwertes zeigten, die sich vor und nach dem Ausfall nur geringfügig unterschieden, konnte von einer gelungen Umsetzung ausgegangen werden (Tabelle 4.29).



Gleichung 4.16: Die Reaktion von CLIO-COOH (**34-35**) mit Aminen kann durch Aktivierung mit EDC und Sulfo-NHS durchgeführt werden. Der aus der Reaktion mit EDC entstandene reaktive O-Acylisoharnstoffester kann direkt oder über den stabileren Succinimidester (**37**) zum Amid umgesetzt werden. Als Nebenreaktion findet die Rückbildung von CLIO-COOH durch Hydrolyse statt.

Kolloid	Elementaranalyse in Massenprozent	Verhältnis S/N
37a (I)	8.92 (C), 1.81 (H), 0.83 (N), 0.43 (S)	1.04
37a (II)	8.98 (C), 1.91 (H), 0.76 (N), 0.69 (S)	2.74
34 (Edukt)	9.56 (C), 1.75 (H), 0.65 (N)	-

Tabelle 4.29: Die Elementaranalysen von CLIO-COO-sulfo-NHS (**37**) zeigten eine leichte Umsetzung. Die Werte (I) blieben auch bei einem Ausfall (II) konstant, was für eine erfolgreiche NHS-Ester-Synthese spricht.

Allerdings befanden sich die Werte allesamt in einem niedrigen Bereich, wobei der Kohlenstoffwert im Vergleich zum Edukt abnahm. Bei einer Halbierung des Überschusses an EDC und Sulfo-NHS fiel **37b** ebenfalls aus der Reaktionslösung aus, wies aber zufriedenstellende Werte in der Elementaranalyse auf, die auf eine Besetzung von 77 % bezogen auf den Stickstoffgehalt des CLIO-COOH-T5 schließen ließen. Da die Partikel nach dem Zentrifugieren meistens nur mit einem Ultraschallbad resuspendiert werden konnten, wurde aufgrund der reaktiven NHS-Esterfunktion auf diese Reinigungsmethode bei **37b** verzichtet.

Die Behandlung von **37c** mit einem Ultraschallbad führte zu einer Hydrolyse des NHS-Esters. Hierdurch verringerte sich zwar der Schwefelgehalt am Kolloid um 40 %, jedoch stimmte die Zunahme des Stickstoffwertes mit dem Schwefelgehalt noch besser überein (Tabelle 4.30).

Kolloid	Elementaranalyse in Massenprozent	Verhältnis S/N
37c vor US-Bad	13.69 (C), 2.58 (H), 2.10 (N), 1.53 (S)	1.34
37c nach US-Bad	13.65 (C), 2.41 (H), 1.95 (N), 0.88 (S)	1.10
34 (Edukt)	13.22 (C), 2.28 (H), 1.60 (N)	-

Tabelle 4.30: Trotz der Abnahme des Schwefelgehaltes durch das Benutzen eines Ultraschallbades (US-Bad) wurden befriedigende Werte sowie ein molares Verhältnis von Schwefel zu neu eingebrachtem Stickstoff von annähernd 1:1 erhalten.

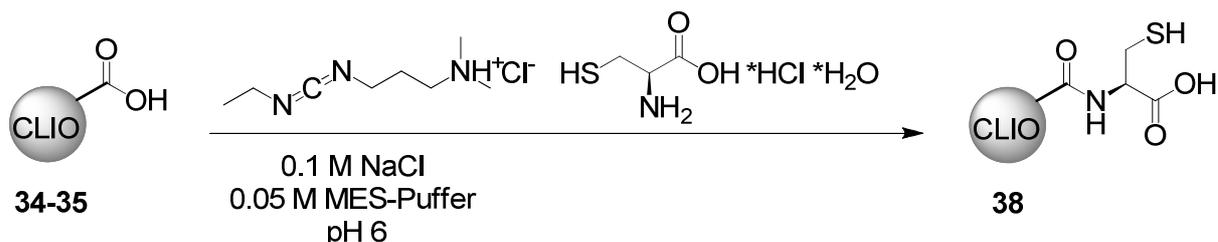
Bei der Darstellung von **37d** wurde untersucht, in welcher Zeitspanne die Umsetzung mit Sulfo-NHS vollständig war (Tabelle 4.31). Schon nach kurzer Zeit zeigte sich die Bildung von CLIO-COO-sulfo-NHS (**37d**) aus dem intermediär gebildeten O-Acylisoharnstoffester. Da es aufgrund der Ungenauigkeiten bei der Analysemethodik

zu leichten Schwankungen des S/N-Verhältnisses kam, konnte von einer stabilen Anbindung von Sulfo-NHS bei **37d** über der gesamten Reaktionsdauer ausgegangen werden. Jedoch zeigte sich auch hier eine geringere Suspendierbarkeit des erhaltenen Produkts. Auch beim Einsatz von CLIO-COOH-T20 (**35**) konnte zwar eine gute Umsetzung mit einem Schwefelgehalt von fast 2 % (Verhältnis S/N = 1.1), aber keine erhebliche Verbesserung der Löslichkeit bei **37e** erzielt werden. Diese Instabilität in wässriger Lösung war für die weitere Umsetzung der CLIO-COO-sulfo-NHS (**37**) problematisch (siehe Kapitel 4.4 Fluoreszenzmarkierung). Deshalb wurde als Alternative die direkte Umsetzung von Aminen mit CLIO-COOH per EDC-Kupplung gewählt.

Kolloid	Elementaranalyse in Massenprozent	Verhältnis S/N
37d (I)	12.95 (C), 2.35 (H), 2.12 (N), 1.98 (S)	1.44
37d (II)	12.58 (C), 2.40 (H), 2.08 (N), 1.27 (S)	0.99
37d (III)	12.78 (C), 2.40 (H), 2.40 (N), 2.57 (S)	1.27
37d (IV)	12.92 (C), 2.34 (H), 2.29 (N), 1.96 (S)	1.34
34 (Edukt)	11.92 (C), 2.09 (H), 1.52 (N)	-

Tabelle 4.31: Die Elementaranalysen zeigten einen schnellen Reaktionsverlauf der Bildung von CLIO-COO-sulfo-NHS **37d**.

Erste Umsetzungen von Aminen mit CLIO-COOH (**35**) unter Ausbildung einer Amidbindung erfolgten mit der Aminosäure L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat, da bei dieser die Reaktion anhand des Schwefelgehalts in der Elementaranalyse beurteilt werden konnte (Gleichung 4.18). Der Einsatz einer doppelten Menge an Cystein bei Cystein-carboxy-CLIO (**38b**, CLIO-COO-Cys) zeigte keine erhebliche Verbesserung der Anbindung gegenüber **38a**, da beide bei ansonsten gleichen Werten einen Schwefelgehalt von unter 1 % aufwiesen (Tabelle 4.32 oben).



Gleichung 4.17: Umsetzung von CLIO-COOH (**34-35**) mit Cystein über den O-Acylisoharnstoffester zur Darstellung von CLIO-COO-Cys (**38**) durch Ausbildung einer Amidbindung.

Die zeitlich versetzte Zugabe von Cystein nach 1.5 (**38c**) bzw. 3.0 h (**38d**) führte bei beiden zu einer fast gleichwertigen Erhöhung der am Kolloid gebundenen Aminosäure (Tabelle 4.32 unten). Da CLIO-COO-Cys (**38a-d**) mit dem Dextran T20 als stabile Suspensionen vorlagen, wurde bei **38e-g** die Reaktionsdauer der Umsetzung von CLIO-COOH (**34**) mit Cystein untersucht (Tabelle 4.33). Eine Erhöhung der Stickstoff- und Schwefelwerte gegenüber dem Edukt (**35**) zeigte sich erst bei **38g** nach einer Reaktionszeit von 20 h. Das Verhältnis Schwefel zu Stickstoff war vor allem bei **38e** wenig aussagekräftig, da aufgrund des Hüllverlustes kein exakter Zuwachs des Stickstoffgehalts für die Berechnung erhalten werden konnte.

CLIO-COO-Cys	Elementaranalyse in Massenprozent	S/N
38a	15.38 (C), 2.73 (H), 2.02 (N), 0.55 (S)	0.5
38b	15.12 (C), 2.75 (H), 1.90 (N), 0.80 (S)	1.0
35 (Edukt)	14.94 (C), 2.53 (H), 1.56 (N)	-
38c	17.29 (C), 2.74 (H), 2.18 (N), 1.72 (S)	1.1
38d	15.12 (C), 2.75 (H), 1.90 (N), 1.84 (S)	1.9
35 (Edukt)	15.45 (C), 2.81 (H), 1.47 (N)	-

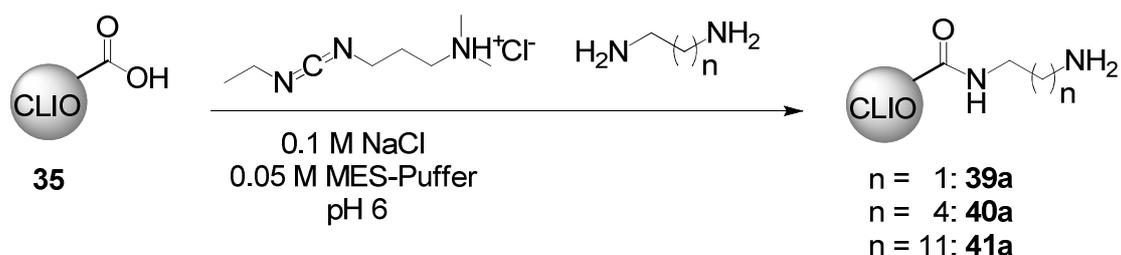
Tabelle 4.32: Elementaranalysen von CLIO-COO-Cys (**38a-b**) bei verschiedenen Mengen an Cystein (oben). Die nachträgliche Zugabe von Cystein bei **38c** (1.5 h) und **38d** (3.0 h) zu dem gebildeten O-Acylisoharnstoffester führte zu einer besseren Anbindung von Cystein an den Partikel (unten).

CLIO-COO-Cys	Elementaranalyse in Massenprozent	Reaktionsdauer
38e	9.58 (C), 1.84 (H), 1.02 (N), 0.71 (S)	1 h
38f	9.74 (C), 2.88 (H), 1.21 (N), 1.15 (S)	3 h
38g	10.98 (C), 2.06 (H), 2.06 (N), 2.90 (S)	20 h
34 (Edukt)	10.26 (C), 1.88 (H), 1.02 (N)	-

Tabelle 4.33: Bei der Umsetzung von **34** zeigten sich erst bei **38g** befriedigende Ergebnisse mit einer starken Erhöhung des Schwefel- und Stickstoffwertes im Verhältnis von 1.2 : 1.

Um erneut primäre Aminogruppen an der Oberfläche der Partikel einzuführen, wurden die Carboxy-CLIO (**34-36**) mit Diaminen analog zu Cystein umgesetzt (Gleichung 4.18). Durch die Verwendung von Ethylendiamin ($n = 1$), 1,5-Diaminopentan-Dihydrochlorid ($n = 4$) und 1,12-Diaminododecan ($n = 11$) sollte der Effekt des

Abstandes zwischen Eisenoxidkern und Fluoreszenzmolekülen untersucht werden (siehe Kapitel 4.4.). Bei CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39a-41a**) zeigte sich aber nur ein um 0.2-0.4 % erhöhter Stickstoffgehalt, der jedoch auch bei einer zweiten Zentrifugation des Diaminoethan-CLIO (**39a**) konstant blieb (Tabelle 4.35). Ein weiterer Hinweis auf die erfolgreiche Umsetzung war eine stark verbesserte Suspendierbarkeit der Kolloide im Vergleich zu CLIO-COOH (**34-36**).

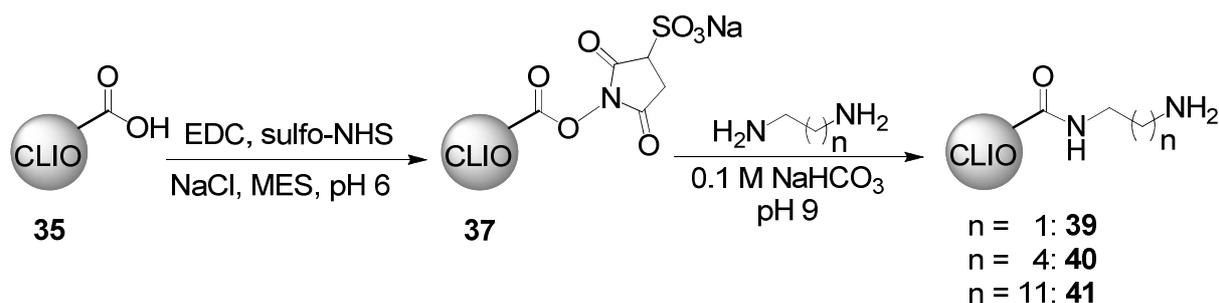


Gleichung 4.18: Einführung von primären Aminogruppen bei CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39a-41a**) durch die Anbindung von Ethylendiamin (n = 1), Cadaverin (n = 4) und Diaminododecan (n = 11).

CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n -NH ₂	Elementaranalyse in Massenprozent
39a (I)	10.63 (C), 2.24 (H), 1.23 (N)
39a (II)	10.62 (C), 2.20 (H), 1.11 (N)
35 (Edukt)	11.70 (C), 2.27 (H), 0.90 (N)
<hr/>	
40a	9.49 (C), 1.96 (H), 0.69 (N)
35 (Edukt)	9.27 (C), 1.80 (H), 0.45 (N)
<hr/>	
41a	18.06 (C), 2.97 (H), 1.91 (N)
35 (Edukt)	18.29 (C), 3.19 (H), 1.62 (N)

Tabelle 4.34: Unter Ausbildung einer Amidbindung wurden Ethylendiamin, Cadaverin-Dihydrochlorid und Diaminododecan mit CLIO-COOH (**35**) zu CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39a-41a**) umgesetzt.

Eine Verbesserung der Synthese von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) gelang über den *in situ* dargestellten CLIO-COO-sulfo-NHS (**37**). Dieser wird aus der Reaktionslösung mit Ethanol gefällt und gewaschen, um direkt anschließend in 0.1 M NaHCO₃-Lösung (pH 9) mit den Diaminen umgesetzt zu werden (Gleichung 4.19). Eine Reinigung und weitere Umsetzung des Zwischenprodukts CLIO-COO-sulfo-NHS (**37**) nach 3, 7 und 20 h erbrachte keine relevanten Unterschiede bei der Amidbildung von **39b** (Tabelle 4.35). Es war lediglich eine leichte Tendenz zu einer höheren Anbindung des Diamins bei einer längeren Reaktionszeit erkennbar.



Gleichung 4.19: Optimierte Synthese von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) über einen CLIO-COO-sulfo-NHS-Ester (**37**). Zum Erfolg führte hierbei die nur kurze Aufreinigung der Zwischenstufe verbunden mit einem pH-Wechsel.

Reaktionsdauer zu 37	Elementaranalyse von 39b
3 h	13.68 (C), 2.57 (H), 1.30 (N)
7 h	13.68 (C), 2.72 (H), 1.32 (N)
24 h	13.88 (C), 2.85 (H), 1.47 (N)
35 (Edukt)	15.12 (C), 2.72 (H), 0.92 (N)

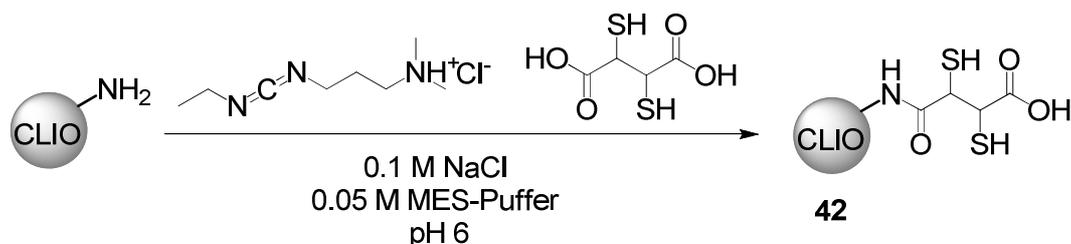
Tabelle 4.35: Eine lange Reaktionsdauer von 24 h bei der Aktivierung des Carboxy-CLIO-T20 (**35**) durch Überführung in den CLIO-COO-sulfo-NHS-Ester (**37**) führte zu einer vermehrten Anbindung des Diamins bei CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂-T20 (**39b**).

Während beim Einsatz von Ethylendiamin bei **39c** der Stickstoffgehalt in Abhängigkeit von der Menge an Carboxylgruppen am Kolloid stark zunahm, zeigte sich bei den längerkettigen Diaminen 1,5-Diaminopentan-Dihydrochlorid (Cadaverin-Dihydrochlorid) und 1,12-Diaminododecan eine geringere Umsetzung (Tabelle 4.36).

CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n -NH ₂	Elementaranalyse in Massenprozent
39c	19.70 (C), 2.81 (H), 3.56 (N)
35 (Edukt)	20.40 (C), 3.32 (H), 2.39 (N)
40b	14.54 (C), 2.64 (H), 1.18 (N)
35 (Edukt)	15.12 (C), 2.72 (H), 0.92 (N)
41b	15.88 (C), 3.16 (H), 1.38 (N)
35 (Edukt)	15.12 (C), 2.72 (H), 0.92 (N)

Tabelle 4.36: Ergebnisse der Synthesen von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) über einen CLIO-COO-sulfo-NHS-Ester (**37**) als Zwischenstufe.

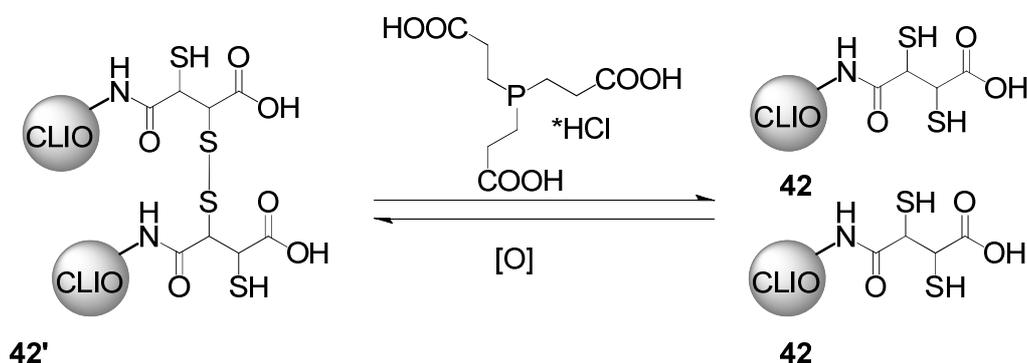
Ebenso erfolgte die Reaktion mit Amino-CLIO (CLIO-NH₂) und Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) durch Aktivierung mit EDC. Hierbei zeigte sich bei einem geringen Überschuss an EDC und DMSA von 5:1 bezogen auf den Stickstoffgehalt eine gute Umsetzung bei CLIO-DMSA (**42a**) (Gleichung 4.20). Bei einem Eduktverhältnis von 1:1 erhielt man bei **42b** einen sehr hohen Schwefelgehalt, der auch bei einer erneuten Zentrifugation stabil blieb (Tabelle 4.37).



Gleichung 4.20: Synthese von CLIO-DMSA (**42**) über eine EDC-vermittelte Amidbindung zwischen CLIO-NH₂ und Dimercaptobernsteinsäure (DMSA).

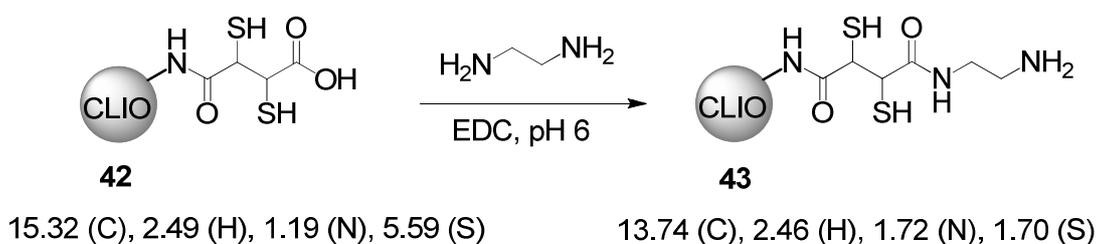
CLIO-DMSA	Elementaranalyse in Massenprozent
42a	15.32 (C), 2.49 (H), 1.19 (N), 5.59 (S)
42b (I)	16.04 (C), 2.73 (H), 1.41 (N), 10.46 (S)
42b (II)	16.08 (C), 2.34 (H), 1.38 (N), 10.63 (S)

Tabelle 4.37: Die Auswertung der Elementaranalysen zeigte eine sehr gute Anbindung der Dimercaptobernsteinsäure an den CLIO-NH₂. Die so dargestellten CLIO-DMSA (**42**) wiesen bei einer wiederholten Zentrifugation stabile Werte auf.

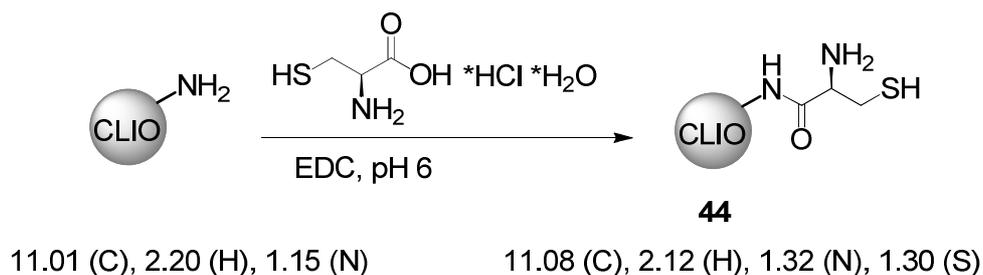


Gleichung 4.21: In der wässrigen Lösung wurden die CLIO-DMSA (**42**) durch Disulfidbrücken untereinander verbunden, was einen Ausfall der Kolloide bewirkte. Mittels Zugabe von TCEP konnten diese unter einer irreversiblen Bildung eines Phosphanoxids zu Thiolen reduziert werden.

Allerdings fielen diese Kolloide mit einer Oberfläche aus DMSA-Molekülen je nach Qualität des eingesetzten CLIO-NH₂ nach wenigen Minuten (**42a**) bis einigen Tagen (**42b**) durch die Bildung von Disulfidbrücken aus und konnten nicht mehr durch wiederholtes Zentrifugieren oder im Ultraschallbad resuspendiert werden (Gleichung 4.21). Das Aufbrechen dieser Bindungen und die damit einhergehende, wiedergewonnene Suspendierbarkeit der Partikel konnte mit Tris(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP) bewerkstelligt werden (Gleichung 4.21). Neben anderen Vorteilen gegenüber den üblichen Reduktionsmitteln wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) ermöglicht dieses wasserlösliche Phosphanderivat eine Umsetzung an den Thiolgruppen der Partikel ohne eine Entfernung des überschüssigen TCEP.^[119,120] Eine verbesserte, wenn auch nicht vollständige Suspendierbarkeit gelang durch die Umsetzung von CLIO-DMSA (**42**) mit Ethylendiamin zu CLIO-DMSA-NH-(CH₂)₂-NH₂ (**43**). Allerdings sank hierbei der Schwefelgehalt um 70 %, während der Stickstoffwert leicht anstieg. (Gleichung 4.22). Alternativ konnte L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat nach demselben Reaktionsschema über den C-Terminus am CLIO-NH₂ (**29g**) gebunden werden, wodurch eine Oberfläche aus Amino- und Thiofunktion bei CLIO-NH-Cys (**44**) entstand (Gleichung 4.23). Diese Partikel fielen im Gegensatz zu CLIO-DMSA (**42**) nicht aus der wässrigen Lösung aus.



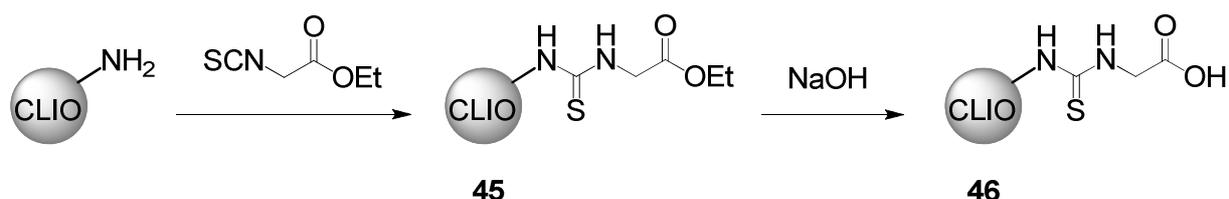
Gleichung 4.22: Die Anbindung von Ethylendiamin an der Oberfläche der Kolloide bewirkte eine verbesserte Suspendierbarkeit von CLIO-DMSA-NH-(CH₂)₂-NH₂ (**43**) gegenüber **42**. Auffällig ist der starke Rückgang des Schwefelgehaltes bei dieser Reaktion.



Gleichung 4.23: Durch die Umsetzung von CLIO-NH₂-T20 (**29g**) mit Cystein konnten stabile Kolloide CLIO-NH-Cys (**44**) mit einer Oberfläche aus Amino- und Thiofunktion generiert werden.

4.4. Fluoreszenzmarkierung von Eisenoxid-Nanopartikeln

Da Anbindungsversuche von Rhodaminfarbstoffen an CLIO-NH₂-Partikel in der Diplomarbeit^[36] fehlschlugen, sollte die Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) erfolgen. Die Reaktion wurde zuerst mit Ethyl-2-isothiocyanatoacetat als Modellsubstanz durchgeführt (Gleichung 4.24), wobei die Anbindung an das Kolloid durch die gebildete Thioharnstoffgruppe per Elementaranalyse nachgewiesen wurde.



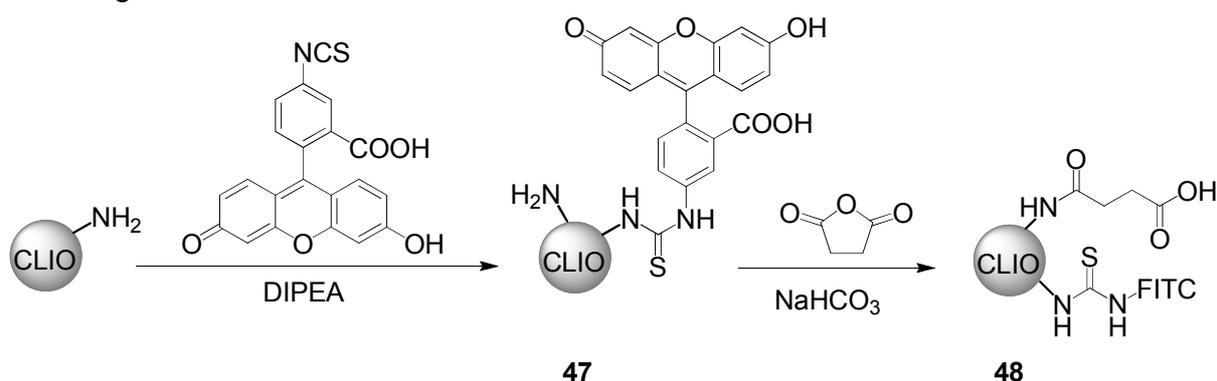
Gleichung 4.24: Umsetzung von CLIO-NH₂ mit Ethyl-2-isothiocyanatoacetat zu CLIO-NCS-COOEt (**45**) und Darstellung von CLIO-NH-NCS-COOH (**46**) durch Verseifung mit Natronlauge.

Bei der Synthese von CLIO-NCS-COOEt (**45**) und CLIO-NH-NCS-COOH (**46a**) fiel wiederholt ein weißer Feststoff aus. Ebenso ließen die Elementaranalysen darauf schließen, dass das Hülldextran als Folge der Modifizierung mit Ethyl-2-isothiocyanatoacetat teilweise aus der Lösung ausfiel. Eine erhöhte Löslichkeit sollte durch Verseifung des Esters mit Natronlauge erzielt werden. Tatsächlich wurde bei **46b** kein weißer Niederschlag mehr beobachtet, jedoch kam es auch hier aufgrund der Instabilität der Partikel zu einem Hüllverlust während der Zentrifugation. Durch die Verwendung von Triethylamin als Hilfsbase und der schonenderen chromatographischen Reinigung konnte eine gelungene Substitution von **46c** beobachtet werden, wobei der Stickstoffwert im Vergleich zum Edukt im Verhältnis 1:1 mit dem Schwefelwert zunahm (Tabelle 4.38).

	NEt ₃	Elementaranalyse
45	-	8.27 (C), 1.70 (H), 0.59 (N), 0.39 (S)
46a	+	7.14 (C), 1.59 (H), 0.42 (N), 0.18 (S)
46b	-	7.77 (C), 1.57 (H), 0.66 (N), 0.28 (S)
46c	+	10.10 (C), 2.20 (H), 1.61 (N), 1.58 (S)

Tabelle 4.38: Bei **45** und **46a-c** lieferte unabhängig von der Hilfsbase nur **46c** geeignete Ergebnisse.

Analog zu der Synthese von CLIO-NCS-COOEt (**45**) erfolgte die Markierung der Kolloide bei CLIO-NH-FITC (**47**) mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und DIPEA in Anlehnung an eine von Weissleder angewandten Methode (Gleichung 4.25).^[82] Die Auswertung der Ergebnisse gestaltete sich schwierig. Bei der wiederholten Zentrifugation von **47a** wurde unter UV-Licht in der überstehenden wässrigen Phase Fluoreszenz nachgewiesen, jedoch nicht in der Kolloidlösung. Es konnte auch nicht geklärt werden, ob es sich hierbei um freien Farbstoff oder um Hüllmaterial mit gebundenem FITC handelte. An den Partikeln selbst konnte Fluorescein durch eine gelblich-grüne Verfärbung der verdünnten Lösung erst nachgewiesen werden, als die Kolloide mit Schwefelsäure aufgeschlossen worden waren. Aufgrund der pH-abhängigen Fluoreszenzeigenschaft von Fluorescein konnte in der stark sauren Lösung jedoch keine Emission beobachtet werden. Bei **47b** wurden die Kolloide solange mit Ethanol am Magneten gewaschen, bis die organische Phase keine Fluoreszenz mehr zeigte. Allerdings konnten Fluorophore nach der anschließenden Zentrifugation in der überstehenden wässrigen Lösung nachgewiesen werden. Deshalb wurden zur zusätzlichen Abtrennung von lose gebundenem Fluoresceinisothiocyanat die FITC-markierten Eisenoxid-Nanopartikel **47c** mit Bernsteinsäureanhydrid zu **48a** umgesetzt. Hierdurch konnte auch eine mögliche weitere Umsetzung der FITC-markierten CLIO-NH₂ (**47**) gezeigt werden (Gleichung 4.25). Ebenso wurden bei der Verwendung der stabileren CLIO-NH₂-T20 Farbstoffmoleküle beim Zentrifugieren von den Kolloiden abgeschieden, weshalb auch **47d** weiter zu **48b** umgesetzt wurde.



Gleichung 4.25: Die Synthese von **47** gelingt unter Ausbildung einer Thioharnstofffunktion. Eine anschließende Umsetzung zu **48** diente der nochmaligen Aufreinigung der Kolloide sowie ihrer Funktionalisierung mit Carboxygruppen.

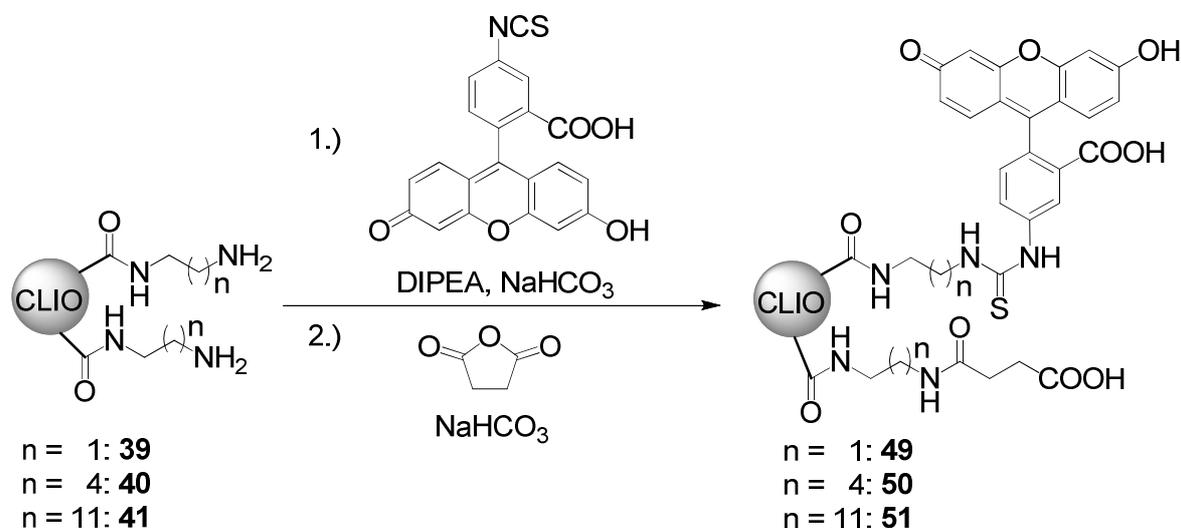
Aus den Elementaranalysen ließ sich eine Anzahl von 60-110 Molekülen pro Eisenoxidkern berechnen, wobei der Stickstoffgehalt aufgrund von Hüllverlusten

wenig aussagekräftig war und nicht zur Auswertung herangezogen werden konnte (Tabelle 4.39). Diese FITC/Kern-Verhältnisse konnten jedoch nur als ungefähre Richtwert dienen, da die Ergebnisse auf dem geringen Schwefelwert der Elementaranalyse basierten. Als Beispiel soll hier die Zunahme der Anzahl an FITC-Molekülen pro Kern bei der Umsetzung von **47d** zu **48b** dienen.

	Elementaranalyse in Massenprozent	FITC pro Kern
47a	10.50 (C), 1.49 (H), 1.10 (N), 0.20 (S)	80
47b	10.95 (C), 2.02 (H), 0.80 (N), 0.25 (S)	100
47c	7.76 (C), 1.71 (H), 0.69 (N), 0.17 (S)	70
47d	12.78 (C), 2.30 (H), 1.29 (N), 0.13 (S)	60
48a	8.76 (C), 1.89 (H), 0.74 (N), 0.27 (S)	110
48b	13.58 (C), 2.37 (H), 1.24 (N), 0.20 (S)	90

Tabelle 4.39: Die Elementaranalysen von **47a-d** deuteten anhand des Schwefelwertes auf eine erfolgreiche Synthese hin. Auch bei der weiteren Umsetzung wiesen **48a-b** das Vorhandensein von Fluoreszenzmolekülen auf.

Um den Effekt eines größeren Abstandes zwischen Eisenoxidkern und Farbstoff auf die Fluoreszenz zu untersuchen, wurden auf dieselbe Weise CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) modifiziert. Nach der Anbindung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wurden auch diese oftmals zur nochmaligen Aufreinigung mit Bernstein-säureanhydrid zu **49-51** umgesetzt (Gleichung 4.26).



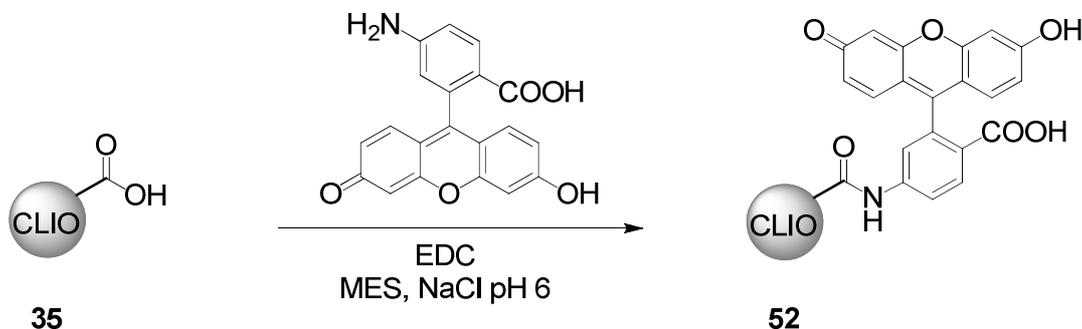
Gleichung 4.26: Die Anbindung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und eine weitere Umsetzung der markierten Kolloide gelang auch bei CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂-T20 (**39-41**).

Anhand der Schwefelwerte der Elementaranalysen konnte eine Markierung von 65-80 Fluoreszenzmolekülen pro Eisenoxidkern errechnet werden (Tabelle 4.40).

CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n - NH-FITC-COOH	Elementaranalyse in Massenprozent	FITC pro Kern
49	11.42 (C), 2.08 (H), 1.10 (N), 0.15 (S)	65
50	12.89 (C), 2.28 (H), 1.16 (N), 0.17 (S)	80
51	12.16 (C), 2.18 (H), 1.08 (N), 0.15 (S)	65

Tabelle 4.40: Die Elementaranalysen zeigten eine Markierung der Diamino-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂, **39-41**) mit 65-80 Fluoresceinmolekülen pro Kern.

Alternativ zu dem aminoreaktiven Fluoresceinisothiocyanat wurde 6-Aminofluorescein über eine Amidbindung an die Carboxyoberfläche von Carboxy-CLIO (**35**, CLIO-COOH) gebunden (Gleichung 4.27). Eine Kontrolle der Umsetzung per Elementaranalyse war hierbei nicht möglich, da keine oder nur eine geringe Zunahme des Stickstoffwertes bei **52a** und **52b** beobachtet werden konnte.



Gleichung 4.27: Die Fluoreszenzmarkierung von CLIO-COOH (**35**) wurde durch die Anbindung von 6-Aminofluorescein bewerkstelligt.

Die Präsenz von Farbstoff wurde zwar in schwefelsaurer Lösung nachgewiesen, jedoch konnten keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Eine UV-Messung von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-FITC (**53**), die durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren aufgereinigt worden waren, zeigte eine starke Absorption des Eisenoxids selbst, sowie eine Bande des Farbstoffs bei 490 nm, die sich durch die Interpolation der Eisenabsorption in diesem Bereich herausarbeiten ließ (Abbildung 4.1 oben). Hieraus ergab sich ein Verhältnis von 70 Farbstoffmolekülen pro Eisenkern. Somit war die gemessene Absorption bei 490 nm nicht nur vom

Fluorophor, sondern auch von der Konzentration der Partikel in der Messlösung abhängig. Da es sich als sehr schwierig gestaltete, die Partikelbande durch eine Hintergrundmessung von unmarkierten Eisenoxid-Nanopartikeln zu maskieren, musste eine allgemeingültige UV-spektroskopische Methode entwickelt werden.

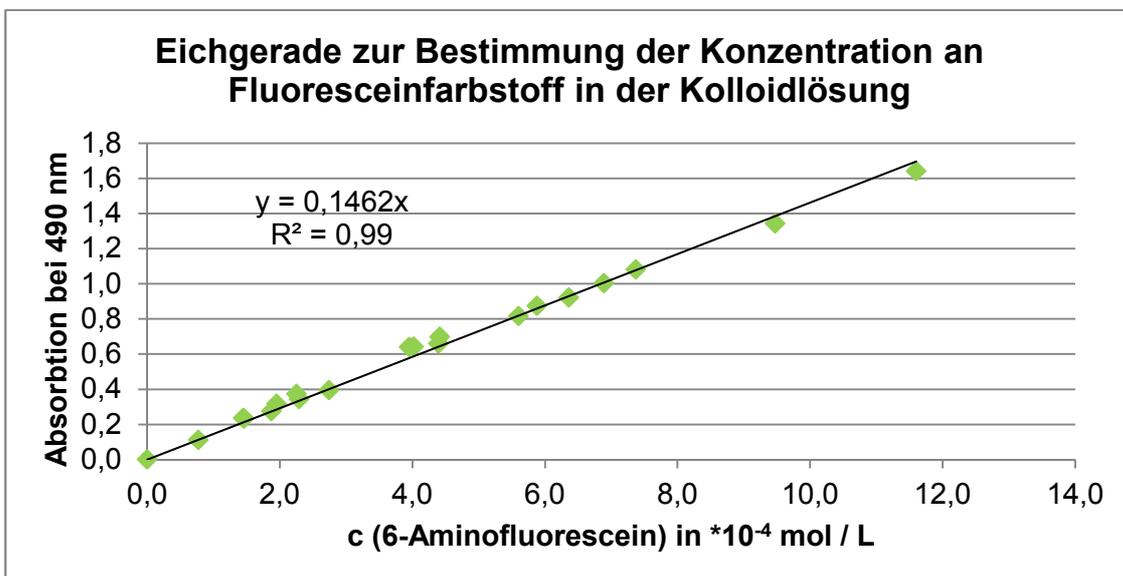
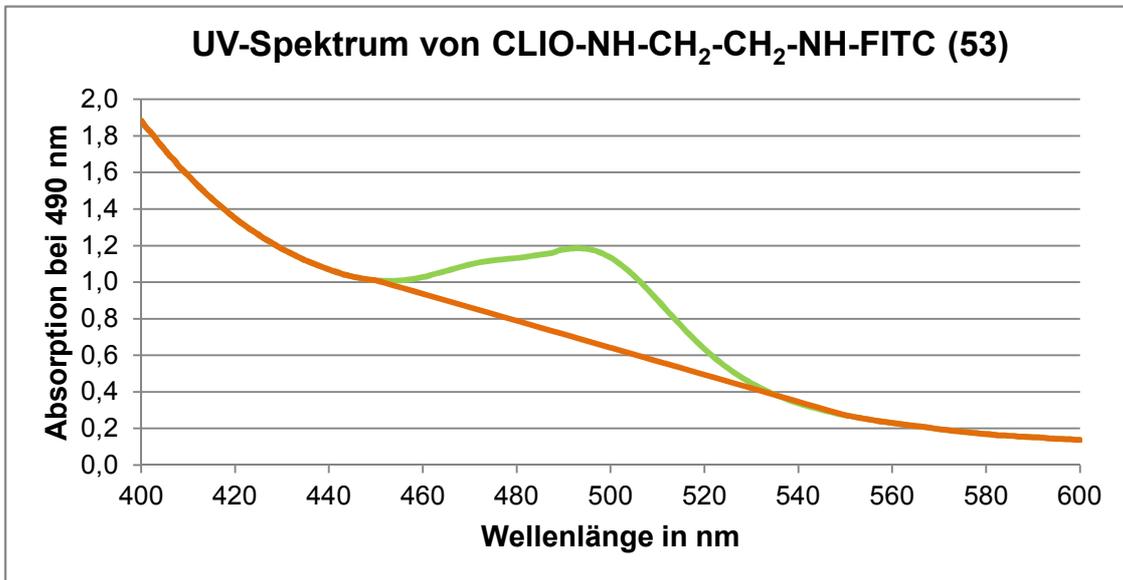


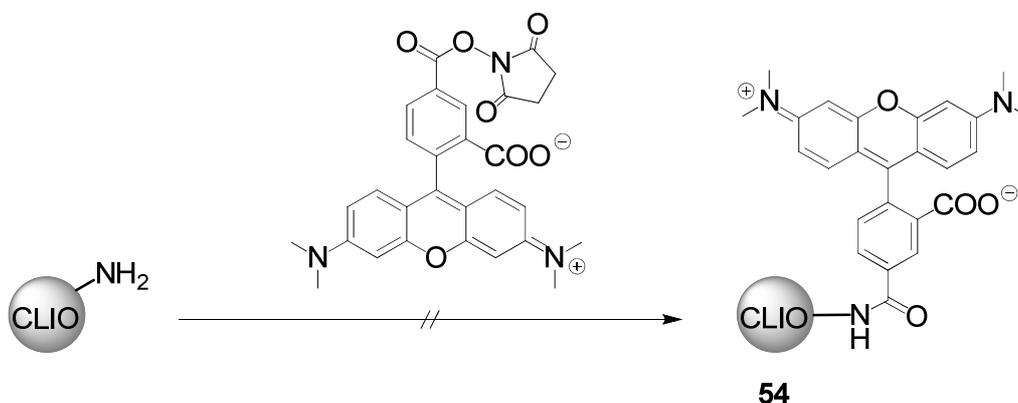
Abbildung 4.1 oben: Das UV-Spektrum von (53) weist einen Hintergrund auf, der durch die Eisenoxid-Nanopartikel verursacht wird und der im Bereich von 450-550 nm interpoliert wurde (braun). Der tatsächlicher Verlauf des Spektrums zeigt das Absorptionsmaxima von FITC bei 490 nm (grün);
unten: Die Eichgerade zur Bestimmung der Fluoresceinkonzentration einer Kolloidlösung wurde mit 6-Aminofluorescein bei 490 nm gemessen.

Bei dieser wurde nach dem Aufschluss der Partikel mit Schwefelsäure das Eisen mit Weinsäure maskiert und die Konzentration an Fluoresceinmolekülen anhand der Absorption bei 490 nm mittels einer Eichgeraden bestimmt (Abbildung 4.1 unten). Für CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-FITC (**53**), deren UV-Spektrum in Abbildung 4.1 oben dargestellt ist, ergeben sich korrespondierende Werte aus der UV-Messung (70), dem Ausschlussverfahren (80) und der Elementaranalyse (110). Anhand dieser Geradengleichung und der Bestimmung der Eisenkonzentration konnte allgemein die Menge an Fluorescein pro Eisenoxidkern erfasst werden (Tabelle 4.41). Die daraus resultierenden Werte sind etwas niedriger als die aus der Elementaranalyse berechneten, besitzen jedoch meist dieselbe Größenordnung.

Fluorescein-markierter Kolloid	Fluorescein pro Kern (UV-spektroskopisch)	Fluorescein pro Kern (Elementaranalyse)
48a	15	110
49	45	65
50	50	80
51	50	65
52c	50	-

Tabelle 4.41: Bei einem Vergleich zu den durch die Elementaranalyse erhaltenen Werten zeigten sich für die UV-spektroskopische Methode zumeist ähnliche, wenn auch etwas niedrigere Werte.

Die Umsetzung von CLIO-NH₂-T5 mit 5-(und-6)-Carboxytetramethylrhodamin-NHS-ester [5(6)-TAMRA-SE] führte unter verschiedenen Versuchsbedingungen nicht zum gewünschten Erfolg (Gleichung 4.28 und Tabelle 4.42).^[86,121]



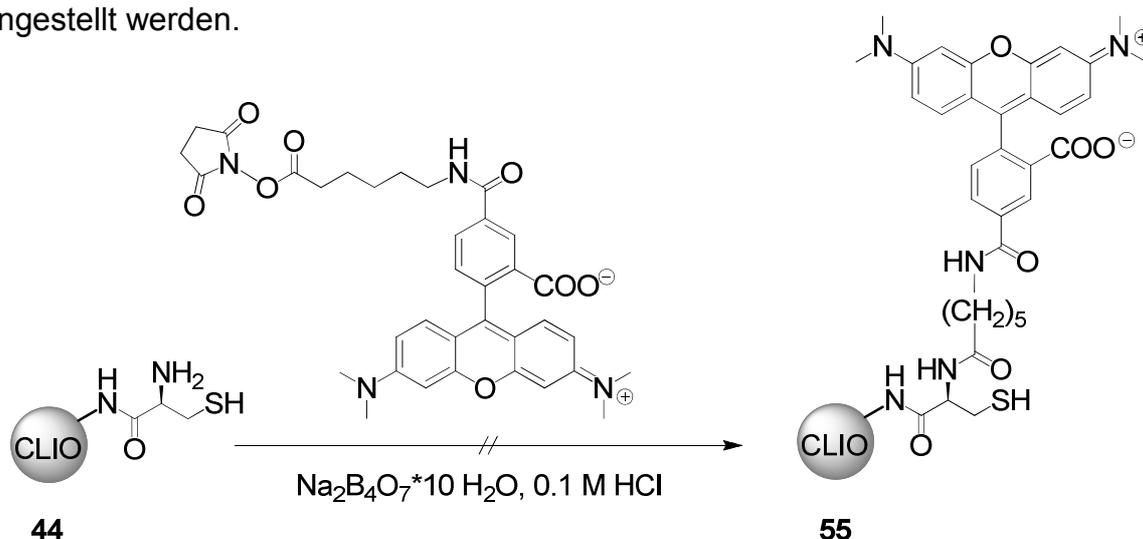
Gleichung 4.28: Die Anbindung von TAMRA-SE an CLIO-NH₂-T5 konnte in verschiedenen Puffersystemen nicht bewerkstelligt werden.

Die nach der Behandlung mit DMSO und EtOH erhaltenen Partikel zeigten entweder wie bei **54a-c** keine charakteristische Rosafärbung in schwefelsaurer Lösung oder ließen beim Zentrifugieren (**54d**) eine Rosafärbung der überstehenden Lösung erkennen. Dies legte die Vermutung nahe, dass bei **54d** die Abtrennung von lose gebundenem bzw. freiem Fluorophor nicht vollständig und die Reaktion nicht erfolgreich war.

Puffersystem	CLIO-NH-COO-TAMRA (54)
Natriumhydrogencarbonat	54a
Natriumtetraborat / HCl	54b,d
Natriumtetraborat / HCl mit DIPEA	54c

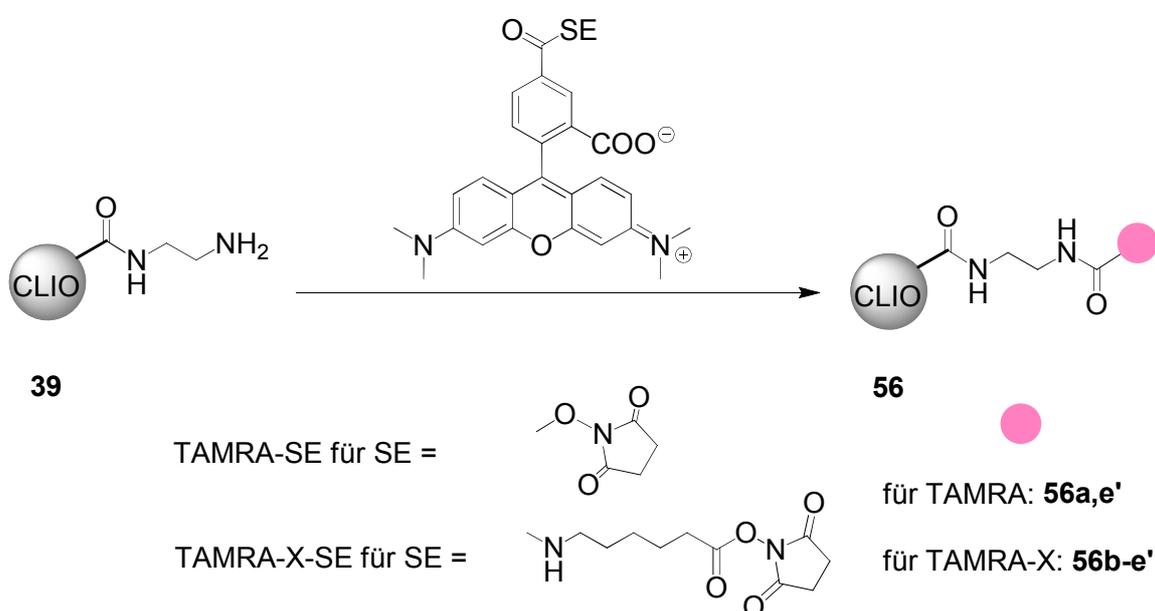
Tabelle 4.42: Die Synthese von TAMRA-markierten CLIO-NH₂-T5 (**54**) wurde mit den Puffern Natrium-hydrogencarbonat (pH 9) und Natriumtetraborat / Salzsäure (pH 8.3) durchgeführt.

Durch die Verwendung von CLIO-NH-Cys (**44**) und 6-Tetramethylrhodamin-5-(und-6)-Carboxyamidohexansäure-NHS-ester [5(6)-TAMRA-X-SE] sollte ein Spacer zwischen Eisenoxidkern und Fluoreszenzmolekül eingebracht werden (Gleichung 4.29). Jedoch konnte auch an **55** kein Farbstoff detektiert werden. Aufgrund der Thiolgruppe fielen bei der Reaktion die Partikel in der auf pH 8.3 gepufferten Lösung aus und wurden durch den Zusatz von TCEP resuspendiert. Allerdings musste wegen des sauren Charakters des Phosphins der pH-Wert mit einer Base nochmals eingestellt werden.



Gleichung 4.29: Auch 5(6)-TAMRA-X-SE konnte nicht erfolgreich mit CLIO-NH-Cys (**44**) umgesetzt werden.

Auch die Umsetzung von TAMRA-SE und TAMRA-X-SE mit dem längerkettigen CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) nach Gleichung 4.30 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen blieb bei **56a-d** zunächst erfolglos (Tabelle 4.43). Erst der Einsatz eines Kolloids (**39c**) mit einem sehr hohen Stickstoffgehalt führte bei **56e'** zu einer festen Bindung des Rhodaminfarbstoffs an den Partikel, die auch bei einer weiteren Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid zu **56e** bestehen blieb. Mit Hilfe des literaturbekannten Extinktionskoeffizienten^[121] konnte aus den durchgeführten UV-spektroskopischen Aufschlussverfahren eine sehr niedrige Anbindung von etwa 10 TAMRA-Molekülen pro Eisenoxidkern berechnet werden.

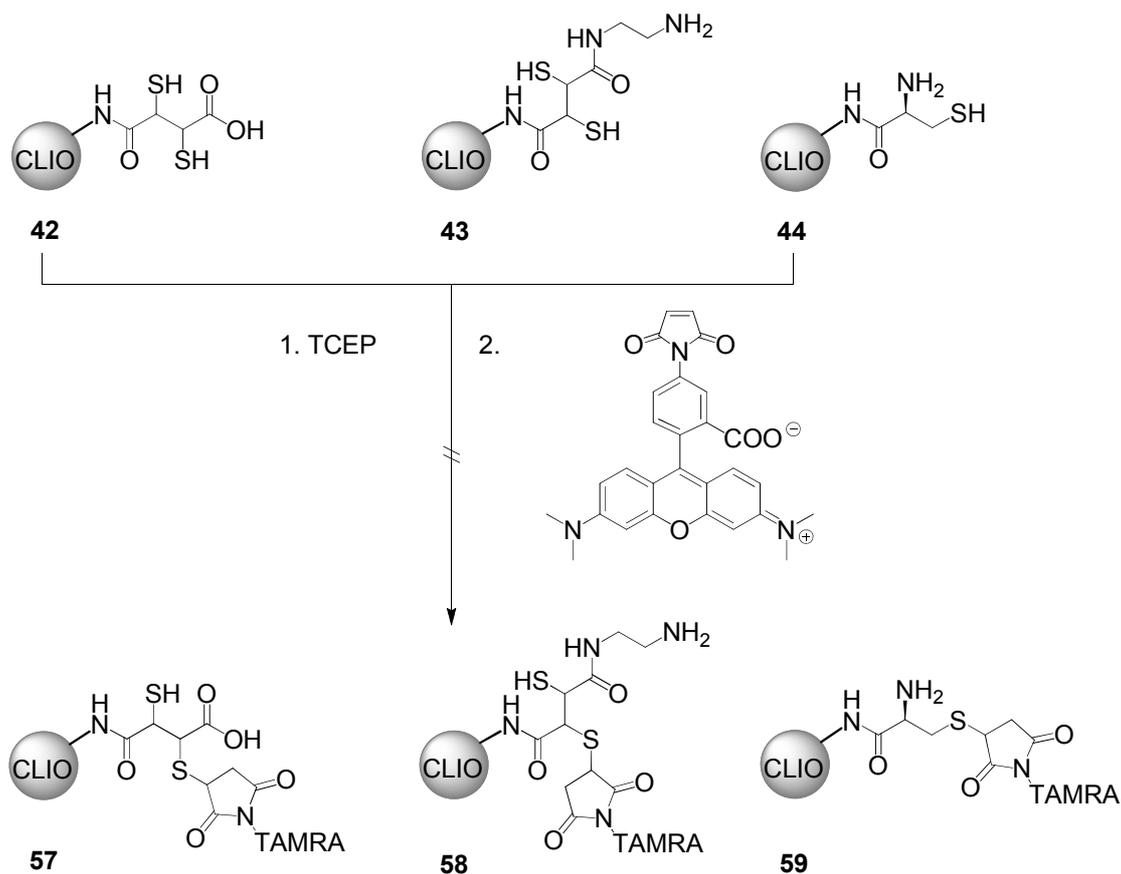


Gleichung 4.30: Die Umsetzung von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) mit TAMRA-SE und TAMRA-X-SE gelang nur durch den Einsatz von **39c**, das einen hohen Stickstoffgehalt aufwies.

CLIO-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH- TAMRA / TAMRA-X	Puffersystem	Farbstoff
56a	Na ₂ B ₄ O ₇ und HCl	TAMRA-SE
56b	Na ₂ B ₄ O ₇ und HCl	TAMRA-X-SE
56c	NaHCO ₃	TAMRA-X-SE
56d	NaHCO ₃ mit DIPEA	TAMRA-X-SE
56e'	NaHCO ₃ mit DIPEA	TAMRA-SE / TAMRA-X-SE

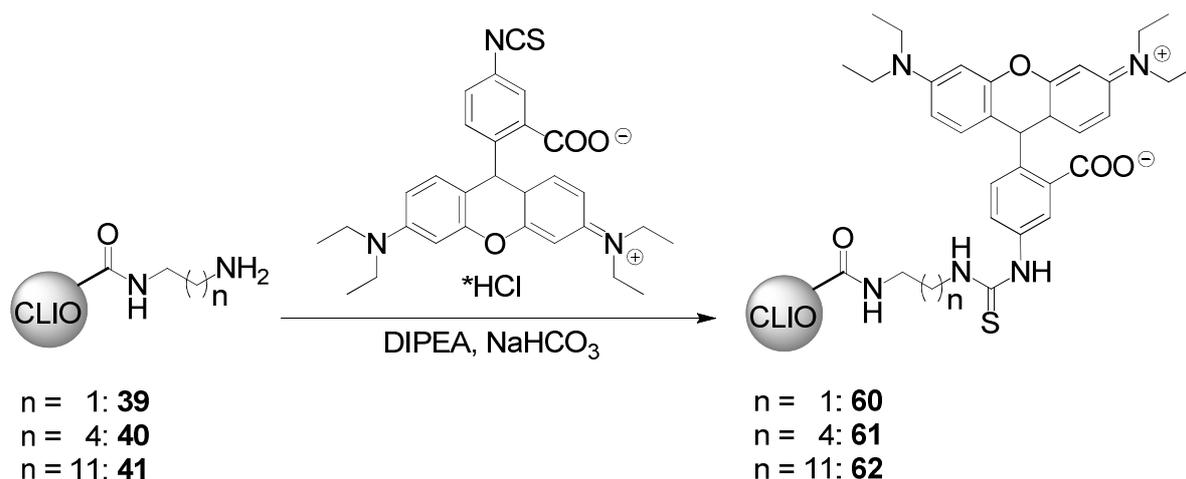
Tabelle 4.43: Die Anbindung von TAMRA-SE und TAMRA-X-SE an CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) wurde in verschiedenen Puffern durchgeführt. Nur bei **56e'** konnte aufgrund des hohen Stickstoffgehalts des Edukts (**39**) eine Umsetzung beobachtet werden.

Neben den NHS-Esterderivaten des Rhodamins wurde auch das thiolreaktive 5(6)-Tetramethylrhodamin-Maleimid (TAMRA-Maleimid) mit CLIO-DMSA (**42**), CLIO-DMSA-NH-(CH₂)₂-NH₂ (**43**) und CLIO-NH-Cys (**44**) umgesetzt (Gleichung 4.31).^[122] Hierbei mussten die Disulfidbrücken der aus der Lösung ausgefallenen Partikel zuvor mit TCEP reduziert und somit die Kolloide resuspendiert werden. Jedoch scheiterte dieser im Arbeitskreis^[114] ansonsten glatt verlaufende Anbindungsversuch ebenso.



Gleichung 4.31: Die Markierung der verschiedenen Kolloide CLIO-DMSA (**42**), CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**43**) und CLIO-NH-Cys (**44**), die Thiolgruppen an der Oberfläche besitzen, mit TAMRA-Maleimid blieb erfolglos.

Da die routinemäßige Markierung von Rhodaminfarbstoffen mit diesen Reaktionen nicht bewerkstelligt werden konnte, wurde mit Rhodamin B-Isothiocyanat auf das bewährte System von Isothiocyanat- und Aminofunktion unter Ausbildung einer Thioharnstoffgruppe zurückgegriffen (Gleichung 4.32). Anhand einer Eichgeraden, die analog zu der Gleichung für die Fluoresceinbestimmung erstellt wurde, konnte ein Verhältnis von 80 (**60**), 15 (**61**) und 20 (**62**) Rhodamin B-Molekülen pro Kern an der Partikeloberfläche von **60-62** ermittelt werden (Abbildung 4.2). Ausschlaggebend für die geringere Besetzung von **61** und **62** war der niedrige Stickstoffgehalt der Edukte.



Gleichung 4.32: Die Anbindung von Rhodamin B-Isouthiocyanat an die Diamino-CLIO (39-41) wurde analog zu der Umsetzung mit FITC durchgeführt.

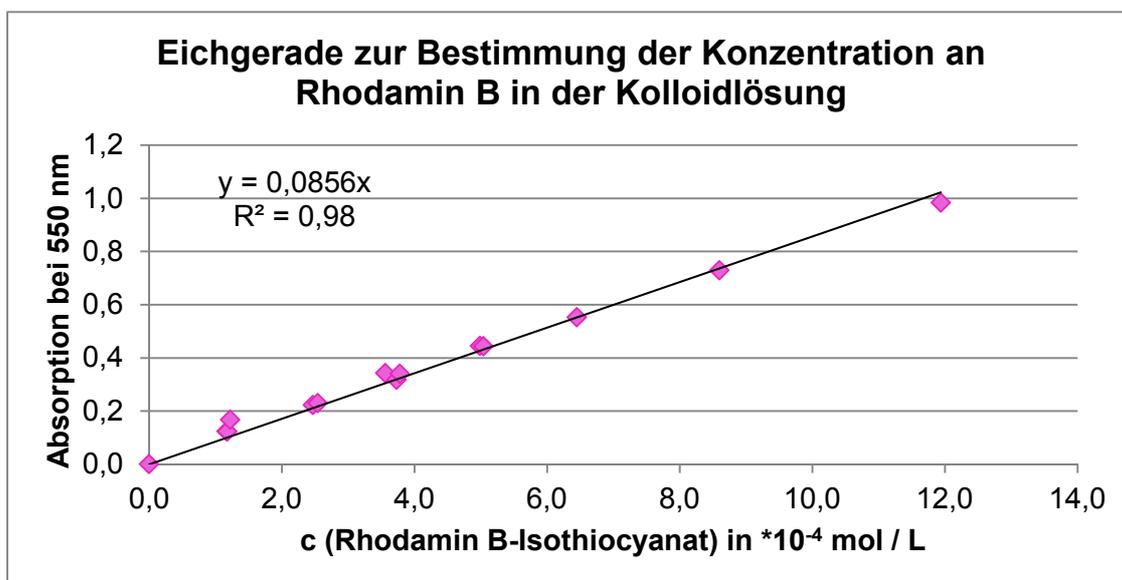
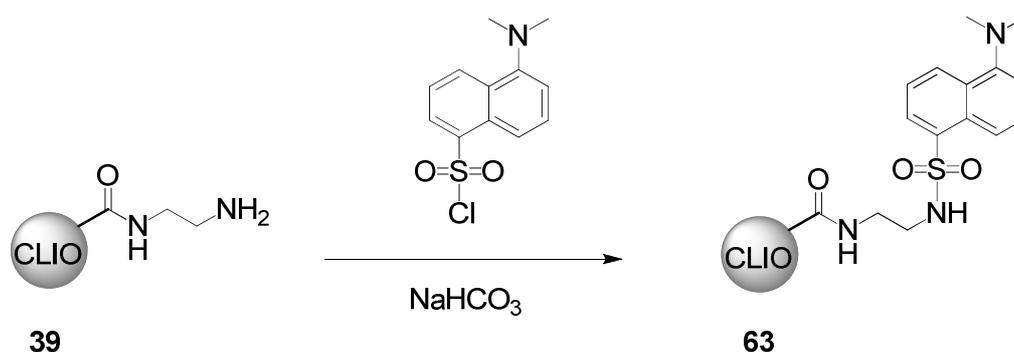


Abbildung 4.2: Die Konzentration von Rhodamin B an den Kolloiden konnte nach der Gleichung bestimmt werden, die sich aus der gemessenen Eichgeraden ergab.

