

DISS. ETH NO. 19472

SURFACE FUNCTIONALIZING
SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE
NANOPARTICLES USING NITROCATECHOL
ANCHORS

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

ESTHER AMSTAD

Material Science ETH

born on June 6, 1983

citizen of Beckenried (NW)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner

Prof. Dr. Erik Reimhult, co-examiner

Prof. Dr. André R. Studart, co-examiner

Prof. Dr. Helmuth Möhwald, external co-examiner

2010

Abstract

Many material properties change and become size dependent if dimensions are reduced from the micro to the nano scale. These unique, size-dependent properties of nanomaterials render them very interesting for fundamental studies and numerous applications. Nanoparticles (NPs) are a particularly interesting but challenging class of nanomaterials. Biomedical applications of superparamagnetic iron oxide NPs for therapeutic and diagnostic purposes require NPs to be stable under physiologic conditions. This can only be achieved if NPs are sterically stabilized with appropriate dispersants that bind irreversibly to the iron oxide surface. Tight control over the dispersant layer not only prevents NP agglomeration but additionally paves the way to tailor the NP size, charge and the type and density of functionalities presented at the NP surface. These factors are especially important for the *in vivo* performance of NPs, in particular the circulation time, targeting ability and clearance route. With the extremely high surface : volume ratio, surface functionalization becomes a key issue in the endeavor to better understand NP structure-function and structure-toxicity relationship and to explore their unique properties for applications in areas such as material science, biology and medicine. A particularly important aspect related to surface properties is the need for reliable and cost-effective approaches to stabilize and disperse single NPs. Only then can their unique, size-dependent properties be explored, controlled and utilized.

One possibility to appropriately modify NP surfaces is to graft low molecular weight dispersants to these surfaces. Such dispersants typically consist of an anchor which is covalently linked to a spacer. Stabilization of NPs with low molecular weight dispersants relies on high affinity anchors that firmly bind spacers and functionalities to the NP surface at high density. Nevertheless, systematic studies comparing the performance of anchors to graft molecules to magnetite (Fe_3O_4) NPs are missing. Therefore, iron oxide NPs stabilized with low molecular weight are often reported to agglomerate under physiological conditions [1].

Iron Oxide Core Synthesis

The binding affinity of dispersants greatly depends on the NP surface chemistry. To interrogate the influence of dispersants on NP stability, it is therefore of primary interest to control the core stoichiometry, surface chemistry and size. To this end, in chapter 5, different approaches to synthesize Fe_3O_4 NPs were taken, namely aqueous precipitation and non-aqueous sol-gel methods using either microwave (MW) or oil bath heating for nucleation and growth of the NPs. While the core size can be controlled if NPs are synthesized by non-aqueous sol-gel methods, it is difficult to tune if NPs are synthesized by aqueous precipitation. However, iron oxide NPs synthesized in the MW for maximally 1 h had a bimodal size distribution. In contrast, NPs grown in the oil bath for 24 h were monomodally distributed. Therefore, from the synthesis methods investigated in this thesis, the non-aqueous sol-gel method where NPs were nucleated and grown in the oil bath allowed the closest control over the core size and its distribution.

Influence of the Dispersant Anchor on Nanoparticle Stability

To assess the suitability of dispersants to sterically stabilize Fe_3O_4 NPs, dispersants were grafted to Fe_3O_4 NPs with core radii between 2.5 and 6 nm and with varying degrees of polydispersity. A set of 8 different catechol-derived anchors were compared regarding their suitability as dispersant anchors. For this purpose, catechol derived anchors were covalently linked to a linear poly(ethylene) glycol (PEG) spacer. Dispersant binding reversibility and therefore NP stability was investigated with temperature-dependent dynamic light scattering (DLS) measurements and complemented with DLS experiments where excessive dispersants were repeatedly removed. Furthermore, NP stability was correlated with the dispersant packing density on the surface of NPs. It was found that electronegative substituents, namely NO_2 -substituents on the aromatic ring of catechols greatly enhance the binding affinity of such anchors towards Fe_3O_4 surfaces. This led to perfect long-term NP stability in physiologic buffers and at temperatures up to 90°C. Furthermore, NP stability was demonstrated to increase with increasing dispersant packing density. Thus, NPs stabilized with PEG-nitrocatechol dispersants exhibited the highest dispersant packing density and dispersion stability.

