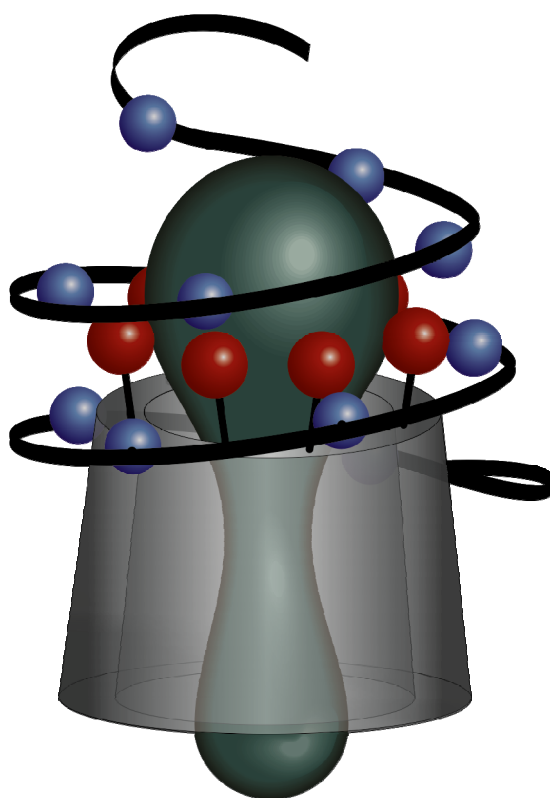


Synthese von Cyclodextrin- und Stärkederivaten zum verbesserten Wirkstofftransport

Dissertation

zur Erlangung des Grades der
Doktorin der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes



Carolin Thiele

Saarbrücken 2010

**Synthese von Cyclodextrin- und
Stärkederivaten zum verbesserten
Wirkstofftransport**

Dissertation
zur Erlangung des Grades der
Doktorin der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Diplom-Chemikerin
Carolin Thiele

Saarbrücken 2010

Tag des Kolloquiums: 20. Juli 2010
Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels
Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wenz
Prof. Dr. Claus-Michael Lehr
Prof. Dr. Dr. h. c. Helmut Ritter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2006 bis März 2010 am Institut für Organische Makromolekulare Chemie an der Universität des Saarlandes unter Leitung von Prof. Dr. Gerhard Wenz angefertigt.

hoffnung einer forscherin

es mögen doch:

bitte wege zu

finden sein zu

wirksamen stoffen

es mögen doch:

bitte die stoffe

den wegen folgen

(Stefan Schwarzmüller)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Summary	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Cyclodextrine	3
2.2	Stärke	7
2.3	Transport von Wirkstoffen	10
3	Zielsetzung	13
4	Synthese funktionalisierter Cyclodextrine	15
4.1	Regioselektive Modifizierung von Cyclodextrin	15
4.1.1	Umsetzung aller primären Hydroxylgruppen	16
4.1.2	Umsetzung einer primären Hydroxylgruppe	17
4.1.3	Umsetzung von zwei primären Hydroxylgruppen	19
4.2	Design eines synthetischen Wirtes für den Wirkstoff Camptothecin	21
4.3	Synthese mono-funktionalisierter Cyclodextrine.....	25
4.4	Synthese hepta-funktionalisierter Cyclodextrine	28
5	Bestimmung des Komplexierungsvermögens der Cyclodextrin-Derivate.....	33
5.1	Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert- Butylphenylderivaten.....	35
5.1.1	Einfluss der funktionellen Gruppen des Gastes	40
5.1.2	Einfluss der funktionellen Gruppen des Wirtes.....	42
5.1.3	Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen und Bestimmung der Orientierung	46
5.2	Solubilisierung von Wirkstoffen.....	54
5.2.1	Camptothecin.....	56
5.2.2	Idarubicin Hydrochlorid	62
5.2.3	Docetaxel.....	70
6	Synthese von Stärkederivaten	75
6.1	Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate.....	75
6.1.1	Synthese von Carboxymethyl-Stärke (CMS).....	75
6.1.2	Synthese von oxidierte Stärke.....	83
6.2	Synthese von Stärken mit zellerkennenden Liganden	89

7	Bildung von Nanopartikeln und Nanoplexen	97
7.1	Stand der Forschung	97
7.2	Nanoplexe aus Block-copolymeren.....	103
7.3	Nanopartikel aus Stärkederivaten	119
7.4	Nanoplexe aus Stärkederivaten.....	123
8	Zusammenfassung	135
9	Experimenteller Teil.....	137
9.1	Reagenzien, Methoden, Geräte und Kalibrierungen.....	137
9.1.1	Reagenzien, Methoden und Geräte.....	137
9.1.2	UV-Spektren und Kalibrierungen	140
9.2	Synthesen der Cyclodextrinderivate.....	141
9.3	Synthesen der Stärkederivate.....	168
10	Literatur	177
11	Verzeichnisse.....	195
11.1	Verzeichnis der Abkürzungen	195
11.2	Verzeichnis der Abbildungen	200
11.3	Verzeichnis der Schemata	204
11.4	Verzeichnis der Tabellen	206
12	Danksagung.....	209

1 Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Cyclodextrine (CDs) mit Thioetherseitengruppen synthetisiert und deren Bindungspotential gegenüber Zytostatika bestimmt. Für Taxotere® konnte die Löslichkeit in Wasser um den Faktor 27 gesteigert werden, wodurch auf den Emulgator Tween 80 verzichtet werden kann. Von Idarubicin wurden erstmals CD Einschlussverbindungen hergestellt mit Stabilitätskonstanten bis zu 460000 M^{-1} .

Ausgehend von nativer Stärke wurden wasserlösliche Stärkecarboxylate durch Oxidation mit TEMPO synthetisiert. An diese wurden Pteroate als zellspezifische Liganden angeknüpft. Durch Kombination der wirkstoffbeladenen CDs mit entgegengesetzt geladenen Polymeren wurden definierte Nanopartikel (NP) erzeugt. Der Einfluss des Ladungsverhältnisses sowie der Einfluss des Salzgehalts und die Redispergierbarkeit wurden untersucht. Aufgrund der Größe (90 – 200 nm) eignen sich die Partikel gut für pharmazeutische Anwendungen. Im Gegensatz zu bisher bekannten NPs kann der Wirkstoff bei niedrigeren pH-Werten, wie sie im Endosom herrschen, freigesetzt werden. Es zeigte sich, dass die NPs spezifisch von Caco-2-zellen aufgenommen wurden und keinen Effekt auf Erythrozyten ausübten.

Es wurden wichtige Fortschritte in Richtung eines molekularen Shuttles erzielt: Die synthetisierten CDs bilden stabile Komplexe mit Zytostatika und können weiter zu NPs umgesetzt werden. Diese bestehen nur aus ungiftigen, biologisch abbaubaren Komponenten, transportieren den Wirkstoff spezifisch zur Krebszelle und setzen ihn dort wieder frei.

Summary

Cyclodextrin (CD) derivatives with thioether groups were synthesized and their binding potential for cytotoxic drugs was determined. The solubility of Taxotere® was enhanced by a factor of 27, thereby eliminating the need of the emulsifier tween 80. No studies have been reported for the association of Idarubicin in CD derivatives till date. Binding constants up to 460000 M^{-1} with this drug moiety were reported for the first time.

Furthermore native starch was oxidized with TEMPO to yield water-soluble derivatives, which were reacted with pteric acid derivatives as cell-specific ligands for a targeted delivery. The synthesized CD derivatives were used to formulate nanoparticles (NPs) along with oppositely charged block-copolymers as well as the starch derivatives. Optimization of polyelectrolyte ratio as well as the influence of salt and dispersibility after freeze-drying was investigated to obtain stable NPs. As against the currently investigated nanoparticulate systems, the formulated NPs offer advantage of releasing the drug at the endosomal pH. It was shown, that these particles enter caco2-cells by endocytosis and show no toxicity to red blood cells.

Thus the CD derivatives could be used in formulating non-toxic, biodegradable NPs with potential for application in targeted drug delivery to cancer cells, releasing the drug specifically at the endosomal pH. The results indicate the potential of the synthesized CDs and starch derivatives for further application as a molecular shuttle for site specific drug delivery.

2 Einleitung

2.1 Cyclodextrine

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Anhydro-glucopyranoseeinheiten bestehen. Sie wurden erstmals von Villiers^[1] im Jahr 1891 isoliert und 1903 von Schardinger^[2] als cyclische Oligosaccharide identifiziert. Man unterscheidet je nach Anzahl der Glucoseeinheiten verschiedene Cyclodextrine. Die gängigsten Cyclodextrine sind α -CD **1 α** (sechs Glucoseeinheiten), β -CD **1 β** (sieben Glucoseeinheiten) und γ -CD **1 γ** (acht Glucoseeinheiten). Diese Verbindungen haben die Form eines hohlen Kegelstumpfs. Es sind auch größere Cyclodextrine bekannt, die aus bis zu 100 Glucoseeinheiten bestehen. Diese zeigen allerdings nicht mehr die Form des Kegelstumpfes mit einer deutlich ausgeprägten Kavität und sind nicht in der Lage andere Moleküle zu komplexieren. Deshalb werden sie im Folgenden nicht weiter betrachtet.

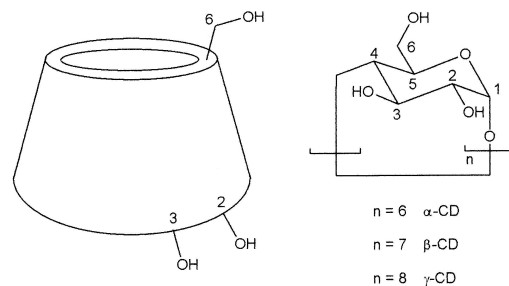


Abbildung 1: α -, β - und γ -CD **1**

Die Darstellung der Cyclodextrine erfolgt durch enzymatischen Abbau von Amylose mit Enzymen wie Cyclodextrin-Glycosyltransferasen (CGTase), die aus Bakterien wie *Bacillus macerans*^[3, 4] und *Klebsiella pneumonia*^[5, 6] gewonnen werden. Durch die CGTase wird eine Windung der α -Helix der Amylose durch Spaltung der glycosidischen Bindung abgetrennt. Durch Bildung einer neuen 1,4-Verknüpfung von zwei Glucoseeinheiten kommt es zur Bildung von ringförmigen Molekülen. Der Ringschluss erfolgt nicht selektiv sondern führt zu einem Produktgemisch, das sich aus verschiedenen Ringgrößen zusammensetzt. Um die einzelnen Derivate zu trennen, kommen selektive Fällungsmittel zum Einsatz^[7, 8].

2.1 Cyclodextrine

Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der Cyclodextrine. Alle Glucoseeinheiten liegen in der 4C_1 -Sesselkonformation vor. α -, β - und γ -CD weisen eine C_n -Symmetrie auf, wobei n für die Zahl der Glucoseeinheiten steht. Die primären Hydroxylgruppen sind an der engeren Seite des Kegelstumpfes zu finden und die sekundären Hydroxylgruppen auf der weiteren Seite. Die Hydroxylgruppen an C2-Position zeigen dabei ins Innere der Kavität und die Hydroxylgruppen an C3-Position auf die Außenseite. Da sich auf der sekundären Seite doppelt so viele Hydroxylgruppen befinden als auf der primären, kommt es zur Ausbildung eines Dipolmoments, welches 10-15D beträgt und parallel zur Drehachse liegt.^[9] Zwischen den Hydroxylgruppen auf der sekundären Seite der Cyclodextrine bildet sich ein Band aus Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese können sich bei β -Cyclodextrin besonders gut ausbilden^[10] und sind der Grund für die vergleichbar schlechte Wasserlöslichkeit dieser Verbindung^[11] im Vergleich zu α - und γ -Cyclodextrin (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrin^[12]

Eigenschaft	α -CD	β -CD	γ -CD
Zahl der Glucose-Einheiten	6	7	8
Molekulargewicht	972	1135	1297
Wasserlöslichkeit [g/100ml H ₂ O bei RT]	14.5	1.85	23.2
Höhe des Kegelstumpfes [Å]	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1
Durchmesser der Kavität [Å]	4.4 – 5.3	5.8 – 6.5	7.4 – 8.3
äußerer Durchmesser [Å]	14.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	17.5 ± 0.4
ungefähres Volumen der Kavität [Å ³]	174	262	427

Im Gegensatz zur hydrophilen äußeren Seite steht die hydrophobe Kavität^[13]. Diese wird durch die H-Atome an den Positionen C-3 und C-5 sowie den etherähnlichen Sauerstoffbrücken gebildet. Diese Kavität verleiht den Cyclodextrinen die besondere Eigenschaft, andere hydrophobe Moleküle oder Molekülteile in ihre Kavität einzuschließen^[14] und macht sie deshalb interessant für die chemische Industrie. Die wichtigsten Triebkräfte, die für die Bildung von CD-Einschlussverbindungen verantwortlich sind, sind hydrophobe und van-der-

Waals-Wechselwirkungen^[15]. Andere Wechselwirkungen, die die Bildung von Wirt-Gast-Systemen beeinflussen können, sind Dipol-Dipol-Wechselwirkungen^[16] und Charge-Transfer-Wechselwirkungen^[17]. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken kann den Komplex zusätzlich stabilisieren und ist entscheidend für die Konformation der Einschlussverbindung^[15].

Durch den Einschluss können die Eigenschaften der inkludierten Verbindungen erheblich beeinflusst werden^[18]:

- Erhöhung der Löslichkeit
- Fixierung von leicht flüchtigen Substanzen
- Maskierung von Geruch und Geschmack
- Stabilisierung von licht- und sauerstoffempfindlichen Substanzen
- Schutz gegenüber Zersetzung durch Mikroorganismen
- Umwandlung von flüssigen Substanzen in Feststoffe
- Modifizierung der chemischen Reaktivität des Gastes

Durch die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten^[18, 19] ist es zu einem starken Anstieg der Publikation auf dem Gebiet der CDs gekommen (siehe Abbildung 2). Zu den Einsatzgebieten der CDs zählen z.B. Solubilisierung von Pharmaka^[20, 21], Transport von Wirkstoffen^[22-26], Katalyse von Reaktionen^[27, 28], chromatographischen Trennungen^[29-31], Kosmetik- und Lebensmittelindustrie^[32].

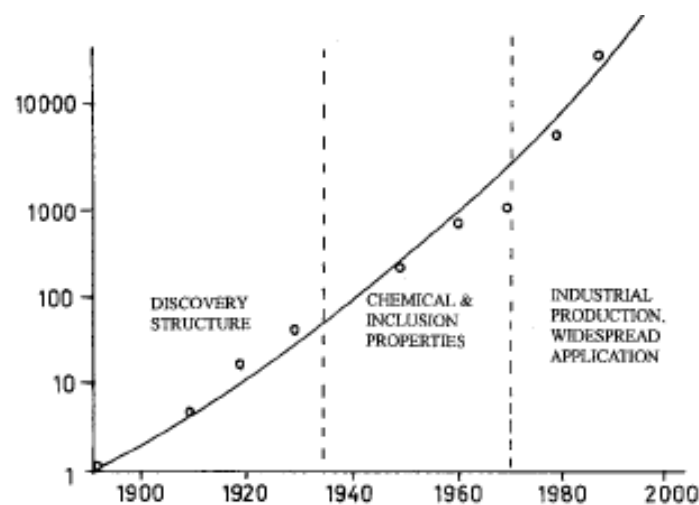


Abbildung 2: Logarithmischer Anstieg der CD-Publikationen^[12]

2.1 Cyclodextrine

Ein wichtiges Kriterium für die Stabilität einer gebildeten Einschlussverbindung ist die Größe des Gastmoleküls. Je besser ein Gast aufgrund seiner dreidimensionalen Gestalt in der Lage ist, die Kavität auszufüllen, desto stabiler ist der resultierende Komplex. Zu dünne oder zu dicke Gäste führen zu einer geringeren Komplexstabilitätskonstante K_S . Untersuchungen von Immel^[33] und Müller^[34] zeigten, dass die Kavität der CDs in Höhe von H-5 eine Engstelle aufweist (siehe Abbildung 3).

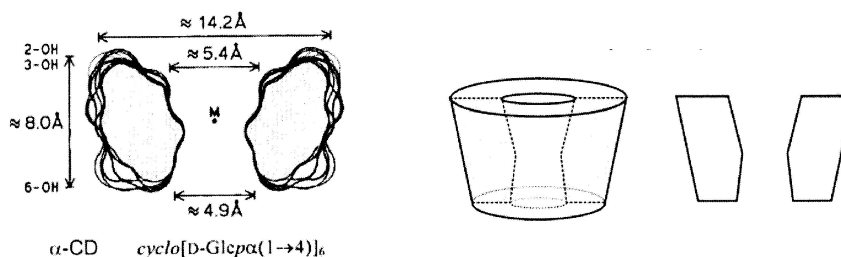


Abbildung 3: Querschnitt durch die Kavität von α -CD^[33] **1** α und idealisierte Darstellungen^[35]

Der Durchmesser der Gäste muss kleiner sein als der Durchmesser dieser Engstelle, damit es überhaupt zu einer Komplexierung kommt. Je besser ein Gast in der Lage ist, die Kavität möglichst raumfüllend auszufüllen, desto größere Werte beobachtet man für die Stabilitätskonstanten.

Tabelle 2: Durchmesser der Engstelle der Kavität von α -, β - und γ -CD

Cyclodextrin	Durchmesser [\AA]
α -CD	4.4
β -CD	5.8
γ -CD	7.4

Aus den bekannten Durchmessern der Engstellen von α -, β - und γ -Cyclodextrin ergeben sich für jedes CD bestimmte Substanzklassen, die optimal komplexiert werden. Die Größe der Kavität von α -CD ist gut für den Einschluss von niedermolekularen aliphatischen Gästen wie α ,- ω -Diolen^[36], α ,- ω -Diaminen^[37], α ,- ω -Dicarbonsäuren^[38, 39], Alkoholen^[40], Carbonsäuren^[41] geeignet, während β -CD Aromaten^[42-44] und Heterocyclen^[45] inkludiert. Noch größere Moleküle wie Makrozyklen^[46] und Steroide^[47] können in γ -CD eingeschlossen werden.

2.2 Stärke

Stärke ist ein nachwachsender Rohstoff und kann aus vielen Pflanzen gewonnen werden. Es handelt sich um ein Homopolysaccharid mit der allgemeinen Summenformel $(C_6H_{10}O_5)_n$, das wie Cyclodextrin aus Anhydroglucoseeinheiten aufgebaut ist. Der Unterschied besteht in der unterschiedlichen Verknüpfung der einzelnen Monomereinheiten. Bei Cyclodextrin sind die einzelnen Glucoseeinheiten über α -1,4-glycosidische Bindungen so miteinander verbunden, dass sich eine ringförmige Struktur ausbildet. Stärke setzt sich dagegen aus Amylose und Amylopektin zusammen.

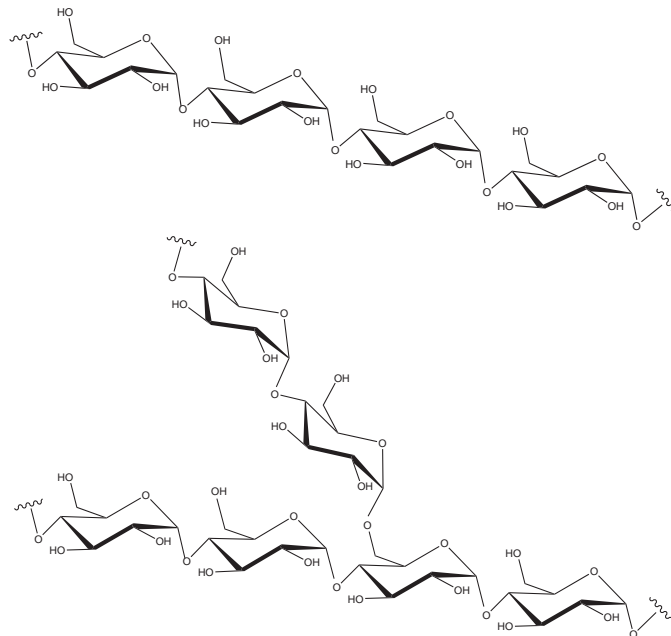


Abbildung 4: Struktur von Amylose und Amylopektin

Bei Amylose handelt es sich um linear verknüpfte α -1,4-Anhydroglucoseeinheiten, die sich in Form von α -Helices anordnen. Im Gegensatz dazu findet man im Amylopektin neben α -1,4-Verknüpfungen auch α -1,6-Verknüpfungen, was zu verzweigten Molekülketten führt (siehe Abbildung 4). Das typische Molekulargewicht von Amylopektin liegt unabhängig vom Stärkeursprung bei etwa $10^7 - 10^8$ g/mol.^[48, 49] Etwa an jeder 20. - 25. Glucoseeinheit tritt neben der 1,4- auch eine 1,6-Verknüpfung auf, so dass hochverzweigte Strukturen resultieren.^[50] Neben dem Polysaccharid findet man in Stärke kleine Mengen Eiweiß, Lipide und esterartig gebundene Phosphorsäure.

Das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin ist je nach dem Ursprung der Stärke unterschiedlich und bestimmt maßgeblich die Eigenschaften der Stärke. So ist die lineare Amylose wesentlich schlechter in Wasser löslich und wird schlechter enzymatisch abgebaut als das verzweigte Amylopektin.^[51] Mit steigendem Amylopektin-Gehalt nimmt die Kristallinität des Stärkekorns zu. Das Aussehen der Stärkekörner (siehe Abbildung 5) ist charakteristisch für die jeweilige Ursprungspflanze, so dass man oft vom Aussehen des Stärkekorn auf seinen Ursprung schließen kann.

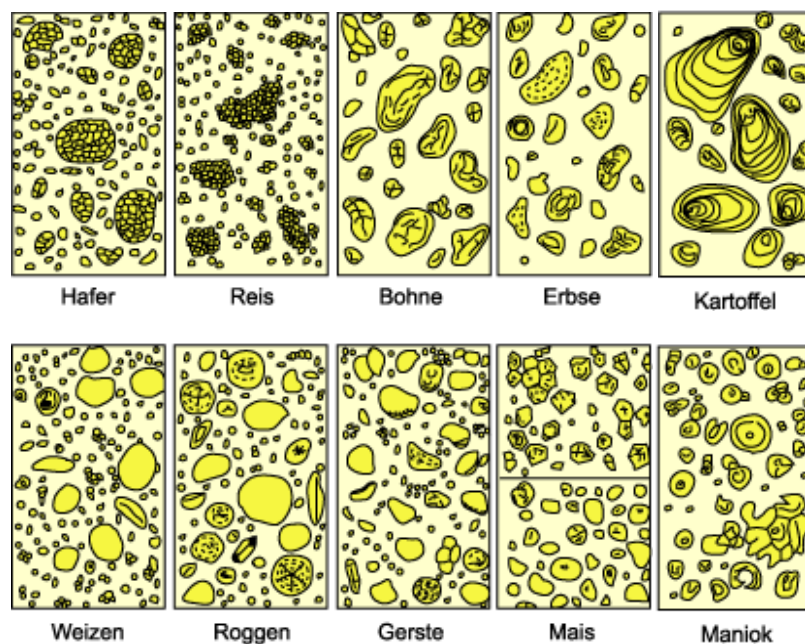


Abbildung 5: Stärkekörner von verschiedenen Pflanzen (200fach vergrößert)^[51]

Stärke und ihre Derivate bieten viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten (siehe Abbildung 6). Die Derivatisierung erfolgt meist an den freien Hydroxylgruppen der Stärke durch Veretherung und Veresterung und hat eine Veränderung der Lösungseigenschaften zur Folge. Weiterhin sind die Oxidation der Stärke und die Bildung von Pfropfcopolymeren wichtige Reaktionen. Stärke/Acrylamid/Acrylsäure-Pfropfcopolymere sind in der Lage ein Vielfaches ihres Gewichtes an Wasser aufzunehmen. Sie finden in der Industrie Verwendung als Superabsorber und können unter Verwendung von Persulfat^[52] oder Azobisisobutyronitril^[53] als Initiator hergestellt werden. Auch die Verwendung von γ -Strahlung als Initiator und PEG als Quervernetzer ist beschrieben.^[54]

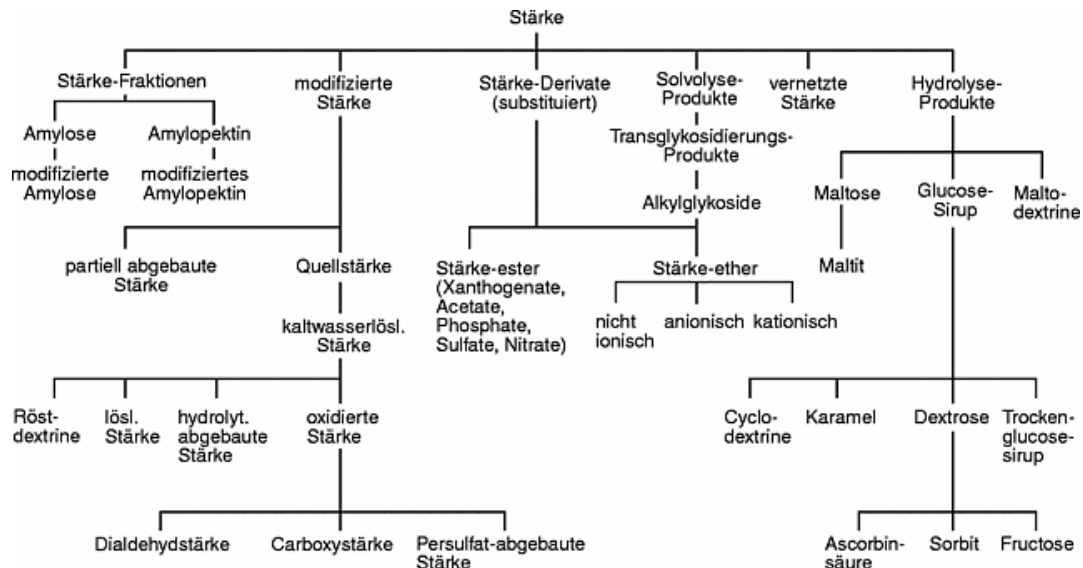


Abbildung 6: Stärkederivate und aus Stärke hergestellte Produkte^[55]

Eine vollständige Umsetzung aller Hydroxylgruppen ist meist nicht möglich, aber auch nicht erstrebenswert. Bereits bei relativ niedrigen Substitutionsgraden ist eine Veränderung der Lösungseigenschaften feststellbar. Durch Veretherung ist beispielsweise Carboxymethylstärke^[56-61] mit DS von 0,7 bis 2,1 zugänglich, wobei der Substitutionsgrad nach einem Carboxymethylierungsschritt bei maximal 1,45 liegt^[60]. Höhere DS können nur durch wiederholte Carboxymethylierung erzielt werden. CMS weist eine deutlich erniedrigte Viskosität auf und dient als Grundstoff für abbaubare Tenside.

Die Synthese von Hydroxyethylstärke (HES) erfolgt durch Reaktion der Stärke mit Ethylenoxid in Gegenwart von Natriumhydroxid, wobei der Substitutionsgrad zwischen 0,02 und 0,50 liegt.^[62-65] Bei Hydroxyethylstärken sinkt mit steigendem Substitutionsgrad die Verkleisterungstemperatur. Es bilden sich klare Pasten, die eine hohe Gefrier- und Taustabilität haben und vergleichbar resistent gegen enzymatischen Abbau sind. Wässrige Lösungen von Hydroxyethylstärken werden im medizinischen Bereich als Blutersatzstoff^[66-71] angewendet. Für die Lebensmittelindustrie ist dieser Stärkeether nicht zugelassen.^[51] Analog zu HES existieren auch Hydroxypropylstärken (HPS), die durch Reaktion von Propylenoxid mit Stärke im Basischen dargestellt werden, wobei ein DS bis zu 1,41 erreicht werden kann.^[72-75] Die Eigenschaften sind ähnlich wie die der HES^[76], jedoch hat HPS die Zulassung zur Verwendung in Lebensmitteln^[77-80], zum Beispiel als Verdickungsmittel^[81].

Stärkeester werden durch Umsetzung von Stärke mit Säurechloriden oder -anhydriden im Basischen gewonnen. Man unterscheidet zwischen organischen (Stärkeacetate und -citrate) und anorganischen Stärkeestern^[82] (Stärkenitrate und -phosphate). Die Stärkeacetate^[83-85] sind bis zu einem Acetylgehalt von 25% wasserlöslich, wobei die Stabilität gegenüber Säuren im Vergleich zu nativer Stärke erhöht ist. Sie werden in Folien eingesetzt und bieten den Vorteil, dass sie dehnbarer und gleichzeitig fester sind als Folien aus nativer Stärke.

Bei der Reaktion von Stärke mit Natriummetaphosphat erhält man Monoester und vernetzte Diester der Stärke^[86, 87]. Diese werden als Verdickungsmittel im Lebensmittelbereich eingesetzt.

2.3 Transport von Wirkstoffen

Der Transport eines Wirkstoffs zu seinem Wirkungsort gehört zu den Aufgaben der Galenik. Besonders bei Krebswirkstoffen besteht das Problem, dass es aufgrund der zur Zerstörung der Krebszellen notwendigen hohen Dosierung häufig zu Nebenwirkungen kommt, weil die Zytostatika nicht nur die Krebszellen angreifen, sondern auch die gesunden Zellen. Um diese Nebenwirkungen zu reduzieren, ist ein geeignetes Transportmedium notwendig. Im Idealfall wird der Wirkstoff in einer Hülle zu seinem Zielort transportiert und erst dort freigesetzt. Dadurch erreicht man eine Aufkonzentration des Wirkstoffs am Zielort und die Nebenwirkungen werden minimiert, da nur geringere Dosen notwendig sind. Die Therapie beruht auf der Tatsache, dass die Wachstumsrate von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen erhöht ist. Diverse Zytostatika wie Paclitaxel (Taxol®)^[88], Doxorubicin (Adriplastin®, Caelyx®)^[89], Docetaxel (Taxotere®)^[90] und Idarubicin (Zavedos®, Idamycin®)^[91] werden bereits erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt. Die aktuellen Forschungen beschäftigen sich größtenteils damit, die Medikamente gezielt an ihren Wirkort zu transportieren und ihre Nebenwirkungen zu reduzieren.

Die Forschung beschäftigt sich in den letzten Jahren verstärkt mit der Entwicklung von Nanopartikeln. Als Nanopartikel werden Teilchen bezeichnet, die in der Größenordnung von 20-1000 nm liegen^[92]. Nanopartikel werden grundsätzlich in vielen Bereichen eingesetzt, können im Speziellen aber auch zum Transport von Wirkstoffen verwendet werden. Man unterscheidet bei Nanopartikeln zwischen Nanosphären und Nanokapseln. Nanosphären bestehen aus einer Polymermatrix, in die ein Wirkstoff gleichmäßig eingelagert werden kann. Im Gegensatz dazu besitzen die Nanokapseln einen flüssigen Kern, der von einer Polymermembran umgeben ist.

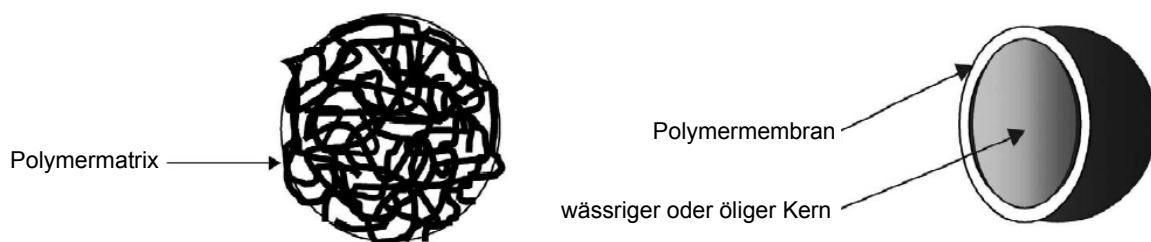


Abbildung 7: Nanosphären (Matrixsystem) und Nanokapseln (Reservoirsystem)^[93]

Allen Tumoren ist gemeinsam, dass sie sehr gut durchblutet sind, aber die Anbindung ans Lymphsystem nur schlecht ausgebildet ist. Deshalb kommt es zu einer Anreicherung von Nanopartikeln im Tumorgewebe, was man unter dem Begriff „Enhanced Permeability and Retention Effect“ (EPR-Effekt) zusammenfasst.^[93-96] Der Nachteil der Nanopartikel liegt darin, dass sie durch unspezifische Endozytose aufgenommen werden und sich überwiegend in Leber, Milz und Lunge anreichern. Diese Anreicherung kann wiederum durch eine Oberflächenmodifizierung der Partikel verringert werden, so dass die Opsonine sich nicht mehr an die Oberfläche der Partikel anlagern können und deshalb nicht mehr von den Makrophagen erkannt werden. Zur Funktionalisierung der Oberfläche können zum Beispiel Pluronic^[97] oder Poloxamine^[98] verwendet werden. Auch die Beschichtung von Nanopartikeln mit Hydroxyethylstärke, die mit Laurylsäure verestert wurde, ist eine erfolgreiche Methode um die Zirkulationszeit der Partikel zu erhöhen.^[99] Die gängigste Methode das „Fressen“ durch das mononukleare phagozytierende System zu unterbinden, ist jedoch die Verwendung von verzweigten PEG-Ketten oder PEG-Copolymeren.^[100]

Die Stabilisierung von Nanopartikeln kann durch monomere und polymere Amphiphile erreicht werden.^[101] So führt zum Beispiel der Einsatz von Monoglyceriden zur Solubilisierung des Wirkstoffs Paclitaxel zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit.^[102-104] Da die niedermolekularen Tenside möglicherweise zu unerwünschten Begleiterscheinungen führen können, verlagert sich das Interesse auf amphiphile Polymere. Als synthetische Polymere werden PEG-Blockcopolymere^[105-109], Polyacrylate^[110], Polyvinylalkohol^[111], Polylactid- und Polyglycolid-Propfcopolymere^[112-115] und Polycyanacrylate^[116] verwendet. Wegen der biologischen Abbaubarkeit im Körper und der damit verbundenen besseren Verträglichkeit kommen vermehrt Biopolymere wie Chitosan^[117-119], Proteine^[120] und Stärkederivate^[121-125] zum Einsatz.

Die Aufnahme des Wirkstoffs in den Nanopartikel kann entweder durch kovalente Anbindung^[109, 114, 126] erfolgen oder auf hydrophoben Wechselwirkungen^[117, 119, 122, 124, 125, 127, 128] und Coulomb-Anziehung^[129] beruhen. Prinzipiell eignen sich viele Nanopartikel zur Solubilisierung von Wirkstoffen. Größenbedingt kommt es dabei zu einer Anreicherung der Partikel im Tumorgewebe. Neben diesem passiven Targeting ist es von Vorteil, zusätzlich ein aktives Targeting durchzuführen. Dies ist durch das Anbringen von speziellen Liganden an der Partikeloberfläche möglich. Es ist bekannt, dass Krebszellen in der Zytoplasmamembran vermehrt Folsäurerezeptoren exprimieren, während die meisten anderen Gewebetypen wenig oder gar keine Rezeptoren aufweisen.^[130] Die Aufnahme von Folsäurekonjugaten erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose.^[131] In der Literatur sind diverse Systeme mit kovalent angebundener Folsäure beschrieben. Als Trägermaterial werden synthetische Polymere wie Polyethylenglycol^[132], Poly(L-lysin)-poly(ethylenglycol)^[133], Poly(acrylsäure)-*b*-poly(isopren)^[134], poly(N-isopropylacrylamide)^[135] sowie Proteine^[136, 137], Cyclodextrine^[138, 139] und PAMAM-Dendrimere^[140] verwendet. Die Anknüpfung der Folsäure erfolgt dabei in allen Fällen unter Verwendung des NHS-Esters der Folsäure, welcher mit Hilfe von DCC in DMSO zum Amid umgesetzt wird.

3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Entwicklung eines Transportsystems für hydrophobe Wirkstoffe. Als Wirkstoffe sollen hier die Zytostatika Camptothecin, Idarubicin und Docetaxel zum Einsatz kommen. Idarubicin und Docetaxel werden bereits angewendet, bei Camptothecin ist die Wirksamkeit nachgewiesen. Viele Wirkstoffe sind allerdings in ihrer Anwendung aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser und den unerwünschten Nebenwirkungen nicht unproblematisch. Deshalb ist ein Transportsystem erstrebenswert, das gleichzeitig solubilisiert und spezifisch nur die Krebszellen angreift ohne gesunde Zellen zu schädigen.

Wie aus der Literatur bekannt ist, sind Cyclodextrine und ihre Derivate in der Lage, hydrophobe Moleküle oder Molekülteile in ihre Kavität einzuschließen. Durch den Einschluss können die Eigenschaften des Gastes verändert werden. So kann beispielsweise ein hydrophober Wirkstoff solubilisiert werden. Da hier im Speziellen Krebswirkstoffe zum Einsatz kommen sollen, muss β -CD verwendet werden, da die Kavität die geeignete Größe aufweist. Natives β -CD ist aufgrund seiner relativ geringen Löslichkeit in Wasser nur bedingt geeignet. Außerdem bildet β -CD nicht mit allen Wirkstoffen stabile Komplexe aus. Deshalb soll nach CD Derivaten mit verbessertem Bindungsvermögen und höherer Wasserlöslichkeit gesucht werden.

Darüber hinaus sollen nanoskalige Carrier entwickelt werden. Da diese Carrier im menschlichen Körper angewendet werden sollen, sollten sie im Idealfall im Körper zu unschädlichen Produkten metabolisiert werden können. Deshalb fällt die Wahl auf ein Kohlenhydratgrundgerüst, genauer auf Stärke. Die Stärke bietet an den freien Hydroxylgruppen Angriffspunkte für Funktionalisierungen. So sollen zum einen hydrophobe Substituenten angeknüpft werden, die für den Einschluss des hydrophoben Wirkstoffs notwendig sind und zum anderen zellspezifische Liganden um ein gerichtetes Targeting zu erreichen. Der Substitutionsgrad zwischen hydrophoben und hydrophilen Substituenten soll so eingestellt werden, dass sich in wässriger Lösung Nanopartikel ausbilden. An die

3 Zielsetzung

Oberfläche des Partikels sollen Folsäure oder Folsäurederivate kovalent gebunden werden, um ein gezieltes Targeting zu erreichen (Abbildung 8). Für diese funktionelle Nanopartikel soll letztlich der selektive Transport von Wirkstoffen in Krebszellen erprobt werden.

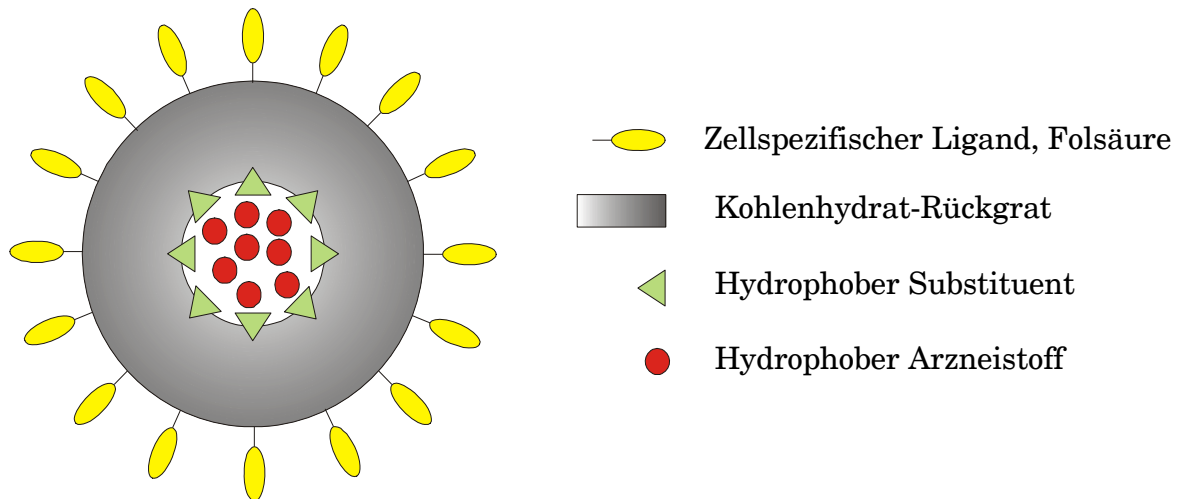


Abbildung 8: Schema des geplanten nanoskaligen Transportsystems auf Stärkebasis für die Tumorthherapie

4 Synthese funktionalisierter Cyclodextrine

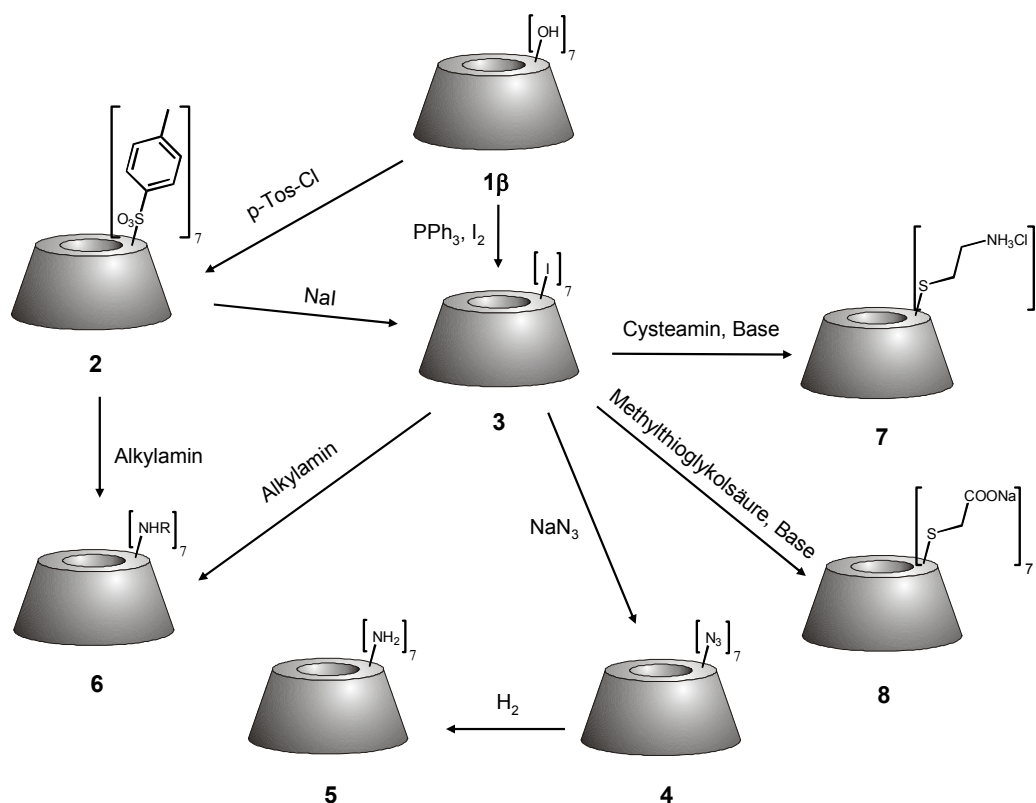
4.1 Regioselektive Modifizierung von Cyclodextrin

Native CDs sind Moleküle, die aufgrund ihres Aufbaus als Wirte für eine Vielzahl von Verbindungen dienen. Durch chemische Modifizierung können die Anwendungsmöglichkeiten der CDs in der supramolekularen Chemie noch gesteigert werden, da es dadurch zu Änderungen in der Größe und den Eigenschaften der Kavität kommen kann. Der hohle Kegelstumpf als Grundform des CDs bleibt bei der Modifizierung unverändert. Somit ist eine maßgeschneiderte Anpassung des CDs an einen bestimmten Gast durchführbar, bei dem die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast optimal sind. Die Umsetzung der Hydroxylgruppen des β -CDs ist außerdem notwendig um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Natives β -CD weist aufgrund der intramolekularen Wasserstoffbrücken nur eine mäßige Löslichkeit in Wasser auf. Jede Glucoseeinheit besitzt insgesamt drei Hydroxylgruppen, die für chemische Reaktionen zugänglich sind. Dabei handelt es sich um eine primäre Hydroxylgruppe an C-6 und zwei sekundäre Hydroxylgruppen an C-2 und C-3. In den meisten Fällen erfolgt keine statistische Umsetzung der Hydroxylgruppen, sondern eine regioselektive Reaktion.

Werden zum Beispiel alle primären Hydroxylgruppen mit einem hydrophobem Substituent umgesetzt, erreicht man eine Vergrößerung der Kavität und damit meist auch ein verbessertes Bindungsvermögen gegenüber einem hydrophoben Gast.^[146] Höfler^[147] konnte zeigen, dass die Einführung von Methylgruppen auf der sekundären Seite zu einer geringeren Bindungskonstante mit *tert.*-Butylbenzoesäure führt. Der Grund dafür liegt darin, dass durch die neu eingeführten Methylgruppen eine ungehinderte Ausbildung von Wasserstoffbrücken auf der sekundären Seite des CDs nicht mehr möglich ist. Im Gegensatz dazu führt eine vollständige Methylierung der primären Seite im Vergleich mit nativem β -CD zu einer Verdopplung der Bindungskonstante mit *tert.*-Butylbenzoesäure (42000 M^{-1} gegenüber 18400 M^{-1}). Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit nur Reaktionen an der primären Seite, also an C6 Position, des CDs durchgeführt.

4.1.1 Umsetzung aller primären Hydroxylgruppen

Die primären Hydroxylgruppen können durch einfache Reaktion mit Elektrophilen selektiv umgesetzt werden, da die primären Hydroxylgruppen nucleophiler als die sekundären sind. Die Schwierigkeit dieses Reaktionstyps liegt darin, die Konkurrenzreaktion an den sekundären Hydroxylgruppen zu unterdrücken, da diese mit steigendem Substitutionsgrad immer wahrscheinlicher wird. So kommt es beispielsweise bei der Umsetzung von β -CD **1 β** mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin zu Produktgemischen, welche mittels Chromatographie getrennt werden müssen, um ein reines heptafunktionalisiertes β -CD Derivat zu erhalten^[148, 149]. Das so erhaltene Heptatosylat **2** kann in einer nucleophilen Substitution zum Beispiel mit Halogenen^[150] oder Alkylaminen^[151] umgesetzt werden. Eine Alternative dazu ist die direkte Synthese von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -CD **3** aus nativem β -CD mit Triphenylphosphin und Iod in einer Ausbeute von 88%^[152].



Schema 1: Synthese von heptafunktionalierten β -CDs, Funktionalisierung nur an C6

Das so erhaltene Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -CD **3** kann mit Natriumazid umgesetzt und anschließend zum Hepta-amino- β -CD **5** reduziert werden^[153]. Die neu eingeführten Aminogruppen können zum Beispiel mit Aldehyden oder

Carbonsäuren zu den entsprechenden Iminen oder Amiden umgesetzt werden. Auch die Umsetzung des Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -CDs **3** mit Thiolen ist möglich. Auf diesem Weg können Heptakis-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]- β -CD (Hepta-cysteaminy]- β -CD)^[154] **7** und Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-ethansulfonsäure)]- β -CD^[155] **8** dargestellt werden.

4.1.2 Umsetzung einer primären Hydroxylgruppe

Eine in vielen Fällen angewandte Reaktion, die zu einem monofunktionalisierten Derivat führt, ist die Umsetzung von β -CD **1 β** mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin^[156, 157]. Bei dieser Reaktion kann es auch zur Bildung von mehrfach tosylierten Produkten kommen. Umkristallisation aus Wasser entfernt die mehrfach tosylierten Produkte und liefert Mono-[6-deoxy-6-(*p*-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9**. Zhong beschreibt eine verbesserte Syntheseroute unter Verwendung von *p*-Toluolsulfonsäureanhydrid in basischer wässriger Lösung mit einer Ausbeute von 61%^[158]. Man geht davon aus, dass vor der Reaktion eine Komplexierung des Anhydrids in der Kavität stattfindet und darin der Grund für die deutlich verbesserte Ausbeute zu sehen ist.

Eine andere Syntheseroute wird von Defaye^[159] beschrieben. Der Zusatz von Kupfer(II)-Ionen führt zur Ausbildung von sandwichartigen mehrkernigen Komplexen mit den sekundären Hydroxylgruppen des CDs, wodurch diese für eine Reaktion nicht mehr zugänglich sind. Die Geometrie der Kupfer(II)-Ionen ist dabei verzerrt quadratisch planar.^[160] Man vermutet weiterhin, dass *p*-Toluolsulfonsäurechlorid vor der eigentlichen Reaktion in die Kavität des CDs eingelagert wird, wodurch eine Präorganisation stattfindet und gleichzeitig die Bildung von mehrfach substituierten Derivaten erschwert wird.

Die so gebildeten Tosylate sind gute Intermediate. Diese können weiter mit Nucleophilen umgesetzt werden können und ermöglichen somit eine unbegrenzte

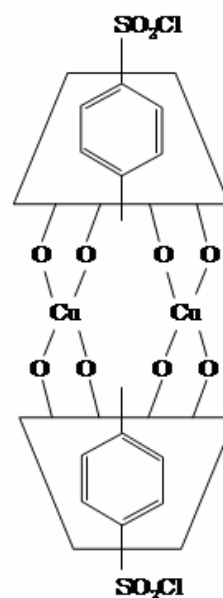
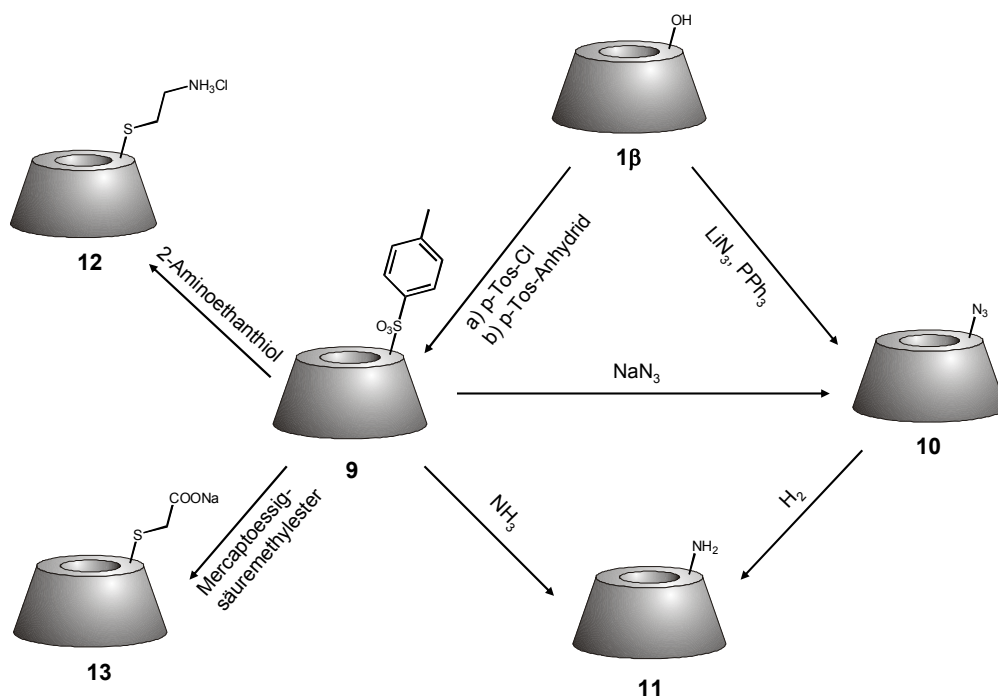


Abbildung 9: Komplexbildung
bei der Darstellung von **9**

4.1 Regioselektive Modifizierung von Cyclodextrin

Vielfalt an Funktionalisierungen. Auch in diesem Fall ist die Darstellung des Azids **10** möglich. Diese kann entweder durch Substitution der Tosylgruppe mit Natriumazid oder direkt durch Reaktion von β -CD mit Lithiumazid und Triphenylphosphin^[161] erfolgen. Reduktion^[156] liefert in einem zweiten Schritt das monosubstituierte Aminoderivat **11**, welches auch direkt aus dem Tosylat und Ammoniak^[157] gewonnen werden kann und Ansatzpunkte für Folgechemie bietet.



Schema 2: Synthese von monofunktionalisiertem β -CD, Funktionalisierung nur an C6

Wie im Fall der hepta-funktionalisierten CD-Derivate ist auch hier die Umsetzung mit Thiolen möglich. Durch Reaktion von 2-Aminoethanthiol mit Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** entsteht Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]- β -CD **12** in einer Ausbeute von 43%.^[162] In analoger Weise gelang Straßnig^[163] die Synthese von Mono-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-essigsäure)]- β -CD **13** durch Reaktion von Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** mit 2-Mercaptoglykolsäuremethylester und anschließender Verseifung des Methylesters.

4.1.3 Umsetzung von zwei primären Hydroxylgruppen

CD-Derivate mit zwei, drei oder vier Substituenten finden z.B. im Bereich der Katalysatoren und „enzyme mimics“ Anwendung. Zur Synthese kann ein bifunktionelles Reagenz verwendet werden, welches durch seine Geometrie die relative Lage der reagierenden Hydroxylgruppen bestimmt. Im Allgemeinen werden dazu Aryldisulfonsäurechloride benutzt, wobei A,B^[164, 165]-, A,C^[166, 167]- oder A,D-Substitutionen^[166, 167] erzielt werden können. Die so erhaltenen Sulfonate **10** - **14** können durch verschiedene Nucleophile wie Halogenide, Amine, Thiole usw. substituiert werden.

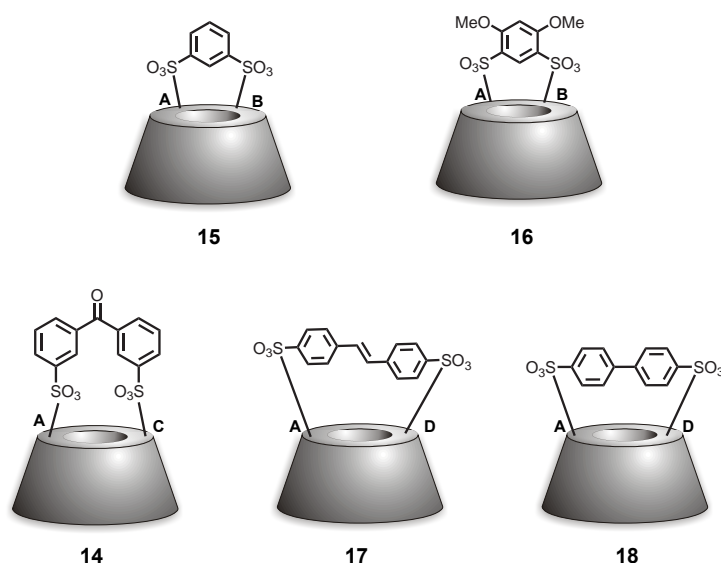
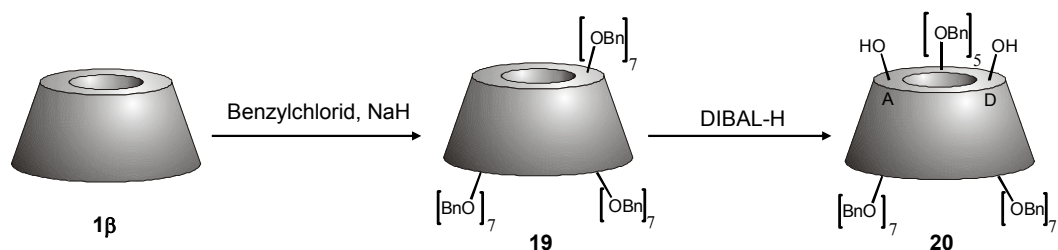


Abbildung 10: Überkappte β -Cyclodextrine

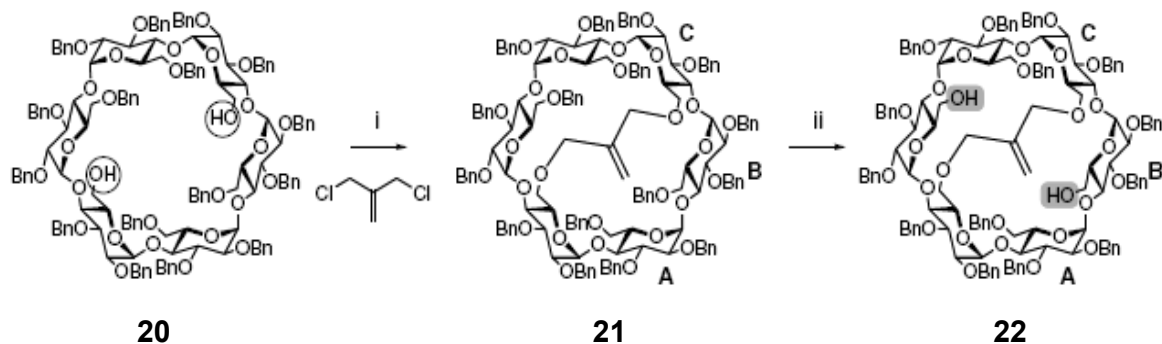
Eine neuere Variante zur Darstellung von disubstituierten Cyclodextrinen stellen die Arbeiten von Sollogoub und Sinay^[168-170] dar. Hier wird perbenzyliertes β -CD mit einem Überschuss an Diisopropyl-aluminiumhydrid (DIBAL-H) umgesetzt. Als Produkt der regioselektiven Didebenzylierung erhält man das A,D-Diol **20** in 83% Ausbeute.