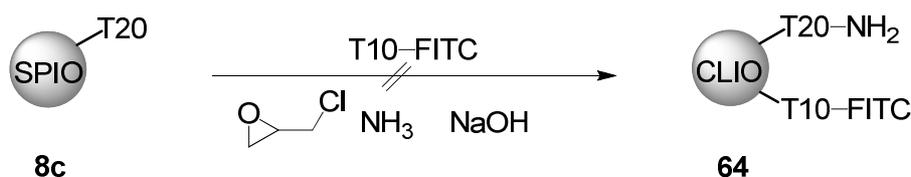
Ein Vorteil für Fluorescein gegenüber Rhodamin B ergab sich aus dem höherem Extinktionskoeffizienten (FITC: $\epsilon = 85000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Rhodamin B-Isouthiocyanat: $\epsilon = 50000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Diese wurden anhand der Geradensteigung ermittelt und sind niedriger als die literaturbekannten Koeffizienten von Fluorescein ($\epsilon = 93000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[123] und Rhodamin B ($\epsilon = 130000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), die jedoch in organischen Lösemitteln vermessen wurden und im Falle des letzteren eine starke Lösemittelabhängigkeit aufweisen.^[124]

Neben FITC- und TAMRA-Molekülen, die üblicherweise zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in der Biomedizin verwendet werden, wurde 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid (Dansylchlorid) mit CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) zu Dansyldiaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Dansyl, **63**) umgesetzt (Gleichung 4.33). Anhand des Schwefelwertes der Elementaranalyse von **63** konnte bei der Reaktion eine Anbindung von 180 Dansylmolekülen pro Eisenoxidkern nachgewiesen werden.



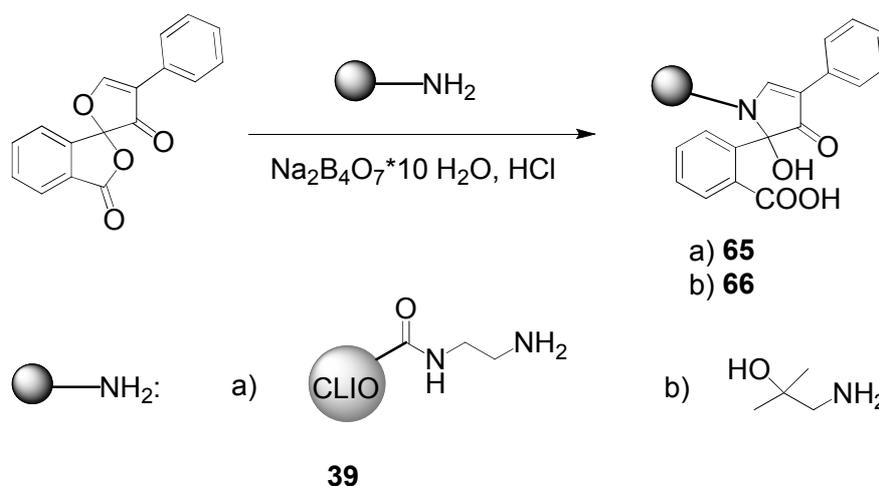
Gleichung 4.33: Die Fluoreszenzmarkierung von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) wurde auch mit Dansylchlorid durchgeführt.

Anstatt die Oberfläche mit Fluoreszenzmolekülen zu versehen, wurde auch versucht, fluoresceinmarkiertes Dextran T10 (T10-FITC) direkt an den Eisenoxidkern zu binden. Da bei der SPIO-Synthese der Großteil des eingesetzten Hüllmaterials abgetrennt wurde (vgl. Kapitel 4.1, Seite 31), sollte T10-FITC bei der CLIO-NH₂-Synthese von **64** eingebunden werden (Gleichung 4.34). **64** zeigte jedoch nach der Aufarbeitung keine Fluoreszenz, obwohl die Menge des eingesetzten T10-FITC mit 7 mg etwa 25 Massen-% des am SPIO eingesetzten Dextran T20 (30 mg) betrug. Dies stellte ein Indiz dafür dar, dass sich während der SPIO-Darstellung eine Wechselwirkung zwischen dem Eisenoxidkern und den unmodifizierten Dextranmolekülen ausbildete, durch die diese Moleküle bevorzugt bei der CLIO-NH₂-Synthese fest an den Kern gebunden wurden.



Gleichung 4.34: Nach **AAV 6** wurden SPIO-T20 im Beisein von T10-FITC zu CLIO-NH₂ (**64**) umgesetzt.

Interessant für die bessere Charakterisierung von Kolloiden, die Aminogruppen an der Oberfläche trugen, war die Umsetzung mit Fluorescamin. Aus diesem nicht fluoreszierenden Reagenz entsteht durch die spezifische Reaktion mit primären Aminen ein starkes Fluorophor, wodurch man theoretisch mittels einer Eichgeraden die Menge an primären Amineinheiten pro Partikel im nanomolaren Bereich bestimmen kann.^[125,126] Nach Gleichung 4.34 geschah die Umsetzung von Fluorescamin mit CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) und 1-Amino-2-methylpropan-2-ol als Modellsubstanz.^[127]



Gleichung 4.34: Die Umsetzung von Fluorescamin wurde bei **65** mit CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) (a) und bei **66** mit 1-Amino-2-methylpropan-2-ol (b) durchgeführt.

Die Messung der Fluoreszenz von reinem Fluorescamin, CLIO-NH-CH₂-CH₂-N-Fluorescamin (**65**) und 1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-2,4-diphenyl-1H-pyrrol-3(2H)-on (**66**) mit einer Anregung bei 390 nm^[126,127] zeigte bei **66** die erwartete starke Fluoreszenz bei 480 nm, während bei dem Edukt Fluorescamin und **65** keine Bande beobachtet werden konnte (Abbildung 4.3). Da bei der Darstellung von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ allgemein ein hoher Überschuss an Diamin verwendet wurde, sollte die Verlinkung von CLIO-COOH (**34-36**) durch eine zweimalige Reaktion mit dem Diamin ausgeschlossen worden sein. Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die Synthese des Fluorophors aus Fluorescamin und primären Amin gelang, jedoch diese Reaktion nicht bei aminierten Eisenoxid-Nanopartikeln anwendbar war.

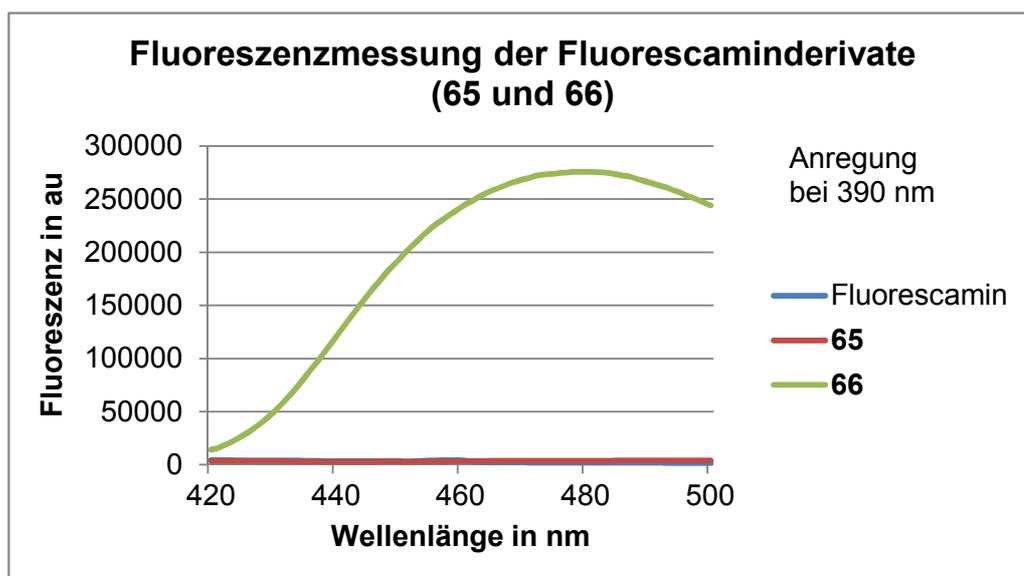


Abbildung 4.3: Bei der Anregung (390 nm) von 1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-2,4-diphenyl-1H-pyrrol-3(2H)-on (**66**, grün) zeigte sich eine starke Fluoreszenz bei 480 nm, die bei Fluorescamin (blau) und CLIO-NH-CH₂-CH₂-N-Fluorescamin (**65**, rot) ausblieb.

Um die Fluoreszenz der FITC- und RBITC-markierten Diamino-CLIO (**49-51** für FITC und **60-62** für RBITC) miteinander vergleichen zu können, wurden die Kolloidlösungen auf eine Farbstoffkonzentration von etwa $5 \cdot 10^{-6}$ M in einer alkalischen wässrigen Lösung (pH 10) verdünnt. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der Fluorophore pro Kern ergaben sich dadurch verschiedene Eisenkonzentrationen der Messlösungen (Tabelle 4.44).

CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n - NH-FITC-COOH/-RBITC	c (Fe) in 10 ⁻³ (mol / L)	c (FITC) in 10 ⁻⁶ (mol / L)	Farbstoff pro Kern
49	1.4	5.0	45
50	1.3	5.0	50
51	1.2	4.6	50
60	0.9	5.5	80
61	4.4	4.9	15
62	3.3	5.2	20

Tabelle 4.44: Zur Durchführung der Fluoreszenzmessung wurden die FITC- und Rhodamin B-markierten Eisenoxid-Nanopartikel CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH /-RBITC (**49-51** für FITC und **60-62** für RBITC) auf eine Eisenkonzentration von $0.9-4.4 \cdot 10^{-3}$ M und eine Farbstoffkonzentration von etwa $5.0 \cdot 10^{-6}$ M eingestellt.

Die Spaltbreite wurde bei den Experimenten so gewählt, dass eine maximale Fluoreszenz bei der Anregung ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$) von FITC-markierten Kolloiden (**49-51**) detektiert werden konnte. Bei **49-51** wurden sehr gute Ergebnisse erzielt, wobei **50** mit dem mittleren Diamin-Spacer die höchste Fluoreszenz erbrachte. Im Gegensatz hierzu konnte bei derselben Spaltbreite für RBITC-markierte Kolloide (**60-62**) bei $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ nur die Anregungsbande beobachtet werden. Durch die Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ wurde aber ebenso eine sehr geringe Fluoreszenz detektiert (Abbildung 4.4).

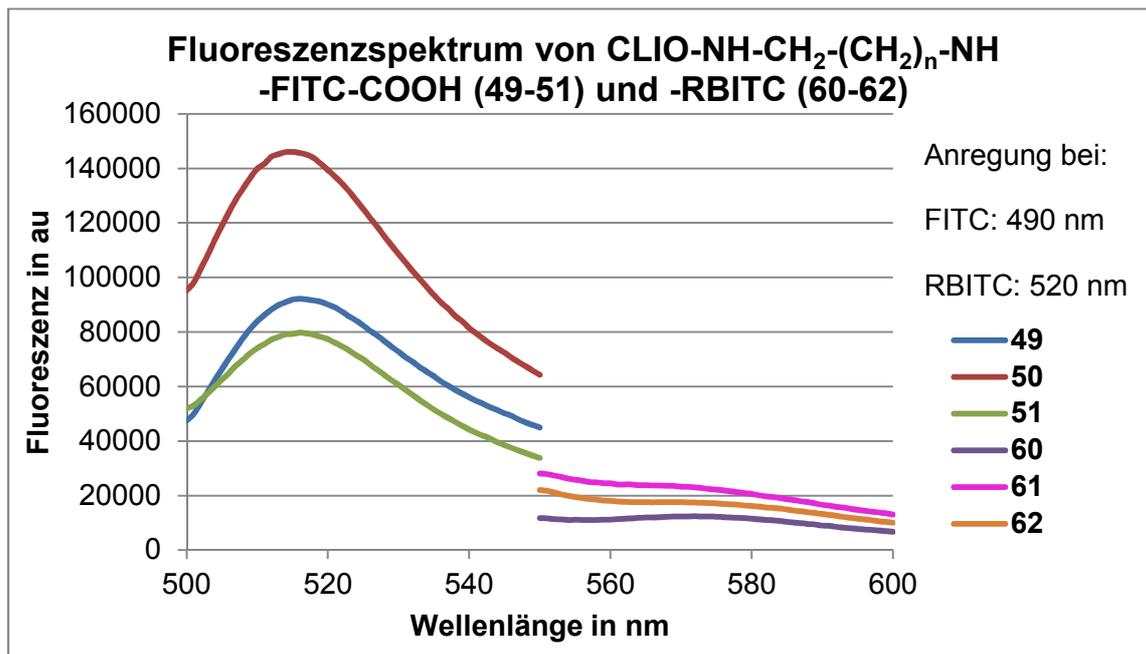


Abbildung 4.4: Die FITC-markierten Kolloide **49-51** zeigten starke Banden, wohingegen die RBITC-markierten Partikel **60-62** bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol / L}$ kaum fluoreszierten.

Dass CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH-FITC-COOH (**50**) aufgrund der Diaminkettenlänge bessere Fluoreszenzeigenschaften als **49** und **51** besitzen, konnte durch eine erneute Fluoreszenzmessung bei einer Spaltbreite von 1.5 nm mit einer zweiten Fraktion von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH (**49'O-51'O**), deren Darstellung nicht behandelt wurde, nicht bestätigt werden. Ebenso wurden Lösungen derselben Kolloide (**49'A-51'A**) vermessen, nachdem die Partikel nach **AAV 11** mit Weinsäure maskiert worden waren (Tabelle 4.45). Aufgrund der geringeren Spaltbreite wurde bei **49'O-51'O** eine weitaus geringe Fluoreszenz beobachtet, die jedoch bei **49'A-51'A** durch den Aufschluss der Partikel und die Maskierung des Eisens signifikant anstieg (Abbildung 4.5).

CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n - NH-FITC-COOH	c (Fe) in 10 ⁻³ (mol / L)	c (FITC) in 10 ⁻⁶ (mol / L)	Farbstoff pro Kern
49'O	1.8	5.0	40
49'A	1.7	4.9	
50'O	2.7	5.0	25
50'A	1.5	2.8	
51'O	1.4	4.9	45
51'A	1.6	5.3	

Tabelle 4.45: CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH (**49'O-51'O**) wurden zur Fluoreszenzmessung auf eine FITC-Konzentration von etwa $5.0 \cdot 10^{-6}$ M verdünnt. Bei **49'A-51'A** wurden die Konzentrationen durch die Volumina der bei **AAV 11** verwendeten Reagenzien festgelegt.

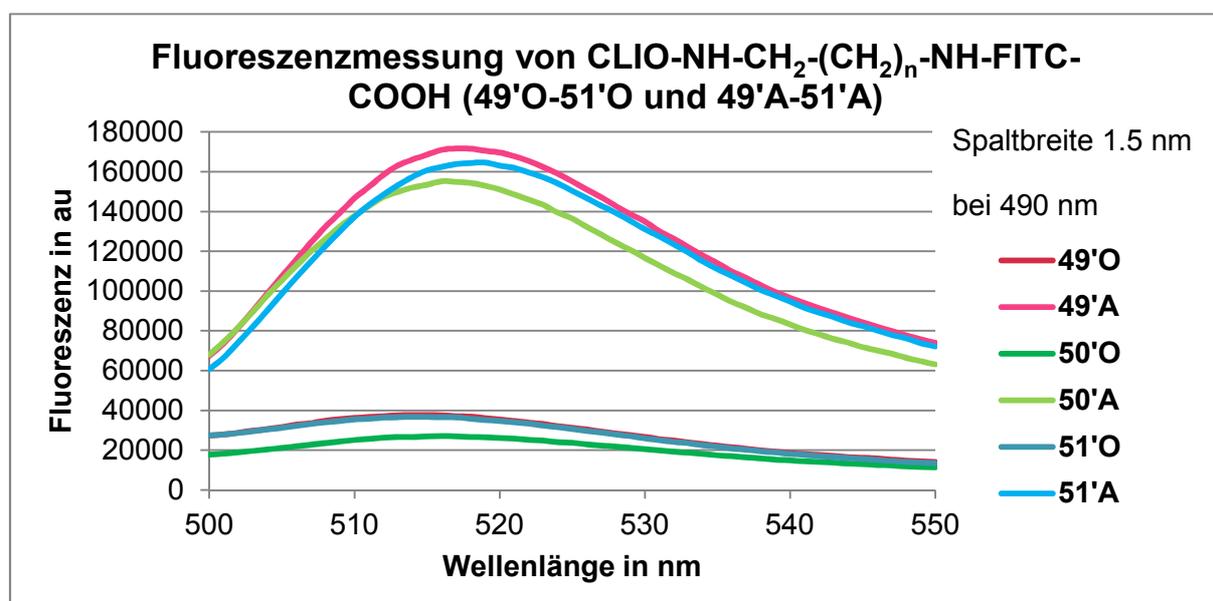


Abbildung 4.5: Bei der Fluoreszenzmessung von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede zwischen **49'O-51'O**. Der Aufschluss der Partikel bei **49'A-51'A** führte zu einer erheblichen Verstärkung der Fluoreszenz.

Eine nochmalige Fluoreszenzmessung bei einer Spaltbreite von 1.5 nm von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH (**49-51**), bei der die Messlösungen auf die Eisenkonzentration normiert worden waren, zeigte bei intakten Partikeln eine um etwa 90 % geringere Fluoreszenz im Vergleich zu den aufgeschlossenen Partikellösungen (Tabelle 4.46 und Abbildung 4.6). 6-Aminofluorecein-markierte Partikel (**52**) lieferten ähnliche Ergebnisse und wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n -NH-FITC-COOH	c (Fe) in 10 ⁻³ (mol / L)	c (FITC) in 10 ⁻⁶ (mol / L)	Fluoreszenz in % bei 520 nm
49O/A	2.2	7.7	7 %
50O/A	2.3	9.0	11 %
51O/A	2.3	9.1	9 %

Tabelle 4.46: Bei denselben Konzentrationen an Eisen und FITC zeigten **49O-51O** nur etwa 10 % der Fluoreszenz von **49A-51A**.

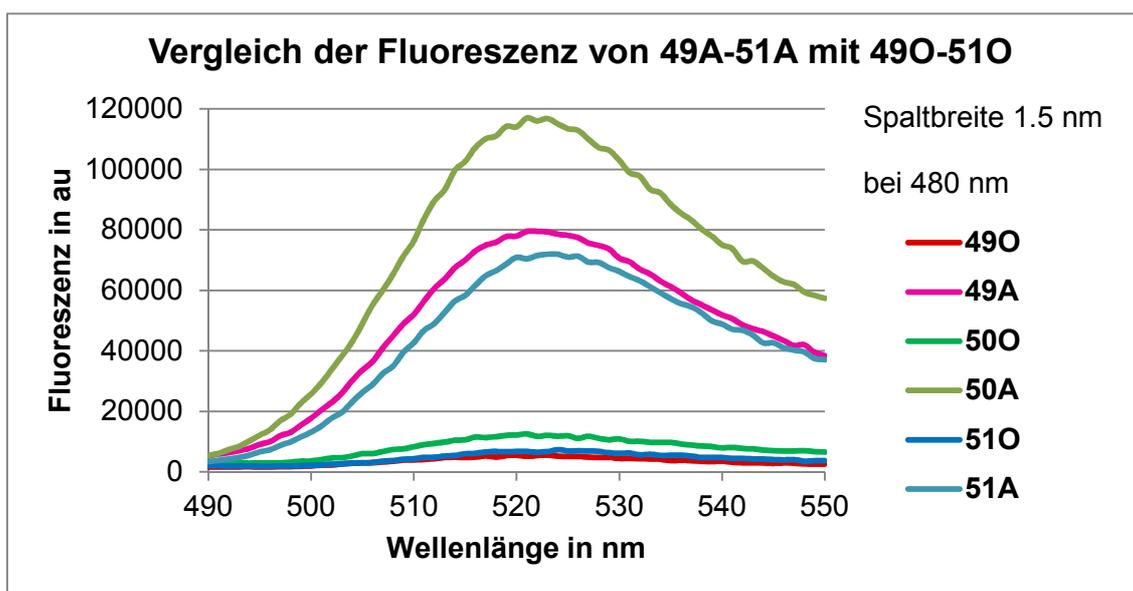


Abbildung 4.6: Im Vergleich zu den unveränderten Kolloidlösungen **49O-51O** wurde bei den aufgeschlossenen Partikeln von **49A-51A** eine immense Erhöhung der Fluoreszenz beobachtet.

Dies warf die Frage auf, ob die Eisenoxid-Nanopartikel an sich die Fluoreszenz verhindern, oder ob durch die Anbindung des Farbstoffs an die Partikeloberfläche Fluoreszenzlöschung auftritt. Deshalb wurde die Fluoreszenz einer konstanten Menge an ungebundenem FITC ($5 \cdot 10^{-6}$ M) in SPIO-T20-Suspensionen mit unterschiedlichen Eisenkonzentrationen vermessen. Die rückgängige Fluoreszenz bei zunehmendem Eisengehalt bestätigte die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Eisenmenge (Abbildung 4.7 oben). Da die Eisenoxid-Nanopartikel schon bei einer für Fluoreszenzmessungen üblichen Konzentration eine starke, aber zu längeren Wellenlängen abfallende Absorption in den UV-Spektren aufwiesen (Abbildung 4.7 unten) wurde angenommen, dass die bei 490 nm eingestrahlte Anregungsenergie teilweise durch die Kolloide absorbiert wird und somit die Fluoreszenzanregung geschwächt wird.

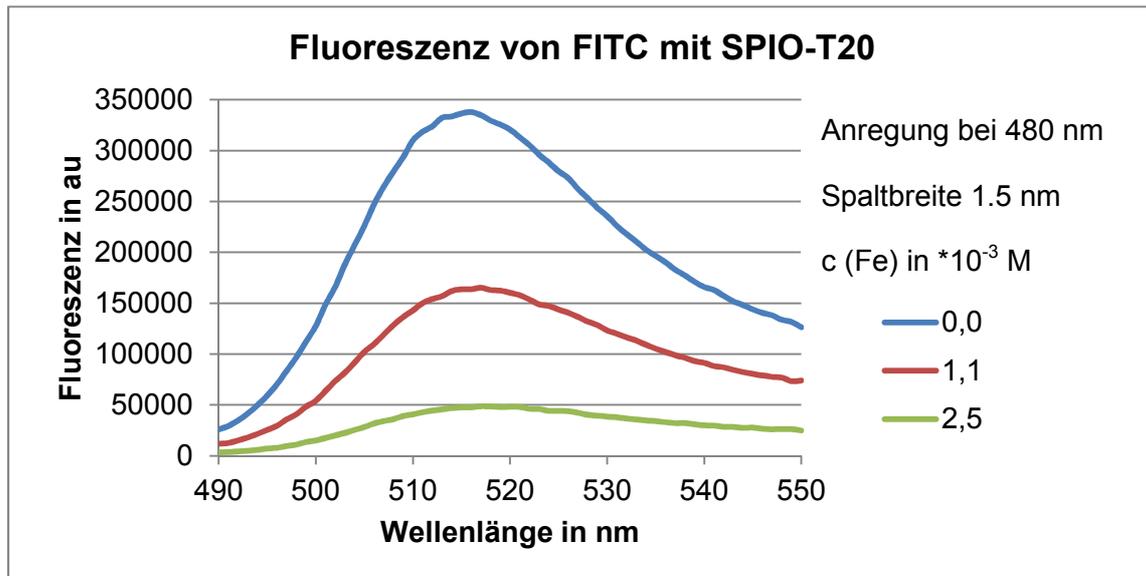


Abbildung 4.7 oben: Bei einer Anregung bei 480 nm zeigte die FITC-Lösung eine starke Abhängigkeit von der Menge an SPIO-T20. Bei einer $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Fe-Lösung ging die Fluoreszenz auf 15 % zurück. **Unten:** Das UV-Spektrum einer Suspension von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) (c von Fe = $2.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) zeigte bei 490 nm eine starke Absorption, die bei 550 nm nur noch etwa 50 % betrug.

Hieraus sollten sich eigentlich Vorteile für die Rhodaminfarbstoffe ergeben, da diese in einem Wellenlängenbereich von etwa 550 nm angeregt werden, bei der die Eisenabsorption im Vergleich zu dem Wert bei 490 nm um 50 % geringer war. Für Rhodamin B-markierte Partikel konnte jedoch wie bei Abbildung 4.4 gezeigt nur eine schwache Fluoreszenz beobachtet werden. Bei der Vermessung der TAMRA-markierten Kolloide CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA-COOH (**56e**) hingegen wurde eine starke Fluoreszenz beobachtet, obwohl nur 10 Moleküle TAMRA pro Kern vorhanden waren (Abbildung 4.8). Die intakten Partikel (**56eO**) zeigten mit einem

Abfall der Fluoreszenz um 60 % im Vergleich zu den aufgeschlossenen Partikeln (**56eA**) eine bei weitem bessere Fluoreszenz als Fluorescein-markierte Partikel.

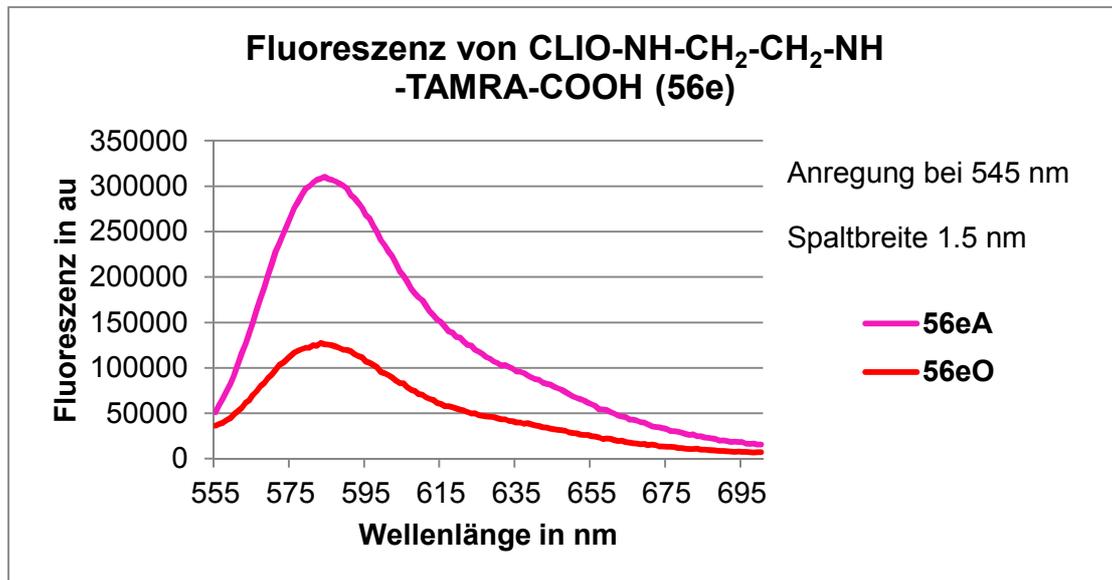


Abbildung 4.8: Die TAMRA-markierten Kolloide CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA-COOH (**56e**) besaßen sowohl im aufgeschlossenen (**56eA**) als auch im intakten Zustand (**56eO**) eine sehr starke Fluoreszenz. Im Vergleich zu **56eA** verminderte sich bei **56eO** die Fluoreszenz um 60 %.

Im Vergleich hierzu wurde bei CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Dansyl (**63**) mit einer Anregungswellenlänge von 330 nm keine Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 4.9). In diesem Wellenlängenbereich ist die Absorption der Eisenoxid-Nanopartikel so stark, dass fast gar keine Fluoreszenz bei 510 nm detektiert werden konnte.

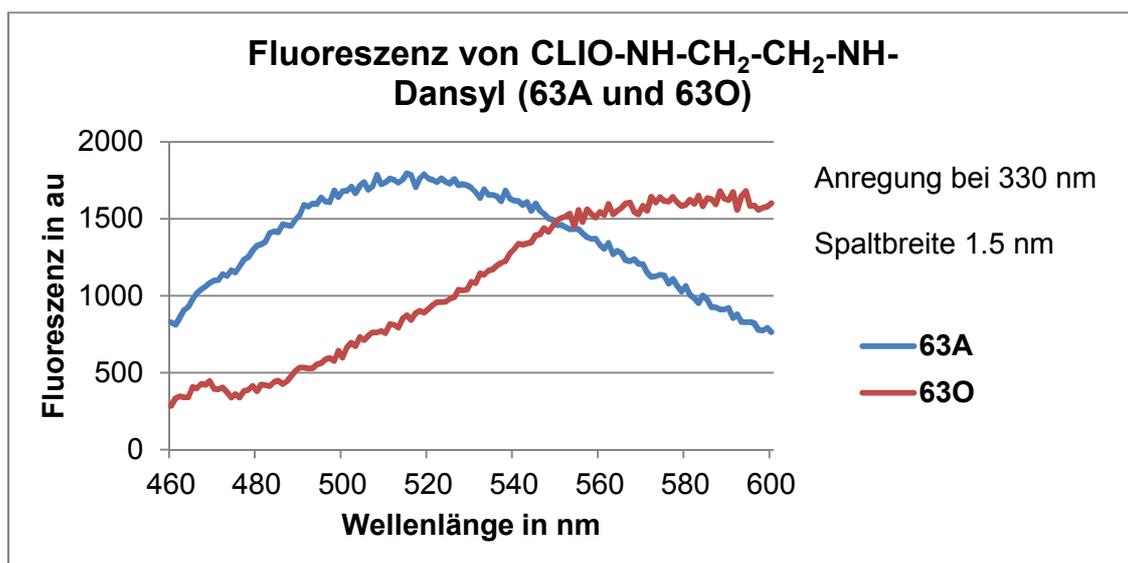


Abbildung 4.9: Bei der Messung von Dansyl-markierten CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Dansyl (**63**) konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden.

Um die Auswirkungen der Eisenoxid-Nanopartikel auf die Fluoreszenzfarbstoffe näher zu untersuchen, wurden die Fluoreszenzlebensdauern der FITC- und TAMRA-markierten Kolloide (**49** und **56e**) bestimmt. Als Verfahren wurde die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung angewandt. Nach Anregung der Fluoreszenzmoleküle mit monochromatischem Licht wird das Auftreten einzelner Photonen am Detektor zeitaufgelöst verfolgt und somit der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz auf der Zeitskala dargestellt. Aus dem erhaltenen Histogramm wurde mittels einer Regressionsanalyse die Fluoreszenzlebensdauer τ ermittelt (Abbildung 4.10).^[128]

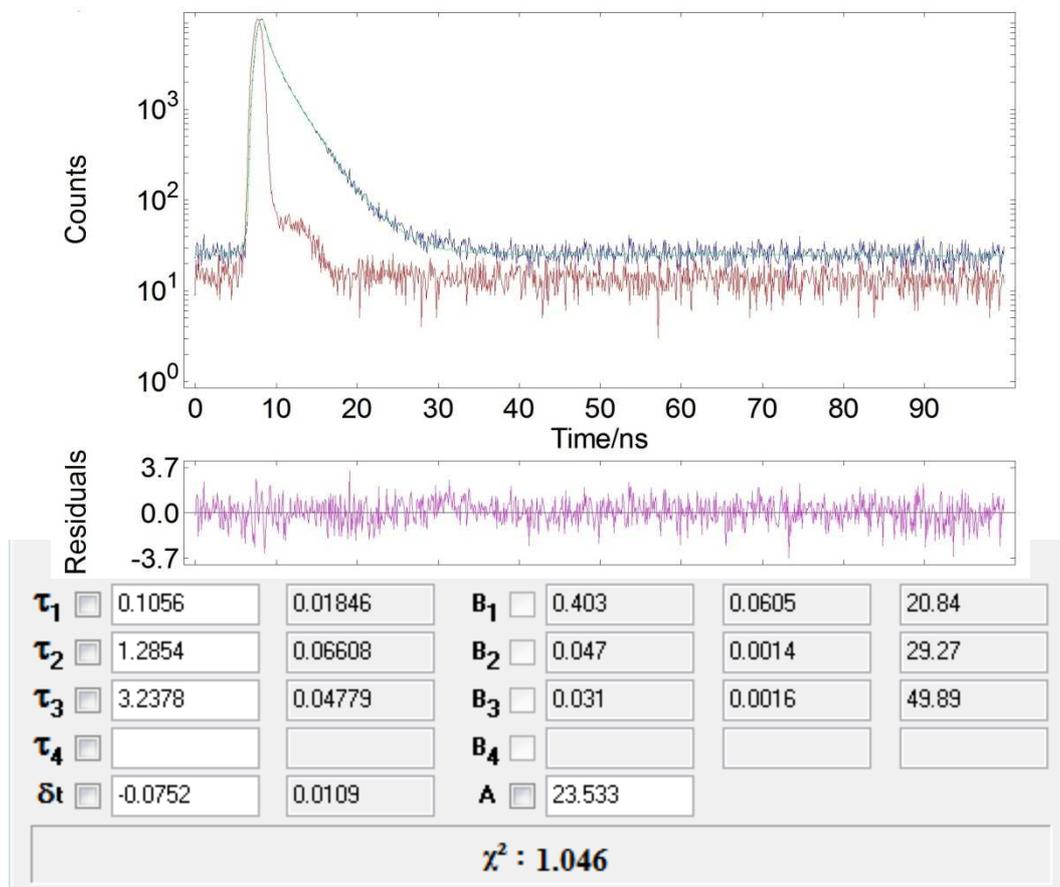


Abbildung 4.10: Durch die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung wurde, wie hier am Beispiel von **49** gezeigt, ein Histogramm erhalten, aus dem durch eine Regressionsanalyse die Fluoreszenzlebensdauern τ_n mit der entsprechenden Prozentgewichtung erhalten wurden.

Während die Ergebnisse von FITC-markierten Partikeln (**49**) mit den Werten der aufgeschlossenen Kolloide, von freiem FITC und der Literatur^[123] verglichen wurden, konnten die Messergebnisse von TAMRA-markierten CLIO (**56e**) aus Materialmangel nur mit der Literatur^[129] verglichen werden (Tabelle 4.47).

τ in ns mit %	τ_1	τ_2	τ_3	χ^2
49O	0.11 / 20.8	1.28 / 29.3	3.24 / 49.9	1.046
49A	0.53 / 33.8	2.23 / 42.1	4.21 / 24.1	1.563
FITC	0.12 / 48.1	1.30 / 35.8	3.47 / 16.1	1.070
Lit. ^[123] (FITC)	4.12 / 100	-	-	-
56eO	1.13 / 16.8	2.63 / 83.2	-	1.190
Lit. ^[128] (TAMRA)	2.09 / 100	-	-	-

Tabelle 4.47: Die Messung ergab für die FITC-Derivate (**49O**, **49A** und FITC) drei verschiedene Fluoreszenzlebensdauern, während bei CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA-COOH (**56e**) zwei beobachtet werden konnten.

Die für FITC und **49O** gemessenen Lebensdauern stimmten überein, allerdings verschoben sich die prozentualen Gewichtungen zwischen τ_1 und τ_3 . Während **49A** ähnliche Werte aufzeigte, wurde in der Literatur für das Dianion in Natronlauge nur eine Lebensdauer aufgeführt, die mit 4.12 ns nahe an τ_3 von **49A** lag. Die literaturbekannte Fluoreszenzlebensdauer von TAMRA lag mit 2.09 ns unter Berücksichtigung des Prozentsatzes nahe am Mittelwert der gemessenen Lebensdauern. Da keine Veränderung der Werte festgestellt werden konnte, wurde von keiner negativen Beeinflussung der Fluoreszenzlebensdauern durch die Anbindung der Fluoreszenzmoleküle an die Eisenoxid-Nanopartikel ausgegangen.

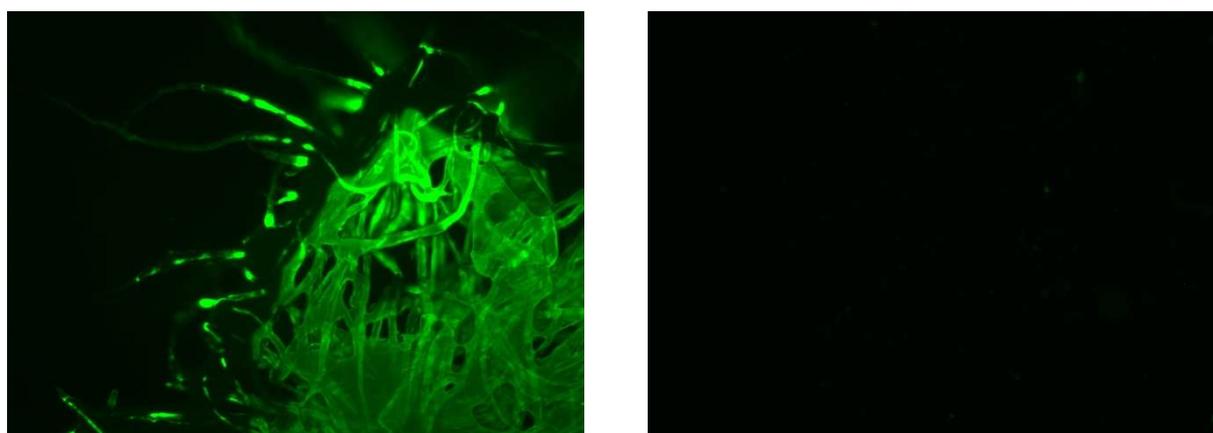
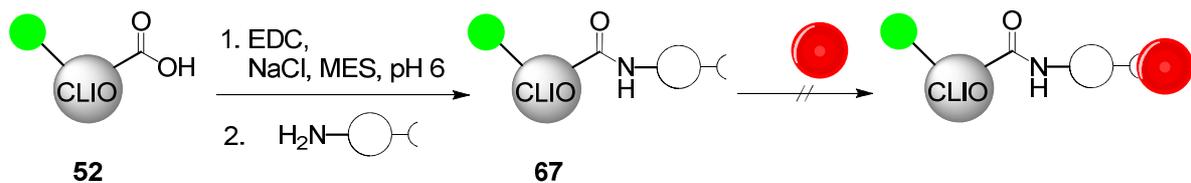


Abbildung 4.11: 6-Aminofluorescein-markierte CLIO-COOH (**52**) zeigte unter dem Fluoreszenzmikroskop eine starke, grünliche Fluoreszenz des Trägermaterials (links). Die Kontrolle mit SPIO-T20 wies keine Fluoreszenz auf (rechts).

Im Gegensatz zur Fluoreszenzmessung in wässriger Lösung konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop 6-Aminofluorescein-markierte CLIO-COOH (**52**) nachgewiesen werden. Als Trägermaterial wurde Papier benutzt, das mit einigen Tropfen einer Kolloid-Lösung getränkt wurde. Während bei der Verwendung von SPIO-T20 keine Fluoreszenz detektiert werden konnte, wurde beim Einsatz von **52** eine starke grünliche, auch nach dem Auswaschen aller niedermolekularen Bestandteile bestehen bleibende Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 4.11).

4.5. Umsetzung von Kolloiden mit bioaktiven Molekülen

Die dargestellten Eisenoxid-Nanopartikel sollten für ihren Einsatz in der MR-Angiographie an Thrombozyten gebunden werden. Dies sollte durch das Anbringen von blutplättchenspezifischen Antikörperfragmenten an der Oberfläche von 6-Amino-Fluorescein-markierten Carboxy-CLIO (**52**) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Nieswandt geschehen (Gleichung 4.35).



Gleichung 4.35: Nach bekanntem Schema erfolgte die Anbindung der Peptide über den N-Terminus an Fluorescein-markierte und carboxylierte CLIO (**52**). Diese bioaktivierten Partikel (**67a-e**) sollten im Blutplasma an Thrombozyten gebunden werden.

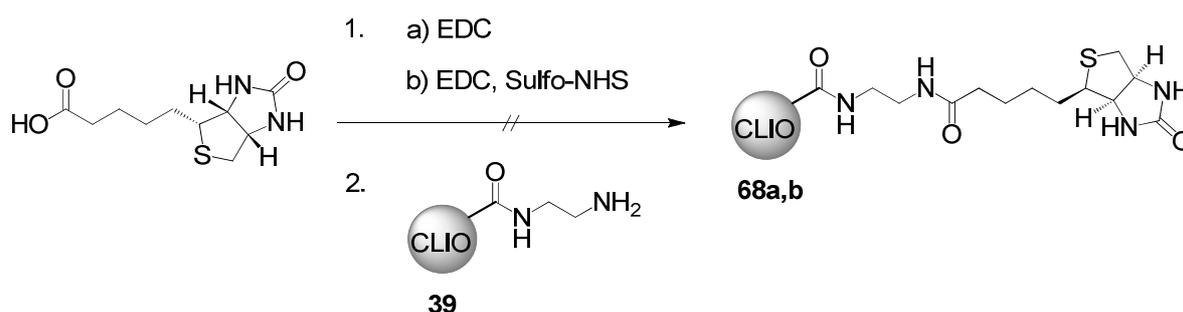
In der verdünnten Blutplasmalösung wurden die Blutplättchen mittels einer Durchflusszytometrie anhand ihrer Größe identifiziert, während der Nachweis der Partikel an den Thrombozyten durch ihre Fluoreszenz erfolgen sollte. Es zeigte sich jedoch bei mehreren Versuchen mit den Antikörperfragmenten aus Tabelle 4.48 nur eine geringe Fluoreszenz, bei der von keiner erfolgreichen Markierung der Thrombozyten mit Eisenoxid-Nanopartikeln ausgegangen werden konnte.

CLIO	Elementaranalyse in Massenprozent	Peptid
67a	15.03 (C), 2.78 (H), 2.35 (N), 0.73 (S)	97H1
67b	14.69 (C), 2.57 (H), 2.27 (N), 0.36 (S)	56F8
67c	15.03 (C), 2.69 (H), 2.28 (N), 0.29 (S)	89A2
67d	15.68 (C), 2.76 (H), 2.82 (N)	3F3
67e	14.52 (C), 2.60 (H), 1.98 (N)	5D7
29f	11.24 (C), 2.48 (H), 1.07 (N)	
34-36	11.36 (C), 2.23 (H), 1.42 (N)	

Tabelle 4.48: Die Zunahme der Kohlenstoff- und Stickstoffwerte sowie das Auftreten eines geringen Schwefelgehalts waren Anzeichen für eine erfolgreiche Anbindung der Peptide an die Partikel.

Da nur ein geringer Teil der mit den Peptiden umgesetzten CLIO (**52**), die aus verschiedenen Chargen stammten, mit dem Blutplasma vermengt wurden, konnten Elementaranalysen von **67a-e** durchgeführt werden (Tabelle 4.48). Diese belegten einen starken Anstieg der Kohlenstoff- und Stickstoffwerte im Vergleich zu den verwendeten Ausgangsverbindungen, was für eine erfolgreich Anbindung der Antikörper an die Partikel spricht. Aufgrund der in Kapitel 4.4. durchgeführten Fluoreszenzmessungen beruhte die geringe Fluoreszenz an den Blutplättchen vermutlich auf der festgestellten Absorption der Anregungsenergie durch die intakten Eisenoxid-Nanopartikel.

Mit den Antikörperexperimenten konnte der Nachweis nicht erbracht werden, dass Eisenoxid-Nanopartikel, die mit bioaktiven Molekülen markiert wurden, substratspezifisch an Zielmoleküle angebracht werden konnten. Für die weitere Untersuchung dieser Thematik wurde das System Biotin / Avidin gewählt, das häufig in der Biochemie und der Molekularbiologie verwendet wird^[130] und auch schon bei Weissleder erwähnt wurde.^[82] Da Biotin (Vitamin H) mit einer Komplexbildungskonstante von $10^{15} \text{ L mol}^{-1}$ eine sehr hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin zeigt,^[131] sollten Biotin-markierte Kolloide über diese spezifische Wechselwirkung an Avidin und Streptavidin gebunden werden. Beide Proteine bestehen aus vier identischen Untereinheiten und können somit als Tetramer vier Biotinmoleküle in ihren hydrophoben Taschen binden.^[132]



Gleichung 4.36: Die direkte Anbindung von Biotin an Diaminoethan-CLIO (**39**) durch eine EDC- und Sulfo-NHS-vermittelte Amidbildung zu **68a,b** konnte nicht bewerkstelligt werden.

In ersten Versuchen sollte das Biotin direkt an Diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂, **39**) angebracht werden (Gleichung 4.36). Hierzu sollte bei **68a** die Carboxylgruppe des Biotins mit EDC bei pH 6 aktiviert werden. Aufgrund der literaturbeschriebenen schlechten Löslichkeit des Biotins in saurer wässriger Lösung^[132] konnte allerdings keine Umsetzung anhand der Elementaranalysen belegt

werden. Zwar zeigte sich ein geringer Schwefelwert, doch nahmen die übrigen Werte ab. Die Bildung eines Biotin-NHS-Esters mit EDC und Sulfo-NHS in einem DMF/DMSO-Gemisch, gefolgt von der Umsetzung mit Diaminoethan-CLIO (**39**) zu **68b** führte zu demselben Ergebnis. Es wurde vermutet, dass durch die schlechte Wasserlöslichkeit des Biotins und einer literaturbeschriebenen geringen Ausbeute bei der Darstellung des Biotin-NHS-Esters^[133] die Anbindung des Biotins an den Diaminoethan-CLIO (**39**) nicht glatt verlief.

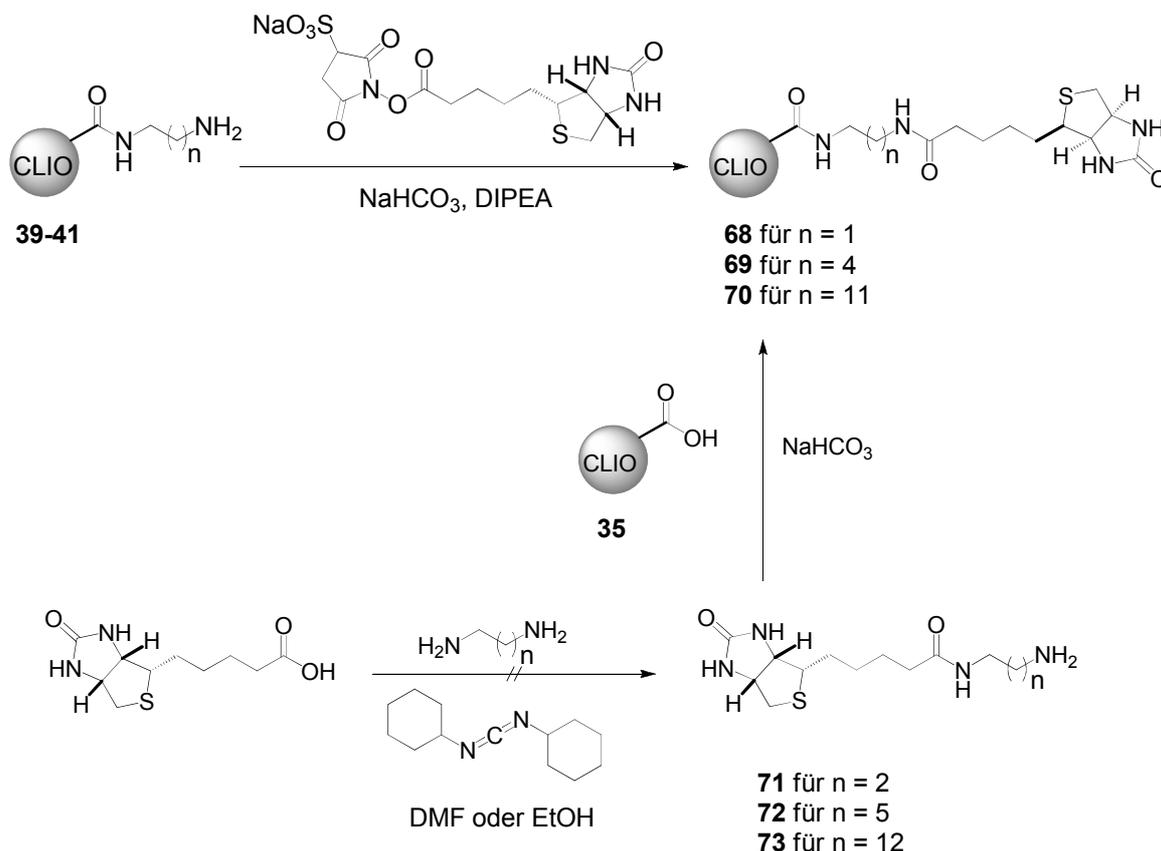
Deshalb wurden die Kolloide (**39-41**) mit Natrium-Biotin-3-sulfo-N-hydroxy-succinimidylester (Sulfo-NHS-Biotin) der Firma Sigma-Aldrich bei pH 9 umgesetzt (Gleichung 4.37 oben).^[134] Ein Schwefelgehalt von 0.1 % und eine leichte Zunahme des Stickstoffwertes deuteten eine erfolgreiche Synthese von **68c,d** an. Ebenso zeigte ein Gemisch aus CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH₂ (**40**) und CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH₂ (**41**) anhand des Schwefelgehaltes bei **69a/70a** eine Umsetzung mit Sulfo-NHS-Biotin. Allerdings nahmen im Gegenzug die übrigen Werte stark ab (Tabelle 4.49).

Kolloid	Elementaranalyse in Massenprozent
68c	13.16 (C), 2.31 (H), 1.07 (N), 0.11 (S)
68d	10.84 (C), 2.09 (H), 0.93 (N), 0.13 (S)
39	11.39 (C), 2.11 (H), 1.26 (N)
69a/70a	12.74 (C), 2.35 (H), 0.77 (N), 0.40 (S)
40/41	14.75 (C), 2.93 (H), 1.29 (N)

Tabelle 4.49: Bei der Umsetzung von CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) mit Sulfo-NHS-Biotin konnte zwar ein geringer Schwefelwert beobachtet werden, jedoch nahmen die übrigen Werte ab.

Alternativ kann Biotin mit Diaminen verschiedener Kettenlängen modifiziert und über die freie Aminoereinheit weiter umgesetzt werden.^[135] Hierdurch wird die Löslichkeit von Biotin beeinflusst und gleichzeitig ein Abstandshalter eingeführt, damit die Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin durch größere, an das Biotin gebundene Moleküle, wie beispielsweise Rezeptoren, nicht behindert wird.^[131,136] In Anlehnung an eine Synthese von Garlick^[137] wurde Biotin mit Ethylendiamin, Cadaverin-Dihydrochlorid und Diaminododecan umgesetzt. Da diese Synthese eine einfache Amidbildung mit der standardmäßigen Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) darstellte, wurde der nach Abtrennung des überschüssigen Diamins erhaltene weiße Feststoff ohne Charakterisierung mit CLIO-COOH (**35**) umgesetzt (Gleichung 4.37

unten). Während der Reaktion zeigte sich ein vermehrter Ausfall der Kolloide mit steigender Kettenlänge des Diaminlinkers. Diese Änderung der Suspendierbarkeit konnte bei den gereinigten Partikeln nicht mehr beobachtet werden, so dass man von einer nur geringfügigen Anbindung der Biotinderivate ausgehen musste. So konnte bei **68e** ein Schwefelwert von lediglich 0.09 % festgestellt werden.



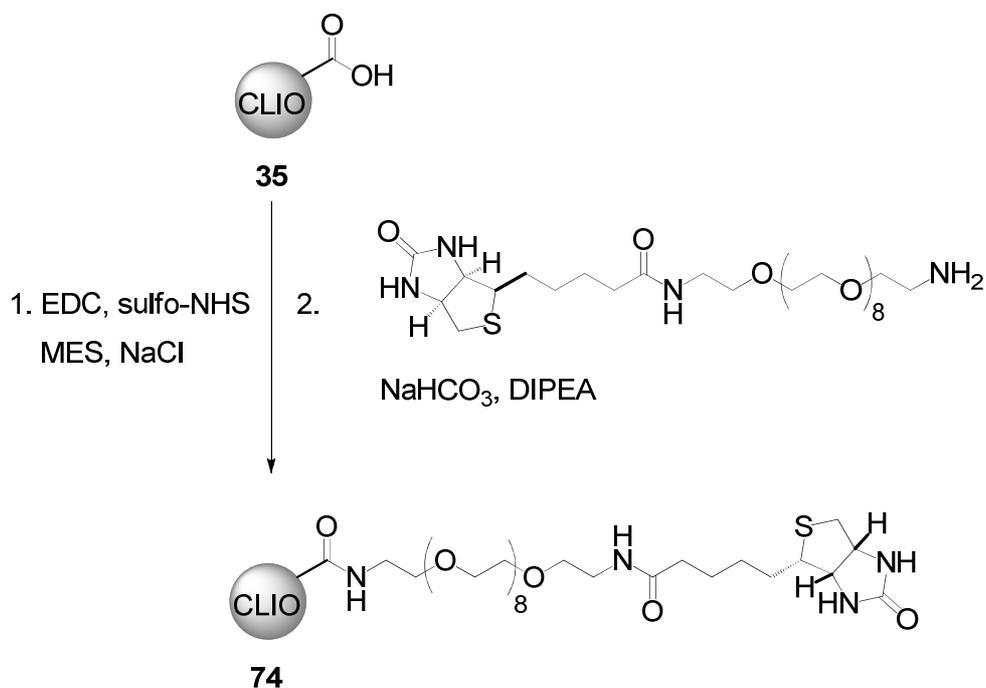
Gleichung 4.37 oben: Die Synthese von biotinylierten Partikeln (**68-70**) erfolgte durch die Umsetzung der Partikel (**39-41**) mit Sulfo-NHS-Biotin unter basischen Bedingungen. **Unten:** Biotin wurde im organischen Medium durch Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) mit den Diaminen Ethylendiamin, Cadaverin-Dihydrochlorid und Diaminododecan zu den Amiden **71-73** umgesetzt und nach einer kurzen Aufreinigung an Carboxy-CLIO (**35**) zur Darstellung von **68-70** gebunden.

Begründet werden konnte dies mit einer unvollständigen Reaktion des Biotins mit den Aminen. Bei Umsetzungen mit Ethylendiamin unter verschiedenen Versuchsbedingungen, die aufgrund der leichten Abtrennbarkeit des Diamins als Modellreaktionen dienen sollten, wurde eine Mischung aus Biotin und den Produkten **71a-d** erhalten (Tabelle 4.50). Das Edukt konnte anhand des Peaks der Carbonsäuregruppe bei etwa 180 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum neben dem Auftreten der Amidgruppe des Produkts bei 165 ppm nachgewiesen werden. Genauere Aussagen über das Biotin- / Amino-Ethylamidobiotin-Verhältnis waren aufgrund der Überlager-

ung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale nicht möglich. Die Darstellung von **72** und **73** wurde wegen der bei **71** erlangten Kenntnisse nicht weiter verfolgt.

Amino-Ethylamidobiotin	Edukte
71a	DCC
71b	DCC, NEt_3
71c	DCC, DIPEA
71d	DCC, DIPEA, NHS

Tabelle 4.50: Die Darstellung von Amino-Ethylamidobiotin (**71**) wurde durch die Aktivierung der Biotingruppe durch Dicyclohexylcarboddimid (DCC) und zusätzlichem Einsatz von Triethylamin (NEt_3), Hünig-Base (DIPEA) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) versucht.



Gleichung 4.38: Die Markierung von Carboxy-CLIO (**35**) mit Biotin erfolgte über ein wasserlösliches PEG-Derivat des Biotins.

Zum anderen könnte die schlechte Umsetzung von Carboxy-CLIO (**35**) mit den Aminobiotinen (**71-73**) an der nicht ausreichenden Löslichkeit im wässrigen Medium liegen. Diese kann durch die Derivatisierung des Biotins mit hydrophilen PEG-Ketten erhöht werden.^[132,138] Die Darstellung solcher PEG-verbundenen biotinylierten CLIO (**74**) erfolgte durch die Umsetzung von Carboxy-CLIO (**35**) mit O-(2-Amino-ethyl)-O'-

[2-(biotinyl-amino)-ethyl]-octaethylenglykol (Biotin-PEG-NH₂) nach Gleichung 4.38. Jedoch wurde auch hier ein Schwefelgehalt von nur 0.17 % erhalten.

Ohnehin war es schwer, eine erfolgreiche Anbindung an die Kolloide durch den Schwefelgehalt zu bestimmen, da eine Anzahl von unter 10 Moleküle pro Kern für die Weiterreaktion mit Avidin ausreichend wäre. Dies entspräche einem Schwefelgehalt von unter 0.05 %. Somit sollte der Nachweis der Biotinanbindung an der Partikeloberfläche indirekt über die Wechselwirkung der Biotin-markierten Kolloide (68-70, 74) mit Avidin erfolgen.

Für den Nachweis einer Biotin-Avidin-Bindung wird üblicherweise eine UV-spektroskopische Methode verwendet, bei der die biotinhaltige Komponente mit einem Avidin-HABA-Komplex vermischt wird.^[131,139,140]

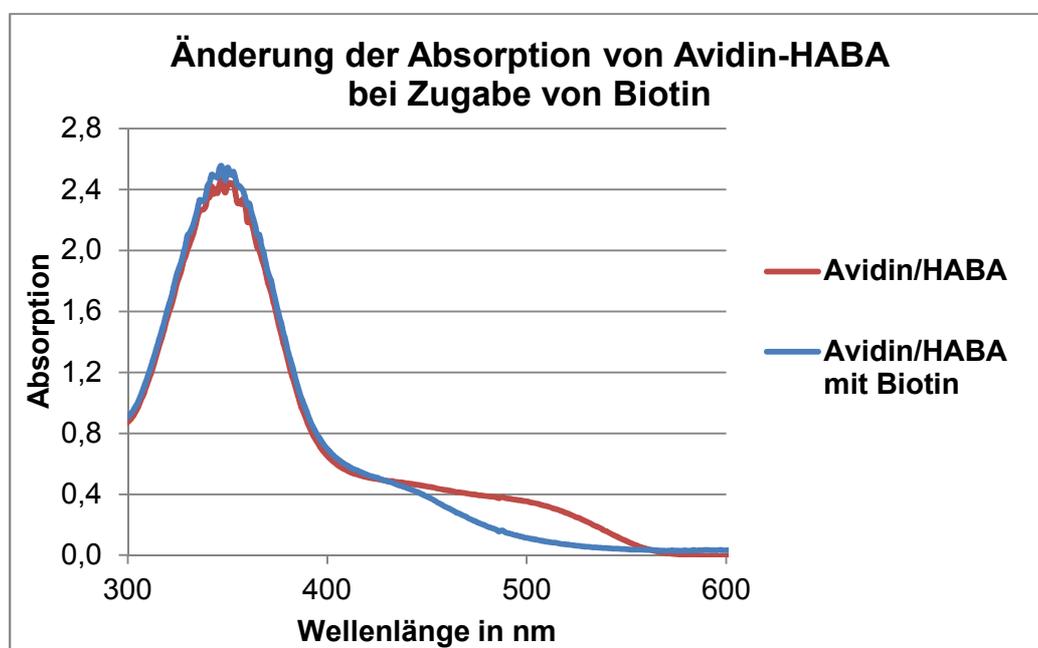


Abbildung 4.12: Der Avidin-HABA-Komplex zeigte neben der literaturbeschriebenen Bande bei 500 nm eine sehr intensive Absorption bei 350 nm (rot). Die Zugabe von Biotin hatte nur eine Reduzierung der Absorption bei 500 nm zur Folge (blau).

Durch die Komplexbindung mit Avidin zeigt HABA (4'-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure) eine intensive orange Absorption bei 500 nm. Da Biotin eine sehr viel höhere Komplexbildungskonstante als HABA besitzt, wird dieses am Avidin verdrängt und die Bildung des stabileren Biotin-Avidin-Komplexes kann durch den Rückgang der Absorption bei 500 nm validiert werden. Der Avidin-HABA-Komplex zeigte eine sehr starke Absorption bei 350 nm und im Bereich bei 500 nm eine kleinere

Absorptionsbande. Diese wurde durch die Zugabe von Biotin verringert, während die Absorption bei 350 nm nahezu unverändert blieb (Abbildung 4.12).

Zur quantitativen Bestimmung sollte die Konzentration von Biotin idealerweise bei etwa $0.1 \mu\text{mol pro ml}$ liegen,^[141] was bei einer Kolloidlösung mit 0.1 M Eisen einer Anzahl von etwa 10 Biotinmolekülen pro Eisenoxidkern entspricht. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Biotin-Lösung (0.4 mM) mit der Avidin-HABA-Lösung vermessen (Abbildung 4.12). Es konnte ein stetiger, linearer Rückgang der Absorption durch die Zugabe von Biotin beobachtet werden, der sich durch die im Diagramm angegebene Geradengleichung beschreiben ließ. Bei insgesamt $44 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$ Biotin wurde ein konstant bleibender Wert von etwa 0.17 erreicht.

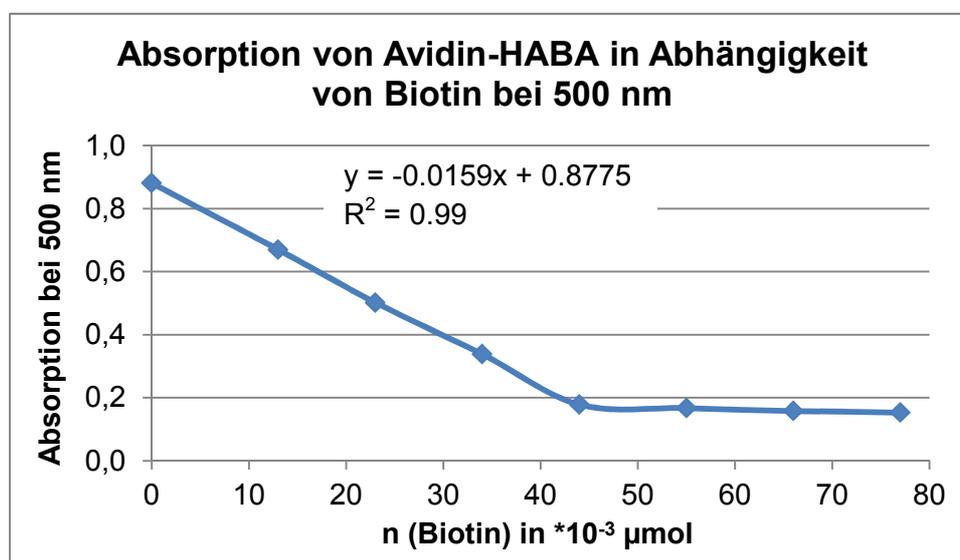


Abbildung 4.12: Die Absorption des Avidin-HABA-Komplexes fiel bei Biotinzugabe linear nach der angegebenen Gleichung ab und erreichte bei einer Menge von $44 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$ Biotin ein Plateau.

Demgegenüber zeigten die UV-Spektren von Biotin-diaminothan-CLIO (**68f**) und Biotin-diaminododecan-CLIO (**70b**) mit Avidin-HABA keinen solch linearen Absorptionsrückgang (Abbildung 4.13). Bei beiden konnte zunächst eine leichte Zunahme der Absorption gemessen werden. Während bei **68f** wegen der gleichbleibenden Absorption von etwa 1.0 keine weiteren Messungen durchgeführt wurden, konnte bei **70b** ein Abfall der Absorption bei größeren Partikelmengen beobachtet werden. Allerdings absorbierte ab einer Menge von $19 \mu\text{mol}$ der Eisenhintergrund so stark, dass keine Hintergrundmessung mehr ausgeführt konnte, sondern die Eisenabsorption nach einer gesonderten Messung rechnerisch abgezogen werden musste. Wegen des nichtlinearen Verlaufs konnte bei **70b** keine

Regressionsgerade zur quantitativen Biotinbestimmung erhalten werden. Setzte man die letzten vier Werte (25.6-16.5 μmol Eisen) von **70b** in Relation zu der Eichgeraden aus Abbildung 4.12 so ergaben sich Biotin-Eisenoxidkern-Verhältnisse, die sich mit steigendem Eisengehalt von 3 auf 15 vergrößerten (Tabelle 4.51).