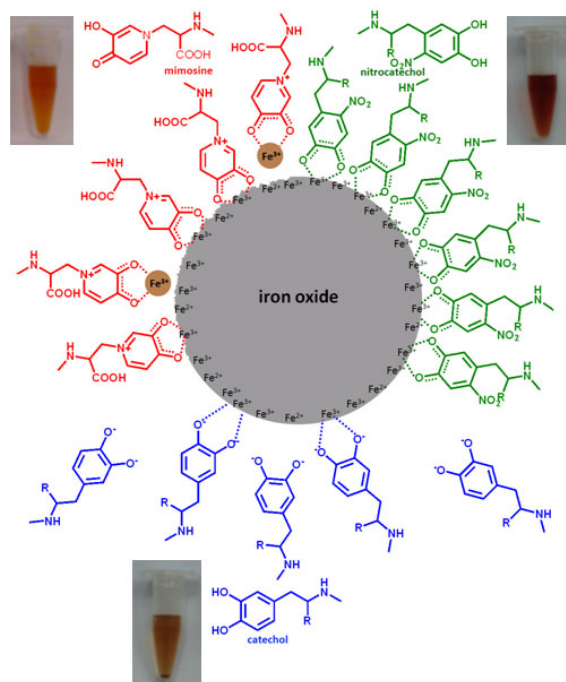


Figure 1: Cartoon of different anchors adsorbed on iron oxide NPs. Iron oxide NPs stabilized with dispersants that contain low binding affinity anchors such as catechols are unstable due to reversible dispersant adsorption. Iron oxide NPs stabilized with anchors that have a too high binding affinity such as mimosine are unstable because mimosine gradually dissolves NPs resulting in mimosine/ Fe^{3+} complexes. If the binding affinity of anchors is optimal, NPs are stable even under dilute physiologic conditions and up to temperatures of $90^{\circ}C$. This is the case *e.g.* for dispersants containing nitrocatechols as anchors.

Electronic Interactions of NitroDOPA with Fe_3O_4 Surfaces

The underlying chemical reactions responsible for the different binding affinities of chemically similar anchors were elucidated with electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and complemented with Fourier transform infrared (FTIR) and UV/VIS spectroscopy measurements. Nitrocatechols were found to adsorb to surface-confined Fe(II) ions resulting in a strong electron delocalization between the catechol's delocalized Π^* orbitals and surface Fe(II). This resulted in an increased electron density in nitrocatechol and an electron depletion at the coordinating iron ion which then appeared as Fe^{3+} in EPR. This strong electron delocalization is responsible for the close to optimal binding affinity of nitrocatechols to Fe_3O_4 surfaces. However, it also became clear that binding affinity should not be maximized. A too high binding affinity of anchors to the metal ion leads to gradual NP dissolution, as was shown for mimosine which has a very high complexation constant towards Fe^{3+} ions. Therefore should binding affinities be optimized such that they are high enough to prevent dispersant desorption but below the threshold where NPs start to dissolve (Figure 1).

Influence of the PEG Molecular Weight on Nanoparticle Stability

After anchors that firmly bind molecules to Fe_3O_4 surfaces were discovered, the influence of the PEG molecular weight (M_w) on NP stability, packing density and dispersant density profile was investigated with DLS, small angle neutron scattering (SANS) and thermogravimetric analysis (TGA). PEG M_w s between 5 kDa and 10 kDa were found to be optimal for achieving good long-term NP stability up to 90 °C. DLS measurements indicated that NPs coated with dispersants which had a PEG $M_w < 1.5$ kDa agglomerated under physiologic conditions. These experimental results were well in agreement with theoretical calculations of inter-particle potentials. If the PEG molecular weight was higher than 10 kDa, the dispersant packing density was below the threshold where NPs start to agglomerate. Thus, not only the anchor but also the dispersant molecular weight has to be optimized.

Iron Oxide Nanoparticle Functionalization

Different strategies to functionalize individually stabilized iron oxide NPs were compared. A monolayer of neutravidin was assembled on biotin-presenting iron oxide NPs. Subsequently, these NPs were functionalized with two different biotinylated antibodies. This biotin-avidin functionalization strategy worked well if NPs were used directly after they had been assembled in dilute conditions. However, NPs started to crosslink if functionalized at higher concentrations or if they were stored for prolonged times.

Alternatively, antibodies were covalently linked to acrylate presenting NPs through different coupling reactions. Similarly to what was observed for the functionalization of NPs through the biotin-avidin strategy, NPs started to crosslink during the covalent coupling of antibodies which have multiple amine groups per molecule. However, NPs could readily be functionalized with fluorophores that contained exactly one amine group per molecule. This was achieved by covalently coupling the amine containing fluorophores to acrylate presenting NPs. It resulted in individually stabilized dual labeled contrast agents which were detectable with magnetic resonance imaging (MRI) and fluorescence microscopy.

