

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. November 2012 (22.11.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/156094 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 9/51* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/002136
- (22) Internationales Anmeldedatum:
18. Mai 2012 (18.05.2012)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2011 101 952.2 18. Mai 2011 (18.05.2011) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FREIE UNIVERSITÄT BERLIN** [DE/DE]; Kaiserswerther Strasse 16-18, 14195 Berlin (DE). **CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN** [DE/DE]; Charitéplatz 1, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HAAG, Rainer** [DE/DE]; Stanzer Zeile 82, 12209 Berlin (DE).

VONNEMANN, Jonathan [DE/DE]; Kastanienallee 73, 10435 Berlin (DE). **DERNEDDE, Jens** [DE/DE]; Niebuhrstrasse 72, 10629 Berlin (DE). **WEINHART, Marie** [DE/DE]; Warschauer Strasse 28, 10243 Berlin (DE). **GRÖGER, Dominic** [DE/DE]; Lorenzstrasse 48, 12209 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **KÖNIG · SZYNKA · TILMANN · von RENESSE**; Mönchenwerther Str. 11, 40545 Düsseldorf (DE).

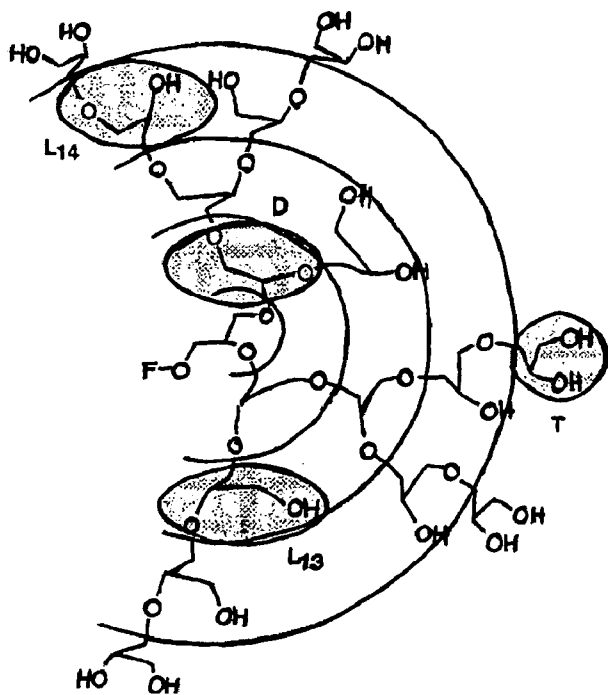
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH DENDRITIC POLYGLYCEROL SULFATE

(54) Bezeichnung : MIT DENDRITISCHEM POLYGLYCEROLSULFAT FUNKTIONALISIERTE NANOPARTIKEL

Fig. 1



(57) Abstract: The invention relates to nanoparticles, characterized by a) a core consisting of an inorganic material and b) a shell consisting of a linker and dendritic polyglycerol sulfate, wherein the polyglycerol sulfate consists of repeated glycerol units of formula $(RO-CH_2)_2CH-OR$, where $R = H$ or other glycerol units, and one or more OH groups of the glycerol units are replaced by sulfate groups of formula $-OSO_3X$, where X is equal to H, by an alkali metal atom, such as Li, Na or K, or by an ammonium ion, and wherein the linker links the polyglycerol sulfate and the core to each other. The nanoparticles are suitable for medical uses, for example, for the diagnosis and treatment of inflammatory diseases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel, gekennzeichnet durch a) einen Kern aus einem anorganischen Material und b) eine Hülle aus Linker und dendritischem Polyglycerolsulfat, wobei das Polyglycerolsulfat aus sich wiederholenden Glycerin-Einheiten der Formel $(RO-CH_2)_2CH-OR$ besteht, wobei $R = H$, oder weitere Glycerin-Einheiten sind, eine oder von mehrere OH-Gruppen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2012/156094 A1



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

MIT DENDRITISCHEM POLYGLYCEROLSULFAT FUNKTIONALISIERTE NANOPARTIKEL

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel mit dendritischen Polyglycerolsulfaten, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendungen, insbesondere im medizinischen Bereich. Dabei sind die dendritischen Polyglycerolsulfate und die anorganischen Nanopartikel über Linker miteinander verbunden.

10

Eine Entzündung ist eine charakteristische Antwort von menschlichem oder tierischem Gewebe auf einen schädigenden Reiz oder der Invasion von Pathogenen, bei der Leukozyten aufgrund ihrer antimikrobiellen, sekretorischen und Phagozytose-Aktivitäten eine Schlüsselrolle spielen. Bei allen Formen der Entzündungsreaktion wird die Rekrutierung von Leukozyten an das Gefäßendothel und das nachfolgende Auswandern in das umliegende entzündete Gewebe beobachtet.

15

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Die akute Entzündungsreaktion ist somit das erste Alarmsignal des Körpers, das auf die Eindämmung und schließlich Eliminierung proinflammatorischer Reize ausgerichtet ist.

5 Neben dieser gewünschten, schützenden Eigenschaft der Entzündungsreaktion zur Eliminierung von Antigenen in unserem Körper kann eine Fehlfunktion der Immunantwort jedoch zu schweren sekundären Gewebeschäden führen, wenn der proinflammatorische Reiz persistiert. Dies beobachtet man bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise Rheuma, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, chronische
10 Gewebeabstoßung bei Transplantaten, Asthma, Arthrose, Berylliose oder Schuppenflechte.

Der erste Schritt der Leukozyten Auswanderung besteht in der Aktivierung der vaskulären Endothelzellen durch Signale (Cytokine) die vom Ort der Entzündung im
15 Gewebe stammen. Aktivierte Endothelzellen ihrerseits sezernieren weitere Signalmoleküle (Chemokine), die Leukozyten aktivieren. Weiterhin führt die Aktivierung der Endothelzellen zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf der vaskulären Oberfläche. Es werden so komplementäre Zelladhäsionsmoleküle auf Leukozyten und Endothelzellen präsentiert, die einander binden und so die
20 Adhäsionskaskade einleiten an deren Ende das Auswandern der Leukozyten steht.

Dieser komplexe Prozess der Rekrutierung der Leukozyten an das Endothel am Entzündungsort wird eingeleitet durch schwache Wechselwirkungen von Selektin-Ligandkomplexen, die zur Reduktion der Fließgeschwindigkeit der Zellen führt und das
25 anschließende Anhaften der Leukozyten an der Blutgefäßwand ermöglicht.

Selektine sind transmembranäre, homologe Glykoproteine, die entsprechend ihres zellulären Vorkommens in L-, E- und P- Selektin eingeteilt sind. E-Selektin wird auf Endothelzellen präsentiert, P-Selektin wird sowohl von Endothelzellen als auch auf
30 Plättchen (Thrombozyten) exprimiert und L-Selektin von den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) gebildet.

Der initiale Kontakt von Leukozyten mit den Endothelzellen erfolgt durch Wechselwirkung von L-Selektin Kohlehydrat-Liganden der Endothelzellen. Eine
35 wichtige Rolle als Bindungspartner stellt dabei das auf Protein und Lipiden präsentierte Tetrasaccharid Sialyl LewisX (sLeX) dar, welches als Standardligand für Struktur-Wirkungs-Beziehungen zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften sowie für die Suche nach Selektininhibitoren herangezogen wird.

Da Selektin-Ligand Wechselwirkungen die Leukozyten Auswanderung einleiten, stellt ihre Addressierung/Blockade eine Möglichkeit zur Lokalisierung und therapeutischer Intervention von Entzündungen dar.

5 Verschiedene Selektininhibitoren sind aus dem Stand der Technik bekannt, allerdings ist bislang kein Therapeutikum auf dem Markt.

10 So sind in DE 102006036326 A1 dendritische Polyglycerolsulfate und -sulfonate offenbart, die eine hohe Affinität zu L- und P-Selektin haben. Die IC_{50} -Werte liegen dieser Verbindungen zwischen 10 und 40 nM.

15 Aus EP 2123269 A1 sind funktionalisierte Nanopartikel mit einer Größe von 15-50 nm bekannt. Die Partikel bestehen aus einem Goldkern und einer Hülle aus langkettigen linearen Alkylgruppen mit sulfatierten Aminoalkoholen als funktionelle Gruppe. Die Partikel eignen sich als Inhibitoren der Selektin-Ligand Wechselwirkungen und zeigen IC_{50} -Werte im pikomolaren Bereich.

20 Aufgabe der Erfindung ist es daher, verbesserte Substanzen zur Verfügung zu stellen, welche sich besonders zur Lokalisierung und zur Behandlung von Entzündungen eignen, untoxisch sind und sich einfach und günstig herstellen lassen.

25 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Nanopartikel mit einem anorganischen Kern und einer Hülle aus Linker und dendritischen Polyglycerolsulfaten (dPGS) gemäß den Merkmalen der Ansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß umfassen die Nanopartikel

- 30 a) einen Kern aus einem anorganischen Material und
b) eine Hülle aus Linker und dendritischem Polyglycerolsulfat,
wobei das Polyglycerolsulfat aus sich wiederholenden Glycerin-Einheiten der Formel $(RO-CH_2)_2CH-OR$ besteht, wobei $R = H$, oder weitere Glycerin-Einheiten sind, eine oder von mehrere OH-Gruppen der Glycerin-Einheiten durch Sulfatgruppen der Formel $-OSO_3X$, worin X gleich H , ein Alkalimetallatom wie Li , Na oder K , oder ein Ammoniumion wie Triethylammonium oder Diisopropylethylammonium ist, ersetzt sind,
35 und wobei der Linker Polyglycerolsulfat und Kern miteinander verbindet.