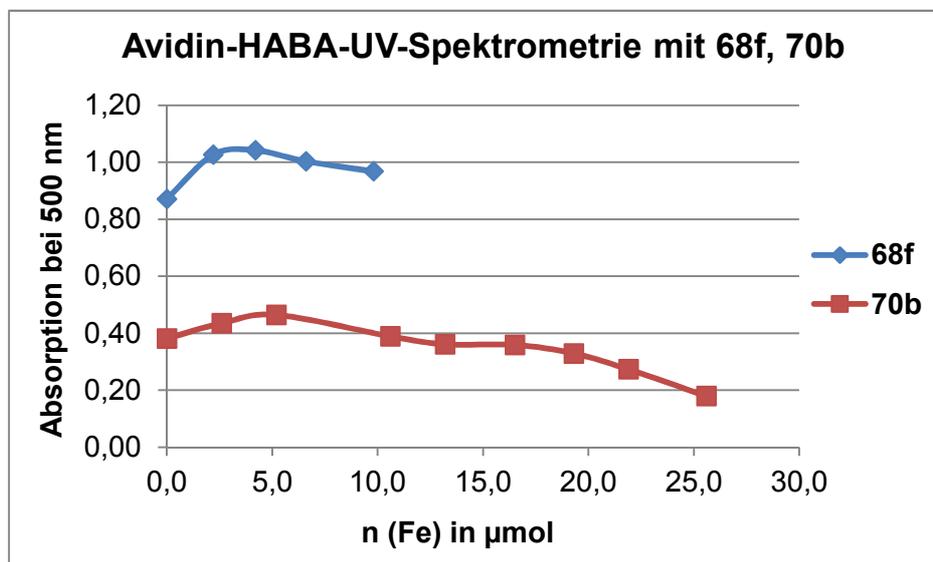


Abbildung 4.13: Bei Biotin-diaminoethan-CLIO (**68f**) und Biotin-diaminododecan-CLIO (**70b**) zeigte sich anfangs ein tendenziell gleicher Verlauf mit einer Zunahme der Avidin-HABA-Absorption. Während bei **68f** die Messung daraufhin abgebrochen wurde, wurde bei **70b** ein Rückgang der Absorption bei größeren Mengen an Partikellösung gemessen.

Eisen in μmol	Biotin pro Kern	Eisen in μmol	Absorption bei 500 nm
16.5	3	0.0	0.59
19.3	5	1.9	0.61
21.9	10	5.6	0.79
25.6	15	7.6	0.90

Tabelle 4.51 links: Anhand der letzten Datenpunkte der UV-spektroskopischen Messungen von **70b** konnte nur eine leichte Markierung der Partikel mit 12-Amino-dodeanylamidobiotin (**73**) vermutet werden. **rechts:** Mit steigendem Kolloidgehalt von **69a/70a** wurde eine erhöhte Absorption bei 500 nm festgestellt.

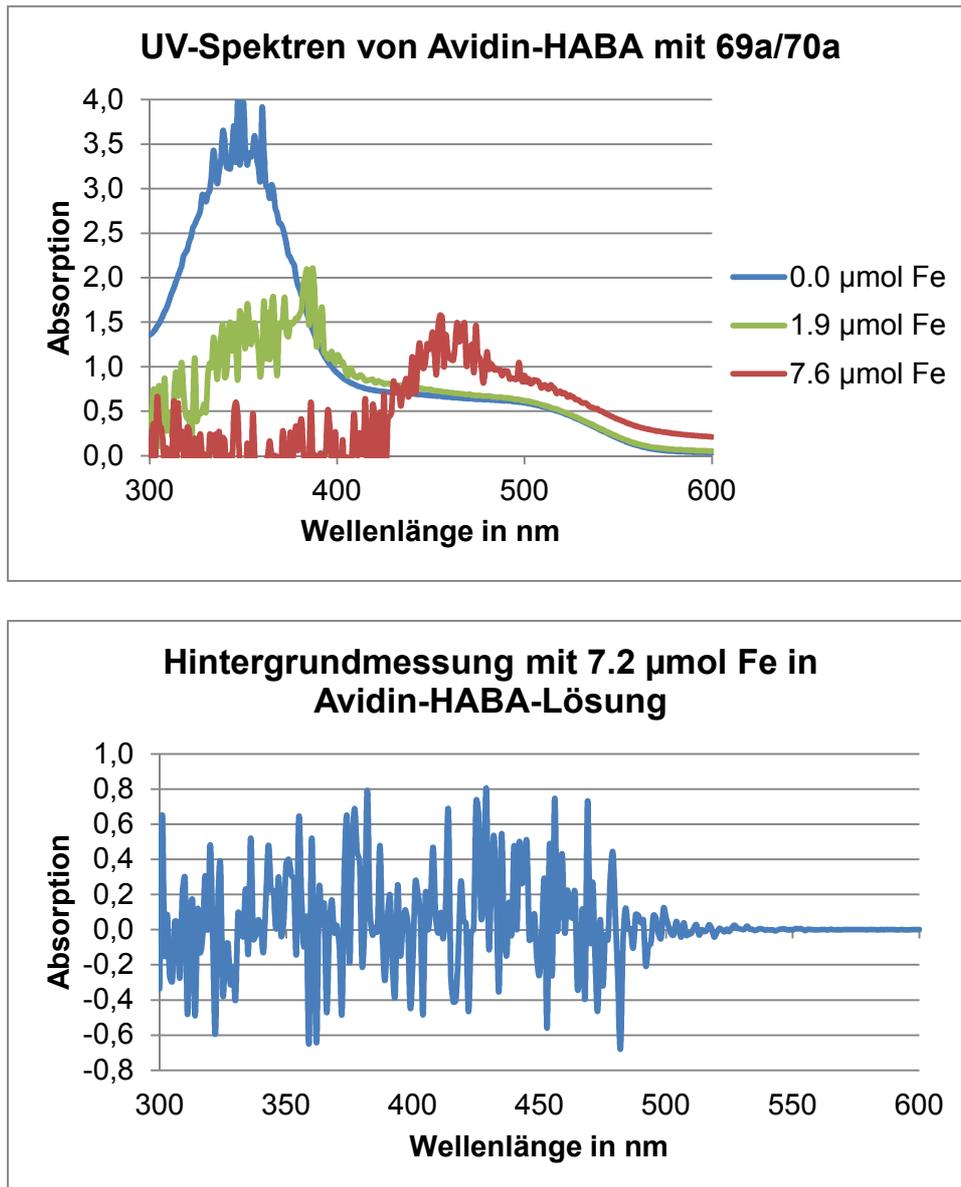


Abbildung 4.14 oben: UV-Spektren von Avidin-HABA mit Biotin-diaminopentan-CLIO und Biotin-diaminododecan-CLIO (**69a/70a**) zeigten einen starken Einfluss der Partikel auf die Absorption. **unten:** Dies wurde auch bei einer Vermessung von Avidin-HABA mit CLIO-NH₂ (**30f**) beobachtet. Eine Hintergrundmessung ergab bei derselben Lösung von Avidin-HABA-CLIO-NH₂ Interferenzen, die das Ergebnis der Biotinbestimmung bei 500 nm verfälschen.

UV-Spektren des Avidin-HABA-Komplexes mit Biotin-diaminopentan-CLIO und Biotin-diaminododecan-CLIO (**69a/70a**) zeigten ebenso eine Erhöhung der Absorptionswerte bei 500 nm in Gegenwart der Kolloide (Tabelle 4.51 rechts). Messungen über einen Wellenbereich von 300-600 nm legten dar, dass die UV-Spektren mit steigendem Eisengehalt zunehmend durch die Absorption der Eisenpartikel beeinflusst wurden (Abbildung 4.14 oben). Am stärksten war hierdurch der Wellenlängenbereich von 300-450 betroffen, in dem es zum Verschwinden der

intensiven Absorptionsbande des Farbstoffes kam. Mit steigendem Kolloidgehalt der Lösung verschob sich die Störung der Absorption durch den Eisenhintergrund bis hin zu der Messwellenlänge von 500 nm. Dies war nicht das Ergebnis der Wechselwirkung des Avidin-HABA-Komplexes mit den Partikeln, sondern kam einzig durch die intensive Absorption der Kolloide zustande, wie UV-Spektren des Avidin-HABA-Komplexes mit einer CLIO-NH₂-Lösung (**30f**) bewiesen. Hierbei zeigten sich sogar erhebliche Unterschiede, als dieselbe Avidin-HABA-CLIO-NH₂-Lösung von **30f** für die Hintergrund- als auch für die Probenmessung verwendet wurde (Abbildung 4.14 unten). Somit war eine Verifizierung der Anbindung von Biotin an die Kolloide über die übliche UV-spektroskopische Avidin-HABA-Methode wegen der Absorptionseigenschaften der Partikel nicht möglich. Da Avidin eine molare Masse von 66 kDa besitzt,^[130] sollte ein Nachweis der Anbindung an biotinylierte Partikel durch eine Elementaranalyse gelingen. Hierzu wurden die Kolloide Biotin-diaminoethan-CLIO (**68c**) und Biotin-PEG-carboxy-CLIO (**74**) mit dem Avidin-HABA Reagenz umgesetzt. Die Aufreinigung bei den Avidin-Konjugaten **75** und **76** galt als vollständig, wenn die organischen und wässrigen Reinigungslösungen keinen Farbstoff mehr aufwiesen. Die Elementaranalysen wiesen einen Anstieg des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes auf, der für eine gelungene Anbindung des Avidins sprach (Tabelle 4.52).

Kolloid	Elementaranalyse in Massenprozent
75	15.54 (C), 2.91 (H), 1.51 (N), 0.12 (S)
68c	13.16 (C), 2.31 (H), 1.07 (N), 0.11 (S)
76	15.46 (C), 2.76 (H), 1.58 (N), 0.23 (S)
74	14.11 (C), 2.57 (H), 1.12 (N), 0.17 (S)

Tabelle 4.52: Die Umsetzungen von Biotin-diaminoethan-CLIO (**68c**) und Biotin-PEG-carboxy-CLIO (**74**) mit Avidin wurde mittels Elementaranalysen verfolgt. Diese zeigten im Vergleich zu den Edukten einen Anstieg der Kohlenstoff- und Stickstoffwerte.

Darüber hinaus wurden am ZEMM (Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin) Würzburg Biotin-diaminoethan-CLIO (**68c**) auf Papier als Trägermaterial unter verschiedenen Verdünnungen mit FITC-markiertem Streptavidin behandelt. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Streptavidins wurde im Gegensatz zur Kontrolle bei den Kolloiden unter dem Fluoreszenzmikroskop die Anbindung des

Proteintetramers nachgewiesen (Abbildung 4.15). Mit steigender Verdünnung wurde hierbei eine intensivere Fluoreszenz bewirkt. Ebenso belegte die Einfärbung mit DAB (Diaminobenzidin) durch die charakteristische, unlösliche Braunfärbung die Anwesenheit von Streptavidin an den Partikeln (Abbildung 4.16). Die Intensität der Färbung erwies sich im Gegensatz zur Fluoreszenz unabhängig von der Verdünnung.

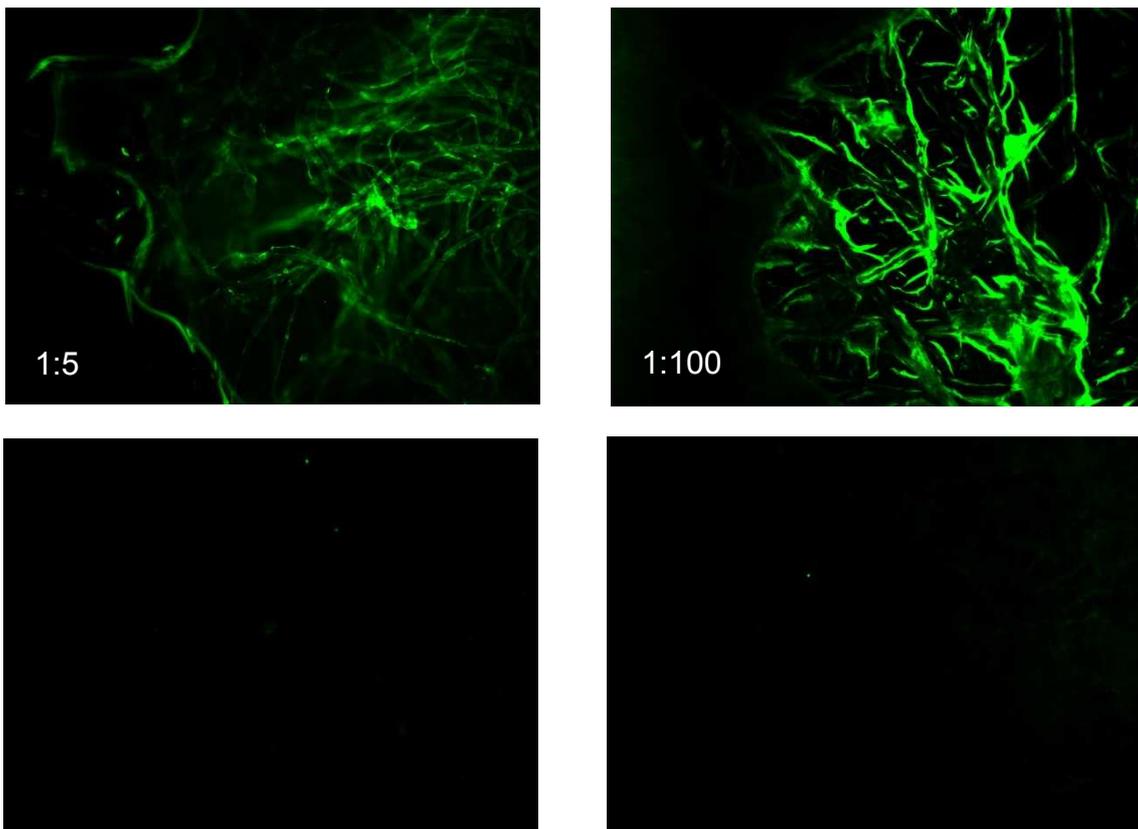


Abbildung 4.15: Bei Biotin-diaminoethan-CLIO (68c) zeigte sich in Verbindung mit FITC-markiertem Streptavidin Fluoreszenz (oben), während die Kontrolle ohne Partikel dunkel blieb (unten).



Abbildung 4.16: Bei den Verdünnungsreihen wurde Streptavidin an den Partikeln zusätzlich durch DAB-Färbung nachgewiesen (oben). Die Partikel alleine zeigten nur ihre Eigenfarbe (unten).

4.6. Spektroskopische und *in vivo* Eigenschaften der Kolloide

4.6.1. Relaxivitäten der Eisenoxid-Nanopartikel

Die Messung der Relaxivitäten erfolgte innerhalb des SFB 688 in Zusammenarbeit mit T. Kampf (Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. P. M. Jakob) am Lehrstuhl für Experimentelle Physik V. Zur Bestimmung der Relaxationsraten R_1 und R_2 (in s^{-1}) wurden Konzentrationsreihen der Partikellösungen im Bereich von 35-250 $\mu\text{mol Fe}$ pro L bei 7 Tesla gemessen. Aus diesen wurden mit Hilfe einer Regressionsgeraden die Relaxivitäten r_1 und r_2 (in $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) der Kolloide ermittelt (Tabelle 4.53). Um den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Relaxivitäten einschätzen zu können, wurden die Messungen für SPIO, Amino-CLIO (CLIO-NH₂) und Carboxy-CLIO (CLIO-COOH) mit den Hüllpolymeren Dextran T5, T20 und T40 durchgeführt, wobei die SPIO und CLIO-NH₂ als Edukte für die jeweiligen bei der Messung verwendeten Derivate dienten. Da es sich bei den Eisenoxid-Nanopartikeln um ein T2-Kontrastmittel handelt, wurden die feldstärkeabhängigen r_1 -Werte nicht zur Auswertung herangezogen. Unabhängig von der eingesetzten Dextranhülle wurde eine Abnahme der r_2 -Werte in der Reihe SPIO, CLIO-NH₂ und CLIO-COOH beobachtet. Auffällig ist der extrem niedrige Wert für CLIO-COOH-T5 (**34**).

Partikel	r_1 in $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	r_2 in $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
SPIO-T5 (7a)	1.3 ± 0.1	342 ± 36
CLIO-NH ₂ -T5 (24c)	0.6 ± 0.1	215 ± 41
CLIO-COOH-T5 (34)	0.04 ± 0.01	1.6 ± 0.7
SPIO-T20 (5f)	0.6 ± 0.2	460 ± 46
CLIO-NH ₂ -T20 (29d)	0.6 ± 0.1	209 ± 50
CLIO-COOH-T20 (35)	0.3 ± 0.1	85 ± 24
SPIO-T40 (5g)	1.5 ± 0.0	449 ± 3
CLIO-NH ₂ -T40 (33c)	0.9 ± 0.2	331 ± 55
CLIO-COOH-T40 (36)	0.4 ± 0.05	70 ± 18
Resovist® (0.45 T)	25	164
Endorem® (0.45 T)	24	107

Tabelle 4.53: Von SPIO, CLIO-NH₂ und CLIO-COOH mit den Dextranhüllen T5, T20 und T40 wurden die Relaxivitäten bei 7 T bestimmt.

Dies war darauf zurückzuführen, dass sich wegen der schlechten Suspendierbarkeit dieser Kolloide im starken Magnetfeld größere Agglomerate bildeten, wodurch der superparamagnetische Charakter weitgehend verloren ging.

Die dargestellten Partikel wiesen im Vergleich zu Resovist® und Endorem® Relaxivitäten in der gleichen Größenordnung auf, die im Falle der SPIO erheblich größer ausfielen. Eine zweite Messreihe sollte die Ergebnisse der Relaxivitätsmessungen verifizieren (Tabelle 4.54). Die absoluten Werte der r_2 -Relaxivitäten änderten sich nur unerheblich. Unterschiede traten bei den Kolloiden mit Dextran T20 als Polymerhülle auf, die durch eine erhöhte Stabilität von **28b** und **35a** erklärt wurden. Demgegenüber zeigten die Carboxy-CLIO **34** und **36** eine vergleichbar geringere r_2 -Relaxivität.

Kolloide	r_1 in $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	r_2 in $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
SPIO-T5 (7a)	1,11	316,00
CLIO-NH ₂ -T5 (24b)	0.86	275,00
CLIO-COOH-T5 (34)	0.56	43,00
SPIO-T20 (5f)	1,13	206,00
CLIO-NH ₂ -T20 (28b)	0.95	246,00
CLIO-COOH-T20 (35a)	0.92	332,00
SPIO-T40 (5g)	1,85	396,00
CLIO-NH ₂ -T40 (33a)	0.67	192,00
CLIO-COOH-T40 (36)	0.55	17,00

Tabelle 4.54: Eine zweite Messreihe bestätigte größtenteils die Relaxivitätswerte aus Tabelle 4.53. Erhebliche Unterschiede ergaben sich für CLIO-COOH-T20 (**35a**), währenddessen die Werte für **34** und **36** niedrig blieben.

Anhand der erhaltenen Werte konnte davon ausgegangen werden, dass sich die dargestellten Kolloide für den Einsatz als MR-Kontrastmittel eignen. Vorteile ergaben sich hierbei für Eisenoxid-Nanopartikel mit einer Hülle aus Dextran T20, da diese auch bei den Carboxy-Derivaten **35** im Vergleich zu **34** und **36** hohe r_2 -Werte besaßen.

4.6.2. Hydrodynamischer Durchmesser von Eisenoxid-Nanopartikeln

Da der hydrodynamische Durchmesser ein entscheidender Faktor für die *in vivo*-Verteilung der Kolloide ist, wurde dieser für SPIO, CLIO-NH₂ und CLIO-COOH durch Laserlichtstreuung an einem Fiber-Optic Particle Analyzer vermessen (Tabelle 4.55).

Kolloid	Ø T5 (nm)	Ø T20 (nm)	Ø T40 (nm)
SPIO	90	40-50	100
CLIO-NH ₂	70	10-60	10-80
CLIO-COOH	70	60	80

Tabelle 4.55: Die Durchmesser der dargestellten Kolloide variieren in Abhängigkeit von der Dextranhülle (T5, T20 und T40) und deren weiteren Modifikation.

SPIO, die mit Dextran T20 umhüllt wurden, wiesen mit etwa 50 nm einen wesentlich kleineren Durchmesser auf als ihre Analoga mit Dextran T5 und T40. Durch die Vernetzung der polymeren Hülle verringerten sich die Radien der CLIO-NH₂ bei allen Derivaten. Während bei CLIO-NH₂-T5 ein scharfer Peak bei 70 nm erhalten wurde, führte die Verlinkung von Dextran T20 und T40 als Hüllmaterial zu einer Verteilung der Partikelgrößen in einem Bereich von 10-60 bzw. 10-80 nm. Durch die weitere Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid zu Carboxy-CLIO (CLIO-COOH) blieb bei Dextran T5 der Durchmesser unverändert, bei Dextran T20 und T40 hingegen konnte eine einheitliche Partikelgröße von 60 und 80 nm mit dem Wegfall der kleineren Durchmesser erzielt werden. Letztendlich zeigten die Durchmesser der modifizierten Eisenoxid-Nanopartikel im Gegensatz zu den SPIO nahezu keine Abhängigkeit von dem eingesetzten Dextran, da sich die Partikelgrößen allesamt in einem Bereich von 60-80 nm bewegten.

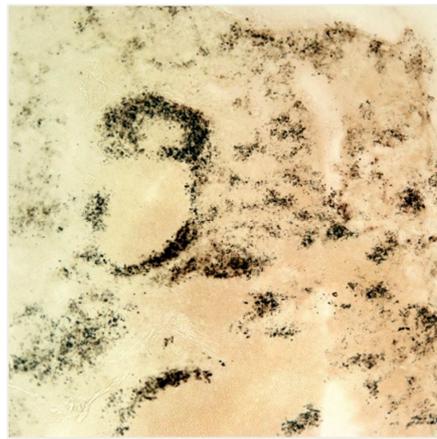
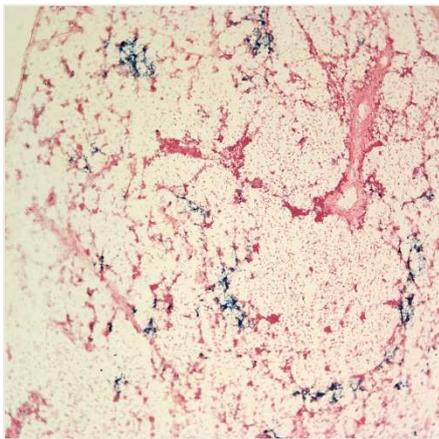
4.6.3. *In-vivo*-Verteilung von Eisenoxid-Nanopartikeln

Durchgeführt wurden die *in-vivo*-Experimente von Frau M. Michalska (Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. W. Bauer) in der experimentellen Physik V. Der Nachweis des Eisens durch Berliner-Blau- und DAB-Färbung sowie Fluoreszenz erfolgte von Frau E. Bauer im ZEMM (Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin) des Universitätsklinikums Würzburg. Die Berliner-Blau-Färbung nach Mallory über einen Eisen-Cyano-Komplex stellte hierbei die gängige Methode dar. Sensitiver ist der

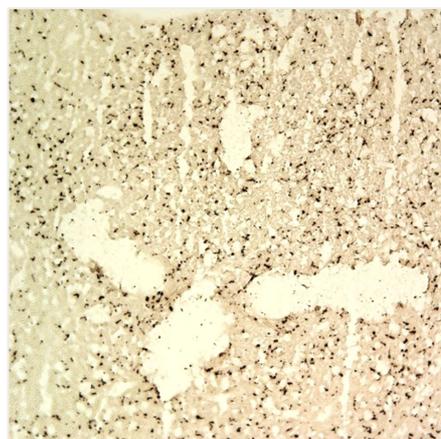
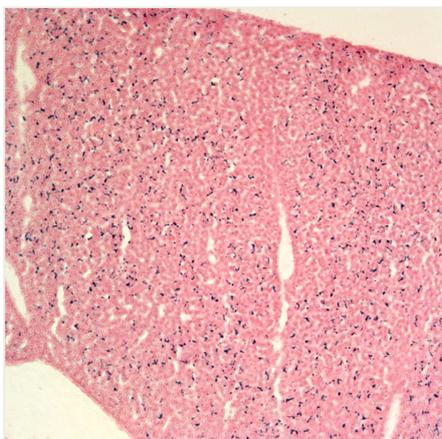
Nachweis durch DAB-Färbung, bei der das zuvor gebildete Berliner-Blau als Katalysator für die Oxidation und Polymerisation von Diaminobenzidin dient.^[142,143]

Als Versuchsmäuse wurden transgene ApoE knockout Mäuse verwendet, die einen erhöhten Cholesteringehalt besitzen, so dass sich durch fetthaltiges Futter (Western Diät) sehr schnell Plaques ausbilden. Hiermit wurde Atherosklerose am menschlichen Herzen simuliert, die durch Gabe der Eisenoxid-Nanopartikel (30 mg CLIO-NH₂ pro kg Maus) diagnostiziert werden sollte. Wie für diese Partikelgröße vermutet, lagerten sich die intravenös injizierten Kolloide in Leber und Milz ab (Abbildung 17a, b). Nur wenig Eisen konnte in der Lunge und in der Aortenwurzel detektiert werden, während in dem Skelett, der Niere und dem Gehirn keine Kolloide nachgewiesen wurden (Abbildung 4.17c-g).

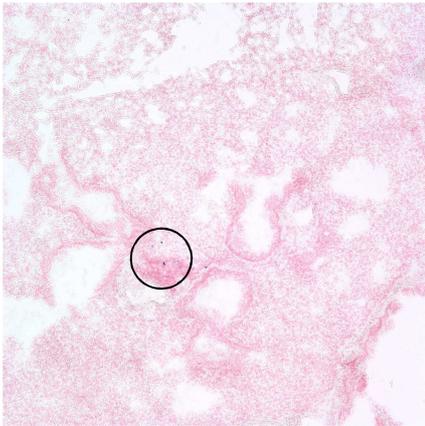
a) Milz



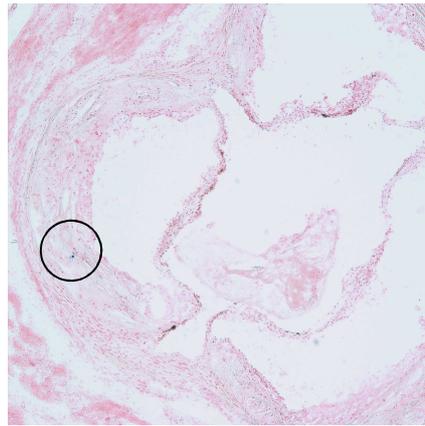
b) Leber



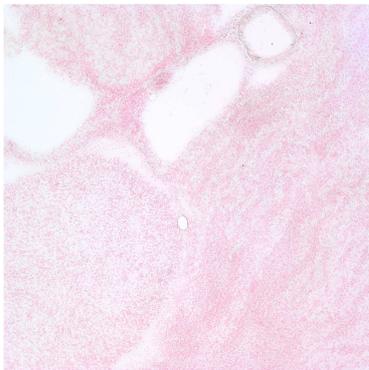
c) Lunge



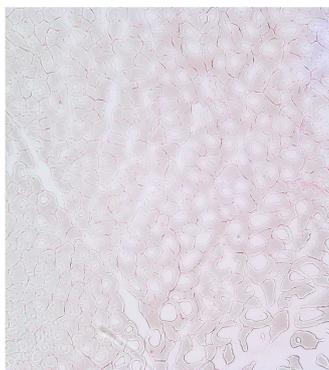
d) Aortenwurzel



e) Niere



f) Skelettmuskulatur



g) Gehirn

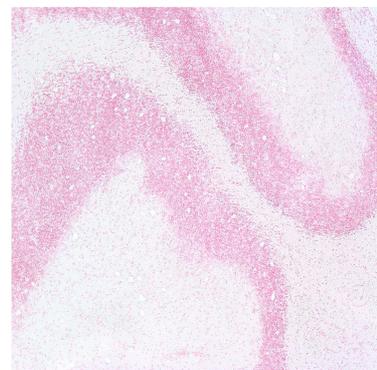


Abbildung 4.17: Die Schnitte der Organe zeigen die *in-vivo*-Verteilung der Kolloide CLIO-NH₂-T20 (30 mg CLIO-NH₂-T20 / kg Maus) nach 30 min. Die Kolloide wurden als blaue Ablagerung mittels Berliner-Blau-Färbung oder als braune Rückstände durch DAB-Färbung nachgewiesen.

Dass es sich hierbei tatsächlich um die Eisenoxid-Nanopartikel und nicht um körpereigenes Eisen handelte, konnte durch den Nachweis der Dextranhülle mit FITC-markierten Dextran-Antikörpern belegt werden (Abbildung 4.18).

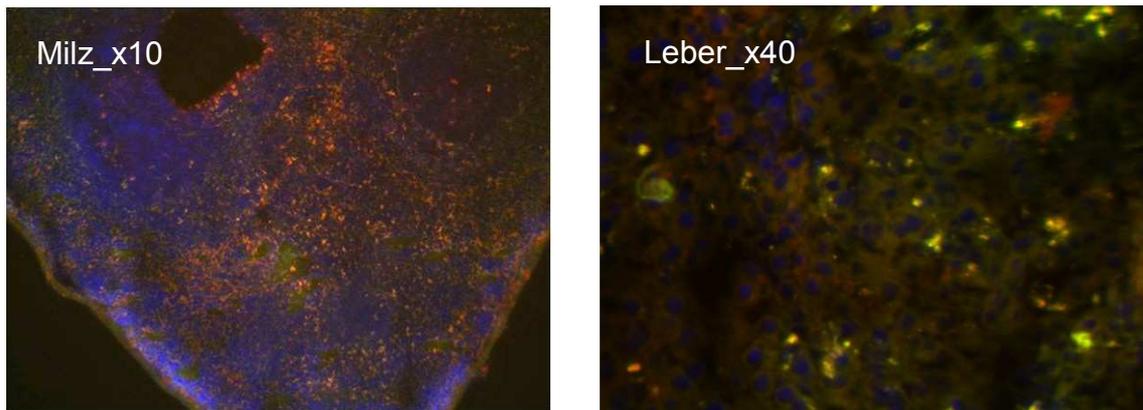


Abbildung 4.18: Durch die Markierung mit FITC-markierten Dextran-Antikörpern wurden indirekt durch die Polymerhülle die Eisenoxid-Nanopartikel in Milz (links) und Leber (rechts) nachgewiesen.

Im Vergleich zu den Kolloiden P904 von Guerbet (Villepinte, Frankreich) zeigten die dargestellten CLIO-NH₂-T20 eine geringere Anlagerung in der Milz (Abbildung 4.19). Dennoch konnte in den Aorten nur sehr wenig Eisen detektiert werden, obwohl darüber hinaus durch den FITC-markierten Antikörper MAB 1852 eine dicke Schicht von Makrophagen, die das Eisen hätten aufnehmen können, nachgewiesen wurde (Abbildung 4.20).

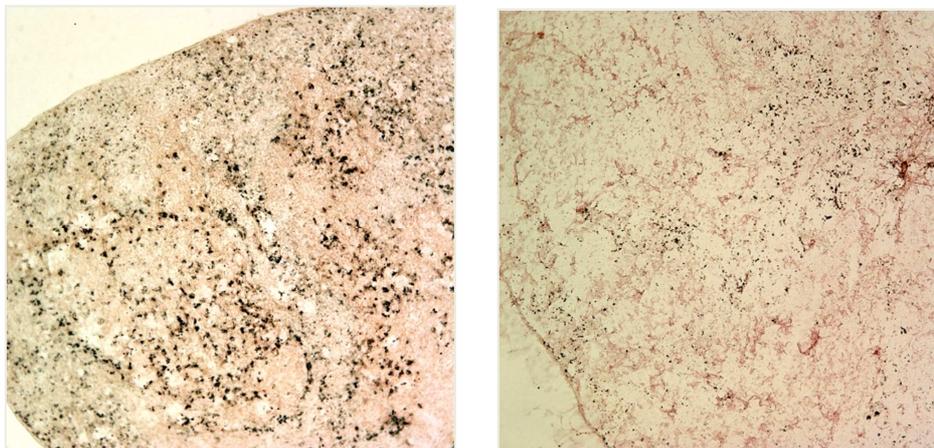


Abbildung 4.19: DAB-Färbung der Milz nach Gabe von P904 (links) und von CLIO-NH₂-T20 (rechts).

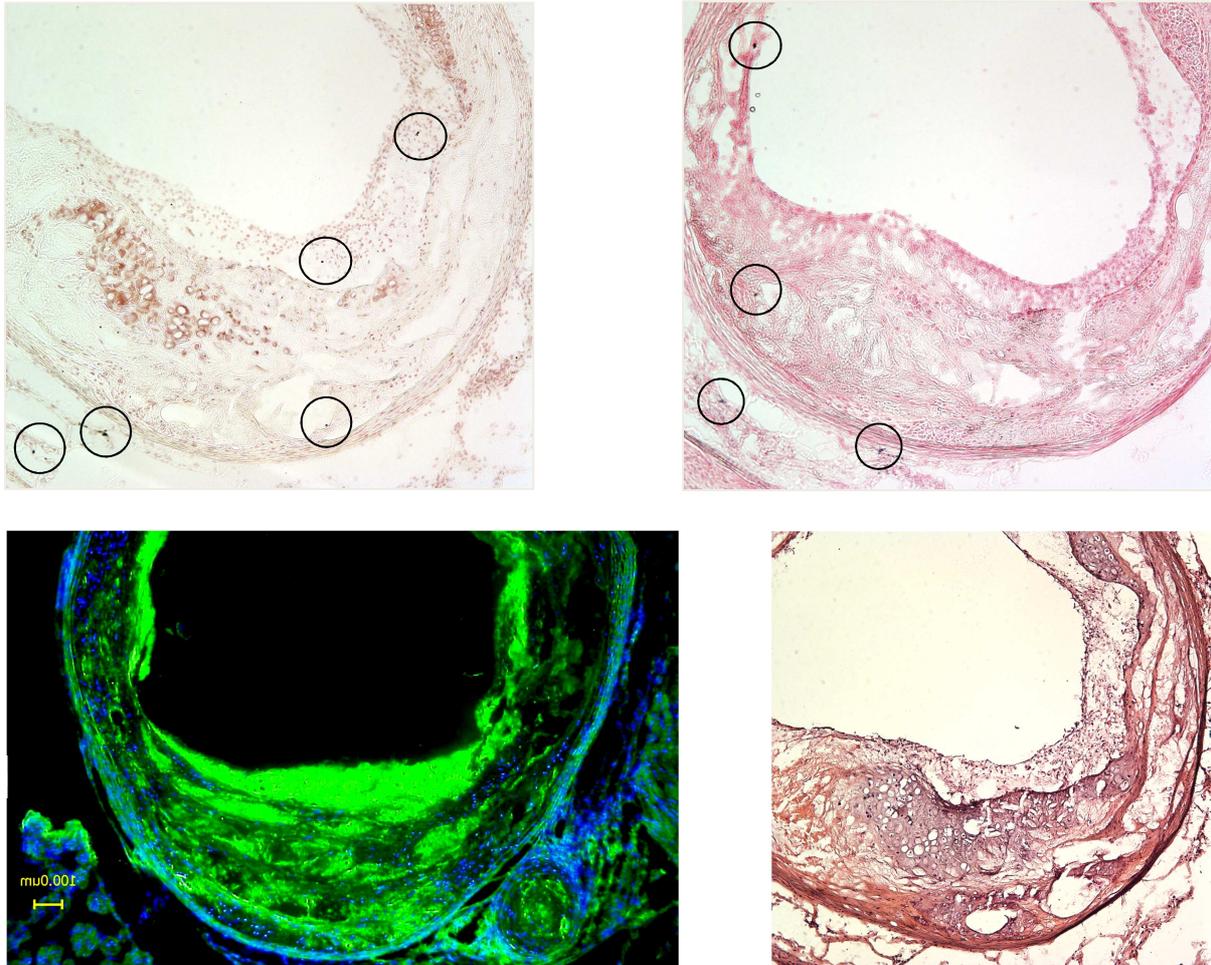


Abbildung 4.20: Die Fluoreszenz von FITC (grün) zeigte eine starke Ansammlung von Makrophagen in den Aorten (unten), doch konnten diese nicht genügend mit den Kolloiden markiert werden (oben).

Diese Versuche machten deutlich, dass ein Einsatz der dargestellten Kolloide in der MR-Angiographie nur möglich ist, wenn diese durch die Markierung mit Antikörpern in den Makrophagen angereichert werden. Hierfür war es von entscheidender Bedeutung, dass die Dextranhülle unter *in-vivo*-Bedingungen nicht vom Eisenoxidkern separiert wird. Um dies nachzuweisen, wurden 6-Aminofluorescein-markierte Carboxy-CLIO (**52**) einer 24 Wochen alten ApoE knockout Maus verabreicht (5 mg Fe / ml, 30 mg Fe / kg Körpergewicht). Bei der anschließenden Histologie wurde Fluoreszenz vorwiegend in der Leber und Milz detektiert, während sich in der Aorta neben der Autofluoreszenz der Gefäßwand nur wenig Fluoreszenz durch die Fluorescein-markierten Partikel zeigte (Abbildung 4.21).

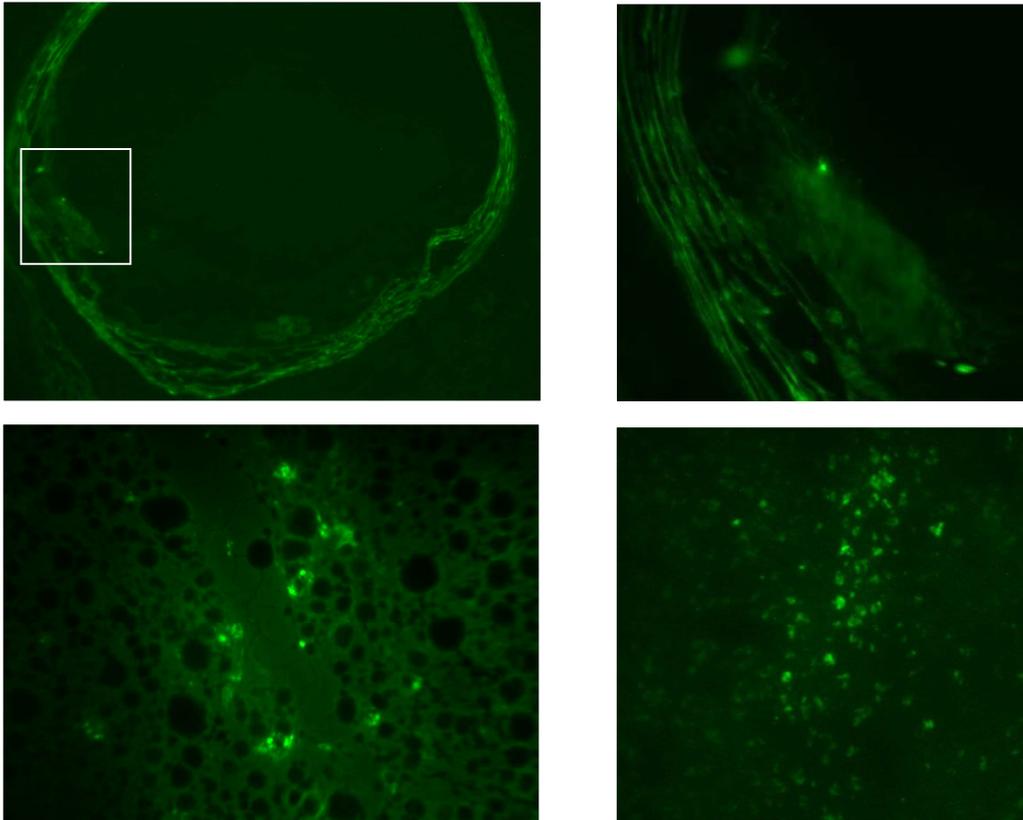


Abbildung 4.21 oben: Neben der Autofluoreszenz der Gefäßmuskulatur ließ sich nur wenig Fluoreszenz der markierten Partikel in der Aorta beobachten (links). Eine Vergrößerung des Ausschnitts verdeutlichte das Vorhandensein einzelner, kugelförmiger Partikel (rechts). **Unten:** Die Überzahl der fluorescein-markierten Partikel (**52**) sammelte sich in Leber (links) und Milz (rechts) an.

Dies stellte ein Indiz für die stabile Anbindung der Fluoreszenzmoleküle an den Eisenoxidkern dar, was durch die Untersuchung derselben Lebergewebeschnitten mit Berliner-Blau-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt wurde. Hierbei wurde nur in den Regionen Fluoreszenz detektiert, in denen auch Eisen nachgewiesen wurde (Abbildung 4.22). Allerdings wurde nicht an allen Stellen, bei denen Eisen gefunden wurde, auch Fluoreszenz beobachtet, was ein Hinweis dafür ist, dass keine vollständige Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Partikel vorlag.

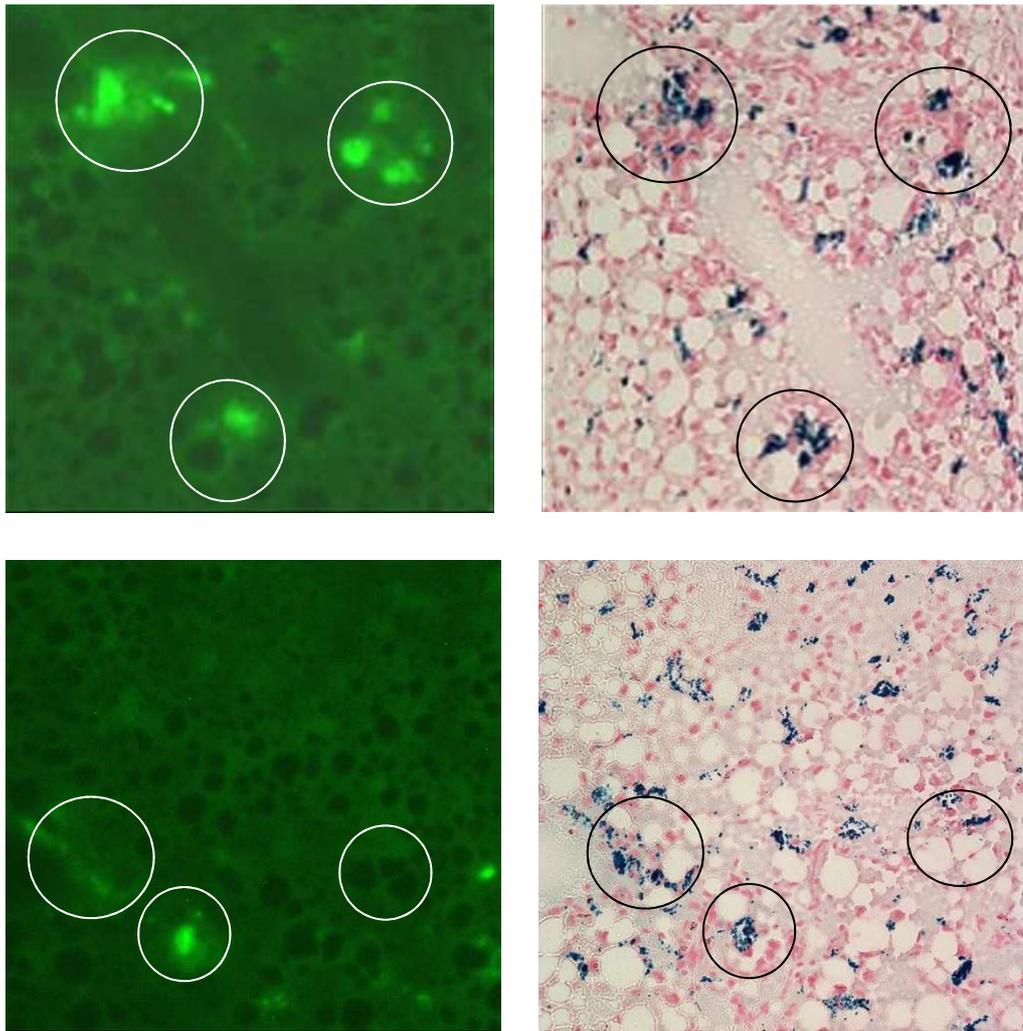


Abbildung 4.22: Bei verschiedenen Gewebeschnitten der Mauseber korrelierte die Fluoreszenz mit der Position des nachgewiesenen Eisens.

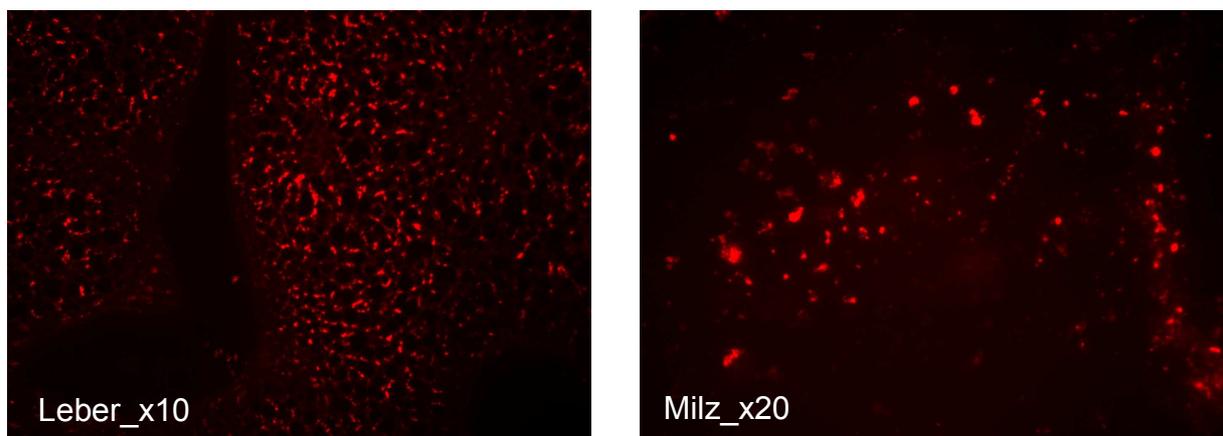


Abbildung 4.23: CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA-COOH (**56e**) lagerten sich in Leber und Milz an und konnten anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.

Im Einklang hierzu konnte bei Rhodamin-markierten Partikeln (**56e**) Fluoreszenz hauptsächlich in Leber und Milz detektiert werden (Abbildung 4.23). Dies diente als Beweis für die feste Anbindung des TAMRA-Farbstoffs an die Oberfläche von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) durch eine Amidbindung.

Ebenso wurden die *in-vivo*-Eigenschaften der biotinylierten Kolloide Biotin-diaminoethan-CLIO (**68c**) und Biotin-PEG-carboxy-CLIO (**74**) untersucht, die sich ebenfalls hauptsächlich in Leber, Milz und den Lymphknoten ansammelten. Bemühungen, die Biotin-Kolloid-Bindung durch die Markierung mit Streptavidin nachzuweisen, schlugen bei **74** fehl. Es konnte lediglich eine unspezifische Streptavidinanbindung durch endogenes Biotin, das in vielen Gewebearten vorkommt, festgestellt werden (Abbildung 4.24).

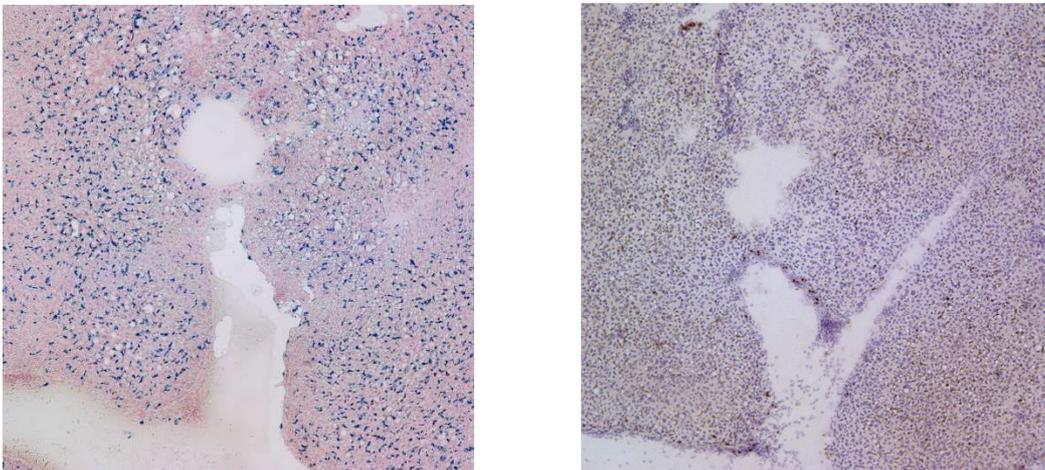


Abbildung 4.24: Durch die Berliner-Blau-Färbung wurde bei **74** Eisen in der Leber detektiert (links), jedoch zeigte die Behandlung mit Streptavidin-DAB nur eine unspezifische Braunfärbung (rechts).

Der Tierversuch mit **68** führte zu demselben Resultat, obwohl Regionen der Lymphknoten, in denen Eisen festgestellt wurde, nach der Behandlung mit FITC-markiertem Streptavidin Fluoreszenz zeigten. Nähere Untersuchungen der Leber wiesen aber ebenfalls auf eine unspezifische Bindung von Streptavidin mit DAB hin (Abbildung 4.25). Somit konnte wie bei den Versuchen mit Antikörpern der Nachweis nicht erbracht werden, dass Zielmoleküle über spezifische Wechselwirkungen mit den Eisenoxid-Nanopartikeln markiert werden können.

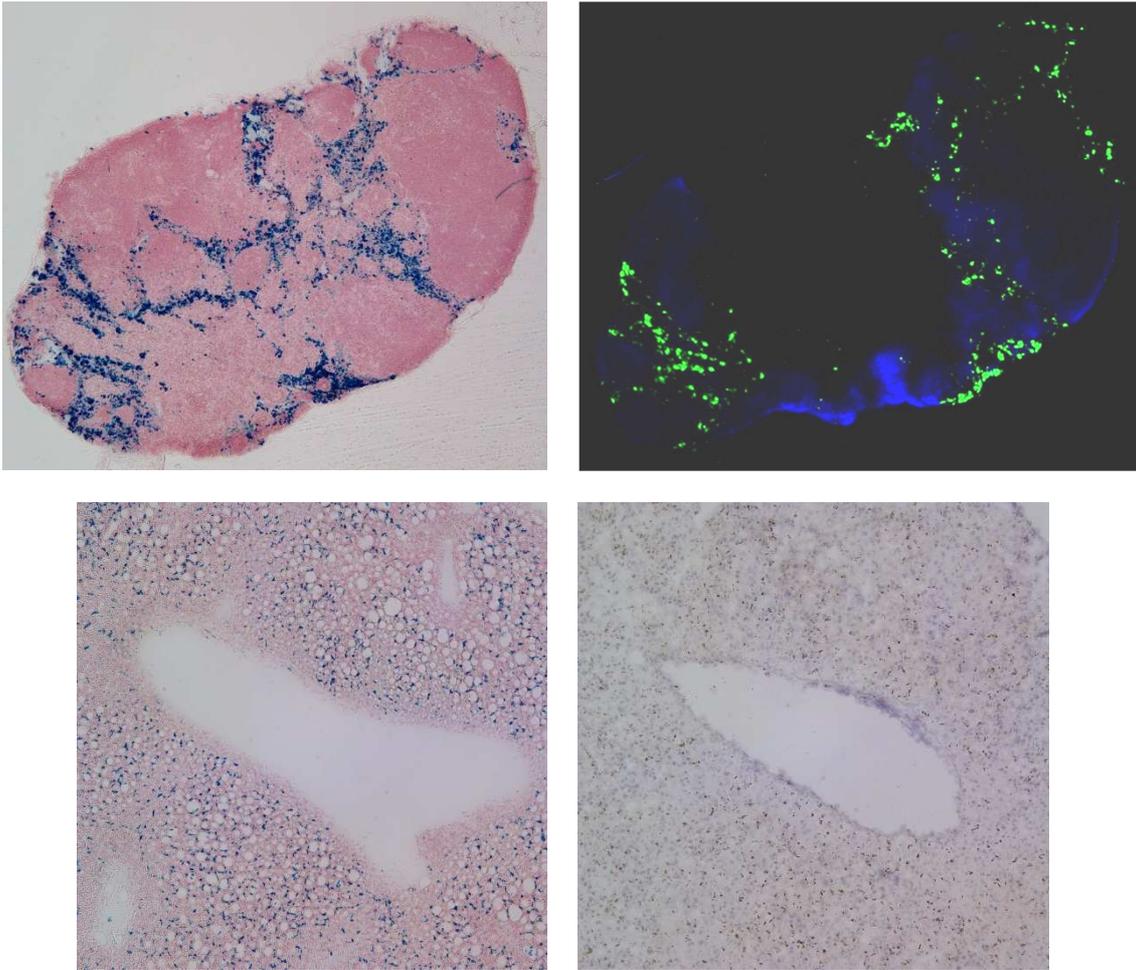


Abbildung 4.25 oben: Bei der Verwendung von **68** wurde in den Lymphknoten neben Eisen (links) Fluoreszenz aufgrund der Wechselwirkung von FITC-markiertem Streptavidin mit Biotin nachgewiesen (rechts). **Unten:** Die Behandlung der Leber mit Streptavidin und DAB zeigte eine unspezifische Bindung durch endogenes Biotin.

5. Experimenteller Teil

5.1. Arbeitsmethoden

5.1.1. Generelle Versuchsdurchführung

Für die Größenausschlusschromatographie wurde Sephadex G25 der Firma Fluka verwendet. Als Laufmittel wurde, wenn nicht anders angegeben, destilliertes Wasser benutzt. Als allgemeine Reinigungsmethode für Eisenoxid-Nanopartikel wurde die Fällung der Partikel aus einer wässrigen Lösung durch Zugabe eines organischen Lösemittels entwickelt. Der ausgefallene braun-schwarze Feststoff wurde mit einem starken permanenten Magneten am Kolbenboden gesammelt, wobei dies durch den in der Lösung enthaltenen magnetischen Rührstab noch beschleunigt wurde. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, der schwarze Rückstand mit organischem Lösemittel versetzt und 5-10 min bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden die Partikel wiederum am Magneten gesammelt und das organische Lösemittel abdekantiert. Dieser Vorgang wurde mehrmals mit Ethanol wiederholt und durch die Wiederaufnahme der Kolloide in Wasser beendet. Generell wurde hierfür 150-200 % des Volumens der eingesetzten Kolloidlösung benötigt.

Die Dialyse der Reaktionslösungen wurde mit den Dialyseschläuchen Visking (**M**olecular **W**eight **C**ut **O**ff (MWCO) von 14 kDa) und Nadir® (MWCO von 10-20 kDa) der Firma Roth gegen destilliertes Wasser durchgeführt. Dadurch vergrößerte sich das Volumen der Suspension um bis zu 100 %. Bei der Synthese von SPIO und CLIO-NH₂ konnte der Fortschritt der Dialyse durch den Nachweis von Chloridionen in der Lösung mit Silbernitratlösung kontrolliert werden. Erfahrungsgemäß genügte jedoch eine 3-4 stündige Dialyse.

Zur Abtrennung von Nebenprodukten wurde eine Megafuge 1.0 der Firma Heraeus (max. Beschleunigung: 4300 g) und zur Isolierung der Partikel eine Microzentrifuge Galaxy 16DH von VWR international mit einer maximalen Beschleunigung von 16000 g benutzt. Bei letzterem wurde das schwarze Zentrifugat mit wenig Wasser versetzt, um 24 h bei Raumtemperatur aufzuquellen, ehe die Partikel in einem größeren Volumen suspendiert wurden.

Für die weitere Reinigung der Partikellösung standen Rotilabo® CME-Spritzenfilter der Firma Roth mit einer Porengröße von 0.45 und 0.22 µm zur Verfügung. Diese wurden bei der Filterung mit destilliertem Wasser nachgespült, so dass das

Endvolumen der fertigen Kolloidsuspension leicht erhöht wurde.

Die Eisenkonzentration der dargestellten Kolloidlösungen wurde mit einer in der Diplomarbeit^[36] entwickelten UV-spektroskopischen Methode bestimmt. Durch die Messung der Absorption des Eisen(II)-Phenanthrolin-Komplexes, der aus 20-70 mg der Suspension gewonnen wurde, konnte anhand der Eichgerade $y = 0.023x - 0.0123$ ($R^2 = 0.99$) der Eisengehalt berechnet werden.

Zur Durchführung der Elementaranalysen wurde je nach Konzentration 0.5-2.0 ml der Kolloid-Suspension am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene schwarze Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet.

5.1.2. Analytische Methoden

Die Elementaranalysen (C, H, N, S) wurden mit Hilfe eines Vario Micro Cube der Firma Elementar Analysensysteme GmbH vom analytischen Service des Instituts für Anorganische Chemie durchgeführt. Die hydrodynamischen Durchmesser der Eisenoxid-Nanopartikel wurden an einem FPAR-1000, Fiber-Optics Particle Analyzer der Firma Photal Otsuka Electronics gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mittels der „Molecular Weight Conversion Distribution“ Methode (Wt. Conv. Distribution) ausgewertet. Die UV-Analysen wurden an einem Helios Epsilon der Firma Thermo Scientific und einem 8453 UV/Vis-Diodenarray-Spektrophotometer der Firma Agilent durchgeführt.

5.1.3. Spektroskopische Methoden

Für Kernspinresonanz-Messungen stand das Spektrometer Bruker Avance 400 (^1H , Messfrequenz 400.1 MHz; ^{13}C , Messfrequenz 100.6 MHz) zur Verfügung. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandenkoppelt aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die üblichen Standards TMS (^1H , ^{13}C) und sind auf der δ -Skala in ppm angegeben.

Die Relaxivitäten wurden im Arbeitskreis Jakob am Institut für Experimentelle Physik V bestimmt. T1 wurde mit einem Multi-Spin-Echo-Verfahren, T2 mit einer CPMG-Sequenz (Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz) bestimmt.

Die Messung der Fluoreszenz wurde an einem PTI QM4-2003 Fluoreszenzspektrometer mit R928 Photomultiplier, GL-3300 Stickstofflaser und GL302 Farbstofflaser durchgeführt. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde von Dr. Andreas Steffen an einer Apparatur von Edinburgh Instruments bestimmt. Die Fluoreszenz-

mikroskopie sowie die Auswertung der *in vivo* Versuche wurde von Frau E. Bauer am DZHI durchgeführt.

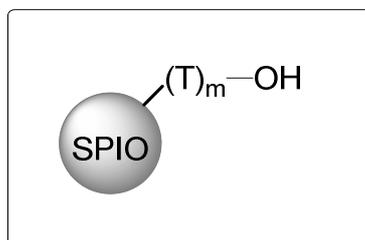
5.1.4. Lösungsmittel und Ausgangsverbindungen

Destilliertes Wasser sowie Ethanol wurde ohne weitere Aufreinigung benutzt. DMSO und DMF wurden in pro analysis Qualität eingesetzt.

Die verwendeten Chemikalien waren größtenteils handelsübliche Produkte der Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck und Invitrogen und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Farbstoffe FITC, RBITC, TAMRA-SE und TAMRA-X-SE wurden als gemischte Isomere eingesetzt, die die Verlinkungsfunktionen an der 5- und 6-Position trugen. Zur Vereinfachung der Reaktionsschemata wurde nur das 5-Isomer dargestellt. Der Farbstoff TAMRA-Maleimid lag im Arbeitskreis als Acetonlösung unbekannter Konzentration vor.

5.2. Synthesen

Optimierung der Synthese von SPIO (*superparamagnetic iron oxides*)



Aufbauend auf der Diplomarbeit^[36] erfolgte die Synthese von SPIO mit Dextran T5 (1), T20 (3) und T40 (6) in Anlehnung an das Patent von Josephson^[69].

AAV 1 - Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Synthese von SPIO:

Dextran wurde unter Erwärmen in 20 ml N₂-gesättigtem Wasser gelöst. Zu der klaren, farblosen Lösung wurden 10 ml einer hellbraunen FeCl₃·6 H₂O-Lösung (2.7 g, 10.0 mmol) und 6 ml einer mit Salzsäure versetzten, frisch hergestellten, hellgrünen FeCl₂·4 H₂O-Lösung (1.2 g, 6.0 mmol) hinzugegeben. Eisenoxide wurden durch Hinzutropfen einer 6 %igen Ammoniaklösung bei RT gefällt. Bei pH 4-5 bildete sich eine braune, zähe Masse, die sich bei weiterer Basenzugabe bis zu pH 10-11 in eine schwarze Suspension verflüssigte. Diese wurde innerhalb 1 h auf 80 °C erwärmt und eine weitere Stunde bei 80 °C im basischen Milieu gerührt. Nach Abkühlen wurden die Kolloide mit 20 ml einer 13 %igen Natriumhypochloritlösung oxidiert und 68 h bei RT gerührt.

Versuch 1: 2a

Eine Lösung von SPIO-T5 (2a*), das nach **AAV 1** mit Dextran T5 (1) in der vorausgehenden Diplomarbeit synthetisiert wurde, wurde 1 h bei 13000 g in mehreren Teilen zentrifugiert. Man erhielt 70 ml einer Lösung von 2a.

Ausbeute: 70 % Eisen (10.5 mmol, 0.150 M)

CHN-Analyse: C 8.75 %, H 1.70 %

Versuch 2: 2b

Die Durchführung von **AAV 1** erfolgte mit Dextran T5 (1, 9.5 g, 1.9 mmol). Bei der anschließenden Aufarbeitung wurde die Suspension 1 h bei 4000 g zentrifugiert, 6 h bis zur pH-Neutralität dialysiert und zweimal bei 13000 g für jeweils 1 h zentrifugiert.

Zuletzt wurde die Lösung durch 0.45 und 0.22 μm Filter aufgereinigt, was 50 ml einer schwarzen Suspension von SPIO-T5 (**2b**) ergab.

Ausbeute: 38 % Eisen (5.6 mmol, 0.113 M)

CHN-Analyse: C 10.91 %, H 2.34 %

Versuch 3: 2c

Versuch 1 wurde wiederholt. Die dialysierte Kolloidlösung wurde mit Wasser verdünnt und zweimal in mehreren Chargen bei 13000 g zentrifugiert. Nach der 1. und 2. Zentrifugation wurden jeweils CHN-Analysen durchgeführt.

Ausbeute: 73 % Eisen (11.0 mmol, 0.110 M)

CHN-Analyse: I: C 11.98 %, H 2.21 %

II : C 8.53 %, H 1.69 %

Versuch 4: 4a

In Anlehnung an **AAV 1** wurde die Umsetzung mit Dextran T20 (**3**, 1.0 g, 57 μmol) durchgeführt. Durch Zentrifugation bei 13000 g für 1 h wurden SPIO-T20 (**4a**) als schwarzer Bodensatz isoliert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und durch 0.45 und 0.22 μm Membranen gefiltert.

Ausbeute: 13 % Eisen (2.1 mmol, 0.042 M)

CHN-Analyse: C 9.10 %, H 1.74 %

Versuch 5: 4b

Die Synthese von SPIO-T20 mit **3** (2.0 g, 114 μmol) nach **AAV 1** und Aufreinigung analog zu Versuch 3 ergab eine Ausbeute von 30 %.

Ausbeute: 30 % Eisen (4.8 mmol, 0.096 M)

CHN-Analyse: C 13.88 %, H 2.39 %

Versuch 6: 4c

3 (3.0 g, 171 μmol) wurden nach **AAV 1** mit den Eisensalzen umgesetzt. Die Partikel wurden als Zentrifugat einer stark verdünnten Stammlösung isoliert und in 50 ml destilliertem Wasser resuspendiert.

Ausbeute: 67 % Eisen (10.0 mmol, 0.200 M)

CHN-Analyse: C 12.28 %, H 2.15 %

Versuch 7: 4d-g

Gemäß **AAV 1** wurde Dextran T20 (**3**, 9.0 g, 514 μmol) eingesetzt. Die Fällung der Kolloide mit Ammoniaklösung erfolgte hierbei ohne Auftreten einer zähen Phase bei pH 4-5. Die Aufarbeitung der Reaktionslösung erfolgte analog zu Versuch 1, wobei beim 1. Zentrifugationsschritt nur wenig agglomeriertes Material als schwarzer Feststoff zurückblieb. Die Abtrennung des überschüssigen organischen Polymers durch Zentrifugation bei 13000 g hingegen konnte auch bei verdünnter Kolloidlösung nicht bewerkstelligt werden, da die SPIO-T20 (**4d**) nicht als Bodensatz ausfielen.