Schema 3: Darstellung von Per-benzyl- β -CD **19** und regioselektive Debenzylierung zum Diol **20**

4.1 Regioselektive Modifizierung von Cyclodextrin

Die beiden freien Hydroxylgruppen können nun mit Hilfe der bereits beschriebenen Reaktionsmöglichkeiten weiter umgesetzt werden. Eine weitere Reaktion dieses Produktes mit DIBAL-H führt wiederum zu einer Didebenzylierung, welche regioselektiv im Uhrzeigersinn zu der ersten Debenzylierung verläuft.^[169] Auf diese Weise ist auch die Synthese von tetrasubstituierten CDs möglich.



Schema 4^[171]: Synthese und regioselektive Didebenzylierung von 21 i) NaH, RT, 2h, 92%, ii) DIBAL-H, Toluol, 50°C, 1h, 90%

4.2 Design eines synthetischen Wirtes für den Wirkstoff Camptothecin

In dieser Arbeit sollte unter anderem ein geeignetes β -CD-Derivat zur Solubilisierung des antineoplastischen Wirkstoffs Camptothecin^[172] (CPT) **23** synthetisiert werden. Camptothecin gehört in die Gruppe der Chinolin-Alkaloide und kann aus dem Holz und der Rinde des in China vorkommenden Baumes *Camptotheca acuminata* gewonnen werden. Es hat eine zytotoxische Wirkung gegen verschiedene Krebsarten wie Darm- und Eierstockkrebs^[172], wird allerdings aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser und der hohen Toxizität nicht in der Krebstherapie angewendet. Bei CPT handelt es sich um einen Inhibitor der Topoisomerase I. Topoisomerase I ist ein Enzym, welches für die Entknäulung der DNA bei der Zellteilung verantwortlich ist. Der hohen Wirksamkeit von CPT stehen die schlechte Löslichkeit aufgrund der hauptsächlich apolaren Oberfläche (Abbildung 11) und Stabilitätsprobleme gegenüber^[173].

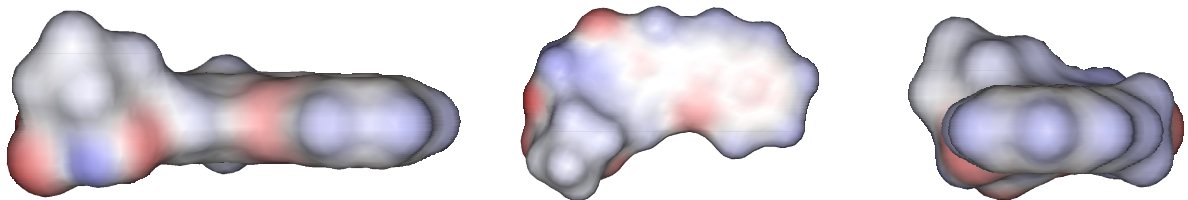
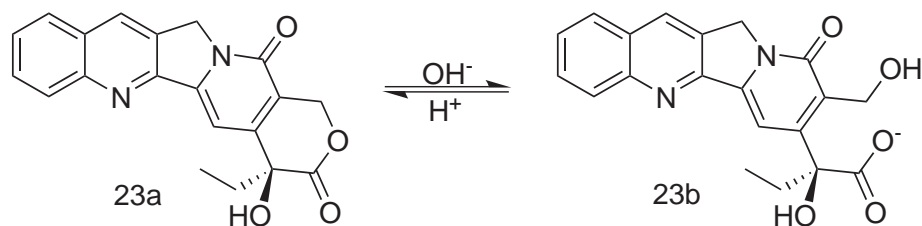


Abbildung 11: Polare (rot) und apolare (blau) Regionen von CPT **23**

Der in CPT enthaltene Lactonring ist bereits unter schwach basischen Bedingungen, wie sie im Blut vorkommen, nicht stabil und es kommt zur Spaltung des Lactons (Schema 5). Diese offene Form ist nicht mehr wirksam, da das Carboxylat bevorzugt an das im menschlichen Blut vorkommende Albumin bindet.^[174] Diese Nachteile können durch spezielle pharmazeutische Formulierungen vermindert werden^[173, 175-178], unter anderem auch durch den Einschluss in β -CD-Derivate^[179]. Cyclodextrinderivate werden bereits in der Pharmaindustrie eingesetzt.^[24] Durch die Inklusion von hydrophoben Gästen in die Kavität kann der Wirkstoff solubilisiert werden. Folglich sind eine erhöhte Konzentration des Wirkstoffs im Plasma sowie ein damit verbundener Anstieg der Wirksamkeit zu beobachten.

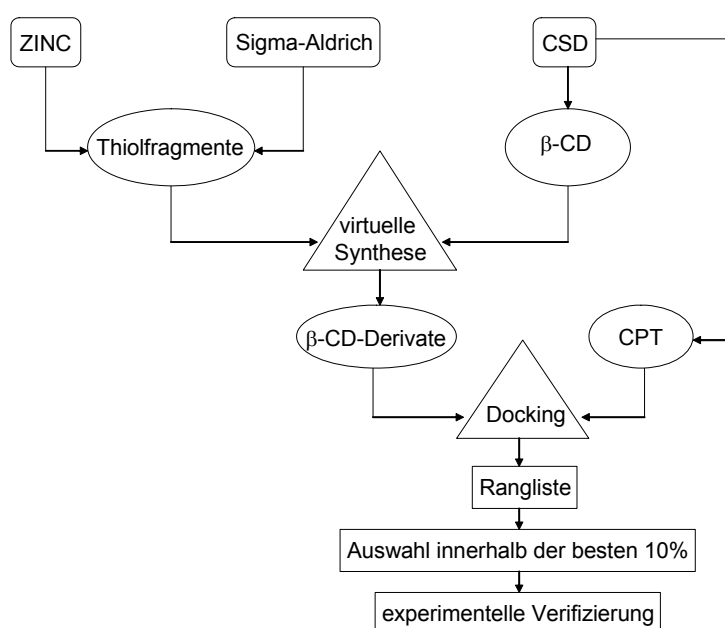


Schema 5: pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen der Lactonform (aktiven Form) **23a** und der Carboxylatform (inaktiven Form) **23b** von CPT

Da die Suche nach einem geeigneten Wirt durch zahllose Synthesen oft sehr zeit- und kostenintensiv ist, wurde diese Suche in Kooperation mit Steffen^[21] (AK Lengauer, Universität des Saarlandes) unter Zuhilfenahme eines virtuellen Screenings durchgeführt. Bei der computer-unterstützten Suche eines Liganden für ein gegebenes Protein haben sich die Docking-tools FlexX^[180], Gold^[181], Glide^[182], Dock^[183] und AutoDock^[184] bewährt. In den meisten Fällen des virtuellen Screenings wird zu einem gegebenen Wirt der ideale Gast gesucht. Dabei werden eine große Anzahl möglicher Moleküle gegen ein Zielmolekül gedockt und die jeweiligen Bindungsenergien berechnet. Die besten Kandidaten werden in experimentellen Studien untersucht um die Ergebnisse zu validieren. Es sind mehrere erfolgreiche Studien bekannt, bei denen es mit Hilfe des virtuellen Screenings gelungen ist, neue Wirkstoffe für gegebene Liganden zu identifizieren.^[185] DeJong berichtete von der erfolgreichen Suche nach neuen Gästen für ein gegebenes β -CD-Dimer.^[186] Da hier die Anwendungsmöglichkeit des Antikrebswirkstoffs Camptothecin verbessert werden soll, wurde das Screening in die entgegengesetzte Richtung durchgeführt und folglich als inverses Screening bezeichnet.

In dieser Arbeit sollten ausgehend von Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** und Heptakis-(6-deoxy-6-iod)- β -Cyclodextrin **3** durch Reaktion mit Thiolen die entsprechenden mono- und heptasubstituierten β -CD Derivate synthetisiert werden. Vorherige Arbeiten von Straßnig ließen vermuten, dass sich schwefelsubstituierte CDs für die Komplexierung von CPT **23** gut eignen. Zum einen stellt die Kupplung von Thiolen an CDs eine einfache Möglichkeit zur Einführung verschiedener funktioneller Gruppen dar. Zum anderen konnte

Straßnig zeigen, dass Heptakis-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]- β -CD **7** und Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-essigsäure)]- β -CD **8** dazu in der Lage sind, stabile Einschlussverbindungen mit dem Wirkstoff Camptothecin **23** zu bilden.^[163] Die Auswahl der zu kuppelnden Thiole erfolgte dabei unter Zuhilfenahme des inversen virtuellen Screenings. Das virtuelle Screening selbst war nicht Bestandteil dieser Arbeit und wird deshalb nur kurz beschrieben. Für eine detaillierte Beschreibung des Screenings wird auf die Arbeiten von Steffen verwiesen^[21, 187].



Schema 6: Durchführung des inversen virtuellen Screenings

Die Strukturen von β -CD **1 β** und CPT **23** stammten aus der Cambridge Structural Database (CSD). Die Thiolbausteine wurden dem Sigma-Aldrich Katalog und der ZINC-Datenbank entnommen. Dabei wurden nur Verbindungen berücksichtigt, die genau eine Thiolgruppe tragen und deren Molekulargewicht kleiner als 200 g/mol ist. Aus den Thiolfragmenten und β -CD wurde eine virtuelle Bibliothek von 1846 mono- und hepta-funktionalisierten CDs generiert. Mit den beiden Dockingtools AutoDock und GlamDock erfolgte das Docking und die anschließende Bewertung der gedockten Komplexe. Bei dem Docking wurde CPT als rigide betrachtet, während die konformelle Flexibilität in den Substituenten des β -CDs zu finden war. Von den gedockten Komplexen wurden die besten 10%

4.2 Design eines synthetischen Wirtes für den Wirkstoff Camptothecin

visuell untersucht und geeignete Liganden ausgewählt. Als Auswahlkriterien spielten zum einen die Verfügbarkeit der Thiolbausteine und zum anderen die erwartete Löslichkeit der β -CD-Derivate eine Rolle. Von den Thiolbausteinen wurden neun Derivate ausgewählt, von denen die entsprechenden β -CD Derivate im Labor dargestellt und deren Komplexstabilitätskonstante K_S mit Camptothecin **23** bestimmt werden sollten.

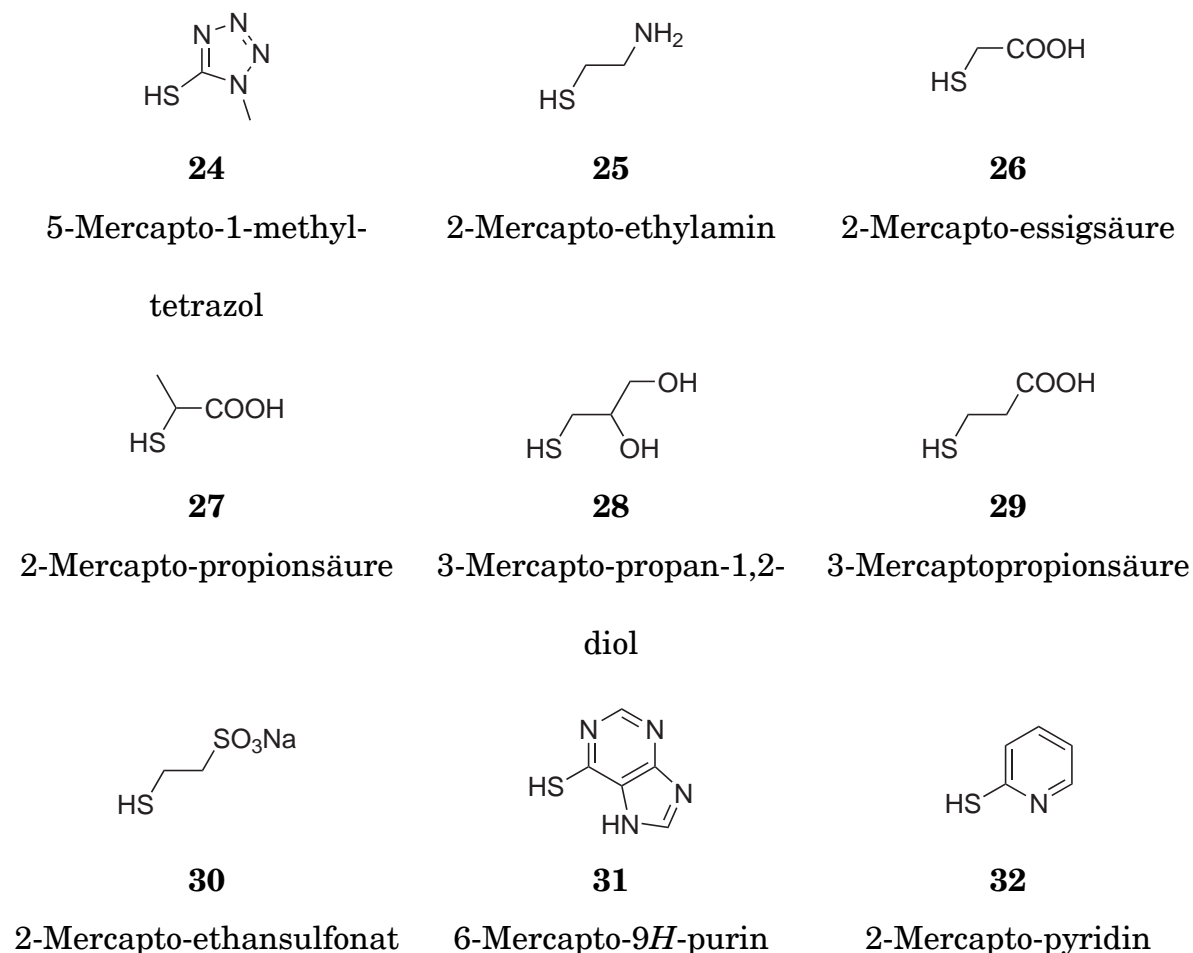


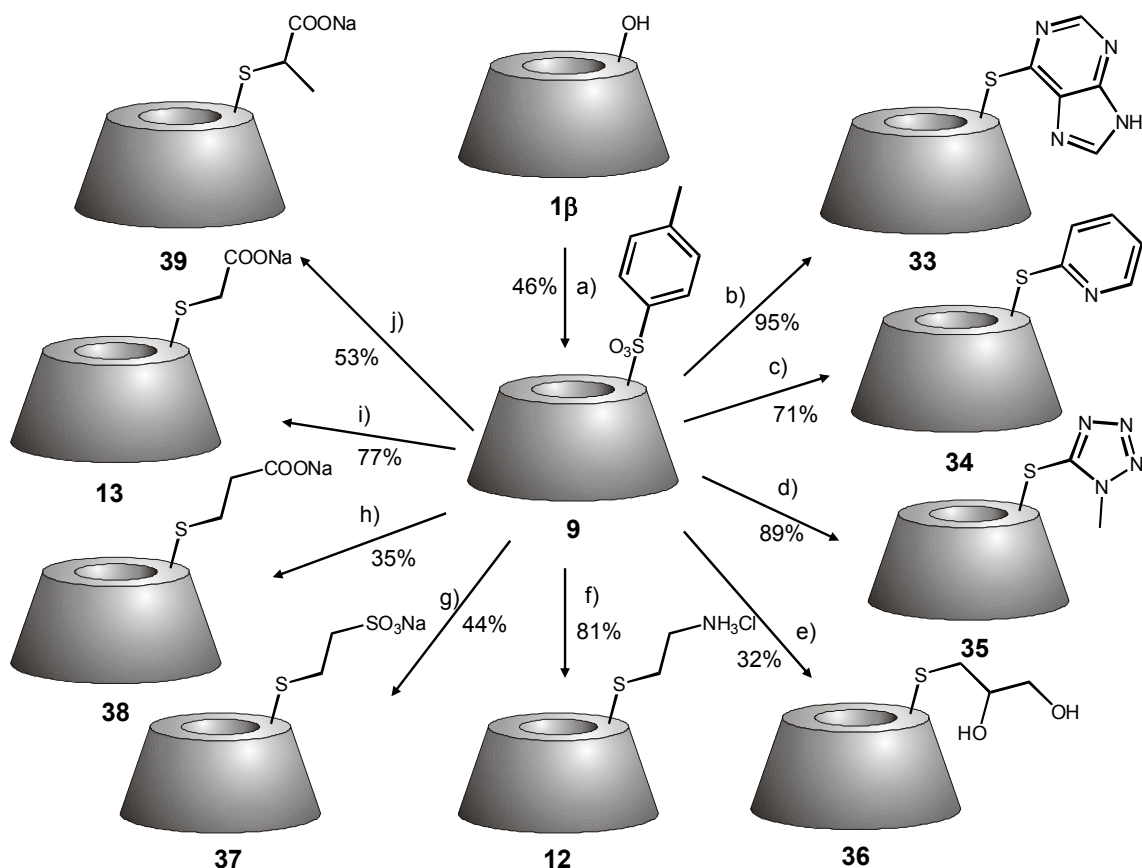
Abbildung 12: Thiolbausteine **24** - **32** als Ergebnis des virtuellen Screening

4.3 Synthese mono-funktionalisierter Cyclodextrine

Die Vorstufe für alle synthetisierten mono-funktionalisierten Verbindungen war Mono-[6-deoxy-6-(*p*-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9**. Bei der Tosylgruppe handelt es sich um eine gute Abgangsgruppe, welche durch Reaktion mit Nucleophilen leicht substituiert werden kann (siehe Schema 7). Als Nucleophile fungierten hier Thiole, die ebenfalls mit weiteren funktionellen Gruppen wie Hydroxylgruppen, Aminen, Carbon- und Sulfonsäuregruppen ausgestattet waren und somit die Möglichkeit zu einer weiteren Funktionalisierung der β -CDs boten. Mono-[6-deoxy-6-(*p*-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** erhielt man aus der Umsetzung von nativem β -CD mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und Kupfersulfat Pentahydrat in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch bei pH 12. Nach einer Reaktionszeit von 20h wurde die Reaktionslösung mit 1M Salzsäure neutralisiert, der kupfer(II)-haltige Niederschlag abzentrifugiert und das Produkt bei 4°C auskristallisiert. Es wurde aus 10 mM EDTA-Lösung umkristallisiert, wodurch letzte Kupferspuren und mehrfach tosylierte Nebenprodukte beseitigt wurden und man das Reinprodukt als weiße Kristalle erhielt. Die erfolgreiche Umsetzung zum monotosylierten Produkt war aus dem Massenspektrum erkennbar. Zusätzlich lieferte das ¹H-NMR-Spektrum zwei Dubletts bei 7.42 und 7.74 ppm, die den aromatischen Protonen zugeordnet werden können. Die Integration dieser beiden Signale betrug jeweils zwei. Im Vergleich dazu betrachtete man das Proton am anomeren C-Atom. Die substituierte Glucoseeinheit lieferte ein Signal bei 4.75 ppm mit der Integration eins und die anomeren Protonen der unsubstituierten Glucoseeinheiten ergaben ein Signal bei 4.83 ppm mit der Integration sechs. Aus diesem Integralverhältnis war eindeutig ein monotosyliertes β -CD Derivat zu identifizieren.

Die weitere Umsetzung des Mono-[6-deoxy-6-(*p*-toluolsulfonyl)]- β -Cyclodextrin **9** zu den Verbindungen **12**, **13** und **33** - **39** erfolgte in den meisten Fällen durch Reaktion mit 10 Äquivalenten des entsprechenden Thiols in Dimethylformamid, wobei Triethylamin als Base verwendet wurde. Nach einer Reaktionszeit von 3 Tagen bei 60°C wurden die substituierten CDs je nach Substituent aus Ethanol oder Aceton ausgefällt. Die weitere Reinigung aller Produkte erfolgte mittels kontinuierlicher Nanofiltration gegen Wasser.

4.3 Synthese mono-funktionalisierter Cyclodextrine



Schema 7: Synthese mono-funktionalisierter β -CDs. a) Tos-Cl, NaOH, ACN/H₂O b) 6-Mercapto-9H-purin **31**, NEt₃, DMF c) 2-Mercapto-pyridin **32**, NEt₃, DMF d) 5-Mercapto-1-methyl-tetrazol **24**, NEt₃, DMF e) 3-Mercapto-propan-1,2-diol **28**, NEt₃, DMF f) 2-Mercapto-ethylamin Hydrochlorid **25**, NH₄HCO₃, DMF/H₂O g) 2-Mercapto-ethansulfonat Natriumsalz **30**, NEt₃, DMSO h) 1) 3-Mercapto-propionsäuremethylester, NEt₃, DMF 2) NaOH i) 1) 2-Mercapto-essigsäuremethylester, NEt₃, DMF 2) NaOH j) 1) 2-Mercapto-propansäuremethylester, NEt₃, DMF 2) NaOH

Bei den Verbindungen **33** - **36** war eine direkte Umsetzung mit den jeweiligen Thiolen in DMF möglich. Lagen die umzusetzenden Thiole als Salze vor, war es aufgrund der Löslichkeiten nicht möglich, die Reaktion in DMF durchzuführen. So wurde bei der Kupplung des 2-Mercapto-ethylamins **25**, welches als Hydrochlorid vorliegt, eine DMF/Wasser-Mischung (1:3) als Lösungsmittel verwendet. Das Natriumsalz der Sulfonsäure **30** wurde erfolgreich in DMSO in einer Ausbeute von 44 % gekuppelt.

Sollte dagegen ein Thiol mit Carbonsäurefunktionalität eingeführt werden (**26**, **27**, **29**), war es notwendig, die Säure vor der Umsetzung zu schützen. Dies wurde hier durch Überführung in die entsprechenden Methylester in Methanol unter

Säurekatalyse erreicht. Die erfolgreiche Veresterung ließ sich aus dem $^1\text{H-NMR}$ nachweisen, da die neu eingeführte Methylgruppe ein scharfes Singulett bei 3.47 im Fall des Thiomilchsäuremethylesters lieferte. Die Methylester konnten dann problemlos mit Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -Cyclodextrin **9** zur Reaktion gebracht werden. Anschließende Verseifung mit 1M NaOH lieferte nach 18h quantitativ die gewünschten Produkte **13**, **38** und **39**.

Der Nachweis der erfolgreichen Umsetzungen konnte in allen Fällen durch den entsprechenden Molekülpeak im Massenspektrum nachgewiesen werden. Weitere Nebenprodukte konnten nicht detektiert werden. Die Monofunktionalisierung war außerdem bei allen Derivaten aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erkennbar. Eine genaue Zuordnung der Signale war aufgrund des Symmetrieverlustes und der sich dadurch ergebenden komplexen Spektren nur mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie möglich. Es konnte jedoch für alle synthetisierten Verbindungen eine eindeutige Identifizierung vorgenommen werden. In Abbildung 13 ist beispielhaft das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfonyl)]- β -cyclodextrin **12** zu sehen.

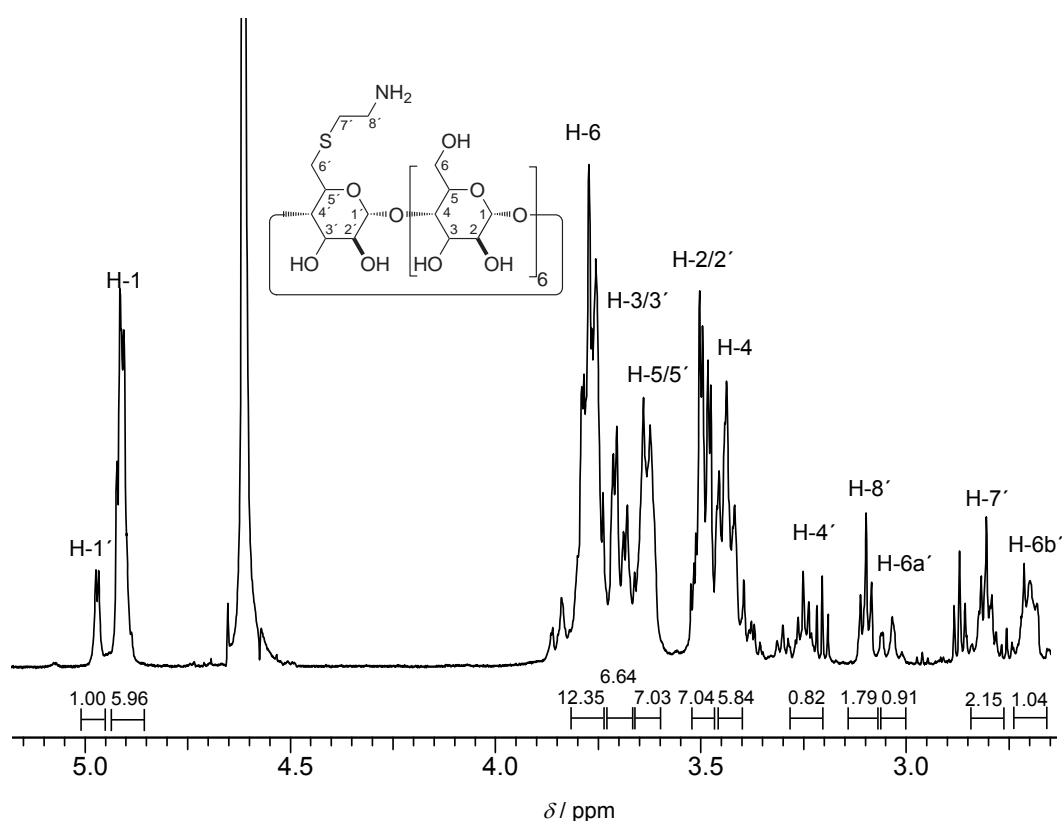


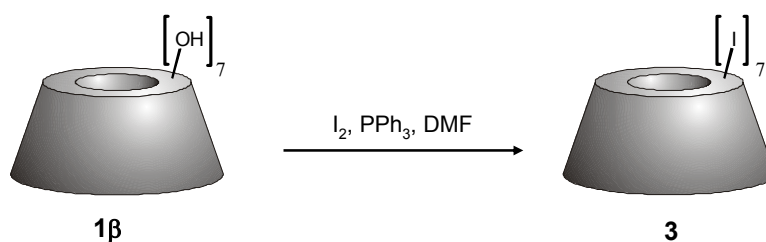
Abbildung 13: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfonyl)]- β -cyclodextrin **12**

Man beobachtete eine Aufspaltung des 1-H-Signals in zwei Signale mit den Integrationen 1 und 6, welche durch die nicht mehr vorhandene C7-Symmetrie verursacht wurde. Zusätzlich erschienen die Signale der eingeführten Thioetherseitengruppen.

In den ^{13}C -NMR-Spektren aller monosubstituierten Derivate kam es zu einer Aufspaltung aller Signale der Glucoseatome, was auf den Verlust der C7-Symmetrie zurückzuführen war und somit ebenfalls einen Hinweis auf die erfolgreiche Umsetzung lieferte. Außerdem kam es zu einem Tieffeldshift des C6'-Signals, beispielsweise bei Mono-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-ethansulfonsäure)]- β -cyclodextrin **37** von 59.6 ppm in Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** auf 61.2 ppm.

4.4 Synthese hepta-funktionalisierter Cyclodextrine

Zur Synthese von hepta-funktionalisierten β -CD Derivaten war es notwendig, eine Vorstufe herzustellen, die leicht weiter umgesetzt werden konnte. In diesem Fall gelang dies über die regioselektive Darstellung von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin **3**. Dieses CD-Derivat war leicht aus der Umsetzung von nativem β -CD mit Iod und Triphenylphosphin zu erhalten und bot mit der Iodfunktionalität einen guten Angriffspunkt für weitere chemische Modifizierungen an der C6-Position.

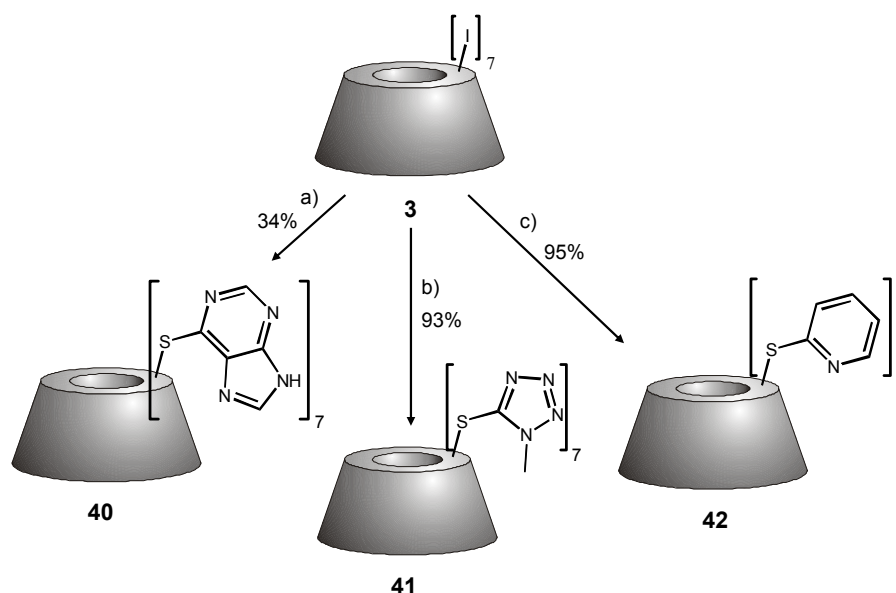


Schema 8: Synthese von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin **3**

Bei der Reaktion kam es immer zum Einschluss von elementarem Iod in die Kavität des CDs. Dieses konnte entfernt werden, indem man die sekundären Hydroxylgruppen von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin **3** acetylierte, die acetylierte Verbindung säulenchromatographisch reinigte und anschließend die

Acetylgruppen wieder abspaltete. Die Acetylierung war notwendig um die Verbindung lipophiler zu machen, da erst in diesem Zustand die Chromatographie über Kieselgel ermöglicht wurde. Eine einfachere Methode zur Entfernung des Iods ist eine Soxhlet-Extraktion mit Methanol, die jedoch geringe Iodspuren zurückließ. Bei den hier beschriebenen weiteren Umsetzung von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin störten geringe Spuren von Iod nicht, sodass auf die aufwendige Prozedur der Acetylierung, Chromatographie und Deacetylierung verzichtet werden konnte. Wie bei der Synthese der monofunktionalisierten CDs erfolgte die Derivatisierung auch bei den hepta-funktionalisierten CDs mit Thiolen, die weitere Funktionalitäten trugen und somit unter Umständen eine weitere Umsetzung möglich machten.

Aus der Umsetzung von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin **3** mit Thiolen erhielt man die Verbindungen **40** - **49**. Die Synthese erfolgte mit einem Überschuss des zu kuppelnden Thiols und Triethylamin als Base in DMF. Es wurden pro umzusetzende Hydroxylgruppe 2.5 Äquivalente des Thiols und äquimolare Mengen der Base eingesetzt.

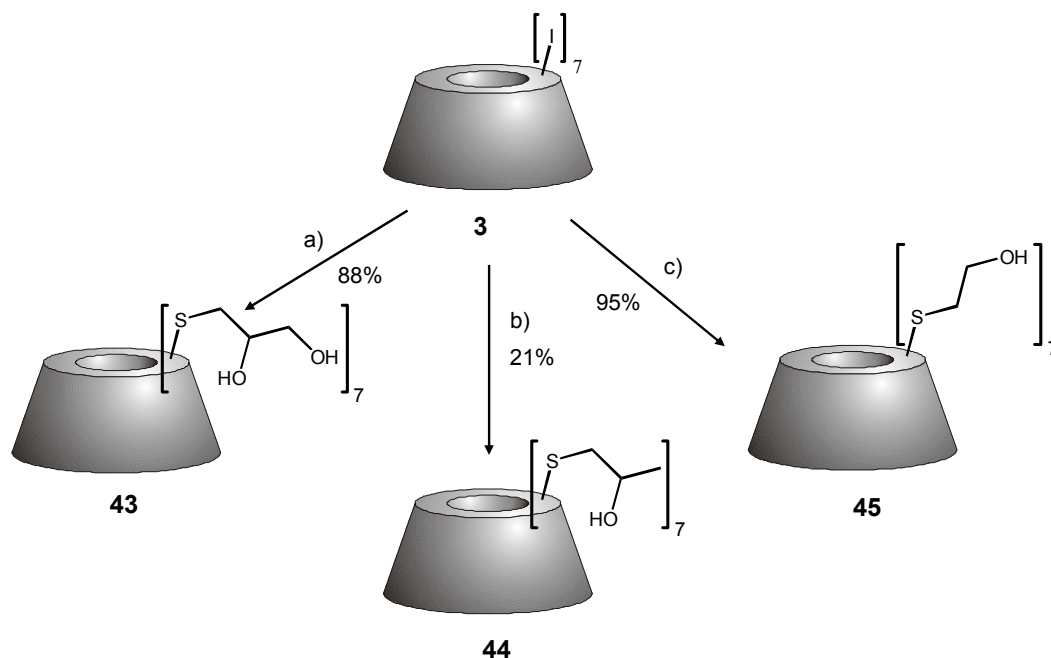


Schema 9: Synthese von hepta-funktionalisierten β -CDs mit aromatischen Gruppen. a) 6-Mercapto-9H-purin **31**, NEt_3 , DMF b) 5-Mercapto-1-methyl-tetrazol **24**, NEt_3 , DMF c) 2-Mercapto-pyridin **32**, NEt_3 , DMF

4.4 Synthese hepta-funktionalisierter Cyclodextrine

Die Synthese der hepta-funktionalisierten β -CD-Derivate **41** und **42** mit aromatischen Gruppen gelang problemlos in DMF (siehe Schema 9). Bei der Darstellung der Verbindung **40** konnte nur eine Ausbeute von 34% erreicht werden, was wahrscheinlich auf unvollständiges Ausfällen bei der Aufarbeitung zurückzuführen ist. Alle β -CD-Derivate sollten anschließend für mikrokalorimetrische Titrationsen und zur Solubilisierung von Wirkstoffen verwendet werden. Dazu müssen die Verbindungen eine gute Löslichkeit in Wasser aufweisen. Dies war bei den Verbindungen **40** - **42** nicht der Fall, da die aromatischen Gruppen die Hydrophobie der CD Derivate deutlich erhöhten. Deshalb konnten diese CDs nicht für weitere Messungen herangezogen werden.

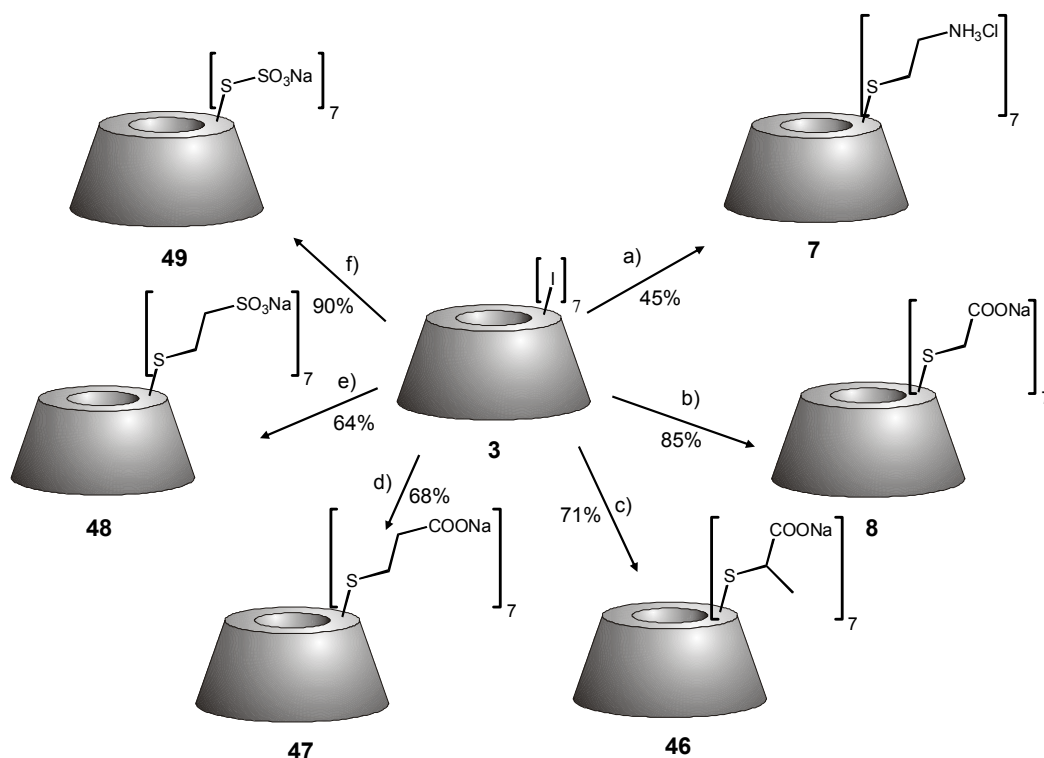
Es ist jedoch gelungen, eine große Zahl von β -CDs mit aliphatischen Gruppen darzustellen, welche eine gute Löslichkeit in Wasser aufwiesen und somit für die weiteren Messungen verwendet werden konnten. Die Synthesen erfolgten nach den oben genannten Standardbedingungen.



Schema 10: Synthese von hepta-funktionalisierten β -CDs mit neutralen aliphatischen Gruppen.
a) 3-Mercapto-propan-1,2-diol **28**, NEt_3 , DMF, b) 1-Mercapto-2-propanol, NEt_3 , DMF, c) 2-Mercapto-ethanol, NEt_3 , DMF

In Schema 10 sind die synthetisierten β -CDs mit neutralen aliphatischen Seitenketten dargestellt. Alle Derivate sind mit Hydroxylgruppen versehen, die für die Löslichkeit der neutralen Verbindungen in Wasser notwendig sind. Eine alternative Möglichkeit zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit ist die gezielte Einführung geladener Gruppen in β -CD. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um anionische oder kationische Gruppen handelt. Die dargestellten β -CDs mit geladenen Seitenketten sind in Schema 11 gezeigt.

Da zu erwarten war, dass die hepta-funktionalisierten Derivate im Vergleich zu den monofunktionalisierten die stabileren Komplexe mit einem bestimmten Gast ausbilden, wurden hier nicht nur die vorgeschlagenen Derivate aus den Ergebnissen des virtuellen Screenings synthetisiert. Ausgehend von dem vorgeschlagen Derivat **43** wurden die Verbindungen **43** und **44** als eine Art homologe Reihe dargestellt. Weiterhin wurde das Derivat **49** synthetisiert, welches dazu verwendet werden sollte, den Einfluss des Schwefels auf die Komplexstabilität zu untersuchen.



Schema 11: Synthese von hepta-funktionalisierten β -CDs mit aliphatischen Gruppen. a) 2-Mercapto-ethylamin Hydrochlorid **25**, NEt_3 , DMF b) 1) 2-Mercaptoessigsäuremethylester, NEt_3 , DMF 2) NaOH c) 1) 2-Mercapto-propionsäuremethylester, NEt_3 , DMF 2) NaOH d) 1) 3-Mercaptopropionsäuremethylester, NEt_3 , DMF 2) NaOH e) 2-Mercapto-ethansulfonat Natriumsalz **30**, NEt_3 , DMSO f) Thiosulfat, DMSO

5 Bestimmung des Komplexierungsvermögens der Cyclodextrin-Derivate

Um die Stabilität der gebildeten Wirt-Gast-Systeme bestimmen zu können, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem UV/VIS-Spektroskopie^[188], Circular dichroismus^[189], Fluoreszenz-Spektroskopie^[190], NMR-Spektroskopie^[191], Elektronenspinresonanz-Spektroskopie^[192], Kapillarelektrophorese, Gas- und Flüssigchromatographie^[193], Leitfähigkeitsmessung^[194] und mikrokalorimetrische Titration^[195]. Die mikrokalorimetrische Titration zählt dabei zu den präzisesten Methoden. Außerdem handelt es sich dabei um die einzige Methode, mit der die Komplexstabilitätskonstante K_s , die Reaktionsenthalpie ΔH^0 sowie die Stöchiometrie n des gebildeten Komplexes direkt bestimmt werden können. Weiterhin bietet diese Bestimmungsmethode den Vorteil, dass keine chromophore oder für den Einschluss sensitive Gruppen notwendig sind und es sich daher um eine sehr universell anwendbare Analytik handelt. Der Einsatz der mikrokalorimetrischen Titration kann nur durch die Löslichkeiten von Wirt und Gast beschränkt werden, da eine ausreichende Wasserlöslichkeit beider Komponenten gegeben sein muss.

Die treibende Kraft für den Einschluss eines Gastes in die Kavität des Cyclodextrins sind solvophobe Wechselwirkungen. So erniedrigen bereits kleine Anteile an organischen Lösungsmittelzusätzen die Komplexstabilität drastisch^[196]. Durch die hydrophile Außenseite der CDs ergibt sich eine relativ gute Wasserlöslichkeit, während das Innere der Kavität durch die apolaren Wasserstoffe H-3 und H-5 sowie die etherähnlichen Sauerstoffbrücken einen hydrophoben Charakter aufweist. Die Komplexierung eines Gastes wird durch ungerichtete Kräfte, wie hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen ermöglicht. Durch den Einschluss nehmen die anziehenden Wechselwirkungen zwischen dem apolaren Gast und der apolaren Kavität des Cyclodextrins zu. Gleichzeitig wird das vor der Komplexierung in der Kavität eingeschlossene Wasser durch den Gast in das umgebende Wasser freigesetzt. Dadurch wird die Bildung eines stabilen Wirt-Gast-Komplexes möglich.

Der Anteil der hydrophoben Wechselwirkungen hängt von der hydrophoben Oberfläche des Gastes ab. Schließt man eine homologe Reihe aliphatischer Gäste in CD ein, so wird ΔG^0 mit jeder zusätzlichen Methylengruppe um den Faktor $2.8 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ negativer^[197]. Höfler untersuchte den Einschluss von para-substituierten Benzoessäurederivaten in β -CD^[43]. Die Änderung der freien Energie ΔG^0 reduziert sich von -6.9 kJ mol^{-1} für Benzoessäure auf $-24.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ für *p-tert*-Butylbenzoessäure. Der Benzolring allein ist zu klein, um die Kavität von β -CD vollständig auszufüllen. Durch die zusätzliche *tert*-Butylgruppe kommt es zu einer Vergrößerung der hydrophoben Fläche des Gastes und damit zu einer besseren Raumausfüllung, einer Abnahme von ΔG^0 und einer stabileren Einschlussverbindung.

Die Bindungsselektivität kann durch polare Gruppen am CD gesteuert werden. Viele der synthetisierten Derivate zeigen verbesserte Eigenschaften in der molekularen Erkennung. Zum Beispiel ist die chirale Selektivität für Aminosäuren bei Mono-(6-deoxy-6-amino)- β -CD **11**^[198, 199] größer als bei nativem β -CD. Sehr interessante Bindungseigenschaften zeigen auch die Hepta-6-deoxy-6-S- β -CD-Derivate^[21, 200, 201], die supramolekulare Strukturen wie molekulare Kapseln^[202, 203] ausbilden können. Ebenso wurde bereits der Beitrag von Coulomb-Wechselwirkungen bei der Inklusion von geladenen Wirkstoffen in statisch substituierte Sulfobutyl-ether- β -CD gezeigt^[204].

Trotz der vielen bereits gemessenen Stabilitätskonstanten von β -CD und seinen Derivaten fehlt bis jetzt ein generelles Verständnis für die spezifischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Wirten und Gästen^[197, 205, 206]. Die detaillierte Kenntnis dieser Wechselwirkungen erlaubt die Synthese von maßgeschneiderten künstlichen Rezeptoren und ist deshalb von essentieller Bedeutung^[207, 208].

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Zum besseren Verständnis der bei der Inklusion eines geladenen Gastes in ein geladenes β -CD Derivat auftretenden Wechselwirkungen wurde das Bindungsverhalten neutraler, kationischer und anionischer β -CD Derivate gegenüber geladenen Gästen untersucht. Dabei wurden die Untersuchungen von Straßnig^[163] weiter vertieft, der para-substituierten *tert*-Butylphenylderivate in geladene CD Derivate inkludierte (Abbildung 14). Diese sind durch ihre Größe dazu in der Lage, die Kavität des β -CDs gut auszufüllen und deshalb resultieren stabile Komplexe^[43].

Straßnig zeigte, dass die Komplexstabilitätskonstanten beim Einschluss verschiedener Gäste in das gleiche CD Derivat erheblich voneinander abweichen, obwohl der hydrophobe Teil des Gastes immer gleich bleibt. Folglich muss die funktionelle Gruppe des Gastes einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des gebildeten Komplexes haben. Die Komplexstabilität beim Einschluss in verschiedene monosubstituierte CD Derivate stieg in folgender Reihe der Funktionalität des Gastes: $\text{Gua}^+ < \text{NH}_3^+ < \text{NMe}_2\text{O} < \text{SO}_3^- < \text{COO}^-$. Diese Reihe korreliert mit den Hydrophobien der Gäste. So bildeten hydrophobere Gäste stabilere Komplexe aus als die hydrophileren. Er zeigt ebenfalls, dass eine Erhöhung der Pufferkonzentration bei gleichem Wirt-Gast-System eine Erniedrigung der Stabilitätskonstanten zur Folge hatte. Dies lässt darauf schließen, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen einen entscheidenden Anteil an der Komplexierung haben und diese bei hoher Ionenstärke durch Abschirmung vermindert wird.

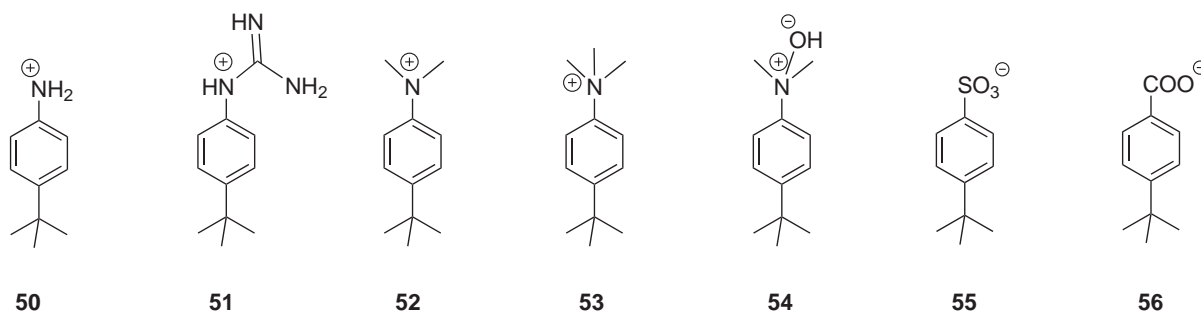


Abbildung 14: Geladene para-substituierte tert-Butylphenylderivate 50 - 56

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Verbindung **50** wurde durch einfache Protonierung von 4-*tert*-Butylanilin mit Salzsäure gewonnen und konnte durch weitere Reaktion mit 1H-pyrazol-1-carboxamidin Hydrochlorid in das Guanidinderivat **51** überführt werden. Die Reaktion von **52** mit Methyljodid lieferte das Trimethylammoniumiodid **53**. Sulfonierung von *tert*-Butylbenzol lieferte **55**, während das neutrale N-Oxid **54** durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid aus **52** erhalten wurde^[209].

Als geladene Wirte wurden zusätzlich zu den bereits vorgestellten Derivaten aus den Kapiteln 3.2 und 3.3 ebenfalls Mono-amino- β -CD **11**, sowie die beiden guanidin-funktionalisierten Derivate **57** und **58**^[210, 211] (Abbildung 15) untersucht.

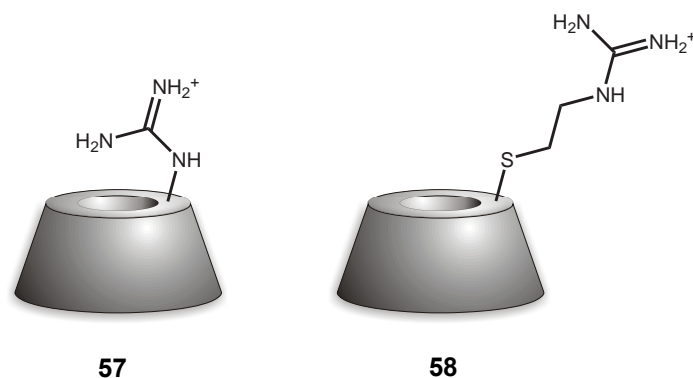


Abbildung 15: Guanidin-funktionalisierte CD Derivate

Die Protonierungskonstanten der heptasubstituierten β -CD Derivate **5**, **7**, **8** und **47** sowie des Gastes **54** wurden in wässriger Lösung durch potentiometrische Titration bestimmt. Die bestimmten pK_S -Werte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Experimentell bestimmte pK_S -Werte

Verbindung	$pK_S^{[a]}$
5	9.50(1), 8.89(1), 8.33(1), 8.07(1), 7.57(1), 7.35(1), 6.75(1)
7	9.99(1), 9.45(1), 9.05(1), 8.72(1), 8.32(1), 7.96(1), 7.37(1)
8	6,10(2), 5.32(2), 4.91(3), 4.37(3), 4.04(3), 3.50(2), 3.01(2)
47	6.49(1), 5.69(1), 5.25(1), 4.75(1), 4.31(1), 3.78(1), <3
54	4.30(1)

^[a] $pK_{S,i}$ (= $-\log K_{S,i}$, $K_{S,i} = [H_{n-i}L] \times [H] \times [H_{n-i+1}L]^{-1}$, 25.0°C, 0.10 M KCl). Fehler (3σ) sind in Klammern angegeben

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

In Abbildung 16 ist beispielhaft die Teilchenverteilung von Heptakis-(6-deoxy-6-amino)- β -CD **5** als Funktion des pH-Werts dargestellt. Die mikrokalorimetrischen Messungen wurden hier standardmäßig bei pH 6.8 durchgeführt. Aus der Teilchenverteilung lässt sich die Ladungszahl des jeweiligen Wirt oder Gastes bei diesem pH-Wert durch Summierung über die Verteilung der relevanten Spezies berechnen.

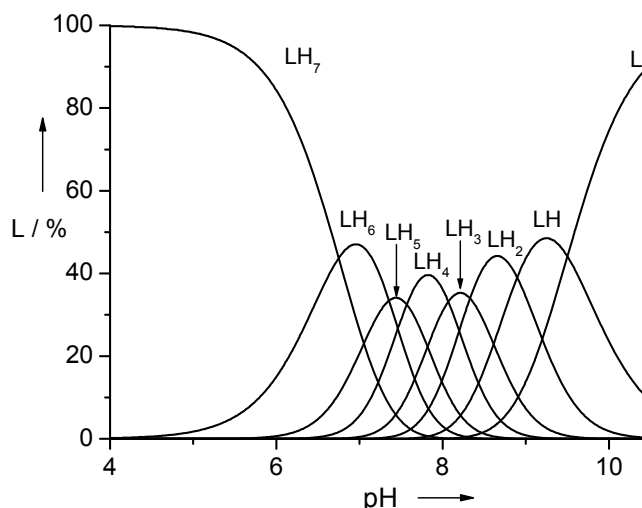


Abbildung 16: Teilchenverteilung für Heptakis-(6-deoxy-6-amino)- β -CD **5** als Funktion des pH-Werts

Speziell für Heptakis-(6-deoxy-6-amino)- β -CD **5** ergab sich eine Ladungszahl von 6.2. Das heißt, es liegt keine vollständige Protonierung bei pH 6.8 vor. Wahrscheinlich liegt der Grund dafür in einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den benachbarten Aminogruppen. Dies führt auch zu einem Abfall der pKs-Werte mit steigendem Protonierungsgrad. Bei dem hepta-kationischen Derivat **7** ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt, da durch die beiden Methylengruppen der Abstand zwischen den einzelnen Ladungen vergrößert wird.

Tabelle 4: Ladungszahlen aus den potentiometrischen Titrationsen bei pH 6.8

CD	1 β	5	7	8	11	12	13	43	46	47	48	49	57	58
Ladung z	0	6.2	6.8	-6.8	1	1	-1	0	-7.0	-6.6	-7.0	-7.0	1.0	1.0

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Die Bindungskonstanten für alle Wirt-Gast-Systeme wurden aufgrund der guten Löslichkeit aller Komponenten in Wasser mittels mikrokalorimetrischer Titration (ITC) bestimmt. Die Titrationsen wurden in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 6.8 durchgeführt. Die Wirte **5** und **7** mit sieben Aminogruppen wurden bei pH 3 titriert, um eine vollständige Protonierung aller Aminogruppen zu erzwingen. Alle Kombinationen der Wirte und Gäste lieferten Einschlussverbindungen, die eine 1:1-Stöchiometrie aufweisen. Aus der Titrationskurve erhielt man mittels nicht-linearer Regression die Komplexstabilitätskonstante K_S , sowie die Bindungsenthalpie ΔH^0 und die Änderung der freien Energie ΔG^0 . In Tabelle 5 sind die mikrokalorimetrischen Daten für den Einschluss eines neutralen, eines kationischen und eines anionischen tert-Butylphenylderivats in die geladenen β -CD Derivate **1 β** , **5**, **7**, **8**, **11 - 13**, **43**, **46 - 49**, **57** und **58** aufgelistet. Obwohl der hydrophobe Teil des Gastes bei allen Verbindungen identisch war, erhielt man sehr große Unterschiede in den Komplexstabilitätskonstanten.

Tabelle 5: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Titration von β -CD Derivaten und tert-Butylphenylderivaten in wässrigem 50 mM Phosphatpuffer

Wirt	Gast	pH	n	K_S / M^{-1}	$\Delta G^0 / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H^0 / \text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta S^0 / \text{kJ mol}^{-1}$
1β	51	6.8	1.00	6400	-21.71 ± 0.03	-16.51 ± 0.05	5.23 ± 0.06
1β	54	6.8	1.07	8010	-22.27 ± 0.04	-14.69 ± 0.05	7.61 ± 0.06
1β	55	6.8	1.16	11600	-23.19 ± 0.03	-17.09 ± 0.04	6.13 ± 0.05
5	51	3.0	1.00	37	-8.93 ± 0.08	-18.03 ± 0.46	-9.07 ± 0.46
5	54	3.0	1.00	74	-10.66 ± 0.17	-1.52 ± 0.06	9.16 ± 0.18
5	55	3.0	0.90	8980	-22.55 ± 0.06	-18.36 ± 0.08	4.22 ± 0.10
7	51	3.0	0.85	11200	-23.10 ± 0.04	-26.99 ± 0.10	-3.84 ± 0.11
7	54	3.0	0.83	30300	-25.57 ± 0.09	-20.75 ± 0.11	4.84 ± 0.14
7	55	3.0	1.04	3410000	-37.27 ± 0.23	-28.35 ± 0.17	8.96 ± 0.28
8	51	6.8	0.84	1150000	-34.57 ± 0.24	-33.49 ± 0.34	1.14 ± 0.42
8	54	6.8	0.84	30900	-25.61 ± 0.04	-22.79 ± 0.08	2.86 ± 0.09
8	55	6.8	0.89	6240	-21.65 ± 0.05	-16.94 ± 0.08	4.74 ± 0.09
11	51	6.8	0.72	2900	-19.75 ± 0.04	-16.35 ± 0.11	3.43 ± 0.12

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

11	54	6.8	0.83	3100	-19.92 ± 0.04	-13.02 ± 0.06	6.91 ± 0.08
11	55	6.8	0.81	9310	-22.64 ± 0.04	-16.12 ± 0.07	6.54 ± 0.08
12	51	6.8	0.93	8120	-22.30 ± 0.03	-18.53 ± 0.07	3.81 ± 0.07
12	54	6.8	1.05	8040	-22.28 ± 0.05	-14.82 ± 0.07	7.49 ± 0.09
12	55	6.8	1.08	22800	-24.86 ± 0.05	-18.80 ± 0.07	6.10 ± 0.08
13	51	6.8	0.93	11000	-23.05 ± 0.05	-17.38 ± 0.08	5.70 ± 0.10
13	54	6.8	1.05	8320	-22.36 ± 0.04	-15.06 ± 0.06	7.32 ± 0.07
13	55	6.8	1.14	7880	-22.23 ± 0.13	-16.78 ± 0.15	5.48 ± 0.20
43	51	6.8	0.88	45500	-26.57 ± 0.05	-31.99 ± 0.11	-5.37 ± 0.12
43	54	6.8	0.91	30900	-25.61 ± 0.07	-24.02 ± 0.13	1.62 ± 0.15
43	55	6.8	0.93	24100	-25.00 ± 0.03	-25.36 ± 0.05	-0.33 ± 0.05
46	51	6.8	0.84	477000	-32.39 ± 0.24	-32.22 ± 0.50	0.23 ± 0.56
46	54	6.8	1.02	11800	-23.23 ± 0.03	-20.13 ± 0.05	3.12 ± 0.05
46	55	6.8	1.06	3430	-20.17 ± 0.03	-16.59 ± 0.06	3.61 ± 0.07
47	51	6.8	0.81	547000	-32.73 ± 0.08	-35.58 ± 0.17	-2.79 ± 0.18
47	54	6.8	0.94	20500	-24.60 ± 0.09	-21.00 ± 0.15	3.62 ± 0.17
47	55	6.8	0.92	6320	-21.68 ± 0.04	-19.25 ± 0.07	2.46 ± 0.08
48	51	6.8	0.75	583000	-32.89 ± 0.21	-32.96 ± 0.41	-0.01 ± 0.46
48	54	6.8	0.84	30900	-25.61 ± 0.04	-22.79 ± 0.08	2.86 ± 0.09
48	55	6.8	0.94	4790	-21.00 ± 0.07	-14.87 ± 0.10	6.15 ± 0.12
49	51	6.8	0.90	37600	-26.10 ± 0.08	-16.61 ± 0.08	9.53 ± 0.13
49	54	6.8	0.99	1680	-18.40 ± 0.11	-15.15 ± 0.19	2.89 ± 0.22
49	55	6.8	0.96	403	-14.86 ± 0.06	-14.21 ± 0.33	0.68 ± 0.34
58	51	6.8	0.89	9170	-22.60 ± 0.12	-19.09 ± 0.16	3.56 ± 0.20
58	54	6.8	0.93	9180	-22.61 ± 0.05	-16.53 ± 0.09	6.10 ± 0.10
58	55	6.8	0.94	19100	-24.42 ± 0.02	-21.71 ± 0.04	2.76 ± 0.05
57	51	6.8	0.85	4420	-20.80 ± 0.03	-17.28 ± 0.07	3.54 ± 0.08
57	54	6.8	0.87	5230	-21.21 ± 0.04	-14.34 ± 0.02	5.69 ± 0.05
57	55	6.8	0.94	18500	-24.34 ± 0.03	-18.52 ± 0.05	5.85 ± 0.06

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Die gemessenen Daten erlaubten eine Unterscheidung zwischen Bindungsaffinität ΔG^{00} , die durch hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen in der Kavität bestimmt wird und Bindungsselektivität $\Delta\Delta G^0$, die durch spezifische polare Wechselwirkungen an der Außenseite des CDs verursacht wird.