40 Die PGS-Hülle um den Kern ist dendritisch (baumartig) verzweigt. Da Glycerin über 3 OH-Gruppen verfügt, lassen sich daraus bei der Polymerisierung zu Polyglycerol - anders als z.B. bei Propandiol - mehr oder weniger stark vernetzte, dreidimensionale Strukturen (dendritische Polymere) erzeugen. Wie stark das dPGS dabei verzweigt ist, lässt sich durch den Verzweigungsgrad (DB) angeben. Der Verzweigungsgrad ist im

Rahmen dieser Erfindung definiert nach Frey (Wilms D., Wurm F., Nieberle J., Böhm P., Kemmer-Jonas U., Frey H., *Macromolecules*, 2009, 42, 3230-3236) durch die folgende Gleichung (1):

$$DB = \frac{2D}{2D + L}$$

D und L in Gleichung (1) definieren dabei die Anzahl der linearen (L), bzw. dendritischen (D) Glycerineinheiten pro Nanopartikel. L entspricht der Anzahl der Glycerineinheiten (Glycerinmoleküle) pro Nanopartikel, die jeweils mit 2 weiteren Glycerineinheiten verbunden sind. D stellt entsprechend die Anzahl der Glycerineinheiten pro Nanopartikel dar, die jeweils mit 3 weiteren Glycerineinheiten verbunden sind. Der theoretische maximale nach dieser Formel beläuft sich auf 100%, in diesem Fall von maximal verzweigten Polyglycerolen spricht man von sog. Polyglycerol-Dendrimeren.

Zur Veranschaulichung des Verzweigungsgrades ist in **Fig. 1** der Ausschnitt eines dPGS-Moleküls exemplarisch dargestellt. T steht für terminale (T) Glycerineinheiten, das heißt, Glycerineinheiten, die mit nur einem Glycerinmolekül verbunden sind. Die terminalen Glycerineinheiten bilden das Ende der jeweiligen Polyglycerolkette und befinden sich somit auf der Oberfläche der Nanopartikel.

In Abhängigkeit der Polymerisationsbedingungen lässt sich der Verzweigungsgrad des Polyglycerols beliebig einstellen. Erfindungsgemäß beträgt der Verzweigungsgrad 1-100 %. Vorzugsweise beträgt der Verzweigungsgrad von 30-80% und besonders bevorzugt von 55-65%.

Erfindungsgemäß ist das dPGS vorzugsweise nicht perfekt, d.h. es weist einen Verzweigungsgrad von weniger als 100% auf (sog. dendritische Polymere). Dendritische Polymere haben gegenüber Dendrimeren (maximal verzweigt) mehrere Vorteile. Bei Dendrimeren nimmt die sterische Hinderung mit zunehmendem Verzweigungsgrad zu, so dass dem Wachstum der Hülle theoretisch Grenzen gesetzt sind und die Partikel einen bestimmten Durchmesser nicht überschreiten können. Bei dendritischen Polymeren ist das nicht der Fall. Außerdem haben dendritische Polymere den Vorteil, dass sie nicht nur an deren Oberfläche, sondern auch im Innern über freie funktionelle Gruppen verfügen. Diese kann man beispielsweise nutzen um andere Moleküle, wie z.B. medizinisch wirksame Substanzen oder andere Markermoleküle zu koppeln. Des Weiteren haben dendritische Polymere eine größere Beweglichkeit (Flexibilität) als Dendrimeren.

Erfindungsgemäß beträgt die Schichtdicke der Hülle aus dPGS und Linker ca. 1-20 nm, vorzugsweise von 2-10 nm.

Das durchschnittliche Molekulargewicht der dPGS beträgt etwa 100 bis 1.000.000 g/mol, bevorzugt 2.500 – 200.000 g/mol und besonders bevorzugt von 5.000 – 15.000 g/mol.

Die dPGS weisen Sulfatgruppen $-\text{OSO}_3\text{X}$ auf; worin X gleich H, ein Alkalimetallatom wie Li, Na oder K, oder ein Ammoniumion wie Triethylammonium oder Diisopropylethylammonium ist. Die Sulfatgruppen können mit Hilfe geeigneter Sulfatierungsreagenzien in die als Ausgangsverbindung eingesetzten dendritischen Polyglycerole eingeführt werden (Turk H, Haag R, Alban S (2004) „Dendritic Polyglycerol sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system“, Bioconjugate Chem 15:162–167.). Die dendritischen Polyglycerole sind z.B. herstellbar durch eine einstufige anionische Polymerisation (z.B. eine sog. anionic multibranching ringopening polymerization, Haag R, Mecking S, Türk H. DE 10211664A1; 2002). Als Sulfatierungsreagenz wird bevorzugt ein Komplex aus SO_3 mit Basen, wie Pyridin oder Triethylamin verwendet. Über das Verhältnis von SO_3 zu den OH-Gruppen des dendritischen Polyglycerols kann der resultierende Sulfatierungsgrad eingestellt werden.

Der Sulfatierungsgrad beträgt 1-100%, bevorzugt 50-99%, und besonders bevorzugt 80-99%, ganz besonders bevorzugt 84-99%. Der Begriff „Sulfatierungsgrad“ drückt im Rahmen dieser Erfindung den Prozentsatz der $-\text{OH}$ -Gruppen der Glycerineinheiten des dPG (dendritisches Polyglycerol) aus, die im dPGS sulfatiert sind. Ist z.B. die Hälfte der $-\text{OH}$ Gruppen der Glycerineinheiten sulfatiert, so beträgt der Sulfatierungsgrad 50%.

Der Kern besteht aus einem nanoskaligen anorganischen Material. Grundsätzlich eignen sich alle Metalle und anorganischen Metallverbindungen, die inert und biokompatibel, und wasserunlöslich sind. Wegen ihrer hohen Biokompatibilität sind Gold und Eisenoxid besonders bevorzugt und eignen sich daher besonders für die Verwendung im therapeutischen oder diagnostischen Bereich. Ganz besonders bevorzugt sind Gold Nanopartikel. Typischerweise hat der Kern der erfindungsgemäßen Nanopartikel einen Durchmesser von 5-45 nm vorzugsweise von 10-30 nm.

Als Linker eignen sich C_1 - C_{20} -Kohlenwasserstoffreste, z.B. verzweigte oder lineare C_1 - C_{20} -Alkylketten, optional unterbrochen mit $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{O})-\text{N}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{S})-\text{N}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{S})-\text{O}-$, oder -triazol-, welche alpha-terminal 1, 2 oder 3 Thio-Gruppen oder Phosphonat-Gruppen aufweisen und omega-terminal

eine oder mehrere, vorzugsweise eine reaktive Gruppe, ausgewählt aus der Gruppe – (C=O)-OH, C-(C=O)-R, mit R = N-Hydroxysuccinimid, Cl, -N=C=S, -N₃, oder -alkin.

Die Linker können über die terminalen Thio-Gruppen oder Phosphonatgruppen kovalent oder koordinativ an den Kern gebunden sein. Im Falle von Gold Nanopartikeln sind alpha-terminale Thio-Gruppen bevorzugt. Die Bindung der Thio-Gruppen zum Gold Nanopartikel findet vorzugsweise über eine „weiche Base, weiche Säure“ Bindung statt, die Bindungsenergie beträgt dabei im Allgemeinen 126-146 kJ/mol, was vergleichbar ist zu schwachen kovalenten Bindungen (150-500 kJ/mol). Im Falle von Eisenoxid Nanopartikeln sind alpha-terminale Phosphonat-Gruppen bevorzugt. Dabei erfolgt die Bindung der Phosphonat-Gruppe zum Eisenoxid Nanopartikel bevorzugt über eine koordinative Bindung.

Wegen der hohen Affinität von Schwefel zu vielen Metallen bilden Thio-Gruppen eine bevorzugte Funktion, über die sich die dPGS mit dem Kern verknüpfen lassen. Bevorzugt werden dabei die Linkermoleküle über Thio-Gruppen wie Thiol-Gruppen oder schwefelhaltige Heterocyclen an die Oberfläche der anorganischen Kerne gekoppelt. Beispiele für schwefelhaltige Heterocyclen sind schwefelhaltige Fünfringe wie Dithiolane.

Bevorzugte Linker sind C₁-C₂₀-Kohlenwasserstoffketten wie C₁-C₂₀-Alkylketten, z.B. Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Octyl oder Decyl. Diese können z.B. über eines oder mehrere, insb. 1, 2 oder 3 Schwefelatome mit dem Kern und über eine Carboxylgruppe mit dem dPGS verbunden sein.

Besonders bevorzugte Linker sind Disulfide, insbesondere cyclische Disulfide wie Dithiolane. Diese weisen eine Adsorptionsenergie auf, die mit der von kovalenten Bindungen vergleichbar ist. Dies ist beispielhaft im **Schema 1** für Liponsäure als Linker dargestellt.

Ein geeigneter Linker ist zum Beispiel Liponsäure. Überraschend wurde gefunden, dass Liponsäure dPGS mit einem M_w im Bereich von 10.000 g/mol bis 15.000 g/mol an Gold Nanopartikel mit hoher Stabilität koppelt.

Das Linkermolekül ist über eine kovalente Bindung mit dem dPGS verbunden. Die Bindung des Linkers mit dem dPGS erfolgt über eine funktionelle Gruppe des Linkers, die mit einer freien NH₂- oder OH-Gruppe des dPGS verknüpft wird, z.B. über eine Esterbindung oder eine Peptidbindung. Bei der Verknüpfungsreaktion handelt es sich typischerweise um eine Kondensationsreaktion, bei der der Linker über eine funktionelle Gruppe, z.B. eine freie Carboxyl-Gruppe, mit dem dPGS verknüpft wird. Bei Liponsäure erfolgt die Bindung an dPGS beispielsweise über die Carboxylgruppe.

Der Linker bildet im Allgemeinen eine innere Schicht um den anorganischen Kern, um die herum sich eine äußere Schicht aus dPGS befindet.

Typischerweise hat der Linker eine Länge von 0,5-10 nm, vorzugsweise von 1-5 nm.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nanopartikel einen Kern aus Gold, eine dPGS-Hülle mit einem durchschnittlichem Molekulargewicht M_w von 500–100.000 g/mol und einem Verzweigungsgrad von 30-80% und einem Thio-Linker aus einer C_1 - C_8 -Alkyl-Gruppe, mit einer oder mehreren alpha-terminalen Disulfidgruppen und einer omega-terminalen Gruppe $-C-(C=O)-OH$, $-C-(C=O)-Cl$ oder $-C-(C=O)-N$ -Hydroxysuccinimid.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nanopartikel einen Kern aus Gold, eine dPGS-Hülle mit einem durchschnittlichem Molekulargewicht von 5.000–15.000 g/mol und einen Verzweigungsgrad von 55-65% und einem Liponsäure-Linker gekoppelt an das dPGS über eine Amid-Bindung.