Eine Probe der dialysierten Kolloide wurde mittels Größenausschlusschromatographie mit Sephadex aufgereinigt und analysiert (**4e**). Eine zweite (2 ml) wurde in Anlehnung an Molday et. al.^[77] in eine Chromatographiesäule mit 1 cm Durchmesser gefüllt, um der sich in 1 cm Höhe vom Boden ein starker Ringmagnet befand. In dieser Ebene konnte die Ausbildung einer schwarzen Phase beobachtet werden, die mit Wasser gewaschen und getrocknet wurde (**4f**). Eine andere Probe wurde 24 h auf einem starken Magneten platziert. Da keine Ausfällung bemerkbar war, wurde die Lösung mit Ethanol versetzt, worauf sich augenblicklich ein brauner Niederschlag am Magneten bildete. Nach 10 min wurde die überstehende Lösung abdekantiert und der schwarze Bodensatz zur Charakterisierung in Wasser aufgenommen (**4g**).

CHN-Analyse: **4d**: C 34.65 %, H 5.57 %

4e: C 35.14 %, H 5.33 %

4f: C 34.71 %, H 5.61 %

4g: C 33.71 %, H 5.73 %

AAV 2 - Aufreinigung von Eisenoxid-Nanopartikel durch magnetische Fällung:

Die nach **AAV 1** hergestellten SPIO wurden durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels aus der wässrigen Suspension gefällt und mittels eines starken Magneten am Glasboden gesammelt. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, die zurückgebliebene schwarze, zähe Masse auf dieselbe Weise mit dem organischen Lösemittel gereinigt und anschließend in Wasser resuspendiert.

Versuch 8: 5a

SPIO-T5 wurden nach **AAV 1** mit Dextran T5 (8.3 g, 1.7 mmol) hergestellt. Die dialysierte, schwarze Partikellösung (120 ml) wurde in mehreren Chargen 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Kolloide erhielt man 80 ml einer

schwarzen Lösung von **5a***. Da die überstehende Lösung noch eine dunkelbraune Farbe auswies, wurde diese unter Rühren mit Ethanol versetzt. Nach 50 ml des organischen Lösemittels setzte eine braune Trübung ein und an der Eintropfstelle bildeten sich weiße Schlieren. Die ausgefallenen schwarzen Kolloide wurden mit einem Magneten am Kolbenboden isoliert und die überstehende, trübe Lösung abdekantiert. Die Nanopartikel wurden in 20 ml Wasser aufgenommen und mit **5a*** vereinigt. Anschließend wurde diese Suspension mit 170 ml DMSO/EtOH-Gemisch vermischt und die Kolloide erneut als dunkelbrauner Niederschlag am Magneten abgetrennt. Der schwarze Feststoff wurde nochmals mit 100 ml DMSO/EtOH und zweimal EtOH gemäß **AAV 2** gewaschen und in Wasser resuspendiert.

5a*: Ausbeute: 87 % Eisen (13.9 mmol, 0.139 M)

CHN-Analyse: C 10.40 %, H 1.85 %

5a: Ausbeute: 75 % Eisen (12.0 mmol, 0.120 M)

CHN-Analyse: C 12.34 %, H 2.49 %

Versuch 9: 5b

Gemäß **AAV 1** wurden $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (2.7 g, 10.0 mmol) und FeCl_2 (1.0 g, 5.0 mmol) mit **1** (7.5 g, 1.5 mmol) zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde mit 300 ml DMSO versetzt und 72 h auf einem starken Magneten ruhen gelassen. Der ausgefallene schwarze Feststoff wurde in Wasser aufgenommen und charakterisiert.

Ausbeute: 80 % Eisen (11.5 mmol, 0.100 M)

CHN-Analyse: C 8.05 %, H 1.50 %

Versuch 10: 5c

In Anlehnung an **AAV 1** wurde Dextran T5 (**1**, 7.5 g, 1.5 mmol) als Hüllmaterial verwendet. Die Kolloide wurden nach **AAV 2** mit 200 ml DMSO/EtOH (2:1) isoliert und nach einer vierstündigen Dialyse charakterisiert.

Ausbeute: 75 % Eisen (12.0 mmol, 0.120 M)

CHN-Analyse: C 11.72 %, H 2.10 %, N 0.13 %, S 0.22 %

Versuch 11: 5d

Die mit **1** (7.5 g, 1.5 mmol) nach **AAV 1** hergestellten Eisenoxid-Nanopartikel wurden durch Zugabe von 250 ml DMSO/EtOH (2:1) gefällt. Anschließend wurde der schwarze Rückstand mit demselben Lösungsmittelgemisch und fünfmal mit Ethanol

in Anlehnung an **AAV 2** gewaschen. Das zähflüssige Gel wurde in Wasser aufgenommen, 4 h dialysiert und in mehreren Chargen 30 min bei 13000 G zentrifugiert. Die Resuspendierung in Wasser und Filterung durch eine 0.45 µm Membran ergab SPIO-T5 (**5d**).

Ausbeute: 92 % Eisen (14.8 mmol, 0.145 M)

CHN-Analyse: C 8.49 %, H 1.63 %, N 0.29 %

Versuch 12: 5e

AAV 1 wurde unter Verwendung von Dextran T20 (**3**, 3.0, 171 µmol) durchgeführt. Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 4000 g für 30 min abgetrennt. Die Eisenoxid-Nanopartikel wurden mit 250 ml DMSO/EtOH (2:1) aus der schwarzen Lösung gefällt und mit DMSO/EtOH (1:1) und dreimal Ethanol gewaschen. Durch Wiederaufnahme in Wasser und 0.45 µm-Filterung wurden 100 ml einer wässrigen Suspension von SPIO-T20 (**5e**) erhalten.

Ausbeute: 82 % Eisen (13.2 mmol, 0.132 M)

CHN-Analyse: C 15.29 %, H 2.76 %

Versuch 13: 5f

Die Durchführung der Synthese mit anschließender Zentrifugation erfolgte analog zu Versuch 11. Zur Abtrennung des ungebundenen Dextrans wurde die schwarze Suspension mit 200 ml DMSO/EtOH (2:1) versetzt, der schwarze Niederschlag an einem Magneten gesammelt und dreimal mit 150 ml Ethanol gemäß **AAV 2** versetzt. Die Aufnahme in Wasser ergab **5f**.

Ausbeute: 89 % Eisen (14.2 mmol, 0.129 M)

CHN-Analyse: C 12.44 %, H 2.29 %, N 0.22 % S 0.22 %

Versuch 14: 5g

Durch die Durchführung von **AAV 1** im Beisein von Dextran T40 (**6**) (1.5 g, 38 µmol) wurden SPIO-T40 (**5g**) synthetisiert. Die Abtrennung von Dextran wurde analog zu **AAV 2** mit jeweils 200 ml DMSO/EtOH 3:1, DMSO/EtOH 2:1 (zweimal) und Ethanol (dreimal) durchgeführt. Aus der erhaltenen Suspension wurden Agglomerate durch Zentrifugation bei 4000 g für 30 min abgetrennt. Durch die anschließende, fünfstündige Dialyse wurden 140 ml einer Suspension von SPIO-T40 (**5g**) erhalten.

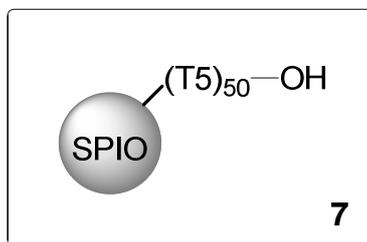
Ausbeute: 85 % Eisen (13.6 mmol, 0.097 M)

CHN-Analyse: C 10.02 %, H 1.80 %

AAV 3 - Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Synthese von SPIO:

Gemäß **AAV 1** wurde Dextran mit Eisensalzen zu SPIO umgesetzt. Die Kolloide wurden durch Zugabe von 200 ml DMSO/EtOH 2:1 als brauner Niederschlag gefällt und anschließend mit einem starken Magneten als Bodensatz isoliert. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der schwarze Rückstand unter Ausführung von **AAV 2** mit je 200 ml DMSO/EtOH (2:1), DMSO/EtOH (1:1) und dreimal EtOH auf dieselbe Weise gewaschen. Die SPIO wurden in 80 ml Wasser resuspendiert und 15 min bei 4000 g zentrifugiert. Die überstehende, schwarze Suspension wurde über einen Spritzenfilter vom Bodensatz getrennt und nach 3-4 stündiger Dialyse in mehreren Chargen 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in insgesamt 80-90 ml Wasser resuspendiert und mit 0.45 und 0.22 μm Filtern von Agglomeraten gereinigt.

Darstellung von SPIO-T5 (7)



Versuch 15: 7a

Aus Eisen(II)-, Eisen(I)-chloriden und Dextran T5 (**1**, 7.5 g, 1.5 mmol) wurden gemäß **AAV 3** 100 ml einer SPIO-T5-Suspension synthetisiert.

Ausbeute: 88 % Eisen (14.0 mmol, 0.140 M)

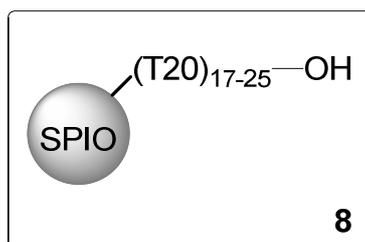
CHN-Analyse: C 8.13 %, H 1.68 %

Versuch 16: 7b

Analog zu Versuch 15 wurden 130 ml einer schwarzen Suspension von **7b** erhalten.

Ausbeute: 89 % Eisen (14.2 mmol, 0.109 M)

CHN-Analyse: C 8.44 %, H 1.59 %

Synthese von SPIO-T20 (8)**Versuch 17: 8a**

SPIO-T20 (**8a**) wurde in Anlehnung an **AAV 3** mit Dextran T20 (**3**, 3 g, 171 μ mol) dargestellt.

Ausbeute: 88 % Eisen (14.0 mmol, 0.140 M)

CHN-Analyse: C 9.46 %, H 2.01 %

Versuch 18: 8b

Die Wiederholung von Versuch 17 mit einer geringen Zugabe von Wasser vor der abschließenden Zentrifugation erbrachte 120 ml einer Suspension von **8b**.

Ausbeute: 76 % Eisen (12.2 mmol, 0.102 M)

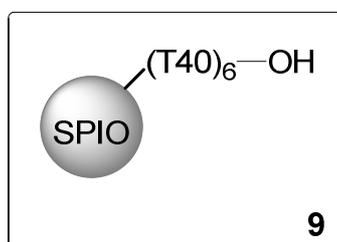
CHN-Analyse: C 13.32 %, H 2.52 %

Versuch 19: 8c

Analog zu Versuch 17 wurde **8c** mit einer starken Verdünnung vor der Zentrifugation dargestellt.

Ausbeute: 89% Eisen (14.3 mmol, 0.119 M)

CHN-Analyse: C 8.70 %, H 1.70 %

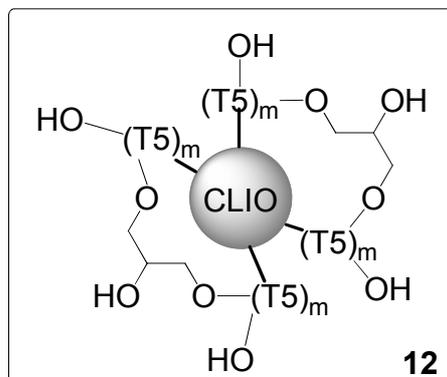
Synthese von SPIO-T40 (9)**Versuch 20:**

Die Durchführung von **AAV 3** erfolgte mit Dextran T40 (**6**, 1.5 g, 38 μ mol). Man erhielt 120 ml einer Suspension von SPIO-T40 (**9**).

Ausbeute: 59 % Eisen (9.5 mmol, 0.079 M)

CHN-Analyse: C 8.44 %, H 1.59 %

Synthese von CLIO-T5 (12)



Versuch 21: 12a

Zu einer Lösung aus SPIO-T5 (**2a**, 20.0 ml, 3.00 mmol Fe, 0.36 mmol Glucosemonomer) wurden 25 ml einer 5 M Natronlauge und Epichlorhydrin (10.0 ml, 11.8 g, 127.5 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 5 h dialysiert. Die auf 10 ml eingengte Suspension wurde mittels Chromatographie mit Sephadex G25 (Laufmittel H₂O/konz. NH₃ 100:1) gereinigt.

Ausbeute: 72 % Eisen (2.2 mmol, 0.086 M)

CHN-Analyse: C 41.34 %, H 6.46 %

Versuch 22: 12b

10.0 ml einer Lösung von **2b** (1.10 mmol Fe, 0.19 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.4 ml 2 M NaOH versetzt. Nach 20 min wurden 0.5 ml Epichlorhydrin (0.6 g, 6.5 mmol) und nach weiteren 2.5 h wurden nochmals 1.6 ml 2 M NaOH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h auf 45 °C erhitzt und anschließend 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer vierstündigen Dialyse wurde die Suspension chromatographisch mit Sephadex G25 (Laufmittel H₂O/konz. NH₃ 100:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 77 % Eisen (0.85 mmol, 0.085 M)

CHN-Analyse: C 10.63 %, H 2.28 %

Versuch 23: 12c

Zu einer Lösung von **2b** (7.0 ml, 0.77 mmol Fe, 0.13 mmol Glucosemonomer) wurden 13 ml Wasser, 4.6 ml 2 N Natronlauge und nach 30 min 0.5 ml Epichlorhydrin (0.6 g, 6.5 mmol) hinzugegeben. Nach 24 h wurde die Suspension für 3.5 h dialysiert und anschließend mit Sephadex G25 (Laufmittel H₂O/konz. NH₃ 80:1) chromatographisch und durch 0.45 und 0.22 µm Filter gereinigt.

Ausbeute: 71 % Eisen (0.55 mmol, 0.055 M)

CHN-Analyse: C 22.46 %, H 4.66 %

Versuch 24: 12d

10.0 ml einer Lösung von **2c** (1.10 mmol Fe, 0.13 mmol Glucosemonomer) wurden mit 3 ml 2 N NaOH versetzt. Nach 45 min wurden 0.1 ml Epichlorhydrin (118 mg, 1.3 mmol) hinzugegeben. Diese Zugabe derselben Menge von Epichlorhydrin wurde nach 1 h, 2 h und 3 h wiederholt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend 4 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Die überstehende, klare Lösung wurde abgenommen, der schwarze Rückstand in Wasser resuspendiert und durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran gefiltert. Man erhielt 25 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 95 % Eisen (1.05 mmol, 0.042 M)

CHN-Analyse: C 9.32 %, H 1.55 %

Versuch 25: 12e

Analog zu Versuch 24 wurde **2c** mit 2.3 ml 2 N NaOH umgesetzt. Epichlorhydrin (0.3 ml, 0.35 g, 3.8 mmol) wurde in drei Portionen je 0.1 ml in Abständen von jeweils einer Stunde hinzugegeben. Die schwarze Lösung wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung wurde mit einer fünfstündigen Dialyse und Zentrifugation bei 13000 g für 30 min bewerkstelligt. Anschließend wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen. Auch nach 1 h im Ultraschallbad konnten die Kolloide nicht gänzlich in Lösung gebracht werden und wurden unter hohen Verlusten durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran gefiltert. Da die erhaltene Suspension nach einigen Minuten wieder ausfiel, wurde der Versuch abgebrochen.

Versuch 26: 12f

Der Versuch 25 wurde unter einmaliger Zugabe des Epichlorhydrins wiederholt.

Ausbeute: 85 % Eisen (0.94 mmol, 0.094 M)

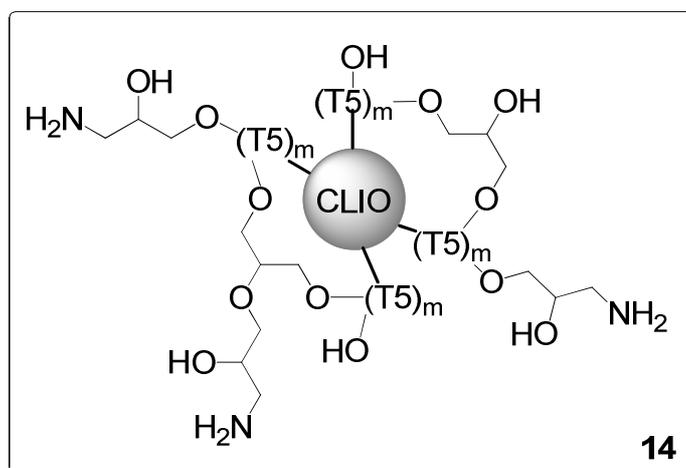
CHN-Analyse: C 8.59 %, H 1.58 %

Versuch 27: 12g

Die Durchführung der Synthese von **12g** erfolgte mit **2c** (11.0 ml, 1.21 mmol Fe, 0.15 mmol Glucosemonomer) und 3 ml 2 N NaOH. Nach einer Stunde wurden 0.5 ml Epichlorhydrin (0.6 g, 6.4 mmol) hinzugegeben und die Lösung 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer vierstündigen Dialyse wurde die Partikel durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 g als schwarzer Rückstand isoliert und nach Resuspendierung in Wasser mittels einer 0.22 µm Membran gefiltert.

Ausbeute: 100 % Eisen (1.21 mmol, 0.134 M)

CHN-Analyse: C 8.49 %, H 1.74 %

Synthese von CLIO-NH₂-T5 (14)**Versuch 28: 14a**

Zu einer Lösung von **12a** (10.0 ml, 0.86 mmol Fe, 0.10 mmol Glucosemonomer nach **2a**) wurden 3.0 ml konz. Ammoniak (**13**, 0.7 g, 37.7 mmol) und 1.0 ml Epichlorhydrin (**11**, 1.2 g, 12.8 mmol) hinzugegeben. Die schwarze Suspension wurde 14 h bei 35 °C gerührt und anschließend dialysiert. Nach Entnahme einer Probe für die Elementaranalyse wurde die Lösung chromatographisch an Sephadex G25 aufgereinigt und 2 h bei 13000 g zentrifugiert. Da hierbei die Kolloide nicht als Bodensatz isoliert werden konnten wurde der Versuch abgebrochen.

CHN-Analyse nach Dialyse: C 42.48 %, H 7.45 %, N 6.58 %

CHN-Analyse nach Chromatographie: C 43.80 %, H 7.32 %, N 4.86 %

Versuch 29: 14b

12b (4.6 ml, 0.39 mmol Fe, 0.07 mmol Glucosemonomer) wurde mit Natronlauge (1.0 ml, 2.0 mmol) auf 40°C erhitzt. Nach 10 Minute wurde Epichlorhydrin (0.2 ml, 0.24 g, 2.6 mmol) und nach weiteren 10 min wurde Ammoniak (0.5 ml, 0.11 g, 6.3 mmol) hinzugegeben. Die Zugabe derselben Menge an Ammoniak wiederholte sich nach 2 h. Das Reaktionsgemisch wurde 21 h bei 40 °C gerührt, anschließend 9 h dialysiert, chromatographisch an Sephadex G25 (Laufmittel H₂O/NH₃ 100:1) aufgereinigt und durch 0.45 und 0.22 µm Membranen gefiltert.

Ausbeute: 51 % Eisen (0.20 mmol, 0.040 M)

CHN-Analyse: C 14.33 %, H 2.82 %, N 1.98 %

Versuch 30: 14c

Der Versuch 29 wurde unter der Zugabe der doppelten Menge an Natronlauge, Ammoniak und Epichlorhydrin wiederholt.

Ausbeute: 61 % Eisen (0.28 mmol, 0.028 M)

CHN-Analyse: C 17.64 %, H 3.23 %, N 2.97 %

Versuch 31: 14d

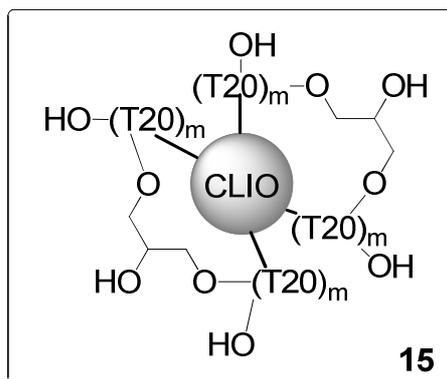
12d (10.0 ml, 0.54 mmol Fe, 0.08 mmol Monomer) wurde mit 0.4 ml 2 N NaOH versetzt. Nach 30 min wurde Epichlorhydrin (0.3 ml, 0.35 g, 3.8 mmol) und nach weiteren 30 min Ammoniak (60 µL, 13.7 mg, 758 µmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und ausgehend von einem pH-Wert 7-8 durch eine siebenstündige Dialyse neutralisiert. Die Kolloide wurde mittels Zentrifugation isoliert, in Wasser aufgenommen und mit 0.22 µm Filter gereinigt.

CHN-Analyse: C 8.71 %, H 1.65%, N 0.18 %

Versuch 32: 14e

Versuch 31 wurde nochmals mit einer erhöhten Menge an Ammoniak (0.6 ml, 137 mg, 7.6 mmol) durchgeführt. Die Dialyse erfolgte hierbei von pH 9-10 bis zu einem pH-Wert von 8-9.

CHN-Analyse: C 9.83 %, H 1.82%, N 0.77 %

Synthese von CLIO-T20 (15)**Versuch 33: 15a**

9.0 ml einer Lösung von SPIO-T20 (**4a**, 0.42 mmol Fe, 0.06 mmol Glucosemonomer) wurden mit 0.7 ml 2 N NaOH und nach einer Stunde mit 0.25 ml Epichlorhydrin (**11**, 0.3 g, 3.2 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, 8 h dialysiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in Wasser resuspendiert und mittels Filterung aufgereingt.

CHN-Analyse: C 8.62 %, H 1.57 %

Versuch 34: 15b

Zu einer Lösung von **4a** (9.0 ml, 0.38 mmol Fe, 0.05 mmol Glucosemonomer) wurden 50 μ L 2 N NaOH und nach 45 min 0.2 ml Epichlorhydrin (236 mg, 2.6 mmol) gegeben. Nach 15 h wurde die Lösung dialysiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wurde in Wasser suspendiert und durch 0.45 und 0.22 μ m Filter gereinigt.

CHN-Analyse: C 8.27 %, H 1.50 %

Versuch 35: 15c

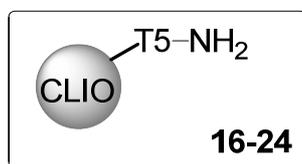
Die Umsetzung von **4b** (10.0 ml, 0.96 mmol Fe, 0.23 mmol Glucosemonomer) erfolgte mit 50 μ L 2 N NaOH. Nach einer Stunde wurden 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 13.0 mmol) hinzugegeben und die Lösung 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer sechsständigen Dialyse wurde die Suspension zentrifugiert, der schwarze Rückstand in Wasser aufgenommen und durch eine 0.22 μ m Membran gefiltert.

CHN-Analyse: C 8.23 %, H 1.52 %

Versuch 36: 15d

Der Versuch 35 wurde mit 5 ml einer 2 N Natronlauge wiederholt.

CHN-Analyse: C 8.52 %, H 1.56 %

**Synthese von CLIO-NH₂-T5 (16) durch einmalige Zugabe der Edukte****Versuch 37: 16a**

10.0 ml einer SPIO-T5-Lösung (2.40 mmol Fe, 0.32 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.3 ml 2 N NaOH (**10**, 2.6 mmol) und 0.24 ml Epichlorhydrin (**11**, 0.3 g, 3.1 mmol) versetzt. Nach 5 h wurden 2.4 ml konz. Ammoniak (**13**, 0.5 g, 30.3 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und dialysiert. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 13000 g wurde das Zentrifugat in Wasser aufgenommen und durch 0.45 und 0.22 µm Filter aufgereinigt. Nach Entnahme einer Probe für die Elementaranalyse wurde die Suspension erneut durch Zentrifugation auf die beschriebene Weise aufgereinigt.

Ausbeute: 76 % Eisen (1.83 mmol, 0.073 M)

a) CHN-Analyse (1. Zentrifugation): C 10.07 %, H 1.91 %, N 0.94 %

b) CHN-Analyse (2. Zentrifugation): C 8.99 %, H 1.78 %, N 0.59 %

Versuch 38: 16b

17.0 ml einer zu **2a** analogen SPIO-T5-Lösung (4.08 mmol Fe, 0.55 mmol Glucosemonomer) wurden mit 0.5 ml Epichlorhydrin (590 mg, 6.4 mmol) und 3.0 ml NaOH (2 N, 6.0 mmol) versetzt. Nach 1 h wurden 1.0 ml Ammoniak (228 mg, 12.6 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und dialysiert. 1-2 ml dieser Lösung wurden für eine Elementaranalyse abgetrennt und die verbleibenden 30 ml 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in Wasser resuspendiert und es wurden nochmals 2 ml für eine Elementaranalyse entnommen. Die erhaltene Suspension wurde aufgeteilt und auf einer Chromatographiesäule mit 3 cm bzw. 6 cm Durchmesser mit Sephadex G25 gereinigt. Man erhielt 25 ml einer 0.09 M und 17 ml einer 0.08 M Lösung.

Gesamtausbeute: 88 % Eisen (3.61 mmol)

a) CHN-Analyse (nach Dialyse): C 24.26 %, H 4.70 %, N 4.00 %

b) CHN-Analyse (Durchmesser 3 cm): C 9.21 %, H 1.73 %, N 0.50 %

c) CHN-Analyse (Durchmesser 6 cm): C 12.31 %, H 2.17 %, N 0.50 %

Versuch 39: 16c

Zu einer SPIO-T5-Lösung (10.0 ml, 2.40 mmol Fe, 0.32 μ mol Glucosemonomer) wurden 3.0 ml 2 N NaOH und 0.5 ml Epichlorhydrin (590 mg, 6.4 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 0.55 ml Ammoniak (125 mg, 7.0 mmol) versetzt. Nach weiteren 20 h wurde die Lösung 3 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in Wasser resuspendiert und durch 0.45 und 0.22 μ m Membran gefiltert. Anschließend wurde eine Probe für die Elementaranalyse entnommen und diese Prozedur wiederholt. 3 ml der erhaltenen Suspension wurden mit Sephadex G25 chromatographiert (Laufmittel H₂O/NH₃ 40:1) und für eine weitere Elementaranalyse eingesetzt.

a) CHN-Analyse (1. Zentrifugation): C 10.69 %, H 2.02 %, N 1.06 %

b) CHN-Analyse (2. Zentrifugation): C 10.92 %, H 2.10 %, N 0.76 %

c) CHN-Analyse (Chromatographie): C 9.29 %, H 1.94 %, N 0.51 %

Versuch 40: 16d

10.0 ml einer SPIO-T5-Lösung von **5a*** (1.39 mmol Fe, 0.22 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.0 ml 2 N Natronlauge und nach 1 h mit 0.4 ml Epichlorhydrin (472 mg, 5.1 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und nochmals mit derselben Menge an Epichlorhydrin versetzt. Nach 1 h wurde Ammoniak (0.2 ml, 46 mg, 2.5 mmol) hinzugegeben und die Lösung erneut 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde 5.5 h bis zu pH 7 dialysiert und 40 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Partikel wurden in 8 ml Wasser resuspendiert und durch eine 0.22 μ m Membran gefiltert.

CHN-Analyse: C 10.64 %, H 1.93 %, N 0.23 %

Versuch 41: 16e

Versuch 40 wurde mit 2.0 ml Ammoniak (455 mg, 25.3 mmol) durchgeführt.

CHN-Analyse: C 12.64 %, H 2.27 %, N 1.31 %

Versuch 42: 16f

5b (10.0 ml, 1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurde mit 1 ml 2 N NaOH versetzt. Nach 1 h erfolgte die Zugabe von Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol), woraufhin die Lösung 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach zweimaliger Fällung mit DMSO/EtOH und dreimaligem Waschen mit Ethanol sowie einer vierstündigen Dialyse wurden die Partikel in Wasser resuspendiert. Die Filterung (0.45 µm) ergab 6.7 ml einer Lösung von **16f**.

CHN-Analyse: C 8.38 %, H 1.75 %, N 0.18 %

Versuch 43: 16g

5a (10.0 ml, 1.20 mmol Fe, 0.24 mmol Glucosemonomer) wurde mit 2.5 ml 2 N NaOH und nach 15 min mit Epichlorhydrin (2.5 ml, 3.0 g, 31.9 mmol) versetzt. Nach weiteren 15 min erfolgte die Zugabe von Ammoniak (8.0 ml, 1.8 g, 101.1 mmol) und das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloide wurden mit einem DMSO/EtOH-Gemisch gefällt und in 20 ml Wasser resuspendiert. Nach einer dreistündigen Dialyse wurde die Suspension bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Kolloide in 6.0 ml Wasser aufgenommen.

Ausbeute: 72 % Eisen (0.86 mmol, 0.144 M)

CHN-Analyse: C 10.07 %, H 1.91 %, N 0.94 %, S 1.01 %

Versuch 44: 16h

10.0 ml von **5b** (1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurden unter Zugabe von 1.2 ml 2 N NaOH mit Epichlorhydrin (0.5 ml, 590 mg, 6.4 mmol) zur Reaktion gebracht. Nach 5 h wurde Ammoniak (4.0 ml, 910 mg, 50.6 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloide wurden als schwarzbrauner Niederschlag durch Zugabe von 20 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt und mit Ethanol gewaschen. Die Lösung wurde 3 h dialysiert und die Kolloide wurden durch Zentrifugation (30 min/13000 g) isoliert. Nach Resuspendierung in Wasser erhielt man 7.1 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 78 % Eisen (0.78 mmol, 0.110 M)

CHN-Analyse: C 9.19 %, H 1.78 %, N 0.95 %

Versuch 45: 16i

10.0 ml einer Lösung von **7** (1.10 mmol, 0.13 mmol Glucosemonomer) wurde mit 0.9 ml einer 3 N NaOH und 4.2 ml Epichlorhydrin (5.0 g, 53.6 mmol) versetzt. Nach 45 min wurden 1.6 ml Ammoniak (0.4 g, 20.2 mmol) hinzugegeben und die Lösung 66 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 100 ml DMSO/EtOH gefällt. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, der schwarze Schlamm dreimal mit 50 ml EtOH gewaschen und in 15 ml Wasser resuspendiert. Nach einer vierstündigen Dialyse wurden die Kolloide per Zentrifugation (30 min/13000 g) isoliert, in 8 ml Wasser aufgenommen und durch eine 0.45 Membran gefiltert.

Ausbeute: 87 % Eisen (1.00 mmol, 0.095 M)

CHN-Analyse: C 8.77 %, H 1.58 %, N 0.20 %

Synthese von CLIO-NH₂-T5 (17) durch mehrmalige Zugabe der Edukte**Versuch 46: 17a**

10.0 ml einer Lösung von SPIO-T5 (**2b**, 1.10 mmol Fe, 0.19 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.4 ml 2 N NaOH vorgelegt, nach 30 min mit Epichlorhydrin (0.75 ml, 885 mg, 9.6 mmol) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 3.8 ml Ammoniak (865 mg, 48.0 mmol) hinzugegeben und die Lösung wurde 2 h bei 45 °C gerührt. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch 0.4 ml Epichlorhydrin (472 mg, 5.1 mmol) zugesetzt und nach weiteren 4 h nochmals dieselbe Menge an Epichlorhydrin (0.4 ml, 472 mg, 5.1 mmol). Die Lösung wurde 18 h bei 45 °C gerührt und 5 h dialysiert. Nach Entnahme einer Probe wurden die Kolloide mittels Chromatographie an Sephadex G25 (Laufmittel: H₂O/NH₃ 167:1) aufgereinigt und man erhielt 10.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 63 % Eisen (0.66 mmol, 0.066 M)

CHN-Analyse (Dialyse): C 33.93 %, H 6.95 %, N 9.87 %

CHN-Analyse (Chromatographie): C 22.99 %, H 4.43 %, N 5.30 %

Versuch 47: 17b

Analog zu Versuch 46 wurden als erstes 2.4 ml NaOH (4.8 mmol) und 0.45 ml Epichlorhydrin (531 mg, 5.7 mmol) eingesetzt, gefolgt von 2.3 ml Ammoniak (523 mg, 29.1 mmol). Abschließend wurde die Lösung zweimal mit je 0.2 ml Epichlorhydrin (236 mg, 2.6 mmol) versetzt und wie bei Versuch 46 beschrieben aufgereinigt.

Ausbeute: 86 % Eisen (0.95 mmol, 0.079 M)

CHN-Analyse (Dialyse): C 31.79 %, H 5.96 %, N 8.79 %

CHN-Analyse (Chromatographie): C 22.16 %, H 4.47 %, N 4.79 %

Versuch 48: 17c

2c (20.0 ml, 2.20 mmol Fe, 0.27 mmol Glucosemonomer) wurde mit 6 ml 2 N Natronlauge und nach 45 min mit Epichlorhydrin (0.85 ml, 1.0 g, 10.8 mmol) umgesetzt. Die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 50 °C erhitzt und anschließend mit Ammoniak (6.0 ml, 1.4 g, 75.8 mmol) und nach 10 min mit Epichlorhydrin (0.6 ml, 0.7 g, 7.7 mmol) vermengt. Das Reaktionsgemisch wurde 7 h bei 40 °C und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Dialyse wurde die Lösung auf 10 ml eingeeengt und chromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: H₂O/NH₃ 100:1). Nach einer erneuten Reduzierung des Volumens auf 20 ml wurden die Kolloide durch 0.45 und 0.22 µm Filter gereinigt.

Ausbeute: 50 % Eisen (1.10 mmol, 0.045 M)

CHN-Analyse: C 10.15 %, H 1.97 %, N 0.98 %

Versuch 49: 17d

8.0 ml einer zu **2a** analogen SPIO-T5-Lösung von **2a'** (1.9 mmol Fe, 0.26 mmol Glucose-monomer) wurden mit 1.4 ml 2 N NaOH und 0.25 ml Epichlorhydrin (295 mg, 3.2 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 0.5 ml Ammoniak (114 mg, 6.3 mmol) und 0.1 ml Epichlorhydrin (118 mg, 1.3 mmol) vermengt. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Dialyse wurde die Suspension 1 h bei 13000 g zentrifugiert, der schwarze Rückstand wurde in 25 ml Wasser aufgenommen und durch 0.45 und 0.22 µm Filter aufgereinigt.

Ausbeute: 79 % Eisen (1.51 mmol, 0.060 M)

CHN-Analyse: C 10.00 %, H 2.01 %, N 1.06 %

Versuch 50: 17e

20.0 ml von **2a** (3.00 mmol Fe, 0.37 mmol Glucosemonomer) wurden mit 3.5 ml Natronlauge (7.0 mmol) und 0.6 ml Epichlorhydrin (708 mg, 7.7 mmol) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Da die Lösung einen pH-Wert von 4-5 aufwies, wurden nochmals 1 ml 2 N Natronlauge hinzugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 1.5 ml Ammoniak (341 mg, 19.0 mmol) und 0.25 ml

Epichlorhydrin (295 mg, 3.2 mmol) vermengt und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde 7 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und chromatographisch an Sephadex G25 gereinigt. Man erhielt 25.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 83 % Eisen (2.50 mmol, 0.100 M)

CHN-Analyse: C 8.67 %, H 1.70 %, N 0.70 %

Versuch 51: 17f

20.0 ml einer Lösung von **2a** (3.00 mmol Fe, 0.37 mmol Glucosemonomer) wurden mit 3 ml 2 N Natronlauge und 0.4 ml Epichlorhydrin (472 mg, 5.1 mmol) versetzt. Nach 2.5 h wurden erneut 0.6 ml Epichlorhydrin (708 mg, 7.7 mmol) hinzugegeben. Nach weiteren 18 h wurden 3.0 ml Ammoniak (683 mg, 37.9 mmol) hinzugefügt, das Gemisch auf 50 °C erhitzt und nochmals mit 2.0 ml Ammoniak (455 mg, 25.3 mmol) behandelt. Die Lösung wurde 8 h bei 40 °C gerührt, bevor 0.2 ml Epichlorhydrin (236 mg, 2.6 mmol) hinzugefügt wurden. Nach der Umsetzung bei Raumtemperatur für 15 h wurden nochmals 0.3 ml Epichlorhydrin (354 mg, 3.8 mmol) hinzugegeben. Die anschließende Aufreinigung erfolgte durch Dialyse und Chromatographie.

CHN-Analyse: C 10.03 %, H 2.00 %, N 0.94 %

Versuch 52: 17g

Zu 27.0 ml einer Lösung von **2c** (3.00 mmol Fe, 0.36 mmol Glucosemonomer) wurden 3.0 ml NaOH (6.0 mmol) und nach 1 h 0.4 ml Epichlorhydrin (472 mg, 5.1 mmol) hinzugegeben. Nach weiteren 1.75 h wurde die Lösung nochmals mit Epichlorhydrin (0.6 ml, 708 mg, 7.7 mmol) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Ammoniak (3.0 ml, 683 mg, 37.9 mmol) wurde das Reaktionsgemisch auf 40 °C erhitzt und nach 1.5 h erneut mit Ammoniak (2.0 ml, 455 mg, 25.3 mmol) zur Reaktion gebracht. Eine nochmalige Versetzung mit Epichlorhydrin (0.2 ml, 236 mg, 2.6 mmol und 0.3 ml, 354 mg, 3.8 mmol) erfolgte nach 5 und 23 h. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt, 6 h dialysiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 20 ml Wasser aufgenommen und durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran gefiltert. Man erhielt eine 25.0 ml einer schwarzen Suspension von **17g**.

Ausbeute: 50 % Eisen (1.10 mmol, 0.045 M)

CHN-Analyse: C 11.23 %, H 2.13 %, N 1.69 %

Darstellung von CLIO-NH₂-T5 (18-24)**Versuch 53: 18a**

10.0 ml einer Lösung von **2c** (1.10 mmol Fe, 0.13 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.2 ml 2 N NaOH vorgelegt und nach 1.5 h und 2.5 h mit Epichlorhydrin (0.3 ml, 354 mg, 3.8 mmol und 0.2 ml, 236 mg, 2.6 mmol) versetzt und anschließend 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ammoniak (1.5 ml, 341 mg, 19.0 mmol) und nach 45 min nochmals Ammoniak (1.0 ml, 228 mg, 12.6 mmol) hinzugegeben und die Lösung 6 h bei 30 °C gerührt. Nach Zugabe von Epichlorhydrin (0.3 ml, 354 mg, 3.8 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt, auf 40 °C erhitzt und mit Ammoniak (5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) versetzt. Nach fünfstündiger Reaktion wurde die Lösung dialysiert (7 h) und zentrifugiert (30 min/13000 g). Der schwarze Rückstand wurde in 13 ml Wasser aufgenommen und durch einen 0.22 µm Filter aufgereinigt. Man erhielt 25.0 ml einer Suspension von **18a**.

Ausbeute: 100 % Eisen (1.10 mmol, 0.044 M)

CHN-Analyse: C 11.23 %, H 2.10 %, N 1.70 %

Versuch 54: 18b

10.0 ml einer Lösung von **5b** (1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurden analog zu Versuch 49 unter Verwendung von 1.1 ml 2 N NaOH umgesetzt. Die schwarze Suspension wurde langsam zu 50 ml DMSO hinzugegeben, die Kolloide am Magneten gesammelt und die überstehende dunkelbraune Lösung abdekantiert. Der schwarze Rückstand wurde in 4 ml Wasser aufgenommen und durch eine 0.45 µm Membran gefiltert. Die verbleibende dunkelbraune Lösung wurde mit 20 ml DMSO und 20 ml MeOH vermischt und 20 h auf einen starken Magneten platziert. Nach Zugabe von 20 ml EtOH wurde die gelbliche Lösung vom schwarzen Bodensatz abgetrennt. Dieser wurde in Wasser aufgenommen und mit der zuvor erhaltenen Suspension vereinigt. 2 ml der Kolloidlösung wurden für eine Elementaranalyse eingeeengt. Man erhielt einen schwarzen, klebrigen Rückstand, der nicht entnommen werden konnte.

Ausbeute: 75 % Eisen (0.75 mmol, 0.150 M)

Versuch 55: 18c

5b (10.0 ml, 1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurde mit 50 μ L NaOH (2.0 mg, 50 μ mol) und nach 2 h mit 0.5 ml Epichlorhydrin (590 mg, 6.4 mmol) versetzt und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 2.5 ml Ammoniak (569 mg, 31.6 mmol) und nach weiteren 7 h Epichlorhydrin (0.4 ml, 472 mg, 5.1 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt und nochmals 24 h bei Raumtemperatur mit 5.0 ml Ammoniak (1.1 g, 63.2 mmol) zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden nach der allgemeinen Methodik mit 50 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt und dreimal mit je 20 ml EtOH gewaschen. Nach einer dreistündigen Dialyse wurde die Lösung 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 4 ml Wasser aufgenommen und nach einer Filterung (0.45 μ m) erhielt man 5.4 ml einer CLIO-NH₂-T5-Suspension.

Ausbeute: 95 % Eisen (0.95 mmol, 0.175 M)

CHN-Analyse: C 9.49 %, H 1.89 %, N 1.07 %

Versuch 56: 18d

Nach Versuch 55 wurde **5b** (0.97 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) mit 1.2 ml NaOH (2 N, 2.4 mmol), Epichlorhydrin (0.5 ml, 590 mg, 6.4 mmol) und Ammoniak (2.5 ml, 569 mg, 31.6 mmol) zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde auf 40 °C erhitzt und nach 2 h mit Epichlorhydrin (0.4 ml, 472 mg, 5.1 mmol) versetzt. Nach weiteren 5 h wurde konz. Ammoniak (5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloide wurden mit 50 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt, einmal mit 50 ml DMSO/EtOH (1:1) und zweimal mit 40 ml bzw. 30 ml EtOH gewaschen. Die Partikel wurden mit Hilfe eines Ultraschallbades in 6 ml Wasser resuspendiert, 2 h dialysiert und durch eine 0.45 μ m Membran gefiltert. Man erhielt 13.5 ml einer schwarzen Suspension, deren Eisengehalt nach der durchgeführten UV-Analyse einer zu hohen Ausbeute von 125 % entsprach.

Ausbeute: 125 % (1.21 mmol, 0.090 M)

CHN-Analyse: C 13.13 %, H 2.89 %, N 0.96 %

Versuch 57: 18e

10.0 ml **5b** (1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurden unter Rühren mit 2.2 ml NaOH (2 N, 4.4 mmol) versetzt. Nach 45 min wurden 0.4 ml Epichlorhydrin

(472 mg, 5.1 mmol) und nach 16 h 3.0 ml Ammoniak (683 mg, 37.9 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde auf 40 °C erhitzt und nach 2.5 h mit Epichlorhydrin (0.3 ml, 354 mg, 3.8 mmol) sowie nach 5 h mit Ammoniak (4.0 ml, 0.910 mg, 50.6 mmol) versetzt. Die Suspension wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden analog zu Versuch 56 mit den organischen Lösemitteln isoliert, in 4 ml Wasser aufgenommen und durch einen Spritzenfilter (0.45 µm) gereinigt.

Ausbeute: 73 % Eisen (0.73 mmol, 0.146 M)

CHN-Analyse: C 10.71 %, H 2.11 %, N 1.49%

Versuch 58: 19a

10.0 ml einer Lösung von **5c** (1.20 mmol Fe, 0.22 µmol Glucosemonomer) wurden mit 2.2 ml 2 N NaOH, 1.4 ml Epichlorhydrin (1.7 g, 17.9 mmol) und 0.1 ml Ammoniak (23 mg, 1.3 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Epichlorhydrin (0.5 ml, 0.6 g, 6.4 mmol) und nach weiteren 7 h Ammoniak (5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) hinzugegeben. Nach 23 h wurden die Partikel durch Zugabe von 30 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt und mit 10 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal mit je 20 ml EtOH gewaschen. Der schwarze, schlammige Rückstand wurde in 9 ml Wasser aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde 5.5 h dialysiert und 45 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 5 ml resuspendiert und durch eine 0.45 µm Membran gefiltert.

Ausbeute: 94 % Eisen (1.13 mmol, 0.190 M)

CHN-Analyse: C 8.13 %, H 1.64 %, N 0.80 %

Versuch 59: 19b

Der Versuch wurde analog zu Versuch 57 mit 1.4 ml Ammoniak (319 mg, 17.7 mmol) im ersten Teil der Umsetzung durchgeführt.

Ausbeute: 91 % Eisen (1.09 mmol, 0.200 M)

CHN-Analyse: C 8.41 %, H 1.95 %, N 0.83 %

Versuch 60: 19c

5b (10.0 ml, 1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurde mit 1.0 ml 2 N NaOH vorgelegt. Nach 30 min wurden 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 0.5 ml Ammoniak (0.1 g, 6.3 mmol) versetzt. Die erneute Zugabe von Epichlorhydrin (0.5

ml, 0.6 g, 6.4 mmol) und Ammoniak (4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) erfolgte nach 3 bzw. 6 h. Das Reaktionsgemisch wurde nach 18 h mit 20 ml DMSO/EtOH (1:1) vermennt. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der schwarze Niederschlag mit 10 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal mit je 15 ml EtOH gewaschen. Die Partikel wurden in Wasser aufgenommen und 3 h dialysiert. Nach einer 50-minütigen Zentrifugation bei 13000 g wurden die Kolloide als schwarzer Rückstand in 5 ml Wasser resuspendiert und gefiltert (0.45 µm).

Ausbeute: 100 % Eisen (1.00 mmol, 0.179 M)

CHN-Analyse: C 8.73 %, H 1.86 %, N 0.67 %

Versuch 61: 19d

In Anlehnung an Versuch 59 wurde **5b** (0.98 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) mit 1.0 ml Natronlauge (80 mg, 2.0 mmol), 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) und 2.0 ml Ammoniak (0.5 g, 25.3 mmol) zur Reaktion gebracht. Wie beschrieben wurde die Lösung nochmals mit Epichlorhydrin (0.5 ml, 0.6 g, 6.4 mmol) und Ammoniak (4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) versetzt und aufgereinigt.

Ausbeute: 97 % Eisen (0.95 mmol, 0.146 M)

CHN-Analyse: C 9.37 %, H 2.01 %, N 0.86 %

Versuch 62: 20a

5.0 ml einer Lösung von **5a** (0.60 mmol Fe, 0.12 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.0 ml 2 N NaOH, nach 1 h mit Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und nach weiteren 2 h mit Ammoniak (2.0 ml, 455 mg, 25.3 mmol) versetzt. Nachdem die Lösung 21 h bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde Epichlorhydrin (0.5 ml, 590 mg, 6.4 mmol) und nach 8 h Ammoniak (4.0 ml, 910 mg, 50.6 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde wiederum 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 25 ml DMSO/EtOH (1:1), 10 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal 10 ml EtOH isoliert und in 6 ml Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde 4 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in 7 ml Wasser resuspendiert und die erhaltene schwarze Lösung wurde gefiltert (0.45 µm).

Ausbeute: 66 % Eisen (0.39 mmol, 0.047 M)

CHN-Analyse: C 10.51 %, H 2.15 %, N 0.70 %

Versuch 63: 20b

Die Reaktion wurde analog zu Versuch 62 durchgeführt, wobei die erste Zugabe von Ammoniak nach 4 h erfolgte. Bis zur darauf folgenden Versetzung mit Epichlorhydrin wurde die Lösung 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Man erhielt 6.8 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 62 % Eisen (0.37 mmol, 0.055 M)

CHN-Analyse: C 10.61 %, H 2.06 %, N 0.63 %

Versuch 64: 20c

Die Durchführung der Synthese nach Versuch 62 geschah durch Zugabe von Ammoniak nach 6 h. Die weitere Umsetzung und Aufreinigung erfolgte wie beschrieben.

Ausbeute: 66 % Eisen (0.39 mmol, 0.072 M)

CHN-Analyse: C 10.22 %, H 2.14 %, N 0.80 %

Versuch 65: 21a

10.0 ml einer Lösung von **5a** (1.20 mmol Fe, 0.24 mmol Glucosemonomer) wurden mit 2.0 ml 2 N NaOH, nach 30 min mit 2.0 ml Epichlorhydrin (2.4 g, 25.5 mmol) und nach weiteren 30 min mit 4.0 ml Ammoniak (0.9 g, 50.6 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 41 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) und nach weiteren 3.5 h 8.0 ml Ammoniak (1.8 g, 101.1 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde wiederum 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 80 ml DMSO/EtOH (1:1) von den Nebenprodukten abgetrennt und mit 30 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal je 30 ml EtOH von Nebenprodukten gereinigt. Der schwarze Rückstand wurde in 15 ml Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde 4 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Partikel erhielt man 8.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 73 % Eisen (0.87 mmol, 0.109 M)

CHN-Analyse: C 12.06 %, H 2.45 %, N 1.69 %

Versuch 66: 21b

10.0 ml einer Lösung von **5c** (1.20 mmol Fe, 0.22 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.2 ml 3 N NaOH vorgelegt. Nach 30 min wurde unter Rühren 1.8 ml

Epichlorhydrin (2.1 g, 23.0 mmol) und nach weiteren 30 min 3.6 ml Ammoniak (0.8 g, 45.5 mmol) hinzugegeben. Nach 19 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Epichlorhydrin (0.9 ml, 1.1 mg, 11.5 mmol) und nach 4 h mit Ammoniak (7.2 ml, 1.6 g, 91.0 mmol) versetzt. Analog zu Versuch 65 wurde das Reaktionsgemisch mit den organischen Lösemitteln behandelt und die Kolloide durch Dialyse (5 h) und Zentrifugation (30 min/13000 g) aufgereinigt.

Ausbeute: 92 % Eisen (1.10 mmol, 0.138 M)

CHN-Analyse: C 10.81 %, H 2.10 %, N 1.75 %

Versuch 67: 21c

9.1 ml einer Lösung von **5a** (1.09 mmol Fe, 0.23 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.5 ml einer 3 N NaOH und nach 1 h mit Epichlorhydrin (1.3 ml, 1.5 g, 16.6 mmol) vermengt. Nach 4 h wurde Ammoniak (2.2 ml, 0.5 g, 27.8 mmol) hinzugegeben und die Lösung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte die Zugabe von Epichlorhydrin (1.4 ml, 1.7 g, 17.9 mmol) und nach weiteren 5.5 h von Ammoniak (4.5 ml, 1.0 g, 56.9 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloide wurden durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1), gefolgt von DMSO/EtOH (1:1) und dreimal EtOH gereinigt und in 10 ml Wasser aufgenommen. Nach einer Dialyse und Zentrifugation (45 min/13000 g) wurde der gewonnene schwarze Rückstand in 5 ml Wasser resuspendiert und die Lösung gefiltert (0.45 μm).

Ausbeute: 75 % Eisen (0.82 mmol, 0.109 M)

CHN-Analyse: C 10.04 %, H 2.07 %, N 0.69 %

Versuch 68: 21d

20.0 ml einer Lösung von **5a** (2.40 mmol Fe, 0.50 mmol Glucosemonomer) wurden mit 5.0 ml einer 2 N NaOH vorgelegt. Nach 30 min wurden 2.5 ml Epichlorhydrin (3.0 g, 31.9 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 5.0 ml Ammoniak (1.1 g, 63.2 mmol) und nach 8 h mit 3.0 ml Epichlorhydrin (3.5 g, 38.3 mmol) versetzt. Nach weiteren 18 h wurde erneut 10.0 ml Ammoniak (2.3 g, 126.3 mmol) hinzugefügt und das Gemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt. In Anlehnung an Versuch 63 wurden die Kolloide isoliert, 5 h dialysiert und 90 min bei 13000 g zentrifugiert. Man erhielt 12.3 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 78 % Eisen (1.88 mmol, 0.153 M)

CHN-Analyse: C 13.83 %, H 2.51 %, N 2.05 %

Versuch 69: 21e

Analog zu Versuch 68 wurde **5d** (20.0 ml, 2.90 mmol Fe, 0.35 mmol Glucosemonomer) mit Natronlauge (2.3 ml, 0.3 g, 6.9 mmol), Epichlorhydrin (1.8 ml, 2.1 g, 23.0 mmol), Ammoniak (3.5 ml, 0.8 g, 44.2 mmol) und wiederholt mit Epichlorhydrin (2.1 ml, 2.5 g, 26.8 mmol) und Ammoniak (7.0 ml, 1.6 g, 88.5 mmol) umgesetzt. Die Partikel wurden mit DMSO/EtOH (1:1) gefällt und fünfmal mit EtOH gewaschen. Durch Zugabe von 20 ml Wasser wurde eine schwarze Lösung erhalten, die 5.5 h dialysiert und anschließend bei einem Volumen von 60 ml 30 min bei 13000 g zentrifugiert wurde. Der erhaltene schlammige Rückstand wurde in 18 ml Wasser resuspendiert und durch 0.45 und 0.22 µm Filter aufgereinigt.

Ausbeute: 84 % Eisen (2.43 mmol, 0.135 M)

CHN-Analyse: C 10.81 %, H 2.12 %, N 1.54 %

Versuch 70: 22a

Zu 10.0 ml einer Lösung von **5b** (1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurden 1.2 ml 2 N NaOH und nach 2.5 h 0.5 ml Epichlorhydrin (590 mg, 6.4 mmol) gegeben. Die Lösung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 1.5 ml Ammoniak (341 mg, 19.0 mmol) versetzt. Die erneute Zugabe von 0.3 ml Epichlorhydrin (354 mg, 3.8 mmol) erfolgte nach 24 h. Nach weiteren 8 h wurden 5.0 ml Ammoniak (1.1 g, 63.2 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloide wurden durch Zugabe von 30 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt und an einem Magneten als schwarzer Bodensatz gesammelt. Dieser wurde einmal mit 10 ml DMSO/EtOH (1:1), dreimal mit 20 ml EtOH und abschließend jeweils mit 20 ml EtOH/H₂O (3:1 und 2:1) gewaschen. Die Partikel wurden in 3 ml Wasser aufgenommen, nach Entnahme einer Probe 2.5 h dialysiert und durch eine 0.45 µm Membran gefiltert. Man erhielt 10.0 ml einer CLIO-NH₂-T5-Lösung.

Ausbeute: 80 % Eisen (0.80 mmol, 0.080 M)

CHN-Analyse (vor Dialyse): C 10.69 %, H 2.18 %, N 1.38 %

CHN-Analyse: C 11.03 %, H 2.26 %, N 0.87 %

Versuch 71: 22b

Analog zu Versuch 70 wurde **5b** (10.0 ml, 1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) mit 1.1 ml 2 N NaOH und 0.5 ml Epichlorhydrin (590 mg, 6.4 mmol) für 41 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.5 ml Ammoniak (341 mg, 19.0 mmol), 0.4 ml Epichlorhydrin (472 mg, 5.1 mmol) und erneut 5.0 ml Ammoniak (1.1 g, 63.2 mmol) auf die beschriebene Weise hinzugegeben. Die Aufreinigung erfolgte durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) und viermal EtOH. Die Kolloide wurden in 25 ml Wasser resuspendiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in 4 ml Wasser aufgenommen und durch 0.45 und 0.22 µm Filter gereinigt.

Ausbeute: 93 % Eisen (0.93 mmol, 0.160 M)

CHN-Analyse: C 9.90 %, H 2.05 %, N 0.97 %

Versuch 72: 22c

5b (10.0 ml, 1.00 mmol Fe, 0.11 mmol Glucosemonomer) wurde mit 1.0 ml 2 N NaOH und nach 30 min mit Epichlorhydrin (0.4 ml, 472 mg, 5.1 mmol) versetzt. Die Mischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Ammoniak (1.5 ml, 341 mg, 19.0 mmol) versetzt. Nach 3 h wurden 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) und nach weiteren 22 h 3.0 ml Ammoniak (0.7 g, 37.9 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 25 h bei Raumtemperatur gerührt und zu 26 ml eines DMSO/EtOH-Gemisches (1:1) hinzugegeben. Die ausgefallenen Partikel wurden an einem Magneten gesammelt und mit DMSO/EtOH (1:1) und viermal mit je 10 ml EtOH gewaschen. Nach einer Dialyse und Filterung (0.45 µm) erhielt man 10.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 84 % Eisen (0.84 mmol, 0.084 M)

CHN-Analyse: C 11.34 %, H 2.42 %, N 1.49 %

Versuch 73: 23a

Zu 10.0 ml einer Lösung von **5c** (1.20 mmol Fe, 0.22 mmol Glucosemonomer) wurden 2.2 ml 2 N NaOH und nach 1 h 1.4 ml Epichlorhydrin (1.7 g, 17.9 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 2.0 ml Ammoniak (0.5 g, 25.3 mmol) versetzt. Nach weiteren 7 h wurde Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) zugefügt und die Lösung wiederum 11 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Ammoniak (5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) wurde das

Reaktionsgemisch 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit 50 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt und anschließend mit 20 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal je 20 ml EtOH gewaschen. Nach Resuspendierung der Kolloide in 6 ml Wasser wurde die Lösung 4 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 4 ml Wasser aufgenommen und die erhaltene schwarze Suspension wurde durch eine 0.22 µm Membran gefiltert.

Ausbeute: 89 % Eisen (1.07 mmol, 0.210 M)

CHN-Analyse: C 8.44 %, H 1.70 %, N 0.82 %

Versuch 74: 23b

5c (20.0 ml, 2.40 mmol Fe, 0.44 mmol Glucosemonomer) wurde mit 3.0 ml einer 3 N Natronlauge und nach 30 min mit Epichlorhydrin (3.4 ml, 4.0 g, 43.3 mmol) versetzt. Nach 5 h wurde Ammoniak (7.0 ml, 1.6 g, 88.5 mmol) hinzugegeben und die Lösung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde wiederum Epichlorhydrin (2.0 ml, 2.4 g, 25.5 mmol) und nach 6 h Ammoniak (5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde erneut 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 200 ml DMSO/EtOH (1:1) versetzt und die Partikel am Magneten gesammelt. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der schwarze, schlammige Rückstand mit 30 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal mit je 30 ml EtOH gewaschen. Eine Lösung dieses Rückstandes in 15 ml Wasser wurde 5 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Partikel erhielt man 14.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 98 % Eisen (2.35 mmol, 0.168 M)

CHN-Analyse: C 10.34 %, H 2.23 %, N 1.73 %

Versuch 75: 23c

10.0 ml einer Lösung von **5d** (1.45 mmol Fe, 0.17 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.1 ml einer 2 N Natronlauge vorgelegt. Nach 30 min wurden 0.8 ml Epichlorhydrin (944 mg, 10.2 mmol) und nach 5 h 1.7 ml Ammoniak (387 mg, 21.5 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und erneut mit Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und nach weiteren 5 h mit Ammoniak (3.4 ml, 0.8 g, 43.0 mmol) versetzt. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wurden die Kolloide durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) gefällt und mit DMSO/EtOH (1:1) und dreimal Ethanol gewaschen. Die in 20 ml Wasser

aufgenommen Partikel wurden 5 h dialysiert und anschließend 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in 9 ml Wasser aufgenommen und durch 0.45 und 0.22 μm Filter gereinigt.

Ausbeute: 87 % Eisen (1.26 mmol, 0.126 M)

CHN-Analyse: C 9.97 %, H 1.81 %, N 1.43 %

Versuch 76: 23d

Analog zu Versuch 70 wurde **5d** (10.0 ml, 1.45 mmol Fe, 0.17 mmol Glucosemonomer) mit 1.6 ml NaOH (2 N, 4.8 mmol), 1.1 ml Epichlorhydrin (1.3 g, 14.0 mmol) und 2.5 ml Ammoniak (0.6 g, 31.6 mmol), gefolgt von 1.3 ml Epichlorhydrin (1.5 g, 16.6 mmol) und 5.0 ml Ammoniak (1.1 g, 63.2 mmol) versetzt. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erhielt man 10.0 ml einer schwarzen Suspension von **23d**.

Ausbeute: 86 % Eisen (1.24 mmol, 0.124 M)

CHN-Analyse: C 10.06 %, H 1.91 %, N 1.43 %

Versuch 77: 23e

10.0 ml einer Lösung von **5d** (1.45 mmol Fe, 0.17 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.1 ml einer 3 N NaOH und nach 15 min mit 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) vermengt. Nach weiteren 30 min wurde 2.0 ml Ammoniak (0.5 g, 25.3 mmol) hinzugegeben und die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde wiederum mit Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und nach 4 h mit Ammoniak (4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) für 19 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) gefällt, fünfmal mit EtOH gewaschen und in 15 ml Wasser resuspendiert. Die Lösung wurde 5 h dialysiert, 30 min bei 13000 g zentrifugiert und der schwarze Rückstand in 6 ml Wasser aufgenommen. Nach einer Filterung erhielt man 10.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 82 % Eisen (1.19 mmol, 0.119 M)

CHN-Analyse: C 11.60 %, H 2.24 %, N 1.99 %

AAV 4 - Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Synthese von CLIO-NH₂-T5 (24)

10.0 ml einer Lösung von SPIO-T5 wurden mit einem 20-fachen Überschuss an Natronlauge bezogen auf die Menge Glucosemonomer am Eisenoxid-Nanopartikel versetzt. Nach 15 min wurde ein 70-80-facher Überschuss an Epichlorhydrin und

nach weiteren 30 min ein 150-160-facher Überschuss an Ammoniak hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 17-18 h bei Raumtemperatur gerührt und wiederum mit derselben Menge Epichlorhydrin versetzt. Nach 4 h wurde Ammoniak im Verhältnis 300-400:1 bezogen auf eine Monomereinheit des Hülldextrans hinzugegeben und die Lösung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt.

Versuch 78: 24a

7a (1.40 mmol Fe, 0.16 mmol Glucosemonomer) wurde nach **AAV 4** mit NaOH (1.0 ml, 0.1 g, 3.0 mmol), Epichlorhydrin (je 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (2.0 ml, 0.5 g, 25.3 mmol und 4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) umgesetzt. Die Partikel wurden durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) und viermal EtOH isoliert und in Wasser resuspendiert. Die erhaltene Lösung wurde dialysiert und bei 13000 g zentrifugiert. Nach Wiederholung der Dialyse und Zentrifugation erhielt man 10.0 ml einer Lösung von CLIO-NH₂-T5 (**24a**).

Ausbeute: 82 % Eisen (1.15 mmol, 0.115 M)

CHN-Analyse: C 10.40 %, H 2.02 %, N 1.62 %

Versuch 79: 24b

Gemäß **AAV 4** wurde **7a** (1.40 mmol Fe, 0.16 mmol Glucosemonomer) mit NaOH (1.0 ml, 0.1 g, 3.0 mmol), Epichlorhydrin (je 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (2.0 ml, 0.5 g, 25.3 mmol und 5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) umgesetzt. Die Aufreinigung geschah durch Versetzen mit zweimal DMSO/EtOH (1:1) und dreimal EtOH. Die wässrige Suspension der Partikel (30 ml) wurde 3 h dialysiert und 40 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Partikel wurden resuspendiert und zweimal durch 0.22 µm Filter gereinigt.

Ausbeute: 78 % Eisen (1.01 mmol, 0.099 M)

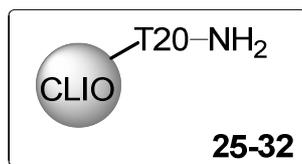
CHN-Analyse: C 10.85 %, H 2.34 %, N 1.51 %

Versuch 80: 24c

Nach **AAV 4** und Versuch 78 erhielt man 12.0 ml einer Suspension von **24c**.

Ausbeute: 78 % (1.09 mmol, 0.091 M)

CHN-Analyse: C 9.39 %, H 1.81 %, N 1.06 %

Darstellung von CLIO-NH₂-T20 (25-32)**Versuch 81: 25a**

10.0 ml einer Lösung von SPIO-T20 (**4b**, 0.96 mmol Fe, 0.23 mmol Glucosemonomer) wurden mit 0.05 ml 2 N NaOH (4.0 mg, 0.1 mmol) und nach 1 h mit 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) für 18 h zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden 3.0 ml Ammoniak (0.7 g, 37.9 mmol) und nach 7 h 0.2 ml Epichlorhydrin (0.2 g, 2.6 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 4.0 ml Ammoniak (0.9 g, 50.6 mmol) vermennt. Nachdem das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde die Lösung 6.5 h dialysiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in 6 ml Wasser aufgenommen und die erhaltene Suspension gefiltert (0.22 µm).

CHN-Analyse: C 15.65 %, H 2.76 %, N 3.04 %

Versuch 82: 25b

Analog zu Versuch 81 wurde die Umsetzung mit 4.0 ml Natronlauge (320 mg, 8.0 mmol) durchgeführt.