Assembly of Iron Oxide Nanoparticles into Thermoresponsive Superstructures

Iron oxide NPs can be used as actuators to locally produce heat if subjected to an alternating magnetic field (AMF). Inserted into a thermoresponsive vesicular structure, the

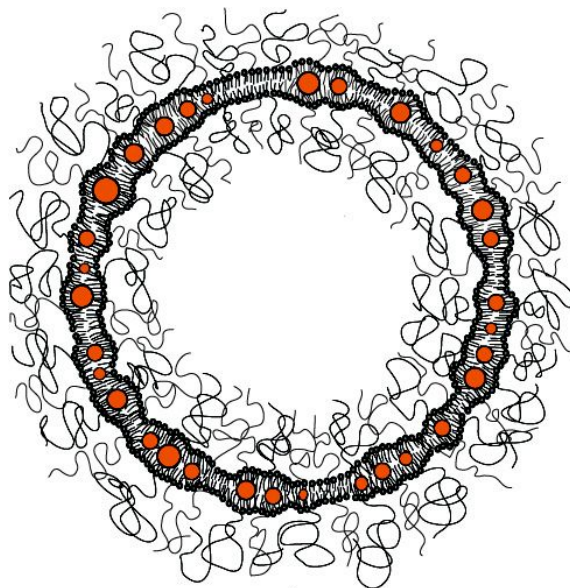


Figure 2: Cartoon of iron oxide NPs assembled in the liposome membrane. Individually stabilized hydrophobic NPs spontaneously assembled into the hydrophobic part of the liposome membrane. These NPs can be used as actuators to trigger release if subjected to an alternating magnetic field. Liposomes were sterically stabilized with PEG to prevent agglomeration if they are stored in the gel phase ($T < T_m$) and to provide stealth properties *in vivo*.

through NP produced heat can be used to trigger release of cargo that had been encapsulated in liposomes. Release will be more efficient if NPs are directly inserted into the thermoresponsive structure. Controlled and stable assembly of NPs into the hydrophobic core of thermoresponsive lipid membranes can only be achieved for NPs with a hydrophobic shell and of sufficiently small size. High affinity anchors pave the way to assemble an irreversibly bound monolayer of palmityl-nitroDOPA on the Fe_3O_4 NP surface. Such individually stabilized hydrophobic NPs were shown to spontaneously assemble into the hydrophobic core of membranes of liposomes (Figure 2).

Liposomes consisting of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) lipids incorporating 2.5 nm core radius NPs in their membrane were prepared through extrusion. The structure of liposomes and the membrane distortions caused by the iron oxide NPs assembled therein, were studied with SANS. Despite that iron oxide NPs significantly distorted the membranes, the membrane phase transition temperature (T_m), determined by differential scanning calorimetry (DSC), was not affected by the presence of iron oxide NPs.

DSPC was chosen because of its T_m of 55 °C which is well above the body temperature. Liposomes are highly impermeable in the gel phase ($T < T_m$) but become permeable at $T \approx T_m$. Application of an AMF could therefore be used to raise the temperature locally in

the liposome membrane, where iron oxide NPs were embedded, to T_m to release cargo. It was indeed shown that release of encapsulated calcein could be more efficiently triggered if hydrophobic NPs were embedded in the liposome membrane rather than if hydrophilic NPs were encapsulated in the liposome lumen.

A comparison between palmityl-nitroDOPA stabilized and oleic acid coated iron oxide NPs revealed that a thin, irreversibly bound hydrophobic dispersant shell surrounding Fe_3O_4 cores also at elevated temperatures was key to this performance. DLS measurements performed before and after exposure of liposomes hosting iron oxide NPs in their membrane revealed that liposomes remained intact during the AMF treatment. Thus, cargo could be gradually released by applying multiple short AMF pulses, which decreased heating of bulk water. In addition to close control over the time and rate at which encapsulated cargo can be delivered, these vesicles thus also allow to efficiently release cargo at bulk temperatures significantly below T_m . This renders Fe_3O_4 NPs functionalized liposomes very attractive delivery vehicles to ferry both, drugs and chemical reagents to desired locations.

Impact of Controlled Surface Modification on Applications

Both the results on functionalized, individually stabilized hydrophilic NPs and on embedded hydrophobic NPs for actuation of liposome membranes demonstrate that high-performance NP applications can only be realized if the NP surface can be modified in a controlled way. Therefore, suitable anchors that firmly bind spacers and functionalities to NP surfaces open up a multitude of possibilities to design multifunctional NPs which meet stringent requirements regarding stability, size and surface functionality. As demonstrated in this thesis they create the opportunity to design NPs and smart materials for so far unobtainable applications.

