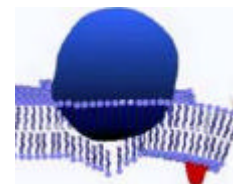
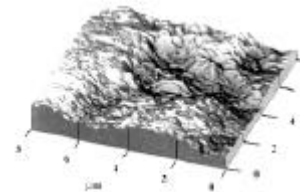
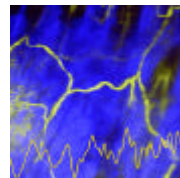




Technologie- früherkennung

Technologieanalyse

**Nanobiotechnologie II:
Anwendungen in der
Medizin und Pharmazie**



Gefördert vom



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Nanobiotechnologie II: Anwendungen in der Medizin und Pharmazie

Technologieanalyse

Volker Wagner

und

Dietmar Wechsler

Herausgeber:
Zukünftige Technologien Consulting
der VDI Technologiezentrum GmbH
Graf-Recke-Str. 84
40239 Düsseldorf

im Auftrag und mit Unterstützung des

Bundesministeriums für Bildung und Forschung

Diese Technologieanalyse entstand im Rahmen des Vorhabens "Identifikation und Bewertung von Ansätzen Zukünftiger Technologien" (Förderkennzeichen NT 2113) der Abteilung Zukünftige Technologien Consulting der VDI Technologiezentrum GmbH im Auftrag und mit Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), Referat 513.

Projektleitung: Dr. Dr. Axel Zweck
Durchführung: Dr. Volker Wagner
Dr. Dr. Dietmar Wechsler

Dank gilt einer Vielzahl von Experten, die wertvolle Beiträge und Anregungen geliefert haben. Insbesondere möchten wir den folgenden Experten für die Erstellung von Kurzstudien und die Durchsicht des Manuskriptes danken:

Dipl.-Ing. C. Bergemann, Prof. Dr. F. Bier, Dr. O. Bujok, Dr. N. Gajovich-Eichelmann, Dr. R. Günther, Prof. Dr. H. Gaub, Prof. Dr. Hörber, Dr. S. Howitz, Dr. A. Jordan, Prof. Dr. J. Kreuter, Prof. Dr. A. Lendlein, Prof. Dr. C.-M. Lehr, PD Dr. U. Massing, Dr. T. Schöffter, PD Dr.-Ing. T. Stieglitz, Dr. M. Wevers, Prof. Dr.-Ing. G. Ziegler

Zukünftige Technologien Nr. 50
Düsseldorf, im Januar 2004
ISSN 1436-5928

Für den Inhalt zeichnen die Autoren verantwortlich. Die geäußerten Auffassungen stimmen nicht unbedingt mit der Meinung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung überein.

Außerhalb der mit dem Auftraggeber vertraglich vereinbarten Nutzungsrechte sind alle Rechte vorbehalten, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen photomechanischen Wiedergabe (Photokopie, Mikrokopie) und das der Übersetzung.

Zukünftige Technologien Consulting (ZTC)
der VDI Technologiezentrum GmbH

Graf-Recke-Straße 84
40239 Düsseldorf

Die VDI Technologiezentrum GmbH ist im Auftrag und mit Unterstützung des
Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) tätig.

Titelbild:

Bild oben links: Blutkapillare im Fettgewebe einer Maus, aufgenommen mit einem Fluoreszenz-Verfahren unter Verwendung von Quantum-Dots. Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Watt W. Webb, Cornell University, durchgeführt. Copyright © by Cornell University.

Bild oben rechts: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer nanostrukturierten Keramik, deren Eignung als Implantatmaterial untersucht wird. Die Aufnahme entstammt einer Veröffentlichung von T. J. Webster in der Fachzeitschrift Biomaterials aus dem Jahr 1999.

Bild unten links: Beispiel für einen Genchip, der z. B. zur Analyse aktiver Gene in einer Gewebeprobe verwendet werden kann. Quelle: The Tech Museum of Innovation, San Jose, California.

Bild unten rechts: Schematische Darstellung eines Nanopartikels, das eine Zellmembran durchdringt und so als Fähre für Wirkstoffe dienen kann. Quelle: Internetseite des Nanobionet e. V.

Vorwort

Im Rahmen der Technologiefrüherkennung für das BMBF sucht die Zukünftige Technologies Consulting der VDI Technologiezentrum GmbH nach neuen Technologieansätzen, die in besonderem Maße zukunftssträftig sind und zugleich eine Vielfalt von gesellschaftlich relevanten Kriterien erfüllen, wie zum Beispiel einen Beitrag zur Nachhaltigkeit oder zur Wettbewerbsfähigkeit Deutschlands zu leisten. Eines der schon früh aufgegriffenen Themen war die Nanotechnologie. Zum damaligen Zeitpunkt war es nicht leicht, die Besonderheiten der Nanotechnologie zu vermitteln, da sich selbst bei Naturwissenschaftlern der Gedanke hielt, ‚nano‘ sei die zwangsläufige Fortsetzung von ‚mikro‘. Heute hat sich endlich die Einsicht durchgesetzt, dass die Nanotechnologie, nicht nur die Möglichkeit bietet, Quanteneffekte gezielt zu nutzen, sondern dass es sich bei ihr um ein interdisziplinäres Feld handelt, in dem physikalische Gesetzmäßigkeiten, biologische Funktionen und chemische Eigenschaften konvergieren. Durch diese Konvergenz der Disziplinen wird die Entwicklung ganz neuer Produkte möglich.

In der Folge befassten wir uns im Rahmen der Technologiefrüherkennung mit Teilgebieten der Nanotechnologie. Neben physikalischen Themen griffen wir das Thema Nanobiotechnologie auf. Die Wichtigkeit der Nanobiotechnologie ergibt sich aus ihren Beiträgen zur Aufklärung biologischer Vorgänge auf der Nanoskala. Das Feld präsentiert sich dabei in zweifacher Perspektive: Zum einen erlaubt die Nanobiotechnologie die Nutzung von Biomolekülen für die Herstellung neuer Produkte und zum anderen liefert sie die Werkzeuge, um biologische Prozesse auf molekularer Ebene zu verstehen und zu manipulieren. Eine erste Technologieanalyse aus dem Jahr 2002 widmete sich der ersteren, technischen Perspektive und beschreibt die Nutzung biomolekularer Systeme für nanotechnologische Anwendungen. Die vorliegende Technologieanalyse befasst sich mit der zweiten Perspektive und fokussiert auf Anwendungen der Nanobiotechnologie in der Medizin und Pharmazie.

Die Herausforderungen an die Auseinandersetzung mit diesem Thema im Rahmen der Früherkennung sind die bekannten und spiegeln eine ähnliche Situation wider, wie zum Zeitpunkt des Aufgreifens der Nanotechnologie: Das Technologiefeld erscheint auf den ersten Blick heterogen und unübersichtlich. Es bedarf der gliedernden Strukturierung, insbesondere, da der Anteil der Nanotechnologie zumindest zur Zeit noch in vielen künftigen Anwendungsbereichen unscharf erscheint.

Ziel der vorliegenden Technologieanalyse ist es daher, jene Bereiche der Medizin und Pharmazie herauszuarbeiten, in denen Nanotechnologie von großer Bedeutung ist. Weiter von Interesse sind natürlich Deutschlands Stand im internationalen Wettbewerb sowie wesentliche technologische und sonstige Hemmnisse in der oder für die Nanobiotechnologie. In diesem Sinne bietet die vorliegende Technologienanalyse zur Nanobiotechnologie eine Unterstützung des Ziels ‚Deutschlands Stärken in herausragenden Technologiefeldern zu stärken‘.

Dr. Dr. A. Zweck

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 METHODIK UND ZIELSETZUNG	3
2.1 Definition der Nanobiotechnologie	3
2.2 Basis der Technologieanalyse	4
2.3 Ziel der Technologieanalyse	4
2.4 Strukturierung der Technologieanalyse	5
2.5 Literaturanalyse	5
3 NANOPARTIKEL IN DER THERAPIE	7
3.1 Liposomen	8
3.2 Polymer-Nanopartikel	12
3.3 Feste Lipid-Nanopartikel	16
3.4 Wirkstoff-Nanokristalle	16
3.5 Polymertherapeutika	17
3.6 Fullerene	23
3.7 Anorganische Nanopartikel	24
3.8 Thermotheapie mit Nanopartikeln	28
3.9 Literaturanalyse	30
3.10 Zusammenfassende Bewertung	33
4 IN-VIVO-DIAGNOSTIK - NANOPARTIKEL FÜR DIE MOLEKULARE BILDGEBUNG	41
4.1 Ultraschallkontrastmittel	42
4.2 Nukleare Bildgebungsverfahren	44
4.3 Kontrastmittel für die Kernspintomographie	45
4.4 Optische Methoden	47
4.5 Zusammenfassende Bewertung	49
5 BIOCHIPS – WERKZEUGE FÜR DIE BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNG UND DIE MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK	53
5.1 DNA-Chips	54
5.2 Proteinchips	62
5.3 Labs-on-a-Chip	68
5.4 Zellchips	71
5.5 Nanotechnologie für die Weiterentwicklung von Chip-Plattformen	73
5.6 Neuartige Chipsysteme	87
5.7 Literatur und Patente	96
5.8 Zusammenfassende Bewertung	98

6 BIOPHYSIKALISCHE ANALYTIK – WERKZEUGE FÜR DIE ANALYSE UND MANIPULATION VON EINZELMOLEKÜLEN	105
6.1 Rasterkraftmikroskopie	105
6.2 Scanning Near-Field Optical Microscopy	108
6.3 Optische Pinzetten	110
6.4 Laserinduzierte Fluoreszenz	113
6.5 Zusammenfassende Bewertung	115
7 BIOAKTIVE MATERIALIEN UND OBERFLÄCHEN	117
7.1 Knochenersatzmaterialien	117
7.2 Nanostrukturierte Oberflächen für Implantate	118
7.3 Stents	124
7.4 Titandioxid-Nanopartikel für antibakterielle Oberflächen	125
7.5 Silber-Nanopartikel als Antibiotikum	126
7.6 Zusammenfassende Bewertung	127
8 TISSUE ENGINEERING	131
8.1 Die Methode	132
8.2 Problemstellungen im Tissue Engineering	135
8.3 Stand der Technik, Beispiele für Produkte	136
8.4 Marktpotenzial	137
8.5 Anwendungspotenzial der Nanobiotechnologie im Tissue Engineering	138
8.6 Zusammenfassende Bewertung	144
9 INTELLIGENTE IMPLANTATE	147
9.1 Neuroprothetik	147
9.2 Implantierbare Mikrochips für Drug-Delivery-Anwendungen	150
9.3 Zusammenfassende Bewertung	154
10 FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN, MARKTPOTENZIAL UND POLITISCHE AKZEPTANZ	157
10.1 Forschungsaktivitäten und Fördermaßnahmen	157
10.2 Literatur und Patente	159
10.3 Marktpotenzial	162
10.4 Politische Akzeptanz	163
11 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	165
LITERATURVERZEICHNIS	169
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	183

1 EINLEITUNG

Die Nanobiotechnologie als Schnittstelle zwischen Nanotechnologie und Biologie hat in den letzten Jahren durch wegweisende wissenschaftliche Arbeiten über die Funktionsweise von Motorproteinen, den Aufbau elektronischer Bauelemente mit Hilfe von DNA und den Einsatz von Nanopartikeln zur Heilung von Krankheiten auf sich aufmerksam gemacht.

Aufgrund der großen Breite an Anwendungsoptionen und Forschungsfragen, die in der Nanobiotechnologie bearbeitet werden, bietet es sich an, gemäß des Anwendungspotenzials eine Aufteilung in zwei Bereiche vorzunehmen: Im ersten Bereich werden Technologien zusammengefasst, die auf die Herstellung von Nanotechnologie-Produkten unter Nutzung von Biomolekülen abzielen, während der zweite Bereich die Anwendungen der Nanobiotechnologie in den Life Sciences umfasst. Innerhalb der Life Sciences konzentriert sich die überwiegende Anzahl der nanobiotechnologischen Arbeiten wiederum auf medizinische und pharmazeutische Anwendungen.

Einer der Gründe für den enormen Bedeutungszuwachs der Nanobiotechnologie in der Medizin und Pharmazie ist die fortwährende Weiterentwicklung der instrumentellen Analytik, die es mittlerweile erlaubt, biologische Objekte auf der Nanoskala zu untersuchen. Da die funktionellen Einheiten der Zelle, wie DNA, Proteine, Membranen und Reaktionszentren, in dieser Größenordnung liegen, werden von der Nanobiotechnologie entscheidende Beiträge zur Aufklärung der Funktionsweise der Zelle erwartet. Die Kenntnis der Zellfunktionen auf molekularer Ebene wiederum ist eine Voraussetzung, um Krankheiten zu verstehen und neue Heilverfahren zu entwickeln.

Außerhalb der Grundlagenforschung ist es vor allem die biomedizinische Forschung, in der die Nanobiotechnologie zunehmend an Bedeutung gewinnt. So führt in der Biochiptechnologie der anhaltende Trend zur weiteren Miniaturisierung und zu empfindlicheren Nachweisverfahren zu einem verstärkten Einsatz der Nanotechnologie. In der medizinischen Therapie weisen insbesondere Nanopartikel ein großes Anwendungspotenzial auf: Sie können beispielsweise als Fähren eingesetzt werden, um Wirkstoffe direkt zum kranken Gewebe zu transportieren. Weiterhin sind es nanostrukturierte Oberflächen, denen zukünftig sowohl für die Implantattechnik als auch für das Tissue Engineering eine große Bedeutung zugeschrieben wird.

In dieser Technologieanalyse soll ein Überblick gegeben werden, in welchen Bereichen der medizinischen und pharmazeutischen Forschung Nanobiotechnologie bereits heute eine entscheidende Rolle spielt und inwieweit sie dazu beitragen kann, neue und marktfähige medizinische Produkte zu entwickeln.

2 METHODIK UND ZIELSETZUNG

2.1 Definition der Nanobiotechnologie

Die Nanobiotechnologie ist als Wissenschaftsfeld noch zu jung, als dass sich bereits eine einheitliche, allgemein anerkannte Definition durchgesetzt hätte. Wie in der Technologieanalyse „Nanobiotechnologie I: Grundlagen und Anwendungen molekularer funktionaler Biosysteme“ [Wevers und Wechsler, 2002] bereits ausgeführt, ist Nanobiotechnologie in der Regel durch die folgenden Aspekte charakterisiert:

- Nanoskaligkeit (in mindestens zwei Dimensionen, d. h., keine einfache, nm dicke Schicht) spielt für die Anwendung eine funktions-tragende Rolle,
- Biokomponenten sind Bestandteil der Anwendung,
- Potenzial zum Maßschneidern der funktionellen Einheiten oder zur Kontrolle bzw. für eine Ansteuerung auf der Nanoskala ist gegeben.

Weiterhin wird in der ersten Technologieanalyse eine Untergliederung der Nanobiotechnologie vorgeschlagen: Demnach wird der Bereich, in dem Biomoleküle für den Aufbau technischer Systeme genutzt werden, als Bio2Nano bezeichnet und der Einsatz von Nanotechnologie zur Analyse oder Manipulation von Biomolekülen als Nano2Bio. In der ersten Technologieanalyse zum Thema Nanobiotechnologie wurde der Bio2Nano-Bereich aufgearbeitet, zu dem beispielsweise der Bottom-up Aufbau elektronischer Schaltelemente unter Nutzung von DNA oder die Verwendung von Biomolekülen als Sicherheitsmerkmal gehören [Wevers und Wechsler, 2002].

Anwendungen der Nanotechnologie in der Medizin und Pharmazie sind dem Nano2Bio-Bereich zuzuordnen, da hier Nanotechnologie genutzt wird, um biologische Systeme zu analysieren, zu manipulieren oder die Biokompatibilität von Materialien zu erhöhen. So wird beispielsweise versucht, mit Hilfe von Nanopartikeln Krankheiten auf molekularer Ebene zu erkennen oder Wirkstoffe über biologische Barrieren zu transportieren. Weiterhin sind dem Nano2Bio-Bereich auch die analytischen Methoden der Nanobiotechnologie zuzuordnen, wie Rastersondentechniken und optische Methoden, die z. B. in der biomedizinischen Forschung genutzt werden, um Zellbestandteile und einzelne Biomoleküle zu untersuchen.

2.2 Basis der Technologieanalyse

Die Technologieanalyse basiert auf Literaturrecherchen, Internetrecherchen, Experteninterviews und Kongressbeobachtungen. Eingeflossen sind weiterhin Informationen aus jenen Forschungsprogrammen der führenden Industrienationen, in denen Nanobiotechnologie-Projekte gefördert werden. Einige der Kapitel enthalten zudem Auszüge aus Kurzstudien, die von Experten zu verschiedenen der hier behandelten Themen angefertigt wurden. Um für die Bewertung einzelner Forschungsbereiche ein ausgeglichenes Meinungsbild einzuholen, wurden zahlreiche Interviews mit Experten aus Wissenschaft und Industrie durchgeführt.

2.3 Ziel der Technologieanalyse

Mit der vorliegenden Technologieanalyse soll ein Überblick über die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Nanobiotechnologie im Bereich Medizin und Pharmazie gegeben werden. Neben den wissenschaftlichen Aktivitäten werden auch technische Hürden und das Marktpotenzial diskutiert. Maßgebliches Ziel der Technologieanalyse ist ein Informationstransfer in die folgenden Richtungen:

- Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und andere Stellen der Forschungsförderung sollen objektiv informiert werden, so dass ein notwendiger Forschungs- und Koordinierungsbedarf innerhalb und außerhalb des Technologiegebietes abgestimmt werden kann.
- In der Nanotechnologie, der Medizin und Pharmazie tätige Wissenschaftler sollen Informationen über angrenzende Wissenschaftsgebiete erhalten, auch mit dem Ziel, auf diese Weise interdisziplinäre Kooperationen anzustoßen.
- Industrielle Anwender sollen durch den Überblick zur Kontaktaufnahme zu potenziellen Forschungspartnern angeregt werden.
- Es wird angestrebt, der interessierten Öffentlichkeit und Entscheidungsträgern aus Politik und Wirtschaft einen unkomplizierten Einstieg in die Thematik zu ermöglichen.

Die Technologieanalyse versteht sich auch als Innovationsanalyse im Sinne der übergreifenden Zielorientierung der Forschungs- und Technologiepolitik des BMBF. Ziel ist es dabei, zur Sicherung der wirtschaftlichen und technologischen Wettbewerbsfähigkeit innovative Forschungsergebnisse und technische Entwicklungen schneller als bisher in marktfähige Produkte umzusetzen und Innovationshemmnisse abzubauen.

Ausgehend von dem recherchierten Stand der Forschung werden im Rahmen der Technologieanalyse die jeweiligen Anwendungsperspek-

tiven unter Berücksichtigung konkurrierender Verfahren diskutiert. Im Sinne einer Technikvorsorge werden zudem frühzeitig anwendungsrelevante Anforderungen und Entwicklungshemmnisse identifiziert.

2.4 Strukturierung der Technologieanalyse

Bei der Strukturierung der Technologieanalyse haben wir uns entlang von Anwendungsfeldern orientiert, wie sie auch in der Nanomedizin Taxonomie der Canadian Business Alliance vorgeschlagen wurden [Gordan und Sagman, 2003]. Abweichend davon ist der Bereich in vitro Diagnostik nicht als eigenständiges Kapitel in dieser Analyse aufgenommen worden, sondern wird als Teil des fünften Kapitels "Biochips – Werkzeuge für die biomedizinische Forschung und die medizinische Diagnostik" diskutiert. Biochips sind bezüglich ihrer Anwendungen eine Querschnittstechnologie. Sie sind sowohl von hoher Bedeutung in der Grundlagenforschung für die Genomik und Proteomik, in der biomedizinischen Forschung und zukünftig vermutlich auch in der medizinischen Diagnostik. Um die Biochiptechnologie hier zusammenhängend diskutieren zu können und Wiederholungen zu vermeiden, wurde das potenzielle Anwendungsfeld der medizinischen Diagnostik dem Kapitel Biochips untergeordnet.

Als Ergebnis des Konferenzmonitorings und der Literaturlauswertung wurden die folgenden Bereiche in der Medizin und Pharmazie identifiziert, für die ein großes Anwendungspotenzial der Nanobiotechnologie vorhergesagt wird: Drug Delivery, In-vivo-Diagnostik, Biochips, biophysikalische Analytik, biofunktionale Oberflächen, Tissue Engineering und Intelligente Implantate.

Aufgrund der schiereren Fülle an potenziellen Anwendungsmöglichkeiten der Nanobiotechnologie in der Medizin und Pharmazie mussten wir den Fokus dieser Technologieanalyse auf eine Auswahl der wichtigsten Anwendungsfelder und Trends richten. Dabei haben wir alles daran gesetzt, eine möglichst repräsentative Auswahl an Anwendungsbeispielen vorzustellen, die es dem Leser ermöglichen soll, in Kürze einen Überblick über das Innovationspotenzial der Nanobiotechnologie für den Bereich Medizin und Pharmazie zu erlangen.

2.5 Literaturlauswertung

Um einen Eindruck von den wissenschaftlichen Aktivitäten in den einzelnen Anwendungsbereichen der Nanobiotechnologie zu erhalten, wurde eine Literaturlauswertung vorgenommen, deren Ergebnisse in Abschnitt 10.2 „Literatur und Patente“ diskutiert werden. Die beiden Bereiche Drug Delivery und Biochips sind thematisch so breit gefächert und

die Anzahl der Veröffentlichungen so groß, dass hier vertiefende Literaturanalysen durchgeführt wurden, die jeweils am Ende des entsprechenden Kapitels diskutiert werden.

Grundsätzlich sollte bei der Interpretation von Publikationsdaten immer berücksichtigt werden, dass sich Publikationszahlen, die zu einem bestimmten Themengebiet in verschiedenen Datenbanken gefunden werden, um mehrere zehn Prozent unterscheiden können. Gründe hierfür sind unter anderem, dass verschiedene Fachzeitschriften-Pools ausgewertet werden und dass in manchen Datenbanken zusätzlich zu den Autoren-Keywords ein weiter gefasster Satz an Keywords verwendet wird. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bei gleichen Suchbegriffen für eine bestimmte medizinische Technologie Recherchen in verschiedenen Literaturdatenbanken zu abweichenden Trefferzahlen führen. Aufgrund dieser Unschärfe der Rechercheergebnisse sind die hier präsentierten Publikationszahlen als qualitative Indikatoren für die Aktivität in einem Wissenschaftsfeld zu verstehen.

3 NANOPARTIKEL IN DER THERAPIE

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte Paul Ehrlich in Frankfurt die Idee, Medikamente gezielt an ihren Wirkort zu transportieren. So genannte Zauberkekeln (Magic Bullets) sollten dies ermöglichen. Ende der 60er Jahre wurde diese Idee wieder aufgenommen und versucht, mit Hilfe von Nanopartikeln zu verwirklichen. Der Wirkstofftransport ist eine Teildisziplin der Arzneimittelverabreichung, für die sich die englische Bezeichnung Drug Delivery¹ eingebürgert hat.

Der Bedarf an Drug-Delivery-Systemen ist groß, da sich mit ihnen prinzipiell eine ganze Reihe von Problemen überwinden lassen, die bei der Applikation vieler Wirkstoffe auftreten:

- 1) Der Wirkstoff ist in wässrigen Medien unlöslich.
- 2) Der Wirkstoff reichert sich nicht hinreichend im Zielgewebe an, wohl aber in anderen Gewebearten und führt so zu starken Nebenwirkungen.
- 3) Viele Wirkstoffe sind chemisch labil und werden zersetzt, bevor sie das Zielgewebe erreicht haben.
- 4) Biologische Barrieren, wie z. B. Zellmembranen oder die Blut-Hirn-Schranke, können vom Wirkstoff nicht überwunden werden, so dass der Ort der Wirkung unerreichbar bleibt.

Derzeit gibt es viele Wirkstoffe, die trotz ihres hohen pharmakologischen Potenzials aufgrund dieser Probleme das Zielgewebe entweder gar nicht oder nur zu einem Bruchteil der verabreichten Menge erreichen und somit als Medikamente nicht zum Einsatz kommen können. Die „intelligenten“ Drug-Delivery-Systeme, nach denen heute geforscht wird, sollen daher den Wirkstoff während des Transports zum Zielgewebe vor dessen Zersetzung schützen, sich passiv oder aktiv im Zielgewebe anreichern (drug targeting) und die Freigabe des Wirkstoffes mit einem kontrollierten Zeit-Dosis-Profil ermöglichen (controlled release).

Ein besonderer Bedarf an diesen neuartigen Drug-Delivery-Systemen entsteht durch die Fortschritte bei der Aufklärung des menschlichen Genoms und Proteoms, so werden immer mehr Gene und Proteine, die für bestimmte Krankheiten verantwortlich sind, identifiziert. Damit ge-

¹ Arzneimittelverabreichung (engl.: drug delivery) bezeichnet allgemein das Verfahren oder die Technologie, mit der ein Therapeutikum angewendet bzw. dem Körper zugeführt wird. Zu den herkömmlichen Formen des Drug Deliverys zählen z. B. Tabletten, Salben und Zerstäuber. Auch Nanopartikel, die für den Wirkstofftransport eingesetzt werden, sind demnach Drug-Delivery-Systeme. Reichern sich die Nanopartikel aufgrund ihrer Struktur oder einer Funktionalisierung selektiv im kranken Gewebe an, so spricht man von Drug Targeting. Da die meisten Nanopartikel-Transportsysteme gerade mit dem Ziel der spezifischen Anreicherung eines Wirkstoffes im Zielgewebe entwickelt werden, wird im Zusammenhang mit Nanopartikeln oftmals generalisierend vom Drug Targeting gesprochen.

winnen DNA (Gentherapie) und Proteine als Wirkstoffe eine zunehmend größere Bedeutung. Der Transport dieser hochempfindlichen Wirkstoffe in das Zielgewebe ist nur mit geeigneten Delivery Systemen möglich, so dass die Drug-Delivery-Technologie in der Medikamentenentwicklung in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird.

Es gibt eine Vielzahl von Nanometer großen Trägersystemen, deren Eignung für Drug-Delivery-Anwendungen derzeit untersucht wird, wie z. B. Liposomen, Polymer-Nanopartikel, Feste Lipid-Nanopartikel, Dendri-mere und anorganische Nanopartikel. An dieser Stelle soll eine Auswahl von Systemen beschrieben werden, die in der Literatur und auf Konferenzen in den letzten Jahren besonders intensiv diskutiert wurden. Eine umfassende Darstellung der Drug Delivery und Drug Targeting Technologie findet der interessierte Leser in der einschlägigen Fachliteratur [z. B. Barratt, 2003; Kim und Lim, 2002; Kreuter, 1994].

Im ersten Teil des Kapitels werden Drug-Delivery-Systeme beschrieben, die aus organischen Nanopartikeln bestehen, dann folgen molekulare nanoskalige Systeme und anschließend anorganische Nanopartikel. Mit Fulleren-Therapeutika und der Magnetflüssigkeitshyperthermie werden zwei Beispiele diskutiert, in denen Nanopartikel eine wichtige Rolle im Wirkstoff- und Therapiedesign zukommt. Abschließend werden in einer Literaturanalyse die verschiedenen zum Teil konkurrierenden Drug-Delivery-Systeme hinsichtlich ausgesuchter bibliometrischer Parameter untersucht und bewertet.

3.1 Liposomen

Liposomen sind kleine Bläschen, die aus Phospholipid-Doppelschichten bestehen. Ihre Grundbausteine sind amphiphile² Phospholipidmoleküle, die sich in einer wässrigen Umgebung spontan zu Liposomen zusammenschließen. In der kugelförmigen Doppelschicht stehen die hydrophilen Enden in Kontakt mit Wasser und die hydrophoben Enden zeigen von beiden Seiten zur Schichtmitte. Man unterscheidet zwischen Liposomen, die aus nur einer Lamelle bestehen (Durchmesser ca. 20 bis 50 nm) und multilamellaren Liposomen, deren Durchmesser bis zu 10 µm betragen kann.

Seit ihrer Entdeckung Mitte der 60er Jahre werden Liposomen auf ihre Eignung als Drug-Delivery-Systeme hin untersucht. Sie weisen dabei ein besonders breites Anwendungsspektrum auf, da es mehrere Möglichkeiten gibt, Wirkstoffmoleküle zu transportieren: Hydrophile Moleküle können im wässrigen Innenraum eingeschlossen, ionische Moleküle an die Membranen adsorbiert und lipophile Moleküle in den inneren

² Amphiphile Moleküle sind Zwittermoleküle, die ein hydrophobes und ein hydrophiles Ende besitzen.

Membranbereich inkorporiert werden (Abb. 3.1). Durch die Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl und der Größe der Liposomen kann der Beladungsgrad mit Wirkstoffen variiert und die Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden. Für hydrophile Wirkstoffe stellen die Membranen eine Permeationsbarriere dar, so dass vor allem bei multilamellaren Liposomen eine verlangsamte Wirkstoffabgabe erreicht wird und sich damit ein Depoteffekt ergibt. Durch ihre natürlichen Grundbausteine (Phospholipide) besitzen Liposomen eine hohe Bioakzeptanz. Ihre Verabreichung erfolgt bevorzugt intravenös; auch eine orale Gabe ist möglich, jedoch erfordert sie eine Modifizierung der Lipidschicht, um sie vor der Zerstörung im Magen-Darm-Trakt zu schützen.



Abb. 3.1. Liposomen als Drug-Delivery-Systeme. Links: Schematische Darstellung eines Lipids mit hydrophiler Kopfgruppe und hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Mitte: Querschnitt durch ein Liposom. Rechts: Verschiedene Möglichkeiten der Einlagerung von Wirkstoffen. Hydrophile Wirkstoffe werden in die wässrige Phase des Liposoms aufgenommen, während lipophile Substanzen in die Lipid-Doppelschicht eingelagert werden können.

Quelle: Lipoxidil, <http://www.lipoxidil.com/liposomes.htm>

Frühe Hoffnungen, Liposomen als Drug-Delivery-Systeme für Krebstherapeutika einsetzen zu können, erwiesen sich jedoch zunächst als trügerisch. Es stellte sich heraus, dass Liposomen vom Immunsystem innerhalb weniger Minuten als körperfremd erkannt, opsonisiert (Anlagerung von bestimmten Proteinen) und durch die Makrophagen in Leber und Milz aus dem Blutstrom eliminiert werden. In den späten 80er Jahren konnte jedoch eine Lösung für dieses Problem gefunden werden. So gelang es, die Liposomenoberfläche mit sperrigen und wasserlöslichen Liganden zu versehen, wie z. B. Polyethylenglycol (PEG), die eine Opsonisierung und damit die Aufnahme durch die Makrophagen stark verringern (Stealth Effect). Somit lässt sich die Halbwertszeit der Blutverweildauer auf bis zu 20 Stunden erhöhen [Uchegbu, 1999].

Werden Liposomen als Drug-Delivery-System für Tumorthapeutika eingesetzt, so nutzt man meistens das sogenannte passive Tumor-Targeting aus. Dieses Targeting Prinzip beruht darauf, dass sich Nanometer große Partikel in Tumorgewebe aufgrund der hier erhöhten Permeabilität der Blutgefäße und der vergrößerten Zellzwischenräume von selbst anreichern (Abb. 3.2). Die Freigabe des Wirkstoffs aus den Liposomen kann nach mehreren Mechanismen erfolgen. Eine langsame Abgabe von wasserlöslichen Wirkstoffen erfolgt durch deren Diffusion durch die Lipidmembran. Durch die Wahl geeigneter Lipide oder zusätzlicher Hüllenbestandteile (z. B. Transportproteine) können die Liposomen in Abhängigkeit von einem äußeren Reiz, z. B. pH-Wert, Temperatur, Enzymeinwirkung oder einem elektrischen Feld, „durchlässig“ werden und so den Wirkstoff an das Zielgewebe abgeben.

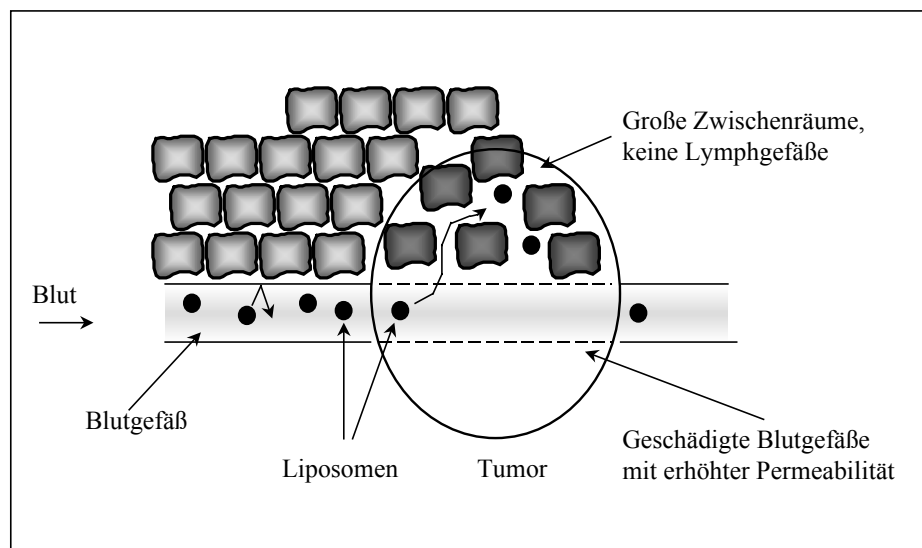


Abb. 3.2. Anreicherung von Liposomen in einem Tumor aufgrund der erhöhten Permeabilität der Blutgefäße im Tumorgewebe. Im gesunden Gewebe können die Liposomen hingegen nicht aus den Blutgefäßen in das Gewebe eindringen.

Quelle: nach U. Massing, Vortrag NanoMed 2003, Berlin

Seit den späten 80er Jahren wird auch an Delivery Systemen für therapeutische Gene auf Basis von Liposomen geforscht. Für diesen Einsatz werden Lipide mit einer Aminogruppe als hydrophile Kopfgruppe verwendet. In Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass solche kationischen Liposomen den Transfer von Genen in die Zelle erhöhen. Jedoch zeigt sich auch hier, dass die kurze Verweildauer der kationischen Liposomen im Blutkreislauf ein großes Problem darstellt und erst mit geeigneten Liganden (Stealth Effekt) gelöst werden muss. Darüber hinaus bestehen noch Schwierigkeiten mit der spezifischen Anreicherung im Zielgewebe.

Liposomen werden bereits seit einiger Zeit erfolgreich in kosmetischen Hautschutz- oder Heilsalben eingesetzt. Als erstes Produkt, das den Weg für weitere Anwendungen der Liposomen ebnete, kam das anti-aging Mittel Capture von Dior 1986 auf den Markt. Pharmazeutische Produkte folgten Anfang der 90er Jahre, darunter Zytostatika, Mykostatika und Antibiotika³ [Müller et al., 2000; Hoffmann, 2000; Maurer et al., 2001].

Einer der wichtigsten Einsatzbereiche von Liposomen im Drug Delivery ist die Krebstherapie. Mitte der 90er Jahre ist in den USA mit Doxil[®] das erste liposomale Tumorthapeutikum zugelassen worden. Ursprünglich wurde es für die Behandlung des häufig bei AIDS Patienten auftretenden Kaposi Sarkoms eingesetzt, aber mittlerweile konnte der Einsatzbereich auf andere Krebsarten ausgeweitet werden. DaunoXome[®] und Myocet[®] sind zwei weitere zugelassene liposomale Tumorthapeutika. Bei allen drei Produkten werden Anthracycline als Wirkstoffe eingesetzt, eine bestimmte Klasse an Zytostatika, die zu einer Schädigung der Herzfunktion führen können [Massing und Fuxius, 2000]. Durch Verwendung von Liposomen als Drug-Delivery-System kann diese Nebenwirkung stark unterdrückt werden.

Obwohl die Liposomen zu den am besten untersuchten Drug-Delivery-Systemen gehören, ist die Anzahl der liposomalen Arzneimittel auf dem Markt immer noch gering. Grund hierfür sind eine Reihe von technischen Problemen, wie die geringe Lagerstabilität für die meisten liposomalen Formulierungen und der hohe Preis pharmazeutisch nutzbarer Liposomen.

Die geringe Lagerstabilität der liposomalen Arzneimittel ist durch die langsame Diffusion der wasserlöslichen Wirkstoffe durch die Lipidmembran bedingt. Um dieses Problem, das bei den meisten Tumorthapeutika auftritt, zu überwinden, können die Wirkstoffe in sogenannte Vesikuläre Phospholipid Gele (VPG) eingeschlossen werden. VPGs bestehen aus einer Matrix von sehr dicht gepackten Liposomen. Die Konzentration eines Wirkstoffs, der in ein VPG eingebracht wurde, ist in den Liposomen als auch in der flüssigen Phase zwischen den Liposomen gleich groß. Da kein Konzentrationsgradient entlang der Liposomenmembran besteht, ändert sich die Konzentration des Wirkstoffs in den Liposomen auch bei langen Lagerzeiten nicht. Die VPGs können auf

³ Zwei deutsche Unternehmen, die aufbauend auf die Liposomen-Technologie neue Delivery Systeme entwickelt haben, sind die Novosom AG in Halle und die IDEA AG in München. Ein Produkt von Novosom, die Smarticles[®], sind maßgeschneiderte Liposom-Systeme, die für den Transport von Genen oder Wirkstoffmolekülen in die Zelle eingesetzt werden können. Die Transfersomen[®] von IDEA bestehen wie Liposomen aus einer Lipiddoppelschicht, deren Flexibilität jedoch durch Verwendung bestimmter Membrankomponenten stark erhöht ist. Aufgrund dieser Flexibilität, können Transfersomen[®] Hautporen besonders gut durchdringen und eignen sich damit als Drug Carrier für die transdermale Verabreichung von Wirkstoffen.

zwei unterschiedlichen Wegen angewandt werden: 1) Sie werden direkt in den Tumor „implantiert“ und stellen so ein Wirkstoffdepot dar, oder 2) sie werden redispergiert, und eine Mischung aus freiem und verkapseltem Wirkstoff wird verabreicht [Massing, 2003].

3.2 Polymer-Nanopartikel

Anfang der 70er Jahre wurde erstmals versucht, Polymer-Nanopartikel als Drug-Delivery-Systeme einzusetzen, wobei ursprünglich der Transport von Impfstoffen und Antitumormedikamenten im Vordergrund stand [Ravi Kumar, 2000; Ravi Kumar 2003]. Als Grundmaterialien für die Polymer-Nanopartikel können verschiedene natürliche oder bioverträgliche synthetische Polymere verwendet werden, wie z. B. Polysaccharide, Polymilchsäure, Polylaktide, Polyacrylate, Polyalkylcyanoacrylate, Polyalkylvinylpyrrolidone oder Acrylpolymere.

Wie bei den Liposomen, hat sich auch bei den Polymer-Nanopartikeln herausgestellt, dass sie bei intravenöser Verabreichung innerhalb kurzer Zeit von phagozytierenden⁴ Zellen aufgenommen werden. Dieser Effekt führt zu einer starken Einschränkung der Anwendbarkeit der Polymer-Nanopartikel als Drug-Delivery-Systeme, wenn eine gezielte Anreicherung des verkapselten Medikamentes in einem bestimmten Organ erfolgen soll. Die aktuelle Forschung auf diesem Gebiet konzentriert sich daher darauf, das Problem der Phagozytose zu überwinden, indem die Polymer-Nanopartikel mit geeigneten Molekülen beschichtet werden. Versuche mit Polymeren, die Ethoxygruppen enthalten, sind vielversprechend: Die Aufnahme der Partikel durch Makrophagen konnte signifikant reduziert und die Verweilzeit der Polymer-Nanopartikel in der Blutbahn erhöht werden.

Die ersten Drug-Delivery-Systeme aus Polymer-Nanopartikeln sind vor etwa 25 Jahren entwickelt worden, um die Probleme der Liposomensysteme zu überwinden, wie das nicht optimale Wirkstofffreisetzungverhalten und die geringe Lagerstabilität. Auch wenn in den letzten Jahren viele Fortschritte auf dem Gebiet der Polymer-Nanopartikel gemacht wurden, was die Herstellung und die Oberflächenbeschichtung betrifft, so befindet sich im Gegensatz zu den Liposomen derzeit noch kein Medikament auf dem Markt, das Polymer-Nanopartikel als Drug-Delivery-System nutzt. Die Hauptgründe hierfür sind der Mangel an geeigneten kostengünstigen industriellen Produktionsmethoden und die Zytotoxizität⁵ vieler der bislang verwendeten Polymere bzw. ihrer Abbauprodukte.

⁴ Phagozytose bezeichnet die Aufnahme von festem Material ins Zellinnere.

⁵ Zytotoxisch bedeutet zellschädigend.

Zukünftige Forschung wird sich mit diesen zentralen Problemen auseinandersetzen müssen, bevor Polymer-Nanopartikel als Drug-Delivery-Systeme weit verbreitet zum Einsatz kommen können. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von weiteren Fragestellungen bezüglich der Anwendung von Polymer-Nanopartikeln zum Medikamententransport, die aktuell erforscht werden [Allemann, 2002]:

- Optimierung der Oberflächen der Polymer-Nanopartikel, um die Verweildauer zu erhöhen.
- Entwicklung von Polymer-Nanopartikeln für hydrophile Verbindungen (Peptide, Proteine, Oligonukleotide).
- Entwicklung von Polymer-Nanopartikeln für die orale Verabreichung. Besondere Herausforderung ist es dabei, die Aufnahme der Partikel durch die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes durch geeignete Oberflächenbeschichtungen zu erhöhen.

Derzeit werden Polymer-Nanopartikel für den Einsatz in der Tumor- und AIDS-Therapie, für die Applikation von Antibiotika und als Vehikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke entwickelt.

Der Begriff Polymer-Nanopartikel umfasst zwei morphologisch verschiedene Partikeltypen, die Nanosphären und die Nanokapseln (Abb. 3.3). Nanosphären bilden eine durchgehende Polymermatrix, über die der Wirkstoff verteilt vorliegt. Nanokapseln bestehen hingegen aus einer Polymerhülle, die einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum umschließt. Die beiden Typen unterscheiden sich im Wirkstofffreisetzungprofil: Während bei Nanosphären die Freisetzung des Wirkstoffs mit der Zeit exponentiell abfällt, ist sie bei der Nanokapsel über einen längeren Zeitraum konstant und verhält sich, wie es typisch für Permeationsvorgänge ist. Im Folgenden soll kurz auf die Herstellung und einige Anwendungsbeispiele für die beiden Partikeltypen eingegangen werden.

Nanosphären

Die ersten Nanosphären wurden aus Polyacrylamid und Polyalkylmethacrylaten Mitte der 70er Jahre hergestellt. Aufgrund der Reaktionsbedingungen und der verwendeten Lösungsmittel waren die Polymerisationsverfahren jedoch nicht für die Verkapselung von empfindlichen Pharmaka geeignet. Zudem sind weder Polyacrylamide noch Polyalkylmethacrylate bioabbaubar, was zu toxischen Reizungen des Körpers führen kann.

Ende der 70er Jahre wurde dann ein Verfahren entwickelt, mit dem sich Nanosphären aus Polyalkylcyanoacrylaten (PACA) herstellen ließen. Polyalkylcyanoacrylate sind biologisch abbaubar und der Polymerisationsprozess läuft unter moderaten Bedingungen ab. Sie schließen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe mit guter Effizienz ein.

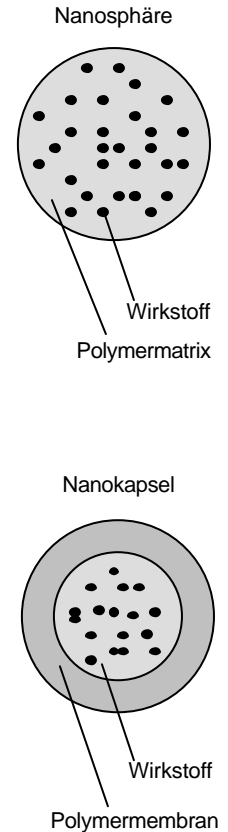


Abb. 3.3. Schematische Darstellung der Nanopartikeltypen Nanosphäre und Nanokapsel.

Bisher wurden diese Partikeltypen vor allem auf ihre Eignung als Drug-Delivery-Systeme für Zytostatika und Antibiotika untersucht.

Anwendungsbeispiele für Nanosphären

Dem Arbeitskreis um Prof. J. Kreuter an der Universität Frankfurt ist es Mitte der 90er Jahre gelungen, mit Hilfe von Polymer-Nanopartikeln Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel aus Poly(butylcyanoacrylaten) eines der wichtigsten Krebstherapeutika, das Doxorubicin, in hoher Konzentration in das Gehirn von Ratten transportieren. Um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, müssen die Nanopartikel mit einer Beschichtung von Polysorbat 80 überzogen werden. Das Delivery-System befindet sich derzeit im Stadium der toxikologischen Studien.

Der Mechanismus, wie die Blut-Hirn-Schranke von den Partikeln überwunden werden kann, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheint die Adsorption eines bestimmten Blutproteins auf die Partikel eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass Partikel, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, verstärkt Apolipoprotein E adsorbieren.

Das Prinzip die Blut-Hirn-Schranke mit Apolipoprotein E als Targetmolekül zu überwinden, ist mittlerweile patentiert worden [Müller, 1997]. Das Unternehmen Nanopharm entwickelt in Zusammenarbeit mit Prof. Kreuter diese Technik mit dem Ziel weiter, eine Drug-Delivery-Plattform zu erarbeiten, die universell anwendbar ist, um Arzneimittel über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. Dabei besteht jedoch das generelle Problem, dass der Wirkstoffanteil in den Polymer-Nanopartikeln vergleichsweise gering ist und sich damit auch nur eine geringe Depotwirkung ergibt. Darüber hinaus ist noch nicht abschließend geklärt, ob der Abbau der Polymerpartikel in den Zellen zu toxischen Effekten führen kann.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Lehr an der Universität Saarland ist ein Delivery System auf Basis von Polymer-Nanopartikeln entwickelt worden, das für den Transport von entzündungshemmenden Arzneimitteln in der Therapie von Darmentzündungen eingesetzt werden soll [Lamprecht et al., 2001]. Der Vorteil bei der Verwendung von Nanopartikeln im Vergleich zu alternativen Applikationsmethoden liegt darin, dass sich die Nanopartikel in die entzündete Darmschleimhaut einlagern und damit ein Wirkstoffdepot bilden. Der Wirkstoff diffundiert dann über einen Zeitraum von etwa einer Woche aus den Partikeln heraus und führt so zu einer kontrollierten Anreicherung des Wirkstoffs im kranken Gewebe. Die bislang nur in Tierversuchen getestete Methode gilt als ein aussichtsreicher Kandidat, um bei der Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Darmentzündungen eingesetzt zu werden.

Nanokapseln

Mitte der 80er Jahre wurden die ersten Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln in einer Grenzflächenpolymerisation präpariert. Bei der Herstellung wird das Alkylcyanoacrylat-Monomer in einer wasserfreien, das Öl enthaltenden, Ethanol-Phase gelöst. Diese organische Phase wird dann in einer wässrigen Tensidlösung dispergiert. Bei Kontakt mit der wässrigen Phase bildet sich eine Öl-in-Wasser-Emulsion. An der Grenzfläche beider Phasen reagiert das amphiphile Monomer in einer anionischen Polymerisation und bildet Nanokapseln. Lipophile Wirkstoffe, die in dem Öl der organischen Phase gelöst sind, werden bei der Polymerisation in die Kapseln inkorporiert. Die Tensidmoleküle der wässrigen Phase werden zum Teil auf der Partikeloberfläche adsorbiert und führen damit zu einer sterischen Stabilisierung, die eine Clusterung der Partikel verhindert. Für die sterische Stabilisierung können auch Block-Copolymere verwendet werden, die über einen zentralen, relativ hydrophoben Teil und einen terminalen, hydrophilen Kettenteil verfügen, wobei die Adsorption auf der Partikeloberfläche über den hydrophoben Molekülteil erfolgt.

Anwendungsbeispiel für Nanokapseln

Die im Jahr 2000 gegründete Capsulation Nanoscience AG wendet ein neuartiges Verfahren an, um Wirkstoffe maßgeschneidert zu verkapseln. Bei dem patentierten Verfahren liegt der Wirkstoff als Suspension in einer wässrigen Lösung von speziellen Polymeren, sogenannten Polyelektrolyten, vor. Die Polyelektrolytmoleküle lagern sich in einem Selbstorganisationsprozess zu einer ultradünnen Polymerhülle um die suspendierten Wirkstoffpartikel zusammen (Abb. 3.4). Um mehrschichtige Kapseln zu erhalten, wird für jede Schicht ein Polyelektrolyt ausgewählt, das eine entgegengesetzte Ladung zu den Molekülen der vorherigen Schicht aufweist. Somit können unter Nutzung von elektrostatischen Wechselwirkungen als treibende Kraft der Selbstorganisation hochorganisierte Polyelektrolytkomplexe gebildet werden. Die Kapseln bestehen aus 4 bis 20 Schichten und haben eine Dicke zwischen 8 und 50 nm. Als Grundbausteine werden entgegengesetzt geladene Polymere, wie Pektine, Gelatine, Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Polyglutaminsäure, verwendet. Das für die Verkapselung der Wirkstoffe entwickelte Verfahren wird auch als Layer-by-Layer Technologie[®] bezeichnet. Durch die Einstellung einer Reihe von Verfahrensparametern ist es möglich, die Kapseln mit maßgeschneiderten Eigenschaften auszustatten, wie Größe, Abbaugeschwindigkeit im Körper oder die Anreicherung in bestimmten Organen.

Zur Zeit wird die Layer-by-Layer Technologie[®] für die Entwicklung von Drug-Delivery-Systemen in den folgenden Anwendungsbereichen eingesetzt: orale Verabreichung von Impfstoffen, Tumorthherapie, Peptidwirkstoffe und Gentherapie. Als ehrgeiziges Ziel hat sich Capsulation vorge-

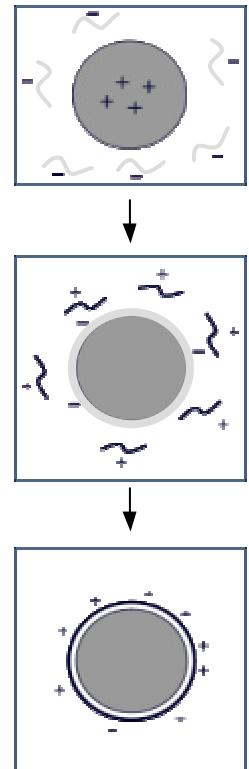


Abb. 3.4. Verkapselung von Wirkstoffen mit ultradünnen Polymerhüllen basierend auf der Selbstorganisation von Polyelektrolytmolekülen.

Quelle: Capsulation, <http://www.capsulation.com>

nommen, mit dieser Technologie Kapseln zu entwickeln, mit denen aktive biologische Materialien transportiert werden können⁶.

3.3 Feste Lipid-Nanopartikel

Als sich herausstellte, dass die Anwendung von Polymer-Nanopartikeln mit vielen Komplikationen verbunden ist, wurden Anfang der 90er Jahre Feste Lipid-Nanopartikel als ein alternatives Drug-Delivery-System untersucht [Müller et al., 2000].

Bei diesem Trägersystem besteht das Matrixmaterial, in das hydrophobe Wirkstoffe eingelagert werden können, aus festen Lipiden. Bei geeigneter Parametrisierung des Herstellungsprozesses können Korngrößen von 50 nm bis 1 µm erhalten werden. Zur Gewährleistung einer hohen Bioakzeptanz und einer guten in-vivo-Abbaubarkeit werden überwiegend physiologische Lipide verwendet, wie z. B. Glyceride aus körpereigenen Fettsäuren. Feste Lipid-Nanopartikel können im industriellen Maßstab mit kosteneffizienten Hochdruck-Homogenisierungsverfahren oder Mikroemulsionsverfahren hergestellt werden [Kreuter, 2002]. Durch die geeignete Wahl der Herstellungsparameter lässt sich die Diffusionsgeschwindigkeit des Wirkstoffes aus der Matrix steuern. Außerdem wird die Wirkstoffliberation durch die in-vivo-Abbaugeschwindigkeit des Trägersystems bestimmt. Auch dieser Parameter kann bei der Herstellung durch die Art der verwendeten Lipide und durch auf die Partikeloberfläche aufgebrauchte Tenside beeinflusst werden. Das Forschungsgebiet Feste Lipid-Nanopartikel ist noch relativ jung, trotzdem befinden sich die ersten Drug-Delivery-Systeme bereits in der klinischen Testphase. Unternehmen, die auf diesem Gebiet arbeiten, sind Skypharma, UK, und PharmaSol in Deutschland.

3.4 Wirkstoff-Nanokristalle

Mehr als 40 % der Wirkstoffkandidaten, die sich bei der pharmazeutischen Industrie in Entwicklung befinden, sind schlecht löslich und weisen deshalb meistens eine unzureichende Bioverfügbarkeit auf. Eine der Strategien, um die Löslichkeit zu erhöhen, ist die Vergrößerung des

⁶ In dem vom BMBF geförderten Projekt „Multifunktionale ‚Künstliche Zellen‘ als Transporter, Sensoren und Nanoreaktoren“ arbeitet Capsulation mit mehreren Projektpartnern an neuartigen intelligenten Delivery Systemen. Ihre Grundstruktur besteht aus Polyelektrolytkapseln, die mit Biopolymeren, Lipiden, Nanopartikeln und Proteinen nach dem Baukastenprinzip funktionalisiert werden sollen. Diese Systeme werden als ein erster Schritt in Richtung intelligente Nanostrukturen gesehen, deren Einsatzmöglichkeiten vom Drug Delivery bis zur Katalyse reichen.

Oberflächen-Volumen-Verhältnisses der Wirkstoffpartikel. Seit Jahren werden daher spezielle Mühlen eingesetzt, um solche Wirkstoffe zu Mikropartikeln zu zermahlen. Aber auch bei dieser Größe ist die Löslichkeit vieler Wirkstoffe noch nicht hinreichend, um sie als Arzneien einzusetzen.

In den 90er Jahren ist es dann gelungen nanoskalige Wirkstoffpartikel, sogenannte Wirkstoff-Nanokristalle, mit Hilfe von Mahlprozessen oder der Hochdruckhomogenisierung herzustellen [Müller et al., 2001]. Diese Partikel bestehen zu 100 % aus Wirkstoff und liegen nach dem Produktionsprozess als Suspensionen (Nanosuspension) vor, die intravenös verabreicht werden. Für die orale Gabe lassen sich aus den Suspensionen auch Granulate oder Tabletten herstellen. Die typische Größe der Wirkstoff-Nanokristalle beträgt 200 – 600 nm.

Um die Applikationseigenschaften der Nanokristalle zu verbessern, können Oberflächenmodifikationen durchgeführt werden. Eine Beschichtung mit Chitosan führt beispielsweise zu einer erhöhten Anhaftung der Partikel an die Darmwände. Mit speziellen Beschichtungen kann auch erreicht werden, dass die Partikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden [Müller et al., 2001]. Im Vergleich zu den Polymer-Nanopartikeln (s.o.) weisen die Wirkstoff-Nanokristalle den Vorteil auf, dass sie zu 100 % aus Wirkstoff bestehen, also keine Polymermatrix benötigen, deren Abbau sich möglicherweise toxisch auf die Zellen auswirkt.

Zu den Unternehmen, die Wirkstoff-Nanokristalle entwickeln oder bereits auf den Markt gebracht haben, gehören PharmaSol, Berlin, SkyePharma, UK, Elan, IR und Wyeth-Ayers Laboratories, USA. Eines der Medikamente, in denen der Wirkstoff als Nanokristall vorliegt, ist Rapamune, das als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen verabreicht wird. Das Medikament wird unter Verwendung der NanoCrystal[®]-Technologie von Elan hergestellt und wurde im Jahr 2000 auf dem Markt eingeführt. Im Jahr 2003 hat Elan mit Merck & Company und Johnson & Johnson Kooperationsverträge geschlossen, um die NanoCrystal[®]-Technologie für verschiedene Wirkstoffkandidaten der beiden Pharmaunternehmen anzuwenden. Der Methode, Wirkstoffe als Nanokristalle zu verabreichen, wird von Seiten der Großindustrie offenbar ein hohes pharmazeutisches und wirtschaftliches Potenzial beigemessen. Dies ist vermutlich auch darauf zurückzuführen, dass diese Technologie durch ihre Einfachheit besteht, die die Wahrscheinlichkeit erhöht, klinische Tests erfolgreich zu durchlaufen.

3.5 Polymertherapeutika

Unter Polymertherapeutika werden Polymerwirkstoffe und die folgenden Delivery Systeme subsumiert: Polymer-Wirkstoff-Konjugate, Polymer-Protein-Konjugate, Polymermizellen und die erst seit kurzem intensiv

beforschten Dendrimere (Abb. 3.5). Im Unterschied zu den partikelförmigen Drug-Delivery-Systemen sind Polymersysteme molekulare Einheiten, deren Größe im Bereich von nur einigen Nanometern liegt. Sie gehören damit zu den nanoskaligen Drug-Delivery-Systemen, bewegen sich von ihrer Größe her jedoch an der unteren Grenze des „Nanospektrums“. Aufgrund ihrer Wirkweise stellen sie ein wichtiges Konkurrenzsystem zu den partikelförmigen Drug-Delivery-Systemen dar.

Die ersten Versuche, Polymertherapeutika zu entwickeln, wurden vor mehr als 25 Jahren unternommen. Der Fortschritt ist zu Beginn jedoch durch zwei Faktoren stark behindert worden: 1) Es wurde unterschätzt, wie stark die Heterogenität der Polymere hinsichtlich der Struktur und des molekularen Gewichtes ihre Toxizität und ihre biologische Aktivität beeinflusst und 2) pharmakologische Aspekte wurden zu Beginn nicht genügend berücksichtigt, da das Gebiet im Wesentlichen von Polymerchemikern ohne die notwendige interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Medizinern und Biologen beforcht wurde.

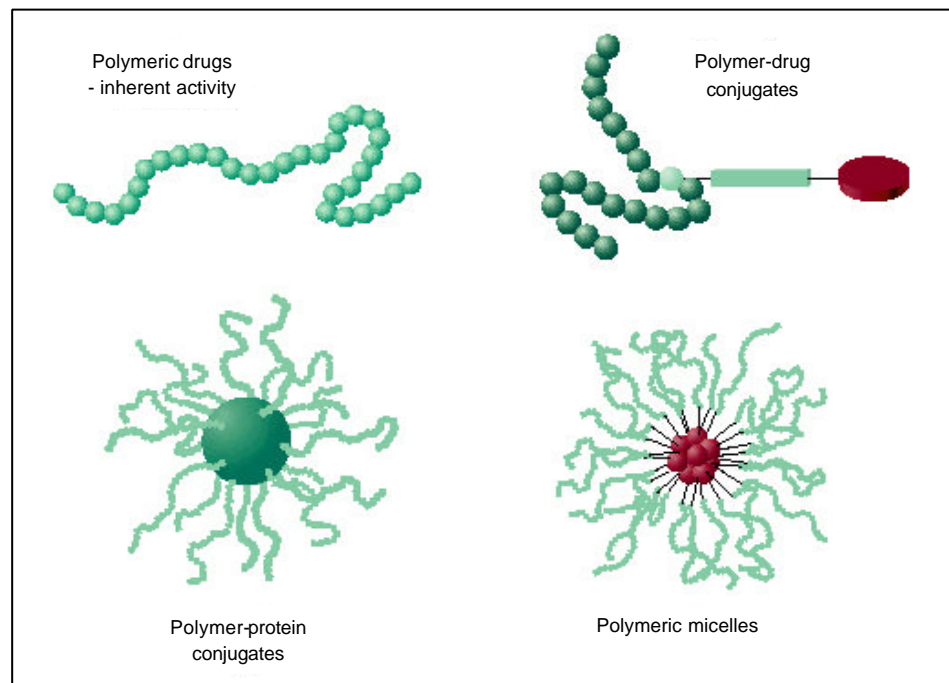


Abb. 3.5. Schematische Darstellung der Struktur von Polymertherapeutika.

Quelle: [Duncan, 2001]

Darüber hinaus war die Entwicklung der Polymertherapeutika in den 80er Jahren vergleichsweise langsam, da Liposomen und Polymer-Nanopartikel im Hinblick auf die kontrollierte Wirkstoffabgabe als überlegen galten und Forschungsaktivitäten entsprechend auf diese Systeme ausgerichtet wurden. Die Schwierigkeiten, die mit den partikelförmigen Drug-Delivery-Systemen auftraten (s. oben) sowie die erfolgreiche Forschung

auf dem Gebiet der Polymermedikamente in der vergangenen Dekade haben jedoch dazu geführt, dass die Forschung an Polymertherapeutika wieder verstärkt auf Interesse stößt. Mittlerweile sind die ersten Polymertherapeutika auf dem Markt, und eine Vielzahl weiterer befinden sich derzeit in der klinischen Testphase [Duncan, 2000; 2003]. Im Folgenden sollen die einzelnen Systeme kurz diskutiert werden.

Polymerwirkstoffe

Polymerwirkstoffe bestehen aus einem bioaktiven Polymer und stellen damit die einfachste Klasse der Polymertherapeutika dar, in der der Wirkstoff (Polymerkette) gleichzeitig auch das Delivery System ist. Ein Beispiel für einen Polymerwirkstoff ist das Medikament Copaxone[®], von Teva Pharmaceutical Industries, das aus einem Zufalls-Kopolymer aus den vier Aminosäuren Alanin, Lysin, Glutarsäure und Tyrosin besteht. Dieses Medikament wird zur Behandlung von Multipler Sklerose eingesetzt und ist bereits in mehreren Ländern zugelassen worden [Duncan, 2000].

Polymer-Wirkstoff-Konjugate

Die Verwendung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten wurde erstmals Mitte der 70er Jahre vorgeschlagen [Ringsdorf, 1975]. Sie bestehen aus 1) einem wasserlöslichen Polymer, 2) einem geeigneten Wirkstoff, 3) der Linker-Komponente, die den Wirkstoff an das Polymer bindet und 4) optional einer Targeting Gruppe (Zielfindungsmolekül), die eine Anreicherung des Konjugates im Zielgewebe bewirkt (Abb. 3.6). Eine Reihe von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten, insbesondere für die Therapie von Tumoren, befinden sich bereits in der klinischen Testphase. Am intensivsten sind bisher Konjugate auf Basis von N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA) untersucht worden. Als Linker wurde die Peptidsequenz Gly-Phe-Leu-Gly entwickelt, die in der Blutlaufbahn stabil ist. Im Zielgewebe wird der Linker durch ein Enzym chemisch zersetzt, womit der Wirkstoff freigesetzt wird. Obwohl zellspezifische Targeting Gruppen in die Konjugate eingeführt werden können, basiert das Targeting der meisten Polymer-Wirkstoff-Konjugate auf der passiven Anreicherung von Partikeln im Tumor (EPR-Effekt⁷). Die ersten klinischen Tests mit HPMA-Copolymeren als Drug-Delivery-System für verschiedene Antitumorwirkstoffe verliefen erfolgreich: Es konnte keine Toxizität oder Immunogenität⁸ der HPMA-Polymerkette festgestellt werden, und die Antitumoraktivität war erhöht bei gleichzeitig reduzierter nichtspezifischer Toxizität [Duncan, 2002].

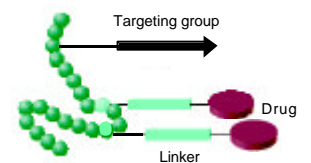


Abb. 3.6. Schematische Darstellung eines Polymer-Wirkstoff-Konjugates

Quelle: nach [Duncan, 2001]

⁷ EPR = Enhanced Permeability and Retention

⁸ Immunogenität bezeichnet die Eigenschaft, eine Immunantwort zu bewirken.

Polymer-Protein-Konjugate

Bei dieser Klasse der Polymertherapeutika wird ein Protein durch das Anheften von Polymermolekülen modifiziert, um seine Applikationseigenschaften zu verbessern. Die chemische Stabilität kann so erhöht, die Zirkulationszeit verlängert und die Löslichkeit im Blut verbessert werden. Die wissenschaftlichen Grundlagen für die Polymer-Protein-Konjugate wurden Ende der 70er Jahre von Davis und Abuchowski mit ihrer PEGylierungstechnik gelegt [Nucci, 1991]. Dabei werden Polyethylenglykol Polymere an die Proteine geheftet. Mittlerweile befinden sich eine ganze Reihe an PEGylierten Proteinwirkstoffen auf dem Markt, darunter C-PEG-Intron[®] zur Behandlung von Hepatitis C und PEG-L-Asparaginase (ONCASPAR[®]) als Wirkstoff gegen Leukämie [Duncan, 2001]. Beide Wirkstoffe sind von dem amerikanischen Unternehmen Enzon Inc. entwickelt worden.

Polymermizellen

Block-Copolymere, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil bestehen, bilden in wässrigen Lösungen spontan Mizellen, die als Drug-Delivery-Systeme verwendet werden können. Der Wirkstoff kann in den hydrophoben Kern der Mizelle eingeschlossen werden oder er kann als Konjugat kovalent gebunden sein. PEG-Aspartat Block-Copolymere bilden Mizellen mit einem Durchmesser zwischen 20 und 60 nm. Wird Doxorubicin (Antitumorwirkstoff) in solche Mizellen eingeschlossen, so kann die Verweilzeit im Blut signifikant erhöht werden und es erfolgt eine Anreicherung von Doxorubicin im Tumorgewebe durch den EPR-Effekt. Die hohe Wirksamkeit von Antitumor-Wirkstoffen in Kombination mit den Mizell Delivery Systemen haben in Japan zu einem aktiven Forschungsprogramm zur Entwicklung dieser Drug-Delivery-Systeme geführt [Duncan, 2000].

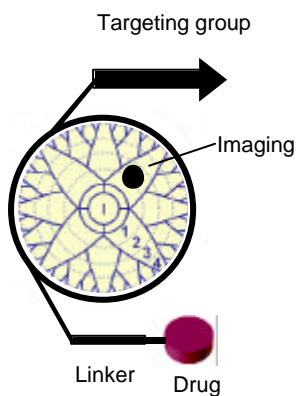


Abb. 3.7. Schematische Darstellung eines Dendrimer Drug-Delivery-Systems. Dendrimere bieten die Möglichkeit, neben dem Wirkstoff auch eine Targeting Gruppe und ein Imaging Molekül zu transportieren.

Dendrimere

Eine Verbindungsklasse, deren Potenzial als Drug-Delivery-System gerade erst entdeckt wird, sind die Dendrimere (Abb. 3.7). Seit Mitte der 80er Jahre wird die Synthese und Chemie dieser hochverzweigten monodispersen Makromoleküle systematisch untersucht [Stiriba, et al., 2002]. Mit einem Durchmesser von 1 bis 10 nm können Dendrimere vaskuläre Poren und Gewebe besser durchdringen als die größeren Polymer-Nanopartikel. Dendrimere können zudem mit einer einheitlichen Molekülmasse synthetisiert werden, was für Drug-Delivery-Systeme von besonderer Bedeutung ist, da die Größe des Trägersystems seine Toxizität und die Anreicherung im Zielgewebe beeinflusst. Ihre Wirkstoff Beladungskapazität von bis zu 25 Gewichtsprozent ist deutlich höher im Vergleich zu Poly-

mer-Wirkstoff-Konjugaten, deren Beladungskapazität typischerweise weniger als 10 Gewichtsprozent beträgt [Malik, 1999; Duncan, 2002].