Die Bindungsaffinität ΔG^{00} kann gemessen werden, wenn ein neutraler Gast eingeschlossen wird. Bei der Inklusion eines geladenen Gastes unterteilt man die Bindung in Bindungsaffinität ΔG^{00} und Bindungsselektivität $\Delta\Delta G^0$. Die Bindungsselektivität $\Delta\Delta G^0$ ist folglich der Unterschied in der Änderung der Freien Energie beim Einschluss eines geladenen zu einem neutralen Gast.

$$\Delta\Delta G = \Delta G^0 - \Delta G^{00} \quad (1)$$

5.1.1 Einfluss der funktionellen Gruppen des Gastes

Die funktionellen Gruppen, die durch nucleophile Substitution in β -CD eingeführt werden können, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Komplexierungseigenschaften. Um diesen Einfluss genauer zu untersuchen, wurde die Änderung der Freien Energie ΔG^0 für die Komplexierung von anionischen, neutralen und kationischen tert-Butylphenylderivaten in β -CD **1 β** sowie in Mono-amino- β -CD **11** mittels ITC bestimmt (siehe Tabelle 6). Aus Abbildung 9 kann man erkennen, dass schon natives β -CD dazu in der Lage war, zwischen verschiedenen geladenen Gästen zu unterscheiden. Dies ist insofern erstaunlich, weil es selbst ungeladen ist. Die Änderung der Freien Energie ΔG^0 war für negativ geladene Gäste betragsmäßig größer als für diejenigen mit einer positiven Ladung. Die Ladungserkennung des nativen β -CDs^[212, 213] kann auf sein inneres Dipolmoment zurückgeführt werden, das parallel zur C7-Achse und mit der positiven Teilladung auf der primären Seite des CDs angeordnet ist. Im Kristall weist das Dipolmoment einen Wert von 14-20 D^[214] und in Lösung von 2.9-3.7 D^[215, 216] auf.

Für den geladenen Wirt **11** war dieser Effekt wesentlich stärker ausgeprägt. Genau wie bei β -CD **1 β** ergaben sich für die Inklusion von anionischen Gästen

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber *tert*-Butylphenylderivaten

wesentlich stabilere Komplexe. Der Einschluss von kationischen Gästen führte in allen Fällen zu geringeren Stabilitätskonstanten, da es durch die positiven Ladungen sowohl am Wirt als auch am Gast zu einer Abstoßung aufgrund von Coulomb-Wechselwirkungen kam.

Tabelle 6: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss der *tert*-Butylphenylderivate **50** - **66** in β -CD **1 β** und in Mono-(6-deoxy-6-amino)- β -CD **11**

Gast	pH	$\Delta G^0 / \text{kJ mol}^{-1}$ mit β -CD 1β	$\Delta G^0 / \text{kJ mol}^{-1}$ mit Mono- (6-deoxy-6-amino)- β -CD 11
50	3.0	-22.03 ± 0.03	-19.29 ± 0.05
51	6.8	-21.71 ± 0.03	-19.75 ± 0.04
52	3.0	-22.08 ± 0.04	-19.30 ± 0.20
53	6.8	-22.25 ± 0.03	-20.11 ± 0.05
54	6.8	-22.27 ± 0.04	-19.92 ± 0.03
54	3.0	-21.06 ± 0.02	-18.64 ± 0.02
55	6.8	-23.19 ± 0.03	-22.64 ± 0.04
55	3.0	-23.12 ± 0.05	-23.25 ± 0.11
56	6.8	-24.03 ± 0.07	-23.41 ± 0.15

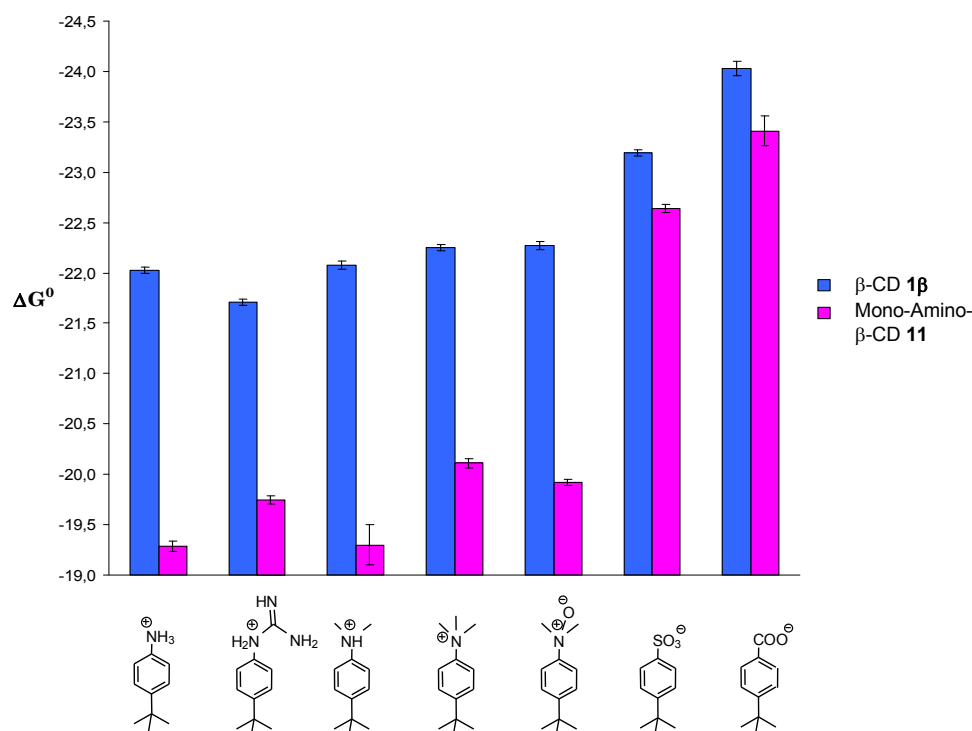


Abbildung 17: Änderung der Freien Energien ΔG^0 für β -CD **1 β** und Mono-amino- β -CD **11** und den Gästen **50** – **56**

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Wie man weiterhin erkennen kann, scheint nur die Ladung des Gastes einen Einfluss auf die Stabilität des gebildeten Komplexes zu haben. Alle kationischen Gäste lieferten sehr ähnliche Werte, sodass die weiteren Messungen nicht mit allen tert-Butylphenylderivaten durchgeführt wurden. Stattdessen wurden die Derivate **51**, **54** und **55** als exemplarische Vertreter eines kationischen, neutralen und anionischen Gastes gewählt. Bei der Wahl dieser Verbindungen spielte die gute Löslichkeit in Wasser die entscheidende Rolle.

5.1.2 Einfluss der funktionellen Gruppen des Wirtes

Im Folgenden wurde der Einfluss der funktionellen Gruppen des Wirtes auf die Komplexierung der hydrophoben Gastmoleküle untersucht. Dazu wurden die Änderungen der Freien Energien ΔG^0 für den kationischen Gast **51**, den neutralen Gast **54** und den anionischen Gast **55** bestimmt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss der Gäste **51**, **54**, und **55** in verschiedene CDs

CD	pH	$\Delta G^0/\text{kJ mol}^{-1}$ mit Gast 51	$\Delta G^0/\text{kJ mol}^{-1}$ mit Gast 55	$\Delta G^{00}/\text{kJ mol}^{-1}$ mit Gast 54
1β	6.8	-21.71 ± 0.03	-23.19 ± 0.03	-22.27 ± 0.04
5	3.0	-8.93 ± 0.08	-22.55 ± 0.06	-10.66 ± 0.17
7	3.0	-23.10 ± 0.04	-37.27 ± 0.23	-25.57 ± 0.09
8	6.8	-34.57 ± 0.24	-21.65 ± 0.05	-25.61 ± 0.04
11	6.8	-19.75 ± 0.04	-22.64 ± 0.04	-19.92 ± 0.04
12	6.8	-22.30 ± 0.03	-24.86 ± 0.05	-22.28 ± 0.05
13	6.8	-23.05 ± 0.05	-22.23 ± 0.13	-22.36 ± 0.04
43	6.8	-26.57 ± 0.05	-25.00 ± 0.03	-25.61 ± 0.07
46	6.8	-32.39 ± 0.24	-20.17 ± 0.03	-23.23 ± 0.03
47	6.8	-32.73 ± 0.08	-21.68 ± 0.04	-24.60 ± 0.09
48	6.8	-32.89 ± 0.21	-21.00 ± 0.07	-25.61 ± 0.04
49	6.8	-26.10 ± 0.08	-14.86 ± 0.06	-18.40 ± 0.11
58	6.8	-22.60 ± 0.12	-24.42 ± 0.02	-22.61 ± 0.05
57	6.8	-20.80 ± 0.03	-24.34 ± 0.03	-21.21 ± 0.04

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Die ΔG^0 -Werte zeigten nur eine minimale Abhängigkeit vom pH-Wert in denjenigen Fällen, in denen die pH-Wert-Änderung keine Änderung des Protonierungszustands von Wirt und/oder Gast bedingte. So betrug die Differenz in der Änderung der Freien Energie $\Delta\Delta G^0 = 0.10 \text{ kJ mol}^{-1}$ für den Einschluss von *tert*-Butylsulfonsäure **55** in natives β -CD **1 β** bei pH 3.0 und pH 6.8. Im Gegensatz dazu zeigten die Messungen für den Gast **54** (N-oxid) und β -CD **1 β** eine deutliche Abhängigkeit der Komplexstabilität vom pH-Wert. Der ΔG^0 -Wert bei pH 6.8 betrug $-22.27 \text{ kJ mol}^{-1}$ und bei pH 3.0 ist $\Delta G^0 = 21.06 \text{ kJ mol}^{-1}$. Gleichzeitig erfolgte eine Ladungsänderung am Gast beim Wechsel des pH-Werts ($pK_s = 4.3$). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass der Protonierungszustand einen entscheidenden Einfluss auf die Komplexstabilität hat.

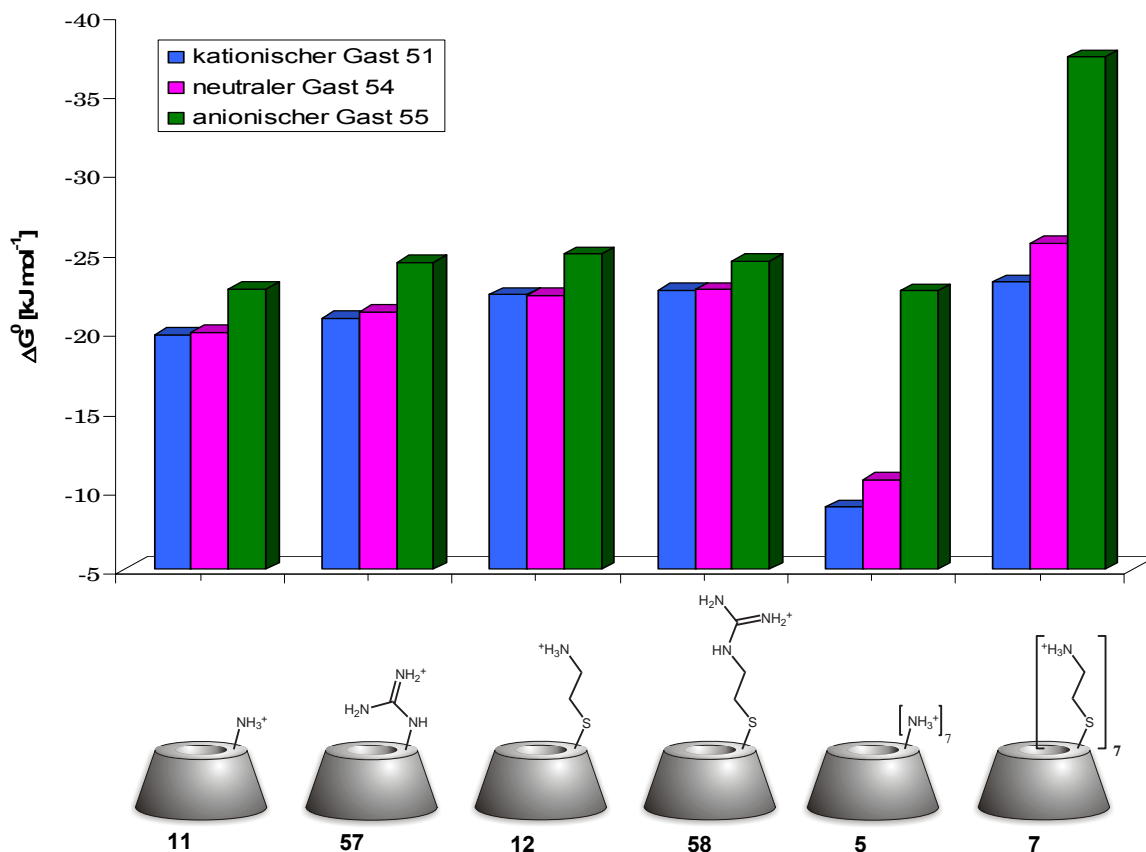


Abbildung 18: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss von **51**, **54** und **55** in kationische β -CD Derivate

In Abbildung 18 und Abbildung 19 kann man deutlich die Fähigkeit der Ladungserkennung der verschiedenen Cyclodextrinderivate bemerken. Für alle Kombinationen, bei denen Wirt und Gast die gleichen Ladungen trugen, ergaben

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

sich die kleinsten Komplexstabilitätskonstanten. Dies ließ sich auf die Coulomb-Abstoßung von Wirt und Gast zurückführen. Betrachtete man dagegen die Inklusion von entgegengesetzt geladenen Gästen und Wirten, erhielt man wesentlich stabilere Komplexe, was ebenfalls aufgrund der resultierenden Anziehungskräfte erklärbar war. Folglich lagen die Werte für den Einschluss des neutralen Gastes zwischen den Werten des kationischen und anionischen Gastes. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Ladungserkennung bei den mono-substituierten CDs in allen Fällen schwächer ausgeprägt war als bei den heptasubstituierten Derivaten. Diese Tatsache war aufgrund der höheren Ladungsdichte bei den heptasubstituierten CDs erklärbar.

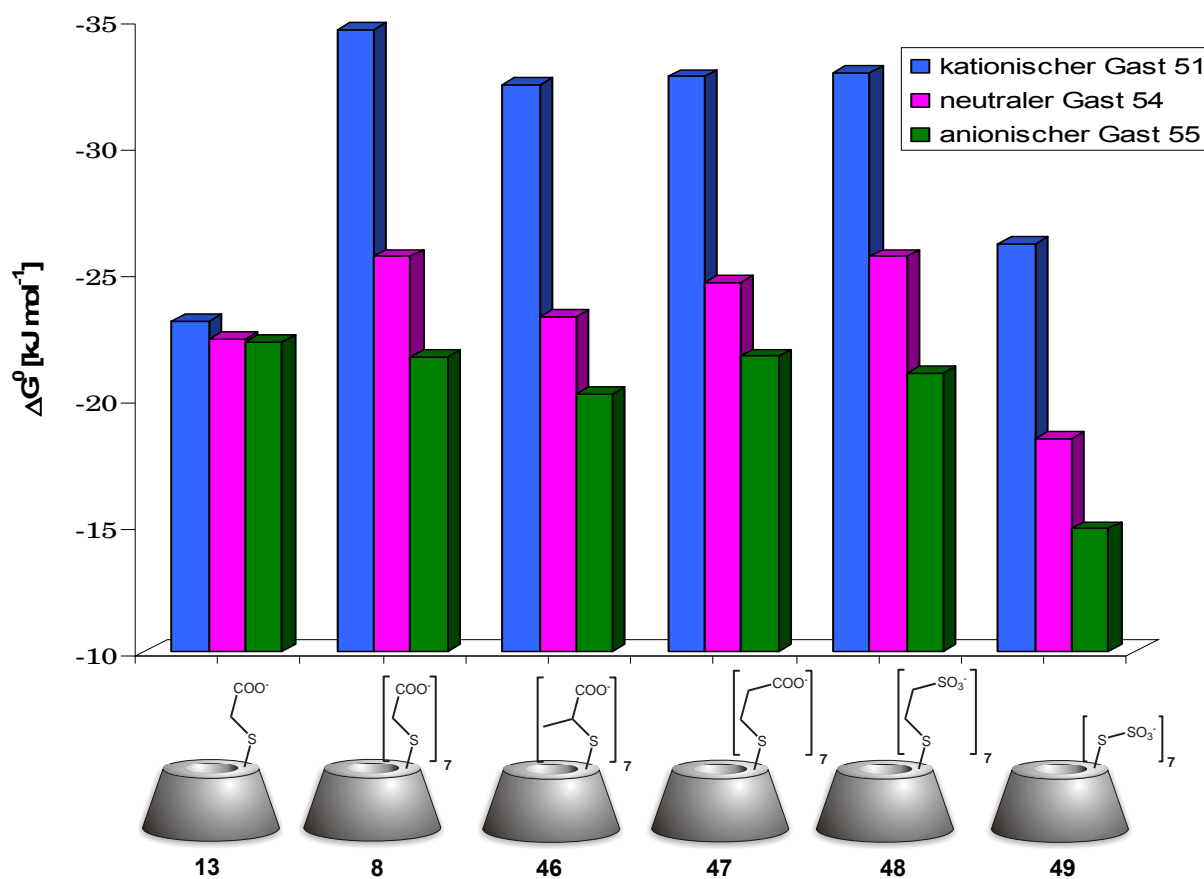



Abbildung 19: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss von **51**, **54** und **55** in anionische β -CD Derivate

Betrachtet man die auftretenden Kräfte beim Einschluss eines neutralen Gastes bei neutralem pH-Wert erhält man die Bindungsaffinität ΔG^{00} . Es fiel auf, dass man die höchsten Werte für die Komplexe mit den Verbindungen **7**, **8**, **43** und

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

46 – 48 erhielt ($\Delta G^0 \approx -25 \text{ kJ mol}^{-1}$). Dabei handelt es sich um heptasubstituierte CDs, die an C-6 Position mit einem Thiol funktionalisiert sind. Die nächsthöheren Werte erreichten die monosubstituierten Thioether **12**, **13**, **58** ($\Delta G^{00} \approx -22 \text{ kJ mol}^{-1}$) und natives β -CD **1 β** ($\Delta G^{00} \approx -22.3 \text{ kJ mol}^{-1}$). Für Mono-amino- β -CD **11** und die guanidinierte Verbindung **75** ergaben sich ΔG^{00} -Werte in der Größenordnung von -21 kJ mol^{-1} , während Hepta-amino- β -CD **5** mit großem Abstand die geringste Bindungsaffinität aufwies. Aus diesen gemessenen Bindungsaffinitäten ließ sich eine Korrelation mit der Hydrophobizität der Atome, die an C-6 des CDs gebunden sind, ableiten.

Die atomaren Inkremente für die Berechnung der $\log P$ -Werte wurden als Maß für die Hydrophobizität genutzt. Bei dem $\log P$ -Wert handelt es sich um den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P in Octanol/Wasser. Dabei wurden der Berechnung die folgenden Werte zugrunde gelegt: OH: -1.4, S: -0.4 und NH_3^+ : -4.6.^[146, 217] Durch Multiplikation dieser Werte mit der Anzahl der Substituenten ergaben sich die Werte in Abbildung 20.

	= N ₇	N ₆ O	O ₇	S ₆ O	S ₇
$\log P$:	-32.2	-13.0	-9.8	-8.8	-2.8

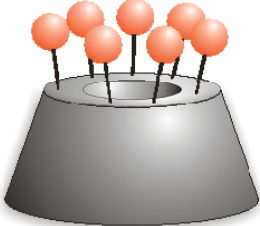


Abbildung 20: $\log P$ der CD Derivate

Aus diesen Werten konnte man deutlich die wesentlich größere Hydrophobie der Schwefelverbindungen und die geringere Hydrophobie der Stickstoffderivatisierten CDs im Vergleich zur Hydroxylgruppe des nativen β -CDs ableiten. In Abbildung 21 ist die Abhängigkeit der Änderung der Freien Energie vom jeweiligen $\log P$ des CD Derivats gezeigt. Man erkennt einen direkten linearen Zusammenhang. Damit war es möglich, die Änderung der Freien Energie beim Einschluss eines neutralen Gastes durch entsprechende Wahl der Substituenten am Cyclodextrin zu steuern.

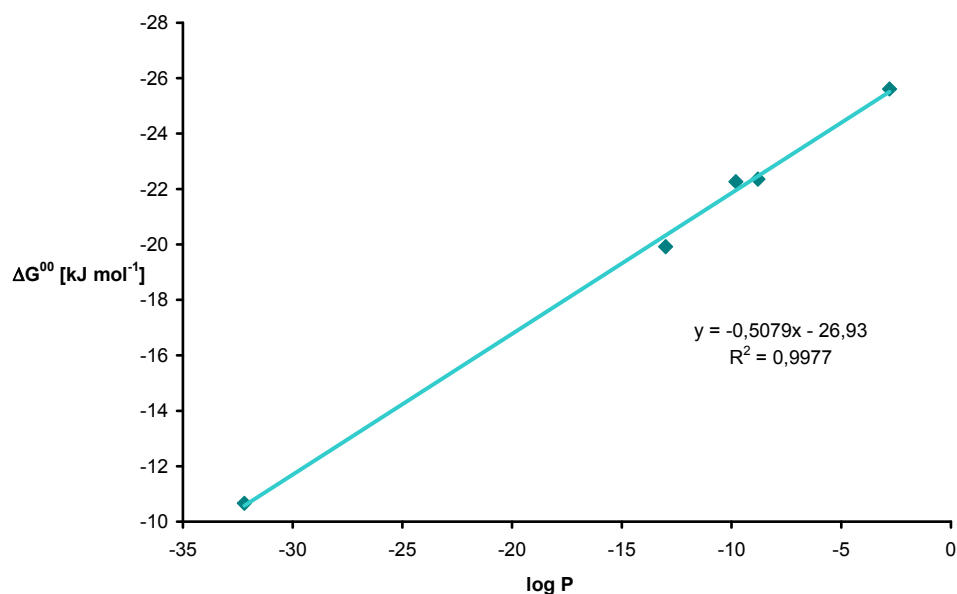


Abbildung 21: Änderung der Freien Energie in Abhängigkeit des $\log P$ beim Einschluss des neutralen Gastes **54** in substituierte CD Derivate

Der Einfluss der hydrophilen Endgruppen schien mit zunehmender Spacerlänge einen immer kleineren Einfluss auf die Bindungsaffinität zu haben. Obwohl die Derivate **7**, **8** und **48** alle einen C2-Spacer, jedoch mit unterschiedlichen Endgruppen, trugen, zeigten sich ähnliche Bindungsaffinitäten (Tabelle 7). Der Einfluss auf die apolare Bindung wurde folglich nur durch die Atome beeinflusst, die nahe an der Kavität des CDs zu finden sind.

5.1.3 Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen und Bestimmung der Orientierung

Neben den bereits genannten Faktoren spielen auch die Endgruppen des CDs eine entscheidende Rolle. Dieser Effekt wurde bereits in Abbildung 17 verdeutlicht. Die Bindungskonstanten für kationische Gäste in einem kationischen CD Derivat sind deutlich geringer als die für anionische Gäste. Um diesen Effekt genauer zu beschreiben und damit eine Aussage über die Bindungsselektivität treffen zu können, wurden die elektrostatischen Wechselwirkungen $\Delta\Delta G^0$ für alle Wirte aus den Differenzen der Änderungen der Freien Energien $\Delta\Delta G^0$ zwischen den geladenen Gästen **51** und **55** im Vergleich zu der des neutralen Gastes **54** untersucht.

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Die berechneten Differenzen der Änderungen der Freien Energien sind in Tabelle 9 aufgeführt. Zusätzlich wurden die Spacerlängen r_s berechnet, um so den Abstand zwischen den Ladungen zu bestimmen. Dazu wurde für jede einzelne Bindungslänge mit Hilfe von Formel 2 die Projektion auf die Ebene berechnet. Dabei steht l_i für die jeweilige Bindungslänge und ϑ_i für den entsprechenden Bindungswinkel. Durch Summieren über die einzelnen Inkremente r_i erhält man die gesuchte Spacerlänge r_s .

$$r_i = l_i \sin \frac{\vartheta_i}{2} \quad (2)$$

Tabelle 8: Bindungslängen l_i und Inkremente r_i zur Berechnung der Spacerlängen r_s

Bindung	l_i / nm	r_i / nm
C–N	0.147	0.120
C=N	0.130	0.130
C–C	0.154	0.126
C–S	0.182	0.149
S–O	0.175	0.143
S–S	0.204	0.167

Man erhält für die Bindungsselektivitäten sowohl positive als auch negative Werte. Das bedeutet, dass abstoßende und anziehende Wechselwirkungen stattfinden. Dabei ist keine der Wechselwirkungen symmetrisch, sondern die anziehenden Wechselwirkungen sind immer stärker. Der Grund dafür liegt darin, dass die Orientierung des Gastes in der Kavität von den funktionellen Gruppen des Wirtes abhängig ist. Der Gast ist dazu in der Lage, den abstoßenden Wechselwirkungen auszuweichen, indem er den Abstand zwischen den gleichen Ladungen erhöht. Zur Bestimmung der Orientierung der Gäste in der Kavität wurden ROESY-NMR-Spektren der Komplexe gemessen. Bei dieser Messmethode, die auf dem Kern-Overhauser-Effekt (NOE) beruht, ist es möglich, Wechselwirkungen zwischen H-Atomen durch den Raum darzustellen. Da der Effekt mit r^{-6} abnimmt, sind nur Wechselwirkungen von Atomen, die einen Abstand kleiner als 3 Å haben erkennbar.

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Tabelle 9: Bindungsselektivitäten der Wirte **1 β** , **5**, **7**, **8**, **11**, **12**, **13**, **43**, **46** - **49**, **57** und **58** sowie Spacerlängen r_s und Ladungszahlen z_w

Wirt	$\Delta\Delta G^0/\text{kJ mol}^{-1[\text{a}]}$	$\Delta\Delta G^0/\text{kJ mol}^{-1[\text{a}]}$	$r_s / \text{nm}^{[\text{b}]}$	$z_w^{[\text{c}]}$
	mit Gast 55	mit Gast 51		
1β	-0.92	0.56	-	0.0
5	-11.89	1.73	0.233	6.2
7	-11.70	2.47	0.544	6.8
8	-8.96	3.96	0.537	-6.8
11	-2.72	0.17	0.147	1.0
12	-2.58	0.00	0.544	1.0
13	-0.69	0.13	0.537	-1.0
43	-0.96	0.62	-	0.0
46	-9.17	3.06	0.537	-7.0
47	-8.14	2.92	0.663	-6.6
48	-7.28	4.62	0.716	-7.0
49	-7.70	3.54	0.459	-7.0
58	-1.82	0.00	0.657	1.0
57	-3.13	0.42	0.250	1.0

[a] Anteil der elektrostatischen Wechselwirkungen zur Änderung der Freien Energie, [b] Spacerlänge, [c] Ladung des Wirtes

Die Inklusion eines Gastes kann grundsätzlich zu zwei verschiedenen Orientierungen führen (Abbildung 22). Den ersten gezeigten Fall erwartet man bei entgegengesetzt geladenen Wirt-Gast-Systemen. Definiert man das CD immer mit der primären Seite nach oben, spricht man in diesem Fall von einer „Aufwärts-Orientierung“. Den umgekehrten Fall, die „Abwärts-Orientierung“ erwartet man bei gleichen Ladungen an Wirt und Gast.

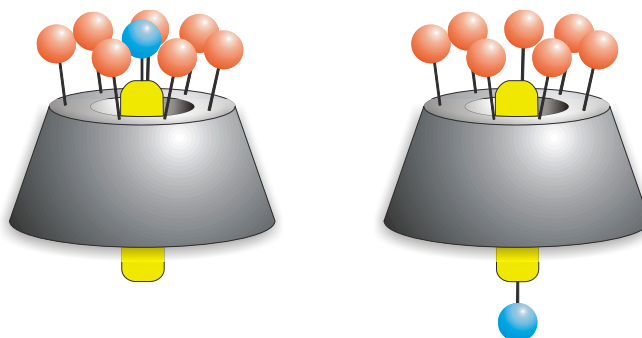


Abbildung 22: Orientierungsmöglichkeiten beim Einschluss eines geladenen Gastes in ein hepta-substituiertes CD-Derivat

In allen Fällen beobachtete man Kreuzpeaks zwischen den aromatischen Protonen des Gastes und H-3 und H-5 des CDs, die innerhalb der Kavität liegen. Dies spricht dafür, dass der aromatische Teil des Gastes vollständig in die Kavität eingeschlossen wird. Eine Ausnahme bildete der Komplex **5·50** (Abbildung 24), da hier nur die Protonen neben der *tert*-Butylgruppe inkludiert wurden, während die Protonen neben der Aminogruppe aus der Kavität herausragten.

Die Zahlen im Komplex in Abbildung 24 stehen für die relativen Integrationen der jeweiligen Peaks. Aus diesen Werten ließ sich die Orientierung der Gäste in der Kavität bestimmen. Es ist für die Auswertung der ROESY-Spektren zwingend erforderlich, dass man die genaue Zuordnung der einzelnen Protonen von Wirt und Gast durchführen kann. Bei den Cyclodextrinderivaten ist die Zuordnung nur mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Spektren möglich. Außerdem dürfen die Signale der für den Einschluss relevanten Protonen nicht überlagern, da sonst keine Integration möglich ist.

Bei der Komplexierung von **50** in β -CD **1 β** kam es zur Überlagerung der Signale von H-3 und H-5, wodurch eine Integration und damit die Bestimmung der Orientierung nicht möglich waren. Um trotzdem eine Aussage über diesen Komplex treffen zu können, wurde der ähnliche Gast **59** inkludiert, der nicht zu einer Überlagerung führte, und die Auswertung der Spektren ermöglichte. Wegen der sehr ähnlichen Strukturen kann man davon ausgehen, dass die Orientierung der beiden Gäste in der Kavität die gleiche ist.

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

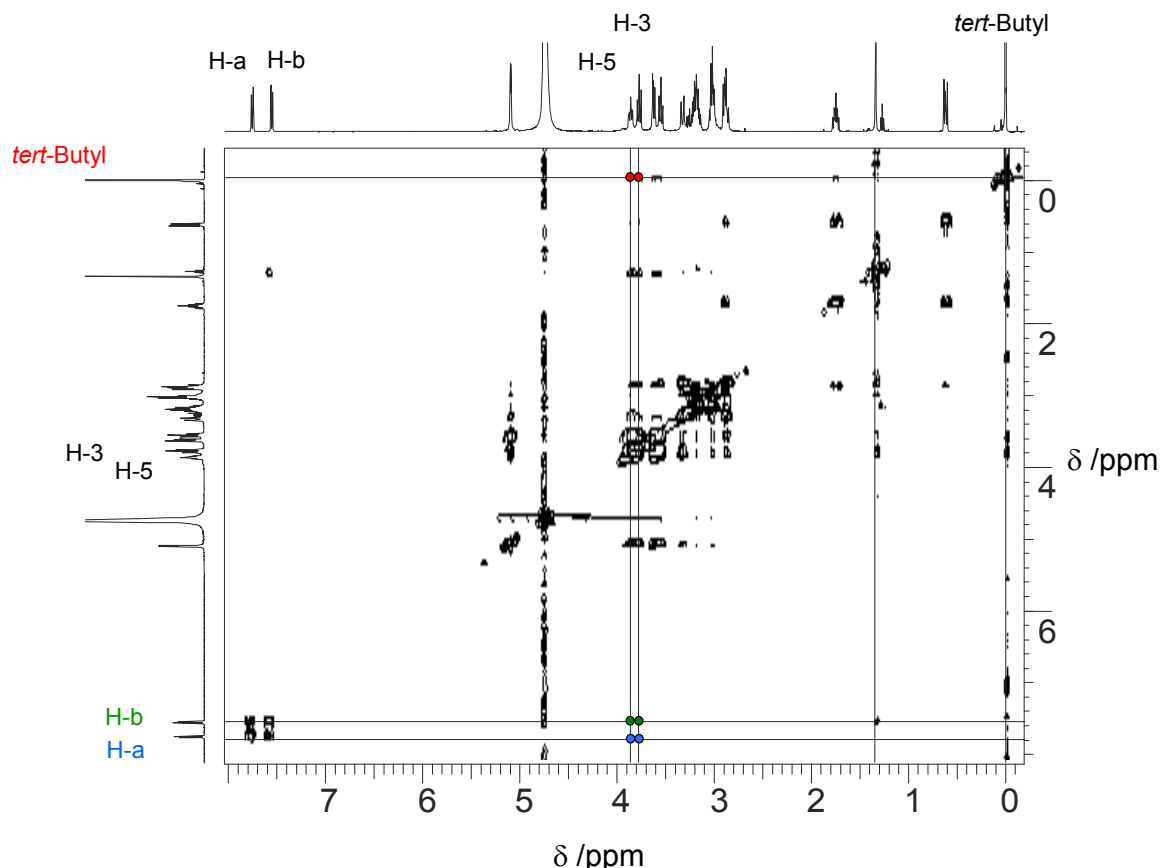


Abbildung 23: ROESY-Spektrum von 48 mit 55

Aus den Schnittbildern der Einschlussverbindungen kann man erkennen, dass die Orientierung des Gastes im CD durch Coulomb-Wechselwirkungen bestimmt wurde. Trugen Wirt und Gast die gleichen Ladungen (z.B. **48**·**55**), orientierte sich der Gast mit seiner Funktionalität auf die sekundäre Seite des CDs. Dadurch wurde der Abstand zwischen den Ladungen maximal und die abstoßenden Kräfte wurden so gering wie möglich gehalten. Blieb man beim gleichen Gast und betrachtete die Orientierung bei der Inklusion in ein entgegengesetzt geladenes CD (z.B. **5**·**55**), stellte man fest, dass sich die Ausrichtung des Gastes um 180° gedreht hatte. Die funktionellen Gruppen von Wirt und Gast versuchten sich so nahe wie möglich zu kommen, um die elektrostatischen Anziehungskräfte zu maximieren. Die Funktionalität des Gastes war bei entgegengesetzten Ladungen von Wirt und Gast immer auf der primären Seite des CDs zu finden.

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

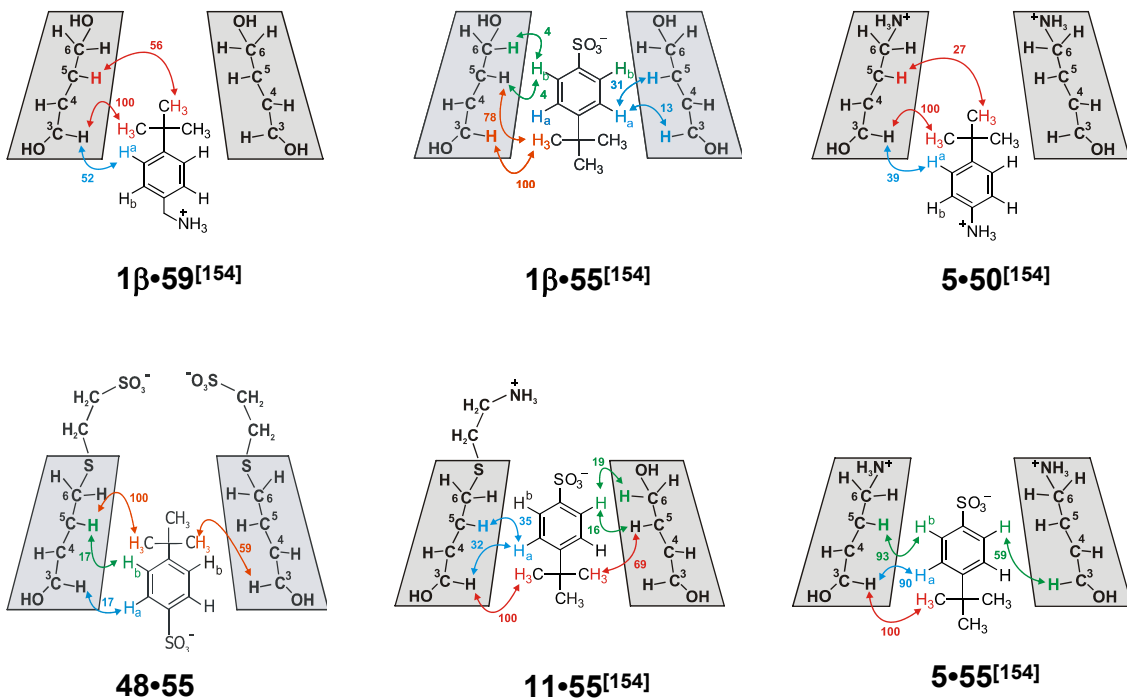


Abbildung 24: Schnittbilder verschiedener CD-Komplexe mit Integration der ROESY-Spektren

Beim Einschluss in neutrale CDs treten keine Coulomb-Kräfte auf, jedoch besitzt jedes CD ein natürliches Dipolmoment, aufgrund dessen die Ausrichtung des Gastes in der Kavität erfolgt. Das Dipolmoment von β-CD ist so orientiert, dass die positive Teilladung auf der primären Seite liegt. Bei der Komplexbildung eines Gastes erfolgt die Orientierung so, dass sich die Dipolmomente von Wirt und Gast antiparallel anordnen. Die Ausrichtung der Gäste im CD ist nie zufällig oder statistisch verteilt, sondern wird von Dipol-Dipol- und Coulomb-Wechselwirkungen eindeutig festgelegt. Sind die Coulomb-Wechselwirkungen anziehend ($\Delta\Delta G^0 < 0$), kommt es zu einer Aufwärtsorientierung und im umgekehrten Fall ($\Delta\Delta G^0 > 0$) zu einer Abwärtsorientierung des Gastes.

Die gemessenen Änderungen in den freien Energien beim Einschluss eines geladenen zu einem neutralen Gast konnten mit berechneten Coulomb-Energien verglichen werden. Die Berechnung der Coulomb-Energien erfolgte nach Formel 3.

$$E_{Coul} = \frac{N_A e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{z_w z_g}{r} e^{-r_{eff}/\lambda_D} \quad (3)$$

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Dabei steht N_A für die Avogadro-Konstante, e für die Elementarladung, ϵ_0 und ϵ_r für die allgemeine und relative Dielektrizitätskonstante, z_w und z_g für die Ladungszahlen von Wirt und Gast, r für den Abstand zwischen den Ladungen, r_{eff} für die effektive Länge, bei der es zur Abschirmung kommt und λ_D für die Debye-Länge. Der Abstand zwischen zwei Ladungen r wird von der Orientierung des Gastes in der Kavität und von der Länge des Spacers r_s bestimmt.

$$r = r_0 + r_s \quad (4)$$

In Fall einer Aufwärtsorientierung wurde für r_0 der Wert 0.3 nm angenommen, was dem inneren Radius der Kavität von β -CD entspricht. Im Fall einer Abwärtsorientierung des Gastes in der Kavität wurde die Höhe der Kavität mit $r_0 = 1.0$ nm angenommen. Die Bestimmung der Länge der Spacergruppe r_s zwischen C-6 und der geladenen Gruppe erfolgte durch Projektion der Bindungslängen auf die Ebene unter Annahme der jeweiligen Bindungswinkel (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).

Der Abschirmeffekt durch Wolken von entgegengesetzt geladenen Ionen um die funktionelle Gruppe wird quantitativ durch die Debye-Hückel-Onsager-Theorie^[218] beschrieben. Lee^[219] beschrieb 2002 eine vereinfachte Formulierung für die Berechnung von Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Proteinen in wässriger Lösung, wobei die Debye-Länge bei 289K proportional zu \sqrt{I} ist.

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (5)$$

Es wurde angenommen, dass die Pufferionen nicht in die Kavität des CDs eindringen können und dass die Bildung der Ionenwolke teilweise durch sterische Hinderung erschwert wird. Aus diesem Grund wurde eine effektive Länge r_{eff} definiert, innerhalb der es zu Abschirmung kommt. Als effektive Länge r_{eff} wurde die Spacerlänge r_s um eine Bindungslänge vermindert angenommen.

$$r_{eff} = r_s - 0.15nm \quad (6)$$

5.1 Untersuchung des Bindungsverhaltens gegenüber tert-Butylphenylderivaten

Die Auftragung der berechneten Coulomb-Energien nach Formel 3 gegen die experimentell bestimmten elektrostatischen Wechselwirkungen $\Delta\Delta G^0$ ist in Abbildung 25 gezeigt. Man erhielt bei einer Ionenstärke von $I = 0.2M$ eine Gerade mit einem sehr guten Korrelationskoeffizient von 0.97 und der Steigung 1. Dies bestätigte das gewählte Modell. Der vernachlässigbar kleine Ordinatenabschnitt bei $E_{coul} = 0$ betrug $\Delta\Delta G^0 = -0.5 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$.

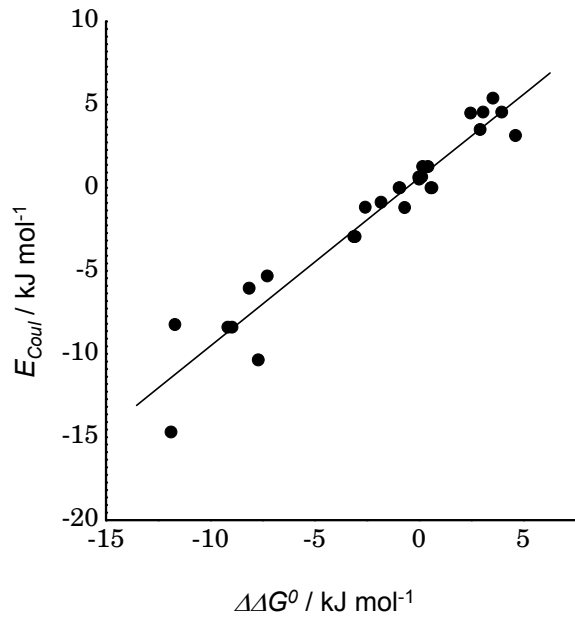


Abbildung 25: Berechnete Coulomb-Energien in Abhängigkeit von den gemessenen elektrostatischen Wechselwirkungen $\Delta\Delta G^0$

Dieser Wert sprach dafür, dass die Bindungselektivität $\Delta\Delta G^0$ ausschließlich auf Coulomb-Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

5.2 Solubilisierung von Wirkstoffen

Alle Wirkstoffe müssen eine gewisse Wasserlöslichkeit besitzen, um pharmazeutisch aktiv zu sein. Gleichzeitig sind die meisten Wirkstoffe lipophil, um die biologischen Membranen mittels passiver Diffusion passieren zu können. Ist ein Molekül zu hydrophil, kann diese Diffusion nicht stattfinden. Viele der bekannten Wirkstoffe sind aus diesem Grund lipophil und damit ist die Löslichkeit in Wasser nicht oder nur in geringem Ausmaß gegeben. Durch den Einschluss der Wirkstoffe in die Kavität eines CDs ist es möglich, eine Steigerung der Löslichkeit, eine Stabilisierung und größere Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs zu erreichen.

Ein Beispiel für die Anwendung eines CDs zur Solubilisierung stellt der entzündungshemmende Wirkstoff Piroxicam dar. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser wird die Substanz als β -CD-Komplex unter dem Namen Brexin vermarktet. Ein weiteres Beispiel ist die Umkehrung der neuromuskulären Blockade durch Rucoronium mit Sugammadex. Bei Sugammadex handelt es sich um Oktakis-[6-deoxy-6-(S-mercaptopropionsäure)]- γ -Cyclodextrin. Durch die Zugabe des CDs bildet sich ein Komplex aus, dadurch kann der Wirkstoff nicht mehr an den Acetylcholinrezeptor der motorischen Endplatte binden. Die Bildung eines solch stabilen Komplexes ist aus zwei Gründen möglich. Zum einen kommt es durch die Spacergruppen zu einer Vergrößerung der hydrophoben Kavität, andererseits bewirken die entgegengesetzten Ladungen an Wirt und Gast eine zusätzliche Stabilisierung aufgrund von anziehenden Coulomb-Wechselwirkungen.

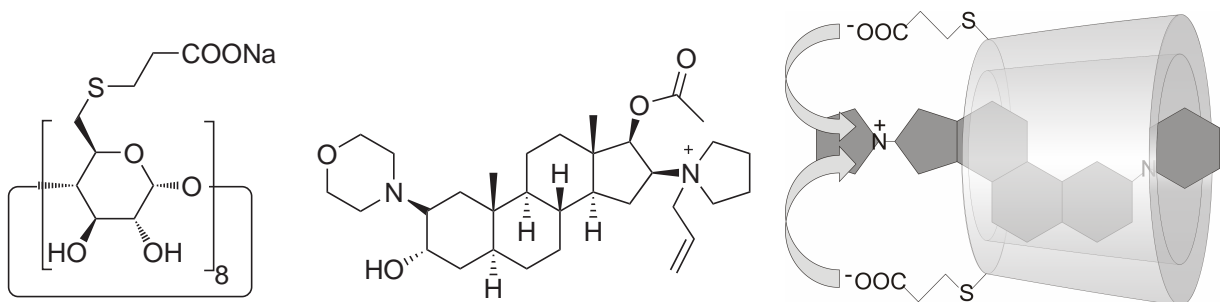


Abbildung 26: Strukturen von Sugammadex und Rucoronium sowie Struktur des resultierenden Komplexes

Ein anderes CD-Derivat, das zur Verkapselung von Wirkstoffen eingesetzt wird, ist Sulfobutylether- β -CD^[220], das unter dem Namen Captisol vermarktet wird. Durch die Ladungen der Sulfonsäuregruppen wird eine gute Löslichkeit in Wasser bedingt. Die Fähigkeit zur Komplexbildung von wasserunlöslichen Wirkstoffen ist bei Sulfobutylether- β -CD stärker ausgeprägt als bei nativem β -CD.^[221]

Tabelle 10: β -CD-Derivate mit pharmazeutischer Anwendung

Cyclodextrin	Substituent
Hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD)	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$
Sulfobutylether- β -CD (SB- β -CD)	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}$
statistisch methyliertes β -CD (RDM- β -CD)	$-\text{CH}_3$
verzweigtes β -CD	Glucosyl oder Maltosyl

In Tabelle 10 sind weitere β -CD Derivate aufgeführt, die zum Transport von Wirkstoffen verwendet werden. Hydrophile β -CD-Derivate werden bei niedriger bis moderater oraler Dosierung als nicht-toxisch betrachtet.^[222] Die nativen CDs (α -CD, β -CD und γ -CD) werden im Darm fermentiert. Lipophile Derivate wie RDM- β -CD können vom Verdauungstrakt in den Blutkreislauf gelangen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass RDM- β -CD nach parenteraler Applikation eine toxische Wirkung aufweist.^[223]

Nach den systematischen Untersuchungen zum besseren Verständnis der bei der Inklusion auftretenden Wechselwirkungen, wurden im zweiten Teil Zytostatika als Gäste verwendet. Im Speziellen wurden in dieser Arbeit die Wirkstoffe Camptothecin, Idarubicin und Docetaxel eingesetzt. Diesen Molekülen ist gemeinsam, dass sie eine schlechte Löslichkeit in Wasser aufweisen, die die Applikation erschwert und mit Nebenwirkungen verbunden ist. Durch den Einschluss in die Kavität der CD-Derivate könnte die Wasserlöslichkeit deutlich gesteigert werden, wodurch die Verabreichung der Medikamente erleichtert werden würde. Gleichzeitig könnten mögliche Nebenwirkungen vermindert werden.

5.2.1 Camptothecin

Camptothecin ist ein Topoisomerase I Inhibitor und wurde erstmals 1966 von Wall^[224] aus dem in China vorkommenden Baum *Camptotheca acuminata* isoliert. Der Wirkstoff zeigt eine hohe antineoplastische Aktivität und könnte gegen Krebserkrankungen von Lunge, Prostata, Brust, Magen, Darm, Eierstöcke, Haut und Lymphsystem eingesetzt werden.^[172, 225] Trotz der hohen Antitumor-Aktivität *in vitro* kann das Potential von CPT *in vivo* nicht ausgeschöpft werden. Dies liegt zum einen an der schlechten Löslichkeit in Wasser und zum anderen an der Öffnung des Lactonrings unter physiologischen Bedingungen, wobei ein Carboxylat und ein Alkohol gebildet werden.^[226, 227] Die Zerstörung des Lactons wirft mehrere Probleme auf. Die Carboxylatform ist nicht mehr aktiv, da der Lactonring für die passive Diffusion in Krebszellen und für die Wechselwirkung mit Topoisomerase benötigt wird.^[228] Außerdem wird vermutet, dass das gebildete Hydroxycarboxylat die beobachteten Nebenwirkungen verursacht.^[229, 230] Deshalb ist es für die Anwendung als Zytostatika essentiell, dass der Lactonring geschlossen bleibt.

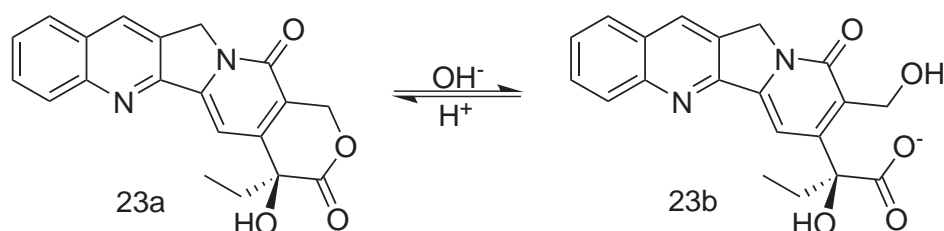


Abbildung 27: pH-abhängiges Gleichgewicht bei CPT **23**. rechts: Lactonform, links: Carboxylatform

Zur Solubilisierung des Wirkstoffs CPT **23** wurden sowohl mono- als auch hepta-substituierte β -Cyclodextrinderivate verwendet. Da CPT sich nur sehr schlecht in Wasser löst, war die Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten K_S nicht mit isothermer Titrationsmikrokalorimetrie möglich. Stattdessen erfolgte die Bestimmung nach der Methode der Löslichkeitsisothermen von Higuchi und Lach^[231]. Diese Methode wurde bereits von Kang^[179] zur Untersuchung von CPT-Cyclodextrin-Komplexen angewendet.

Kang untersuchte die Komplexierung von Camptothecin in nativem β -CD, statistisch methyliertem β -CD (RDM- β -CD) und statistisch hydroxypropyliertem

β -CD (HP- β -CD). Dabei konnte er zeigen, dass die CPT-Konzentration in Lösung mit steigender CD-Konzentration linear ansteigt. In Tabelle 11 sind die bestimmten Komplexstabilitätskonstanten K_S aufgeführt.

Tabelle 11: Bindungskonstanten K_S und Freie Bindungsenergien ΔG^0 für CPT **23** in 20mM HCl^[179]

CD-Derivat	K_S [M^{-1}]	ΔG^0 [kJ/mol]
β -CD	266	-13.83
RDM- β -CD	910	-16.88
HP- β -CD	160	-12.58

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von CPT in reinem Wasser, wurde der Extinktionskoeffizient in DMSO und in einem 1:1-Gemisch aus DMSO/Wasser bestimmt. Zur Messung wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von $d = 1\text{cm}$ verwendet. Das Absorptionsmaximum lag bei $\lambda_{\max} = 368\text{nm}$, die Auftragungen sind in Abbildung 62 gezeigt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Formel 7) ergibt sich der Extinktionskoeffizient ε aus der Steigung der Geraden zu $\varepsilon = 42282\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (7)$$

Zur Messung der Löslichkeitsisothermen wurde von jedem CD-Derivat eine Konzentrationsreihe in 20 mM HCl hergestellt. Die Lösungen wurden mit CPT gesättigt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, um eine Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Durch die Verwendung der verdünnten Salzsäure als Lösungsmittel wurde sichergestellt, dass sich das Camptothecin in der aktiven Lactonform befindet. Es wurde vom nicht gelösten Wirkstoff abfiltriert und der Gehalt an Camptothecin in Lösung mittels UV-Spektroskopie bestimmt. In einem gesonderten Experiment wurde die Nullpunktlöslichkeit $[G]_0$ von Camptothecin im verwendeten Lösungsmittel ohne den Zusatz eines Cyclodextrins bestimmt. Dieser Messwert wurde als Blindwert von allen bestimmten Konzentrationen subtrahiert. Die Nullpunktlöslichkeit von CPT in 20 mM HCl betrug $[G]_0 = 2.11 \pm 0.24\mu\text{M}$.

Bildet sich ein Komplex mit der Stöchiometrie 1:1 aus, kann K_s nach Formel 8 aus der Steigung B der Auftragung der gemessenen Gastkonzentration $[G]$ gegen die CD-Konzentration $[CD]$ und der Nullpunktlöslichkeit $[G]_0$ bestimmt werden.^[232] Der Ordinatenabschnitt entspricht der Nullpunktlöslichkeit $[G]_0$ des Gastes im verwendeten Lösungsmittel.

$$K_s = \frac{B}{1 - B} \frac{1}{[G]_0} \quad (8)$$

Aus der so bestimmten Komplexstabilitätskonstanten K_s lässt sich mit Hilfe von Formel 9 die Änderung der Freien Energie ΔG^0 berechnen. Dabei steht R für die Gaskonstante und T für die Temperatur in Kelvin.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_s \quad (9)$$

Die synthetisierten β -CD-Derivate **40**, **41**, **42** und **46** waren nicht unter den vorgegebenen Bedingungen in Lösung zu bringen und konnten deshalb nicht zur Solubilisierung von Camptothecin verwendet werden. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden mono-substituierten Derivate synthetisiert und untersucht. Bei dem Derivat **33** stellte sich das Problem, dass die Lösung des Cyclodextrinderivats gelb gefärbt war und diese Absorption mit der des Wirkstoffs überlagerte. In diesem Fall wurde der lipophile Wirkstoff mit 1,1,2-Trichlorethan aus dem wässrigen CD-Wirkstoff-Komplex extrahiert und der Wirkstoffgehalt in der organischen Phase bestimmt. Dabei nahm man an, dass der Wirkstoff quantitativ extrahiert wurde. Um die Öffnung des Lactonrings zu unterbinden wurde dem 1,1,2-Trichlorethan im Volumenverhältnis 75:1 Trifluoressigsäure zugesetzt. Der Extinktionskoeffizient von CPT in 1,1,2-Trichlorethan/Trifluoressigsäure (75:1) wurde zu $\varepsilon = 13490 M^{-1} cm^{-1}$ bestimmt.