Zusammenfassung

Viele Materialeigenschaften verändern sich und werden grössenabhängig, wenn die Dimensionen von der Mikro- in die Nanometer Grössenskala verkleinert werden. Die resultierenden einzigartigen Eigenschaften machen Nanomaterialien attraktiv für die Grundlagenforschung und zahlreiche Anwendungen. Ein bedeutendes, aber auch herausforderndes Beispiel solcher Nanomaterialien sind Nanopartikel. Durch das hohe Verhältnis der Oberfläche zum Volumen wird die Oberflächenfunktionalisierung zentral fürs Bestreben zum besseren Verständnis des Einflusses der Struktur auf die Funktion und Toxizität. Zusätzlich ist eine kontrollierte Oberflächenmodifizierung Voraussetzung, damit die speziellen Materialeigenschaften von Nanopartikeln in Bereichen wie der Materialwissenschaft, Biologie und Medizin zum Tragen kommen. Von besonderer Bedeutung ist die rasch zunehmende Nachfrage nach einer kontrollierten, kostengünstigen Möglichkeit, die Nanopartikel individuell stabilisieren und dispergieren zu können. Nur so können die speziellen Materialeigenschaften von Nanopartikeln erforscht, kontrolliert und gezielt ausgeschöpft werden.

Geladene Nanopartikel können elektrostatisch stabilisiert werden, falls diese Nanopartikel in wässrigen Lösungen mit niedrigen Salzkonzentrationen dispergiert werden. Wenn Nanopartikel aber über weite pH Bereiche oder in Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen dispergiert werden sollen, müssen sie sterisch stabilisiert sein.

Ein grosses Anwendungsgebiet von Nanopartikeln ist die Biomedizin. Vor allem für die biomedizinischen Anwendungen müssen Nanopartikel auch unter hohen Salzkonzentrationen stabil sein. Diesen hohen Anforderungen können nur sterisch stabilisierte Nanopartikel gerecht werden. Eine gute Kontrolle über die Oberflächenchemie erlaubt es, zusätzlich zur Nanopartikelstabilität die Nanopartikelladung und die Art und Dichte von funktionellen Gruppen, die an der Nanopartikeloberfläche präsentiert werden, an die entsprechende Anwendung anzupassen. Diese Faktoren sind von grosser Bedeutung für *in vivo* Anwendungen, weil sie die Zirkulationszeit und die Route, auf der diese Nanopartikel

ausgeschieden werden, bestimmen. Deshalb ist es entscheidend, Protokolle zu etablieren, die eine kontrollierte, experimentell einfache, vielseitige und kostengünstige Modifizierung der Nanopartikeloberflächen erlauben.

Ein Ansatz dieses Ziel zu erreichen ist die Adsorption von Detergenzien auf der Nanopartikeloberfläche. Diese können aus Ankern bestehen, die kovalent mit Platzhaltermolekülen verbunden sind. Die Strategie der Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln durch niedermolekulare Detergenzien beruht auf Ankern, die Platzhaltermoleküle irreversibel auf die Nanopartikeloberfläche anbinden. Trotz der Wichtigkeit der Anker zur Stabilisierung und Funktionalisierung von Magnetit (Fe_3O_4) Nanopartikeln wurde bisher, unseres Wissens, keine umfassende Studie verfasst, die die Tauglichkeit von verschiedenen Ankern vergleicht. Weil oft suboptimale Anker zur Stabilisierung von Eisenoxidnanopartikeln verwendet werden, agglomerieren solche Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen [1].

Eisenoxidnanopartikel Synthese

Die Bindungsaffinität von Ankern hängt stark von der Stöchiometrie der Oberfläche der Nanopartikeln ab. Soll der Einfluss von Ankern auf die Nanopartikelstabilität erforscht werden, muss sichergestellt sein, dass die Stöchiometrie der Nanopartikeloberfläche für alle Chargen gleich ist. Zudem sollten Detergenzien, die kommerziell erhältlichen Nanopartikeln zur besseren Handhabung oft zugesetzt werden, vermieden werden.