Untersuchungen mit verschiedenen Dendrimerfamilien haben gezeigt, dass kationische Dendrimere toxisch sind, während sich anionische Dendrimere als biokompatibel erwiesen haben [Patri, 2002]. Die bislang am besten untersuchte Dendrimerklasse im Hinblick auf Eignung als Drug-Delivery-System sind Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere (s. Abb. 3.8). Sie sind biokompatibel, nicht immunogen, wasserlöslich und besitzen modifizierbare Amino-Endgruppen, die zum Anheften von Zielfindungsmolekülen verwendet werden können.

Dendrimere als Drug-Delivery-Systeme können Wirkstoffe in Molekülhohlräume verkapseln, oder der Wirkstoff wird an die Oberfläche kovalent über ein Linkermolekül gebunden. Darüber hinaus können Targetmoleküle, z. B. Antikörper, an die Oberfläche gebunden werden, die zur selektiven Anreicherung des Dendrimers im Zielgewebe führen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, eine bildgebende Gruppe in das Dendrimer zu verkapseln, um so die Verteilung des Drug-Delivery-Systems im Körper nachweisen zu können. Solche Experimente sind mit Gadolinium, einem Kontrastmedium für Magnetresonanz-Verfahren, durchgeführt worden. Aufgrund der Möglichkeit, mit bildgebenden Gruppen und Zielfindungsmolekülen arbeiten zu können, gehören Dendrimere zu den flexibelsten und vielseitigsten Drug-Delivery-Systemen [Patri, 2002].

Um Wirkstoffe in das Dendrimer zu verkapseln, muss das Dendrimer in eine Kern-Schale-Struktur überführt werden, die aus einem inneren verzweigten Gerüst und der funktionalen Schale der Peripherie besteht (Abb. 3.9). Dazu wird das Dendrimer, das bereits die Wirkstoffmoleküle

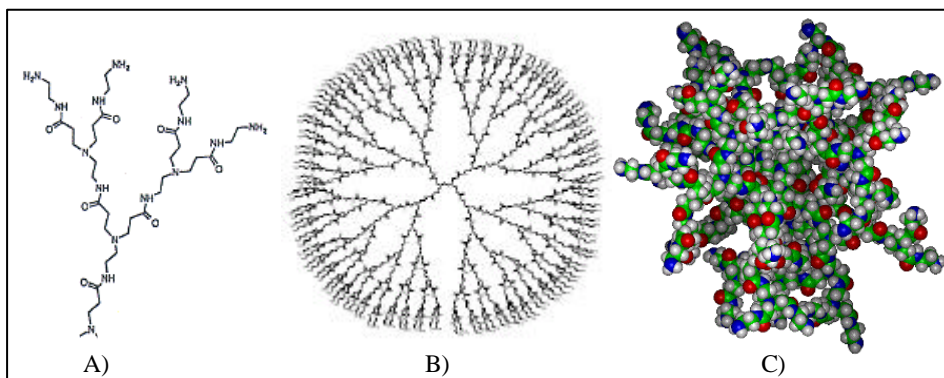


Abb. 3.8. PAMAM Dendrimer: A) Strukturformel eines Dendrimerastes, B) Strukturformel und C) Kalottenmodell des Dendrimers.

Quelle: A u. B) [Patri et al., 2002]; C) Dendritech Inc., <http://www.dendritech.com/pamam.html>

in Molekülhohlräumen aufgenommen hat, in einem abschließenden Syntheseschritt mit sperrigen Endgruppen versehen, die das Herausdiffundieren des Wirkstoffes verhindern [Baars und Meijer, 2000].

Die Schalen sind unter physiologischen Bedingungen (neutrales Milieu) relativ stabil und werden bei bestimmten externen Signalen, z. B. saures Milieu oder Einwirkung von Licht, gespalten, wobei der Wirkstoff freigesetzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Polyethylenimine, die eine solche Kern-Schale-Struktur aufweisen, Antitumorwirkstoffe (Mercaptopurin), kurze DNA-Fragmente (Oligonukleotide) sowie bakterizide Silbernanopartikel aufnehmen können [Haag, 2002].

Erste medizinische Untersuchungen zur Eignung von Dendrimeren als Drug-Delivery-Systeme, insbesondere für Antitumorwirkstoffe, sind bereits durchgeführt worden. So wurde im Arbeitskreis um Prof. Duncan CisPlatin, ein Antitumormedikament, mit anionischen PAMAM-Dendrimeren verkapselt. Das Dendrimer mit dem verkapselten CisPlatin reichte sich durch den EPR-Effekt im Tumor an (passives Targeting) und zeigte eine deutlich höhere Wirksamkeit als CisPlatin ohne Delivery System [Patri et al., 2002].

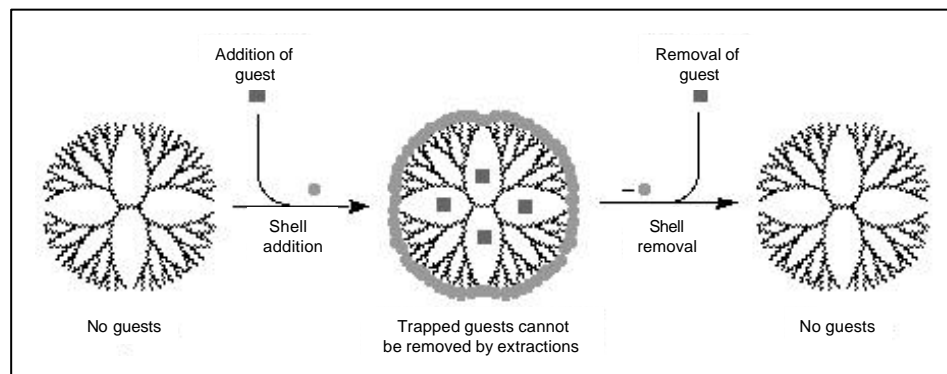


Abb. 3.9. Schematische Darstellung der Struktur und Herstellung eines Dendrimers mit Kern-Schale-Struktur (Dendritische Box).

Quelle: A. Shipway, <http://www.ninger.com/dendrimer/three.htm>

Mittlerweile gibt es auch pharmazeutische Unternehmen, die intensiv an Drug-Delivery-Systemen auf Basis von Dendrimeren forschen. Eines dieser Unternehmen ist NanoBio, USA, das eng mit der University of Michigan zusammenarbeitet. Die an der University of Michigan entwickelte Technologie ist exklusiv an das Unternehmen NanoBio lizenziert worden, das die Technologieplattform durch weitere Patente abgesichert hat. An Tiermodellen ist der Proof-of-Principle für die Behandlung verschiedener Krebsarten, darunter Brustkrebs und Prostatakrebs, mit Dendrimer-Delivery-Systemen erbracht worden. Erste klinische Tests

sollen innerhalb der nächsten drei Jahre durchgeführt werden [Nanobio, 2002].

Prof. Ruth Duncan, eine führende Wissenschaftlerin auf dem Gebiet der Polymertherapeutika, ist vorsichtig optimistisch. Sie geht davon aus, dass Dendrimere langfristig ein beachtliches Potenzial als Delivery Systeme besitzen. Jedoch haben erste systematische Untersuchungen auch ergeben, dass Dendrimere vergleichsweise schnell aus dem Tumorgewebe wieder herauswandern, was dazu führen kann, dass der Wirkstoff nicht hinreichend im Tumor aufkonzentriert wird. Die Eignung der Dendrimere als Drug-Delivery-Systeme kann letztendlich nur mit klinischen Studien gezeigt werden, die bislang noch ausstehen [Chem & Eng. News, 2002].

3.6 Fullerene

Bereits 1993, also acht Jahre nach der Entdeckung der Fullerene, wiesen wissenschaftliche Untersuchungen erstmalig darauf hin, dass sich auf Basis von C₆₀-Fullerenen möglicherweise eine neue Klasse von Medikamenten entwickeln läßt. Das C₆₀-Fulleren besteht aus 60 Kohlenstoffatomen, die in Fünf- und Sechsecken angeordnet, ein kugelförmiges Molekül bilden, dessen Form der eines Fußballs ähnelt. Fullerene sind von ähnlicher Größe wie Hormone oder Peptid α -Helices⁹ und damit ideal als Liganden von Enzymen und Rezeptoren geeignet. Sie zeichnen sich weiterhin dadurch aus, dass sich die Eckpunkte des Moleküls, also die 60 Kohlenstoffatome, durch chemische Gruppen funktionalisieren lassen (Abb. 3.10). Die starre Struktur des Kohlenstoffgerüsts ermöglicht es außerdem, die räumliche Konfiguration der funktionellen Gruppen präzise vorzugeben, so dass sie exakt zur Anordnung der aktiven Gruppen im Zielmolekül passt. Dies ist ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu Medikamenten auf Benzolbasis, die in Lösung flexibel sind, und bei denen aufgrund von Schwingungs- und Rotationsbewegungen die funktionellen Gruppen keine definierte Position einnehmen. Wegen dieser besonderen Eigenschaften der Fullerene wird seit Mitte der 90er Jahre erforscht, inwieweit sie als Grundbaustein für eine neue Klasse von antiviralen, neuroprotektiven und antitumoralen Medikamenten geeignet sind [Gorman, 2002; CSixty, 2003].

Ein Unternehmen, das sich auf die Entwicklung von Medikamenten auf Fullerenbasis konzentriert und umfassende Patentrechte an Fulleren-Wirkstoffplattformen hält, ist CSixty. Am weitesten fortgeschritten in der Entwicklung ist ein HIV-Therapeutikum, das die HIV-Protease inhibieren soll, ein Enzym, das essenziell für das Überleben des HIV-Virus

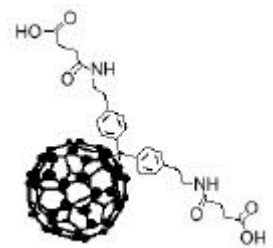


Abb. 3.10. Ein Fulleren-Molekül, das die HIV-Protease inhibiert.

Quelle: [Wilson, 1999]

⁹ Peptid α -Helice bezeichnet die Struktur eines helixförmig aufgewundenen Polypeptids. Sie ist eine von verschiedenen möglichen sekundären Strukturen eines Proteins.

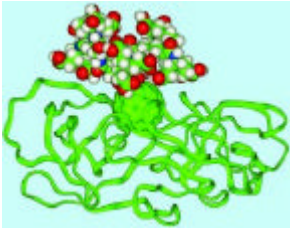


Abb. 3.11. Simulation der Wirkweise eines HIV-Protease Inhibitors auf Fullerenbasis. Das C60-Molekül (grauer Ball) passt genau in das aktive Zentrum des Protease-Enzyms.

Quelle: A. Kirschner/NYU in [Gorman, 2002]

ist. Der entwickelte Wirkstoff ist ein wasserlösliches C60-Fulleren-Derivat, das einen Liganden trägt, dessen Struktur chemisch und sterisch hochkomplementär zur HIV-Protease ist (Abb. 3.11). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Wirkstoff das aktive Zentrum der HIV-Protease inhibiert, jedoch stehen klinische Studien noch aus. CSixty rechnet mit einer Markteinführung in frühestens 3 bis 4 Jahren unter der Prämisse, dass keine Komplikationen in den klinischen Studien auftreten [CSixty, 2003]. Bei CSixty befinden sich 5 weitere Medikamente zur Behandlung von Tumoren und neurologischen Krankheiten in der Entwicklung.

Eine interessante Strategie für die Tumorthherapie, in der Fullerene als Delivery System Verwendung finden, ist die Verkapselung radioaktiver Atome in den Fullerenkäfig. In Kombination mit einem Antikörper als Zielfindungsmolekül, der an das Fullerenmolekül angeheftet wird, ist eine Anreicherung der radioaktiven Verbindung im Tumorgewebe möglich. Die Tumorzellen werden dann durch die radioaktive Strahlung selektiv zerstört. Weil das radioaktive Atom aus dem Fullerenkäfig nicht freigesetzt werden kann, ergibt sich ein entscheidender Vorteil gegenüber Radiotherapeutika auf Chelatbasis. Nach der Behandlung werden die Fullerene mit den radioaktiven Atomen wieder aus dem Körper ausgeschieden.

Auch wenn die Entwicklung der fullerenbasierten Medikamente bisher sehr erfolgreich verlaufen ist, so werden erst Toxizitätstests an Tieren und nachfolgend die klinischen Studien zeigen, ob die Fullerene-Wirkstoffe alle Kriterien erfüllen, um als Medikamente eingesetzt werden zu können.

3.7 Anorganische Nanopartikel

Bei der Herstellung von anorganischen Nanopartikeln für Drug-Delivery-Anwendungen sind bisher vor allem Gold-, Kalziumphosphat-, Silikat- und magnetische Nanopartikel verwendet worden. Kolloidale Goldpartikel und magnetische Nanopartikel werden als Delivery Systeme für chemotherapeutische Medikamente, Impfstoffe und Nukleinsäure erforscht. Kalziumphosphat-Nanopartikel haben sich als besonders effektive Impfstoffhilfsmittel erwiesen, außerdem wird derzeit auch ihr Potenzial als Delivery System für Proteinwirkstoffe untersucht. Darüber hinaus hat es erste Versuche gegeben, Silikat-Nanopartikel für gentherapeutische Anwendungen einzusetzen. Im Folgenden sollen die verschiedenen Delivery Systeme auf Basis anorganischer Nanopartikel und ihre potenziellen Anwendungen kurz beschrieben werden.

Kalziumphosphat-Nanopartikel

Kalziumphosphat-Nanopartikel werden aus anorganischen Salzen hergestellt und weisen eine Größe von 400-600 nm auf. An der Oberfläche können bis zu 20 Gewichtsprozent Proteine absorbiert werden, bei Einlagerung der Proteine in die Partikel beträgt die Beladungskapazität 50 % oder mehr.

Besonders intensiv ist der Einsatz von Kalziumphosphat-Nanopartikeln als Impfstoffhilfsmittel untersucht worden. Derzeit werden viele Impfstoffe mit geringen Mengen an Aluminiumsalzen verabreicht, um so die Immunreaktion des Körpers zu verstärken. Verglichen mit diesen Aluminiumsalzen sind die Kalziumphosphat-Nanopartikel jedoch etwa 100fach wirksamer und rufen zudem keine Reizungen oder entzündliche Reaktionen an der Injektionsstelle hervor, weisen also eine bessere Verträglichkeit auf.

Ein Unternehmen, das derzeit Präparate mit Kalziumphosphat als Impfstoffhilfsmittel entwickelt, ist Biosante. Weiterhin wird bei Biosante auch das Potenzial von Kalziumphosphat-Nanopartikeln als Delivery System für Proteine, wie z. B. Insulin, untersucht, um so orale, okulare und pulmonale Darreichungswege für diese Wirkstoffklasse zu erschließen [Biosante, 2002]. BioAir[®] ist eines der Formulierungssysteme auf Basis von Kalziumphosphat-Nanopartikeln, das bei Biosante derzeit entwickelt wird. Es soll die Verabreichung von Proteinen, insbesondere Insulin, mit einem Spray direkt über die Lunge ermöglichen. Präklinische Tests mit BioAir[®] konnten erfolgreich abgeschlossen werden und haben gezeigt, dass mit dieser Darreichungsform derselbe Effekt erzielt wird, wie mit Insulin-Injektionen.

Gold-Nanopartikel

Gold-Nanopartikel (kolloidales Gold) werden durch Reduktion einfacher Goldsalze unter Zusatz von geeigneten Additiven hergestellt. Durch die Menge des Reduktionsmittels kann die Größe der Nanopartikel kontrolliert werden, die von 3 nm bis zu etwa 120 nm Durchmesser reicht. Gold-Nanopartikel scheinen besonders geeignet für Drug-Delivery-Anwendungen aufgrund ihrer günstigen „Bindungseigenschaften“. So lassen sich sowohl der Wirkstoff als auch das Targeting Molekül über Thiolgruppen einfach an die Goldpartikel koppeln.

Ein amerikanisches Unternehmen, das Drug-Delivery-Systeme auf Basis von kolloidalem Gold entwickelt, ist Cytimmune. Derzeit arbeitet das Unternehmen an einem Antitumormedikament, bei dem der biologische Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) an die Goldpartikel gekoppelt wird. Das natürlich vorkommende Immun-Hormon bewirkt den Tod von Tumorzellen, wirkt jedoch auch toxisch auf gesundes Gewebe, so dass die selektive Anreicherung im Tumor eine Voraussetzung für die Anwen-

derung dieses Wirkstoffs ist. Weiterhin arbeitet Cytimmune an einem Gene-Delivery-System auf Basis von Gold-Nanopartikeln. Beide Wirkstoffsysteme befinden sich noch in einer frühen Entwicklungsphase [Cytimmune, 2003].

Neben kolloidalen Goldpartikeln kommen auch Goldkomposite als Materialien für die Herstellung von Drug-Delivery-Systemen in Frage. So wird beispielsweise an Nanokugeln gearbeitet, die aus einem dielektrischen Kern (z. B. aus Goldsulfid oder Silikat) und einer Hülle aus Gold bestehen. Durch geeignete Wahl der Durchmesser von Kern und Schale der Partikel können die Absorptionseigenschaften so geändert werden, dass das Absorptionsmaximum im nahen Infrarot (NIR) liegt, also einem Wellenlängenbereich mit einer vergleichsweise hohen physiologischen Transmission. Mit einer entsprechenden Bestrahlung von außen lassen sich dadurch auch Partikel in tieferen Gewebeschichten erwärmen. Dieser photothermische Effekt kann, wie im Folgenden beschrieben, für die kontrollierte Freisetzung von Medikamenten genutzt werden.

Copolymere aus N-isopropylacrylamid (NIPPAm) und Acrylamid (AAm) haben eine sogenannte kritische Lösungstemperatur, bei der die Polymermatrix „kollabiert“ und in der Polymermatrix eingeschlossene Wirkstoffmoleküle schlagartig freigesetzt werden. Werden die Gold-Nanokugeln in ein Hydrogel des Polymers eingelagert und mit Licht einer Wellenlänge von 800-1200 nm (NIR) bestrahlt, so erwärmen sie sich. Die Erhöhung der Temperatur führt schließlich zum Kollaps der Matrixstruktur, und die eingeschlossenen Wirkstoffmoleküle werden freigesetzt [West und Halas, 2002].

Der photothermische Effekt ist auch direkt für die Wirkstofffreisetzung eingesetzt worden. Ren und Chow [2003] beschreiben Experimente, in denen CisPlatin (ein Antitumormedikament) durch einen Linker an die Gold-Nanoshells gekoppelt wurden. Dabei konnte die Desorption des CisPlatins von der Oberfläche entweder durch Einstrahlung von Licht im nahen Infrarot oder durch den pH-Wert gesteuert werden. Inwieweit sich diese Methode nutzen lässt, um Drug-Delivery-Systeme aufzubauen, muss in weiteren Experimenten noch untersucht werden.

Silikatpartikel

Der Bedarf an neuartigen Delivery Systemen für DNA ist hoch, da die bestehenden Systeme entscheidende Nachteile haben: So gilt die Verwendung von Viren als Genvektoren als sehr risikoreich, und Liposomen weisen nur eine sehr niedrige Transfektionsrate auf. Im Arbeitskreis um Prof. Lehr an der Universität Saarland ist mit Silikat-Nanopartikeln ein weiteres neuartiges DNA-Delivery System untersucht worden. Der Grundstoff für die Nanopartikel sind kommerzielle SiO₂-Kolloide, deren Oberfläche kovalent mit Aminoalkylsilanen modifiziert wird. Die Größe der Partikel beträgt zwischen 10 und 100 nm. Unter physiologischen Be-

dingungen bilden solche Nanopartikel stabile Komplexe mit DNA und sind in der Lage, die DNA in Zellen einzuschleusen. Die beobachteten Transfektionsraten sind dabei vergleichbar mit denen anderer nicht-viraler DNA-Vektoren. Jedoch erwies sich die Zytotoxizität der Silikatpartikel als unerwartet niedrig, so dass Silikatpartikel als eine aussichtsreiche Plattform für DNA-Delivery-Systeme betrachtet werden [Lehr, 2003].

Magnetische Nanopartikel

Das so genannte magnetische Drug Targeting basiert auf der intravenösen oder intraarteriellen Injektion magnetischer Partikel, die mit Arzneimitteln beladen sind und durch externe Magnetfelder im erkrankten Gewebe angereichert werden.

Die chemicell GmbH, Berlin, hat mit den magnetischen targetMAG-Nanopartikeln ein System entwickelt, mit dem Lübke et al. [1996] erstmalig das Konzept des magnetischen Drug Targetings klinisch an 15 Patienten mit Krebserkrankungen erprobte. In diesen klinischen Tests konnte die generelle Machbarkeit des Targetings und die Verträglichkeit der magnetischen Nanopartikel gezeigt werden. Die verwendeten biokompatiblen targetMag-Nanopartikel sind etwa 100 nm groß und können mit Arzneistoffen (z. B. Zytostatika) beladen werden. Sie zirkulieren mit einer Bluthalbwertszeit von 30 Minuten im Gefäßsystem des Körpers und werden durch ein externes Magnetfeld lokal im kranken Zielgewebe angereichert. Tierexperimentelle Untersuchungen von Alexiou et al. [2003], in denen die targetMAG-Nanopartikel mit einer therapielevanten Zytostatika-Dosierung zum Einsatz kamen, haben gezeigt, dass das magnetische Drug Targeting bei intraarterieller Injektion der Partikel für die Behandlung oberflächlich gelegener Tumore einsetzbar ist.

FeRx, USA, ist ein weiteres Unternehmen, das ein Verfahren entwickelt hat, bei dem magnetische Partikel über ein lokales Magnetfeld im Zielgewebe angereichert werden. Die Partikel bestehen aus einem Eisen-Kohlenstoff-Komposit und weisen eine Größe zwischen 500 nm und 5 µm auf, so dass sie sich im Grenzbereich zwischen Nano- und Mikroskala befinden. Zur Beladung der Partikel werden sie in eine Lösung mit Wirkstoff gegeben, wobei der Wirkstoff von der Kohlenstoffkomponente der Partikel absorbiert wird.

Bei dem von FeRx entwickelten Verfahren zur Behandlung von Lebertumoren werden die Partikel in die tumorzuführende Arterie eingebracht und magnetisch im Tumor fixiert. Durch die Größe der Teilchen bedingt, kommt es zur Embolisation kleinerer Arterien, so dass die Blutversorgung des Tumorareals gestört wird. In Verbindung mit dem Zytostatikum kann somit zeitlich begrenzt eine Reduzierung des Tumorwachstums erzielt werden. Da die magnetischen Aktivkohleteilchen biologisch nicht abbaubar sind, gelten sie als Implantate, die nach Ende der therapeu-

tischen Behandlung wieder aus dem Körper operativ entfernt werden müssen. Die von FeRx entwickelte Behandlungsmethode ist jedoch bislang nur für Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als zwei Jahren gedacht, so dass auf die chirurgische Entfernung der Aktivkohleteilchen aus dem Körper verzichtet wird. Das Wirkstoffsystem befindet sich mittlerweile in der klinischen Phase III [FeRx, 2003].

In dem Projekt „Magnetofection“¹⁰ werden magnetische Nanopartikel als Delivery Systeme für die Gentherapie entwickelt. Die Anreicherung von aktiven Genvektoren im Zielgewebe ist ein bislang ungelöstes Problem, das mit der „Magnetofection“-Methode überwunden werden soll. Dazu werden die Genvektoren an die mit einer speziellen Beschichtung versehenen magnetischen Nanopartikel gekoppelt und mit Hilfe eines Magnetfeldes im Zielgewebe angereichert. Bei erfolgreichem Abschluss des Projektes soll aus dieser Gentransfer-Methode eine breit anwendbare klinische Basistechnologie für die Gentherapie hervorgehen.

Magnetische Eisenpartikel können auch in Liposomen eingeschlossen werden, die als Delivery System für Tumortherapeutika dienen. Somit ist es möglich, den Wirkstoff mit Hilfe von Magnetfeldern im kranken Gewebe anzureichern und gleichzeitig seine Freigabe extern zu kontrollieren: Mit dem Magnetfeld werden die Liposomen im Tumor lokal auf 42 °C erhitzt, um so die Freisetzungsrates des Zytostatikums sprunghaft zu erhöhen. Dieses Verfahren ist ein Beispiel dafür, dass Magnetfelder nicht nur genutzt werden können, um Medikamente innerhalb des Körpers zum kranken Gewebe zu navigieren sondern auch um sie kontrolliert freizusetzen [Saiyed et al., 2003].

3.8 Thermotherapie mit Nanopartikeln

Bei der Hyperthermie¹¹ wird das Tumorgewebe auf 42-45 °C erwärmt und damit die Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber zellzerstörenden Medikamenten und Strahlen stark erhöht. Mit demselben Verfahren lassen sich auch höhere Temperaturen über 50 °C bis 70 °C im Tumorgewebe erzeugen, mit denen eine direkte Zerstörung des Tumors z. B. nach Ende der Strahlentherapie möglich ist („Thermoablation“). Beide Strategien lassen sich bei der Behandlung eines Patienten kombinieren. Mit den bislang verwendeten hyperthermischen Verfahren besteht bis heute die Schwierigkeit, dass vor allem tieferliegende Gewebe weder

¹⁰ „Magnetofection“ ist ein vom BMBF gefördertes Verbundprojekt zwischen dem Klinikum rechts der Isar der TU München (Arbeitsgruppe um Dr. C. Plank) und dem Unternehmen chemicell, Berlin.

¹¹ Von Hyperthermie wird gesprochen, wenn Temperaturen bis 45°C angewendet werden. Thermotherapie bezeichnet allgemein die Überwärmungsbehandlung, wobei auch Behandlungsmethoden eingeschlossen sind, bei denen Temperaturen über 45 °C erreicht werden.

räumlich noch biologisch selektiv erwärmt werden können. Auch wird versucht, eine homogenere Erwärmung des kranken Gewebes zu erreichen, als es mit herkömmlichen Methoden möglich ist.

Die Magnetflüssigkeitshyperthermie (MFH) ist ein neuer Ansatz in der Thermotheapie, bei dem die Erwärmung magnetischer Nanopartikel in einem magnetischen Wechselfeld zur Tumorbekämpfung genutzt wird [Jordan, 1999]. Dieser Ansatz soll das Anwendungsspektrum der Thermotheapie deutlich erweitern und wird derzeit in zwei klinischen Studien an der Charité in Berlin zur Behandlung von Hirntumoren getestet. Der Einsatz dieser Methode zur Heilung weiterer Krebserkrankungen, wie das fortgeschrittene Prostatakarzinom, soll in Kürze folgen.

Bei der Magnetflüssigkeitshyperthermie werden Eisenoxid-Nanopartikel, die mit einer patentierten Oberfläche beschichtet sind, in Wasser gelöst und in den Tumor injiziert. Dann werden die Eisenoxid-Nanopartikel durch ein magnetisches Wechselfeld in Schwingung versetzt und erwärmen so das Tumorgewebe auf eine Temperatur von über 45 °C. Aufgrund der erhöhten Temperatur gelangen die Teilchen in die Zellzwischenräume und werden dann von den Tumorzellen aufgenommen. Wenn es zum massiven Absterben der Krebszellen kommt, nehmen vitale Krebszellen die Partikel aus ihrer Umgebung erneut auf und werden so bei der nächsten Thermotheapie „getroffen“ [Jordan, 2001]. Das abgestorbene Gewebe wird dann durch das natürliche Immunsystem des Körpers zur Milz und Leber transportiert und dort abgebaut [Schattenfroh, 2000].

Bislang sind die verwendeten Partikel noch nicht mit Zielfindungsmolekülen ausgestattet, das heißt die Partikel müssen in das Tumorgewebe eingespritzt werden. Die Behandlung von metastasierenden oder multifokal ausgedehnten Krebserkrankungen ist daher noch nicht möglich. Um das Verfahren auch für solche Krebsarten einsetzen zu können, wird zur Zeit an einer Beschichtung der Nanopartikel gearbeitet. Dabei sollen die Nanopartikel mit einer Schicht aus Zielfindungsmolekülen ausgestattet werden, die zu einer selektiven Anreicherung der Partikel im Tumorgewebe führen. Eine zweite Schicht soll die Suspensionsstabilität und die Bioverteilung der Nanopartikel im Gewebe verbessern. Dabei ist es das Fernziel, die Nanopartikel so zu gestalten, dass eine intravenöse oder interarterielle Verabreichung möglich ist und sich die Nanopartikel über die Zielfindungsmoleküle selektiv im Tumorgewebe anreichern. Dies würde es ermöglichen, auch periphere Tumorzellen selektiv abzutöten und damit das nach der klassischen Chemotherapie häufig beobachtete erneute Wachstum des Tumors zu verhindern. Über das Coating der Nanopartikel ist es prinzipiell auch möglich, Zytostatika oder radioaktive Isotope an die Partikel zu koppeln, um so kombinierte Therapieformen anzuwenden, wie die hypertherme Radiotheapie oder die hypertherme Radiochemotheapie. Angesichts solcher Perspektiven ist

für die Magnetflüssigkeitshyperthermie ein großer medizinischer Bedarf und ein erhebliches Marktpotenzial zu erwarten.

Um die Thermotherapiemethoden für die klinische Anwendung weiterzuentwickeln, sind zwei Unternehmen gegründet worden: Die MFH Hyperthermiesysteme GmbH, die das weltweit erste klinische Magnetwechselfeldsystem entwickelt hat und die MagForce Applications GmbH,¹² die in Zusammenarbeit mit dem Institut für neue Materialien, Saarbrücken, die Mehrfachbeschichtung der Partikel entwickelt. Beide Unternehmen konzentrieren sich auf die konsequente Umsetzung der MFH-Forschungsansätze in Produkte und deren Vermarktung, um eine internationale Verbreitung des Verfahrens in möglichst vielen medizinischen Einrichtungen zu erreichen.

Neben der Magnetflüssigkeitshyperthermie gibt es eine Reihe weiterer Beispiele für die kombinierte Anwendung von Hyperthermie und Drug Delivery mit Nanopartikeln, wobei die Partikel jedoch nicht für die Erwärmung des Gewebes genutzt werden. So ist z. B. untersucht worden, inwieweit die hypertherme Erwärmung geeignet ist, um Liposomen gezielt in Tumorgewebe anzureichern [Kong, 2000].

Magnetische Nanopartikel erweisen sich in Kombination mit der modernen Medizintechnik als äußerst vielseitig einsetzbar. So können sie mit Hilfe von Magnetfeldern zur Anreicherung des Wirkstoffs im kranken Gewebe genutzt werden. In der Kernspintomographie finden sie als Kontrastmittel zur Diagnose von Krankheiten Verwendung (s. auch Kapitel 4), und durch Erhitzen mit externen Magnetfeldern können sie in einem neuartigen Hyperthermie-Verfahren direkt zur Heilung von Krebs eingesetzt werden. Aufgrund dieser vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in der Diagnose und Therapie ist bei den magnetischen Nanopartikeln ein zunehmender medizinischer Bedarf und ein erhebliches Marktpotenzial zu erwarten.

3.9 Literaturanalyse

Um einen Überblick über die weltweiten Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet nanoskaliger Drug-Delivery-Systeme zu erhalten, wurde eine Literaturanalyse durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der Publikationszahlen wurde mit Hilfe der MEDLINE Datenbank ermittelt. In dieser Datenbank werden Veröffentlichungen aus 3900 Zeitschriften aus den Bereichen Medizin und Pharmazie aufgenommen und Publikationsaktivitäten können bis in das Jahr 1959 zurückverfolgt werden. Da die Herkunftsländer der Autoren in MEDLINE nicht als Suchfeld zur Ver-

¹² Die Unternehmen MagForce Applications GmbH und MFH Hyperthermiesysteme GmbH sind mittlerweile in die MFH-Gruppe, Berlin, zusammengeführt worden.

fügung stehen, wurde diese Information mit dem Science Citation Index ermittelt.

Nach den Ergebnissen der Recherche können die nanoskaligen Drug-Delivery-Systeme gemäß ihrer zeitlichen Entwicklung in drei Kategorien eingeteilt werden (s. Tab. 3.1 und Abb. 3.12). Zur ersten Kategorie zählen die Liposomen, über die Mitte der 70er Jahre die ersten Veröffentlichungen erschienen sind. Seit Mitte der 80er Jahre hat die Forschungsaktivität stark zugenommen und erreicht 10 Jahre später ihr Maximum mit beachtlichen ca. 340 Veröffentlichungen pro Jahr. Die seit den letzten Jahren stagnierenden Publikationszahlen zeigen an, dass Liposomen als Drug-Delivery-Systeme mittlerweile ein etabliertes Wissenschaftsfeld sind. Diese Einschätzung wird durch die Markteinführung der ersten liposomalen Arzneimittel in den letzten Jahren bestätigt.

Zur zweiten Gruppe gehören die Polymer-Nanopartikel und die Polymer-Wirkstoff-Konjugate. Die ersten Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Polymer-Nanopartikel sind Ende der 70er Jahre erschienen. Nach etwa 10 Jahren nehmen die Publikationszahlen deutlich zu, erreichen aber nicht die Dynamik der Veröffentlichungen über Liposomen. Ähnlich verhält es sich mit den Polymer-Wirkstoff-Konjugaten; hier dauert es fast 20 Jahre, bis bei den Publikationszahlen eine deutliche Zunahme zu erkennen ist.

Die übrigen hier untersuchten Drug-Delivery-Systeme - Feste Lipid-Nanopartikel, Wirkstoff-Nanokristalle, Dendrimere, Fullerene, magnetische Nanopartikel und Gold-Nanopartikel - gehören zur dritten Gruppe

Tab. 3.1. Ergebnisse der Literaturanalyse in den Datenbanken MEDLINE und SCISEARCH für die verschiedenen Drug-Delivery-Systeme.

Drug-Delivery-System	Erste Publikation (MEDLINE)	Gesamtzahl Publikationen (MEDLINE)	Deutsche Autoren / % (SCISEARCH)	Platz Deutschlands im Ranking ^{a)}
Liposomen	1974	4036	6,6	4
Polymer-Nanopartikel	1978	575	10,9	3
Wirkstoff-Nanokristalle	1994	38	31,0	2
Feste Lipid-Nanopartikel	1996	62	48,8	1
Polymer-Wirkstoff-Konjugate	1977	198	3,7	8
Dendrimere	1991	86	7,3	3
Fullerene	1992	72	6,0	6
Magnetische Nanopartikel	1991	58	23,0	2
Gold	1991	10	0	keine Publikat.

a) Für das Ranking wurden mit SCISEARCH nur Publikationen der Jahre 1998-2002 ausgewertet. Die Herkunftsländer der Autoren sind nach ihrer Häufigkeit aufgelistet. Der Platz im Ranking gibt demnach Auskunft über die Aktivitäten deutscher Wissenschaftler auf den einzelnen Gebieten im internationalen Vergleich.

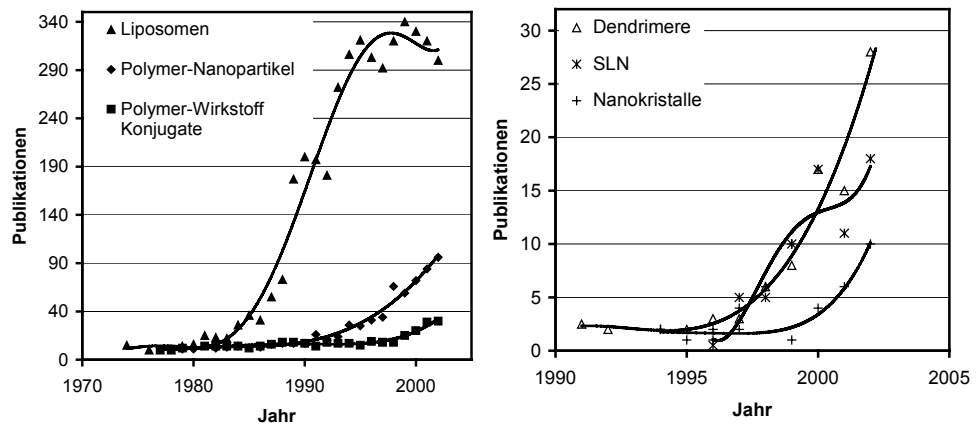


Abb. 3.12. Publikationsverläufe für verschiedene nanoskalige Drug-Delivery-Systeme, wie sie mit der MEDLINE Datenbank ermittelt wurden. Um die Übersicht zu erhöhen, sind die Systeme nach Höhe der Publikationszahlen in zwei verschiedenen Grafiken dargestellt. Von den Delivery Systemen, die erst seit Anfang der 90er Jahre erforscht werden, ist zudem nur eine Auswahl gezeigt (rechte Grafik, SLN = Feste Lipid-Nanopartikel).

und werden Anfang bis Mitte der 90er Jahre das erste Mal in der Literatur erwähnt. Die Forschungsintensität für Dendrimere, Feste Lipid-Nanopartikel und Fullerene ist dabei relativ hoch: In der MEDLINE Datenbank lassen sich für jedes dieser Forschungsgebiete etwa um die 70 Veröffentlichungen nachweisen. Die Forschungsintensität in dem Bereich Gold-Nanopartikel ist auffallend niedrig mit nur 10 Veröffentlichungen seit Anfang der 90er Jahre. Den Rechercheergebnissen zu Folge sind Feste Lipid-Nanopartikel und Wirkstoff-Nanokristalle die jüngsten Forschungsgebiete mit den ersten Veröffentlichungen Mitte der 90er Jahre.

Der Anteil deutscher Autoren an den Publikationen der letzten 5 Jahre (1998-2002) ist für die einzelnen Delivery Systeme sehr unterschiedlich. So werden etwa 49 % der Publikationen über Feste Lipid-Nanopartikel (SLN) von deutschen Wissenschaftlern veröffentlicht. Auf guten Positionen befindet sich Deutschland auch bei Dendrimeren, Polymer-Nanopartikeln, Wirkstoff-Nanokristallen, magnetischen Nanopartikeln und Liposomen mit einem Publikationsanteil zwischen 7 und 23 % (Tab. 3.1). Auffallend niedrig ist der Anteil deutscher Veröffentlichungen im Bereich Polymer-Wirkstoff-Konjugate: In diesem Feld belegt Deutschland im internationalen Ranking nur den achten Platz. Auf den Gebieten der Gold-Nanopartikel werden in der SCISEARCH Datenbank in den letzten 5 Jahren keine Publikationen von deutschen Autoren gefunden.

Abbildung 3.13 zeigt eine Matrix, in der der Neuigkeitsgrad der Delivery Systeme gegen den Platz Deutschlands im Publikationsranking aufgetragen ist. Besonders bei den neuen Delivery Systemen, in denen Deutschland einen hohen Anteil an den internationalen Forschungsak-

tivitäten hat, ergeben sich interessante Perspektiven: Auf der einen Seite ist die notwendige kritische Masse für schnelle Fortschritte gegeben, auf der anderen Seite bestehen noch hohe Chancen für entscheidende Durchbrüche, die oftmals Voraussetzung sind, um die Technologieführerschaft zu übernehmen. In etablierteren Feldern, wie beispielsweise den Polymer-Wirkstoff-Konjugaten, werden viele Anwendungsbereiche schon intensiv von englischen oder japanischen Teams bearbeitet. Die Perspektiven, eine führende Position in diesen Forschungsfeldern zu erreichen, sind damit deutlich geringer einzuschätzen.

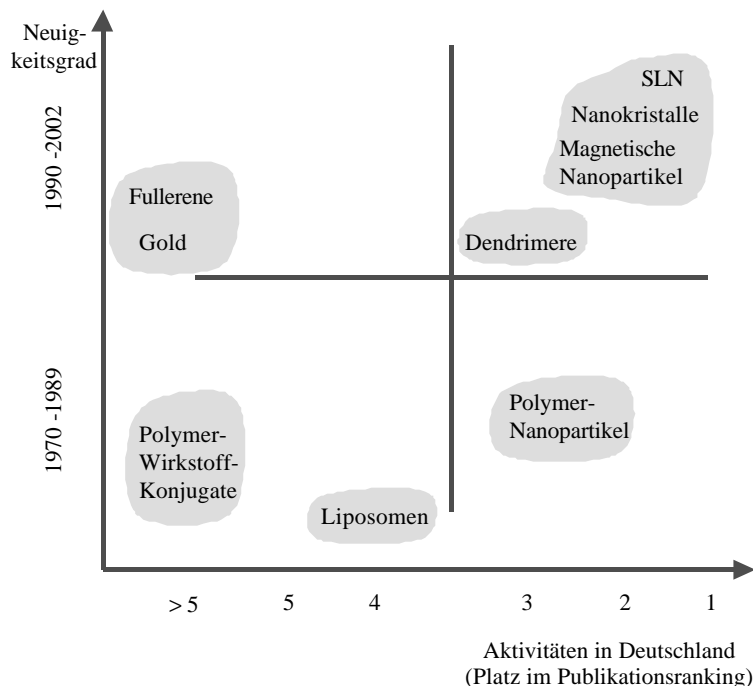


Abb. 3.13. Matrix, in der Neuigkeitsgrad einer Technologie gegen die Position Deutschlands im Publikationsranking aufgetragen ist. Im rechten oberen Quadranten befinden sich die Systeme, die noch großes Entwicklungspotenzial haben und für die Deutschland gut positioniert ist (SLN = Feste Lipid-Nanopartikel).

3.10 Zusammenfassende Bewertung

Viele hochwirksame Wirkstoffe erfordern ein geeignetes Drug-Delivery-System, um als Medikament zur Anwendung kommen zu können: Solche Transportsysteme werden benötigt, wenn der Wirkstoff 1) in wässrigen Medien unlöslich ist, 2) sich unspezifisch in verschiedenen Geweben anreichert und so zu starken Nebenwirkungen führt oder 3) chemisch labil ist und abgebaut wird, bevor er das Zielgewebe erreicht hat. Der Bedarf an „smarten“ Delivery Systemen ist daher hoch und ein Umsatz in

Milliardenhöhe durchaus realistisch, wenn man berücksichtigt, dass der weltweite Markt für Medikamente etwa 400 Mrd. US\$ beträgt.

Nanopartikel oder nanoskalige Polymerverbindungen sind Möglichkeiten, solche Delivery Systeme zu realisieren. Der Wirkstoff wird entweder in die Partikel eingeschlossen oder an ihre Oberfläche gekoppelt. Die Anreicherung im kranken Gewebe kann nach einem passiven Mechanismus erfolgen, der die erhöhte Permeabilität von Tumorgeweben ausnutzt, oder er kann aktiv durch Zielfindungsmoleküle, wie z. B. Antikörper, bewirkt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, magnetische Nanopartikel mit Hilfe von Magnetfeldern im kranken Gewebe anzureichern. Partikel mit einer Größe von bis zu etwa 100 nm werden von den Zellen durch den Endozytosemechanismus aufgenommen. Der Wirkstoff wird dann je nach Delivery System durch unterschiedliche Mechanismen freigesetzt, wie z. B. Enzyme oder pH-sensitive Reaktionen.

Die Eigenschaften und der Stand der Entwicklung der verschiedenen in diesem Kapitel diskutierten Drug-Delivery-Systeme werden in den Tabellen 3.2-3.4 zusammengefasst. In Tabelle 3.2 sind die von der aktuellen Forschung anvisierten Einsatzbereiche der verschiedenen Drug-Delivery-Systeme aufgeführt. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Anwendungsbreite. So können z. B. Polymer- oder Feste Lipid-Nanopartikel sehr vielseitig angewandt werden, während anorganische Partikel nur ein sehr schmales Anwendungsspektrum aufweisen. Weiterhin lässt sich aus Tabelle 3.2 erkennen, dass für die Einsatzbereiche Tumorthherapie, Gentransfektion und Protein-/Peptidwirkstoffe die

	Antitumor-therapeutika	Antibiotika / Virostatika	Proteine / Peptide	Gentherapie	AIDS-Therapeutika	Impfstoffe/ Impfstoffhilfsmittel	Radiotherapie	Immunsuppressiva
Liposomen	✓	✓		✓		✓		
Polymer-Nanopartikel	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Wirkstoff-Nanokristalle	✓	✓	✓		✓			✓
Feste Lipid-Nanopartikel	✓	✓	✓	✓		✓		✓
Polymer-Wirkstoffkonjugate	✓			✓				
Polymer-Proteinkonjugate			✓					
Dendrimere	✓	✓		✓	✓			
Fullerene	✓				✓		✓	
Kalziumphosphat-Nanopartikel			✓			✓		
Gold-Nanopartikel	✓		✓					
Magnetische Nanopartikel	✓			✓				
Silikat-Nanopartikel				✓				

Tabelle 3.2. Anwendungspotenzial verschiedener nanoskaliger Drug-Delivery-Systeme für eine Auswahl von Wirkstoffklassen. Die Angaben basieren auf aktueller Literatur und auf einer Expertenbefragung.

Tab. 3.3 Stand der Entwicklung der verschiedenen Drug-Delivery-Systeme (Ergebnis einer Expertenbefragung).

Drug-Delivery-System	Forschung/Entwickl.	Toxikologische Studien	Klinische Studien	Produkte	Anwendung, Unternehmen (Beispiele)
Liposomen	█	█	█	█	Caelyx [®] , Tumorthapeutikum, Schering-Plough
Polymer-Nanopartikel	█	█	█	█	Tumorthapeutikum, American Bioscience ¹⁾
Wirkstoff-Nanokristalle	█	█	█	█	Rapamune [®] , Immunsuppressivum, Wyeth-Ayerst Laboratories
Feste Lipid-Nanopartikel	█	█	█	█	Immunsuppressivum, Pharmatec
Polymer-Protein-Konjugate	█	█	█	█	Peg-Intron [®] , Hepatitis C, Schering-Plough
Polymer-Wirkstoff-Konjugate	█	█	█	█	Tumorthapeutikum, CRC/Pharmacia
Dendrimere	█	█	█	█	AIDS, Starpharma
Fullerene	█	█	█	█	AIDS, CSixty
Kalziumphosphat-Nanopartikel	█	█	█	█	Impfstoffhilfsmittel, Biosante Pharmaceuticals
Gold-Nanopartikel	█	█	█	█	Tumorthapeutikum, Cytimmune
Magn. Nanopartikel	█	█	█	█	Tumorthapeutikum, FeRx
Silikat-Nanopartikel	█	█	█	█	Gentherapie, Universität Saarland

¹⁾ Von American Bioscience wird bereits ein auf Albumin (niedermolekulares Protein) basierendes Drug-Deliver-System (ABI-007) vermarktet.

Anzahl der in Entwicklung befindlichen Delivery Systeme am höchsten ist.

In Tabelle 3.3 ist der Entwicklungsstand der verschiedenen Delivery Systeme aufgeführt, wobei jeweils ein Beispiel für eines der am weitesten entwickelten Produkte gegeben ist. Demnach befinden sich Liposomen, Polymer-Protein-Konjugate und Nanokristall-Präparate bereits auf dem Markt. Besonders bemerkenswert ist die Markteinführung der

Tab. 3.4. Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale der verschiedenen Drug-Delivery-Systeme

Delivery System	Merkmale
Liposomen	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Bioakzeptanz aufgrund der natürlichen Komponenten (Phospholipide) • Liposomen Produkte sind bereits auf dem Markt • Hoher Preis pharmazeutisch nutzbarer Liposomen • geringe Lagerstabilität
Polymer-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Für eine Vielzahl von Wirkstoffklassen einsetzbar • Überwindung der Blut-Hirn-Schranke • Mangel an geeigneten kostengünstigen industriellen Produktionsmethoden • Zytotoxizität der Zersetzungsprodukte vieler der bislang verwendeten Polymere
Wirkstoff-Nanokristalle	<ul style="list-style-type: none"> • 100 % Wirkstoff → keine toxischen Polymer-Abbauprodukte • Überwindung der Bluthirnschranke bei geeigneter Beschichtung möglich • Erste Produkte bereits auf dem Markt
Feste Lipid-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Bioakzeptanz physiologischer Lipide • Kostengünstige industrielle Herstellungsverfahren
Polymer-Protein-Konjugate	<ul style="list-style-type: none"> • Erste Produkte bereits auf dem Markt • Nur für Proteine anwendbar
Polymer-Wirkstoff-Konjugate	<ul style="list-style-type: none"> • Dreifachfunktion möglich: Drug Delivery, Bildgebung, aktive Zielfindung • Geringe Wirkstoff-Beladungskapazität
Dendrimere	<ul style="list-style-type: none"> • Können mit einheitlicher Molekülmasse synthetisiert werden • Beladungskapazität bis zu 25 Gewichtsprozent • Vielseitiges Delivery System, da Wirkstoff, Zielfindungsmolekül und bildgebende Gruppen an die Dendrimere gekoppelt werden können • Dendrimere wandern vergleichsweise schnell wieder aus Tumorgewebe heraus
Fullerene	<ul style="list-style-type: none"> • Hat das Potenzial, Grundbaustein für eine neuartige Klasse von Wirkstoffen zu werden • Räumliche Konfiguration der funktionellen Gruppen kann vorgegeben werden
Gold-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Gute Biokompatibilität von Gold • Geringe Forschungsintensität
Magnetische Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Anreicherung über magnetische Felder im Zielgewebe • Einsatz in der Hyperthermie • Möglichkeit der kontrollierten Freigabe des Wirkstoffs
Kalziumphosphat-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Hilfsstoff für Impfstoffe und Delivery von Proteinen • Entwicklung bereits relativ weit fortgeschritten
Silikat-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • DNA Delivery • Geringe Forschungsintensität

Nanokristall-Präparate, wenn man die geringe Anzahl an Veröffentlichungen auf diesem Gebiet bedenkt. Forschungsaktivitäten werden hier offensichtlich stark von der Industrie vorangetrieben, die sich aus Wettbewerbsgründen bei der Publikation von Forschungsergebnissen im Allgemeinen eher zurückhält. Bei Systemen, wie den Polymer-Nanopartikeln und Polymer-Wirkstoff-Konjugaten haben Komplikationen, die sich z. B. durch geringe Blutverweilzeiten oder die Toxizität der Zerstellungsprodukte des Delivery Systems ergeben, eine Markteinführung bislang verhindert: Trotz der vergleichsweise großen Anzahl an Veröffentlichungen sind die klinischen Studien für die am weitesten entwickelten Produkte für diese beiden Systeme noch nicht abgeschlossen. Fullerene und Dendrimere sind noch junge Forschungsgebiete im Drug Delivery, und die ersten Produkte befinden sich noch in der Phase der toxikologischen Tests.

In Tabelle 3.4 sind die wichtigsten Aspekte der einzelnen Drug-Delivery-Systeme aufgeführt. Für die vergleichende Bewertung der Systeme müssen ganz unterschiedliche Kriterien berücksichtigt werden, von denen die wichtigsten im Folgenden aufgezählt sind: 1) Die Verweilzeit im Blut muss lang genug sein, damit sich das Delivery System im Zielgewebe anreichern kann, 2) die Partikel und ihre Abbauprodukte müssen untoxisch sein, 3) die Lagerstabilität muss hinreichend lang sein und 4) die Partikel müssen sich im industriellen Maßstab zu marktfähigen Preisen produzieren lassen. Für jeden Anwendungsbereich muss also im Einzelfall geprüft werden, welches der Delivery Systeme das höchste Potenzial besitzt und es ist durchaus denkbar, dass Systeme, die bislang auf wenig Interesse gestoßen sind, für bestimmte Nischenanwendungen die höchste Eignung aufweisen.

Nach den Ergebnissen der Recherchen zu diesem Kapitel können die verschiedenen Drug-Delivery-Systeme in drei Gruppen eingeteilt werden.

- 1) Drei der Delivery Systeme werden bereits seit Mitte der 70er Jahre erforscht: Liposomen, Polymer-Nanopartikel und Polymer-Wirkstoff-Konjugate. Delivery Systeme auf Basis von Liposomen sind ein bereits etabliertes Wissenschaftsfeld mit etwa 300 Veröffentlichungen pro Jahr, und die ersten Produkte sind bereits am Markt eingeführt.

Die Anzahl der Publikationen auf dem Gebiet der Polymerpartikel mit ~90 pro Jahr und der Polymer-Wirkstoff-Konjugate mit ~35 pro Jahr sind deutlich niedriger, und die Entwicklung der Systeme erfolgt entsprechend langsamer. Für beide Systeme befinden sich die am weitesten entwickelten Produkte in der klinischen Testphase.

- 2) Sei den 90er Jahren werden eine Reihe weiterer Delivery Systeme mit relativ hoher Intensität erforscht, zu diesen gehören Feste Lipid-Nanopartikel, Dendrimere und Fullerene. Keines der Systeme befindet sich bislang auf dem Markt. Deutschland ist auf dem Gebiet der

Festen Lipid-Nanopartikel führend und auch in der Dendrimerforschung ist Deutschland mit einem Anteil von 7,3 % an den Publikationen gut positioniert. Die Forschung an Fulleren-Wirkstoffen wird besonders von dem Unternehmen CSixty vorangetrieben, mit dem Ziel, Plattform-Technologien zu entwickeln und patentrechtlich abzusichern. Da es sich bei den Fulleren-Therapeutika um eine gänzlich neue Wirkstoffklasse handelt, für die es noch keinerlei klinische Erfahrungen gibt, ist das Risiko, in diese Technologie zu investieren, entsprechend hoch. Eine noch sehr junge Delivery-Technologie sind die Wirkstoff-Nanokristalle, über die Mitte der 90er Jahre die ersten Veröffentlichungen erschienen sind. Das Konzept, den Wirkstoff direkt als Nanopartikel zu verabreichen und mit einer Beschichtung zu versehen, die z. B. den Transport über die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht, gilt als sehr vielversprechend. Die ersten Produkte befinden sich bereits auf dem Markt.

- 3) Zur dritten Gruppe gehören die anorganischen Delivery Systeme, über die bislang wenig publiziert wurde und die vor allem von Industrieunternehmen erforscht werden. Trotz geringer Aktivitäten auf diesen Gebieten befinden sich z. B. Kalziumphosphat-Nanopartikel bereits in der klinischen Testphase.

Magnetflüssigkeits-
hyperthermie

Nanopartikel können nicht nur als Delivery Systeme eingesetzt werden sondern auch direkt als Bestandteil neuartiger Therapiemethoden. Dies ist der Fall bei der Magnetflüssigkeitshyperthermie, bei der Nanopartikel in den Tumor injiziert und mit einem Magnetwechselfeld erwärmt werden, um so das Tumorgewebe zu zerstören. Die Entwicklung dieser Methode wird besonders von deutschen Forschern vorangetrieben.

Externe Kontrolle

Weiterhin können magnetische Methoden auch für die Anreicherung von Wirkstoffen und zu ihrer kontrollierten Freigabe genutzt werden. Damit wird es möglich, Zytostatika in hohen Konzentrationen im Tumorgewebe anzureichern und gleichzeitig die systemische Konzentration so gering wie möglich zu halten. Dies eröffnet die Perspektive auf sehr effiziente Tumorbehandlungen mit geringen Nebeneffekten. Weitere Möglichkeiten für die Freisetzung und die Anreicherung des Wirkstoffs im Körper, sollten sich z. B. durch die äußere Einwirkung von Ultraschall und Laserlicht (photodynamische Therapie) auf entsprechend maßgeschneiderte Nanopartikel ergeben. Die Kombination der Nanopartikel-Technologie mit der modernen Medizintechnik zu ihrer externen Kontrolle eröffnet Perspektiven auf ganz neuartige Therapiemethoden.

Marktpotenzial

In einer im Herbst 2003 erschienenen Marktstudie von BCC wird das weltweite Marktvolumen von nanoskaligen Drug-Delivery-Systemen mit 10 Mio. US\$ für das Jahr 2003 angegeben. Bis zum Jahr 2007 sollen sich die Umsätze auf 50 Mio. US\$ verfünffacht haben. BCC verwendet dabei eine sehr stringente Definition für nanoskalige Drug-Delivery-Systeme. So werden nur Systeme berücksichtigt, deren Durchmesser kleiner als 100 nm ist. Nanokristalle bleiben ganz unberücksichtigt mit der Begrün-

dung, dass der Innovationsgehalt zu gering sei, um hier von Nanobiotechnologie zu reden.

In dieser Technologieanalyse haben wir uns an die gängige Definition für nanoskalige Drug-Delivery-Systeme gehalten, wie sie von Wissenschaftlern genutzt wird. Demnach wird bei pharmazeutischen Anwendungen von Nanopartikeln gesprochen, wenn die Größe des Partikels 1-1000 nm beträgt. Diese Definition zu Grunde legend, befinden sich bereits heute eine ganze Reihe von „nanoformulierten“ Medikamenten auf dem Markt. Unseren eigenen Recherchen zufolge, wird für die liposomalen Tumortherapeutika, DaunoXome[®], Doxil[®]/Caelyx[®] und Myocet[®] im Jahr 2003 ein Umsatz von mehr als 200 Mio. US\$ erwartet. Dabei gibt es eine Vielzahl weiterer Medikamente, für die Submikrometer große Drug-Delivery-Systeme eingesetzt werden. Darüber hinaus befinden sich derzeit etwa 100 Medikamente in der klinischen Phase, für deren Formulierung auf Nanotechnologie bzw. nanoskalige Delivery Systeme zurückgegriffen wird. Diese Zahlen lassen darauf schließen, dass nanoskalige Drug-Delivery-Systeme zunehmend an Bedeutung bei der Darreichung von Wirkstoffen gewinnen werden und dass hier ein Wachstumsmarkt mit beträchtlichem Marktpotenzial entsteht.

Aufgrund der sehr aufwändigen klinischen Studien, die Drug-Delivery-Systeme vor dem Markteintritt durchlaufen müssen, ist die Markteinführung praktisch nur von Pharmaunternehmen finanzierbar. In der Vergangenheit hat sich jedoch verschiedentlich gezeigt, dass innovative Forschung im akademischen Bereich bei der Pharmaindustrie nur auf sehr zurückhaltendes Interesse gestoßen ist. Dies kann verschiedenste Gründe haben, wie die Konzernstrategie bzgl. bestimmter Produktgruppen oder die Tendenz auf Materialien zu setzen, für die bereits klinische Daten vorliegen. Für eine anwendungsorientierte Forschung könnte eine frühzeitige Abstimmung mit den F&E-Strategien der Industrie durchaus hilfreich sein, um so zielgerichtet in Systeme zu investieren, die später auch eine Chance haben, bis zur Marktreife entwickelt zu werden.

Innovationstransfer

Derzeit befinden sich mehr als ein Dutzend verschiedener Delivery Systeme in der Entwicklung, die zum Teil dieselben potenziellen Anwendungsgebiete aufweisen und damit in Konkurrenz zueinander stehen. Dabei sind die Anforderungen an die Delivery Systeme hinsichtlich der Zielfindungseigenschaften und der Transportmechanismen in die Zelle außerordentlich komplex. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eines der Systeme für alle Anwendungen ideal geeignet ist und den Markt somit stark dominieren wird. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die meisten der hier vorgestellten Systeme gemäß ihrer Stärken für eine bestimmte Anwendung den konkurrierenden Systemen überlegen sind und damit ein entsprechendes Marktsegment ausfüllen werden. Für eine Reihe von Delivery Systemen, die sich noch nicht in der Anwendung befinden und für die daher noch ein erhöhter Forschungsbedarf besteht, ist Deutschland besonders gut positioniert. Zu diesen Systemen zählen Feste Lipid-

Nanopartikel, Wirkstoff-Nanokristalle, Polymer-Nanopartikel, Dendri-
mere und magnetische Nanopartikel.

4 IN-VIVO-DIAGNOSTIK – NANOPARTIKEL FÜR DIE MOLEKULARE BILDGEBUNG

Die Fortschritte in der biochemischen Forschung und der Molekularbiologie ermöglichen es mittlerweile, Krankheiten auf molekulare Abnormalitäten zurückzuführen. Die Molekulare Bildgebung hat sich zum Ziel gesetzt, diese molekularen Signaturen von Krankheiten zu detektieren und für die medizinische Diagnose zu nutzen. Im Idealfall ließen sich somit Krankheiten bereits vor dem Ausbruch der ersten Symptome diagnostizieren und therapieren [Lamerichs, 2003].

Die Molekulare Bildgebung ist als Teil eines Paradigmenwechsels zu sehen, der vom derzeitigen Krankenservice zu einem prophylaktischen Gesundheitsservice führen soll. Damit wird die Erhaltung der Gesundheit und nicht mehr ihre Wiederherstellung in den Mittelpunkt der medizinischen Versorgung gestellt.

Das Prinzip der Molekularen Bildgebung beruht darauf, ein bildgebendes Molekül an ein Transportmolekül oder –partikel zu koppeln, das außerdem über eine Zielfindungseinheit verfügt, wie z. B. bestimmte Rezeptoren, Liganden oder Peptide (Abb. 4.1). Das Zielfindungssystem ist dabei spezifisch für molekulare Marker einer bestimmten Krankheit und bewirkt die Anreicherung des Kontrastmittels im kranken Gewebe. Das Konzept der Molekularen Bildgebung wird derzeit für eine Vielzahl von Diagnoseverfahren entwickelt; zu ihnen zählen Magnetresonanz-, Ultraschall-, nukleare und optische Bildgebungsverfahren.

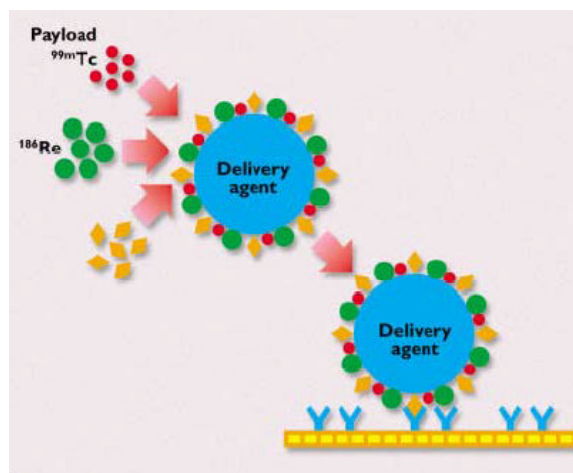


Abb. 4.1. Prinzip der Molekularen Bildgebung am Beispiel der Nuklearmedizin. Die bildgebende Komponente (Tc-99), das Zielfindungsmolekül und gegebenenfalls auch der Wirkstoff (Re-186) werden an ein Nanopartikel gekoppelt. Das Zielfindungsmolekül bewirkt dabei die Anreicherung im kranken Gewebe.

Quelle: [Lamerichs, 2003]

4.1 Ultraschallkontrastmittel

In der Ultraschalldiagnostik wird die Echointensität der an Gewebs- und Organgrenzen reflektierten Ultraschallwellen gemessen und zur Untersuchung von Gewebestrukturen und –erkrankungen eingesetzt. Der Kontrast zwischen gesundem und krankem Gewebe ist dabei generell sehr schwach, so dass nach Kontrastmitteln gesucht wird, die sich an molekulare Marker anlagern, die spezifisch für eine bestimmte Erkrankung sind [Hughes et al., 2003]. Neue Entwicklungen bei den Kontrastmitteln auf Basis von Mikrobläschen und gasfreien Nanopartikeln, die über eine aktive Zielfindungsfunktion verfügen, sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Mikrobläschen

Mikrobläschen, wie sie als Ultraschallkontrastmittel verwendet werden, haben einen mittleren Durchmesser von 1-2 μm und bewegen sich damit an der oberen Grenze des Nanospektrums [Unger et al., 2003]. Ein Beispiel für ein solches Kontrastmittel ist Definity[®], das von ImaRx, USA, vertrieben wird und aus Phospholipid-Vesikeln besteht, die mit einem Perfluoropropan/Luft-Gemisch gefüllt sind (Abb. 4.2). Um ein direktes Targeting des kranken Gewebes zu ermöglichen, können Zielfindungsmoleküle an die Phospholipidschicht gekoppelt werden.

Mikrobläschen sind insbesondere geeignet, um Ziele innerhalb der Blutgefäße sichtbar zu machen. Daher müssen sich die Zielmoleküle auf Zellen an der Innenseite der Gefäßwände befinden. Für das Targeting außerhalb der Blutgefäße sind kleinere Partikel erforderlich, die einen Durchmesser von deutlich weniger als 500 nm haben sollten.

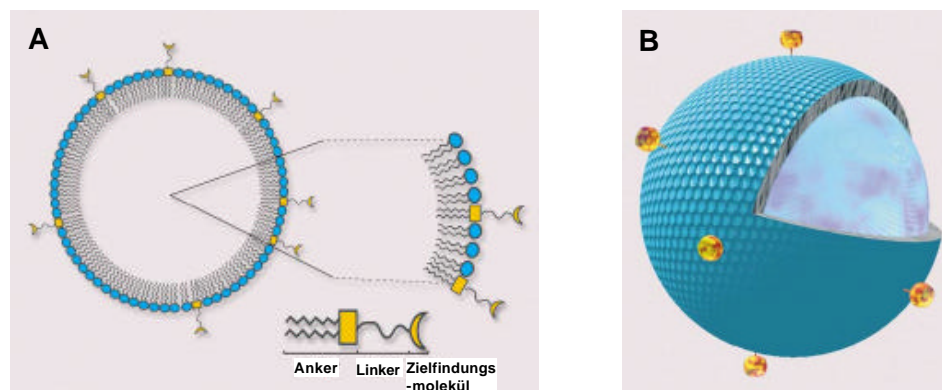


Abb. 4.2. A) Mikrobläschen, bestehend aus einer gasgefüllten Lipidkugel. An der Oberfläche sind über Linkermoleküle die sogenannten Zielfindungsmoleküle gekoppelt, die eine Anreicherung im erkrankten Gewebe bewirken. B) 3D-Computersimulation eines Mikrobläschens.

Quelle: [Unger et al., 2003]

Nur solche Partikel sind in der Lage, die Schicht von Endothelzellen, mit denen die Blutgefäße ausgekleidet sind, zu durchdringen. Mikrobläschen, die mit einer aktiven Zielfindungsfunktion ausgestattet sind, werden derzeit vor allem für zwei Anwendungsbereiche diskutiert: für die Diagnose von Blutgefäßerkrankungen und für den Nachweis von neugebildeten Blutgefäßen, der sogenannten Angiogenese, die einer Tumorbildung vorausgeht. Zum Nachweis der Angiogenese gilt das Protein $\alpha_v\beta_3$ -Integrin¹ als eine besonders aussichtsreiche Zielstruktur. So ist es der Arbeitsgruppe um J. R. Lindner von der University Virginia gelungen Mikrobläschen mit Zielfindungsmolekülen auszustatten, die spezifisch an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden. Mit diesem Kontrastmittel konnte Tumor-Angiogenese in Ratten nachgewiesen werden [Ellegala et al., 2003]. Das Diagnoseverfahren soll nun für den klinischen Einsatz weiterentwickelt werden.

Nanopartikel

Neben Mikrobläschen werden seit jüngster Zeit auch Emulsionen von perfluorierten Kohlenwasserstoffen als gasfreie Ultraschallkontrastmittel eingesetzt. Die perfluorierten Kohlenwasserstoffpartikel sind von einer Lipidschicht umgeben und liegen bei Raumtemperatur im flüssigen Zustand vor [Lanza et al., 1996]. Die Nanopartikel (250 nm Durchmesser) können dabei mit Zielfindungsmolekülen wie z. B. Biotin (Vitamin H) versehen werden. Solche Kontrastmittel werden derzeit vor allem für den Nachweis pathogener Veränderungen im Bereich der Blutgefäße entwickelt.