CHN-Analyse: C 12.78 %, H 2.33 %, N 1.63 %

Versuch 83: 26

4c (10.0 ml, 2.00 ml Fe, 0.39 µmol Glucosemonomer) wurde mit 2.1 ml 3 N NaOH und nach 40 min mit Epichlorhydrin (3.2 ml, 3.8 g, 40.8 mmol) umgesetzt. Nach 30 min wurde Ammoniak (6.3 ml, 1.4 g, 79.6 mmol) hinzugefügt und die Lösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Epichlorhydrin (1.6 ml, 1.9 g, 20.4 mmol) und nach 3 h Ammoniak (12.6 ml, 2.9 g, 159.2 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wiederum 69 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch die Zugabe von 500 ml DMSO/EtOH (1:1) setzte sich am Rührfisch eine kleine Menge eines klebrigen Feststoffs ab. Das Lösemittelgemisch wurde eingeeengt und mit kleinen Portionen von Ethanol versetzt. Es fiel ein hellbrauner Niederschlag aus, der mit einem Magneten am Kolbenrand gesammelt wurde. Dieser Rückstand wurde in Wasser gelöst und unter Verdünnung 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Es konnte jedoch nur wenig

schwarzes Zentrifugat erhalten werden, in dem sich auch ein farbloser Feststoff befand. Der gesamte Bodensatz wurde in 4 ml Wasser aufgenommen. Eine Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex G50 misslang, da die Partikel hierbei ausfielen. Daraufhin wurde der Versuch abgebrochen.

Versuch 84: 27a

10.0 ml einer Lösung von **4c** (2.00 ml Fe, 0.39 mmol Glucosemonomer) wurden mit 2.1 ml 3 N NaOH und nach 40 min mit Epichlorhydrin (1.6 ml, 1.9 g, 20.4 mmol) zur Reaktion gebracht. Nach 30 min wurde Ammoniak (3.2 ml, 0.7 g, 40.4 mmol) hinzugefügt und die Lösung für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Epichlorhydrin (0.8 ml, 0.9 g, 10.2 mmol) und nach 3 h Ammoniak (6.3 ml, 1.4 g, 79.6 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wiederum 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit 70 ml DMSO/EtOH (1:1) und fünfmal mit 20 ml Ethanol gewaschen. Die Kolloide wurden in 15 ml Wasser aufgenommen und die entstandene Suspension 4 h dialysiert und zentrifugiert (90 min / 13000 g). Nach Resuspendierung des Zentrifugats erhielt man 10.0 ml einer schwarzen Lösung.

Ausbeute: 80 % Eisen (1.59 mmol, 0.159 M)

CHN-Analyse: C 12.74 %, H 2.46 %, N 1.55 %

Versuch 85 : 27b

Nach Versuch 84 wurde **4c** (10.0 ml, 2.00 ml Fe, 0.39 μ mol Glucosemonomer) mit Epichlorhydrin (1.8 ml, 2.1 g, 23.0 mmol und 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (3.5 ml, 0.8 g, 44.2 mmol und 7.0 ml, 1.6 g, 88.5 mmol) umgesetzt. Die Lösung wurde mit DMSO/EtOH (1:1) versetzt, bis die Partikel als braun-schwarzer Feststoff ausfielen. Die Kolloide wurden mit DMSO/EtOH (1:1) und fünfmal Ethanol gewaschen und in Wasser resuspendiert. Analog zu Versuch 84 wurden die Partikel dialysiert und zentrifugiert. Die erhaltene Lösung wurde zusätzlich durch Filterung (0.45 und 0.22 μ m) gereinigt.

Ausbeute: 71 % (1.42 mmol, 0.158 M)

CHN-Analyse: C 13.47 %, H 2.58 %, N 1.76 %

Versuch 86: 27c

9.5 ml einer Lösung von **4c** (9.5 ml, 1.90 ml Fe, 0.38 mmol Glucosemonomer) wurden mit 5 ml Wasser verdünnt und gemäß Versuch 78 mit Epichlorhydrin (1.5 ml,

1.8 g, 19.1 mmol und 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (3.0 ml, 0.7 g, 37.9 mmol und 7.0 ml, 1.6 g, 88.5 mmol) umgesetzt. Aus der Lösung wurde durch Zugabe von 300 ml DMSO/EtOH (1:1) ein brauner Feststoff gefällt. Die Kolloide wurden dreimal mit Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde 5 h dialysiert und 45 min zentrifugiert. Die Partikel wurden in 8 ml Wasser aufgenommen und die erhaltene Lösung durch Filter (0.45 und 0.22 μm) gereinigt.

Ausbeute: 62 % Eisen (1.18 mmol, 0.131 M)

CHN-Analyse: C 12.72 %, H 2.23 %, N 1.33 %

Versuch 87: 27d

SPIO-T20 (**5e**, 10.0 ml, 1.32 mmol Fe, 0.36 mmol Glucosemonomer) wurden nach Versuch 84 mit Epichlorhydrin (1.5 ml, 1.8 g, 19.1 mmol und 0.8 ml, 0.9 g, 10.2 mmol) und Ammoniak (4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol und 8.0 ml, 1.8 g, 101.1 mmol) umgesetzt. Die Kolloide wurden durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) gefällt und mit DMSO/EtOH (1:1) und dreimal mit Ethanol gewaschen. Die Partikel wurden in 13 ml Wasser resuspendiert. Diese Lösung wurde 4 h dialysiert und zentrifugiert. Hierbei war das schwarze Zentrifugat mit einem weißen Feststoff verunreinigt. Der Rückstand wurde wiederum in Wasser aufgenommen und 20 min bei 4000 g zentrifugiert. Die überstehende, schwarze Lösung wurde durch Filter (0.45 und 0.22 μm) abgenommen und charakterisiert.

Ausbeute: 62 % Eisen (1.07 mmol, 0.134 M)

CHN-Analyse: C 13.96 %, H 2.64 %, N 1.46 %

Versuch 88: 27e

Analog zu Versuch 84 wurde die Umsetzung von **5e** (10.0 ml, 1.32 mmol Fe, 0.36 mmol Glucosemonomer) mit Epichlorhydrin (2.0 ml, 2.4 g, 25.5 mmol und 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (3.0 ml, 0.7 g, 37.9 mmol und 4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) durchgeführt. Bei der schnellen Zugabe der zweiten Charge von Ammoniak fiel ein weißer Feststoff aus. Nachdem die Lösung von diesem durch vorsichtiges Abgießen getrennt worden war, wurden die Kolloide durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) gefällt, mit DMSO/EtOH (1:1) und dreimal Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die Partikel wurden durch Dialyse und Zentrifugation weiter aufgereinigt. Man erhielt 11.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 57 % Eisen (0.75 mmol, 0.068 M)

CHN-Analyse: C 14.72 %, H 2.78 %, N 1.67 %

Versuch 89: 27f

20.0 ml einer Lösung von **5f** (2.58 mmol Fe, 0.52 mmol Glucosemonomer) wurden mit 3.4 ml einer 2 N NaOH und nach 20 min mit 2.4 ml Epichlorhydrin (2.8 g, 30.6 mmol) versetzt. Nach einer weiteren Stunde wurden 4.1 ml Ammoniak (0.9 g, 51.8 mmol) hinzugegeben und die Lösung 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Epichlorhydrin (1.2 ml, 1.4 g, 15.3 mmol) und nach 2 h von Ammoniak (9.0 ml, 2.0 g, 113.8 mmol) wurde die Suspension erneut 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden gemäß Versuch 88 gereinigt und isoliert. Nach Filterung (0.45 und 0.22 μm) erhielt man 14.0 ml einer Suspension von **27f**.

Ausbeute: 81 % Eisen (2.10 mmol, 0.150 M)

CHN-Analyse: C 11.02 %, H 2.50 %, N 1.03 %

Versuch 90: 28a

In Anlehnung an Versuch 77 wurde **5e** (10.0 ml, 1.32 mmol Fe, 0.36 mmol Glucosemonomer) mit 2.0 ml einer 3 N Natronlauge vorgelegt. Nach 15 min wurde Epichlorhydrin (0.5 ml, 590 mg, 6.4 mmol) und nach 30 min Ammoniak (1.0 ml, 228 mg, 12.6 mmol) hinzugegeben und die Lösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde erneut mit Epichlorhydrin (0.5 ml, 590 mg, 6.4 mmol) und nach 4 h mit Ammoniak (3.0 ml, 683 mg, 37.9 mmol) versetzt und 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 80 ml DMSO/EtOH (1:1) isoliert und mit 20 ml DMSO/EtOH (1:1) und dreimal 20 ml Ethanol gewaschen. Der schwarze, schlammige Rückstand wurde in 15 ml Wasser aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde 4 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 8 ml Wasser resuspendiert und durch eine 0.45 μm Membran gefiltert. Man erhielt 10.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 86 % Eisen (1.13 mmol, 0.113 M)

CHN-Analyse: C 13.50 %, H 2.59 %, N 1.25 %

Versuch 91: 28b

20.0 ml einer Lösung von **5e** (2.64 mmol Fe, 0.72 mmol Glucosemonomer) wurden mit 5.0 ml einer 3 N NaOH, nach 30 min mit Epichlorhydrin (1.5 ml, 1.8 g, 19.1 mmol) und nach einer weiteren Stunde mit Ammoniak (3.0 ml, 0.7 g, 37.9 mmol) versetzt.

Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 1.5 ml Epichlorhydrin (1.8 g, 19.1 mmol) und nach 4.5 h 7.0 ml Ammoniak (1.6 g, 88.5 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wiederum für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu Versuch 90 mit einer zweistündigen Zentrifugation und einer Filterung durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran.

Ausbeute: 76 % Eisen (2.00 mmol, 0.100 M)

CHN-Analyse: C 13.64 %, H 2.62 %, N 1.31 %

Versuch 92: 28c

Die Umsetzung und Aufreinigung geschah analog zu Versuch 90 mit jeweils 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (2.0 ml, 0.5 g, 25.3 mmol und 4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) in den einzelnen Reaktionsschritten.

Ausbeute: 83 % Eisen (1.09 mmol, 0.109 M)

CHN-Analyse: C 14.15 %, H 2.62 %, N 1.47 %

Versuch 93: 28d

Versuch 90 wurde durch Zugabe von je 1.5 ml Epichlorhydrin (1.8 g, 19.1 mmol) und Umsetzung mit Ammoniak (3.0 ml, 0.7 g, 37.9 mmol und 7.0 ml, 1.6 g, 88.5 mmol) durchgeführt. Nach einer analogen Aufarbeitung erhielt man 13.0 einer schwarzen Suspension von CLIO-NH₂-T20 (**28d**).

Ausbeute: 70 % Eisen (0.92 mmol, 0.071 M)

CHN-Analyse: C 14.93 %, H 2.87 %, N 1.94 %

Versuch 94: 28e

15.3 ml einer Lösung von **5f** (1.97 mmol Fe, 0.39 mmol Glucosemonomer) wurden gemäß Versuch 84 mit NaOH (2.7 ml, 0.3 g, 8.1 mmol), Epichlorhydrin (je 1.7 ml, 2.0 g, 21.7 mmol) und Ammoniak (2.5 ml, 0.6 g, 31.6 mmol und 8.0 ml, 1.8 g, 101.1 mmol) umgesetzt, wobei der Zeitraum zwischen der zweiten Gabe von Epichlorhydrin und Ammoniak 2 h betrug.

Ausbeute: 79 % Eisen (1.55 mmol, 0.097 M)

CHN-Analyse: C 10.51 %, H 2.32 %, N 0.93 %

AAV 5 - Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 zur Synthese von CLIO-NH₂-T20 (29)

10.0 ml einer Lösung von SPIO-T20 wurden mit einem 20-fachen Überschuss an Natronlauge bezogen auf die Menge Glucosemonomer am Eisenoxid-Nanopartikel versetzt. Nach 15 min wurde ein 40-50-facher Überschuss an Epichlorhydrin und nach weiteren 30 min ein 100-110-facher Überschuss an Ammoniak hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 17-18 h bei Raumtemperatur gerührt und wiederum mit derselben Menge an Epichlorhydrin versetzt. Nach 4 h wurde Ammoniak im Verhältnis 250-290:1 bezogen auf eine Monomereinheit des Hülldextrans hinzugegeben und die Lösung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Einsatz von zweimal DMSO/EtOH 1:1 und dreimal EtOH. Nach Dialyse (4-5 h) und Zentrifugation bei 13000 g (45 min - 2h) wurde die erhaltene Kolloidlösung durch 0.45 bzw. 0.22 µm Filter gereinigt.

Versuch 95: 29a

Aus **5f** (1.29 mmol Fe, 0.26 mmol Glucosemonomer) wurden gemäß **AAV 5** mit Natronlauge (1.8 ml, 0.2 g, 5.4 mmol), Epichlorhydrin (je 1.1 ml, 1.3 g, 14.0 mmol) und Ammoniak (2.1 ml, 0.5 g, 26.5 mmol und 5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) nach 0.22 µm-Filterung 10.2 ml einer schwarzen Suspension von **29a** erhalten.

Ausbeute: 89 % Eisen (1.15 mmol, 0.113 M)

CHN-Analyse: C 12.19 %, H 2.48 %, N 1.70 %

Versuch 96: 29b

Nach **AAV 5** und Versuch 95 wurden 10.0 ml einer Lösung von **29b** erhalten.

Ausbeute: 80 % Eisen (1.03 mmol, 0.103 M)

CHN-Analyse: C 12.27 %, H 2.36 %, N 1.64

Versuch 97: 29c

Der Versuch 95 wurde in Anlehnung an **AAV 5** mit 5.2 ml Ammoniak (1.2 g, 65.7 mmol) im letzten Reaktionsschritt durchgeführt.

Ausbeute: 89 % Eisen (1.15 mmol, 0.113 M)

CHN-Analyse: C 11.89 %, H 2.53 %, N 1.34 %

Versuch 98: 29d

Aus **5f** (1.29 mmol Fe, 0.26 mmol Glucosemonomer) wurden nach **AAV 5** 11.0 ml einer Suspension von **29d** mit NaOH (1.7 ml, 0.2 g, 5.1 mmol), Epichlorhydrin (je 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (2.0 ml, 0.5 g, 25.3 mmol und 5.0 ml, 1.1 g, 63.2 mmol) dargestellt.

Ausbeute: 91 % Eisen (1.18 mmol, 0.107 M)

CHN-Analyse: C 12.59 %, H 2.64 %, N 1.54 %

Versuch 99: 29e

8a (1.40 mmol Fe, 0.21 mmol Glucosemonomer) wurde mit Natronlauge (1.3 ml, 156 mg, 3.9 mmol), Epichlorhydrin (je 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (1.5 ml, 0.3 g, 20.0 mmol und 4.8 ml, 1.1 g, 60.7 mmol) gemäß **AAV 5** umgesetzt. Die zweite Zugabe von Ammoniak wurde 2 h nach der Versetzung mit Epichlorhydrin durchgeführt.

Ausbeute: 94 % Eisen (1.32 mmol, 0.120 M)

CHN-Analyse: C 12.59 %, H 2.64 %, N 1.54 %

Versuch 100: 29f

Nach **AAV 5** wurden 11.0 ml einer CLIO-NH₂-T20-Lösung (**29f**) aus **8a** (1.40 mmol Fe, 0.21 mmol Glucosemonomer), NaOH (1.8 ml, 0.2 g, 5.4 mmol), Epichlorhydrin (je 0.9 ml, 1.1 g, 11.5 mmol) und Ammoniak (1.8 ml, 0.4 g, 22.8 mmol und 4.5 ml, 1.0 g, 56.9 mmol) dargestellt.

Ausbeute: 78 % Eisen (1.09 mmol, 0.099 M)

CHN-Analyse: C 11.24 %, H 2.48 %, N 1.07 %

Versuch 101: 29g

Analog zu Versuch 100 wurde **29g** nach **AAV 5** unter Einsatz von je 1.0 ml Epichlorhydrin (1.2 g, 12.8 mmol) synthetisiert.

Ausbeute: 71 % Eisen (0.99 mmol, 0.081 M)

CHN-Analyse: C 11.01 %, H 2.20 %, N 1.15 %

Versuch 102: 30a

Nach **AAV 4** wurde **5f** (1.29 mmol Fe, 0.26 mmol Glucosemonomer) mit NaOH (1.8 ml, 0.2 g, 5.4 mmol), Epichlorhydrin (je 1.5 ml, 1.8 g, 19.1 mmol) und Ammoniak (3.0

ml, 0.7 g, 37.9 mmol und 7.0 ml, 1.6 g, 88.5 mmol) umgesetzt. Bei der Aufarbeitung mit zweimal DMSO/EtOH 1:1 und dreimal EtOH befand sich ein weißer, klebriger Feststoff am Rührfisch. Der schwarze Rückstand wurde in Wasser aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde 4 h dialysiert und zentrifugiert. Hierbei war das schwarze Zentrifugat mit einem weißen Feststoff verunreinigt. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser resuspendiert. Diese Suspension wurde 15 min bei 4000 g zentrifugiert. Die schwarze Lösung wurde vom ausgefallenen, weißen Feststoff abgenommen und gefiltert (0.45 und 0.22 μm).

Ausbeute: 84 % Eisen (1.08 mmol, 0.090 M)

CHN-Analyse: C 12.23 %, H 2.53 %, N 1.46 %

Versuch 103: 30b

Gemäß **AAV 4** wurde **8a** (1.40 mmol Fe, 0.21 mmol Glucosemonomer) mit NaOH (1.5 ml, 180 mg, 4.5 mmol), Epichlorhydrin (je 1.2 ml, 1.4 g, 15.3 mmol) und Ammoniak (2.4 ml, 0.5 g, 30.3 mmol und 5.6 ml, 1.3 g, 70.8 mmol) zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden durch Zugabe von dreimal DMSO/EtOH 1:1 und dreimal EtOH isoliert und in 20 ml Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde 5 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Die Kolloide wurden wiederum in 10 ml Wasser aufgenommen. Nach einer Filterung (0.45 μm) erhielt man 14.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 84 % Eisen (1.18 mmol, 0.084 M)

CHN-Analyse: C 10.68 %, H 1.99 %, N 1.07 %

Versuch 104: 30c

Nach **AAV 4** wurde **8a** (1.40 mmol Fe, 0.21 mmol Glucosemonomer) mit Natronlauge (1.5 ml, 180 mg, 4.5 mmol), Epichlorhydrin (je 1.3 ml, 1.5 g, 16.6 mmol) und Ammoniak (2.5 ml, 0.6 g, 31.6 mmol und 5.9 ml, 1.3 g, 74.6 mmol) umgesetzt. Die Isolierung der Partikel erfolgte durch Zugabe von zweimal DMSO/EtOH 1:1 und dreimal EtOH. Nachdem der schwarze Schlamm in 150 ml Wasser aufgenommen worden war, wurde die Lösung 4 h dialysiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Nach Aufreinigung durch einen 0.45 μm Filter erhielt man 12.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 99 % Eisen (1.38 mmol, 0.115 M)

CHN-Analyse: C 12.25 %, H 2.10 %, N 1.18 %

Versuch 105: 30d

Analog zu Versuch 104 wurde **8b** (1.02 mmol Fe, 0.22 mmol Glucosemonomer) umgesetzt.

Ausbeute: 76 % Eisen (0.76 mmol, 0.108 M)

CHN-Analyse: C 16.52 %, H 3.12 %, N 1.85 %

Versuch 106: 30e

Versuch 105 wurde mit der doppelten Menge aller Edukte durchgeführt. Nach der ersten Teilreaktion wurde die Lösung für 24 bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß Versuch 105. Man erhielt 18.0 ml einer Lösung von **30e**.

Ausbeute: 87 % Eisen (1.78 mmol, 0.099 M)

CHN-Analyse: C 14.74 %, H 2.60 %, N 1.10 %

Versuch 107: 30f

Versuch 105 wurde gemäß **AAV 4** unter schneller Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak wiederholt. An der Eintropfstelle bildete sich ein weißer Feststoff. Die Lösung wurde wie bei Versuch 105 beschrieben aufgereinigt.

Ausbeute: 86 % Eisen (0.86 mmol, 0.092 M)

CHN-Analyse: C 13.77 %, H 2.88 %, N 0.93 %

Versuch 108: 30g

In Anlehnung an Versuch 105 wurde **AAV 4** durch langsames Hinzutropfen von Epichlorhydrin und Ammoniak umgesetzt. Die Kolloide wurden durch die beschriebene Aufreinigungsmethode vom im geringen Ausmaß entstandenen, weißen Feststoff getrennt.

Ausbeute: 86 % Eisen (0.86 mmol, 0.094 M)

CHN-Analyse: C 14.14 %, H 2.70 %, N 0.97 %

Versuch 109: 30h

Analog zu Versuch 104 wurde **8b** (1.02 mmol Fe, 0.22 mmol Glucosemonomer) mit Natronlauge, Epichlorhydrin und Ammoniak umgesetzt und das Reaktionsgemisch mit 100 ml DMSO/EtOH 1:1 versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde an einem Magneten gesammelt und die überstehende organische Phase abdekantiert. Bei der Zugabe von 30 ml Ethanol setzte eine milchige Trübung ein, aus der sich durch

Mischung mit 10 ml DMSO eine durchsichtige Lösung ergab. Die Partikel wurden nochmals mit dreimal EtOH gewaschen und in 15 ml Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde 4 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Nach Resuspendierung in Wasser erhielt man 10.0 ml einer schwarzen Lösung.

Ausbeute: 75 % Eisen (0.75 mmol, 0.075 M)

CHN-Analyse: C 18.29 %, H 3.62 %, N 3.18 %

AAV 6 - Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 zur Synthese von CLIO-NH₂-T20 (31)

10.0 ml einer Lösung von SPIO-T20 wurden mit einem 20-fachen Überschuss an Natronlauge bezogen auf die Menge Glucosemonomer am Eisenoxid-Nanopartikel versetzt. Nach 15-30 min wurde ein 65-75-facher Überschuss an Epichlorhydrin und nach weiteren 30-60 min ein 65-75-facher Überschuss an Ammoniak hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 17-18 h bei Raumtemperatur gerührt und wiederum mit derselben Menge an Epichlorhydrin versetzt. Nach 3-4 h wurde NH₃ im Verhältnis 270:1 bezogen auf eine Dextranmonomereinheit hinzugegeben und die Lösung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte nach **AAV 5**.

Versuch 110: 31a

Gemäß **AAV 6** wurde **8a** (1.40 mmol Fe, 0.21 mmol Glucosemonomer) mit NaOH (1.7 ml, 0.2 g, 5.1 mmol), Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (1.0 ml, 228 mg, 12.6 mmol) umgesetzt. Nach 24 h wurde erneut Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (4.5 ml, 1.0 g, 56.9 mmol) hinzugegeben und das Gemisch nach **AAV 6** aufgereinigt.

Ausbeute: 104 % Eisen (1.46 mmol, 0.133 M)

CHN-Analyse: C 10.49 %, H 2.14 %, N 1.05 %

Versuch 111: 31b

8b (1.02 mmol Fe, 0.22 mmol Glucosemonomer) wurde nach **AAV 6** unter einer schnellen Zugabe von Natronlauge (1.5 ml, 180 mg, 4.5 mmol), Epichlorhydrin (je 1.3 ml, 1.5 g, 16.6 mmol) und Ammoniak (1.3 ml, 0.3 g, 16.4 mmol und 5.9 ml, 1.3 g, 74.6 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 95 % Eisen (0.95 mmol, 0.095 M)

CHN-Analyse: C 14.15 %, H 2.64 %, N 0.94 %

Versuch 112: 31c

Bei der Wiederholung des Versuchs 110 nach **AAV 6** erhielt man durch langsames Hinzutropfen von Epichlorhydrin und Ammoniak 10.0 ml einer Suspension von **31c**.

Ausbeute: 80 % Eisen (0.80 mmol, 0.080 M)

CHN-Analyse: C 15.32 %, H 2.88 %, N 1.54 %

Versuch 113: 31d

Der Versuch 112 wurde wiederholt.

Ausbeute: 80 % Eisen (0.80 mmol, 0.080 M)

CHN-Analyse: C 14.21 %, H 2.92 %, N 1.27 %

Versuch 114: 31e

8c (1.19 mmol Fe, 0.18 mmol Glucosemonomer) wurde in Anlehnung an **AAV 6** mit Natronlauge (1.0 ml, 120 mg, 3.0 mmol), Epichlorhydrin (je 0.9 ml, 1.1 g, 11.5 mmol) und Ammoniak (0.9 ml, 0.2 g, 11.4 mmol und 4.0 ml, 0.9 g, 50.6 mmol) zur Reaktion gebracht und gereinigt.

Ausbeute: 88 % Eisen (1.05 mmol, 0.117 M)

CHN-Analyse: C 10.26 %, H 1.94 %, N 1.22 %

Versuch 115: 32a

10.0 ml einer Lösung von **8a** (1.40 mmol Fe, 0.21 mmol Glucosemonomer) wurden mit NaOH (1.5 ml, 180 mg, 4.5 mmol) vorgelegt. Gemäß den Zeitangaben von **AAV 6** wurden jeweils Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (1.0 ml, 228 mg, 12.6 mmol) hinzugegeben. Die Partikel wurden mit DMSO/EtOH 1:1 und dreimal EtOH isoliert und in 15 ml Wasser resuspendiert. Die Lösung wurde 3.5 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Nach Wiederaufnahme des Rückstandes in 10 ml Wasser und Filterung (0.45 µm) erhielt man 12.0 ml einer Suspension von **32a**.

Ausbeute: 93 % Eisen (1.31 mmol, 0.109 M)

CHN-Analyse: C 9.12 %, H 1.63 %, N 0.37 %

Versuch 116: 32b

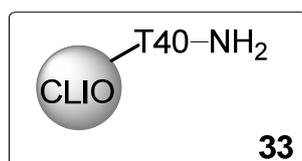
Analog zu Versuch 115 wurde **8c** (1.19 mmol Fe, 0.18 mmol Glucosemonomer) mit Natronlauge (1.0 ml, 120 mg, 3.0 mmol) und jeweils 0.9 ml Epichlorhydrin (1.1 g,

11.5 mmol) und Ammoniak (0.2 g, 11.4 mmol) umgesetzt und aufgereinigt, wobei die Lösung 3 h bei 13000 g zentrifugiert werden musste.

Ausbeute: 89 % Eisen (1.06 mmol, 0.126 M)

CHN-Analyse: C 8.59 %, H 1.72 %, N 0.54 %

Darstellung von CLIO-NH₂-T40 (33)



Versuch 117: 33a

10.0 ml einer Lösung von SPIO-T40 (**5g**, 0.97 mmol Fe, 0.15 mmol Glucosemonomer) wurden mit 1.0 ml einer 3 N Natronlauge und nach 15 min mit Epichlorhydrin (1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) versetzt. Nach weiteren 30 min wurde Ammoniak (1.3 ml, 296 mg, 16.4 mmol) hinzugegeben und die Lösung für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Epichlorhydrin (0.6 ml, 0.7 g, 7.7 mmol) und nach 4 h von Ammoniak (3.0 ml, 683 mg, 37.9 mmol) wurde das Reaktionsgemisch erneut 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloide wurden durch Zugabe von 200 ml DMSO/EtOH 1:1 gefällt. Die Partikel wurden mit DMSO/EtOH 1:1 und fünfmal mit EtOH gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde bei 13000 g zentrifugiert und der erhaltene Rückstand wieder in Wasser aufgenommen. Nach Filterung (0.45 und 0.22 µm) erhielt man 10.5 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 76 % Eisen (0.74 mmol, 0.070 M)

CHN-Analyse: C 9.37 %, H 1.75 %, N 0.76 %

Versuch 118: 33b

5g (0.97 mmol Fe, 0.14 mmol Glucosemonomer) wurde nach **AAV 4** mit NaOH (1.0 ml, 120 mg, 3.0 mmol), Epichlorhydrin (je 0.86 ml, 1.0 g, 11.0 mmol) und Ammoniak (1.7 ml 0.4 g, 21.5 mmol und 3.5 ml, 0.8 g, 44.2 mmol) umgesetzt. Aus dem Reaktionsgemisch wurden die Kolloide durch Zugabe von DMSO/EtOH 1:1 gefällt und mit DMSO/EtOH 1:1 und dreimal mit EtOH gewaschen. Die Partikel wurden in 15 ml Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde 4 h dialysiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in Wasser resuspendiert und durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran gefiltert.

Ausbeute: 69 % Eisen (0.67 mmol, 0.059 M)

CHN-Analyse: C 9.08 %, H 1.93 %, N 0.95 %

Versuch 119: 33c

Analog zu Versuch 118 wurde **5g** (0.97 mmol Fe, 0.14 mmol Glucosemonomer) mit NaOH (1.0 ml, 120 mg, 3.0 mmol), Epichlorhydrin (je 0.85 ml, 1.0 g, 10.8 mmol) und Ammoniak (1.7 ml, 0.4 g, 21.5 mmol und 4.3 ml, 1.0 g, 54.3 mmol) zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung erhielt man 10.0 ml einer Suspension von **33c**.

Ausbeute: 73 % Eisen (0.71 mmol, 0.071 M)

CHN-Analyse: C 9.47 %, H 2.16 %, N 1.09 %

Versuch 120: 33d

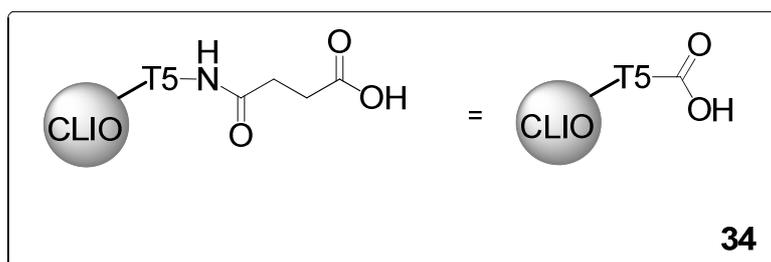
Nach **AAV 5** wurde **33d** aus **5g** (0.97 mmol Fe, 0.14 mmol Glucosemonomer) mit Natronlauge (1.0 ml, 120 mg, 3.0 mmol), Epichlorhydrin (je 0.6 ml, 0.7 g, 7.7 mmol) und Ammoniak (1.3 ml, 0.3 g, 16.4 mmol und 3.0 ml, 0.7 g, 37.9 mmol) dargestellt.

Ausbeute: 81 % Eisen (0.79 mmol, 0.077 M)

CHN-Analyse: C 9.20 %, H 1.85 %, N 1.06 %

AAV 7: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Carboxy-CLIO-T5 (34, CLIO-COOH-T5) und -T40 (36, CLIO-COOH-T40)

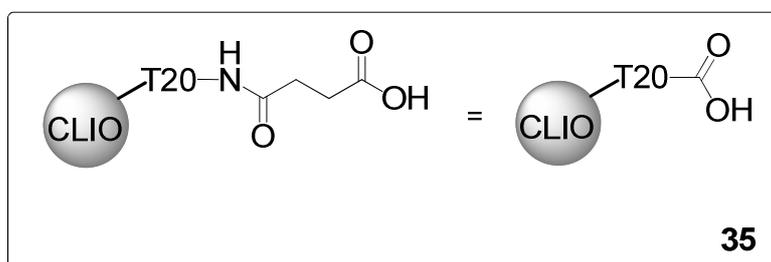
Eine wässrige Suspension von CLIO-NH₂ wurde mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 8.5 (0.1 N NaHCO₃-Lösung) eingestellt. Ein 5-7-facher Überschuss an Bernsteinsäureanhydrid bezogen auf die Stickstoffmenge am CLIO-NH₂ wurde in 0.5-3.0 ml DMSO gelöst und hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und mit DMSO/EtOH (1:1) und mehrmals mit Ethanol aufgearbeitet. Der schwarze Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die erhaltene Suspension 4 h dialysiert sowie 45-120 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Partikel wurden in Wasser resuspendiert und anschließend durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran gefiltert.

Synthese von Carboxy-CLIO-T5 (34, CLIO-COOH-T5)**Versuch 121:**

5.0 ml einer CLIO-NH₂-Lösung von **24c** (0.50 mmol Fe, 0.06 mmol N) wurden nach **AAV 7** mit NaHCO₃ (42 mg, 0.50 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (28 mg, 0.28 mmol) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung erhielt man 5.3 ml einer Suspension von CLIO-COOH-T5.

Ausbeute: 90 % Eisen (0.45 mmol, 0.085 M)

CHN-Analyse: C 11.26 %, H 2.51 %, N 1.38 %

Synthese von Carboxy-CLIO-T20 (35, CLIO-COOH-T20)

AAV 8: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Carboxy-CLIO-T20 (35,
Nach **AAV 7** erfolgte die Synthese von CLIO-COOH-T20 (**35**) mit einem 10-15-fachen Überschuss an Bernsteinsäureanhydrid.

Versuch 122: 35a

Gemäß **AAV 8** wurde **27d** (7.5 ml, 1.00 mmol Fe, 0.12 mmol N) mit NaHCO₃ (62 mg, 0.74 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (180 mg, 1.80 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 90 % Eisen (0.90 mmol, 0.113 M)

CHN-Analyse: C 13.61 %, H 2.57 %, N 1.29 %

Versuch 123: 35b

In Anlehnung an **AAV 8** wurde **30d** (6.3 ml, 0.68 mmol Fe, 0.11 mmol N) mit NaHCO_3 (53 mg, 0.63 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (174 mg, 1.74 mmol) zur Reaktion gebracht.

Ausbeute: 69 % Eisen (0.47 mmol, 0.053 M)

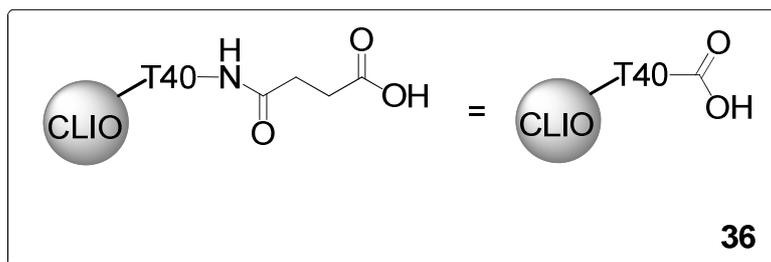
CHN-Analyse: C 18.29 %, H 3.19 %, N 1.62 %

Versuch 124: 35c

Nach **AAV 8** wurde **30h** (9.1 ml, 0.68 mmol Fe, 0.22 mmol N) mit NaHCO_3 (76 mg, 0.91 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (212 mg, 2.12 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 94 % Eisen (0.64 mmol, 0.092 M)

CHN-Analyse: C 20.40 %, H 3.32 %, N 2.39 %

Synthese von Carboxy-CLIO-T40 (36, CLIO-COOH-T40)**Versuch 125: 36**

5.0 ml einer Lösung von **33c** (0.36 mmol Fe, 0.03 mmol N) wurden nach **AAV 7** mit NaHCO_3 (42 mg, 0.50 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (18 mg, 0.18 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 100 % Eisen (0.36 mmol, 0.070 M)

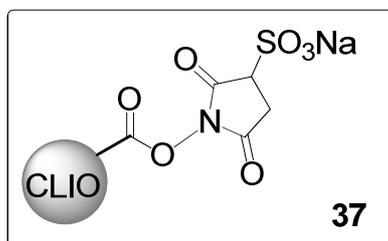
CHN-Analyse: C 9.66 %, H 2.00 %, N 1.01 %

AAV 9: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Aktivierung und Umsetzung von CLIO-COOH (34-36)

Eine Suspension von CLIO-COOH (**34-36**) wurde mit Natriumchlorid (0.1 M) und 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, 0.05 M) auf pH 6 gepuffert. Es wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und die Carboxy-reaktive Komponente hinzugegeben, wobei sich beide Stoffmengen am Stickstoffgehalt der Partikel orientierten. Das Reaktionsgemisch wurde 14-20 h bei Raumtemperatur gerührt und,

wenn nicht anders beschrieben, durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) und Ethanol sowie durch Dialyse und Zentrifugieren bei 13000 g gereinigt.

Darstellung von Sulfo-NHS-carboxy-CLIO (37, CLIO-COO-sulfo-NHS)



Versuch 126: 37a

Gemäß **AAV 9** wurde CLIO-COOH-T5 (**34**, 5.0 ml, 0.19 mmol Fe, 0.01 mmol N) mit NaCl (35 mg, 0.60 mmol), MES (60 mg, 0.31 mmol), EDC (24 mg, 0.13 mmol) und Sulfo-NHS (28 mg, 0.13 mmol) umgesetzt. Aus der erhaltenen Suspension wurde eine Probe für die Elementaranalyse entnommen (I). Da die Kolloide nach 24 h als schwarzer Niederschlag ausfielen, wurde die farblose, wässrige Phase abdekantiert und vom schwarzen Rückstand erneut eine Elementaranalyse (II) angefertigt.

Ausbeute: 100 % Eisen (0.36 mmol, 0.070 M)

CHN-Analyse (I): C 8.92 %, H 1.81 %, N 0.83 %, S 0.43 %

CHN-Analyse (II): C 8.98 %, H 1.91 %, N 0.76 %, S 0.69 %

CHN-Analyse (**34**): C 9.56 %, H 1.75 %, N 0.65 %

Versuch 127: 37b

Nach **AAV 9** wurde **37b** aus **34** (3.0 ml, 0.26 mmol Fe, 0.01 mmol N), EDC (15 mg, 78 μ mol) und Sulfo-NHS (17 mg, 78 μ mol) dargestellt. Während der Reaktion fielen die Kolloide teilweise als schwarzer Niederschlag aus. Die Isolierung der Partikel erfolgte durch viermalige Zugabe von Ethanol.

CHN-Analyse: C 9.56 %, H 1.87 %, N 0.99 %, S 0.94 %

CHN-Analyse (**34**): C 9.15 %, H 1.88 %, N 0.56 %

Versuch 128: 37c

Gemäß **AAV 9** wurde **34** (3.8 ml, 0.36 mmol Fe, 0.05 mmol N) mit EDC (59 mg, 0.31 mmol) und Sulfo-NHS (68 mg, 0.31 mmol) in 0.1 M NaCl- und 0.05 M MES-Puffer umgesetzt. Während der Reaktion fielen die Kolloide größtenteils als schwarzer

Niederschlag aus. Die Partikel wurden dreimal mit Ethanol gewaschen. Die Resuspendierung in 5 ml Wasser unter einer kurzen Ultraschallbadbenutzung (1-2 min) scheiterte. Daraufhin wurde 1 ml der Lösung für eine Elementaranalyse abgeführt und weitere 2 ml für 45 min in ein Ultraschallbad gestellt. Aus dieser Suspension wurden die Partikel anschließend mit Ethanol gefällt und ebenfalls für eine Elementaranalyse vorbereitet.

CHN-Analyse (vor US-Bad): C 13.69 %, H 2.58 %, N 2.10 %, S 1.53 %

CHN-Analyse (nach US-Bad): C 13.65 %, H 2.41 %, N 1.95 %, S 0.88 %

CHN-Analyse (**34**): C 13.22 %, H 2.28 %, N 1.60 %

Versuch 129: 37d

In Anlehnung an **AAV 9** wurde **34** (7.0 ml, 0.47 mmol Fe, 0.06 mmol N) mit NaCl (41 mg, 0.70 mmol) und MES (68 mg, 0.35 mmol) vorgelegt. Direkt nach Zugabe von EDC (134 mg, 0.70 mmol) und Sulfo-NHS (152 mg, 0.70 mmol) wurden etwa 1 ml der Reaktionslösung entnommen, fünfmal mit 6 ml Ethanol gewaschen und für eine Elementaranalyse genutzt (I). Nach 1.5 h fiel teilweise ein schwarzer Feststoff aus der Reaktionslösung und es wurde erneut eine Elementaranalyse auf die eben beschriebene Weise durchgeführt (II). Bei der ersten Versetzung mit EtOH kam es zu einer milchigen Trübung der organischen Phase. Diese Analyseprozedur wurde nach weiteren 1.5 h (III) und nach 17 h (IV) wiederholt.

CHN-Analyse (I): C 12.95 %, H 2.35 %, N 2.12 %, S 1.98 %

CHN-Analyse (II): C 12.58 %, H 2.40 %, N 2.08 %, S 1.27 %

CHN-Analyse (III): C 12.78 %, H 2.40 %, N 2.40 %, S 2.57 %

CHN-Analyse (IV): C 12.92 %, H 2.34 %, N 2.29 %, S 1.96 %

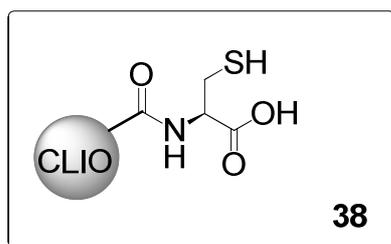
CHN-Analyse (**34**): C 11.92 %, H 2.09 %, N 1.52 %

Versuch 130: 37e

Gemäß **AAV 9** wurde **35** (4.0 ml, 0.53 mmol Fe, 0.02 mmol N) mit EDC (50 mg, 0.26 mmol) und Sulfo-NHS (57 mg, 0.26 mmol) umgesetzt. Die Kolloide fielen während der Reaktion nicht aus und wurden durch fünfmalige Zugabe von Ethanol gefällt und gewaschen. Der Versuch, die Partikel in 2 ml Wasser zu resuspendieren, gelang nicht vollständig.

CHN-Analyse: C 14.65 %, H 2.50 %, N 2.01 %, S 1.92 %

CHN-Analyse (**35**): C 14.14 %, H 2.43 %, N 1.27 %

Darstellung von Cystein-carboxy-CLIO (38, CLIO-COO-Cys)**Versuch 131: 38a**

Nach **AAV 9** wurde **35** (1.8 ml, 0.20 mmol Fe, 0.03 mmol N) in insgesamt 2.0 ml 0.1 M NaCl- und 0.05 MES-Pufferlösung mit EDC (48 mg, 0.25 mmol) und L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat (20 mg, 0.11 mmol) umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhielt man 2.0 ml einer Suspension von **38a**.

Ausbeute: 85 % Eisen (0.17 mmol, 0.085 M)

CHN-Analyse: C 15.38 %, H 2.73 %, N 2.02 %, S 0.55 %

Versuch 132: 38b

Die Durchführung des Versuchs erfolgte analog zu Versuch 131 und **AAV 9** mit 40 mg L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat (0.23 mmol).

Ausbeute: 75 % Eisen (0.15 mmol, 0.077 M)

CHN-Analyse: C 15.12 %, H 2.75 %, N 1.90 %, S 0.80 %

Versuch 133: 38c

Gemäß **AAV 9** wurde **35** (1.1 ml, 0.09 mmol Fe, 0.01 mmol N) mit EDC (12 mg, 0.06 mmol) und nach 30 min mit L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat (6 mg, 0.03 mmol) umgesetzt und gereinigt.

CHN-Analyse: C 17.29 %, H 2.74 %, N 2.18 %, S 1.72 %

Versuch 134: 38d

Die Synthese von **38d** in Anlehnung an **AAV 9** und Versuch 133 erfolgte durch Zugabe von Cystein nach 1.5 h.

CHN-Analyse: C 16.38 %, H 2.89 %, N 2.05 %, S 1.84 %

Versuch 135: 38e

34 (2.0 ml, 0.25 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurde nach **AAV 9** mit EDC (54 mg, 0.28 mmol) und L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat (50 mg, 0.28 mmol) umgesetzt. Nach 1 h wurde die Kolloide durch Ethanol und Zentrifugieren aufgereinigt.

Ausbeute: 96 % Eisen (0.24 mmol, 0.120 M)

CHN-Analyse: C 9.58 %, H 1.84 %, N 1.02 %, S 0.71 %

Versuch 136: 38f

Gemäß **AAV 9** und Versuch 135 wurde das Reaktionsgemisch angesetzt und nach 3 h aufgereinigt.

Ausbeute: 88 % Eisen (0.22 mmol, 0.112 M)

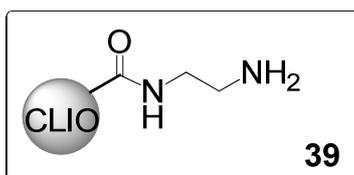
CHN-Analyse: C 9.74 %, H 2.88 %, N 1.21 %, S 1.15 %

Versuch 137: 38g

Die Durchführung der Synthese von **38g** erfolgte nach Versuch 136 mit dem Abbruch der Reaktion nach 20 h.

Ausbeute: 76 % Eisen (0.19 mmol, 0.094 M)

CHN-Analyse: C 10.98 %, H 2.06 %, N 2.06 %, S 2.90 %

Synthese von Diaminoethan-CLIO (39, CLIO-NH-(CH₂)₂-NH₂)**Versuch 138: 39a**

Gemäß **AAV 9** wurden 5.0 ml CLIO-COOH-T20 (**35**, 0.85 mmol Fe, 0.06 mmol N) mit MES (49 mg, 0.25 mmol) und NaCl (29 mg, 0.50 mmol) gepuffert und mit EDC (0.25 g, 1.3 mmol) und Ethylendiamin (0.2 ml, 0.18 g, 3.0 mmol), das zuvor in 0.2 ml DMSO gelöst wurde, zur Reaktion gebracht. Nach dem ersten Zentrifugieren wurde der schwarze Rückstand erneut in Wasser aufgenommen und nochmals zentrifugiert.

Ausbeute: 67 % Eisen (0.57 mmol, 0.114 M)

CHN-Analyse (1. Zentrifugation): C 10.63 %, H 2.24 %, N 1.23 %

CHN-Analyse (2. Zentrifugation): C 10.62 %, H 2.20 %, N 1.11 %

CHN-Analyse (**35**): C 11.70 %, H 2.27 %, N 0.90 %

AAV 10: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Umsetzung von CLIO-COOH (34-36) mit Diaminen über einen Sulfo-NHS-Carboxy-CLIO (37, CLIO-COO-sulfo-NHS)

Eine Suspension von CLIO-COOH (**34-36**) wurde mit Natriumchlorid (0.1 M) und 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, 0.05 M) auf pH 6 gepuffert. Es wurde EDC und Sulfo-NHS hinzugegeben. Die Reaktion zum Zwischenprodukt CLIO-COO-sulfo-NHS (**37**) wurde durch Zugabe von Ethanol abgebrochen. Die Partikel wurden zweimal mit Ethanol gewaschen und in 2-10 ml einer 0.1 M Natriumhydrogencarbonatlösung resuspendiert. Das jeweilige Diamin (Ethylendiamin, Cadaverindihydrochlorid bzw. Diaminododecan) wurde hinzugegeben. Die Kolloide wurden durch eine kurze Zeit im Ultraschallbad vollständig in Lösung gebracht und das Reaktionsgemisch 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde die Lösung durch Zugabe von DMSO/EtOH (1:1) und Ethanol sowie durch Dialyse und Zentrifugieren bei 13000 g gereinigt.

Versuch 139: 39b

Gemäß **AAV 10** wurden 6.0 ml CLIO-COOH-T20 (**35**, 0.58 mmol Fe, 0.04 mmol N) mit MES (60 mg, 0.31 mmol) und NaCl (36 mg, 0.62 mmol) gepuffert und mit EDC (50 mg, 0.26 mmol) und N-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (Sulfo-NHS, 57 mg, 0.26 mmol) umgesetzt. Nach 3 (I), 7 (II) und 20 h (III) wurden jeweils 2.0 ml der Reaktionslösung mit 0.1 ml Ethylendiamin (90 mg, 1.5 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt je 2.0 ml einer schwarzen Suspension, von denen eine Elementaranalyse und Eisengehaltsbestimmung durchgeführt wurde.

I: Ausbeute: 83 % Eisen (0.16 mmol, 0.080 M),
CHN-Analyse: C 13.68 %, H 2.57 %, N 1.30 %

II: Ausbeute: 88 % Eisen (0.17 mmol, 0.085 M)
CHN-Analyse: C 13.68 %, H 2.72 %, N 1.32 %

III: Ausbeute: 88 % Eisen (0.17 mmol, 0.085 M)
CHN-Analyse: C 13.88 %, H 2.85 %, N 1.47 %

35 (Edukt): CHN-Analyse: C 15.12 %, H 2.72 %, N 0.92 %

Versuch 140: 39c 537

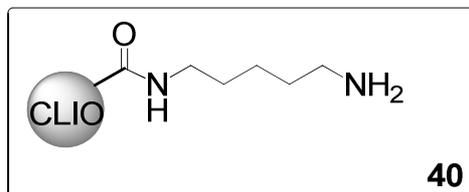
Nach **AAV 10** wurden **35** (6.3 ml, 0.58 mmol Fe, 0.14 mmol N) mit EDC (130 mg, 0.68 mmol), Sulfo-NHS (150 mg, 0.69 mmol) und Ethylendiamin (50 µL, 45 mg, 0.75 mmol) zur Reaktion gebracht. Man erhielt 6.0 ml einer Suspension von **39c**.

Ausbeute: 100 % Eisen (0.60 mmol, 0.100 M)

CHN-Analyse: C 19.70 %, H 2.81 %, N 3.56 %

CHN-Analyse (**34**): C 20.40 %, H 3.32 %, N 2.39 %

Darstellung von Diaminopentan-CLIO (40, CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH₂)



Versuch 141: 40a

Nach **AAV 9** wurde CLIO-COOH-T5 (**34**, 7.3 ml, 1.00 mmol Fe, 0.06 mmol N) mit EDC (74 mg, 0.39 mmol) und 1,5-Diaminopentan-Dihydrochlorid (Cadaverin-Dihydrochlorid, 125 mg, 0.71 mmol) umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhielt man 7.0 ml einer schwarzen Suspension.

Ausbeute: 81 % Eisen (0.81 mmol, 0.115 M)

CHN-Analyse: C 8.96 %, H 1.86 %, N 1.05 %

CHN-Analyse (**34**): C 9.01 %, H 1.71 %, N 0.83 %

Versuch 142: 40b

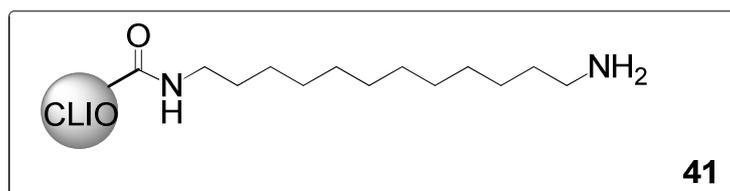
Nach **AAV 10** wurde CLIO-COOH-T20 (**35**, 2.0 ml, 0.19 mmol Fe, 0.02 mmol N) mit EDC (20 mg, 0.1 mmol), Sulfo-NHS (22 mg, 0.1 mmol) und Cadaverin-Dihydrochlorid (22 mg, 0.1 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 82 % Eisen (0.16 mmol, 0.080 M)

CHN-Analyse: C 14.54 %, H 2.64 %, N 1.18 %

CHN-Analyse (**35**): C 15.12 %, H 2.72 %, N 0.92 %

Synthese von Diaminododecan-CLIO (41, CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH₂)



Versuch 143: 41a

In Anlehnung an **AAV 9** erhielt man 5.0 ml einer Suspension von **41a** aus CLIO-

COOH-T20 (**35**, 7.9 ml, 0.42 mmol Fe, 0.07 mmol N), EDC (74 mg, 0.39 mmol) und 1,12-Diaminododecan (125 mg, 0.71 mmol).

Ausbeute: 92 % Eisen (0.39 mmol, 0.077 M)

CHN-Analyse: C 18.06 %, H 2.97 %, N 1.91 %

CHN-Analyse (**35**): C 18.29 %, H 3.19 %, N 1.62 %

Versuch 144: **41b**

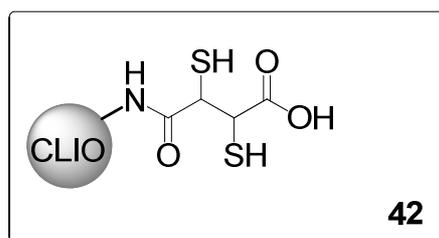
Gemäß **AAV 10** und Versuch 142 wurden 2.0 ml einer Suspension von **41b** mit Diaminododecan (38 mg, 0.19 mmol in 1 ml Ethanol) dargestellt.

Ausbeute: 82 % Eisen (0.16 mmol, 0.079 M)

CHN-Analyse: C 15.88 %, H 3.16 %, N 1.38 %

CHN-Analyse (**35**): C 15.12 %, H 2.72 %, N 0.92 %

Synthese von Dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (**42**, CLIO-DMSA)



Versuch 145: **42a**

Eine Suspension von CLIO-NH₂-T20 (**28b**, 10.0ml, 1.00 mmol Fe, 0.11 mmol N) wurde mit Natriumchlorid (58 mg, 1.0 mmol) und 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, 98 mg, 0.5 mmol) auf pH 6 gepuffert. Die Lösung wurde mit EDC (79 mg, 0.41 mmol) und Dimercaptobernsteinsäure (81 mg, 0.44 mmol in 5 ml DMSO) versetzt und 20 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach 1 h ein Ausfall der Kolloide beobachtet werden konnte. Die Partikel wurden mit Ethanol gefällt und viermal gewaschen. Nach einer Resuspendierung in 20 ml Wasser wurde **42a** durch Zentrifugieren bei 13000 g für 10 min erhalten. Da die Kolloide aus der Lösung ausfielen, konnte keine Eisenausbeute gemessen werden.

CHN-Analyse: C 15.32 %, H 2.49 %, N 1.19 %, S 5.59 %

Versuch 146: **42b**

Analog zu Versuch 145 wurde CLIO-NH₂-T20 (**29c**, 7.0ml, 0.61 mmol Fe, 0.07 mmol N) mit EDC (45 mg, 0.24 mmol) und Dimercaptobernsteinsäure (69 mg, 0.38 mmol in

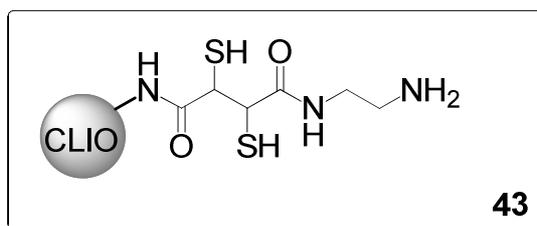
3 ml DMSO) umgesetzt und aufgereinigt. Die erhaltene Suspension wurde nochmals 15 min bei 13000 g zentrifugiert.

Ausbeute: 92 % Eisen (0.56 mmol, 0.093 M)

CHN-Analyse (I): C 16.04 %, H 2.73 %, N 1.41 %, S 10.46 %

CHN-Analyse (II): C 16.08 %, H 2.34 %, N 1.38 %, S 10.63 %

Darstellung von Diaminoethan-dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (43, CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂)



Versuch 147:

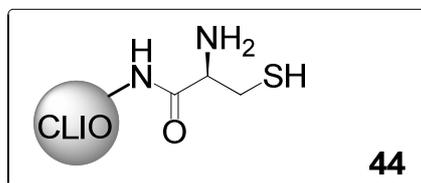
5.0 ml einer Suspension von **42a** unbekannter Konzentration wurden mit EDC (75 mg, 0.39 mmol) und Ethylendiamin (30 μ L, 27 mg, 0.45 mmol in 0.8 ml DMSO) in 0.1 M NaCl- und 0.05 M MES-Puffer umgesetzt. Die Partikel wurden durch Zugabe von EtOH aus der Reaktionslösung gefällt und dreimal mit EtOH gewaschen. Die Kolloide wurden in 10 ml Wasser resuspendiert und 30 min bei 13000 g zentrifugiert.

Ausbeute: 0.48 mmol, 0.096 M an Eisen

CHN-Analyse: C 13.74 %, H 2.46 %, N 1.72 %, S 1.70 %

CHN-Analyse (**42a**): C 15.32 %, H 2.49 %, N 1.19 %, S 5.59 %

Synthese von Cystein-amino-CLIO (44, CLIO-NH-Cys)



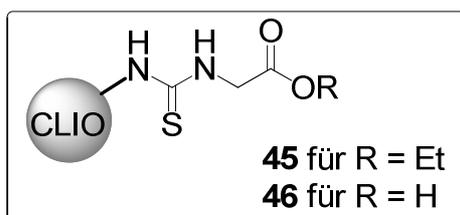
Versuch 148:

Eine Lösung von CLIO-NH₂-T20 (**29g**, 5.0 ml, 0.41 mmol, 0.04 mmol) wurde mit NaCl (29 mg, 0.50 mmol) und MES (49 mg, 0.25 mmol) gepuffert, mit EDC (25 mg, 0.13 mmol) und L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat (37 mg, 0.21 mmol) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch viermalige Zugabe von EtOH

gefällt und gewaschen und nach Wiederaufnahme in Wasser 1 h bei 13000 g zentrifugiert.

Ausbeute: 90 % Eisen (0.37 mmol, 0.082 M)

CHN-Analyse: C 11.08 %, H 2.12 %, N 1.32 %, S 1.30 %



Synthese von Etyl-ester-thioharnstoff-amino-CLIO (45, CLIO-NCS-COOEt)

Versuch 149: 45

Zu 10.0 ml einer Lösung von CLIO-NH₂ (**16a**, 0.73 mmol Fe, 0.03 mmol N) wurde Natriumhydrogencarbonat bis zu einem pH-Wert von 8.0 hinzugegeben. Die schwarze Lösung wurde mit 70 µL Ethyl-2-isothiocyanatoacetat (82 mg, 0.56 mmol in 1 ml DMSO) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung zeigte eine rötlich-braune Verfärbung und es fiel ein weißer Feststoff aus. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h dialysiert, bis das Dialysat keine gelbliche Verfärbung mehr aufwies. Die rötlich-braune Lösung wurde vom weißen Bodensatz abfiltriert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Die Partikel wurden in 20 ml Wasser aufgenommen und durch eine 0.45 und 0.22 µm Membran gefiltert. 5 ml dieser Suspension wurden zusätzlich an Sephadex G25 (Laufmittel: Wasser/NH₃ 100:1) chromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 96 % Eisen (0.70 mmol, 0.028 M)

CHN-Analyse (Zentrifugation): C 8.81 %, H 1.91 %, N 0.47 %, S 0.74 %

CHN-Analyse (Chromatographie): C 8.27 %, H 1.70 %, N 0.59 %, S 0.39 %

Synthese von Carboxy-thioharnstoff-amino-CLIO (46, CLIO-NCS-COOH)

Versuch 150: 46a

10.0 ml einer mit NaHCO₃ auf pH 9.0 gepufferten Lösung von **17e** (1.00 mmol Fe, 0.05 mmol N) wurden mit 40 µL Triethylamin (29 mg, 0.28 mmol) und 25 µL Ethyl-2-

isothiocyanatoacetat (29 mg, 0.20 mmol in 0.6 ml DMSO) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 24 h in den Kühlschrank gestellt. Der hierbei ausgefallene, weiße Feststoff wurde abfiltriert. Nach einer Dialyse wurde die Lösung zur Vorbereitung der Zentrifugation für 20 h bei 4 °C aufbewahrt. Es trat erneut ein weißer Niederschlag auf. Daraufhin wurde die Lösung mit 2.0 ml einer 2 N Natronlauge versetzt und 4 h bei 60 °C gerührt. Nach einer Dialyse und Größenausschlusschromatographie (Laufmittel: Wasser/NH₃ 100:1) erhielt man 10.0 ml einer Suspension von **46a**.

CHN-Analyse: C 7.14 %, H 1.59 %, N 0.42 %, S 0.18 %

Versuch 151: 46b

Analog zu Versuch 149 wurde **17g** (5.0 ml, 0.55 mmol Fe, 0.07 mmol N) mit NaHCO₃ gepuffert. Die Lösung wurde mit 50 µL Ethyl-2-isothiocyanatoacetat (59 mg, 0.4 mmol) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit 5 ml 2 N NaOH versetzt und 5 h bei 50 °C gerührt. Die Lösung wurde 5 h dialysiert und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Der schwarze Rückstand wurde in 8 ml Wasser aufgenommen und anschließend gefiltert (0.45 und 0.22 µm).

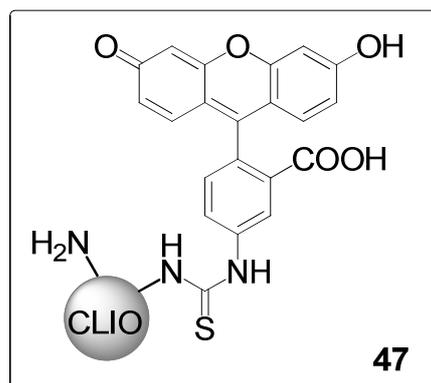
Ausbeute: 84 % Eisen (0.46 mmol, 0.046 M)

CHN-Analyse: C 7.77 %, H 1.57 %, N 0.66 %, S 0.28 %

Versuch 152: 46c

Versuch 151 wurde unter Zugabe von 20 µL Triethylamin (15 mg, 0.14 mmol) mit **17f** (5.0 ml, 0.24 mmol Fe, 17 µmol N), 6 µL Ethyl-2-isothiocyanatoacetat (10 mg, 71 µmol in 0.2 ml DMSO) und 5 ml 2 N NaOH wiederholt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Dialyse und Chromatographie an Sephadex G25 (Laufmittel: Wasser/NH₃ 100:1).

CHN-Analyse: C 10.10 %, H 2.20 %, N 1.61 %, S 1.58 %

Synthese von FITC-amino-CLIO (47, CLIO-NH-FITC)**Versuch 153: 47a**

17g (0.55 mmol Fe, 0.07 mmol N) wurde in 5.0 ml einer mit Natriumcarbonat (42 mg, 0.5 mmol) gepufferten Lösung mit DIPEA (10 μ L, 8 mg, 0.06 mmol) versetzt. Nach Zugabe von Fluoresceinisothiocyanat (FITC, 1.5 mg, 4 μ mol in 0.2 ml DMSO) wurde das Reaktionsgemisch 18 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 0.5 ml 2 N NaOH versetzt und 1 h bei 40 °C gerührt. Nachdem das Gemisch 5 h dialysiert worden war, fielen die Partikel aus der Lösung aus. Die Kolloide wurden dreimal durch Zentrifugation aus der wässrigen Phase abgetrennt, wobei die überstehende Lösung Fluoreszenz aufwies.

CHN-Analyse: C 10.50 %, H 1.49 %, N 1.10 %, S 0.20 %

Versuch 154: 47b

20a (5.0 ml, 0.24 mmol Fe, 0.01 mmol N) wurde mit Natriumhydrogencarbonat (47 mg, 0.56 mmol), DIPEA (44 μ L, 33 mg, 0.25 mmol) und FITC (1 mg, 3 μ mol in 0.3 ml DMSO) versetzt und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 15 ml DMSO/EtOH 1:1 gefällt, zweimal mit DMSO/EtOH 1:1 und dreimal mit Ethanol gewaschen. Nach Wiederaufnahme in 8 ml Wasser wurde die erhaltene Lösung 4 h dialysiert und anschließend 30 min bei 13000 g zentrifugiert.

Man erhielt 4.1 ml einer Suspension von **47b**.

CHN-Analyse: C 10.95 %, H 2.02 %, N 0.80 %, S 0.25 %

Versuch 155: 47c

Nach Versuch 154 wurde **19b** (4.3 ml, 0.86 mmol Fe, 0.06 mmol N) in 0.13 N NaHCO₃-Lösung mit DIPEA (0.2 ml, 0.15 g, 1.2 mmol) und FITC (2 mg, 5 μ mol in 0.3 ml DMSO) versetzt und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde analog zu Versuch 154 aufgereinigt.

Ausbeute: 75 % Eisen (0.65 mmol, 0.108 M)

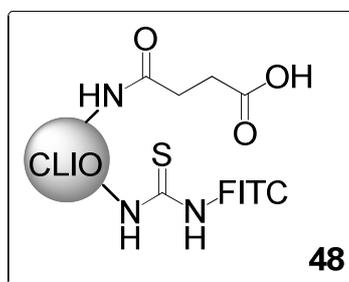
CHN-Analyse: C 7.76 %, H 1.71 %, N 0.69 %, S 0.17 %

Versuch 156: 47d

3.0 ml einer Suspension von CLIO-NH₂-T20 (0.38 mmol Fe, 0.05 mmol N) wurden mit NaHCO₃ (29 mg, 0.35 mmol) gepuffert und mit DIPEA (0.1 ml, 74 mg, 0.57 mmol) und FITC (3 mg, 8 μmol in 0.3 ml DMSO) für 19 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden durch fünfmaliges Waschen mit EtOH gereinigt und in 4 ml Wasser resuspendiert.