Um eine bessere Kontrolle über diese Parameter zu bekommen, wurden im Rahmen dieser Dissertation Eisenoxidkerne auf verschiedene Arten synthetisiert, namentlich durch Fällungsreaktionen aus wässrigen Lösungen und durch Sol-Gel Methoden. Nanopartikel, die mittels letzteren Verfahrens hergestellt wurden, entstanden in organischen Lösungsmitteln durch Zersetzungsreaktionen von Präkursoren bei erhöhten Temperaturen, indem entweder mittels Mikrowellen oder im Ölbad geheizt wurde. Die Grösse der Nanopartikel, die durch Fällungsreaktionen in wässrigen Lösungen entstanden, war schwierig zu kontrollieren, im Gegensatz zu Eisenoxidnanopartikeln die mittels Sol-Gel Methoden in organischen Lösungsmitteln synthetisiert wurden. Nanopartikel die mittels der Mikrowelle während maximal 1 h geheizt wurden, zeigten eine bimodale Kerngrößenverteilung. Dem gegenüber stehen Nanopartikel, die im Ölbad produziert wurden und sich als monodispers erwiesen. Von den untersuchten Synthesemethoden erlaubte somit die nichtwässrige Sol-Gel Route, bei der Nanopartikel im Ölbad synthetisiert wurden, die beste Kontrolle über die Kerngrösse und Kerngrößenverteilung.

Einfluss des Ankers auf die Nanopartikelstabilität

Um die Tauglichkeit von verschiedenen Detergenzien zu vergleichen, wurden Detergenzien auf frisch synthetisierte Eisenoxidnanopartikel mit Radien zwischen 2.5 nm und 6 nm adsorbiert. Weil erwartet wird, dass die Anker der Detergenzien einen entscheidenden Einfluss auf die Nanopartikelstabilität haben, wurde zuerst dieser Einfluss untersucht. Die Tauglichkeit von 8 unterschiedlichen Catecholderivaten als Anker für die Stabilisierung von Eisenoxidnanopartikeln wurde verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Catecholderivate kovalent zu Poly(ethylen glykol) (PEG) gebunden. Die Nanopartikelstabilität und Bindungsreversibilität der Detergenzien wurden unter anderem mit temperaturabhängigen dynamischen Lichtstreuungsmessungen bestimmt. Zusätzlich wurde die Nanopartikelstabilität mit der Packungsdichte der Detergenzien auf den Nanopartikeloberflächen korreliert. Dabei stellte sich heraus, dass das Einführen eines elektronegativen Substituenten, wie z.B. einer NO_2 -Gruppe, direkt in den aromatischen Catecholring zu einer viel besseren Haftung dieser Anker auf Eisenoxidoberflächen führt, als das für unsubstituierte Catechole der Fall ist. Das zeigte sich in einer deutlich höheren Eisenoxidnanopartikelstabilität unter physiologischen Bedingungen und bis zu Temperaturen von 90°C. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikelstabilität mit der Detergenzienpackungsdichte korreliert. Deshalb waren Eisenoxidnanopartikel, die mit PEG-Nitrocatecholen stabilisiert wurden, unter physiologischen Bedingungen deutlich stabiler als Nanopartikel, die mit PEG-Catecholen oberflächenmodifiziert waren.

Elektronische Interaktionen von Nitrocatecholen mit Eisenoxidoberflächen

Die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen, die für die stärkere Bindung von elektronegativ substituierten Ankern auf Eisenoxidoberflächen verantwortlich sind, wurden mittels Elektronen-Paramagnetischen-Resonanz-Spektroskopie, Fouriertransformation Infrarot Spektroskopie und UV/VIS Spektroskopie näher untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Nitrocatechole zuerst auf oberflächengebundenen Fe(II) binden. Das ruft eine starke Elektronendelokalisation zwischen dem delokalisierten Π^* -System von Nitrocatecholen und an der Oberflächen gebundenem Fe(II) hervor. Daraus resultiert eine erhöhte Elektronendichte im Nitrocatechol Ring und ein Elektronenmangel am koordinierten Eisenion. Das Letztere zeigte sich in der Elektron-Paramagnetischen-Resonanz-Spektroskopie als Fe^{3+} -Signal. Diese starke Elektronendelokalisation ist für die verglichen mit den unsubstituierten Catecholen erhöhte Bindungsaffinität der Nitrocatechole zu Eisenoxidoberflä-