In Abbildung 28 sind die Löslichkeitsisothermen der substituierten β -CD-Derivate mit CPT **23** in 20 mM HCl gezeigt. Mono-substituierte Derivate sind mit Rauten gekennzeichnet, hepta-substituierte Derivate mit Quadraten, gleiche

Farben stehen dabei für gleiche Substituenten. Man erkennt deutlich einen linearen Anstieg der CPT-Löslichkeit mit steigender CD-Konzentration. Dies sprach für die Bildung ein Komplexes mit einem Wirt-Gast-Verhältnis von 1:1.

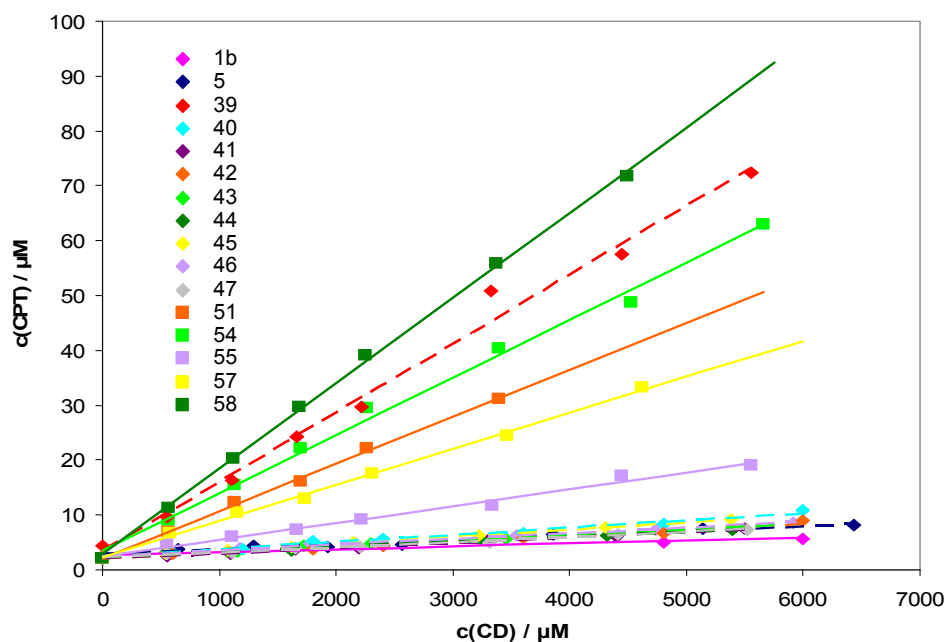


Abbildung 28: Zunahme der Löslichkeit von Camptothecin als Funktion der Konzentration der CD Derivate

In Tabelle 12 sind die berechneten Komplexstabilitätskonstanten K_S sowie die Änderungen der Freien Energien ΔG^0 zusammengefasst. Die Messung mit RDM- β -CD lieferte eine Komplexstabilitätskonstante von $K_S = 186 \text{ M}^{-1}$ und wich damit deutlich von den Ergebnissen von Kang^[179] ($K_S = 910 \text{ M}^{-1}$,) ab. Diese konnte zum einen durch eine abweichende Versuchsdurchführung und zum anderen auf einen anderen Substitutionsgrad und ein anderes Substitutionsmuster des RDM- β -CDs zurückgeführt werden.

Alle synthetisierten heptasubstituierten β -CD-Derivate, die Ergebnisse des inversen virtuellen Screenings waren und die unter den vorgegebenen Bedingungen löslich waren, zeigten deutlich höhere Komplexstabilitätskonstanten mit CPT als die bisher aus der Literatur bekannten Derivate. Die höchste Stabilitätskonstante wurde mit dem Derivat **48** ($K_S = 7496 \text{ M}^{-1}$) erzielt. Damit konnte im Vergleich zu nativem β -CD die Komplexierungsfähigkeit um den Faktor 37 gesteigert werden.

5.2 Solubilisierung von Wirkstoffen

Tabelle 12: Bindungskonstanten K_S und Änderung der Freien Energie ΔG^0 für CPT **23**

Substituent	K_S / M^{-1}	$\Delta G^0 / kJ mol^{-1}$
1β OH	202 ± 30	-13.2 ± 0.5
5 $NH_3^{+(a)}$	397 ± 59	-14.8 ± 0.4
71 Hydroxypropyl ^(c)	223 ± 32	-13.4 ± 0.4
72 Methyl ^(c)	186 ± 12	-12.9 ± 0.2
39 Mercapto-9 <i>H</i> -purin ^(b)	3629 ± 1567	-20.2 ± 1.1
40 2-Mercapto-pyridin ^(b)	641 ± 53	-16.0 ± 0.2
41 5-Mercapto-1-methyl-tetrazol ^(b)	465 ± 55	-15.2 ± 0.3
42 3-Mercapto-propan-1,2-diol ^(b)	531 ± 79	-15.6 ± 0.4
43 2-Mercapto-ethylamin ^(b)	498 ± 69	-15.4 ± 0.3
44 2-Mercapto-ethan-sulfonsäure ^(b)	431 ± 56	-15.0 ± 0.3
45 3-Mercapto-propionsäure ^(b)	569 ± 68	-15.7 ± 0.3
46 2-Mercapto-essigsäure ^(b)	493 ± 61	-15.4 ± 0.3
47 2-Mercapto-propionsäure ^(b)	419 ± 53	-15.0 ± 0.3
51 3-Mercapto-propan-1,2-diol ^(a)	4106 ± 475	-20.6 ± 0.3
54 2-Mercapto-ethylamin ^(a)	4821 ± 572	-21.0 ± 0.3
55 2-Mercapto-essigsäure ^(a)	1450 ± 177	-18.0 ± 0.3
57 3-Mercapto-propionsäure ^(a)	3134 ± 364	-19.9 ± 0.3
58 2-Mercapto-ethan-sulfonsäure ^(a)	7496 ± 2002	-22.1 ± 0.7
49 Thiosulfat ^(a)	370 ± 48	-14.7 ± 0.3

(a) hepta-substituiert, (b) mono-substituiert, (c) statistisch substituiert

Wie man erkennen kann, führten die hepta-substituierten CD-Derivate zu stabileren Komplexen als die entsprechenden monosubstituierten Verbindungen. Die Ausnahme stellte das monosubstituierte Purinyl- β -CD-Derivat **33** dar. Dessen Stabilitätskonstante lag im Bereich der heptasubstituierten Verbindungen. Das Derivat **49** wurde als negatives Beispiel synthetisiert, um zu zeigen, dass die Komplexbildung nicht ausschließlich durch die Schwefelsubstitution zustande kommt. Wie erwartet erhielt man mit $K_S = 370 M^{-1}$ eine sehr niedrige Stabilitätskonstante.

Vergleicht man die Änderungen der Freien Energien der monosubstituierten Derivate mit dem Wert für natives β -CD, ergab sich eine Stabilisierung von etwa $\Delta\Delta G^0 = -2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die gleiche Rechnung ergab für die heptasubstituierten Derivate eine Stabilisierung von $\Delta\Delta G^0 = -(5-9) \text{ kJ mol}^{-1}$. Daraus kann man schließen, dass drei bis vier Substituenten an der Bindung beteiligt sind. Der Beitrag aller Substituenten ist wahrscheinlich aus sterischen Gründen nicht möglich. Eine Ausnahme bildete Derivat **33**, bei dem ein Purinsubstituent eine Stabilisierung von $\Delta\Delta G^0 = -7 \text{ kJ mol}^{-1}$ zur Folge hatte. Wahrscheinlich kam es in diesem Fall zu einer zusätzlichen Stabilisierung aufgrund von π - π -Wechselwirkungen.

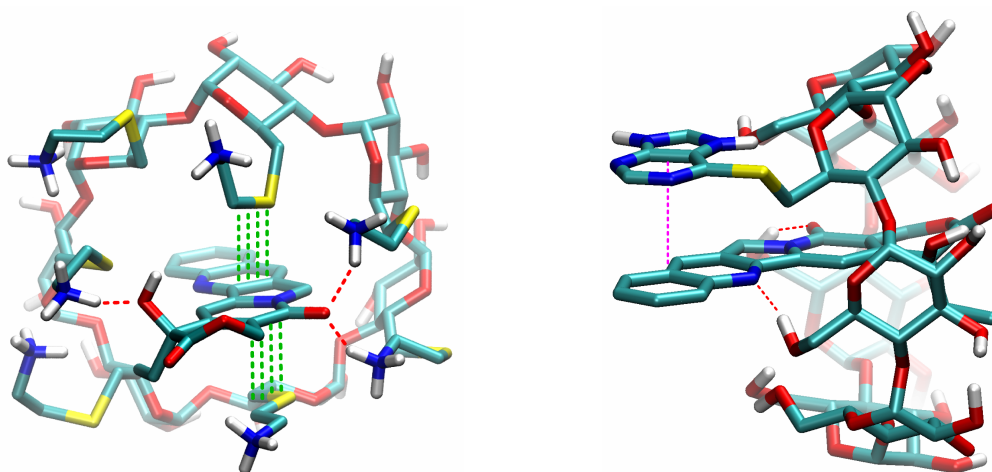
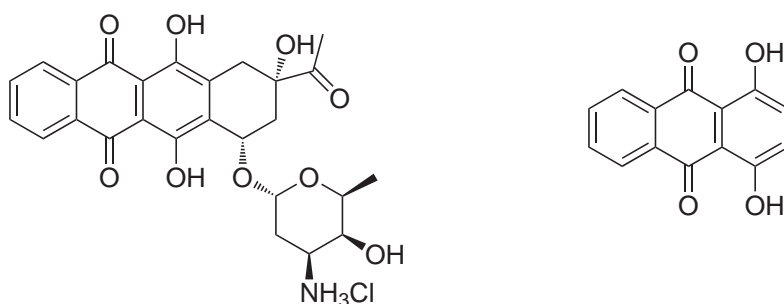


Abbildung 29: Wechselwirkungen in CPT-CD Komplexen. Links: **7-CPT**, rechts: **33-CPT**

Allgemein kann man daraus schließen, dass die Substitution von β -CD eine Vergrößerung der Kavität zur Folge hat und damit die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast verstärkt werden. Dabei sind hydrophobe Wechselwirkungen die treibende Kraft für die Bindung. Zusätzlich auftretende polare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken und π - π -Wechselwirkungen im Fall von aromatischen Seitenketten, sind für spezifische Wechselwirkungen verantwortlich. In Abbildung 29 sind zwei Beispiele von gedockten CD-CPT-Komplexen mit den auftretenden Wechselwirkungen gezeigt. Rote Linien zeigen in beiden Komplexen Wasserstoffbrücken an, die grünen Linien stehen für starke hydrophobe Wechselwirkungen und die rosa Linie für π - π -Wechselwirkungen.

5.2.2 Idarubicin Hydrochlorid

Idarubicin **60** oder 4-Demethoxydaunorubicin gehört zur Klasse der anthracyclinen Antibiotika. Es ist ein hochtoxischer, antineoplastischer Wirkstoff, der in seiner Anwendung aufgrund der Nebenwirkungen eingeschränkt ist. Die Wirkungsweise beruht auf Wechselwirkungen mit der DNA oder der Inhibition von Topoisomerase II. Idarubicin wird hauptsächlich zur Behandlung von Leukämie eingesetzt.^[233] Aufgrund der Toxizität von Idarubicin (IDA) **60** wurde als Modellsubstanz 1,4-Dihydroxyanthrachinon (DHA) **61** untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeit der Molekülteile, die in die Kavität eingeschlossen werden, erwartete man ein ähnliches Komplexierungsverhalten. Der Wirkstoff Idarubicin liegt allerdings in der protonierten Form vor, sodass man hier eine wesentlich stärker ausgeprägte Ladungsdiskriminierung erwartet.



Idarubicin Hydrochlorid (IDA) **60** 1,4-Dihydroxy-anthrachinon (DHA) **61**

Abbildung 30: Strukturen von Idarubicin **60** und der Modellverbindung 1,4-Dihydroxy-anthrachinon **61**

Da die Modellverbindung DHA **61** in Wasser nur sehr schlecht löslich ist, erfolgte die Bestimmung von K_S und ΔG^0 wie bei CPT **23** aus den Löslichkeitsisothermen. Dazu wurde zuerst der Extinktionskoeffizient ε in DMSO bestimmt. Alle Messungen wurden in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von $d = 1\text{cm}$ durchgeführt. Das Absorptionsmaximum lag bei $\lambda_{\text{max}} = 480\text{nm}$.

Aus der Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration (siehe Abbildung 63) ließ sich nach Formel 7 der Extinktionskoeffizient zu $\varepsilon = 8240\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmen. Die Nullpunktlöslichkeit von DHA in Wasser betrug $[G]_0 = 0.245 \pm 0.031\mu\text{M}$. Im Gegensatz zu CPT wurde bei diesen Messungen als

Lösungsmittel Wasser statt 20 mM Salzsäure verwendet. Da sich beim Einschluss von CPT gezeigt hatte, dass die hepta-substituierten β -CD-Derivate zu höheren K_S -Werten führen, wurde im Weiteren auf eine Untersuchung der mono-substituierten Derivate verzichtet.

In Tabelle 13 sind die nach Gleichung 8 und 9 berechneten Komplexstabilitätskonstanten und die Änderungen der Freien Energie aufgeführt. Man kann erkennen, dass der Einschluss von DHA in β -CD **1 β** die kleinste Komplexstabilitätskonstante lieferte. Die nächsthöhere Stabilitätskonstante wurde mit Hepta-amino- β -CD **5** erreicht. Durch die Derivatisierung der CDs mit Schwefelverbindungen konnte die Fähigkeit zur Solubilisierung deutlich gesteigert werden.

Tabelle 13: Bindungskonstanten K_S und Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss von 1,4-Dihydroxyanthrachinon (DHA) in hepta-substituierte β -CD Derivate

Substituent	K_S / M^{-1}	$\Delta G^0 / kJ mol^{-1}$
1β OH	1039 \pm 143	-17.21 \pm 0.34
5 NH ₃ ⁺	1745 \pm 313	-18.49 \pm 0.44
43 3-Mercapto-propan-1,2-diol	36226 \pm 11580	-26.01 \pm 0.79
45 2-Mercapto-ethanol	112224 \pm 17448	-28.81 \pm 0.39
7 2-Mercapto-ethylamin	453002 \pm 65452	-32.27 \pm 0.36
8 2-Mercapto-essigsäure	40939 \pm 5971	-26.31 \pm 0.36
46 2-Mercapto-propionsäure	21552 \pm 3121	-24.72 \pm 0.36
47 3-Mercapto-propionsäure	137041 \pm 20798	-29.30 \pm 0.38
48 2-Mercapto-ethan-sulfonsäure	291811 \pm 38857	-31.18 \pm 0.33

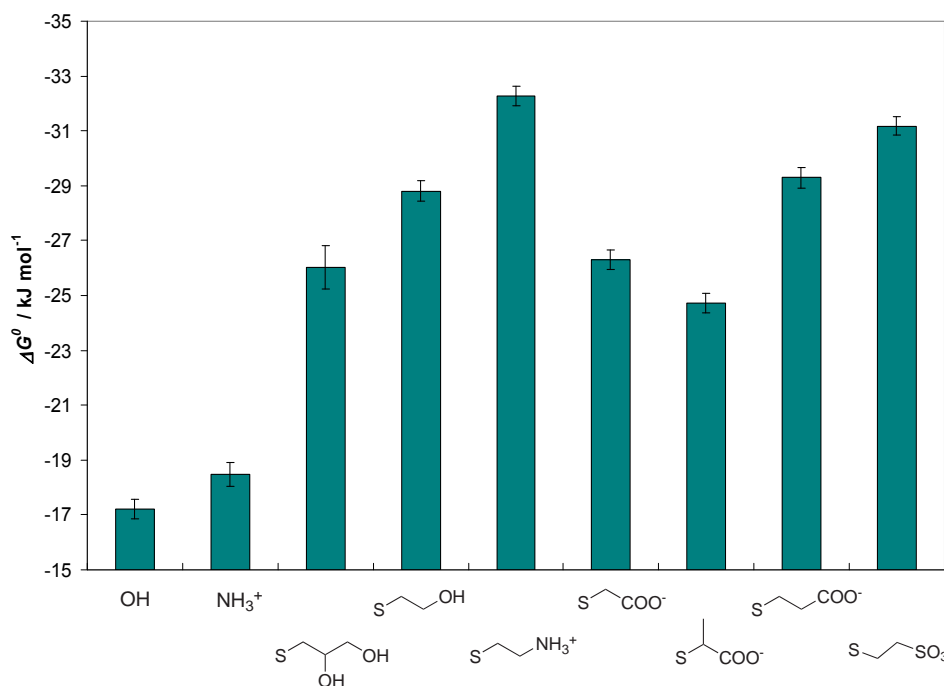


Abbildung 31: Änderung der Freien Energien ΔG^0 beim Einschluss von DHA in hepta-substituierte CD Derivate

Man konnte feststellen, dass die Einführung der sieben Aminogruppen bei **5** zu einem stabileren Komplex mit DHA im Vergleich zu nativem β -CD **1 β** führte. Ein möglicher Grund lag in der Ladung des CDs. Die höchste Bindungskonstante erzielte man mit **7**, welches ebenfalls ein aminofunktionalisiertes Derivat ist. Hier waren jedoch die Aminogruppen nicht direkt an C6 sondern über einen Ethylenspacer gekuppelt. Diese Gruppen bewirkten eine Vergrößerung der hydrophoben Kavität des CDs und dadurch resultierten stabilere Komplexe. Dieser Effekt trat auch bei den Derivaten **7**, **8**, **43**, **45** und **46 – 48** auf. Die beiden Derivate **8** und **47** unterscheiden sich nur durch die Länge der Spacergruppen (Ethylen- im Gegensatz zu Propylengruppe). Die zusätzliche Methylengruppe bewirkte allerdings durch eine weitere Ausdehnung der Kavität eine Steigerung der Stabilitätskonstanten um mehr als das Dreifache. Vergleicht man die Derivate mit verzweigten Substituenten mit denjenigen, die linear substituiert sind, kann man erkennen, dass verzweigte Substituenten die Stabilitätskonstanten herabsetzten. Zum Beispiel sank der K_S -Wert durch die zusätzliche Methylgruppe von $K_S = 40939 \pm 5971$ bei **46** auf $K_S = 21552 \pm 3121$ bei **8**. Da es sich bei DHA um einen neutralen Gast handelt, hatte die Ladung der funktionellen Gruppen keinen Einfluss auf die Komplexierungseigenschaften.

Da mit den untersuchten Derivaten sehr hohe Komplexstabilitätskonstanten mit DHA erzielt werden konnten, wurde im zweiten Schritt der kationische Wirkstoff Idarubicin Hydrochlorid **60** in die synthetisierten CDs eingeschlossen (Tabelle 14). Da der Wirkstoff in der protonierten Form vorlag und damit wasserlöslich war, wurde die Komplexbildung mittels isothermer Titrationsmikrokalorimetrie untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgeführt. Mit Idarubicin und nativem β -CD und Hepta-amino- β -CD konnte keine Komplexbildung beobachtet werden.

Tabelle 14: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Titration von heptasubstituierten CD Derivaten und Idarubicin Hydrochlorid **60** in PBS bei pH = 7,4; $T = 25^\circ\text{C}$

	Substituent	N	K_S / M^{-1}	$\Delta G^0 /$ kJ mol $^{-1}$	$\Delta H^0 /$ kJ mol $^{-1}$	$T\Delta S^0 /$ kJ mol $^{-1}$
43	3-Mercapto- propan-1,2-diol	0.85	29600 \pm 2380	-25.51 \pm 0.20	-27.64 \pm 1.13	-2.10 \pm 1.15
45	2-Mercapto- ethanol	1.37	60500 \pm 8790	-27.28 \pm 0.36	-15.54 \pm 0.47	11.77 \pm 0.59
46	2-Mercapto- propionsäure	1.08	103000 \pm 14300	-28.60 \pm 0.34	-14.66 \pm 0.33	13.97 \pm 0.47
47	3-Mercapto- propionsäure	1.06	240000 \pm 56500	-30.69 \pm 0.58	-24.13 \pm 0.59	6.60 \pm 0.83
48	2-Mercapto-ethan- sulfonsäure	0.87	460000 \pm 51600	-32.30 \pm 0.28	-23.62 \pm 0.40	8.73 \pm 0.49

Die Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten K_S von Idarubicin Hydrochlorid und Heptakis-(6-deoxy-6-cysteaminyl)- β -CD **7** war nicht mittels mikrokalorimetrischer Titration möglich, da die nichtlineare Regression zur Anpassung der Messwerte keine sinnvollen Ergebnisse lieferte. Ein möglicher Grund könnten die gleichen Ladungen an Wirt und Gast sein, wodurch eine Coulomb-Abstoßung resultiert. Deshalb erfolgte die Bestimmung des K_S -Werts mittels Fluoreszenz-Anisotropie.

Fluoreszierende Moleküle emittieren bei Anregung mit linear polarisiertem Licht wiederum linear polarisiertes Licht. Betrachtet man ein frei bewegliches Fluorophor, so ist die Rotationsgeschwindigkeit größer als die Fluoreszenzlebenszeit. Dadurch wird die Schwingungsebene des linear

polarisierten Lichtes in Abhängigkeit von der Beweglichkeit des fluoreszierenden Teilchens gedreht. Die Intensität des emittierten Lichts wird bei zwei verschiedenen Analysatorstellungen detektiert. Im ersten Fall stehen Polarisator und Analysator parallel (I_{\parallel}) und im zweiten Fall senkrecht (I_{\perp}) zueinander. Die Anisotropie r wird nach Formel 10 berechnet.^[234]

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G \cdot I_{\perp}} \quad (10)$$

Dabei steht G für den Gerätefaktor. Dieser Korrekturfaktor ist geräteabhängig und wird durch unterschiedliche Empfindlichkeiten des Analysators für parallele und senkrechte Strahlung verursacht.

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{\parallel}} \quad (11)$$

Wird I_{\parallel} bei 0° Polarisatorstellung und 0° Analysatorstellung gemessen, so erfolgt die Bestimmung von i_{\parallel} genau entgegengesetzt, also bei jeweils 90° . Die Vorgehensweise zur Bestimmung von i_{\perp} ist analog.

Sind in der Lösung verschiedene fluoreszierende Teilchen vorhanden, wird eine Mischanisotropie gemessen. Diese setzt sich aus den Anisotropien der einzelnen Komponenten r_j und ihrem Anteil f_j zusammen.^[235]

$$\bar{r} = \sum_{j=1}^n f_j r_j \quad (12)$$

Beim Einschluss eines fluoreszenzaktiven Gastes in die Kavität eines CDs wird dessen Beweglichkeit vermindert. Durch die eingeschränkte Fähigkeit zur Rotation verändert sich die Anisotropie. Bei Kenntnis der Anisotropie des freien Gastes ist damit eine Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten aus der Änderung der Anisotropie möglich. Dazu wird bei verschiedenen CD-Konzentrationen die Anisotropie gemessen.

Grundlage der Berechnungen bildet das Massenwirkungsgesetz (MWG) für die Bildung des Wirt-Gast-Komplexes.



$$K_S = \frac{[W \cdot G]}{[W] \cdot [G]} \quad (13)$$

Die Gleichgewichtskonzentrationen von Wirt und Gast ($[W]$ und $[G]$) entsprechen der jeweiligen Ausgangskonzentration $[W]_0$ und $[G]_0$ abzüglich der Gleichgewichtskonzentration des Komplexes $[W \cdot G]$.

$$[W] = [W]_0 - [W \cdot G] \quad (14)$$

$$[G] = [G]_0 - [W \cdot G] \quad (15)$$

Die Anisotropie ist von der Konzentration des Wirt-Gast-Komplexes $[WG]$ gemäß Formel 16 linear abhängig.

$$r = r_F + (r_{W \cdot G} - r_0) \cdot \frac{[W \cdot G]}{[G]_0} \quad (16)$$

Um das System aus vier Gleichungen (Formel 13 -16) mit den fünf Variablen $r_{W \cdot G}$, $[W \cdot G]$, $[W]$, $[G]$ und K_S zu lösen, wurden die folgenden dimensionslosen Größen zur Vereinfachung eingeführt. Dabei steht ν für das Wirt-Gast-Verhältnis, X für den Komplexierungsgrad und k für die reduzierte Stabilitätskonstante.

$$\nu = \frac{[W]_0}{[G]_0} \quad (17)$$

$$X = \frac{[W \cdot G]}{[G]_0} \quad (18)$$

$$k = \frac{1}{K_S \cdot [G]_0} \quad (19)$$

Durch Einsetzen von Formel 14, 15, 17 – 19 in Formel 13 erhielt man das MWG in der dimensionslosen Form.

$$k = (v - X) \cdot \frac{1 - X}{X} \quad (20)$$

Formel 20 wurde in die quadratische Gleichung 21 überführt und gelöst (Formel 22).

$$X^2 - (v + k + 1)X + v = 0 \quad (21)$$

$$X = \frac{v + k + 1}{2} \pm \sqrt{\frac{(v + k + 1)^2}{4} - v} \quad (22)$$

Durch Rückumwandlung der dimensionslosen Größen X, ν und k erhielt man Formel 23.

$$r - r_0 = (r_{W-G} - r_0) \cdot \left(\frac{\frac{[W]_0}{[G]_0} + \frac{1}{K_S \cdot [G]_0} + 1}{2} - \sqrt{\frac{\left(\frac{[W]_0}{[G]_0} + \frac{1}{K_S \cdot [G]_0} + 1\right)^2}{4} - \frac{[W]_0}{[G]_0}} \right) \quad (23)$$

$$r = r_0 + (r_{W-G} - r_0) \cdot \frac{\frac{[W]_0}{[G]_0} + 1 + \frac{1}{K_S \cdot [G]_0} - \sqrt{\left(\frac{[W]_0}{[G]_0} + 1 + \frac{1}{K_S \cdot [G]_0}\right)^2 - 4 \frac{[W]_0}{[G]_0}}}{2} \quad (24)$$

Durch Umformen und Auflösen nach r ergab sich Formel 24. Diese Funktion wurde durch nichtlineare Regression mit dem Programm Origin® an die experimentellen Daten angepasst. Die Variablen waren dabei K_S und r_{W-G} . In Abbildung 32 sind die Differenzen der Fluoreszenzanisotropien von Komplex und freiem Gast in Abhängigkeit vom Wirt-Gast-Verhältnis sowie die Anpassung der Daten durch nichtlineare Regression gezeigt. Als Ergebnis erhielt man $k = 6.85$. Durch Einsetzen in Formel 19 mit $[G]_0 = 15 \mu\text{M}$ erhält man die Komplexstabilitätskonstante $K_S = 9739 \text{ M}^{-1}$.

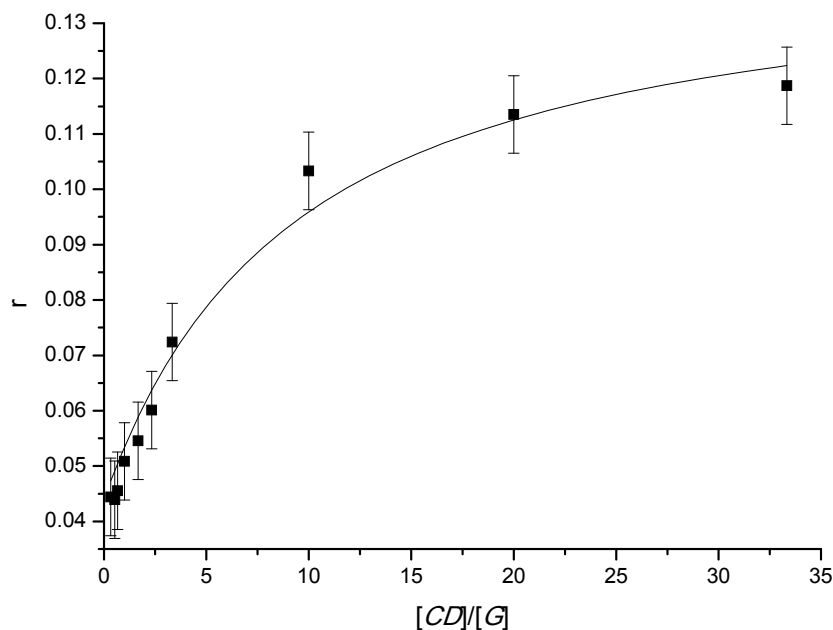


Abbildung 32: Differenz der Anisotropien des Komplexes und freiem Gast in Abhängigkeit des Wirt-Gast-Verhältnisses

In Abbildung 33 sind die Änderungen der Freien Energien für die Komplexbildung von 1,4-Dihydroxyanthraquinon und Idarubicin Hydrochlorid gezeigt. Wie erwartet, war die Ladungsdiskriminierung beim Einschluss des geladenen Wirkstoffs deutlich stärker ausgeprägt. Für das kationische Cyclodextrinderivat **7** ergab sich aufgrund der gleichen Ladungen von Wirt und Gast ein weniger stabiler Komplex im Vergleich zu 1,4-DHA. Im Gegensatz dazu ergab sich bei Verwendung der anionischen CDs **8** und **45** - **48** eine anziehende Coulomb-Wechselwirkung, die zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Einschlussverbindungen führte. Bei den neutralen CD-Derivaten **43** und **44** kam es im Vergleich zu 1,4-DHA ebenfalls zu weniger stabilen Komplexen. Jedoch war der Effekt hier weniger stark ausgeprägt als bei **7**. Daraus konnte man eindeutig den Einfluss der Ladung des Cyclodextrins auf die Komplexstabilität erkennen. Betrachtete man die anionischen CD-Derivate, erkannte man beim Einschluss von 1,4-DHA und Idarubicin den gleichen Trend. Die Verzweigung in der Seitenkette des CDs **46** erniedrigte die Fähigkeit zur Komplexbildung. Eine Verlängerung der Spacergruppe des CDs um eine Methyleneinheit brachte jedoch im Gegensatz zu 1,4-DHA keine wesentliche Veränderung der Komplexstabilität (vgl. **8** mit **47**).

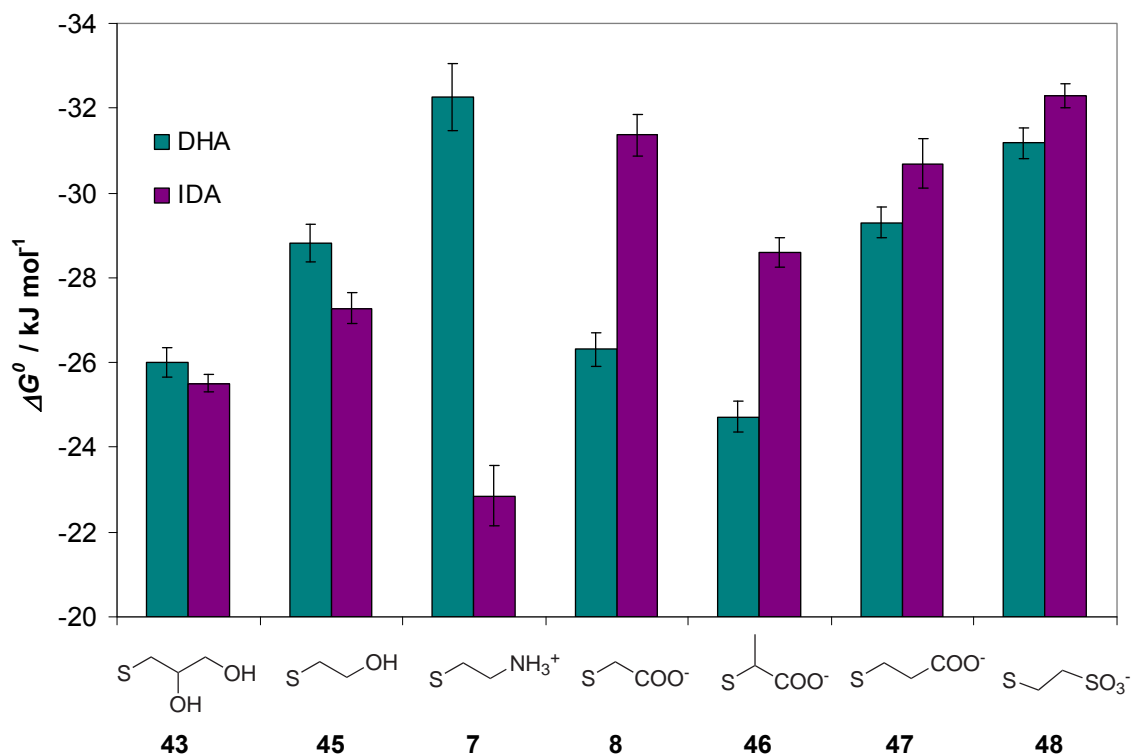


Abbildung 33: Änderung der Freien Energien beim Einschluss von DHA und Idarubicin Hydrochlorid in heptasubstituierte CD Derivate

5.2.3 Docetaxel

Docetaxel (DOC) ist ein Zytostatikum, welches semisynthetisch aus der Europäischen Eibe gewonnen wird. Es wird unter dem Namen Taxotere[®] von der Firma Sanofi-Aventis vermarktet und wirkt gegen Krebserkrankungen von Lunge, Brust, Prostata, Eierstöcken und Magen. Die Wirkung von Docetaxel beruht auf der Bindung an freies Tubulin, was sowohl die Zusammenlagerung des Tubulins in stabile Mikrotubuli begünstigt als auch die Zellteilung verhindert.^[236, 237] Aufgrund der extrem geringen Löslichkeit von DOC in Wasser ist eine Applikation nur in Kombination mit dem Emulgator Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat) möglich.

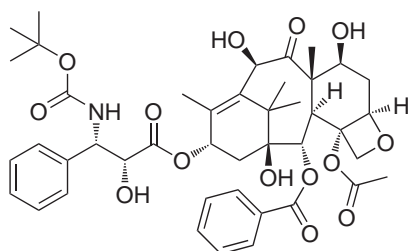


Abbildung 34: Struktur von Docetaxel

Durch den Einschluss in CDs kann der Wirkstoff jedoch solubilisiert werden. Dieser Effekt ist bereits bei der Verwendung von nativem β -CD zu beobachten und kann durch Funktionalisierungen des CDs gesteigert werden.^[238, 239] Die Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten war bei Docetaxel aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser wie bei Camptothecin mit der bereits beschriebenen Methode der Löslichkeitsisothermen möglich. Die Messungen konnten in diesem Fall statt in 20 mM Salzsäure in reinem Wasser durchgeführt werden, da der Wirkstoff unter diesen Bedingungen stabil war. Der Extinktionskoeffizient wurde wegen der geringen Löslichkeit in Wasser in einem Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1 v/v) zu $\epsilon = 16660 M^{-1} cm^{-1}$ bestimmt. Die Nullpunktlöslichkeit von Docetaxel in Wasser wurde aus dem Mittelwert von sechs Messungen bestimmt und betrug $[G]_0 = 18,9 \pm 0,7 \mu M$. Die Berechnung der Komplexstabilitätskonstanten erfolgte nach Gleichung 8.

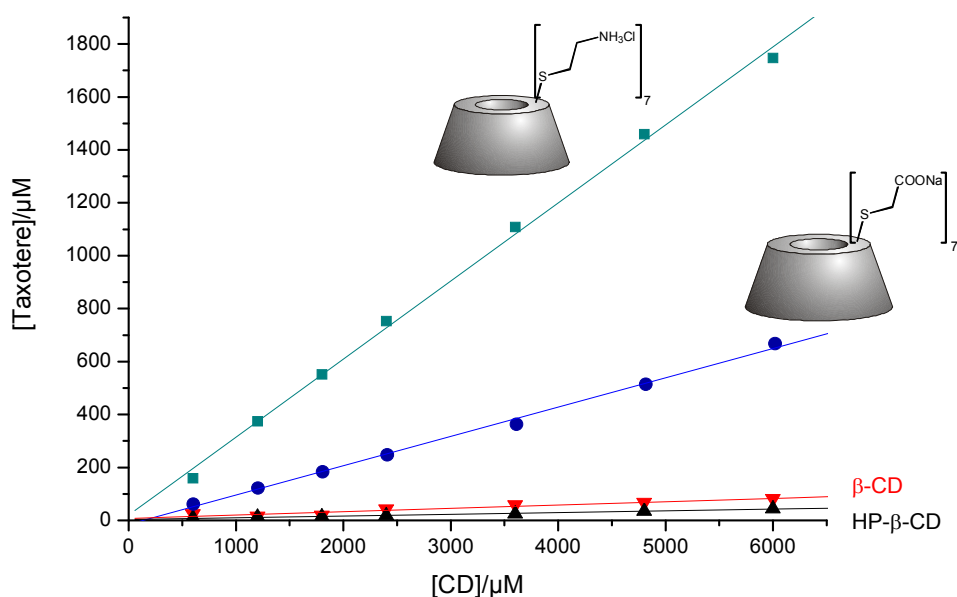


Abbildung 35: Zunahme der Löslichkeit von Docetaxel als Funktion der Konzentration der CD-Derivate

In Abbildung 35 ist die Zunahme der Löslichkeit von Docetaxel mit steigender Cyclodextrinkonzentration gezeigt. Beim Einschluss von Docetaxel wurde eine 1:1-Stöchiometrie angenommen. Die Komplexbildung eines Wirkstoffmoleküls durch zwei Cyclodextrinmoleküle wäre in diesem Fall zwar denkbar, sollte allerdings aufgrund der gleichen Ladungen der Cyclodextrine und der daraus

resultierenden elektrostatischen Abstoßung destabilisiert werden. Aus diesem Grund wurde wie bei CPT von der Bildung eines einfachen 1:1-Komplexes ausgegangen.

In Tabelle 15 sind die Bindungskonstanten K_S für die drei Wirkstoffe Camptothecin, Idarubicin Hydrochlorid und Docetaxel sowie die Modellverbindung 1,4-Dihydroxyanthrachinon zusammengefasst. Man kann deutlich das wesentlich höhere Bindungspotential der Heptakis-6-thioether im Vergleich zu nativem β -CD, Heptakis-(6-deoxy-6-amino)- β -CD, HP- β -CD und RDM- β -CD erkennen. Die Bindungskonstanten, die mit den Thioethern erreicht wurden, liegen um den Faktor 5 – 100 höher als die der Referenz-CDs. Dieser hohe Anstieg des Bindungsvermögens kann auf die größere Hydrophobie des Schwefels im Vergleich zu Sauerstoff und Stickstoff zurückgeführt werden. Durch die Substitution mit Thiolen kommt es zu einer Vergrößerung der hydrophoben Kavität des CDs. Dieser Effekt wird durch hydrophobe Liganden am CD weiter verstärkt. Die Einführung einer zusätzlichen Methylengruppe von **8** zu **47** hat einen Anstieg der Bindungskonstante zur Folge. Andererseits macht es den Anschein, als ob verzweigte Substituenten die Stabilität des gebildeten Komplexes herabsetzen (Wirt **46**). Diese sterisch anspruchsvolleren Seitenketten haben eine weniger ausgeprägte Fähigkeit einen Gast zu binden.

Allen vier untersuchten Gästen ist eine ähnliche hydrophobe Bindungsstelle gemeinsam. Der Molekülteil, der in die Kavität eingeschlossen wird, ist immer ein Benzylring, der entweder monosubstituiert (DOC) oder ortho-substituiert ist (CPT, DHA, IDA). Im Vergleich der Wirkstoffe untereinander werden mit CPT die geringsten K_S -Werte erreicht, da der hydrophile Stickstoff des Chinolins die Bildung der Einschlussverbindung stört. Die außergewöhnlich hohen Stabilitätskonstanten mit DHA können darauf zurückgeführt werden, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Hydroxylgruppen des Gastes und den sekundären Hydroxylgruppen des CDs möglich ist, welche zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Einschlussverbindung führen.

Tabelle 15: Bindungskonstanten K_S für CPT, DOC, IDA und DHA mit C6-substituierten β -CD Derivaten, bestimmt durch Mikrokalorimetrie (i), Löslichkeitsisothermen (s) oder Fluoreszenz-anisotropie (f).

Wirt	Substituent	CPT	DOC	DHA	IDA
1β	OH	202 ^s	676 ^s	1039 ^s	< 100 ⁱ
HP- β -CD	O-CH ₂ -CH(CH ₃)-OH ^a	223 ^s	350 ^s	n.b	< 100 ⁱ
RDM- β -CD	O-CH ₃ ^a	186 ^s	n.b	n.b	< 100 ⁱ
5	NH ₂	397 ^s	n.b.	1745 ^s	< 100 ⁱ
7	S-CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ Cl	4821 ^s	22160 ^s	453002 ^s	9739 ^f
8	S-CH ₂ -COONa	1450 ^s	6600 ^s	40939 ^s	316000 ⁱ
43	S-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ OH	4106 ^s	n.b	36226 ^s	29600 ⁱ
45	S-CH ₂ -CH ₂ -OH	3212 ^s	n.b	112224 ^s	60500 ⁱ
46	S-CH(CH ₃)-COONa	886 ^s	n.b	21552 ^s	103000 ⁱ
47	S-(CH ₂) ₂ -COONa	3134 ^s	n.b	137041 ^s	240000 ⁱ
48	S-CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ Na	7496 ^s	n.b	291811 ^s	460000 ⁱ

^a statistically substituted; DS(HP) = 0.9; DS(Me) = 1.8, n.b.: nicht bestimmt

Da es sich bei IDA um einen geladenen Gast handelt, ist hier die Ladungsdiskriminierung besonders stark ausgeprägt. Mit den anionischen Wirten **8**, **46**, **47** und **48** bilden sich aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen deutlich stabilere Komplexe aus als mit dem kationischen Wirt **7**. Dieser Unterschied tritt bei IDA wesentlich stärker auf als bei DHA. Beim Einschluss in die neutralen Wirte **43** und **45** sind demnach die Differenzen zwischen IDA und DHA vernachlässigbar. Ähnliche Effekte, die auf Coulomb-Wechselwirkungen beruhen, wurden bereits beschrieben und sind unter dem Begriff „Salzbrücke“ bekannt.^[208]

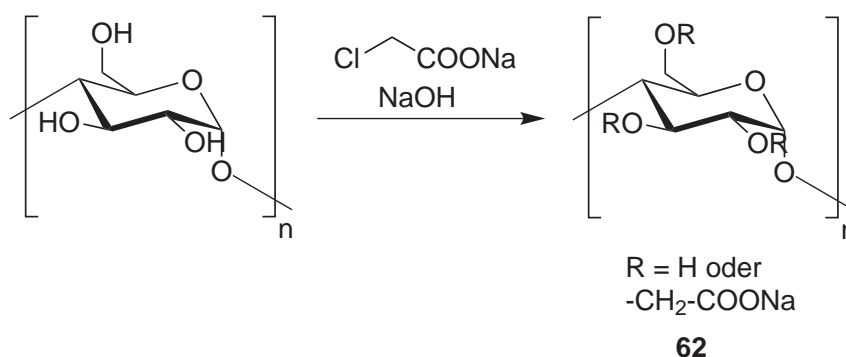
6 Synthese von Stärkederivaten

6.1 Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate

6.1.1 Synthese von Carboxymethyl-Stärke (CMS)

Carboxymethyl-Stärke **62** gehört zu den wichtigsten industriell angewandten Stärkederivaten, wo sie als Verdickungsmittel, als Additiv in der Herstellung von Papier und als Hilfsstoff in der pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommt.^[56, 240] Der Substitutionsgrad bestimmt die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Produkts wie Viskosität in Lösung, Wechselwirkungen mit Kationen und Filmbildungseigenschaften. Kommerziell erhältliche Produkte weisen normalerweise einen Substitutionsgrad kleiner als 0.3 auf.

Die erste Synthese erfolgte 1924 von Chowdhury in 40%iger wässriger Natronlauge mit Monochloracetat.^[241] Durch die Reaktion werden Säurefunktionalitäten in die Stärke eingeführt, welche in einer späteren Reaktion weiter umgesetzt werden können und gleichzeitig die Löslichkeit in Wasser deutlich verbessern.



Schema 12: Synthese von CMS **62**

Die Carboxymethylierung kann an Stärken unterschiedlichen Ursprungs durchgeführt werden, zum Beispiel an Maisstärke^[60, 242-245], Weizenstärke^[60], Kartoffelstärke^[60, 242, 244, 246], Wachsmaisstärke^[60, 244, 246], oxidierter Kartoffelstärke^[60], Amaranstärke^[242], Wachsamaranstärke^[247], Maniok-Stärke^[244, 248], Erbsenstärke^[244, 246] und Reisstärke^[242, 244].

Zur Bestimmung des Substitutionsgrads gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann die CMS mit Perchlorsäure oder 2M Trifluoressigsäureanhydrid vollständig abgebaut werden und die resultierenden substituierten

Glucoseeinheiten mittels HPLC analysiert werden. Zum anderen ist die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nach Abbau in deuterierter Schwefelsäure möglich. Aus diesen Methoden erhält man ebenfalls Informationen über die Verteilung der Substituenten am Glukosegrundgerüst. Die Titration der eingeführten Carboxylgruppen ist meistens mit Problemen verbunden, da die Proben zuerst in eine eindeutige Wäageform überführt und in dieser ausgefällt werden müssen. Außerdem ist der Substanzbedarf bei der Titration wesentlich größer, so dass HPLC und NMR als Bestimmungsmethoden vorzuziehen sind.

In den folgenden Jahren wurden die Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Carboxymethylstärke optimiert. So gibt es heute mehrere Lösungsmittelsysteme zur Durchführung der Reaktion. In den meisten Fällen erfolgt die Umsetzung heterogen in einem Wasser/Alkohol-Gemisch^[60, 246, 248, 249]. Es sind auch Reaktionen im Ethanol/Toluol/Wasser-Gemisch^[56], in Aceton^[250], Isopropanol^[245], Cyclohexan^[245], Dimethylformamid^[245] und Methanol^[245] sowie deren Mischungen mit Wasser^[245] beschrieben. Zum anderen ist auch die Methode der induzierten Phasentrennung^[246] bekannt. Bei dieser Methode wird die Reaktion in DMSO mit festem Natriumhydroxid und Monochloracetat bei 80°C durchgeführt und das Produkt aus Methanol ausgefällt. Der Vorteil der Synthese über die induzierte Phasentrennung liegt darin, dass man Stärken mit höheren Substitutionsgraden herstellen kann. So gelang Heinze die Darstellung von CMS mit einem Substitutionsgrad von 1.51.^[246] Um ähnlich hohe D_s -Werte über die heterogene Syntheseroute zu erreichen, ist in den meisten Fällen eine Mehrfach-Carboxymethylierung notwendig. Das heißt, dass der gleiche Reaktionsschritt immer wieder wiederholt wird, bis man den gewünschten Substitutionsgrad erreicht hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden carboxymethylierte Stärken mit Substitutionsgraden zwischen 0.04 und 1.28 synthetisiert. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Parameter, wie Verhältnis Chloressigsäure zu AGU, Temperatur, Amylosegehalt der Stärke und Lösungsmittel untersucht.

Zur Darstellung der Verbindungen **62a-c**, **62j** und **762k** wurde Chloressigsäure in Methanol gelöst, und nacheinander mit Stärke und frisch gemahlenem Natriumhydroxid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für die in Tabelle 16 und Tabelle 19 genannte Zeit bei der angegebenen Temperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde der Feststoff abgesaugt, mit Isopropanol gewaschen und getrocknet. Die weitere Reinigung erfolgte mittels kontinuierlicher Ultrafiltration gegen Wasser unter Verwendung einer Membran mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa. Die Synthese der Verbindungen **62g-i** erfolgte durch Zugabe von Stärke in ein Gemisch aus wässriger Natronlauge und Isopropanol. Die Suspension wurde 1h bei 40°C gerührt und dann mit fester Chloressigsäure versetzt, wobei die Viskosität sofort deutlich zunahm. Die Reaktionsmischung wurde 2h bei 40°C gerührt. Bei der Darstellung der Verbindung **62h** kam es zu einem Verklumpen der Stärke, so dass kein Rühren der Mischung mehr möglich war. Der Feststoff wurde in allen Fällen in Wasser gelöst und mittels kontinuierlicher Ultrafiltration gegen Wasser über eine Cellulosemembran mit der Ausschlussgrenze 5 kDa gereinigt. Eine dritte Variante zur Darstellung von CMS wurde bei den Verbindungen **62e** und **62f** angewandt. Hier wurde die Stärke in wässriger Natriumhydroxidlösung aufgequollen. Dazu gab man die Lösung von Monochloressigsäure in Isopropanol und rührte 24h bei Raumtemperatur. Nach Isolation des Feststoffs wurde dieser mit Isopropanol gewaschen, in Wasser gelöst, ultrafiltriert und lyophilisiert.

In Tabelle 16 ist der Einfluss der Temperatur bei der Darstellung von Carboxymethylstärke in Isopropanol gezeigt. Bei den Synthesen hat sich gezeigt, dass eine Temperaturerhöhung nicht zu höheren Substitutionsgraden führte. Stojanovic^[249] untersuchte ebenfalls den Einfluss der Temperatur auf den Substitutionsgrad^[249]. Er konnte zeigen, dass der DS mit steigender Temperatur langsam anstieg und sich bei 80°C asymptotisch einem maximalen Wert von etwa 0.5 näherte. Die hier erhaltenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Stojanovic, der allerdings ein Ethanol/Wasser-Gemisch als Lösungsmittel verwendete. Ein anderer möglicher Grund liegt in der Hydrolyse der Chloressigsäure. Man muss hier davon ausgehen, dass durch die

6.1 Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate

Temperaturerhöhung kein höherer Substitutionsgrad erreicht werden konnte, stattdessen trat die Hydrolyse der Chloressigsäure in den Vordergrund.

Tabelle 16: Einfluss der Temperatur bei der Synthese von CMS.

	<i>T</i> [°C]	n(MCA)/ n(AGU)	n(NaOH)/ n(AGU)	Reaktions- zeit [h]	Lösungs- mittel	Stärke	DS	Ausbeute
62a	25	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.33	72%
62b	35	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.12	20%
62c	45	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.10	82%

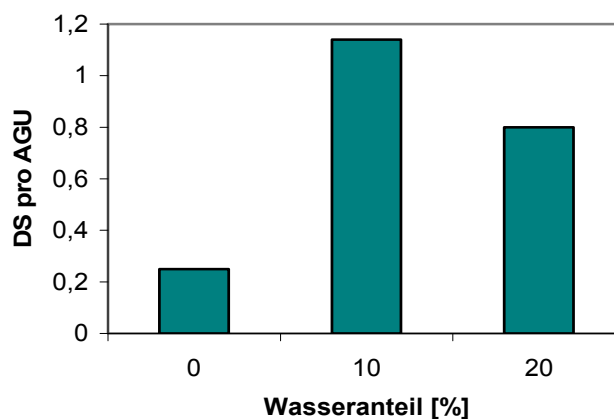
Man kann feststellen, dass alle Reaktionen, die in rein organischen Lösemitteln ohne Wasser durchgeführt wurden nur zu geringen DS führten. Die Reaktion in Methanol lieferte lediglich einen Substitutionsgrad von 0.04, während in Isopropanol Werte zwischen 0.06 und 0.35 erreicht wurden. Der Grund für die relativ geringen Substitutionsgrade ist in dem fehlenden Wasser zu sehen, welches notwendig ist, um die Stärke aufzuquellen und so überhaupt für die Reaktion zugänglich zu machen. Diese Werte decken sich mit den literaturbekannten Ergebnissen.

Es ist beschrieben, dass die Verwendung von Isopropanol/Wasser-Gemischen im Vergleich zu Methanol- und Ethanol/Wasser-Gemischen zu höheren Substitutionsgraden führt, während Methanol/Wasser-Mischungen die niedrigsten DS liefert.^[246] Dies lässt sich zum einen durch das unterschiedliche Quellungsvermögen der Alkohole erklären und zum anderen durch die verschiedenen Hydrolysegeschwindigkeiten der Monochloressigsäure. Da Methanol in der Reihe der betrachteten Alkohole den kleinsten pK_s -Wert hat (Methanol: 15.2, Ethanol: 15.8, Isopropanol: 16.5), kann man davon ausgehen, dass die Hydrolyse hier am schnellsten ist und folglich der Substitutionsgrad im Produkt am kleinsten wird. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Umsetzungen ein Isopropanol/Wasser-Gemisch zur Carboxymethylierung von Stärke gewählt (Tabelle 17). Da auch in reinem Wasser nur geringe Substitutionsgrade erreicht werden, muss es für die Reaktion eine optimale Wassermenge geben. Um diese zu bestimmen, wurde bei den folgenden Reaktionen das Mischungsverhältnis von Isopropanol und Wasser variiert.

Tabelle 17: Einfluss des Isopropanol/Wasser-Verhältnisses bei der Darstellung von CMS

	<i>T</i> [°C]	n(MCA)/ n(AGU)	n(NaOH)/ n(AGU)	Reaktions- zeit [h]	Lösungs- mittel (v/v)	Stärke	DS	Ausbeute
62d	25	6.0	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.25	71%
62e	25	6.0	5.0	24	Ipr/H ₂ O 9:1	Acros	1.12	69%
62f	25	6.0	5.0	24	Ipr/H ₂ O 4:1	Acros	0.80	69%

Wie erwartet ist der DS in reinem Isopropanol mit 0.25 am geringsten. Durch die Zugabe von Wasser ließ sich der Substitutionsgrad erhöhen, er durchlief bei 10% Wasseranteil ein Maximum und sank danach wieder ab. Damit konnte gezeigt werden, dass ein gewisser Wasseranteil in der Reaktion notwendig ist, um die

**Abbildung 36:** Abhängigkeit des Substitutionsgrads bei der Carboxymethylierung vom Wasseranteil im Lösemittel

Stärke aufzuquellen. Bei einem zu hohen Wasseranteil rückte die Reaktion von Chloressigsäure zu Hydroxyessigsäure in den Vordergrund. Dadurch wurde der Anteil an reaktiver Chloressigsäure verringert und der Substitutionsgrad sank.

Weiterhin hat der Amylosegehalt der eingesetzten Stärke einen Einfluss auf den Substitutionsgrad. Heinze konnte zeigen, dass Stärken mit höherem Amyloseanteil höhere DS liefern als Stärken mit höherem Amylopektin-Gehalt. So sinkt in der Reihe Erbsenstärke (90% Amylose), Kartoffelstärke (28% Amylose) und Wachsmaisstärke (1% Amylose) der Substitutionsgrad von 1.61 über 1.58 nach 1.51 nach 5 Carboxymethylierungsschritten.^[246] Diese Theorie konnte durch eigene Messungen mit drei verschiedenen Stärken unterschiedlichen Amylosegehalts bestätigt werden (Tabelle 18).

6.1 Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate

Tabelle 18: Einfluss des Amylosegehalts der verwendeten Stärke bei der Darstellung von CMS. ($n(\text{MCA})/n(\text{AGU}) = 1.4$, $n(\text{NaOH})/n(\text{AGU}) = 3.0$, Reaktionszeit 2h, $T = 40^\circ\text{C}$, Isopropanol/ $\text{H}_2\text{O} = 6.25:1$)

	Stärke	Amylosegehalt	DS	Ausbeute
62g	Acros	34.1%	0.79	87%
62h	Hylon VII	50.3%	1.28	96%
62i	Avebe	33.2	0.81	94%

Den größten Einfluss auf den Substitutionsgrad habt allerdings das Verhältnis der eingesetzten Menge an Natriumhydroxid und Monochloressigsäure pro Anhydroglucoseeinheit. Stojanovic erhält bei zwei Äquivalenten NaOH pro AGU den größten Substitutionsgrad^[249]. Sowohl bei größeren als auch bei kleineren Verhältnissen kam es zu einem Abfall des Substitutionsgrads. Dieser Effekt wurde auch von Khalil^[245] beschrieben und lässt sich damit erklären, dass eine gewisse Menge an Natriumhydroxid notwendig ist um die Hydroxylgruppen der Stärke zu deprotonieren. Als Nebenreaktion tritt jedoch eine nucleophile Substitution an Chloressigsäure auf, wobei Hydroxyessigsäure gebildet wird, welche nicht mehr in der Lage ist, mit Stärke zu reagieren. Diese Konkurrenzreaktion wird mit steigendem Natriumhydroxidanteil begünstigt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Basenanteils jedoch nicht untersucht.