Die Zielfindung erfolgt dabei in einem dreistufigen Prozess (Abb. 4.3): Zuerst wird ein Biotin konjugierter Antikörper verabreicht, der an Targetmoleküle im Zielgewebe bindet. Im zweiten Schritt erfolgt die Gabe von Avidin, einem Linker-Molekül, das sich an den Antikörper heftet. Im Dritten Schritt wird dann die Nanopartikel-Emulsion verabreicht, wobei an die Oberfläche der Nanopartikel Biotinmoleküle gekoppelt sind. Die Biotinmoleküle binden an die noch freien Bindungsstellen des Avidins, so dass sich die Nanopartikel gezielt im pathogenen Gewebe anreichern. In Tierversuchen hat dieses Verfahren eine so große Kontrastverstärkung erzeugt, dass der Nachweis von feinsten arteriellen Blutgerinnseln möglich wurde [Dayton et al., 2002].

Wird Gadolinium in die Lipidhülle des Partikels inkorporiert, so können die Partikel multipel als Ultraschall- und als MR-Kontrastmittel verwendet werden. Prinzipiell besteht darüber hinaus die Möglichkeit, Wirk-

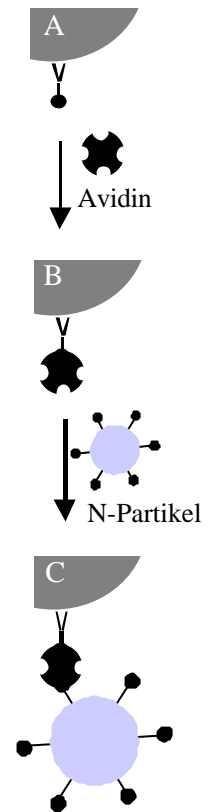


Abb. 4.3. Target Mechanismus für Perfluorocarbon-Nanopartikel: A) Blutgerinnsel mit über Antikörper gebundenem Biotin, B) Linkermolekül Avidin wird verabreicht, C) Nanopartikel binden über Biotin-Linker an Avidin.

¹ Integrine sind die wichtigste Klasse der Adhäsions-Rezeptoren für Matrix-Proteine, die eine Schlüsselstellung beim Ablauf der Angiogenese einnehmen. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist ein spezifisches Integrin auf der Membran von Endothelzellen, dem eine Rolle bei der tumorassoziierten Angiogenese zugeschrieben wird.

stoffe in die Nanopartikel zu verkapseln und die Partikel zusätzlich als Drug-Delivery-Systeme zu verwenden. Eine solche Kombination von Bildgebungsfunktion und Wirkstofftransport ist ein Bestandteil des Theranostik-Konzeptes², das eine engere Verzahnung von Diagnose und Therapie zum Ziel hat.

4.2 Nukleare Bildgebungsverfahren

Nukleare Bildgebungsverfahren geben Informationen über die Anatomie und die Funktion von Organen [Rollo, 2003]. Ein Einblick in physiologische Vorgänge ist möglich, weil die Aufnahme der Radionuklide in einem Gewebe von der Stoffwechselgeschwindigkeit abhängt. Mit nuklearen Bildgebungsverfahren werden deutlich höhere Empfindlichkeiten als mit Magnetresonanz-Methoden erreicht; jedoch liefern sie nur geringe morphologische Informationen, so dass es für Ärzte oftmals schwierig ist, eine Region mit erhöhter Stoffwechselaktivität exakt zu lokalisieren [Lanza et al., 2003].

Technetium-99 ist ein Radionuklid, das häufig für diagnostische Problemstellungen verwendet wird. Verabreichte Technetium-Phosphonate reichern sich beispielsweise in Knochenbereichen an, die eine erhöhte Zellaktivität aufweisen, wie sie bei Entzündungen, Tumoren, und Frakturen auftreten. Die Konzentration des Radioisotopes wird dann über die emittierte Gammastrahlung mit einer Gamma-Kamera detektiert.

Philips, Dow Chemical und Kereos Inc., USA, haben sich in einem Verbundprojekt zusammengeschlossen, um ein molekulares Kontrastmittel für nukleare Bildgebungsverfahren zu entwickeln. Das Kontrastmittel besteht aus einer Suspension aus Perfluorocarbon-Nanopartikeln, an die Technetium-99 als bildgebende Komponente gekoppelt ist. Zusätzlich werden die Nanopartikel mit einem Liganden ausgestattet, der an Proteine bindet, die spezifisch für Tumor-Angiogenese sind. Die Partikel reichern sich in den neugebildeten Blutgefäßen an und können mit Hilfe einer Gamma-Kamera nachgewiesen werden. Diese Methode soll für die Diagnose von Tumoren eingesetzt werden, die sich noch in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung befinden.

In dem Verbundprojekt übernimmt Philips die Entwicklung der medizinischen Apparate, während Dow Chemical ein Verfahren entwickelt, um die Radionuklide an die Nanopartikel anzukoppeln. Kereos testet die Nanopartikel-Systeme und wird die aussichtsreichsten Kandidaten bis zur

² Unter Theranostik wird die therapiebegleitende Diagnose verstanden, deren Ziel die patientenspezifische Therapie ist. Zu den Hauptelementen der Diagnose in der Theranostik zählen die Bestimmung der genetischen Prädisposition, die Charakterisierung des Stadiums der Krankheit und das Monitoring des Heilungsfortschritts.

Marktreife weiterentwickeln. Das Projekt wird vom NCI (National Cancer Institute) mit 2,8 Mio. US\$ unterstützt [Philips, 2003].

4.3 Kontrastmittel für die Kernspintomographie

Bei der Kernspin- oder auch Magnetresonanztomographie (MRT) werden die inneren Gewebe indirekt über ihren Wassergehalt dargestellt. Zur Bildgebung bei diesem Verfahren wird die Energie gemessen, die beim Übergang von Wasserstoffkernen zwischen verschiedenen Energiezuständen in einem magnetischen Feld absorbiert wird. Eine Limitierung der MRT ergibt sich dadurch, dass die relative Dichte an Wasserstoffkernen in verschiedenen Geweben sehr ähnlich ist. Aus diesem Grund werden bei der Aufnahme von MRT-Bildern Kontrastmittel eingesetzt, die sich in bestimmten Geweben anreichern. Sie verändern den Energie-transfer zwischen Wasserstoffkernen und Molekülen in ihrer Umgebung und beeinflussen damit das MRT-Signal. Als Kontrastmittel werden vor allem Gadolinium-, Eisen- oder Mangan-Verbindungen sowie Fett- und Ölemulsionen eingesetzt.

Ein von Lanza et al. [2003] neu entwickeltes MRT-Kontrastmittel besteht aus einer Perfluorocarbon-Emulsion, wobei die Perfluorocarbon-Nanopartikel mit einer Lipidschicht umgeben sind. In die Lipidschicht können hunderte von Zielfindungsmolekülen, wie Antikörper oder Peptide, eingelagert werden. Zusätzlich werden etwa 50.000 Gadolinium-Chelatkomplexe als bildgebende Komponente an die Nanopartikel geheftet. Die Partikel werden derzeit auf ihre Eignung hin untersucht, arteriosklerotische Plaque zu diagnostizieren. Bei dieser Anwendung werden Zielfindungsmoleküle für Fibrin verwendet (Abb. 4.4). Fibrin-Ablagerungen sind Bestandteil feinsten Blutgerinnsel, die durch Risse in der Oberfläche der Plaque verursacht werden. In Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Methode für den Nachweis von Blutgerinnseln im Frühstadium eignet [Lanza et al., 2003].

Die Perfluorocarbon-Nanopartikel werden auch daraufhin untersucht, ob sie als Kontrastmittel für die Diagnose von Angiogenese eingesetzt werden können. Dabei wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Zielmolekül verwendet. Einem Wissenschaftlerteam der University of Washington ist es gelungen, mit solchen Partikeln Angiogenese im Frühstadium in Kaninchen nachzuweisen. Als eine potenzielle Anwendung des neuartigen Kontrastmittels wird der Nachweis von Krebsmetastasen gesehen.

Die ersten klinischen Tests der Perfluorocarbon-Nanopartikel als Kontrastmittel für die Diagnose von Arteriosklerose und Angiogenese sind in den kommenden Jahren geplant. Dabei gibt es auch Überlegungen, die Partikel als Delivery System für Wirkstoffe einzusetzen, so dass Therapie und Diagnose kombiniert werden können [Lanza et al., 2003].

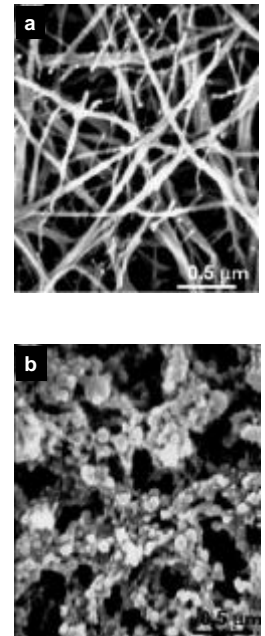


Abb. 4.4. A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Fibrin-Ablagerung, wie sie bei der Bildung von Blutgerinnseln auftritt. B) Anreicherung von Nanopartikeln mit Fibrin spezifischen Zielfindungsmolekülen auf der Fibrin-Ablagerung.

Quelle: [Lanza, 2003]

Nanopartikel für die
,herkömmliche‘ MRT-
Diagnostik

Auch in der ,herkömmlichen‘ MRT-Diagnostik, die keine Zielfindungsmoleküle einsetzt, werden Kontrastmittel auf Basis von Nanopartikeln verwendet. So reichern sich Eisenoxid-Nanopartikel nach intravenöser Injektion auch ohne zusätzliche Funktionalisierung in der Leber und der Milz an und können für die Untersuchung dieser Organe eingesetzt werden. Die Kontrastgebung der superparamagnetischen³ Eisenoxid-Nanopartikel ist etwa zwei Größenordnungen stärker als die herkömmlicher Gadolinium-Verbindungen, so dass MRT-Bilder mit deutlich höherer Empfindlichkeit aufgenommen werden können.

Ein interessanter Anwendungsbereich solcher Eisenoxid-Nanopartikel ist die Markierung von Zellen, mit dem Ziel, ihren Verbleib nach einer Transplantation zu verfolgen. Derzeit werden die Zellen für solche Experimente vor der Implantation ex vivo mit einem Farbstoff markiert. Durch Entnahme von Gewebe können die Zellen aufgrund der Markierung dann mit entsprechenden Nachweismethoden wieder identifiziert werden. Insbesondere für die Stammzellentherapie wird nun nach Methoden gesucht, mit denen die Verteilung implantierter Zellen in vivo sichtbar gemacht werden kann.

Bulte et al. [2001] haben ein Kontrastmittel auf Basis von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel entwickelt, das einen solchen in vivo Nachweis von Zellen ermöglichen soll. Um eine gute Zellgängigkeit zu erreichen, werden die Nanopartikel in das Gerüst von Dendrimeren eingelagert. Ersten Versuchen zu Folge weisen Zellen, die Magnetodendrimere aufgenommen haben, weder Wachstumsstörungen noch ein verändertes Verhalten in der Differenzierung auf. Die Eignung der Magnetodendrimere für die Markierung von Zellen wurde von Bulte et al. [2001] an Ratten untersucht. In den Experimenten konnte die Migration und die Verteilung von implantierten Zellen, mit Hilfe der magnetischen Markierung mit der MRT-Methode sichtbar gemacht werden. Das Wissenschaftlerteam geht davon aus, dass die Magnetodendrimere das Potenzial haben, zukünftig Anwendung als MRT-Kontrastmittel in der Stammzellentherapie zu finden.

Zwei Kontrastmittel auf Basis von Eisenoxid-Nanopartikeln, die für die ,herkömmliche‘ MRT eingesetzt werden und sich bereits in der klinischen Anwendung befinden, sind Endorem[®] (Guerbet) und Resovist[®] (Schering) [Weinmann, 2003]. Eisenoxid-Nanopartikel machen bislang jedoch nur einen verschwindend geringen Bruchteil des Gesamtmarktes an MRT-Kontrastmitteln aus, der 1999 auf 430 Mio. US\$ geschätzt wurde. Dies ist unter anderem auf den Neuigkeitsgrad der Technologie zurückzuführen und darauf, dass nanoskalige MRT-Kontrastmittel eher für Spezialanwendungen eingesetzt werden. Der Markt wird derzeit klar

³ Superparamagnetische Materialien wechselwirken mit einem magnetischen Feld, können jedoch nicht permanent magnetisiert werden.

von Gadolinium Produkten dominiert, was nicht zuletzt auch auf ihren frühen Markteintritt zurückzuführen ist.

4.4 Optische Methoden

Eines der optischen Verfahren in der medizinischen Diagnose, die sich bereits in der klinischen Anwendung befinden, ist die Photodynamische Diagnose (PDD). Bei dieser Methode wird dem Patienten oral oder durch Injektion ein Fluoreszenzfarbstoff (Photosensibilisator) verabreicht, der sich im Tumor anreichert. Durch Bestrahlung mit Laserlicht werden die Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz angeregt und der Tumor wird so sichtbar. Optische Methoden können aufgrund der geringen Eindringtiefe von sichtbarem und infrarotem Licht nur für die Untersuchung von oberflächennahem bzw. endoskopierbarem Gewebe angewendet werden. Neben der Diagnose lässt sich Licht auch zur Tumorthherapie einsetzen. In der sogenannten Photodynamischen Therapie (PDT) werden dieselben Photosensibilisatoren wie in der PDD genutzt, jedoch in einem anderen Wellenlängenbereich angeregt. Durch die Anregung des Farbstoffes werden in Gegenwart von Sauerstoff toxische Substanzen erzeugt, die die Krebszellen oxidativ zerstören.

Eine Weiterentwicklung in der optischen Diagnose ist die Verwendung von Zielfindungsmolekülen, die Krebsmarker aktiv erkennen. Eine solche molekulare Diagnosemethode wird zum Beispiel von Forschern am Massachusetts General Hospital in Boston entwickelt. Sie verwenden Farbstoffmoleküle, die an tumorspezifische Antikörper gekoppelt sind, zur Sichtbarmachung von Krebsgeschwüren. Nach dem Andocken des Antikörpers aktiviert ein tumorspezifisches Enzym den zunächst nicht fluoreszierenden Farbstoff. Eine endoskopisch herangeführte Lichtquelle bringt das Fluorophor dann zum Leuchten. Ein Gerät, das die Farbstoffe anregt und deren Fluoreszenz detektiert, ist von Siemens entwickelt worden und befindet sich derzeit in der Testphase. Die Technik kann überall dort angewandt werden, wo Lichtsignale endoskopisch registrierbar sind. Damit lassen sich Tumorherde mit bis zu Submillimeter Größe auf Hautflächen und in Hohlorganen, wie Bronchien, Magen und Darm, diagnostizieren.

Bei den optischen Methoden wird seit einigen Jahren auch der Einsatz von Nanopartikeln als bildgebende Komponente und als Delivery System diskutiert. Für das Anwendungspotenzial der Quantum-Dots (QDs) und Dendrimere in diesem Bereich sollen im Folgenden einige Beispiele gegeben werden.

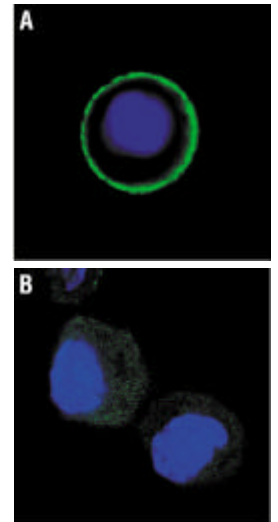


Abb. 4.5. Nachweis des Krebsmarkers Her2 mit Quantumdots, die mit Immunoglobulin (IgG) als Zielfindungsmolekül ausgestattet sind. A) Der helle Ring entsteht durch die Fluoreszenz der QDs, die sich an der Zelloberfläche der Krebszelle angelagert haben. B) Als Blindprobe eine gesunde Zelle, bei der kein Fluoreszenzsignal zu beobachten ist.

Quelle: [Wu et al., 2003]

Quantum-Dots

Das Anfärben von Zellen oder einzelnen Zellbestandteilen ist in der Biologie eine etablierte Technik. Die verwendeten organischen Farbstoffe weisen jedoch eine Reihe von Nachteilen auf, beispielsweise bleichen sie mit der Zeit aus und es besteht nur eingeschränkt die Möglichkeit der Multiplexanwendung, da jeder Farbstoff eine spezifische Anregungswellenlänge aufweist. Weiterhin ergeben sich Einschränkungen durch ihre Zytotoxizität und die häufig unzureichende Stabilität des Fluoreszenzsignals in biologischen Medien. Aus diesen Gründen werden seit einigen Jahren alternative Marker auf Basis von Nanopartikeln entwickelt, wie Quantum-Dots, Nanophosphore, RLS-Partikel und Dye-Doped Silikat-Nanopartikel (s. Kapitel 5). Von diesen Systemen sind die Quantum-Dots am weitesten in der Entwicklung fortgeschritten, und in den letzten Jahren sind drei vielbeachtete wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht worden, die Beispiele dafür geben, wie Quantum-Dots im biologischen Imaging, in Tierversuchen mittlerweile auch *in vivo*, eingesetzt werden können:

- 1) In einer Arbeit, die in der Zeitschrift *Nature Biotechnology* veröffentlicht wurde, haben Wu et al. [2003] QDs eingesetzt, um Krebsmarker an der Oberfläche von Zellen nachzuweisen (Abb. 4.5). Die Quantum Dots wurden mit Immunoglobulin als Zielfindungsmolekül ausgestattet und dann in Lösung auf eine Zellkultur gegeben. Durch die aktive Wechselwirkung des Zielfindungsmoleküls mit dem Krebsmarker Her2, der spezifisch für Brustkrebs ist, reicherten sich die QDs auf der Oberfläche der Zellmembran an und konnten über das Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden.
- 2) Dubertret et al. [2002] ist es gelungen, Zellen eines Froschembryos mit QDs anzufärben und so die Entwicklung einzelner Zelllinien zu verfolgen.
- 3) Larson et al. [2003] verwendeten Quantum Dots, um Blutgefäße in lebenden Organismen sichtbar zu machen. Mit Hilfe einer speziellen Fluoreszenztechnik konnten Blutgefäße, die sich einige 100 μm tief im Gewebe befanden, in lebenden Mäusen visualisiert werden.

Mit diesen Experimenten ist gezeigt worden, dass Quantum Dots ein vielseitiges Anwendungspotenzial für die Markierung von Geweben und biologischer Proben aufweisen. Bevor QDs als Biomarker für *in vivo* Studien in Tierexperimenten und später gegebenenfalls auch in der medizinischen Diagnostik weite Verbreitung finden können, muss erst noch ihre toxikologische Unbedenklichkeit nachgewiesen werden. Um in einer biologischen Umgebung toxische Effekte durch die Schwermetallbestandteile der QDs zu vermeiden, werden sie von einem biokompatiblen Material eingekapselt. Für das *In-vivo*-Imaging sind QDs beispielsweise in Phospholipidmizellen oder Polymerhüllen eingeschlossen worden [Larson et al., 2003; Dubertret et al., 2002]. Mäuse, an denen Imaging-

Experimente mit QDs durchgeführt wurden, zeigten keine sichtbare Schädigungen, so dass bislang davon ausgegangen wird, dass die QDs wieder ausgeschieden werden, bevor es zur Freisetzung der Schwermetalle kommt. Langzeitstudien zur Toxizität der QDs stehen jedoch noch aus.

Dendrimere

Die NASA und das National Cancer Institut finanzieren ein Projekt mit 11 Mio. US\$, in dem unter Einsatz von Nanopartikeln auf molekularer Ebene Krebs und andere Krankheiten diagnostiziert werden sollen [Sparks, 2002]. Das Projekt ist darauf ausgerichtet, Zellschädigungen zu erkennen, wie sie bei Astronauten aufgrund der besonders starken Strahlenbelastung auftreten: Sind Astronauten der Weltraumstrahlung längerfristig ausgesetzt, so sterben mehr und mehr Zellen aufgrund der Strahlenbelastung ab. Der Zelltod, die sogenannte Apoptosis, wird dabei durch bestimmte Enzyme, wie z. B. Caspase-3 verursacht, die die Zelle von innen zerstören. Für einen diagnostischen Test von Strahlenschäden sind weiße Blutkörperchen besonders geeignet, weil sie sehr sensitiv auf Weltraumstrahlung reagieren.

In dem NASA/NCI Projekt wird auf Basis von Dendrimeren ein Verfahren entwickelt, um den Zelltod in vivo nachzuweisen. Die Dendrimere werden dabei mit Zuckermolekülen ausgestattet, so dass sie von weißen Blutkörperchen inkorporiert werden. An das Dendrimer werden zudem zwei Farbstoffmoleküle gekoppelt. Wird das System mit Licht bestrahlt, so tritt keine Fluoreszenz auf, da das angeregte Farbstoffmolekül seine Energie an das zweite FRET-Farbstoffmolekül abgibt und damit die Fluoreszenzaktivität gelöscht wird (FRET-Effekt, Fluorescence Resonance Energy Transfer). Wird in einem weißen Blutkörperchen, welches das Dendrimer-System inkorporiert hat, Caspase-3 freigesetzt, so zerstört dieses Enzym die Bindung zum FRET-Farbstoffmolekül und das verbleibende Farbstoffmolekül zeigt bei Lichteinfall Fluoreszenz. Derzeit wird ein Retina-Scanner entwickelt, der die Fluoreszenz der Dendrimer-Systeme in der Netzhaut des Auges nachweisen soll.

4.5 Zusammenfassende Bewertung

In der Molekularen Bildgebung erfolgt die Diagnose auf der molekularen Ebene, womit es möglich werden soll, Krankheiten bereits vor Ausbruch der ersten Symptome zu erkennen. Die Molekulare Bildgebung ist damit Teil eines neuen Trends in der Medizin, der die Erhaltung der Gesundheit in den Mittelpunkt der medizinischen Versorgung rückt. Neben der Früherkennung von Krankheiten ermöglicht es die Molekulare Bildgebung auch, die Wirksamkeit eines Medikamentes über molekulare Marker der Krankheit praktisch in Echtzeit nachzuweisen. Somit könnte der Erfolg

einer medikamentösen Behandlung, insbesondere in der Krebstherapie, sehr viel früher, als es derzeit möglich ist, ermittelt werden. Dies eröffnet die Perspektive auf eine optimierte und auf den einzelnen Patienten angepasste Medikation. Darüber hinaus sind molekulare bildgebende Verfahren auch für die pharmazeutische Forschung interessant, um die Wirkweise von Wirkstoffkandidaten an Zellkulturen oder Tiermodellen nicht-invasiv untersuchen zu können.

Methoden der Molekularen Bildgebung werden derzeit für Magnetresonanz-, Ultraschall-, nukleare und optische Bildgebungsverfahren entwickelt. Unabhängig von der konkreten diagnostischen Methode wird dabei immer dasselbe Prinzip angewandt: Die bildgebende Komponente und ein Zielfindungsmolekül, das spezifisch an einen molekularen Marker im kranken Gewebe ankoppelt, werden über ein Nano- oder Mikropartikel miteinander verknüpft. Seit neuestem gibt es auch Versuche optische Methoden für die Diagnose einzusetzen, wobei aufgrund der geringen optischen Eindringtiefe des sichtbaren und des infraroten Lichtes nur Gewebe an der Oberfläche der Haut oder von Hohlorganen untersucht werden kann. Die Nanopartikel-Systeme, an denen in den letzten Jahren vor allem von amerikanischen Teams intensiver gearbeitet wurde, sind im Folgenden noch einmal aufgezählt:

- Ultraschall Methoden: Perfluorocarbon-Nanopartikel, die den hochempfindlichen Nachweis von Blutgerinnseln ermöglichen. Dabei werden Biotin-Avidin Kopplungsmechanismen für die Zielfindung genutzt. Weiterhin werden Mikrobläschen, für die Diagnose von Blutgefäßerkrankungen und von Krebs entwickelt. In der Tumordiagnose erfolgt das Targeting über $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Zielmoleküle.
- Nukleare Bildgebungsverfahren: Perfluorocarbon-Nanopartikel, die Tc-99 als bildgebende Komponente enthalten und für die Krebsdiagnose eingesetzt werden sollen. Als Zielmolekül dient, wie bei der Ultraschallmethode, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.
- Magnetresonanz-Methoden: Perfluorocarbon-Nanopartikel mit Gadolinium als bildgebende Komponente. Für den Nachweis von Blutgerinnseln erfolgt die Zielfindung über Moleküle, die spezifisch an Fibrin binden. In der Krebsdiagnostik wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Zielmolekül verwendet.
- Optische Methoden: Quantum Dots zur Detektion von Krebszellen unter Einsatz von Immunoglobulin G als Zielfindungsmolekül für den Krebsmarker Her2. Weiterhin sind QDs in Tierexperimenten für die Sichtbarmachung oberflächennaher Blutgefäße eingesetzt worden. Dendrimersysteme mit organischen Farbstoffen werden für den Nachweis von Strahlenschäden entwickelt.

Eine interessante Perspektive ergibt sich, wenn das nanoskalige bildgebende System gleichzeitig auch eine Drug-Delivery-Funktion übernimmt, so dass Diagnose und Therapie in einem Schritt erfolgen können.

Dieses Theranostik-Konzept wird in Zukunft vermutlich an Bedeutung gewinnen.

Der Umsatz mit konventionellen Kontrastmitteln für Ultraschallmethoden, Magnetresonanzmethoden und nuklear medizinische Verfahren betrug 1999 weltweit etwa 1,5 Mrd. US\$ [BCC, 1999]. Dies zeigt, dass sich molekulare Kontrastmittel in einem Marktumfeld mit durchaus interessantem Umsatzvolumen bewegen. Obwohl die Molekulare Bildgebung noch eine sehr junge Disziplin ist, sind bereits eine Reihe von molekularen Kontrastmitteln zugelassen worden. Bislang basiert jedoch keines von ihnen auf Nanopartikeln, deren Einsatz in der Molekularen Bildgebung sich noch weitgehend im Forschungsstadium befindet und deren Anwendung in der klinischen Diagnostik erst mittelfristig erwartet wird.

Ein wichtiger Aspekt für alle Kontrastmittel, die auf Basis von Nanopartikeln entwickelt werden, ist ihre Biokompatibilität. Weil vielfach mit neuen Materialien gearbeitet wird, die bislang noch nicht in der klinischen Anwendung sind, gibt es einen großen Forschungsbedarf, die Kontrastmittel auf ihre Biokompatibilität und Biostabilität zu prüfen. Bedarf besteht auch an der Entwicklung geeigneter Beschichtungen oder Verkapselungen, die es ermöglichen würden, unzureichend biokompatible Materialien als Kontrastmittel zu verwenden.

Bei der Entwicklung von bildgebenden Verfahren für die medizinische Diagnostik ist neben dem Kontrastmittel auch die zweite Komponente, das dazugehörige Messverfahren, zu berücksichtigen. Um die hohen Zielsetzungen zu erreichen, Krankheiten bereits im Frühstadium, also vor Ausbruch der Symptome, zu erkennen, sind sehr hohe Nachweisempfindlichkeiten notwendig. Vielfach sind zudem quantitative Aussagen erforderlich, wenn zum Beispiel der Heilungsprozess mit einem bildgebenden Verfahren dokumentiert werden soll. Um diese Zielsetzungen zu erreichen, wird eine enge Verzahnung der Kontrastmittelforschung mit den F&E-Aktivitäten auf dem Gebiet der Messverfahren als notwendig angesehen.

5 BIOCHIPS – WERKZEUGE FÜR DIE BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNG UND DIE MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms hat der Genomik, also der Erforschung des Aufbaus und der Funktion der Gene eines Organismus, einen gewaltigen Auftrieb gegeben. Eines der essenziellen Werkzeuge in der Genforschung sind sogenannte DNA-Chips, kleine Probenträger, die zur DNA-Analyse genutzt werden. Sie finden vor allem in der biomedizinischen Forschung Einsatz, um krankheitsverursachende Gene zu identifizieren oder zu sequenzieren. Zukünftig sollen sie auch verstärkt in der Diagnostik genutzt werden, z. B. für die Früherkennung von Krankheiten oder um die Medikamentenverträglichkeit von Patienten zu untersuchen. Die großen Fortschritte in der Genomik haben jedoch auch zu der Erkenntnis geführt, dass aktive Gene in einer Zelle nur schwach mit der Konzentration der von ihnen kodierten Proteine korreliert sind. Da praktisch alle Funktionen der Zelle auf Ebene der Proteine ablaufen, ist die Erforschung des Proteoms von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Zellfunktionen und für die Aufklärung von Krankheiten. Diese Erkenntnis hat zu verstärkten Anstrengungen geführt, Techniken, die für die DNA-Analyse eingesetzt werden, auf die Proteinanalyse zu übertragen. Mit den in der Entwicklung befindlichen Proteinchips sollen vor allem die Proteinexpression und die Signalwege in der Zelle analysiert werden.

Die Integration der Probenaufbereitung, der Nachweisreaktion und der Detektion der Reaktionsprodukte in ein miniaturisiertes Labor im Hemdtaschenformat ist ein weiterer Forschungstrend in der Biochip-Technologie. Solche Labs-on-the-Chip werden mit dem Ziel entwickelt, Arbeitsprozesse zu automatisieren und gleichzeitig den Probeneinsatz zu minimieren. Neben der DNA- und Proteinanalytik sollen solche Systeme mittelfristig auch für die medizinische Diagnose vor Ort in der Arztpraxis genutzt werden.

Das Gros der Biochips, wie sie heute in der biomedizinischen Forschung Verwendung finden, werden nicht als Nanobiotechnologie klassifiziert, da weder die laterale Strukturierung nanoskalig ist, noch Nanotechnologie in den Detektionssystemen eingesetzt wird. Jedoch gibt es mittlerweile verschiedene Ansätze, um mit Hilfe von Nanotechnologie derzeitige Chip-Plattformen zu verbessern oder um bestimmte Funktionalitäten zu erweitern.

Um das Anwendungspotenzial der Nanotechnologie für Biochips abzuleiten, ist ein Einblick in die Funktion, die Herstellungsweise, sowie in die Trends und Limitierungen der einzelnen Biochip-Systeme notwendig. Die erste Hälfte des Kapitels soll daher in die Grundlagen der Biochip-Technologie einführen, um dann in der zweiten Hälfte aufzuzeigen, wie Nanotechnologie zu ihrer Weiterentwicklung beitragen kann. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf Technologie- und Markttrends

gelegt, um herauszuarbeiten, in welchen Bereichen sich besondere Chancen ergeben, weitere Forschungsanstrengungen in Produkte mit hohem Marktpotenzial umzusetzen.

5.1 DNA-Chips

DNA-Chips sind kleine Probenräger, auf denen einzelsträngige DNA-Moleküle auf diskreten Positionen angeordnet sind, so dass sich gleichförmige Reihen und Spalten ergeben. Weisen die Spots mit immobilisierter DNA einen Durchmesser von weniger als 200 μm auf, so spricht man auch von Microarrays. Um DNA-Fragmente mit einem DNA-Chip nachzuweisen, wird die DNA in der Probe (Proben-DNA) entweder radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und dann mit dem Chip in Kontakt gebracht. Sind auf dem Chip DNA-Einzelstränge (im folgenden als Fänger-moleküle bezeichnet) immobilisiert, die zur Proben-DNA komplementär sind, so erfolgt ein Bindungsereignis, das heißt, die beiden DNA-Einzelstränge bilden eine Doppelhelix. Nach einem Waschvorgang, der ungebundene Probenmoleküle entfernt, wird der Chip ausgelesen. Bei Verwendung von Fluoreszenzmarkern erfolgt der Nachweis von Bindungsereignissen mit einem Fluoreszenzmikroskop. Über die Koordinaten eines Fluoreszenzsignals auf dem Chip lässt sich die Struktur der Proben-DNA, die durch komplementäre Fänger-moleküle gebunden wurde, eindeutig bestimmen.

Herstellung

Am weitesten verbreitet sind Chips auf denen cDNA oder Oligonukleotide immobilisiert sind [Shoemaker und Linsley, 2002]. Dabei werden zwei grundsätzliche Verfahren unterschieden: die in-situ-Synthese von Oligonukleotiden auf dem Chip und das Aufbringen ex situ hergestellter Oligonukleotide, cDNA oder RNA.

Der GeneChip[®] von Affymetrix, USA, ist für Gen-Expressionsanalysen der am weitesten verbreitete DNA-Chip (s. Abb. 5.1). Die Synthese der Oligomere mit bis zu 25 Basen erfolgt direkt auf dem Chip mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens. Dazu werden zunächst die untersten Bausteine auf dem Chip immobilisiert und dann mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen. Der Chip wird dann durch Masken mit UV-Licht bestrahlt, um an definierten Positionen die Schutzgruppen zu entfernen. Danach erfolgt an diesen Positionen die Ankopplung einer neuen Base. Wird dieser Prozess etwa 70 mal mit verschiedenen Masken wiederholt, so lassen sich Tausende von verschiedenen 25mer-Oligonukleotiden auf dem Chip synthetisieren. Mit diesem Verfahren können mittlerweile Chips mit 1,3 Mio. Spots hergestellt werden, wobei der Durchmesser eines Spots nur noch 11 μm beträgt. Der Nachteil der Methode liegt in den hohen Kosten der Masken und der relativ hohen

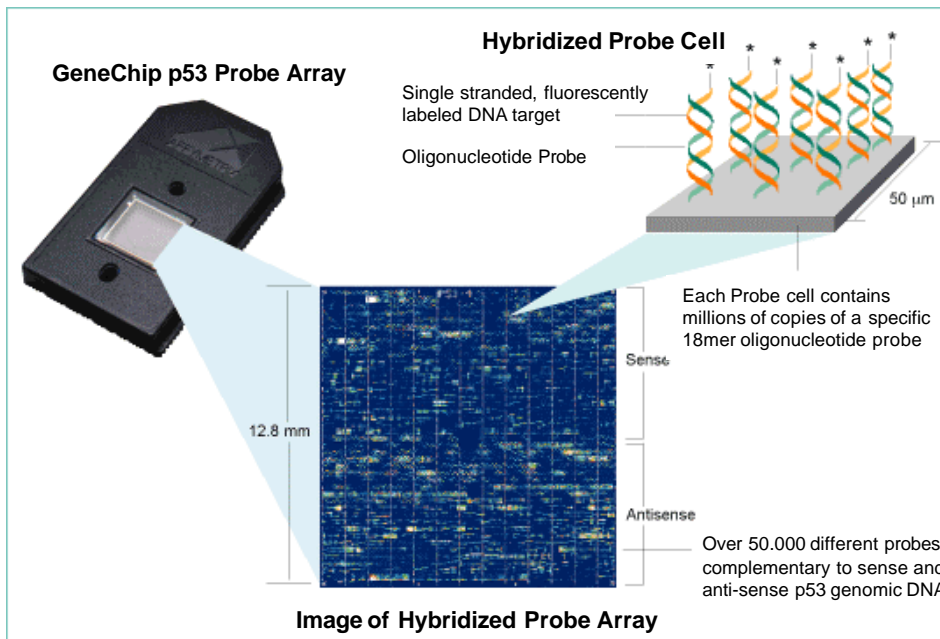


Abb. 5.1. Genechip[®] p53 von Affymetrix zur Analyse von 1262 Basen im Tumor-Suppressor-Gen p53. Der Chip wird für die Tumordiagnostik eingesetzt. Von rechts nach links: der DNA-Chip, grafische Darstellung der Ergebnisse eines Chip-Experiments und hybridisierte DNA auf einem Spot des Chips.

Quelle: Weizmann Institute of Science, <http://bip.weizmann.ac.ilmb/education/rtp1.gif>

Fehlerquote bei der Synthese. So werden nur etwa 28 % der Oligonukleotide fehlerfrei synthetisiert [Stekel, 2003]. Außerdem besteht kaum die Möglichkeit, die Chips auf Kundenwünsche anzupassen.

In einer ähnlichen aber deutlich kostengünstigeren Methode werden Inkjet Drucker genutzt, um die einzelnen Basenbausteine in lithographisch erzeugte Wells (Vertiefungen auf dem Chip) zu sprühen. Über Reaktions- und Waschschrte erfolgt ein sukzessiver Aufbau der Oligonukleotide. Dieses Verfahren ist vergleichsweise einfach zu handhaben und erlaubt die Synthese von Oligonukleotiden mit bis zu 60 Basen. Die Spotdichte ist jedoch deutlich geringer als bei den Affymetrix Chips.

Bei den sogenannten ex-situ-Verfahren werden bereits vorab synthetisierte Oligonukleotide (20-50 Basen) oder cDNA (500-2000 Basen) direkt auf den Chip aufgebracht. In den meisten Fällen werden dazu spezielle Plotter verwendet, die in Fertigungsroboter integriert sind. Bei diesen Verfahren werden typischerweise 0.3–0.6 nl Flüssigkeitsvolumen auf den Chip übertragen, und es können Spotdichten von etwa 10000 cm⁻² erreicht werden. Zu den Vorteilen der ex-situ-Verfahren zählen geringe Kosten und eine hohe Flexibilität, die es erlaubt, Chips spezifisch auf ein bestimmtes Experiment zuzuschneiden [Street, 2002; Winegarden und Woodgett, 2001; Gerhold et al., 1999].

Anwendungen

Genexpressionsstudien

Die häufigste Anwendung für DNA-Chips sind Genexpressionsstudien, in denen die Genaktivität zwischen gesundem und krankem Gewebe verglichen wird, um auf diesem Wege jene Gene zu bestimmen, die an einem bestimmten Krankheitsbild beteiligt sind. Für solche Studien wird die mRNA aus den beiden Gewebearten isoliert, in cDNA umgewandelt und mit zwei verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Proben werden dann mit einem DNA-Chip in Kontakt gebracht, dessen Fängermoleküle für bekannte Gene charakteristische komplementäre Basensequenzen enthalten (s. Abb. 5.2). Exprimierte Gene werden also durch Hybridisierungsreaktionen an die Fängermoleküle gebunden. Das sich ergebende Farbmuster zeigt damit an, welche Gene in welchen Zellen aktiv waren. Sind in beiden Zelltypen die gleichen Gene aktiv, so ergibt sich eine entsprechende Mischfarbe.

Eingesetzt werden Genexpressionsstudien, um eine veränderte Expression von Rezeptoren oder Enzymen aufzudecken und damit Krankheiten und deren Verlauf besser zu verstehen sowie Ansatzpunkte für die Thera-

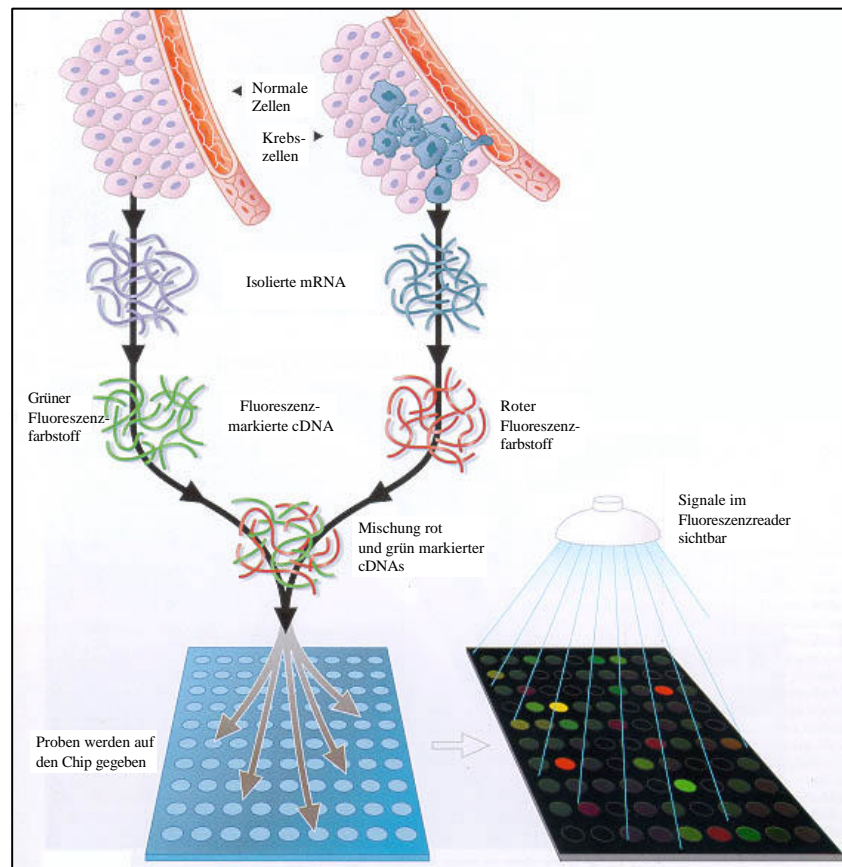


Abb. 5.2. Ablauf einer Genexpressionsstudie mit Hilfe von DNA-Chips.

Quelle: Informationssekretariat Biotechnologie, <http://www.i-s-b.org/wissen/broschuere/chip.htm>

pie zu finden [Spreyer, 1999]. Ein Beispiel für die Anwendung von Expressionsstudien in der präklinischen Entwicklungsphase sind toxikologische Tests: So kann ein Wirkstoff-Kandidat auf eine Zellkultur gegeben werden, um dann mit DNA-Chips zu untersuchen, ob dies zur Aktivierung von Krebsgenen geführt hat.

Die Bestimmung schwach exprimierter Gene ist jedoch aufgrund der geringen Signalintensität schwierig. Dies stellt eine Limitierung des Verfahrens dar, weil eine Vielzahl wichtiger regulatorischer Gene in die Gruppe der schwach exprimierten Gene fällt [Lampel, 2000].

Mit Hilfe von SNPs¹ sollen in umfangreichen Assoziationsstudien krankheitsfördernde oder –auslösende Gene identifiziert werden. Weiterhin soll es mit Hilfe von SNP-Mustern möglich werden, das Ansprechverhalten eines Patienten auf bestimmte Medikamente zu überprüfen und somit Therapien individuell auf Patienten zuzuschneiden. Zahlen aus der Onkologie lassen erahnen, welche Bedeutung solche Verfahren in Zukunft in der Medizin erlangen können: Oftmals sprechen nur 20-30 % der Patienten auf spezielle Wirkstoffe an, während sie bei 70 % nicht zur Therapie verwendet werden können.

Single Nucleotide
Polymorphisms

Bei der Resequencing Technology von Affymetrix wird von bekannten Genen jedes Basenpaar durch ein 25mer-Oligonukleotid repräsentiert, das die Information über das Basenpaar inklusive seiner Position im Gen repräsentiert. Für jedes „Gen-Oligonukleotid“ werden drei weitere „SNP-Oligonukleotide“, in denen die mittlere Base gegen eine der drei anderen Basen ausgetauscht ist, auf den Chip aufgebracht. Damit ist jede mögliche Variante des Gens auf dem Chip repräsentiert. Durch einen Vergleich der Hybridisierungsintensitäten der Oligomere, die das Gen repräsentieren, mit den „SNP-Oligomeren“ können die SNPs identifiziert werden [Gerhold et al., 1999].

Sind die SNPs bekannt, so kann für jeden Menschen eine individuelle SNP-Karte erstellt werden. Dazu müßte man Fängermoleküle, die alle bekannten SNPs repräsentieren, auf einem Chip immobilisieren, der anschließend mit der Patienten-DNA als Probe zusammengegeben wird. Die Auswertung der Bindungsereignisse würde dann das individuelle SNP-Muster des Patienten liefern [DZ Bank, 2001].

Bei der Nutzung von DNA-Chips zur Sequenzaufklärung werden Oligonukleotide bekannter und überlappender Sequenzen mit jeweils kleinen

Sequenzierung

¹ Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) stellen die häufigste Variation im menschlichen Genom dar. Dabei handelt es sich um einzelne Nukleotidpaare in einem Gen, die von Individuum zu Individuum einer Spezies verschieden sind. Sie sind über das gesamte Genom verteilt und treten in einem Abstand von etwa 1000 Basenpaaren auf. SNPs können zu genetisch bedingten Krankheiten oder zu Unverträglichkeit gegenüber Pharmaka führen.

Nukleotidunterschieden auf dem Microarray aufgebracht. Unter ausreichend stringenten Versuchsbedingungen erfolgt ausschließlich an den Fängermolekülen, die 100 % komplementär zu den aufgetragenen Proben sind, eine Hybridisierung. Aus dem resultierenden Signalmuster können dann die Gensequenzen in der unbekanntenen Probe rekonstruiert werden.

Marktpotenzial

Es gibt eine Vielzahl von Studien, die das Marktpotenzial der DNA-Chips untersucht haben. Obwohl die Analysteneinschätzungen zum Teil beträchtlich voneinander abweichen, so bewegen sie sich doch in der selben Größenordnung und weisen sehr ähnliche Steigerungsraten für die Zukunft auf. Eine Bioinsight Studie gibt für 1999 das weltweite Marktvolumen für DNA-Chips mit 150 Mio. US\$ an und prognostiziert für 2006 einen Umsatz von 750 Mio. US\$ [DZ Bank, 2001]. Diese Zahlen werden durch eine neuere Studie von Freedonia [2002] bestätigt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Umsätze mit der Peripherie von DNA-Chips, wie Chip-Arrayern, Auslesegeräten, Reagenzien und Software, größer sind als mit den DNA-Chips selbst: Für 2006 werden Umsätze im Peripheriesegment von knapp einer Milliarde US\$ erwartet.

Der größte Einzelbedarf für Biochip-Produkte, wenn auch zukünftig mit abnehmendem Anteil, besteht für die Genexpressionsprofilierung in der biomedizinischen Forschung (Abb. 5.3.); einem Einsatzbereich in dem Chips mit extrem hoher Spotdichte benötigt werden.

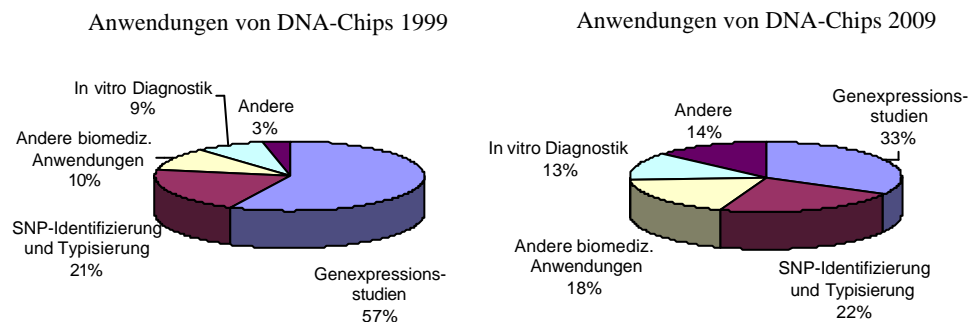


Abb. 5.3. Prozentualer Anteil der verschiedenen Anwendungsbereiche am Gesamtumsatz der DNA-Chips für 1999 und prognostiziert für 2009

Quelle: [DZ Bank, 2001]

Für Anwendungen außerhalb der biomedizinischen Forschung, die nach Prognosen selbst am Ende des Jahrzehnts nur ca. ein Viertel der Gesamtumsätze ausmachen sollen, wird eine hohe Spotdichte wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung sein. Hier wird es vielmehr darauf an-

kommen, eine geringe Anzahl an Genen, Proteinen oder anderen Molekülen mit hoher Zuverlässigkeit zu untersuchen. Dabei muß berücksichtigt werden, dass die neuen Werkzeuge für die individualisierte Medizin womöglich erst dann eingesetzt werden, wenn pharmakoökonomische Überlegungen Kosteneinsparungen im Gesundheitswesen sicher erscheinen lassen [DZ Bank, 2001].

Limitierungen und Trends

Während Titerplatten, wie sie in der Anfangsphase der Parallelisierung von biologischen Experimenten verwendet wurden, auf einer Fläche von 13 x 8,5 cm 24 Reaktionsgefäße beherbergten, ist die Miniaturisierung mittlerweile soweit fortgeschritten, dass DNA-Chips angeboten werden, auf denen mehr als 1 Mio. Reaktionen durchgeführt werden können. Ein Treiber für diese Entwicklung ist die mit der massiven Parallelisierung und Automatisierung verbundene Zeit- und Kostenersparnis. Der erhöhte Einsatz von Laborrobotik hat zudem zu einer verbesserten Präzision bei der Ausführung der Experimente geführt.

Spotdichte

Als langfristiges Ziel dieses Miniaturisierungstrends wurde bislang immer der Genom-Chip gesehen, der die Gesamtheit aller Gene einer Spezies enthält. Seit Herbst 2003 wird ein solcher Chip von Affymetrix angeboten, mit dem 38.500 menschliche Gene nachgewiesen werden können. Der Genomchip enthält 1,3 Mio. Spots mit einem Durchmesser von nur noch 11 µm. Obwohl das bislang gesetzte Ziel der Miniaturisierung mittlerweile erreicht ist, arbeitet Affymetrix an Chips mit einer noch höheren Spotdichte, die z. B. für SNP-Analysen eingesetzt werden sollen. Während für die Genomforschung eine weitere Erhöhung der Chipdichte also nach wie vor interessant ist, wird es bei biomedizinischen Anwendungen, in denen es um die Untersuchung spezifischer Gewebe und Krankheitsbilder geht, eher einen Trend zu geringeren Spotdichten geben. Dies liegt darin begründet, dass in einem bestimmten Gewebetyp nur 5000 - 10000 Gene nachgewiesen werden können, von denen viele keine relevante Information tragen. DNA-Chips für den Nachweis von 500 - 1000 Genen, die die entscheidende Information über Zellfunktionen tragen, sind daher für viele biomedizinische Anwendungen am geeignetsten. Mit ihnen lassen sich die Untersuchungen kostengünstiger und mit weniger Rechenaufwand durchführen [Winegarden und Woodgett, 2001].

Auf hochdichten DNA-Chips wird mit Spotgrößen von deutlich unter 100 µm gearbeitet und die Reaktionsgeschwindigkeit wird bereits durch die Spotgröße limitiert. Für eine typische PCR-Probe² sollte die Spotgröße etwa 100 µm betragen, damit die Reaktionsereignisse in einer

² Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) ist ein enzymatisches in-vitro-Verfahren zur Vermehrung (Amplifikation) von DNA-Sequenzen.

akzeptablen Zeitspanne eintreten. Dies bedeutet, dass bei einer weiteren Miniaturisierung der DNA Chips mit entsprechend höheren Konzentrationen der Proben-DNA gearbeitet werden muß, um keine Einbußen in der Nachweisempfindlichkeit hinnehmen zu müssen. Dies impliziert Proben volumina von einigen Pico- bzw. Femtolitern, einem Voluminareich, in dem die Handhabung von Flüssigkeiten, insbesondere wenn es sich um biologische Proben handelt, bis heute nur schwer beherrschbar ist [Bier und Kleinjung, 2001]. Um die Hybridisierung zu beschleunigen, gibt es mittlerweile allerdings auch technische Ansätze. Bei einem von Nanogen entwickelten System wird die Hybridisierung beispielsweise durch elektrische Felder und bei dem von Infineon entwickelten Flow-Thru-Chip durch eine spezielle Fluidik beschleunigt.

Nachweisempfindlichkeit

Für bestimmte Anwendungen im biomedizinischen Bereich stehen nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung, so dass hier ein Bedarf für analytische Methoden mit einer sehr hohen Nachweisempfindlichkeit gegeben ist. Ein Beispiel für solche Anwendungen ist der Einsatz von DNA-Chips in der Neurobiologie, wo mit Hilfe von Expressionsanalysen Zellen bestimmter Hirnregionen auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Gegenwärtig werden für eine solche Analyse bis zu mehrere Mikrogramm „total RNA“ benötigt. Dabei lässt sich größenordnungsmäßig abschätzen, dass für eine Probe von 10 µg „total RNA“ etwa eine Million Zellen benötigt werden. Aufgrund der besonders ausgeprägten Heterogenität des Gehirns ist es schwierig, genügend große homogene Gewebereiche zu finden, aus denen eine hinreichende Menge an RNA isoliert werden kann. Für diese Forschung ist daher ein Bedarf an DNA-Chips mit einer deutlich verbesserten Nachweisempfindlichkeit gegeben [Shoemaker und Linsley, 2002].

Verlässlichkeit

Obwohl DNA-Chips in der biomedizinischen Forschung bereits weit verbreitet sind, gibt es immer noch eine Reihe von Problemen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Experimente. Ein Vergleich von Expressionsstudien, die in verschiedenen Laboratorien mit identischen Proben durchgeführt wurden, hat eine deutliche Streuung der Ergebnisse ergeben [Petricoin et al., 2002]. Für solche Abweichungen gibt es eine Reihe von Gründen, von denen die wichtigsten im Folgenden kurz diskutiert werden sollen.

Ein Problem, das sich bei der Chipherstellung nach der Methode von Affymetrix ergibt, ist die Fehlerhäufigkeit bei der Oligonukleotid-Synthese. Wird bei den Reaktionsschritten eine Ausbeute von 95 % erreicht, so werden nur 28 % der 25-Oligomeren vollständig korrekt synthetisiert. Zu fehlerhaften Signalen kann es zudem bei geringen Abweichungen in der Nukleotidsequenz zwischen Fänger- und Probenmolekül kommen. In solchen Fällen treten Kreuzhybridisierungen auf, das heißt, ein Bindungsereignis tritt ein, obwohl die DNA-Stränge nicht vollständig komplementär sind. Eine weitere Fehlerquelle ist der Waschprozess, mit dem Proben-DNA, die nur in Teilsequenzen mit dem Fän-

germolekül übereinstimmt, entfernt werden soll. Da die Bindungskonstante zwischen dem Fänger- und dem Probenmolekül abhängig von dem Verhältnis zwischen A-T- und G-C-Bindungen ist, können die Waschbedingungen immer nur für einige DNA-Sequenzen optimal eingestellt werden und schwächer gebundene Proben-DNA wird mit dem Waschprozess teilweise entfernt. Eine quantitative Auswertung des Experimentes ist damit nur noch eingeschränkt möglich.

Aufgrund dieser zahlreichen Fehlerquellen werden Expressionsstudien auch als Zweifarbenexperimente (s. o.) durchgeführt, bei denen die Proben der gesunden und kranken Zellen auf demselben Chip analysiert werden. Bei zwei getrennt durchgeführten Experimenten würden die statistischen Abweichungen viel zu hoch sein, um die beiden Expressionsprofile aussagekräftig vergleichen zu können.

Da für klinische Anwendungen DNA-Chips absolut verlässliche Ergebnisse liefern müssen, wenn z. B. auf Basis einer SNP-Analyse über die Medikation entschieden wird, ist bis zum klinischen Einsatz dieser Analysemethode noch weitere Entwicklungsarbeit zu leisten. Dabei müssen für diagnostische Anwendungen nur wenige Parameter getestet werden, so dass hier ein Bedarf für Chips entsteht, die nur 50 – 250 Spots enthalten. Solche Chips sind am besten geeignet, um Proben spezifisch auf bereits bekannte DNA-Sequenzen zu testen, wie z. B. SNPs oder die DNA von Krankheitserregern. Markierungsfreie Systeme sind dabei von Vorteil, weil so ein Arbeitsschritt bei der Probenaufbereitung gespart werden kann. Im Idealfall sind die Systeme so empfindlich, dass bei der Probenaufbereitung auch auf die DNA-Amplifikation verzichtet werden kann, um so das Kontaminationsrisiko zu minimieren und einen weiteren Arbeitsschritt zu sparen.

Erfordernisse für
klinische Anwendungen

Von vielen Experten wird erwartet, dass die Chiptechnologie in der Diagnostik zur Routineanwendung³ wird, sobald Chiptypen der zweiten Generation erhältlich werden, die robust und zuverlässig arbeiten und einfach zu bedienen sind [Bean, 2001]. Eine weitere essenzielle Voraussetzung für den Routineeinsatz von Biochips in der Diagnostik sind erheblich niedrigere Preise für die Biochips. Während DNA-Chips derzeit je nach Anwendung einige hundert US\$ kosten, wird von Seiten der Industrie als Voraussetzung für einen Biochip-Massenmarkt ein Preis in der Größenordnung von einigen US\$ pro Chip genannt.

³ Die diagnostischen Anwendungen der Biochips sind nicht zu verwechseln mit den bereits in Routineanwendung befindlichen Gentests der Forensik, in denen der genetische Fingerabdruck eines Menschen bestimmt wird. Diese Tests basieren auf den Bereichen der DNA, die keine Information für die Proteinsynthese enthalten. Werden diese nichtcodierenden Bereiche, die etwa 92-95 % der gesamten DNA darstellen, enzymatisch verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, so entsteht ein für jeden Menschen charakteristisches Bandenmuster, das z. B. zum Täterschaftsnachweis in der Forensik genutzt werden kann.

5.2 Proteinchips

Trotz der großen Fortschritte in der Genomforschung hat sie bislang kaum dazu beigetragen, krankheitsverursachende Proteine zu identifizieren. Dies liegt darin begründet, dass die Konzentration der mRNA in einer Zelle nur schwach mit der Konzentration des korrespondierenden Proteins korreliert. Um die Funktion der Proteine bei der Entwicklung von Krankheiten zu bestimmen, bleibt daher keine andere Möglichkeit, als sie direkt zu messen [Mitchell, 2002]. Dabei ist die Komplexität des menschlichen Proteoms mit geschätzten 0,5 bis 1 Million Proteinen ungleich größer als die des Genoms mit seinen 30000-40000 Genen. Die höhere Anzahl an Proteinen erklärt sich dadurch, dass bereits während des Transkriptionsprozesses aus einer DNA-Sequenz verschiedene mRNA-Moleküle erzeugt werden können. Darüber hinaus unterliegen Proteine durch chemische Reaktionen weiteren Modifikationen. Die für den Proteinnachweis eingesetzten Methoden, wie 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie (MS), sind in der herkömmlichen experimentellen Konfiguration für Hochdurchsatz-Experimente nicht geeignet. Es besteht daher ein Bedarf an neuen Nachweismethoden, die es erlauben, eine große Anzahl von Proteinen parallel zu analysieren. Durch den enormen Erfolg der DNA-Chips inspiriert, wird daher in den letzten Jahren intensiv an der Entwicklung von Proteinchips gearbeitet.

Dabei reicht die Analogie der beiden Chiptypen nicht sehr weit. Während sich die Struktur der DNA aus der Abfolge von 4 verschiedenen Basen ergibt, bestehen Proteine aus 20 verschiedenen Aminosäuren. DNA ist ein vergleichsweise stabiles Molekül, das durch PCR vervielfacht oder über ein Standardverfahren synthetisiert werden kann. Außerdem wird die chemische Reaktivität der DNA kaum durch die Sequenz der Basenpaare beeinflusst.

Proteine sind hingegen chemisch vergleichsweise labil und ihre Eigenschaften sind maßgeblich durch ihre Struktur bedingt, die sich bei Kontakt mit Oberflächen ändern kann. Bei Proteinen werden die chemischen Eigenschaften zudem durch die Sequenz der Aminosäuren entscheidend beeinflusst, daher können sie sich stark in ihrem chemischen Verhalten unterscheiden: Sie können hydrophil oder hydrophob sein und saure oder basische Eigenschaften aufweisen. Darüber hinaus gibt es bislang kein einfaches Verfahren, Proteine auf synthetischem Wege herzustellen oder zu vervielfältigen. Aufgrund dieser Eigenschaften der Proteine stellt die Herstellung von Proteinchips eine große Herausforderung dar, und die Fortschritte sind nicht so rasant wie bei der Entwicklung der DNA-Chips. Zu den technischen Hürden bei der Herstellung von Proteinchips zählen,

- 1) die Bereitstellung geeigneter Fängermoleküle, die mit den gesuchten Proteinen Bindungen eingehen,

- 2) die Herstellung geeigneter Oberflächen, auf denen Proteine immobilisiert werden können, ohne dass sie ihre tertiäre Struktur und damit ihre biologische Aktivität ändern,
- 3) die Entwicklung geeigneter Nachweisverfahren mit hoher Sensitivität, die einen entsprechend großen Messbereich aufweisen, der die Variabilität der Proteinkonzentrationen in einer Zelle abdeckt [Mitchell, 2002].

Herstellung

Zu den Materialien, die bei der Herstellung von Proteinchips zur Anwendung kommen, gehören Nitrozellulose, Polyvinylidenfluorid (PVDF), Silikon, Glas und Kunststoff. Am häufigsten werden Glasscheiben verwendet, die mit speziellen Silanreagenzien oder poly-L-Lysin vorbehandelt werden, um die Proteine zu immobilisieren. Andere Materialien, die zur Beschichtung verwendet werden, sind Gold, Aluminium, hydrophile Polymere und Polyacrylamid-Gele. Jedes Material erfordert eine spezielle Chemie, die gewährleistet, dass die Fängermoleküle die richtige Orientierung aufweisen und gleichzeitig eine hydrophile Umgebung schafft, in der Reaktionen mit den Proteinen stattfinden können.

Die Chip-Plattform

Die Firma Zyomyx, USA, hat eine Chipplattform entwickelt, bei der sich die Proteine in photolithographisch produzierten „Microwells“ befinden, so dass sie immer von einer wässrigen Lösung umgeben sind und nicht durch „Austrocknung“ denaturieren. Diese Technik erlaubt die Fertigung hochdichter Chips mit mehr als 10.000 Spots, die für die Suche und Validierung von Wirkstoff-Targets eingesetzt werden sollen.

Eine andere Strategie verfolgt Packard (mittlerweile von Perkin Elmer aufgekauft) mit ihrem Hydrogel Chip. Der Chip besteht aus einem porösen Polyacrylamidgel, auf das die Fängerproteine aufgedruckt werden. Für die Immobilisierung werden Kopplungsreagenzien verwendet, die die Proteinmoleküle kovalent an die Oberfläche binden. Auch bei dieser Technik befinden sich die Fängermoleküle in einer wässrigen Phase.

Um die Proteine auf die Chips aufzubringen, werden Ink-Jet oder Contact Printing Methoden verwendet, ähnlich wie sie auch für DNA-Chips eingesetzt werden.

Die wohl größte Herausforderung bei der Herstellung von Proteinchips ist die Bereitstellung geeigneter Fänger- bzw. Testmoleküle, wie Antikörper, Antikörper-Surrogate, Aptamere oder Proteine. Um Zugang zu der enormen Anzahl an Antikörpern oder Proteinen zu bekommen, die für hochdichte Proteinchips benötigt werden, haben die Chip-Hersteller Allianzen mit Protein- bzw. Antikörperbanken geschlossen. Solche Proteinbanken stellen große Mengen mit Hilfe von Viren produzierter Proteine bzw. Antikörper bereit.

Die Fängermoleküle

Affibody AB, Stockholm, stellt Antikörper-Surrogate her, die Antikörpern hinsichtlich der Bindungseigenschaften sehr ähnlich, zugleich chemisch aber deutlich stabiler sind. Die Surrogate bestehen aus 58 Aminosäuren, sie sind gut löslich in wässrigen Medien und mit Hilfe von Bakterienkulturen einfach zu erzeugen. Eine weitere Klasse von Fängermolekülen sind Aptamere. Sie bestehen aus einzelsträngigen DNA-Molekülen, die abhängig von der Basensequenz definierte 3D-Strukturen ausbilden, die es ermöglichen, praktisch jedes Protein mit hoher Affinität und Selektivität zu binden. Wird Thymin gegen Deoxyuridin ausgetauscht, so können Photoaptamere hergestellt werden, die durch Einstrahlen von UV-Licht eine kovalente Bindung zu spezifischen Stellen der Proteine ausbilden. Dies ermöglicht eine sehr rigorose Waschprozedur, mit der ungebundene Proteine von dem Substrat entfernt werden können. Die verbleibenden gebundenen Proteine lassen sich dann mit einem universellen Farbnachweis für Proteine detektieren [Boguslavsky, 2003].

Detektion

Da es für Proteine kein Vervielfältigungsverfahren wie die PCR für DNA gibt, müssen die für Proteinchips verwendeten Nachweisverfahren hochempfindlich sein. Die gängigsten Nachweisverfahren arbeiten mit Fluoreszenzmarkern oder radioaktiven Markern. Diese Methoden verfügen über eine hohe Nachweisempfindlichkeit, jedoch besteht das Problem, dass durch die Marker die Reaktivität der Proteine beeinflusst wird. Zwei analytische Techniken, die ohne Marker auskommen, sind MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer) und die SPR-Spektroskopie (Surface Plasmon Resonance).

Bei der MALDI-MS Methode werden Proteine mit einem Laserstrahl von der Substratoberfläche desorbiert und dann mit einem Massenspektrometer analysiert. Ein Vergleich von Massenspektren verschiedener Proben gibt dabei direkt Aufschluß über die Unterschiede in der Proteinexpression, oftmals können die Proteine auch direkt über ihre Masse identifiziert werden.

Die SPR-Spektroskopie basiert auf Änderungen des Brechungsindex der Substratoberfläche, die durch gebundene Proteinmoleküle hervorgerufen werden. Diese Technik bietet den Vorteil, dass Messungen in-situ durchgeführt werden können, das heißt, der Chip braucht vor der Analyse nicht gewaschen werden, um ungebundene Proteine zu entfernen. Damit wird es auch möglich, kinetische Parameter des Bindungsprozesses direkt zu messen [Mitchell, 2002; Lee und Mrksich, 2002].

Anwendungen

Hinsichtlich der Anwendung werden *Analytical* Proteinchips und *Functional* Proteinchips unterschieden [Zhu and Snyder, 2003]. Auf den *Analytical* Proteinchips werden Antikörper, Antikörper-Surrogate oder andere Fängermoleküle immobilisiert, um Proteine in Lösungen nachzu-

weisen und zu quantifizieren. Sie werden in den folgenden Bereichen angewandt:

- **Target Identifikation:** Messung der Protein-Expressionsprofile, um Proteinkonzentrationen mit Krankheitsbildern und –verläufen korrelieren zu können. Kann ein bestimmtes Protein als krankheitsauslösend identifiziert werden, so besteht ein Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Wirkstoffes, der die krankheitsauslösenden Mechanismen inhibiert.
- **Diagnose:** Durch den Nachweis von Proteinen soll es möglich werden, die Ursachen und die Verläufe von komplexen Krankheiten, wie z. B. Krebs, präziser vorherzusagen, ähnlich wie es heute bereits mit DNA-Chips versucht wird.
- **Pharmakogenomik:** Patienten reagieren auf bestimmte Medikamente oftmals sehr unterschiedlich. Führen Medikamente bei einer sehr kleinen Gruppe von Patienten zu Nebenwirkungen, so kann dies zur Folge haben, dass das Medikament überhaupt nicht zugelassen wird. Die individuelle Ausprägung der Medikamentenverträglichkeit hat genetische Ursachen und ist letztendlich auf die Expression bestimmter Proteine zurückzuführen. In diesem Zusammenhang können Proteinchips eingesetzt werden, um Patienten auf die Verträglichkeit von Medikamenten zu untersuchen.

Functional Proteinchips enthalten eine große Anzahl von Proteinen oder sogar das gesamte Proteom einer Spezies und werden eingesetzt, um Protein-Protein-, Protein-DNA- oder Enzym-Substrat-Wechselwirkungen zu untersuchen. Solche Chips finden vor allem in der Wirkstoffforschung und der Grundlagenforschung Anwendung [Zhu und Snyder, 2003]:

- **Erforschung der Signalwege in einer Zelle:** Proteinchips, die das Proteom eines Organismus enthalten, können zur Untersuchung individueller Protein-Protein Wechselwirkungen eingesetzt werden. Diese Wechselwirkungen geben Aufschluss über die Signalwege innerhalb einer Zelle, die auch bei pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen und Targets für Wirkstoffe darstellen.
- **Nachweis von Konformationsänderungen und Modifikationen,** wie Glykolisierung oder Phosphorylierung, der Proteine. Insbesondere die Phosphorylierung ist ein Kontrollmechanismus, der viele Aspekte des Zelllebens reguliert. Die anormale Phosphorylierung von Proteinen spielt z. B. eine wichtige Rolle bei Krankheiten, wie Krebs, Rheuma und Diabetes. Der Nachweis der Phosphorylierung mit Proteinchips ist daher sowohl in der Wirkstoffforschung als auch für die medizinische Diagnose von großem Interesse.