15

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können gleiche oder voneinander verschiedene dPGS und Linker aufweisen. Bevorzugt wird ein Linkertyp und ein dPGS-Typ eingesetzt.

20

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die erfindungsgemäßen Nanopartikel eine sehr hohe Affinität zu Selektinen wie L-Selektin aufweisen. Die hohe Affinität der erfindungsgemäßen Nanopartikel zu Selektinen macht diese zu hervorragend geeigneten Substanzen für den Einsatz im Medizin- oder Diagnostikbereich, vor allem bei entzündlichen Erkrankungen.

25

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können mit geeigneten medizinischen Wirkstoffen zu Konjugaten verbunden werden. Diese Konjugate aus den erfindungsgemäßen Nanopartikeln mit Wirkstoffen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Damit können beispielsweise Substanzen sehr selektiv in entzündetes Gewebe transportiert werden.

30

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Nanopartikel liegt darin, dass keine weiteren zielführenden Moleküle wie z.B. Antikörper, Antikörperfragmente, Proteine, Peptide oder Oligonucleotiden für den Transport der Partikel an den Wirkungsort eingesetzt werden müssen, da das dPGS selbst zielführend wirkt. Dies verringert den synthetischen Aufwand und die damit verbundenen Kosten und erhöht die Robustheit des Systems.

35

40

Weiterhin benötigen die erfindungsgemäßen Nanopartikel bei diagnostischen Anwendungen nicht notwendigerweise signalgebenden Moleküle, da die anorganischen Kernmaterialien wie Gold oder Eisenoxid selbst als Signalgeber wirken können, beispielsweise in MSOT (Multispektrale Optoakustische Tomographie) Messungen oder im MRT.

Als Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzung mit akzeptablen Träger können die Nanopartikel z.B. in Form Tabletten, Kapseln, Pulver, Suspensionen, und Infusionen angewendet werden. Die Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen können des Weiteren Träger und/oder Hilfsstoffe enthalten. Geeignete Träger und Hilfsstoffe beinhalten Bindemittel, Suspensionsmittel, Gleitmittel, Farbstoffe, Geschmacksstoffe und Konservierungsmittel.

Für eine therapeutische Behandlung mit den erfindungsgemäßen Nanopartikeln kommen z.B. alle entzündlichen Prozesse in Frage, sowohl akuter wie chronischer Art. Erfindungsgegenstand ist daher auch die Verwendung als Prophylaktika oder Therapeutika für Entzündungserkrankungen. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Substanzen eingesetzt bei Erkrankungen bei denen die Extravasation von Leukozyten ins Gewebe eine Rolle spielt und zu Gewebsschädigungen führt.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel eignen sich vor allem zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, insbesondere von rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Morbus Crohn, ulzerative Colitis, Allograft-Abstoßung, Asthma, Beryliose oder von Autoimmunerkrankungen oder Gewebeabstoßung.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können auch zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen eingesetzt werden, bei denen die Selektin-vermittelte Leukozytenadhäsion dysreguliert ist.

Bei chronisch entzündlichen Prozessen kommt es nach Gewebeerstörung zur Entstehung von Fibrosen. Dabei spielen die beiden Cytokine IFN und TNF α eine wichtige Rolle. IFN γ wird von einer bestimmten Population von Leukozyten abgesondert und führt zur Aktivierung von Makrophagen, die ihrerseits hydrolytische Enzyme und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies produzieren, was zur Zerstörung von umliegendem Gewebe führt. Außerdem wird TNF α freigesetzt, was zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf benachbarten Endothelien führt, wodurch vermehrt Leukozyten rekrutiert werden.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel binden Selektine wie L- und P-Selektin mit besonders hoher Affinität und blockieren so die Interaktion mit ihren Liganden. Der

Leukozyten/Endothel-Kontakt wird reduziert und damit das vermehrte Auswandern der Leukozyten in die Entzündungsherde unterdrückt.

Die Nanopartikel können daher auch als selektive Selektin-Inhibitoren eingesetzt werden. Mit den erfindungsgemäßen Nanopartikeln konnten überraschenderweise IC_{50} -Werte von bis zu 180 fM beobachtet werden, welche bis um den Faktor 100 niedriger sind als die IC_{50} -Werte für aus dem Stand der Technik bekannte Substanzen (z.B. EP 2123269 A1). Die erfindungsgemäßen Nanopartikel eignen sich somit besonders vorteilhaft zur Inhibition der Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können auch als Diagnostika verwendet werden, z.B. als Kontrastmittel zum Einsatz in bildgebenden Verfahren wie MRT und MSOT. Bevorzugt ist der Einsatz als Diagnostika bei Entzündungskrankheiten, z.B. als Selektinindikatoren zur Diagnose, Lokalisierung und Visualisierung der Selektine verwendet werden, insbesondere in vitro in entzündetem Gewebe, in Organen, in Gewebeschnitten aber insbesondere auch in vivo. Durch den anorganischen Kern der erfindungsgemäßen Nanopartikel eignen sich diese direkt als Kontrastmittel, z.B. Gold-Nanopartikel in der Multispektralen Optoakustischen Tomographie (MSOT) und Eisenoxid-Nanopartikel in der MRT (Magnetresonanz Tomographie).

Falls erforderlich oder erwünscht, können die erfindungsgemäßen Nanopartikel auch mit weiteren signalgebenden Molekülen beladen oder an signalgebende Moleküle gebunden werden.

Bevorzugte signalgebende Moleküle sind beispielsweise radioaktive Isotope wie Iod-124, Iod-125 oder Fluor-18. Daneben können auch Farbstoffe, insbesondere Fluorophore wie z.B. Aminomethylcoumarin, Fluorescein, Cyanin, Rhodamin und deren Derivate verwendet werden. Bei den signalgebenden Molekülen kann es sich jedoch auch um einen Fluoreszenzdonor oder -reporter und einen Fluoreszenzakzeptor oder -quencher handeln, die insbesondere als Paar aus jeweils einem Fluoreszenzdonor/-reporter und einem Fluoreszenzakzeptor/-quencher verwendet werden können.

Beispiele solcher Konjugate mit signalgebenden Molekülen sind:

- 1) Gold-Nanopartikel-dPGS, kovalent konjugiert mit Cyaninfarbstoff,
- 2) Gold-Nanopartikel-dPGS, kovalent konjugiert mit Rhodaminfarbstoff,
- 3) Gold-Nanopartikel-dPGS, kovalent konjugiert mit Chelatoren für Radionuklide wie z.B. 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), diethylenetriamin-pentaessigsäure (DTPA) oder Mercaptoacetyltriglycin (MAG₃).

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel sind auch in der Lage, Chemokine spezifisch zu binden. Dabei handelt es sich z.B. um proinflammatorische Cytokine, insbesondere

TNF α , IL-1, IL-6, sowie IL-8 und MIP-1 β . Bei einer inhibitorischen Bindung der Chemokine, wie INF oder TNF α , durch die erfindungsgemäßen dPGS-Nanopartikel wird eine Interaktion mit Rezeptoren der Chemokine verhindert, so das Gewebeschädigung und Leukozytenextravasation verhindert werden.

5

Aufgrund ihrer spezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen wie Selektinen, Chemokinen und Gerinnungsfaktoren, insbesondere mit L- und P-Selektin können die erfindungsgemäßen Nanopartikel bevorzugt auch in in vitro Applikationen angewendet werden. Hierzu werden die erfindungsgemäßen Nanopartikel – analog zur kommerziell erhältlichen Heparinsepharose – an eine Matrix immobilisiert. Bevorzugte Matrices, bzw. Oberflächen zur Immobilisierung sind anorganische sowie polymere natürliche synthetische Materialien, beispielsweise Glas, Silica, Dextran, Agarose, Sepharose oder synthetische hydrophile Polymere.

10

15

Die immobilisierten erfindungsgemäßen Nanopartikel können zur Fraktionierung von biologischen Proben wie Körperflüssigkeiten, Plasma, Blut, Serum, Zellsuspensionen und Überständen von Zellkulturen, oder zur Reinigung spezifischer Proteine wie z.B. L-Selektin, P-Selektin, Chemokine, Gerinnungsfaktoren eingesetzt werden.

20

Schließlich können die erfindungsgemäßen Nanopartikel auch als Fänger, z.B. im ELISA, verwendet werden.

25

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel weisen damit viele Vorteile auf: Sie sind sehr gut biokompatibel, einfach herzustellen, und haben eine sehr hohe Affinität zu L- und P-Selektin.

HERSTELLUNG

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Nanopartikel wird in den folgenden Schemata und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

5

Dabei werden In den dargestellten Reaktionsschemata folgende Abkürzungen verwendet:

AuNP = Gold Nanopartikel

AuNR = Gold Nanostäbchen

10

DCC = Dicyclohexylcarbodiimid

MsCl = Methansulfonylchlorid

NHS = N-Hydroxysuccinimid

DIPEA = Diisopropylethylamin

Pyr = Pyridin

15

TA = Liponsäure

mPEG-SH 1000=Methoxy-terminiertes Polyethylenglycol-Thiol mit einem Molekulargewicht von 1000 g/mol

CTAB= Cetyltrimethylammoniumbromid

MSOT= Multispectral Optoacoustic Tomography

20

OD= Optische Dichte

Die Figuren zeigen:

25

Fig. 1: Aufbau von dendritischem Polyglycerol. Terminale (T), lineare (L) und dendritische (D) Wiederholungseinheiten sind grau unterlegt.

Fig. 2 (Schema 1): Liponsäure als Linker.

30

Fig. 3 (Schema 2): Reaktionsschema zur Herstellung eines aktivierten Linkermoleküls am Beispiel von Liponsäure (NHS-Aktivierung von Liponsäure) nach der Synthese von Liu *et al.* (Liu, W. Journal of the American Chemical Society. 2008, 1274-1284).