Tabelle 19: Einfluss des Monochloressigsäure/AGU-Verhältnisses bei der Darstellung von CMS

	T [°C]	$n(\text{MCA})/$ $n(\text{AGU})$	$n(\text{NaOH})/$ $n(\text{AGU})$	Reaktions- zeit [h]	Lösungs- mittel	Stärke	DS	Ausbeute
62j	25	2.0	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.06	94%
62a	25	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.33	72%
62d	25	6.0	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.35	71%

Erwartungsgemäß steigt der Substitutionsgrad mit größer werdendem Verhältnis Chloressigsäure zu AGU. Gleichzeitig ist allerdings ein zunehmender Abbau der Stärke mit steigenden Anteil an Chloressigsäure beschrieben.^[249]

Bei allen durchgeführten Synthesen wurde der Substitutionsgrad nach Abbau mit deuterierter Schwefelsäure aus dem ^1H -NMR-Spektrum bestimmt. Diese Analyseverfahren gibt Aufschluss über die Verteilung der Substituenten an der Glucoseeinheit. In Abbildung 37 ist beispielhaft ein ^1H -NMR-Spektrum von CMS gezeigt. Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte aus dem H-H-COSY und aus dem Vergleich mit literaturbekannten Spektren von Carboxymethylcellulose^[251].

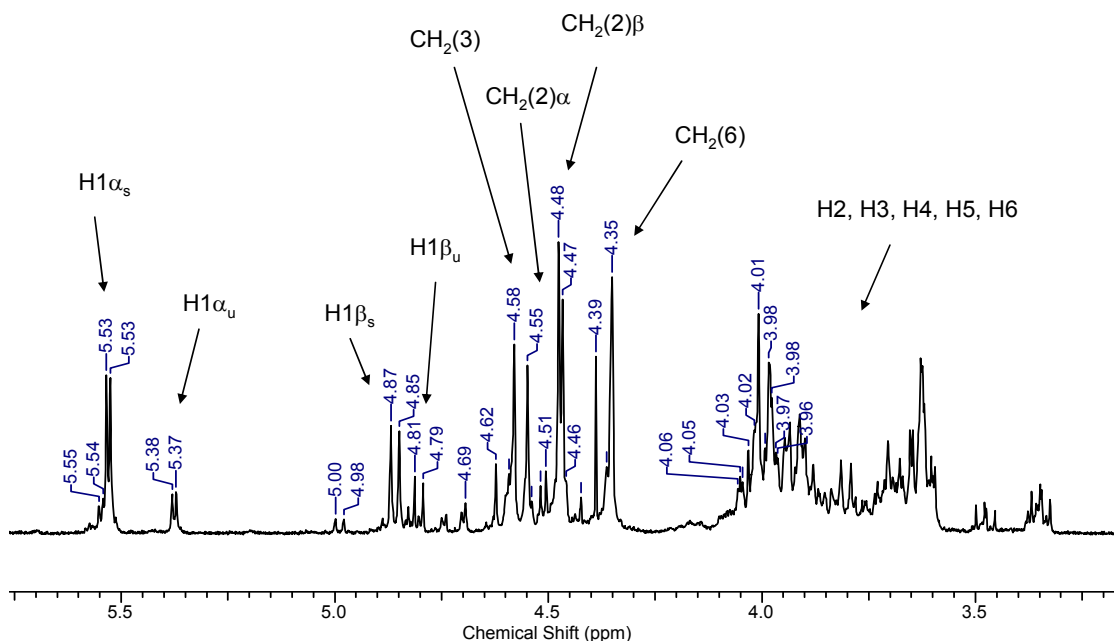


Abbildung 37: ^1H -NMR Spektrum von CMS nach säurehydrolytischem Abbau. (Indices s und u stehen für substituiert und unsubstituiert)

Man erkannte eine Aufspaltung der anomeren Protonen in vier Signale. Beim säurehydrolytischen Abbau der Stärke entstand ein Gemisch aus α - und β -Glucose. Im Fall einer Substitution an C-2 Position, erfolgte eine Verschiebung des Signals des jeweiligen anomeren Protons, so dass man insgesamt vier Signale erhielt. Weiterhin erschienen die Signale der Methylengruppen der Chloressigsäure. Je nach dem Ort der Anknüpfung ergab sich eine andere chemische Verschiebung. Diese Tatsache erlaubte die Bestimmung der partiellen DS. Der Substitutionsgrad wurde aus dem Verhältnis der Protonen der Methylengruppen der neu eingeführten Carboxymethylgruppe zu den anomeren Protonen berechnet (Formel 24). Die partiellen Substitutionsgrade an der Stelle n ließen sich analog nach Formel 25 berechnen.

$$D_s = \frac{\frac{1}{2} \left(\int CH_2(2)\alpha + \int CH_2(2)\beta + \int CH_2(3) + \int CH_2(6) \right)}{\int H1\alpha_s + \int H1\alpha_u + \int H1\beta_s + \int H1\beta_u} \quad (24)$$

$$D_s(n) = \frac{\frac{1}{2} \int CH_2(n)}{\int H1\alpha_s + \int H1\alpha_u + \int H1\beta_s + \int H1\beta_u} \quad (25)$$

Tabelle 20: Partielle Substitutionsgrade von CMS (Zahlen in Klammern geben den Ort der Substitution an)

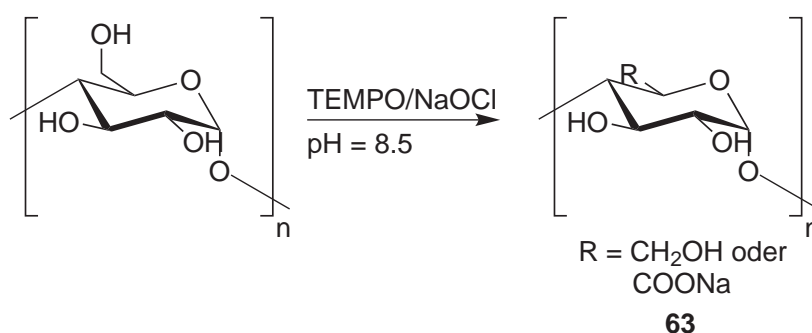
Probe	DS (3)	DS (2)	DS (6)	DS (gesamt)
62a	0.04	0.14	0.15	0.33
62b	0.02	0.08	0.03	0.12
62c	0.02	0.04	0.03	0.10
62d	0.04	0.17	0.14	0.35
62e	0.08	0.71	0.33	1.12
62f	0.05	0.51	0.25	0.80
62g	0.07	0.53	0.20	0.79
62h	0.25	0.67	0.36	1.28
62i	0.06	0.52	0.22	0.81
62j	0.00	0.06	0.00	0.06
62k	0.00	0.04	0.00	0.04

Es ließ sich feststellen, dass in allen Fällen der Substitutionsgrad an Position 2 am größten war. Dies lässt sich einfach erklären, da es sich dabei um die acideste Hydroxylgruppe handelt. Die Substitution an C-6-Position war immer am geringsten. Dies liegt zum einen an der geringeren Acidität und zum anderen daran, dass ein Teil dieser Hydroxidgruppen durch die 1,6-Verknüpfung zu Amylopektin blockiert ist und nicht für die Substitution zur Verfügung steht. Im Gegensatz zu den Positionen 2 und 3 liegt hier der maximal erreichbare Substitutionsgrad folglich auch nicht bei eins, sondern ist abhängig vom Amylopektinanteil.

6.1.2 Synthese von oxidierter Stärke

Zur Oxidation von Kohlehydraten sind in der Literatur mehrere Möglichkeiten beschrieben. Speziell an Stärke werden zum Beispiel Natriumnitrit in Stickstoffdioxid, Brom^[252], Ozon^[253], Natriumperodat^[254], Wasserstoffperoxid^[255] und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Eisen(II)-sulfat^[255], Wasserstoffperoxid in Kombination mit Kupfer(II)-Ionen^[256] verwendet.

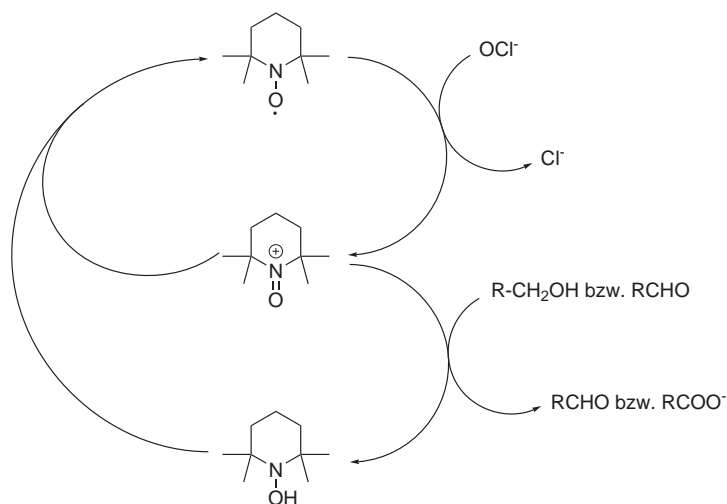
Neben den bereits beschriebenen Methoden ist auch die Oxidation mit Natriumhypochlorit und katalytischen Mengen TEMPO möglich^[257]. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Oxidation selektiv an den primären Hydroxylgruppen erfolgt. Weitere Vorteile dieser Methode sind hohe Reaktionsraten und -ausbeuten, hohe Selektivität, geringer Abbau des Polysaccharids und der katalytische Einsatz von TEMPO. Die Reaktion liefert immer ein Gemisch aus unumgesetzten Alkoholgruppen, Aldehyd- und Säurefunktionalitäten. Das Verhältnis der Komponenten zueinander ist über die eingesetzte Menge NaOCl steuerbar. Durch die Zugabe des relativ milden Reduktionsmittels Natriumborhydrid wird selektiv die Aldehydfunktionalität zum primären Alkohol reduziert, damit erhält man als Produkt eine Stärke, die an der Position C6 teilweise zur Carbonsäure oxidiert ist.



Schema 13: Darstellung von oxidierter Stärke **63**

Zur Oxidation wird Natriumhypochlorit und katalytische Mengen TEMPO verwendet. Bei TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl) handelt es sich um ein stabiles Radikal. Unter Einwirkung von Hypochlorit wird es zum Nitrosylkation oxidiert, welches die eigentliche reaktive Spezies bei der Oxidation darstellt und den primären Alkohol über den Aldehyd zum Carboxylat oxidiert. Dabei wird das Nitrosylkation zum Hydroxylamin reduziert, welches

mit einem weiteren Nitrosylkation zu TEMPO komproportioniert und so der katalytische Kreislauf geschlossen wird.^[257]



Schema 14: Mechanismus der TEMPO-Oxidation

Wie man aus Schema 14 erkennen kann, ist für die Oxidation des Alkohols zum Aldehyd sowie des Aldehyds zum Carboxylat jeweils ein Äquivalent Hypochlorit nötig. Setzt man also bei der Reaktion ein Äquivalent Hypochlorit ein, kann unter optimalen Bedingungen ein Substitutionsgrad von 0.5 erreicht werden. In der Praxis erhält man jedoch immer kleinere DS, da ein Teil der Alkohole nur bis zum Aldehyd oxidiert und anschließend durch die Zugabe von Natriumborhydrid wieder reduziert werden. Außerdem liegt der maximal mögliche Substitutionsgrad nicht bei eins, da ein Teil der primären Hydroxylgruppen durch die α -1,6-Verknüpfung zu Amylopektin blockiert ist und deshalb nicht oxidiert werden kann.

Die Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgte photometrisch nach dem Blumenkrantz-Assay^[258]. Mit Hilfe von Glucuronsäure wurde eine Kalibrierung durchgeführt anhand der der Gehalt an Glucuronsäure in der unbekannt Probe erfolgte. Die Berechnung des Substitutionsgrad erfolgte durch Einsetzen von Formel 27 und 28 in Formel 26.

$$D_s = \frac{n(ox)}{n(ox) + n(AGU)} \quad (26)$$

6.1 Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate

$$m(\text{Einwaage}) = m(\text{ox}) + m(\text{AGU}) \quad (27)$$

$$m(\text{ox}) = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (28)$$



Abbildung 38: Kalibrierlösungen zur Bestimmung des Glucuronsäureanteils, Zahlen stehen für die enthaltene Menge an Glucuronsäure in μg

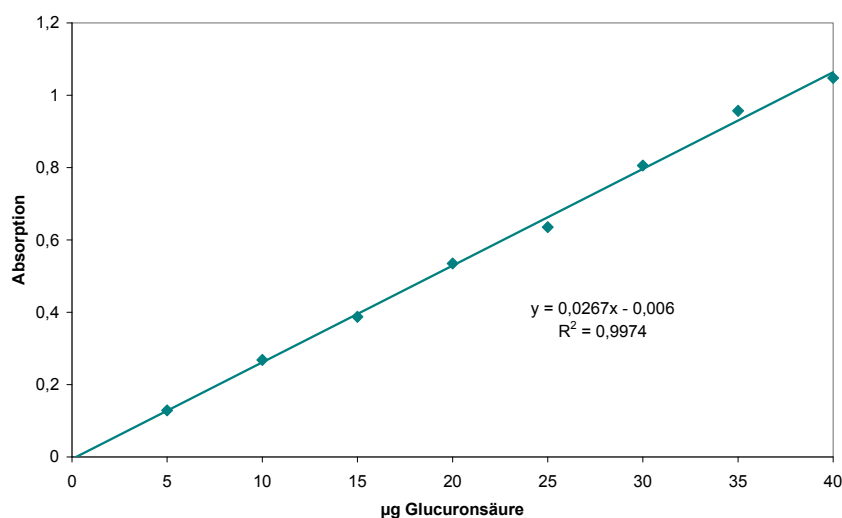


Abbildung 39: Lineare Abhängigkeit der Absorption vom Anteil an Glucuronsäure

Aus dem Mechanismus ergibt sich, dass sich der Substitutionsgrad über das Verhältnis von Natriumhypochlorit zur Glucoseeinheit steuern lässt. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Reaktionen aus Tabelle 21 durchgeführt. Dabei wurde immer die gleiche Stärke und die gleiche Menge des Katalysators TEMPO eingesetzt, während das molare Verhältnis von Hypochlorit pro AGU von 0,25 bis 4,00 variiert wurde.

6.1 Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate

Tabelle 21: Einfluss des NaOCl/AGU-Verhältnisses bei der Darstellung von oxidiertem Stärke (verwendete Stärke: Avebe, 8 mg TEMPO/g Stärke)**63**

	Stärke	mg TEMPO / g Stärke	n(NaOCl)/ n(AGU)	DS	Ausbeute	M _W / g mol ⁻¹
63a	Avebe	8	0.25	0.06	54%	48387
63b	Avebe	8	0.50	0.24	69%	61127
63c	Avebe	8	0.80	0.29	63%	n.b.
63d	Avebe	8	1.00	0.37	75%	n.b.
63e	Avebe	8	1.20	0.48	71%	n.b.
63f	Avebe	8	1.40	0.51	64%	33608
63g	Avebe	8	1.60	0.63	54%	n.b.
63h	Avebe	8	1.80	0.72	69%	64465
63i	Avebe	8	2.00	0.72	89%	n.b.
63j	Avebe	8	3.00	0.70	60%	54754
63k	Avebe	8	4.00	0.70	75%	63349

In Abbildung 40 sind die erhaltenen Substitutionsgrade gegen das molare Verhältnis von Hypochlorit zu AGU geplottet. Man erkennt einen linearen Anstieg des Substitutionsgrads bis etwa ein DS von 0.7 erreicht ist. Eine weitere Erhöhung der Hypochloritmenge lieferte keine Erhöhung des Substitutionsgrads. Man kann davon ausgehen, dass bei etwa 0.7 der maximale Substitutionsgrad erreicht ist. Im Bereich zwischen $0 < D_s < 0.7$ ließ sich gezielt jeder beliebige DS einstellen.

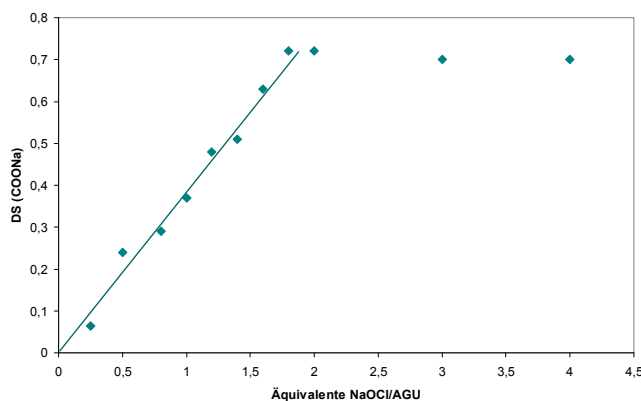


Abbildung 40: Substitutionsgrad der oxidierten Stärken **63** in Abhängigkeit des Natriumhypochlorit/AGU-Verhältnisses

Der Anteil der 1,6-Verknüpfung in Amylopektin beträgt etwa 5 - 6 %, die mittlere Kettenlänge liegt bei 20 - 25 Monomereinheiten. Der maximale Substitutionsgrad wird folglich nicht alleine durch den Verzweigungsgrad bestimmt. Es scheint wahrscheinlich, dass ein Teil der primären Hydroxylgruppen nicht für die Reaktion zugänglich ist. Die molekulare Masse der oxidierten Stärken lag immer im Bereich von 30000 – 60000 g/mol. Dabei ließ sich keine Korrelation mit der eingesetzten Menge an Natriumhypochlorit feststellen. Kato berichtete, dass bei der Oxidation von Stärke mit TEMPO/NaOCl/NaBr bevorzugt die 1,6-glycosidischen Bindungen gespalten wurden und eine oxidierte Stärke mit nahezu reiner 1,4-Verknüpfung resultierte.^[259] Bei der Variation der Menge an Hypochlorit wurde in dieser Arbeit immer die gleiche Stärke als Ausgangsmaterial verwendet. Man kann davon ausgehen, dass durch die bevorzugt stattfindende Spaltung der 1,6-glycosidischen Bindung oxidierte Stärken resultieren, deren Molekulargewicht in einem ähnlichen Größenbereich liegen.

Es stellte sich die Frage, ob die Menge des eingesetzten Katalysators einen Einfluss auf den Substitutionsgrad hat. Aus diesem Grund wurden Reaktionen mit der halben Menge an TEMPO durchgeführt und mit den vorherigen Ergebnissen verglichen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Einfluss der TEMPO-Menge bei der Oxidation von Stärke

	Stärke	mg TEMPO/ g Stärke	n(NaOCl)/ n(AGU)	DS	Ausbeute
63l	Avebe	4	0.5	0.23	100%
63b	Avebe	8	0.5	0.24	69%
63m	Avebe	4	0.8	0.24	74%
63c	Avebe	8	0.8	0.29	63%
63n	Avebe	4	1.0	0.29	96%
63d	Avebe	8	1.0	0.37	75%

6.1 Synthese elektrophil funktionalisierter Stärkederivate

Wie erwartet stieg in allen Fällen der Substitutionsgrad mit steigender Menge an Hypochlorit an. Dabei konnte man jedoch feststellen, dass die Reaktionen, die mit der halben Menge an TEMPO durchgeführt wurden, immer einen leicht geringeren Substitutionsgrad zur Folge hatten. Außerdem ließ sich erkennen, dass der Effekt umso stärker ausgeprägt war, je mehr Äquivalente Hypochlorit verwendet wurden. Weiterhin konnte man den Trend erkennen, dass die Ausbeuten bei der Verwendung der halben Katalysatormenge größer wurden. Man kann davon ausgehen, dass TEMPO ein Abbau der Stärke katalysiert.

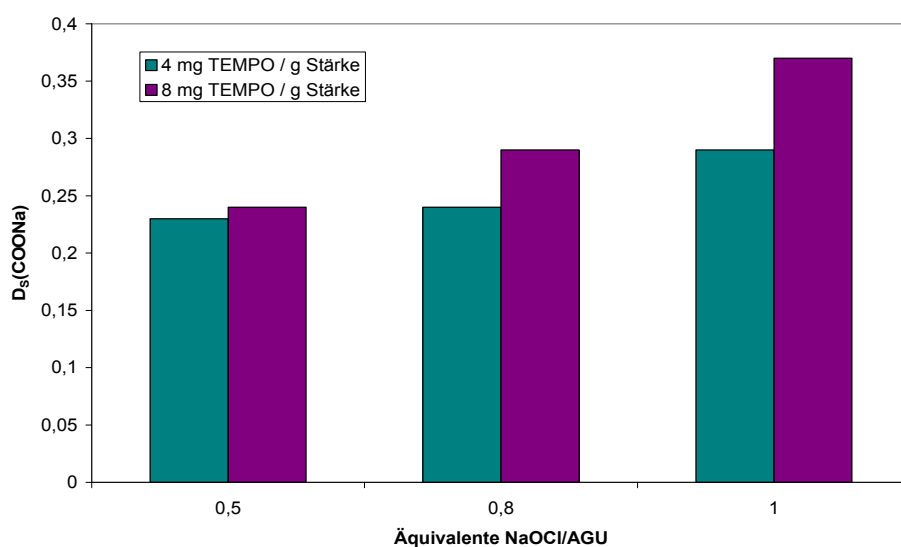


Abbildung 41: Substitutionsgrad in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente NaOCl/AGU unter Verwendung von 4 bzw. 8 mg TEMPO/g Stärke

Um den Einfluss der verwendeten Stärke zu untersuchen, wurden Stärken mit einem Amylosegehalt zwischen 0% und 50.3% mit jeweils einem Äquivalent NaOCl umgesetzt. Aus den Ergebnissen dieser Reaktionen (Tabelle 23) konnte man schließen, dass der Amylosegehalt der verwendeten Stärken nur einen geringen Einfluss auf den Substitutionsgrad hat. Es zeigte sich eine leichte Tendenz zu niedrigeren Substitutionsgraden bei steigendem Amylosegehalt.

Tabelle 23: Einfluss der verwendeten Stärke auf den Substitutionsgrad

	Stärke	Amylose- gehalt	mg TEMPO/ g Stärke	n(NaOCl)/ n(AGU)	DS	Ausbeute
63o	Wachsmaisstärke	0%	8	1.0	0.32	74%
63p	Maisstärke	22.8%	8	1.0	0.31	85%
63q	Kartoffelstärke	33.0%	8	1.0	0.29	73%
63d	Avebe	33.2%	8	1.0	0.37	75%
63r	Acros	34.1%	8	1.0	0.25	70%
63s	Hylon VII	50.3%	8	1.0	0.23	64%

Bei der Darstellung von oxidierte Stärke war ein problemloses Upscaling bis in den 100 g - Bereich möglich. Man erhielt ein sehr gut wasserlösliches Produkt, welches in großen Mengen in einer guten Reinheit erhalten wurde. Aus diesem Grund wurde die oxidierte Stärke als Ausgangsverbindung für die weiteren Umsetzungen gewählt.

6.2 Synthese von Stärken mit zellerkennenden Liganden

Durch die eingeführten Carboxylgruppen war es möglich, weitere Gruppen an das Stärkegrundgerüst anzubringen. Zum Beispiel kann die Carboxylgruppe mit einem Amin zum entsprechenden Amid umgesetzt werden. Zu dieser Reaktion sind in der Literatur mehrere Methoden beschrieben, die meist die Umsetzung der Säurefunktionalität zu einem Aktivester beinhalten. Mögliche Reagenzien zur Bildung eines Aktivesters und der anschließenden Kupplung zum Amid sind EDCI^[260], DCC^[261], CDI^[262], DCC/N-Hydroxysuccinimid^[263], DCC/N-Hydroxyphthalimid^[264], DCC/Nitrophenol^[265], DCC/Pentachlorphenol^[266], DCC/Pentafluorphenol^[267], DCC/1-Hydroxypiperidin^[268], DCC/HOBt^[269], DCC/HOAt^[270], HBTU^[271], HATU^[270], TBTU^[272], BOP^[273] und PyBOP^[274].

In dieser Arbeit sollten an die oxidierten Stärken mittels Amidbindung Folsäurederivate angeknüpft werden. Dabei wurde im Gegensatz zu bereits beschriebenen Systemen^[132, 275, 276] jedoch kein PEG-Spacer verwendet, sondern Alkylketten unterschiedlicher Länge. Die Aktivierung der Carboxylgruppe

6.2 Synthese von Stärken mit zellerkennenden Liganden

erfolgte in dieser Arbeit in situ durch Reaktion mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Hydroxybenzotriazol (HOBt). Die resultierenden Stärken mit den zellspezifischen Liganden sollten im nächsten Schritt weiter zu Nanopartikeln und Nanoplexen umgesetzt werden.

Folsäure wird auch als *N*-(4-(((2-Amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)-benzoyl)glutaminsäure bezeichnet und besteht aus einem 2-Amino-4-hydroxypteridinring, welcher über die Position C6 über eine Methylengruppe an die Aminogruppe der *para*-Aminobenzoesäure gebunden ist. Diese Carboxylgruppe ist mittels Amidbindung mit *L*-Glutaminsäure verknüpft. Die Teilstruktur, die aus Pteridin und Aminobenzoesäure gebildet wird, bezeichnet man als Pteroinsäure.

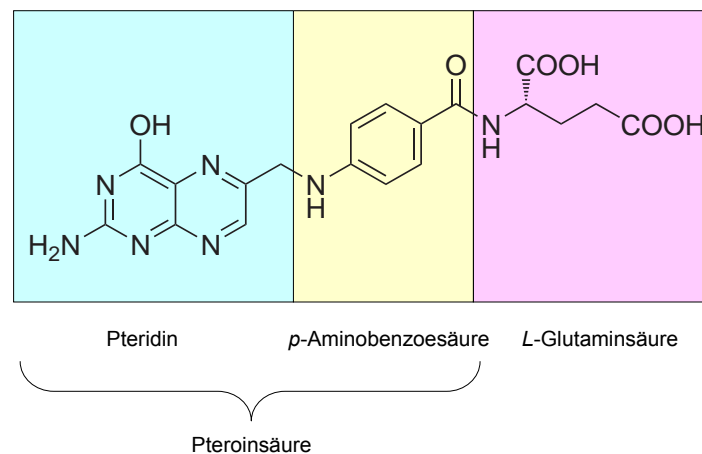
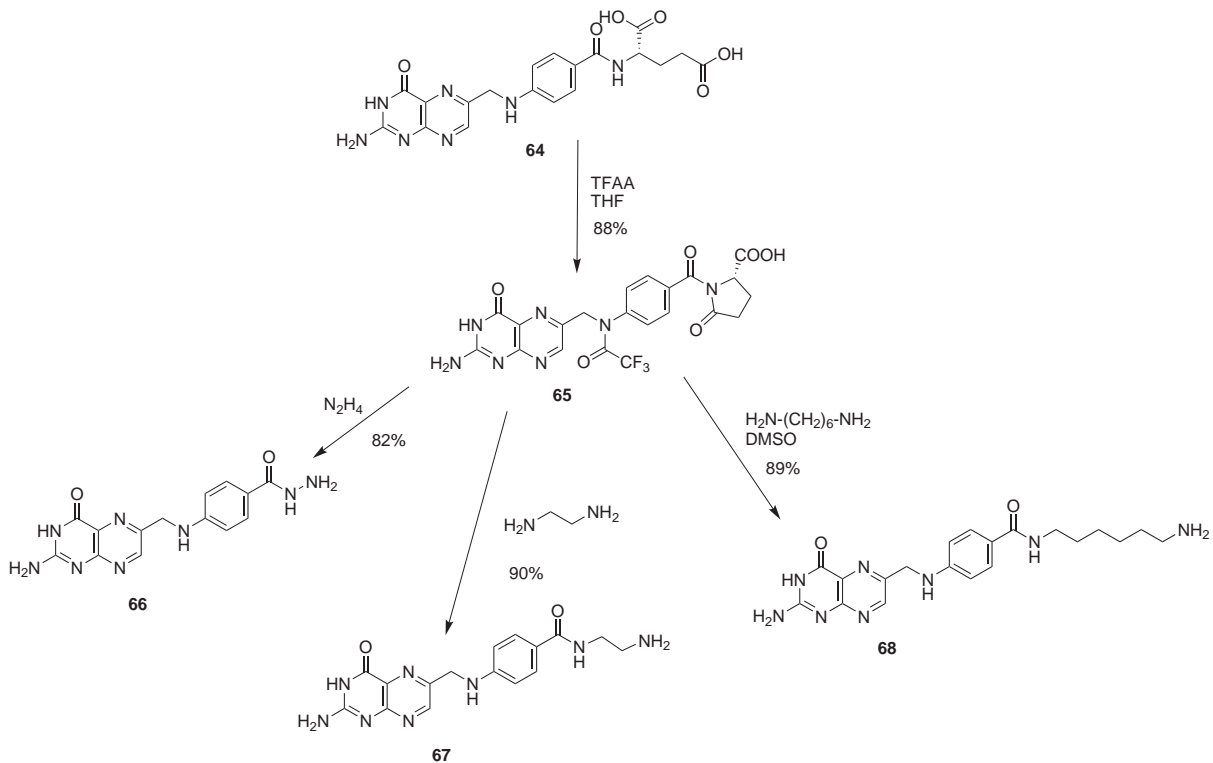


Abbildung 42: Struktur von Folsäure

Leamon^[143, 277] führte Untersuchungen zur optimalen Anknüpfungsstelle eines kovalent gebundenen Wirkstoffs an Folsäure durch. Er konnte zum einen zeigen, dass es keine Rolle spielt, ob die Anbindung an α - oder γ -Carboxylgruppe der Folsäure erfolgt. Zum anderen tauschte er die Glutaminsäure-Einheit gegen Glycin aus. Auch dieses Derivat wurde vom Folsäurerezeptor erkannt und mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man darauf schließen, dass nur die Pteroinsäure-Einheit für die Erkennung durch den Rezeptor notwendig ist. Damit kann für den gerichteten Transport nicht nur Folsäure verwendet werden, sondern auch Pteroinsäure und ihre Derivate. Die Erkennung durch den Folsäurerezeptor scheint dabei wenig direkt

von der Gruppe abzuhängen, die angeknüpft wird. So waren die Aufnahmeraten der Pterinderivate mit Glutaminsäure und Cystein vergleichbar. Wurde dagegen nur Pterinsäure verwendet, erhielt man eine um den Faktor 3 geringe Affinität zum Rezeptor. Leamon geht davon aus, dass der Abstand zwischen dem angebondenen Makromolekül und *p*-Aminobenzoesäure einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem Folatezeptor hat und die längeren Spacergruppen eine höhere Affinität bewirken.

In dieser Arbeit wurden aminofunktionalisierte Pterate mit verschiedenen Spacerlängen synthetisiert, die anschließend mittels Amidbindung an die oxidierten Stärken angeknüpft wurden.



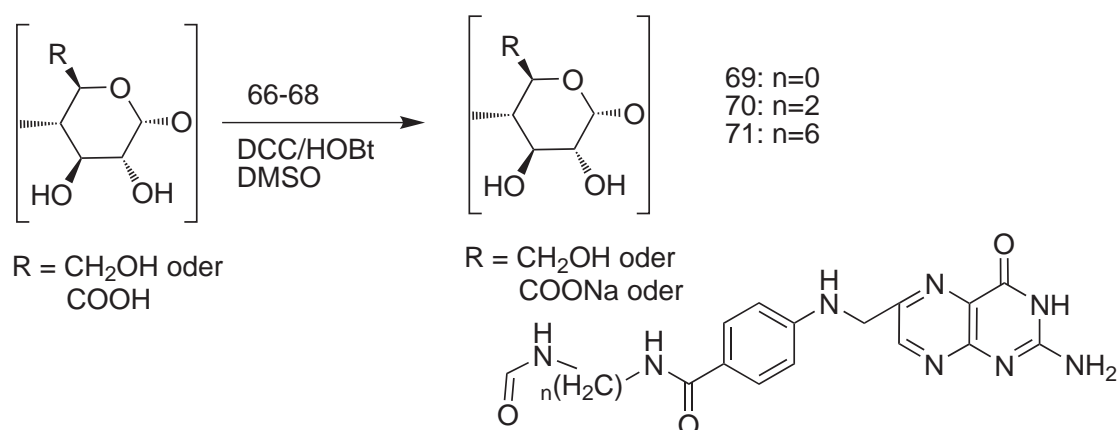
Schema 15: Darstellung von aminofunktionalisierten Pteraten

Setzt man Folsäure in wasserfreiem Tetrahydrofuran mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) um, erhält man Pyrofolsäure in 88% Ausbeute^[278]. Diese wurde mit Diaminen umgesetzt und man erhielt in Ausbeuten zwischen 82% und 90% die entsprechenden aminofunktionalisierten Derivate, die sich in der Länge des verwendeten Spacers unterscheiden. Bei der Verwendung von flüssigen

6.2 Synthese von Stärken mit zellerkennenden Liganden

Diaminen wie Ethylendiamin und Hydrazin war die Umsetzung direkt in Substanz möglich. Bei dem längerkettigen Diamin wurde Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel eingesetzt. Die erfolgreiche Umsetzung konnte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und den Massenspektren nachgewiesen werden. Die Öffnung der Pyrofolensäure durch die jeweiligen Diamine erfolgte regioselektiv an der Carbonylgruppe in α -Position zum aromatischen Ring. Das Massenspektrum lieferte dabei den Beweis für die regioselektive Umsetzung.

Diese aminofunktionalisierten Pteroate konnten mit Hilfe von DCC/HOBt an die Carboxylgruppen der oxidierten Stärken gekuppelt werden.



Schema 16: Kupplung von aminofunktionalisierten Pteroaten **66** – **68** an oxidierte Stärke

Da für diese Umsetzung die freie Säure benötigt wurde, musste das Carboxylat vor der Reaktion mittels eines Kationentauschers (Dowex 50WX2-200) in die freie Säure überführt werden. Dieser Reaktionsschritt konnte einfach und schnell im IR-Spektrum beobachtet werden (Abbildung 43). Man erkennt bei der Carboxylatform deutlich die Carbonylschwingung bei 1599 cm^{-1} . Nach Behandlung mit dem Ionentauscher verschwand diese Schwingung und die Schwingung der freien Säure bei 1722 cm^{-1} erschien.

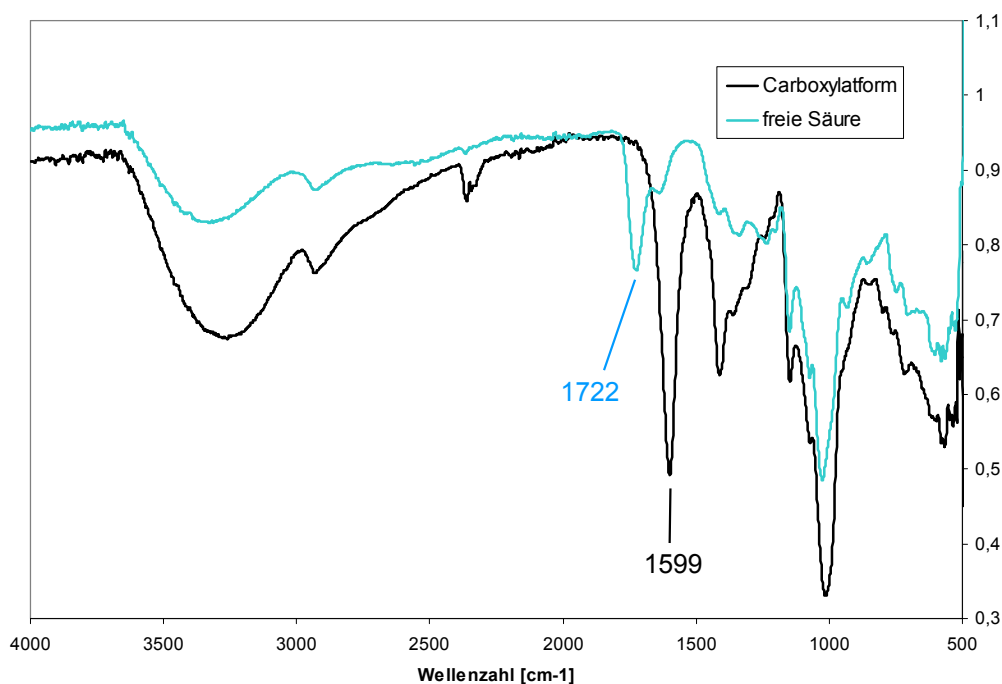


Abbildung 43: IR-Spektrum von oxidiertem Stärke **63** vor und nach Behandlung mit Ionentauscher (Dowex 50WX2-200)

Die erfolgreiche Kupplung des Amins erkannte man bereits während des Reaktionsverlaufs durch die Bildung des unlöslichen Dicyclohexylharnstoffs. Dieser wurde abfiltriert und die Reaktionsmischung mit 1M NaOH verdünnt. Dadurch wurden die unumgesetzten Carboxylgruppen deprotoniert und so eine bessere Löslichkeit in Wasser erzielt. Dabei kam es mit steigendem Substitutionsgrad vermehrt zur Bildung von Niederschlägen. Die weitere Reinigung erfolgte mittels kontinuierlicher Ultrafiltration gegen Wasser über eine Cellulosemembran mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa und Abtrennung der unlöslichen Bestandteile mittels Filtration. Dazu wurde ein Spritzenvorsatzfilter aus Cellulosemischester mit einer Porengröße von 0,22 μm verwendet. Nach Lyophilisieren erhielt man die Produkte als gelbe bis bräunliche watteartige Feststoffe. Der Anteil der angeknüpften Pteroate ließ sich über UV-Spektroskopie bestimmen.

Die Pteroate **66** - **68** wurden in verschiedenen Stöchiometrien eingesetzt um ihr Kupplungsverhalten zu untersuchen. Der Substitutionsgrad muss so eingestellt werden, dass einerseits genügend Liganden für den gerichteten Transport zur Verfügung stehen und andererseits die modifizierten Stärken noch wasserlöslich

6.2 Synthese von Stärken mit zellerkennenden Liganden

sind. In Tabelle 24 - Tabelle 26 sind die durchgeführten Umsetzungen mit den Pteroaten **66** – **68** gezeigt. Man kann erkennen, dass in allen Fällen wie erwartet der Substitutionsgrad mit steigendem Verhältnis von Ligand zu Carboxylgruppen anstieg.

Tabelle 24: Synthese von Stärken mit Pteroylhydrazid **66** als Ligand

	n(Ligand)/n(COOH)	DS _{Ligand} pro AGU	Molmasse pro Ligand [g/mol]	DS _{COONa} pro AGU
69a	0.2	0.115	1921	0.475
69b	0.5	0.105	1948	0.485
69c	1.0	0.208	1208	0.382

Tabelle 25: Synthese von Stärken mit Pteroylamidethylamin **67** als Ligand

	n(Ligand)/n(COOH)	DS _{Ligand} pro AGU	Molmasse pro Ligand [g/mol]	DS _{COONa} pro AGU
70a	0.2	0.015	12890	0.705
70b	0.3	0.026	7587	0.694
70c	0.5	0.036	5578	0.684
70d	1.0	0.029	6839	0.691

Tabelle 26: Synthese von Stärken mit Pteroylamidhexylamin **68** als Ligand

	n(Ligand)/n(COOH)	DS _{Ligand} pro AGU	Molmasse pro Ligand [g/mol]	DS _{COONa} pro AGU
71a	0.1	0.008	23330	0.582
71b	0.2	0.023	8382	0.567
71c	0.3	0.077	2852	0.643
71d	0.5	0.250	1144	0.340
71e	1.0	-		

Bei kleinem Verhältnis Ligand/COOH war die Reaktionseffizienz bei der Verwendung von Pteroylhydrazid **66** am größten, da hier die Elektronendichte an der Aminogruppe am größten ist. Bei steigendem Verhältnis Ligand/COOH wird dieser Effekt von der zunehmenden Flexibilität der Spacergruppe überlagert und

die Kupplung mit **68** lieferte die größeren Massenanteile Ligand im Produkt. Bei der Umsetzung mit einem Äquivalent Ligand **68** pro Carboxylgruppe erhielt man ein Produkt, welches aufgrund des hohen Massenanteils an hydrophobem Ligand nicht mehr in Wasser löslich war. Aus diesem Grund konnte der genaue Massenanteil nicht mittels UV-Spektroskopie bestimmt werden. Das Derivat mit dem C2-Spacer lieferte den geringsten Massenanteil Ligand. Diese Ergebnisse konnten mit der zunehmenden Flexibilität der zu kuppelnden Aminogruppen mit steigender Spacerlänge erklärt werden. Während beim C2-Spacer nur eine eingeschränkte Beweglichkeit möglich ist, ist das Pterolat mit C6-Spacer wesentlich flexibler und kann deshalb leichter mit dem Polymer reagieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist, drei aminofunktionalisierte Pterolate mit Spacerlängen von null, zwei und sechs Methylengruppen darzustellen. Die Kupplung an oxidierte Stärken mittels Amidbindung wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei konnte durch Variation der Stöchiometrie der DS an Ligand eingestellt werden.

Für die weitere Bildung von Nanoplexen sollte ein Polymer verwendet werden, an das ein zellspezifischer Ligand angebunden ist und welches eine gute Löslichkeit in Wasser aufweist. Weiterhin ist bekannt, dass sich eine gewisse Spacerlänge zwischen Ligand und Makromolekül positiv auf die Erkennung durch den Folsäurerezeptor auswirkt. Deshalb wurde für die weiteren Umsetzungen das Derivat **71b** gewählt, wobei es sich um eine oxidierte Stärke mit Pteroylamidhexylamin als Ligand und einem DS von 0.023 handelt.

7 Bildung von Nanopartikeln und Nanoplexen

7.1 Stand der Forschung

Unter Nanopartikeln versteht man Teilchen, deren Größe im Bereich von 50 – 200 nm liegen.^[274] Größere Partikel werden als Mikroteilchen bezeichnet, kleinere als Sub-Nanopartikel. Nanoteilchen in wässriger Lösung ergeben meist trübe, opaleszierende Dispersionen.^[275] Nanopartikel können sowohl aus anorganischen Materialien als auch aus Polymeren hergestellt werden, sowie aus einer Kombination der beiden genannten Verbindungsklassen. Als anorganische Materialien werden zum Beispiel Gold, Silber, Kohlenstoff, Wolframcarbid, Silber- und Cadmiumsulfid^[276], Cadmiumselenid und -tellurid^[277], Titandioxid, Zinkoxid^[278], Siliziumdioxid, Nickeloxid^[279] und Eisen(III)-oxid^[279] verwendet. Zur Darstellung von Nanopartikel aus Polymeren für pharmazeutische Anwendungen kommen hauptsächlich Polylactid (PLA)^[280] und Poly-(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA)^[281, 282] zum Einsatz. Diese bieten den Vorteil, dass sie nicht toxisch und biologisch abbaubar sind. Daneben werden auch vermehrt Polymere auf Kohlenhydratbasis zur Darstellung von Nanopartikeln verwendet, zum Beispiel Chitosan^[283], Dextran^[284], Cyclodextrine^[285], Arabinogalaktan^[286], Maltodextrin^[287] und Stärke^[288-290]. Diese Polymere werden ebenfalls vom menschlichen Körper toleriert und sind biologisch abbaubar. Dadurch sind Nanopartikel auf Kohlenhydratbasis gut für pharmazeutische Anwendungen geeignet.

Sowohl Mikro- als auch Nanopartikel spielen eine wichtige Rolle in der Medizin. Bei beiden Arten kann man eine weitere Unterteilung in Kapseln und Sphären vornehmen (vgl. Abbildung 7). In der Medizin und Pharmazie werden Nanopartikel zum Beispiel für die Verkapselung von Wirkstoffen verwendet. Dies dient dazu Geruch oder Geschmack zu maskieren^[291], Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Hilfsstoffen zu vermeiden, unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren^[292] und um ein gezieltes Targeting zu erreichen. Auch sind durch den Einschluss des Wirkstoffs in Nanopartikel neue Applikationsformen denkbar, zum Beispiel die orale Gabe von Insulin^[293] und Heparin^[294].

Zur Darstellung von Nanopartikeln sind mehrere Methoden beschrieben. Dabei unterscheiden sich die Herstellungsmöglichkeiten von anorganischen Partikeln grundlegend von den Methoden zur Synthese von Partikeln, die aus Polymeren bestehen. Hier wird nur auf die Beschreibung von Systemen auf Basis von Polymeren eingegangen. Dabei zählen die Emulsionspolymerisation^[295, 296], sowie die Micro- und Miniemulsionstechnik^[295] und die Emulsions-Evaporations-Methode^[297, 298] zu den häufigsten Methoden. Nanopartikel aus nativer Stärke können durch mechanische Behandlung der Stärkekörner in einer Vibrationsmühle gewonnen werden. Szymonska erhält damit Partikel, deren Größe zwischen 50 und 100 nm liegen.^[289] Daneben gibt es auch die Möglichkeit der Selbstorganisation. Diese tritt immer dann auf, wenn sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche im Polymer vorhanden sind. In wässriger Lösung kommt es zu einer Selbstorganisation, bei der sich die hydrophilen Gruppen um die hydrophoben Bereiche anordnen und so eine Abschirmung der hydrophoben Bereiche resultiert.

Die Charakterisierung der dargestellten Partikel erfolgt mittels verschiedener Verfahren. Um die Größe der Partikel zu bestimmen, wird dynamische Lichtstreuung (DLS)^[299-301] verwendet. Die Messung des Zeta-Potentials gibt außerdem Aufschluss über die Oberflächenladung des Partikels.^[300] Die Gestalt der Partikel kann mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wie der Rasterelektronenmikroskopie (REM)^[299], Rasterkraftmikroskopie (AFM)^[300] und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)^[301] untersucht werden.

Nanopartikel werden nach intravenöser Gabe meist schnell von den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems erkannt und aus der Blutbahn eliminiert.^[302] Dieser Effekt ist auf die Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche der Nanopartikel zurückzuführen und wird als Opsonisierung bezeichnet. Die Adsorption kann durch eine Oberflächenmodifizierung mittels einer sterischen Barriere vermieden werden. Dazu können Polyethylenglycol (PEG), PEG-Derivate wie Poloxamere (Pluronic[®]) und Poloxamine^[303], Heparin oder Dextran zum Einsatz kommen^[287], wodurch eine längere Zirkulationszeit

der Partikel erreicht wird. Von den genannten Möglichkeiten, wird PEG am häufigsten verwendet.

Weiterhin ist bekannt, dass durch eine chemische Modifizierung der Oberfläche des Partikels, zum Beispiel durch geladene Gruppen, die Aufnahme in die Zellen gesteigert werden kann.^[274] Dabei erzielen Partikel mit einer negativen Oberflächenladung eine hohe systemische Retention, die auf eine Reduzierung der Opsonierung im Blut zurückzuführen ist.^[304] Generell lässt sich feststellen, dass hydrophile Nanoteilchen mit einer Größe von einigen bis zu einigen hundert Nanometern eine lange Verweildauer im Blutplasma zeigen und aufgrund der erhöhten Permeabilität und Retention (EPR) leicht in Tumore eindringen können.^[305-307]

In der Literatur sind verschiedene Nanopartikel beschrieben, die aus Block-copolymeren bestehen. Li verwendete zum Beispiel ligandstabilisierte Platinpartikel und Poly(isopren-*block*-dimethylaminoethylmethacrylat) (PI-*b*-PDMAEMA) um organisch-anorganische Hybridmaterialien zu erzeugen.^[308] Block-copolymere aus PEG und Aminosäuren sind gut für die kovalente Anbindung von Wirkstoffen geeignet und können so eine große Menge therapeutisch aktiver Substanzen transportieren.^[309]

Eine andere Möglichkeit zum Aufbau supramolekularer Strukturen liegt in der Verwendung von Polyelektrolyten. Dabei wird ein Polymer mit geladenen Gruppen mit einem entsprechenden Gegenion umgesetzt. Je nach Natur des Gegenions bilden sich verschiedene Strukturen aus (siehe Abbildung 44). In der vorliegenden Arbeit sind speziell die Polyelektrolyt-Komplexe mit strukturellen mehrwertigen Gegenionen von Interesse.

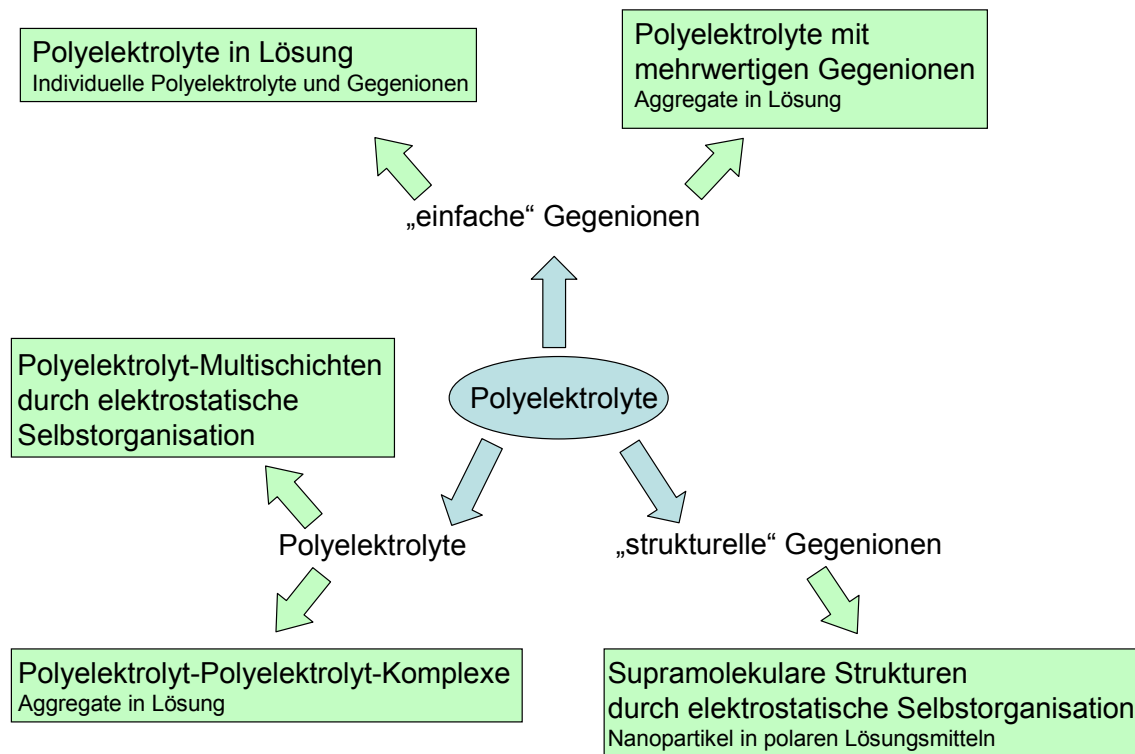


Abbildung 44: Strukturen aus Polyelektrolyten^[310]

Nanopartikel bestehen aus nur einer Art von Teilchen. Im Gegensatz dazu setzen sich Nanoplexe aus zwei oder mehr verschiedenen Komponenten zusammen, die unterschiedliche Ladungen tragen. Aufgrund der Coulomb-Anziehung bilden sich supramolekulare Strukturen aus, die unter idealen Bedingungen zur Bildung eines Nanoteilchens führen können. Der Vorteil der Nano- oder Polyplexe liegt in der pH-abhängigen Stabilität. Da der Zusammenhalt im Wesentlichen durch elektrostatische Wechselwirkungen verursacht wird, bewirkt eine Änderung des pH-Werts eine Änderung des Protonierungszustands der Bestandteile und damit eine Änderung in der Stabilität der Nanopartikel. Zum Beispiel ist es möglich, Nanopartikel zu kreieren, die mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und dort aufgrund des niedrigeren pH-Werts im Endosom den Wirkstoff freisetzen.

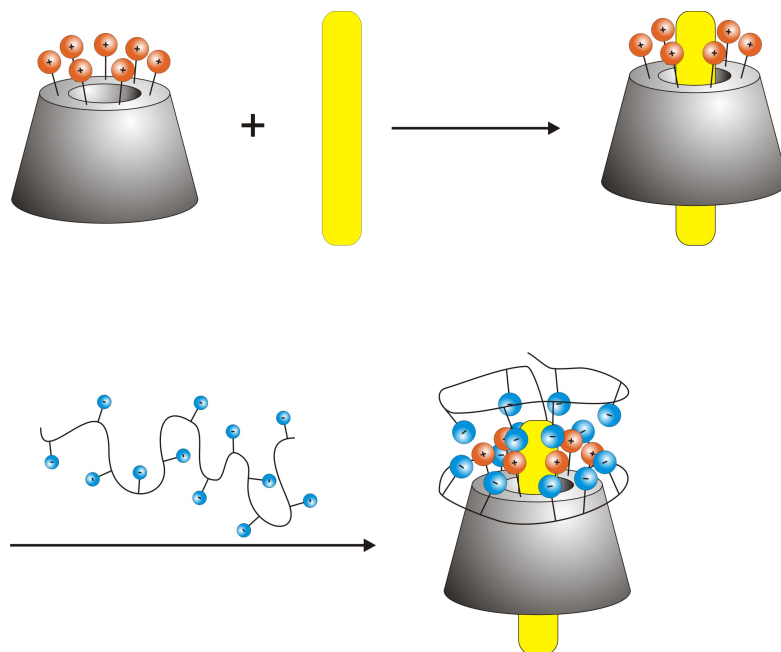
In der Literatur sind diverse Nanoplex-Systeme beschrieben. So sind kationische Polymere dazu in der Lage mit DNA Komplexe auszubilden. Als Polymere werden zum Beispiel Poly(ethylenimin) (PEI), Polylysin, Chitosan^[283] und

Poly(dimethylaminoethylmethacrylat) (PDMAEMA)^[311] verwendet. Gröhn^[312] untersucht die Assoziation von DNA mit verschiedenen zwei- und vierwertigen organischen Gegenionen. In allen Fällen bilden sich DNA-Komplexe aus, bei Verwendung von zweiwertigen Ionen ist jedoch ein hoher Überschuss an Gegenionen notwendig (Ladungsverhältnis 50:1). Bei vierwertigen Gegenionen kommt es bereits bei einem Ladungsverhältnis von 1:1 zu Aggregation. Hoh^[313] arbeitet ebenfalls an DNA, verwendet aber Spermidin als Gegenion. Mit steigendem Anteil an Spermidin verändert sich die Struktur von Schleifen über blumenartige Strukturen zu scheibenförmigen Partikeln. Die Komplexbildung zwischen DNA und einem zylindrischen Bürstenpolymer mit quartären Poly(vinylpyridin)- und Polyethylenimin-Seitenketten sowie zwischen DNA und einem Dendrimer der fünften Generation ist Gegenstand der Arbeiten von Schmidt^[314]. Er untersuchte die Bildung von Polyplexen zwischen DNA und Poly(ethylenglycol)-block-poly(2-(diethylamino)ethylmethacrylat).^[315] Dabei konnte er zeigen, dass die Größe der Polyplexe vom Verhältnis der beiden Komponenten zueinander abhängig ist. Es bilden sich Kern-Schale-Strukturen aus, die aus einem dichten Kern negativ geladener DNA und positiv geladener Diethylaminoethylmethacrylat-ketten sowie einer polymeren Hülle aus PEG bestehen. Diese hydrophile Hülle reduziert Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen, die die Erkennung durch das phagozytierende System steuern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein Transportsystem für hydrophobe Wirkstoffe zu entwickeln. Mit den dargestellten CD Derivaten war bereits die Möglichkeit der Solubilisierung der Wirkstoffe gegeben. Durch die geladenen Gruppen der Cyclodextrine lag der Versuch nahe, die CD-Wirkstoff-Komplexe weiter zu Polyplexen umzusetzen. Dazu wird je nach Ladung am CD ein entgegengesetzt geladenes Polymer benötigt. Unter Berücksichtigung der literaturbeschriebenen Ergebnisse fiel die Wahl dabei auf ein anionisches und ein kationisches Block-copolymer mit PEG. Damit kann eine Abschirmung erreicht und so die Zirkulationszeit im Blut erhöht werden.

7.1 Stand der Forschung

Zum anderen wurde ein Polyanion auf Stärkebasis gewählt. Dabei handelt es sich um ein biologisch abbaubares Polymer, welches gut vom menschlichen Körper toleriert wird. Zusätzlich konnte hier mit Pteroinsäureamidhexylamin ein zellspezifischer Ligand angebunden werden, der einen gerichteten Transport ermöglicht. Dieses Polymer vereint mehrere positive Eigenschaften wie die negative Ladung zur Polyplexbildung, biologische Abbaubarkeit und einen zellspezifischen Ligand zum gerichteten Transport. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Stärke analog zu Dextran als hydrophiles Polymer eine Art sterische Abschirmung des Partikels bewirkt und so die Opsonisierung verhindert.



Schema 17: Bildung von Nanoplexen aus einem hepta-kationischen CD-Derivat und einem polyanionischen Polymer

Es gibt viele Faktoren, die einen Einfluss auf die Bildung und die Stabilität der Nanoplexe haben. Dazu gehören das stöchiometrische Verhältnis der beiden Komponenten, die Konzentrationen der Lösungen, die Reihenfolge der Zugabe, die Rührgeschwindigkeit und das Lösungsmittel.