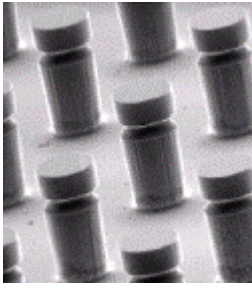


Abb. 5.4. Zyomyx Proteinchip: Gezeigt sind die säulenartigen Spots, auf denen die Proteine immobilisiert werden.

Quelle: Current Drug Discovery, <http://www.currentdrugdiscovery.com/2002/may.html>

Marktpotenzial

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Proteomik für die Wirkstoffforschung wird erwartet, dass die Proteinchips zu einem Werkzeug mit herausragender Bedeutung für die pharmazeutische Industrie werden. Entsprechend optimistisch waren vor einigen Jahren noch die Einschätzungen einiger Marktstudien bezüglich des Marktpotenzials der Proteinchips. So wurde z. B. in einer Studie von BioPerspectives [2002] (früher BioInsights) der Markt für Proteinchips im Jahr 2006 auf 700 Mio. US\$ geschätzt. Nachdem die Produktentwicklung im letzten Jahr deutlich langsamer voranschritt als erwartet, wird in einer neuen Studie von BioPerspektives [2003] das Marktvolumen für Proteinchips generell nur noch halb so hoch eingeschätzt und für das Jahr 2007 ein Umsatz von 400 Mio. US\$ prognostiziert. Langfristig soll das Marktpotenzial für Proteinchips jedoch größer als das für DNA-Chips sein.

Ciphergen, USA, gehört zu den wenigen Unternehmen, die bereits kommerzielle Proteinchips anbieten. Dabei nimmt der Chip, der für Expressionsstudien vermarktet wird, eine Sonderstellung ein, da er eine Art chromatographische Oberfläche darstellt, die 8 bis 16 Spots für die Affinitätsbindung von Proteinen enthält. Zur Analyse werden die Proteine mit einem Laser desorbiert und dann mit einem Massenspektrometer nachgewiesen. Biacore bietet einen SPR-basierten Proteinchip an, der allerdings nur aus einem einzigen Spot besteht. Derzeit wird an einer Array-Version des Chips mit einigen hundert bis 1000 Spots gearbeitet [Mitchell, 2002; Lee und Mrksich, 2002]. Im Februar 2003 hat Zyomyx, USA, seine Protein Profiling Technologie am Markt eingeführt. Der entwickelte Chip besteht aus 6 Zellen, die jeweils 200 säulenartige Spots aufweisen, auf denen Antikörper oder Antikörperfragmente als Fänger-moleküle immobilisiert sind (Abb. 5.4).

Limitierungen und Trends

Aufgrund der komplexen Struktur und der chemischen Labilität der Proteine ist die Herstellung von Proteinarrays im Vergleich zu DNA-Chips deutlich aufwändiger. Dabei gibt es eine ganze Reihe von Hürden, die die Markteinführung und –durchdringung der Proteinchips bisher erschwert haben:

1) Fängermoleküle

Als eines der größten Probleme wird derzeit die Bereitstellung einer hinreichenden Anzahl spezifischer Antikörper angesehen. Antikörper zu isolieren, zu reinigen und anzureichern ist auch heute noch mit einem enormen Zeit- und Forschungsaufwand verbunden. Darüber hinaus benötigen

viele Kunden Proteinchips, die an ihre speziellen Forschungsprobleme angepasst sind und entsprechend ausgewählte Fängermoleküle tragen.

2) Chemisches Verhalten der Proteine

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von Proteinchips ist die chemisch labile Natur der Proteine. Um biologisch aktiv zu sein, müssen sie in einer bestimmten dreidimensionalen Struktur vorliegen. Ein Kontakt mit Oberflächen kann diese Struktur zerstören (Denaturierung), womit die Proteine nicht mehr ihr natürliches Bindungsverhalten aufweisen. Ein besonderes Problem stellen Membranproteine dar, die nicht nur sehr schwer zu reinigen und zu kristallisieren sind, sondern auch besonders leicht auf der Chipoberfläche ihre natürliche Aktivität verlieren. Ein Ziel bei der Herstellung von Proteinchips ist es daher, die Oberflächen der Chips zu optimieren, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Dabei werden verschiedene Ansätze diskutiert, wie SAMs (Self-Assembled Monolayers), nanostrukturierte Oberflächen oder Biomaterialien. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Oberflächen für die Proteinchips sind Unternehmen kaum bereit, über technische Details Auskunft zu geben.

3) Detektion

Da Proteine in sehr unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb der Zelle und in Körperflüssigkeiten auftreten, sind die Ansprüche an die Dynamik der Nachweismethoden extrem hoch. So muss der Empfindlichkeitsbereich bei der Detektion etwa 7 Größenordnungen für Zellproben und 12 Größenordnungen für Blutproben betragen, um das gesamte Spektrum der Proteine abdecken zu können. Für DNA-Proben beträgt der Konzentrationsbereich etwa 4 Größenordnungen. Dies entspricht gerade dem maximalen Dynamikbereich der Fluoreszenz und massenspektroskopischen Nachweismethoden. Eine Lösungsstrategie für dieses Problem ist der Einsatz separater Chip-Plattformen für Proteine, die in hohen und solche, die in niedrigen Konzentrationen auftreten. Da die Markierung von Proteinen zu einer Änderung ihrer Reaktivität führen kann, gelten markierungsfreie Detektionssysteme, wie die SPR- und die Massenspektroskopie, als besonders aussichtsreiche Ausleseverfahren für Proteinchips.

Inwieweit hochdichte Proteinchips, auf denen ein Großteil des Proteoms einer Spezies aufgetragen ist, auf eine starke Nachfrage stoßen werden, ist bislang ungewiss. Nach Aussagen von Analysten und Marktstudien ist es eher wahrscheinlich, dass viele Anwender ein höheres Interesse an niedrigdichten Proteinchips haben, die Messungen mit einer hohen Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit für spezielle biomedizinische und klinische Anwendungen ermöglichen [Economist, 2003]. Es ist daher

durchaus denkbar, dass die Markteinführung dieser Technologie mit Proteinchips erfolgt, die nur einige 10 bis 100 Spots aufweisen, bevor sich hochdichte Chips durchsetzen können. Sollte dies zutreffen, so würde die Einführung der Proteinchips den umgekehrten Weg der DNA-Chips gehen.

5.3 Labs-on-a-Chip

Unter Labs-on-a-Chip (LOCs) versteht man miniaturisierte Laboratorien, in denen komplexe chemische Prozesse durchgeführt werden. Für diese Systeme gibt es eine Reihe von Einsatzmöglichkeiten, von denen hier nur die biomedizinischen erläutert werden sollen. Gemäß des analysierten biologischen Materials können dabei drei Anwendungsbereiche unterschieden werden: die Analyse von DNA, Proteinen und Zellen (s. Abb. 5.5).

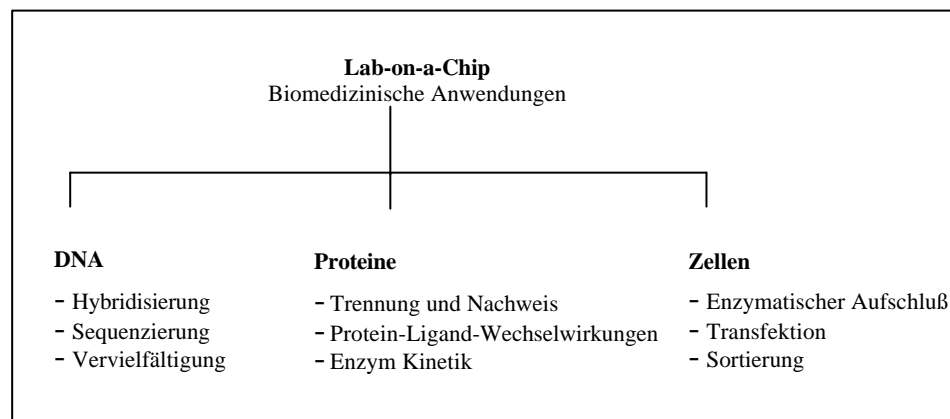


Abb. 5.5. Das Anwendungspotenzial von Labs-on-a-Chip in der biomedizinischen Forschung.

Die Besonderheit der LOCs besteht darin, dass Flüssigkeiten und Chemikalien in Kanälen und Reaktoren gehandhabt werden, deren Breite nur einige 10 bis 100 μm beträgt. In solch schmalen Kanälen weisen Flüssigkeiten laminare Strömungsprofile auf, und ihre Durchmischung erfolgt im Wesentlichen durch Diffusionsprozesse, die im Vergleich zur turbulenten Mischung sehr viel langsamer sind. Das Wissenschaftsfeld, das sich mit der Handhabung von Flüssigkeiten, wie Transport, Mischung, und Trennung, unter solchen Bedingungen beschäftigt, ist die Mikrofluidik. Ihr kommt in der LOC-Technologie daher eine besondere Bedeutung zu.

Aufgrund der Miniaturisierung und dem monolithischen Aufbau weisen LOCs entscheidende Vorteile im Vergleich zur herkömmlichen Labortechnik auf, die sich folgenderweise zusammenfassen lassen [Chovan und Guttman, 2002]:

- Geringe Totvolumina und reduzierter Reagenzienverbrauch
- Monolithischer Aufbau ermöglicht billige Massenfabrikation
- Die Mikrofluidik führt zu einem verbesserten Masse- und Wärmetransfer. Dadurch können Reaktionsbedingungen präziser gesteuert und höhere Ausbeuten erreicht werden.
- Der Zeitbedarf für Analysen kann durch die Parallelisierung von Arbeitsprozessen drastisch reduziert werden.

Herstellung und Funktionselemente

Die Verfahren, mit denen LOCs hergestellt werden, sind vielfach aus der Mikrostrukturtechnik entliehen⁴. Als Materialien werden hauptsächlich Glas, Silizium und verschiedene Polymere, wie Polydimethylsiloxan, Polycarbonat und Teflon, verwendet. Zu den wichtigsten Herstellungsmethoden zählen Photo- und Soft-Mikrolithographie, sowie Formtechniken und Mikrofabrikationsverfahren, die Laser oder elektrochemische Reaktionen nutzen [Chovan und Guttman, 2002].

Die Schnittstelle zwischen der Laborwelt und dem LOC ist die Probeninjektion. Die Proben werden entweder über eine Kapillare oder über einen Druckgradienten in den Chip eingesogen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Mikropipetten für die Injektion zu verwenden.

Innerhalb des Chips kann der Transport der Flüssigkeiten z. B. durch einen Druckgradienten erfolgen oder über elektroosmotische Prozesse. Bei letzteren wird ausgenutzt, dass die Oberflächen der mikrofluidischen Kanäle immer eine gewisse Ladung aufweisen, die in Gegenwart einer Flüssigkeit zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht führen. Wird eine Spannung angelegt, so bewegt sich die Flüssigkeit aufgrund dieser Doppelschicht in die durch die Polung der Spannung vorgegebene Richtung. Um Flüssigkeiten miteinander zu mischen, werden die Kanalwände strukturiert, so dass turbulente Strömungsmuster erzeugt werden [Knight, 2002].

Zur Auftrennung geladener Moleküle, wie z. B. DNA, können Elektrophorese-Techniken angewandt werden. Dabei werden DNA-Bruchstücke entlang eines elektrischen Gradienten durch ein Gel gezogen. Da die Wandergeschwindigkeit der Fragmente abhängig von ihrer Größe ist, wird hiermit eine Auftrennung der Probe erreicht. Um Reaktionen in den mikrofluidischen Systemen zu kontrollieren, kann z. B. die Reaktionszeit über die Geschwindigkeit, mit der die Flüssigkeiten durch die Reaktionskammer strömen, eingestellt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit,

⁴ Ein deutsches Unternehmen, das mit Mikrostrukturierungstechniken Fluidik-Komponenten aus verschiedensten Materialien, wie Silikon, Glas, Keramik und Kunststoff, herstellt, ist die Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH (GeSiM) in Großberkmannsdorf.

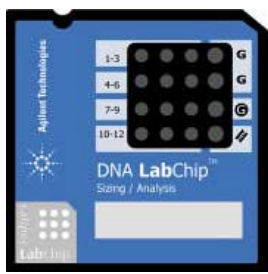


Abb. 5.6. Lab-on-a-Chip von Agilent, der eingesetzt wird, um zu testen ob RNA-Proben für DNA-Microarray Experimente geeignet sind.

Quelle: Agilent Technologies, <http://www.labs.agilent.com>

die Temperatur des Reaktors über Mikroheizelemente und –sensoren zu steuern.

Für die Detektion von Biomolekülen in LOCs sind eine Reihe von Verfahren angewandt worden, wie Fluoreszenzmethoden, Massenspektrometer und elektrochemische Methoden. Bei den Fluoreszenzmethoden wird ein analoges Verfahren genutzt, wie in der DNA-Chip Technologie, das heißt die Probemoleküle müssen vor der Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden [Auroux et al., 2002].

Marktpotenzial

Das erste kommerzialisierte LOC-Produkt für biomedizinische Anwendungen war der 2001 von Agilent eingeführte 2100 Bioanalyzer (s. Abb. 5.6). Diese Plattform kann für verschiedene Arbeitsprozesse in der Biomedizin eingesetzt werden, wie z. B. Gen- und Proteinexpressionsanalysen, Reinigung von Proteinen oder Isolation von RNA [Derwent, 2002]. In einer Marktanalyse von Freedonia [2002] wird der Umsatz von LOCs im Jahr 2006 auf etwa 180 Mio. US\$ geschätzt.

Anwendungen

LOCs können für viele Bereiche in der Forschung und Diagnostik eingesetzt werden, die auch schon für Protein- und DNA-Chips beschrieben worden sind. Im Folgenden sind die drei wichtigsten Anwendungsfelder noch einmal aufgeführt:

- Integrierte und automatisierte Probenaufbereitung für DNA- und Proteinchips
- Untersuchung und Manipulation von Zellen, wie z. B. das Sortieren Reinigen und Klonieren von Zellen⁵
- Langfristig wird für LOCs auch ein großes Anwendungspotenzial im Point-of-Care Bereich gesehen, insbesondere für die Diagnose von Krankheiten und Krankheitserregern sowie in der Pharmakogenetik.

Limitierungen und Trends

Die Mikrofluidik ist eine der Kerntechnologien, ohne die der Aufbau von LOCs nicht möglich ist. Eines der verbleibenden Probleme der LOC-Fluidik ist die Tendenz von Biomolekülen, sich an den Wänden der Kanäle abzulagern. Es ist daher von hohem Interesse, die fluidischen Systeme so weiterzuentwickeln, dass ein Transport der Biomoleküle

⁵ Evotec Technologies, Hamburg, hat mit Cytoman[®], Cytocon[®] und Elektra[®] bereits drei Lab-on-a-Chip Systeme auf den Markt gebracht, mit denen Zellen getrennt, analysiert und kloniert werden können.

ohne Wandkontakt möglich ist. Um dies zu erreichen, kann mit einer sogenannte hydrodynamischen Fokussierung gearbeitet werden, bei der die Probe röhrenförmig von einer Schutzflüssigkeit umhüllt ist [Berlin und Chan, 2003]. Eine weitere Herausforderung in der LOC-Technik ist die Positionierung des biologischen Materials mit nanoskaliger Genauigkeit, wie es für bestimmte Nachweismethoden notwendig ist.

5.4 Zellchips

Ein erst vor einigen Jahren entwickelter Chip-Typ ist der Zellchip, der für verschiedene Anwendungen in den Bereichen Zell- und Wirkstoffforschung eingesetzt wird. Obwohl die Größe von Zellen bis einige 10 μm beträgt, reagieren Zellen empfindlich auf nanoskalige Oberflächenstrukturen (s. Kapitel 8, Tissue Engineering). Darüber hinaus sind Ionenkanäle und Rezeptoren, also die funktionellen Biomoleküle an der Oberfläche der Zelle, nanoskalig. Um Zellen zu untersuchen, ergibt sich daher ein prinzipieller Bedarf an technischen Systemen, die in einer ähnlichen Größenordnung liegen. So können Zellen beispielsweise mit Oberflächenstrukturen, die in der Vertikalen nanoskalig sind, topografisch geführt werden. Auch bei einzelnen funktionalen Elementen der Biochips, wie Poren oder Sensoren, spielen nanoskalige Abmessungen eine Rolle. So beträgt bei bestimmten Chiptypen, mit denen Zellsignale gemessen werden, der Abstand zwischen Sensorelement und Zelloberfläche nur 10-20 nm. Aufgrund der frühen Entwicklungsphase der Zellchip-Technologie soll das Anwendungspotenzial der Nanotechnologie hier nicht vertiefend behandelt werden, und wir beschränken uns auf die Diskussion von drei Anwendungsbeispielen:

1) Zell-Microarrays für die Wirkstoffforschung

In einer Arbeit von Schwenk et al. [2002] wird die Verwendung von Zell-Microarrays für die Charakterisierung von Antikörpern beschrieben. Ein Problem bei der Herstellung von Proteinchips ist die Immobilisierung der Proteine auf der Chipoberfläche, da hierbei die dreidimensionale Proteinstruktur erhalten bleiben muss. Dies kann in vielen Fällen mittlerweile erreicht werden, jedoch ist der Aufwand hoch, insbesondere für die sehr empfindlichen Transmembran-Proteine. Als Alternative zu den Proteinchips sind Zell-Microarrays entwickelt worden, mit denen Moleküle charakterisiert werden sollen, die spezifisch auf Proteine der Zellmembran einwirken. In den von Schwenk et al. [2002] vorgestellten Experimenten werden Zell-Microarrays mit einem kommerziellen Microarray hergestellt. Die verwendeten Zellen verfügen dabei über einen bekannten Satz an Membranproteinen (Antigene). Die Chips werden mit Lösungen von jeweils einem Antikörper in Kontakt gebracht. Nach einem Färbeschritt werden die Bindungsereignisse dann mit einem

Fluoreszenzverfahren nachgewiesen. Solche Experimente eignen sich, um Antikörper, die spezifisch mit Membranproteinen reagieren, hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften zu charakterisieren.

Ein anderer Ansatz wurde von Ziauddin und Sabatini [2001] gewählt, um Zell-Microarrays herzustellen, die für die Identifikation von Wirkstoff-Targets und Zell-Proteinprodukten eingesetzt werden sollen. Für die Herstellung der Chips wurde cDNA rasterförmig auf ein Substrat aufgedruckt und dann mit einem Lipid-Transfektionsreagenz versetzt. Danach wird der Chip in ein Kulturmedium eingebracht und mit Zellen geimpft. Die Zellen werden mit der cDNA transfiziert und es bilden sich Zellpopulationen an den entsprechenden Rasterpunkten des Substrats, die die Expressionsprodukte der cDNA enthalten. Die exprimierten Proteine können dann mit Antikörpern nachgewiesen werden.

2) Chips für Ionenkanalstudien

Ionenkanäle steuern den Elektrolythaushalt der Zelle und spielen bei vielen Krankheiten eine besondere Rolle. Es besteht daher ein großes Interesse, die Funktion der Ionenkanäle und Möglichkeiten zu ihrer Manipulation zu verstehen. Um Ionenströme zu messen, wird bisher zumeist die Patch Clamp Technik verwendet, bei der eine mit Elektrolytlösung gefüllte Pipette mit einer Apertur von 1-2 μm an die Membran einer Zelle gepresst wird. Mit dieser Technik können Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle gemessen werden. Das Ansetzen der Pipette an die Zelle ist jedoch sehr zeitaufwendig und erfordert hoch qualifiziertes Fachpersonal.

Um solche Messungen zu automatisieren und parallelisieren, sind mikrostrukturierte Glaschips entwickelt worden, die eine Öffnung (Apertur) mit einem Durchmesser von nur einem Mikrometer enthalten. Für Messungen an Ionenkanälen wird eine Zelle auf die Apertur geschoben und mit Unterdruck ein Membranfleck aus der Zelle herausgelöst, der in der Apertur zurückbleibt. An den in der Membran fixierten Ionenkanälen können dann Transportmessungen ausgeführt werden. Aufgrund der planaren Geometrie können auch Nahfeld-optische Methoden und konfokale Fluoreszenzmikroskope für kombinierte spektroskopische und elektrophysiologische Untersuchungen an Ionenkanälen eingesetzt werden [Fertig et al., 2001].

Bislang enthalten die verwendeten Glaschips nur eine einzelne Apertur, aber die Fertigung von Apertur Arrays lässt sich technisch ohne große Hürden realisieren. Ein solcher Ionenkanal-Chip kann z. B. für die Charakterisierung von Wirkstoffkandidaten für Ionenkanal-Targets eingesetzt werden. Dies wäre von großem Interesse für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheiten wie Herzrhythmusstörungen, Migräne und Epilepsie. Ein Start-up Unternehmen, das Chips für Ionen-

kanalstudien herstellt und maßgeschneiderte Lösungen für die Pharma-industrie entwickelt, ist die NanIon Technologies GmbH in München.

3) Neuro-Chip

Ein Chip, mit dem sich die elektrischen Signale von Zellen untersuchen lassen, ist von Infineon in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München, entwickelt worden. Dieser auf CMOS-Basis aufgebaute Chip verfügt an der Oberfläche über 128 x 128 Sensoren pro Quadratmillimeter (s. Abb. 5.7). Einzelne Zellen werden in einer Nährlösung direkt auf das Sensorfeld des Neuro-Chip platziert und können dort zu neuronalen Netzen zusammenwachsen. Mit diesem Chip ist es möglich, die elektrischen Signale von Neuronen (Nervenzellen) und ganzen Neuronenverbänden mit bislang unerreichter Genauigkeit zu messen. Jede Zelle liegt dabei auf mindestens einem Sensor, da der Abstand der Sensoren 8 μm beträgt, während Neuronen typischerweise einen Durchmesser zwischen 10-50 μm aufweisen. Der Chip ist vor allem für die Erforschung der Wechselwirkungen der Zellen untereinander konzipiert worden. Durch Messungen mit diesem Chip soll es möglich werden, ein tieferes Verständnis von Lern-, Gedächtnis-, und Wahrnehmungsvorgängen zu gewinnen. Anwendungspotenzial für den Chip wird aber auch im diagnostischen Bereich gesehen.

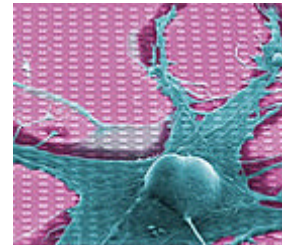


Abb. 5.7. Eine lebende Nervenzelle auf dem Neuro-Chip, der von Infineon in Zusammenarbeit mit dem MPI für Biochemie entwickelt wurde.

Quelle: Infineon, <http://www.infineon.com/>

5.5 Nanotechnologie für die Weiterentwicklung von Chip-Plattformen

5.5.1 Entwicklung von Nanoarrays

Rasterkraftmikroskopie

Rasterkraftmikroskopie, auch als AFM (Atomic Force Microscopy) bezeichnet, ist das Arbeitspferd der Nanotechnologie. Die Technik basiert auf einer scharfen, nur wenige Nanometer dicken Spitze, die an einem Federarm befestigt ist. Die Spitze wird mit Piezotechnik oberhalb der Probe positioniert und dann zur Abrasterung der Probenoberfläche verwendet. Die repulsiven intermolekularen Kräfte zwischen der Spitze und den Oberflächenmolekülen führen zu einer Auslenkung des Federarms, die mit einem Laserstrahl abgetastet wird. Mit einem AFM lassen sich Oberflächenstrukturen mit einer Auflösung von wenigen Nanometern abbilden (s. auch Kapitel 7.1). Zu den Nachteilen des Verfahrens zählen die aufwändige Probenvorbereitung und deutlich längere Messdauern im Vergleich zu den optischen Ausleseverfahren.

Auf Basis der AFM-Technologie ist von Prof. Mirkin, Northwestern University, die Dip-Pen Nanolithography entwickelt worden. Bei dieser

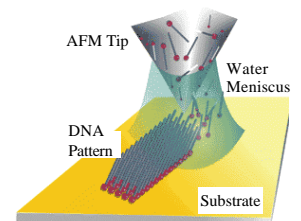


Abb. 5.8. Verwendung der Dip-Pen Nanolithography, um DNA auf ein Substrat aufzutragen.

Quelle: Northwestern University, <http://www.northwestern.edu>

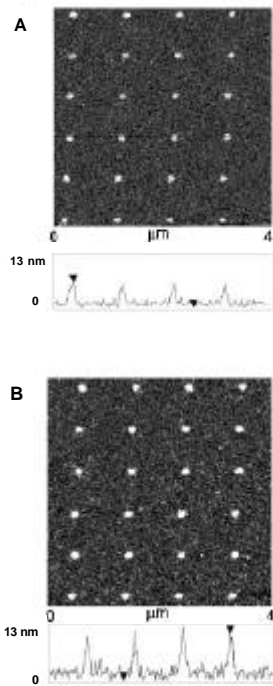


Abb. 5.9. Detektion von Bindungsereignissen mit einem AFM: Protein-Nanoarray A) vor und B) nach Eintreten der Bindungsereignisse.

Quelle: [Lee et al., 2002b]

Mithilfe dieser Methode wird eine AFM-Spitze genutzt, um Moleküle auf eine Substratoberfläche aufzutragen (s. Abb. 5.8). Die Technik verwendet dabei das Prinzip einer einfachen Schreibfeder (Dip-Pen): Die Spitze des AFMs wird in „molekulare Tinte“ getaucht und dann oberhalb der Substratoberfläche positioniert. Durch Wasser, das aus der unmittelbaren Umgebung zwischen AFM-Spitze und Oberfläche kondensiert, bildet sich eine Kapillare, über die die Moleküle von der AFM-Spitze auf das Substrat transportiert werden. Wird die Spitze bewegt, so lassen sich auf dem Substrat Strukturen auftragen, deren Breite nur 20 nm beträgt.

In einer Science-Veröffentlichung beschreiben Lee et al. [2002], wie mit der Dip-Pen Nanolithography (DPN) Protein-Nanoarrays mit einer Spotgröße von 100 nm hergestellt werden können. Bindungsereignisse konnten mit einem AFM über die Veränderung der Höhe der Spots nachgewiesen werden (s. Abb. 5.9). Mit dieser Methode sind auch DNA-Arrays produziert worden, deren Spotgröße lediglich 50 nm betrug. Damit ist es möglich, ein Array mit 100000 DNA-Spots auf der Fläche eines Spots eines herkömmlichen Arrays zu realisieren.

Bevor solche Arrays kommerziell hergestellt werden können, muss die DPN noch parallelisiert werden, um so die Produktionsdauer von Nanochips zu verkürzen. Dazu sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Mirkin bereits Pen-Arrays hergestellt worden mit mehr als 10000 individuellen Spitzen, mit denen entsprechend 10000 verschiedene Moleküle auf ein Substrat aufgetragen werden können.

Die DPN-Technologie wird von dem Unternehmen NanoInk, Chicago, kommerzialisiert. Single-Pen DPN-Writer befinden sich seit Frühjahr 2003 auf dem Markt, und in den nächsten Jahren soll eine breite Palette an Peripherieprodukten, wie verschiedene „Schreiblösungen“ (Proteine, DNA, Nanopartikel etc.), Software und Pen-Arrays, angeboten werden.

Bioforce, USA, ist ein weiteres Unternehmen, das bereits Produkte für die Herstellung und das Auslesen von Nanoarrays auf den Markt gebracht hat. Der von Bioforce entwickelte Nanoarrayer[®] erlaubt es, Biomoleküle mit einem Abstand von weniger als 1 µm auf einem Substrat zu positionieren [Henderson, 2003]. Details der Technologie sind bislang nicht veröffentlicht worden.

Ob Nanoarrays breite Verwendung für die Proteom- und Genomforschung finden werden, ist unter Wissenschaftlern umstritten. So erfordert diese Technologie hohe Investitionen; außerdem muss mit extrem kleinen Probenvolumina im Pico- bis Femtoliterbereich gearbeitet werden, was bislang noch technische Probleme aufwirft. Jedoch weisen Nanoarrays auch eine Reihe von Vorteilen auf, die ihre Anwendung für bestimmte Forschungszwecke interessant werden lassen :

- Die extrem geringen Probenmengen, die für die Nanochip-Analytik benötigt werden, sind von Vorteil, wenn z. B. das Proteom einer einzelnen Zelle untersucht werden soll.

- Der Nachweis von Bindungsereignissen kann markierungsfrei mit einem AFM erfolgen. Darüber hinaus muss nach Inkubation mit der Probe der Chip nicht gespült werden, sondern die Messung kann direkt in der Probenflüssigkeit erfolgen.

Das Unternehmen Solexa, UK, setzt ebenfalls auf Nanoarray Technologie mit dem Ziel, das *1000 US\$ Genome*⁶ zu realisieren. Auf dem entwickelten Sequenzierungs-Chip wird eine Dichte von 10^8 Spots pro cm^2 erreicht, wobei jeder Spot nur ein Molekül enthält. Der Einzelmolekülansatz ermöglicht es, die Sequenzierung eines menschlichen Genoms mit nur einem Chip durchzuführen, wobei auf eine Amplifizierung (PCR) der Proben-DNA verzichtet werden kann. Details der Technologie sind bislang nicht veröffentlicht worden.

DNA-Selbstorganisation

Im Arbeitskreis von Prof. Bier (FhG-IBMT) wird ein grundlegend anderer Ansatz verfolgt, um nanoskalige laterale Strukturen zu erzeugen: In einem vom BMBF geförderten Projekt (BIOFUTURE-Wettbewerb) wird mit Hilfe der Dielektrophorese einsträngige DNA zwischen Interdigital-Elektroden „gespannt“, deren Abstand nur wenige Mikrometer beträgt. Durch die Basensequenz der DNA-Stränge wird somit ein Nanometer-raster zwischen den Elektroden definiert. Wird eine DNA-Probe mit dem Chip in Kontakt gebracht, so hybridisieren DNA-Probenmoleküle an komplementären Basensequenzen der aufgespannten DNA-Stränge und können über ihre Position mit optischen Methoden identifiziert werden. Bei dieser Technik werden also einzelne Spots auf einem Chip einfach durch lange DNA-Stränge mit einer bekannten Basensequenz ersetzt. Hölzel et al. [2003] konnten bereits zeigen, dass sich DNA mit dieser Methode strecken und spezifisch zwischen Elektroden fixieren lässt. Das Anwendungspotenzial solcher DNA-Nanostrukturen reicht von der Herstellung neuartiger Nanochips für die DNA-Analyse über DNA-Elektronik bis hin zur Erforschung von Zellprozessen, wie der Wechselwirkung zwischen DNA und Proteinen.

5.5.2 Nanotechnologie für Chipoberflächen

Monoschichten

Eine Möglichkeit, die Oberflächen von Proteinchips zu optimieren, ist die Beschichtung der Substrate mit Monoschichten aus organischen

⁶ Mit *1000 US\$ Genome* wird die Genotypisierung einer Spezies in weniger als einem Tag bei Kosten von weniger als 1000 US\$ bezeichnet.

Molekülen. Damit lässt sich verhindern, dass Proteine unspezifisch an der Substratoberfläche gebunden werden. Weiterhin bieten solche Schichten den Vorteil, dass immobilisierte Fängermoleküle, wie Proteine und Antikörper, ihren natürlichen aktiven Zustand beibehalten.

Das Unternehmen MicroSurfaces, Minneapolis, verwendet für die Herstellung von Biochip-Beschichtungen Moleküle, die aus einer „teflon-artigen“ Kopfgruppe bestehen und am anderen Ende ein Linker-Molekül tragen, das eine Bindung mit der Substratoberfläche eingeht. Die Schichten weisen eine Stärke von 1-3 nm auf und sind an ihrer Oberfläche hydrophil. Diese Beschichtungen eignen sich auch für den Einsatz in der Lab-on-a-Chip Technologie.

Houseman and Mrksich [2002] verwenden sogenannte selbstorganisierende Monoschichten (SAMs, Self-Assembled Monolayers), um Biochips zu beschichten. Die SAM-Moleküle tragen an einem Ende eine Thiolgruppe, die an die Substratoberfläche bindet, und am anderen Ende eine Polyethylenglykolgruppe, an die Fängermoleküle kovalent gebunden werden können.

Nanostrukturierte Oberflächen

Das Unternehmen SuNyx, Köln, stellt superhydrophobe Oberflächen her, auf denen Wassertröpfchen fast die Form einer idealen Kugel aufweisen. Somit wird erreicht, dass der Oberflächenkontakt des Tröpfchens auf ein Minimum reduziert ist. Um solche superhydrophobe Eigenschaften zu erzeugen, werden nanostrukturierte Oberflächen mit einem hydrophoben Material beschichtet.

Die SuNyx-Technologie lässt sich bei der Herstellung von Biochips einsetzen, um z. B. biologisches Material präziser zu positionieren: Werden auf einer superhydrophoben Chip-Oberfläche hydrophile Spots aufgetragen, so ist die Spotgröße des zu positionierenden biologischen Materials genau auf die Größe der hydrophilen Fläche begrenzt. Ein weiterer Einsatzbereich für die SuNyx-Technologie sind zweidimensionale Labs-on-a-Chip. Bei der 2D-Fluidik werden Flüssigkeiten nicht in mikrofluidischen Kanälen, sondern auf einem Netzwerk planarer Bahnen bewegt. Für solche Chips werden Materialien benötigt, deren Benetzungsgrad möglichst gering ist, damit sich auf den Flüssigkeitsbahnen ideale Tropfen mit minimalem Oberflächenkontakt ausbilden können.

Ein Chipsystem, das aus planaren Flüssigkeitsnetzwerken aufgebaut ist, wurde von dem Unternehmen Advalytix, Brunenthal, realisiert. Flüssigkeitstropfen werden bei diesem System durch akustische Oberflächenwellen (SAW-Technologie) auf fluidischen Bahnen bewegt. Die verwendeten SAW-Bauelemente, die einen berührungsfreien Transport von Flüssigkeiten ermöglichen, werden auch als Nanopumpen bezeichnet.

5.5.3 Nanopartikel Fluoreszenzmarker

Für den Nachweis von Bindungsereignissen auf Biochips, insbesondere DNA-Chips, werden vor allem organische Farbstoffe (Fluorescein, Cy3, Cy5, Rhodamin etc.) als Fluoreszenzmarker verwendet. Diese Marker besitzen eine Reihe von inhärenten Nachteilen: Sie bleichen aus, wobei der Ausbleichprozess je nach Farbstoff unterschiedlich schnell ist, und sie sind ungeeignet für Multiplexanwendungen. Auch besteht ein Bedarf an Markern mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal. In den vergangenen Jahren hat es daher verstärkte Forschungsaktivitäten gegeben, um Markersysteme mit verbesserten Eigenschaften herzustellen, wie Quantumdots, Nanophosphore, Gold-Nanopartikel und Dye-Doped Silikat-Nanopartikel (s. Tab. 5.1).

Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuartiger Marker ist der Aufbau multiplexfähiger Assayformate⁷. Bei diesen Assays werden sowohl Fängermoleküle als auch die Probenmoleküle mit einem Farbstoff markiert. Wird mit mehreren Fängermolekülen gearbeitet, so muss die Markierung entsprechend mit verschiedenen Farbstoffen erfolgen, um sie unterscheiden zu können. In diesem Fall spricht man von Multiplexing. Quantum Dot Corp., USA, hat für solche Anwendungen nanoskalige Latexkugeln entwickelt, die an der Oberfläche eine Kombination verschiedenfarbiger Quantum-Dots enthalten und so mit einer Art Spektral-Strichcode ausgestattet sind. Fängermoleküle eines bestimmten Typs werden auf einem Latexkugeln mit einem bekannten Spektral-Strichcode immobilisiert. Werden solche Beads mit der Probe in Kontakt gebracht, so erfolgen Affinitätsbindungen zwischen Fänger- und passenden Probenmolekülen. Bindungsereignisse können dann optisch anhand des Markers am Probenmolekül nachgewiesen werden und die Identifizierung des Probenmoleküls erfolgt ebenfalls optisch über den Spektral-Strichcode des Beads. Multiplexfähige Assays ermöglichen also den Nachweis verschiedener Probenmoleküle in einem homogenen Assay-Format, das für viele Anwendungen preisgünstiger und experimentell weniger aufwändig als der Einsatz von Biochips ist.

Multiplexfähige Assays

Das Anwendungsspektrum der Fluoreszenzmarker geht über den Einsatz in der Biochip-Analytik hinaus. Sie können für eine Vielzahl von Assay-Formaten und vor allem auch für das *in vivo* Imaging von Biomolekülen eingesetzt werden. An dieser Stelle sollen nur die technischen Aspekte der Fluoreszenzmarker vorgestellt und im Hinblick auf Biochipanwendungen und alternative Assay-Formate diskutiert werden. Ihr Einsatz im Bereich Bio-Imaging wird im Kapitel "In-vivo-Diagnostik" beschrieben.

⁷ Ein Assay ist ein chemischer oder biologischer Test, bei dem die Aktivität eines biologischen Zielmoleküls (oft ein Protein) in Gegenwart anderer Substanzen (oft chemische Substanzen) geprüft wird. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der Begriff Assay vielfach als Synonym für Test, Probe oder Nachweisverfahren verwendet.

Tab. 5.1. Qualitativer Vergleich der verschiedenen Markersysteme für Biomoleküle. √ = trifft zu, – = trifft nicht zu.

	Langzeitstabilität	Multiplexing	nicht toxisch	höherer Signalintensitäten als organische Marker	Am Markt eingeführt
Organische Fluorophore	-	-	-	-	√
RLS Particles®	√	[√]	√	√	√
Quantum-Dots	√	√	-	√	√
Nanophosphore	√	√	√	√	-
Dye-Doped Silikat-Nanopartikel	√	-	√	√	-

Gold-Nanopartikel

Werden Gold-Nanopartikel von einheitlicher Größe und Form mit weißem Licht bestrahlt, so erzeugen sie ein intensives Streusignal, dessen Farbe von der Form und der Größe der Partikel abhängt. Dieser Effekt wird als Resonance Light Scattering (RLS) bezeichnet und ist allgemein bei kolloidalen Metallpartikeln zu beobachten. Das Unternehmen Genicon, USA, hat auf Basis von RLS-Goldpartikeln ein Labelsystem für Biochipanwendungen entwickelt. Aufgrund der großen Intensität des gestreuten Lichtes kann mit diesen Nanopartikeln eine 10fach bessere Nachweisempfindlichkeit für Bindungsereignisse erreicht werden als mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen. In Genexpressionsstudien wurde mit dieser Technologie eine dreifach höhere Anzahl an unterschiedlich stark exprimierten Genen bestimmt als mit herkömmlichen Fluoreszenzmarkern [Genicon, 2003]. Ein erstes Komplettsystem für Einfarb-Genexpressionsstudien inklusive der Chipplattform und bildverarbeitenden Software wird von Genicon bereits angeboten und über Qiagen vermarktet.

Die CLONDIAG GmbH ist ein weiteres Unternehmen, das eine Biochip-Plattform entwickelt hat, bei der Gold-Nanopartikel als Marker eingesetzt werden [Adelhelm et al., 2002]. Bei ihrem ArrayTubes®-System wird die Proben-DNA mit Gold-Nanopartikeln markiert und dann mit einer Silberbeschichtung verstärkt. Bindungsereignisse auf dem Chip können mit einem einfachen optischen Reader ausgelesen werden. Bei diesem Verfahren werden also keine kostenintensiven Fluoreszenzreader benötigt. Für die in-situ-Synthese von Oligonukleotiden wird ein spezielles paten-

tiertes Druckverfahren verwendet, das die Herstellung von Chips mit mehr als 1000 Spots bei einer Spotgröße von nur 32 μm ermöglicht. Aufgrund der einfachen Handhabung und des geringeren finanziellen Aufwands im Vergleich zu den Fluoreszenzsystemen steht mit dem ArrayTubes[®]-System eine Plattform zur Verfügung, die die Array Technologie einem breiten Nutzerkreis in Forschung und Anwendung zugänglich macht.

Quantenpunkte

Quantenpunkte (Quantum-Dots), wie sie in der biomedizinischen Forschung definiert und verwendet werden, sind Nanometer große Partikel ($< 50 \text{ nm}$) mit einem Kern aus einem Verbindungshalbleiter, wie z. B. CdS, CdSe, CdTe, und einer anorganischen Hülle aus z. B. ZnS (s. Abb. 5.10). Sie weisen besondere optische Eigenschaften auf, da absorbiertes Licht in einer anderen Wellenlänge emittiert wird, analog zum Prinzip der Fluoreszenz. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist dabei eine Funktion der Größe des Quantum-Dots und seiner chemischen Zusammensetzung. Wissenschaftlern am MIT und der University of California in Berkeley ist es mittlerweile gelungen eine Polymerbeschichtung zu entwickeln, die es ermöglicht die Quantum-Dots in Wasser zu handhaben und Biomoleküle anzukoppeln. Auf Basis von Quantum-Dots lassen sich auch hoch multiplexfähige Assays durchführen. Dazu wurden von der Firma Quantum Dot Corporation, USA, nanoskalige Latexkügelchen entwickelt, die mit einer Kombination verschiedenfarbiger Quantum-Dots ausgestattet sind (s. oben).

Die Quantum-Dot Technologie gilt nach mehreren Jahrzehnten der Forschung (v. a. in den USA und Russland) mittlerweile als ausgereift. Die Produktion ist aufgrund der mehrschaligen Struktur und der Oxidationsempfindlichkeit der Precursormaterialien jedoch vergleichsweise aufwändig. Auch die Toxizität der verwendeten Schwermetalle ist im Vergleich zu Nanophosphoren ein Nachteil.

Technologieführer auf dem Gebiet der Quantum-Dots ist die Firma Quantum Dot Corporation, die in der zweiten Jahreshälfte 2002 mit der weltweiten Vermarktung von Quantum-Dots für Anwendungen in der Biotechnologie begonnen hat. Die Firma besitzt exklusive Vermarktungslizenzen für Quantum-Dot Anwendungen von den Erfindern der ZnS-beschichteten Quantum-Dots, M. Bawendi, MIT, und P. Alivisatos, Berkeley.

Nanophosphore

Mitte der 80er Jahre wurden die ersten Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit sich Leuchtphosphore als Marker für Biomoleküle eignen. Leuchtphosphore, wie sie auch in Leuchtstofflampen, TV-

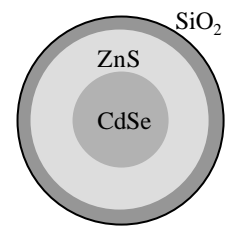


Abb. 5.10. Schematischer Aufbau eines Quantum-Dots.

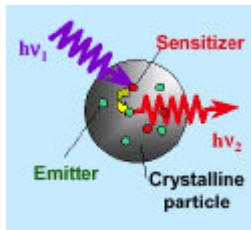


Abb. 5.11. Aufbau und Fluoreszenzmechanismus eines Nanophosphors.

Quelle: [Hoheisel, 2002]

und Computerbildschirmen Verwendung finden, bestehen aus nicht-toxischen anorganischen Verbindungen, wie z. B. LaPO_4 , Y_2O_3 oder Silikaten, die mit Ionen von Lanthanoid-Elementen dotiert sind. Die Ionen dienen als Lichtemittenten mit einem charakteristischen schmalbandigen UV-Fluoreszenzspektrum (s. Abb. 5.11). Da die Emissionswellenlänge unabhängig von der Größe der Partikel ist, vereinfacht sich die industrielle Herstellung im Vergleich zu den Quantum-Dots. Darüber hinaus sind Nanophosphore deutlich umweltfreundlicher als Quantum-Dots, weil sie keine toxischen Schwermetalle enthalten. Einem Forschungskonsortium, bestehend aus der Bayer Technology Service GmbH, der Nanosolutions GmbH und der Universität Hamburg, ist es gelungen, nanoskalige Leuchtphosphore (Nanophosphore) herzustellen und an Proteine und DNA-Fragmente zu binden.

Je nach chemischer Zusammensetzung können Nanophosphore mit unterschiedlichen Emissionsspektren hergestellt werden. Aufgrund dieser Multiplexfähigkeit sind sie als Marker für homogene Assays geeignet und hier wird auch eines ihrer Hauptanwendungsgebiete gesehen. Für die Realisierung solcher Assays mit bis zu zehn Sonden soll das Prinzip des Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) genutzt werden. Dazu wird an die Probenmoleküle ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Kommt es zu einer Affinitätsbindung mit einem Fängermolekül, das mit einem Nanophosphor markiert ist, so wird ein Teil der absorbierten Energie von dem Nanophosphor auf den Fluoreszenzfarbstoff übertragen. Das Ergebnis ist ein verändertes Emissionsspektrum des Nanophosphors, über das sich die Affinitätsbindung eindeutig nachweisen lässt. Für dieses elegante Assayformat konnte bereits der Proof-of-Principle erbracht werden [Hoheisel, 2002].

Dye-Doped Silikat-Nanopartikel

Prof. Tan an der Universität Florida hat ein Markersystem für Biomoleküle entwickelt, das aus mit Farbstoff gefüllten (Dye-Doped) Silikat-Nanopartikeln besteht. Der Kern der Partikel wird in einer Wasser-Öl-Mikroemulsion hergestellt, wobei der Farbstoff in den emulgierten Wassertröpfchen gelöst ist. Durch Zugabe von Tetraethylorthosilikat bildet sich um die Farbstofftröpfchen eine Silikatschale. Der Kern der Silikatpartikel enthält Zehntausende von Farbstoffmolekülen und es wird eine Fluoreszenzintensität erreicht, die etwa 10^5 mal größer ist als die eines einzelnen Farbstoffmoleküls.

Die gefüllten Silikatpartikel weisen darüber hinaus zwei weitere Vorteile auf: Sie sind einfach an Biomoleküle zu koppeln und sie bleichen nicht aus [Tan, 2003]. Anwendungspotenzial für Dye-Doped Silikat-Nanopartikel wird in den Bereichen Markersysteme für Biochips, Bio-Imaging und In-vivo-Diagnostik gesehen.

5.5.4 Nanotechnologie zur Weiterentwicklung von Detektionsverfahren

TIR-FM Detektor

Als Standard-Detektionsverfahren für DNA- und Proteinchips werden derzeit spezielle Fluoreszenzmikroskope (Biochip-Reader) eingesetzt. Die Technik ist weitgehend standardisiert, da sich nur zwei Design-Prinzipien durchgesetzt haben: Scanner mit meist konfokaler Optik, Laser-Fluoreszenzanregung und Photomultiplier-Detektion (Einkanalgänge) sowie Imager mit Weißlichtbeleuchtung und monochromer CCD-Kamera (Multikanal-Messung). Die besten Laser-Scanner erreichen eine Auflösung von etwa 3 μm . Die Sensitivität ist bei beiden Typen sehr hoch, es können zwischen 0,1 bis 1 Fluorophore pro Quadratmikrometer detektiert werden. Biochip-Reader sind heute von mehr als 20 Firmen kommerziell erhältlich.

Die "Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy" (TIR-FM) ist ein spezialisiertes Fluoreszenzmikroskopieverfahren, bei dem die Anregung oberflächennaher Fluorophore durch das sog. evaneszente Feld erfolgt⁸. Bei dieser Methode werden nur Fluoreszenzmarker angeregt, deren Abstand von der Oberfläche weniger als etwa 100 nm beträgt, während weiter entfernte Moleküle unsichtbar bleiben.

In dem von der Firma Zeptosens, Schweiz, hergestellten SensiChip[®] wird die TIR-FM Technologie durch die Verwendung der planaren Wellenleiter-Technik (Planar Wave Guide, PWG) weiter optimiert. Der Chip, mit dem bis zu 100 Gene nachgewiesen werden können, ist mit einer 150-300 nm dicken Schicht aus Tantaloxid versehen, auf die teilweise ein optisches Gitter aufgeprägt ist. Laserlicht wird über das Gitter in den PWG eingekoppelt und erzeugt an den Grenzflächen ein starkes Evaneszenzfeld (s. Abb. 5.12). Durch die Verwendung eines Materials mit hohem Brechungsindex wie Tantaloxid und durch die geringe Dicke des Films wird das evaneszente Feld in seiner Intensität und Reichweite noch verstärkt.

⁸ Grundlage dieser Methode ist die Totalreflexion eines Lichtstrahls beim Übergang von einem Medium mit höherer zu einem Medium mit geringerer optischer Dichte. Eine solche Grenzschicht wird z. B. bei der SensiChip[®]-Technologie der Firma Zeptosens durch die Beschichtung eines Glasträgers mit einem Material mit höherem Brechungsindex erzeugt, wie z. B. Ta₂O₅ oder TiO₂. Bei der Totalreflexion des Lichtes an einer solchen Grenzschicht entsteht ein sogenanntes evaneszentes elektromagnetisches Feld, dessen Intensität im optisch dünneren Medium über eine kurze Distanz exponentiell abnimmt. Die Eindringtiefe dieses evaneszenten Feldes wird dabei vor allem durch die Wellenlänge und den Einfallswinkel des Lichts bestimmt und liegt typischerweise zwischen 70 nm und 200 nm. Bei TIRFM wird das evaneszente Feld zur Anregung der Fluoreszenzmarker genutzt.

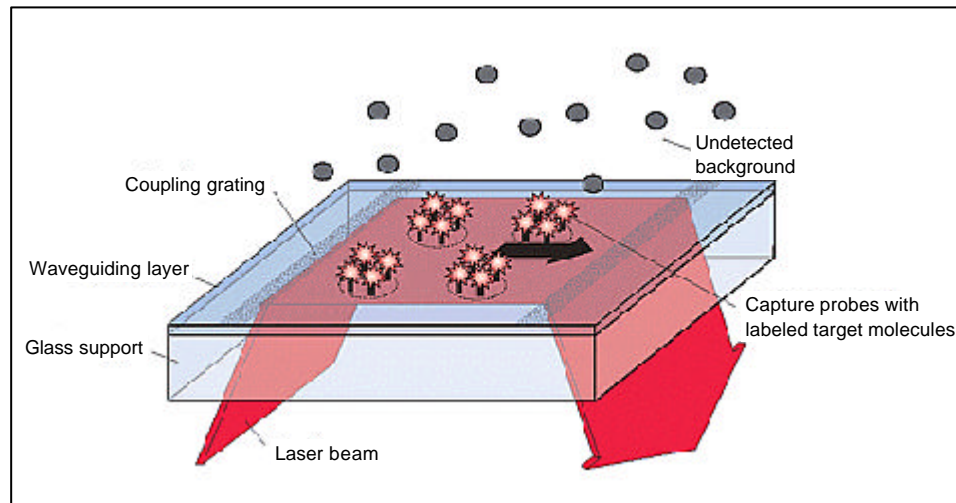


Abb. 5.12. TIR-FM Technik unter Nutzung eines planaren Wellenleiters beim Sensi-Chip[®]. Das Evaneszenzfeld breitet sich senkrecht zur Chipoberfläche aus und dringt dabei etwa 100 nm ins optisch dünnere Medium vor. Somit ist es möglich, Bindungsereignisse ohne störende Hintergrundsignale von ungebundenen Molekülen in der Lösung zu messen, da nur Moleküle, die sich im Abstand von 100 nm von der Oberfläche befinden, gesehen werden.

Quelle: Qiagen, http://www.qiagen.com/catalog/automation/images/fig_planar_wvguide_tech.gif

Die Zeptosens AG konnte anhand von Modellanwendungen zeigen, dass das Signal/Rausch-Verhältnis mit dem neuartigen Detektionssystem um bis zu 100fach höher ist als bei den besten konfokalen Biochip-Readern [Duvencek et al., 2002]. Erste Modellanwendungen zeigen, dass diese Technologie auch für die Auslesung von Proteinchips angewandt werden kann [Pawlak et al., 2002]. Die SensiChip[®]-Technologie wird von Zeptosens für den Proteomics-Markt und von Qiagen exklusiv für den Genomics-Markt vermarktet.

SPR-Detektor

SPR-Spektroskopie (Surface Plasmon Resonance) ist eine hoch empfindliche markierungsfreie Detektionsmethode, mit der oberflächennahe Bindungsereignisse in Echtzeit gemessen werden können. Sie basiert auf den folgenden physikalischen Gesetzmäßigkeiten: Bei der Totalreflexion eines Lichtstrahls (siehe oben) an einer Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen optischen Dichten kann sich die elektrische Feldkomponente des Lichtes etwa 200 nm in das optisch dünnere Medium fortsetzen (Evaneszenzfeld). Befindet sich zwischen den beiden optischen Medien eine dünne Metallschicht (etwa 50 nm), so regt monochroma-

tisches polarisiertes Licht Plasmonen⁹ in dem Metallfilm an. Der resonante Energietransfer auf die Plasmonen bedingt eine Schwächung des reflektierten Strahls, und es entsteht ein scharfer Schatten, der als Surface Plasmon Resonance bezeichnet wird. Die Resonanzenergie ist abhängig vom Brechungsindex der Metallschicht, die wiederum durch die Massekonzentration der gebundenen Biomoleküle beeinflusst wird. Die durch eine Affinitätsbindung an der Oberfläche bewirkte Intensitätsänderung des reflektierten Lichtstrahls kann mit einem Detektor direkt gemessen werden (s. Abb. 5.13). Eine Markierung der Biomoleküle ist bei dieser Nachweismethode nicht notwendig.

Eingesetzt werden SPR-Systeme¹⁰ in der Grundlagen- und Wirkstoffforschung für Affinitätsanalysen sowie für die Messung von Antikörper-Antigen- und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Biochipsysteme auf Basis der SPR-Technologie werden schon seit einigen Jahren, z. B. von dem Unternehmen Biacore, Schweden, kommerziell angeboten. Der Biacore Chip wird integriert mit einem fluidischen System eingesetzt, wobei pro Messzyklus pro Chip nur ein Typ von Fänger-molekül untersucht werden kann [Biacore, 2003].

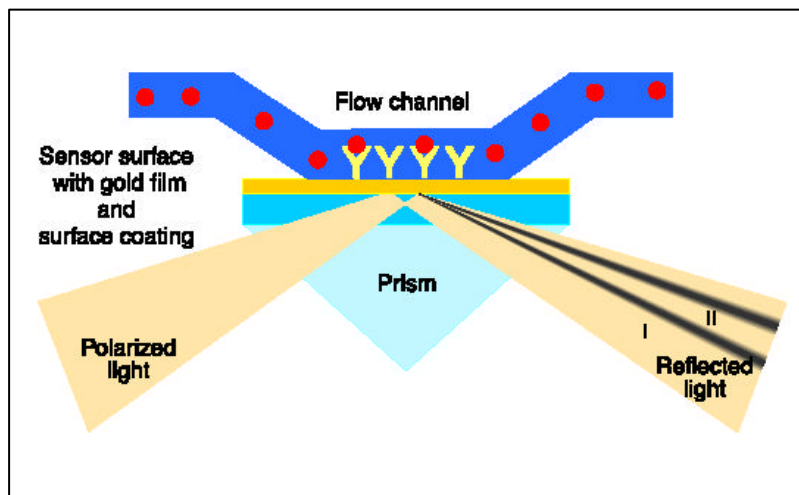


Abb. 5.13. SPR-Technologie für die Detektion von Bindungsereignissen, wie sie von dem Unternehmen Biacore, Schweden, eingesetzt wird.

Quelle: Biacore, http://www.biacore.com/pdf/TN/TN_1.pdf

⁹ Oberflächenplasmonen sind Oberflächenwellen in Metallen, die durch kollektive Schwingungen der Elektronen gegen die Atomrümpfe angeregt werden.

¹⁰ Bei Edelmetall-Nanopartikel, die kleiner sind als die Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes, tritt ebenfalls ein Plasmonen-Resonanzeffekt auf. Werden Biomoleküle an die Nanopartikel gebunden, so ändert sich bei einem Bindungsereignis das Resonanzspektrum. Raschke et al. [2003] haben gezeigt, wie dieser Effekt genutzt werden kann, um mit einzelnen Gold-Nanopartikeln Bindungsereignisse zwischen Biomolekülen nachzuweisen.

Die SPR-Technologie ist in den letzten Jahren weiterentwickelt worden, so dass es mittlerweile auch möglich ist, sie als Auslesesystem für Microarrays einzusetzen. Ein solches SPR-Imaging-System ist von GWC Instruments (Madison, USA) kommerziell erhältlich. Graffinity, Heidelberg, verwendet bei der Wirkstoffforschung ebenfalls SPR-Imager, mit denen mehr als 4500 Meßpunkte simultan ausgelesen werden können.

Massenspektrometrie

Massenspektrometer¹¹ (MS) sind über die letzten Jahre zu einem der wichtigsten Werkzeuge des Biochemikers geworden. Mit ihnen können Proteine identifiziert, Bioreaktionen verfolgt und Protein- sowie Oligonukleotid-Sequenzierungen durchgeführt werden. Das Alleinstellungsmerkmal moderner MS-Verfahren ist ihre Fähigkeit, ohne chemische Markierung in nur einem Analyseschritt geringste Mengen von Peptiden, DNA-Oligonukleotiden oder Proteinen zu identifizieren.

Die MS-basierten Techniken sind derzeit noch keine üblichen Werkzeuge zum Auslesen hochdichter Biochips. Jedoch gibt es mit MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) und TOF-SIMS (Time-Of-Flight Secondary Ion MS) zwei Entwicklungen, die das Potenzial haben, Biochips mit einer Auflösung im Nanometerbereich zu analysieren.

SMALDI

MALDI-MS-Systeme werden seit Ende der 80er Jahre in der Bioanalytik eingesetzt und zählen in diesem Bereich mittlerweile zu einer der wichtigsten Untersuchungsmethoden [Mo und Karger, 2002].

Bei MALDI wird die Probe von einer festen Matrix organischer Moleküle umgeben. Als Träger werden Arrays mit Millimeter großen Spots auf Edelstahlsubstraten verwendet (MALDI-Target). Durch das Verdampfen der Matrixmoleküle mit einem Laserstrahl werden die Probenmoleküle schonend in die Gasphase überführt und gleichzeitig ionisiert. MALDI-Systeme sind für Hochdurchsatzanwendungen, wie z. B. die Genotypisierung, geeignet [Sauer und Gut, 2002].

Bei SMALDI (Scanning-MALDI) wird die MALDI-Technik um die Komponente eines positionierbaren Probenträgers erweitert. Durch die x,y-Positionierung des Probenträgers können biologische Objekte oder auch hochdichte Biochips mit einer Auflösung von 250 nm untersucht werden. Für die Aufnahme von 10.000 bis 160.000 Spektren werden nur 3 - 50 Minuten benötigt [Spengler und Hubert, 2002]. SMALDI bietet

¹¹ Massenspektrometer werden eingesetzt, um Molekülmassen zu bestimmen. Moleküle müssen dazu zuerst ionisiert werden. Die Ionen werden dann in einem elektrischen Feld beschleunigt, in einem magnetischen Feld aufgetrennt und nachfolgend detektiert. Über das Detektorsignal kann die Masse und die relative Konzentration der Moleküle bestimmt werden.

die einzigartige Möglichkeit, Massenspektren von Mikrometer großen Oberflächen oder hoch integrierten Protein-Nanoarrays mit submikrometer Auflösung aufzunehmen. Zukünftige Anwendungsszenarien sind beispielsweise die Analyse von hochdichten 2D-Arrays, die ganze Proteome enthalten oder differentielle Proteinexpressionsanalysen an einzelnen oder wenigen Zellen. SMALDI ist noch eine sehr junge Technologie, und Methoden für die Präparation von Biomolekülen und Zellmaterial befinden sich noch in der Entwicklung.

TOF-SIMS ist eine weitere MS-Methode, die für das Auslesen von Biochips verwendet werden kann. Als Ionisationsquelle dient hierbei ein Ionenstrahl, der aus der Probe sekundäre Ionen herausschlägt, deren Masse über ihre Flugzeit zwischen Probenträger und Detektor bestimmt wird. Wird auf einem Chip PNA¹² als Fängermolekül verwendet, so kann ein Hybridisierungsereignis anhand der Phosphoratome nachgewiesen werden. Ein DNA-Nachweis mit der TOF-SIMS-Methode, der auf diesem Prinzip basiert, ist in einem von Prof. Arlinghaus geleiteten Projekt entwickelt worden [Arlinghaus et al., 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Methode ein DNA-Nachweis mit einer lateralen Auflösung im Nanometerbereich möglich ist. Die TOF-SIMS-Methode soll weiter entwickelt werden, so dass zukünftig auch Nanoarrays für den Nachweis und die Sequenzierung von DNA eingesetzt werden können.

TOF-SIMS

5.5.5 Nanotechnologie für Labs-on-a-Chip

Aufgrund der sehr breit gefächerten Anwendungsmöglichkeiten der Labs-on-a-Chip (LOCs) gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, mit Hilfe von Nanotechnologie diese Systeme mit neuen Funktionalitäten auszustatten, wie z. B. Oberflächenstrukturierungen, Detektionssysteme, Nanoporen oder nanoskalige Aktuatoren¹³. Anwendungsbeispiele aus dem Bereich der DNA- und Proteinchips lassen sich dabei zum Teil auf die Labs-on-a-chip übertragen. Eine umfassende Darstellung des Anwendungspotenzials der Nanotechnologie für LOCs geht über den Rahmen der Technologieanalyse hinaus; daher beschränken wir uns an dieser Stelle auf drei Beispiele.

Nanofeldkäfige

Um nanoskalige biologische Objekte, wie Proteine oder Viren in einem fluidischen System zu trennen und für die Analyse einzufangen, wird das

¹² PNA ist ein synthetisches DNA-Analogon, in dem das Phosphatatom enthaltende Gerüst der DNA durch Polyamide ersetzt ist. PNA ist damit frei von Phosphoratom, weist aber sehr ähnliche Hybridisierungseigenschaften wie DNA auf.

¹³ Denkbar ist auch der Einsatz von Biomolekülen als Aktuatoren, wie bereits von Wevers und Wechsler [2002] beschrieben wurde.

Prinzip der Dielektrophorese¹⁴ genutzt. Insbesondere für Feldkäfige, die es ermöglichen, Partikel innerhalb einer strömenden Flüssigkeit einzufangen, sind sehr hohe lokale Feldstärken notwendig. Zur Erzeugung solcher Felder müssen extrem kleine Elektroden in das Mikrofluidiksystem integriert werden, deren laterale Dimensionen weniger als 100 nm betragen.

Solche Nanofeldkäfige werden z. B. in dem Projekt Nanovirdetekt¹⁵ als Teil eines Mikrofluidiksystems aufgebaut [Stelzle et al., 2002]. Ziel des Projektes ist es, einen Sensor zu entwickeln, mit dem geringste Konzentrationen von krankheitserregenden Viren im Blut nachgewiesen werden können. Da die lokalen Feldstärken nicht ausreichen, um kleine Viren mit einem Durchmesser von nur etwa 30 nm einzufangen, müssen künstliche Nanopartikel mit einer Größe von etwa 500 nm eingesetzt werden. Die Partikel tragen hochspezifische Antikörper, durch die der Virus auf dem Nanopartikel gebunden wird. Zur Markierung werden farbstoffmarkierte Antikörper verwendet, die sich ebenfalls an die Viren anlagern. Die Partikel können dann in dem Nanofeldkäfig eingefangen und optisch detektiert werden.

Nanoporen

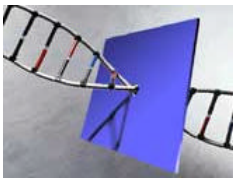


Abb. 5.14. Schematische Darstellung, wie eine Nanopore zur DNA-Sequenzierung genutzt werden kann.

Quelle: Agilent Technologies, <http://www.labs.agilent.com>

Ein weiteres nanoskaliges Bauelement, das interessante Perspektiven für Lab-on-a-Chip Anwendungen bietet, sind sogenannte Nanoporen. Solche Membranöffnungen, deren Durchmesser nur wenige Nanometer beträgt, können zur Detektion von DNA oder Proteinen genutzt werden (s. Abb. 5.14). So beschreiben Howorka et al. [2001], wie mit Hilfe von Nanoporen kurze DNA-Stränge mit einer Auflösung von einem Basenpaar sequenziert werden können. Als Messgröße dient dabei der Stromfluss durch die Nanopore: Trennt die Membran zwei mit Elektrolytlösung gefüllte Kammern und wird eine Spannung über die Membran gelegt, so bewegen sich Ionen des Elektrolyten durch die Pore und es fließt ein Strom. Befindet sich ein Molekül in der Pore, z. B. ein DNA-Einzelstrang, so wird der Ionenfluss reduziert und der Stromfluss ändert sich entsprechend. Agilent Laboratories und Harvard University haben einen

¹⁴ Bei der Manipulation von Partikeln mit Hilfe der Dielektrophorese werden inhomogene elektrische Hochfrequenz-Wechselfelder erzeugt, die in den Teilchen elektrische Dipolmomente induzieren. Aufgrund dieser Dipolmomente erfahren die Teilchen eine Kraft, die sie je nach Frequenz der angelegten Wechselspannung entweder in Bereiche hoher Feldstärke zieht (positive DEP) oder in Bereiche niedriger Feldstärke drängt (negative DEP). Da die Kraftwirkung proportional zum Volumen der Teilchen ist, kann der Effekt gezielt zu deren größen-spezifischen Selektion und Anreicherung genutzt werden.

¹⁵ Verbundpartner in dem vom BMBF geförderten Projekt Nanovirdetekt: Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut NMI, Reutlingen; Evotec GmbH, Hamburg; Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert; Mediagnost GmbH, Reutlingen.

Kooperationsvertrag geschlossen, um auf Basis von Nanoporen eine kommerzielle Technologie für die Gensequenzierung zu entwickeln.

Molekulare Siebe

Um Partikel in Flüssigkeiten aufzutrennen, ist von Physikern am Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik in Halle ein neuartiges Verfahren entwickelt worden, das auf einem Ratschenmechanismus basiert [Matthias und Müller, 2003]. Zur Auftrennung von suspendierten mikro- und nanoskaligen Teilchen wurde eine spezielle Siliziummembran entwickelt, die Millionen Poren mit einem sägezahnförmigen Profil enthält (Abb. 5.15). In einem Experiment wurden mit dieser Membran zwei Behälter getrennt, die mit wässrigen Suspensionen von monodispersen mikroskaligen Latexkugeln gefüllt waren. Befindet sich das Wasser in Ruhe, so fluktuieren die Teilchen gemäß der Brownschen Bewegung regellos in alle Richtungen und die Teilchenzahl in beiden Behältern bleibt konstant. Wird die Suspension periodisch mit 40 Hz durch die asymmetrischen Poren hin und her bewegt, so erzwingt die besondere Kanalform ein asymmetrisches ratschenförmiges Strömungsprofil. Während sich das Wasser im zeitlichen Mittel nicht bewegt, erfahren die Teilchen einen Nettotransport und reichern sich in einem der beiden Behälter an. Da die Transportrichtung stark vom Teilchendurchmesser abhängt, sollte sich die Methode auch zur Auftrennung von polydispersen Suspensionen eignen. Berechnungen zu Folge zeigt das Verfahren dabei eine besonders hohe Auflösung im Bereich von 0.1 - 1 Mikrometer.