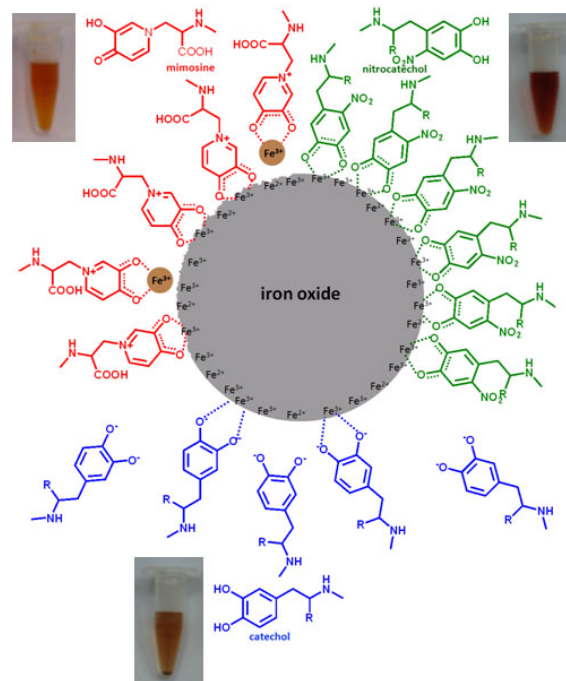


Abbildung 1: Sketch von Eisenoxidnanopartikeln die mit Detergenzien stabilisiert wurden, die verschiedene Anker haben. Eisenoxidnanopartikel, die mit Detergenzien stabilisiert wurden, die einen Anker haben, der eine tiefe Affinität zu Fe_3O_4 Oberflächen hat, agglomerieren, weil die Detergenzien reversibel adsorbieren. Eisenoxidnanopartikel, die mit Detergenzien stabilisiert sind, die einen Anker haben, der zu stark bindet, sind instabil weil der Anker die Nanopartikel auflöst. Dabei werden Anker/ Fe^{3+} Komplexe gebildet. Nur wenn Fe_3O_4 Nanopartikel mit Detergenzien mit Ankern stabilisiert sind, die eine optimale Affinität zu Fe_3O_4 haben, bleiben sie stabil unter verdünnten, physiologischen Bedingungen und bis zu Temperaturen von 90 °C. Nitrocatechol Anker erfüllten diese Kriterien.

chen verantwortlich.

Es stellte sich aber heraus, dass die Bindungsaffinität der Anker nicht maximiert werden sollte. Eine zu hohe Bindungsaffinität führt zu einer kontinuierlichen Auflösung der Eisenoxidnanopartikeln unter Bildung von Anker/ Fe^{3+} -Komplexen. Das wurde bei Mimosin Ankern beobachtet. Die Bindungsaffinität von Ankern muss dementsprechend optimiert werden. Sie sollte gross genug sein, um eine reversible Adsorption von Detergenzien zu verhindern, aber unterhalb der Limite bleiben, bei welcher Anker Eisenoxidnanopartikel aufzulösen beginnen (Abbildung 1).

Einfluss vom PEG Molekulargewicht auf die Nanopartikelstabilität

Nachdem Anker gefunden wurden, die Moleküle irreversibel auf Eisenoxidnanopartikeloberflächen anbinden können, wurde der Einfluss des PEG Molekulargewichts auf die Nanopartikelstabilität, die Detergenzienpackungsdichte und das Detergenziendichteprofil

mittels dynamischer Lichtstreuung, Kleinwinkel-Neutronenstreuung und Thermogravimetrie untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Detergenzien, die PEG mit Molekulargewichten zwischen 5 kDa und 10 kDa enthalten, zu höchster Nanopartikelstabilität führen. Dynamische Lichtstremessungen haben gezeigt, dass Nanopartikel, die mit Detergenzien oberflächenmodifiziert wurden, die PEGs mit Molekulargewichten unterhalb von 1.5 kDa beinhalten, instabil sind. Diese experimentellen Ergebnisse stehen in Einklang mit theoretischen Berechnungen von Potentialen zwischen zwei Partikeln. Wenn das PEG Molekulargewicht 10 kDa überschreitet, ist die Detergenzienpackungsdichte zu gering, was auch zur Agglomeration von Nanopartikeln führt. Deshalb muss nicht nur der Anker, sondern auch das PEG Molekulargewicht optimiert werden, um eine gute Nanopartikelstabilität erzielen zu können.

Funktionalisierung von Eisenoxidnanopartikeln

Weil solche Detergenzien mit dem Anker an die Nanopartikeloberfläche binden, werden die Endgruppen der Platzhaltermoleküle grossteils in der Nähe der Grenzfläche der Nanopartikeln mit der flüssigen Phase sein. Deshalb kann die Funktionalität der Nanopartikel durch Änderung der Endgruppe des Platzhalters beliebig angepasst werden. Unterschiedliche Methoden, Nanopartikel mit Antikörpern zu funktionalisieren, wurden miteinander verglichen.