7.2 Nanoplexe aus Block-copolymeren

Zur Darstellung von Nanoplexen können Block-copolymere mit geladenen Gruppen verwendet werden. Dabei ist es von Vorteil, wenn ein Teil des Polymers aus PEG besteht. Der andere Teil des Blockcopolymers besteht aus Monomeren, die eine Ladung tragen. Dadurch werden Coulomb-Wechselwirkungen mit dem zweiten Baustein des Nanoplexes ermöglicht. Als zweiter Baustein sollen in diesem Fall CD Derivate verwendet werden. Dabei ist es möglich, einen Wirkstoff in die Kavität des CDs einzuschließen und so eine Beladung des Nanoplexes mit Wirkstoff zu erreichen. Dabei kann man davon ausgehen, dass die Coulomb-Wechselwirkungen nur zwischen den geladenen Bausteinen und dem entgegengesetzt geladenen CD stattfinden. Um diesen Teil des Partikels ordnen sich die PEG-Ketten an und führen so zu einer Stabilisierung des Teilchens.

Aus diesem Grund wurde die Bildung von Nanoplexen zuerst an dem System aus Polyethylenoxid-*b*-polymethacrylsäure (PEO-*b*-PMAA) mit Hepta-cysteaminyl- β -CD **7** untersucht. Das Polymer besteht aus 170 Ethylenoxid- ($n=170$) und 180 Methacrylsäure-bausteinen ($m=180$) und hat eine Molmasse von 23000 g/mol.

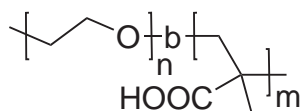


Abbildung 45: Struktur von PEO-*b*-PMAA

Die Darstellung aller Partikel erfolgte in wässriger Lösung. Dazu wurden die beiden Komponenten einzeln in Wasser oder Puffer gelöst, wobei die Konzentration jeweils 1 mg/ml betrug. Es wurde immer das Polymer vorgelegt und unter Rühren bei 15500 rpm tropfenweise mit der Lösung des CD-Derivats versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde 60 s bei RT weitergerührt.

Zuerst wurde die Nanoplexbildung in Wasser untersucht. Allerdings war die Verwendung von reinem Wasser nicht möglich, da sich das Polymer unter diesen Bedingungen nicht löste. Deshalb wurde PEO-*b*-PMAA in 1M Natronlauge gelöst und anschließend mit Salzsäure neutralisiert. Im Vergleich dazu wurden unter gleichen Bedingungen die Partikel in PBS hergestellt. Dabei handelt es sich um

7.2 Nanoplexe aus Block-copolymeren

einen 10 mM Phosphatpuffer, der zusätzlich 155 mM Natriumchlorid enthält. Der pH-Wert beträgt 7.4 und entspricht damit den physiologischen Bedingungen des Blutes. Die Eigenschaften der gebildeten Nanoplexe wie Größe, Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotential sind wesentlich vom Verhältnis der geladenen Gruppen zueinander abhängig. Aus diesem Grund wurde die Nanoplexbildung aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminy- β -CD **7** bei verschiedenen Mischungsverhältnissen in Wasser und PBS untersucht. Die Charakterisierung der Partikel erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS). Die Ergebnisse dieser Messungen sind als Mittelwerte aus drei Messungen in Tabelle 27 und Tabelle 28 gezeigt.

Tabelle 27: Nanoplexe **72** aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminy- β -CD **7** in 50 mM wässriger NaCl-Lösung

Probe	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
72a	0.5	163.0 ± 4.7	100	0.117 ± 0.015	0.3 ± 0.1
72b	0.9	114.6 ± 2.3	100	0.082 ± 0.036	0.2 ± 0.1
72c	1.0	110.7 ± 4.4	100	0.052 ± 0.001	0.1 ± 0.1
72d	1.1	119.1 ± 1.3	100	0.081 ± 0.017	-0.2 ± 0.2
72e	1.5	118.0 ± 6.5	100	0.042 ± 0.015	-0.2 ± 0.2
72f	2.0	131.8 ± 1.2	100	0.045 ± 0.008	-0.6 ± 0.0
72g	5.0	139.3 ± 2.3	100	0.054 ± 0.010	-1.1 ± 1.1
72h	10	147.0 ± 1.9	100	0.040 ± 0.028	-0.8 ± 0.2
72j	100	209.2 ± 25.5	47	0.733 ± 0.009	-8.3 ± 0.3
		15.4 ± 0.2	53		
72k	250	375.8 ± 24.7	72	0.760 ± 0.030	-12.7 ± 1.5
		15.4 ± 0.0	28		
PEO-<i>b</i>- PMAA	∞	218.4 ± 42.0	49	0.233 ± 0.021	-14.8 ± 0.9
		15.8 ± 0.6	51		

Tabelle 28: Nanoplexe **73** aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD **7** in PBS

Probe	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
73a	0.5	191.4 ± 8.1	100	0.424 ± 0.081	-1.7 ± 0.2
73b	0.9	181.7 ± 12.5	90	0.521 ± 0.021	-0.3 ± 0.5
		12.8 ± 1.8	7		
73c	1.0	217.7 ± 12.9	85	0.467 ± 0.163	-1.0 ± 0.2
		14.0 ± 0.2	10		
73d	1.1	282.4 ± 14.7	71	0.564 ± 0.042	-1.0 ± 0.2
		13.4 ± 1.3	11		
73e	1.5	371.2 ± 33.7	85	0.559 ± 0.055	-0.8 ± 0.7
		14.5 ± 1.6	8		
73f	2.0	293.5 ± 20.0	75	0.708 ± 0.116	-0.8 ± 1.0
		15.3 ± 0.5	18		
73g	5.0	367.5 ± 88.5	82	0.854 ± 0.086	-2.1 ± 0.5
		15.5 ± 2.1	13		
		535.7 ± 91.9	50		
73h	10	134.0 ± 49.9	18	0.541 ± 0.063	-4.2 ± 0.1
		15.5 ± 0.61	30		
73i	100	514.3 ± 9.7	50	0.484 ± 0.069	-9.4 ± 1.8
		15.0 ± 0.2	34		
		419.1 ± 32.8	58		
73j	250	14.8 ± 0.4	30	0.528 ± 0.062	-11.9 ± 1.6
		80.8 ± 20.3	11		
		592.4 ± 8.5	42		
73k	500	173.2 ± 22.2	24	0.618 ± 0.115	-12.2 ± 0.8
		16.3 ± 0.1	30		
PEO-<i>b</i>- PMAA	∞	235.4 ± 4.3	46	0.418 ± 0.049	-15.3 ± 1.1
		17.1 ± 1.1	50		

Auch das reine Block-copolymer bildet in wässriger Lösung Aggregate aus. Dieses Phänomen ist in der Literatur beschrieben.^[321, 322] Zwischen PEO und PMAA bilden sich Wasserstoffbrücken aus. Diese können entweder zwischen zwei Polymerketten ausgebildet werden, was zur Bildung von Mizellen führt oder zwischen den Blöcken einer einzelnen Kette. Im zweiten Fall spricht man von „Selbst-Komplexierung“. Das Verhältnis der beiden Spezies zueinander ist unter anderem vom pH-Wert abhängig. Im sauren Milieu sind die Carboxylgruppen vollständig protoniert und es bilden sich polymere Mizellen. Mit steigendem pH-Wert bilden sich immer weniger Wasserstoffbrücken aus mit der Folge, dass die interpolymeren Komplexe zerstört werden und der Anteil der Selbstkomplexierung steigt. Mit steigendem pH-Wert nimmt folglich die Größe der Partikel ab.

Bei der Darstellung einiger Partikel erhielt man keine monodispersen Systeme. Es kam teilweise zur Bildung von kleineren Teilchen, die in der Größenordnung von 15 nm liegen. Da diese jedoch auch beim reinen Polymer zu beobachten waren, kann ausgeschlossen werden, dass das Auftreten der kleineren Partikel im Zusammenhang mit der Bildung der Nanoplexe stand. Jedoch verschwand die kleinere Spezies bei der Darstellung der Nanoplexe in Wasser bis zu einem Mischungsverhältnis von 10:1 und war erst wieder bei größeren Verhältnissen COOH/NH₂ zu beobachten. Der Anteil der jeweiligen Teilchengröße berechnet sich aus den Messungen der dynamischen Lichtstreuung und stellt den Anteil der Intensität des gestreuten Lichts dar. Da große Partikel wesentlich mehr Streulicht erzeugen als kleine, ist der Zahlenanteil der kleinen Partikel bei gleichen Intensitätsanteilen deutlich größer. Man kann also davon ausgehen, dass das reine Block-copolymer zum größten Teil Teilchen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 16 – 17 nm ausbildet. Dies entspricht in etwa der in der Literatur beschriebenen Größe.^[321]

Die hydrodynamischen Durchmesser der dargestellten Partikel in Wasser und PBS sind in Abbildung 46 gezeigt. Man erkennt, dass bei gleichem Mischungsverhältnis die Partikel in PBS immer deutlich größer waren als die

entsprechenden Partikel in Wasser. Dieser Effekt wird umso deutlicher, je größer das Verhältnis COOH/NH_2 wurde. Zum Vergleich wurde auch der hydrodynamische Durchmesser des reinen Polymers bestimmt. Dabei waren die Werte in Wasser und Puffer innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Der zuvor genannte Effekt musste also eindeutig durch die Bildung der Nanoplexe hervorgerufen werden.

Gleichzeitig traten auch drastische Unterschiede der Polydispersitätsindices auf, welche ein Maß für die Qualität der Partikel darstellen. Man erhielt in Wasser kleinere PDI-Werte als in Puffer, dies galt allerdings nur bis zu einem Verhältnis COOH/NH_2 von 10:1. Bei größerem Überschuss an Polymer stieg der PDI sprunghaft an. Dies ist identisch mit dem Mischungsverhältnis, ab dem die kleineren Partikel wieder auftraten.

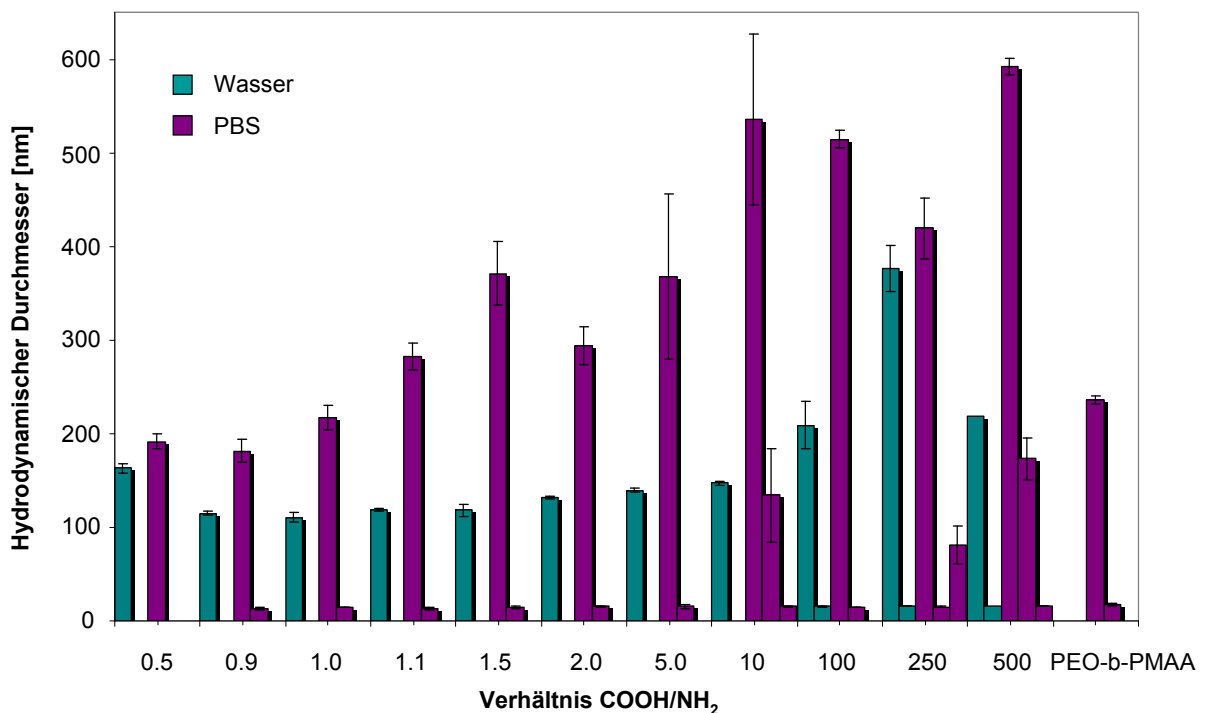


Abbildung 46: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe **72** und **73** aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD **7** in Wasser und PBS

Die Unterschiede der Partikelgrößen in Wasser und PBS bei gleichen stöchiometrischen Verhältnissen lassen sich im Wesentlichen durch zwei Faktoren beschreiben. Man muss davon ausgehen, dass die Bildung der Nanoplexe zum großen Teil vom pH-Wert der Lösungen abhängt. Der pH-Wert

der gepufferten Salzlösung beträgt 7.4, während der pH-Wert von reinem Wasser aufgrund der Bindung von Kohlendioxid aus der Luft im leicht sauren Bereich ($\text{pH} \cong 5$) liegt. Folglich liegen in reinem Wasser mehr Carboxylgruppen in der protonierten Form vor. Es sind also weniger negative Ladungen vorhanden, die anziehende Coulomb-Wechselwirkungen verursachen können. Dadurch sollte die Bindung schwächer sein. Zum anderen kommt es durch die im Puffer vorhandenen Ionen zu einer Abschirmung der Ladungen am Polymer. Es bilden sich Ionenwolken aus, die die resultierenden Strukturen weniger dicht werden lassen. Die Folge davon ist ein Anstieg der Größe der Partikel.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von He^[320], der ebenfalls einen Anstieg der Partikelgröße beim Übergang von Wasser zu PBS feststellte.

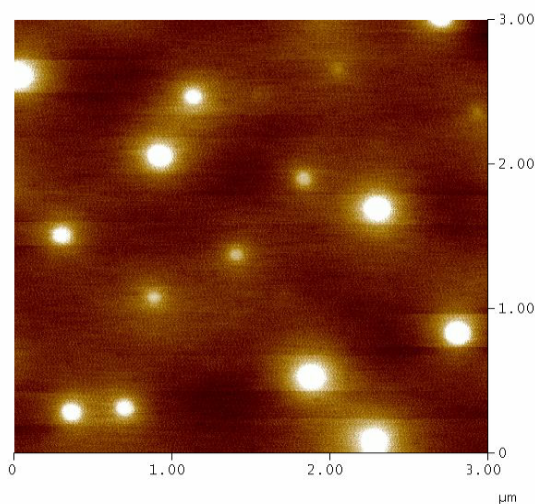


Abbildung 47: AFM-Bild des Nanoplexes **72j** aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyll- β -CD **7**

In Abbildung 47 ist das AFM-Bild der Nanoplexe aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyll- β -CD **7** gezeigt. Das Verhältnis von COOH/NH₂ beträgt 100, das Lösungsmittel ist Wasser. Man kann deutlich die größere und die kleinere der beiden Spezies erkennen. In beiden Fällen bildeten sich perfekt sphärische Partikel aus.

Betrachtet man die Ergebnisse für Wasser und PBS getrennt, lässt sich feststellen, dass die Partikel in PBS mit steigendem Polymeranteil immer größer wurden. In PBS sind im Vergleich zu Wasser die hydrophoben Wechselwirkungen stärker ausgeprägt. Für die Partikel in Wasser schien es ein Minimum des hydrodynamischen Durchmessers bei Mischungsverhältnissen, die nahe an eins liegen, zu geben. An diesem Punkt war die Menge der positiven und negativen Ladungen etwa gleich, so dass es zu einer kompletten

Ladungsneutralisation kam. Daher war das Zetapotential in diesem Fall nahezu null. Bei Ladungsverhältnissen größer als eins hat man einen Überschuss an negativer Ladung. Die negativen Ladungen der Polymerketten stoßen sich ab und es resultieren größere Partikel durch repulsive elektrostatische Wechselwirkungen. Zusätzlich werden bei der Nanoplexbildung die jeweiligen Gegenionen des Polyelektrolyts und des CDs ins Lösungsmittel freigesetzt, wodurch es zu einer Erhöhung der Entropie kommt. Diese Entropieerhöhung ist umso stärker ausgeprägt je näher das Ladungsverhältnis an eins liegt. Bei kleineren oder größeren Ladungsverhältnissen können nicht alle Gegenionen freigesetzt werden. Die Bildung der Nanoplexe wird somit sowohl durch enthalpische als auch durch entropische Effekte bestimmt.

Gröhn^[317] untersucht die Assoziation von DNA mit verschiedenen zwei- und vierwertigen organischen Gegenionen. In allen Fällen bilden sich DNA-Komplexe aus, jedoch ist bei Verwendung von zweiwertigen Ionen ein hoher Überschuss an Gegenionen notwendig (Ladungsverhältnis 50:1). Bei vierwertigen Gegenionen kommt es bereits bei einem Ladungsverhältnis von 1:1 zu Aggregation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier erhaltenen Werten. Im vorliegenden Fall handelt es sich um strukturelle Gegenionen mit sieben Ladungen. Folglich kann man darauf schließen, dass eine höhere Ladungszahl des Gegenions die Stabilität der gebildeten Aggregate in der Art beeinflusst, dass Stabilität bei einem Ladungsverhältnis von 1:1 erreicht wird.

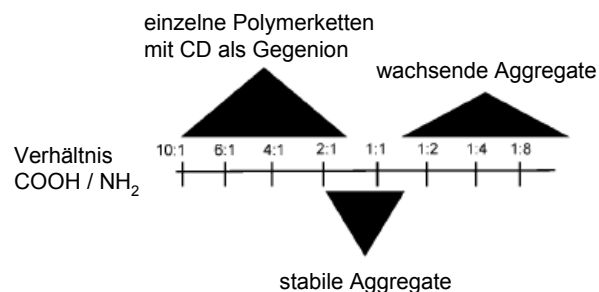


Abbildung 48: Stabilität der gebildeten Komplexe in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis^[323]

7.2 Nanoplexe aus Block-copolymeren

He^[320] untersuchte die Bildung von Polyplexen zwischen PEG-*b*-PDMAEMA und DNA in HEPES-Puffer bei verschiedenen Mischungsverhältnissen. Er stellte fest, dass bei großem DNA-Überschuss der hydrodynamische Radius der Partikel in der gleichen Größenordnung lag, wie der von reiner DNA. Auch im vorliegenden Fall konnten bei großem Polymerüberschuss Partikel erhalten werden, deren hydrodynamische Durchmesser sich kaum von dem des reinen Block-copolymers unterschieden. Erst bei einem Ladungsverhältnis Polymer/Gegenion von 0.5, bilden sich Partikel mit deutlich unterschiedlicher Größe aus. Die Größe der Polyplexe nimmt mit steigender Gegenionkonzentration zu. Dabei existieren freie Gegenionen neben den Komplexen und es kommt zu einer Umlagerung der Polyplexe.

Tabelle 29: Nanoplexe **72** aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD **7** in Wasser nach Lyophilisieren

Probe	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn.		PDI	Zetapotential [mV]
		Durchmesser [nm]	Anteil		
72a	0.5	202.2 ± 42.1	100	0.220 ± 0.008	0.3 ± 0.2
72b	0.9	109.4 ± 0.6	100	0.145 ± 0.017	0.5 ± 0.2
72c	1.0	104.0 ± 4.2	100	0.084 ± 0.026	0.1 ± 0.1
72d	1.1	109.1 ± 0.8	100	0.089 ± 0.008	-0.1 ± 0.0
72e	1.5	123.5 ± 7.3	100	0.089 ± 0.022	-0.4 ± 0.1
72f	2.0	146.7 ± 4.3	100	0.113 ± 0.004	-0.4 ± 0.1
72g	5.0	171.9 ± 10.8	100	0.156 ± 0.002	-0.6 ± 0.1
72h	10	169.3 ± 1.5	100	0.195 ± 0.011	-0.9 ± 0.3
72i	100	222.6 ± 19.6	93	0.468 ± 0.025	-17.1 ± 3.2
		18.7 ± 1.7	7		
72j	250	274.1 ± 5.9	91	0.786 ± 0.002	-13.3 ± 1.5
		17.7 ± 0.0	9		

Ein weiterer Punkt, der für potentielle Anwendungen von Interesse ist, lag in der Frage der Redispergierbarkeit der Nanoplexe. Sollte es möglich sein, die Lösungen der Nanoplexe in die feste Form zu überführen, ergäbe sich eine

wesentlich einfachere Handhabung und eine bessere Lagerstabilität. Deshalb wurden jeweils 10 ml der dargestellten Nanoplexe aus PEO-*b*-PMAA und Heptacysteaminy- β -CD **7** aus Tabelle 27 und Tabelle 28 gefriergetrocknet. In allen Fällen erhielt man ein weißes Pulver, welches durch Zugabe der gleichen Menge bidestilliertem Wasser wieder gelöst wurde. Damit blieben die Konzentration der beiden Polyelektrolyte und falls die Partikel im PBS synthetisiert wurden, die Konzentration des Puffers gleich. Die Daten nach dem Gefriertrocknen sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 zusammengefasst.

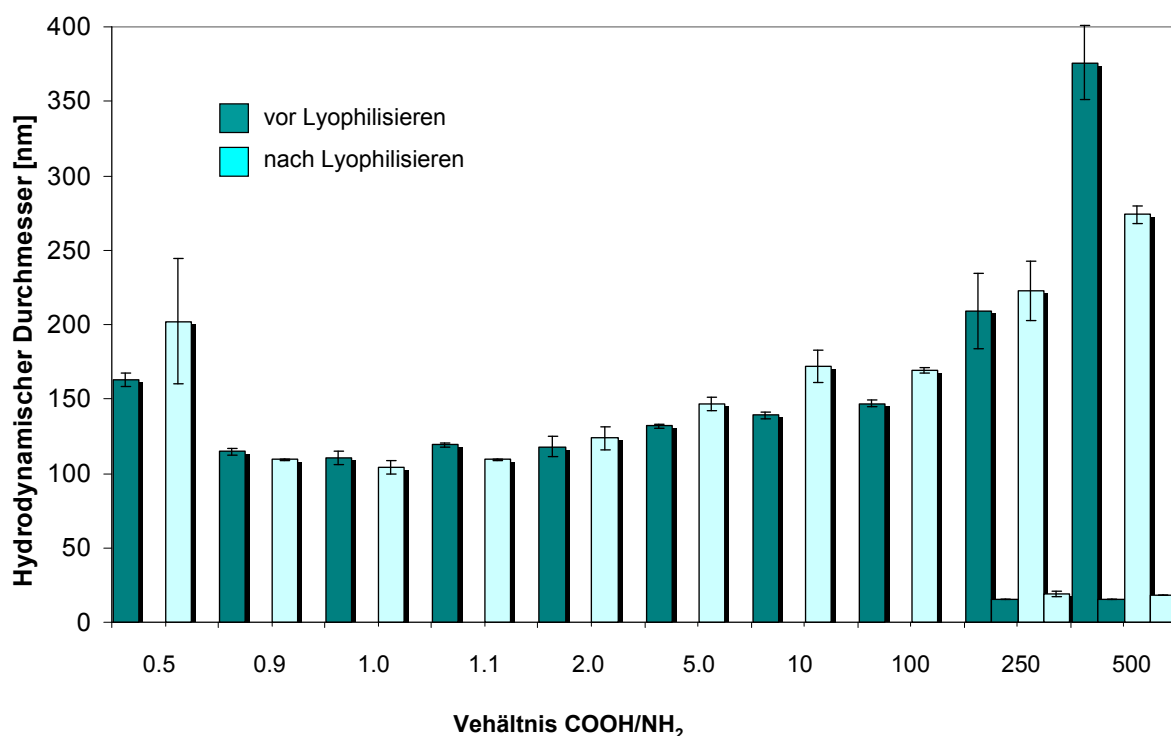


Abbildung 49: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe **72** aus PEO-*b*-PMAA und Heptacysteaminy- β -CD **7** in Wasser vor und nach Lyophilisieren

Betrachtet man die Nanoplexe, die in Wasser hergestellt wurden, ist die Redispergierbarkeit in fast allen Fällen gegeben (siehe Tabelle 29 und Abbildung 49). Eine Ausnahme stellte das höchste Verhältnis von COOH/NH₂ dar. In diesem Fall waren die Partikel nach dem Lyophilisieren kleiner. Die hydrodynamischen Durchmesser der übrigen Mischungsverhältnisse waren innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Allerdings stieg der PDI im Vergleich zu den Werten vor dem Gefriertrocknen an, nahm jedoch immer noch sehr kleine Werte an. Der PDI durchlief ein Minimum bei einem Mischungsverhältnis COOH/NH₂ von 1.1, an diesem Punkt war das Zetapotential des Partikels auch nahezu null.

7.2 Nanoplexe aus Block-copolymeren

Tabelle 30: Nanoplexe **73** aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD **7** in PBS nach Lyophilisieren

Probe	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn.		PDI	Zetapotential [mV]
		Durchmesser [nm]	Anteil		
73a	0.5	223.7 ± 42.3	100	0.422 ± 0.026	-2.3 ± 0.1
73b	0.9	195.6 ± 27.6	100	0.452 ± 0.007	-1.7 ± 0.2
73c	1.0	343.8 ± 11.8	100	0.340 ± 0.020	-1.3 ± 0.3
73d	1.1	351.1 ± 33.1	100	0.336 ± 0.019	-1.6 ± 0.5
73e	1.5	189.9 ± 64.9	26	0.615 ± 0.031	-1.4 ± 0.1
		680.9 ± 149.9	74		
73f	2.0	502.2 ± 38.5	93	0.899 ± 0.093	-2.3 ± 0.4
		17.0 ± 1.4	7		
		248.5 ± 27.6	53		
73g	5.0	874.6 ± 98.1	35	1.000 ± 0.000	-7.8 ± 0.6
		15.2 ± 0.0	12		
		736.2 ± 223.9	62		
73h	10	114.3 ± 47.6	21	0.827 ± 0.206	-10.0 ± 1.1
		13.9 ± 0.7	17		
73i	100	179.5 ± 45.4	50	0.885 ± 0.030	-10.5 ± 2.3
		607.7 ± 59.0	50		
73j	250	228.9 ± 5.4	73	0.725 ± 0.072	-12.6 ± 1.8
		22.6 ± 0.9	27		
73k	500	310.0 ± 28.0	91	0.683 ± 0.013	-12.7 ± 1.4
		17.6 ± 0.9	9		

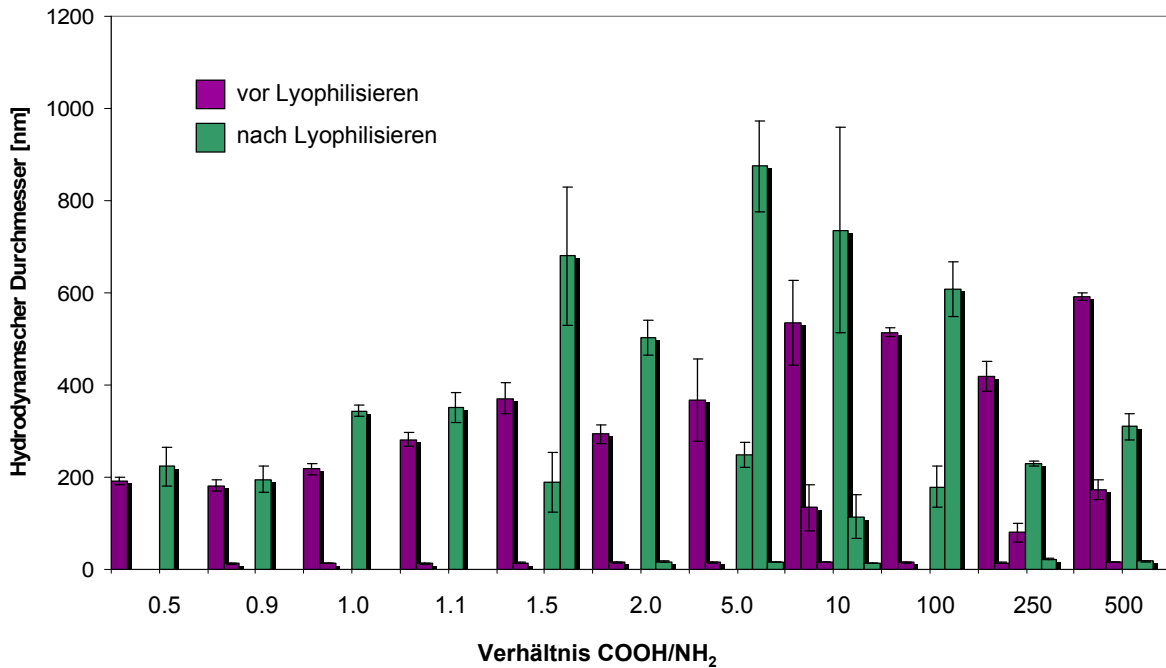


Abbildung 50: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe **73** aus PEO-*b*-PMAA und Heptacysteaminyl- β -CD **7** in PBS vor und nach Lyophilisieren

Bei den Nanoplexen, die in PBS hergestellt wurden, war dagegen die Redispergierbarkeit nach dem Gefriertrocknen nur eingeschränkt gegeben (siehe Abbildung 50). Bei kleinen COOH/NH₂-Verhältnissen bis 0.9 stellte die Redispergierbarkeit kein Problem dar. Danach stieg der hydrodynamische Durchmesser der Partikel bis zu einem Verhältnis von COOH/NH₂ von 10 sehr stark an. Wurde der Anteil an Polymer noch weiter erhöht, waren die Teilchen nach dem Redispergieren deutlich kleiner als zuvor. Auch der PDI stieg nach dem Redispergieren an. Dies sprach ebenfalls dafür, dass die Partikel nicht vollständig redispergierbar waren. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten liegt in der Ostwald-Reifung der Partikel. Die Ostwald-Reifung beschreibt die Veränderung von kolloidalen Systemen mit der Zeit und beruht auf einer Minimierung der Freien Energie des Systems. Dabei kommt es zu einem Materiefluss von den kleinen zu den größeren Teilchen mit der Folge, dass die kleinen Partikel verschwinden und die größeren Partikel weiter wachsen.

Nachdem das System aus anionischem Stärkederivat und kationischem CD-Derivat zu stabilen und teilweise auch redispergierbaren Partikeln führte, sollte nun das System invertiert werden. Dies war besonders von Interesse aufgrund der Komplexbildungskonstanten der Cyclodextrinderivate mit Idarubicin und Camptothecin. Der Einschluss des Wirkstoffs Idarubicin führte bei der Verwendung von Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD **48** zu den stabilsten Komplexen. Um das anionische CD-Derivat **48** zu einem Nanoplex umsetzen zu können, benötigte man ein kationisches Polymer. Um weiterhin die bereits genannten Vorteile des PEGs nutzen zu können, fiel die Wahl auf das Blockcopolymer Polyethylenoxid-block-poly(dimethylaminoethyl-methacrylsäure) (PEO-*b*-DMAEMA). Das Polymer besteht aus $n = 114$ Ethylenoxid- und $m = 95$ Dimethylaminoethylmethacrylsäure-monomereinheiten und hat eine Molmasse von 20000 g/mol.

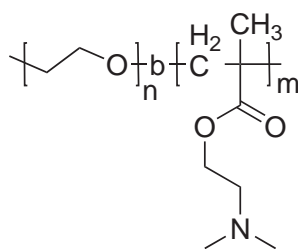
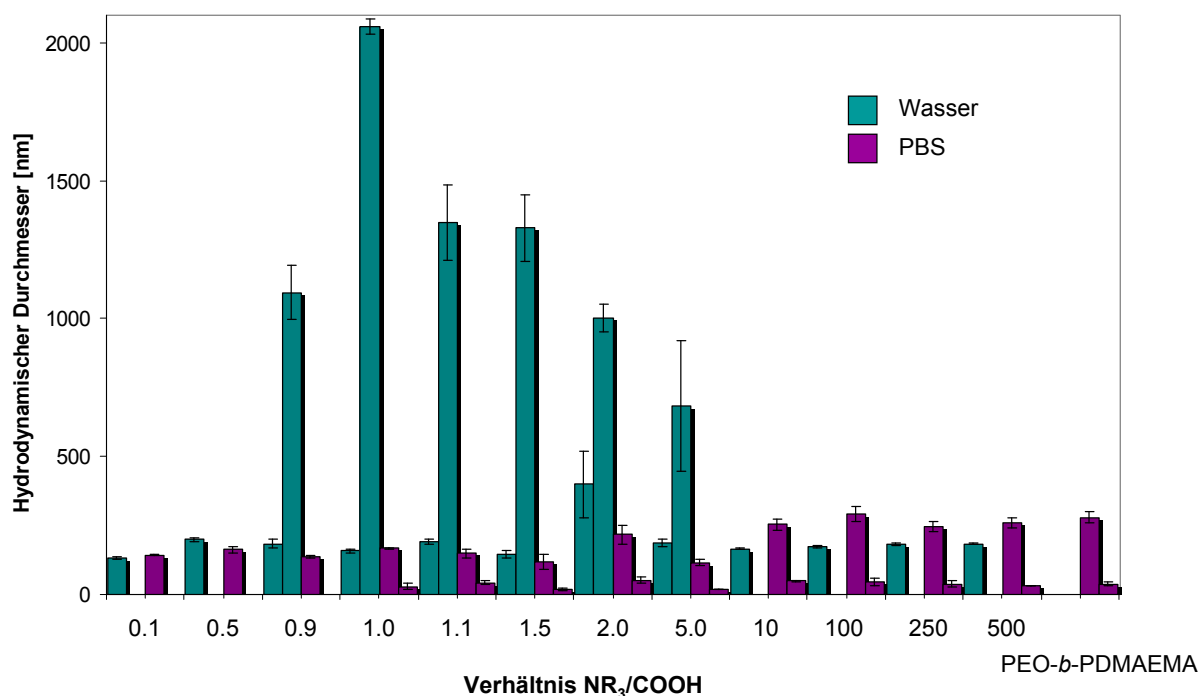


Abbildung 51: Struktur von Polyethylenoxid-*b*-poly(dimethylaminoethylmethacrylsäure) (PEO-*b*-PDMAEMA), $n=114$, $m=95$

Die Darstellung der Nanoplexe erfolgte analog zu dem zuvor beschriebenen System aus PEO-*b*-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD. Da sich das anionische Polymer nicht in reinem Wasser löste, wurde es in konzentrierter Salzsäure gelöst und anschließend mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7.4 gebracht. In Tabelle 31 und Tabelle 32 sowie in Abbildung 52 sind die Ergebnisse der Nanoplexbildung bei verschiedenen Ladungsverhältnissen in Wasser und in PBS gezeigt.

Tabelle 31: Nanoplexe **74** aus PEO-*b*-DMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD **48** in Wasser

Probe	Verhältnis NR ₃ /COOH	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
74a	0.1	132.0 ± 4.3	100	0.265 ± 0.043	-11.9 ± 1.8
74b	0.5	199.7 ± 7.0	100	0.250 ± 0.009	-5.8 ± 0.6
74c	0.9	183,8 ± 17.1 1095.2 ± 99.5	39 61	0.504 ± 0.003	-3.2 ± 0.0
74d	1.0	158.3 ± 6.0 2058.5 ± 26.2	53 47	0.631 ± 0.110	-3.0 ± 0.4
74e	1.1	190.1 ± 9.5 1349.0 ± 137.2	65 35	0.827 ± 0.011	-2.8 ± 0.2
74f	1.5	147.5 ± 14.0 1328.5 ± 120.9	41 59	0.865 ± 0.234	-2.9 ± 0.2
74g	2.0	399.3 ± 121.1 1003.8 ± 49.8	41 71	0.713 ± 0.042	-2.3 ± 0.3
74h	5.0	186.8 ± 14.1 683.1 ± 235.1	28 72	0.481 ± 0.016	1.2 ± 0.4
74i	10	165.6 ± 2.2	100	0.190 ± 0.010	2.9 ± 2.7
74j	100	172.9 ± 6.5	100	0.171 ± 0.021	4.0 ± 1.8
74k	250	180.9 ± 4.6	100	0.179 ± 0.017	4.7 ± 1.4
74l	500	183.8 ± 1.9	100	0.178 ± 0.010	3.3 ± 2.3

**Abbildung 52:** Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe **74** und **75** aus PEO-*b*-PDMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD **48** in Wasser und PBS

7.2 Nanoplexe aus Block-copolymeren

Tabelle 32: Nanoplexe aus PEO-*b*-DMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD **48** in PBS

Probe	Verhältnis NR ₃ /COOH	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
75a	0.1	142.0 ± 1.9	100	0.523 ± 0.038	-5.82 ± 1.10
75b	0.5	162.6 ± 12.0	100	0.472 ± 0.082	-4.54 ± 0.44
75c	0.9	136.6 ± 5.9	100	0.600 ± 0.012	-3.66 ± 1.16
75d	1.0	166.4 ± 2.5	63	0.494 ± 0.051	-4.90 ± 0.87
		29.2 ± 10.7	20		
75e	1.1	149.1 ± 16.8	66	0.487 ± 0.069	-3.55 ± 0.34
		43.3 ± 7.4	30		
75f	1.5	118.2 ± 27.1	82	0.500 ± 0.121	-3.32 ± 0.46
		17.7 ± 4.2	7		
75g	2.0	216.8 ± 34.0	55	0.510 ± 0.075	-3.15 ± 0.54
		52.1 ± 9.5	41		
75h	5.0	115.8 ± 10.5	82	0.519 ± 0.100	-1.66 ± 0.35
		20.1 ± 0.3	11		
75i	10	254.4 ± 20.3	65	0.783 ± 0.151	-1.28 ± 1.47
		47.9 ± 1.7	28		
75j	100	291.3 ± 26.2	86	0.593 ± 0.033	4.83 ± 1.49
		44.7 ± 13.2	14		
75k	250	245.1 ± 18.2	89	0.559 ± 0.048	3.45 ± 0.60
		38.0 ± 12.5	9		
75l	500	260.6 ± 18.3	88	0.610 ± 0.126	3.97 ± 0.93
		32.9 ± 0.1	9		
PEO-<i>b</i>- DMAEMA		279.6 ± 19.8	87	0.650 ± 0.151	5.76 ± 0.32
		37.9 ± 7.7	10		

Wie schon der bei der Verwendung des anionischen Blockcopolymer erhielt man auch hier nicht immer monodisperse Systeme. Die kleinere Spezies, die in PBS einen hydrodynamischen Durchmesser von 30-40 nm zeigte, trat auch hier schon beim reinen Polymer auf und hat daher keinen Einfluss auf die Nanoplexbildung. Die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel in PBS lagen alle in einem

ähnlichen Größenordnungsbereich und wurden mit steigendem Polymeranteil im Nanoplex leicht größer. Dieser Effekt war in reinem Wasser nicht zu beobachten. Hier kam es bei Ladungsverhältnissen zwischen 0.9 und 5.0 zur Bildung von zwei unterschiedlichen Partikelgrößen. Dabei lagen die kleineren Partikel in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Partikel in PBS, die andere Spezies zeigte einen starken Anstieg der hydrodynamischen Durchmesser. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den vorherigen Messungen, bei denen das anionische Block-copolymer PEO-*b*-PMAA verwendet wurde.

Bei der Betrachtung der PDI-Werte fiel auf, dass diese für PBS unabhängig vom Mischungsverhältnis waren und immer zwischen 0.5 und 0.6 lagen. Im Gegensatz dazu überspannten die PDIs in Wasser einen deutlich größeren Bereich. Der PDI stieg bis zu einem Mischungsverhältnis von 1.5 an und sank danach wieder. Ab einem 10-fachen Überschuss an Polymer blieb der Polydispersitätsindex konstant.

Auch an diesem System wurde die Redispergierbarkeit der Nanoplexe nach Lyophilisieren untersucht. In Tabelle 33 und Abbildung 53 sind die Ergebnisse für die Partikel in PBS gezeigt. Die Partikel, die in Wasser synthetisiert wurden, konnten nicht redispergiert werden. Es bildeten sich Aggregate, die größer als 1000 nm waren. Nur durch die Anwesenheit der Salze des Puffers und der dadurch resultierenden größeren hydrophoben Wechselwirkungen wurde ein Redispergieren der Partikel möglich. Man stellte dabei fest, dass bis zu einem zehnfachen Ladungsüberschuss des Polymers der hydrodynamische Durchmesser der Partikel nach dem Gefriertrocknen wesentlich größer war. Daraus erhielt man bereits einen Hinweis darauf, dass das Redispergieren bei diesem System grundsätzlich nicht so einfach war, als bei dem umgekehrten System auf Basis von PEO-*b*-PMAA. Wurde der Anteil des Polymers weiter erhöht, waren die Partikel nach dem erneuten Lösen innerhalb der Fehlergrenzen gleich groß. Bei Untersuchung der PDI-Werte konnte vor und nach Redispergieren kein großer Unterschied festgestellt werden.

7.2 Nanoplexe aus Block-copolymeren

Tabelle 33: Nanoplexe aus PEO-*b*-DMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD **48** in PBS nach Lyophilisieren

	Verhältnis NH ₂ /COOH	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
75a	0.1	546.6 ± 152.6	100	0.565 ± 0.086	-6.3 ± 1.0
75b	0.5	382.3 ± 29.6	100	0.508 ± 0.093	-7.3 ± 0.6
75c	0.9	391.8 ± 46.4	100	0.427 ± 0.049	-5.6 ± 0.3
75d	1.0	308.6 ± 16.1	100	0.454 ± 0.088	-5.5 ± 0.5
75e	1.1	310.7 ± 4.1	100	0.512 ± 0.031	-5.7 ± 0.8
75f	1.5	271.4 ± 24.6	100	0.401 ± 0.013	-5.1 ± 0.4
75g	2.0	345.3 ± 16.7	83	0.444 ± 0.013	-5.1 ± 0.5
		68.5 ± 17.5	17		
75h	5.0	390.9 ± 137.1	100	0.450 ± 0.022	-2.3 ± 0.6
75i	10	384.8 ± 14.3	89	0.478 ± 0.024	-1.3 ± 1.2
		72.2 ± 18.4	11		
75j	100	218.9 ± 52.5	50	0.677 ± 0.144	2.8 ± 0.7
		823.6 ± 55.2	50		
75k	250	224.6 ± 43.2	38	0.537 ± 0.021	4.8 ± 1.1
		1075.3 ± 284.5	62		
75l	500	256.4 ± 5.9	46	0.503 ± 0.032	5.9 ± 0.5
		665.8 ± 212.3			

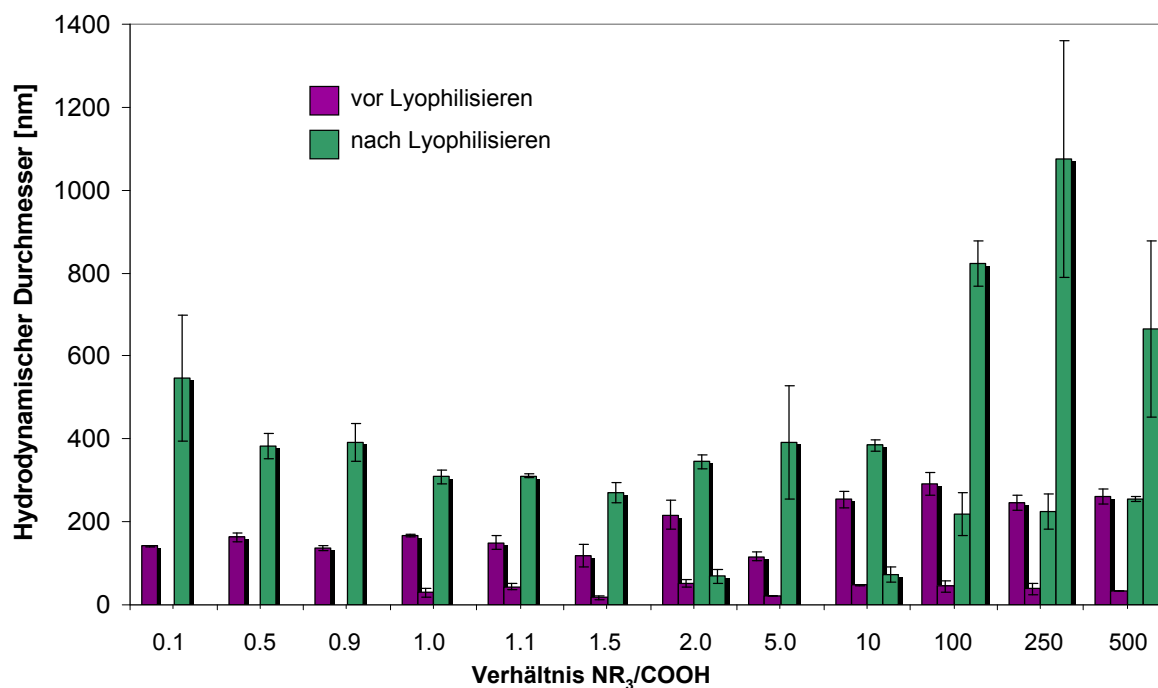


Abbildung 53: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe **75** aus PEO-*b*-PDMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD **48** in PBS vor und nach Lyophilisieren

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das anionische Block-copolymer besser für die Bildung von Polyplexen mit CD Derivaten geeignet war als das kationische PEO-*b*-PDMAEMA. Es bildeten sich sowohl in Wasser als auch in PBS Partikel aus, die besser für den Transport von Wirkstoffen geeignet zu sein scheinen, da sowohl die hydrodynamischen Durchmesser als auch die Polydispersitätsindices im interessanten Bereich für pharmazeutische Anwendungen liegen.

7.3 Nanopartikel aus Stärkederivaten

Um die Nanopartikel zum gerichteten Wirkstofftransport einsetzen zu können, sollten die einzelnen Komponenten biologisch abbaubar sein. Deshalb wurden Stärkederivate als anionische Polymere verwendet. Die Stärkederivate bestanden aus partiell oxidierte Stärke, deren Carboxylgruppen teilweise mit Pteroylamidhexylamin umgesetzt waren. Da bekannt ist, dass viele Tumorzellen eine erhöhte Anzahl an Folsäurerezeptoren exprimieren, sollte eine Modifizierung mit Folsäure oder deren Derivate einen gezielten Transport zu den Krebszellen und eine rezeptorvermittelte Endozytose ermöglichen. Hier wurde statt Folsäure mit Pterinsäurederivaten gearbeitet, da diese synthetisch leichter zugänglich sind und ebenfalls vom Folsäurerezeptor erkannt werden. Die synthetisierten Polymere vereinten mehrere positive Eigenschaften wie eine gute Löslichkeit in Wasser, eine ausreichende Zahl von Ladungen um die Bildung von Nanoplex zu ermöglichen sowie die Funktionalisierung mit Folsäurederivaten um ein aktives Targeting zu erreichen.

Durch die Anbindung der Pterate wurden die hydrophilen Stärkederivate in Produkte überführt, die in wässriger Lösung spontan Nanopartikel ausbilden. In Tabelle 34 sind die Daten der synthetisierten Nanopartikel aufgelistet.

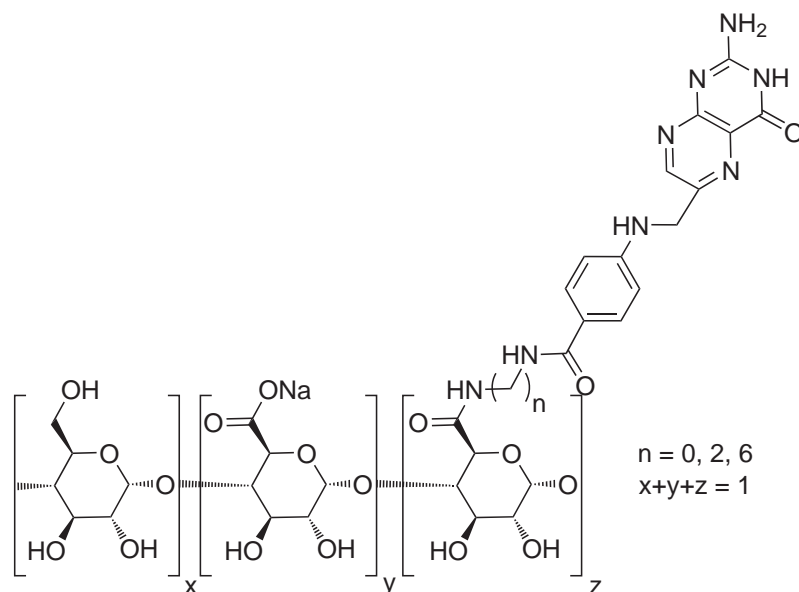
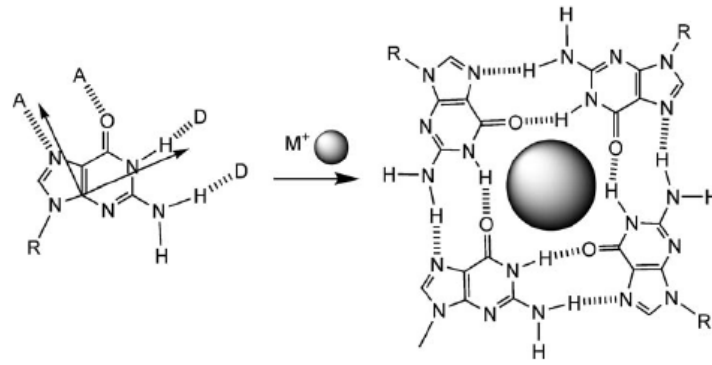


Abbildung 54: Struktur der synthetisierten Stärkederivat mit zellspezifischen Liganden

Tabelle 34: Hydrodynamische Durchmesser und Zetapotential der pterioatfunktionalisierten amphiphilen Stärkederivate in PBS

	Spacer -länge	DS (Ligand)	DS (COONa)	Carboxyl/ Ligand	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil	PDI	Zeta- Potential [mV]
69a	0	0.115	0.475	4.13	297.0 ± 59.3 59.5 ± 8.2	69% 31%	0.615	-17.0 ± 0.9
69b	0	0.105	0.485	4.62	23.3 ± 0.7 4.6 ± 0.1	65% 35%	0.460	-14.4 ± 2.6
69c	0	0.208	0.382	1.84	119.8 ± 1.5	100%	0.465	-15.2 ± 0.8
70a	2	0.015	0.705	47.0	133.1 ± 5.6 10.5 ± 1.2	65% 35%	0.741	-9.2 ± 0.9
70b	2	0.026	0.694	26.7	70.6 ± 2.5 5.1 ± 0.2	90% 10%	0.533	-11.8 ± 0.3
70c	2	0.036	0.684	19.0	84.1 ± 20.2 7.6 ± 1.6	60% 40%	0.828	-17.0 ± 5.7
70d	2	0.029	0.691	23.8	151.4 ± 28.4 358.5 ± 115.6	50% 50%	0.800	-14.4 ± 2.3
71a	6	0.008	0.582	72.8	65.7 ± 13.7 4.4 ± 0.1	85% 15%	0.762	-19.4 ± 0.8
71b	6	0.023	0.567	24.7	83.8 ± 7.3 5.6 ± 0.5	93% 7%	0.545	-19.9 ± 1.8
71c	6	0.077	0.643	8.35	83.6 ± 0.9 13.8 ± 0.1	67% 33%	0.502	-21.6 ± 1.7
71d	6	0.250	0.340	1.36	107.4 ± 14.0 6.2 ± 0.2	19% 81%	0.324	-14.4 ± 4.4

Die Bildung von Partikeln läuft hier über Wasserstoffbrücken. Der Pteridinrest der Pteroinsäure ist strukturell eng mit Guanin verwandt. Es ist bekannt, dass Guaninderivate Quadruplexe ausbilden.^[324] Die Assoziation erfolgt durch 2 Watson-Crick- und 2 Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (siehe Schema 18).^[325]



Schema 18: Selbstorganisation von Guaninderivaten in G4-Quartette in Gegenwart von Metallionen^[324]

Der Makrozyklus besitzt vier Carbonylsauerstoffatome, die ins Innere der Kavität zeigen. In diese Kavität können Metallkationen wie Na^+ , K^+ und NH_4^+ eingelagert werden, wobei K^+ aufgrund seiner Größe am besten geeignet ist. In Wasser bilden sich helikale Strukturen aus, wobei die Guanineinheiten aufgrund von π - π -Wechselwirkungen parallel zueinander liegen und durch das zentrale Metallion stabilisiert werden.^[326] Die Zahl der aufeinander gestapelten Guaninquartette ist von der Konzentration abhängig. Die Höhe der Säulen kann dabei bis zu 30 nm betragen.^[327] Die beeindruckende Höhe der Stapel verdeutlicht das Zusammenspiel der Kräfte die aus Wasserstoffbrücken, π - π -Wechselwirkungen und Kation-Dipol-Wechselwirkungen resultieren. Da es sich bei dem Pteridinrest der Pteroinsäure um die gleiche Struktureinheit handelt, kann man davon ausgehen, dass auch die auftretenden Kräfte und Wechselwirkungen vergleichbar sind.

Man kann der Tabelle entnehmen, dass alle Partikel ein negatives Zetapotential aufwiesen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Synthese nur ein Teil der Carboxylgruppen mit aminofunktionalisierten Pterooten umgesetzt wurden und die übrigen Säurefunktionalitäten in wässriger Lösung deprotoniert vorlagen und so eine negative Oberflächenladung des Partikels verursachten. In den meisten Fällen erhielt man keine monodispersen Systeme, sondern zusätzlich Teilchen, die in der Größenordnung von 5-10 nm lagen. Bei diesem System ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der kleineren Spezies um unfunktionalisierte Stärkeketten handelt.

7.3 Nanopartikel aus Stärkederivaten

In Abbildung 55 sind die Durchmesser und PDI-Werte in Abhängigkeit des Verhältnisses Carboxylgruppen zu Pteroylamidhexylamin als Ligand gezeigt. Bei Verwendung von Pteroylhydrazid fiel es schwer, einen Zusammenhang zwischen dem Massenanteil des Liganden und der Partikelgröße zu sehen. In diesem Fall bestimmten andere Faktoren die Partikelgröße. Je länger dagegen die Spacergruppe wurde, desto deutlicher war die Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers vom Substitutionsgrad des Liganden zu sehen. Mit steigendem Ligandanteil wurden die Partikel immer größer. Dies erschien nachvollziehbar, da die Ausbildung der Wasserstoffbrücken mit steigendem Ligandanteil vereinfacht wird. Im Allgemeinen war der Substitutionsgrad mit Pteroinsäurederivaten gering. Die optimale Anordnung dieser Einheiten zur Bildung eines Tetramers kann mit steigendem DS aufgrund der räumlichen Nähe einfacher erfolgen.

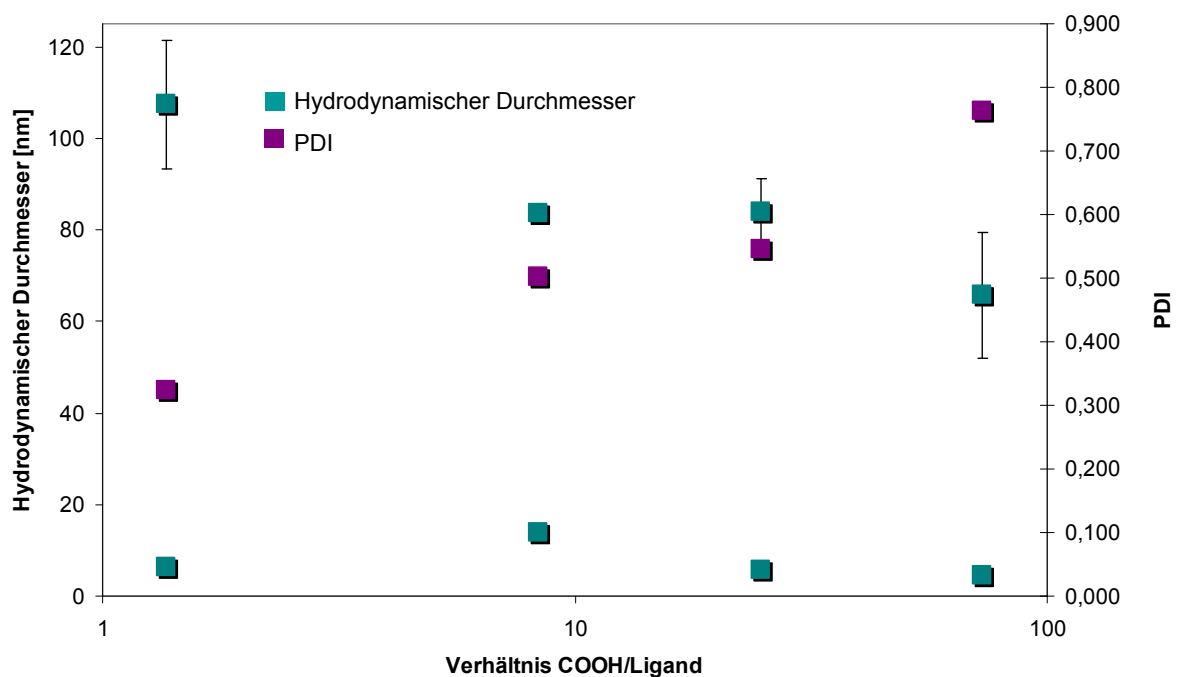


Abbildung 55: Hydrodynamische Radien in Abhängigkeit des Massenanteils Ligand bei Pteroylamidhexylamin **79**

Die Werte für den Polydispersitätsindex waren allgemein nicht besonders gut, sanken aber bei Kupplung des Liganden mit C6-Spacer mit steigendem Ligandanteil. Hier galt es, den Ligandanteil so einzustellen, dass der PDI möglichst klein, gleichzeitig aber der hydrodynamische Durchmesser der Partikel

nicht zu groß wurde. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Pteroylamidhexylamin **79** von den getesteten Derivaten am besten als Ligand geeignet war. Man kann jedoch deutlich erkennen, dass der Anteil der kleinen Spezies mit steigendem Ligandanteil deutlich zunahm. Dies ist ebenfalls mit der besseren Ausbildung von Wasserstoffbrücken aufgrund der größeren räumlichen Nähe der Liganden zu erklären. Auch sind π - π -Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Liganden möglich, welche zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Partikels führen.