Die Forscher um F. Müller am MPI für Mikrostrukturphysik gehen davon aus, dass sich dieses Verfahren in Labs-on-a-Chip integrieren lässt und so auf kleinstem Raum für die Trennung empfindlicher biologischer Objekte, wie Viren oder Zellfragmente, eingesetzt werden kann.



Abb. 5.15. Membran mit sägezahnförmigen Poren. Über einen Ratschenmechanismus können damit kleinste Partikel aufgetrennt werden.

Quelle: MPI für Mikrostrukturphysik, <http://www.mpi-halle.mpg.de>

5.6 Neuartige Chipsysteme

5.6.1 Elektrische Biochips

Bei elektrischen Biochips erfolgt die Detektion eines Bindungsereignisses direkt über ein elektrisches Signal, so dass auf eine aufwendige Optik verzichtet werden kann. In der Literatur werden elektrochemische Verfahren, Impedanzspektroskopie, Leitfähigkeitsmessungen und seit neuestem Feldeffekt-Transistoren als vier Optionen für die elektrische Detektion beschrieben; sie sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Elektrochemische Detektion

Um Bindungsereignisse elektrochemisch mit Hilfe von Redoxreaktionen nachzuweisen, werden Biochips aus einem Siliziumsubstrat gefertigt und mit Dünnschicht-Goldelektroden versehen, deren Abstand nur 200 – 800 nm beträgt. Die Fängeroleküle werden direkt auf diese sogenannten Interdigitalelektroden immobilisiert.

Für den Nachweis von redoxaktiven Molekülen wird an die Elektroden ein Potenzial angelegt, dessen Polung sich periodisch ändert, so dass redoxaktive Moleküle an den Elektrodenoberflächen abwechselnd oxidiert und reduziert werden. Aufgrund des geringen Abstands zwischen den Elektroden wird das gleiche Molekül mehrfach hintereinander oxidiert und reduziert, wodurch sich eine Art innere Verstärkung und eine Erhöhung der Empfindlichkeit ergibt. Dieser Effekt wird als Redox-Recycling bezeichnet.

Die zu detektierenden Moleküle, z. B. DNA, werden mehrfach mit einem Enzymmarker markiert. Nach der Hybridisierung wird ein Enzymsubstrat zugesetzt, aus dem durch die Enzymreaktion das redoxaktive Molekül (p-Aminophenol) freigesetzt und infolge der Mehrfachmarkierung erheblich verstärkt gemessen wird (s. Abb. 5.16). Die Nachweisempfindlichkeit lässt sich damit auf kleiner als 1 nmol/l steigern.

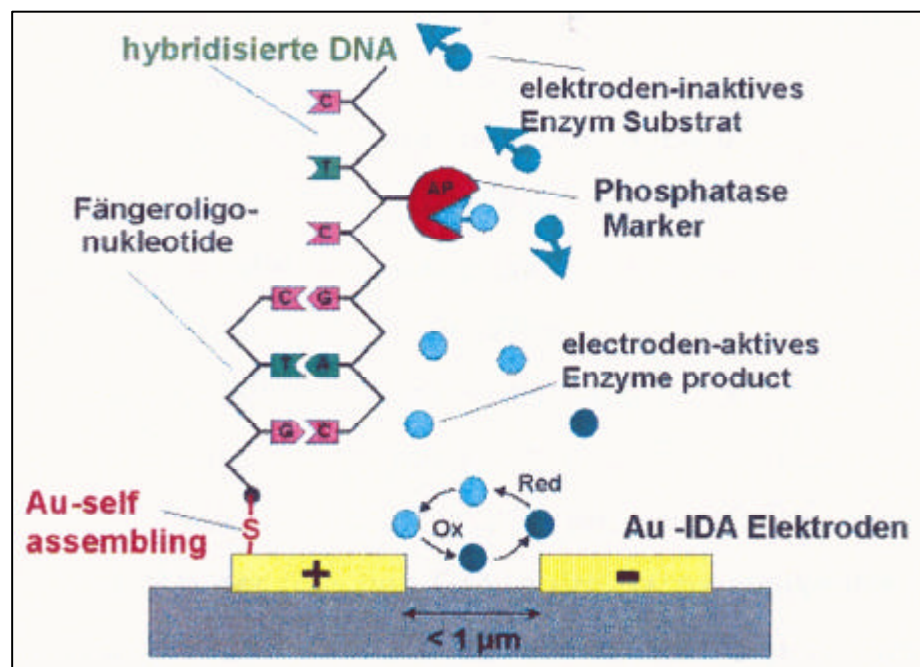


Abb. 5.16. Messprinzip eines elektrischen Biochips mit Detektion durch Redox-Recycling: Die Probenmoleküle sind mit einem Enzym markiert, das ein redoxaktives Molekül aus einem Substrat freisetzt.

Quelle: [Heuberger und Hintsche, 2001]

Durch die Weiterentwicklung der Signalamplifikation soll erreicht werden, dass zukünftig auf eine Anreicherung der Zielmoleküle mittels PCR verzichtet werden kann. Somit ließe sich der Anwendungsbereich der elektrischen Biochips beträchtlich erweitern, weil ein Arbeitsschritt bei der Probenaufbereitung gespart wird.

In dem Forschungsprojekt SIBANAT¹⁶ ist ein elektrischer Biochip entwickelt worden, der das Redoxrecycling Prinzip für die Detektion von Biomolekülen nutzt. Der Chip enthält ein Array von 128 kreisrunden Interdigitalelektroden. Anwendungsperspektiven werden vor allem im Point-of-Care Bereich gesehen. eBiochip, ein Spin-off Unternehmen des Fraunhoferinstituts für Siliziumtechnologie, Itzehoe, hat elektrische Biochips mit 4 Sensoren für biomedizinische und analytische Anwendungen entwickelt. Diese Biochips, deren Nachweisverfahren ebenfalls auf dem Redoxrecycling Prinzip basiert, sind bereits auf dem Markt eingeführt worden.

Impedanzspektroskopie

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie¹⁷ können Bindungsereignisse markerfrei detektiert werden. Dabei werden Mikroelektroden mit einem Abstand von weniger als 300 nm eingesetzt [Heuberger und Hintsche, 2001]. Aufgrund der kleinen Elektroden konzentrieren sich die Feldlinien auf den oberflächennahen Volumenbereich, in dem sich die Fängermoleküle befinden. Die mit der Affinitätsbindung der Probenmoleküle an die Fängermoleküle einhergehende Veränderung der Impedanz lässt sich unter diesen Bedingungen mit hoher Empfindlichkeit direkt messen. Dabei hat sich gezeigt, dass Strukturmaße der Elektroden von 300 bis 200 nm ausreichen, um den Effekt praktisch zu nutzen. Mit der jetzt verfügbaren „Deep-UV-Lithography“ gibt es ein für die Großserienfertigung geeignetes Verfahren, das es gestattet, diesen Strukturbereich bis zu 250 nm zu erschließen. Ist die Nachfrage hoch genug, um eine Produktionslinie auszulasten, so ließen sich die Biochips zu marktfähigen Preisen produzieren. Derzeit befindet sich die Impedanzspektroskopie als Nachweismethode für Biochips jedoch noch im Entwicklungsstadium. Eine Arbeitsgruppe, die intensiv an diesem Verfahren arbeitet, ist die Abteilung von Prof. Heuberger am Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie.

¹⁶ Partner des vom BMBF geförderten SIBANAT Projekts: Eppendorf, Infineon, FhG-ISIT (Fraunhofer Gesellschaft, Institut für Siliziumtechnologie), November AG, Siemens. Das Projekt wurde 2003 mit dem amerikanischen „Jack Raper Award for Outstanding Technology Directions Paper“ ausgezeichnet.

¹⁷ In der Impedanzspektroskopie wird die gemessene Impedanz – also der Wechselstromwiderstand - eines System bei mehreren Frequenzen ausgewertet.

Leitfähigkeit

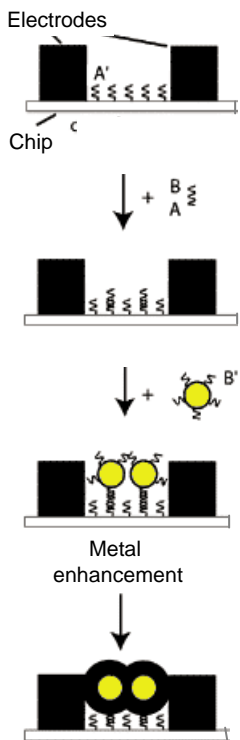


Abb. 5.17. Schema der elektrischen DNA-Detektion basierend auf Leitfähigkeitsmessungen.

Quelle: nach Institut für Physikalische Hochtechnologie, <http://www.ipht-jena.de>

Werden Probenmoleküle mit Gold-Nanopartikeln markiert, so besteht die Möglichkeit, Bindungsereignisse über Leitfähigkeitsmessungen zu detektieren. Dazu werden zwischen zwei Einzelelektroden DNA-Fängermoleküle immobilisiert. Nach der Hybridisierung der mit Gold-Nanopartikeln markierten Proben-DNA wird durch die katalytische Abscheidung von Silber eine dünne leitfähige Schicht ausgebildet (s. Abb. 5.17). Bindungsereignisse können dann über den elektrischen Widerstand zwischen den Elektroden gemessen werden. Die Methode ist dabei empfindlich genug, um Basenfehlpaarungen zwischen den hybridisierten DNA-Strängen nachzuweisen.

Das Prinzip wurde u. a. auf einem Gold-auf-Glas Chip am Institut für Physikalische Hochtechnologien, Jena, realisiert [Möller et al., 2001]. Derzeit gibt es Anstrengungen, durch Parallelisierung der Elektroden die Nachweismethode auf ein Microarray-Format zu bringen. Dieses Verfahren hat aufgrund der simplen, rein elektrischen Detektion hohes Potenzial für die Produktion diagnostischer Einweg-DNA-Chips.

FRIZ Biochem, München, ist ein Unternehmen, das Biochipsysteme entwickelt, die langfristig auch in der klinischen Routinediagnostik oder der Nahrungsmittelkontrolle eingesetzt werden sollen. Eines der in Entwicklung befindlichen Systeme, die LADER (Light Addressable Direct Electrical Readout) Chip-Plattform, beruht auf der unterschiedlichen Leitfähigkeit von Oligonukleotiden in Einzelstrang (isolierend) und Doppelstrang-Form (leitend). Die auf dem Chip immobilisierten Fängermoleküle werden mit einem Elektronen-Donor/Akzeptor-Komplex verknüpft, und der Probenlösung wird eine aktive Komponente zugesetzt, die dem Donor/Akzeptor-Komplex Elektronen zuführt. Erfolgt ein Bindungsereignis, so werden bei Einstrahlung von Licht Elektronen im Donor/Akzeptor-Komplex freigesetzt, die über die doppelsträngige DNA zur Chip-Oberfläche wandern. Die aktive Komponente in der Lösung versorgt den Donor/Akzeptor-Komplex weiter mit Elektronen, so dass ein Strom fließt, der das Bindungsereignis anzeigt. Das LADER-System ist so empfindlich, dass es ohne Amplifikation der Proben-DNA auskommt. Die Markteinführung für LADER ist Ende 2004 geplant.

Feldeffekt Transistoren

Eine erst seit wenigen Jahren in Entwicklung befindliche Methode DNA direkt über ein elektronisches Signal nachzuweisen, beruht auf der Verwendung von Feldeffekt-Transistoren [Fritz et al., 2002]. Bei diesen Sensoren wird die Fänger-DNA direkt auf der Gate-Elektrode eines FET-Transistors immobilisiert (Abb. 5.18). Der FET-Transistor reagiert empfindlich auf Ladungsänderungen an der Oberfläche der Elektroden. Da der Phosphatrückgrat der DNA negativ geladen ist, lässt sich die Hybridisierung zweier DNA-Stränge anhand der sich ändernden Ladung direkt

über ein elektrisches Signal messen. Die Methode ermöglicht einen markierungsfreien Nachweis von Bindungsereignissen und ist empfindlich genug, um einzelne Basenfehlpaarungen zu detektieren.

Die FET-Sensoren, die in der Arbeitsgruppe von S. Ingebrandt, Forschungszentrum Jülich, entwickelt werden, bewegen sich derzeit noch in mikroskaligen Dimensionen, jedoch soll die Gatelänge in der nächsten Generation der Transistoren nur noch einige 100 nm betragen. Die FET-Technologie bietet prinzipiell die Möglichkeit, hochdichte Chips mit mehreren tausend Sensoren zu entwickeln. Werden elektrische Felder eingesetzt, um die Hybridisierungsprozesse zu beschleunigen, so kann die Empfindlichkeit der Methode theoretisch so weit gesteigert werden, dass DNA-Proben ohne vorherige Amplifikation (PCR) nachgewiesen werden können. Der Zielmarkt für FET-Sensoren reicht von DNA-Expressionsstudien bis zu Point-of-Care Anwendungen. Weltweit arbeiten derzeit drei Arbeitsgruppen an der Entwicklung dieser Technologie.

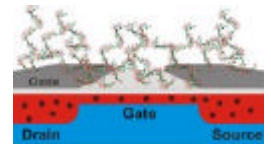


Abb. 5.18. Nachweis von DNA mit einem FET-Transistor.

Quelle: Institut für Schichten und Grenzflächen, <http://www.fz-juelich.de/isg/index.php?index=143>

Magnetische Methoden

Zur Detektion von Bindungsereignissen lassen sich auch Magnetowiderstandseffekte, wie der Riesenmagnetowiderstand (GMR)¹⁸ oder die Riesenmagnetoimpedanz (GMI)¹⁹ nutzen. Im Folgenden soll das Messprinzip solcher Detektoren exemplarisch am Beispiel eines GMR-Sensors erläutert werden.

Die Anwendung eines GMR-Sensors für den Nachweis von Bindungsereignissen im Biochipformat wird bei Schotter et al. [2002] beschrieben. Bei der vorgestellten Methode besteht das Detektionssystem aus einem Chip mit 206 GMR-Sensorelementen, die einen Durchmesser von 70 µm aufweisen (s. Abb. 5.19). Die Sensoren lassen sich separat mit Fänger-molekülen beladen und auch separat auslesen. Um Probenmoleküle nachweisen zu können, werden sie mit nanoskaligen paramagnetischen Teilchen²⁰ markiert. Nach der Affinitätsbindung werden die Marker

¹⁸ Der so genannte Riesenmagnetowiderstand tritt auf, wenn bestimmte magnetische Materialien in nanoskaligen mehrlagigen Schichtsystemen angeordnet werden. Bringt man solche Schichtsysteme in ein äußeres Magnetfeld, so sinkt der elektrische Widerstand ab. Dabei ist die Widerstandsänderung überraschend groß, daher Riesenmagnetowiderstand, und kann typischerweise bis zu 70 % betragen.

¹⁹ Der GMI-Effekt tritt in Drähten aus amorphen weichmagnetischen Materialien (z. B. FeCoSiB) auf und bedingt eine extrem große Änderung der Impedanz unter Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes.

²⁰ Der kommerzielle Haupteinsatzbereich für magnetische Nanopartikel ist die Separation von Zellen und Biomolekülen. Zur Zellseparation werden bioaffine Liganden an die Nanopartikel gekoppelt, die selektiv mit den Zielmolekülen bzw. Oberflächenproteinen der Zellen reagieren. Danach erfolgt eine Abtrennung der markierten Zellen in einem Magnetfeld. Der Vorteil bei der Verwendung von Nanopartikeln im Vergleich zu Mikropartikeln besteht vor allem darin, dass mit ihnen die Gefahr geometrieabhängiger Blockierungen potenzieller Bindungsstellen auf der Zellmembran

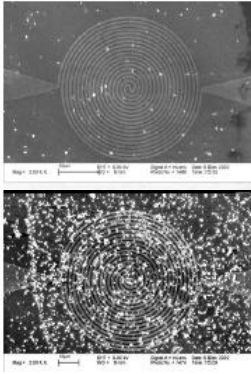


Abb. 5.19. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sensorelementes vor (oben) und nach (unten) dem Eintreten von Bindungsereignissen.

Quelle: [Schotter et al., 2003]

durch ein externes Magnetfeld polarisiert; die entstehenden Streufelder können dann von einem GMR-Sensor nachgewiesen werden. Die Methode zeichnet sich durch ihre Nachweisempfindlichkeit aus, die verglichen mit fluoreszenzbasierten Detektoren etwa zwei Größenordnungen höher ist.

Zwei Projekte, die sich die Entwicklung von GMR-Sensoren zum Ziel gesetzt haben, sind das BARC²¹ Konsortium in den USA und das Projekt „Magnetoresistiver Biochip“ an der Universität Bielefeld²².

5.6.2 Kraftspektroskopie

Bei kraftspektroskopischen Messungen an Biomolekülen wird mit einem Rasterkraftmikroskop die Kraft gemessen, die notwendig ist, um z. B. ein einzelnes Biomolekül zu entfalten oder zwei aneinander gebundene Biomoleküle zu trennen.

Bei einem herkömmlichen DNA- oder Proteinchip können spezifische von unspezifischen Bindungen oftmals nicht exakt unterschieden werden: Da die Bindungskonstante zwischen Fänger- und Probenmolekül abhängig von dem Verhältnis zwischen A-T und G-C Bindungen ist, können die Waschbedingungen, um unspezifisch gebundene Moleküle zu entfernen, immer nur für einige DNA-Sequenzen optimal eingestellt werden. Aus diesem Grund wird bei dem Waschprozess schwächer gebundene Proben-DNA teilweise entfernt, was zu entsprechenden Messartefakten führt. Mit Kraftmessungen kann dieses Problem umgangen werden, da die Kräfte zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungen messbar verschieden sind.

Um die zwischen zwei Bindungspartnern wirkenden Kräfte zu untersuchen, wird einer der Bindungspartner kovalent an die Spitze des AFMs und der andere Bindungspartner kovalent an den Objektträger gebunden. Dann wird die AFM-Feder mit Piezotechnik vertikal zum Objektträger ausgelenkt und damit eine Kraft auf den Molekülkomplex und die AFM-Feder ausgeübt. Die durch diese Kraft bewirkte Deformation der AFM-Feder kann mit einem Laser ausgelesen werden. Ist die Kraft größer als die Bindungskraft zwischen den beiden Molekülen, so kommt es zum Bruch der Bindung.

Die Kraftspektroskopie bietet damit die einzigartige Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen zwei Einzelmolekülen, wie z. B. Protein-

vermieden wird. Zu den Herstellern von magnetischen Nanopartikeln zählen Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach, und die chemicell GmbH, Berlin.

²¹ BARC = Bead Array Counter, ein Projekt in dem ein 64 Spot GMR-Sensor inkl. mikrofluidischem System entwickelt wird. Projektpartner sind Geo-Centers Inc., NOVA Research Inc. und das Naval Research Laboratory.

²² Ergebnisse des vom BMBF geförderten Projektes werden in der Veröffentlichung von Schotter et al. [2002] vorgestellt.

Ligand, Antikörper-Antigen oder DNA-DNA, direkt zu erfassen. Bisher wird diese Technik jedoch nur als Instrument in der Grundlagenforschung genutzt, da das Messverfahren und die Präparation der Proben extrem anspruchsvoll und zeitaufwendig sind. Ein beschleunigtes Format der molekularen Kraftmessung stellt die C-FIT-Technologie dar, die von der Nanotype GmbH, Gräfelfing, entwickelt wird.

C-FIT

Die C-FIT-Technologie (Congruent Force Intermolecular Test) ist ein Ansatz, in dem die "Einzelmolekül-Kraftspektroskopie" in einem parallelisierten Format durchgeführt wird. Sie beruht auf einem Sandwich-Konzept, bei dem zwei Biochips übereinander gelegt werden (s. Abb. 5.20). Der untere Chip, der in einem Array angeordnete Fängermoleküle enthält, wird mit der Probe, die z. B. verschiedene Antigene enthält, versetzt, und passende Antigene werden durch die Fängermoleküle auf dem Chip gebunden. Auf dem oberen Chip ist ein zweiter Satz an Fängermolekülen komplementär zum unteren Chip angeordnet. Jedes Fängermolekül ist dabei mit einem Fluoreszenzmarker ausgestattet und über eine chemische Sollbruchstelle (chemischer Sensorcomplex) mit dem Chip verbunden. Die beiden Chips werden in Kontakt gebracht, so dass die Fängermoleküle des oberen Chips eine Affinitätsbindung mit Probenmolekülen, die auf dem unteren Chip gebunden sind, eingehen. Die Chips werden dann wieder separiert. Ist die Bindung stark genug (also ausreichend spezifisch) reißt die Sollbruchstelle am oberen Chip und der Fluoreszenzmarker kann auf dem unteren Chip nachgewiesen werden.

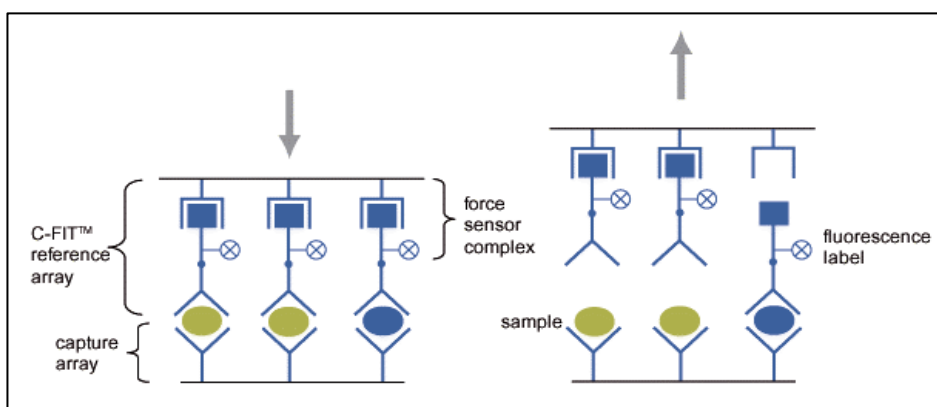


Abb. 5.20. C-Fit Technologie: Oberer und unterer Chip binden das Probenmolekül im Sandwich-Format. Werden die beiden Chips getrennt, so gibt die Position der Fluoreszenzmarker (oberer oder unterer Chip) an, ob eine spezifische Bindung zwischen Proben- und Fängermolekül vorliegt. Auf diesem Weg können spezifische von unspezifischen Bindungen unterschieden werden.

Quelle: Nanotype, <http://www.nanotype.de/>

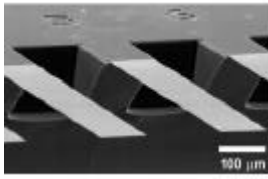


Abb. 5.21. Federarme eines Cantilever-Sensors.

Quelle: [Fritz et al., 2000]

In einer Veröffentlichung in der Fachzeitschrift *Science* beschreiben Albrecht et al. [2003], wie diese Methode für den Nachweis von SNPs eingesetzt werden kann.

Die C-Fit-Technologie hat ein breites Anwendungspotenzial, das von der Genotypisierung über die Proteomanalyse bis zur Wirkstoffforschung reicht. Ein erstes Produkt für die Wirkstoffforschung mit 49 Markern befindet sich seit Sommer 2003 bei der Nanotype GmbH in Entwicklung. Der Chip, der für eine bestimmte Proteinklasse konzipiert wird (Kinasen), soll vor allem für die Analyse von Signalwegen innerhalb von Zellen eingesetzt werden [Nanotype, 2003].

Bei C-FIT handelt es sich um eine völlig neue Technologie-Plattform, die durch den Einsatz von Kraftmessungen das Problem falschpositiver Signale aufgrund nicht-spezifischer Bindungen umgeht. Mit diesem bedeutenden Vorteil wird der C-Fit-Methode, sofern es gelingt alle technischen Hürden bei der Produktentwicklung zu überwinden, ein erhebliches Marktpotenzial zugeschrieben.

Cantilever-Sensoren

Ein weiteres mit der AFM-Technologie verwandtes Nachweisverfahren sind die Cantilever-Sensoren. Das Herzstück dieser Sensoren besteht aus mikromaschinell gefertigten Cantilevern (Hebel) mit einer Länge von zehn bis einigen hundert Mikrometern und einer Dicke von etwa einem Mikrometer, auf denen die Fängermoleküle immobilisiert werden (s. Abb. 5.21 u. 5.22). Kommt es nach Inkubation des Chips mit der Probe zu einem Bindungsereignis, so führt dies zu einer Änderung der Oberflächenspannung. Da sich die Oberflächenspannung nur auf einer Seite des Cantilevers ändert, verbiegt sich der Cantilever um etwa 10 nm. Diese Auslenkung kann mit einem Laser oder einem Piezosensor detektiert werden. Fritz et al. [2000] beschreiben, wie diese Methode für den Nachweis von SNPs genutzt werden kann.

Im Arbeitskreis um Prof. Ziegler, Kaiserslautern, werden Cantilever-Sensoren entwickelt, deren Federarme in Schwingung versetzt und über einen Rückkoppelmechanismus aktiv entdämpft werden. Bindungsereignisse können bei diesem Sensor über eine Frequenzverschiebung der Cantileverschwingung nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit der Methode soll so weit gesteigert werden, dass der Nachweis eines einzelnen Bakteriums möglich wird.

Cantilever-Sensoren eignen sich sowohl für die DNA- als auch für die Proteinanalytik. Der Arbeitsgruppe von Prof. Majumdar, Berkley, ist es gelungen, auf Basis eines Cantilever-Chips, einen Test für Prostatakrebs zu entwickeln. Die 100 Cantilever des Chips werden mit Antikörpern beschichtet, die spezifisch an Prostatakrebs-Antigene binden. Mit dem Sensor kann eine Nachweisempfindlichkeit erreicht werden, die etwa

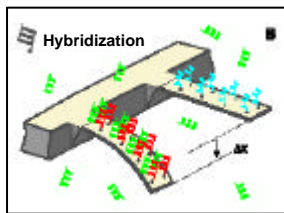
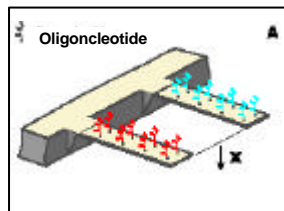


Abb. 5.22. Nachweis von Biomolekülen mit einem Cantilever-Sensor. Die Auslenkung des Federarms, die durch Affinitätsbindungen verursacht wird, kann z. B. mit einem Laser detektiert werden.

Quelle: [Fritz et al., 2000]

einen Faktor 20 unter dem relevanten klinischen Schwellenwert für die entsprechenden Antigene liegt.

Zwei Unternehmen, die sich auf die Entwicklung von Cantilever-Sensoren spezialisiert haben, sind Protiveris, USA und Cation²³, Dänemark. Das Konzept von Protiveris ist es, sehr nah am Markt zu arbeiten und Systeme zu entwickeln, die direkt auf die Bedürfnisse der biopharmazeutischen Industrie zugeschnitten sind. Dabei konzentriert sich Protiveris auf Anwendungen im Bereich der Wirkstoffforschung. Ein Prototyp ihres Cantilever-Sensors wurde im Frühjahr 2003 vorgestellt.

5.6.3 Akustischer Nachweis von Bindungsereignissen

Akubio aus Cambridge, UK, arbeitet an einem akustischen Sensor, mit dem neben DNA und Proteinen auch partikelförmige Krankheitserreger, wie Bakterien und Viren, nachgewiesen werden können.

Im *Resonance Acoustic Profiling* wird ausgenutzt, dass die Resonanzfrequenz eines Quarzkristalls eine Funktion der auf seiner Oberfläche adsorbierten Masse ist. Zum Nachweis von Biomolekülen wird der Quarzkristallresonator, der in einer Durchflusszelle integriert ist, mit Fängermolekülen beschichtet und in Resonanz versetzt. In Gegenwart von komplementären Probenmolekülen erfolgt ein Bindungsereignis, das eine Änderung der Resonanzfrequenz des Quarzkristalls zur Folge hat, die sich quantitativ auswerten lässt. Die Methode ermöglicht es, Biomoleküle markerfrei nachzuweisen und die Bindungskinetik zu bestimmen. Sie ist zudem sensitiv auf Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften der Lösung und der Ladung des Bindungskomplexes.

Akubio hat mit dem Rupture Event Scanning (RVS) einen weiteren akustischen Messmodus entwickelt, der sich besonders für den Nachweis von Viren oder anderen partikelförmigen biologischen Proben eignet. Bei der RVS-Methode wird ein Quarzkristall mit Antikörpern beschichtet und mit der Probenflüssigkeit in Kontakt gebracht. Durch die Antikörper können z. B. Viren spezifisch aus der Probe gebunden werden. Nach dem Bindungsereignis wird der Kristall zu so starken Schwingungen angeregt, dass es zum Bruch der Rezeptorbindung kommt (s. Abb. 5.23). Bei diesem Bindungsbruch wird eine Schallwelle produziert, die von dem Quarzkristall, der nun als empfindliches Mikrofon dient, detektiert wird. Die RVS-Technik kann direkt in komplexen Lösungen, wie z. B. Blut, ausgeführt werden, weil spezifische und nichtspezifische Bindungen über den Messmodus unterschieden werden können. Die Methode

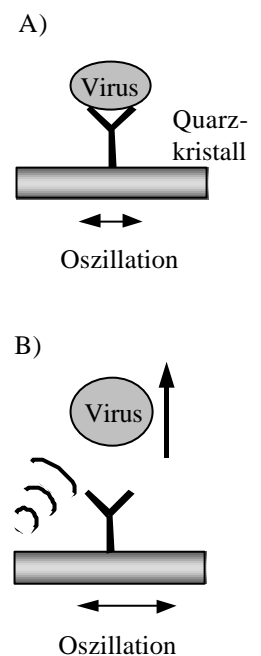


Abb. 5.23. Akustischer Nachweis eines Bindungsereignisses mit der RVS-Methode. A) Der Molekülkomplex wird in Schwingung versetzt, bis es B) zum Bruch der Affinitätsbindung kommt. Das damit verbundene akustische Signal wird detektiert.

²³ Cation hat bereits einen Cantilever-Chip auf den Markt gebracht; jedoch sind die Umsätze hinter den Erwartungen zurückgeblieben und Cation hat im Sommer 2003 seinen Hauptinvestor verloren, so dass die weitere Zukunft des Unternehmens unsicher ist.

soll z. B. in der klinischen Diagnostik für den Nachweis von Virusinfektionen eingesetzt werden. Im Vergleich zu konventionellen Methoden, wie z. B. DNA-basierten Tests, hat sie den Vorteil, dass keine PCR-Amplifikation notwendig ist. Die RVS-Technik hat damit das Potenzial, sich zu einer robusten und besonders einfach zu bedienenden Diagnosemethode für Virusinfektionen zu entwickeln.

Aufgrund der Kombination von robuster Nachweisteknik, die das Arbeiten mit komplexen Flüssigkeiten erlaubt, quantitativer Detektion und der Option, Proben auftrennen zu können, weisen akustische Methoden ein breites Anwendungspotenzial im Bereich Diagnose und Wirkstoffforschung auf. Produkte auf Basis dieser Technologie befinden sich derzeit noch im Entwicklungsstadium [Cooper, 2003].

5.7 Literatur und Patente

Literatur

Chip-Plattformen

Einer Recherche in der SCISEARCH Datenbank zufolge, wurden die ersten Veröffentlichungen über DNA- und Proteinchips Anfang der 90er Jahre publiziert. Ein halbes Jahrzehnt später nimmt die Anzahl der Publikationen auf dem Gebiet der DNA-Chips rasant zu und erreicht im Jahr 2002 mehr als 900 Veröffentlichungen. Aufgrund von technischen und wissenschaftlichen Hürden sind die Fortschritte auf dem Gebiet der Proteinchips deutlich verzögert, was durch einen verzögerten Anstieg der

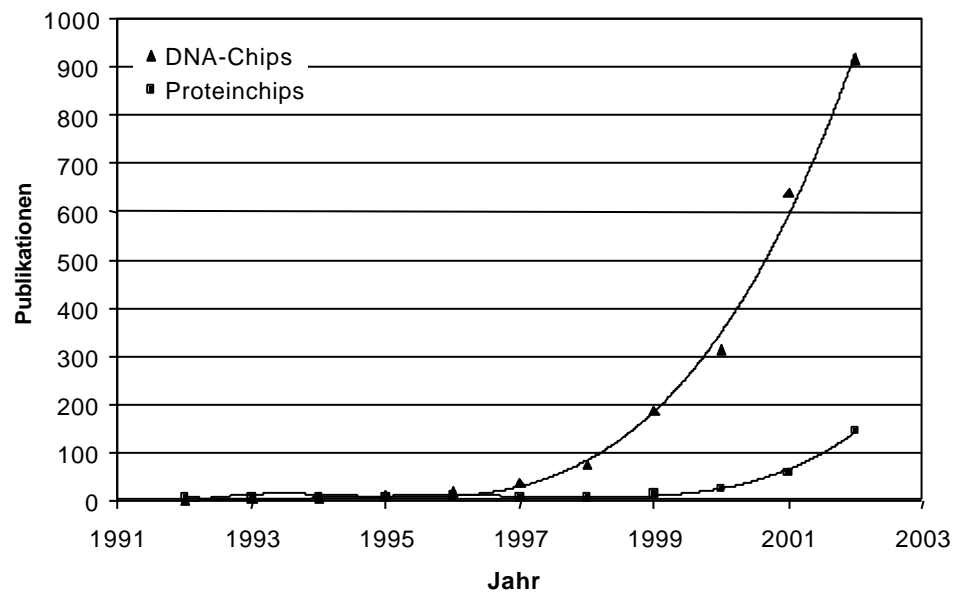


Abb. 5.24. Zeitliche Entwicklung der Publikationen auf den Gebieten der DNA- und Proteinchips. Die Recherche in der SCISEARCH Datenbank umfasst alle Veröffentlichungen mit und ohne Bezug zur Nanotechnologie. Der rasante Anstieg der Publikationen für die DNA-Chips und zeitverzögert auch für die Proteinchips zeigt, dass Nanotechnologie hier für einen Bereich diskutiert wird, der für die biomedizinische Forschung von hoher Bedeutung ist.

Publikationen auf diesem Gebiet (s. Abb. 5.24) reflektiert wird. Lab-on-a-Chip Systeme für die Analyse von Biomolekülen werden Mitte der 90er Jahre das erste Mal in der Literatur erwähnt, und die ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Zellchips werden in der SCISEARCH Datenbank für das Jahr 2000 ausgegeben. Unabhängig vom Chip-Typ werden 45-50 % der Publikationen von amerikanischen Wissenschaftlern veröffentlicht. Bezüglich Anzahl der Publikationen steht Deutschland entweder an zweiter oder an dritter Stelle nach Japan.

Von den in der Literaturanalyse untersuchten Detektionssystemen, deren Funktionalität zumindest zum Teil auf Nanotechnologie basiert, ist die SPR-Spektroskopie am etabliertesten und wird bereits Anfang der 90er Jahre das erste Mal erwähnt (s. Tab. 5.2). Für die anderen Detektorsysteme sind die ersten Veröffentlichungen Ende der 90er Jahre erschienen. Die SPR-Sensoren sind das einzige Nachweissystem, das bereits seit mehreren Jahren in kommerziellen Biochip-Systemen genutzt wird, entsprechend hoch ist die Veröffentlichungsaktivität mit 283 Publikationen in den vergangenen 11 Jahren. Die meisten Veröffentlichungen in abnehmender Reihenfolge kommen aus den USA, Japan, Schweden und Deutschland. Die magnetischen und elektrischen Detektoren sowie die Cantilever-Sensoren befinden sich noch in einem frühen Entwicklungsstadium, und über die einzelnen Technologien sind bislang weniger als 100 Veröffentlichungen erschienen. Was die Anzahl der Publikationen betrifft, liegt Deutschland entweder auf dem 2. oder 3. Platz.

Herstellung und
Chipformate

Tab. 5.2. Ergebnisse der Literaturanalyse in der SCISEARCH Datenbank für die verschiedenen Typen von Biochips und eine Auswahl an Detektionssystemen.

	Erste Publikation	Gesamtzahl Publikationen	Deutsche Autoren / %	Platz Deutschlands im Ranking
DNA-Chips	1991	2774	6,4	3
Proteinchips	1991	408	10,3	2
Lab-on-a-Chip	1996	184	11,4	2
Zellchip	2000	15	5,7	3
SPR-Detektor	1991	283	8,9	4
Elektrische Detektion	1998	84	9,0	2
Magnetische Detektion	1996	33	6,0	3
Cantilever-Sensoren	1998	39	9,1	2

Patente

Auf dem Gebiet der DNA-Chips hält das Unternehmen Affymetrix die bedeutendsten Patente. In seinem entscheidenden Breitbandpatent, das 1989 angemeldet wurde, hat sich Affymetrix die Anordnung von mindes-

tens 1000 Oligonukleotiden auf einem planaren Träger zum Nachweis von DNA-Proben patentieren lassen [Trösch und Ganahl, 2000]. Ein weiteres Unternehmen, das weitreichende Patentrechte auf dem Gebiet der DNA-Chips besitzt, ist OGT (Oxford Gene Technologies). Da die Patente beider Unternehmen im Prinzip dieselbe Technologie beschreiben, waren Affymetrix und OGT in einem mehrjährigen Patentstreit verwickelt, in dem Affymetrix unter anderem vorgeworfen wurde, dass seine Patentansprüche zu breit gefasst sind. Der Patentstreit endete nach zwei Instanzen im Jahr 2001 mit einem Vergleich zwischen beiden Parteien.

Aufgrund der weitreichenden Patente auf dem Gebiet der DNA-Chips ist es Affymetrix gelungen, eine dominierende Position auf dem Biochipmarkt einzunehmen: Mit einem Marktanteil von 27 % im Jahr 2001 ist Affymetrix der Marktführer. Um die Affymetrix und OGT Patente zu umgehen, haben Unternehmen wie Motorola und Agilent versucht, die Chipformate deutlich zu verändern und z. B. Geloberflächen zu benutzen, also 3D-Oberflächen zu konstruieren bzw. andere Verfahren für die Nukleotidsynthese zu entwickeln. Vor allem im Bereich der hochdichten Arrays, wie sie für die Sequenzierungen und Genexpressionsanalyse verwendet werden, ist die Position von Affymetrix aufgrund der Patentlage bislang unangefochten, und der Eintritt in diesen Markt ist für potenzielle Konkurrenten nur unter einem enormen finanziellen Aufwand möglich.

Auf dem Gebiet der elektrischen Biochips, auf dem es bereits starke Forschungsaktivitäten gibt, ist die Patentlage deutlich ausgeglichener. So werden wichtige Patente von Motorola (US), Dissetronic (CH), und FhG-ISIT (D) gehalten. Da es verschiedene elektrische Nachweissysteme gibt, wie elektrochemische Methoden, Leitfähigkeitsmessungen, Impedanzspektroskopie etc., besteht nicht die Gefahr, dass Marktteilnehmer mit Basispatenten den Markteintritt von Konkurrenten praktisch blockieren können. Dasselbe gilt im Prinzip auch für den Proteinchip-Markt: Hier wird das größte Anwendungspotenzial für Chips mit weniger als 1000 Spots gesehen, und die Anzahl der möglichen Plattformen, mit denen solche Chips realisiert werden können, ist vergleichsweise groß.

5.8 Zusammenfassende Bewertung

Von den vier verschiedenen Biochip-Typen, DNA-Chips, Proteinchips, Labs-on-a-Chip und Zellchips, haben in der biomedizinischen Forschung bislang nur die DNA-Chips breite Anwendung gefunden. Die Marktdurchdringung von Proteinchips und Labs-on-a-Chip wird mit einer Zeitverzögerung von etwa 5 Jahren erwartet. Mit 70 % wird der überwiegende Anteil der DNA-Chips auch in den nächsten Jahren für Genexpressionsstudien eingesetzt. Für solche Anwendungen werden vor

allem hochdichte Chips benötigt. Das Marktsegment der hochdichten Chips wird von Firmen wie Affymetrix, Amersham und Agilent dominiert, und die Markteintrittsbarrieren sind hier, insbesondere aufgrund der Basispatente von Affymetrix, sehr hoch.

Die Entwicklung von Proteinchips ist eine sehr viel größere Herausforderung, verglichen zu DNA-Chips, da Proteine chemisch komplexere Moleküle sind als DNA und es bislang keine einfachen Verfahren zu ihrer Synthese gibt. Da Proteinchips, mehr als DNA-Chips, für spezifische Anwendungen maßgeschneidert werden müssen und somit ein deutlich differenzierteres Anwendungsprofil besitzen, ist nicht zu erwarten, dass es den derzeitigen Technologieführern gelingen wird, den Markteintritt potenzieller Konkurrenten durch Basispatente zu blockieren. Vielmehr ist davon auszugehen, dass verschiedene technologische Ansätze auf dem Markt koexistieren werden. Zellchips sind noch ein sehr junges Forschungsgebiet und das Marktpotenzial für diesen Chiptyp ist derzeit noch nicht einschätzbar.

Die Ergebnisse der Literaturanalyse zeigen, welche hohe Bedeutung DNA-Chips in der biomedizinischen Forschung bereits erlangt haben, im Jahr 2002 wurden mehr als 900 Arbeiten in diesem Bereich veröffentlicht. Für Proteinchips zeichnet sich eine ähnliche Entwicklung ab, die jedoch um etwa ein halbes Jahrzehnt verzögert erfolgt, da aufgrund der größeren technischen Herausforderungen die ersten Proteinchips gerade erst auf den Markt kommen.

Das Anwendungspotenzial der Nanotechnologie zur Weiterentwicklung von Biochip-Systemen ist vielfältig. Die in dieser Studie diskutierten Beispiele sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden (s. auch Tab. 5.3).

Anwendungspotenzial
der Nanotechnologie

- 1) Als Ziel bei der Entwicklung hochdichter DNA-Chips galt lange Zeit der Genomchip, mit dem alle Gene des Menschen nachgewiesen werden können. Seit Herbst 2003 wird ein solcher Chip von Affymetrix angeboten. Trotz der enormen Informationsdichte sind solche Chips eine Weiterentwicklung herkömmlicher Technologie, ohne dass hier von Nanotechnologie Gebrauch gemacht werden muss.

Bei Nanochips, wie sie mit der Bioforce oder Dip-Pen-Technologie hergestellt werden können, handelt es sich in der Tat um Nanotechnologie, da der Abstand zwischen den einzelnen Spots ein Mikrometer oder weniger beträgt. Solche Chips erfordern für die Herstellung die experimentell sehr aufwändige AFM-Technologie, und vorerst werden Anwendungen solcher Chip-Typen wohl auf den Forschungsbereich beschränkt bleiben. Sie können z. B. bei der Analyse der Proteome einzelner Zellen Anwendung finden.

- 2) Nanopartikel-Fluoreszenzmarker weisen verschiedene Vorteile im Vergleich zu organischen Fluoreszenzfarbstoffen auf. Sie bleichen

nicht aus, und sie liefern eine höhere Signalintensität. Darüber hinaus sind Multiplex-Anwendungen möglich, was den Weg zu homogenen Assays öffnet; Assays also, die ohne Chip-Plattform auskommen. Der Umsatz an Nanopartikeln, die als Biomarker eingesetzt werden, liegt derzeit in der Größenordnung von etwa 30 Mio. US\$. Jedoch kann ein auf Nanopartikeln basierendes Detektionssystem den entscheidenden technologischen Vorteil einer Chipplattform ausmachen und ihr damit einen entsprechenden Konkurrenzvorteil verschaffen. Während sich Nanophosphore noch in der Entwicklung befinden, sind RLS-Goldpartikel und Quantum-Dots bereits kommerziell erhältlich.

- 3) Zwei kommerzielle Detektionsverfahren für Biochips, bei denen Nanotechnologie zum Einsatz kommt, sind der ZeptoReader[®], der auf TIR-FM Technologie basiert, und SPR-Detektoren. Der Zeptoreader[®] erreicht eine Nachweisempfindlichkeit, die im Vergleich zu herkömmlichen Biochip-Readern um bis zu einem Faktor 100 besser ist. SPR ist eine Technologie, die bereits seit einigen Jahren in kommerziellen Biosensoren eingesetzt wird und die ein markierungsfreies Auslesen der Biochips ermöglicht. Diese Technologie ist inzwischen für den Array Einsatz weiterentwickelt worden und gilt als eine Technik mit großer Perspektive für das markierungsfreie Auslesen von Biochips.
- 4) Zu den neuartigen Chipsystemen, die auf Nanotechnologie basieren, gehören elektrische, magnetische und akustische Nachweisverfahren sowie Cantilever-Sensoren. Diese Systeme sind überwiegend für eine niedrige Sondenzahl ausgelegt und können in der biomedizinischen Forschung zum Einsatz kommen, wenn spezifische DNA- oder Proteinmoleküle nachgewiesen werden sollen. Über den biomedizinischen Bereich hinaus weisen diese Nachweisverfahren ein breites Anwendungsspektrum auf: Sie können in der medizinischen Diagnose, als Biowaffensensoren oder auch in der Wasser- und Agraranalytik, z. B. zur Erkennung von Krankheitskeimen, eingesetzt werden. Von den vorgestellten Verfahren sind die elektrochemischen Verfahren und die Cantilever-Sensoren bislang am weitesten in der Entwicklung fortgeschritten.
- 5) Labs-on-a-Chip und Zellchips sind neuartige Chip-Typen, die sich noch im Stadium der Markteinführung befinden und über die deutlich weniger publiziert wurde im Vergleich zu DNA- und Proteinchips. Die Möglichkeiten, Nanotechnologie für diese Chip-Typen einzusetzen, reichen von der Strukturierung der Oberflächen, über passive Bauelemente, wie Nanoporen und nanoskalige Elektroden, bis hin zu aktiven Elementen im Lab-on-a-chip Bereich, wie z. B. Nanoaktuatoren. Es ist zu erwarten, dass Nanotechnologie zunehmend Einsatz finden wird sowohl für Labs-on-a-chip als auch bei Zellchips, wobei sich die technischen Möglichkeiten gerade erst herauskristallisieren.

Tab. 5.3. Beispiele für das Anwendungspotenzial der Nanotechnologie im Bereich Biochips: Auflistung der Merkmale, die eine Technologie im besonderen Maße kennzeichnen (√ = trifft zu, (√) = trifft für einige der Systeme zu). In der Vertikalen grau unterlegt sind Produkteigenschaften, die nach einer Umfrage der DZ-Bank [2001], von Biochip-Experten als besonders wichtig eingestuft werden.

Nanotechnologie für die Weiterentwicklung von DNA-Chips	Diagnostische Anwendungen	Auf dem Markt eingeführt	Starke Aktivitäten in D	Marktfrei	Erhöhung der Spotdichte	Massenmarkt anvisiert	Sensitivität	Einfache Handhabung	Zuverlässigkeit ¹⁾
Nanoarrays		√		√	√		√		
Nanopartikel-Fluoreszenzmarker	√	(√)	√				√		√
TIR-FM, Zeptosens		√					√		
SPR		√		√				√	
Elektrische Chips	√	(√)	√	(√)		√	√	√	
GMR	√		√			√	√	√	
Cantilever	√	√	√	√		√		√	
Akustische Methoden	√			(√)		√		√	√
C-FIT			√					√	√

¹⁾ Zuverlässigkeit bedeutet in diesem Zusammenhang vor allem eine hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und eine geringe Störanfälligkeit durch unspezifische Bindungen.

In der überwiegenden Anzahl von Biochip-Systemen, die sich derzeit auf dem Markt befinden, spielt Nanotechnologie noch keine Rolle. Jedoch gibt es erste Beispiele, wie den Sensichip[®] von Zeptosens und die SPR-Technologie von Biacore, die zeigen, dass bestimmte Produkteigenschaften nur durch den Einsatz von Nanotechnologie realisiert werden können.

Marktstudien zur Biochiptechnologie sagen für Labs-on-a-Chip und Proteinchips in den nächsten zehn Jahren die größten Wachstumsraten voraus (Abb. 5.25). Dabei gehen Experten davon aus, dass bei der Markteinführung von Proteinchips, Systeme mit einer kleinen Sondenzahl eine weitaus größere Bedeutung haben werden, als es bei den DNA-Chips der Fall war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es weniger um die Charakterisierung des gesamten Proteoms einer Zelle, als vielmehr um den Nachweis spezifischer Klassen von Proteinen geht.

Marktstudien

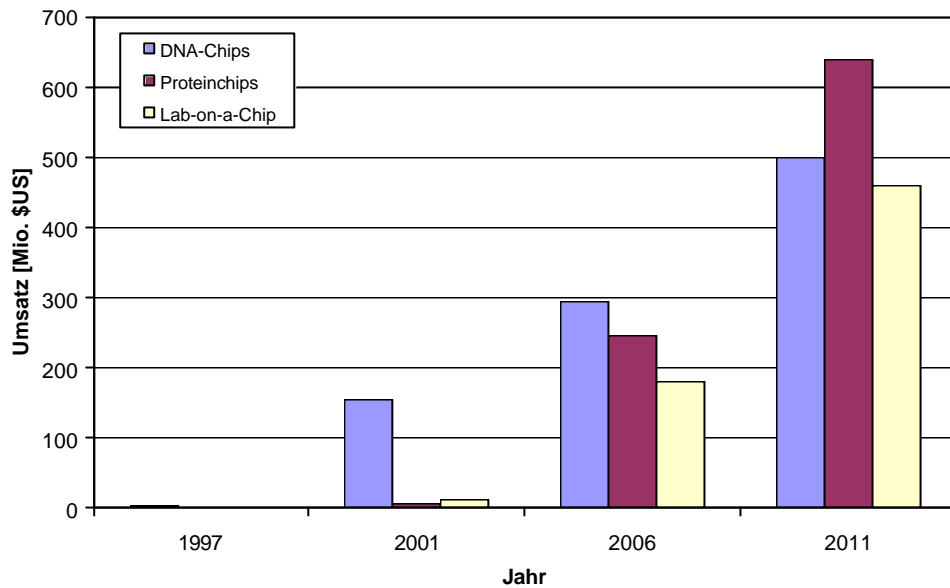


Abb. 5.25. Umsatzentwicklung für verschiedene Biochiptypen [Freedonia, 2002].

Diagnostische Anwendungen

Auch bei diagnostischen Anwendungen, wie sie z. B. im Point-of-Care-Bereich angedacht sind, werden Systeme mit einer kleinen Sondenzahl benötigt, um bestimmte Krankheitsbilder spezifisch nachzuweisen oder die Verträglichkeit eines Patienten auf bestimmte Medikamente zu überprüfen (personalisierte Medizin). Hier wird von vielen Wissenschaftlern ein großer Zukunftsmarkt für Biochips gesehen, der im Vergleich zu den heutigen Anwendungen in der biomedizinischen Forschung ein Massenmarkt ist. Marktstudien zeigen jedoch, dass hier vergleichbare Umsätze, wie sie mit hochdichten Chipsystemen für die biomedizinische Forschung erreicht werden, innerhalb der nächsten Jahre noch nicht zu erwarten sind. Insbesondere die hohen Anforderungen hinsichtlich der Verlässlichkeit der Systeme und die regulatorischen Hürden, die genommen werden müssen, damit solche Systeme in der medizinischen Diagnostik angewendet werden können, lassen eine schnelle Marktdurchdringung nicht erwarten.

Für den diagnostischen Bereich sind folgende Produkteigenschaften der Biochips von besonderer Bedeutung: 1) Eine hohe Bedienungsfreundlichkeit, 2) ein möglichst geringer Aufwand für die Probenaufbereitung und 3) ein robustes, kostengünstiges und platzsparendes Detektorsystem. Das gesamte System muss zudem für die maschinelle Massenanfertigung geeignet sein. Für viele der Detektionssysteme, die auf Nanotechnologie basieren, wird im Diagnostikmarkt eine große Chance gesehen, da sie den herkömmlichen optischen Detektionsverfahren gerade bezüglich dieser Kriterien als überlegen gelten.

Aufgrund der hohen Wachstumsraten und der größeren Diversität des Anwendungsspektrums sind Proteinchips und Labs-on-a-Chip für weitere

Forschungsaktivitäten besonders interessant; bei diesen Chipsystemen bestehen im Vergleich zu den DNA-Chips die größeren Chancen, eine führende Position bei der Entwicklung von Produkten mit großem Marktpotenzial zu erlangen.

6 BIOPHYSIKALISCHE ANALYTIK – WERKZEUGE FÜR DIE ANALYSE UND MANIPULATION VON EINZELMOLEKÜLEN

Nach dem klassischen Ansatz werden bei der Messung physikochemischer Größen, wie z. B. der Temperatur oder der Reaktionsgeschwindigkeit, immer Ensemblemittelwerte bestimmt, weil sie die makroskopischen Eigenschaften eines Systems repräsentieren. Bei biologischen Molekülen hingegen kommt ein weiterer Freiheitsgrad hinzu, da ihre Funktion abhängig ist von der Struktur, also der Konformation, in der sie vorliegen. Bei der Messung von Ensemblemittelwerten geht diese Information zwangsläufig verloren. Für biologische Fragestellungen ist zudem oftmals die orts aufgelöste Darstellung einzelner Molekülbewegungen und Informationen über die Wechselwirkung zwischen einzelnen Molekülen von besonderem Interesse. Diese analytischen Herausforderungen können nur mit Hilfe der Einzelmoleküldetektion gelöst werden. Sie ist damit ein bedeutendes Werkzeug, um ein tiefgreifenderes Verständnis der Zellfunktionen und damit auch der Ursachen von Krankheiten auf molekularer Ebene zu erlangen.

Die Einzelmoleküldetektion wird derzeit durch zwei verschiedene Ansätze dominiert: Die Rastersondenmethoden, bei denen über die Wechselwirkungen einer Sonde mit einer Oberfläche Informationen über die Struktur der Oberfläche erhalten werden und die optischen Methoden, mit denen einzelne Moleküle nicht nur auf Oberflächen sondern auch in Lösung nachgewiesen werden können. In einem Review Report [Brown et al., 2001] vom National Physical Laboratory, U. K., über Einzelmolekülanalytik werden 11 verschiedene analytische Methoden aufgeführt, wobei auch dieser Report nur eine Auswahl der wichtigsten Methoden enthält. In diesem Kapitel beschränken wir uns darauf, die Rasterkraftmikroskopie und SNOM (Scanning Near Field Optical Microscopy) als zwei Vertreter der Rastersondenmethoden vorzustellen und die Fluoreszenzmikroskopie als Beispiel für optische Methoden. Weiterhin werden Laserpinzetten als neuartige Werkzeuge für die Manipulation von Biomolekülen diskutiert.

6.1 Rasterkraftmikroskopie

Bei der Rastersondenmikroskopie (SPM, Scanning Probe Microscopy) werden über die Wechselwirkung einer spitzen nanoskaligen Sonde mit der Oberfläche einer Probe Informationen über die molekulare Oberflächenstruktur erhalten. Um die Oberfläche kartographisch abzubilden, wird die Sonde rasterförmig über die Probe geführt.

Das Rastertunnelmikroskop (STM, Scanning Tunneling Microscope) stellte den Ausgangspunkt für die Entwicklung dieser Technologie dar.

Es wurde 1981 am IBM-Forschungslabor in Rüschlikon von Binnig und Rohrer entwickelt, die 1986 dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Basierend auf der Piezotechnik und Software, die aus der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops hervorgegangen ist, sind eine ganze Reihe von Methoden entstanden, die mittels einer berührungslosen Wechselwirkung eine Oberfläche abtasten.

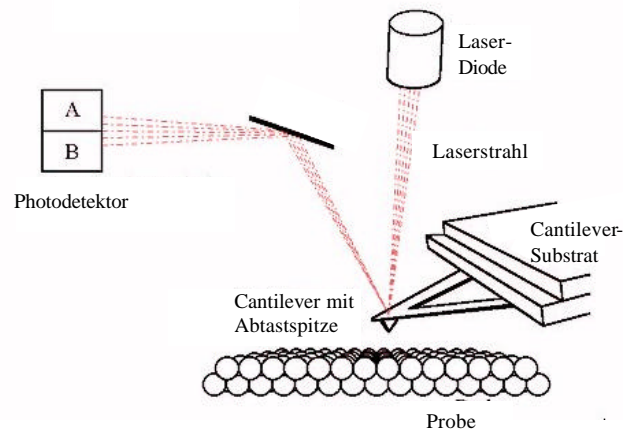


Abb. 6.1. Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops.

Quelle: Universität Freiburg, <http://lapis.chemie.uni-freiburg.de/~zoen/pz-diss.html>

Die für die Analyse biologischen Materials mit Abstand wichtigste Rastersondenmethode ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM, Atomic Force Microscopy). Das erste Rasterkraftmikroskop wurde Mitte der 80er Jahre von Binnig, Gerber und Quate vorgestellt. Um Proben abzurastern, wird eine feine am untersten Ende nur wenige Nanometer breite Spitze an einem Federarm befestigt und über die Probe geführt. Aufgrund des geringen Abstands zwischen Probe und Spitze sind bei dieser Anordnung interatomare Kräfte wirksam, die empfindlich von der Entfernung zwischen Probe und Oberfläche abhängen. Wird der Federarm über die Probe geführt, so erfolgt eine Auslenkung gemäß der topographischen Struktur, die piezoelektrisch oder mit einem Laserstrahl gemessen werden kann (Abb. 6.1). Das Ergebnis eines AFM-Scans ist damit eine dreidimensionale Darstellung der Struktur einer Oberfläche. Die auf einem planaren Substrat fixierten biologischen Proben können dabei im Vakuum, an Luft oder unter Wasser untersucht werden. Aufgrund der intensiven Entwicklungsarbeit in den letzten 15 Jahren gilt das AFM als eine ausgereifte und robuste Untersuchungstechnik für die Nanobiotechnologie.

Analyse biologischer Materialien

Anwendungen des AFM zur Untersuchung biologischer Proben wurden bereits in mehreren Übersichtsarbeiten behandelt, wie z. B. bei Müller und Anderson [2002] sowie Kidoaki und Matsuda [2002]. Typische Anwendungsszenarien umfassen die Detektion von DNA-Einzelmolekülen, die Untersuchung von Zellmembranen und das Studium von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. Neben der Abtastung von Objekten kann ein AFM auch zur Manipulation der Messobjekte genutzt werden, wie z. B. zum Schneiden von DNA oder dem Verschieben von Biomolekülen. Das AFM ist daher ein universelles Werkzeug zur Darstellung und Manipulation von Biomolekülen im Nanometermaßstab. Im Folgenden sollen drei Beispiele für die Anwendung des AFM zur Untersuchung biologischer Proben gegeben werden:

- In der Arbeitsgruppe von D. J. Müller am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik ist ein AFM eingesetzt worden, um Connexine zu untersuchen [Müller und Anderson, 2002]. Connexine sind Proteine, die die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen steuern, indem sie den intrazellulären Raum überbrücken. Kalziumionen bewirken eine Konformationsänderung des Proteins, bei der die Proteinpore geschlossen wird. Dem Wissenschaftsteam um D. J. Müller ist es gelungen, mit einem AFM diesen wichtigen Schutzmechanismus direkt sichtbar zu machen (s. Abb. 6.2).
- Ein Beispiel, wie strukturelle Informationen über Biomoleküle mit Hilfe von AFM-Messungen gewonnen werden können, ist in der Veröffentlichung von Stahlberg et al. [2001] gegeben. Von dem Proteinkomplex F_0F_1 -ATP Synthase wurden AFM-Aufnahmen mit einer lateralen Auflösung von 0.5 nm und einer vertikalen Auflösung von 0.1 nm gemacht, die es ermöglichten, die verschiedenen Untereinheiten darzustellen und ihre Stöchiometrie zu bestimmen.
- Parbhu et al. [2002] untersuchten mit einem AFM in Echtzeit die Aggregation von Amyloid β -Protein. Die Studie diente als Modellsystem für die Bildung von Protein-Plaques, wie sie z. B. bei der Alzheimer-Krankheit auftreten.

Die AFM-Technologie kann auch verwendet werden, um Kräfte zu messen, wie sie beispielsweise zwischen zwei Biomolekülen wirken oder wie sie zur Entfaltung eines Biomoleküls notwendig sind. Diese Technik ist bereits im Kapitel 5 beschrieben worden und soll an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden.

Eine Weiterentwicklung der AFM-Technik stellt die magnetische Kraftmikroskopie (MFM, Magnetic Force Microscopy) dar, bei der der Cantilever eine ferromagnetische Spitze trägt. Durch Abrastern von Oberflächen in relativ großer Entfernung entstehen Abbilder der magnetischen

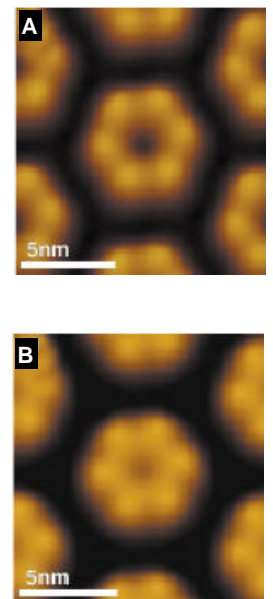


Abb. 6.2. Aufnahmen von Connexin mit einem AFM: A) geöffnete Pore, B) geschlossene Pore nach Kontakt mit Kalziumionen.

Quelle: [Müller und Anderson, 2002]

Struktur [Hartmann, 1996]. Obwohl eigentlich für ferromagnetische Oberflächen und magnetische Datenspeicher entwickelt, bietet die Methode auch das Potenzial zur Untersuchung biologischer Nanosysteme: Eine Anwendungsperspektive ist beispielsweise die Messung von mit Magnetpartikeln markierten Molekülen innerhalb von lebenden Zellen. Einschränkungen der magnetischen Kraftspektroskopie ergeben sich vor allem durch die gegenüber dem AFM schlechtere laterale Auflösung.

Forschungsbedarf

Die Rasterkraftmikroskopie ist zu einer etablierten Technik für die Darstellung der Topographie einzelner Biomoleküle geworden, wobei eine Auflösung von weniger als 1 nm erreicht wird. Der nächste Schritt wird es sein, AFM-Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen den verschiedenen molekularen Maschinen zu untersuchen, um die wirksamen Prinzipien, die diesen Maschinen zugrunde liegen, zu verstehen [Müller und Anderson, 2002]. Um Konformationsänderungen von Molekülen in Echtzeit untersuchen zu können, sind auch Fast-speed-Instrumente, die eine zeitliche Auflösung von 10-15 Scans pro Sekunde erreichen noch zu langsam. Besonders in der Grundlagenforschung besteht daher ein Interesse an noch schnelleren AFMs. Parallelisierte AFM-Systeme, in denen die Abtastung der Probe über ein Array von Spitzen erfolgt, befinden sich bereits in Entwicklung: Ein monolithisches 5x5-Sonden-Array wurde kürzlich vom IBM-Forschungslabor in Rüslikon präsentiert. Darüber hinaus gibt es Bestrebungen, die gesamte Technik so weiterzuentwickeln, dass die Produktionskosten des AFM vergleichbar mit denen eines optischen Mikroskops werden. Dadurch könnte es als Routineinstrument für die Untersuchung von biologischen Oberflächen und Einzelmolekülen eine deutlich weitere Verbreitung finden.

6.2 Scanning Near-Field Optical Microscopy

Die Auflösung in der klassischen Mikroskopie ist aufgrund physikalischer Gesetzmäßigkeiten auf die halbe Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes limitiert und beträgt damit etwa 250 nm. Um diese Einschränkung zu überwinden, wird in der Scanning Near-Field Optical Microscopy (SNOM) das Licht, mit dem die Probe bestrahlt wird, auf einen Punkt lokalisiert, dessen Durchmesser deutlich kleiner als die Wellenlänge des Lichtes ist. Durch die Verwendung von nanoskaligen Aperturen kann dies erreicht werden. In der klassischen SNOM-Konfiguration wird dazu ein Laser in eine Glasfaser eingekoppelt, deren konifizierte und metallisierte Spitze eine Apertur von typischerweise 50-100 nm Weite aufweist (s. Abb. 6.3).

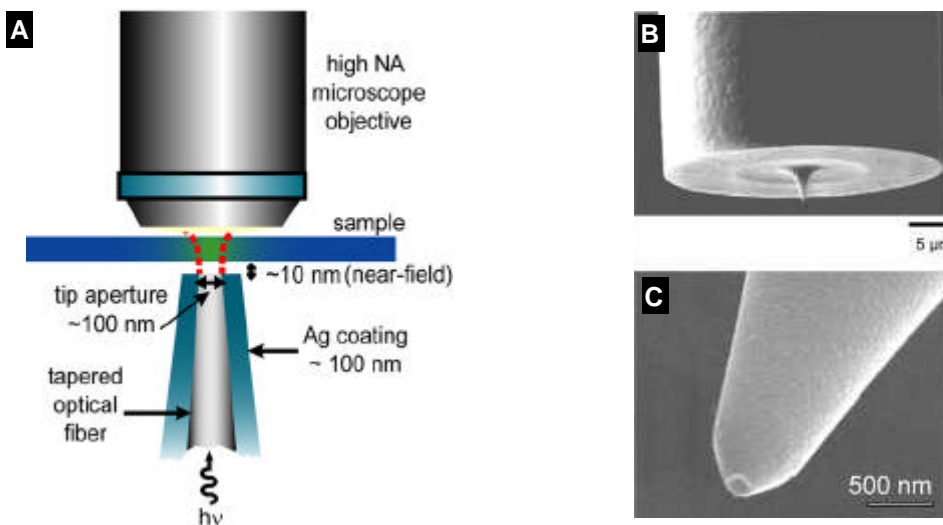


Abb. 6.3. A) Aufbau einer SNOM-Apparatur. B) und C) SNOM-Spitze mit nanoskaliger Apertur, durch die das Licht auf die Probe geleitet wird.

Quellen: A) University of California, Santa Barbara, http://www.chem.ucsb.edu/~buratto_group/NSOMschematic.jpg; B) und C) JASCO, <http://www.jasco.co.uk/images/nsomprobes2.jpg>

Als Preis für die erhöhte Auflösung ändert sich der Charakter des Lichtes und hinter der Apertur bilden sich Evaneszenzwellen aus, deren Intensität exponentiell mit der Entfernung von der Apertur abnimmt. Daher muss die Apertur auf etwa 10 nm an die Probe herangeführt werden. Detektiert wird entweder das reflektierte Licht mittels der gleichen Faser-Apertur oder das durch eine transparente Probe hindurch transmittierte Licht mittels einer gegenüberliegenden Lichtsammeloptik. Eine der wichtigsten Innovationen im Hinblick auf eine verbesserte Auflösung war die Einführung der sogenannten aperturlosen SNOM, bei der die Spitze des Cantilevers als Streulichtquelle dient.

Mit SNOM-Verfahren können Untersuchungsobjekte mit einer räumlichen Auflösung von ca. 50-80 nm detektiert werden. Eine wichtige Einschränkung im Hinblick auf biologische Systeme ist die deutliche Verschlechterung der Auflösung, wenn direkt in Wasser gemessen wird. SNOM-Instrumente können mit Rastersondenmikroskopen in einem System kombiniert werden, so dass optische und topografische Information simultan (mit einer lateralen Auflösung von ca. 50 nm) zugänglich ist.

Erste biologische Anwendungen von SNOM, in denen Biomoleküle direkt oder mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern sichtbar gemacht wurden, sind in der Literatur beschrieben. Die folgenden drei Beispiele sollen

einen Eindruck von der Art der Experimente geben, bei denen SNOM eingesetzt wird:

- Perner et al. [2002] haben mit Hilfe von SNOM die Auswirkung von 17β -Estradiol, einem körpereigenen Hormon, auf Brustkrebszellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Konzentration von 17β -Estradiol einen Einfluss auf die Geometrie der Zelle hat. Die Autoren sehen die Möglichkeit, dass diese Methode für die Diagnose und Therapiekontrolle von Brustkrebs eingesetzt werden könnte.
- In einer SNOM-Studie haben Rieti et al. [2002] die Auswirkungen von elektromagnetischer Strahlung auf Keratinocyten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Strahlungseinwirkung, die räumliche Verteilung von β_4 -Integrin (einem Adhensions-Marker) beeinflusst und damit zu physiologischen Änderungen auf der Zellebene führt.
- Eine besonders für die Grundlagenforschung im Bereich Nanobiotechnologie interessante Arbeit wurde von Kim et al. [2002] publiziert: DNA-Moleküle von λ -Phagen wurden auf einer Glimmeroberfläche mit Hilfe eines elektrischen DC-Felds linearisiert, fixiert und mit SNOM untersucht.