35

Fig. 4 (Schema 3): Reaktionsschema zur Herstellung eines Amin-funktionalisierten dendritischen Polyglycerols (Roller, S.; Zhou, H.; Haag, R. *molecular diversity*. 2005, 9, 305-316). Das dPG Ausgangsmaterial wurde durch eine einstufige „anionic multibranching ringopening polymerization“ synthetisiert (Haag R, Mecking S, Türk H. DE 10211664A1, 2002); Kontrollierte Amin-Funktionalisierung von dPG.

40

Fig. 5 (Schema 4): Reaktionsschema zur Sulfatierung der OH-Gruppen des dendritischen Polyglycerols (Turk H, Haag R, Alban S (2004) Dendritic Polyglycerol

sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system. Bioconjugate Chem 15:162–167.); Sulfatierung von teilaminiertem dPG.

5 **Fig. 6 (Schema 5):** Reaktionsschema zur Kopplung eines Linkers wie eines Liponsäure-Linkers an dPGS; Funktionalisierung von dPGS mit einem Liponsäure-Linker.

10 **Fig. 7 (Schema 6):** Ligandenaustausch von Citrat-stabilisierten Gold Nanopartikeln mit dPGS in wässriger Lösung. Die Anzahl von Citrat bzw. dPGS pro Gold Nanopartikel ist hierbei nur schematisch dargestellt (Ligandenaustausch an citrat-stabilisierten Gold Nanopartikeln mit TA-dPGS in wässriger Lösung).

15 **Fig. 8 (Schema 7):** zeigt die mPEG-SH 1000 Funktionalisierung von CTAB-Funktionalisierten Gold Nanostäbchen. Die Goldnanostäbchen sind hierbei nur schematisch dargestellt; Ligandenaustausch auf Goldnanostäbchen von CTAB Doppelschicht zu mPEG-SH 1000 Schicht.

20 **Fig. 9 (Schema 8):** zeigt die TA-dPGS 10.000 g/mol Funktionalisierung von mPEG-SH 1000 Funktionalisierten Gold Nanostäbchen. Die Goldnanostäbchen sind hierbei nur schematisch dargestellt; Ligandenaustausch auf Goldnanostäbchen von mPEG-SH 1000 Schicht zu TA-dPGS 10.000 g/mol Schicht.

25 **Fig. 10 (Abb. 1):** SPR-Sensorgramm von dPGS-TA funktionalisierten Gold Nanopartikeln.

Fig. 11 (Abb. 2): SPR-Sensorgramm von AuNR-TA-dPGS 10.000 g/mol.

30 Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können hergestellt werden, indem zunächst das dPGS mit einem Linker verknüpft wird und das Reaktionsprodukt anschließend mit dem Kernmaterial aus anorganischen Nanopartikeln umgesetzt wird.

35 Der Linker, z.B. Liponsäure, kann aktiviert werden, z.B. indem es mit *N*-Hydroxysuccinimid in Dichlormethan und Tetrahydrofuran zum Liponsäure-Succinimid umgesetzt wird (siehe Fig. 3, Schema 2).

40 Das als Ausgangsstoff verwendete dPG kann z.B. erhalten werden durch eine einstufige anionische mehrfachverzweigende ringöffnende Polymerisation“ (Haag R, Mecking S, Türk H., DE 10211664A1, 2002). Dieses kann vor der Umsetzung mit dem Linker funktionalisiert werden, z.B. mit Amingruppen (Fig. 4, Schema 3).

Das dPG kann mit Sulfatierungsmitteln wie $\text{SO}_3/\text{Pyridin}$ zu dPGS umgesetzt werden (Fig. 5, Schema 4).

5 Die Verknüpfung des aminfunktionalisierten, dendritischen dPGS mit dem Linker erfolgt z.B. über eine Succinimid-Kupplung in Dichlormethan mit *N,N*-diisopropylethylamin als Base (siehe Fig.6 (Schema 5)).

10 Die anorganischen Nanopartikel, die sich als Kern zur Herstellung der erfindungsgemäßen dPGS-Nanopartikel eignen, können z.B. durch ein von X. Lou und C. Wang, C (*Biomacromolecules*, 2007, 8, 1385-1390) beschriebenes Verfahren hergestellt werden, z.B. durch Reduktion von HAuCl_4 mit Natriumcitrat in wässriger Lösung bei Temperaturen um 100 °C.

15 Die anorganischen Nanopartikel stäbchenförmiger Art, die sich als Kern zur Herstellung der erfindungsgemäßen dPGS-Nanopartikel eignen, können z.B. durch eine von Jana Nikhil entwickelte Vorschrift synthetisiert werden (N., Small, 2005, 8, 875-882). Die CTAB-Funktionalisierten Gold Nanostäbchen können dann z.B. wie in der Vorschrift von Xiaoge Hu and Xiaohu Gao (X. Hu, X. Gao, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, 10028-10035) mit mPEG-SH 1000 funktionalisiert werden.

20 Zum Schluss erfolgt die Kupplung der dPGS mit Hilfe des Linkers an die Kernpartikel. Dazu kann z.B. die von Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi H. (*Journal of Materials Chemistry*. 2008, 18, 4949-4958) beschriebene Methode angewendet werden, in welcher die Citrathülle der anorganischen Nanopartikel im wässrigen System gegen das mit einem Linker wie Liponsäure funktionalisierte dPGS über Nacht bei Raumtemperatur ausgetauscht wird. Eine Aufreinigung erfolgt anschließend über Dialyse in Wasser (Fig. 7, Schema 6).

30 Bei den Goldnanostäbchen erfolgt die Kupplung des TA-dPGS 10.000 g/mol an mPEG-SH 1000 g/mol z.B. bei 60 °C über 12 Stunden unter Rühren in Wasser. Anschließend erfolgt die Aufreinigung z.B. über Waschen durch Zentrifugation.

35 Die Synthese von Konjugaten aus TA-dPGS 10.000 g/mol oder 5.000 g/mol funktionalisierten Gold Nanopartikeln oder Gold Nanostäbchen mit Wirkstoffen oder anderen signalgebenden Molekülen oder Chelatoren für signalgebende radioaktive Metalle kann über zwei Wege erfolgen.

40 In dem ersten Ansatz können die Wirkstoffe oder signalgebenden Moleküle mit einem Linker mit einer oder mehreren alpha-terminalen Disulfidgruppen wie z.B. Liponsäure verknüpft werden, z.B. über eine Esterbindung, Peptidbindung oder Triazoleinheit. Wirkstoffe können z.B. auch über säure-labile Bindungen wie z.B. Acetalbindungen,

Esterbindungen oder auch Hydrazonbindungen verknüpft werden. Anschließend können die mit Linker versehenden signalgebenden Moleküle oder Wirkstoffe bei dem Inkubieren von Gold Nanopartikeln oder Gold Nanostäbchen mit dem TA-dPGS 10.000 g/mol oder TA-dPGS 5.000 g/mol statistisch mit untergemischt werden. Somit wird eine statistische Verteilung von Wirkstoffen, signalgebenden Molekülen und TA-dPGS auf der Oberfläche erreicht.

Alternativ können die Wirkstoffe oder signalgebenden Moleküle kovalent and das TA-dPGS gebunden werden. Hierbei wird ein dPG mit mehreren Azidgruppen funktionalisiert wie in Schema 3 (Fig. 4) beschrieben. Anschließend wird nur ein Teil dieser Azidgruppen zu Amingruppen reduziert. Die Linkereinheit wie z.B. Liponsäure wird an die Amingruppe wie in Schema 5 (Fig. 6) beschrieben gekoppelt. Anschließend können die noch vorhandenen Azidgruppen für z.B. eine Azid-Alkin Huisgen Cycloaddition benutzt werden (Huisgen, R., Proc. Chem. Soc., 1961, 357-396) um das signalgebende Molekül oder den Wirkstoff mit dem TA-dPGS zu verbinden. Alternativ können auch mehrere Azidgruppen reduziert werden und die Linker Einheit und der Wirkstoff oder das signalgebende Molekül statistisch an das dPGS wie in Schema 5 (Fig. 6) über eine Amidkupplung verbunden werden.

Das mit dem Wirkstoff oder signalgebende Molekül verbundene TA-dPGS kann dann für die Funktionalisierung der Gold Nanopartikel oder Gold Nanostäbchen verwendet werden.

Verwendung

Aufgrund ihres anorganischen Kerns eignen sich die erfindungsgemäßen TA-dPGS funktionalisierten Nanopartikel oder Nanostäbchen hervorragend für die Verwendung als Kontrastmittel für die Diagnostik von Entzündungskrankheiten wie z.B. durch MSOT (Multispectral Optoacoustic Tomography). Genauere Informationen zu MSOT-Messungen sind z.B. in dem Review von Vasilis Ntziachristos enthalten. (Ntziachristos, V.; Razansky, D. chemical reviews 2010, 110, 2783-2794). Für die Untersuchung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen TA-dPGS funktionalisierten Nanopartikel oder Nanostäbchen als Kontrastmittel für z.B. MSOT-Messungen kann z.B. ein LPS-induziertes Arthritis Modell benutzt werden (Chen, W; Mahmood, U; Weissleder, R; Tung, C, Arthritis Res Ther. 2005, 310–317). Hierbei wird einer Maus Lipopolysaccharide (LPS) intra-artikular injiziert. Anschließend wird der Maus z.B. die AuNR-TA-dPGS 10.000 g/mol Suspension (z.B. 100 µL, 100 OD) intravaskulär injiziert. Eine anschließende MSOT-Untersuchung zeigt einen erhöhten Kontrast bei den Arthritis-induzierten Gelenken aufgrund der starken Anlagerung der TA-dPGS funktionalisierten Nanopartikel oder Nanostäbchen an das L-Selektin des entzündetem

Endothel. Eine Markierung der erfindungsgemäßen TA-dPGS funktionalisierten Nanopartikel oder Nanostäbchen mit signalgebenden Molekülen wie z.B. Cyaninfarbstoffe, Rhodaminfarbstoffe, oder Chelatoren für Radionuklide ermöglicht die Verwendung von weiteren Diagnostikmethoden wie z.B. Fluoreszenztomographie, PET (Positronen Emmisions Tomographie) oder SPECT (Einzelphotononen Emmisionscomputertomographie) über analoge Messungen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen TA-dPGS funktionalisierten Nanopartikel oder Nanostäbchen als entzündungshemmendes Mittel kann z.B. durch ein Allergisches Kontaktdermatitis-Modell aufgezeigt werden. Hierbei wird wie in (Dernedde J., Rausch A., Weinhart M., Enders S. Tauber R., Licha K., Schirner M. Zügel U. Von Bonin A. Haag R., Proc. Nat. Aca. Sci. USA 2010, 107, 19679-19684) beschrieben einer Maus durch die Injektion in das Ohr von dem Allergen Trimellitic Anhydrid (TMA) eine akute allergische Kontaktdermatitis induziert. Anschließend wird dosisabhängig die Ohrdicke bei gleichen Zeitabständen nach der Zugabe des entzündungshemmenden Mittels gemessen. Anhand der verringerten Ohrdicke im Vergleich zu der Kontrolle ohne Zugabe von entzündungshemmendem Mittel kann die Effizienz der Entzündungshemmung bestimmt werden.