Eine weitere Verbesserung der Partikel könnte erreicht werden, wenn der zellspezifische Ligand über einen PEG-Spacer an das Stärkegerüst gekoppelt würde. Zum einen erwartet man eine größere Flexibilität des Liganden, sowie kleinere PDI-Werte und zusätzlich eine Stabilisierung gegenüber den Makrophagen und daraus resultierend eine längere Zirkulationszeit in der Blutbahn.

7.4 Nanoplexe aus Stärkederivaten

Die synthetisierten trifunktionellen Stärkederivate können analog zu den Blockcopolymeren auch zum Aufbau von Nanoplexen verwendet werden. Dadurch wird es möglich, gezielt ein bestimmtes CD Derivat auszuwählen, welches mit dem zu transportierenden Wirkstoff stabile Komplexe ausbildet. Die einzige Beschränkung liegt in der Notwendigkeit einer Ladung am CD, die für die Bildung der Polyplexe essentiell ist. Durch die Verwendung von CD und Stärke als Bausteine der Polyplexe erwartet man eine sehr gute Toleranz im Körper und eine einfache Metabolisierung zu körpereigenen Substanzen. Die Wahl des anionischen Stärkederivats fiel dabei auf das Derivat **71b**. Dabei handelt es sich um eine teilweise oxidierte Stärke, an die Pteroylamidhexylamin als zellerkennender Ligand angebunden ist. Der Substitutionsgrad an Ligand beträgt 0.023, das Verhältnis von Carboxyl zu Ligand ist 24.7. Dieses Derivat wurde gewählt, da es mit sechs Methylengruppen den längsten Spacer hat, wodurch sich eine größere Flexibilität und somit ein leichteres Andocken an den

Rezeptor ergibt. Zum anderen liegt der Durchmesser der Partikel mit 84 nm in einem guten Bereich für die Aufnahme in Zellen.

Wie bereits bei der Synthese der Nanoplexe aus Block-copolymeren wurden auch hier mehrere Faktoren untersucht. In Tabelle 35 sind die dargestellten Nanoplexe aus oxidierte Stärke mit zellspezifischem Ligand und Heptacysteaminy- β -CD **7** in bidestilliertem Wasser beschrieben. Das Verhältnis der Carboxylgruppen zu Aminogruppen wurde von 0.14 über 0.74 bis 3.71 variiert. Weiterhin wurde die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten betrachtet. Bei diesen Partikelsynthesen wurden die Proben vor der Messung über einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0.22 μ m filtriert.

Das stöchiometrische Verhältnis hatte unabhängig von der Mischungsreihenfolge einen entscheidenden Einfluss auf die Größe der resultierenden Partikel. In beiden Fällen wurde die maximale Partikelgröße bei einem COOH/NH₂-Verhältnis von 0.74 erreicht (siehe Abbildung 56). Sowohl bei kleineren als auch bei größeren Verhältnissen nahm die Partikelgröße ab. Es war auffällig, dass die Fehler beim Verhältnis 0.74 ebenfalls deutlich größer waren als bei den anderen Messwerten.

Tabelle 35: Nanoplexe **76** aus oxidierte Stärke mit zellspezifischem Ligand und Heptacysteaminy- β -CD **7** in Wasser

	Molverhältnis CD:Stärke	Verhältnis COOH/NH ₂	Start- Substanz	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
76a	1:2	0.14	Stärke	83.6 \pm 0.3	0.206 \pm 0.010
76b	1:10	0.74	Stärke	141.4 \pm 25.9	0.206 \pm 0.066
76c	1:50	3.71	Stärke	113.0 \pm 5.3	0.213 \pm 0.018
76d	1:2	0.14	CD	210.8 \pm 3.6	0.082 \pm 0.014
76e	1:10	0.74	CD	356.9 \pm 49.8	0.206 \pm 0.014
76f	1:50	3.71	CD	112.1 \pm 2.3	0.077 \pm 0.012

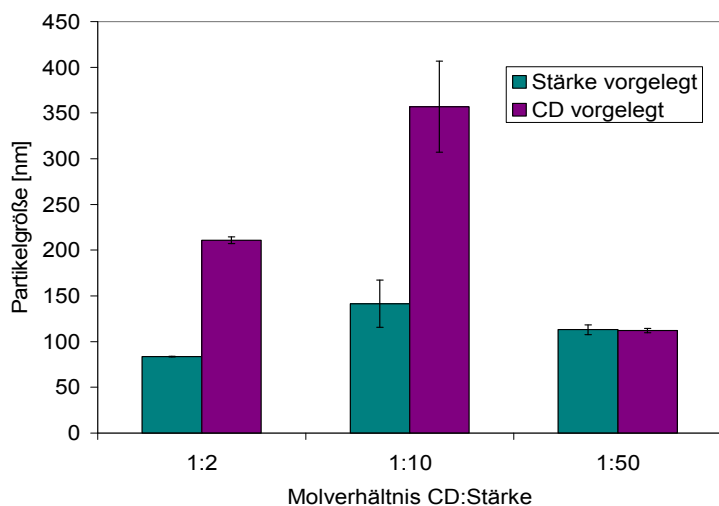


Abbildung 56: Nanoplexe aus oxidierte Stärke mit zellspezifischem Ligand **71b** und Hepta-cysteaminyl- β -CD **7** in Wasser, Partikelgrößen in Abhängigkeit vom stöchiometrischen Verhältnis CD zu Stärke

Man kann erkennen, dass die Partikelgrößen in den Fällen, in denen das CD Derivat vorgelegt wurde, deutlich größer waren als im umgekehrten Fall. Bei einem Verhältnis von 50:1 war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Die Partikelgrößen waren innerhalb der Fehlergrenzen gleich.

Die bisherigen Messungen zeigen, dass das Vorlegen des Polymer zu kleineren Partikeln führte. Ab einem bestimmten Mischungsverhältnis war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Aus diesem Grund wurden die Partikel, bei denen das Polymer vorgelegt wurde, näher untersucht. Damit die Nanoplexe im menschlichen Körper angewendet werden können, müssen sie unter den dort herrschenden Bedingungen stabil sein. Die spätere Applikation soll intravenös erfolgen. Darum wurde die Stabilität der Nanoplexe auch in einer gepufferten Salzlösung (PBS), die dem pH-Wert des Blutes (pH = 7.4) entspricht, bestimmt.

Bei den dargestellten Partikeln aus Tabelle 36 und Tabelle 37 wurde immer die modifizierte Stärke vorgelegt und unter Rühren bei 15500 rpm tropfenweise mit der Lösung des CDs versetzt. In Abbildung 57 sind die Ergebnisse zusammengefasst. In diesen Fällen wurde auf die Filtration der Proben vor der Messung verzichtet. Dies bietet den Vorteil, dass kein Produkt verloren geht und ein Arbeitsschritt gespart werden kann.

7.4 Nanoplexe aus Stärkederivaten

Tabelle 36: Nanoplexe **76** aus oxidierte Stärke mit zellspezifischem Ligand **71b** und Heptacysteaminy- β -CD **7** in Wasser

	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
76g	0.1	109.8 ± 5.2	100	1.000 ± 0.000	6.8 ± 0.2
76h	0.5	314.2 ± 5.7	100	0.990 ± 0.017	1.8 ± 0.2
76i	0.9	122.5 ± 7.7	100	0.144 ± 0.014	-26.9 ± 0.7
76j	1.0	122.8 ± 4.7	100	0.148 ± 0.009	-25.3 ± 0.8
76k	1.1	95.9 ± 4.6	100	0.171 ± 0.020	-27.5 ± 2.4
76l	1.5	106.9 ± 9.1	100	0.233 ± 0.003	-33.0 ± 0.9
76m	2.0	136.0 ± 3.7	100	0.251 ± 0.012	-37.9 ± 0.1
76n	5.0	192.1 ± 2.2	96	0.332 ± 0.032	-38.8 ± 4.0
		24.3 ± 0.5	4		
76o	10	257.0 ± 46.4	93	0.453 ± 0.006	-46.2 ± 2.8
		28.4 ± 3.8	7		
76p	100	344.8 ± 46.8	94	0.472 ± 0.013	-47.4 ± 0.4
		30.2 ± 1.9	6		
76q	250	274.5 ± 11.5	91	0.458 ± 0.032	-38.0 ± 3.0
		33.8 ± 1.6	9		

Man erkennt dass auch bei diesem System sowohl der hydrodynamische Durchmesser als auch der Polydispersitätsindex wesentlich vom stöchiometrischen Verhältnis des Polyelektrolyts und des CDs abhängig war. Unabhängig vom Lösungsmittel existierte ein optimales Mischungsverhältnis bei etwa 1.1, bei dem man die kleinsten Nanoplexe erhielt. Diese Ergebnisse sind identisch mit den Messungen bei denen die Block-copolymere verwendet wurden und den literaturbeschriebenen Untersuchungen von Gröhn^[317]. Folglich kommt es unabhängig vom verwendeten Polymer bei Verwendung eines mehrwertigen strukturellen Gegenions zur Bildung der kleinsten Partikel.

Tabelle 37: Nanoplexe **77** aus oxidiertes Stärke mit zellspezifischem Ligand **71b** und Heptacysteaminyl- β -CD **7** in PBS

	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil [%]	PDI	Zetapotential [mV]
77a	0.1	263.6 ± 44.6	100	1.000 ± 0.000	-5.7 ± 0.9
77b	0.5	549.5 ± 54.2	100	0.368 ± 0.049	-14.9 ± 0.7
77c	0.9	189.9 ± 4.8	100	0.120 ± 0.041	-13.4 ± 0.2
77d	1.0	165.0 ± 1.1	100	0.165 ± 0.005	-16.5 ± 0.7
77e	1.1	145.6 ± 0.5	100	0.224 ± 0.006	-15.4 ± 1.4
77f	1.5	93.1 ± 6.4	55	0.438 ± 0.019	-15.5 ± 0.8
		497.4 ± 103.4	43		
77g	2.0	202.6 ± 13.4	77	0.456 ± 0.006	-14.1 ± 1.6
		31.1 ± 1.1	15		
77h	5.0	153.3 ± 14.6	85	0.515 ± 0.006	-8.3 ± 0.5
		16.2 ± 0.2	13		
77i	10	135.2 ± 7.2	83	0.503 ± 0.028	-11.4 ± 0.8
		16.7 ± 1.1	15		
77j	100	124.9 ± 5.5	88	0.506 ± 0.006	-9.6 ± 1.9
		13.1 ± 0.9	11		
77k	250	133.5 ± 12.3	93	0.514 ± 0.010	-10.2 ± 2.6
		12.2 ± 0.5	7		
77l	500	141.2 ± 4.3	89	0.495 ± 0.002	-12.2 ± 1.2
		13.4 ± 0.8	10		

Bei einem Überschuss an Cyclodextrin waren die PDI-Werte sehr groß. Mit steigendem Polymeranteil wurden die Werte kleiner, durchliefen ein Minimum bei einem stöchiometrischen Verhältnis von eins und stiegen danach langsam wieder an. War das Verhältnis von Carboxylgruppen zu Aminogruppen kleiner als 2.0, wurden in Wasser die kleineren Partikel erreicht. Stieg das Verhältnis über den genannten Wert an, erhielt man den umgekehrten Fall und die Partikel in PBS waren kleiner. Bei den kleineren Mischungsverhältnissen trat damit der

7.4 Nanoplexe aus Stärkederivaten

von den vorhergehenden Messungen mit den Block-copolymeren erwartete und literaturbekannte^[320] Effekt auf. Die Zunahme der hydrodynamischen Durchmesser beim Wechsel von Wasser zu Puffer kann durch die auftretenden Wechselwirkungen der Polyelektrolyte mit den kleinen Ionen des Puffers erklärt werden. Dadurch kommt es zu einer Aufweitung der Partikel.

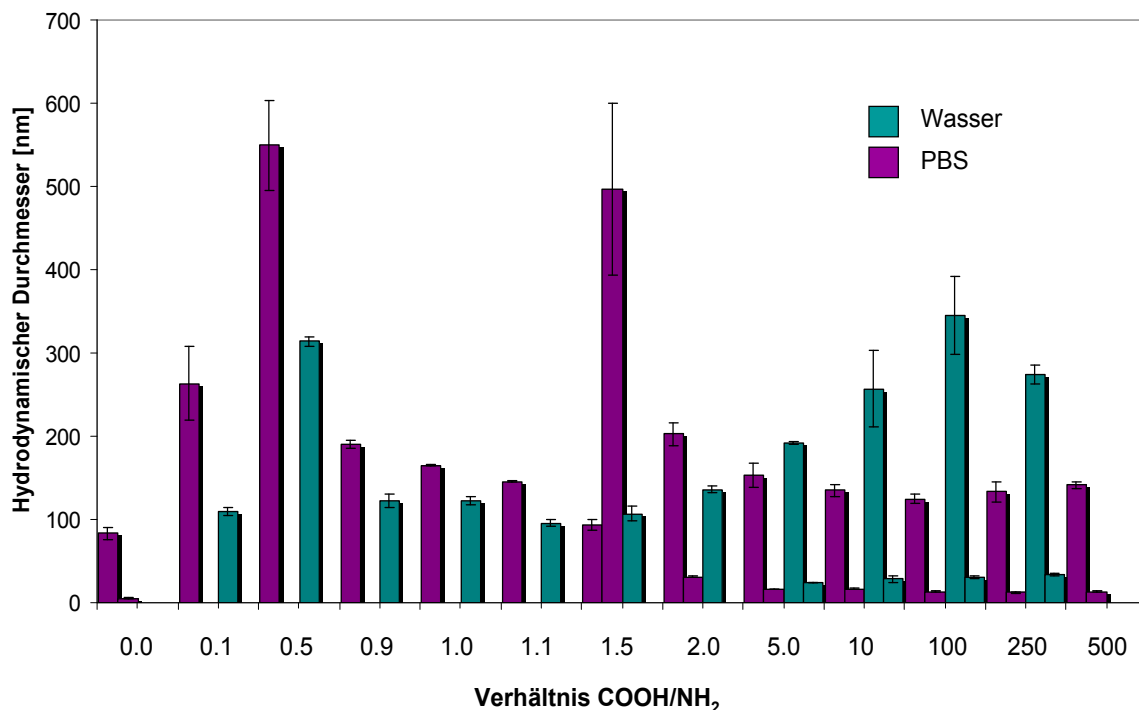
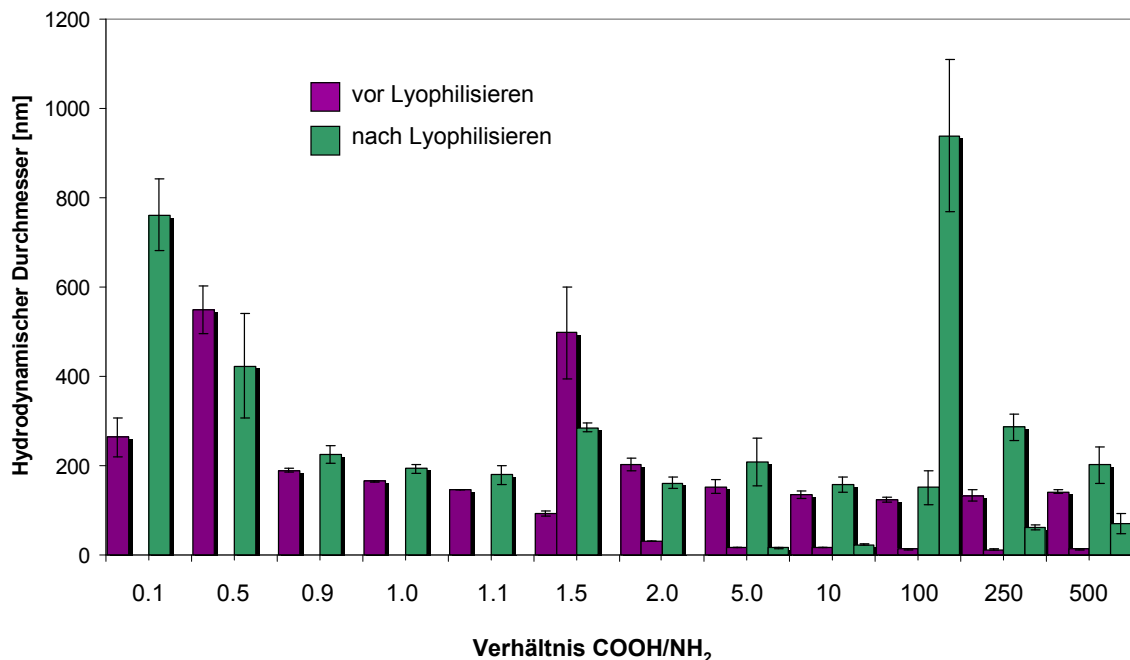


Abbildung 57: Hydrodynamische Radien der Nanoplexe **76** und **77** aus oxidiertes Stärke mit zellspezifischem Ligand **71b** und Hepta-cysteaminyll- β -CD **7** in PBS und Wasser

Die Redispergierbarkeit der Nanoplexe nach dem Gefriertrocknen ist ein wichtiger Faktor für die spätere Anwendung als Carriersystem für Wirkstoffe. Man erhielt nach Lyophilisieren einen gelblichen Feststoff. Die Partikel, die in Wasser synthetisiert wurden, waren nach dem Gefriertrocknen nicht mehr in Wasser löslich. Durch Zugabe des Puffers bei der Herstellung wurde das Redispergieren der Partikel ermöglicht. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 38 und Abbildung 58 gezeigt.

Tabelle 38: Nanoplexe aus oxidierte Stärke mit zellspezifischem Ligand **71b** und Heptacysteaminy- β -CD **7** in PBS nach Lyophilisieren

	Verhältnis COOH/NH ₂	Hydrodyn. Durchmesser [nm]	Anteil	PDI	Zetapotential [mV]
77a	0.1	761.3 ± 79.9	100	0.969 ± 0.021	-7.8 ± 0.7
77b	0.5	423.1 ± 116.9	100	0.648 ± 0.071	-14.4 ± 1.1
77c	0.9	225.1 ± 19.4	100	0.241 ± 0.016	-15.6 ± 1.4
77d	1.0	193.4 ± 10.4	100	0.230 ± 0.014	-15.4 ± 1.2
77e	1.1	179.1 ± 22.2	100	0.284 ± 0.044	-15.9 ± 0.8
77f	1.5	285.7 ± 9.8	100	0.414 ± 0.015	-15.3 ± 0.5
77g	2.0	161.1 ± 12.4	100	0.526 ± 0.093	-10.9 ± 1.2
77h	5.0	208.9 ± 53.1	89	0.557 ± 0.102	-14.5 ± 0.7
		16.4 ± 1.8	11		
77i	10	157.5 ± 16.3	82	0.706 ± 0.025	-18.4 ± 2.3
		23.6 ± 0.6	18		
77j	100	151.2 ± 38.6	78	0.715 ± 0.027	-18.8 ± 0.7
		939.1 ± 171.1	22		
77k	250	286.7 ± 30.0	69	0.695 ± 0.075	-17.0 ± 0.9
		62.0 ± 7.0	31		
77l	500	202.3 ± 41.1	76	0.742 ± 0.014	-16.7 ± 1.3
		71.3 ± 22.7	24		

**Abbildung 58:** Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe **77** aus oxidierte Stärke mit zellspezifischem Ligand **71b** und Heptacysteaminy- β -CD **7** in PBS vor und nach Lyophilisieren

Man konnte feststellen, dass sich die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel durch das Gefriertrocknen und erneutes Lösen in den meisten Fällen nicht wesentlich veränderten. Die Polydispersitätsindices waren bei allen stöchiometrischen Verhältnissen nach dem Redispergieren größer als zuvor. Es trat nach wie vor das Minimum der Partikelgröße und des PDIs bei Verhältnissen von COOH/NH₂ auf, die nahe an eins lagen. Dieser Effekt war bei allen dargestellten Nanoplexen zu beobachten, unabhängig von der Art des gewählten Polymers und Cyclodextrins.

Die geplante Applikation der wirkstoffbeladenen Nanopartikel soll intravenös erfolgen, daher ist es wichtig, wie sich die Partikel gegenüber den Bestandteilen des Blutes verhalten. Blut besteht aus dem zellulären Anteil und aus Plasma. Beim Plasma handelt es sich um eine wässrige Lösung von Proteinen, Salzen und anderen niedermolekularen Stoffen, wie Zucker. Der zelluläre Anteil wird als Hämatokrit bezeichnet und enthält als Hauptbestandteil Erythrozyten (rote Blutkörperchen), sowie Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen). Die Erythrozyten sind für den Transport von Sauerstoff verantwortlich. Die Besonderheit der roten Blutkörperchen besteht in der Tatsache, dass sie keinen Zellkern besitzen und nicht zur Endozytose befähigt sind. Aus diesem Grund wurde erwartet, dass die Nanopartikel nicht in die Erythrozyten eindringen können. Allerdings muss getestet werden, ob die Partikel an die Membran adsorbieren und so Schäden verursachen können.

Zum anderen wurde die Wirkung der Nanopartikel auf Caco-2-Zellen untersucht. Dabei handelt es sich um epithelale Darmkrebszellen, die Folsäurerezeptoren exprimieren und so ein aktives Targeting durch rezeptorvermittelte Endozytose ermöglichen. Die Membranen von biologischen Zellen sind sehr komplex und beeinflussen die Wechselwirkungen mit Nanopartikeln. Die Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in die Membranproteine eingebettet sind. Einige dieser Proteine fungieren als Rezeptoren und haben spezifische Affinitäten für bestimmte Moleküle wie zum Beispiel Zucker oder Folsäure. Um zu testen, welche Auswirkungen die Nanoplexe auf Erythrozyten und Caco-2-Zellen haben,

wurden die Partikel zusammen mit Caco2-Zellen und roten Blutkörperchen inkubiert. Diese Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernhard (Universität des Saarlandes).

In Abbildung 59 ist das Kontrollexperiment gezeigt. Die kleinen Zellen stellen die roten Blutkörperchen dar und die größeren die Caco-2-Zellen. Es war keine Fluoreszenz erkennbar. Alle Experimente wurden in einer physiologischen Lösung durchgeführt, die 145 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 10 mM Glucose und 10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure) enthielt. Der pH-Wert wurde mit TRIS (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol) auf 7.4 eingestellt.

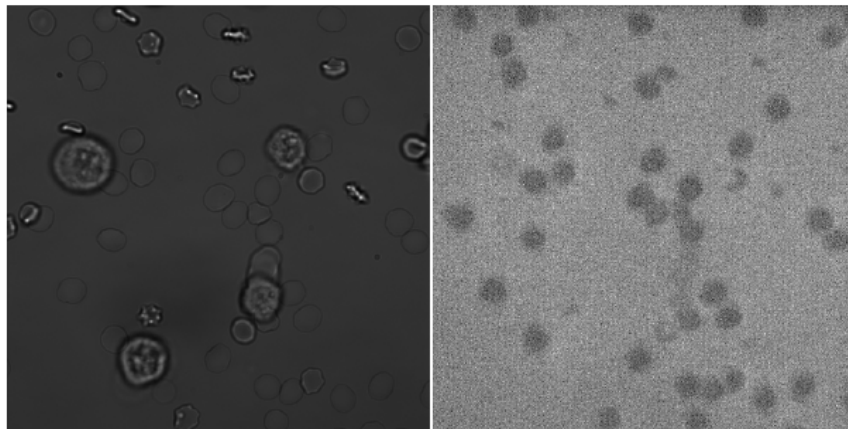


Abbildung 59: Kontrollexperiment, Erythrozyten und Caco2-Zellen ohne Nanoplex. Links: Betrachtung bei 488 nm, rechts: Betrachtung unter Tageslicht^[328]

76a wurde mit 1,4-Dihydroxyanthrachinon als Modellschubstanz an Stelle des Zytostatikums Idarubicin beladen und zusammen mit roten Blutkörperchen und Caco-Zellen in der oben beschriebenen physiologischen Lösung bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Inkubation mit der Nanoplexlösung und Waschen mit physiologischer Lösung war eine Fluoreszenz der Caco-2-zellen zu sehen (Abbildung 60). Die roten Blutkörperchen zeigten dagegen keine Fluoreszenz.

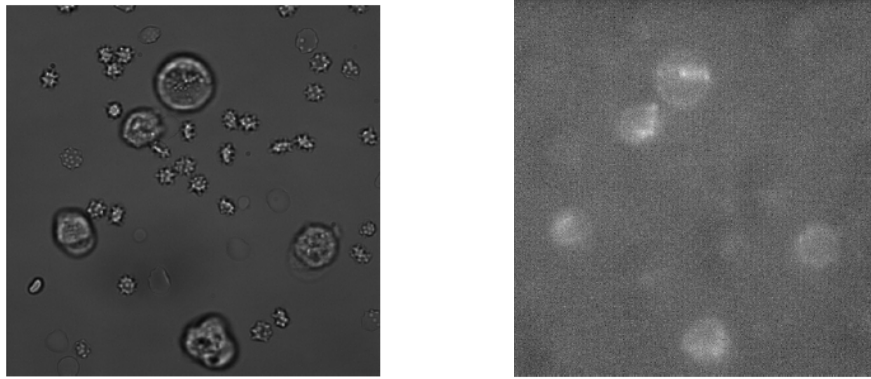


Abbildung 60: Erythrozyten und Caco-2-zellen nach Inkubation mit Nanoplexlösung. links: Betrachtung im Tageslicht, mitte: Betrachtung bei 488 nm, rechts: Überlagerung der Beobachtung im Tageslicht und bei 488 nm mit dem konfokalen Mikroskop^[328]

Dies zeigt, dass die Nanopartikel mittels Endozytose in die Caco-2-zellen aufgenommen wurden. Mit steigender Nanoplex-Konzentration wurde die Fluoreszenz der Caco-2-Zellen stärker und somit nahm der Anteil der Nanoplexe in der Zelle zu. Zusätzlich wurden die Caco-2-zellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Damit ist es möglich, verschiedene Ebenen der Zelle darzustellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz nicht nur auf der Zellmembran zu sehen war, sondern auch in der Zelle. Dabei gab es Bereiche mit stärkerer und mit schwächerer Fluoreszenz. In Abbildung 61 ist eine Caco-2-zelle nach Behandlung mit Nanoplexen gezeigt. Die einzelnen Bilder stellen verschiedene Ebenen der Zelle von oben nach unten dar.

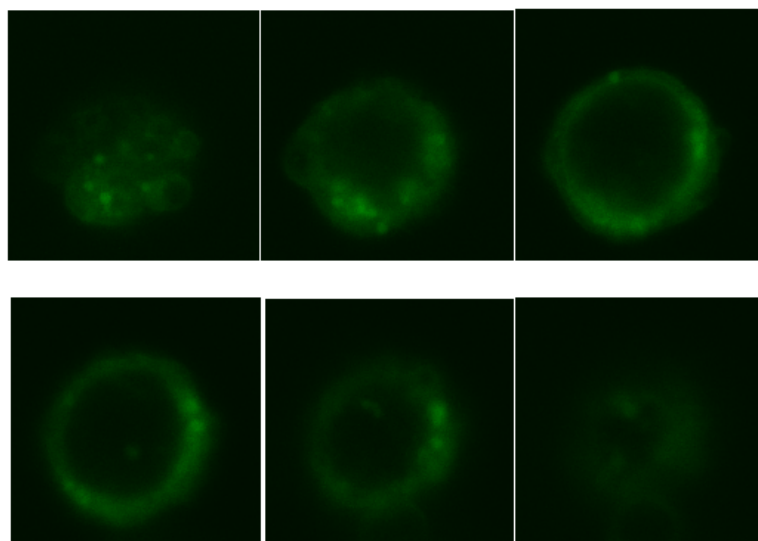


Abbildung 61: Aufnahme einer Caco-2-zelle mit wirkstoffbeladenem Nanoplex mit dem konfokalen Mikroskop, Beobachtung bei 488 nm^[328]

Zwischen den roten Blutkörperchen und den Nanopartikeln kam es zu keiner erkennbaren Wechselwirkung. Es war keine Fluoreszenz erkennbar, daher kann man davon ausgehen, dass es zu keiner Adsorption an die Zellmembran kommt. Deshalb stellen diese Art von Nanoplexen ein viel versprechendes Carriersystem dar, welches dazu geeignet ist, einen Wirkstoff spezifisch zu Caco-2-zellen zu transportieren ohne dabei die roten Blutkörperchen zu schädigen.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit kann in drei Teile gegliedert werden. Der erste Teil stellt die Synthese und Charakterisierung von β -Cyclodextrinderivaten dar. Es ist gelungen 6 neue mono- und 5 heptasubstituierte Derivate zu synthetisieren, welche alle in der Lage sind, kleine hydrophobe Moleküle in ihre Kavität einzuschließen. Diese Derivate wurden zum einen dazu genutzt, ein besseres Verständnis für bei der Bildung eines Wirt-Gast-Komplexes auftretenden Wechselwirkungen zu erlangen, die bislang nicht genauer untersucht wurden. Zum anderen konnten mit Hilfe eines inversen virtuellen Screenings neue heptasubstituierte CD Derivate gefunden werden, welche stabile Komplexe mit den Zytostatika Camptothecin, Taxotere und Idarubicin ausbilden. Daraus ergibt sich neben der Möglichkeit der Solubilisierung eine potentiell verbesserte Administration. Speziell im Fall von Taxotere wird in der momentanen Formulierung der Emulgator Tween 80 verwendet. Durch die Verwendung eines Transportmediums auf Kohlenhydratbasis könnten diese Nachteile umgangen werden.

Der zweite Teil der Arbeit besteht in der Synthese von Stärkederivaten. Diese wurden mit zellspezifischen Liganden verknüpft, um ein aktives Targeting zu erreichen. Dazu wurde Stärke mit Natriumhypochlorit und katalytischen Mengen TEMPO oxidiert. Durch die Wahl des stöchiometrischen Verhältnisses Hypochlorit/AGU konnte jeder gewünschte Substitutionsgrad zwischen 0 und 0.8 eingestellt werden. Die resultierenden Carboxylgruppen wurden im nächsten Schritt mit aminofunktionalisierten Pteroaten umgesetzt, die als zellspezifische Liganden fungieren. Auch hier konnte über die Stöchiometrie der Substitutionsgrad gesteuert werden.

Der letzte Teil stellt die Verknüpfung der beiden ersten Teile dar. Aus den CD- und Stärkederivaten konnten Nanoplexe und Nanopartikel gebildet werden. Die Bildung der Nanoplexe wurde zuerst an einem kationischen und einem anionischen Block-copolymer untersucht und diese Ergebnisse dann auf die Stärke übertragen. Es ist gelungen, Nanoplexe in dem für die intravenöse Applikation interessanten Größenbereich (>100nm) mit guten Polydispersitäten herzustellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die meisten der Partikel in

PBS redispergierbar sind. Durch das Anknüpfen der Pteroate erreichte man Stärkederivate, die einen gerichteten Transport zum Zielort möglich machen. Die sie außerdem dazu zur Selbstassoziation in der Lage sind. Damit wurde die spontane Bildung von Nanopartikeln in wässriger Lösung durch Wasserstoffbrücken möglich. Damit übernahm das Pteroat sowohl die Rolle des zellspezifischen Liganden als auch die Funktion eines zur Aggregation befähigten, biokompatiblen Substituenten. Bei vielen Nanopartikeln stellt die Freisetzung des Wirkstoffs ein Problem dar. Die Verkapselung eines Wirkstoffs in Nanoplexe bietet den Vorteil, dass durch den niedrigeren pH-Wert im Endosom im Vergleich zum Blut und der damit verbundenen Änderung des Protonierungszustands der Polyelektrolyte eine Freisetzung des Wirkstoffs leicht möglich ist.

Abschließend konnte bewiesen werden, dass die Nanoplexe auf Stärkebasis in der Lage sind, in Krebszellen einzudringen, während rote Blutkörperchen nicht angegriffen werden. Damit erhielt man ein viel versprechendes Carriersystem, welches einen Wirkstoff gezielt zu seinem Bestimmungsort transportieren kann ohne gesunde Zellen zu schädigen.

9 Experimenteller Teil

9.1 Reagenzien, Methoden, Geräte und Kalibrierungen

9.1.1 Reagenzien, Methoden und Geräte

Die eingesetzten Feinchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma-Aldrich, ABCR, Merck, Acros Organics und Wacker in mindestens 95 %-iger Reinheit bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Absolute Lösungsmittel werden entsprechend den Standardverfahren getrocknet und entweder direkt eingesetzt oder über Molsieb aufbewahrt. Das für Ultra-, Nanofiltrationen und die Darstellung der Nanoplexe verwendete Wasser wurde mit einer Destille der Firma Buchi bidestilliert.

Für **dünnschichtchromatographische Untersuchungen** wurden Fertigfolien der Firma Machery-Nagel & Co (ALUGRAM SIL G / UV254) verwendet. Die Verbindungen wurden entweder direkt unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder durch Eintauchen in eine ethanolische Schwefelsäure-Lösung und anschließender Erwärmung mit einem Heißluftfön sichtbar gemacht.

Die Reinigung der synthetisierten CD-Derivate erfolgte mittels kontinuierlicher **Nanofiltration** gegen bidestilliertes Wasser. Dazu wurde eine Stahlzelle der Firma Berghof mit 200ml Inhalt sowie eine Pumpe der Firma Besta HD2-200 verwendet. Weiterhin kam die Membran BM-5 der Firma Berghof mit einer Ausschlussgrenze von 500 Da zum Einsatz.

Zur **Ultrafiltration** gegen bidestilliertes Wasser wurde je nach Produktmenge entweder eine Filtrationszelle der Firma Millipore mit UF-C5 Membran der Firma Microdyn-Nadir GmbH (Regeneratcellulose, cut-off: 5 kDa) oder ein Keramikmodul der Firma Junghans (cut-off: 3nm) verwendet.

Zum **Gefriertrocknen** wurde die Lyophile Alpha 1-4 der Firma Christ verwendet.

NMR-Spektren wurden mit einem Spektrometer des Typs AVANCE 500 (^1H : 500.27 MHz, ^{13}C : 125.79 MHz) oder des Typs Magnet Spin 400 MHz Ultra shield plus (^1H : 400.00 MHz) der Firma Bruker Biospin bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) relativ zu Tetramethylsilan angegeben. Zur Auswertung der Spektren wurde die Software ACD Labs 7.0 der Firma Avanced Chemistry Development Inc. verwendet. Die Multiplizitäten werden durch die folgenden Abkürzungen beschrieben: s für Singulett, d für Dublett, t für Triplett, q für Quartett, m für Multiplett, br für ein breites Signal.

UV-Spektren wurden mit einem UV/VIS-Spektrometer Lambda 2 von Perkin Elmer aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten mit einer Dicke von 1 cm verwendet.

Die **Massenspektren** werden auf dem Gerät Micromass ZQ-4000 der Firma Waters GmbH aufgenommen und mit der Software MassLynx (Version 4.0) ausgewertet.

CHN-Analysen wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität des Saarlandes durchgeführt auf dem Gerät CHN-900 Elemental Analysator der Firma Leco Corporation.

Infrarot-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Tensor 27 der Firma Bruker Optik GmbH als Reflexionsspektren mit der GoldenGate-Micro-ATR-Technik aufgenommen. Zur Auswertung der Spektren wurde die Software OPUS 4 verwendet. Die Intensitäten werden durch die Abkürzungen s für stark, m für mittel und w für schwach beschrieben.

Die Bestimmung des Massenmittels der Polymere wurde mittels **Gelpermeationschromatographie (GPC)** durchgeführt. Die Messungen erfolgten in 0.1M NaNO_3 -Lösung mit zwei Trennsäulen (MCX 10^3 und MCX 10^6) der Firma Polymer Standard Services GmbH und einer Vorsäule. Zur Detektion

wurde ein PSS SLD 7000 BI-MwA Lichtstreu-Detektor der Firma Polymer Standard Service GmbH und ein LR40 Brechungsindex-Detektor der Firma ViscoTek GmbH verwendet. Die Molmassen wurden relativ zu Pullulan-Standards ($M_n = 342 - 710000$ Da) ermittelt.

Zur Filtration über **Spritzenvorsatzfilter** wurden Chromafil Xtra MV20/25 Filter aus Cellulose-Mischester der Firma Macherey-Nagel mit einer Porengröße von $0.20 \mu\text{m}$ benutzt.

Die Messung des **pH-Werts** wurde mit dem pH-Meter MP220 der Firma Mettler-Toledo GmbH durchgeführt.

Die Bestimmung von hydrodynamischen Radien und PDI der Nanoteilchen erfolgte mittels **Photonenkorrelationsspektroskopie** an einem ZetaSizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments Ltd in wässriger Lösung. Mit diesem Gerät wird ebenfalls das Zetapotential der Partikel gemessen. Alle Messungen werden bei 633 nm mit einem He-Ne-Laser durchgeführt.

Die Gestalt der Partikel wurde mittels **Rasterkraftmikroskopie (AFM)** untersucht. Dazu wurde ein Gerät vom Typ Bioscope verwendet, das mit einem Bioscope BS3-Z2-Scankopf (Digital Instruments Inc.), einem Zeiss Axiovert und einem Nanoscope IV NS 4-Controller (Digital Instruments Inc.) ausgestattet war.

Fluoreszenz Intensitäten I wurden mit einem Jasco FT 6500 **Fluoreszenz-Spektrometer** bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm für horizontale (h) and vertikale (v) Positionen von Polarisator und Analysator gemessen.

9.1.2 UV-Spektren und Kalibrierungen

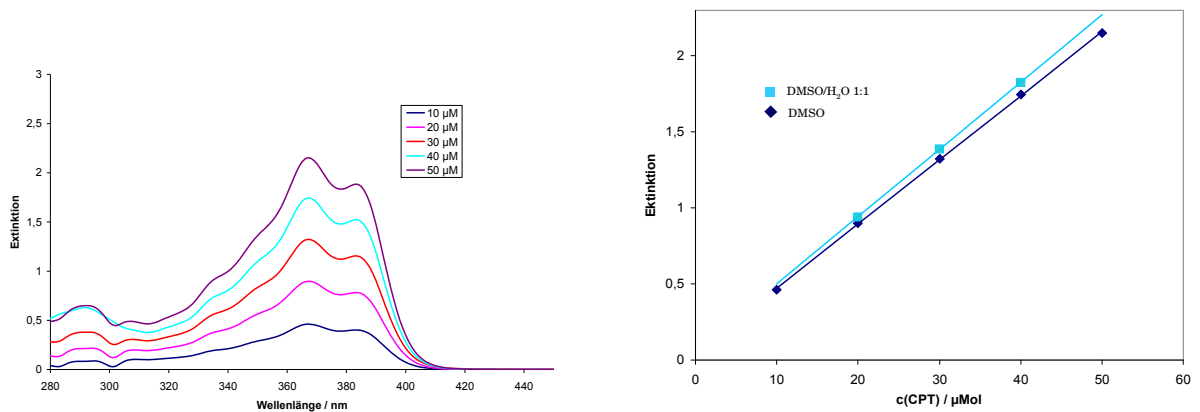


Abbildung 62: Rechts: UV-Spektren von CPT in DMSO Links: Extinktion als Funktion der Konzentration

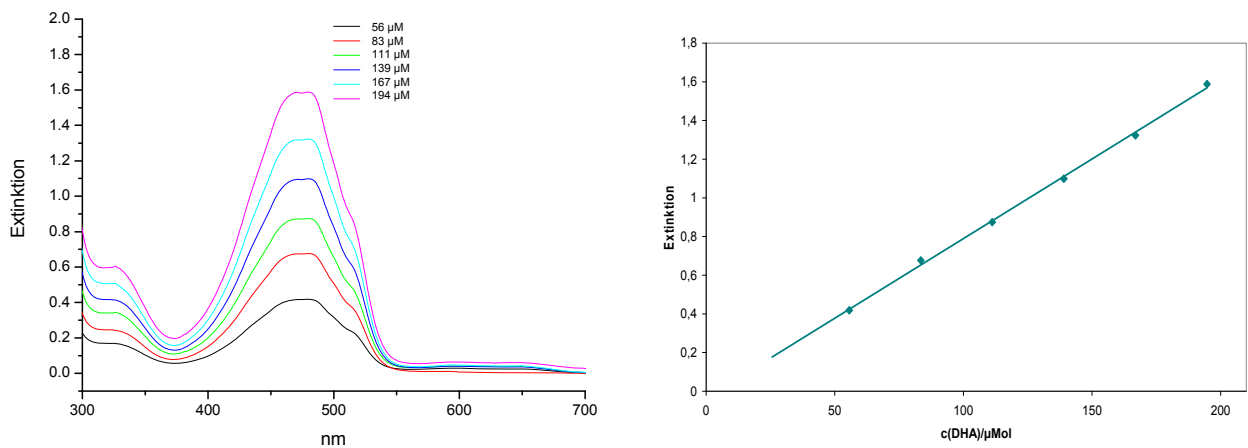


Abbildung 63: Rechts: UV-Spektren von DHA in DMSO Links: Extinktion als Funktion der Konzentration

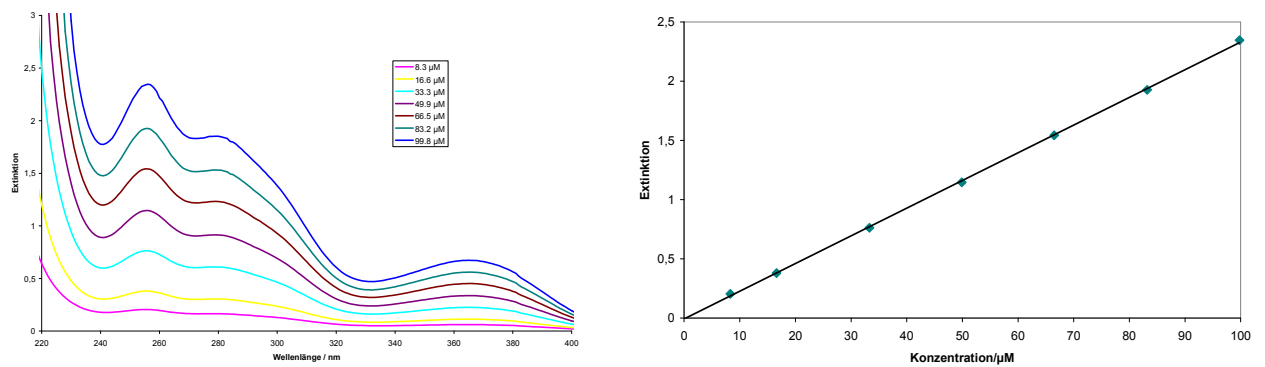
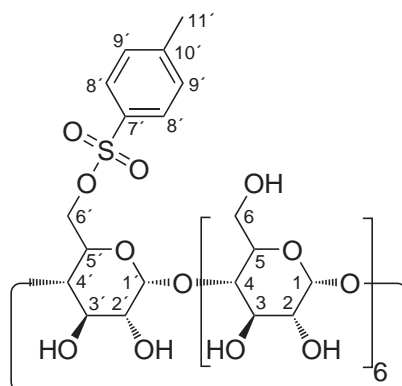


Abbildung 64: Rechts: UV-Spektren von Pterroat 66 in Wasser/Hydrazin (99:1) Links: Extinktion als Funktion der Konzentration

9.2 Synthesen der Cyclodextrinderivate

Mono-[6-deoxy-6-(*p*-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin^[159] **9**



Zu der Suspension von 22.70 g (20.0 mmol) getrocknetem β -Cyclodextrin **1 β** in 1 l Wasser werden nacheinander die Lösungen von 15.0 g Kupfersulfat Pentahydrat (60.0 mmol) und 20.0 g Natriumhydroxid (500 mmol) in je 1 l Wasser gegeben. Die dunkelblaue Mischung wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein pH-Wert von 13 einstellt. Es werden 30.0 g (158 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in 200 ml Acetonitril zugetropft. Der sich bildende weiße Niederschlag auf der Oberfläche geht bei längerem Rühren wieder in Lösung. Es wird 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, portionsweise mit 1 M Salzsäure neutralisiert und der blaue Niederschlag sofort abzentrifugiert (5000 rpm, 2 min). Die verbleibende Lösung wird bei 4 °C zur Kristallisation gebracht und liefert nach Unkristallisieren aus 10 mM EDTA-Lösung (Dinatriumsalz) das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 11.9 g (9.22 mmol)

46 % (bezogen auf β -Cyclodextrin **1 β**)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-*d*₆) = 7.74 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2H, 8-*H*), 7.42 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2H, 9-*H*), 5.69 (m, 14H, 2/2'/3/3'-OH), 4.79 (m, 7H, 1/1'-*H*), 4.35 (m, 6H, 6-OH), 3.55 (m, 21H, 3/3'/5/5'/6/6'-*H*), 3.26 (m, 14H, 2/2'/4/4'-*H*), 2.42 (s, 3H, 11-*H*).

¹³C-NMR: δ / ppm (DMSO-*d*₆) = 144.86 (C-7'), 132.71 (C-10'), 129.93 (C-9'), 127.62 (C-8'), 102.28 (C-1'), 101.95 (C-1), 81.54 (C-4), 81.20 (C-

9.2 Synthesen der Cyclodextrinderivate

4'), 73.09 (C-2), 72.77 (C-2'), 72.47 (C-5'), 72.19 (C-5), 68.94 (C-3),
68.72 (C-3'), 59.96 (C-6), 59.55 (C-6'), 21.24 (C-11).

IR: $\nu_{\max} / \text{cm}^{-1} = 3261$ (br, O-H), 2926 (C-H), 1647 (C=C), 1598 (C=C),
1360 (SO₂-OC), 1154 (C_{prim}-OH), 1078 (C-O-C), 1022 (C_{sek}-OH).

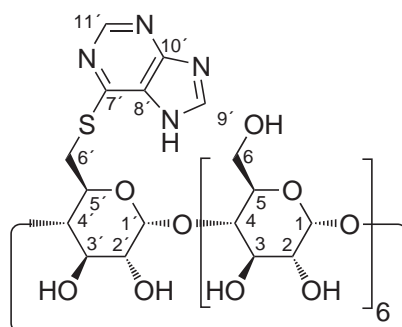
MS (ESI): m/z (H₂O + DMSO) = 1289.37 [M+H]⁺

Summenformel: C₄₉H₇₆O₃₇S * 6 H₂O

CHN-Analyse: berechnet: C 42.12 %, H 6.35 %

erhalten: C 41.68 %, H 6.31 %

Mono-[6-deoxy-6-(6-sulfanyl-9H-purin)]-β-cyclodextrin **33**



1.52 g (1.18 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]-β-cyclodextrin **9** werden in 15 ml DMF gelöst und mit 1.64 ml (11.8 mmol) Triethylamin und 2.00 g (11.8 mmol) 6-Mercaptopurin Monohydrat **31** versetzt. Die gelbe Mischung wird drei Tage auf 60 °C erhitzt, eingengt und aus Ethanol ausgefällt. Der gelbe Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.42 g (1.12 mmol)

95 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]-β-cyclodextrin **9**)

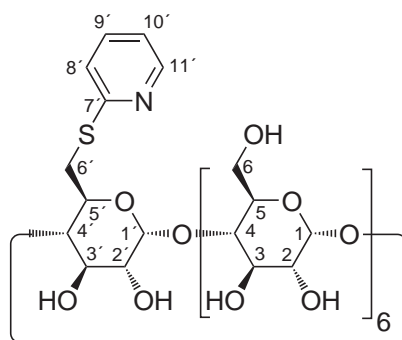
IR: $\nu_{\max} / \text{cm}^{-1} = 3274$ (br, O-H), 2925 (m, C-H), 1567 (s, C=C), 1324 (m, O-H), 1242 (m, C-O-C), 1152 (s, C_{prim}-OH), 1076 (w, C-O-C), 1022 (s, C_{sek}-OH).

MS (ESI): m/z (H₂O) = 1271.17 [M+H]⁺, 1293.10 [M+Na]⁺

CHN-Analyse: berechnet: 41.14 %C, 6.32 %H, 4.08 %N

erhalten: 41.17 %C, 6.20 %H, 4.74 %N

Mono-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-pyridin)]- β -cyclodextrin **34**



2.26g (1.75mmol) Mono-[6-deoxy-6-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin **9** werden in 20ml DMF gelöst. Zu der Lösung gibt man nacheinander 2.44ml (17.5mmol) Triethylamin und 1.95g (17.5mmol) 2-Mercaptopyridin **32**. Die Mischung wird zuerst 3d bei Raumtemperatur und dann 2d bei 60°C gerührt. Es wird auf ca. die Hälfte des Volumens eingeeengt und aus Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wird mit Aceton gewaschen, in Wasser gelöst und nanofiltriert (500 Da).

Ausbeute: 1.50g (1.22 mol)

70% (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin **9**)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 8.29 (d, $^3J = 4$ Hz, 1H; 8'-H), 7.59 (m, 1H; 11'-H), 7.28 (m, 1H; 9'-H), 7.02 (m, 1H; 10'-H), 5.96 (d, $^3J = 6$ Hz, 2H; 2'/3'-OH), 5.71 (m, 18H; 2/3/6-OH), 4.93 (d, $^3J = 3$ Hz, 1H; 1'-H), 4.83 (m, 6H; 1-H), 4.48 (m, 6H; 5-H), 4.42 (t, $^3J = 6$ Hz, 1H; 5'-H), 4.00 (d, $^3J = 12$ Hz, 1H; 6a'-H), 3.62 (m, 19H; 3/3'/6a/6b-H), 3.48 (m, 1H; 4'-H), 3.29 (m, 13H; 2/2'/4-H), 2.96 (m, 1H; 6b'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 149.1 (C-8'), 136.7 (C-11'), 122.6 (C-9'), 119.8 (C-10'), 102.6 (C-1'), 102.0 (C-1), 81.6 (C-4), 80.8 (C-4'),

9.2 Synthesen der Cyclodextrinderivate

73.2 (C-3'), 73.0 (C-3), 72.4 (C-5), 72.4 (C-5'), 72.1 (C-2), 71.8 (C-2'), 60.0 (C-6), 31.8 (C-6').

IR: $\nu_{\max} / \text{cm}^{-1} = 3314$ (br, O-H), 2916 (m, C-H), 1579 (w, C=C), 1152 (s, C_{prim}-OH), 1078 (m, C-O-C), 1029 (s, C_{sek}-OH).

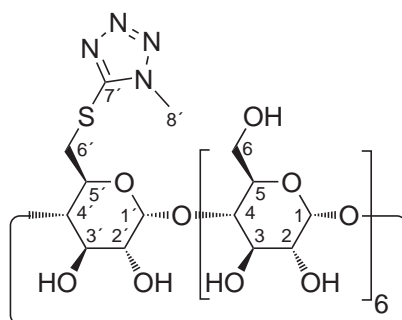
MS (ESI): m/z (H₂O) = 1228.51 [M+H]⁺

Summenformel: C₄₇H₇₃NO₃₄S * 6H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 42.25 %C, 6.41 %H, 1.05 %N

erhalten: 42.68 %C, 7.46 %H, 1.18 %N

Mono-[6-deoxy-6-(1-methyl-5-sulfanyl-tetrazol)]-β-cyclodextrin 35



2.22 g (1.72 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]-β-cyclodextrin **9** werden in 20 ml DMF gelöst und mit 2.40 ml (17.2 mmol) Triethylamin und 2.00 g (17.2 mmol) 5-Mercapto-1-methyltetrazol **24** versetzt. Die klare Mischung wird drei Tage bei 60 °C gerührt. Man lässt abkühlen und fällt aus Aceton aus. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.88 g (1.52 mmol)

89 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]-β-cyclodextrin **9**)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 5.85 (m, 2H; 2'/3'-OH), 5.69 (m, 12H; 2/3-OH), 4.89 (m, 1H; 1'-H), 4.82 (m, 6H; 1-H), 4.42 (m, 6H; 6-OH), 3.62 (m, 21H; 3/3'/5/5'/6/6'-H), 3.33 (m, 14H; 2/2'/4/4'-H), 2.07 (s, 3H; 8-H).

^{13}C -NMR: δ / ppm (DMSO- d_6) = 153.6 (C-7), 101.9 (C-1), 101.4 (C-1'), 81.6 (C-4'), 81.2 (C-4), 73.0 (C-5), 72.9 (C-5'), 72.5 (C-2), 72.4 (C-2'), 72.0 (C-3), 72.0 (C-3'), 59.9 (C-6), 59.7 (C-6'), 30.7 (C-8).

IR: ν_{max} / cm^{-1} = 3300 (br, O-H), 2925 (m, C-H), 1657 (w, C=N), 1151 (s, C_{prim} -OH), 1075 (m, C-O-C), 1025 (s, C_{sek} -OH).

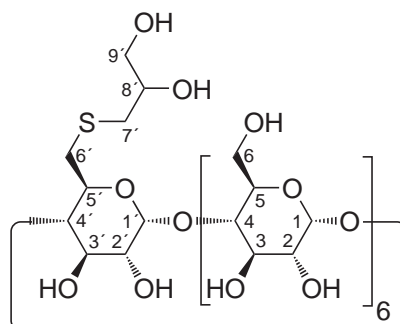
MS (ESI): m/z (H_2O) = 1233.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Summenformel: $\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_{34}\text{S} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 39.40 %C, 6.31 %H, 4.18 %N

erhalten: 39.25 %C, 6.40 %H, 5.34 %N

Mono-[6-deoxy-6-(3-sulfanyl-propan-1,2-diol)]- β -cyclodextrin **39**



1.75 g (1.36 mmol) Mono-[6-deoxy-6-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin **9** werden in 20 ml DMF gelöst. Zu der Lösung gibt man 1.90 ml (13.6 mmol) Triethylamin und 1.18 ml (13.6 mmol) Thioglycerin **28** und rührt 3d bei 60°C. Es wird auf ca. die Hälfte des Volumens eingengt und aus Isopropanol ausgefällt. Der Niederschlag wird in Wasser gelöst und mittels Nanofiltration (500 Da) gereinigt.

Ausbeute: 0.53 g (0.43 mmol)

32% (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin **9**)

^1H -NMR: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.82 (br, 2H, 2'/3'-OH), 5.72 (m, 12H, 2/3-OH), 4.85 (m, 1H, 1'-H), 4.81 (m, 6H, 1-H), 4.55 (m, 1H, 8'-OH), 4.51 (m, 1H, 9'-OH), 3.75 (m, 2H, 9'-H), 3.62 (m, 13H, 3/3'/6-H),

9.2 Synthesen der Cyclodextrinderivate

3.54 (m, 9H, 5/5'/7'-H), 3.32 (m, 14H, 2/2'/4/4'-H), 3.01 (m, 1H, 8'-H), 2.68 (m, 2H, 6'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 102.33 (C-1'), 101.96 (C-1), 85.00 (C-4'), 81.57 (C-4), 73.10 (C-3), 72.90 (C-3'), 72.44 (C-2), 72.06 (C-2'), 71.50 (C-5), 71.22 (C.5'), 64.68 (C-7'), 64.59 (C-9), 59.96 (C-6), 36.62 (C-6'), 20.84 (C-8').