CHN-Analyse: C 12.78 %, H 2.30 %, N 1.29 %, S 0.13 %

Darstellung von Carboxy-FITC-amino-CLIO (48, CLIO-NH-FITC-COOH)



Versuch 157: 48a

47c (2.3 ml, 0.25 mmol Fe, 0.01 mmol N) wurde mit NaHCO₃ (19 mg, 0.23 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (37 mg, 0.37 mmol in 1 ml DMSO) für 18 h zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden durch Zugabe von Ethanol gefällt, viermal mit Ethanol gewaschen und in 3.5 ml Wasser resuspendiert.

Ausbeute: 100 % Eisen (0.25 mmol, 0.075 M)

CHN-Analyse: C 8.76 %, H 1.89 %, N 0.74 %, S 0.27 %

FITC / Kern: 15

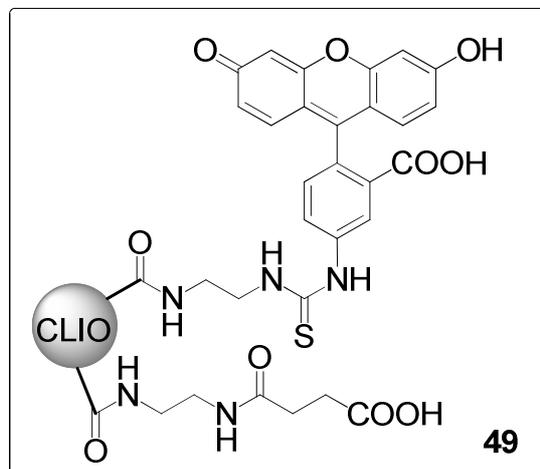
Versuch 158: 48b

3.0 ml einer Suspension von **47d** wurden in 0.1 M NaCO₃-Lösung mit Bernsteinsäureanhydrid (40 mg, 0.40 mmol in 1.5 ml DMSO) versetzt und 44 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit 10 ml Ethanol gefällt und zweimal mit EtOH gewaschen, bis kein Farbstoff in der organischen Phase detektiert werden konnte. Die Kolloide wurden in 4 ml Wasser aufgenommen und 15 min bei 13000 g zentrifugiert.

Ausbeute: 0.29 mmol, 0.095 M an Eisen

CHN-Analyse: C 13.58 %, H 2.37 %, N 1.24 %, S 0.20 %

Synthese von Carboxy-FITC-diaminoethan-CLIO (49, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-FITC-COOH)



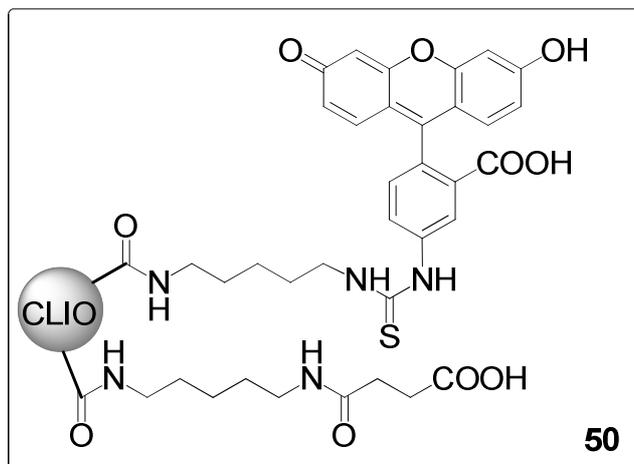
Versuch 159:

2.4 ml einer Suspension von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂-T20 (**39**, 0.22 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit NaHCO₃ (24 mg, 0.29 mmol), DIPEA (15 µL, 11 mg, 0.09 mmol) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC, 2.8 mg, 7 µmol in 0.5 ml DMSO) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von 10 ml Ethanol gefällt und viermal mit EtOH gewaschen. Nach Wiederaufnahme in 6 ml Wasser wurde die Kolloidlösung mehrmals bei 13000 g zentrifugiert und anschließend in 2 ml Wasser resuspendiert. Diese Suspension wurde mit NaHCO₃ (17 mg, 0.2 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (7 mg, 0.07 mmol in 0.5 ml DMSO) für 19 h zur Reaktion gebracht. Die Aufreinigung erfolgte erneut durch Fällung und dreimaliges Waschen mit EtOH und Zentrifugieren bei 13000 g für 40 min. Nach Wiederaufnahme der Partikel in Wasser erhielt man 1.5 ml einer Suspension von **49**.

Ausbeute: 78 % Eisen (0.17 mmol, 0.115 M)

FITC / Kern: 45

Synthese von Carboxy-FITC-diaminopentan-CLIO (50, CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH-FITC-COOH)



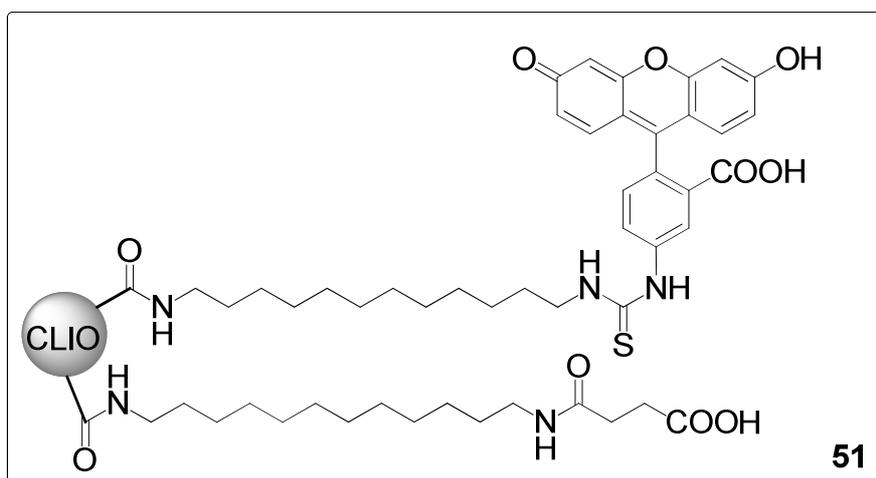
Versuch 160:

Die Synthese von **50** erfolgte mit CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH₂-T20 (**40**, 0.20 mmol Fe, 0.02 mmol N) analog zu Versuch 159.

Ausbeute: 90 % Eisen (0.18 mmol, 0.121 M)

FITC / Kern: 50

Synthese von Carboxy-FITC-diaminododecan-CLIO (51, CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH-FITC-COOH)

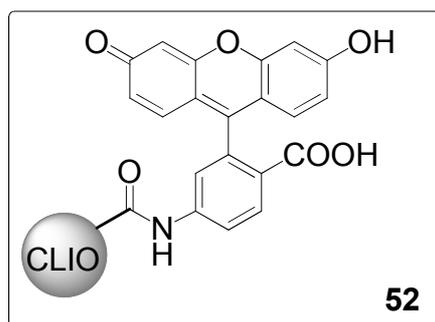


Versuch 161:

Gemäß Versuch 159 wurde CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH₂-T20 (**41**, 0.23 mmol Fe, 0.02 mmol N) zu **51** umgesetzt.

Ausbeute: 76 % Eisen (0.18 mmol, 0.117 M)

FITC / Kern: 50

Darstellung von 6-Aminofluorescein-carboxy-CLIO (52, CLIO-COO-NH-FA)**Versuch 162: 52a**

2.0 ml einer Suspension von CLIO-COOH-T20 (**35**, 0.09 mmol, 0.01 mmol N) wurden in 0.05 M MES- und 0.1 M NaCl-Lösung mit EDC (62 mg, 0.32 mmol) und 6-Aminofluorescein (7.6 mg, 22 μ mol in 1 ml DMSO) für 20 h zur Reaktion gebracht. Zur Reinigung wurden die Partikel mit EtOH gefällt und viermal gewaschen und nach der Wiederaufnahme in Wasser 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Man erhielt 2.0 ml einer Suspension von **52a**.

CHN-Analyse (**52a**): C 14.66 %, H 2.55 %, N 1.33 %

CHN-Analyse (**35**): C 13.63 %, H 2.52 %, N 1.21 %

Versuch 163: 52b

Nach Versuch 162 wurde **35** (4.8 ml, 0.55 mmol, 0.06 mmol N) mit EDC (159 mg, 0.8 mmol) und 6-Aminofluorescein (5 mg, 6 μ mol in 1 ml DMSO) umgesetzt und aufgereinigt.

Ausbeute: 95 % Eisen (0.52 mmol, 0.104 M)

CHN-Analyse (**52b**): C 14.05 %, H 2.49 %, N 1.22 %

CHN-Analyse (**35**): C 13.63 %, H 2.52 %, N 1.21 %

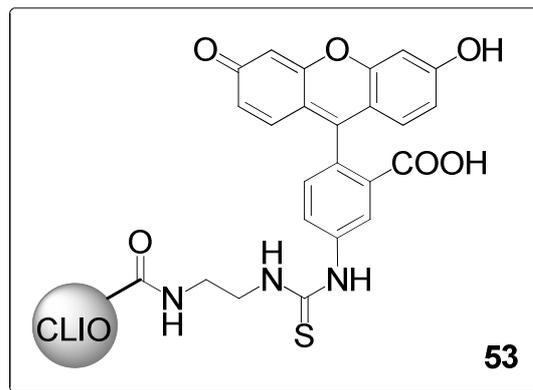
Versuch 164: 52c

Gemäß Versuch 162 wurde **35** (1.7 ml, 0.17 mmol, 0.01 mmol N) mit EDC (11 mg, 0.06 mmol) und 6-Aminofluorescein (2 mg, 14 μ mol in 1 ml DMSO) zur Reaktion gebracht und aufgereinigt.

Ausbeute: 100 % Eisen (0.17 mmol, 0.117 M)

6-Aminofluorescein / Kern: 50

Synthese von FITC-diaminoethan-CLIO (53, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-FITC)



Versuch 165:

Nach Versuch 159 wurde CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂-T20 (**39**, 4.5 ml, 0.39 mmol Fe, 0.04 mmol N) mit NaHCO₃ (50 mg, 0.60 mmol), DIPEA (50 µL, 37 mg, 0.29 mmol) und Fluoresceinisothiocyanat (7.8 mg, 20 µmol in 0.5 ml DMSO) für 18 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden mit 10 ml Ethanol gefällt und solange mit EtOH gewaschen, bis die organische Phase keine Fluoreszenz mehr zeigte. Die Kolloide wurden in Wasser aufgenommen und bei 13000 g zentrifugiert. Da die überstehende Lösung Fluoreszenz aufwies, wurde die Zentrifugation bis zum Ausbleiben der Fluoreszenz in der wässrigen Phase wiederholt.

Ausbeute: 79 % Eisen (0.31 mmol, 0.077 M)

CHN-Analyse (Anfang): C 13.04 %, H 2.38 %, N 0.96 %, S 0.34

CHN-Analyse (Ende): C 13.25 %, H 2.38 %, N 0.93 %, S 0.26

FITC / Kern (CHN-Analyse): 110

FITC / Kern (UV-Spektrum): 70

FITC / Kern (Aufschlussverfahren): 80

Versuch 166: Messung eines UV-Spektrums von 53

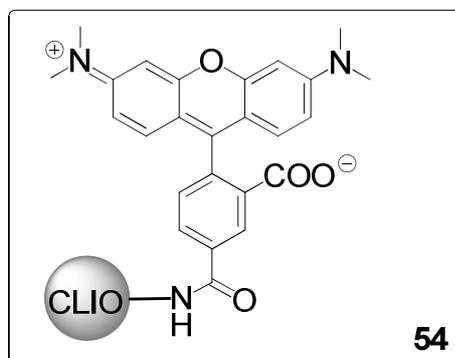
0.2 ml einer Suspension von **53** wurden mit 11.8 ml Wasser auf eine Eisenkonzentration von $1.28 \cdot 10^{-3}$ M verdünnt. Das UV-Spektrum dieser Lösung zeigte eine zu größeren Wellenlängen hin abfallende Extinktion des Eisenhintergrunds mit einer Absorptionsbande von FITC mit dem Wert 1.2 bei 490 nm.

Versuch 167: Erstellen einer Eichgeraden zur Bestimmung der Fluoresceinkonzentration einer wässrigen Lösung

6-Aminofluorescein (4.3 mg, 0.0124 mmol) wurde in 10.0 ml DMSO gelöst. Diese organische Lösung wurde mit Wasser auf eine Konzentrationen an 6-Aminofluorescein von $1.5\text{-}11.6 \cdot 10^{-6}$ mol / L verdünnt. 0.1 ml dieser Lösungen wurden mit 0.2 ml konz. Schwefelsäure, 1.0 ml Weinsäurelösung (80 mg/ml) und 4.0 ml 3 N NaOH versetzt. Nach 10-15 min wurde die Absorption der Messlösungen bei 490 nm bestimmt.

AAV 11 - Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung einer UV-Messung von Fluoreszenz-markierten Partikeln

Nach Versuch 167 wurden 0.1 ml einer Fluoreszenz-markierten Kolloidlösung mit einer ca. 0.1 M Eisenkonzentration nach der Behandlung mit 0.2 ml konz. H_2SO_4
1.0 ml Weinsäurelösung (80 mg/ml)
4.0 ml 3 N NaOH vermessen.

Synthese von TAMRA-amino-CLIO (54, CLIO-NH-TAMRA)**Versuch 168: 54a**

3.0 ml einer CLIO-NH₂-T5-Lösung aus **18a** (0.14 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit Natriumhydrogencarbonat (25 mg, 0.3 mmol) vorgelegt. TAMRA-SE (1 mg, 2 μmol in 0.1 ml DMSO) wurde hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zugabe von DMSO/EtOH (2:1) gefällt und mit DMSO gewaschen. Nach Resuspendierung in 2 ml Wasser zeigte die Partikellösung keine charakteristische Rhodaminfärbung.

Versuch 169: 54b

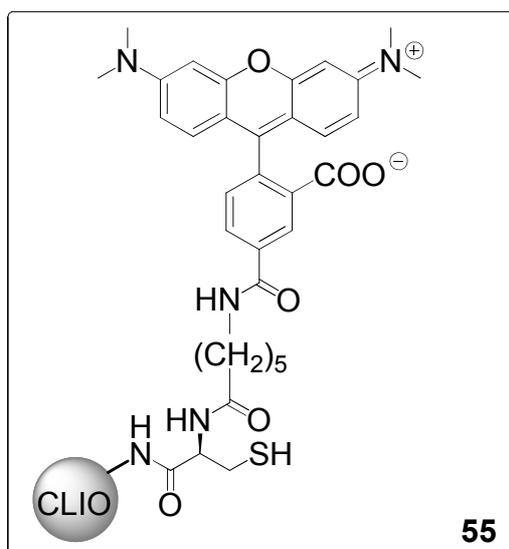
2.8 ml von **18a** (0.13 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (50 mg, 0.13 mmol) und 1.4 ml 0.1 N HCl auf einen pH-Wert von 8.0-8.5 gepuffert. TAMRA-SE (1 mg, 2 μmol in 0.6 ml DMSO) wurde hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit 6 ml DMSO/EtOH (1:1) gefällt, zweimal mit 5 ml DMSO/EtOH (1:1) und zweimal mit 5 ml EtOH gewaschen. Da die überstehende organische Phase keine Färbung aufzeigte, wurden die Partikel in 1.0 ml Wasser aufgenommen. Die Kolloidlösung zeigte aber keine Rhodaminfärbung.

Versuch 170: 54c

5.0 ml einer CLIO-NH₂-Lösung aus **19a** (0.94 mmol Fe, 0.06 mmol N) wurden mit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (90 mg, 0.24 mmol), 2.2 ml 0.1 N HCl und 0.1 ml DIPEA (74 mg, 0.6 mmol) vorgelegt und mit TAMRA-SE (2 mg, 4 μmol in 0.3 ml DMSO) für 17 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden durch Zugabe von DMSO gefällt und mehrmals mit Ethanol gewaschen. Eine wässrige Suspension der gereinigten Partikel zeigte jedoch keine Anzeichen des Rhodaminfarbstoffs.

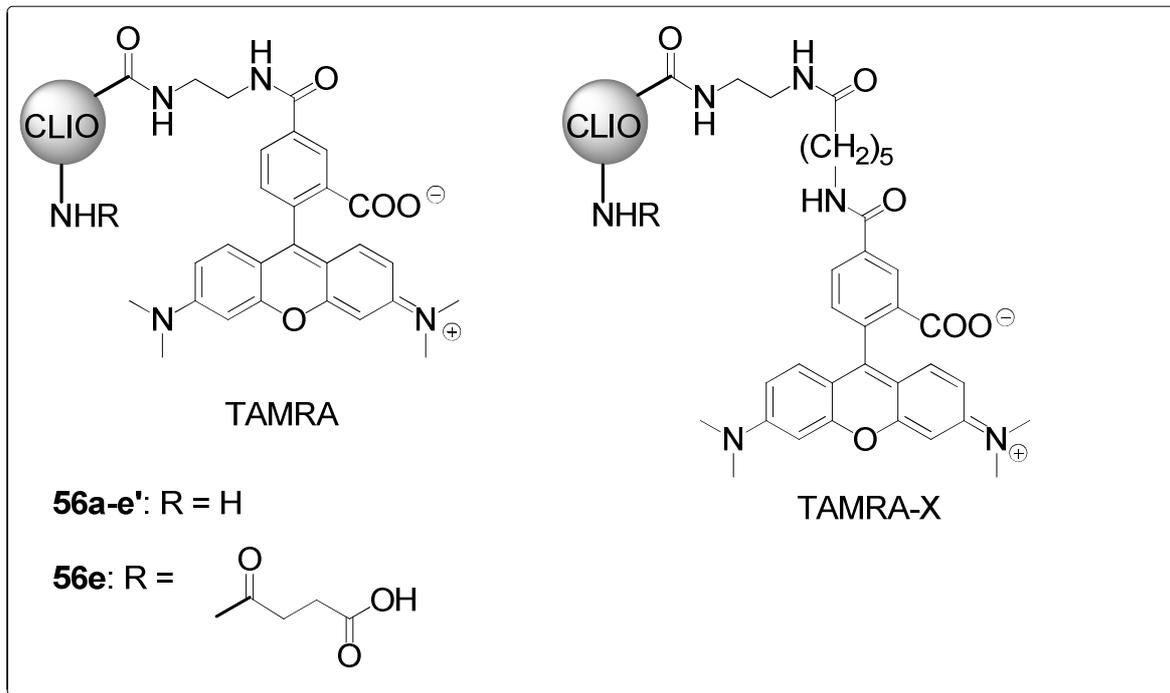
Versuch 171: 54d

Analog zu Versuch 169 wurde **18a** (1.4 ml, 0.06 mmol Fe, 0.01 mmol N) mit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (25 mg, 0.07 mmol), 0.7 ml 0.1 N HCl und TAMRA-SE (1 mg, 2 μmol in 0.1 ml DMSO) umgesetzt. Nachdem die Partikel mit DMSO gefällt worden waren und die anschließende DMSO-Waschlösung keine Färbung aufwies, wurden die Partikel in 5 ml Wasser aufgenommen und 30 min bei 13000 g zentrifugiert. Hierbei zeigte die überstehende Lösung eine Rosafärbung und der Versuch wurde abgebrochen.

Synthese von TAMRA-X-Cystein-amino-CLIO (55, CLIO-NH-Cys-TAMRA-X)**Versuch 172:**

1.0 ml einer Suspension von CLIO-NH-Cys (**44**, 0.08 mmol Fe, 6 μ mol N) wurden mit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (18 mg, 0.05 mmol) und 0.5 ml 0.1 N HCl versetzt. Da die Partikel als schwarzer Niederschlag ausfielen, wurde TCEP*HCl (5 mg, 0.02 mmol) hinzugegeben und der pH-Wert durch DIPEA (5 μ L, 4 mg, 0.03 mmol) auf einen Bereich zwischen 8-9 eingestellt. Nach Zugabe von TAMRA-X-SE (0.5 g, 0.08 μ mol in 0.1 ml DMSO) wurde das Reaktionsgemisch 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch das Fällern und Waschen mit EtOH (insgesamt dreimal) und Zentrifugieren bei 13000 g aufgereinigt. Es konnte keine Fluoreszenzmarkierung festgestellt werden.

Darstellung von (Carboxy-)TAMRA- und (Carboxy-)TAMRA-X-diaminoethan-CLIO (56, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA(-carboxy) / -TAMRA-X(-carboxy))



Versuch 173: 56a

2.0 ml einer Suspension von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**, 0.17 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit Na₂B₄O₇·H₂O (36 mg, 0.1 mmol) und 1.0 ml 0.1 N HCl auf einen pH-Wert von 8.3 gepuffert. Nach Zugabe von TAMRA-SE (2 mg, 4 μmol in 0.2 ml DMSO) wurde die Lösung 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit EtOH gefällt und zweimal mit EtOH gewaschen. Nach Wiederaufnahme in 5 ml Wasser wurden die Kolloide mehrmals zentrifugiert, bis die überstehende Lösung keine Fluoreszenz mehr aufwies. An den Kolloiden konnte ebenfalls kein Farbstoff detektiert werden.

Versuch 174: 56b

Analog zu Versuch 173 wurde **39** (1.0 ml, 0.12 mmol Fe, 0.01 mmol N) mit Na₂B₄O₇·H₂O (18 mg, 0.05 mmol), 0.5 ml 0.1 N HCl und TAMRA-X-SE (0.05 mg, 0.08 μmol in 0.1 ml DMSO) umgesetzt. Die Partikel wurden durch viermalige Zugabe von EtOH und Zentrifugation bei 13000 g für 1 h gereinigt. Es konnte keine Fluoreszenz an den Partikeln festgestellt werden.

Versuch 175: 56c

1.0 ml einer Lösung von **39** (0.12 mmol Fe, 0.01 mmol N) wurden 20 h mit Natriumhydrogencarbonat (10 mg, 0.12 mmol) und TAMRA-X-SE (1 mg, 2 μ mol in 0.5 ml DMSO) bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufreinigung gemäß Versuch 174 konnte kein Farbstoff an den Kolloiden festgestellt werden.

Versuch 176: 56d

In Anlehnung an Versuch 175 wurde die Umsetzung von **39** (1.0 ml, 0.12 mmol Fe, 0.01 mmol N) mit Natriumhydrogencarbonat (10 mg, 0.12 mmol), TAMRA-X-SE (0.5 mg, 1 μ mol) und DIPEA (25 μ L, 19 mg, 0.14 mmol) durchgeführt. Die gereinigten Partikel zeigten keine Fluoreszenz.

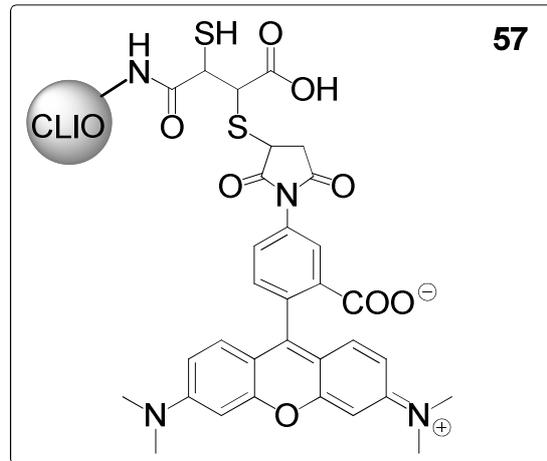
Versuch 177: 56e

Gemäß Versuch 176 wurden 2.0 ml einer Lösung von **39c** (1.0 ml, 0.20 mmol Fe, 0.07 mmol N) mit Natriumhydrogencarbonat (17 mg, 0.20 mmol), DIPEA (10 μ L, 8 mg, 0.06 mmol) und einem Gemisch aus TAMRA-SE und TAMRA-X-SE von unbekannter Konzentration in 0.5 ml DMSO für 18 h zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden mit Ethanol gewaschen und nach Wiederaufnahme in Wasser zentrifugiert, bis die jeweilige überstehende organische bzw. wässrige Phase keine Fluoreszenz mehr aufzeigte. 0.1 ml der erhaltenen Partikellösung (2 ml) wurden mit 0.3 ml konz. Schwefelsäure versetzt und nach Auflösung der Partikel, die sich durch einen Farbwechsel von schwarz zu gelblich-klar erkennen ließ, mit 5 ml Wasser zu **56e'** verdünnt. Da diese Lösung eine starke Rosafärbung zeigte, wurde die restliche Kolloidlösung von **56e'** zur nochmaligen Aufreinigung nach **AAV 7** mit Bernsteinsäureanhydrid zu **56e** umgesetzt. Hierbei konnte keine Abtrennung von TAMRA-Molekülen beobachtet werden und man erhielt 1.5 ml einer Lösung von **56e**. Von dieser Suspension wurde nach **AAV 11** ein UV-Spektrum gemessen, woraus mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten eine Markierung von 10 TAMRA-Molekülen pro Eisenoxid-kern berechnet wurde.

Ausbeute: 70 % Eisen (0.14 mmol, 0.093 M)

TAMRA / Kern (Aufschlussverfahren): 10

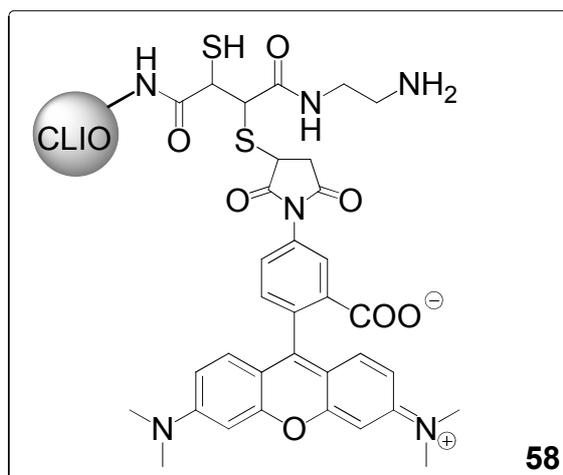
Darstellung von TAMRA-succinimid-dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (57, CLIO-DMSA-succinimid-TAMRA)



Versuch 178:

CLIO-DMSA (**42**, 0.49 mmol Fe, 0.04 mmol S) wurde mit TCEP*HCl (15 mg, 0.05 mmol) in 4 ml Wasser resuspendiert und mit konz. Ammoniak auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Nach der in der Literatur beschriebene Weise^[114] wurden die Kolloide mit 0.1 ml einer TAMRA-Maleimid-haltigen Acetonlösung unbekannter Konzentration für 20 h bei Raum-temperatur umgesetzt. Nach der Reinigung der Partikel durch Waschen mit EtOH und Zentrifugieren bei 13000 g konnte keine Fluoreszenz an den Kolloiden nachgewiesen werden.

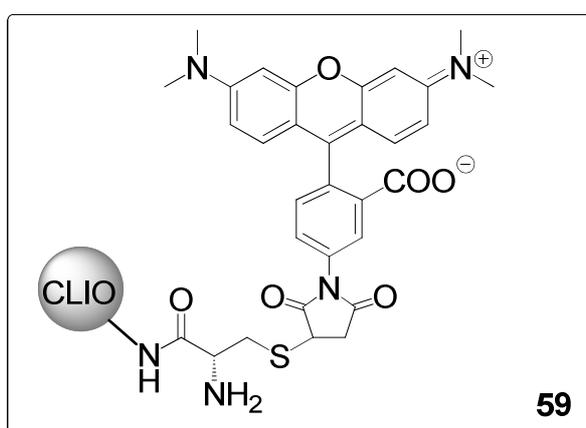
Synthese von TAMRA-succinimid-diaminoethan-dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (58, CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂-succinimid-TAMRA)



Versuch 179:

CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**43**) unbekannter Konzentration lag als Bodensatz in 1.5 ml PBS-Puffer-Lösung vor und wurde durch Zugabe von TCEP resuspendiert. Die Lösung wurde mit konz. NH₃ neutralisiert (pH 7) und mit TAMRA-Maleimid in 0.2 ml Aceton für 17 h bei Raumtemperatur umgesetzt. An den aufgereinigten Partikeln (Fällung und Waschen mit Ethanol, Zentrifugation bei 13000 g) konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden.

Synthese von TAMRA-succinimid-Cystein-amino-CLIO (59, CLIO-NH-Cys-succinimid-TAMRA)

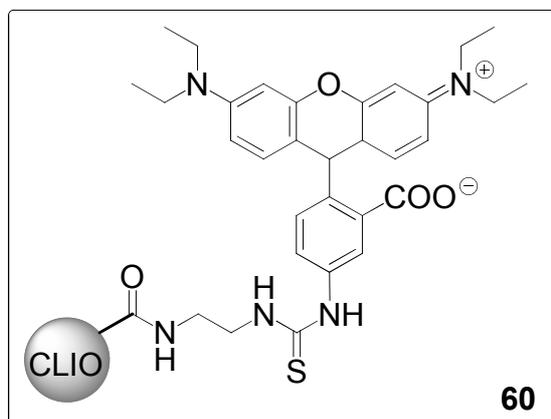


Versuch 180:

CLIO-NH-Cys (**44**, 0.15 mmol Fe) wurde mittels TCEP in 2.0 ml einer mit PBS-Puffer und 3 N Natronlauge auf pH 7 gepufferten Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde

mit TAMRA-Maleimid in Aceton versetzt und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit EtOH gefällt, dreimal mit EtOH gewaschen und 1 h bei 13000 g zentrifugiert. Die Partikel zeigten keine Fluoreszenz.

Darstellung von RBITC-diaminoethan-CLIO (60, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-RBITC)

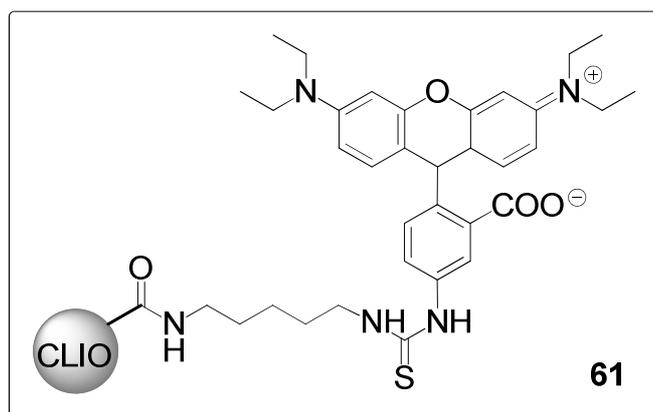


Versuch 181:

1.6 ml einer Lösung von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**, 0.17 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit NaHCO₃ (16 mg, 0.19 mmol) und DIPEA (10 µL, 7 mg, 0.06 mmol) vorgelegt und mit Rhodamin B-Isothiocyanat-Hydrochlorid (RBITC, 4 mg, 7 µmol in 0.5 ml DMSO) für 18 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Partikel wurden mit Ethanol gefällt und gewaschen, bis die überstehende organische Phase farblos blieb. Die Kolloide wurden in 6 ml Wasser resuspendiert und zweimal bei 13000 g zentrifugiert. Man erhielt 1.5 ml einer Lösung von **60**.

Ausbeute: 95 % Eisen (0.16 mmol, 0.108 M)

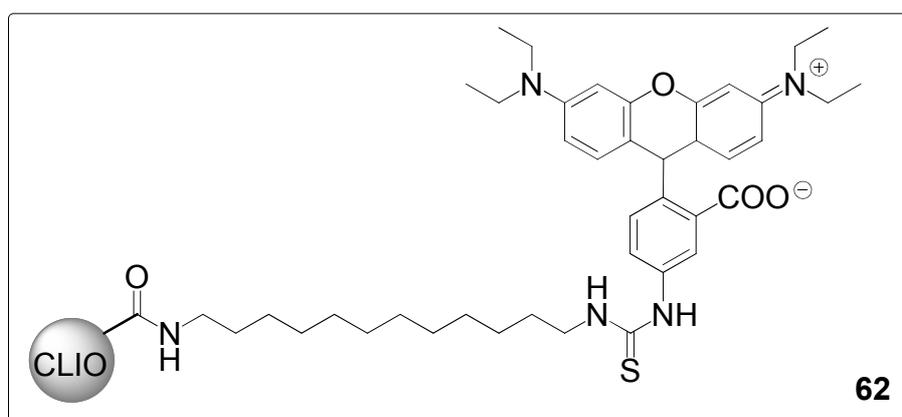
RBITC / Kern: 80

Synthese von RBITC-diaminopentan-CLIO (61, CLIO-NH-(CH₂)₅-NH-RBITC)**Versuch 182:**

Analog zu Versuch 181 wurde CLIO-NH-(CH₂)₅-NH₂ (**40**, 2.0 ml, 0.18 mmol Fe, 3 μmol N) mit NaHCO₃ (20 mg, 0.12 mmol), DIPEA (10 μL, 7 mg, 0.06 mmol) und RBITC (4 mg, 7 μmol in 0.5 ml DMSO) umgesetzt und aufgereinigt.

Ausbeute: 67 % Eisen (0.12 mmol, 0.082 M)

RBITC / Kern: 15

Synthese von RBITC-diaminododecan-CLIO (62, CLIO-NH-(CH₂)₁₂-NH-RBITC)**Versuch 183:**

Die Synthese von **62** erfolgte nach Versuch 182 mit CLIO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ (**41**, 2.0 ml, 0.23 mmol Fe, 6 μmol N).

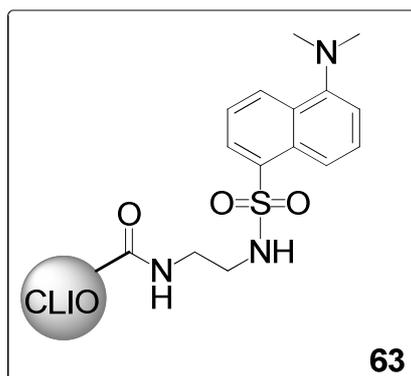
Ausbeute: 74 % Eisen (0.17 mmol, 0.111 M)

RBITC / Kern: 20

Versuch 184: Erstellen einer Eichgeraden zur spektroskopischen Untersuchung von Rhodamin B-Isothiocyanat-hydrochlorid

Rhodamin B-Isothiocyanat-hydrochlorid (2.7 mg, 5.0 μmol) wurde in 1.0 ml DMSO gelöst und anschließend mit 9.0 ml Wasser auf eine Konzentration von $5.0 \cdot 10^{-4}$ M verdünnt. Diese Stammlösung wurde mit Wasser auf Konzentrationen zwischen $1.0 \cdot 10^{-4}$ M und $5.0 \cdot 10^{-4}$ M eingestellt. Mit jeweils 0.1 ml dieser Lösungen wurden nach **AAV 11** UV-Spektren bei 550 nm gemessen. Als Kontrolle wurden 3.2 mg RBITC (6.0 μmol in 0.6 ml DMSO) in 4.4 ml Wasser gelöst. Nach der Verdünnung auf Konzentrationen zwischen $1.0 \cdot 10^{-4}$ M und $12.0 \cdot 10^{-4}$ M wurde wiederum nach **AAV 11** UV-Spektren aufgenommen. Aus den Werten beider Verdünnungsreihen wurde eine Eichgerade mit der Gleichung $y = 0.0856 \cdot x$ ($R^2 = 0.9899$) für die Bestimmung der Rhodamin B Konzentration in wässrigen Kolloidlösungen erstellt.

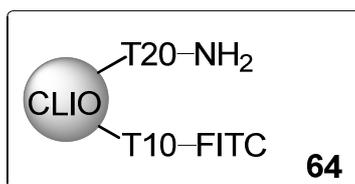
Darstellung von Dansyl-diaminoethan-CLIO (63, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Dansyl)



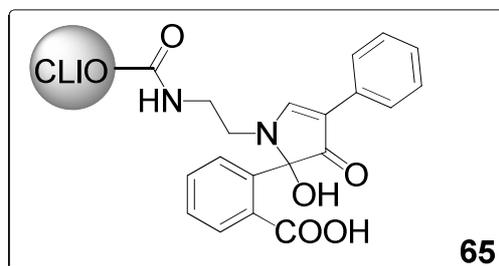
Versuch 185:

2.2 ml einer Suspension von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**, 0.24 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit NaHCO₃ (19 mg, 0.23 mmol) gepuffert und mit Dansylchlorid (25 mg, 0.1 mmol in 1 ml EtOH) für 17 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Während der Umsetzung kam es zu einer Eintrübung der Lösung und es setzte sich etwas schwarzer Feststoff am Magnetrührstab ab. Die Partikel wurden gänzlich mit EtOH gefällt und sechsmal mit EtOH gewaschen, bis die überstehende Lösung farblos erschien. Nach Resuspendierung in 4 ml Wasser zeigte sich bei der anschließenden Zentrifugation eine leichte Gelbfärbung der wässrigen Phase. Nach einer zweiten Zentrifugation wurden die Kolloide wiederum in 2 ml Wasser resuspendiert.

CHN-Analyse: C 10.24 %, H 1.91 %, N 0.81 %, S 0.42 %

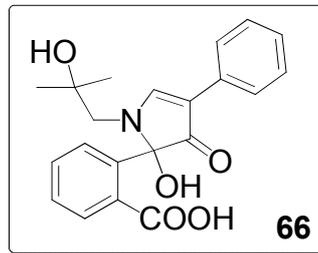
Darstellung von T10-FITC-amino-CLIO (64, CLIO-NH₂-T10-FITC)**Versuch 186:**

10.0 ml einer Suspension von **8c** (1.19 mmol Fe, 0.19 mmol Glucosemonomer, 30 mg Dextran T20) wurden mit Dextran T10-FITC (7 mg, 0.7 μ mol) vorgelegt und nach **AAV 6** mit 1.0 ml 3 N NaOH, Epichlorhydrin (je 1.0 ml, 1.2 g, 12.8 mmol) und Ammoniak (1.0 ml, 0.2 g, 12.6 mmol und 4.8 ml, 1.1 g, 60.7 mmol) umgesetzt und durch Zugabe von EtOH aufgereinigt. **64** zeigte nach Wiederaufnahme in Wasser keine Fluoreszenz.

Synthese von Fluorescamin-diaminoethan-CLIO (65, CLIO-NH-CH₂-CH₂-N-Fluorescamin)**Versuch 187:**

0.1 ml einer Lösung von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**, 8 μ mol Fe, 1 μ mol N) wurden mit 0.9 ml Wasser verdünnt und mit 1.0 ml einer 4 mM Na₂B₄O₇·10 H₂O- und 17 mM HCl-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 0.1 ml einer Fluorescamin-Lösung (0.5 mg, 2 μ mol) wurde das Gemisch 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eine Fluoreszenzmessung mit einer Anregungswellenlänge von 330 nm durchgeführt.

Synthese von 2-(2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-3-oxo-4-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-yl)benzoesäure (66)



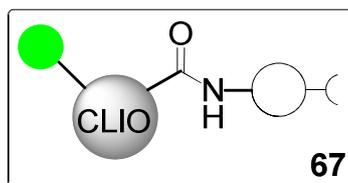
Versuch 188:

1-Amino-2-methylpropan-2-ol (25 μ L, 22 mg, 0.25 mmol) wurden in 10.0 ml Wasser gelöst. 1.0 ml dieser Lösung (2 mg, 25 μ mol) wurden analog zu Versuch 187 mit Tetraborat, HCl und Fluorescamin umgesetzt und ausgewertet.

Versuch 189: Erstellen von verdünnten Kolloidlösungen für die Fluoreszenzmessung

Fluorescein- und Rhodaminhaltige Eisenoxid-Nanopartikel-Lösungen wurden mit Wasser und 3 N NaOH auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt und auf einen pH-Wert von 10 eingestellt.

Darstellung von Antikörper-6-amino-Fluorescein-carboxy-CLIO (67, CLIO-COO-NH-FA-AK) und anschließende Umsetzung mit Blutplasma



Versuch 190:

MES (50 mg, 0.26 mmol) und NaCl (30 mg, 0.51 mmol) wurden in 2.5 ml Wasser gelöst und mit 2.5 ml einer Lösung von 6-Aminofluorescein-markierten Carboxy-CLIO (52, ungefähre Eisenkonzentration 0.1 M) verschiedener Chargen versetzt. Es wurde EDC (40 mg, 0.21 mmol) hinzugegeben. Anschließend wurden je 0.5 ml dieser Lösung mit 0.5 ml einer Antikörperlösung aus 97H1, 56F8, 89A2, 3F3 und 5D7 vermischt und 1 h mittels einer Vortex geschüttelt. Aus diesen Lösungen wurden 0.1 ml entnommen und mit derselben Menge an Blut vermengt. Das Gemisch wurde stark verdünnt und zur Auswertung in ein Durchflusszytometer eingebracht. Aus den

verbliebenen 0.9 ml Antikörper-Kolloid-Lösungen wurden die Partikel mit EtOH gefällt und zweimal gewaschen. Nach Wiederaufnahme in 1.5 ml Wasser und Zentrifugieren der Kolloide für 1 h bei 13000 g wurden Elementaranalysen durchgeführt.

CHN-Analyse (97H1): C 15.03 %, H 2.78 %, N 2.35 %, S 0.73 %

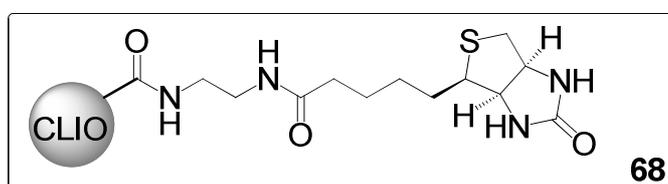
CHN-Analyse (56F8): C 14.69 %, H 2.57 %, N 2.27 %, S 0.36 %

CHN-Analyse (89A2): C 15.03 %, H 2.69 %, N 2.28 %, S 0.29 %

CHN-Analyse (3F3): C 15.68 %, H 2.76 %, N 2.82 %

CHN-Analyse (5D7): C 14.52 %, H 2.60 %, N 1.98 %

Synthese von Biotin-diaminoethan-CLIO (**68**, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Biotin)



Versuch 191: **68a**

2.0 ml einer CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂-Lösung (**39**, 0.17 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden mit MES (21 mg, 0.11 mmol) und NaCl (13 mg, 0.22 mmol) auf pH 6 gepuffert. Es wurden EDC (32 mg, 0.17 mmol) und Biotin (24 mg, 0.1 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 1 ml DMSO 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die teilweise ausgefallenen Partikel wurden mit Ethanol vollends gefällt, dreimal mit EtOH gewaschen und in 2.0 ml Wasser resuspendiert.

Ausbeute: 70 % Eisen (0.14 mmol, 0.068 M)

CHN-Analyse: C 9.79 %, H 2.01 %, N 0.82 %, S 0.32 %

CHN-Analyse (Edukt): C 10.15 %, H 1.87 %, N 1.23 %

Versuch 192: **68b**

Biotin (20 mg, 0.08 mmol) wurde unter Erwärmen in 1 ml DMF gelöst und mit 2 ml einer 0.05 M MES- und 0.1 M wässrigen Lösung versetzt. Nach Zugabe von EDC (15 mg, 0.08 mmol) wurde das Gemisch 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.0 ml einer CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂-Lösung (**39**, 0.08 mmol Fe, 0.01 mmol N) hinzugegeben, der pH-Wert mit Natriumhydrogencarbonat (19 mg, 0.23 mmol) auf 9 gebracht und die Reaktionslösung erneut 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch dreimalige Zugabe von Ethanol gereinigt und in 1.0 ml Wasser aufgenommen.

Ausbeute: 80 % Eisen (0.06 mmol, 0.064 M)

CHN-Analyse: C 9.37 %, H 2.06 %, N 0.73 %, S 0.07 %

CHN-Analyse (Edukt): C 10.15 %, H 1.87 %, N 1.23 %

Versuch 193: 68c

2.0 ml einer CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂-Lösung (**39**) unbekannter Eisenkonzentration wurden mit NaHCO₃ (17 mg, 0.2 mmol), DIPEA (19 µL, 14 mg, 0.1 mmol) und Natrium-Biotin-3-sulfo-N-hydroxysuccinimidylester (Sulfo-NHS-Biotin, 7 mg, 16 µmol) versetzt und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden mit Ethanol gefällt und zweimal gewaschen. Nach Wiederaufnahme in 3 ml Wasser und Zentrifugieren (1 h bei 13000 g) erhielt man 2.0 ml einer Suspension von **68c**.

Ausbeute: 0.19 mmol, 0.094 M an Eisen

CHN-Analyse: C 13.16 %, H 2.31 %, N 1.07 %, S 0.11 %

Versuch 194: 68d

2.7 ml einer Suspension von **39** (0.22 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurden analog zu Versuch 193 mit NaHCO₃ (23 mg, 0.3 mmol), DIPEA (10 µL, 8 mg, 58 µmol) und Sulfo-NHS-Biotin (10 mg, 23 µmol in 0.5 ml DMSO) für 60 h zur Reaktion gebracht und aufgereinigt. Man erhielt 2.5 ml einer Suspension von **68d**.

Ausbeute: 100 % Eisen (0.26 mmol, 0.105 M)

CHN-Analyse: C 10.84 %, H 2.09 %, N 0.93 %, S 0.13 %

CHN-Analyse (**39**): C 11.39 %, H 2.11 %, N 1.26 %

Versuch 195: 68e

CLIO-COOH (**35**, 0.19 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurde in 2.0 ml einer 0.05 M MES- und 0.1 M NaCl-Lösung mit EDC (20 mg, 0.1 mmol) und Sulfo-NHS (22 mg, 0.1 mmol) für 3 h umgesetzt. Die aktivierten Partikel wurden mit Ethanol gefällt, zweimal mit Ethanol gewaschen und in 3 ml einer 0.1 N NaHCO₃-Lösung resuspendiert.

Biotin (40 mg, 0.16 mmol) wurde unter Erwärmen in 2.0 ml DMF gelöst und mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 46 mg, 0.22 mmol) versetzt. Nach der Zugabe von Ethylendiamin (50 µL, 45 mg, 0.75 mmol) in 1 ml DMF trübte sich die Lösung milchig ein und wurde anschließend 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Zentrifugieren (10 min / 13000 g) erhaltene weiße Feststoff wurde in 1 ml Wasser gelöst und zu der Partikellösung hinzugegeben.

Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und die Kolloide wurden durch dreimalige Zugabe von 8 ml Ethanol und Zentrifugieren (2 h / 13000 g) gereinigt.

Ausbeute: 79 % Eisen (0.15 mmol, 0.074 M)

CHN-Analyse: C 13.59 %, H 2.48 %, N 0.95 %, S 0.09 %

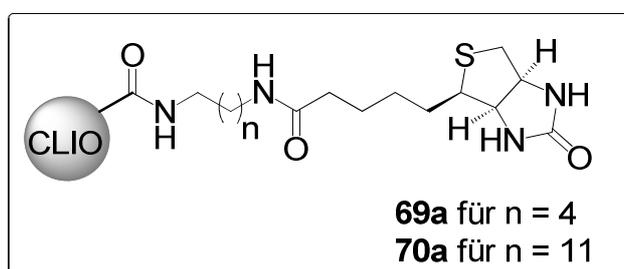
CHN-Analyse (**35**): C 15.12 %, H 2.72 %, N 0.92 %

Versuch 196: 68f

Biotin (25 mg, 0.10 mmol) wurde mit DCC (32 mg, 0.15 mmol) in Ethanol als weißlich-trübe Suspension vorgelegt und mit Ethylendiamin (0.1 ml, 90 mg, 1.50 mmol) versetzt. Hierdurch wurde eine farblose, klare Lösung erhalten, die nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur im Vakuum eingeeengt wurde. Der erhaltene weiße Feststoff wurde in 1 ml EtOH gelöst und mit Carboxy-CLIO (**35**, 0.19 mmol Fe, 0.07 mmol N), die wie beschrieben mit EDC (25 mg, 0.13 mmol) und Sulfo-NHS (32 mg, 0.15 mmol) behandelt und anschließend gereinigt worden waren, in 3 ml 0.1 N NaHCO₃-Lösung umgesetzt. Nach der wiederholten Aufreinigung durch Ethanol (dreimal) und Zentrifugieren (1 h / 13000 g) wurden 1.5 ml einer Suspension von **68f** erhalten. Die UV-spektroskopische Untersuchung mit dem Avidin-HABA-Komplex ließ nicht auf eine erfolgreiche Synthese schließen.

Ausbeute: 74 % Eisen (0.14 mmol, 0.074 M)

Synthese von Biotin-diaminopentan-/dodecan-CLIO (**69a/70a**, CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH-Biotin / CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH-Biotin)



Versuch 197: 69a/70a

0.9 ml einer Lösung von Diaminopentan-CLIO (**40b**, 0.07 mmol Fe, 7 μmol N) und 1.0 ml einer Lösung Diaminododecan-CLIO (**41b**, 0.08 mmol, 10 μmol N) wurden zusammen mit NaHCO₃ versetzt und mit Sulfo-NHS-Biotin (5 mg, 21 μmol) für 20 h zur Reaktion gebracht, wobei es zu einer braunen Eintrübung der Lösung kam. Die

Partikel wurden durch Zugabe von EtOH vollends gefällt, zweimal mit EtOH gewaschen und nach Wiederaufnahme in 3 ml Wasser zweimal 2-3 h bei 13000 g zentrifugiert. Man erhielt 2.0 ml eines Gemisches von **69a/70a**.

Ausbeute: 81 % Eisen (0.12 mmol, 0.061 M)

CHN-Analyse: C 12.74 %, H 2.35 %, N 0.77 %, S 0.4 %

CHN-Analyse (**40b**): C 14.34 %, H 2.64 %, N 1.18 %

CHN-Analyse (**41b**): C 15.08 %, H 3.16 %, N 1.38 %, S 0.4 %

Versuch 198: 69b

Nach Versuch 196 wurde Biotin (25 mg, 0.10 mmol) mit DCC (32 mg, 0.15 mmol) und Cadaverin-Dihydrochlorid (18 mg, 0.1 mmol) umgesetzt. Nach 10 min setzte sich ein flockiger weißer Niederschlag ab, der sich nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur aufgelöst hatte. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingeeengt und wie beschrieben mit aktiviertem Carboxy-CLIO (**35**, 0.19 mmol Fe, 0.07 mmol N) zur Reaktion gebracht und aufgereinigt. Da die UV-spektroskopischen Untersuchungen von **68f** und **70b** fehlschlagen, wurde der Versuch abgebrochen.

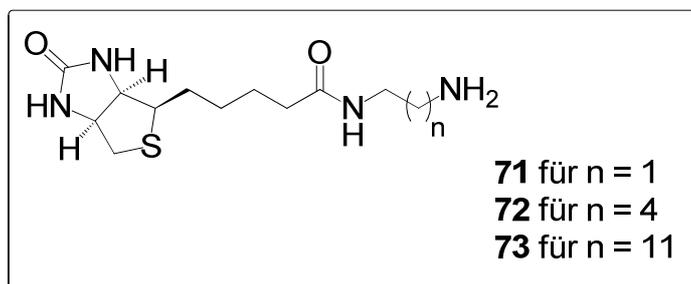
Ausbeute: 82 % Eisen (0.16 mmol, 0.104 M)

Versuch 199: 70b

Unter den Bedingungen von Versuch 196 wurde Biotin mit Dodecandiamin (21 mg, 0.1 mmol) und anschließend mit Carboxy-CLIO umgesetzt. Die UV-spektroskopische Untersuchung von **70b** mit dem Avidin/HABA-Komplex ließ nicht auf eine erfolgreiche Synthese schließen.

Ausbeute: 74 % Eisen (0.14 mmol, 0.093 M)

Versuche zur Synthese von 2-Amino-ethylamidobiotin (71), 5-Aminopentylamido-biotin (72) und 12-Amino-dodeanylamidobiotin (73)



Versuch 200: 71a

Biotin (40 mg, 0.16 mmol) wurde unter Erwärmen in 2 ml DMF gelöst und mit DCC (35 mg, 0.17 mmol) und Ethylendiamin (0.1 ml, 90 mg, 1.50 mmol) versetzt. Nach 18 h wurde die Lösung eingeeengt und der erhaltene weiß-gelbliche Feststoff in 3 ml Wasser gelöst. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert und der pH-Wert von 10 mit 0.1 N HCl auf 3 eingestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde gefiltert, mit Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Signale im ^1H -NMR-Spektrum wiesen auf die Ausgangsverbindung hin.

Versuch 201: 71b

Biotin (25 mg, 0.10 mmol) wurde in 2 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit DCC (24 mg, 0.12 mmol) und Triethylamin (14 μL , 10 mg, 0.10 mmol) versetzt. Nach 15 min wurde Ethylendiamin (10 μL , 9 mg, 0.15 mmol) hinzugegeben und das Gemisch für eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und die wässrige Phase eingeeengt. Das ^{13}C -NMR-Spektrum wies auf ein Gemisch aus Edukt und Produkt hin.

Versuch 202: 71c

Biotin (50 mg, 0.21 mmol) wurde in 1 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit DCC (24 mg, 0.12 mmol in 0.5 ml DMF) versetzt. Nach 1 h wurde DIPEA (35 μL , 0.26 mg, 0.20 mmol) und Ethylendiamin (20 μL , 18 mg, 0.30 mmol) in 0.5 ml DMF hinzugegeben und das Gemisch für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufreinigung analog zu Versuch 200 zeigte das ^{13}C -NMR-Spektrum ein Gemisch aus Edukt und Produkt.

Versuch 203: 71d

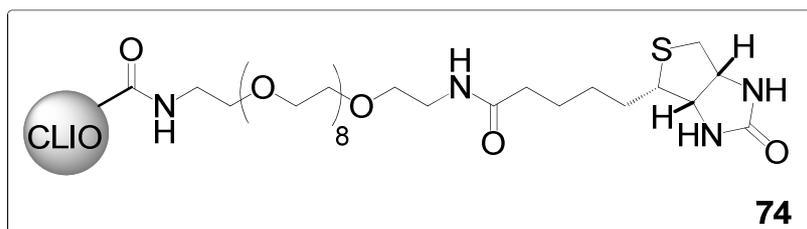
Biotin (100 mg, 0.41 mmol) wurde bei 0 °C in 3 ml DMF gegeben und die trübe Lösung mit DCC (98 mg, 0.48 mmol) und Sulfo-NHS (52 mg, 0.45 mmol) versetzt. Nach 1 h wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und die Lösung wurde klar. Nach 3 h wurde DIPEA (70 µL, 0.53 mg, 0.41 mmol) und Ethylendiamin (40 µL, 36 mg, 0.59 mmol) hinzugegeben und die Reaktionslösung für weitere 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde mittels Zentrifugation (10 min / 13000 g) abgetrennt und die organische Phase eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol refluxiert, gefiltert und eingengt. Nach einer erneuten Zugabe von 7 ml Methanol wurde ein weißer Rückstand durch Filterung abgetrennt und die organische Phase im Vakuum eingengt. Wiederum zeigte der erhaltene Feststoff ein Edukt-/Produkt-Gemisch im ¹³C-NMR.

Versuch 204: 72

Nach Versuch 200 wurde Biotin (50 mg, 0.21 mmol) in DMF mit DCC (53 mg, 0.26 mmol) umgesetzt. Cadaverin-dihydrochlorid wurde ebenfalls unter Erwärmen in 1 ml DMF gelöst und hinzugegeben. Aus der klaren, farblosen Lösung fiel ein weißer Feststoff aus. Da die Darstellung von **71a** unter diesen Bedingungen gescheitert war, wurde der Versuch abgebrochen.

Versuch 205: 73

Biotin (50 mg, 0.21 mmol) wurde in 2 ml EtOH vorgelegt und mit DCC (53 mg, 0.26 mmol) versetzt. Zur milchig-trüben Suspension wurde Diaminododecan (77 mg, 0.38 mmol in 1 ml EtOH) hinzugegeben, worauf sich die Suspension klärte. Die farblose Lösung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde in EtOH gelöst, mit 2 N HCl versetzt und erneut eingengt. Der Feststoff wurde in EtOH resuspendiert gefiltert und mit EtOH gewaschen. Aufgrund der Ergebnisse von Versuch 200, bei dem auch eine Aufreinigung durch Salzbildung mit Salzsäure vorgenommen wurde, wurde der Versuch abgebrochen.

Darstellung von Biotin-PEG-carboxy-CLIO (74, CLIO-COO-PEG-Biotin)**Versuch 206:**

Carboxy-CLIO (CLIO-COOH, **35**, 0.20 mmol Fe, 0.02 mmol N) wurde in 2.0 ml einer 0.05 M MES- und 0.1 M NaCl-Lösung mit EDC (20 mg, 0.10 mmol) und Sulfo-NHS (23 mg, 0.11 mmol) umgesetzt und nach 18 h dreimal mit Ethanol gewaschen. O-(2-Amino-ethyl)-O'-[2-(biotinyl-amino)-ethyl]-octaethylenglykol (Biotin-PEG-NH₂, 20 mg, 0.03 mmol) wurde in 1 ml einer 0.1 M NaHCO₃-Lösung gelöst und zum schwarzen, schlammigen Partikelrückstand hinzugegeben. Nach Zugabe von DIPEA (10 µL, 8 mg, 0.06 mmol) in 3 ml 0.1 M NaHCO₃-Lösung wurde das Reaktionsgemisch 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der üblichen Aufreinigung durch Fällung mit Ethanol und Zentrifugieren bei 13000 g erhielt man 2.0 ml einer Lösung von **74**.

Ausbeute: 95 % Eisen (0.19 mmol, 0.096 M)

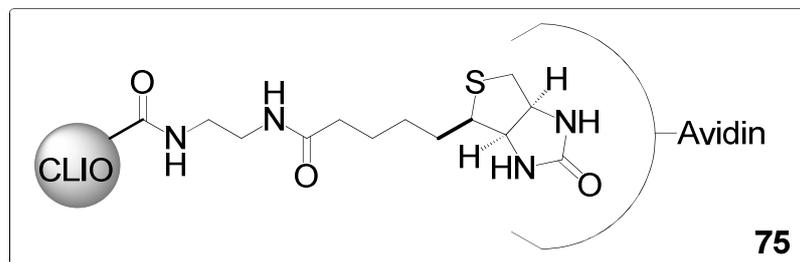
CHN-Analyse: C 14.11 %, H 2.57 %, N 1.12 %, S 0.17 %

CHN-Analyse (**35**): C 15.04 %, H 2.65 %, N 0.98 %

Versuch 207: Erstellen einer Eichgeraden mit Avidin-HABA und Biotin

Natriumchlorid (1.2 g, 20.5 mmol) und 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-säure (HEPES-Puffer, 125 mg, 0.5 mmol) wurden in 50 ml Wasser gelöst. Aus 25.0 ml dieser Pufferlösung wurde mit Biotin (2.4 mg, 10 µmol) eine 0.4 mM Messlösung erstellt. Nach der Produktinformation von Sigma^[141] wurden 10.0 ml destilliertes Wasser über eine 0.45 µm-Membran zum Avidin-HABA-Reagenz hinzugegeben, wodurch eine ungefähr 0.3 mM HABA-Lösung mit etwa 0.45 mg / ml Avidin erhalten wurde. 2.0 ml dieser Lösung wurden nach und nach mit jeweils etwa 0.03 ml der Biotinlösung versetzt. Vor jeder Zugabe wurde die Absorption der Avidin-HABA-Lösung bei 500 nm mit der Pufferlösung als Hintergrund gemessen. In ähnlicher Weise wurde die Vermessung von biotinylierten Kolloiden durchgeführt.

Synthese von Avidin-Biotin-diaminoethan-CLIO (75, CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Biotin-Avidin)



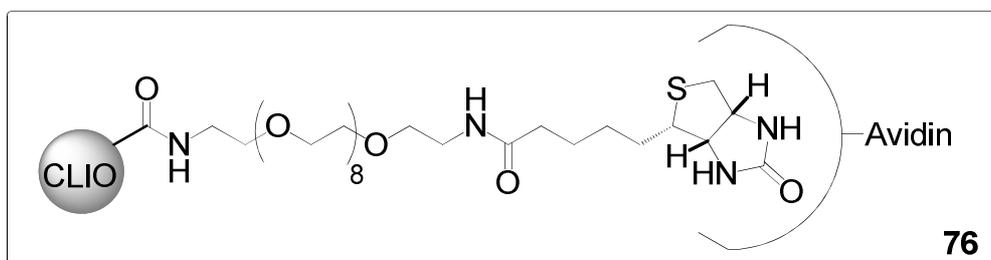
Versuch 208:

1.0 ml einer Suspension von Biotin-aminoethan-CLIO (**68c**, 0.09 mmol Fe, 0.01 mmol N) wurden mit 1.0 ml einer Avidin-HABA-Lösung aus Versuch 207 versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Aus dem Reaktionsgemisch wurden die Partikel mit 5 ml EtOH gefällt und zweimal mit EtOH gewaschen. Nach Resuspendierung in Wasser wurden die Kolloide 25 min bei 13000 g zentrifugiert.

CHN-Analyse: C 15.54 %, H 2.91 %, N 1.51 %, S 0.12 %

CHN-Analyse (**68c**): C 13.16 %, H 2.31 %, N 1.07 %, S 0.11 %

Synthese von Avidin-Biotin-PEG-carboxy-CLIO (76, CLIO-COO-PEG-Biotin-Avidin)



Versuch 209:

Analog zu Versuch 208 wurden 1.0 ml Biotin-PEG-carboxy-CLIO (**74**, 0.10 mmol Fe, 0.01 mmol N) mit 1.0 ml einer Avidin-HABA-Lösung umgesetzt und gereinigt.

CHN-Analyse: C 15.46 %, H 2.76 %, N 1.58 %, S 0.23 %

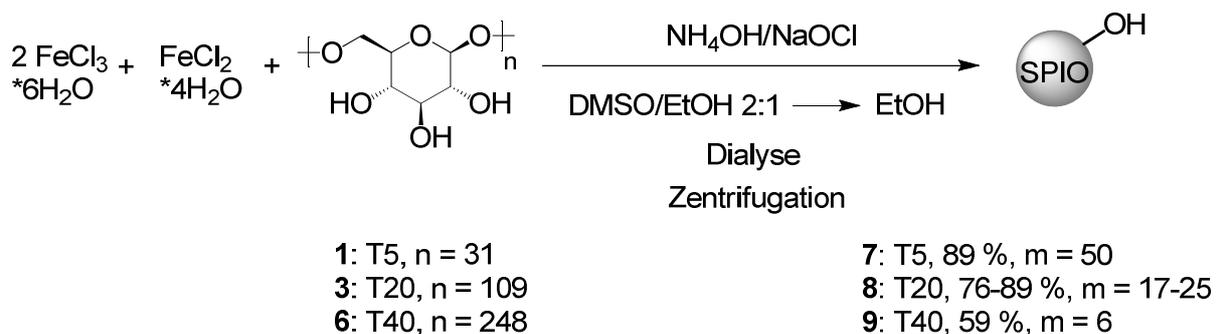
CHN-Analyse (**74**): C 14.11 %, H 2.57 %, N 1.12 %, S 0.17 %

Versuch 210: Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie von Biotin-diaminoethan-CLIO (68f)

Eine geringe Menge an Biotin-diaminoethan-CLIO-Lösung (**68f**) wurde auf Papier als Trägermaterial aufgebracht und eingetrocknet. Diese feste Phase wurde mit einer Lösung von FITC-markierten Streptavidin getränkt und daraufhin mehrmals mit Pufferlösung gewaschen. Als Kontrolle wurde dasselbe Verfahren bei Trägermaterial ohne Kolloidlösung angewandt.