Der breiten Einführung von SNOM-basierten Detektionssystemen für die nanoskopische optische Detektion stand bislang der hohe apparative Aufwand und die komplexe Justage entgegen. Darüber hinaus gilt SNOM auch 15 Jahre nach seiner Erfindung noch immer nicht als eine voll ausgereifte Technik, was sich in einer Vielzahl an Publikationen niederschlägt, die sich mit technischen Verbesserungen beschäftigen [Kirstein 1999].

6.3 Optische Pinzetten

Optische Pinzetten nutzen Laserlicht anstelle von mechanischen Werkzeugen, um nano- und mikroskalige biologische Objekte zu manipulieren (Abb. 6.4). Dafür wird ein stark fokussierter Laserstrahl verwendet, dessen Fokus nur noch einen Durchmesser von wenigen Mikrometern aufweist. Mit einem solchen sehr inhomogenen Laserfeld können Partikel eingefangen werden, vorausgesetzt ihr Brechungsindex ist im Vergleich zur Umgebung höher. Dieser Effekt lässt sich folgendermaßen erklären: Sowohl beim Eintritt in das Partikel als auch beim Austritt wird der Laserstrahl gebrochen und sein Impuls ändert sich. Aufgrund dieser Impulsänderungen wirken Kräfte auf das Teilchen, die zusammengenommen das Teilchen in Richtung des Fokus des Laserstrahls ziehen und dort fixieren.

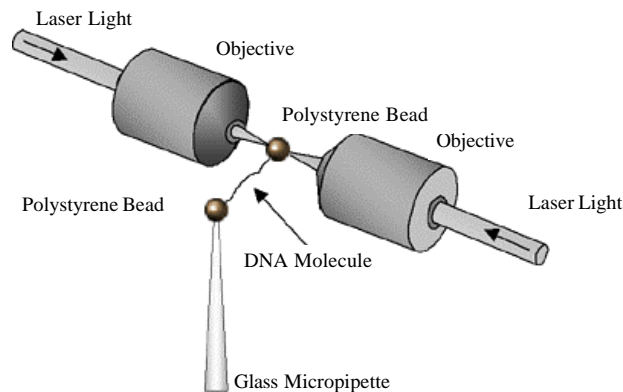


Abb. 6.4. Aufbau eines Experiments, bei dem eine optische Pinzette verwendet wird, um die Wechselwirkung zwischen DNA und Proteinen zu untersuchen. Die Proteine befinden sich in Lösung und sind auf der Abbildung nicht gezeigt.

Quelle: University of Minnesota, <http://www.chem.umn.edu/netstep/2001/june/27kmf.html>

Ashkin und Dziedzic [1987] veröffentlichten die erste Arbeit, in der lebende biologische Objekte mit einer Laserpinzette eingefangen wurden. Die verwendeten Zellen überstanden die Lasermanipulation ohne nachweisbare Schädigungen. Seitdem wird eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten der optischen Pinzette zur Untersuchung biologischer Objekte diskutiert. So können beispielsweise Zellen und Bakterien eingefangen, selektiert und mit Nanometergenauigkeit positioniert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Wechselwirkungen von Zellen untereinander zu untersuchen. Die zusätzliche Einkopplung eines Ultraviolettlasers, der gepulst betrieben wird, erlaubt es, feinste biologische Strukturen in Zellen zu bearbeiten: So ist es beispielsweise möglich, kleine Fragmente aus Chromosomen zu schneiden oder Zellen miteinander zu fusionieren¹. Außerdem können Laserpinzetten für die Gentransfektion genutzt werden, also um DNA-Fragmente in Zellen einzubringen. Die folgenden zwei Beispiele illustrieren die Art der Experimente, die mit Laserpinzetten durchgeführt werden können:

- Einem Team um Professor Wang, Cornell University, ist es gelungen, mit optischen Pinzetten, DNA aus Chromatin-Komplexen zu entfal-

¹ In dem vom BMBF geförderten Projekt „Optische Nanochirurgie – Von der DNA bis zur Zelle“ wird ein Verfahren entwickelt, das genau solche Manipulationen ermöglichen soll. Bei der in Entwicklung befindlichen Methode wird ein Nanopartikel an ein DNA-Fragment mit einer definierten Basenabfolge gekoppelt. Wird dieses DNA-Fragment mit einzelsträngiger Proben-DNA zusammengegeben, so erfolgt eine Hybridisierungsreaktion an der Stelle der Proben-DNA, die zu dem DNA-Fragment komplementär ist. Durch Einstrahlung von Laserlicht, das von dem Nanopartikel absorbiert wird, soll dann die Proben-DNA an definierter Stelle gebrochen werden. Projektpartner des Forschungsverbundes sind die Jenlab GmbH, Jena, und das Institut für Physikalische Hochtechnologie, Jena [König, 2003].

ten [Brower-Toland et al., 2002]. Diese DNA-Entfaltung ist von großer Bedeutung für die frühen Schritte bei der DNA-Transkription. Auf Basis der experimentellen Ergebnisse konnte ein Mechanismus entwickelt werden, der die einzelnen Schritte der DNA-Entfaltung beschreibt.

- In einer Veröffentlichung in Applied Physics Letters beschreiben Hirano et al. [2002] eine neuartige Methode, um DNA mit optischen Lasern zu manipulieren. Während bislang kleine Polymerkügelchen kovalent an die DNA gebunden werden mussten, um die DNA mit optischen Pinzetten zu handhaben, verwendete das Team dielektrische Polymerkügelchen, die sich im Fokus der Pinzette clusterten. Mit diesen Beadclustern ist es gelungen, DNA an einer beliebigen Stelle entlang des Stranges einzufangen und dann zu bewegen. Durch Abschalten des Lasers konnte die DNA dann wieder freigegeben werden. Diese Methode bietet Perspektiven sowohl für den Einsatz in der Gentherapie als auch generell für die besonders sanfte Manipulation von Biomolekülen, wie sie in der Bioanalytik oftmals erforderlich ist.

Die Laserpinzette ist bereits heute ein wichtiges Werkzeug für den Biochemiker, um Zellfunktionen aufzuklären und einzelne Zellbestandteile auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Insbesondere die Kombination von optischen Pinzetten mit Laserskalpells eröffnet ganz neue Möglichkeiten, zerstörungsfrei biologische Objekte auch innerhalb lebender Zellen zu manipulieren. Damit ist zu erwarten, dass diese Technologie zu einem wichtigen Werkzeug in der biochemischen und biomedizinischen Forschung wird.

Photonisches Kraftmikroskop

Das Photonische Kraftmikroskop (PFM, Photonic Force Microscope) ist ein Rasterkraftmikroskop, in dem die Abtastung nicht über einen Hebelarm, sondern eine optische Pinzette und ein Kunststoff- oder Glaskügelchen erfolgt. Es wurde im Arbeitskreis von H. Hörber am EMBL (European Molecular Biology Laboratory) in Heidelberg entwickelt [Hörber und Miles, 2003; Pralle et al., 2000]. Das Kügelchen wird im Fokus der optischen Pinzette fixiert und direkt oberhalb der Oberfläche der Probe positioniert. Um ein dreidimensionales Bild der Oberfläche zu erhalten, wird die Probe dann mit Piezotechnik rasterförmig verschoben. Die Wechselwirkung der Probe mit der PFM-Sonde führt zu deren Auslenkung, die optisch detektiert werden kann.

Der große Vorteil des PFMs im Vergleich zur herkömmlichen Rasterkraftmikroskopie ist der deutlich geringere Auflagedruck der Sonde auf der Probe. Zudem vermag die PFM-Sonde den komplizierten Formen der Eiweißmoleküle, die aus der Zellwand emporragen, besser zu folgen als der Hebelarm des AFMs.

Dies ermöglicht es, mit dem PFM empfindliche Zellmembranen ohne Deformationseffekte zu untersuchen. Die bisher verwendeten Partikel sind zwischen 40 nm und 1 Mikrometer groß und beschränken die Auflösung des PFM auf etwa 50 nm. Wie beim AFM, können durch die Ankopplung von Molekülen an das Kügelchen Einzelmolekülexperimente durchgeführt werden, wobei die Kraftsensitivität die des AFMs um 2-3 Größenordnungen übersteigt.

Ende der 90er Jahre wurde diese Technologie erstmalig eingesetzt, um Zelloberflächen zu untersuchen. In den Experimenten konnten sogenannte „Rafts“ auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Diese Bereiche, in denen die Membran eine deutlich geringere Viskosität und eine erhöhte Konzentration an Membranproteinen aufweist, sind von Bedeutung für die Proteinanordnung auf der Zelloberfläche und für zelluläre Signalprozesse. Die im Arbeitskreis von H. Hörber durchgeführten Experimente ergaben eine Größe der Rafts von etwa 50 nm. Ein weiterer Einsatzbereich der PFM ist die Untersuchung von Motorproteinen. Um den Bewegungsmechanismus dieser Proteine aufzuklären, erscheint das PFM aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit als ein besonders geeignetes Werkzeug.

6.4 Laserinduzierte Fluoreszenz

Bei der Einzelmoleküldetektion mittels laserinduzierter Fluoreszenz können fluoreszierende Biomoleküle direkt nachgewiesen werden, indem die Fluoreszenz mit einem Laser angeregt und das Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Mikroskops ausgelesen wird. Die meisten Biomoleküle sind allerdings nicht fluoreszenzaktiv und müssen daher zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit Nanopartikeln, wie beispielsweise Quantum-Dots oder Nanophosphoren, markiert werden.

Während das AFM eine extrem hohe räumliche Auflösung erreicht und der direkteste Weg ist, einzelne Moleküle nachzuweisen, sind optische Methoden nicht auf Oberflächen beschränkt und sind daher für ein größeres Spektrum von biologischen Systemen einsetzbar.

Die größte Herausforderung bei der Einzelmoleküldetektion in Lösung mittels laserinduzierter Fluoreszenz liegt in der Reduktion des Hintergrundsignals, das durch die Lichtstreuung der Lösung und darin enthaltener Verunreinigungen verursacht wird. Um dieses Hintergrundrauschen zu reduzieren, muss das räumliche Beobachtungsvolumen so weit wie möglich eingegrenzt werden. Daher werden für diese Methoden vielfach konfokale Mikroskope eingesetzt, bei denen durch eine spezielle Anordnung der Linsen und Blenden erreicht wird, dass nur Licht aus der Brennebene, also aus einem extrem kleinen Volumen der Probe, auf den Detektor fällt. Mit dieser Technik werden Beobachtungsvolumina im Femtoliterbereich (10^{-15} l) erreicht, die eine Detektion von individuellen Farb-

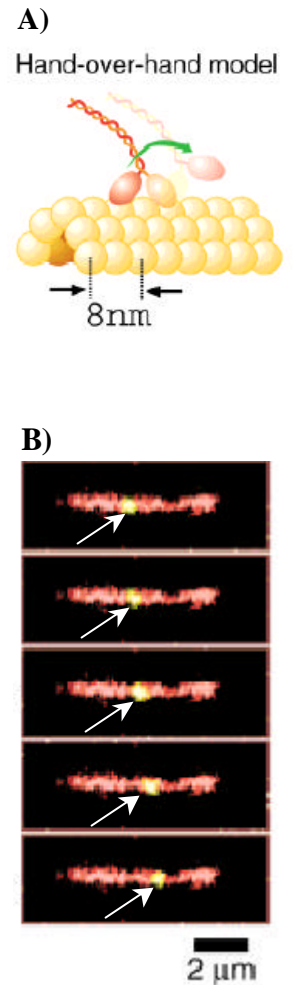


Abb. 6.5. A) Schematische Darstellung des Motorproteins Kinesin auf einer Transportschiene (Mikrotubuli). B) Einzelmoleküldetektion: Gezeigt ist die Bewegung von Kinesin entlang eines Mikrotubuli innerhalb einer Sekunde. Kinesin ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert worden.

Quelle: [Ishii und Yanagida, 2000]

stoffmolekülen bei Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-11} Mol pro Liter Lösung erlauben. Im Mittel befindet sich dann weniger als ein Molekül im Beobachtungsvolumen.

Die in den letzten Jahren wachsende Bedeutung der fluoreszenzbasierten Einzelmoleküldetektion ist auf die Weiterentwicklung der Laser und der Detektortechnologie und auf die seit einiger Zeit verfügbaren sehr effizienten Fluoreszenzmarker, darunter auch Nanopartikel-Systeme, zurückzuführen. Darüber hinaus ist die technische Ausrüstung für diese Technologie in den letzten Jahren deutlich billiger geworden, was ihre Verbreitung stark begünstigt hat.

Eine Vielzahl von Anwendungen der fluoreszenzbasierten Einzelmoleküldetektion findet der interessierte Leser in einer Reihe von Übersichtsartikeln [Schwille und Kettling, 2001; Ishii und Yanagida, 2000; Weiss, 1999]; im Folgenden sollen lediglich zwei Beispiele aufgeführt werden:

- Sako et al. [2000] haben mit Hilfe der optischen Einzelmoleküldetektion die ersten Schritte der Signalübertragung der epidermalen Wachstumsfaktoren² (EGF) untersucht. Mit ihrem Experiment konnten sie die Dimerisierung und Phosphorylierung bei der Signalübertragung auf der Zelloberfläche aufklären. Die Studie gilt als ein Paradebeispiel für die Aufklärung molekularer Vorgänge in der Zelle, wie sie nur mit Hilfe der Einzelmoleküldetektion möglich ist.
- Ein Team um Paul Selvin, University of Illinois, hat mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion, den Bewegungsablauf von Myosin V aufgeklärt [Yildiz et al., 2003]. Das Motorprotein ist verantwortlich für den Transport von Biomolekülen innerhalb der Zellen entlang von Actin-Filamenten. In den Experimenten ist einer der „Füße“ des Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden (s. auch Abb. 6.5). Die Messungen wurden mit einer TIRF-Apparatur durchgeführt. Dabei konnte durch ein spezielles Auswerteverfahren der Daten die laterale Auflösung für die Detektion von Fluoreszenzsignalen deutlich erhöht werden, so dass es möglich wurde, die Schrittbewegung des Motorproteins zu beobachten. Die Ergebnisse der Untersuchungen unterstützen stark die Hypothese, dass sich Myosin V nach dem sogenannten „Hand-über-Hand“-Mechanismus bewegt, der vergleichbar mit der Schrittabfolge beim Gehen eines Menschen ist.

Um nanoskalige Bestandteile der Zelle, wie z. B. Reaktionszentren, Membranen oder einzelne Filamente, mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können, muss wie bei der SNOM-Technik, die Beugungsgrenze der Auflösung durchbrochen werden. In dem vom BMBF

² Epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) werden in Epi- u. Endothelzellen nachgewiesen. EGF-Rezeptoren befinden sich an der Oberfläche von Tumorzellen und fördern das Tumorstadium.

geförderten Projekt „Optische Nanoskopie für zelluläre Systeme“³ ist eine Strategie entwickelt worden, mit Hilfe einer neuartigen Optik (4Pi-konfokale Mikroskopie) und einem neuartigen spektroskopischen Verfahren (STED, Stimulated Emission Depletion) diese Beugungsgrenze zu überwinden. Das entwickelte STED-4Pi-Mikroskop erreicht eine Auflösung von einigen 10 nm und ermöglicht die Abbildung von fluoreszenzmarkierten Zellbestandteilen mit bislang unerreichter Schärfe. Die STED-4Pi-Mikroskopie gilt sowohl für die biologische Forschung als auch für technische Anwendungen als ein Verfahren mit interessanten Perspektiven [Dyba und Hell, 2002].

Die Einzelmoleküldetektion mittels laserinduzierter Fluoreszenz wird auch in Zukunft einen großen Beitrag zur Aufklärung der Struktur und Funktion von Biomolekülen leisten und so ermöglichen, das Zusammenspiel dieser Moleküle in der Zelle besser zu verstehen. Eine große Herausforderung wird es sein, diese Techniken für das Studium von Vorgängen innerhalb lebender Zellen weiterzuentwickeln. Dabei ist zu erwarten, dass die Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion auch in der biomedizinischen Forschung zunehmend an Bedeutung gewinnen wird, weil sie dazu beitragen kann, pathogene Prozesse auf molekularer Ebene aufzuklären.

6.5 Zusammenfassende Bewertung

Die Einzelmolekülspektroskopie ist zu einem wichtigen Werkzeug in der Nanobiotechnologie geworden, um die Strukturen und Struktur-Funktionsbeziehungen von Biomolekülen aufzuklären. Die beiden dominierenden Methoden sind die Rastersondenmikroskopie und die laserinduzierte Fluoreszenz. Weiterhin werden Laser eingesetzt, um biologische Moleküle zu manipulieren, also z. B. ihre Position zu verändern oder sie zu zerschneiden. Die wichtigsten Aspekte der vorgestellten Systeme sollen im Folgenden noch einmal zusammengefasst werden:

- Die Rasterkraftmikroskopie zählt zu den etablierten Methoden in der Nanobiotechnologie und wird eingesetzt, um die Oberflächenstrukturen von Biomolekülen und Zellen aufzuklären. Derzeit wird an der Weiterentwicklung dieser Technologie gearbeitet, um eine höhere zeitliche Auflösung zu erreichen, die es ermöglicht Struktur-Funktionsbeziehungen von Biomolekülen zu messen.
- SNOM gehört ebenfalls zur Gruppe der Rastersondenmethoden, bei der durch Nutzung von Nahfeldeffekten eine optische Auflösung von etwa 50 nm erreicht wird. Die Methode ist kompatibel zur Rasterkraftmikroskopie, so dass optische und topographische Informationen

³ Die Verbundpartner des Projektes sind Leica Microsystems, Heidelberg, das MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen, und die Universität Heidelberg.

simultan gewonnen werden können. Mittlerweile gibt es erste Beispiele für die Anwendungen von SNOM in der Nanobiotechnologie, wie z. B. die Untersuchung von Zelloberflächen oder Biomolekül-Komplexen. Jedoch gilt die Methode auch 15 Jahre nach ihrer Einführung noch nicht als voll ausgereift.

- Optische Pinzetten nutzen Laserstrahlen, um mikro- und nanoskalige Teilchen einzufangen, zu detektieren und zu bewegen. Diese Methode kann kombiniert werden mit einem sogenannten Laserskalpell, mit dem Biomoleküle innerhalb der Zelle zerschnitten oder ihre funktionalen Elemente ausgeschaltet werden können. Diese optischen Methoden befinden sich noch in einer vergleichsweise frühen Entwicklungsphase und gelten als hochinteressante Werkzeuge für die Nanobiotechnologie.
- Die Einzelmoleküldetektion mittels laserinduzierter Fluoreszenz ermöglicht den Nachweis von einzelnen Molekülen auch in Lösung. Mit ihr können beispielsweise die Bewegungsabläufe von Motorproteinen oder Signalwegen innerhalb der Zelle aufgeklärt werden. Mehrere Übersichtsartikel, die über solche Anwendungen publiziert wurden, dokumentieren die große Bedeutung, die diese Methode bereits heute bei der Untersuchung von Zellbestandteilen und -funktionen erreicht hat.

Der Einzelmoleküldetektion kommt eine besondere Bedeutung in der Molekularbiologie und der biomedizinischen Forschung zu, da sie ein tiefgreifenderes Verständnis von Zellfunktionen und pathologischen Prozessen auf molekularer Ebene erst ermöglicht. Damit wird eine wichtige Voraussetzung z. B. für die Entwicklung neuer Medikamente oder verbesserter Gewebematrizes im Tissue Engineering geschaffen. Die Methoden der Einzelmoleküldetektion werden im Wesentlichen in Forschungslabors angewandt, so dass hier für den Forschungsmarkt typische Marktvolumina zu erwarten sind: In einer BCC Studie [2003] wird der weltweite Umsatz an Rastersondenmikroskopen inklusive der Peripherie für 2003 auf 200 Mio. US\$ geschätzt. Auch wenn die vorgestellten Methoden der Einzelmoleküldetektion zum Teil bereits in der Nanobiotechnologie etabliert sind, so gibt es dennoch Forschungsbedarf, um sie weiter zu verbessern und ihre Anwendungsbereiche auszubauen. Zwei wichtige Ziele sind hierbei die Entwicklung von Methoden, die die Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen von Biomolekülen ermöglichen und die „Nanochirurgie“ zur Manipulation von Zellbestandteilen innerhalb lebender Zellen.

7 BIOAKTIVE MATERIALIEN UND OBERFLÄCHEN

In diesem Kapitel soll aufgezeigt werden, welche Möglichkeiten die Nanobiotechnologie bietet, die Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien, orthopädischen Implantaten und bakteriziden Oberflächen zu optimieren.

Bei der Weiterentwicklung von Implantatmaterialien sind die Verlängerung der Lebensdauer und eine verbesserte Bioverträglichkeit zwei wichtige Zielsetzungen. Um die Wechselwirkungen zwischen Implantat und Gewebe zu beschreiben, wird zwischen Biokompatibilität und Biofunktionalität unterschieden: Ein Material wird als biokompatibel bezeichnet, wenn es biologisch verträglich ist, also weder toxische noch immunologische Reaktionen hervorruft. Biofunktionale Materialien wechselwirken darüber hinaus aktiv mit biologischen Materialien, das heißt, sie haben beispielsweise einen aktiven Einfluss auf die Proteinexpression von Zellen oder das Zellwachstum. Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung von nanostrukturierten Implantatmaterialien ist es, die Biokompatibilität zu optimieren und so weit wie möglich auch eine gewisse Biofunktionalität zu erreichen.

Um den Verschleiß bei Gelenkimplantaten zu reduzieren, werden Materialien mit hoher Härte und niedriger Oberflächenrauigkeit gesucht. Insbesondere nanostrukturierte Beschichtungen aus Diamant werden in diesem Zusammenhang erforscht. Weiterhin finden nanostrukturierte Materialien als Oberflächenbeschichtungen für Stents Anwendung. In die nanoporösen Beschichtungen sollen Wirkstoffe eingelagert werden, um so den Wiederverschluss der implantierten Stents zu verhindern. In diesem Kapitel wird ausschließlich der Einsatz nanostrukturierter Materialien für Implantate diskutiert; Beispiele für Anwendungen in der Geweberegeneration finden sich im Kapitel „Tissue Engineering“.

Unter den antibiotischen Wirkstoffen feiert Silber in den letzten Jahren ein Comeback, dabei kann durch die Verwendung von Silber-Nanopartikeln das Anwendungsspektrum deutlich erhöht werden. Eine Möglichkeit antimikrobielle Oberflächen für klinische Anwendungen und im Bereich Raumhygiene herzustellen, ist die Verwendung von Titandioxid-Nanopartikeln, die aufgrund ihrer photokatalytischen Eigenschaften unter Einstrahlung von Licht eine selbstreinigende und antibiotische Wirkung aufweisen.

7.1 Knochenersatzmaterialien

Knochen bestehen aus einem Biokompositmaterial, das zu etwa 70 % die mineralische Komponente Hydroxylapatit und zu 30 % organische Komponenten enthält. Das Hydroxylapatit im Knochen weist eine nanokristalline Struktur mit einer Korngröße von weniger als 50 nm auf. Da Zellen

auf solche Strukturen reagieren, wird vermutet, dass nanostrukturierte Materialien eine besonders hohe Biokompatibilität aufweisen.

Seit Ende der 90er Jahre sind eine Reihe von Forschungsvorhaben durchgeführt worden, in denen der Einsatz von Hydroxylapatit-Nanopartikeln als Knochenersatzmaterial untersucht wurde. Die Zielsetzung der Projekte war es, knochenähnlichere Zemente mit verbesserten mechanischen Eigenschaften zu entwickeln [Oyane et al., 2002]. Das von Orthovita, USA, entwickelte Produkt VITOSS[®] ist ein Beispiel für ein solches Knochenersatzmaterial. Es enthält Beta-Trikalziumphosphat-Nanopartikel, die eine schnellere Regeneration des Knochendefektes bewirken. Das poröse Material wird entweder auf den Knochendefekt angepasst und in einem Stück in die Defektstelle eingesetzt oder als Pulver eingefüllt. Die hohe Porosität von VITOSS[®] erlaubt das Eindringen von Blut und damit von Nährstoffen in das Implantat. Bei Fortschreiten des Heilungsprozesses führen Zellen des umgebenen Gewebes zu einer Restrukturierung der Oberfläche des Zements, was letztendlich zu einer vollständigen Regeneration des Knochens im Defektbereich führt [Orthovita, 2003]. Seit Mitte 2000 ist VITOSS[®] als Knochenersatzmasse in Europa zugelassen. Die Osartis GmbH in Obernburg ist ein weiteres Unternehmen, das mit dem Produkt Ostim[®] ein nanostrukturiertes Knochenersatzmaterial herstellt. Ostim[®] wurde im Jahr 2002 für den europäischen Markt zugelassen und ist ein synthetisch hergestellter reiner Hydroxylapatit. Die Abbaubarkeit von Ostim im Organismus beruht auf der Nanostruktur des Hydroxylapatits.

BCC schätzt das weltweite Marktvolumen für synthetische Knochenersatzmaterialien auf 100 Mio. US\$ im Jahr 2000. Die Konkurrenz in diesem Marktsegment ist groß und nur neue Produkte, die deutliche Vorteile gegenüber bestehenden Produkten aufweisen, haben eine Chance, einen wesentlichen Marktanteil zu erringen. Da Nanokristalle in Knochenersatzmaterialien dazu tendieren, in Submikrometer und Mikrometer große Partikel zu agglomerieren, gilt es bislang noch nicht als schlüssig nachgewiesen, dass Produkte, die auf Nanopartikeln basieren, den herkömmlichen Produkten überlegen sind. Das Marktvolumen von Nanopartikeln für orthopädische Anwendungen im Jahr 2000 wird auf etwa 200.000 US\$ geschätzt, wobei die Umsätze im Wesentlichen auf den Verkauf von Knochenersatzmaterialien zurückzuführen sind [BCC, 2001a].

7.2 Nanostrukturierte Oberflächen für Implantate

Die typische Lebenszeit eines künstlichen Knie- oder Hüftgelenks beträgt zwischen 10 und 15 Jahren. Komplikationen treten vor allem durch Verschleiß der Implantatoberflächen und krankhafte Reaktionen des umgebenden Gewebes auf, so dass wiederholte Operationen notwendig sind. Wünschenswert, um das Leiden der Patienten zu verringern und auch aus

Kostengründen, wäre daher eine Verlängerung der Lebensdauer von künstlichen Gelenkimplantaten auf mehr als 40 Jahre. Bereits heute gibt es Keramiken auf Basis von Aluminium- und Zirkoniumoxid, die eine deutlich höhere Verschleißfestigkeit aufweisen als die zur Zeit genutzten Metallimplantate. Jedoch ist der Preis für diese Werkstoffe dreimal höher und es ergeben sich Nachteile durch eine erhöhte Bruchgefahr und geometrische Limitierungen [Catledge, 2002]. Eine andere Strategie, die Lebensdauer der Implantate zu erhöhen, ist die Verwendung von nanostrukturierten Oberflächenbeschichtungen. Aufgrund der in den letzten Jahren erhöhten Forschungsaktivität auf diesem Gebiet sollen im Folgenden drei solcher Beschichtungsmaterialien vorgestellt werden: nanostrukturierte Diamant-, Hydroxylapatit- und Metallkeramik-Beschichtungen.

Diamantbeschichtungen

Stand der Technik bei künstlichen Kniegelenken ist derzeit der Einsatz von Kobaltchromlegierungen (CoCr) für den Gelenkkopf und UHMW¹-Polyethylen für die Gelenkpfanne. Allerdings sind Kobaltlegierungen nur bedingt biokompatibel, außerdem kann der hohe Verschleiß des Reibpartners und der dabei entstehende Abrieb zur Knochenrückbildung und Prothesenlockerung führen. Der Einsatz des sehr gut biokompatiblen Titan scheitert an dessen unzureichendem Verschleißverhalten. Als eine potenzielle Lösung dieser Problematik werden Titanimplantate mit einer Verschleißschutzschicht aus Diamant gesehen [Rüffer et al., 2003].

Solche Diamantschichten werden mit CVD-Verfahren (Chemical Vapour Deposition) aus der Gasphase auf das Substrat abgeschieden [Rüffer et al., 2003; Heinrich et al., 1997]. Durch eine geeignete Wahl der Gaszusammensetzung ist es dabei möglich, nanokristalline Schichten zu erzeugen. Die Oberflächenrauigkeit dieser Diamantschichten ist mit nur 15 nm etwa eine Größenordnung geringer als die herkömmlicher Diamantbeschichtungen, zudem sind die nanostrukturierten Oberflächen härter und zäher und weisen einen geringeren Reibungskoeffizienten auf [Catledge et al., 2002; Toprani et al., 2000]. In Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass die Diamantoberflächen nicht durch Körperflüssigkeiten angegriffen werden und in Tierversuchen wurden keine allergischen oder pathomorphologischen Reaktionen hervorgerufen (s. auch Abb. 7.1). Diamantoberflächen weisen damit eine hohe Biokompatibilität und Biotoleranz auf. Nach Einschätzung von Catledge et al. [2002] haben nanostrukturierte Diamantbeschichtungen für Kobalt-Chrom- und Titanimplantate das Potenzial, die Lebensdauer der Implantate auf mehr als 40 Jahre zu erhöhen.

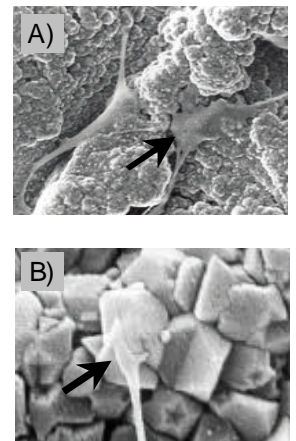


Abb. 7.1. A) Osteoblasten (knochenbildende Zellen) auf einem diamantbeschichteten Substrat. B) Ausbildung von 50-200 nm großen Zellanhaftungspunkten auf einer Diamantoberfläche.

Quelle: [Rüffer et al., 2003]

¹ UHMW = Ultra High Molecular Weight

Hydroxylapatit

Aufgrund der geringen Festigkeit und Risszähigkeit eignet sich Hydroxylapatit (HA) nicht als tragendes Material für Implantate, die unter starker Belastung stehen². Bisher wird HA jedoch als Beschichtungsmaterial für Titan- und Kobalt-Chrom-Implantate verwendet, um das Knochenwachstum um das Implantat herum zu beschleunigen. HA-Beschichtungen finden vor allem in der Orthopädie aber auch in der Dentalmedizin Einsatz.

Die Bedeutung der Nanostrukturierung von HA-Implantatbeschichtungen für die Materialeigenschaften wurde erst im letzten Jahrzehnt erkannt, als Dünnschicht Abscheidungsprozesse aus der Elektronikindustrie adaptiert wurden, um solche Beschichtungen herzustellen. Durch diese neuen Beschichtungsverfahren konnten nanostrukturierte Oberflächen erzeugt werden, deren Struktureigenschaften denen von Apatit im Knochen sehr nahe kommt. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung der Zellanhaftung sowie der Proliferation und der Mineralisation des umgebenden Gewebes [Catledge et al., 2002].

Das vorherrschende Verfahren zur Auftragung von HA-Oberflächen für medizinische Anwendungen ist das Plasma Spray Verfahren, das Temperaturen von höher als 10.000 °C erfordert. Die durchschnittliche Korngröße der Beschichtung liegt bei 15-25 µm. Dabei ist es nicht möglich mit diesem Verfahren kleinere Korngrößen zu erreichen, da ein feineres Ausgangsmaterial aufgrund der hohen Temperaturen vollständig verdampfen würde. Dies ist ein entscheidender Nachteil, da die Korngröße bestimmend für das Haftverhalten der HA-Schicht auf dem Implantat ist. Aufgrund der relativ schwachen Bindung der mikrostrukturierten HA-Schichten zum Implantat wird von manchen Medizinern ein Abplatzen der Schichten befürchtet.

Derzeit werden neuartige Beschichtungsverfahren untersucht, wie Ion Beam Sputtering und Pulsed Laser Deposition, mit denen die Nachteile des Plasma Spray Verfahrens überwunden werden sollen. Erste Ergebnisse zeigen, dass mit den neuen Verfahren nanostrukturierte HA-Oberflächen erzeugt werden können, die verbesserte Eigenschaften bezüglich des Abriebs und der Haltbarkeit aufweisen. Außerdem werden aus dem nanostrukturierten Material geringe Mengen an Kalzium- und Phosphationen freigesetzt, die das Knochenwachstum stimulieren. Untersuchun-

² Es gibt jedoch bereits erste Ansätze Implantate herzustellen, die vollständig aus Hydroxylapatit bestehen. So konnte die Arbeitsgruppe um Jackie Ying am MIT mit einem optimierten Sinterprozess aus Hydroxylapatit-Nanopartikeln Implantate herstellen, die deutlich duktiler und bruchfester sind als herkömmlicher Hydroxylapatit. Nach Einschätzung von Ying sollte es in einigen Jahren möglich sein, mit dieser Technik Implantate herzustellen, die eine vergleichbare Belastbarkeit wie natürliche Knochen aufweisen [Ying, 2003].

gen haben zudem ergeben, dass Beschichtungen, die durch Sputtering-Verfahren hergestellt werden, auch zu einer verbesserten Fixierung des Implantats am umgebenden Knochen führen [Wang et al., 1996].

Bis zur industriellen Herstellung von Implantatbeschichtungen mit diesem Verfahren muss noch weitere Forschungsarbeit geleistet werden, um das Langzeit- und das in-vivo-Verhalten der nanostrukturierten Beschichtungen zu untersuchen.

Metallkeramik-Beschichtungen

Die heute verwendeten Hüftimplantate bestehen aus einer UHMW-Polyethylen-Gelenkpfanne und einem Gelenkkopf, der häufig aus einer Co-Cr-Mo-Legierung gefertigt ist. Diese Metall-Kunststoff-Kombination wird seit 30 Jahren eingesetzt, wobei sich die Abnutzung der Polyethylen-Gelenkpfanne, wie bei den Kniegelenksprothesen, als limitierend für die Lebensdauer herausgestellt hat.

Bisher hat es eine Reihe von Versuchen gegeben, den Gelenkkopf mit keramischen Oberflächen zu versehen und so die Abriebeffekte zu verringern. Das Problem ist jedoch die geringe Haftung der keramischen Materialien auf dem metallischen Substrat. Keramische Materialien haben typischerweise eine Kombination aus kovalenten und ionischen Bindungen. Materialien mit kovalenten Bindungen sind hart und stark strapazierfähig, während metallische Materialien zäh und duktil sind und ionische Materialien hart und spröde. Aufgrund ihres kovalent/ionischen Bindungstyps ist die Bindung der Keramiken zu metallischen Substraten nicht ausreichend für Implantatanwendungen.

Dieses Problem soll durch nanokristalline Cr-Ti-N-Beschichtungen überwunden werden. Ziel ist es, durch einen schichtweisen Übergang von keramischen Schichten mit vorwiegend metallischem Charakter (Cr/CrTi) zu Schichten mit vorwiegend kovalentem Charakter (CrTiN), ein maximales Haftvermögen der keramischen Schicht auf dem Implantat zu erreichen. Erste Versuchsreihen haben gezeigt, dass mit einer solchen Beschichtung, die Abnutzung der Polyethylen-Gelenkpfanne stark verringert wird. In weiteren Tests muß jetzt noch untersucht werden, ob dieses Material auch für den in-vivo-Einsatz geeignet ist [Catledge et al., 2002].

Keramiken

Neben der Beschichtung von Implantaten besteht auch die Möglichkeit, durch die Oberflächenstrukturierung der Implantate selbst die Biokompatibilität zu verbessern. Die bisher für Knochenimplantate verwendeten Materialien, wie Titan, Ti-6Al-4V- und Co-Cr-Mo-Legierungen, weisen einen hohen Grad an Biokompatibilität auf, jedoch ist sie noch nicht hoch genug für eine jahrzehntelange physiologische Belastung. Um die Materialeigenschaften zu verbessern, werden daher nanostrukturierte Kera-

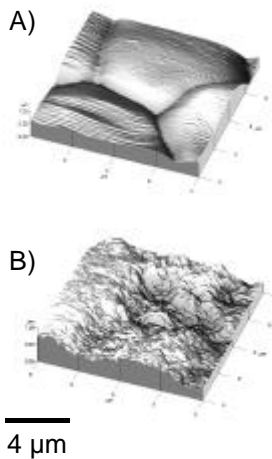


Abb. 7.2. Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von Titandioxid-Oberflächen. Oberfläche einer A) konventionellen TiO_2 -Schicht mit einer Korngröße von 2 μm und B) einer nanostrukturierten Oberfläche mit einer Korngröße von 30 nm. Beide Abbildungen haben den gleichen Maßstab.

Quelle: [Webster et al., 1999]

miken als potenzielle Implantatmaterialien untersucht. Sie sind verglichen zu konventionellen Keramiken duktiler und weisen eine besonders hohe Biokompatibilität auf.

Die Arbeitsgruppe um Thomas Webster von der Purdue University, USA, hat mit einem Sinterprozess aus TiO_2 - und Al_2O_3 -Nanopulvern nanostrukturierte Werkstücke hergestellt und ihre Biokompatibilität untersucht. Ihre Experimente zeigen, dass die Adhäsion von Osteoblasten³ auf nanostrukturierten Oberflächen deutlich stärker ist, verglichen mit konventionellen TiO_2 -Oberflächen (s. Abb. 7.2). Dabei wurden folgende kritische Korngrößen für die Adhäsion der Osteoblasten ermittelt: ca. 58 nm für Al_2O_3 und ca. 44 nm für TiO_2 . Die Korngröße von konventionellen Titanimplantaten beträgt etwa 2 μm . Thomas Webster vermutet, dass die größere Oberfläche der nanostrukturierten Materialien der Grund für die verbesserte Zellhaftung ist [Webster et al., 1999].

Unterstützt werden diese Forschungsergebnisse durch Arbeiten unter Leitung von Prof. Ziegler am Bayreuther Friedrich Baur-Forschungsinstitut. An Sol-Gel-basierten, nanoporösen Titanoxidbeschichtungen konnte gezeigt werden, dass eine Nanoporosität und die damit verbundene nanostrukturierte Oberflächentopographie ein signifikant verbessertes Zellwachstum auf metallischen Substraten hervorruft [Heidenau et al., 2001]. Darüber hinaus lassen sich die Sol-Gel-basierten Titanoxidbeschichtungen derart modifizieren, dass gezielt antibakteriell wirkende Metallionen, wie z. B. Kupferionen, aus der Beschichtung freigesetzt werden⁴. Durch den so erreichten antibakteriellen Effekt kann das Risiko der aseptischen Implantatlockerung gemindert werden [Heidenau, et al., 2003]. Sind die Metallionen nach einer bestimmten Zeit ausgelaugt, so verbleibt an der Implantatoberfläche noch die biokompatible Titanoxidbeschichtung, die ein verbessertes Einwachsverhalten des Implantats ermöglicht.

Organische Nanofasern und Kompositmaterialien

Neben nanostrukturierten Keramiken werden auch organische Nanofasern auf ihre Biokompatibilität hin untersucht. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass PCU-Carbon-Nanofasern⁵ die Zellhaftung von Osteoblasten erhöhen. Carbon-Nanofasern haben außergewöhnliche mecha-

³ Osteoblasten sind knochenbildende Zellen.

⁴ Bei Implantatoperationen stellen bakterielle Entzündungen immer noch eine häufig auftretende Komplikation dar. Die während der Operation eingebrachten Bakterien können über Monate im Implantatbereich überleben, bevor eine Entzündung ausbricht. Antibiotika erreichen die im Implantatbereich besonders geschützten Bakterien nur sehr schlecht, so dass sich Entzündungen durch Gabe von Antibiotika oftmals nicht verhindern lassen. Daher besteht ein Bedarf an bakterizid wirkenden Implantatmaterialien.

⁵ PCU = PolyCarbonate Urethane

nische Eigenschaften, wie z. B. ein hohes Verhältnis von Reißfestigkeit zu Gewicht und eine nanoskalige Geometrie, die der von kristallinem Hydroxylapatit im Knochen gleicht. Sie gelten daher als interessante Materialien für die Herstellung von orthopädischen und Zahnimplantaten [Price et al., 2003]. Ein weiteres Material, das in der Arbeitsgruppe von Thomas Webster untersucht wird, ist ein nanostrukturiertes PLGA⁶-Titan-Komposit. Die Haftung von Osteoblasten auf diesem Material ist ebenfalls außergewöhnlich hoch. Es wird vermutet, dass diese Materialkombination in besonderem Maße in der Lage ist, die Oberfläche und die chemischen Eigenschaften von Knochen zu simulieren und erscheint daher als eine interessante Option für die Herstellung von Knochenimplantaten [Kay et al., 2002].

Marktpotenzial und Forschungsprogramme

Weltweit werden jährlich etwa 1,2 Mio. künstliche Hüft- und Kniegelenke implantiert und der Gesamtmarkt für Hüft- und Knieimplantate wird auf etwa 5 Mrd. US\$ geschätzt [Investor, 2003]. Für Implantate, die durch nanostrukturierte Oberflächen verbesserte mechanische Eigenschaften aufweisen und über eine erhöhte Biokompatibilität verfügen, wird daher ein beträchtliches Marktpotenzial erwartet.

Es gibt eine Reihe von Unternehmen, die im Bereich nanostrukturierter Oberflächenbeschichtungen von Implantaten tätig sind, dazu zählen ICET, USA, Inframat, USA und IsoTis, Niederlande. Bei Inframat und ICET befindet sich die Entwicklung von Hydroxylapatit-Beschichtungen für Implantate in einem noch frühen Stadium. IsoTis hat seine Hydroxylapatit-Beschichtungstechnologie bereits mit mehreren Patenten absichern lassen. Im Jahr 2000 wurde das erste mit IsoTis-Technologie beschichtete Hüftimplantat einem Patienten am Universitätsklinikum in Maastricht eingesetzt.

In Deutschland sind zwei Forschungsprogramme aufgelegt worden, mit denen die Erforschung biokompatibler Materialien gefördert wird: Die DFG fördert in ihrem Schwerpunktprogramm 1100 „Grenzfläche zwischen Werkstoff und Biosystem“ seit dem Jahre 2000 die nachhaltige Verbesserung von Werkstoffen für Langzeitimplantate. Vom Freistaat Bayern wird seit Beginn 2000 die zweite Runde des Forschungsverbundes Biomaterialien (FORBIOMAT) gefördert, der die Neu- und Weiterentwicklung von Biomaterialien zum Ziel hat. Unter den Verbundprojekten gibt es einzelne Projekte, in denen nanostrukturierte Materialien hinsichtlich ihrer Eignung als Implantatmaterialien untersucht werden.

⁶ PLGA ist ein Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Copolymer.



Abb. 7.3. Ein Stent (Gefäßstütze), wie er zur Aufweitung von verengten Herzkranzgefäßen verwendet wird

Quelle: MEDICA,
<http://www.medica.de>

7.3 Stents

Stents (Gefäßstützen) sind kleine röhrenartige Drahtgeflechte, die zur Aufweitung und als Stütze in verengte Herzkranzgefäße eingeführt werden (Abb. 7.3). In fast jedem zweiten Fall diagnostizieren Ärzte entzündliche Reaktionen und als Folge eine Wiederverengung des Gefäßes. Durch den Einsatz radioaktiver Isotope kann der Wiederverschluss der Gefäße verhindert werden. Erste Versuche die ganze aus Edelstahl bestehende Stütze radioaktiv zu machen, waren jedoch nicht erfolgreich, weil die Isotope entweder schon während der Operation von den Stents abgewaschen wurden oder aber die Radioaktivität nicht ausreichte, um den Wiederverschluss des Gefäßes zu verhindern.

Die AlCove Surface GmbH, Gladbeck, hat ein Verfahren entwickelt, mit dem dieses Problem überwunden werden kann. Mit einem Plasmaverfahren wird der Stent mit einer Aluminiumschicht versehen, die anschließend mit einem elektrochemischen Prozess in poröses Aluminiumoxid umgewandelt wird. Die Porengrößen der nanoporösen amorphen Schicht können zwischen 10 nm und mehr als 100 nm variiert werden. Durch Einlagerung radioaktiver Nuklide in die Poren kann eine kontrollierte Abgabe der Radioaktivität erreicht werden, die das Risiko für einen Wiederverschluss des Blutgefäßes deutlich vermindert. Es gibt bereits erste Exemplare dieser beschichteten Stents, die zunächst in Tierversuchen getestet werden müssen [AlCove, 2003]. Diese neuartige Stent-Technologie ist 2002 mit dem Innovationspreis Ruhrgebiet ausgezeichnet worden.

Eine weitere Möglichkeit, den Wiederverschluss von Stents zu verhindern, ist die Nutzung des Lotus-Effektes. Dieser Ansatz wird von einem Team um Prof. Thull, Universität Würzburg, untersucht. In dem Projekt werden Stents mit Titanwerkstoffen beschichtet, die analog dem Lotuseffekt eine geringe Benetzbarkeit aufweisen und so die Wahrscheinlichkeit einer Thrombenbildung verringern würden. Zu den Oberflächenmaterialien auf Titanbasis, die untersucht werden sollen, zählen u. a. TiO_2 , TiN , TiC und TiB_2 . Ziel ist es, durch die Einstellung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Implantatoberfläche eine Konformationsänderung der Proteine bei Kontakt mit der Oberfläche zu verhindern, um so die Auslösung der Gerinnungskaskade zu unterbinden [Biehl, 2003]. Das Projekt wird im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Grenzfläche zwischen Wirkstoff und Biosystem“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Weltweit werden etwa 2 Mio. Stents allein für Herzkranzgefäße implantiert, wobei der Gesamtmarkt etwa 2 Mrd. US\$ beträgt. Das Marktpotenzial für Stents, die über Wirkstoffreservoirs verfügen, wie sie auch durch die Technologie von AlCove realisiert werden können, wird von Branchenquellen auf 4-6 Mrd. US\$ geschätzt [Nasdaq, 2003].

7.4 Titandioxid-Nanopartikel für antibakterielle Oberflächen

Die bakterizide Wirkung von Titandioxid-Nanopartikeln basiert auf einem photokatalytischen Effekt. Bedingt durch die elektronische Struktur von Titandioxid können Elektronen durch UV-Licht angeregt werden. Dieser Prozess führt in Gegenwart von Wasser und Sauerstoff zur Bildung von hochreaktiven Radikalen, wie das Hydroxylradikal (OH) und das Perhydroxylradikal (HOO), die Mikroorganismen, die sich an der Oberfläche der Partikel befinden, zerstören [Winkler, 2002]. Neben der toxischen Wirkung auf Bakterien, Hefen und Pilze können auch chemische Substanzen wie Kohlenwasserstoffe, Ammoniak, Schwefelwasserstoff und eine Vielzahl weiterer Umweltgifte oxidativ zersetzt werden. Daher sind photokatalytische Materialien nicht nur für antimikrobielle Anwendungen, sondern auch für die Zerstörung von umweltschädigenden Substanzen in Luft und Wasser geeignet. Neben Titandioxid weisen auch Zinn- und Zinkoxide photokatalytische Eigenschaften auf, wobei Titandioxid der weitaus am häufigsten verwendete Photokatalysator ist.

Bei der Produktion von photokatalytischen Oberflächen werden Titandioxidpartikel mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm eingesetzt, weil nanoskalige Partikel einen stärkeren photokatalytischen Effekt aufweisen und die Partikel zudem transparent sind, da sie einen kleineren Durchmesser als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes aufweisen.

Besonders hoch sind die Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten auf dem Gebiet der TiO_2 -Photokatalysatoren in Japan. Die überwiegende Anzahl der F&E-Projekte befasst sich allerdings mit dem Einsatz für technische Anwendungen, wie selbstreinigende Oberflächen sowie Luft- und Wasserreinigung. Medizinische Anwendungen werden zum Beispiel von Toshiba Lighting and Technology Corp. untersucht, die eine Titandioxidbeschichtung für Lampen entwickelt hat. Die Schicht besteht aus TiO_2 -Nanokristallen, die durch das Licht der Lampe aktiviert werden. Diese Lampen sind speziell für die Sterilisation der Luft in Krankenhäusern und Kaufhäusern entwickelt worden.

In den USA gibt es ebenfalls starke Aktivitäten auf dem Gebiet photokatalytischer Prozesse. Vom Ministerium für Verteidigung sind seit Mitte der 90er Jahre mehr als 12 Projekte finanziert worden, um untersuchen zu lassen, inwieweit photokatalytische Nanopartikel nach dem Einsatz chemischer oder biologischer Waffen zur Dekontamination genutzt werden können.

In Deutschland stellt die Firma ItN Nanovation aus Saarbrücken die desinfizierende Oberflächenbeschichtung Nanozid[®] her, die Titandioxid-Nanopartikel als bakteriziden Bestandteil enthält. Die Beschichtung kann durch Tauchen oder Sprühen auf Metall, Keramik und Kunststoffoberflächen aufgetragen werden und eignet sich für die Sterilisation von

medizinischen Geräten und Klimaanlage sowie zur Anwendung im Sanitärbereich und im Lebensmittelsektor [ItN, 2003].

Nach Schätzungen von BCC sind im Jahr 2000 weltweit TiO_2 -Nanopulver im Wert von einer viertel Million US\$ verkauft worden [BCC, 2001b]. Davon wird jedoch nur ein sehr kleiner Bruchteil für die Herstellung antimikrobieller Oberflächen verwendet. Der überwiegende Anteil der TiO_2 -Nanopartikel wird für die Herstellung von selbstreinigenden Oberflächen und Katalysatoren für die Luft- und Wasserreinigung eingesetzt. Ob desinfizierende Oberflächen auf Basis von TiO_2 -Nanopartikeln ein großes Marktpotenzial haben, wird sich erst abschätzen lassen, wenn sich diese Technologie als alltagstauglich erwiesen hat.

7.5 Silber-Nanopartikel als Antibiotikum

Die keimtötende Wirkung von Silber ist schon seit etwa 3000 Jahren bekannt. Ende des 19. Jahrhunderts wurden Silberverbindungen von Ärzten zur aktiven Behandlung von Brandwunden und infektiösen Erkrankungen, wie Ohrinfektionen oder Syphilis eingesetzt. Mit der Entwicklung von organisch-chemischen Antibiotika nahm die Verwendung von Silberpräparaten seit Anfang des 20. Jahrhunderts ab. Die zunehmende Anzahl antibiotikaresistenter Bakterienstämme hat zu einem Comeback von Silber als Antibiotikum geführt. Dabei sind es Silberionen, von denen die bakterizide Wirkung ausgeht. Sie blockieren Enzyme, die für den Sauerstoff-Stoffwechsel der Zelle notwendig sind und unterbinden damit zentrale Stoffwechselfunktionen der Zelle. Außerdem destabilisieren Silberionen die Zellmembran und stören die Zellteilung und damit die Vermehrung von Bakterien. Aufgrund dieser speziellen Wirkmechanismen wird davon ausgegangen, dass Bakterien keine Resistenz gegen Silber ausbilden können.

Durch Verwendung von Nanopartikeln wird die Silberoberfläche, die mit der Umgebung in Kontakt steht, größer; zudem ist die benötigte Menge an Silber für den gleichen antiseptischen Effekt wesentlich kleiner. Silber-Nanopartikel haben darüber hinaus den Vorteil, dass sie in eine Vielzahl von Materialien integriert werden können. Dabei dienen die Nanopartikel als Silberdepots, die kontinuierlich Silberionen freisetzen, so dass es zu einer desinfizierenden Langzeitwirkung kommt. In geeigneten Polymermatrizes wandern Nanopartikel an die Oberfläche des Polymers, so dass hier mit besonders niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden kann und zudem Verschmutzungseffekten entgegengewirkt wird. Dieser Effekt ist von Prof. Schmidt am Institut für neue Materialien (INM, Saarbrücken) genutzt worden, um einen neuartigen antimikrobiellen Kunststoff zu entwickeln, der mittlerweile für die Produktion von Hörgeräten Verwendung findet [Schmidt, 2003].

Die Silbertechnologie wurde in den vergangenen Jahren insbesondere in Japan vorangetrieben. Zahlreiche Produkte rund um die Hygiene sind dort mittlerweile mit Silber oder Silberverbindungen ausgestattet [Horn, 2003]. In Deutschland wird die Technologie von dem Unternehmen Bio-Gate, Nürnberg, in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM) in Produkte umgesetzt. Die neu entwickelten Herstellungsverfahren ermöglichen es, Silber-Nanopartikel mit einem Durchmesser von nur 5 nm herzustellen [Bio-Gate, 2003]. Dabei hat sich gezeigt, dass die antimikrobielle Wirksamkeit um so höher ist, je kleiner der Durchmesser der Partikel ist.

Silberpartikel lassen sich in viele Werkstoffe einarbeiten, um sie so mit bioziden Eigenschaften auszustatten. Beispiele für Anwendungsbereiche sind Instrumente aus der Medizintechnik, die Sanitärindustrie, Lacke und Farben, Bodenbeläge etc. Weiterhin ist es möglich, die Nanopartikel in Fasern zu integrieren und damit antibakterielle Kleidung herzustellen [Yeo et al., 2003; Lee et al., 2003]. Die Idee, Silber-Nanopartikel für die Herstellung antibakterieller Oberflächen einzusetzen, ist noch jung und entsprechen niedrig sind derzeit die Umsätze mit Silber-Nanopartikeln in diesem Marktsegment: Von BCC wird er im Jahr 2000 weltweit auf 650.000 US\$ geschätzt. Bis zum Jahr 2005 soll der Umsatz auf 2,3 Mio. US\$ steigen [BCC, 2001a].

7.6 Zusammenfassende Bewertung

Knochen bestehen aus einem Kompositmaterial, das als anorganische Komponente nanoskaliges Hydroxylapatit enthält. Da Zellen auf nanoskalige Strukturen reagieren, ist in den letzten Jahren intensiv an nanostrukturierten Materialien geforscht worden, mit dem Ziel, die Biokompatibilität und die Biofunktionalität von Implantaten und Knochenersatzmaterialien zu verbessern.

Bei den Knochenersatzmaterialien wird derzeit versucht, durch Verwendung von Hydroxylapatit-Nanopartikeln die natürliche Regeneration des Knochens zu beschleunigen. Erste Produkte mit verbesserten Eigenschaften sind bereits auf dem Markt. Dennoch besteht eine gewisse Skepsis, ob sich die neuartigen Produkte durchsetzen können, da beobachtet wurde, dass die Hydroxylapatit-Nanokristalle dazu tendieren, über lange Zeiträume zu Mikrometer großen Aggregaten zu agglomerieren. Ein Vorteil im Vergleich zu etablierten Materialien wäre damit nicht mehr gegeben.

In der Implantattechnik wird versucht, mit nanostrukturierten Oberflächen die Biokompatibilität der Implantate zu erhöhen und die mechanischen Eigenschaften zu verbessern. Dabei wird je nach Anwendung mit verschiedenen Materialien gearbeitet:

- 1) **Diamantbeschichtungen:** Herstellung von nanostrukturierten Oberflächen mit dem CVD-Verfahren, beispielsweise für Knieimplantate. Die Oberflächen weisen eine extrem geringe Rauigkeit, eine hohe Verschleißfestigkeit und eine hohe Biokompatibilität auf. Es ist denkbar, mit diesem Verfahren die Lebensdauer von Implantaten auf mehr als 40 Jahre zu verlängern. Nanostrukturierte Diamantbeschichtungen für Implantate befinden sich noch im Entwicklungsstadium.
- 2) **Hydroxylapatit-Beschichtungen:** Durch neuartige Verfahren ist die Herstellung nanostrukturierter Hydroxylapatitschichten für orthopädische und Dentalimplantate möglich. Die Nanostrukturierung führt zu einer besseren Zellanhaftung, Proliferation und Mineralisation des umgebenden Gewebes. Mehrere Unternehmen sind in diesem Forschungsfeld aktiv, und die ersten Produkte befinden sich bereits in der klinischen Testphase.
- 3) **Metallkeramik-Beschichtungen:** Dieser Beschichtungstyp wird speziell für die Erhöhung der Lebensdauer von Gelenkimplantaten entwickelt. Dabei soll durch den stufenweisen Übergang der nanostrukturierten Keramiken vom metallischen zum keramischen Charakter das Haftverhalten der Beschichtungen auf dem Substrat verbessert werden. Diese Technologie befindet sich noch in einem vergleichsweise frühen Forschungsstadium.
- 4) **Nanostrukturierte Keramiken:** Das Implantatmaterial selbst ist an der Oberfläche nanostrukturiert. Die Herstellung erfolgt aus TiO_2 - und Al_2O_3 -Nanopulvern in einem Sinterprozess oder durch Aufbringen einer nanoporösen Titanoxidbeschichtung über das Sol-Gel-Verfahren mit anschließender Sinterung. Durch die Nanostrukturierung konnte das Einwachsverhalten von Zellen wesentlich verbessert werden. Das Sol-Gel-Verfahren ermöglicht zudem die Herstellung kupferhaltiger Titanoxidbeschichtungen, die antibakteriell wirken und damit das Risiko einer aseptischen Implantatlockerung vermindern sollen. Erste wissenschaftliche Arbeiten auf diesem Gebiet wurden Ende der 90er Jahre veröffentlicht.

Weiterhin wird Nanotechnologie zur Entwicklung neuartiger Beschichtungen für Stents genutzt. Durch die Einlagerung von Radionukliden in eine nanoporöse Beschichtung der Stents oder durch die Nutzung des Lotuseffektes soll der Wiederverschluss der Blutgefäße verhindert werden. Diese Technologien befinden sich noch in einer frühen Entwicklungsphase und toxikologische und klinische Tests stehen noch aus.

Für die Herstellung bakterizider Oberflächen können sowohl Silber- als auch TiO_2 -Nanopartikel eingesetzt werden. Weil die bakterizide Wirkung von Titandioxid auf einem photokatalytischen Effekt beruht, ist für die Entfaltung der antibakteriellen Wirkung die Einstrahlung von Licht notwendig. Vor allem in Japan wird auf diesem Gebiet intensiv geforscht, und eine Vielzahl von Produkten im medizinischen und hygienischen

Bereich sind von japanischen Unternehmen bereits auf den Markt gebracht worden.

Der Bedarf an nanostrukturierten Oberflächen sowohl bei orthopädischen Implantaten als auch bei Stents ist groß, und das Marktpotenzial für entsprechende Produkte wird auf mehrere Milliarden US\$ geschätzt. Je nach System ist die Forschung unterschiedlich weit fortgeschritten und einige Produkte sind bereits eingeführt, wie z. B. Knochenzemente auf Basis von Hydroxylapatit-Nanopartikeln, oder stehen bereits kurz vor der Markteinführung, wie nanostrukturierte Hydroxylapatit-Beschichtungen von Implantaten.

Auch bei den bakteriziden Oberflächen insbesondere auf Basis von Silber-Nanopartikeln ist die Forschung weit fortgeschritten und verschiedene Produkte sind bereits auf dem Markt eingeführt worden. Das Marktvolumen für TiO₂- und Silber-Nanopartikel selbst ist jedoch mit weniger als einer Million US\$ weltweit eher bescheiden. Hier zeigt sich einmal mehr die Hebelwirkung der Nanotechnologie: Mit einem geringen Einsatz an Nanomaterialien von einigen Hunderttausend US\$ können Produkte mit gänzlich neuen Eigenschaften und einem Marktvolumen von einigen hundert Millionen US\$ erzeugt werden.

Forschungsbedarf ist insbesondere noch bei den Technologien gegeben, die sich in einer frühen Phase der Entwicklung befinden, wie nanostrukturierte Oberflächen für Stents oder neuartige metallkeramische Implantatmaterialien. Über die Ursachen für das verbesserte Anwachsverhalten von Zellen auf nanostrukturierten Materialien ist bislang nur wenig bekannt. Um Nanomaterialien gezielt in der Implantattechnik einsetzen zu können, wird daher eine weitere Erforschung der Grenzfläche Zelle/Werkstoff als sehr wichtig erachtet. Forschung an Nanomaterialien für die Herstellung bakterizider Oberflächen erscheint insbesondere von Interesse im Hinblick auf die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten, die von der Trinkwasserversorgung bis hin zum klinischen Sektor reichen und die auf ein beträchtliches Marktpotenzial dieser Technologie schließen lassen.

8 TISSUE ENGINEERING

Schon seit langem ist es ein Wunsch der Medizin, künstliche Organe und Gewebe für die Behandlung von Gewebedefekten und Organversagen herzustellen. Mitte der 80er Jahre wurde ein neues Wissenschaftsfeld gegründet, das sich diesem Ziel verschrieben hat – das Tissue Engineering (Gewebekultivierung). Es wurde von Vacanti [1993] als interdisziplinäre Wissenschaft definiert, welche biologische und technische Wissenschaften vereint, um lebende Ersatzmaterialien für defekte Gewebe und Organe herzustellen. Das Tissue Engineering ist damit angetreten, die Defizite der konventionellen Methoden zur Behandlung von großen Gewebedefekten und Organversagen zu überwinden.

Lassen sich solche Defekte nicht mit Medikamenten therapieren, so erfolgt die Behandlung bislang oftmals durch die Implantation eines Spenderorgans oder eines künstlichen technischen Implantats, wie z. B. ein künstliches Hüftgelenk oder Herz. Weiterhin besteht die Möglichkeit, medizinische Apparate ex vivo einzusetzen, die die Funktion bestimmter Organe übernehmen können, wie es z. B. in der Dialyse der Fall ist. Alle diese Behandlungsmethoden sind mit teils schwerwiegenden Komplikationen für den Patienten verbunden: Bei der Organtransplantation besteht das grundsätzliche Problem eines weltweiten Mangels an Spenderorganen. Außerdem müssen die Patienten oftmals lebenslang mit Immunsuppressiva behandelt werden, um die Immunreaktion des Körpers zu unterdrücken. Beim Einsatz künstlicher Implantate ergeben sich die Probleme des Abriebs und der Materialermüdung. Außerdem passen sie sich Wachstumsprozessen nicht an, was besonders bei jungen Patienten Mehrfachoperationen bedingt.

Das Tissue Engineering gilt als Lösungsansatz, um die Komplikationen der bestehenden Behandlungsmethoden von Gewebedefekten und Organversagen zu überwinden. Dabei werden verschiedene therapeutische Strategien verfolgt [Griffith and Naughton, 2002; Infoport, 2002]:

- 1) Die Verwendung von frisch isolierten oder kultivierten Zellen, die entweder direkt in das erkrankte Gewebe injiziert oder mit einer zersetzbaren Matrix implantiert werden,
- 2) die Implantation von künstlichen Geweben oder Organen, die in vitro durch Kultivierung von Zellen auf Matrices gewonnen werden und
- 3) die In-situ-Geweberegeneration, bei der lediglich die Zellmatrix in das kranke Gewebe implantiert wird, um die Selbstheilungsfähigkeit des Körpers zu unterstützen.

Eine vielfach ausgesprochene Vision des Tissue Engineerings baut auf der dritten Strategie auf. Sie zielt darauf ab, ein umfassendes Verständnis der Regenerationsmechanismen auf molekularer Ebene zu erlangen, das es ermöglicht, durch einen minimalen Einsatz von Wachstumsfaktoren

und Matrices oder durch Methoden der Gentherapie die Regeneration des kranken Gewebes zu erreichen [Brownlee, 2001].

Die Zellfunktionen in Geweben und Organen werden durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen mitgesteuert; Proteine spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die typische Größe einer Zelle beträgt ca. 10 μm , die eines Proteins ca. 5 nm. Die Untersuchung und die Manipulation von biologischen Objekten in dieser Größenordnung fällt in das Gebiet der Nanobiotechnologie. In diesem Kapitel soll untersucht werden, inwieweit die Methoden der Nanobiotechnologie zur Überwindung wissenschaftlicher und technischer Hürden im Tissue Engineering beitragen können.

8.1 Die Methode

Die Behandlung von Organschäden mit der Methode des Tissue Engineering kann grob in drei Arbeitsschritte eingeteilt werden (s. auch Abb. 8.1): Im ersten Schritt werden gesunde Zellen isoliert und in Kulturgefäßen vermehrt. Dann erfolgt die eigentliche Gewebekultivierung, bei der die Zellen auf eine Gewebeunterlage (Matrix) aufgebracht und vermehrt werden. Die Matrix hat nicht nur eine wichtige Bedeutung für die Topologie der Zellanordnung, sondern auch für den Erhalt der Zellfunktionen (Differenzierung) und die Zellvermehrung (Proliferation). Abschließend erfolgt die Transplantation des kultivierten Gewebes in den Patienten [Minuth, 2003]. Die ersten beiden Schritte in diesem Verfahren, die die Erzeugung von künstlichem Gewebe beinhalten, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

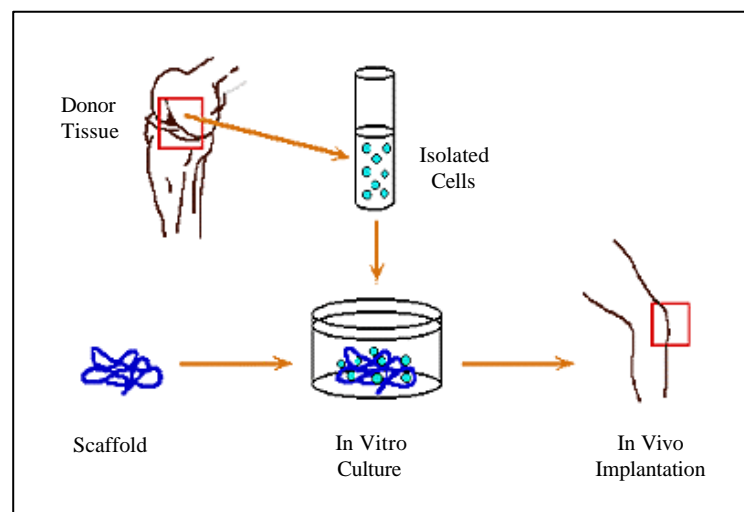


Abb. 8.1. Schematische Darstellung der elementaren Arbeitsschritte im Tissue Engineering.

Quelle: University of Texas at Austin, <http://txtell.lib.utexas.edu/stories/t0003-full.html>

Eine Voraussetzung für die Gewebekultivierung sind gesunde Zellen. Sie können z. B. gesunden Arealen des zu behandelnden Gewebes entnommen werden oder es können auch Gewebe mit ähnlichen Zellpopulationen biopsiert werden. Andere Ansätze verwenden undifferenzierte Zelltypen, wie embryonale oder adulte Stammzellen¹, zur Gewebekultivierung [Nehrer, 2003].

Die Zelle

Die besondere medizinische Eignung der Stammzellen für das Tissue Engineering besteht darin, dass sie sich nicht nur beliebig vermehren lassen, sondern durch Wachstumsfaktoren oder andere Hormone zu unterschiedlichen Gewebezelltypen entwickelt werden können [Griffith and Naughton, 2002]. Bisher ist es jedoch nicht möglich, durch die Kultivierung von Stammzellen vollständig funktionierende Gewebe entstehen zu lassen. Vielmehr können Vorläufer von Gewebezellen kultiviert werden, die teilweise Gewebeeigenschaften aufweisen. Erst die Zukunft wird zeigen, ob bei der Verwendung einer geeigneten extrazellulären Matrix und mit optimalen Kulturmethoden voll differenzierte Gewebe mit Hilfe von Stammzellen entwickelt werden können [Infoport, 2002].