AUSFÜHRUNGSBEISPIELE

Die Erfindung wird anhand der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Sphärische Nanopartikel mit einem Goldkern (AuNP) und einer Hülle aus dendritischen PGS mit Molekulargewichten von 5.300 g/mol, bzw. 10.000 g/mol und einem Sulfatierungsgrad von 85% wurden unter Verwendung von Liponsäure (TA) als Linker wie folgt hergestellt:

Methoden:

¹H-NMR und ¹³C-NMR wurden an einem Bruker™ ECX Spektrometer bei 400 MHz aufgenommen. Die Chemische Verschiebung wird als δ (ppm) angegeben und wurde auf das Lösemittelsignal bezogen. Multiplizitäten werden als s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) und m (multiplet) angegeben. Die dazugehörigen Kopplungskonstanten J werden in Hertz (Hz) angegeben. Die Analyse der Daten wurde mit MestReNova™ version 6.0.2 vorgenommen.

UV/Vis Absorptionsspektren wurden an einem UV/Vis Spektrophotometer von Scinco™ Co., LTD aufgenommen. Die Analyse der Daten wurde an der dazugehörigen LabProPlus™ Software vorgenommen.

DLS und Zeta-Potential Messungen wurden an einem Zetasizer Nano ZS analyzer™ aufgenommen mit einem integriertem 4 mW He-Ne laser, $\lambda = 633$ nm (Malvern Instruments™ Ltd, U.K.). DLS Messungen wurden entweder in Reinstwasser oder 10 mM Phosphatpuffer bei pH=7.4 aufgenommen. Alle Zeta Potential Messungen wurden

5

TEM Transmissions Elektronenmikroskopie wurde an einem CM-12 von FEI™ mit einer Beschleunigungsspannung von 100 kV aufgenommen. Die Daten wurden mit JImage v1.43 analysiert.

10

Die kompetitiven Oberflächenplasmonenresonanzmessungen für die Bestimmung der Selektin-Bindung wurden an einem Biacore™ X Gerät durchgeführt.

Beispiel 1: Herstellung von TA-dPGS 10.000 g/mol:

Die Funktionalisierung von dPGS mit einem Molekulargewicht von 10.000 g/mol mit Liponsäure-NHS war wie folgt. dPGS 10.000 g/mol (500 mg, 0.05 mmol) wurden in einer Mischung aus Dimethylformamid (15 mL) und destilliertem Wasser (13 mL) gelöst. Anschließend wurden Liponsäure-NHS (15.15 mg, 0.05 mmol) und DIPEA (0.017 mL, 0.1 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt wurde zunächst gegen Methanol, dann Natriumchlorid-Lösung und anschließend destilliertem Wasser dialysiert. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt als farbloses Pulver erhalten (491 mg, 95%).

15

20

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) 4.64-3.00 (m, 331 H, PG-backbone, S-S-CH₂-, S-S-CH₂-, S-S-CH-), 2.38 (m, 1 H, S-CH₂-CH₂-), 2.19 (m, 2 H, CH₂CO-), 1.9 (m, 1 H, S-CH₂-CH₂-), 1.52 – 1.52 (m, 10 H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂CO-, -CH₂- initiator), 0.78 (m, 3 H, CH₃- initiator). ¹³C-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) 80-65 (PG-backbone).

25

Beispiel 2: Herstellung von citrat-stabilisierten Gold Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 17 nm:

30

Die Herstellung von citrat-stabilisierten Gold Nanopartikeln mit einem z-average Durchmesser von 17 nm wurde nach einer leicht modifizierten Vorschrift von Lou *et al.* synthetisiert (Lou, X.; Wang, C.; He, L. biomacromolecules. 2007, 8, 1385-1390.) Die Glasgeräte sowie der Rührfisch wurde mit *aqua regia* gewaschen, mit Millipore gereinigt und anschließend bei 120 °C getrocknet. HAuCl₄·3H₂O (34.42 mg, 0.087 mmol) in Reinstwasser (340 mL) wurde unter Rückfluss für 20 Minuten erhitzt bei 110 °C. Anschließend wurde eine Trinatrium Citrat-Lösung (187 mg, 0.524 mmol) in Reinstwasser (20 mL) zu der Lösung gegeben. Nach 15 Minuten trat ein Farbwechsel von gelb zu tiefrot ein. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und durch ein Cellulosefilter (0.22 μ m) gefiltert. Die erhaltene Goldkolloidsuspension wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert. Partikelanalyse über Dynamische Lichtstreuung in Reinstwasser

35

40

ergaben einen z-average Durchmesser von 17.17 nm bei einem Polydispersitätsindex von 0.06. Der Feret Durchmesser bestimmt durch die automatische Auszählung von Elektronenmikroskopie Aufnahmen bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV mithilfe des Programs JImage ergab einen Wert von 18 nm \pm 2.8 nm und bestätigte den Durchmesser der Partikel. UV-Vis Messung der Partikel ergab ein Plasmonen Absorptionmaximum bei 520 nanometern. Die Konzentration der Goldnanopartikel wurde anschließend anhand der Annahme eines 100 prozentigen Goldsäure Umsatzes und der Geometrischen Faktoren der Nanopartikel berechnet. Die erhaltene Konzentration von 1.39 nanomolar stimmte sehr gut mit der Mie Theorie wie in (Haiss, W.; Thanh, N.; Aveyard, J.; Fernig, D, anal. Chem. 2007, 79, 4215-4221.) beschrieben überein.

Beispiel 3: Herstellung von AuNP-TA-dPGS mit 5.300 g/mol:

Für den Ligandenaustausch wurde eine Suspension von 17 nm citrat-stabilisierten Gold Nanopartikeln (20 mL, 1.39E-9 mol/l, 2.79E-11 mol mit TA-dPGS 5.3 kDa (4.3 mg) (synthetisiert nach Schema 5 (Fig. 6)) über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert und anschließend über Dialyse gegen H₂O aufgereinigt. Die Menge des eingesetzten TA-dPGS entsprach 2 Äquivalenten TA-dPGS pro Goldoberflächenatom auf dem Partikel. Da 15 nm Partikel nach Mei *et al.* (Mei, B. C.; Oh, E.; Susumu, K.; Farrell, D.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. langmuir. 2009, 25, 10604-10611.) ungefähr 10000 Gold Atome auf der Oberfläche haben, entspricht dies bei 17 nm Partikeln ungefähr 14000 Gold Atomen auf der Oberfläche. Aus diesem Grund wurden 28000 Äquivalente TA-dPGS pro Gold Nanopartikel eingesetzt, wodurch eine vollständige Besetzung der Partikel gegeben war. Nach der Inkubation über Nacht und Aufreinigung durch Dialyse gegen Wasser konnte über Dynamische Lichtstreuung in Reinstwasser ein z-average Durchmesser von 22.68 nm bei einem Polydispersitätsindex von 0.18 gemessen werden. Ein Rotverschiebung des Plasmonen Absorptionsmaximums von 520 nanometern zu 523 nanometern bestätigte die Funktionalisierung.

Beispiel 4: Herstellung von AuNP-TA-dPGS mit 10.000 g/mol:

Die Herstellung erfolgt analog der Synthese in Beispiel 3, nur wurden hier 7.81 mg von TA-dPGS 10.000 g/mol eingesetzt, um 28000 Äquivalente dPGS 10.000 g/mol pro Gold Nanopartikel zu erreichen. Nach der Inkubation über Nacht und Aufreinigung durch Dialyse gegen Wasser konnte über Dynamische Lichtstreuung in Reinstwasser ein z-average Durchmesser von 22.90 nm bei einem Polydispersitätsindex von 0.18 gemessen werden.

Beispiel 5: Synthese von AuNR mit einer Länge von 40 nm und einem Durchmesser von 10 nm:

Stäbchenförmige Nanopartikel mit einem Goldkern (AuNR) und einer Hülle aus dendritischen PGS mit Molekulargewichten von 5.300 g/mol, bzw. 10.000 g/mol und einem Sulfatierungsgrad von 85% wurden unter Verwendung von Liponsäure (TA) als Linker wie folgt hergestellt:

Die Synthese erfolgte angelehnt an die Vorschrift von Jana Nikhil (N., small, 2005, 8, 875-882). Alle Glasgeräte wurden zunächst gründlich mit *aqua regia* und Reinstwasser gereinigt. HAuCl₄·3H₂O (98 mg, 0.25 mmol) wurde in Reinstwasser (260 mL) gelöst. Anschließend wurden CTAB (18.2 g, 50 mmol), Silbernitrat (8.5 mg, 0.05 mmol) und Ascorbinsäure (88 mg, 0.5 mmol) zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Ein Farbwechsel von leicht gelblich, zu rötlich zu farblos trat ein. Anschließend wurde NaBH₄ (9.5 µg, 2.5E-7 mol) unter starkem Rühren zu der Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktionslösung verfärbte sich nach 15 Minuten tiefrot bis purpurfarben und der Überschuss an CTAB wurde durch zweimaliges Zentrifugieren entfernt. Die gereinigten CTAB-Funktionalisierten Gold Nanostäbchen wurden bei 4 °C im Dunkel gelagert. Zeta-Potential Messungen über Dynamische Lichtstreuung in einem 10 mM Phosphatpuffer bei einem pH von 7.4 ergaben ein Zeta Potential von +30 mV und bestätigten somit die positiv geladene CTAB Hülle. Die Proportionen der Partikel und Verteilung wurden mittels Elektronenmikroskopischer Aufnahmen bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV bestimmt und ergaben eine Länge der Partikel von 40 nm und einem Durchmesser von 10 nm. UV-Vis Spektren wurden benutzt um die optischen Eigenschaften der Partikel sowie deren Dispersion zu untersuchen und ergaben ein transversalen Plasmonenabsorptionsmaximum von 515 nm und ein longitudinalen Plasmonenabsorptionsmaximum von 788 nm.