Biotin-präsentierende Eisenoxidnanopartikel wurden mit einer Monolage von Neutravidin beschichtet. Solche Nanopartikel wurden mit zwei verschiedenen biotinylierten Antikörpern funktionalisiert. Diese Strategie war erfolgreich, wenn die Nanopartikelkonzentration tief gehalten und die Nanopartikel gleich nach der Funktionalisierung getestet wurden. Andernfalls begannen sich solche Nanopartikel über die verschiedenen Biotine, die an einem Antikörper angebunden sind, zu vernetzen. Das Vernetzen führte zu einem Verlust der Kontrolle über Grösse und Stabilität dieser Nanopartikeln.

Als Alternative wurden Antikörper über Amin-Gruppen kovalent an Acrylat-präsentierende Nanopartikel gebunden. In Analogie zu den Nanopartikeln, die via die Biotin-Avidin Bindungsstrategie funktionalisiert wurden, führte auch das kovalente Anbinden von Antikörpern an Nanopartikel wegen den zahlreichen Amin Gruppen, die ein Antikörper besitzt, zur Vernetzung der Nanopartikeln.

Hingegen konnten Acrylat-präsentierende Nanopartikel mit Fluorophoren funktionalisiert werden. Weil Fluorophore nur eine Amingruppe pro Molekül besitzten, vernetzten sich Nanopartikel während der Funktionalisierung nicht. Die resultierenden Nanopartikel

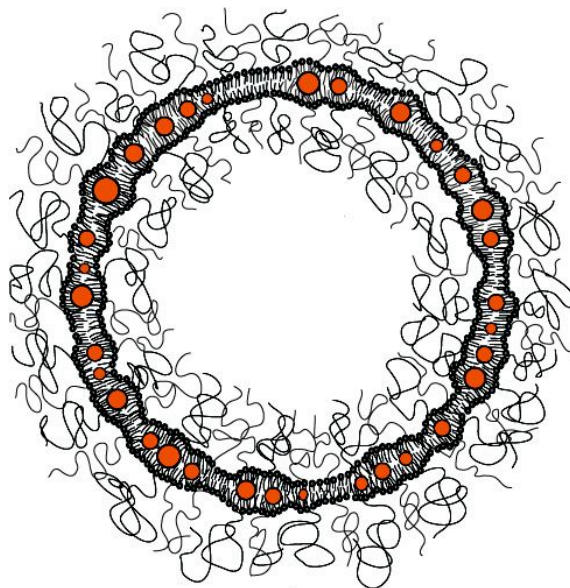


Abbildung 2: Sketch von Eisenoxidnanopartikeln eingebettet in der Membran von Liposomen. Individuell stabilisierte Eisenoxidnanopartikel ordnen sich im hydrophoben Teil der Liposommembran an. Diese Eisenoxidnanopartikel können als Aktuator für eine kontrollierte Freisetzung von Cargo genutzt werden, wenn die Liposome einem alternierenden magnetischen Wechselfeld ausgesetzt werden. Die Liposome wurden mit PEG sterisch stabilisiert damit sie nicht agglomerieren, wenn sie unterhalb ihrer Phasentransformationstemperatur (T_m) aufbewahrt werden.

konnten sowohl mit Magnetresonanz Spektroskopie als auch mit Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden.

Anordnung von Eisenoxidnanopartikeln in Überstrukturen mit temperaturabhängigen Eigenschaften

Eisenoxidnanopartikel generieren lokal Wärme, wenn sie einem alternierenden magnetischen Wechselfeld ausgesetzt sind. Wenn sie in Vesikel eingebettet sind, deren Permeabilität temperaturabhängig ist, kann die durch Eisenoxidnanopartikel lokal generierte Wärme zur Freisetzung von Cargo genutzt werden. Dabei wird Cargo effizienter freigesetzt, wenn die Eisenoxidnanopartikel direkt in der temperaturabhängigen Struktur lokalisiert sind. Eine kontrollierte und stabile Anordnung von Eisenoxidnanopartikeln in Vesikel-Membranen kann nur sichergestellt werden, wenn die Nanopartikel genügend klein sind und vorgängig mit einer irreversibel gebundenen, dünnen hydrophoben Schale bedeckt wurden. Die optimale Bindungsaffinität von Nitrocatecholen zu Fe_3O_4 Oberflächen ermöglichen es, eine Monolage von hydrophoben Detergenzien wie Palmityl-nitroDOPA irreversibel auf die Nanopartikel-Oberfläche zu binden. Es wurde gezeigt, dass sich solch

individuell stabilisierte hydrophobe Nanopartikel in den hydrophoben Teil von Liposommembranen anordnen (Abbildung 2).