Für das Tissue Engineering geeignete Materialien müssen biokompatibel, untoxisch und chirurgisch zu handhaben sein. Dabei können sowohl natürliche Biomaterialien als auch technisch hergestellte Matrices verwendet werden. Eine biogene extrazelluläre Matrix, wie z. B. Kollagen, kann isoliert werden, indem man aus natürlichem Gewebe die zellulären Komponenten herauslöst. Biogene Matrices haben den Vorteil, dass sie natürlicherweise viele der erforderlichen physiologischen Kriterien erfüllen, allerdings besteht das Risiko von Abstoßungsreaktionen und Infektionsübertragungen; darüber hinaus ist die Verfügbarkeit von humanen Produkten eingeschränkt [Stark, 2001].

Die Zellmatrix

Das Wachstum, die Funktion und die Differenzierung der Zelle werden in großem Maße durch das spezifische räumliche Umfeld der Zelle beeinflusst, so dass für jedes Gewebe eine spezifische Matrix benötigt wird. Beim Design der Zellmatrices wird daher grundsätzlich eine Nachahmung der natürlichen räumlichen Umgebung der Zelle angestrebt.

Zu den synthetischen Polymeren, welche derzeit intensiv auf ihre Verwendbarkeit als Matrixmaterialien untersucht werden, gehören PLA,

¹ Als embryonale Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die sich bis zum vierten Tag nach der Befruchtung der Eizelle gebildet haben. Diese Zellen sind pluripotent, das heißt sie können noch zu mehr als 200 verschiedenen Gewebesorten heranwachsen. Gegen die Verwendung von embryonalen Stammzellen zu Forschungszwecken regen sich heftige ethische Bedenken.

Auch im erwachsenen Menschen gibt es zur Regeneration bestimmter Gewebe Reservestammzellen, die noch nicht endgültig differenziert sind. Aus diesen sogenannten adulten Stammzellen können nur noch Zellen eines bestimmten Organs entstehen. Ethische Bedenken bei ihrem Einsatz gibt es nicht.

PGA und PEG². Dabei hat sich gezeigt, dass diese Materialien keine optimale Differenzierung der Zellen hervorrufen. Die verwendeten Polymere wurden insbesondere im Hinblick auf eine geringe Toxizität ihrer Abbauprodukte ausgewählt. Allerdings konnten die zellführenden physikalisch-chemischen Eigenschaften der Polymermatrices nur unzureichend eingestellt werden, so dass keine optimale Wechselwirkung mit Zellen erreicht wurde. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit häufig Kompositmaterialien auf ihre Eignung für die Herstellung von Matrizes geprüft [Minuth et al., 2002].

Die Zellkultur

Die meisten Gewebe bestehen aus einer komplexen Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, welche in einer spezifischen topografischen und funktionellen Beziehung zueinander stehen. Derzeit ist es nur eingeschränkt möglich, diese Zellstrukturen analog in vitro zu kultivieren. Wenn Zellen in Kulturgefäßen vermehrt werden, haben sie die Tendenz, ihre typischen Eigenschaften zu verlieren, das heißt sie entdifferenzieren. So zeigen zum Beispiel Leberparenchymzellen nach ihrer Isolierung aufgrund der Entdifferenzierung nur noch einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Entgiftungsleistung. Bei Verwendung geeigneter Matrixmaterialien kann diese Entdifferenzierung vermieden oder rückgängig gemacht werden. Eine wichtige Rolle bei der Proliferierung und Differenzierung der Zellen spielen Zytokine, die als lokale Hormone spezifische Zellfunktionen regulieren. Wachstumsfaktoren sind Zytokine mit besonderer Bedeutung für das Tissue Engineering, da sie die Proliferation von Zellen in einem Tissue-Engineering-Konstrukt oder im Implantationsgebiet stimulieren oder hemmen können. Um bei der Gewebekultivierung das Zellwachstum aktiv zu beeinflussen, können die Wachstumsfaktoren entweder dem Kulturmedium zugesetzt oder direkt auf die Matrizes aufgebracht werden [Stark, 2001].

Genetic Engineering

Letztendlich wird jegliche Gewebeproliferation und -differenzierung durch den genetischen Code in der Zelle programmiert. Mittlerweile sind für alle bekannten Wachstumsfaktoren die Nukleinsäuresequenzen bekannt. Es ist daher auch denkbar, Methoden der Gentherapie anzuwenden und Gene, die die Wachstumsfaktoren kodieren, mit Hilfe von Genvektoren in die Zellen einzuschleusen. Hierdurch kann eine kontrollierte, kontinuierliche Freisetzung der Zytokine durch die therapierte Zelle erreicht werden. Die Genvektoren können entweder durch eine Ex-vivo-Transfektion von kultivierten Zellen oder durch direkte Bindung an das Matrixmaterial wirksam werden [Stark, 2001].

² PLA= Polymilchsäure, PGA=Polyglykolsäure, PEG=Polyethylenglykol

8.2 Problemstellungen im Tissue Engineering

Bisher sind nur die Tissue Engineering Produkte Haut (Epidermis) und Knorpel in der klinischen Anwendung. Bei ihnen handelt es sich um relativ einfache Gewebetypen, die die Besonderheit gemein haben, keine intrinsischen Blutgefäße zu benötigen. Drei wichtige Hürden sind bislang identifiziert worden, die es zu überwinden gilt, bevor voll funktionsfähige komplexe Organe kultiviert werden können:

- 1) Wenn differenzierte Zellen in künstlicher Umgebung kultiviert werden, haben sie die Tendenz zu entdifferenzieren, das heißt, ihre organtypischen Funktionen zu verlieren. Ein zentraler Punkt beim Tissue Engineering ist daher die Steuerung der Differenzierung des kultivierten Gewebes.
- 2) Bislang ist die Integration eines Gefäßnetzes in die kultivierten Organe noch nicht möglich.
- 3) Die funktionelle dreidimensionale Anordnung der Zellen in komplexen Organen sowie ihre Vernetzung untereinander und mit der Matrix können im Tissue Engineering auch ansatzweise noch nicht reproduziert werden.

Weiterhin besteht das Problem, dass künstlich kultivierte Zellen häufig atypische Proteine exprimieren, die im Falle einer Implantation zu Entzündungen und Abstoßungsreaktionen führen können. Bisher ist es noch in keinem Fall gelungen, eine vom Organismus her bekannte und damit völlig identische Gewebequalität unter *in vitro* Bedingungen zu generieren [Minuth et al., 2002].

Dennoch, es gibt bereits Lösungsansätze, was die Probleme der Entdifferenzierung und der Vaskularisierung anbetrifft. So ist bekannt, dass die Matrizes von entscheidender Bedeutung für Differenzierung und Proliferation der Zellen sind. Es wird daher versucht, Wachstumsfaktoren und Gene in die Matrizes zu integrieren, die bei kontrollierter Freigabe wichtige Zellfunktionen steuern. Hierbei wird das Ziel verfolgt, interaktive Biomaterialien zu konstruieren, die mit Rezeptoren der Zellen des umgebenen Gewebes wechselwirken können und so in der Lage sind, die Migration dieser Zellen gezielt in Richtung der Wundstelle zu leiten und deren Differenzierung zu steuern. Im Idealfall würde im letzten Schritt der Geweberegeneration die künstliche Matrix durch eine natürliche von den Zellen produzierte Matrix ersetzt werden.

Um die Vaskularisierung zu fördern, wird versucht, entsprechende Wachstumsfaktoren in die Matrizes zu integrieren, die den Aufbau von Blutgefäßen bewirken. Darüber hinaus gibt es den Ansatz, Gefäßstrukturen in den Matrizes vorzuformen und damit die Vaskularisierung des Gewebes zu unterstützen.

8.3 Stand der Technik, Beispiele für Produkte

Derzeit sind weltweit etwa 80 Unternehmen im Tissue Engineering tätig, die die gesamte Bandbreite von Produkten in diesem Technologiesektor abdecken: Wachstumsfaktoren, Stammzellentherapie, Biomaterialien für Matrices und Behandlungsmethoden mit künstlich kultivierten Zellen und Geweben. Künstlicher Gewebeersatz wird bisher nur für die vergleichsweise einfach aufgebauten Gewebetypen Haut und Knorpel angeboten. Aber auch die angebotenen Hautprodukte sind noch kein vollständiger Ersatz für die menschliche Haut, da sie nicht über Blutgefäße, Haarfollikel oder Schweißdrüsen verfügen. Im Folgenden sollen exemplarisch zwei Produkte, die sich bereits auf dem Markt befinden, vorgestellt werden.

Das führende Produkt auf dem Markt für Hautersatz ist Apligraf[®], es wird von dem amerikanischen Unternehmen Organogenesis hergestellt. Apligraf[®] ist ähnlich aufgebaut und übt die gleiche Schutzfunktion gegen mechanische Belastungen, Austrocknung und Infektionen aus wie menschliche Haut. Auf eine Wunde aufgebracht, regt es das Wachstum der natürlichen Hautzellen an und beschleunigt damit die Heilung.

Apligraf[®] wird in einem mehrstufigen Prozess aus menschlichen Vorhautzellen hergestellt: Zuerst werden in einer geschlossenen Kultur menschliche Hautzellen (Fibroblasten) mit Kollagen (dem wichtigsten Protein der Haut) in Verbindung gebracht. Die Hautzellen bewegen sich daraufhin durch die Kollagenschicht, verändern deren Struktur und beginnen, menschliches Kollagen zu produzieren. Nach einigen Tagen werden auf diese Kultur Zellen der Epidermis (obere Schicht der Haut) aufgebracht und anschließend der Luft ausgesetzt. Das Ergebnis ist ein mehrschichtiges Produkt, das strukturell und physiologisch der menschlichen Haut sehr ähnlich ist, jedoch keine Blutgefäße, Haarfollikel oder Schweißdrüsen besitzt.

Eingesetzt wird Apligraf[®] für die Heilung von venösen Geschwüren und diabetischem Fuß, dabei ist Apligraf[®] nicht als permanenter Hautersatz gedacht. Vielmehr soll die Wunde durch die künstliche Haut geschützt werden, um so eine ungestörte Gewebeheilung zu ermöglichen. Darüber hinaus verbindet sich der lebende Hautersatz mit den Hautzellen im Wundbereich und regt diese zu verstärkter Gewebebildung an, ohne dabei Abstoßungsreaktionen hervorzurufen. Die künstliche Haut Apligraf[®] bringt für die Patienten gegenüber herkömmlichen Methoden bei der Behandlung von diabetischen Fußgeschwüren eine klare Verbesserung. Nach Angabe von Organogenesis können durch die Behandlung von schwerheilbarer venöser Ulzera (offene Beine, chronische Wunden) mit Apligraf[®] 7500 US\$ pro Patient gespart werden [Organogenesis, 2003].

Die BioTissue Technologies AG ist mit dem Produkt BioSeed-S[®], eine sogenannte „Haut aus der Tube“, bekannt geworden. BioSeed-S[®] ist ein

körpereigener Hautersatz zur Behandlung von schlecht heilenden Wunden. Zur Herstellung wird dem Patienten ein kleines Stück eigener Haut entnommen und im Labor vermehrt. Nach ca. 2-3 Wochen werden die Zellen in Fibrinkleber (biologischer Gewebekleber) auf die Wunde des Patienten aufgetragen. Der Fibrinkleber fixiert die Zellen auf der Wunde und ermöglicht ein besseres Einwachsen. Die Besonderheit von BioSeed-S[®] sind die noch teilungsfähigen Zellen, die sich also auch nach der Transplantation weiter vermehren können und so die Wunde schließen. Im Rahmen einer offenen Anwendungsbeobachtung an Patienten mit „offenen Beinen“, die nicht mehr auf konventionelle Behandlungen ansprachen, wurde bei über 75 % eine signifikante Reduzierung der Wundgröße bis hin zur vollständigen Wundheilung beobachtet [Kessler, 2001; Biotissue, 2003].

8.4 Marktpotenzial

Das enorme Marktpotenzial für ausgereifte Tissue Engineering Produkte, lässt sich an den derzeitigen Kosten abschätzen, die den Gesundheitssystemen weltweit durch Organversagen und Gewebeverlust entstehen. In den USA werden diese Kosten auf 400 Mrd. US\$ pro Jahr geschätzt [Bassett, 2001]. Der Bedarf für Organersatz ist groß: Tausende von Patienten sterben jedes Jahr weltweit während sie auf ein Spenderorgan warten. Im Bereich der Nierenspenden stehen in Deutschland pro Jahr 3500 Transplantationen 12000 Kranken auf der Warteliste gegenüber.

Neben der wichtigsten Anwendung des Tissue Engineerings, der Heilung von Gewebe- und Organversagen, sind künstlich kultivierte Gewebe auch interessant als Modelle zum Testen von Medikamenten und für das Studium von Zellfunktionen. Eine Vielzahl von medizinischen Tests, die heute mit Tierversuchen durchgeführt werden, könnten so durch Studien an künstlich kultivierten Geweben ersetzt werden.

Bislang sind nur für Haut und Knorpel künstliche Gewebeprodukte in der klinischen Anwendung. Wie lange es noch dauern wird, bis voll funktionsfähige komplexe Organe kultiviert werden können, lässt sich nach Aussagen von Experten aufgrund der bestehenden wissenschaftlichen Hürden noch nicht verlässlich abschätzen. Der Antrieb an diesem Fernziel weiter zu arbeiten ist jedoch groß, denn der Markt für ausgereifte Tissue Engineering Produkte wird auf zwei bis dreistellige US\$-Milliardenbeträge geschätzt [MEDICA, 2001].

Auf Grund des frühen Entwicklungsstadiums dieser Medizintechnologie sind die aktuellen Umsätze mit Tissue Engineering Produkten noch vergleichsweise gering. So wurde der Weltmarkt für künstlich kultivierte Hautprodukte im Jahr 2001 auf 100 Mio. US\$ geschätzt [MEDICA, 2001].

8.5 Anwendungspotenzial der Nanobiotechnologie im Tissue Engineering

Die Nanobiotechnologie bietet die Werkzeuge und Techniken, um Materialien auf der Nanometer Skala zu manipulieren und zu untersuchen. Sie kann insbesondere dabei helfen, die Funktionen der Proteine und die Wechselwirkungen der Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix aufzuklären. Darüber hinaus können mit den Methoden der Nanobiotechnologie Matrices aufgebaut, strukturiert und mit Signalmolekülen versehen werden. Die Nanobiotechnologie bietet daher das Potenzial, wesentlich zur Überwindung der derzeitigen technischen Hürden im Tissue Engineering beizutragen und somit Fortschritte bei der Steuerung der Zelldifferenzierung, der Vaskularisierung und der dreidimensionalen Zellanordnung zu erzielen. Im Folgenden sollen mögliche Einsatzfelder der Nanobiotechnologie näher diskutiert werden.

8.5.1 Mikro- und Nanofabrikationstechniken

Es ist bekannt, dass die extrazelluläre Umgebung die Zelle in ihrer Struktur und Funktionalität beeinflusst. Werden Zellen auf einer synthetischen Matrix kultiviert, so erfahren sie ein sehr ungewohntes Nano-Umfeld, das der Zelle unbekannt und für die Zellentwicklung möglicherweise hinderliche Signale gibt.

Strukturierung und
Aufbau von Matrices

Wie Curtis und Wilkinson [2001] ausführen, haben jüngste Forschungsergebnisse gezeigt, dass Zellen selbst auf Strukturen mit einer Größe von nur 5 nm in ihrer Umgebung (1000-5000 mal kleiner als Zellen) reagieren. Nach Desai [2000] konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass durch gerillte Oberflächen die Richtung des Zellwachstums kontrolliert werden kann und dass die Mikrotextur von Oberflächen einen signifikanten Einfluss auf die Zellvermehrung, die Zellhaftung und die DNA-Profile der Zellen hat (s. auch Abb. 8.2). Neben der Architektur und der Oberflächenstrukturierung sind auch Porosität und Porengröße

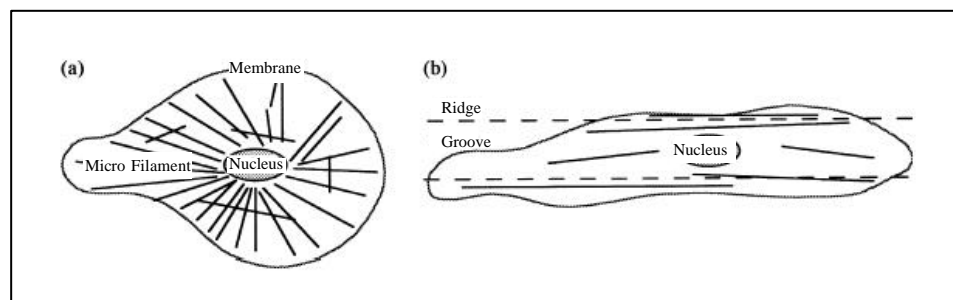


Abb. 8.2. Schematische Darstellung des Zytoskeletts einer Zelle: a) auf einer flachen Oberfläche, b) auf einer mikrostrukturierten Oberfläche.

Quelle: [Wilkinson et al., 2002]

der Matrices von großer Bedeutung für die Gewebekultivierung, da sie die Nährstoffversorgung der Zellen und die Vaskularisierung des Gewebes beeinflussen.

Mechanische und chemische Methoden, mit denen die Oberflächenparameter der Matrix direkt gesteuert werden können, sind also von essenzieller Bedeutung für die Optimierung der Matrices und stellen damit einen wichtigen Meilenstein im Tissue Engineering dar. Eine Übersicht über Nanofabrikationsmethoden findet sich bei Curtis und Wilkinson [2001]. Zwei Beispiele für mechanische Strukturierungstechniken sind im Folgenden aufgeführt:

Mechanische
Strukturierung von
Oberflächen

- 1) Shi et al. [1999] zeigen in ihrer Studie wie es möglich ist, mit dem „Molecular Imprinting“ Oberflächen so zu strukturieren, dass sie spezifische Andockstellen für Proteine enthalten (Abb. 8.3). Bei dem Aufbau von Matrices können solche Oberflächen eingesetzt werden, um Proteine einzulagern, die die Differenzierung und Proliferation der Zellen beeinflussen.

Bei dem von Shi et al. [1999] entwickelten Verfahren werden Proteine auf einer Silikatoberfläche (Mica) adsorbiert und mit einer Schicht von Disacchariden (Zuckermoleküle) überzogen. Dann wird mit einem Plasmaverfahren eine Fluorpolymerschicht aufgebracht und diese durch eine dritte Schicht aus Epoxidharz verstärkt. Im nächsten Arbeitsschritt wird die Mica-Schicht abgezogen und die Proteine mit einer Lauge herausgelöst. Die verbleibende Oberfläche enthält Formabdrücke der Protein Oberflächenstrukturen, in die neue Proteine eingelagert werden können.

- 2) Einem Wissenschaftsteam in Cambridge, USA, ist es gelungen, ein Blutgefäßsystem in einer Gewebematrix in vitro zu erzeugen [Borenstein et al., 2002]. Die entscheidende Komponente des vorgestellten Verfahrens ist eine Mikrofabrikationstechnik, mit der ein Netzwerk aus Kanälen hergestellt wird, das praktisch einer „Blaupause“ der Mikrozirkulation entspricht. Die Zirkulationsmuster sind zuvor mit einem Computermodell berechnet worden. Darauf aufbauend werden lithografische Schablonen gefertigt und Prägeformen hergestellt. Die Prägeformen werden genutzt, um Polymerfilme zu strukturieren, die anschließend zu einem dreidimensionalen Gerüst kombiniert werden. Das Einbringen der Endothelzellen³ in das mikrofluidische Netzwerk erfolgt durch dynamisches Säen, während die Parenchymzellen⁴ in die Zwischenräume der Matrices eingebracht werden. Borenstein et al. [2002] konnten zeigen, dass die Endothelzellen in den Röhren-

³ Endothelzellen kleiden die Innenwände von Venen, Arterien und den Lymphgefäßen aus.

⁴ Parenchymzellen sind Zellen, die die spezifische Funktion eines Organs bedingen.

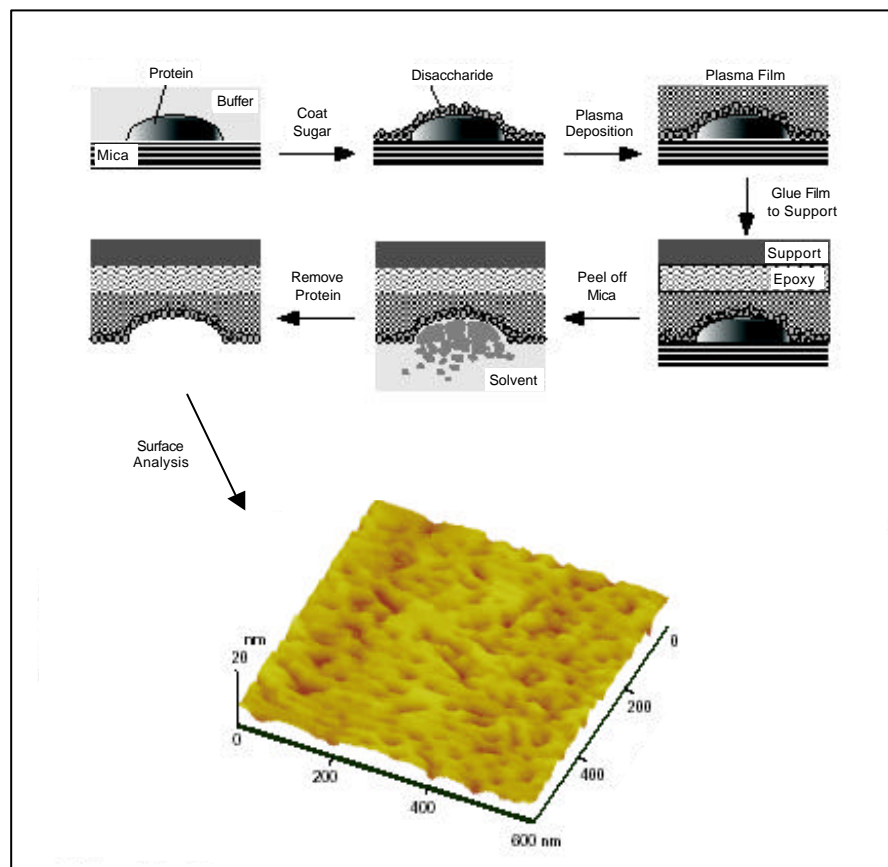


Abb. 8.3. Molecular Imprinting Technik nach Shi [1999]. Erläuterungen, siehe Text.
Quelle: [Shi et al, 1999].

wänden des mikrofluidischen Systems anhaften und sich vermehren. Die Technik soll weiter entwickelt werden, mit dem Ziel Blutgefäßsysteme für vollständige Organe zu kultivieren.

Die derzeit diskutierten Methoden zur chemischen Oberflächenstrukturierung der Matrices befinden sich vielfach eher im Bereich der Mikro- als der Nanotechnologie. Zumindest aber die vertikalen Schichtstrukturen liegen zum Teil im nanoskaligen Bereich, insbesondere wenn Monolagen an Biomolekülen aufgetragen werden. Daher sollen im Folgenden auch diese Strukturierungsmethoden kurz vorgestellt werden. Bei der Oberflächenmodifikation von Biomaterialien mit dem Ziel, die Zelldifferenzierung und die dreidimensionale Zellanordnung besser kontrollieren zu können, werden zwei Kategorien von Verfahren unterschieden:

- 1) Die chemische Änderung der atomaren/molekularen Struktur der Oberfläche (Ätzverfahren, chemische Modifikation) und
- 2) die Beschichtung der Matrices mit einer neuen Oberfläche unter Einsatz von Fotolithografie, „Microcontact Printing“ oder „Solution Coating“.

Um die Anbindung der Zellen an die Matrix zu verbessern, sind beispielsweise Experimente durchgeführt worden, in denen extrazelluläre Matrix-Proteine mit Hilfe des „Microcontact Printings“ auf Oberflächen aufgetragen wurden. Mit diesen Verfahren konnten Regionen für die kontrollierte Bindung von Zellen erzeugt werden. Für solche Bindungen eignen sich Liganden, die eine mit den Adhäsionsrezeptoren der Zellen wechselwirkende RGD-Peptid⁵-Sequenz enthalten. Durch die so bedingte Zellhaftung wird die Migration, das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose (Zelltod) der Zelle beeinflusst. Mikrostrukturierte Beschichtungen mit Molekülen wie PEG (Polyethylenglykol) oder Peptiden werden auch eingesetzt, um das Anbinden unerwünschter Proteine zu verhindern [Desai, 2000; Otsuka, 2001].

Darüber hinaus wird mit Mikrostrukturierungsverfahren experimentiert, um eine kontrollierte dreidimensionale Anordnung von Zellen zu erreichen, wie sie in komplexen Organen besteht. Typischerweise werden dabei räumliche Änderungen in der Ladung, Hydrophilität oder chemischen Funktionalität genutzt, um selektiv die Anlagerung von bestimmten Zelltypen zu fördern. In diesem Zusammenhang werden auch mikrofluidische Verfahren für die gezielte Positionierung von Zellen und Proteinen in dreidimensionalen Matrices diskutiert⁶.

8.5.2 Nanomembranen für die immunisulative Kontrolle

Bei der Transplantation von Organen oder Zellen ist es essenziell, die Immunreaktion des Empfängers zu kontrollieren und oftmals ist dies nur durch die lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva möglich. Um akute Abstoßungsreaktionen zu verhindern, haben Forscher versucht, Biomoleküle, die Immunreaktionen hervorrufen, durch Membranen vom Immunsystem abzuschirmen. Eingesetzt wurde dieses Verfahren z. B. zum Schutz von xenogenen⁷ Pankreas-Inselzellen, die eingeschlossen in eine Membran in den Empfänger transplantiert wurden. Die Membran erlaubt die Diffusion von kleinen Molekülen wie Glucose und Insulin, während der Durchtritt der größeren die Abwehrreaktion hervorrufenden Antikörper verhindert wird. Das Problem bei den herkömmlichen Membranen besteht vor allem darin, dass ihre mechanische Belastbarkeit unzureichend ist und dass die Größenverteilung der Poren zu breit ist, um die implantierten Zellen langfristig vor dem Immunsystem des Körpers abzuschirmen. Ein weiteres häufig auftretendes Problem besteht in der

⁵ RGD-Peptid Sequenz: Arginin-Glycin-Aspartat

⁶ Durch die Besiedlung der Matrix mit Zellen verändert sich die Porosität und Topologie der Matrix. Dadurch bedingte Volumeneffekte sowie der Zusammenbruch der Durchströmung wirken sich negativ auf den Heilungsprozess aus. Um diese Probleme zu überwinden, wird der Einsatz von Formgedächtnispolymeren diskutiert, deren Struktur auch durch externe Signale dem Besiedlungsgrad angepasst werden kann.

⁷ Xenogen bedeutet artfremd, in diesem Zusammenhang also von einem Tier stammend.

Auslösung von Entzündungsreaktionen durch das Kapselmaterial, was nachfolgend zu einer bindegewebigen Einbettung der Kapsel mit Verschlechterung des Stofftransportes führen kann.

Nanomembranen gelten als aussichtsreich, um die bestehenden Unzulänglichkeiten der medizinischen Membranen zu überwinden⁸. So können mit Hilfe von Nanotechnologie Silikonmembranen hergestellt werden, die aufgrund ihrer biochemischen Inertheit und ihrer starken mechanischen Belastbarkeit eine Alternative zu den konventionellen organischen Biokapseln darstellen. Weitere Vorteile der Silikonmembranen sind ihre leicht zu derivatisierende Oberfläche, kontrollierbare Porengrößen und die geringe Membranschichtdicke, die die Diffusion von Nährstoffen und Insulin erleichtert [Desai, 2000]. Es konnte in neueren Untersuchungen auch gezeigt werden, dass die Größe der Membranporen im Nanometerbereich einen Einfluss auf das Wachstum und die Funktion von Zellen hat. Hierdurch ergeben sich Möglichkeiten durch Nanotechnologie, die zellulären Aktivitäten des implantierten Gewebes zu beeinflussen [Kras-teva et al., 2003].

8.5.3 Analytische Methoden der Nanobiotechnologie

Für weitere Fortschritte im Tissue Engineering ist ein umfassendes Verständnis der Zellfunktionen und der Wechselwirkungen der Zelle mit ihrer Umgebung essenziell. Diese Funktionen werden durch Proteine und letztendlich natürlich durch die DNA der Zelle gesteuert. Zur Untersuchung der Funktionen und Wirkweisen von Proteinen und DNA werden analytische Methoden in der Nanobiotechnologie weiterentwickelt und angewandt, wie z. B.

- 1) Biochips zum Nachweis der DNA- und Proteinexpression in Zellen,
- 2) rasterkraftspektroskopische und optische Methoden zur Aufklärung nanoskaliger Strukturen von Zellen und Zellmatrizes oder

⁸ Nanoporöse Membranen können auch in der extrakorporalen Blutreinigung eingesetzt werden. In einem vom BMBF geförderten Projekt wird ein neues Verfahren für die Blutwäsche entwickelt, in dem Filter aus Hohlfasermembranen eingesetzt werden, die nanometerdünne Poren enthalten (vgl. www.nanobio.de). Diese Poren lassen nur das vergiftete Blutplasma nicht aber die empfindlichen Blutplättchen an die Absorberschicht heran, die die schädlichen Stoffe aus dem Plasma entfernt. Das neue Blutreinigungsverfahren erweitert und beschleunigt die Möglichkeiten der Dialyse erheblich, da die in den herkömmlichen Verfahren erforderliche aufwendige Trennung von Blutplättchen und Plasma nicht mehr notwendig ist. An dem Projekt sind folgende Partner beteiligt: Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik Stuttgart, Universität Stuttgart / Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Gambro Dialysatoren GmbH & CoKG, Hechingen.

- 3) optische Pinzetten, um die Bewegung von molekularen Motoren zu messen und damit pulsierende und antreibende Eigenschaften von Geweben zu untersuchen [Craighead and Leong, 1999].

Durch Anwendung dieser Methoden zur Aufklärung der Zellbestandteile und der Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung wird die Nanobiotechnologie daher indirekt eine immer größere Bedeutung für das Tissue Engineering erlangen [Craighead and Leong, 1999].

8.5.4 Aufbau von Matrices durch Selbstorganisation nanoskaliger Fasern

Auch bei der Herstellung von Matrices für die Zellkultivierung kann die Nanotechnologie Beiträge liefern. Dem Ziel, die natürliche Zellmatrix von Knochen durch selbstorganisierende nanoskalige Materialien nachzubilden, ist die Arbeitsgruppe um Samuel Stupp an der Northwestern University, USA, einen Schritt näher gekommen. In einer Veröffentlichung in der Fachzeitschrift Nature [Hartgerink et al., 2001] beschreiben sie ein synthetisches Substitut für Kollagen, das sich in einem Selbstorganisationsprozess zu Strängen zusammenlagert, die als Templat

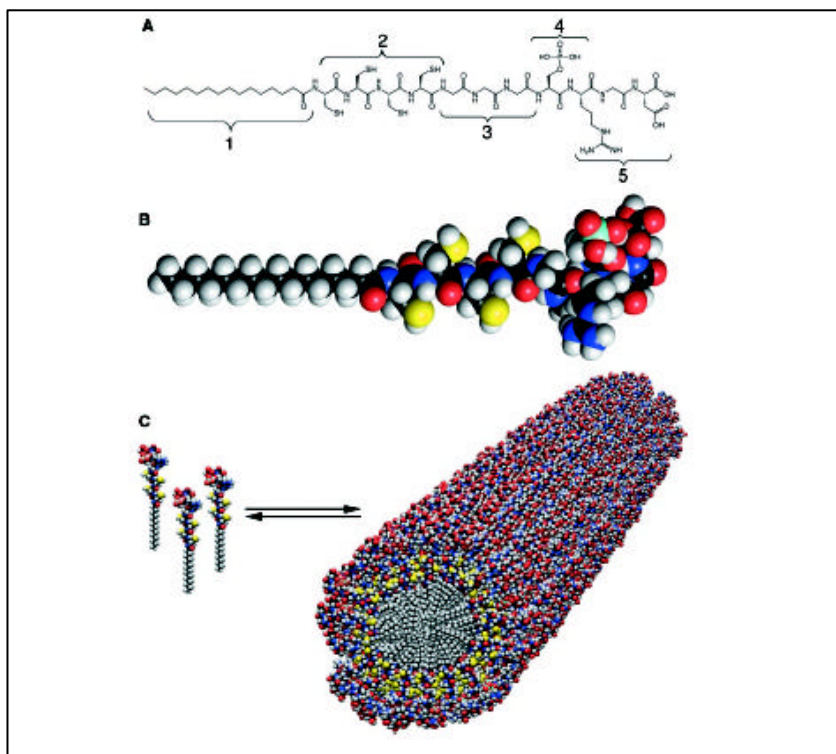


Abb. 8.4. Die Bildung von Nanofasern durch einen Selbstorganisationsprozess von Peptid-Amphiphilen, wie bei Hartgerink et al. [2001] beschrieben: A) Strukturformel und B) Kalottenmodell des Peptid-Amphiphils. C) Schematische Darstellung der Selbstorganisation des Peptid-Amphiphils zu zylindrischen Nanofasern.

Quelle: [Hartgerink et al., 2001]

für die Kristallisation von Hydroxylapatit wirken. Die verwendeten Moleküle sind kegelförmig und bestehen am breiteren Ende aus einem hydrophilen Peptid und am schmalen Ende aus einer hydrophoben Alkylgruppe. Werden diese Moleküle in Wasser mit niedrigem pH-Wert gegeben, so lagern sie sich spontan zu Fasern zusammen, wobei die hydrophoben Enden zur Mitte der Faser zeigen und die Peptidenden nach außen zur wässrigen Phase gerichtet sind (Abb. 8.4). Diese Fasern lenken das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen bezüglich Orientierung und Größe ähnlich wie die Kollagenmatrix im natürlichen Knochen. Weitere Forschungsarbeit ist notwendig, um herauszufinden, ob sich mit der synthetischen Faser Knochensubstitute herstellen lassen, die vergleichbare mechanische Eigenschaften aufweisen wie natürlicher Knochen.

Die Arbeit von Samuel Stupp ist ein erster Schritt auf dem Weg zum Aufbau synthetischer Matrices aus nanoskaligen Materialien. Das Fernziel bei diesem Forschungsansatz ist es, Materialien zu synthetisieren, die nicht nur physikalische Eigenschaften natürlicher Biomaterialien replizieren, sondern auch die Signalwirkungen für die Haftung, Vermehrung und Differenzierung von Zellen, die von der natürlichen Zellmatrix ausgehen.

8.6 Zusammenfassende Bewertung

Zwei Jahrzehnte nachdem sich das Wissenschaftsfeld Tissue Engineering formierte, befinden sich erste Produkte für Haut und Knorpel auf dem Markt. Der Bedarf an künstlichen Geweben ist hoch, da die bestehenden medizinischen Verfahren zur Behandlung von Organversagen mit einer Reihe schwerwiegender Probleme verbunden sind, wie der unzureichenden Anzahl an Spenderorganen und der Abwehrreaktion des Immunsystems. Beim Einsatz medizinischer Ex-vivo-Apparate, wie z. B. der künstlichen Niere, sind es die hohen Kosten und die Unannehmlichkeiten für den Patienten, die neue Lösungsansätze wie das Tissue Engineering attraktiv machen.

Das Marktpotenzial für ausgereifte Tissue Engineering Produkte, insbesondere für Innere Organe wie Niere oder Leber, wird auf zwei bis dreistellige Milliardenbeträge in US\$ geschätzt. Solche Umsätze werden jedoch sicherlich erst nach Jahrzehnten weiterer Forschungs- und Entwicklungsanstrengungen erreichbar sein.

Weil die Wechselwirkungen von Zellen untereinander und mit der Zellmatrix noch kaum verstanden sind, ist es bislang auch ansatzweise noch nicht möglich, Organe wie Niere oder Leber zu kultivieren. Dabei sind drei wissenschaftliche Hürden von entscheidender Bedeutung: 1) Die Zellen komplexer Gewebetypen entdifferenzieren bei der Kultivierung und können dann organtypische Funktionen nicht mehr erfüllen, 2) es ist bislang noch nicht gelungen Gewebe mit Blutgefäßen zu kultivieren und

3) die dreidimensionale Anordnung von Zellen in komplexen Geweben kann noch nicht reproduziert werden. Die Nanobiotechnologie bietet eine Reihe von Werkzeugen, die das Potenzial haben, maßgeblich zur Überwindung dieser Hürden beizutragen:

- Einsatz von Mikro- und Nanofabrikationsmethoden, um die Oberflächen der Matrices nanoskalig zu strukturieren. Mit solchen Nanostrukturierungen soll das Haftverhalten von Proteinen verbessert und die Entdifferenzierung der Zellen verhindert werden.
- Aufbau von Matrices aus Nanofasern durch Selbstorganisationsprozesse
- Verwendung von nanoporösen Membranen zur immunisolutiven Verkapselung von Transplantaten

Um komplexe Gewebe kultivieren zu können, müssen die Funktionen der Gene und Proteine in den Zellen so vollständig wie möglich verstanden werden. Die dazu notwendige Grundlagenforschung profitiert stark durch die Methoden der Nanobiotechnologie, die nicht nur Informationen über die DNA- und Proteinexpression der Zelle liefern, sondern auch die Analyse der Zell- und Matrixoberflächen ermöglichen. Beispiele für solche Methoden sind chipbasierte Analyseverfahren, sowie im Bereich der Oberflächenanalyse optische und rasterkraftmikroskopische Techniken.

Zur Überwindung der bestehenden Hürden im Tissue Engineering wird die Nanobiotechnologie in Zukunft eine zunehmend prominente Rolle spielen. Ein enger Austausch zwischen den beiden Wissenschaftsfeldern und interdisziplinär ausgerichtete Projekte sind eine wichtige Voraussetzung, um das Potenzial der Nanobiotechnologie für das Tissue Engineering nutzbar zu machen.

9 INTELLIGENTE IMPLANTATE

Intelligente Implantate, die über elektronische Elemente verfügen, sind als Neuroprothesen bereits seit Jahren in der klinischen Anwendung und werden seit Mitte der 90er Jahre auch für Drug-Delivery-Anwendungen entwickelt. Diese Systeme werden sowohl auf wissenschaftlichen Konferenzen als auch in Marktstudien vielfach als Nanobiotechnologie klassifiziert. Das Gebiet der Intelligenten Implantate ist zu komplex, um es an dieser Stelle umfassend abhandeln zu können. Aus diesem Grund beschränken wir uns darauf, an einigen Fallbeispielen herauszuarbeiten, welchen Anteil die Nanobiotechnologie an der Entwicklung solcher Systeme derzeit tatsächlich hat und inwieweit sie zukünftig zur Überwindung technischer Hürden beitragen kann.

9.1 Neuroprothetik

Neuroprothesen sind technische Systeme, die ausgefallene Nervenfunktionen wieder herstellen oder ersetzen. Sie überbrücken z. B. gestörte Nervenbahnen, geben Impulse an Muskeln weiter oder ersetzen die Sinnesorgane. Die bekannteste Neuroprothese ist der Herzschrittmacher, der bereits seit über 30 Jahren mit großem Erfolg eingesetzt wird. Andere Beispiele für neurale Prothesen sind der Blasenstimulator, das Cochlear-Implantat (Innenohr-Implantat), die Tiefenhirnstimulation¹, das Retina-Implantat, Greifprothesen und der Fallfußstimulator. Der Herzschrittmacher, das Cochlear-Implantat, die Tiefenhirnstimulation, der Blasen- und der Fallfußstimulator sind mittlerweile in der klinischen Anwendung etabliert.

Während die Anfänge der Neuroprothetik in der Muskelstimulation lagen, gewinnen die Forschungsaktivitäten in den Bereichen der Stimulation peripherer Nerven und der Gehirnimplantate zunehmend an Bedeutung. Diese Entwicklung wird vor allem von der weiteren Miniaturisierung der Implantat-Technologie vorangetrieben. Ein weiterer Trend bei der Entwicklung von Neuroprothesen ist die Verwendung von Elektrodenarrays, die unter anderem bei Cochlear- und Retina-Implantaten eingesetzt werden.

Die Entwicklung des Retina-Implantats ist mittlerweile soweit vorangeschritten, dass in den USA bereits erste klinische Tests durchgeführt werden konnten. Trotz der großen Fortschritte auf diesem Gebiet wird es aber auch in den USA aufgrund der hohen regulatorischen Hürden noch viele Jahre dauern, bis mit einer klinischen Zulassung der ersten Retina-Implantate gerechnet werden kann [Hall, 2003]. Ein weiteres Hemmnis

¹ Tiefenhirnstimulation wird beispielsweise eingesetzt, um die Zittererscheinungen bei Morbus Parkinson zu reduzieren.

sind die hohen Kosten dieser Technologie und der notwendigen Operationen. Es kann daher nicht a priori davon ausgegangen werden, dass diese Kosten, die für ein Retina-Implantat inklusive der Operation derzeit etwa 100.000 US\$ betragen würden, von den Krankenkassen übernommen werden.

Eines der verbleibenden technischen Probleme bei der Entwicklung von Neuroimplantaten ist die begrenzte Biokompatibilität der verwendeten Materialien [Hall, 2003]. Implantate müssen generell eine hohe Kompatibilität zu biologischen Systemen aufweisen, damit sie vollständig in das umgebene Gewebe integriert werden können. Hinsichtlich der Flexibilität sollten sie biologischen Systemen möglichst nahe kommen, um eine mechanische Verletzung der Nerven zu verhindern. Diese Eigenschaften werden auch als mechanische oder strukturelle Biokompatibilität bezeichnet. Mit flexiblen Mikro-Herstellungsverfahren (Micromachining) für die Substrate, Hybridtechniken für die Herstellung der Elektronik und mit neuartigen Verkapselungsmaterialien (z. B. Parylen oder Silikon) stehen mittlerweile Techniken zur Verfügung, die es in Zukunft ermöglichen sollten, Implantate mit einer verbesserten strukturellen Biokompatibilität herzustellen [Stieglitz, 2003].

Auf der Mikroebene wird die Biokompatibilität des Implantats durch die Eigenschaften der Materialoberfläche bestimmt, wie Oberflächenenergie, funktionelle Gruppen und die Nanostrukturierung. Es gibt daher verstärkt Aktivitäten, mit Hilfe der Oberflächenstrukturierung auf der Nanoskala die Eigenschaften der Implantate zu verbessern. In der Arbeitsgruppe um T. Stieglitz am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik werden dazu Plasmaprozesse eingesetzt, mit dem Ziel, eine verbesserte Zellhaftung zu erreichen. Einer der Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe ist es, durch nanoskalige Oberflächenmodifikationen die elektrischen Schnittstellen von neuronalen Prothesen hinsichtlich ihrer Verankerung im Gewebe und ihrer Langzeitverträglichkeit zu verbessern.

Im Folgenden soll das Retina-Implantat herausgegriffen werden, um exemplarisch das Anwendungspotenzial der Nanotechnologie im Bereich der Neuroprothesen im Detail zu diskutieren.

9.1.1 Anwendung der Nanotechnologie am Beispiel des Retina-Implantats

In Deutschland gibt es mehr als 50.000 Menschen, die aufgrund von Netzhauterkrankungen erblindet sind. Mit Retina-Implantaten wird versucht, die Funktion der degenerierten Retina zu ersetzen und dem Patienten zumindest wieder ein begrenztes Sehvermögen zu geben. Aufgrund der großen Fortschritte in der Mikroelektronik, der Optoelektronik und der biomedizinischen Technik haben sich seit Anfang der 90er Jahre die technischen Voraussetzungen für den Aufbau hochkomplexer Neuropro-

thesen deutlich verbessert. Daraufhin sind in mehreren Ländern, unter anderem auch in Deutschland, interdisziplinäre Forschungsgruppen gebildet worden, um die Entwicklung von Retina-Implantaten voranzutreiben.

Dabei werden zwei Ansätze für die Realisierung solcher Implantate verfolgt [Zrenner, 2002]: 1) Subretinale Implantate, die auf Substraten basieren, die hunderte bis Tausende von Mikrophotodioden enthalten. Sie werden unter die Netzhaut implantiert und wandeln das einfallende Licht in Spannungsimpulse um, die an die noch verbliebenen Neuronen in der Retina geleitet werden. 2) Epiretinale Implantate, die keine lichtsensitiven Elemente enthalten und die auf der zur Linse hingewandten Schicht der Retina implantiert werden. Sie benötigen eine hochminiaturisierte CMOS-Kamera, die in eine Brille integriert ist und das Sichtfeld abbildet. Die prozessierten Bildsignale werden dann an das Implantat im Auge gesendet.

Beide Implantat-Typen haben Vor- und Nachteile, der offensichtlichste Unterschied ist der, dass ein subretinales Implantat nur verwendet werden kann, wenn die optische Funktion des Auges, also die Linse noch intakt ist. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass nur beim subretinalen Ansatz das verbleibende neuronale Netzwerk der Retina genutzt wird; beim epiretinalen Implantat ist dies nicht der Fall, so dass eine zusätzliche Signalverarbeitung erforderlich wird.

Um die Entwicklung von Retina-Implantaten in Deutschland voranzutreiben, wurden 1995-2000 zwei Forschungsverbände gefördert: Das EPI-RET Konsortium um Prof. Eckmiller, das den epiretinalen Ansatz verfolgt und das MPD-A (Mikrophotodioden Array) Konsortium um Prof. Zrenner, das an der Entwicklung eines subretinalen Implantats arbeitet. Um Synergien zu nutzen, sind die beiden Forschungskonsortien im Jahr 2000 zu dem Verbund „Retina-Implantat“ vereint worden, dem bundesweit Arbeitsgruppen aus 12 Universitäten und außeruniversitären Instituten angehören. Zwei Unternehmen in Deutschland, die aufbauend auf das Know-how des Retina-Implantat Projektes an der Entwicklung von Retina-Implantaten arbeiten, sind IIP-Technologies in Bonn und die Retina Implant AG in Tübingen. Für das epiretinale Implantat von IIP-Technologies wurden im Herbst 2003 die ersten klinischen Kurzzeitstudien durchgeführt.

Eines von zwei Unternehmen weltweit, dessen subretinale Implantate in einem klinischen Versuch bereits Patienten implantiert wurden, ist Optobionics, USA. Die ersten Implantationen wurden im Jahr 2000 durchgeführt, nach Auswertung der klinischen Daten sollen die Ergebnisse der Studie 2004 in einer Fachzeitschrift veröffentlicht werden.

Retina-Implantate sind als solche keine Nanotechnologie, jedoch kann der Einsatz von Nanotechnologie für einige Komponenten der Implantate zu einer entscheidenden Verbesserung der Implantateigenschaften führen. Im Folgenden sollen dafür drei Beispiele gegeben werden:

- 1) Nanoporöse und nanoskalige Elektroden: Am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut der Universität Tübingen werden Elektroden mit einer nanoporösen Oberfläche für subretinale Implantate entwickelt. Durch die Nanostrukturierung wird die Oberfläche der Elektroden um etwa einen Faktor 100 vergrößert. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, um einen hinreichend großen Ladungstransfer vom Retina-Implantat auf das Gewebe zu erreichen [Stelzle, 2003].

Scriber et al. [2001] beschreiben die Entwicklung eines Mikroelektroden-Arrays für den Einsatz in epiretinalen Implantaten. Das Array besteht aus einem Glassubstrat, das regelmäßig angeordnete Kanäle enthält, deren Durchmesser kleiner als 1 μm ist. Die Kanäle werden mit einem leitfähigen Material gefüllt und stellen somit Nanodrähte dar, die zur Stimulation retinaler Zellen genutzt werden. Weisen die Nanodrähte einen Durchmesser von 0.8 μm auf, so besitzt das Elektrodenarray eine für die Signalübertragung optimierte Geometrie.

- 2) Diamant-Beschichtungen: Am Argonne National Laboratory, USA, wird an einer nanokristallinen Diamantbeschichtung gearbeitet, die für Retina-Implantate eingesetzt werden soll. Die besonderen Eigenschaften von Diamant, wie die hohe Biokompatibilität, die chemische Inertheit und die geringe Oberflächenhaftung, machen es zu einem idealen Material für die Beschichtung von elektronischen Implantaten.
- 3) Neurotransmitter-Chip: Bei den derzeit in Entwicklung befindlichen Retina-Implantaten erfolgt die Signalübermittlung über einen elektrischen Impuls, während in der natürlichen Retina diese Signale hauptsächlich durch chemische Botenstoffe übermittelt werden. In einer Veröffentlichung beschreiben Peterman et al. [2003] ein Micro Electro Mechanical System (MEMS), das Zellen über die Freisetzung von Neurotransmittern stimuliert. Solche MEMS werden auch für die Anwendung in Retina-Implantaten diskutiert. Das System wird mit Mikrofabrikationstechniken hergestellt und besteht an der Oberfläche aus einer nur wenige 100 nm dicken Membran.

Obwohl Nanotechnologie derzeit nur für die Beschichtung der Implantate oder den Aufbau der Elektroden verwendet wird, kann sie zu einer entscheidenden Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Implantate beitragen, vor allem in Bezug auf die neuronale Reizübertragung, Zellanhaftung und die Biokompatibilität.

9.2 Implantierbare Mikrochips für Drug-Delivery-Anwendungen

Seit Mitte der 90er Jahre wird bereits versucht, mit Hilfe von Mikrofabrikationstechniken neuartige Drug-Delivery-Systeme zu entwickeln, die

eine aktiv steuerbare Wirkstofffreigabe ermöglichen. Herkömmliche Darreichungsformen, wie die orale Gabe oder Injektion, weisen für viele Wirkstoffe mit einem engen therapeutischen Konzentrationsbereich ein ungünstiges Zeit-Dosisprofil auf: Direkt nach der Verabreichung können Konzentrationspeaks auftreten, die oberhalb der toxischen Dosis liegen, dann fällt die Konzentration im Blut oftmals sehr rasch bis auf Werte unterhalb der Wirkungsschwelle ab. Implantierbare Drug-Delivery-Systeme können diese Nachteile überwinden, weil die Wirkstoffabgabe passiv oder aktiv gesteuert werden kann, so dass die Wirkstoffkonzentration immer im therapeutischen Bereich liegt. Dabei ist es auch möglich, gepulste Zeit-Dosisprofile vorzugeben, wie sie z. B. für Hormonpräparate erforderlich sind. Durch die Implantation der Mikrochips wird der Wirkstoff direkt im erkrankten Gewebe freigesetzt, die Gefahr von Nebenwirkungen ist somit deutlich geringer. Zu den neuartigen Drug-Delivery-Systemen, die mit Mikrofabrikationsmethoden hergestellt werden, zählen [Shawgo et al., 2002; Tao und Desai, 2003]:

- Mikronadeln für den transdermalen Transport
- Implantierbare Mikrochips für die lokale Wirkstoffgabe
- Bioadhäsive Mikropartikel² für die orale Wirkstoffgabe
- Nanoporöse immunisierende Biokapseln, die für die Verkapselung von transplantierten Organteilen oder Zellen eingesetzt werden

Von diesen Systemen stellen nur die Mikrochips und die immunisierenden Biokapseln Implantate dar. Da Letztere bereits im Kapitel „Tissue Engineering“ beschrieben werden, beschränken wir uns im Folgenden auf die Diskussion der implantierbaren Mikrochips.

9.2.1 Design der Mikrochips

Mikrochips für Drug-Delivery-Anwendungen werden mit dem Ziel entwickelt, Wirkstoffe zu lagern, kontrolliert freizusetzen und gegebenenfalls die Freisetzung mit einem Sensor, der physiologische Parameter misst, aktiv zu steuern. Für die Herstellung solcher Mikrochips können Siliziumwafer verwendet werden, die sich mit Prozesstechniken der Mikro- und Nanostrukturtechnik bearbeiten lassen, wie z. B. UV-Photolithographie, Chemical Vapour Deposition, Electron Beam Evaporation und Reactive Ion Etching.

² Bioadhäsive Mikropartikel enthalten ein Mikrometer großes Wirkstoffreservoir und verfügen über bioadhäsive Liganden, die eine Anreicherung der Partikel an der Oberfläche des Zielorgans bewirken. Am Ort der Wirkung löst sich die Schutzmembran des Reservoirs auf und der Wirkstoff wird freigesetzt.

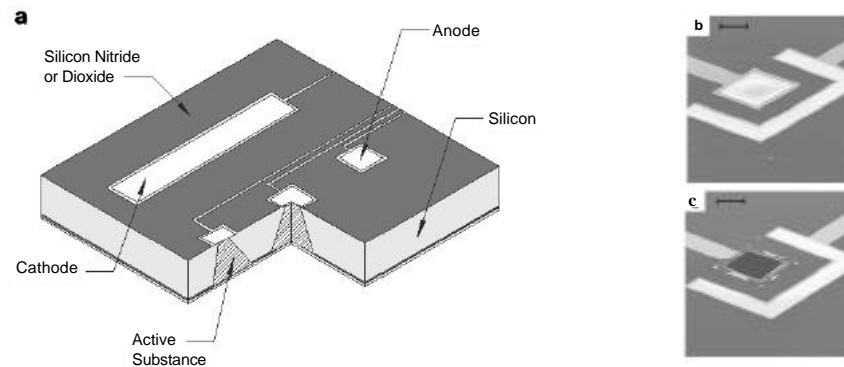


Abb. 9.1. A) Prototyp eines Mikrochips für Drug-Delivery-Anwendungen, wie er von Santini et al. [1999] in der Fachzeitschrift Nature vorgestellt wurde. Gezeigt sind außerdem Aufnahmen B) der Goldmembran und C) des offenen Reservoirs nach Anwendung einer Spannung für nur einige Sekunden, die zu einer Auflösung der Goldmembran geführt hat.

Quelle: [Santini et al., 1999]

Der erste Drug-Delivery-Mikrochip, der aus einem Array an pyramidalen Wirkstoff-Reservoirs bestand (Abb. 9.1), wurde 1999 in einer Veröffentlichung in der Fachzeitschrift Nature beschrieben [Santini et al., 1999]. Um die Freigabe des Wirkstoffs mit solchen Chips zu kontrollieren, sind verschiedene Techniken entwickelt worden. Es können z. B. Gold-Membranen eingesetzt werden, die als Anode in einer elektrochemischen Reaktion dienen. Um diese Reaktion zu ermöglichen, müssen die Anoden mit einem Elektrolyten benetzt werden. Durch Anlegen einer Spannung wird dann eine Anodenreaktion bewirkt, die zur Auflösung der nur 300 nm dicken Goldmembran führt. Ist die Goldkappe entfernt, so kann der Wirkstoff aus dem Reservoir herausdiffundieren.

Freigabe über reversible
Polymerverschlüsse

Als Alternative zu den Goldverschlüssen können auch so genannte künstliche Muskeln verwendet werden. Dabei handelt es sich um ein Verbundmaterial aus einem Hydrogel und einem elektrisch leitfähigen Kunststoff. Durch elektrochemische Stimulation wird eine Schwellung oder Schrumpfung des Gels bewirkt und das Wirkstoffdepot kann somit kontrolliert geöffnet und geschlossen werden. Neben der aktiven Steuerung kann die Wirkstofffreisetzung auch über eine einfache nanoporöse Membran erfolgen, durch die der Wirkstoff kontinuierlich hindurch diffundiert.

Beispiele für implan-
tierbare Drug-Delivery-
Mikrochips

Das Unternehmen ChipRx, USA, entwickelt ein vollintegriertes, selbst-regulierendes Implantat, das die Freigabe von Wirkstoffen ohne telemetrische Steuerung durch den Arzt oder Patienten ermöglicht. Eine Kontrollelektronik steuert die Freisetzungsrates des Wirkstoffs anhand bestimmter physiologischer Parameter, die von einem Sensorelement gemessen werden. Das System enthält eine Batterie, die Elektronik, ein

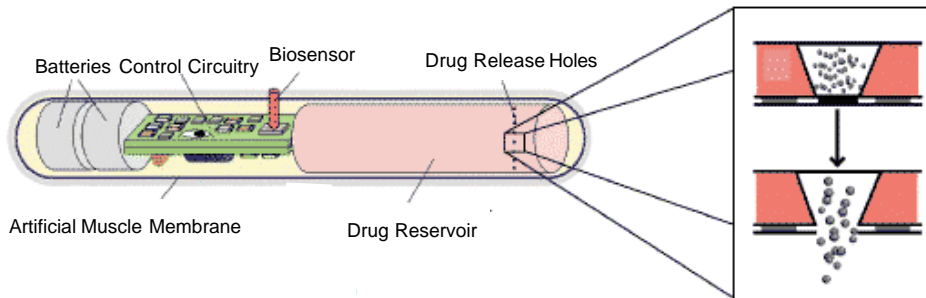


Abb. 9.2. Ein Drug-Delivery-Implantat, das sich bei dem Unternehmen ChipRx, USA, in Entwicklung befindet. Die Wirkstofffreigabe kann mit diesem Implantat aktiv gesteuert werden.

Quelle: ChipRx, <http://www.chiprx.com/products.html>

Wirkstoff-Reservoir und aktiv ansteuerbare Ventile für die Freisetzung des Wirkstoffs (Abb. 9.2).

Ein Implantattyp, dessen Freisetzungsmechanismus passiv ist, wird von dem Unternehmen iMEDD, USA, entwickelt. Das Implantat besteht aus einem röhrenförmigen Container, der eine nanoporöse Membran enthält, durch die der Wirkstoff kontinuierlich hindurchdiffundiert. Das System ist für Behandlungsdauern von mehreren Monaten ausgelegt. Die ersten klinischen Tests sollen mit dem Medikament Interferon-alpha durchgeführt werden, das zur Behandlung von Hepatitis C eingesetzt wird. iMEDD geht davon aus, dass die Behandlungsmethode mit dem neuartigen Delivery System deutlich kostengünstiger ist als die herkömmliche Behandlung, bei der die Applikation des Wirkstoffs über Injektionen erfolgt.

Ein Chipsystem, das mehrere hundert Depots enthält, ist von dem Unternehmen MicroCHIPS, USA, entwickelt worden. Die Depots können mit verschiedenen Wirkstoffen befüllt werden und sind mit Goldmembranen verschlossen, die sich über ein elektrisches Signal auflösen lassen. Die Wirkstofffreigabe wird dabei entweder intern über einen Biosensor oder extern durch einen Arzt oder den Patienten gesteuert.

Diskutiert werden Drug-Delivery-Mikrochips derzeit für den Einsatz in der Krebstherapie, für die Verabreichung von Hormonen und Steroiden, in der Schmerzbehandlung und für Krankheiten des zentralen Nervensystems. Bevor sich solche Systeme am Markt durchsetzen können, muss in klinischen Tests erst noch ihre Überlegenheit gegenüber herkömmlichen Methoden der Medikamentenverabreichung unter Beweis gestellt werden. Der potenzielle Markt für Drug-Delivery-Mikrochips wird von Branchenkreisen derzeit auf mehr als eine Milliarde US\$ geschätzt. In Anbetracht eines globalen Drug-Delivery-Marktes von etwa 40 Milliar-

den US\$ mit Zuwachsraten von derzeit etwa 28 % pro Jahr erscheinen solche Umsätze durchaus realisierbar [Visiongain, 2003].

9.3 Zusammenfassende Bewertung

Neuroprothesen dienen dazu, ausgefallene Nervenfunktionen zu ersetzen oder wieder herzustellen und befinden sich z. B. als Herzschrittmacher und Cochlear-Implantate bereits seit vielen Jahren in der klinischen Routine. Mittlerweile ist die Technik soweit fortgeschritten, dass auch die Entwicklung von Implantaten für hochkomplexe Vorgänge in Angriff genommen werden kann, wie für den Sehprozess oder die Stand/Gangstimulation. Unter Drug-Delivery-Mikrochips werden implantierbare Mikrochips mit Wirkstoffreservoirs verstanden, die die Wirkstofffreigabe aktiv steuern können.

Sowohl Neuroprothesen als auch Drug-Delivery-Mikrochips sind, was ihre funktionalen Elemente anbetrifft, im Wesentlichen der Mikrotechnologie zuzuordnen. Für bestimmte Komponenten spielen nanoskalige Strukturen jedoch eine Rolle:

- Bei den Retina-Implantaten wird Nanotechnologie eingesetzt, um die Signalübermittlung der Elektroden zu verbessern.
- In Drug-Delivery-Mikrochips werden Membranen mit Nanoporen verwendet.
- Der Einsatz nanostrukturierter Oberflächen zur Erhöhung der Biokompatibilität wird sowohl für Neuroprothesen als auch für Drug-Delivery-Mikrochips als bedeutend angesehen.

Der Markt für Neuroprothesen ist beträchtlich; so beträgt der Umsatz an Herzschrittmachern allein in den USA 1,7 Mrd. US\$ und der Markt für Cochlear-Implantate wird weltweit auf etwa 280 Mio. US\$ pro Jahr geschätzt. Komplexere Neuroprothesen, wie das Retina-Implantat oder die Stand/Gangstimulation befinden sich noch im Entwicklungsstadium.

Der potenzielle Markt für Drug-Delivery-Mikrochips wird optimistisch bei mehr als eine Milliarde US\$ gesehen. Die ersten Systeme befinden sich mittlerweile kurz vor der klinischen Testphase, wobei Arbeitsgruppen in den USA besonders aktiv in diesem Bereich sind.

Obwohl in vielen Publikationen und Vorträgen immer wieder darauf hingewiesen wird, dass Nanotechnologie einen wichtigen Beitrag zu der Verbesserung und Weiterentwicklung von Neuroprothesen leisten kann, fehlt es an einer klaren Gegenüberstellung von wissenschaftlichen und technischen Hürden und dem Potenzial der Nanotechnologie, diese zu überwinden. Wissenschaftler gehen wohl davon aus, dass Nanotechnologie eine zunehmend starke Bedeutung bei der Entwicklung von Neuroprothesen und Drug-Delivery-Mikrochips haben wird, ohne jedoch die

Details solcher Entwicklungen genau zu benennen oder vorhersehen zu können. Konsens herrscht jedoch darüber, dass Forschungsaktivitäten im Bereich der Nanobiotechnologie, die zu einer Verbesserung der Biokompatibilität der Implantate führen, generell von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung der Implantat-Technologie sind.

10 FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN, MARKTPOTENZIAL UND POLITISCHE AKZEPTANZ

10.1 Forschungsaktivitäten und Fördermaßnahmen

In Deutschland wurde im Jahr 2000 vom BMBF der Förderschwerpunkt „Nanobiotechnologie“¹ eingerichtet, um Forschung an der Schnittstelle zwischen Bio- und Nanotechnologie voranzutreiben. Gefördert werden Forschungsverbände von Unternehmen, Hochschulen und Forschungsinstituten mit möglichst anwendungsnaher Ausrichtung. Der Förderschwerpunkt ist für die Laufzeit von 2000 bis 2006 mit ca. 50 Mio. Euro ausgestattet. Die Mehrzahl der bislang 27 geförderten Verbundprojekte ist den Bereichen Medizin, Pharmazie und biomedizinische Forschung zuzuordnen. Forschungsaktivitäten im Bereich Nanobiotechnologie finden sich weniger konzentriert auch in weiteren Fördermaßnahmen wieder, so z. B. im Sonderforschungsbereich 569 der DFG mit dem Titel „Hierarchische Strukturbildung und Funktion organisch-anorganischer Nanosysteme“.

Deutschland

Im Oktober 2003 wurde mit finanzieller Unterstützung des BMBF sowie der Länder Rheinland-Pfalz und Saarland ein Kompetenzzentrum für Nanobiotechnologie (CC-NanoBioTech) an der TU Kaiserslautern eingerichtet. Das Ziel von CC-NanoBioTech ist die nachhaltige Entwicklung einer international wettbewerbsfähigen NanoBioTechnologie-Region. Konkret umfasst dies eine fachkundige Beratung für die Industrie und für Forschungseinrichtungen bei allen Fragen entlang der Wertschöpfungskette in der Nanobiotechnologie. Das Projekt ist auf drei Jahre befristet und mit ca. 950.000 EUR Fördergeldern ausgestattet.

In Großbritannien hat das Interesse an Nanotechnologie insgesamt in den letzten Jahren einen Aufschwung erfahren, und die Nanotechnologie wird derzeit durch eine Reihe verschiedener Research Councils gefördert. Das Fördervolumen betrug im Jahr 2001 35 Mio. Euro. Aufgrund der Fragmentierung der Fördersituation in Großbritannien ist es schwierig, einen Überblick über die Forschungsaktivitäten im Bereich Nanobiotechnologie zu geben. Jedoch lassen sich zwei durch das Nanotechnologieprogramm finanzierte Interdisciplinary Research Collaborations (IRC) identifizieren, deren Schwerpunkt auf dem Bereich Nanotechnologie und Lebenswissenschaften liegt. Am IRC „Bionanotechnology“ steht die Erforschung natürlich vorkommender biomolekularer Nanosysteme im Vordergrund und am IRC „Tissue Engineering“ werden unter anderem Fragestellungen, wie die Biokompatibilität von Materialien und Metho-

Großbritannien

¹ Informationen zum Förderschwerpunkt und den geförderten Projekten werden auf der Internetseite „www.nanobio.de“ gegeben.

den der Gentransfektion erforscht [UKCTE, 2003]. Die Förderung für die beiden IRCs beträgt über einen Zeitraum von sechs Jahren ca. 27 Mio. Euro. Darüber hinaus werden biologische Aspekte der Nanotechnologie seit 2000 vom Biotechnology and Biology Science Research Council gefördert: Die 20 Projekte des thematisch breit gefächerten Programms werden mit insgesamt etwa 6 Mio. Euro unterstützt.

Europäische Union

Auf europäischer Ebene ist mit dem 6. Rahmenprogramm der EU (2002-2006) eine starke Förderung der Nanotechnologie im Bereich Life Sciences vorgesehen. Für den Programmschwerpunkt „Nanotechnologie und Nanowissenschaften, wissenschaftsbasierte multifunktionelle Werkstoffe, neue Produktionsverfahren und -anlagen“ werden in den Jahren 2002 bis 2006 insgesamt 1,3 Mrd. Euro bereitgestellt. Ein Schwerpunkt innerhalb dieses Themenbereiches ist die Nanobiotechnologie. In der ersten Ausschreibungsrunde wurden zwei Integrierte Projekte, zwei Networks of Excellence und 8 STREPs² in dieser Priorität ausgewählt, die dem Life-Science Bereich zuzuordnen sind [Seitz, 2003].

Ende 2000 wurde von der Europäischen Kommission ein Gutachten in Auftrag gegeben, um die europäischen Netzwerke im Bereich Nanotechnologie untersuchen zu lassen. Diesem Gutachten nach gibt es in Europa insgesamt 54 Wissenschaftsnetzwerke mit dem Schwerpunkt Nanotechnologie, von denen 26 dem Bereich Nanobiotechnologie zuzuordnen sind. Themenschwerpunkte dieser Netzwerke sind Drug Delivery, biokompatible Materialien sowie Diagnose und Analytik von Biomolekülen [ATIP, 2001].