Beispiel 6: mPEG-SH 1000 Funktionalisierung von AuNR-CTAB

Die Funktionalisierung von AuNR-CTAB mit mPEG-SH 1000 erfolgte angelehnt an die Vorschrift von von Xiaoge Hu and Xiaohu Gao (X. Hu, X. Gao, Phys. Chem. Chem. Phys., 2011, 13, 10028-10035). mPEG-SH 1000 (0.134 g, 133 µmol, 1.24E5 eq.) wurde zu einer CTAB-Funktionalisierte Gold Nanostäbchen Suspension (4 mL, 2.7E-7 mol/L, 1.08E-9 mol) gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die 1.24E5 eingesetzten Äquivalente beruhen auf einer Beobachtung von Sanda C. Boca wie in (S. Boca, Nanotechnology, 2010, 21, 235601) beschrieben. Anschließend wurden die Partikel durch zweimaliges Zentrifugieren mit Reinstwasser gewaschen. Die erfolgreiche mPEG-SH Funktionalisierung wurde mittels UV-Vis Spektroskopie anhand der Rotverschiebung von 4 nm sowie dem neutralen Zeta-Potential in 10 mM Phosphatpuffer bei pH=7.4 mittels Dynamischer Lichtstreuung bestätigt.

Beispiel 7: TA-dPGS 10.000 g/mol Funktionalisierung von AuNR-PEG

TA-dPGS 10.000 g/mol (20 mg, 2E-6 mol) wurde zu einer AuNR-mPEG-SH 1000 Suspension (0.2 mL, 7.23E-8 mol/l, 1,44E-6 mol) gegeben und für 12 Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend wurden die Partikel fünfmal durch Zentrifugieren mit Reinstwasser gewaschen. Die erfolgreiche Funktionalisierung wurde anhand des negativen Zetapotentials mittels Dynamischer Lichtstreuung in einem 10 mM Phosphatpuffer bei pH=7.4 bestätigt.

Beispiel 8: Messung der Bindungsaffinität von AuNP-TA-dPGS 10.000 g/mol und AuNP-TA-dPGS 5.300 g/mol:

Um die Bindungsaffinität der hergestellten AuNP-TA-dPGS und AuNR-TA-dPGS zu L-Selektin zu quantifizieren, wurden die IC₅₀-Werte mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR), in einem kompetitiven Bindungsassay ermittelt. Eine genaue Ausführung der Methode ist in (Enders S., Bernhard G., Zakrzewicz A., Tauber R., *Biochim Biophys Acta*, 2007, 10, 1441-1449) beschrieben.

Der IC₅₀-Wert gibt dabei diejenige Konzentration einer Substanz an, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Sie wurde wie folgt gemessen.

Zunächst wurde die Bindung von L-Selektin modifizierten Gold Nanopartikeln an einen auf der Chipoberfläche immobilisierten, synthetischen Selektin-Liganden (sLeX, 20 mol % + sulfo-Tyrosin 5 mol % gekoppelt auf linearem Polyacrylamid) als positive Kontrolle gemessen und auf 100 % Bindung normalisiert. Das Maß der Bindung wurde hierbei in *Resonance Units* (RU) gemessen. Anschließend wurden die Selektin-funktionalisierten Gold Nanopartikel mit AuNP-TA-dPGS als Kompetitor der Bindung in ansteigender Konzentration vorinkubiert und die relative Abnahme der Bindung im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Schließlich wurde der IC₅₀ Werte über die Berechnung der Konzentration von AuNP-TA-dPGS bestimmt, das zu 50% des Kontroll-Bindungssignals führt.

Aus den Ansichten des SPR-Sensorgrammes für die AuNP-TA-dPGS 10.000 g/mol und AuNP-TA-dPGS 5.300 g/mol (Fig. 10, Abb. 1 und Fig. 2, Abb. 2) können anschließend die IC₅₀-Werte berechnet werden. Die IC₅₀-Werte geben den Punkt der Kurve bei 50 Prozent relativer Bindung der Kontrolle an.

Hierbei ergaben sich für die 5.300 g/mol und die 10.000 g/mol AuNP-TA-dPGS – Partikel IC₅₀-Werte von 210 fM, bzw. von 180 fM, welche überraschend niedrig sind. Für die AuNR-TA-dPGS 10.000 g/mol ergab sich ein IC₅₀-Wert von 136 pM. Dieser Wert ist im Vergleich zu dem nanomolaren IC₅₀-Wert von dPGS sehr gering (Dernedde J., Rausch A., Weinhart M., Enders S. Tauber R., Licha K., Schirner M. Zügel U. Von

Bonin A. Haag R., Proc. Nat. Aca. Sci. USA 2010, 107, 19679-19684). Die Partikel können daher verwendet werden, um hoch affin Selektine anzusteuern und bieten somit die Grundlage der erfindungsgemäßen TA-dPGS funktionalisierten Nanopartikel oder Nanostäbchen als Kontrastmittel und als entzündungshemmendes Mittel.

"Patentansprüche:"

1. Nanopartikel, gekennzeichnet durch
a) einen Kern aus einem anorganischen Material und
5 b) eine Hülle aus Linker und dendritischem Polyglycerolsulfat,
wobei das Polyglycerolsulfat aus sich wiederholenden Glycerin-Einheiten der
Formel $(\text{RO-CH}_2)_2\text{CH-OR}$ besteht, wobei $\text{R} = \text{H}$, oder weitere Glycerin-Einheiten
sind, eine oder von mehrere OH-Gruppen der Glycerin-Einheiten durch Sulfat-
10 Gruppen der Formel $-\text{OSO}_3\text{X}$, worin X gleich H , ein Alkalimetallatom wie Li , Na oder
 K , oder ein Ammoniumion ersetzt sind,
und wobei der Linker Polyglycerolsulfat und Kern miteinander verbindet.
2. Nanopartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der
15 Sulfatierungsgrad des dendritischen Polyglycerolsulfats 1-100%, bevorzugt 50-
99%%, und besonders bevorzugt 80-99% beträgt.
3. Nanopartikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das
20 dendritische Polyglycerolsulfat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 100 bis
1.000.000 g/mol, bevorzugt 2.500 bis 20.000 g/mol und besonders bevorzugt von
5.000 bis 15.000 g/mol aufweist.
4. Nanopartikel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-3, dadurch
25 gekennzeichnet, dass der anorganische Kern aus Gold oder Eisenoxid,
vorzugsweise aus Gold besteht.
5. Nanopartikel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, dadurch
gekennzeichnet, dass der Linker einen $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ -Kohlenwasserstoffrest darstellt, der
verzweigt oder linear ist und optional unterbrochen ist mit $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-(\text{C}=\text{O})-$,
30 $\text{NH}-$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{O})-\text{N}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{S})-\text{N}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{N}-(\text{C}=\text{S})-\text{O}-$ oder $-\text{triazol}-$,
und der alpha-terminal 1, 2 oder 3 Thio-Gruppen oder Phosphonat-Gruppen
aufweist und omega-terminal eine oder mehrere reaktive Gruppen, ausgewählt aus
der Gruppe $-(\text{C}=\text{O})-\text{OH}$, $\text{C}-(\text{C}=\text{O})-\text{R}$, mit $\text{R} = \text{N-Hydroxysuccinimid}$ oder Cl , $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$,
 $-\text{N}_3$, oder $-\text{alkin}$, vorzugsweise Liponsäure.
6. Nanopartikel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch
35 gekennzeichnet, dass der Verzweigungsgrad des dendritischen Polyglycerolsulfats
1-100 %, bevorzugt 30-80% und besonders bevorzugt 55-65% beträgt.
7. Nanopartikel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch
40 gekennzeichnet, dass die Nanopartikel einen Durchmesser von 10-50 nm haben.

8. Verwendung von Nanopartikeln nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-7 als Selektininhibitor.
- 5 9. Verwendung von Nanopartikeln nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-7 als Träger für Wirkstoffsubstanzen.
- 10 10. Konjugat enthaltend Nanopartikel gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 -7 sowie einen oder mehrere Wirkstoffe oder Proteine.
- 10 11. Verwendung von Nanopartikeln nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-7 oder von Konjugaten nach Anspruch 10 als Kontrastmittel.
- 15 12. Verwendung von Nanopartikeln nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-7 oder von Konjugaten nach Anspruch 10 zur Diagnose oder zur Behandlung von Entzündungsprozessen.