Liposome, die aus 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) Lipiden bestanden und hydrophobe Eisenoxidnanopartikel in ihrer Membran hatten, wurden durch Extrusion hergestellt. Die Liposomstruktur und das Ausmass der Membrandeformation, die durch die Eisenoxidnanopartikel hervorgerufen wurde, wurden mit dynamischer Lichtstreuung und Kleinwinkel-Neutronenstreuung untersucht. Mittels Differentkalorimetrie-messungen wurde festgestellt, dass trotz grosser Deformationen der Liposommembran die Liposomphasentransformationstemperatur (T_m) durch die Präsenz der Eisenoxidnanopartikel in der Liposommembran nicht beeinflusst wurde.

DSPC wurde wegen seiner T_m von 55 °C, die deutlich über der Körpertemperatur ist, gewählt. Während Liposome in der Gelphase ($T < T_m$) undurchlässig sind, sind sie um T_m herum sehr permeabel. Deshalb konnte mittels eines alternierenden magnetisches Wechselfelds die Temperatur lokal in der DSPC Membran, wo Eisenoxidnanopartikel lokalisiert waren, durch diese Nanopartikel zu T_m erwärmt werden wo Cargo frei gesetzt wurde. Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung von Calcein effizienter war, wenn die hydrophoben Eisenoxidnanopartikel in der Membran angeordnet waren, also das für Magnetoliposome der Fall war, die hydrophile Eisenoxidnanopartikel in ihrem Lumen hatten.

Um zu untersuchen, ob Cargo wirklich mittels alternierendem magnetischen Wechselfeld freigesetzt werden kann, wurde Calcein als Modellmedikament in das Liposomlumen geladen. Ein Vergleich zwischen palmityl-nitroDOPA und ölsäure stabilisierten Eisenoxidnanopartikeln hat gezeigt, dass eine dünne, irreversibel gebundene hydrophobe Detergenzienschale, die die Eisenoxidnanopartikel einzeln und auch bei erhöhten Temperaturen stabilisiert, der Schlüssel zur verbesserten Effizienz der Freisetzung von Cargo aus solchen Liposomen ist. Das ist darauf zurückzuführen, dass Nanopartikel, die in der Membran eingebettet sind, die lokal generierte Wärme direkt an die Membran abgeben, ohne das Wasser aufwärmen zu müssen.

Dynamische Lichtstremessungen, die an Liposomen gemessen wurde, bevor und nachdem sie einem alternierenden magnetischen Wechselfeld ausgesetzt waren, zeigten, dass Liposome auch nach der Exposition zum magnetischen Wechselfeld noch intakt sind. Weil nach dem Abschalten des alternierenden magnetischen Feldes kein Cargo mehr freigesetzt wurde, konnte Cargo schrittweise freigesetzt werden, indem Liposome, die Eisenoxidnanopartikel in ihrer Membran haben, mehrmals für kurze Zeit einem alternierenden magnetischen Wechselfeldpuls ausgesetzt wurden. Solche Kapseln erlauben deshalb eine zeitlich und mengenmässig kontrollierte Abgabe von Cargo, ohne dass die Wassertem-

peratur T_m erreicht. Das macht diese Kapselsysteme für biomedizinische und chemische Anwendungen attraktiv.

Der Einfluss einer kontrollierten Oberflächenmodifikation von Eisenoxidnanopartikeln auf deren Anwendung

Die Resultate der funktionsierten, individuell stabilisierten, hydrophilen Nanopartikel und der hydrophoben Nanopartikel, die in Liposomenbranen eingebettet waren, haben zeigt, dass leistungsstarke, spezialisierte Anwendungen von Eisenoxidnanopartikeln nur realisiert werden können, wenn die Nanopartikel mit einer dünnen, irreversibel gebundenen Detergenzienschale umgeben sind. Des Weiteren illustrieren diese Beispiele die Wichtigkeit des Ankers für die Oberflächenmodifizierung von Eisenoxidnanopartikeln. Es ist nur möglich, die Nanopartikel an die spezifischen Anwendungen anzupassen, wenn die Chemie und Funktionalität an der Nanopartikeloberfläche genau kontrolliert werden können. Wie in dieser Doktorarbeit gezeigt, eröffnen geeignete Anker, die Platzhaltermoleküle und funktionelle Gruppen irreversibel an die Eisenoxidnanopartikeloberfläche binden können die Möglichkeit, neue, früher nicht umsetzbare Anwendungen von hydrophilen und hydrophoben Eisenoxidnanopartikeln realisieren zu können.