USA

In den USA sind seit dem Jahr 2000 die Forschungsaktivitäten im Bereich der Nanotechnologie, darunter auch im Teilbereich der Lebenswissenschaften, deutlich verstärkt und ausgedehnt worden. Im Jahr 2002 wurden im Rahmen der National Nanotechnology Initiative (NNI) 604 Mio. US\$ für die Förderung von Forschungsprojekten ausgegeben. Von dieser Summe entfallen etwa acht Prozent, also ca. 48 Mio. US\$, auf den Bereich Medizin, Diagnose und Therapie [Roco, 2002]. Interessanterweise verfolgt mittlerweile auch die NASA in Kooperation mit dem NCI (National Cancer Institute) ein Nanobiotechnologie-Programm mit dem Ziel neuartige Diagnosemethoden zu entwickeln, die bei längeren Weltraum-Expeditionen eine Überwachung des Gesundheitszustandes der Astronauten ermöglichen sollen. Ende 2001 wurden in einer Ausschreibung von 53 eingereichten Projektvorschlägen sieben ausgewählt und mit insgesamt 11 Mio. US\$ gefördert [Brown, 2001].

Japan

Japan verfolgt ein außerordentlich ehrgeiziges Nanotechnologie-Forschungsprogramm und wird 2003 mit ca. 1 Mrd. US\$ mehr Forschungs-

² Specific Targeted Research Projects (STREPs) sind Forschungsprojekte, die auf die Erzielung konkreter Ergebnisse oder auf die Erfüllung bestimmter gesellschaftlicher Bedürfnisse in Europa ausgerichtet sind.

mittel für die Nanotechnologie bereitstellen als die USA [ATIP, 2003]. Die fünf Schwerpunkte sind Materialien, Fabrikation/Metrologie, Biomedizin, Energie/Umwelt und IT/Elektronik. Von den Gesamtausgaben entfallen 4 Prozent, also etwa 40 Mio. US\$ auf den Bereich Biomedizin, wobei hier berücksichtigt werden muss, dass es bei den verschiedenen Förderbereichen gewöhnlich zu erheblichen thematischen Überschneidungen kommt [Meakin, 2002].

10.2 Literatur und Patente

Die Literaturanalyse zum Thema Nanobiotechnologie in der Medizin und Pharmazie wurde in der SCISEARCH (Science Citation Index) Datenbank durchgeführt, die ein sehr breites disziplinübergreifendes Spektrum an naturwissenschaftlichen Fachzeitschriften auswertet. Dabei wurden für die in dieser Technologieanalyse behandelten Themen separate Recherchen durchgeführt, um möglichst spezifische Suchterme einsetzen zu können und so eine hohe Treffsicherheit zu erreichen. Der Bezug zur Nanotechnologie wurde entweder durch den Suchterm nano? oder durch spezifische Kombinationen von Suchtermen sichergestellt, wie z. B. „Liposomes und Drug Delivery“ oder „Biochips und Surface Plasmon Resonance“ etc.

In Abb. 10.1 ist der zeitliche Verlauf der Publikationsentwicklung für den Bereich Nanobiotechnologie in der Medizin und Pharmazie dargestellt. Bei der statistischen Auswertung der Publikationen wurden alle in dieser Technologieanalyse diskutierten Technologiefelder berücksichtigt: Drug Delivery, In-vivo-Diagnostik, Biochips, Biophysikalische Analytik, Bioaktive Materialien, Tissue Engineering und Intelligente Implantate. Seit Anfang der 90er Jahre hat sich die Anzahl der Publikationen etwa versiebenfacht. Publikationen bis Mitte der 80er Jahre sind hauptsächlich dem Drug-Delivery-Bereich zuzuordnen, in dem mit nanoskaligen Systemen gearbeitet wurde, lange bevor die modernen Methoden der Nanoanalytik und der Nanostrukturierung seit Mitte der 80er Jahre verfügbar waren.

Die intensivste Publikationstätigkeit zeigen die USA mit etwa 33 % der Veröffentlichungen, gefolgt von Deutschland mit einem Anteil von 11.5 %. Auf den Plätzen 3 und 4 folgen Japan und Großbritannien. Der Anteil Deutschlands an den Publikationen variiert dabei zwischen den Anwendungsfeldern; so ist der Anteil deutscher Publikationen im Bereich der „Biophysikalischen Analytik“ mit etwa 13 Prozent am höchsten und im Bereich „Tissue Engineering“ mit 8 Prozent am niedrigsten (s. Abb. 10.2).

Die Gesamtzahl der Nanobiotechnologie-Publikationen in den verschiedenen Anwendungsfeldern variiert stark (s. Abb. 10.3): In den etablierten

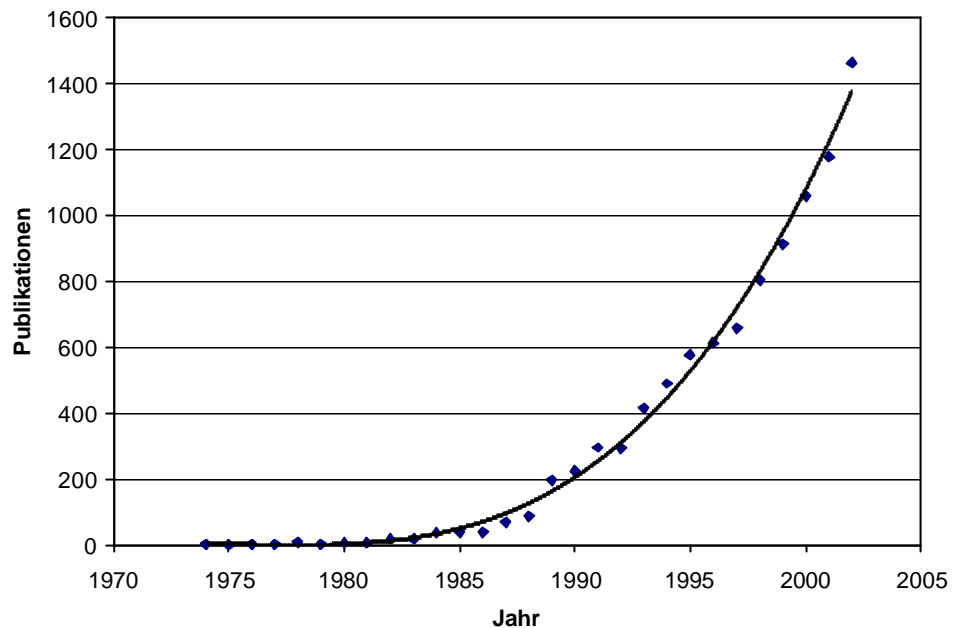


Abb. 10.1. Zeitliche Entwicklung der Nanobiotechnologie-Publikationen für die in dieser Technologieanalyse diskutierten Anwendungsfelder: Drug Delivery, In-vivo-Diagnostik, Biochips, Biophysikalische Analytik, Bioaktive Materialien, Tissue Engineering und Intelligente Implantate.

Bereichen, wie Drug Delivery, Biochips und Biophysikalische Analytik, werden mittlerweile pro Jahr mehrere hundert wissenschaftliche Arbeiten publiziert. In der In-vivo-Diagnostik sind es mit etwa 50 Veröffentlichungen bereits deutlich weniger, und in den Bereichen Tissue Engineering und Intelligente Implantate hat die Diskussion um das Anwendungspotenzial der Nanotechnologie gerade erst begonnen, so dass die Anzahl der Publikationen noch sehr niedrig ist.

Die Patentsituation im Bereich Nanotechnologie für Life Sciences ist in einer Studie des Büros für Technikfolgenabschätzung (TAB) untersucht worden [TAB, 2003]. Demnach wurden im Jahr 1999 weltweit gut 400 Patente im Bereich Nanotechnologie für die Life Sciences angemeldet. Dieser Bereich trägt damit etwa 40 Prozent zum Gesamtaufkommen der Nanotechnologie-Patente bei. Wie bei den Publikationen ist auch hier die USA führend, Deutschland liegt auf dem zweiten Platz, gefolgt von Großbritannien, Kanada und Japan. Der Anteil der Life-Science-Patente an den Nanotechnologie-Patenten beträgt für Deutschland 33 Prozent und liegt damit etwas unter dem Durchschnittswert [TAB, 2003].

Die Literatur- und Patentdaten weisen auf eine ausgezeichnete Position Deutschlands im Bereich Nanobiotechnologie in den Life Sciences hin. Dies wird durch ein White Paper bestätigt, das von 3i, der Economist Intelligent Unit und dem Institute of Nanotechnology erstellt wurde [3i, 2002]: In einer Expertenbefragung wird Deutschland nach den USA und

Großbritannien als eines der drei Länder mit der qualitativ besten Forschung im Bereich Nanotechnologie in den Life Sciences identifiziert.

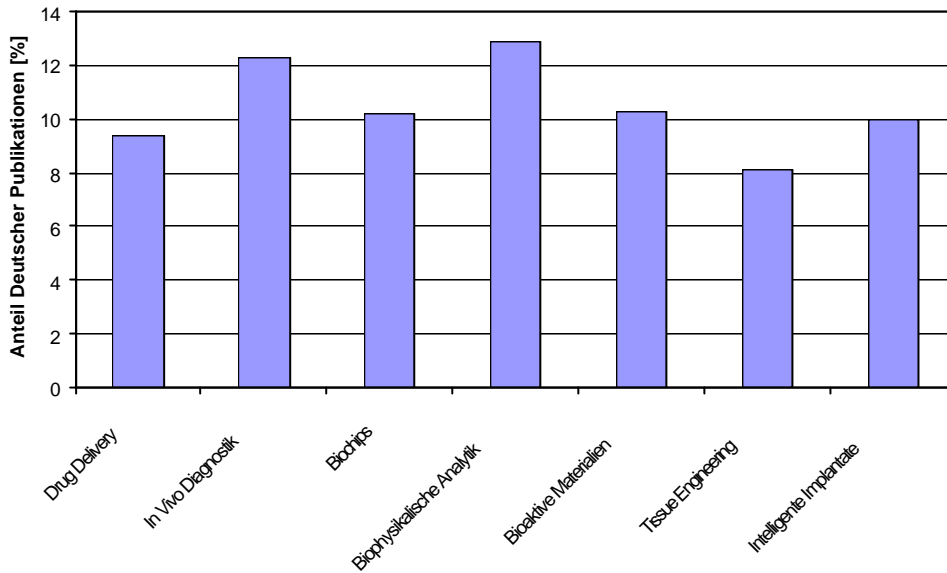


Abb. 10.2. Anteil Deutschlands an den Nanobiotechnologie-Publikationen für die verschiedenen Anwendungsfelder in der Medizin und Pharmazie.

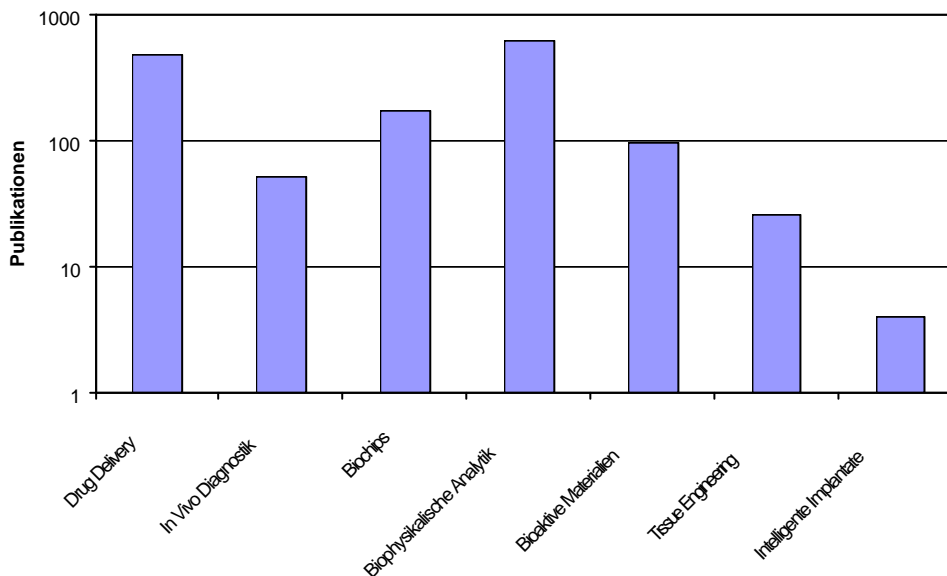


Abb. 10.3. Anzahl der Nanobiotechnologie-Publikationen in den einzelnen Anwendungsfeldern im Jahr 2002. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert: So beträgt die Differenz zwischen den Publikationszahlen in den Bereichen „Biophysikalische Analytik“ (634 Publikationen) und „Intelligente Implantate“ (4 Publikationen) mehr als einen Faktor 100.

10.3 Marktpotenzial

Bislang sind nur wenige Marktstudien im Bereich Nanobiotechnologie durchgeführt worden, eine davon wurde im Herbst 2003 von der Business Communications Company (BCC) veröffentlicht [BCC, 2003]. Demnach wird das weltweite Marktvolumen von Produkten, die der Nanobiotechnologie zuzuordnen sind, im Jahr 2002 mit 269 Mio. US\$ angegeben; für das Jahr 2007 werden die Umsätze auf 1,2 Mrd. US\$ geschätzt. Der Studie zufolge wurde der größte Umsatz, knapp 200 Mio. US\$ im Jahr 2002, mit Instrumenten der biophysikalischen Analytik erzielt, wie z. B. den Rastersondentechniken³. Das Marktvolumen von Nanotechnologie-Produkten für die medizinische Analytik und Diagnostik, zu denen auch Kontrastmittel oder Nanopartikel-Marker für Biochips zählen, wird mit 80 Mio. US\$ angegeben. Nach dieser Studie befanden sich im Jahr 2002 noch keine Tissue-Engineering-Produkte auf dem Markt, zu deren Herstellung Nanobiotechnologie beigetragen hätte.

Bei der Interpretation von Marktstudien muss berücksichtigt werden, dass die zugrunde liegenden Marktanalysen nicht den gesamten Markt erschöpfend aufarbeiten. Darüber hinaus werden verschiedene Definitio-

Tab. 10.1. Marktpotenzial der Nanobiotechnologie im Bereich Medizin und Pharmazie nach einer Studie der Business Communication Company [BCC, 2003].

	Umsatz weltweit / Mio. US\$		Anzahl der berücksichtig- ten Unternehmen, 2002
	2002	2007	
Biophysikalische Analytik (z. B. Rastersondentechniken)	181	745	27
Diagnostik und Analytik (z. B. Nanopartikel für Biochips)	80	391	57
Wirkstoffe und Drug Delivery	8	33	33
Tissue Engineering	0	1,5	7
Summe	269	1171	124

³ Angegeben ist der weltweite Umsatz mit Rastersondenmikroskopen, wobei unberücksichtigt bleibt, dass diese Instrumente auch für nicht-biologische Anwendungen eingesetzt werden.

nen für Nanobiotechnologie zugrunde gelegt, so dass ganze Produktgruppen, wie z. B. Wirkstoff-Nanokristalle, aufgrund des zu geringen Innovationsgrades oder bestimmte liposomale Wirkstoffe, weil sie größer als 100 nm sind, unberücksichtigt bleiben. Dies ist auch der Grund dafür, dass in der BCC Studie für den Drug Delivery Bereich im Jahr 2002 nur ein Umsatz von 8 Mio. US\$ angegeben ist (Tab. 10.1), obwohl, wie diese Technologieanalyse zeigt, sich bereits eine ganze Reihe von Produkten auf dem Markt befinden, die heute ein Umsatzvolumen von mehreren 100 Mio. US\$ pro Jahr erreichen (s. Kapitel 3).

Front Line Strategic Consulting [2003] schätzt in einer ihrer Studien den Gesamtmarkt für Nanobiotechnologie-Produkte deutlich optimistischer ein als BCC. Sie erwarten für das Jahr 2008 in diesem Bereich einen Umsatz von 3 Mrd. US\$, wobei neben dem Life Sciences Segment auch der wesentlich kleinere Markt für technische Anwendungen berücksichtigt ist.

Auch wenn solche Studien das Marktvolumen nicht exakt vorhersagen können, so geben sie doch zumindest ein ungefähres Bild von der wirtschaftlichen Bedeutung einer Technologie. Die bislang vorliegenden Studien zugrunde legend, ist davon auszugehen, dass bis Ende des Jahrzehnts der Umsatz mit Nanobiotechnologie-Produkten bereits mehrere Milliarden US\$ erreicht haben wird.

10.4 Politische Akzeptanz

Romane wie Crichtons „Prey“ oder Drexlers „Engines of Creation“ lassen bei vielen Menschen den Eindruck entstehen, dass selbstreplizierende Nanoroboter in der vorhersehbaren Zukunft Realität werden können und dass von ihnen eine potenzielle Gefährdung der Menschheit ausgeht. Künstliche selbstreplizierende Systeme, die auf der Nanoskala zum Einsatz kommen, gelten unter Wissenschaftlern in absehbarer Zukunft jedoch als nicht realisierbar.

Ernstzunehmende Gefahren werden von Experten vielmehr bei technischen Anwendungen von Nanopartikeln gesehen, wie beispielsweise den Fullerenen oder Kohlenstoffnanoröhren. Diese Verbindungen sind chemisch extrem stabil und bei einer Produktion im Tonnenmaßstab ist eine Anreicherung in der Umwelt nicht auszuschließen. Dem Vorsorgeprinzip folgend, sollte daher untersucht werden, inwieweit die Produktion von Nanopartikeln im industriellen Maßstab zu einer Gesundheits- und Umweltgefährdung führen kann. Zu dieser Fragestellung sind bislang noch keine umfassenden Studien durchgeführt worden.

Mittlerweile nehmen sich auch erste politische Gruppierungen des Themas Nanotechnologie an. So hat ETC (Action Group on Erosion, Technology and Concentration), eine politische Organisation aus Kanada, einen 84seitigen Report mit dem Titel „The big down – atomtech: tech-

nologies converging at the nanoscale“ veröffentlicht, der das Gefahrenpotenzial durch im Tonnenmaßstab produzierte Nanomaterialien als beträchtlich einstuft. ETC fordert daher ein Moratorium für die kommerzielle Produktion von allen neuen Nanomaterialien. Infolge der öffentlichen Diskussion beauftragte die britische Regierung die Wissenschaftsorganisation Royal Society, bis Frühjahr 2004 Chancen und Risiken der Nanopartikel zu untersuchen.

Da Medikamente, die nanoskalige Drug-Delivery-Systeme nutzen, wie alle Medikamente, vor der Markteinführung klinische Studien durchlaufen müssen, unterliegen Nanopartikel für pharmazeutische Produkte einer genauen medizinischen Überprüfung; Risiken für den Patienten werden damit minimiert. Dennoch, Langzeiteffekte sowie der Abbau und der Verbleib von Nanopartikeln im Körper sind bislang kaum untersucht worden, so dass hier, vor allem von Toxikologen, noch Forschungsbedarf gesehen wird [Borm, 2002].

Was die Anwendungen der Nanobiotechnologie im medizinischen Bereich anbetrifft, so besteht sicherlich Bedarf, die zu erwartenden sozioökonomischen Auswirkungen der personalisierten Medizin zu untersuchen. Die personalisierte Medizin setzt sich zum Ziel, mit Hilfe von neuartigen diagnostischen Verfahren, z. B. unter Anwendung von Biochips, die Medikation spezifisch auf den Patienten zuzuschneiden. Der in Aussicht gestellte Vorteil bei dieser Behandlungsmethode liegt in schnelleren Heilungserfolgen und in geringeren Risiken hinsichtlich der Nebenwirkungen. Auf der anderen Seite gibt es eine Reihe von Implikationen und offenen Fragestellungen, die bei der Einführung der personalisierten Medizin berücksichtigt werden sollten. Klärungsbedarf besteht beispielsweise was die arbeits- und versicherungsrechtlichen Implikationen von Datensätzen anbetrifft, die die genetische Disposition eines Patienten beschreiben. Auch stellt sich die Frage, ob solche Tests Auswirkungen auf die Wirkstoffforschung haben werden, z. B. wenn durch entsprechende diagnostische Tests bekannt ist, dass nur 20 Prozent der potenziellen Patienten auf einen bestimmten Wirkstoffkandidaten ansprechen. Bei einer solchen Konstellation könnte das Pharmaunternehmen zu dem Entschluss kommen, das Medikament nicht mehr weiterzuentwickeln, weil der zu erwartende Umsatz zu klein ist. Auch ist zu berücksichtigen, dass aufgrund des hohen Kostendrucks in den Gesundheitssystemen nicht mehr a priori davon ausgegangen werden kann, dass die Kosten für neue auf Nanotechnologie basierende Heilverfahren oder diagnostische Methoden von den Krankenkassen übernommen werden, wenn damit nicht eine deutliche Kostenreduzierung verbunden ist.

Eine breit gefächerte Diskussion solcher Fragestellungen ist wünschenswert, um sicherzustellen, dass Forschungsaktivitäten zu neuen Technologien führen, die auf eine hohe Akzeptanz beim Patienten stoßen und die Leistungsfähigkeit der Gesundheitssysteme verbessern.

11 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Nanobiotechnologie als Schnittstelle der Nanotechnologie zur Biologie ist ein sehr breit gefächertes Wissenschaftsfeld und hat Bedeutung für eine Vielzahl von Anwendungsbereichen in der Medizin und Pharmazie. Besonders intensive Forschungsaktivitäten hat es in den letzten Jahren in den Bereichen Wirkstofftransport (Drug Delivery) und neuartiger Biochip-Systeme gegeben. Weiterhin gibt es viele Ansätze, Nanopartikel in der molekularen Diagnostik einzusetzen und nanostrukturierte Materialien für die Herstellung bioaktiver Oberflächen zu verwenden. Im Tissue Engineering und in der Neuroprothetik gibt es bislang nur vereinzelt Beispiele für den Einsatz von Nanotechnologie, und ihre Bedeutung für diese Bereiche muss sich in Zukunft erst noch herauskristallisieren. Von grundsätzlicher Bedeutung für die biomedizinische Forschung wiederum sind die analytischen Werkzeuge der Nanobiotechnologie, wie Rastersondentechniken und die optische Einzelmoleküldetektion, die es ermöglichen, einzelne Zellbestandteile in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen und damit wichtige Beiträge zum Verständnis der Funktionsweise der Zelle leisten. Insbesondere die Aufklärung der Funktion der Proteine und der Signalwege innerhalb der Zelle kann in neue Strategien für die Bekämpfung von Krankheiten münden.

Gänzlich neue Wege des Wirkstofftransports werden durch nanoskalige Drug-Delivery-Systeme möglich, die eingesetzt werden, um schwerlösliche oder chemisch labile Wirkstoffe zum kranken Gewebe zu transportieren. Sie können außerdem genutzt werden, um 1) biologische Barrieren, wie die Blut-Hirn-Schranke, zu überwinden und 2) Wirkstoffe gezielt im kranken Gewebe anzureichern, um so die Gefahr von Nebenwirkungen zu verringern. Nach mehr als 20 Jahren intensiver Forschung auf diesem Gebiet befinden sich mittlerweile die ersten Medikamente, die solche Drug-Delivery-Systeme nutzen, auf dem Markt. Hier wird ein Anwendungsfeld der Nanobiotechnologie mit großem wirtschaftlichen Potenzial gesehen, da es eine Vielzahl an Wirkstoffkandidaten gibt, die nur mit einem geeigneten nanoskaligen Delivery System verabreicht werden können.

Ein Beispiel, wie Nanotechnologie zu einer ganz neuen Qualität in der medizinischen Diagnose führen kann, ist die Molekulare Bildgebung, bei der Nanopartikel genutzt werden, um Kontrastmittel mit Hilfe von molekularen Markern im kranken Gewebe anzureichern. Da die molekularen Signaturen vieler Krankheiten bereits vor Ausbruch der Symptome auftreten, können mit solchen Methoden Krankheiten bereits im Frühstadium diagnostiziert werden. Dies geht einher mit einem Paradigmenwechsel in der Medizin, demzufolge sich ihr Fokus zunehmend von der Wiederherstellung auf die Erhaltung der Gesundheit verschieben wird.

Ein weiterer Bereich, in dem Nanotechnologie an Bedeutung gewinnt, ist die Biochip-Technologie. Der Trend zur Miniaturisierung ist bei den

DNA-Chips weiterhin ungebrochen, so dass die laterale Auflösung dem nanoskaligen Bereich immer näher kommt. Für Forschungsanwendungen sind Nanoarrays bereits auf dem Markt eingeführt worden. Neben den hochdichten DNA-Chips, die vor allem für Expressionsstudien und SNP-Analysen eingesetzt werden, gibt es auch ein Marktsegment für Biochips mit geringeren Spotdichten, die in der biomedizinischen Forschung zur Untersuchung bestimmter Krankheitsbilder genutzt werden und die zukünftig auch in der medizinischen Diagnostik zum Einsatz kommen sollen. Ebenso werden für die Proteinanalyse eher Proteinchips mit einer relativ niedrigen Spotzahl von Bedeutung sein. Nanotechnologie wird in diesem Bereich nicht für die weitere Miniaturisierung eine Rolle spielen, sondern vielmehr für die Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit und der Zuverlässigkeit der Systeme. So finden beispielsweise Nanopartikel-Fluoreszenzmarker oder nahfeldoptische Detektionssysteme Einsatz, um die Nachweisempfindlichkeit von Biochips zu erhöhen.

Derzeit werden außerdem eine Reihe von neuartigen elektrischen und magnetischen Biochip-Detektionssystemen entwickelt, die auf Nanotechnologie basieren. Gerade in diesem Bereich sind deutsche Forschungsinstitute und Unternehmen sehr aktiv und international gut positioniert. Im Vergleich zu den konventionellen optischen Verfahren sind die elektrischen und magnetischen Detektoren robuster und einfacher in einem miniaturisierten Sensor zu integrieren. Solche kompakten Systeme sollen mittel- bis langfristig einen Massenmarkt in der medizinischen Diagnostik erschließen, insbesondere, um teure und zeitaufwändige Laboruntersuchungen durch Schnelltests vor Ort beim praktizierenden Arzt oder in der Klinik zu ersetzen. Solche Systeme werden auch für den Einsatz in der personalisierten Medizin entwickelt. Ziel hierbei ist es, z. B. mit Hilfe von Gentests die Medikation spezifisch auf den Patienten zuzuschneiden und damit die Therapie zu optimieren.

Ein weiterer Anwendungsbereich der Nanobiotechnologie ist die Oberflächenstrukturierung von Implantaten, um ihr Einwachsverhalten zu verbessern. Eine große Bedeutung kommt dabei einem verbesserten Verständnis der Vorgänge an der Grenzfläche zwischen dem Gewebe und der Implantatoberfläche zu. Hierbei ist es essenziell, zu verstehen, wie Zellen auf nanoskalige Strukturen in ihrer Umgebung reagieren. Diese Fragestellungen sind auch von großer Bedeutung für das Tissue Engineering, weil die Oberflächen der Gewebematrizes eine entscheidende Funktion bei der Steuerung des Zellwachstums haben, die bislang noch kaum verstanden ist.

Eine weitere Technologie, die in Marktstudien und auf Konferenzen vielfach als Nanobiotechnologie klassifiziert wird, sind die sogenannten Intelligenten Implantate, wie Neuroprothesen oder implantierbare Drug-Delivery-Mikrochips. Bei diesen Implantaten sind jedoch höchstens einzelne Komponenten der Nanotechnologie zuzuordnen. Insbesondere finden nanostrukturierte Oberflächen Verwendung, um die Biokompa-

tibilität des Implantats oder das Einwachsverhalten von Elektroden zu verbessern. Was ihre lateralen Abmessungen und auch die funktionellen Bestandteile anbetrifft, so sind Intelligente Implantate nicht der Nano- sondern vielmehr der Mikrotechnologie zuzuordnen. Hierbei wird ein häufig anzutreffendes Prinzip der Nanotechnologie deutlich: Obwohl Nanotechnologie bei vielen Produkten nur einen sehr geringen Anteil an der Wertschöpfung hat, so lassen sich bestimmte Produkteigenschaften nur mit ihrer Hilfe realisieren. Dadurch ergibt sich eine Hebelwirkung, denn der geringe Anteil an Nanotechnologie führt zu einem großen Mehrwert des Produktes und erzeugt damit einen entsprechenden Konkurrenzvorteil.

Das Marktvolumen von Nanobiotechnologie-Produkten im Bereich der Medizin und Pharmazie ist derzeit noch gering und wird von Marktstudien für das Jahr 2003 auf einige hundert Millionen US\$ geschätzt. Die potenziellen Märkte, die durch Nanobiotechnologie im medizinischen Bereich adressiert werden, sind hingegen immens. So werden in den Bereichen Drug Delivery und Kontrastmittel Milliarden US\$ umgesetzt. Auch im Biochip-Bereich werden bis zum Jahr 2010 mehrere Milliarden US\$ Umsatz erwartet. Nanobiotechnologie ist noch eine sehr junge Technologie, so dass es verfrüht wäre, derzeit eine große Marktdurchdringung zu erwarten. Dies wird sich Marktstudien zufolge jedoch innerhalb der nächsten fünf bis zehn Jahre langsam ändern: In diesem Zeitraum soll der Umsatz mit Nanotechnologie-Produkten im Medizinbereich auf etwa zwei Milliarden US\$ ansteigen.

Die Forschungsgelder, die derzeit weltweit in Nanobiotechnologie für medizinische Anwendungen investiert werden, sind vergleichsweise niedrig: So fließen in den USA weniger als 10 Prozent des Forschungsbudgets für Nanotechnologie direkt in den medizinischen Sektor. Deutschland ist eines der wenigen Länder, die Forschungsaktivitäten im Bereich Nanobiotechnologie mit einem eigenen Förderprogramm unterstützen. Im internationalen Vergleich schneidet die deutsche Nanobiotechnologie-Forschung dabei sehr gut ab: Deutschland liegt sowohl bei den Patentanmeldungen als auch bei den Publikationszahlen im internationalen Ranking auf Platz zwei nach den USA.

Die Nanobiotechnologie befindet sich noch am Anfang ihrer Entwicklung und wird erst im Laufe der nächsten Jahrzehnte ihr volles Potenzial entfalten. Sie wird entscheidend zu einem vertieften Verständnis molekularer Prozesse in der Zelle beitragen und damit ein Fundament für zukünftige revolutionäre Entwicklungen in der Diagnose und Therapie von Krankheiten bilden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adelhelm, K., Ehricht, R., Ermantraut, E., ArrayTubes – DNA-Array-Technologie für jedes Forschungslabor, transkript Laborwelt, Analytica-Sonderausgabe, 21-24, 2002.
- Albrecht, C., Blank, K., Lalic-Mülthaler, M., Hirler, S., Mai, T., Gilbert, I., Schiffmann, S., Bayer, T., Clausen-Schaumann, H., Gaub, H., DNA: A Programmable Force Sensor, *Science*, 301, 367-370, 2003.
- AlCove, AlCove Surfaces GmbH Technologie- und Produktinformation, <http://www.alcove.de>, 2003.
- Alexiou, C., Jurgons, R., Schmidt, R., Bergemann, C., Henke, J., Erhard, W., Huenges, E., Parak, F., Magnetic drug targeting – Biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment, *Journal of Drug Targeting*, 11, 139-149, 2003.
- Alleman, E., Polymeric nanoparticles for therapeutic applications, Chemical Nanotechnology Talks III, Proceedings, DECHEMA, Frankfurt, 2002.
- Antigenics, Product information: aroplatin, <http://www.antigenics.com/products/cancer/aroplatin/>, 2003.
- Arlinghaus, H. F., Feldner, J. C., Shadman, M., Schröder, M., Sohn, S., Brandt, O., Jacob, A., Hoheisel, J. D., Genome diagnostics without DNA labeling, www.nanobio.de/dna.html, 2003.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria, *Science*, 235, 1517-1520, 1987.
- ATIP, Nanobiotechnology Activities in Europe, Asian Technology Information Program, 2001.
- ATIP, Nanotechnology in Asia, Asian Technology Information Program, 2003.
- Aurox, P.-A., Lossifidis, D., Reyes, D. R., Manz, A., Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications, *Anal. Chem.*, 74, 2637-2652, 2002.
- Baars, M.W.P.L., Meijer, E.W., Host-guest chemistry of dendritic molecules, *Topics in Current Chemistry*, 210, 131-182, 2000.
- Barratt, G., Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cellular And Molecular Life Sciences*, 60, 21-37, 2003.
- Bassett, P., Tissue Engineering – Technologies, Trends, & Market Opportunities, Report #9042, 3. Auflage, D&MD Publishing, 2002.
- BCC, Market for contrast media to exceed \$6 billion by 2004, Press Release Business Communications Company <http://www.bccresearch.com/editors/RC-211.html>, 1999.

-
- Übersichtsartikel, die eine besonders interessante und dabei verständliche Einführung in die jeweilige Thematik bieten.

- BCC, Opportunities in nanostructured materials: Biomedical, Pharmaceutical & Cosmetic, Business Communications Company, Inc., Norwalk, 2001a.
- BCC, Opportunities in nanostructured materials: Energy, Catalysis and Structural Applications, Business Communications Company, Inc., Norwalk, 2001b.
- BCC, Biomedical Applications of Nanoscale Devices: Commercial Opportunities, Conference Proceedings, Nanotech and Biotech Convergence, BCC, Stamford, 2003.
- Bean, P., Biochip 2001: The second-generation chip for the clinic, American Clinical Laboratory, 11-12, April 2001.
- Berlin, A., Chan, S., Research at Intel – Precision Biology, Conference Proceedings, Nanotech and Biotech Convergence, Stamford, 2003.
- Biacore, Produktinformation, www.biacore.com, Biacore, 2003.
- Biehl, V., Entwicklung von funktionellen Oberflächenstrukturen in Kombination mit funktionellen Oberflächenzusammensetzungen auf Titanbasiswerkstoffen zur anwendungsbezogenen Einstellung der Grenzfläche zum Blut, <http://www.fmz.uni-wuerzburg.de/projekt16.htm>, 2003.
- Bier, F., Kleinjung, F., Feature-size limitations of microarray technology – a critical review, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 151-156, 2001.
- Bio-Gate, Bio-Gate GmbH Technologie- und Produktinformation, <http://www.bio-gate.de>, 2003.
- Bioperspectives, Protein Biochips: On the threshold of success, Strategic Reports, www.bioinsights.net/pages/reports.html, 2002.
- Bioperspectives, Protein Biochips 2003, Strategic Reports, www.bioinsights.net/pages/reports.html, 2003.
- Biosante, Biosante Pharmaceuticals receives patent for innovative nanoparticle, Biosante Pharmaceuticals, Inc., <http://biosantepharma.com/newshtml/020610pr.html>, 2002.
- Biotissue, Bioseed Produktinformation, www.biotissue-tec.com/de/products/, 2003.
- Boguslavsky, J., Microarray technology empowers proteomics, www.genpromag.com/feats/0111prot.asp, 2003.
- Borenstein, J. T., Terai, H., King, K. R., Kaazempur-Mofrad, M. R., Weinberg, E. J., and Vacanti, J. P., Microfabrication Technology for Vascularized Tissue Engineering, www.healthtech.com/2001/mfb/abstracts/borenstein.htm, 2001.
- Borm, Toxicology and hazards of nanoparticles in medicine, Vortrag, Chemical Nanotechnology Talks III, Mannheim, 2002.
- Brower-Toland, B. D., Smith, C. L., Yeh, R. C., Lis, J. T., Craig, L., Peterson, C. L., Wang, M. D., Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA, *PNAS*, 99, 1960-1965, 2002.
- Brown, D., Joint NASA/NCI research to develop sensors for health monitoring inside the human body, News Release NASA, http://spaceresearch.nasa.gov/general_info/OBPR-01-230.html, 2001.

-
- Brown, R., Gallop, J., Milton, M., Review of Techniques for Single Molecule Detection in Biological Applications, Report, National Physical Laboratory, Teddington, 2001.
- Brownlee, C., The mechanics of tissue engineering, *Modern Drug Discovery*, 4, 34-38, 2001.
- Bulte, J. W. M., Douglas, T., Witwer, B., Zhang, S.-C., Strale, E., et al., Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells, *Nature Biotechnology*, 19, 1141-1147, 2001.
- Catledge, S. A., Fries, M. D., Vohra, Y. K., Lacefield, W. R., Lemons, J. E., Woodard, S., Venugopalan, R., Nanostructured ceramics for biomedical implants, *J. Nanosci. Nanotech.*, 2, 1-20, 2002.
- Chem&Eng. News, Drug Delivery, Cover Story, *Chemical & Engineering News*, 80, 39-47, August 2002.
- Chovan, T, Guttman, A., Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing, *Trends in Biotechnology*, 20, 116-121, 2002.
- Cooper, M. A., Acoustic sensing of molecular interactions, *Conference Proceedings, Nanotech and Biotech Convergence*, Stamford, 2003.
- Craighead, H., Leong, K., Applications: Biotechnology, Medicine, and Healthcare, in "Nanotechnology Research Directions", National Science and Technology Council (USA): M.C. Roco, S. Williams, P. Alivisatos, Eds., Kluwer Academic Publisher, <http://www.wtec.org/loyola/nano/IWGN.Research.Directions/chapter08.pdf>, 1999.
- CSixty, Learn more about CSixty research and development, <http://www.csixty.com/learn.htm>, 2003.
- Curtis, A., Wilkinson, C., Nanotechniques and approaches in biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 19, 97-101, 2001.
- Cytimmune, Research and Development information, <http://www.cytimmune.com>, 2003.
- Dayton, P. A., Ferrara, K.W., Targeted Imaging Using Ultrasound, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 16, 362-377, 2002.
- Derwent, Lab-on-a-chip: smaller, cleaner, cheaper, faster, Derwent Information, <http://www.derwent.com/ipmatters/features/loac.html>, 2002.
- Desai, A. T., Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs, *Medical Engineering & Physics*, 22, 595-606, 2000.
- Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H., Libchaber A., In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science*, 298, 1759-1762, 2002.
- Duncan, R., Polymeric Therapeutics into the 21th Century, in *Controlled Drug Delivery Designing Technologies for the Future*, Hrsg. K. Park, R. J. Mersy, ACS Symposium Series 752, 2000.
- Duncan, R., Polymer Therapeutics, *World Market Series Business Briefing, Pharma Tech*, 178-184, 2001.
- Duncan, R., Polymer-Drug Conjugates in *Handbook of Anticancer Drug Development*, Hrsg. Budman, Calvert und Rowinsky, Lippincott Williams & Wikins, im Druck, 2003.

- Duncan, R., The dawning era of polymer therapeutics, *Nature Reviews*, 2, 347-360, 2003.
- Duveneck, G.L., Abel, A.P., Bopp, M.A., Kresbach, G.M., Ehrat, M., Planar waveguides for ultra-high sensitivity of the analysis of nucleic acids, *Anal. Chim. Acta*, 469, 49-61, 2002.
- Dyba, M., Hell, S. W., Focal spots of size $\lambda/2.3$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution, *Phys. Rev. Lett.* 88, 163901, 2002.
- DZ Bank, Technologie-Trends Biochips, DZ Bank AG, Frankfurt am Main, 2001.
- Economist, The quest for the protein chip, *The Economist Technology Quarterly*, 15. März, 2003.
- Ellegala, D. B., Poi, H. L., Carpenter, J. E., Klibanov, A. L., Kaul, S., Shaffrey, M. E., Sklenar, J., Lindner, J.R., Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v) beta(3), *Circulation*, 108, 336-341, 2003.
- Fertig, N., Meyer, Ch., Blick, R. H., Trautmann, Ch., Behrends, J. C., Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology, *Physical Review E*, 64, 040901, 2001.
- FeRx, Produktinformation, <http://www.ferx.com>, 2003.
- Freedonia, Biochips To 2006: Genomic & Proteomic Applications, The Freedonia Group, Inc., Cleveland, 2002.
- Fritz, J., Baller, M. K., Lang, H. P., Rothuizen, H., Vettinger, P., Meyer E., Güntherodt, H.-J., Gerber, Ch., Gimzewski, J. K., Translating biomolecular recognition into nanomechanics, *Science*, 288, 316-318, 2000.
- Fritz, J., Cooper, B. E., Gaudet, S., Sorger, P. K., Manalis, S. R., Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge, *PNAS*, 99, 14142-14146, 2002.
- Frontline Strategic Consulting, Nanobiotechnology, Report R359-0041, Westfield, MA, 2003.
- Genicon, Two-color differential gene expression profiling on microarrays using ultra-sensitive resonance light scattering (RLS) particles, white paper, Genicon Sciences Corporation, www.geniconsciences.com/, 2003.
- Gerhold, D., Rushmore, T., Caskey, C. T., DNA Chips: promising toys have become powerful tools, *Trends in Biochemical Sciences*, 168-173, 1999.
- Gordon, N., Sagman, U., Nanomedicine Taxonomy, Canadian Institutes of Health Research and Canadian NanoBusiness Alliance, Quebec, 2003.
- Gorman, J., Buckymedicine – Coming soon to a pharmacy near you, *Science News*, 162, 26, 2002.
- Griffith, L. G., Naughton G., Tissue Engineering – Current Challenges and Expanding Opportunities, *Science*, 295, 1009-1014, 2002.

-
- Haag, R., Dendritische Polymere als multifunktionale Träger für die automatisierte organische Synthese und für den kontrollierten Wirkstofftransport, http://www.dfg.de/aktuelles_presse/preise/leibnitz_preis/2002/haag/forschungsschwerpunkte.html, 2002.
- Hall, S. W., Commercializing neuroprostheses: The business of putting the brain back in business, Doktorarbeit, Princeton University, 2003.
- Hartgerink, J. D., Beniash, E., Stupp, S. I., Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers, *Science*, 294, 1684-1688, 2001.
- Hartmann, U., High resolution magnetic imaging based on scanning probe techniques, *J. Magnetism Magn. Mater.*, 157/158, 545-549, 1996.
- Heidenau, F., Stenzel, F., Faus, V., Ziegler G., Sol-Gel-abgeleitete Titanoxid-Beschichtungen von Titan/-legierungen zur Verbesserung der Biokompatibilität, in *Verbundwerkstoffe und Werkstoffverbunde*, Hrsg. B. Wielage, G. Leonhardt, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- Heidenau, F., Gollwitzer, H., Stenzel, F., Mittelmeier, W., Ziegler, G., Antiinfektiöse Ausrüstung einer biokompatiblen Titanoxidbeschichtung für metallische Implantatmaterialien, *Biomaterialien* 3, 22, 2003.
- Heinrich, G., Grögler, S. M., Rosiwal, S. M., Singer, R. F., CVD diamond coated titanium alloys for biomedical and aerospace applications, *Surface and Coatings Technology*, 94/95, 514-520, 1997.
- Henderson, E., Biological Nanoarrays, Vortrag, Nanotech and Biotech Convergence, BCC, Stamford, 2003.
- Heuberger, A., Hintsche, R., Detektion biologischer Kampfstoffe, Analysen und Expertisen zur Wehrtechnischen Vorausschau, Fraunhofer Institut für Naturwissenschaftlich-Technische Trendanalysen, Euskirchen, 2001.
- Hirano, K., Baba, Y., Matsuzawa, Y., Mizuno, A., Manipulation of single coiled DNA molecules by laser clustering of microparticles, *Applied Physics Letters*, 80, 515-517, 2002.
- Hoffmann, D., NMR-Untersuchungen an Nanokapsel-Dispersionen, Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität, Duisburg, 2000.
- Hoheisel, Inorganic Nanoparticles in Medical Diagnostics, Vortrag auf der Konferenz Chemical Nanotechnology Talks III, Dechema, Mannheim, 2002.
- Hölzel, R., Gajovic-Eichelmann, N., Bier, F., Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigitated electrodes – towards single molecule DNA nanostructures, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 555-564, 2003.
- Hörber, J. K. H., Miles, M. J., Scanning Probe Evolution in Biology or feeling the molecular structures of soft matter, *Science*, im Druck, 2003.
- Horn, M., Silber schützt vor Bakterien, *Fraunhofer Magazin*, 1, 62-63, 2003.
- Houseman, B. T., Mrksich, M., Towards quantitative assays with peptide chips: a surface engineering approach, *Trends in Biotechnology*, 20, 279-281, 2002.

- Howorka, S., Cheley, S., Bayley, H., Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores, *Nature Biotechnology*, 19, 636-639, 2001.
- Hughes, M. S., Lanza, G. M., Marsh, J. N., Wickline, S. A., Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy: a brief review, *Medicamundi*, 47, 66-73, 2003.
- 3i, Economist Intelligence Unit, Institute of Nanotechnology, Nanotechnology – Size Matters, building a successful nanotechnology company, 3i Group, London, 2002.
- Infoport, Informationsportal für Biotechnologie, www.i-s-b.org/fokus/tissue/perspek.htm, 2002.
- Investor, Industry Overview, Orthopaedic market segment statistics, Zimmer Inc., <http://investor.zimmer.com/industry.cfm>, 2003.
- Ishii, Y., Yanagida, T., Single molecule detection in life science, *Single Molecules*, 1, 5-16, 2000.
- ItN, Produktinformation, ItN Nanovation GmbH, <http://www.itn-nanovation.com>, 2003.
- Jordan, A., Sholz, R., Wust, P., Föhling, H., Felix, R., Magnetic fluid hyperthermia: Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.*, 210, 413-419, 1999.
- Jordan, A., Nanotechnologie – ein neues Konzept für Diagnostik und Therapie maligner Tumoren, *Der Onkologe*, 7, 1073-1081, 2001.
- Kabadschow, I., Leson, A., Radehaus, C., BioChip-Technology with respect to Nano-, Micro- and Semiconductor Technology, BMBF Report Nr. 03N60118, Technische Universität Chemnitz, 2000.
- Kay, S., Thapa, A., Haberstroh, K. M., Webster, T. J., Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion, *Tissue Engineering*, 753-761, 8, 2002.
- Kessler, V., BioSeed-S, Haut aus der Tube – Dank Tissue Engineering eröffnet sich eine innovative Therapie zur Heilung chronischer Wunden, *ellipse*, 17, 53-54, 2001.
- Kidoaki, S., Matsuda, T., Mechanistic aspects of protein/material interactions probed by atomic force microscopy, *Coll. Surfaces B: Biointerfaces*, 23(2-3), 153-163, 2002.
- Kim, C. K., Lim, S. J., Recent Progress in drug delivery systems for anti-cancer agents, *Arch. in Pharm. Res.*, 25, 229-239, 2002.
- Kim, J. M., Ohtani, T., Park, J. Y., Chang, S. M., Muramatsu, H., DC electric-field-induced DNA stretching for AFM and SNOM studies, *Ultramicroscopy*, 91, 139-149, 2002.
- Kirstein, S., Scanning near-field optical microscopy, *Curr. Opin. Colloid. Interface Sc.*, 4, 256-264, 1999.
- Knight, J., Honey I shrunk the lab, *Nature*, 418, 474- 475, 2002.
- Kong, G., Braun, R.D., Dewhirst M.W., Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size, *Cancer Res.*, 60, 4440-4445, 2000.

- König, K., *Optische Nanochirurgie – Von der DNA bis zur Zelle*, Tagungsband, 1. BMBF-Symposium Nanobiotechnologie, VDI-Technologiezentrum, Düsseldorf, 2003.
- Krasteva, N., Seifert, B., Albrecht, W., Weigel, T., Altanov, G., Groth, Th., Influence of polymer membrane porosity on C3A hepatoblastoma cell adhesive interaction and function, *Biomaterials*, im Druck, 2003.
- Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, M. Dekker, New York, 1994.
- Kreuter, J., *Nanoparticles as Drug Delivery Systems*, unveröffentlichter Enzyklopädiebeitrag, 2002.
- Lamerichs, R., Schäffter, T., Hämisch, Y., Powers, J., *Molecular Imaging: the road to better healthcare*, *Medicamundi*, 47, 2-9, 2003.
- Lampel, S., Lichter, P., *Nukleinsäurechips*, *Medizinische Genetik*, 12, 287-289, 2000.
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Yamamoto, H., Schäfer, U., Takeuchi, H., Maincent, P., Kawashima, Y., Lehr, C.-M., *Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299, 775-781, 2001.
- Lanza, G., Scott, K. W., Cachetis, W., Abendschein, D., Christy, D., Sharkey, A., Miller, J., Gaffney, P., Wickline, S., *A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application*, *Circulation*, 94, 3334-3340, 1996.
- Lanza, G. M., Lamerichs, R., Caruthers S., Wickline S. A., *Molecular Imaging in MR with targeted paramagnetic nanoparticles*, *Medicamundi*, 47, 34-39, 2003.
- Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W., Webb, W. W., *Water-soluble quantum dots for multi-photon fluorescence imaging in vivo*, 300, 1434-1436, 2003.
- Lee, H. J., Yeo, S. Y., Jeong, S. H., *Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics*, *Journal of Material Science*, 38, 2199-2204, 2003.
- Lee, K.-B., Park, S.-J., Mirkin, C. A., Smith, J. C., Mrksich, M., *Protein Nanoarrays generated by Dip-Pen Nanolithography*, *Science*, 295, 1702-1705, 2002.
- Lee, Y.-S., Mrksich, M., *Protein chips: from concept to practice*, *Trends in Biotechnology*, 20, S14-S18, 2002.
- Lehr, C.-M., *Pharmaceutical Nanobiotechnology: Drug Targeting, Gene Delivery and Tissue Engineering*, 3rd NanoMed Proceedings, 2003.
- Lübbe, A. S., Bergemann, C., et al., *Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4-Epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors*, *Cancer Research*, 56, 4686-4693, 1996.
- Malik, N., Evagorou, E. G., Duncan, R., *Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy*, *Anti-Cancer Drugs*, 10, 767-776, 1999.
- Martin, C. R., Mitchell, D. T., *Nanomaterials in analytical chemistry*, *Analytical Chemistry News & Features*, 322-327A, Mai 1998.

- Massing, U., Fuxius, S., Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness, *Drug Resistance Updates*, 3, 171-177, 2000.
- Massing, U., Vesicular phospholipid gels (vpgs) – a novel drug delivery system, *Conference Proceedings, 3rd NanoMed*, Berlin, 2003.
- Matthias, S., Müller, F., Asymmetric pores in a silicon membrane acting as massively parallel brownian ratchets, *Nature*, 242, 53-57, 2003.
- Maurer, N., Fenske, D. B., Cullis, P. R., Developments in liposomal drug delivery systems, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 1, 923-947, 2001.
- Meakin, I., Nanotechnology in Japan - A guide to public spending in FY2002, <http://www.visiononline.tv/content/images/Nanotech%20Budgets%20Japan.pdf>, 2002.
- Medica 2001, Glänzende Aussichten für Tissue Engineering, ALVITO Biotechnologie GmbH, *Medica Messemagazin*, 7, 2001.
- Minuth, W., Strehl, R., Schumacher, K., Von der Zellkultur zum Tissue Engineering, Pabst Science Publishers, Lengerich, 2002.
- Minuth, W., Tissue Engineering – Herstellung von künstlichen Geweben für die Biomedizin, www.biologie.uni-regensburg.de/Anatomie/Minuth/forsch.htm, 2003.
- Mitchell, P., A perspective on protein microarrays, *Nature Biotechnology*, 20, 225-229, 2002.
- Mo, W., Karger, B. L., Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6, 666-675, 2002.
- Möller, R., Csaki, A., Kohler, J. M., Fritzsche, W., Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement, *Langmuir*, 17, 5426-5430, 2001.
- Müller, D. J., Anderson, K., Biomolecular imaging using atomic force microscopy, *Trends in Biotechnology*, 20, 8, S45-S49, 2002.
- Müller, R. H., Lück, M., Kreuter, J., Arzneistoffträgerpartikel für die gewebespezifische Arzneistoffapplikation, *Deutsche Patentanmeldung Nr. 197 45 950.1*, 1997.
- Müller, R. H., Mäder, K., Gohla S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 161-177, 2000.
 - Müller, R. H., Jacobs, C., Kayser O., Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy – Rationale for development and what we can expect for the future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 3-19, 2001.
- Nanobio, Nano-scale Drug Delivery System, NanoBio Corporation, <http://www.nanobio.com/drug.htm>, 2003.
- Nanotype, Nanotype GmbH today announces the beginning product development of a kinase and phosphorylation protein biochip, based on its C-FIT platform, Nanotype, GmbH, <http://www.nanotype.de>, 2003.

-
- Nasdaq, Surmodics makes surface change count, Nasdaq, 26, Mai/Juni 2003.
- Nehrer, S., Prinzipien des Tissue Engineering, www.biotek.at/tissue.html, 2003.
- Nucci, M. R., Shorr, R., Auchowski, A., The therapeutic Values of Poly-ethyleneglycol-modified Proteins, *Advanced Drug Delivery Review*, 6, 133-151, 1991.
- Organogenesis, Apligraf Produktinformation, www.organogenesis.com/apligraf.htm und www.apligraf.com/, 2003.
- Orthovita, Product Information, Orthovita Inc., <http://www.orthovita.com>, 2003.
- Otsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka, K., Self-assembly of poly(ethylene glycol)-based block copolymers for biomedical applications, *Current Opinion in Colloid & Interfaces Science*, 6, 3-10, 2001.
- Oyane, A., Kawashita, M., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with a silane coupling agent and titania solution, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 110, 248-254, 2002.
- Parbhu, A., Lin, H., Thimm, J., Lal, R., Imaging real-time aggregation of amyloid beta protein (1-42) by atomic force microscopy, *Peptides*, 23, 1265-1270, 2002.
- Patri, A. K., Majoros, I. J., Baker, R. J. Jr., Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 466-471, 2002.
- Pawlak, M., Schneider, M., Schick, E., Kresbach, G. M., Ehrat, M., DNA- und Protein-Microarrays – höchste Empfindlichkeit durch Planare Wellenleitertechnologie, *transkript Laborwelt III*, 44-48, 2002.
- Perner, P., Rapp, A., Dressler, C., Wollweber, L., Beuthan, J., Greulich, K. O., Hausmann, M., Variations in cell surfaces of estrogen treated breast cancer cells detected by a combined instrument for far-field and near-field microscopy, 24, 89-100, 2002.
- Petermann, M. C., Bloom, D. M., Lee, C., Bent, S. F., Marmor, M. F., Blumenkranz, M. S., Fishman, H. A., Localized neurotransmitter release for use in a prototype retinal interface, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 3144-3149, 2003.
- Petricoin, E. F., Hackett, J. L., Lesko, L. J., Puri, R. K., Gutman, S. I., Chumakov, K., Woodcock, J., Feigal, D. W. Jr, Zoon, K. C., Sistare, F. D., Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective, *Nature Genetics Supplement*, 32, 474-479, 2002.
- Philips, Press Release, Philips, Dow and Kereos named as collaborators in National Cancer Institute contract awarded to Washington University for development of molecular imaging agents to diagnose and treat cancer, www.medical.philips.com/main/news/content/file_341.html, 2003.
- Pralle, A., Florin, E.-L., Stelzer, E. H. K., Hörber, J. K. H., Photonic Force Microscopy: A new tool providing new methods to study

- membranes at the molecular level, *Single Molecules*, 2, 129-133, 2000.
- Price, R. L., Waid, M. C., Haberstroh, K. M., Webster, T. J., Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers, *Biomaterials*, 24, 1877-1887, 2003.
- Raschke, G., Kowarik, S., Franzl, T., Sönnichsen, C., Klar, T. A., Feldmann, J., Nichtl, A., Kürziniger, K., Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering, *Nano Letters*, 3, 935-938, 2003.
- Ravi Kumar, M. N. V., Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices, 3, 134-258, 2000.
- Ravi Kumar, M. N. V., Sameti, M., Kneuer, C., Lamprecht, A., Lehr C.-M., Polymeric Nanoparticles for Drug and Gene Delivery, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, H. S. Nalwa Editor, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, X, 1-19, 2003.
- Ren, L., Chow, G.M., NIR-sensitive Au-Au₂S nanoparticles for drug delivery, Abstract, *Molecular Engineering of Biological and Chemical Systems*, Symposium, 2003.
- Rieti, S., Manni, V., Lisi, A., Grimaldi, S., Generosi, R., Luce, M., Perfetti, P., Cricenti, A., Pozzi, D., Giuliani, L., Morphological and biochemical analysis by atomic force microscopy and scanning near-field optical microscopy techniques of human keratinocytes (HaCaT) exposed to extremely low frequency 50 Hz magnetic field, *Applied Physics Letters*, 81, 2890-2892, 2002.
- Ringsdorf, H., Structure and properties of pharmacologically active polymers, *Journal of Polymer Science: Polymer Symposium*, 51, 35-53, 1975.
- Roco, M. C., The Future of National Nanotechnology Initiative, Vortrag, National Science Foundation, http://www.nano.gov/roco_aiche_48_slides.pdf, 2002.
- Rollo, F. D., Molecular imaging and nuclear medicine: expectations and requirements, *Medicamundi*, 47, 10-16, 2003.
- Rüffer, M., Heinrich, G., Rosiwal, S., CVD-Diamant in der Humanmedizin, *Industrie Diamanten Rundschau*, 2, http://www.idr-online.info/german/pages/archive/2003_2/09_art/Art09_02_03.htm, 2003.
- Sako, Y., Hibino, K., Miyauchi, T., Miyamoto, Y., Ueda, M., Yanagida, T., Single-Molecule Imaging of Signaling Molecules in Living Cells, *Single Molecules*, 1, 159-163, 2000.
- Saiyed, Z. M., Telang, S. D., Ramchand, C. N., Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine, *BioMagnetic Research and Technology*, 1, 2, 2003.
- Santini, J. T., Cima, M. J., Langer, R., A controlled-release microchip, *Nature*, 397, 335-338, 1999.
- Sauer, S., Gut, I. G., Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromat. B.*, 782, 73-87, 2002.

-
- Schattenfroh, S., Nanotechnologie in der Krebsbekämpfung: Tumorerstörung durch Erhitzen magnetischer, nanometergroßer Teilchen, in *Medizin für die Medien*, http://www.charite.de/mediamed/00/01_00.htm, 2000.
- Schmidt, H., Antimicrobial Coatings, Vortrag, NanoMed 2003, Berlin, 2003.
- Schotter, J., Kamp, P. B., Becker, A., Pühler, A., Brinkmann, D., Schepper, W., Brückl, H., Reiss G., A biochip based on magnetoresistive sensors, *IEEE Transactions on Magnetics*, 38, 3365-3367, 2002.
- Schotter, J., Kamp, P. B., Becker, A., Pühler, A., Reiss, G., Brückl, H., Comparison of a prototype magnetoresistive biosensor to standard fluorescent DNA-detection, eingereicht bei *Biosensors & Bioelectronics*, 2003.
- Schwenk, J. M., Stoll, D., Templin, M. F., Joos, T. O., Cell microarrays: An emerging technology for the characterisation of antibodies, *BioTechniques*, 33, 54-61, 2002.
- Schwille, P., Kettling, U., Analyzing single protein molecules using optical methods, *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 382-386, 2001.
- Scriber, D., Humayun, M., Justus, B., Merritt, C., Klein, R., et al., Intraocular retinal prosthesis test device, *Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Istanbul, 2001.
- Seitz, E., Der Forschungsschwerpunkt Nanotechnologie im 6. EU Forschungsrahmenprogramm, Vortrag, BMBF Nanobiotechnologie Symposium, Hannover, 2003.
- Shawgo, R. S., Grayson, A. C. R., Li, Y., Cima, M. J., BioMEMS for drug delivery, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 6, 329-334, 2002.
- Shi, H., Tsai, W.-B., Garrison, M. D., Ferrari S., Ratner, B. D., Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition, *Nature*, 398, 593-597, 1999.
- Shoemaker, D. D., Linsley, P. S., Recent developments in DNA microarrays, *Current Opinion in Microbiology*, 5, 334-337, 2002.
- Sparks, H., How miniature radiation detectors will keep astronauts safe in deep space, www.space.com/business/technology/technology/radiation_nanobots_020717.html, 2002.
- Spengler, B., Huber, M., Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (SMALDI) Mass Spectrometry: Instrumentation for Sub-Micrometer Resolved LDI and MALDI Surface Analysis, *J. Am. Mass Spectrom.*, 13, 735-748, 2002.
- Spreyer, P., Anwendungsmöglichkeiten von DNA-Arrays in der pharmazeutischen Industrie, *Medizinische Genetik*, 11, 18-19, 1999.
- Stahlberg, H., et al., Bacterial ATP synthase has an undecameric rotor, *EMBO Reports*, 21, 1-5, 2001.

- Stark, B., Tissue Engineering – Neue Ansätze zur Behandlung chronischer Wunden und in der rekonstruktiven Chirurgie, <http://www.aerztekammer-bw.de/standardFrameset/idex.html?/Homepage/fortbild/kongress/b28/>, 2001.
- Stekel, D., Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, Cambridge, 2003.
- Stelzle, M., et al., Viren und Bakterien berührungslos handhaben und nachweisen, ein Lab-on-a-Chip-System mit integrierten 3D-Nanoelektrodenarrays, Info Phys Tech, 42 VDI-Technologiezentrum, 2002.
- Stelzle, M., Micro- and nanotechnology for biomedical applications, Vortrag, NanoMed Konferenz, Berlin, 2003.
- Stieglitz, T., Considerations on surface and structural biocompatibility as prerequisite for long-term stability of neural prostheses, J. Nanoscience and Nanotechnology, im Druck, 2003.
- Stiriba, S.-E., Frey, H., Haag, R., Dendritische Polymere für medizinische Anwendungen: auf dem Weg zum Einsatz in Diagnostik und Therapie, Angew. Chem., 114, 1385-1389, 2002.
- Street, M., DNA Microarrays: Manufacture and Applications, Australasian Biotechnology, 12, 38-39, 2002.
- TAB, TA-Projekt Nanotechnologie, Arbeitsbericht Nr. 92, Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag, Berlin, 2003.
- Tan, W., Bioconjugated nanoparticles for bioanalytical and biotechnological applications, Conference Proceedings, Nanotech and Biotech Convergence, BCC, Stamford, 2003.
- Tao, S. L., Desai, T. A., Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores, Advanced Drug Delivery Reviews, 55, 315-328, 2003.
- Topoleski, L. D. T., Ducheyne, P., Cuckler, J. M., A fractographic analysis of in vivo poly(methyl methacrylate) bone-cement failure mechanisms, J. Biomed. Mater. Res., 24, 135-154, 1990.
- Toprani, N., Catledge, S. A., Vohra, Y. K., Thompson, R., Interfacial adhesion and toughness of nanostructured diamond coatings, J. Mater. Res., 15, 1052-1055, 2000.
- Trösch, J. M., Ganahl, B., Patentsituation im Bereich der DNA-Chip-technologie in Europa, Medizinische Genetik, 12, 3, 337-340, 2000.
- Uchegbu, I. F., Parenteral drug delivery: 1, Pharmaceutical Journal, 263, 309-318, 1999.
- UKCTE, Homepage, UK Centre for Tissue Engineering, <http://www.ukcte.org/>, 2003.
- Unger, E., Matsunaga, T. O., Schumann, P.A., Zutschi, R., Microbubbles in molecular imaging and therapy, Medicamundi, 47, 58-65, 2003.
- Vacanti, J. P., Tissue Engineering, Science 260, 920-926, 1993.
- Visiongain, Drug Delivery 2003 – New Technologies in the global Market, Visiongain Ltd, 2003.

- Wang, S., Lacefield, W. R., Lemons, J. E., Interfacial shear strength and histology of plasma sprayed and sintered hydroxyapatite implants in vivo, *Biomaterials*, 17, 1965-1970, 1996.
- Webster, T. J., Siegel, R. W., Bizios, R., Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 20, 1221-1227, 1999.
- Weinmann, H.-J., Verbesserte Diagnostik in der Magnetischen Resonanz-Tomographie durch Lanthanide, *Laborwelt*, 4, 17-19, 2003.
- Weiss, S., Fluorescence spectroscopy of single biomolecules, *Science*, 283, 1676-1683, 1999.
- West, J. L., Halas, N. J., Applications of nanotechnology to biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 215-217, 2000.
- Wevers, M., Wechsler, D., Technologiefrüherkennung – Nanobiotechnologie I: Grundlagen und Anwendungen molekularer, funktionaler Biosysteme, *Zukünftige Technologien Band 38*, Hrsg. VDI-Technologiezentrum, Düsseldorf, 2002.
- Whitehead, R. Y., Lacefield, W. R., Lucas, L. C., Structure and integrity of a plasma sprayed hydroxylapatite coating on titanium, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 1501-1507, 1993.
- Wilkinson, C. D. W., Riehle, M., Wood, M., Gallagher, J., Curtis, A. S. G., The use of materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering, *Materials Science and Engineering C*, 19, 263-269, 2002.
- Wilson, L. J., Medical applications of fullerenes and metallofullerenes, *The electrochemical Society Interface*, 24-28, Winter 1999.
- Winegarden, N., Woodgett, J., Microarrays – Applications and Trends, *Business Briefing: Future Drug Discovery*, 121-126, 2001.
- Winkler, J., Nano-scaled titanium dioxide – Properties and Use in Coatings with special functionality, *Macromol. Symp.*, 187, 317-324, 2002.
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F., Bruchez, M. P., Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnology*, 21, 41-46, 2003.
- Yeo, S. Y., Lee, H. J., Jeong, S. H., Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect, *Journal of Materials Science*, 38, 2143-2147, 2003.
- Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., Selvin, P. R., Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization, *Science*, 300, 2061-2065, 2003.
- Ying, J. Y., Processing and Properties of Nanostructured Biomaterials for Orthopedic Applications, <http://web.mit.edu/nano/www/research.html>, 2003.
- Zhu, H., Snyder, M., Protein chip technology, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 55-63, 2003.

Ziauddin, J., Sabatini, M., Microarrays of cells expressing defined cDNAs, *Nature*, 411, 107-110, 2001.

Zrenner, E., Will retinal implants restore vision?, *Science*, 295, 1022-1025, 2002.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	Atomic Force Microscopy
ATP	Adenosine Triphosphate
BCC	Business Communications Company
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CCD	Charge Coupled Device
cDNA	Copy Deoxyribonucleic Acid
C-FIT	Congruent Force Intermolecular Test
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CVD	Chemical Vapour Deposition
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPN	Dip-Pen Nanolithography
EGF	Epidermal Growth Factor
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ETC	Action Group on Erosion, Technology and Concentration
FET	Field Effect Transistor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GMI	Giant Magneto-Impedance
GMR	Giant Magnetoresistance
HA	Hydroxylapatit
HPMA	2-Hydroxypropyl Methacrylate
LADER	Light Addressable Direct Electrical Readout
LOC	Lab-on-a-Chip
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MEMS	Micro Electro Mechanical System
MFH	Magnetflüssigkeitshyperthermie
MFM	Magnetic Force Microscopy
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Mass Spectrometer

NCI	National Cancer Institute
NIR	Near Infra-Red
OGT	Oxford Gene Technologies
PAMAM	Polyamidoamin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDD	Photodynamische Diagnose
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylen glycol
PFM	Photonic Force Microscopy
PGA	Poly(Glycolic Acid)
PLGA	Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)
PWG	Planar Wave Guide
QD	Quantum-Dot
RLS	Resonance Light Scattering
RNA	Ribonucleic Acid
RVS	Rupture Event Scanning
SAM	Self-Assembled Monolayer
SAW	Surface Acoustic Wave
SLN	Solid Lipid Nanoparticle
SNOM	Scanning Near Field Optical Microscopy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPM	Scanning Probe Microscopy
SPR	Surface Plasmon Resonance
STED	Stimulated Emission Depletion
STM	Scanning Tunneling Microscopy
TIR-FM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
TOF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometer
UHMW	Ultra High Molecular Weight
VPG	Vesikuläre Phospholipid Gele