6. Zusammenfassung

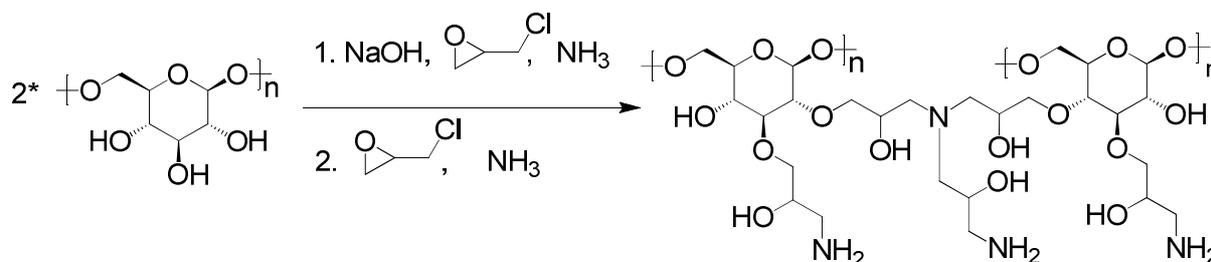
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst die Synthese von superparamagnetic iron oxides (SPIO) optimiert, bei der als organisches Hüllmaterial Dextran mit den Molmassen 5 kDa, 20 kDa und 40 kDa (T5, T20 bzw. T40) verwendet wurde.^[67,69,71] Die Aufreinigung der dargestellten SPIO (**2**, **4a-b**) erfolgte anfänglich über eine zeitaufwendige mehrmalige Zentrifugation bei 13000 g, die jedoch bei der Verwendung von Dextran T20 wegen der ausbleibenden Fällbarkeit der Partikel scheiterte. Ein bedeutender Fortschritt für die Abtrennung des überschüssigen Dextrans war die Entwicklung einer neuen Aufreinigungsmethode, bei der die dargestellten Kolloide durch Zugabe eines DMSO/EtOH-Gemisches mit Hilfe eines Permanentmagneten aus der wässrigen Suspension gefällt und gereinigt wurden. Unter Verwendung eines Gradienten von DMSO/EtOH von 2:1 bis hin zu reinem Ethanol wurden somit über 75 % des eingesetzten Dextrans abgetrennt. Hierdurch konnte die abschließende Aufreinigung durch Zentrifugation bei SPIO (**8**) mit Dextran T20 auf 1 h verkürzt werden. Die auf diese Weise dargestellten SPIO (**7-9**) bestanden aus etwa 50 % Eisen und einer von der Kettenlänge abhängigen Anzahl m von Dextranmolekülen (Gleichung 6.1). Die beste Suspendierbarkeit wiesen hierbei die SPIO (**8**) mit Dextran T20 auf.



Gleichung 6.1: Eine erfolgreiche Abtrennung des überschüssigen Dextrans wurde durch die Fällung der Kolloide in einem H₂O/DMSO/EtOH-Gemisch mit anschließender Dialyse und Zentrifugation bewerkstelligt.

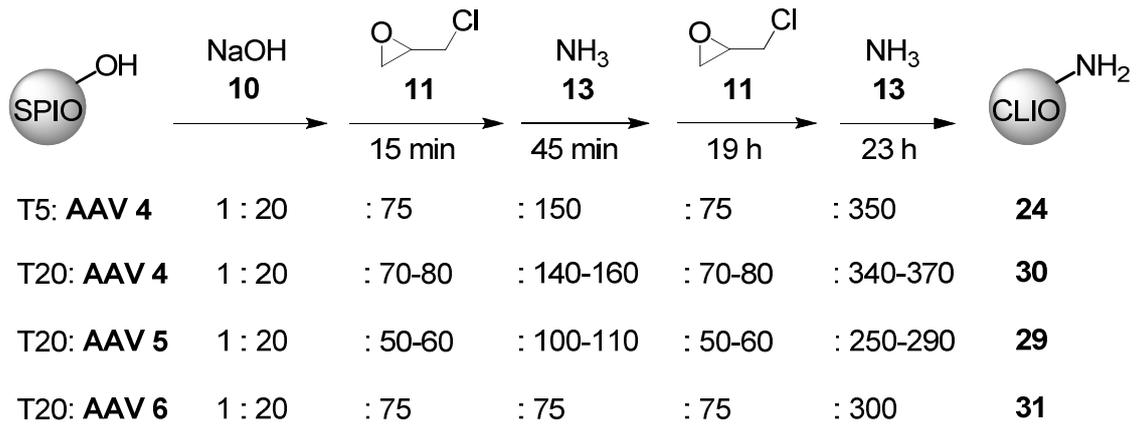
Wegen der allgemeinen Aufreinigungsmethode durch Fällung, Dialyse und Zentrifugation beliefen sich die Ausbeuten der dargestellten Kolloide bei den meisten Versuchen auf über 70 %. Durch die Umsetzung mit Epichlorhydrin und Ammoniak wurden aus diesen SPIO CLIO-NH₂ (cross linked iron oxides) dargestellt.^[69] Dies diente zum einen der Vernetzung der Dextranhülle und einer damit einhergehenden

erhöhten Stabilität der Partikel und zum anderen der Einführung von primären Aminogruppen zur weiteren Modifikation. Als erfolgreich wurde die Darstellung von CLIO-NH₂ bei einer konstant bleibenden Zunahme des Kohlenstoffwertes sowie einem Stickstoffgehalt von 1-2 % eingestuft. Bei der getrennten Durchführung von Vernetzung mit Epichlorhydrin und Aminierung mit Ammoniak konnte anhand der sinkenden oder stagnierenden Kohlenstoffwerte der Elementaranalysen bei den Kolloiden **12**, **14** und **15** keine Steigerung der Stabilität belegt werden. Deshalb wurde die Synthese auf der Basis einer alternierenden Zugabe von Epichlorhydrin und Ammoniak optimiert. Bei der ersten Umsetzung mit den beiden Reaktanden sollte die polymere Dextranhülle durch die Bildung von sekundären und tertiären Aminen vernetzt werden, während die zweite Umsetzung mit Epichlorhydrin und Ammoniak der Einführung primärer Aminogruppen dienen sollte (Gleichung 6.2).



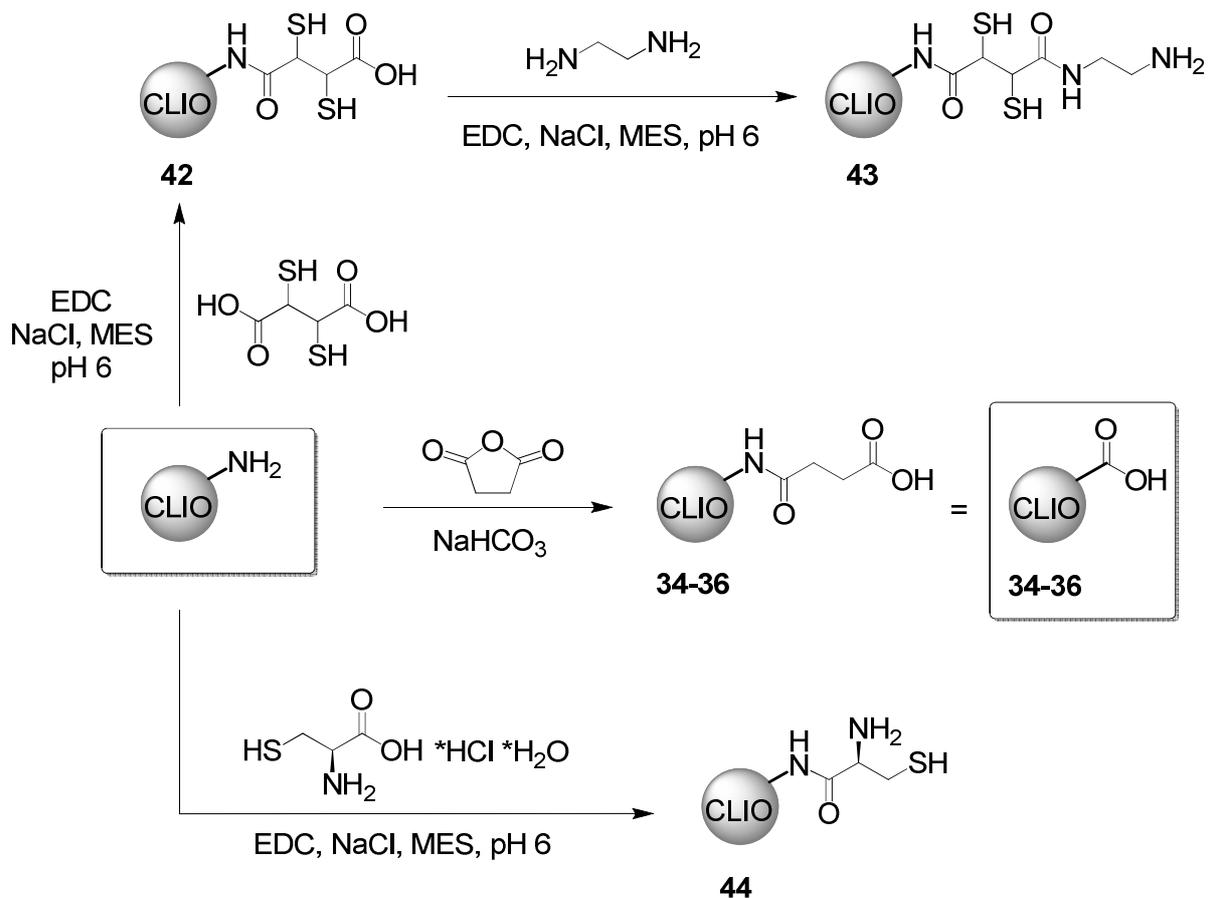
Gleichung 6.2: Die Vernetzung der Dextranhülle und die Einführung von primären Aminogruppen erfolgten durch Variation der stöchiometrischen Verhältnisse von Epichlorhydrin und Ammoniak.

Bestimmt wurde der Grad der Vernetzung und Aminierung hauptsächlich durch das gewählte stöchiometrische Verhältnis von Epichlorhydrin und Ammoniak bezogen auf die Menge der Glucosemonomereinheiten an den SPIO (Gleichung 6.3). Auch die Reaktionszeiten und Zutropfgeschwindigkeiten der beiden Verlinkungsreagenzien nahmen Einfluss auf die Umsetzung. So wurden nach **AAV 4** stabile CLIO-NH₂-T5 (**24**) mit einem Stickstoffgehalt von 1-2 % dargestellt, während nach **AAV 4-5** keine geeigneten CLIO-NH₂-T40 (**33**) erzielt wurden. Bei Dextran-T20-umhüllten Partikeln wurden mit **AAV 4-6** mehrere Möglichkeiten einer erfolgreichen Synthese von CLIO-NH₂-T20 (**29-31**) entwickelt. Allerdings fiel während der Reaktion bei **AAV 4-5** oftmals lose gebundenes Dextran durch die Vernetzung aus, was bei der Synthese nach **AAV 6** vermieden wurde. Aufgrund des vergleichbar niedrigen Einsatzes an Epichlorhydrin und Ammoniak erwies sich auch hier Dextran T20 als das am besten geeignete Hüllmaterial.



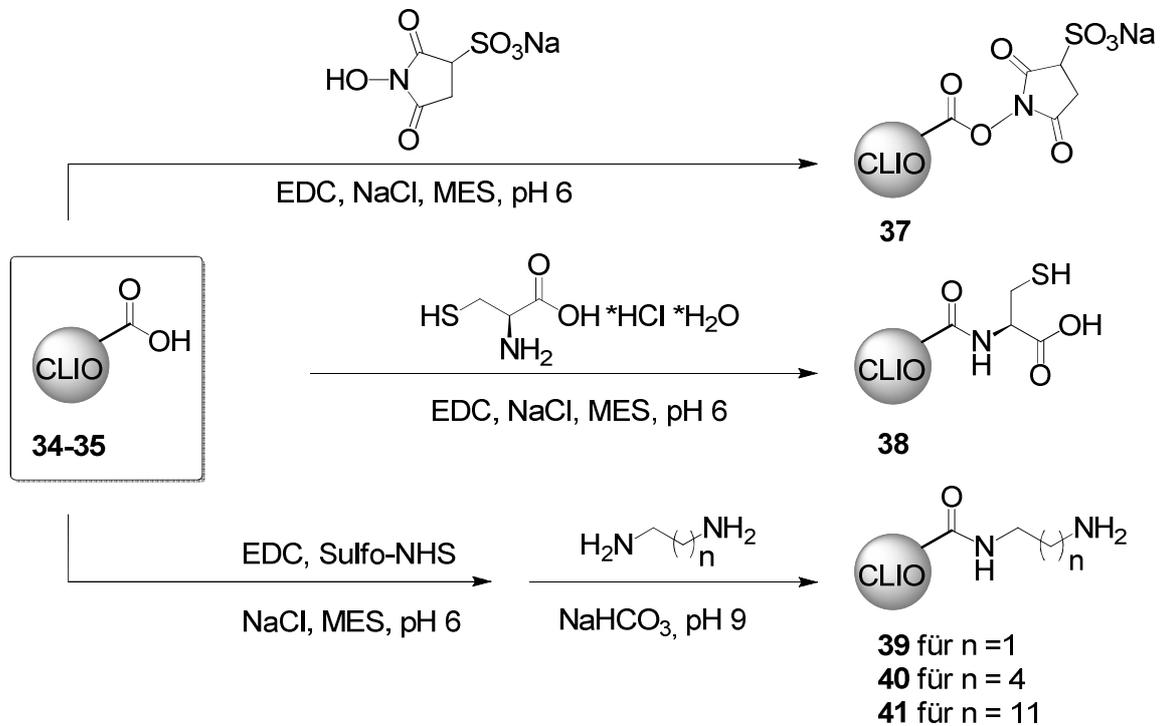
Gleichung 6.3: Nach **AAV 4** wurden stabile CLIO-NH₂-T5 dargestellt. Analog konnte die Synthese unter Verwendung mit SPIO-T20 mit verschiedenen stöchiometrischen Ansätzen erfolgen.

Ausgehend von diesen CLIO-NH₂ wurde eine Vielzahl von Derivaten, an deren funktionellen Gruppen die Kolloide mit Fluoreszenzmolekülen und bioaktiven Molekülen markiert werden sollten, dargestellt (Gleichung 6.4).^[82]



Gleichung 6.4: Durch Aktivierung der Carboxylgruppen von Dimercaptobernsteinsäure und Cystein mit EDC wurden CLIO-NH₂ zu CLIO-DMSA (**42**) und CLIO-NH-Cys (**44**) umgesetzt. Die Einführung von Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche (**34-36**) erfolgte mit Bernsteinsäureanhydrid.

Einen weiteren Grundbaustein bildeten hierbei die Carboxy-CLIO (**34-36**) mit den Hüllpolymeren Dextran T5 (**34**), T20 (**35**) und T40 (**36**), aus denen unter anderem aminierte CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) hervorgingen (Gleichung 6.5).



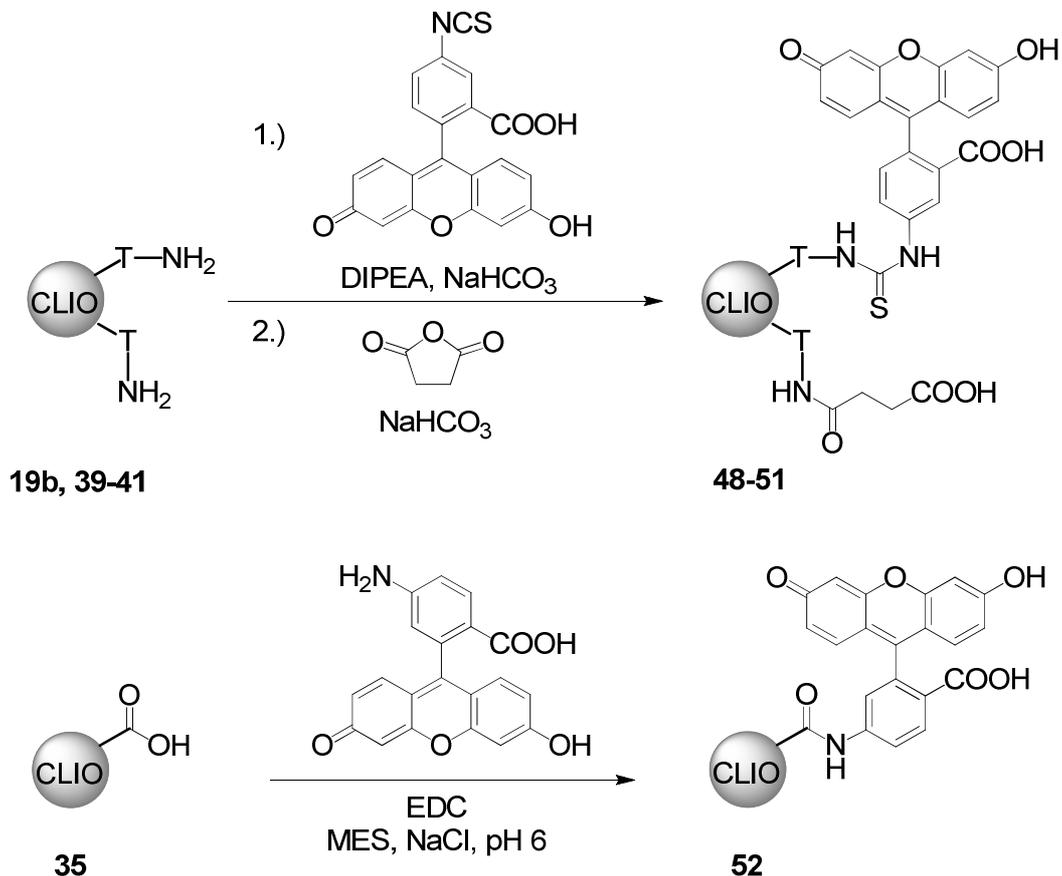
Gleichung 6.5: Ausgehend von den Carboxy-CLIO (**34-35**) wurden die Kolloide **37-41** über eine EDC-vermittelte Zero-length-Kupplungsmethode dargestellt.

Kolloid	Sinkende Suspendierbarkeit	Dextran
CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n -NH ₂ (39-41)		
CLIO-NH ₂		T20
CLIO-COOH (34-36)		
CLIO-NH-Cys (44)		T5
CLIO-COO-Cys (38)		
CLIO-DMSA-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂ (43)		T40
CLIO-DMSA (42)		

Tabelle 6.1: Der Einfluss der funktionellen Gruppen an der Oberfläche auf die Suspendierbarkeit ist weitaus größer als der des verwendeten Dextran. Vor allem Partikel mit Thiol- und / oder Carboxylgruppen wiesen eine niedrige Suspendierbarkeit auf, während sich Aminogruppen positiv auf die Löslichkeit auswirkten.

Neben dem verwendeten Dextran beeinflussten die an der Partikeloberfläche angebrachten funktionellen Gruppen im Wesentlichen die Suspendierbarkeit der Kolloide. Tendenziell sank die Stabilität von Eisenoxid-Nanopartikeln in einer wässrigen Lösung durch das Anbringen von funktionellen Gruppen in der Reihe Amino-, Carboxy-, Thiolfunktion (Tabelle 6.1).

Alle drei eingeführten Funktionalitäten sollten zur Markierung der Kolloide mit Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffen genutzt werden. Dies wiederum diente der Detektion der Partikel bei *in-vivo*- und *in-vitro*-Versuchen sowie der Unterscheidung vom körpereigenen Eisen. Die Einführung von Fluoresceinfarbstoffen erfolgte bei aminierten CLIO (**19b**, **39-41**) mit Fluoresceinisothiocyanat und bei Carboxy-CLIO (**35**) mit 6-Aminofluorescein.^[82] Im Falle der Amino-CLIO wurde zur zusätzlichen Aufreinigung oftmals eine Carboxylierung durchgeführt (Gleichung 6.6).



Gleichung 6.6: Fluoresceinderivate wurden sowohl über eine Aminofunktion (oben) als auch über eine Carboxylgruppe (unten) an die Kolloide gebunden.

Eine genauere Auswertung der Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch eine UV-spektroskopische Messmethode, bei der das Eisen nach dem Aufschluss der Partikel mit Weinsäure maskiert worden war. Anhand einer Eichgeraden ($y = 0.146 x$, $R^2 =$

0.99) wurden jeweils etwa 50 Fluoresceinmoleküle pro Eisenoxidkern gemessen, was mit den Werten aus anderen Analyseverfahren gut übereinstimmte.

Während der Fluorescein-Eisenoxidkern-Abstand keinen Einfluss auf die Stärke der Fluoreszenz hatte, verminderten die intakten Kolloide die Fluoreszenz um 90 % im Vergleich zu den aufgeschlossenen Partikellösungen (Abbildung 6.1 oben). Dies konnte mit der sehr starken Absorption der Eisenoxid-Nanopartikel im Bereich von 400-500 nm erklärt werden (Abbildung 6.1 unten).

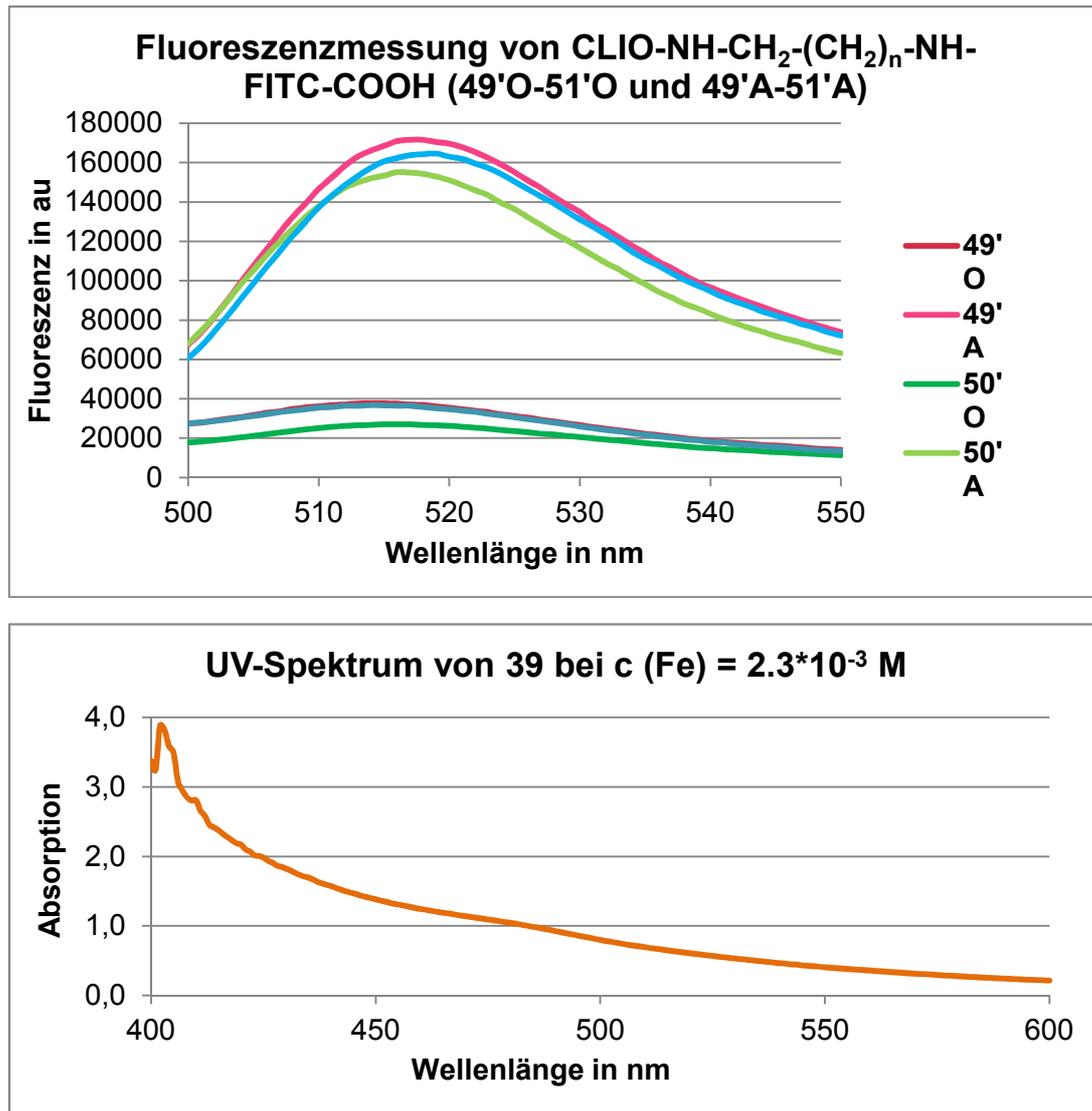


Abbildung 6.1 oben: Der Aufschluss der Partikel bei CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH (**49'A-51'A**) führte zu einer Vervielfachung der Fluoreszenz im Vergleich zu den intakten Partikeln (**49'O-51'O**). **unten:** Eine Suspension von CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**39**) (c von Fe = 2.3*10⁻³ M) zeigte im Bereich von 400-500 nm eine starke Absorption, die bei 550 nm nur noch etwa 0.5 Einheiten betrug.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte jedoch bei *in-vivo*-Versuchen eine intensive Fluoreszenz beobachtet werden. Fluoreszenz war hierbei nur in den Bereichen

detektierbar, in denen Eisen nachgewiesen wurde, was die starke Bindung des Farbstoffs an die Partikel bewies (Abbildung 6.2).

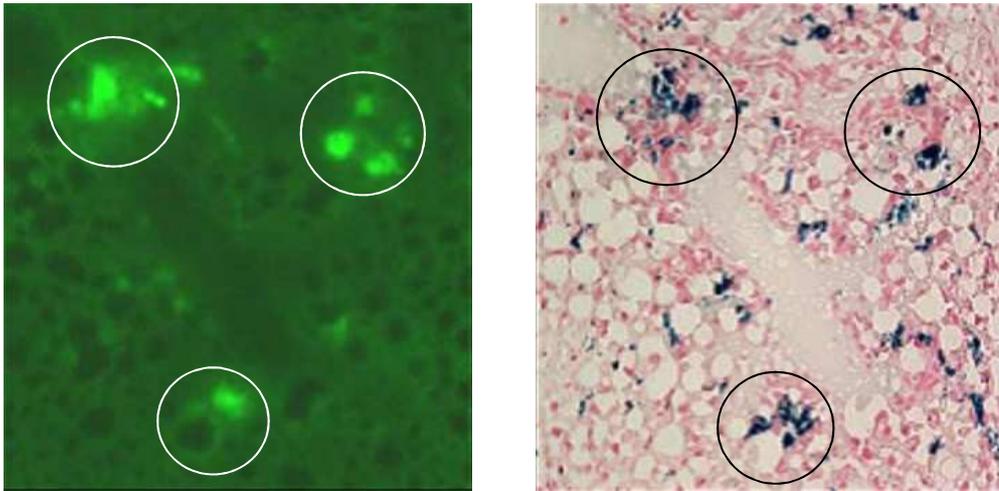
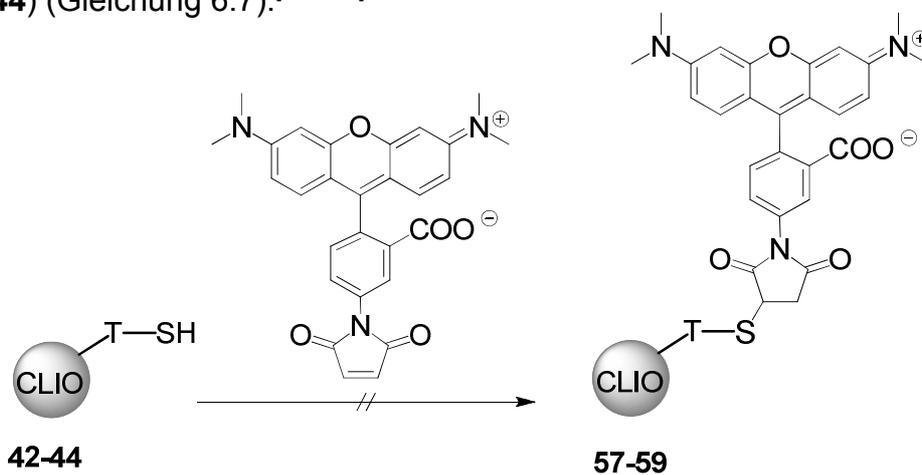


Abbildung 6.2: Bei Schnitten von Gewebe der Mauseber korrelierte die Fluoreszenz mit der Position des nachgewiesenen Eisens.

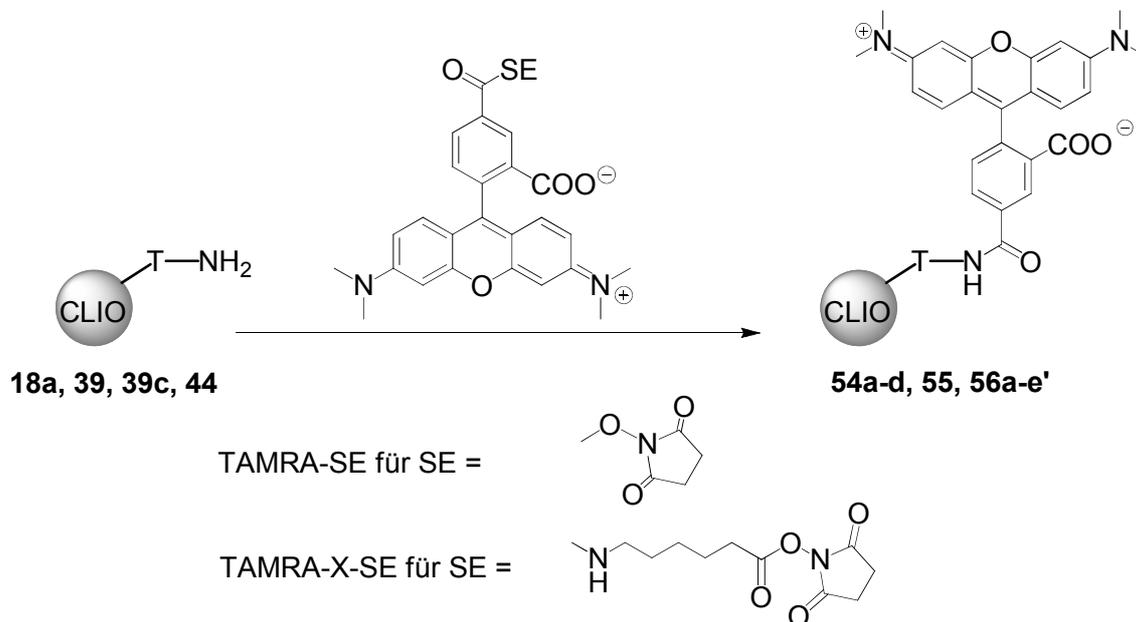
Im Falle der auf Rhodamin basierenden Farbstoffe sollte die Markierung an den Thiol- und Aminogruppen der entsprechenden Kolloide durchgeführt werden. Eine Anbindung von TAMRA-Maleimid scheiterte jedoch unter verschiedenen Versuchsbedingungen bei CLIO-DMSA (**42**), CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**43**) und CLIO-NH-Cys (**44**) (Gleichung 6.7).^[114,122]



Gleichung 6.7: Bei den Kolloiden (**42-44**) wurden vor der Umsetzung mit TAMRA-Maleimid die Disulfidbrückenbindungen mit TCEP reduziert. Jedoch scheiterte die folgende Fluoreszenzmarkierung bei verschiedenen pH-Werten.

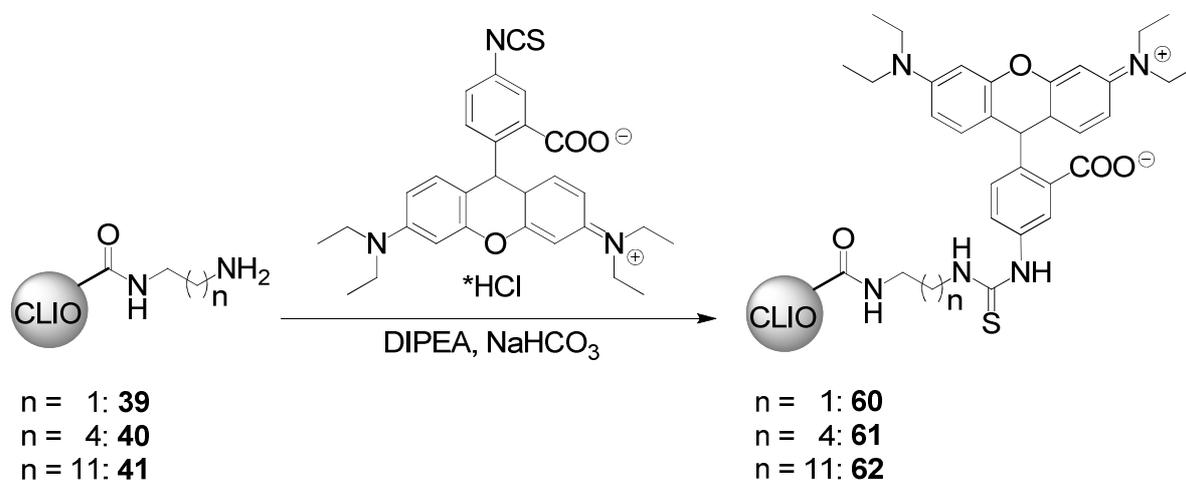
Auch die Umsetzung von TAMRA-SE und TAMRA-X-SE mit CLIO-NH₂ (**18a**), Diaminoethan-CLIO (**39**) und CLIO-NH-Cys (**44**) unter Ausbildung einer Amidbindung blieb zunächst erfolglos.^[86,121] Erst der Einsatz von **39c** mit einem hohen

Stickstoffgehalt führte bei **56e'** zum Erfolg (Gleichung 6.8). Anhand des literaturbekannten Extinktionskoeffizienten^[121] ließ sich bei **56e**, das durch Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid aus **56e'** erhalten wurde, mittels einer UV-spektroskopischen Messung eine Anzahl von 10 TAMRA-Molekülen je Eisenoxidkern ermitteln.



Gleichung 6.8: **54a, 56c:** NaHCO₃; **54b,d, 55, 56a,b:** Na₂B₄O₇·10 H₂O / HCl; **54c:** Na₂B₄O₇·10 H₂O / HCl und DIPEA; **56d,e':** NaHCO₃ und DIPEA.

Alternativ wurden die Diamino-CLIO (**39-41**) durch Anbindung von Rhodamin B-Isothiocyanat (RBITC) markiert (Gleichung 6.9). Die Umsetzung und Auswertung mittels einer Eichgeraden ($y = 0.0856 x$, $R^2 = 0.99$) erfolgte analog zu FITC-markierten Partikeln. Jedoch ließ die Geradensteigung auf ein geringes Absorptionsvermögen von RBITC im Vergleich zu Fluorescein schließen.



Gleichung 6.9: Analog zu FITC wurden Diamino-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂, **39-41**) mit 15-80 Molekülen Rhodamin B-Isothiocyanat pro Kern markiert.

In Einklang hiermit stand die Messung einer sehr schwachen Fluoreszenz der RBITC-markierten Kolloide **60-62**, während die TAMRA-markierten Kolloide von **56e** eine intensive Bande zeigten (**56eA**), die darüber hinaus von den intakten Partikeln (**56eO**) im Vergleich zu FITC geringer beeinflusst wurde (Abbildung 6.3).

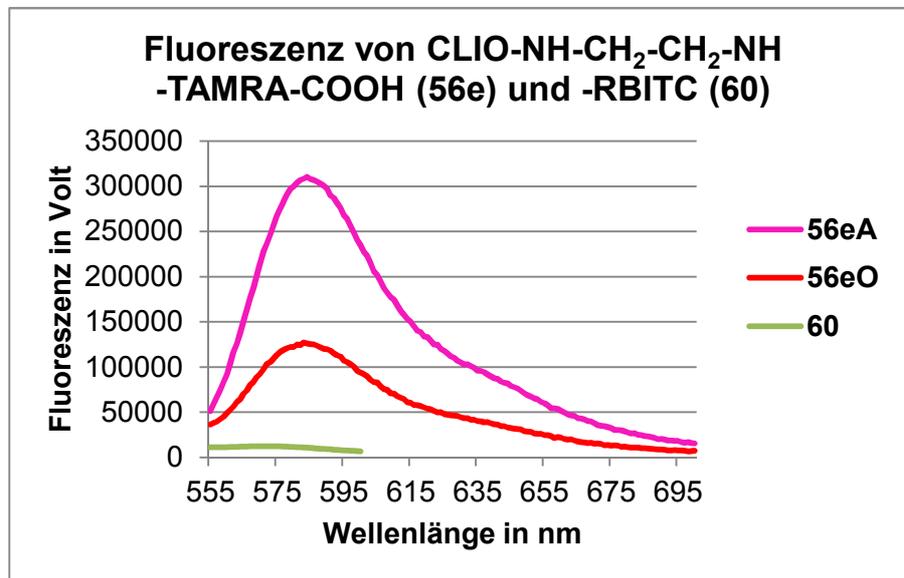


Abbildung 6.3: TAMRA-markierte und mit Bernsteinsäureanhydrid carboxylierte Diaminoethan-CLIO (**56e**) wiesen eine sehr viel höhere Fluoreszenz auf als ihre Rhodamin B Analoga (**60**). Die Fluoreszenzlöschung durch die intakten Partikel erwies sich bei **56e** aufgrund der längerwelligen Anregung geringer als bei Fluorescein-markierten Kolloiden.

Die stabile Anbindung des TAMRA-Farbstoffs an Diaminoethan-CLIO (**39**) wurde neben der anschließenden Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid durch *in-vivo*-Versuche nachgewiesen. Wegen der Anreicherung der Kolloide in der Leber und Milz wurde vornehmlich in diesen Organen Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 6.4).

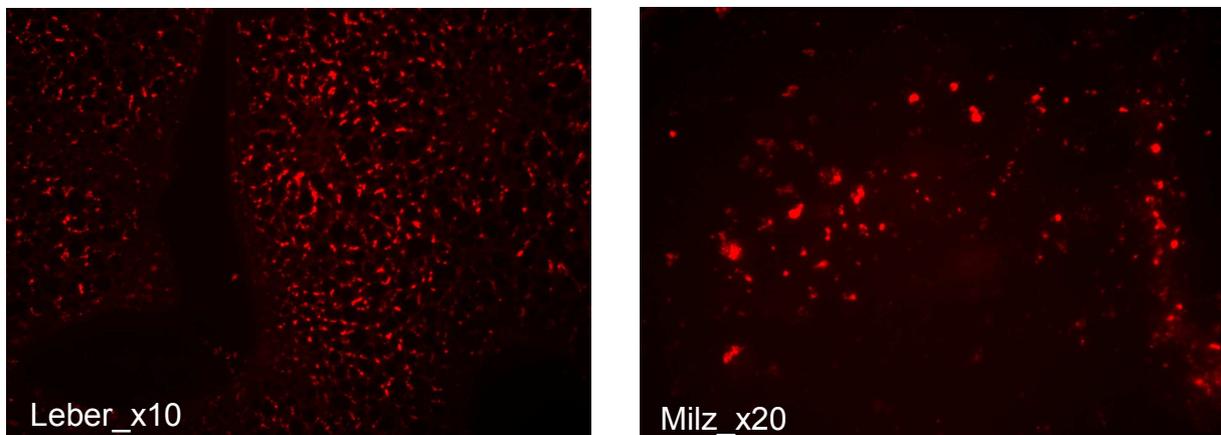


Abbildung 6.4: CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA-COOH (**56e**) lagerten sich in Leber und Milz an und konnten anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.

Die spezifische Anbindung der Kolloide an definierte Zielproteine sollte durch die Anbindung von Antikörpern und Biotin an der Partikeloberfläche erfolgen. Zwar wiesen verschiedene Analysemethoden auf eine erfolgreiche Umsetzung hin, jedoch konnte eine spezifische, bioaktive Konnektivität der Partikel bei *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen nicht nachgewiesen werden.

Die Relaxivitäten der SPIO (**7a**, **5f**, **5g**), Amino-CLIO (CLIO-NH₂, **24b,c**, **29b,d**, **33a,c**) und Carboxy-CLIO (CLIO-COOH, **34-46**) lagen in der Größenordnung der Werte von Resovist® und Endorem®, so dass sich die dargestellten Kolloide als Magnetresonanzkontrastmittel eignen. Erhebliche Unterschiede zeigten sich aufgrund der verminderten Suspendierbarkeit bei den Carboxy-CLIO (Tabelle 6.2).

Kolloide	r1 in mM ⁻¹ s ⁻¹	r2 in mM ⁻¹ s ⁻¹
SPIO-T5 (7a / 7a)	1.3 / 1.1	342 / 316
CLIO-NH ₂ -T5 (24c / 24b)	0.6 / 0.9	215 / 275
CLIO-COOH-T5 (34)	0.6	1.6 / 43
SPIO-T20 (5f / 5f)	0.6 / 1.1	460 / 206
CLIO-NH ₂ -T20 (29d / 28b)	0.6 / 1.0	209 / 246
CLIO-COOH-T20 (35 / 35a)	0.3 / 0.9	85 / 332
SPIO-T40 (5g / 5g)	1.5 / 1.9	449 / 396
CLIO-NH ₂ -T40 (33c / 33a)	0.9 / 0.7	331 / 192
CLIO-COOH-T40 (36 / 36)	0.4 / 0.6	70 / 17
Resovist® (0.45 T)	25	164
Endorem® (0.45 T)	24	107

Tabelle 6.2: Relaxivitätsmessungen von SPIO (**7a**, **5f**, **5g**), CLIO-NH₂ (**24b,c**, **29b,d**, **33a,c**) and CLIO-COOH (**34-46**) im Vergleich zu Resovist® und Endorem®.

Dementsprechend befanden sich auch die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel in einem Bereich um 60-80 nm. Unterschiede ergaben sich nur für SPIO-T20 (40-50 nm) und SPIO-T5-40 (90-100 nm).

Wie für diesen Durchmesser erwartet reicherten sich bei *in-vivo*-Experimenten die meisten Partikel in den Organen des Retikuloendothelialen Systems (RES) wie Leber und Milz an. In der Aortenwurzel des Herzens, dem eigentlichen Zielorgan, war hingegen nur sehr wenig Eisen zu finden (Abbildung 6.5).

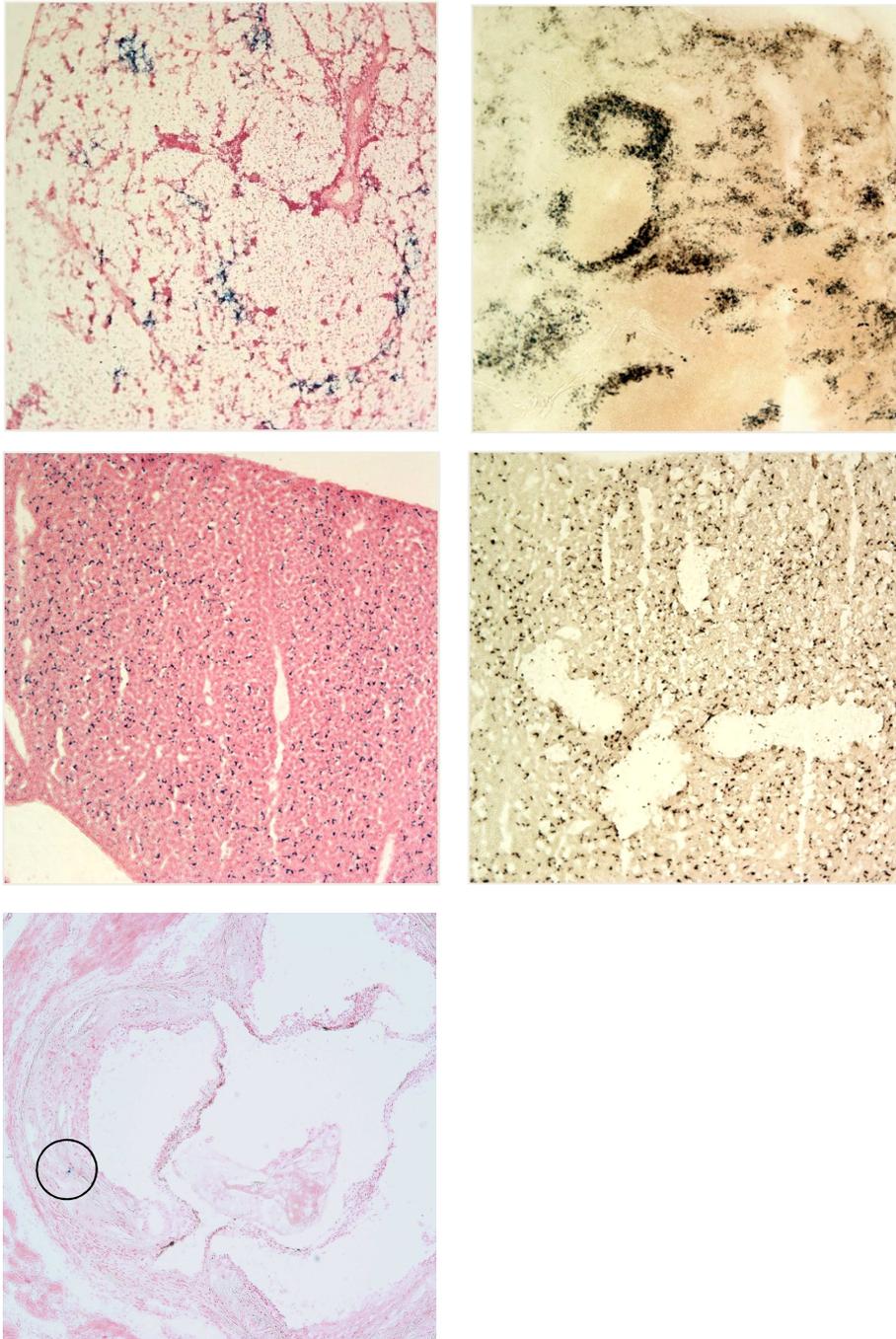
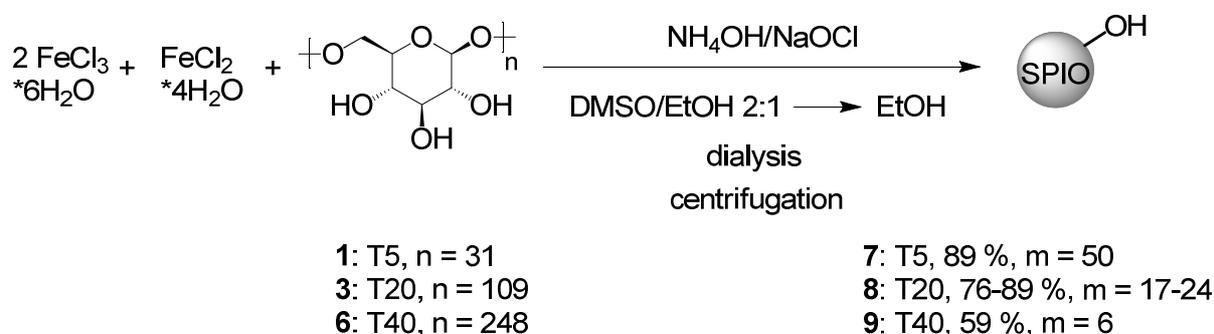


Abbildung 6.5: Nachweis des Eisens über Berliner-Blau-Färbung und DAB-Färbung. **Oben:** Milz; **Mitte:** Leber; **unten:** Aortenwurzel.

7. Summary

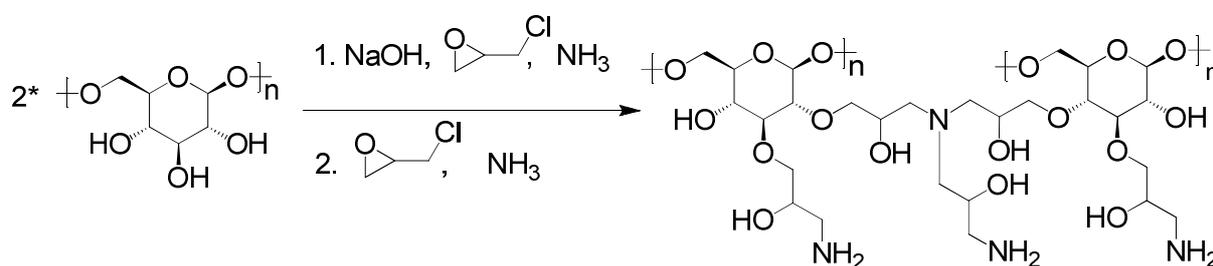
The first aim of this thesis was the optimization of the synthesis of superparamagnetic iron oxides (SPIO), which were coated by an organic shell of dextran with molecular weights of 5 kDa, 20 kDa and 40 kDa (T5, T20, T40, respectively).^[67,69,71] The purification of the SPIO (**2**, **4a-b**) was initially realized over a time-consuming repeated centrifugation at 13000 g, which failed in the case of dextran T20 due to a lack of sedimentation of the particles. The removal of the excess dextran was significantly improved by the development of a new purification method, in which the colloids were precipitated by a mixture of DMSO and EtOH and collected with a strong permanent magnet. Using a gradient of DMSO / EtOH from 2:1 to pure ethanol, over 75 % of the appropriated dextran was separated from the iron oxide nanoparticles. Hereby the final purification of the SPIO with dextran T20 (**8**) was shortened to one hour. With this procedure the SPIO (**7-9**) consisted of about 50% iron and a number *m* of dextran molecules depending on the chain length (scheme 7.1). At this, SPIO with dextran T20 (**8**) exhibited the best suspensibility in aqueous solution.



Scheme 7.1: A successful removal of the excess dextran was accomplished by the precipitation of the colloids in a mixture of H₂O/DMSO/EtOH followed by dialysis and centrifugation of the iron oxide nanoparticles.

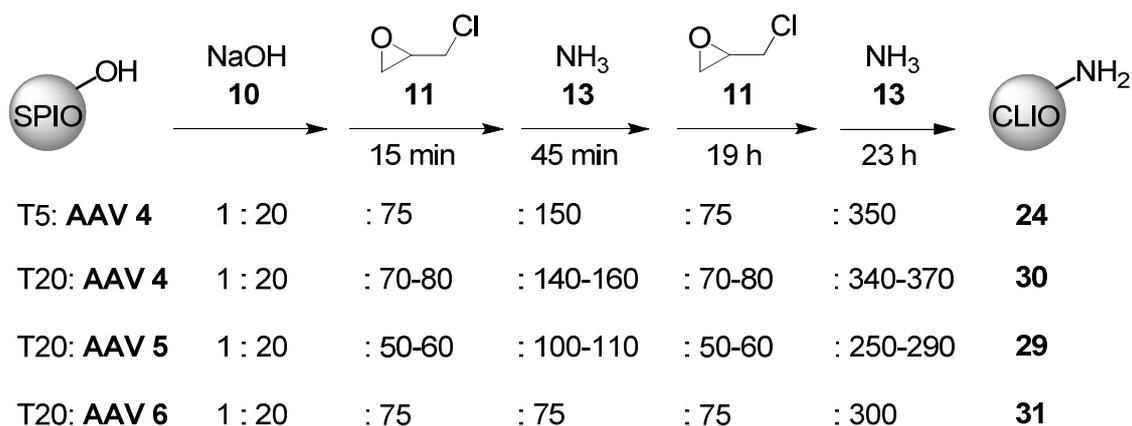
Because of the general method of purification by precipitation, dialysis and centrifugation, the yields of the colloids in most experiments amounted to more than 70 %. In the next step the organic shell of the SPIO was treated with epichlorohydrin and ammonia to generate CLIO-NH₂ (cross linked iron oxides).^[69] Through this procedure the nanoparticles were stabilised and primary amino groups were established on the surface for further modification. If the CLIO-NH₂ have a constant

increased carbon value and a nitrogen content of 1-2 %, the synthesis was considered successful. By separation of crosslinking with epichlorohydrin and amination with ammonia the carbon values of the colloids **12**, **14** and **15** stagnated or decreased, demonstrating no increased stability of the colloids. Therefore, the synthesis of CLIO-NH₂ was optimized on the basis of an alternating addition of epichlorohydrin and ammonia. In the first reaction with the two reactants the polymeric dextran shell should be crosslinked by the formation of secondary and tertiary amines, while primary amino groups should be introduced by the second reaction with epichlorohydrin and ammonia (scheme 7.2).



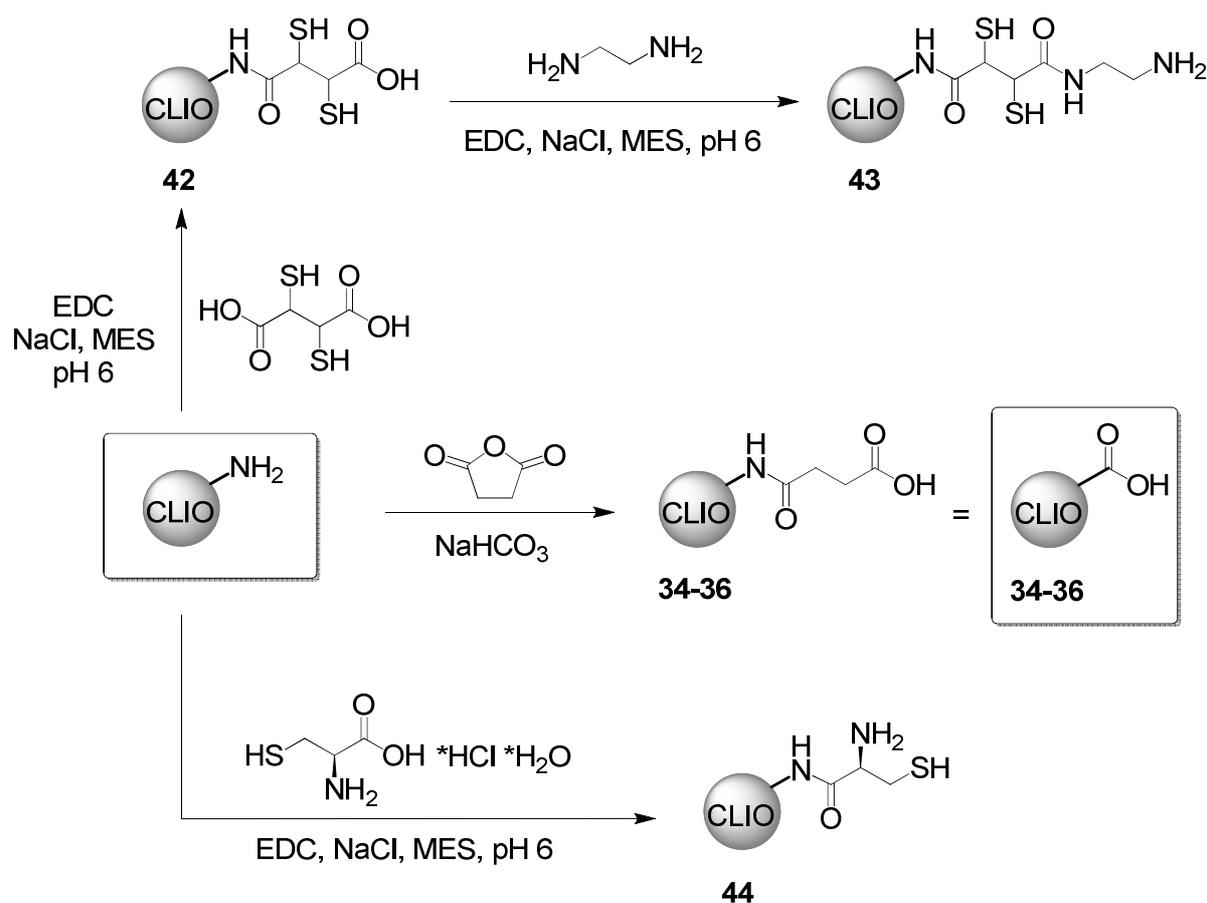
Scheme 7.2: The crosslinking of the dextran shell and the introduction of primary amino groups were performed by varying the stoichiometric ratios of epichlorohydrin and ammonia.

The degree of crosslinking and amination was mainly determined by the chosen stoichiometric ratio of epichlorohydrin and ammonia to the amount of monomeric glucose units of the SPIO (Scheme 7.3). The chemical reaction was also influenced by the reaction times and the rate of addition of the two linking reagents. Stable CLIO-NH₂-T5 (**24**) with a nitrogen content of 1-2 % were synthesized by **AAV 4**, while no suitable CLIO-NH₂-T40 (**33**) could be generated by **AAV 4-5**. In the case of particles coated with dextran T20, several possibilities for a successful synthesis of CLIO-NH₂-T20 (**29-31**) were performed in **AAV 4-6**. During the reaction of **AAV 4-5** loosely bound dextran was often precipitated due to crosslinking, this could be avoided in **AAV 6** with less ammonia in the first reaction step. Due to the comparatively low use of epichlorohydrin and ammonia in **AAV6** dextran T20 appeared as the most appropriate coating material.



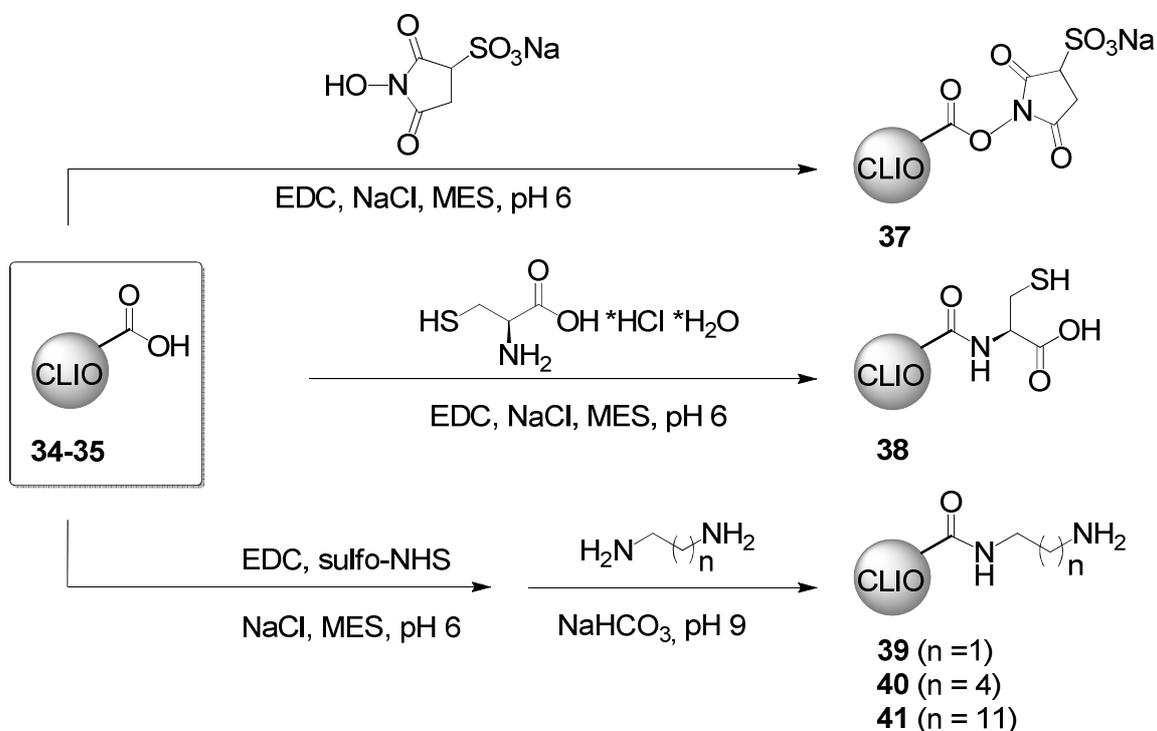
Scheme 7.3: Stable CLIO-NH₂-T5 were synthesized by **AAV 4**. The synthesis could be achieved similarly with different stoichiometric ratios using SPIO-T20.

Based on these CLIO-NH₂ a variety of derivatives were prepared (scheme 7.4). By the established functional groups the colloids should be marked with fluorescent molecules and bioactive molecules.^[82]



Scheme 7.4: CLIO-DMSA (**42**) and CLIO-NH-Cys (**44**) were generated from CLIO-NH₂ by activating the carboxyl groups of dimercaptosuccinic acid and cysteine via EDC. The introduction of carboxyl groups on the particle surface (**34-36**) was performed with succinic anhydride.

The carboxy-CLIO (**34-36**) with a polymeric shell of dextran T5 (**34**), T20 (**35**) and T40 (**36**) represented another basic colloid, from which, inter alia, aminated CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂ (**39-41**) were synthesized (scheme 7.5)



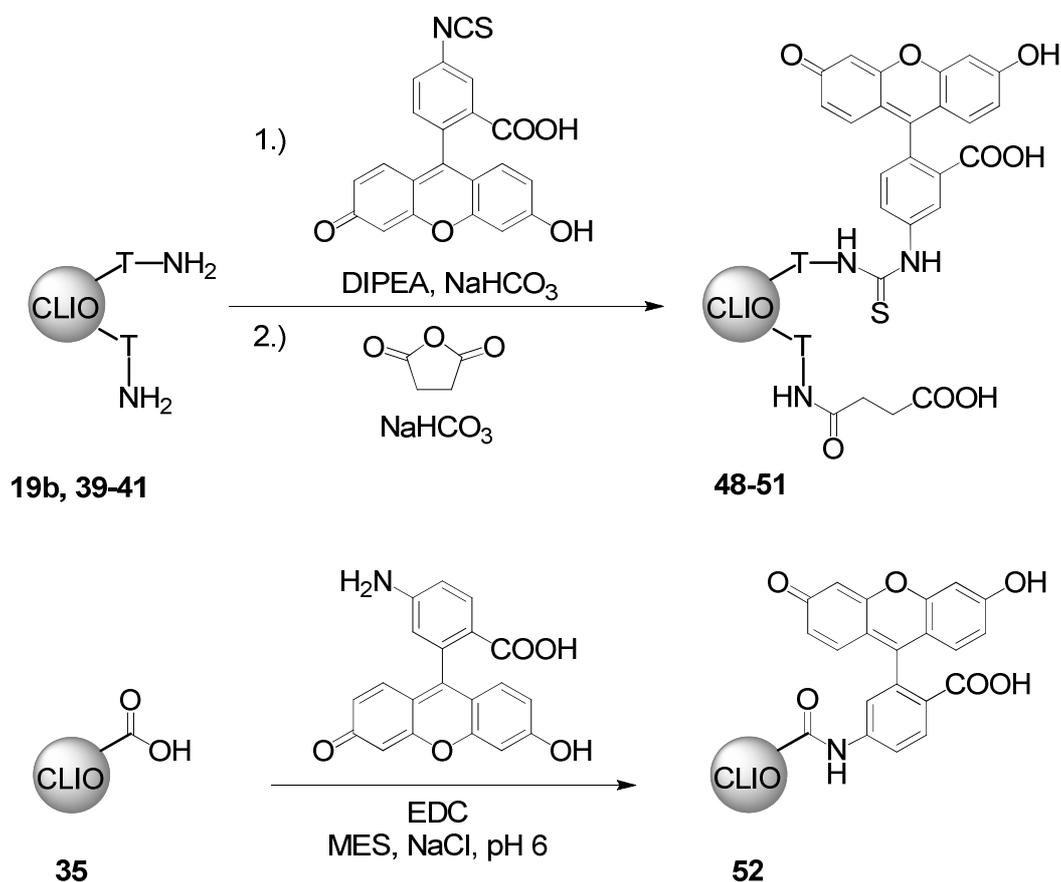
Scheme 7.5: Starting from the carboxy-CLIO (**34-35**) colloids **37-41** were generated via an EDC-mediated zero-length coupling method.

colloid	decreasing suspensibility	dextran
CLIO-NH-CH ₂ -(CH ₂) _n -NH ₂ (39-41)		
CLIO-NH ₂		T20
CLIO-COOH (34-36)		T5
CLIO-NH-Cys (44)		
CLIO-COO-Cys (38)		
CLIO-DMSA-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂ (43)		T40
CLIO-DMSA (42)		

Table 7.1: The suspensibility of the colloids was far more influenced by the functional groups fixed on the surface than by the dextran used. Especially particles with thiol and / or carboxyl groups possessed low suspensibility, while amino groups had a positive impact on the solubility.

Besides the dextran used the suspensibility of the colloids was substantially influenced by functional groups attached to the particle surface. In general, the stability of iron oxide nanoparticles in an aqueous solution decreased due to the attached functional groups in the series amino, carboxy, thiol function (table 7.1).

All three introduced functions should be used to mark the colloids with fluorescein and rhodamine dyes. This in turn was used for detection of the particles in *in vivo* and *in vitro* experiments as well as the distinction from the iron pool of the organism. The introduction of fluorescein dye was carried out at aminated CLIO (**19b**, **39-41**) by reaction with fluorescein isothiocyanate (FITC) and at carboxy-CLIO (**35**) with 6-aminofluorescein.^[82] In the case of amino-CLIO additional purification was often performed by carboxylation with succinic acid anhydride (scheme 7.6).



Scheme 7.6: Fluorescein derivatives were bound to colloids via an amino function (above) or a carboxyl group (below).

A detailed analysis of the fluorescent labeling was performed by a UV spectroscopic measuring method in which the iron had been masked with tartaric acid after destroying the iron oxide nanoparticles. Using a calibration curve ($y = 0.146 x$, $R^2 =$

0.99) about 50 fluorescein molecules per iron oxide core were measured. This agreed well with values from other analytical methods. While the fluorescein to iron oxide core distance had no effect on the strength of the fluorescence, intact colloids decreased the fluorescence up to 90 % compared to digested particles (figure 7.1 above). This could be explained with the very strong absorption of iron oxide nanoparticles in the range of 400-500 nm (figure 7.1 below).