Fig. 1

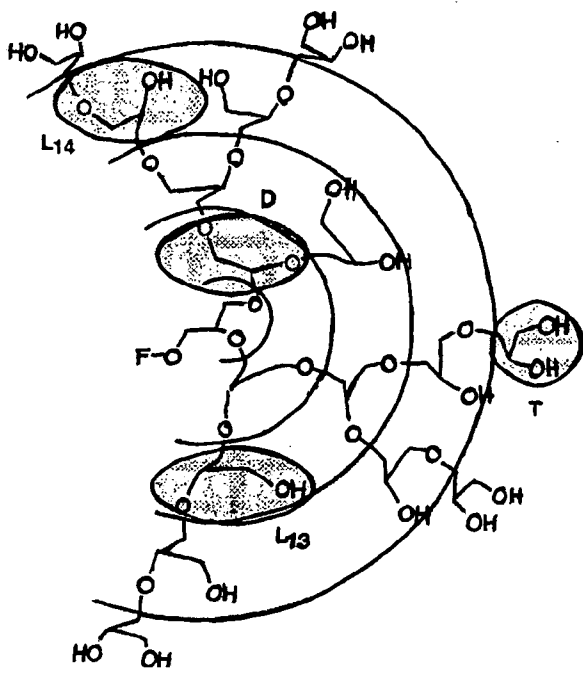


Fig. 2 (Schema 1)

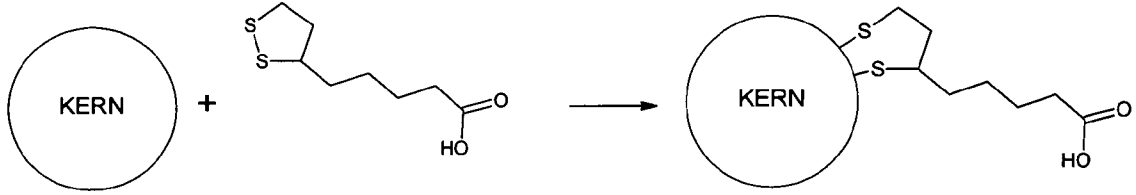


Fig. 3 (Schema 2)

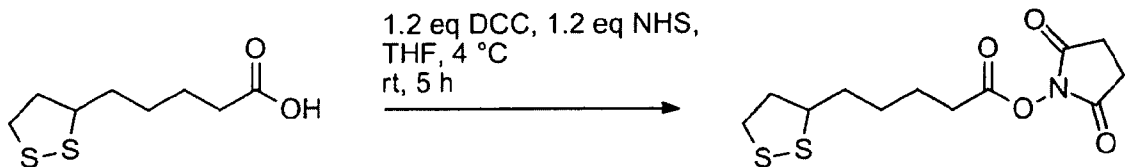


Fig. 4 (Schema 3)

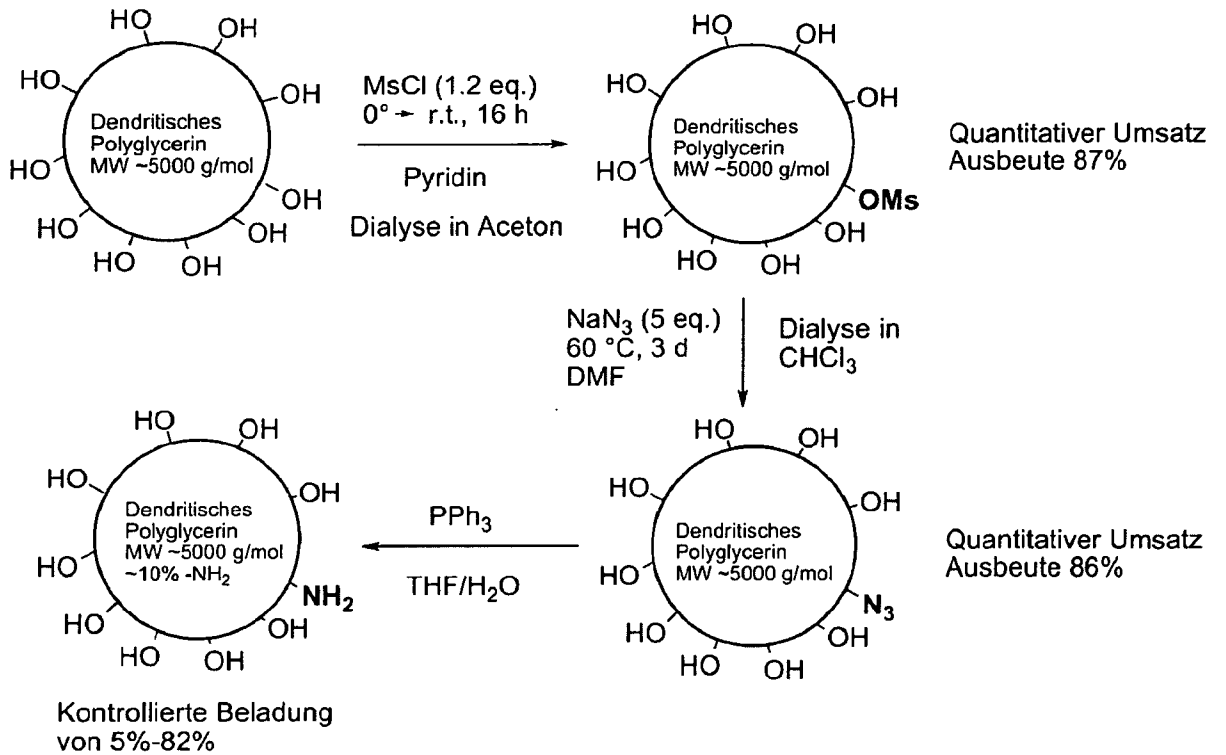


Fig. 5 (Schema 4)

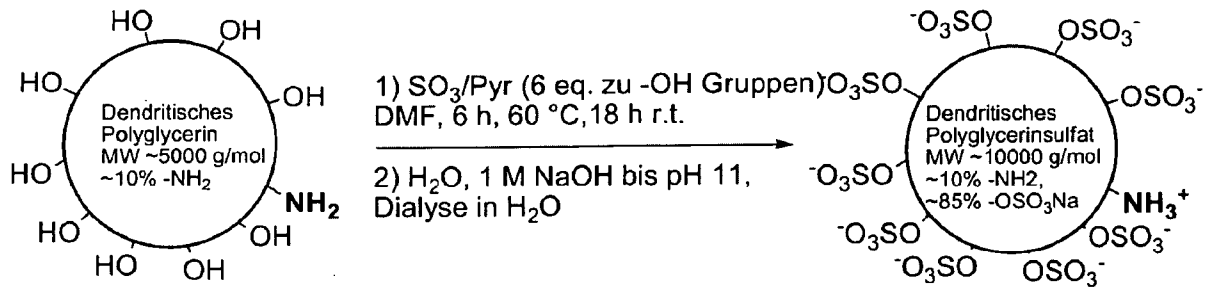


Fig. 6 (Schema 5)

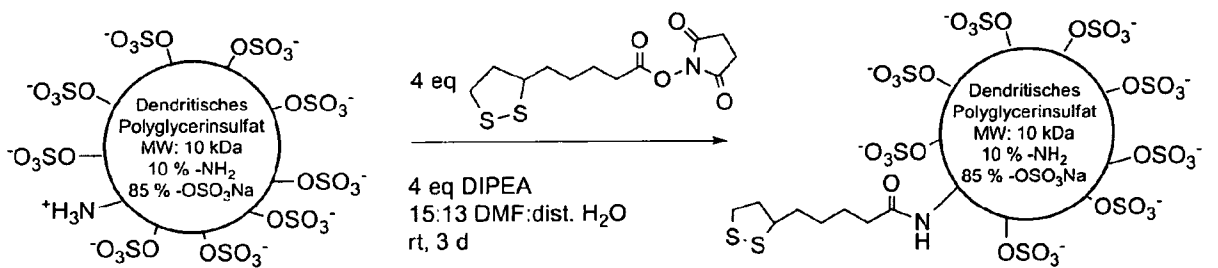
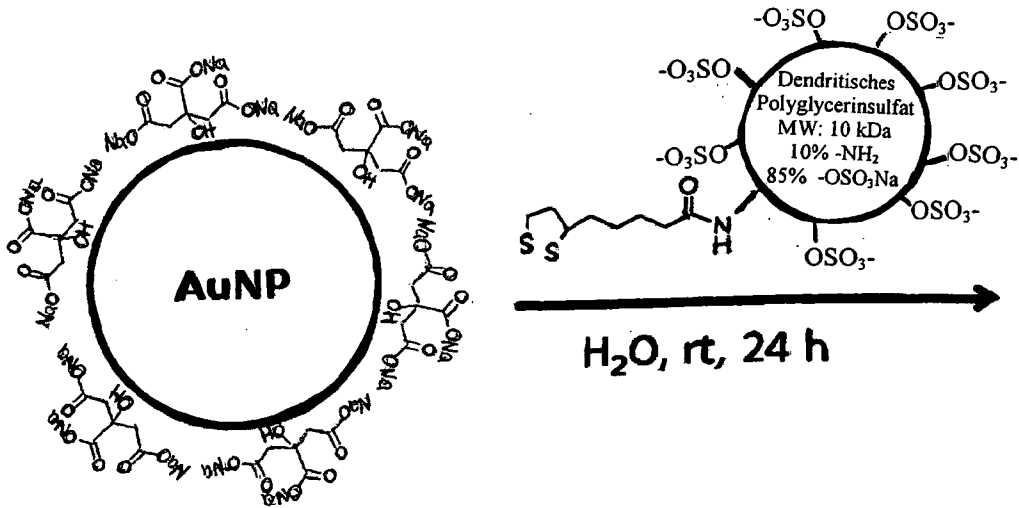
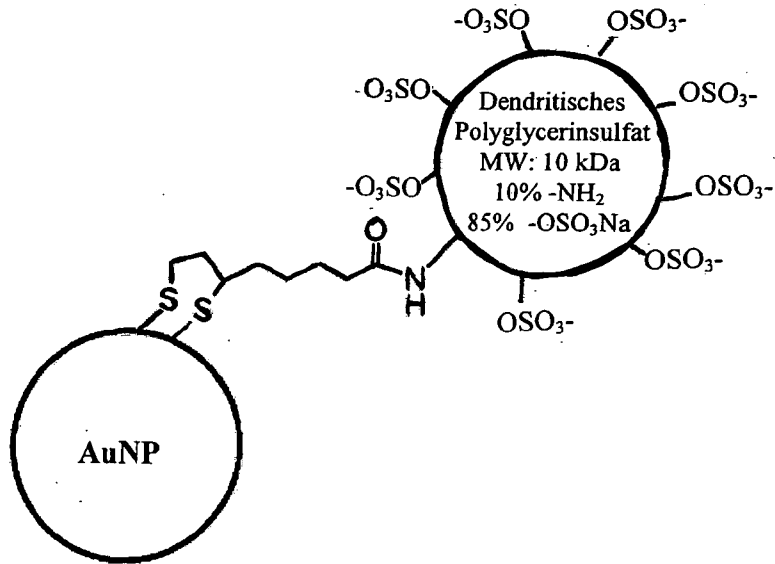


Fig. 7 (Schema 6)

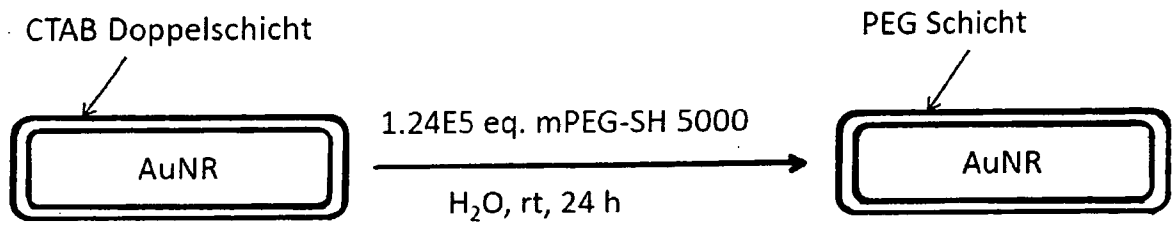


Citrat-stabilisierte Nanopartikel

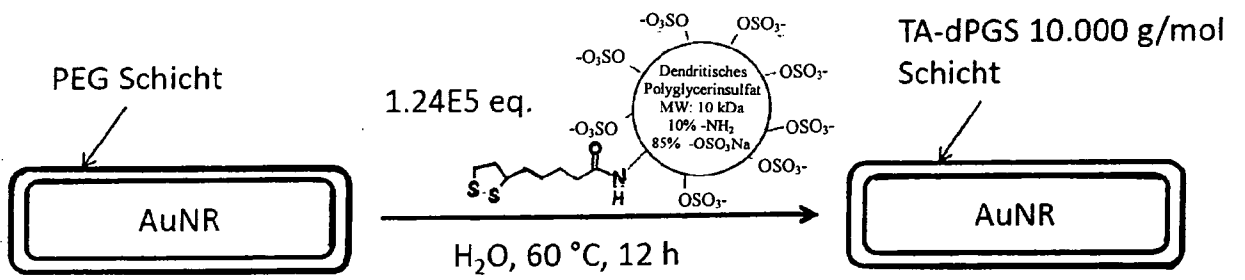


dPGS-funktionalisierte Nanopartikel

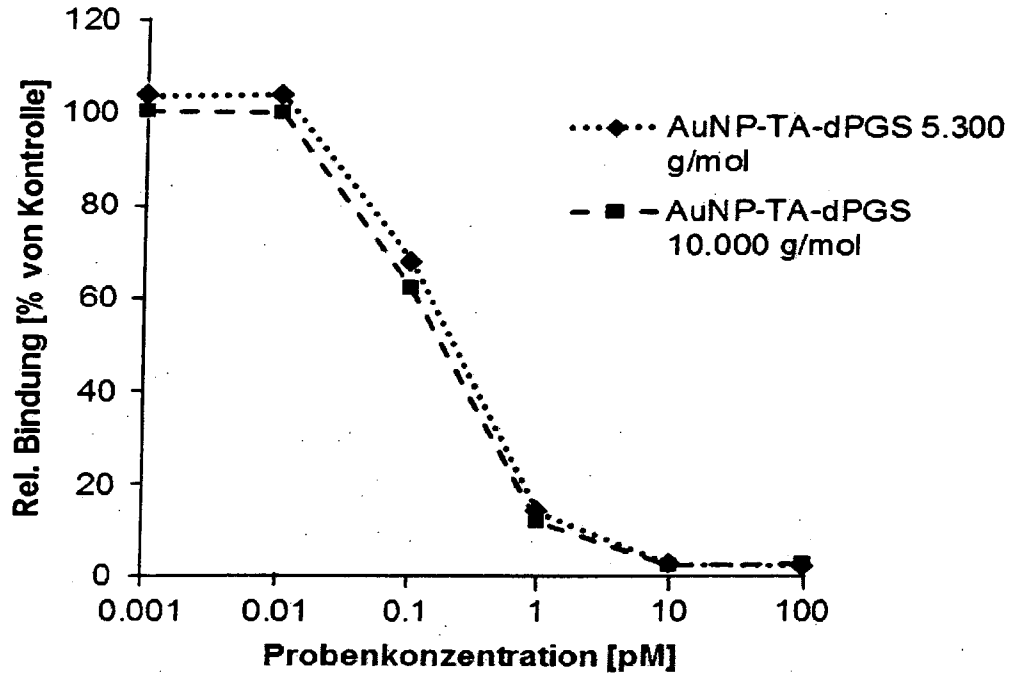
Figur 8 (Schema 7)



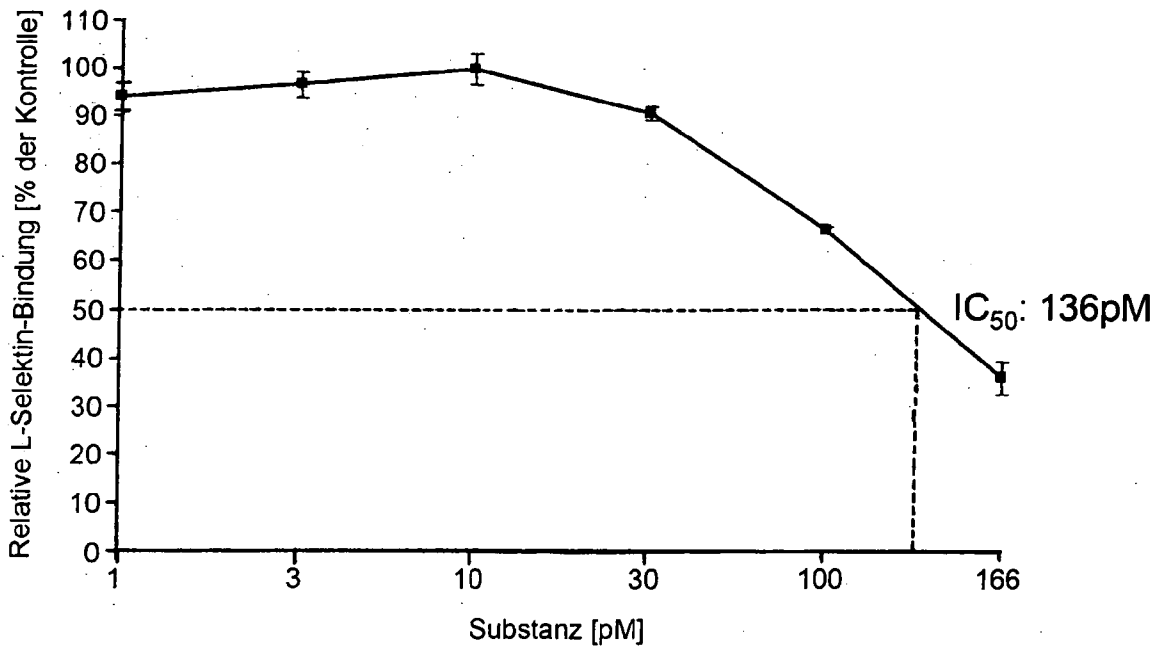
Figur 9 (Schema 8)



Figur 10 (Abbildung 1)



Figur 11 (Abbildung 2)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/002136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 A61K9/51
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 033 660 A1 (UNIV BERLIN FREIE [DE]; CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN [DE]) 11 March 2009 (2009-03-11) page 2, paragraph 0008 - paragraph 0016 page 6, paragraph 0047 page 3, paragraph 0020	1-12
Y	DE 10 2006 036326 A1 (CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN [DE]; UNIV BERLIN FREIE [DE]) 7 February 2008 (2008-02-07) cited in the application Claims	1-12
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 1 August 2012	Date of mailing of the international search report 09/08/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schüle, Stefanie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/002136

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ANDREW ZILL ET AL: "Clickable polyglycerol hyperbranched polymers and their application to gold nanoparticles and acid-labile nanocarriers", CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 47, no. 4, 1 January 2011 (2011-01-01), page 1279, XP55034348, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/c0cc04096g the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/002136

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 2033660	A1	11-03-2009	EP 2033660 A1	11-03-2009
			EP 2197494 A2	23-06-2010
			WO 2009030492 A2	12-03-2009

DE 102006036326	A1	07-02-2008	CA 2659940 A1	07-02-2008
			CN 101506272 A	12-08-2009
			CN 102585202 A	18-07-2012
			DE 102006036326 A1	07-02-2008
			EP 2046868 A2	15-04-2009
			JP 2009545545 A	24-12-2009
			WO 2008015015 A2	07-02-2008

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. A61K47/48 A61K9/51
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTER GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 A61K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, FSTA

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 2 033 660 A1 (UNIV BERLIN FREIE [DE]; CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN [DE]) 11. März 2009 (2009-03-11) Seite 2, Absatz 0008 - Absatz 0016 Seite 6, Absatz 0047 Seite 3, Absatz 0020	1-12
Y	DE 10 2006 036326 A1 (CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN [DE]; UNIV BERLIN FREIE [DE]) 7. Februar 2008 (2008-02-07) in der Anmeldung erwähnt Claims	1-12
	----- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. August 2012

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/08/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schüle, Stefanie

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ANDREW ZILL ET AL: "Clickable polyglycerol hyperbranched polymers and their application to gold nanoparticles and acid-labile nanocarriers", CHEMICAL COMMUNICATIONS, Bd. 47, Nr. 4, 1. Januar 2011 (2011-01-01) , Seite 1279, XP55034348, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/c0cc04096g das ganze Dokument -----</p>	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/002136

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
EP 2033660	A1	11-03-2009	EP 2033660 A1	11-03-2009
			EP 2197494 A2	23-06-2010
			WO 2009030492 A2	12-03-2009

DE 102006036326	A1	07-02-2008	CA 2659940 A1	07-02-2008
			CN 101506272 A	12-08-2009
			CN 102585202 A	18-07-2012
			DE 102006036326 A1	07-02-2008
			EP 2046868 A2	15-04-2009
			JP 2009545545 A	24-12-2009
			WO 2008015015 A2	07-02-2008