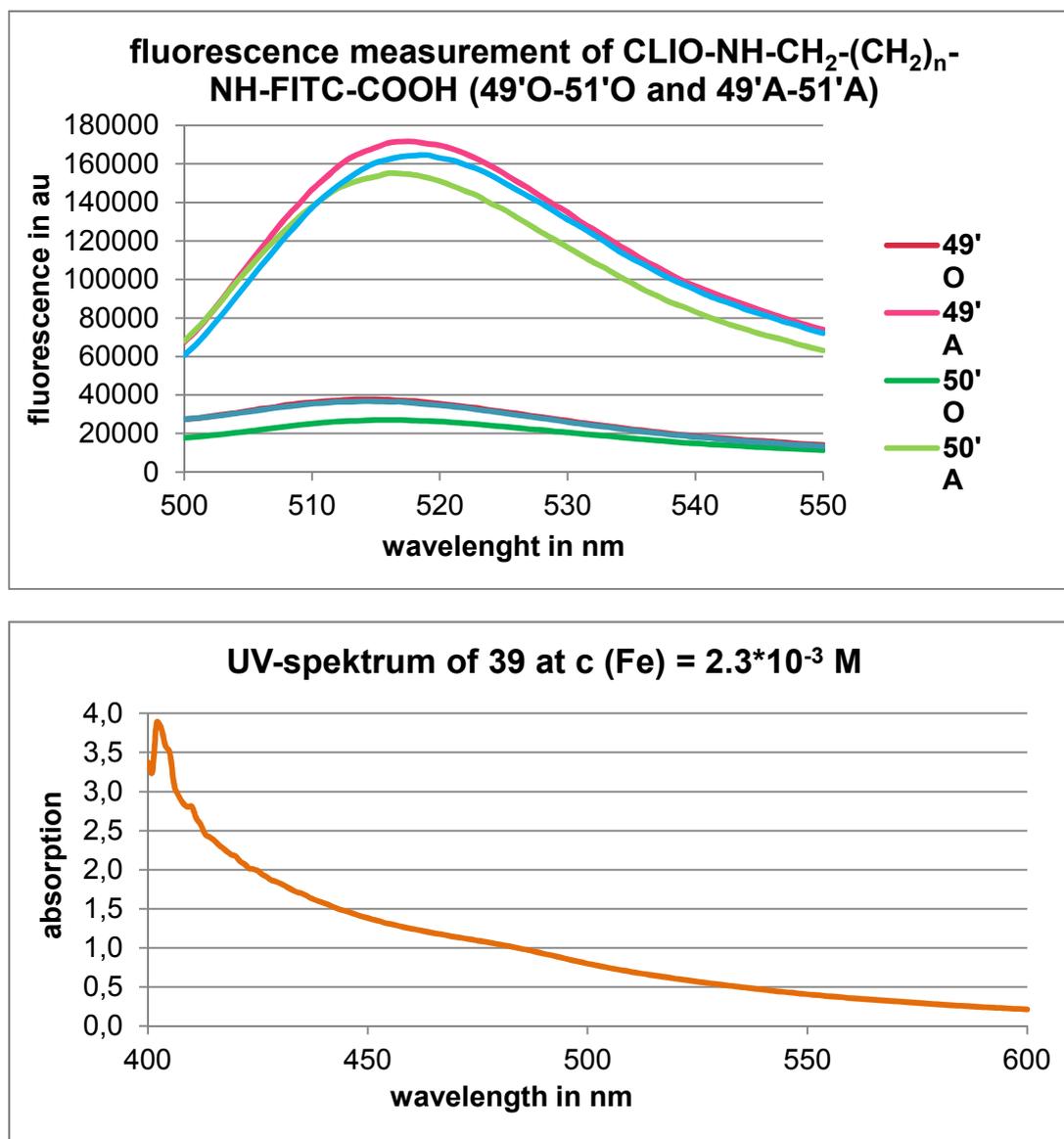


Figure 7.1 above: The digestion of the particles CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH-FITC-COOH (49'A 51'A) led to a multiplication of fluorescence compared to the intact particles (49'O-51'O). **below:** A suspension of CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (39) (c Fe = 2.3 * 10⁻³ M) exhibited a strong absorption in the range of 400-500 nm. At 550 nm the absorption was only about 0.5 units.

Nevertheless in *in vivo* experiments an intense fluorescence could be observed under a fluorescence microscope. Fluorescence is detectable only in regions where

also iron is found, demonstrating the strong binding of the dye on the particle (figure 7.2).

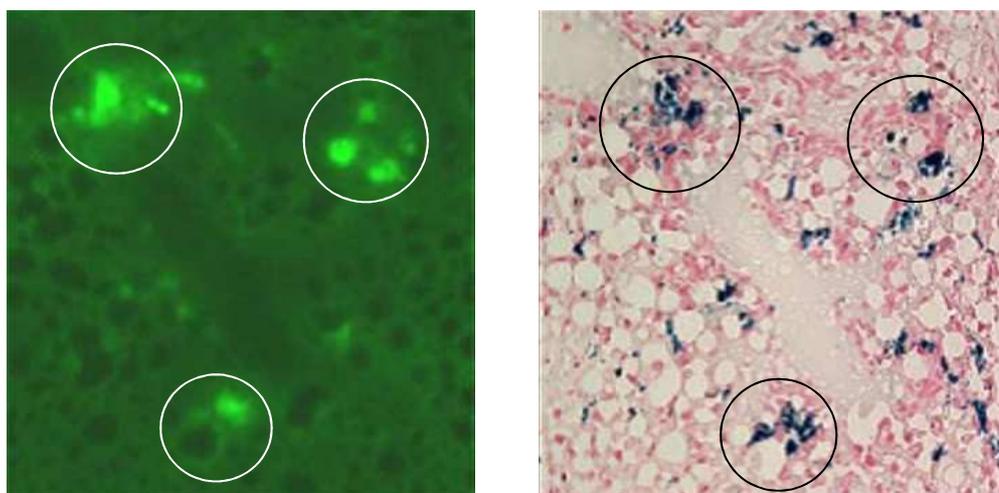
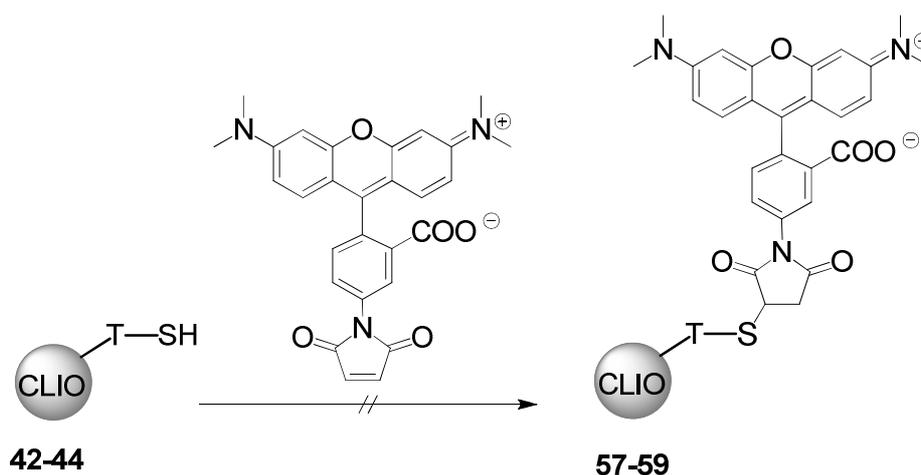


Figure 7.2: The fluorescence correlated with the position of the detected iron in sections of liver tissue of mice.

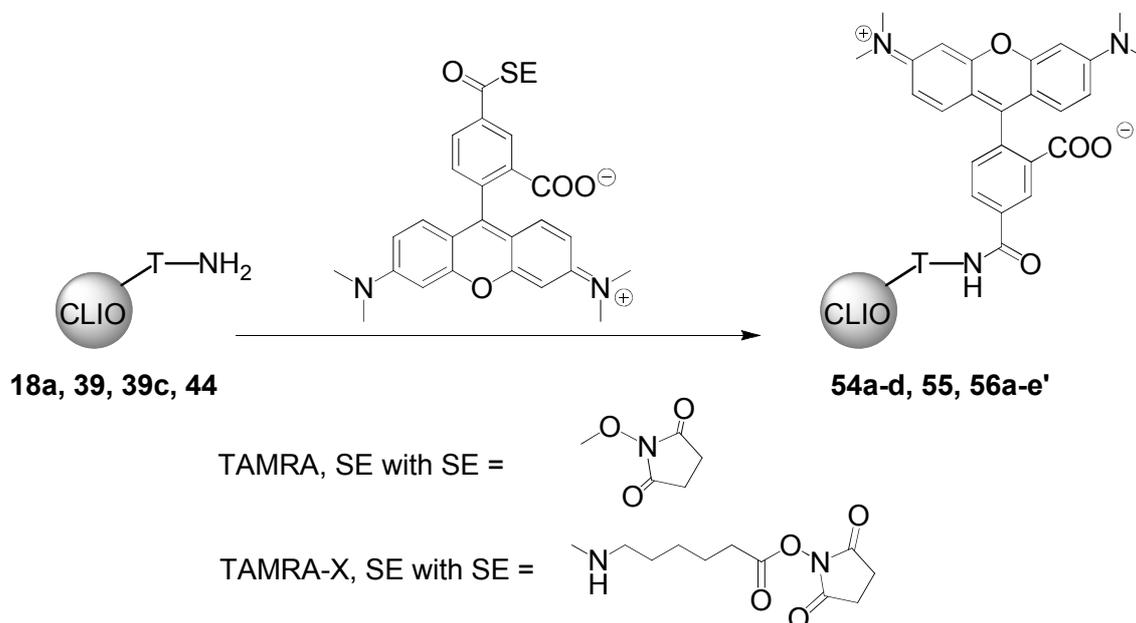
In the case of rhodamine based dyes, labeling of the colloids should be achieved at the thiol and amino groups. But linking of TAMRA, maleimide on CLIO-DMSA (**42**), CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (**43**) und CLIO-NH-Cys (**44**) failed under various experimental conditions (scheme 7.7).^[114,122]



Scheme 7.7: Before the reaction with TAMRA, maleimide, disulfide bonds of the colloids (**42-44**) were reduced by TCEP. However, the following fluorescent labeling failed at various pH values.

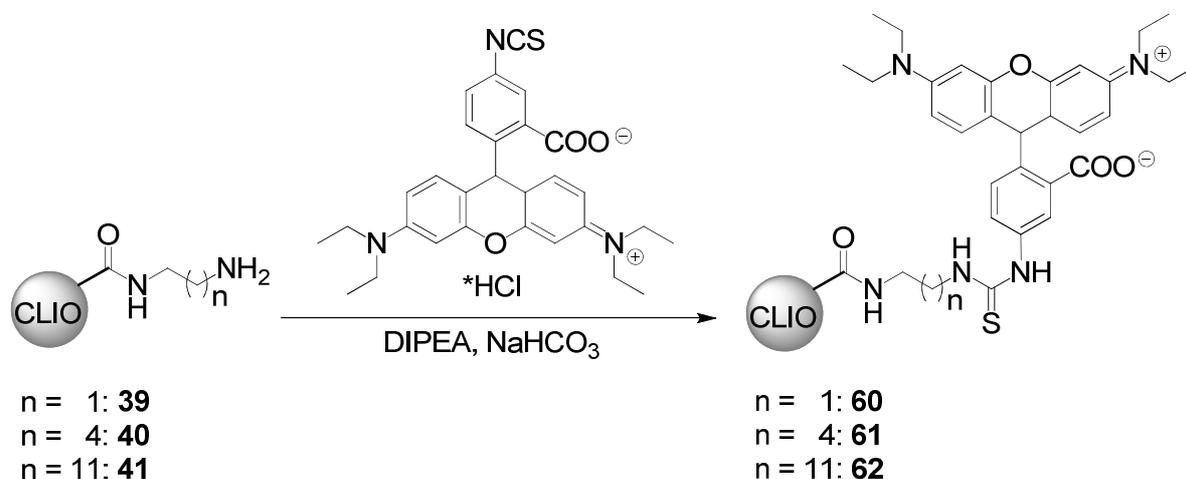
Also the reaction of TAMRA, SE and TAMRA-X, SE with CLIO-NH₂ (**18a**), diamino-ethan-CLIO (**39**) and CLIO-NH-Cys (**44**) via amide bond formation was initially unsuccessful.^[86,121] Only by the use of **39c** with a high nitrogen content, **56e'** could

be synthesized (scheme 7.8). Based on the literature-known extinction coefficient^[121] a number of 10 TAMRA molecules per iron oxide core could be measured by UV spectroscopy at **56e**, which was generated by carboxylation of **56e'** with succinic acid anhydride.



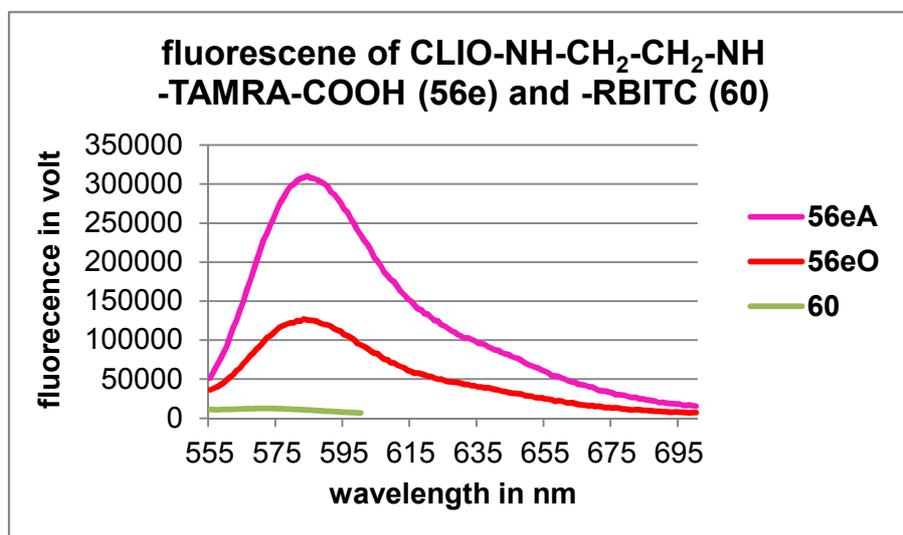
Scheme 7.8: **54a, 56c:** NaHCO₃; **54b,d, 55, 56a,b:** Na₂B₄O₇·10 H₂O / HCl; **54c:** Na₂B₄O₇·10 H₂O / HCl and DIPEA; **56d,e'**: NaHCO₃ and DIPEA.

Alternatively, the diamino-CLIO (**39-41**) were labeled by binding of rhodamine B, isothiocyanate (RBITC) (scheme 7.9). Similar to FITC-labeled particles the reaction was achieved and analysed using a calibration curve ($y = 0.0856 x$, $R^2 = 0.99$). But the slope of the straight line suggested a low absorption of RBITC compared to fluorescein.



Scheme 7.9: Analogously to FITC diamino-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)_n-NH₂, **39-41**) were labeled with 15 to 80 molecules rhodamine B isothiocyanate per core.

In accordance with this, a very weak fluorescence of RBITC-labeled colloids **60-62** could be observed. TAMRA-labeled colloids of **56e** exhibited a very intense band (**56eA**), which was less influenced by the intact particles (**56eO**) compared to fluorescein (figure 7.3).



Scheme 7.3: TAMRA-labeled and carboxylated diaminoethan-CLIO (**56e**) exhibited a much higher fluorescence than their Rhodamine B analogues (**60**). Fluorescence quenching by the intact particles proved to be lower at **56e** due to the longer wavelength excitation than with fluorescein-labeled colloids.

In addition to the carboxylation with succinic acid anhydride the stable attachment of the TAMRA dye to diaminoethan-CLIO (**39**) was detected by *in vivo* experiments. Since the colloids were enriched in liver and spleen, fluorescence was mainly observed in these organs (figure 7.4).

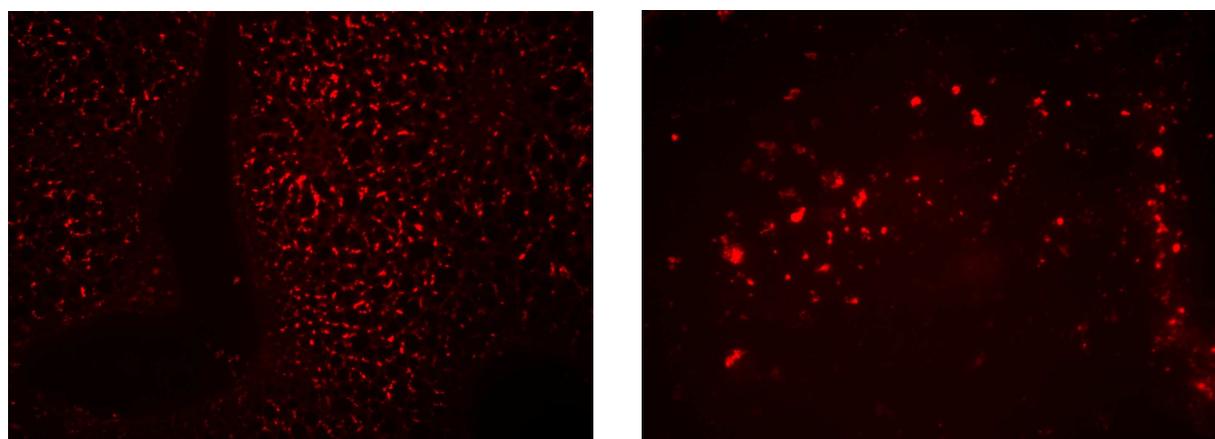


Figure 7.4: The deposition of CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA-COOH (**56e**) in liver and spleen was demonstrated by the fluorescence labeling of the colloids.

Specific attachment of the colloids to defined target proteins should be carried out by binding of antibodies and biotin at the particle surface. Although several analytical methods indicated a successful labeling with antibodies and biotin, a specific, biological connectivity of the particles in *in vitro* and *in vivo* experiments could not be demonstrated.

The relaxivities of SPIO (**7a**, **5f**, **5g**), amino-CLIO (CLIO-NH₂, **24b,c**, **29b,d**, **33a,c**) and carboxy-CLIO (CLIO-COOH, **34-46**) were in the order of the values of Resovist® and Endorem®, such that the synthesized colloids are suitable as magnetic resonance contrast agents. Significant differences appeared at carboxy-CLIO due to the decreased suspensibility of the colloids (table 7.2).

colloids	r1 in mM ⁻¹ s ⁻¹	r2 in mM ⁻¹ s ⁻¹
SPIO-T5 (7a / 7a)	1.3 / 1.1	342 / 316
CLIO-NH ₂ -T5 (24c / 24b)	0.6 / 0.9	215 / 275
CLIO-COOH-T5 (34)	0.6	1.6 / 43
SPIO-T20 (5f / 5f)	0.6 / 1.1	460 / 206
CLIO-NH ₂ -T20 (29d / 28b)	0.6 / 1.0	209 / 246
CLIO-COOH-T20 (35 / 35a)	0.3 / 0.9	85 / 332
SPIO-T40 (5g / 5g)	1.5 / 1.9	449 / 396
CLIO-NH ₂ -T40 (33c / 33a)	0.9 / 0.7	331 / 192
CLIO-COOH-T40 (36 / 36)	0.4 / 0.6	70 / 17
Resovist® (0.45 T)	25	164
Endorem® (0.45 T)	24	107

Table 7.2: Measurements of the relaxivity of SPIO (**7a**, **5f**, **5g**), CLIO-NH₂ (**24b,c**, **29b,d**, **33a,c**) and CLIO-COOH (**34-46**) compared to Resovist® and Endorem®.

Accordingly the hydrodynamic diameters of the particles span a range between 60-80 nm. Differences were observed only for SPIO-T20 (40-50 nm) and SPIO-T5-40 (90-100 nm).

As expected for this diameter, in *in vivo* experiments most of the particles were enriched in the organs of the reticuloendothelial system (RES) such as liver and spleen. However, in the aortic root of the heart, the real target organ, only a very low content of iron was detected (figure 7.5).

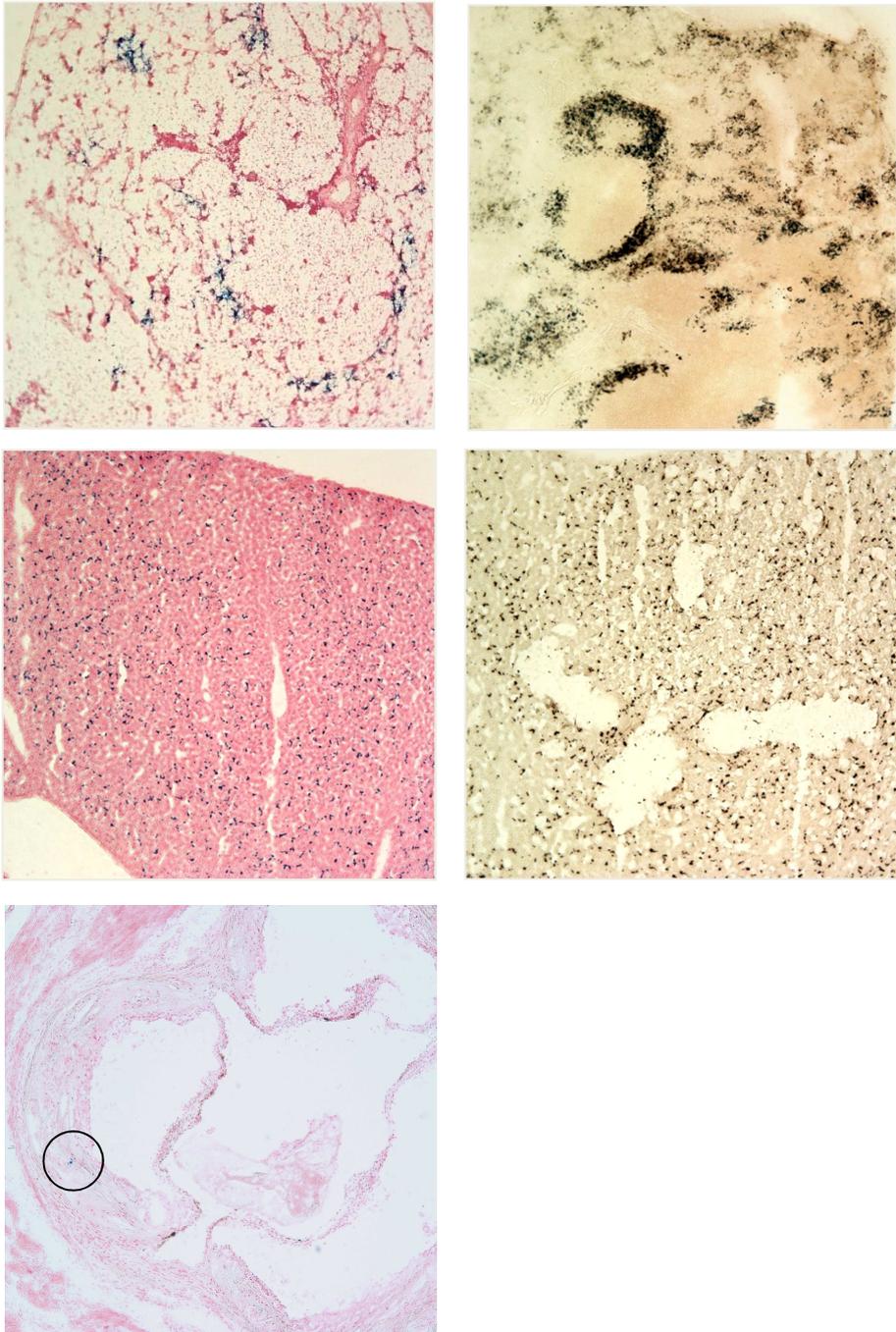


Figure 7.5: Detection of iron by Prussian blue and DAB staining. **above:** spleen; **center:** liver; **below:** aortic root.

8. Literaturverzeichnis

- [1] T. Neumann, J. Biermann, A. Neumann, J. Wasem, G. Ertl, R. Dietz, R. Erbel, *Dtsch. Ärztebl. Int.* **2009**, *106*, 269-275.
- [2] K. Dickstein, A. Cohen-Solal, G. Filippatos, J. McMurray, P. Ponikowski, P. A. Poole-Wilson, A. Strömberg, D. J. van Veldhuisen, D. Atar, A. W. Hoes, A. Keren, A. Mebazaa, M. Nieminen, S. G. Priori, K. Swedberg, *Eur. Heart J.* **2008**, *29*, 2388-2442.
- [3] D. M. Lloyd-Jones, M. G. Larson, E. P. Leip, A. Beiser, R. B. D'Agostino, W. B. Kannel, J. M. Murabito, R. S. Vasan, E. J. Benjamin, D. Levy, *Circulation* **2002**, *106*, 3068-3072.
- [4] J. Biermann, T. Neumann, C. E. Angermann, H. Düngen, R. Erbel, W. Herzog, B. Maisch, T. Müller-Tasch, C. Özcelik, S. Pankuweit, B. Pieske, D. Pittrow, V. Regitz-Zagrosek, T. Scheffold, S. Störk, R. Wachter, G. Gelbrich, J. Wasem, A. Neumann, *J. Public Health* **2012**, *20*, 23-30.
- [5] J. G. F. Cleland, A. Khand, A. Clark, *Eur. Heart J.* **2001**, *22*, 623-626.
- [6] M. R. Cowie, A. Zaphiriou, *British Med. J.* **2002**, *325*, 422-425.
- [7] M. W. Merx, G. Ertl, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2011**, *136*, 700-702.
- [8] J. G. F. Cleland, *Heart* **1998**, *79*, S10-S16.
- [9] R. Campisi, J. Czernin, H. Schöder, J. W. Sayre, H. R. Schelbert, *Circulation* **1999**, *99*, 491-497.
- [10] J. Schwitter, D. Nanz, S. Kneifel, K. Bertschinger, M. Büchi, P. R. Knüsel, B. Marincek, T. F. Lüscher, G. K. von Schulthess, *Circulation* **2001**, *103*, 2230-2235.
- [11] G. Vincenti, R. Nkoulou, C. Steiner, H. Imperiano, G. Ambrosio, F. Mach, O. Ratib, J. Vallee, T. H. Schindler, *J. Nucl. Cardiol.* **2009**, *16*, 549-561.
- [12] N. A. A. Matheijssen, H. W. Louwerenburg, F. P. van Ruge, R. P. J. H. Arens, B. Kauer, A. de Roos, E. E. van der Wall, *Magn. Res. Med.* **1996**, *35*, 221-228.
- [13] C. O. Ritter, M. Kowalski, A. M. Weng, M. Beer, D. Hahn, H. Köstler, *Magnet. Res. Med.* **2012**, *67*, 246-250.
- [14] F. Grothues, G. C. Smith, J. C. C. Moon, N. G. Bellenger, P. Collins, H. U. Klein, D. J. Pennell, *Am. J. Card.* **2002**, *90*, 29-34.
- [15] T. Wech, M. Gutberlet, A. Greiser, D. Stäb, C. O. Ritter, M. Beer, D. Hahn, H.

- Köstler, *Fortschr. Röntgenstr.* **2010**, 182, 676-681.
- [16] A. M. Wenig, C. O. Ritter, J. Lotz, M. J. Beer, D. Hahn, H. Köstler, *Eur. Radiol.* **2010**, 20, 1356-1365.
- [17] P. Nordbeck, O. Ritter, I. Weiss, M. Warmuth, D. Gensler, N. Burkard, V. Herold, P. M. Jakob, G. Ertl, M. E. Ladd, H. H. Quick, W. R. Bauer, *Magnet. Res. Med.* **2011**, 65, 44-50.
- [18] U. Pietrzyk, M. Khodaverdi, *Physik in unserer Zeit* **2006**, 37, 235-240.
- [19] J. Schwitter, *J. Magnet. Res. Imaging* **2006**, 24, 953-963.
- [20] M. Lüning, M. Koch, L. Abet, H. Wolff, B. Wenig, K. Buchali, W. Schopke, T. Schneider, A. Muhler, B. Rudolph, *Fortschr. Röntgenstr.* **1991**, 4, 398-406.
- [21] P. Lang, S. Grampp, M. Vahlensieck, M. Mauz, E. Steiner, H. Schwickert, A. Gindele, R. Felix, H. K. Genant, *Fortschr. Röntgenstr.* **1995**, 6, 469-477.
- [22] P. C. Lauterbur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1004-1011.
- [23] P. Mansfield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5456-5464.
- [24] H. W. Spiess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4010.
- [25] A. Haase, *Journal der Physik* **2003**, 12, 27-29.
- [26] D. Weishaupt, V. D. Köchli, B. Marincek, *Wie funktioniert MRI?*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2006**.
- [27] R. Damadian, *Science* **1971**, 171, 1151-1153.
- [28] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293-2352.
- [29] M. Taupitz, S. Schmitz, B. Hamm, *Fortschr. Röntgenstr.* **2003**, 175, 752-765.
- [30] D. D. Schwert, J. A. Davies, N. Richardson, *Topics Cur. Chem.* **2002**, 221, 165-199.
- [31] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37-38.
- [32] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127.
- [33] W. Kuhn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 1-19.
- [34] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley VCH, Weinheim, **2001**.
- [35] L. Bianci, I. Bertini, C. Luchinat, *Coordination Chem. Rev.* **1996**, 150, 1-296.
- [36] R. Beringer, *Diplomarbeit*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg **2007**.
- [37] C. T. Rodgers, M. D. Robson, *Prog. Cardiovas. Diseases* **2011**, 54, 181-190.
- [38] <http://www.fmri-easy.de>.
- [39] K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, 26, 3995-4021.

- [40] R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901-927.
- [41] D. D. T. Maglinte, M. D. Kohli, S. Romano, J. C. Lappas, *Radiology* **2009**, *252*, 633-641.
- [42] R. F. Mattrey, R. F. Glass, V. Gylys-Varney, P. C. Hayek, R. R. Varney, *Investigative Radiol.* **1987**, *22*, 107.
- [43] D. L. Rubin, H. H. Muller, M. Nino-Murcia, M. Sidhu, V. Christy, S. W. Young, *J. Magnet. Res. Imaging* **1991**, *1*, 371-380.
- [44] S. R. Thomas, L. C. Clark Jr., J. L. Ackermann, R. G. Pratt, R. E. Hoffmann, L. J. Busse, R. A. Kinsey, R. C. Samaratunga, *J. Comput. Assist. Tomogr.* **1986**, *10*, 1-9.
- [45] H. K. Lee, O. Nalcioglu, *J. Magnet. Res. Imaging* **1992**, *2*, 53-61.
- [46] P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 512-523.
- [47] A. J. L. Villaraza, A. Bumb, M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2921-2959.
- [48] K. H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 499.
- [49] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 19-29.
- [50] S. Aime, S. G. Crich, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, L. Tei, E. Terreno, *Coordination Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1562-1579.
- [51] C. S Bonnet, É. Tóth, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 367-384.
- [52] M. Botta, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *3*, 399-407.
- [53] D. E. Reichert, R. D. Hancock, M. J. Welch, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7013-7020.
- [54] L. Helm, *Chimia* **2011**, *65*, 696-698.
- [55] H. Hifumi, S. Yamaoka, A. Tanimoto, T. Akatsu, Y. Shindo, A. Honda, D. Citterio, K. Oka, S. Kuribayashi, K. Suzuki, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6393-6399.
- [56] J. Vymazal, E. Spuentrup, G. Cardenas-Molina, A. J. Wiethoff, M. G. Hartmann, P. Caravan, E. C. Parsons, *Investigative Radiol.* **2009**, *44*, 697-704.
- [57] C. Yang, J. Wu, Y. Hou, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5130-5141.
- [58] C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J. N. Pons, J.-C. Bacri, F. Gazeau, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1001-1011.
- [59] E. Riedl, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, de Gruyter, Berlin, New York **2002**.
- [60] Al. Roch, R. N. Muller, *J. Chem. Physics* **1999**, *110*, 5403-5411.

- [61] M. Hofmann-Antenbrink, H. Hofmann, X. Montet, *Swiss Med. Wkly.* **2010**, *140*, 13081-13089.
- [62] R. E. Rosensweig, *J. of Mag. Mag. Mat.* **2002**, *252*, 370–374.
- [63] R. Lawaczeck, H. Bauer, T. Frenzel, M. Hasegawa, Y. Ito, K. Kito, N. Miwa, H. Tsutsui, H. Vogler, H.-J. Weinmann, *Acta Radiologica* **1997**, *38*, 584-597.
- [64] F. D. Knollmann, J. C. Böck, S. Teltenkötter, W. Wlodarczyk, A. Mühler, T. J. Vogl, R. Felix, *J. Magn. Res. Imaging* **1997**, *7*, 191-196.
- [65] A. Bumb, M. W. Brechbiel, P. L. Choyke, L. Fugger, A. Eggeman, D. Prabhakaran, J. Hutchinson, P. J. Dobson, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 335601.
- [66] K. E. Kellar, D. K. Fujii, W. H. H. Gunther, K. Briley-Sæbø, M. Spiller, S. H. Koenig, *Magn. Res. Physics, Biology and Medicine* **1999**, *8*, 207-213.
- [67] E. Pollert, K. Knížek, M. Marysko, K. Záveta, A. Lancok, J. Boháček, M. Babic, *J. Magn. Magn. Mat.* **2006**, *306*, 241-247.
- [68] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R198-R206.
- [69] S. Palmacci, L. Josephson, *US Patent* 5,262,176, **1991**.
- [70] J. Hradil, A. Pisarev, M. Babic, D. Horak, *China Particuology* **2007**, *5*, 162-168.
- [71] R. S. Molday, D. Mackenzie, *J. Immunol. Methods* **1982**, *52*, 353-367.
- [72] B. R. Jarrett, M. Frendo, J. Vogan, A. Y. Louie, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 1-7.
- [73] H. Miyaji, A. Misaki, *J. Biochem.* **1973**, *74*, 1131-1139.
- [74] T. Kawaguchi, M. Hasegawa, *J. Mat. Science: Mat. Med.* **2000**, *11*, 31-35.
- [75] P. Wunderbaldinger, L. Josephson, R. Weissleder, *Acad. Radiol.* **2002**, *9*, 304-306.
- [76] K. G. Paul, T. B. Frigo, J. Y. Groman, E. V. Groman, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 394-401.
- [77] R. S. Molday and L. L. Molday, *Febs. Letters* **1984**, *170*, 232-238.
- [78] D. Högemann, L. Josephson, R. Weissleder, J. P. Basilion, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 941-946.
- [79] M. Kresse, S. Wagner, D. Pfefferer, R. Lawaczeck, V. Elste, W. Semmler, *Magn. Res. Med.* **1998**, *40*, 236-242.
- [80] S. Chen, F. Reynolds, L. Yu, R. Weissleder, L. Josephson, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6387-6392.
- [81] T. Kawaguchi, T. Hanaichi, M. Hasegawa, S. Maruno, *J. Mat. Science: Mat. Med.* **2001**, *12*, 121-127.
- [82] E. Y. Sun, L. Josephson, K. A. Kelly, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.*

- 2006**, 17, 109-113.
- [83] L. X. Tiefenauer, G. Kuhne, R. Y. Andres, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 347-352.
- [84] M. V. Kvach, I. A. Stepanova, I. A. Prokhorenko, A. P. Stupak, D. A. Bolibrukh, V. A. Korshun, V. V. Shmanai, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1673–1682.
- [85] Amersham GE Healthcare, *Product booklet* **2006**.
- [86] E. A. Schellenberger, D. Sosnovik, R. Weissleder, L. Josephson, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 1062-1067.
- [87] H. J. Gruber, C. D. Hahn, G. Kada, C. K. Riener, G. S. Harms, W. Ahrer, T. G. Dax, H. Knaus, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 696-704.
- [88] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 105-111.
- [89] T. H. Kim, J. K. Kim, W. Shim, S. Y. Kim, T. J. Park, J. Y. Jung, *Magn. Res. Imaging* **2010**, 28, 1004-1013.
- [90] K. J. Landmark, S. DiMaggio, J. Ward, C. Kelly, S. Vogt, S. Hong, A. Kotlyar, A. Myc, T. P. Thomas, J. E. Penner-Hahn, J. R. Baker, Jr., M. M. B. Holl, B. G. Orr, *Am. Chem. Soc. Nano* **2008**, 2, 773-783.
- [91] <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer>.
- [92] L. Josephson, C. Tung, A. Moore, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 186-191.
- [93] H. W. Kang, L. Josephson, A. Petrovsky, R. Weissleder, Al. Bogdanov, Jr., *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 122-127.
- [94] M. Lewin, N. Carlesso, C. Tung, X. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 410-414.
- [95] M. Zhao, M. F. Kircher, L. Josephson, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 840-844.
- [96] P. Wunderbaldinger, L. Josephson, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 264-268.
- [97] M. Taupitz, J. Schnorr, C. Abramjuk, S. Wagner, H. Pilgrimm, H. Hünigen, B. Hamm, *J. Magn. Res. Imaging* **2000**, 12, 905-911.
- [98] G. Fleige, F. Seeberger, D. Laux, M. Kresse, M. Taupitz, H. Pilgrimm, C. Zimmer, *Investigative Radiol.* **2002**, 37, 482-488.
- [99] M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, I. Kravec, H. Pilgrimm, H. Bergmann-Fritsch, B. Hamm, *Investigative Radiol.* **2004**, 39, 394-405.

- [100] E. Schellenberger, J. Schnorr, C. Reutelingsperger, L. Ungethüm, W. Meyer, M. Taupitz, B. Hamm, *Small* **2008**, *4*, 225-230.
- [101] N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, A. Bee, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *194*, 427-433.
- [102] S. Sun, H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205.
- [103] Y.-W. Jun, Y.-M. Huh, J.-S. Choi, J.-H. Lee, H.-T. Song, S. Kim, S. Yoon, K.-S. Kim, J.-S. Shin, J.-S. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5732-5733.
- [104] Y.-M. Huh, Y.-W. Jun, Ho-T. Song, S. Kim, J.-S. Choi, J.-H. Lee, S. Yoon, K.-S. Kim, J.-S. Shin, J.-S. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12387-12391.
- [105] J. Park, K. An, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang, T. Hyeon, *Nat. Mat.* **2004**, *3*, 891-895.
- [106] J. Qin, S. Laurent, Y. S. Jo, A. Roch, M. Mikhaylova, Z. M. Bhujwala, R. N. Muller, M. Muhammed, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1874-1878.
- [107] J. Amici, E. Celasco, P. Allia, P. Tiberto, M. Sangermano, *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 411-416.
- [108] N. Kohler, G. E. Fryxell, M. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7206-7211.
- [109] P. Zou, Y. Yu, Y. A. Wang, Y. Zhong, A. Welton, C. Galban, S. Wang, D. Sun, *Molecul. Pharma.* **2010**, *7*, 1974-1984.
- [110] H. B. Na, I. S. Lee, H. Seo, Y. I. Park, J. H. Lee, S. Kim, T. Hyeon, *Chem. Commun.* **2007**, 5167-5169.
- [111] H. Pardoe, W. Chua-anusorn, T. G. St. Pierre, J. Dobson, *J. Magn. Magn. Mat.* **2001**, *225*, 41-46.
- [112] M. S. Nikolic, M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Förster, H. Weller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6577-6580.
- [113] S. Kim, S. Kim, J. B. Tracy, A. Jasanoff, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4556-4557.
- [114] S. Blömer, *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg **2012**.
- [115] T. Shen, R. Weissleder, M. Papisov, A. Bogdanov, Jr., T. J. Brady, *Magn. Res. Med.* **1993**, *29*, 599-604.
- [116] C. T. Yavuz, J. T. Mayo, W. W. Yu, A. Prakash, J. C. Falkner, S. Yean, L. Cong, H. J. Shipley, A. Kan, M. Tomson, D. Natelson, V. L. Colvin, *Science*

- 2006**, 314, 964-967.
- [117] Z. Grabarek, J. Gergely, *Anal. Biochemistry* **1990**, 185, 131-135.
- [118] J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle, *Anal. Biochemistry* **1986**, 156, 220-222.
- [119] J. C. Han, G. Y. Han, *Anal. Biochemistry* **1994**, 220, 5-10.
- [120] E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P. R. Selvin, *Anal. Biochemistry* **1999**, 273, 73-80.
- [121] <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp00143.pdf>.
- [122] <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp00003.pdf>.
- [123] <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>.
- [124] http://iwan.chem.tu-berlin.de/~lehre/pc/pr1_WS/skript/05_homo.pdf.
- [125] M. Weigele, S. L. DeBernardo, J. P. Tengji, W. Leimgruber, *Journal Amer. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5927-5928.
- [126] S. DeBernardo, M. Weigele, V. Toome, K. Manhart, W. Leimgruber, P. Böhlen, S. Stein, S. Udenfriend, *Archives biochem. biophys.* **1974**, 163, 390-399.
- [127] A. Schroedter, *Dissertation*, Universität Hamburg, Hamburg **2002**.
- [128] <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzlebensdauer>.
- [129] E. Dulkeith, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, München **2004**.
- [130] G. Redeuilh, C. Secco, E. Baulieu, *J. Biological Chem.* **1985**, 260, 3996-4002.
- [131] K. K. Lo, W. Hui, *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 1992-2002.
- [132] D. S. Wilbur, P. M. Pathare, D. K. Hamlin, S. A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 819-832.
- [133] C. Somlei, M. Berenyi, P. Maroy, *Zeitschr. Naturforsch.* **1993**, 48b, 511-516.
- [134] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, M. K. Chyan, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 1514-1522.
- [135] N. M. Green, L. Konieczny, E. J. Toms, R.C. Valentine, *Biochem. J.* **1971**, 125, 781-791.
- [136] G. Redeuilh, C. Secco, E. Baulieu, *J. Biological Chem.* **1985**, 260, 3996-4002.
- [137] R. K. Garlick, R. W. Giese, *J. Biological Chem.* **1988**, 263, 210-215.
- [138] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, P. M. Pathare, S. A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 572-584.
- [139] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, R. L. Vessella, J. E. Stray, K. R. Buhler, P. S. Stayton, L. A. Klumb, P. M. Pathare, S. A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.*

- 1996**, 7, 689-702.
- [140] N. M. Green, *Biochem. J.* **1965**, 94, 23c-24c.
- [141] Sigma, *Produktinformation HABA/Avidin Reagent*, Produktnummer H2153.
- [142] J. Nguyen-Legros, J. Bizot, M. Bolesse, J.-P. Pulicani, *Histochemistry* **1980**, 66, 239-244.
- [143] M. Schroeter, A. Saleh, D. Wiedermann, M. Hoehn, S. Jander, *Magn. Res. Med.* **2004**, 52, 403-406.

Anhang A: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
au	Willkürliche Einheiten (arbitrary units)
CLIO	<i>cross linked iron oxide</i>
CME	Cellulose-Mischester
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSA	Dimercaptobernsteinsäure
DMSO	<i>N,N</i> -Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
Et	Ethyl-
EtOH	Ethanol
FA-NH ₂	6-Amino-fluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunden
HCl	Salzsäure
kDa	Kilodalton
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MR(T)	Magnetresonanz(tomographie)
ms	Millisekunden
MWCO	Ausschlußgrenze (molecular weight cutoff)
NaOH	Natronlauge
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PEG	Polyethylenglykol
RBITC	Rhodamin B-isothiocyanat
s	Sekunden
SPIO	<i>superparamagnetic iron oxides</i>
sulfo-NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid

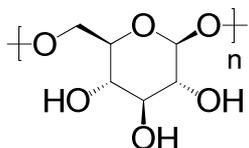
Anhang B: Verzeichnis der Verbindungen

- 1 Dextran T5 (n = 31)
- 2 SPIO-T5
- 3 Dextran T20 (n = 109)
- 4 SPIO-T20
- 5 SPIO (a-d: T5; e-f: T20, g: T40)
- 6 Dextran T40
- 7 SPIO-T5
- 8 SPIO-20
- 9 SPIO-T40
- 10 Natronlauge
- 11 Epichlorhydrin
- 12 CLIO-T5
- 13 Ammoniak
- 14 Amino-CLIO-T5 (CLIO-NH₂-T5)
- 15 CLIO-T20
- 16-24 Amino-CLIO-T5 (CLIO-NH₂-T5)
- 25-32 Amino-CLIO-T20 (CLIO-NH₂-T20)
- 33 Amino-CLIO-T40 (CLIO-NH₂-T40)
- 34 Carboxy-CLIO-T5 (CLIO-COOH-T5)
- 35 Carboxy-CLIO-T20 (CLIO-COOH-T20)
- 36 Carboxy-CLIO-T40 (CLIO-COOH-T40)
- 37 Sulfo-NHS-carboxy-CLIO (CLIO-COO-sulfo-NHS)
- 38 Cystein-carboxy-CLIO (CLIO-COO-Cys)
- 39 Diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH₂)
- 40 Diaminopentan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH₂)
- 41 Diaminododecan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH₂)
- 42 Dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (CLIO-DMSA)
- 43 Diaminoethan-dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂)
- 44 Cystein-amino-CLIO (CLIO-NH-Cys)
- 45 Etyhlester-thioharnstoff-amino-CLIO (CLIO-NCS-COOEt)
- 46 Carboxy-thioharnstoff-amino-CLIO (CLIO-NCS-COOH)

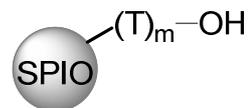
- 47 FITC-amino-CLIO (CLIO-NH-FITC)
- 48 Carboxy-FITC-amino-CLIO (CLIO-NH-FITC-COOH)
- 49 Carboxy-FITC-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-FITC-COOH)
- 50 Carboxy-FITC-diaminopentan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH-FITC-COOH)
- 51 Carboxy-FITC-diaminododecan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH-FITC-COOH)
- 52 6-Aminofluorescein-carboxy-CLIO (CLIO-COO-NH-FA)
- 53 FITC-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-FITC)
- 54 TAMRA-amino-CLIO (CLIO-NH-TAMRA)
- 55 TAMRA-X-Cystein-amino-CLIO (CLIO-NH-Cys-TAMRA-X)
- 56 (Carboxy-)TAMRA- und (Carboxy-)TAMRA-X-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-TAMRA(Carboxy) / -TAMRA-X(-Carboxy); Carboxy für e
- 57 TAMRA-succinimid-dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (CLIO-DMSA-succinimid-TAMRA)
- 58 TAMRA-succinimid-diaminoethan-dimercaptobernsteinsäure-amino-CLIO (CLIO-DMSA-NH-CH₂-CH₂-NH₂-succinimid-TAMRA)
- 59 TAMRA-succinimid-Cystein-amino-CLIO (CLIO-NH-Cys-succinimid-TAMRA)
- 60 RBITC-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-RBITC)
- 61 RBITC-diaminopentan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH-RBITC)
- 62 RBITC-diaminododecan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH-RBITC)
- 63 Dansyl-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Dansyl)
- 64 T10-FITC-amino-CLIO (CLIO-NH₂-T10-FITC)
- 65 Fluorescamin-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-N-Fluorescamin)
- 66 2-(2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-3-oxo-4-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-yl)benzoesäure
- 67 Antikörper-6-amino-Fluorescein-carboxy-CLIO (CLIO-COO-NH-FA-AK)
- 68 Biotin-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Biotin)
- 69 Biotin-diaminopentan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₄-NH-Biotin)
- 70 Biotin-diaminododecan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-(CH₂)₁₁-NH-Biotin)
- 71 2-Amino-ethylamidobiotin
- 72 5-Amino-pentylamido-biotin
- 73 12-Amino-dodecanylamidobiotin
- 74 Biotin-PEG-carboxy-CLIO (CLIO-COO-PEG-Biotin)

-
- 75** Avidin-Biotin-diaminoethan-CLIO (CLIO-NH-CH₂-CH₂-NH-Biotin-Avidin)
- 76** Avidin-Biotin-PEG-carboxy-CLIO (CLIO-COO-PEG-Biotin-Avidin)

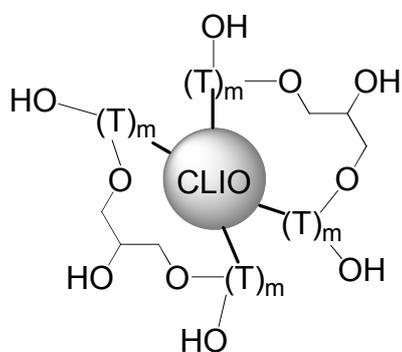
Anhang C: Strukturtafeln



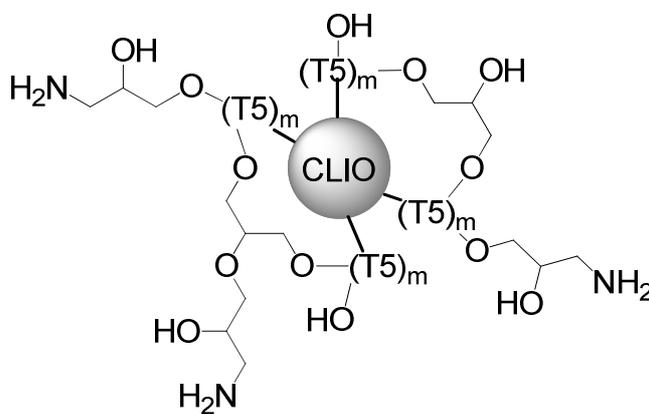
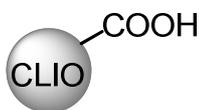
n	
31	1
109	3
248	6



Dextran	
T5	2, 5a-d, 7
T20	4, 5e-f, 8
T40	5g, 6, 9

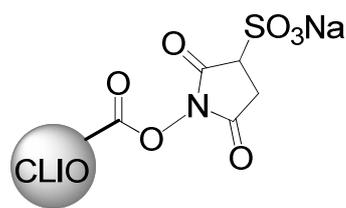


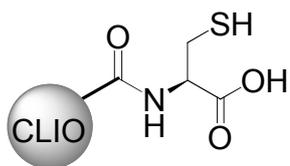
Dextran	
T5	12
T20	15

**14**

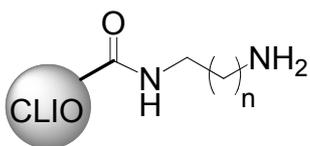
Dextran	
T5	16-24
T20	25-32
T40	33

Dextran	
T5	34
T20	35
T40	36

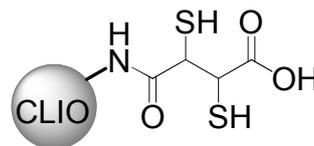
**37**



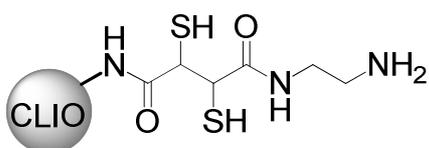
38



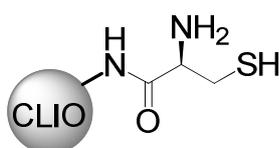
n	
1	39
4	40
11	41



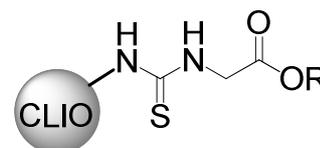
42



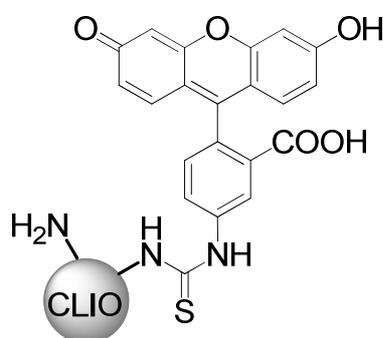
43



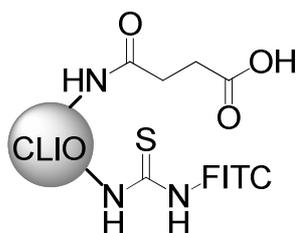
44



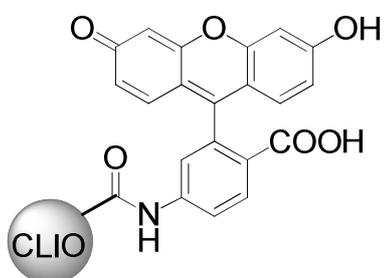
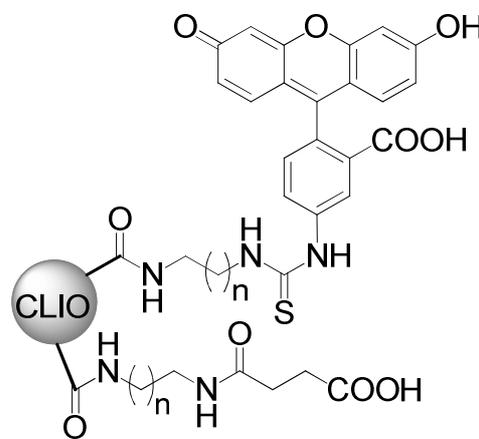
R	
OEt	45
H	46



47

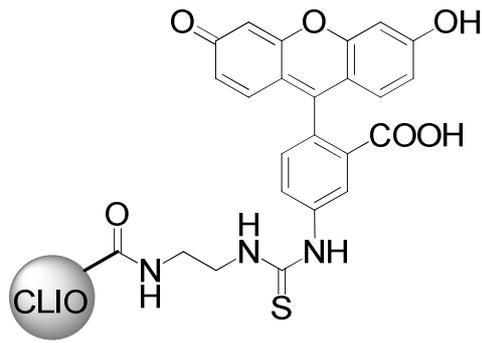


48

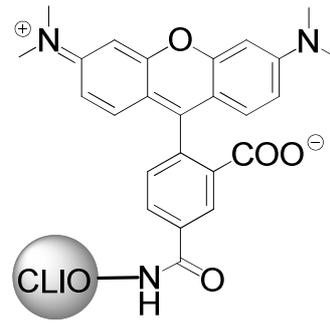


52

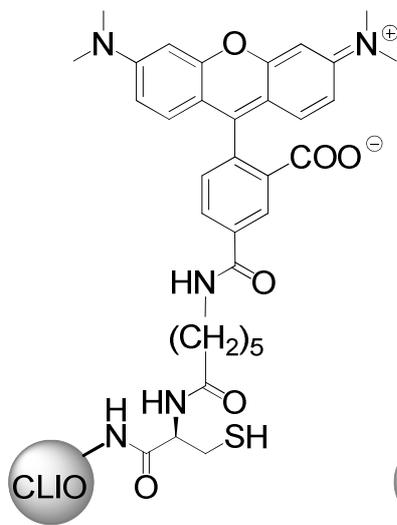
n	
1	49
4	50
11	51



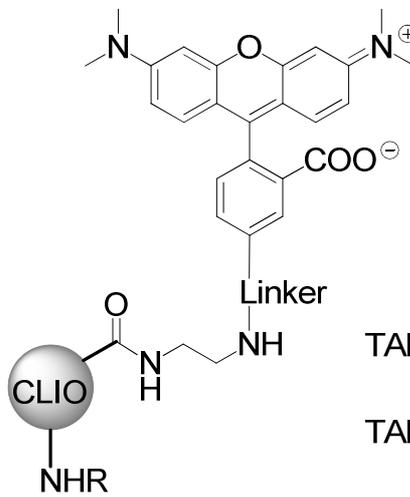
53



54



55



56

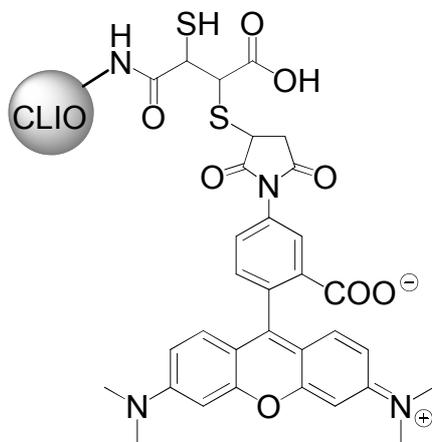
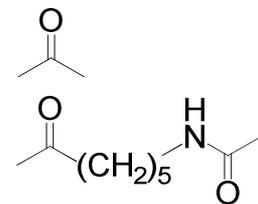
56a-e': R = H

56e: R =

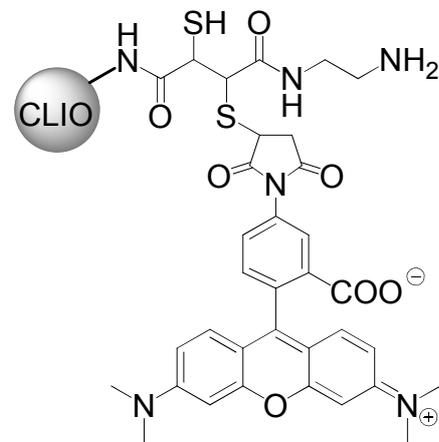
Linker

TAMRA

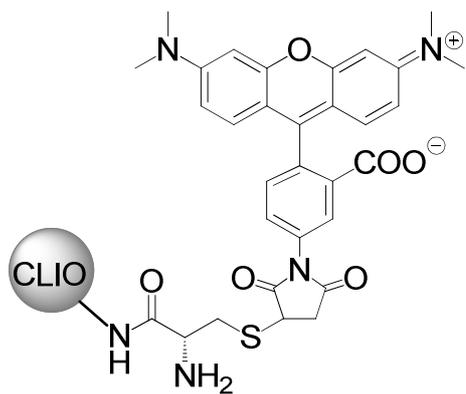
TAMRA-X



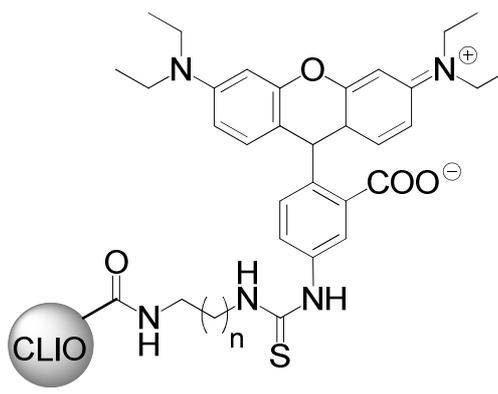
57



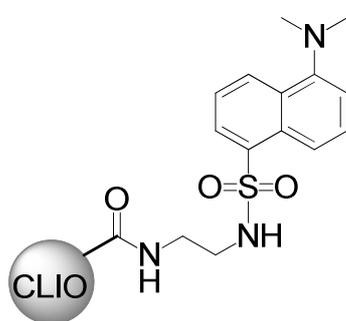
58



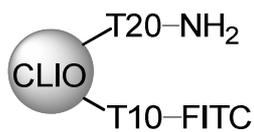
59



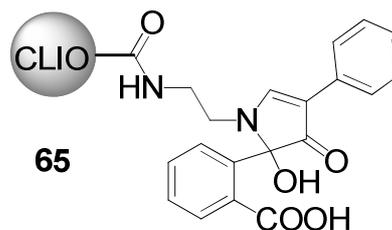
n	
1	60
4	61
11	62



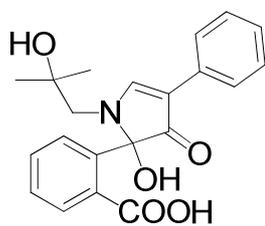
63



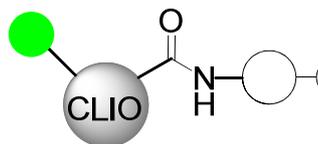
64



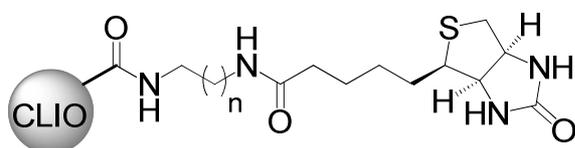
65



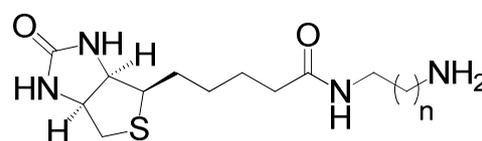
66



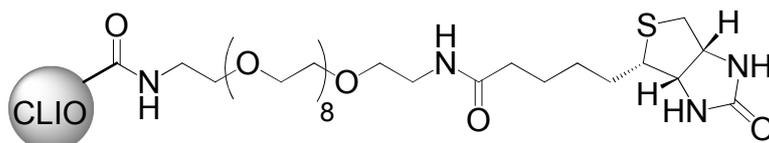
67



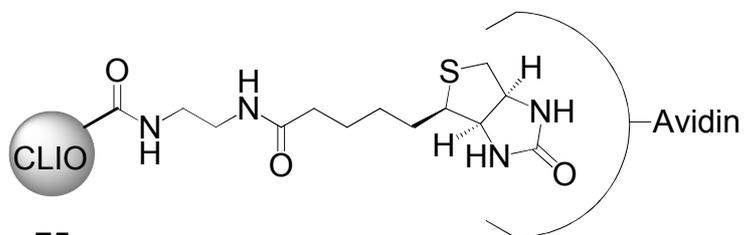
n	
1	68
4	69
11	70



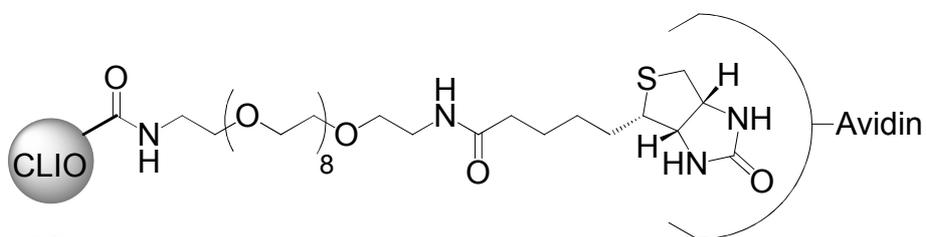
n	
1	71
4	72
11	73



74



75



76

Danksagung

In erster Linie danke ich meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. Wolfdieter A. Schenk für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie sein Verständnis für meine familiären Umstände.

Ganz herzlich danke ich Frau E. Bauer für die Auswertung der Tierversuche, ihr Engagement und ihre Hilfe bei vielen Fragestellungen.

Großer Dank gilt auch Frau M. Michalska für die Durchführung der Tierversuche, Herrn Dr. A. Steffen für die Messung der Fluoreszenzlebensdauern und Herrn T. Kampf für die Relaxivitätsmessungen.

Auch möchte ich so manchem Arbeitskreis in der organischen und anorganischen Chemie dafür danken, dass ich immer ein gern gesehener Gast bei der Benutzung Ihrer Gerätschaften war. Hierzu gehören der AK Seibel, AK Würthner, AK Tacke, AK Braunschweig und AK Schatzschneider.

Frau L. Michels und Frau S. Timmroth möchte ich für die Messung der Elementaranalysen und Herrn Dr. R. Bertermann und Frau M.-L. Schäfer für die Aufnahmen der NMR-Spektren danken. Weiterer Dank gilt Frau C. Walter, Frau M. Kromm, Herrn B. Fertig und Herrn A. Schertzer für ihre große Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Dankbar bin ich auch dem DZHI Würzburg für die Finanzierung eines Teiles dieser Arbeit.

Dem Arbeitskreis Breuning (Tobi, Melli, David und Thomas) danke ich für die unterhaltsamen Mittagspausen und für das gelegentliche, abendliche Beisammen sein. Auch meinen Studienfreunden Marcel Gsänger, der mir immer gerne eine Übernachtungsmöglichkeit in Würzburg geboten hat, und Ulrich Mayerhöffer bin ich für die vielen Treffen zum Mittagessen, Kaffeetrinken und Ausgehen dankbar.

Nicht zu vergessen sind natürlich meine beiden lieben Kolleginnen Steffi Sparka und Anne Werner, ohne die die Arbeit im Labor zuletzt nur halb so lustig war und die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Mein Dank gilt auch allen meinen Freunden und Verwandten für ihr Interesse an meiner Arbeit, das mich immer motivierte.

Vor allem danke ich meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Am meisten danke ich jedoch meiner Frau Monika, die mir immer ein fester Rückhalt war und die mich immer unterstützt hat. Hier sind auch meine lieben Kinder Johann, Karla und Elise zu nennen, die mich immer aufheitern und ablenken konnten, wenn meine Versuche nicht den gewünschten Erfolg zeigten.