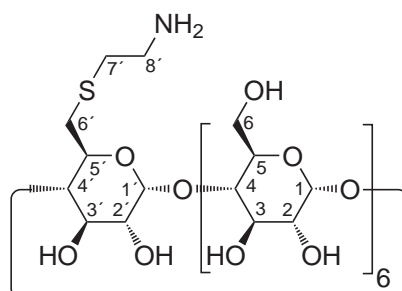
MS (ESI): m/z (H_2O) = 624.50 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$, 632.60 $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$, 1247.54 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,

Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{O}_{36}\text{S} * 6\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 40.54 %C, 6.65 %H

erhalten: 40.86 %C, 6.29 %H

Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]- β -cyclodextrin^[162] **12**



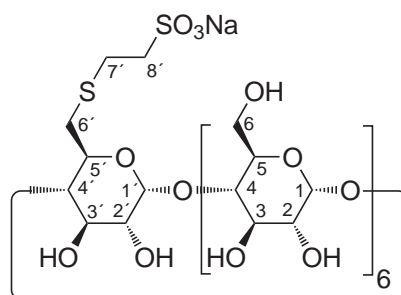
5.21 g (4.04 mmol) Mono-[6-deoxy-6-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin **9**, 4.13 g (36.4 mmol) Cysteamin Hydrochlorid **25** und 10.5 g (133 mmol) Ammoniumhydrogen-carbonat werden in 80 ml einer DMF/Wasser-Mischung (1:3) suspendiert und für drei Tage auf 60 °C erwärmt. Dabei entsteht eine gelbe klare Lösung, welche auf ca. 10 ml eingengt und aus Aceton ausgefällt wird. Nach Absaugen des Niederschlags wird wieder in Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhält das Produkt als farblosen watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 4.02 g (3.27 mmol)

81 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin **9**)

- $^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 4.97 (m, 1H; 1'-H), 4.91 (m, 6H; 1-H), 3.77 (m, 12H; 6a/b-H), 3.70 (m, 7H; 3/3'-H), 3.63 (m, 7H; 5/5'-H), 3.49 (m, 7H; 2/2'-H), 3.44 (m, 6H; 4-H), 3.25 (m, 1H; 4'-H), 3.10 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H; 8'-H), 3.04 (m, 1H; 6a'-H), 2.80 (m, 2H; 7'-H), 2.70 (m, 1H; 6a'-H).
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 102.26 (C-1'), 101.94 (C-1), 84.67 (C-4'), 81.54 (C-4), 73.07 (C-3), 72.94 (C-3'), 72.40 (C-2), 72.31 (C-2'), 72.17 (C-5'), 72.02 (C-5), 60.21 (C-6'), 59.98 (C-6), 38.62 (C-7), 32.81 (C-8).
- IR: ν_{max} / cm^{-1} = 3277 (br, O-H), 2926 (m, C-H), 1653 (m, N-H), 1152 (s, $\text{C}_{\text{prim}}\text{-OH}$), 1077 (m, C-O-C), 1024 (s, $\text{C}_{\text{sek}}\text{-OH}$).
- MS (ESI): m/z ($\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$) = 1194.48 $[\text{M}+\text{H}]^+$
- Summenformel: $\text{C}_{44}\text{H}_{75}\text{O}_{34}\text{NS} \cdot \text{HCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- CHN-Analyse: berechnet: C 39.48 %, H 6.63 %, N 1.05 %
erhalten: C 38.32 %, H 6.55 %, N 2.55 %

Mono-(6-deoxy-6-(2-sulfanyl-ethansulfonsäure)]- β -cyclodextrin **37**

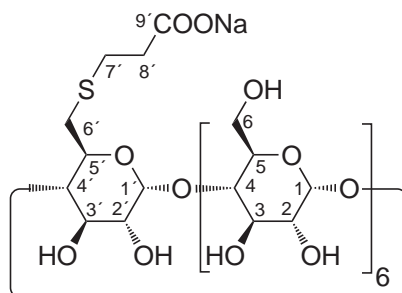


1.57 g (1.22 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** werden in 20 ml DMSO gelöst, mit 1.70 ml (12.2 mmol) Triethylamin und 2.00 g (12.2 mmol) 2-Mercapto-ethansulfonat Natriumsalz **30** versetzt. Die klare farblose Lösung wird für drei Tage auf 60 °C erhitzt, bis fast zur Trockne eingengt, in Wasser aufgenommen und aus Aceton ausgefällt. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt, über eine BM-5 Membran (Ausschlussgrenze 500 Dalton) nanofiltriert und lyophilisiert.

9.2 Synthesen der Cyclodextrinderivate

- Ausbeute: 0.68 g (0.53 mmol)
44 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9**)
- $^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 4.99 (m, 1H; 1'-H), 4.93 (m, 6H; 1-H), 3.83 (m, 8H; 5/5'/6'-H), 3.78 (m, 13H; 3/3'/6-H), 3.72 (m, 14H; 2/2'/4/4'-H), 3.04 (m, 2H; 7-H), 2.83 (m, 2H; 8-H).
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 103.1 (C-1/1'), 82.1 (C-4/4'), 74.3 (C-5'), 74.2 (C-5), 73.3 (C-2), 73.3 (C-2'), 73.1 (C-3), 73.1 (C-3'), 61.4 (C-6'), 61.2 (C-6), 51.7 (C-7), 32.9 (C-8).
- MS (ESI): m/z (H_2O) = 1257.39 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 1259.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1281.55 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- Summenformel: $\text{C}_{44}\text{H}_{73}\text{O}_{37}\text{S}_2\text{Na} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- CHN-Analyse: berechnet: 37.08 %C, 6.29 %H
erhalten: 36.55 %C, 5.98 %H

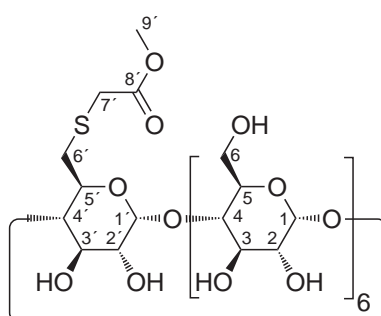
Mono-[6-deoxy-6-(3-sulfanyl-propionsäure)]- β -cyclodextrin **38**



2.00 g (1.55 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** werden in 15 ml trockenem DMF gelöst und mit 2.16 ml (15.5 mmol) Triethylamin und 1.86 g (15.5 mmol) Mercaptopropionsäuremethylester versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Tage bei 60 °C gerührt, auf die Hälfte des Volumens eingengt und aus Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet und in ca. 100 ml 1M NaOH 18h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 1M HCl neutralisiert und mittels Nanofiltration (500 Da) gegen Wasser gereinigt. Nach Lyophilisieren erhält man einen weißen watteartigen Feststoff.

- Ausbeute: 0.66 g (0.54 mmol)
98 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9**)
- $^1\text{H-NMR}$: δ / ppm ($\text{D}_2\text{O/DSS}$) = 4.98 (d, $^3\text{J} = 3.65$ Hz, 1H, 1'-H), 4.91 (m, 6H, 1-H), 3.85 (m, 2H, 6a'/b'-H), 3.81 (m, 13H, 3/3'/6a-H), 3.71 (m, 13H, 5/5'/6b-H), 3.51 (m, 7H, 2/2'-H), 3.42 (m, 7H, 4/4'-H), 2.67 (t, $^3\text{J} = 7.31$ Hz, 2H, 7'-H), 2.32 (t, $^3\text{J} = 7.31$ Hz, 2H, 8'-H).
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm ($\text{D}_2\text{O/DSS}$) = 102.74 (C-1), 85.01 (C-4'), 82.10 (C-4), 74.00 (C-3), 73.77 (C-3'), 72.96 (C-2), 72.81 (C-2'), 72.71 (C-5), 72.13 (C-5'), 61.13 (C-6), 38.46 (C-8), 30.07 (C-7).
- IR: ν_{max} / cm^{-1} = 3259 (br, O-H), 2927 (m, C-H), 1568 (s, COO^-), 1397 (s, COO^-), 1153 (s, $\text{C}_{\text{prim-OH}}$), 1077 (m, C-O-C), 1025 (s, $\text{C}_{\text{sek-OH}}$).
- MS (ESI): m/z ($\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO}$) = 634.42 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, 1245.45 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1221.43 $[\text{M-H}]^-$
- CHN-Analyse: berechnet: 38.91 %C, 6.46 %H
erhalten: 38.54 %C, 6.00 %H

Mono-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-essigsäuremethylester)]- β -cyclodextrin

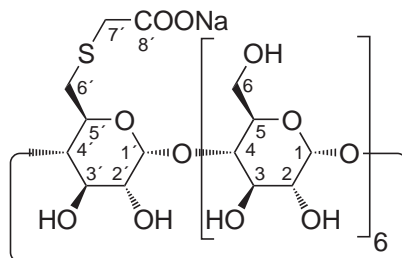


2.48 g (1.92 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** werden in 20.0 ml absolutem DMF gelöst, mit 2.68 ml (19.2 mmol) Triethylamin und tropfenweise mit 1.75 ml (19.2 mmol) Thioglycolsäuremethylester versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Tage auf 60 °C erhitzt, auf ca. 6 ml eingengt und aus etwa 150 ml Ethanol ausgefällt. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

9.2 Synthesen der Cyclodextrinderivate

- Ausbeute: 1.59 g (1.30 mmol)
68 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9**)
- $^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.74 (m, 12H, 2/3-OH), 4.85 (s, 1H, 1'-H), 4.81 (m, 6H, 1-H), 4.44 (m, 6H, 6-OH), 4.33 (dd, 2H, 2'/3'-OH), 3.77 (m, 3H, 9-H), 3.60 (m, 30H, 3/3'/5/5'/6/6'-H), 3.36 (m, 7H, 4/4'-H), 3.28 (m, 7H, 2/2'-H), 3.08 (m, 1H, 7a-H), 2.82 (m, 1H, 7b-H).
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 170.80 (C-8), 102.36 (C-1'), 102.00 (C-1), 81.63 (C-4), 81.31 (C-4'), 73.04 (C-3), 72.95 (C-3'), 74.40 (C-2), 72.25 (C-2'), 72.05 (C-5), 71.17 (C-5'), 59.93 (C-6), 59.79 (C-6'), 51.90 (C-9), 33.91 (C-7).
- IR: ν_{max} / cm^{-1} = 2385 (br, O-H), 2926 (s, C-H), 1717 (m, C=O), 1151 (s, $\text{C}_{\text{prim-OH}}$), 1076 (m, C-O-C), 1021 (s, $\text{C}_{\text{sek-OH}}$).

Mono-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-essigsäure)]- β -cyclodextrin^[163] **13**

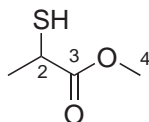


1.41 g (1.15 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(S-thioglycolsäure-methylester)]- β -cyclodextrin werden in 30 ml 1M NaOH gelöst und 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man bringt mit 1 N Salzsäure auf pH 6, nanofiltriert und lyophilisiert.

- Ausbeute: 1.08 g (0.88 mmol)
77 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(S-thioglycolsäuremethylester)]- β -cyclodextrin)

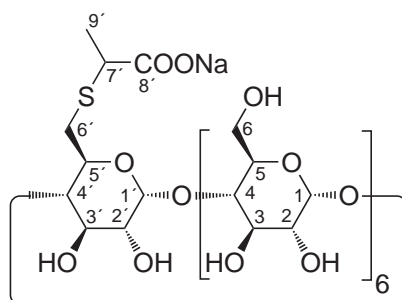
- ¹H-NMR: δ / ppm (D₂O) = 4.99 (d, ³J = 4 Hz, 1H; 1'-H), 4.92 (t, ³J = 3 Hz, 6H; 1-H), 3.78 (m, 8H; 3/3'/6a-H), 3.70 (m, 8H; 5/5'/6b-H), 3.50 (m, 7H; 2/2'-H), 3.44 (m, 7H; 4/4'-H), 3.16 (s, 2H; 7-H), 3.02 (m, 1H; 6a'-H), 2.78 (m, 1H; 6b'-H).
- ¹³C-NMR: δ / ppm (D₂O) = 177.5 (C-8), 103.1 (C-1), 102.9 (C-1'), 85.3 (C-4'), 82.3 (C-4), 74.3 (C-3), 74.3 (C-3'), 73.2 (C-2), 73.1 (C-2'), 72.5 (C-5/5'), 61.4 (C-6), 61.2 (C-6'), 38.9 (C-7).
- IR: ν_{\max} / cm⁻¹ = 3286 (br, O-H), 2919 (m, C-H), 1732 (s, COOH), 1151 (s, C_{prim}-OH), 1066 (m, C-O-C), 1026 (s, C_{sek}-OH).
- MS (ESI): m/z (H₂O + MeOH) = 1207.47 [M-Na]⁻, 1231.52 [M+H]⁺
- Summenformel: C₄₄H₇₁O₃₆SNa * 7H₂O
- CHN-Analyse: berechnet: 38.91 %C, 6.38 %H
erhalten: 38.54 %C, 6.38 %H

Thiomilchsäure-methylester



16.7 ml (188 mmol) Thiomilchsäure werden in 50 ml Methanol gelöst, mit 2 ml Schwefelsäure (conc.) versetzt und 4.5 Stunden bei 50°C gerührt. Man lässt abkühlen, gießt die Reaktionsmischung in ca. 120 ml Wasser und extrahiert die wässrige Phase mit Diethylether. Die organische Phase wird mit NaHCO₃ und Brine gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und vom Lösemittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird mittels Destillation gereinigt (50 mbar, 60°C).

- Ausbeute: 15.0 g (125 mmol)
67 % (bezogen auf Thiomilchsäure)
- ¹H-NMR: δ / ppm (MeOH-d₄) = 1.22 (m, 3H, H-3); 3.47 (m, 3H, H-7); 4.49 (m, 1H, H-2).
- ¹³C-NMR: δ / ppm (MeOH-d₄) = 21.48 (C-3); 36.09 (C-2); 52.92 (C-7); 175.80 (C-4).

Mono-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-propionsäure)]- β -cyclodextrin **39**

2.00 g (1.55 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9** werden in 20 ml DMF gelöst und mit 2.16 ml (15.5 mmol) Triethylamin und 1.86 g (15.5 mmol) 5-Mercapto-1-methyltetrazol **24** versetzt. Die Mischung wird drei Tage bei 60 °C gerührt. Man lässt abkühlen und fällt aus Isopropanol aus. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet, in 40 ml 1M NaOH gelöst und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Man neutralisiert mit 1M Salzsäure, nanofiltriert und lyophilisiert.

Ausbeute: 1,02 g (0,82 mmol)

78 % (bezogen auf Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- β -cyclodextrin **9**)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 4.99 (m, 1H; 1'-H), 4.92 (m, 6H; 1-H), 3.81 (m, 7H; 3/3'-H), 3.72 (m, 14H; 5/5'/6/6'-H), 3.50 (m, 7H; 2/2'-H), 3.44 (m, 7H; 4/4'-H), 2.79 (m, 1H; 7-H), 1.25 (br, 3H; 10-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 198.3 (C-8), 102.8 (C-1), 102.4 (C-1'), 82.1 (C-4), 82.0 (C-4'), 74.1 (C-3), 73.9 (C-3'), 73.1 (C-2), 73.0 (C-2'), 72.8 (C-5'), 72.8 (C-5), 61.3 (C-6'), 61.2 (C-6), 55.4 (C-7), 19.4 (C-10).

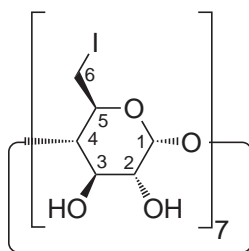
IR: ν_{max} / cm^{-1} = 3244 (br, O-H), 2925 (s, C-H), 1577 (s, COO^-), 1388 (m, O-H), 1152 (s, $\text{C}_{\text{prim}}\text{-OH}$), 1076 (m, C-O-C), 1021 (s, $\text{C}_{\text{sek}}\text{-OH}$).

MS (ESI): m/z (H_2O) = 1221.29 $[\text{M-Na}]^-$, 1224.32 $[\text{M+H}]^+$

Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{O}_{36}\text{SNa} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 39.94 %C, 6.33 %H

erhalten: 39.94 %C, 6.18 %H

Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin^[152] 3

86.7 g (330 mmol) Triphenylphosphin werden unter Stickstoff in 300 ml DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wird innerhalb von 20 Minuten 87.8 g (346 mmol) Iod zugeben, wobei die Temperatur 8 °C nicht übersteigt. Man lässt auf Raumtemperatur kommen und gibt langsam 25.0 g (22.0 mmol) β -Cyclodextrin zu der braunen Mischung. Es wird zwei Stunden bei Raumtemperatur und 42 Stunden bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen engt man die Mischung auf ca. 200 ml ein, gibt die Lösung von 19.5 g (360 mmol) Natrium-methanolat in 120 ml Methanol zu und rührt 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es wird aus ca. 2.5 l kaltem Methanol ausgefällt. Der gelbe Niederschlag wird mittels Soxhlet mit Methanol gereinigt.

Ausbeute: 47.6 g (22.1 mmol)

100 % (bezogen auf β -Cyclodextrin)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.93 (m, 14H, 2/3-OH), 4.98 (d, 3J = 3.5 Hz, 7H, 1-H), 3.79 (d, 3J = 9.14 Hz, 7H, 6a-H), 3.63 (t, 3J = 9.14 Hz, 7H, 3-H), 3.58 (m, 7H, 5-H), 3.43 (m, 7H, 6b-H), 3.37 (dd, 3J = 9.65 Hz, 7H, 2-H), 3.27 (t, 3J = 9.0 Hz, 7H, 4-H).

¹³C-NMR: δ / ppm (DMSO- d_6) = 102.08 (C-1), 85.90 (C-4), 72.13 (C-2), 71.87 (C-3), 70.90 (C-5), 9.46 (C-6).

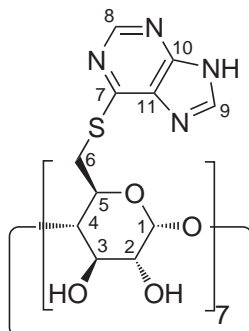
IR: ν_{\max} / cm^{-1} = 3299 (br, O-H), 2910 (m, C-H), 1371 (s, O-H), 1094 (m, C-O-C), 1033 (s, C_{sek}-OH).

Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{O}_{28}\text{I}_7 \cdot \text{I}_2$

CHN-Analyse: berechnet: 23.38 % C, 2.94 % H

erhalten: 24.63 % C, 3.08 % H

Heptakis-[6-deoxy-6-(sulfanyl-9H-purin)]-β-cyclodextrin 40



Die Lösung von 1.00 g (0.53 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3** in 10 ml absolutem DMF wird mit 1.28 ml (9.19 mmol) Triethylamin und 1.57 g (9.19 mmol) 6-Mercaptopurin Monohydrat **31** versetzt und fünf Tage bei 60 °C gerührt. Beim Abkühlen fällt ein gelber Feststoff aus, welcher abgetrennt und im Vakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 370 mg (0.18 mmol)

34 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-cyclodextrin **3**)

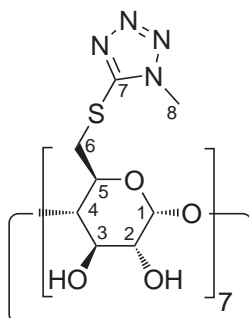
IR: $\nu_{\max} / \text{cm}^{-1} = 3428$ (br, O-H), 2915 (m, C-H), 1656 (m, C=N), 1572 (s, C=C), 1200 (m, C-O-C), 1011 (s, C_{sek}-OH).

MS (ESI): m/z (H₂O + DMSO) = 1036.71 [M+2H]²⁺, 2072.93 [M+H]⁺

Summenformel: C₇₇H₈₄N₂₈O₂₈S₇ * 8H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 41.69 %C, 4.54 %H, 17.68 %N

erhalten: 40.92 % C, 5.27 % H, 18.31 % N

Heptakis-[6-deoxy-6-(1-methyl-5-sulfanyl-tetrazol)]-β-cyclodextrin 41

Die Lösung von 1.00 g (0.53 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3** in 10 ml absolutem DMF wird mit 1.28 ml (9.19 mmol) Triethylamin und 1.07 g (9.19 mmol) 5-Mercapto-1-methyl-tetrazol **24** versetzt und vier Tage bei 60 °C gerührt. Man lässt abkühlen und fällt aus ca. 100 ml Ethanol aus. Der feine gelbe Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.90 g (0.49 mmol)

93 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3**)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 5.96 (br, 7H; 2-OH), 5.86 (br, 7H; 3-OH), 4.92 (d, 7H; 1-H), 4.09 (t, ³J = 7 Hz, 7H; 5-H), 3.74 (d, ³J = 11 Hz, 7H; 6-H), 3.66 (m, 7H; 3-H), 3.42 (m, 35H; 2/4/8-H).

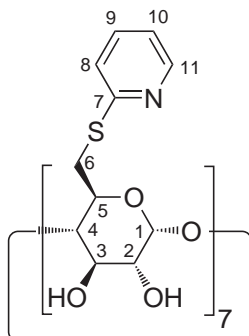
¹³C-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 153.4 (C-7), 102.1 (C-1), 84.5 (C-4), 72.4 (C-3), 72.0 (C-2), 69.3 (C-5), 35.0 (C-8), 33.5 (C-6).

MS (ESI): *m/z* (H₂O + DMSO + MeOH) = 1821.49 [M+H]⁺

Summenformel: C₅₆H₈₄N₂₈O₂₈S₇ * 8H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 34.21 %C, 5.13 %H, 19.95 %N

erhalten: 34.28 %C, 4.69 %H, 20.17 %N

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-pyridin)]-β-cyclodextrin 42

1.90 g (1.00 mmol) Heptakis-[6-deoxy-6-iodo]-β-cyclodextrin **3** werden in 15 ml DMF gelöst und nacheinander mit 2.44 ml (17.5 mmol) Triethylamin und 1.95 g (17.5 mmol) 2-Mercaptopyridin **32** versetzt. Die Mischung wird 4 Tage bei 60°C gerührt, etwa auf die Hälfte des Volumens eingengt und aus Aceton ausgefällt. Man erhält einen rot-braunen Feststoff.

Ausbeute: 1.69 g (0.95 mmol)

95% (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)-β-cyclodextrin **3**)

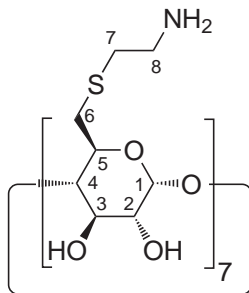
¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 8.29 (m, 7H, 10-H), 7.38 (m, 7H, 9-H), 6.94 (m, 14H, 8/11-H), 5.92 (br, 14H, 2/3-OH), 4.92 (d, ³J = 3.05 Hz, 7H, 1-H), 3.95 (m, 14H, 3/6a-H), 3.64 (m, 7H, 5-H), 3.39 (m, 21H, 2/4/6b-H).

¹³C-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 148.92 (C-10), 136.08 (C-9), 121.49 (C-8), 119.37 (C-10), 101.96 (C-1), 84.92 (C-4), 72.63 (C-5), 72.20 (C-2), 69.96 (C-3), 30.69 (C-6).

Summenformel: C₇₇H₉₁O₂₈S₇N₇ * 2H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 50.73 %C, 5.25 %H, 5.38 %N

erhalten: 50.36 %C, 5.14 %H, 5.23 %N

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-amino-ethylsulfanyl)]-β-cyclodextrin^[154] 7

2.00 g (17.6 mmol) 2-Aminoethanthiol Hydrochlorid **25** werden unter Stickstoff in 20.0 ml absolutem DMF gelöst und mit 2.60 ml (17.6 mmol) Triethylamin versetzt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildet. Zu der Mischung werden 2.40 g (1.26 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3** in 10 ml absolutem DMF getropft und 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, in ca. 40 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit 2 N Salzsäure auf 2 eingestellt. Nach Lyophilisieren suspendiert man in 20 ml Ethanol, rührt 30 Minuten bei Raumtemperatur und saugt den Feststoff ab.

Ausbeute: 1.02 g (0.57 mmol)

45 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3**)

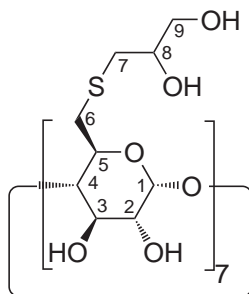
¹H-NMR: δ / ppm (D₂O + DSS) = 5.00 (d, ³J = 3.47 Hz, 7H, 1-H), 3.80 (m, 7H, 5-H), 3.74 (t, ³J = 9.46 Hz, 7H, 3-H), 3.51 (m, 14H, 2/4-H), 3.09 (m, 21H, 6a/7-H), 2.87 (m, 21H, 6b/8-H).

¹³C-NMR: δ / ppm (D₂O + DSS) = 102.95 (C-1), 85.05 (C-4), 73.68 (C-3), 73.30 (C-5), 72.93 (C-2), 39.52 (C-7), 33.27 (C-6), 30.98 (C-8).

Summenformel: C₅₆H₁₀₅O₂₈N₇S₇ * 7HCl * 6H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 35.17 %C, 6.53 %H, 5.13 %N

erhalten: 33.51 %C, 6.82 %H, 5.97 %N

Heptakis-[6-deoxy-6-(3-sulfanyl-propan-1,2-diol)]-β-cyclodextrin 43

2.00 g (1.05 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3** werden in 10 ml absolutem DMF unter Erwärmen gelöst. Zu der Lösung gibt man 2.56 ml (18.4 mmol) Triethylamin und 1.60 ml (18.4 mmol) Thioglycerin **28**. Die Reaktionsmischung wird 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt, auf etwa die Hälfte eingengt und aus 150 ml Ethanol ausgefällt. Der leicht gelbliche Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.63 g (0.92 mmol)

88 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3**)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.89 (d, 7H; 2-OH), 5.78 (s, 7H; 3-OH), 4.85 (m, 7H; 1-H), 4.68 (d, 7H; 8-OH), 4.50 (m, 7H; 9-OH), 3.79 (m, 7H; 5-H), 3.57 (m, 14H; 3/8-H), 4.43 (m, 7H; 4-H), 3.35 (m, 21H; 2/7-H), 3.02 (m, 7H; 6a-H), 2.88 (m, 7H; 6b-H), 2.69 (m, 7H; 9a-H), 2.54 (m, 7H; 9b-H).

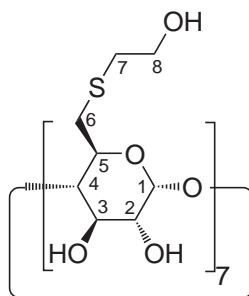
$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 102.1 (C-1), 84.2 (C-4), 72.6 (C-3), 72.3 (C-5), 71.4 (C-2), 64.6 (C-8), 56.1 (C-9), 36.7 (C-6), 18.6 (C-7).

MS (ESI): m/z (H_2O + DMSO): 1765.61 [M^+ + H]

Summenformel: $\text{C}_{63}\text{H}_{112}\text{O}_{42}\text{S}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 40.38 %C, 6.67 %H

erhalten: 40.81 %C, 7.06 %H

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-ethanol)]- β -cyclodextrin 45

2.50 g (1.31 mmol) Heptakis-[6-deoxy-6-iodo]- β -cyclodextrin **3** werden in 20 ml DMF gelöst und nacheinander mit 3.21 ml (23.0 mol) Triethylamin und 2.00 ml (23.0 mmol) 2-Mercaptoethanol versetzt. Die Mischung wird 3d bei 60°C gerührt, auf ca. die Hälfte des Volumens eingeeengt und aus Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, in Wasser gelöst, mittels Nanofiltration (500 Da) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 1.94 g (1.25 mmol)

95 % (bezogen auf Heptakis-[6-deoxy-6-iodo]- β -cyclodextrin **3**)

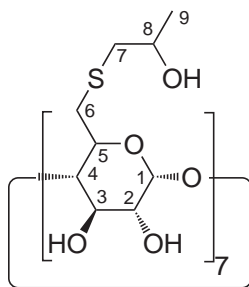
$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.85 (br, 14H, 2/3-OH), 4.87 (s, 7H, 1-H), 4.72 (br, 7H, 8-OH), 3.77 (s, 7H, 5-H), 3.59 (m, 7H, 2-H), 3.51 (m, 14H, 8-H), 3.39 (m, 14H, 3/4-H), 3.04 (m, 7H, 6a-H), 2.84 (m, 7H, 6b-H), 2.64 (m, 14H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 102.1 (C-1), 84.25(C-4), 72.6 (C-2), 72.3 (C-3), 71.4 (C-5), 60.8 (C-8), 35.3 (C-7), 33.3 (C-6).

Summenformel: $\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{O}_{35}\text{S}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 42.25 %C, 6.46 %H

erhalten: 42.67 %C, 7.27 %H

Heptakis-[6-deoxy-6-(3-sulfanyl-2-propanol)]- β -cyclodextrin 44

2.50 g (1.31 mmol) Heptakis-[6-deoxy-6-iodo]- β -cyclodextrin **3** werden in 20 ml DMF gelöst und nacheinander mit 3.21 ml (23.0 mol) Triethylamin und 2.02 ml (23.0 mmol) 1-Mercapto-2-propanol versetzt. Die Mischung wird 3d bei 60°C gerührt, auf ca. die Hälfte des Volumens eingeeengt und aus Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, in Wasser gelöst, mittels Nanofiltration (500 Da) gereinigt und lyophilisiert.

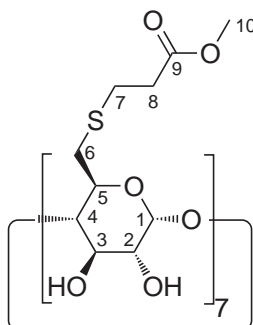
Ausbeute: 0.46 g (0.28 mmol)

21 % (bezogen auf Heptakis-[6-deoxy-6-iodo]- β -cyclodextrin **3**)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.84 (br, 14H, 2/3-OH), 4.86 (s, 7H, 1-H), 4.63 (br, 7H, 8-OH), 3.78 (m, 7H, 5-H), 3.70 (m, 7H, 8-H), 3.59 (m, 7H, 2-H), 3.37 (m, 14H, 3/4-H), 3.02 (m, 7H, 6a-H), 2.88 (m, 7H, 6b-H), 2.61 (m, 7H, 7a-H), 2.53 (m, 7H, 7b-H), 1.10 (d, 21H, 9-H).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 102.1 (C-1), 84.3 (C-4), 72.6 (C-2), 72.3 (C-3), 71.0 (C-5), 66.1 (C-8), 41.8 (C-7), 33.9 (C-6), 22.6 (C-9).

Heptakis-[6-deoxy-6-(3-sulfanyl-propionsäuremethylester)]- β -cyclodextrin



2.00 g (1.05 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)- β -cyclodextrin **3** werden in 15 ml DMF gelöst und mit 2.56 ml (18.4 mmol) Triethylamin und 2.21 g (18.4 mmol) Mercaptopropionsäure-methylester versetzt. Die Mischung wird 3 d bei 60 °C gerührt, etwa auf die Hälfte eingengt und aus Ethanol ausgefällt.

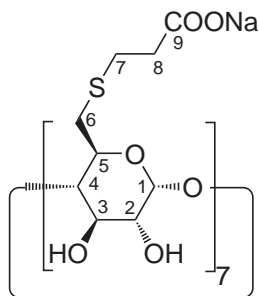
Ausbeute: 1.48 g (0.80 mmol)

76 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)- β -cyclodextrin **3**)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.93 (m, 7H, 2-OH), 5.83 (s, 7H, 3-OH), 4.87 (s, 7H, 1-H), 3.74 (t, $^3J=9.3\text{Hz}$, 7H, 5-H), 3.59 (m, 28H, 3/10-H), 3.35 (m, 14H, 2/4-H), 3.06 (m, 7H, 6a-H), 2.83 (m, 7H, 6b-H), 2.76 (t, $^3J=7.25\text{Hz}$, 14H, 7-H), 2.57 (t, $^3J=7.25\text{Hz}$, 14H, 8-H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 171.79 (C-9), 102.03 (C-1), 84.63 (C-4), 72.46 (C-3), 72.21 (C-2), 71.44 (C-5), 51.35 (C-9), 35.76 (C-8), 34.13 (C-6), 27.68 (C-7),

MS (ESI): m/z ($\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO}$) = 1855.64 $[\text{M}+\text{Li}]^+$, 1871.20 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 943.71 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$

Heptakis-[6-deoxy-6-(3-sulfanyl-propionsäure)]- β -cyclodextrin 47

1.48 g Heptakis-[6-deoxy-6-(S-mercapto-propionsäuremethylester)]- β -cyclodextrin (0.80 mmol) werden in 100 ml 1M NaOH gelöst und 18h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit 1M Salzsäure neutralisiert, nanofiltriert (Berghof BM-5) und lyophilisiert.

Ausbeute: 1.36 g (0.69 mmol)

86 % (bezogen auf Heptakis-[6-deoxy-6-(S-mercapto-propionsäure-methylester)]- β -cyclodextrin

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm ($\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$) = 4.97 (d, ^3J = 3.47 Hz, 7H, 1-H), 3.79 (t, ^3J = 8.83 Hz, 7H, 5-H), 3.74 (t, ^3J = 9.46 Hz, 7H, 3-H), 3.48 (dd, 7H, 2-H), 3.41 (t, ^3J = 9.3 Hz, 7H, 4-H), 3.05 (br, 7H, 6a-H), 2.77 (br, 21H, 6b/7-H), 2.43 (br, 14H, 8-H).

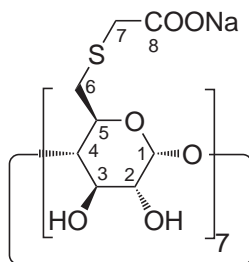
$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm ($\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$) = 172.09 (C-9), 101.64 (C-1), 84.11 (C-4), 73.46 (C-3), 72.51 (C-2), 71.96 (C-5), 37.32 (C-8), 34.00 (C-6), 29.32 (C-7).

MS (ESI): m/z (H_2O) = 897.97 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, 1773.38 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 873.41 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$, 1749.36 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Summenformel: $\text{C}_{63}\text{H}_{91}\text{O}_{42}\text{S}_7\text{Na}_7 \times 4\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 38.27% C, 5.04% H

erhalten: 38.59% C, 5.39% H

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-essigsäure)]-β-cyclodextrin 8

2.00 g Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)-β-cyclodextrin **3** (1.05 mmol) werden in 20 ml trockenem DMF gelöst. Zu der Lösung werden 2.56 ml Triethylamin (18.4 mmol) und 1.67 ml Thioglykolsäuremethylester (18.4 mmol) gegeben. Die Mischung wird 3 d bei 60°C gerührt. Man engt auf etwa die Hälfte des Volumens ein und fällt aus Ethanol aus. Der Niederschlag wird abgesaugt, im Luftstrom getrocknet, in 100 ml 1M NaOH gelöst und 18h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit 1M HCl neutralisiert, nanofiltriert (Berghof BM-5) und lyophilisiert.

Ausbeute: 1.48 g (0.82 mmol)

% (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)-β-cyclodextrin **3**)

¹H-NMR: δ / ppm (D₂O/DSS) = 4.95 (d, 7H, 1-*H*), 3.86 (m, 7H, 5-*H*), 3.75 (t, ³J = 9.46 Hz, 7H, 3-*H*), 3.49 (m, 14H, 2/4-*H*), 3.24 (m, 14H, 7-*H*), 3.02 (m, 7H, 6a-*H*), 2.81 (m, 7H, 6b-*H*).

¹³C-NMR: δ / ppm (D₂O/DSS) = 177.82 (C-8), 101.94 (C-1), 84.08 (C-4), 73.38 (C-), 72.59 (C-2), 72.12 (C-), 38.56 (C-7), 34.39 (C-6).

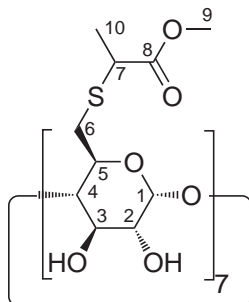
MS (ESI): *m/z* (H₂O) = 849.24 [M+2Na]²⁺, 1675.33 [M+Na]⁺, 825.72 [M-2H]²⁻

Summenformel: C₅₆H₇₇O₄₂S₇Na₇×8H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 34.46% C, 4.80% H

erhalten: 33,94% C, 4,65% H

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-propionsäure-methylester)]- β -cyclodextrin



2.00 g (1.05 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)- β -cyclodextrin **3** werden unter Erwärmen in 10 ml wasserfreiem DMF gelöst, mit 2.56 ml (18.4 mmol) Triethylamin und 2.21 g (18.4 mmol) Thiomilchsäuremethylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wird vier Tage bei 60 °C gerührt. Man lässt abkühlen und fällt aus ca. 200 ml Isopropanol aus. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.38 g (0.75 mmol)

71 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)- β -cyclodextrin **3**)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 5.94 (br, 1H, 2-OH), 5.83 (m, 1H, 3-OH), 4.85 (t, 1H, 1-H), 3.80 (br, 1H, 5-H), 3.62 (s, 3H, 9-H), 3.60 (m, 2H, 3/7-H), 3.42 (m, 1H, 4-H), 3.32 (m, 1H, 2-H), 3.13 (m, 1H, 6a-H), 2.94 (br, 1H, 6b-H), 1.32 (m, 3H, 10-H).

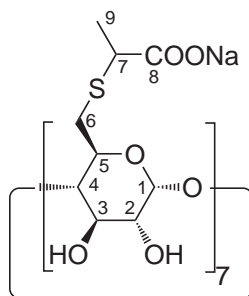
$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (DMSO- d_6) = 173.17 (C-8), 102.08 (C-1), 84.20 (C-4), 72.39 (C-3), 72.09 (C-2), 71.20 (C-5), 51.94 (C-9), 41.76 (C-7), 32.73 (C-6), 17.46 (C-10).

MS (ESI): m/z (H_2O + DMSO) = 1866.50 [M+H] $^+$

Summenformel: $\text{C}_{70}\text{H}_{112}\text{O}_{42}\text{S}_7$

CHN-Analyse: berechnet: 45.45 %C, 6.10 %H

erhalten: 45.22 %C, 6.72 %H

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-propionsäure)]- β -cyclodextrin 46

1.00 g (0.54 mmol) Heptakis-[6-deoxy-(6-S-thiomilchsäure-methylester)]- β -cyclodextrin werden in ca. 25 ml 1 M NaOH-Lösung suspendiert und 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisieren mit 1 M Salzsäure, Nanofiltration über eine BM-5 Membran (Ausschlussgrenze 500 Dalton) und Lyophilisieren erhält man das Produkt als weißen watteartigen Feststoff.

Ausbeute: 1.03 g (0.54 mmol)

100 % (bezogen auf Heptakis-[6-deoxy-(6-S-thiomilchsäure-methylester)]- β -cyclodextrin)

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 4.99 (m, 7H; 1-H), 3.85 (m, 7H; 5-H), 3.78 (m, 7H; 3-H), 3.46 (m, 21H; 2/4/7-H), 3.05 (m, 7H; 6a-H), 2.86 (m, 7H; 6b-H), 1.27 (d, $^3J = 7$ Hz, 21H; 9-H).

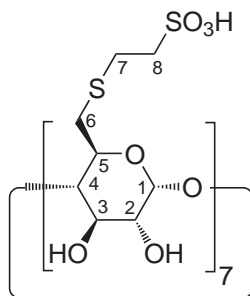
$^{13}\text{C-NMR}$: δ / ppm (D_2O) = 180.5 (C-8), 101.3 (C-1), 83.5 (C-4), 73.4 (C-3), 72.6 (C-2), 72.1 (C-5), 45.7 (C-7), 33.7 (C-6), 19.0 (C-9).

MS (ESI): m/z (H_2O) = 1749.45 $[\text{M-H}]^-$, 1773.44 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Summenformel: $\text{C}_{63}\text{H}_{91}\text{O}_{42}\text{S}_7\text{Na}_7 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

CHN-Analyse: berechnet: 36.59 %C, 5.31 %H

erhalten: 36.53 %C, 5.14 %H

Heptakis-[6-deoxy-6-(2-sulfanyl-ethansulfonsäure)]-β-cyclodextrin^[155] 48

1.33 g (0.70 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3** werden unter Erwärmen in 10 ml DMF gelöst, mit 1.70 ml (12.2 mmol) Triethylamin versetzt und die Lösung von 2.00 g (12.2 mmol) 2-Mercaptoethansulfonat Natriumsalz **30** zugegeben. Die Mischung wird für drei Tage auf 60 °C erhitzt, etwa auf die Hälfte eingengt und aus Aceton ausgefällt. Der weiße Niederschlag wird abgesaugt und mittels Nanofiltration gereinigt.

Ausbeute: 0.75 g (0.37 mmol)

53 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iod)-β-cyclodextrin **3**)

¹H-NMR: δ / ppm (D₂O) = 4.99 (d, ³J = 4 Hz, 7H; 1-H), 3.91 (m, 7H; 5-H), 3.80 (t, ³J = 10 Hz, 7H; 3-H), 3.48 (m, 14H; 2/4-H), 3.04 (m, 21H; 6a/8-H), 2.85 (m, 21H; 6b/7-H).

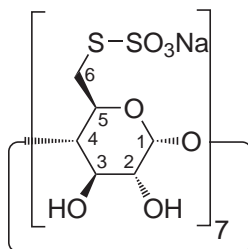
¹³C-NMR: δ / ppm (D₂O) = 101.2 (C-1), 83.3 (C-4), 72.9 (C-3), 72.1 (C-2), 71.4 (C-3), 51.4 (C-8), 33.4 (C-6), 27.3 (C-7).

MS (ESI): m/z (H₂O + DMSO) = 1102 [M+2H]²⁺

Summenformel: C₅₆H₉₁O₄₉S₁₄Na₇ * 8H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 29.22 %C, 4.68 %H

erhalten: 29.14 %C, 5.17 %H

Heptakis-[6-deoxy-6-(sulfanyl-sulfonyloxy natrium)]-β-Cyclodextrin 49

3.00 g (1.58 mmol) Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)-β-cyclodextrin **3** werden in 100 ml absolutem DMSO gelöst und mit 17.5 g (111 mmol) Natriumthiosulfat versetzt. Die Mischung wird 3d bei 70°C gerührt und aus Isopropanol ausgefällt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Isopropanol gewaschen und mittels Nanofiltration (500 Da) gereinigt.

Ausbeute: 2.80 g (1.43 mmol)

90 % (bezogen auf Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)-β-cyclodextrin **3**)

¹H-NMR: δ / ppm (D₂O) = 5.14 (d, ³J = 4 Hz, 1H, 1-H), 4.25 (m, 1H, 5-H), 3.76 (m, 2H, 2/3-H), 3.52 (m, 3H, 4/6a/6b-H).

¹³C-NMR: δ / ppm (D₂O) = 100.00 (C-1), 81.31 (C-4), 72.51 (C-5), 71.93 (C-2), 69.57 (C-3), 53.17 (C-6).

MS (ESI): *m/z* (H₂O) = 1003.7 [M+2Na]²⁺

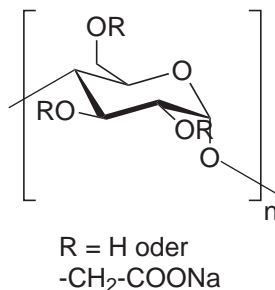
Summenformel: C₄₂H₆₃O₄₉S₁₄Na₇ * 12H₂O

CHN-Analyse: berechnet: 23.16 %C, 4.03 %H, 20.61 %S

erhalten: 22.97 %C, 3.98 %H, 20.51 %S

9.3 Synthesen der Stärkederivate

Carboxymethylstärke 62



Variante I (Synthese von 62a, 62b, 62c, 62d, 62j, 62k)

Zu der Lösung von Monochloressigsäure in ca. 50 ml Lösungsmittel werden nacheinander Stärke und frisch pulverisiertes Natriumhydroxid zugegeben. Die Mischung wird für die in Tabelle 39 angegebene Zeit bei der genannten Temperatur gerührt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Es wird erneut in Wasser gelöst, ultrafiltriert und lyophilisiert.

Variante II (Synthese von 62g, 62h, 62i)

Natriumhydroxid wird in Wasser gelöst, mit Isopropanol versetzt und auf die angegebene Temperatur erwärmt. Nach Zugabe der Stärke lässt man 1h quellen und gibt dann Monochloressigsäure zu. Nach beendeter Reaktion wird der Feststoff abgesaugt und mit Isopropanol gewaschen. Es wird erneut in Wasser gelöst, ultrafiltriert und lyophilisiert.

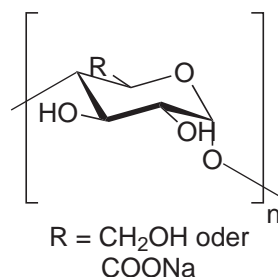
Variante III (Synthese von 62e und 62f)

Stärke wird in wässriger Natronlauge 2 Stunden bei RT gequollen und mit einer Lösung von Monochloressigsäure in Isopropanol versetzt. Nach beendeter Reaktion wird der Feststoff abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Es wird erneut in Wasser gelöst, ultrafiltriert und lyophilisiert.

¹H-NMR: δ / ppm (D₂O/D₂SO₄) = 5.53 (d, H1 α_s), 5.38 (d, H1 α_u), 4.86 (d, H1 β_s), 4.80 (d, H1 β_u), 4.59 (m, CH₂(3)), 4.51 (CH₂(2) α), 4.48 (CH₂(2) β), 4.35 (CH₂(6)), 3.65-4.05 (Glucosegrundgerüst)

Tabelle 39: Reaktionsbedingungen, Substitutionsgrad D_S und Ausbeute bei der Darstellung von CMS **62**

	T [°C]	n(MCA)/ n(AGU)	n(NaOH)/ n(AGU)	Reaktions- zeit [h]	Lösungs- mittel	Stärke	DS	Ausbeute
62a	25	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.33	72%
62b	35	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.12	20%
62c	45	3.5	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.10	82%
62d	25	6.0	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.35	71%
62e	25	6.0	5.0	24	Isopr/H ₂ O 10:1	Acros	1.12	69%
62f	25	6.0	5.0	24	Isopr/H ₂ O 20:1	Acros	0.80	69%
62g	40	1.4	3.0	2	Isopr/H ₂ O 6.25:1	Acros	0.79	87%
62h	40	1.4	3.0	2	Isopr/H ₂ O 6.25:1	Hylon VII	1.28	96%
62i	40	1.4	3.0	2	Isopr/H ₂ O 6.25:1	Avebe	0.81	94%
62j	25	2.0	5.0	24	Isopropanol	Acros	0.06	15%
62k	25	3.4	8.0	72	Methanol	Acros	0.04	60%

Oxidierter Stärken 63

5.00 getrocknete Stärke (30.8 mmol) werden in 200 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und 1h bei 95°C erhitzt, wobei die Stärke aufquillt. Mit 1M Natronlauge wird ein pH-Wert von 8.5 eingestellt und mit TEMPO (4 bzw. 8 mg/g Stärke) versetzt. Die jeweilige Menge Natriumhypochlorit (x mol) wird über einen Zeitraum von 2h in 2ml Portionen zugegeben. Während der Zugabe wird der pH-Wert mit Hilfe eines Dosimaten konstant bei 8.5 gehalten. Nach beendeter Zugabe werden langsam x/2 mol Natriumborhydrid zugegeben, um die

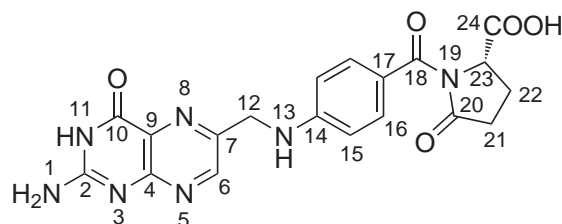
9.3 Synthesen der Stärkederivate

Carboxylgruppen zum Alkohol zu reduzieren. Die weitere Reinigung der Produkte erfolgt mittels kontinuierlicher Ultrafiltration gegen Wasser über eine 5 kDa Cellulosemembran und anschließendem Gefriertrocknen.

$^1\text{H-NMR}$: δ / ppm ($\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$) = 5.69 (s, H1'), 5.43 (d, H1a), 5.22 (m, H3'), 5.19 (m, H5'), 4.90 (d, H-4'), 4.79 (m, H1b), 4.61 (s, H2'), 3.17-4.05 (Glucosegrundgerüst)

Tabelle 40: Reaktionsbedingungen bei der Oxidation von Stärke

	Stärke	mg TEMPO / g Stärke	n(NaOCl)/ n(AGU)	D _S	Ausbeute
63a	Avebe	8	0.25	0.06	54%
63b	Avebe	8	0.50	0.24	69%
63c	Avebe	8	0.80	0.29	63%
63d	Avebe	8	1.00	0.37	75%
63e	Avebe	8	1.20	0.48	71%
63f	Avebe	8	1.40	0.51	64%
63g	Avebe	8	1.60	0.63	54%
63h	Avebe	8	1.80	0.72	69%
63i	Avebe	8	2.00	0.72	89%
63j	Avebe	8	3.00	0.70	60%
63k	Avebe	8	4.00	0.70	75%
63l	Avebe	4	0.50	0.23	100%
63m	Avebe	4	0.8	0.24	74%
63n	Avebe	4	1.0	0.29	96%
63o	Wachsmaisstärke	8	1.08	0.32	74%
63p	Maisstärke	8	1.0	0.31	85%
63q	Kartoffelstärke	8	1.0	0.29	73%
63r	Acros	8	1.0	0.25	70%
63s	Hylon VII	8	1.0	0.23	64%

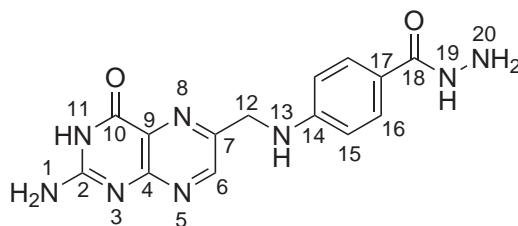
Pyrofolsäure 65^[278]

25 g Folsäure (56.5 mmol) werden in 250 ml wasserfreiem THF suspendiert und auf 2°C gekühlt. Zu der abgekühlten Suspension werden 64 ml Trifluoressigsäureanhydrid (0.453 mol) so zugetropft, dass die Temperatur nicht über 8°C steigt. Die Mischung wird 6h im Eisbad gerührt, und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Nach vorsichtigem Entfernen des Lösungsmittels ($T < 40^\circ\text{C}$), wird aus 1.5 l Ether ausgefällt und 2 h bei RT gerührt um die Fällung zu vervollständigen. Das gelbe Produkt wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet.

Ausbeute: 27.3 g (52.5 mmol)

93 % (bezogen auf Folsäure 64)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO- d_6) = 8.67 (s, 1H, 6-H), 7.65 (m, 2H, 16-H), 7.58 (d, 2H, 15-H), 5.12 (m, 2H, 12-H), 4.69 (m, 1H, 23-H), 2.52-1.99 (m, 4H, 21/22-H).

Pteroylhydrazid 66^[278]

58.3 ml Hydrazin Monohydrat (1.20 mol) werden in einem braunen Kolben vorgelegt und portionsweise mit 5.00 g (9.63 mmol) Pyrofolsäure 65 versetzt. Im

9.3 Synthesen der Stärkederivate

Reaktionsverlauf entsteht eine orangefarbene Lösung, die 20h bei RT gerührt wird. Man fällt aus etwa 400 ml Methanol aus und rührt die Mischung zur Vervollständigung der Fällung weitere 4h. Der orange Feststoff wird abgesaugt, mit Methanol und Diethylether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Das Produkt wird lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

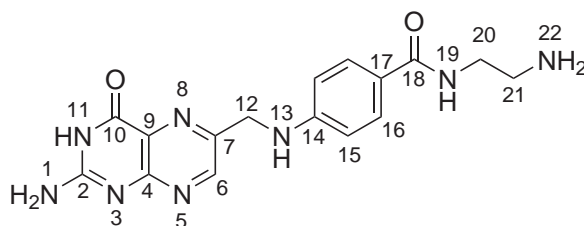
Ausbeute: 2.58 g (7.91 mmol)

82 % (bezogen auf Pyrofolensäure **65**)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 9.35 (s, 1H, 19-H), 8.61 (s, 1H, 6-H), 7.56 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, 16-H), 6.90 (m, 3H, 13/20-H), 6.61 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, 15-H), 4.45 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H, 12-H).

MS (ESI): m/z (DMSO/H₂O) = 327.46 [M+H]⁺

Pteroylamidethylamin **67**



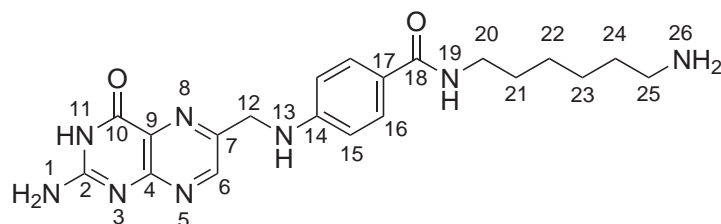
10.6 g (20.4 mmol) Pyrofolensäure **65** werden portionsweise zu 171 ml (2.55 mol) gegeben. Es entsteht eine klare orange-rote Lösung, die 24h bei RT gerührt wird. Die Reaktionsmischung wird aus 500 ml Aceton ausgefällt. Der gelbe Niederschlag wird mit Ether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Das Produkt wird lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Ausbeute: 6.52 g (18.4 mmol)

90 % (bezogen auf Pyrofolensäure **65**)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 8.59 (s, 1H, 6-H), 7.00 (m, 1H, 19-H), 7.59 (d, 2H, 15-H), 7.05 (br, 2H, 22-H), 6.85 (m, 1H, 13-H), 6.61 (d, 2H, 16-H), 4.45 (d, 2H, 12-H), 2.64 (m, 4H, 20/21-H).

MS (ESI): m/z (DMSO/MeOH) = 355.41 [M+H]⁺

Pteroylamidhexylamin 68

89.5 g (770 mmol) 1,6-Diaminohexan werden in 500 ml DMSO gelöst und unter Lichtausschluss portionsweise mit Pyrofolensäure **65** (20.00 g, 38.5 mmol) versetzt. Es entsteht eine klare orange-rote Lösung, die 24h bei RT gerührt wird. Die Reaktionsmischung wird auf ca. 60 ml eingengt und aus 500 ml Aceton ausgefällt. Der orange Niederschlag wird mit Ether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Das Produkt wird lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

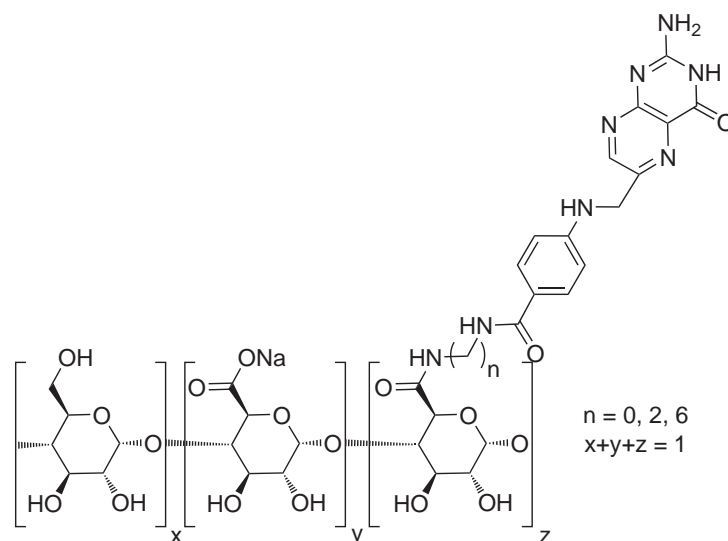
Ausbeute: 14.0 g (34.2 mmol)

89 % (bezogen auf Pyrofolensäure **65**)

¹H-NMR: δ / ppm (DMSO-d₆) = 8.58 (s, 1H, 6-H), 7.98 (m, 1H, 19-H), 7.59 (d, 2H, 15-H), 7.13 (br, 2H, 22-H), 6.84 (m, 1H, 13-H), 6.62 (d, 2H, 16-H), 4.45 (d, 2H, 12-H), 2.62 (t, 2H, 20-H), 1.48-1.27 (m, 10H, 21/22/23/24/25-H).

MS (ESI): m/z (DMSO/H₂O) = 411.51 [M+H]⁺, 206.47 [M+2H]²⁺

Stärken mit zellspezifischen Liganden



Oxydierte Stärke (freie Säure) **63** wird in DMSO bei 50°C gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Man lässt wieder auf Raumtemperatur abkühlen und gibt unter Lichtausschluss den Ligand und äquimolare Mengen HOBt und DCC zu. Die Reaktionsmischung wird 24h bei Raumtemperatur gerührt, mit Natronlauge verdünnt und unter Lichtausschluss gegen Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknen erhält man die Produkte als gelbe bis braune Feststoffe.

Tabelle 41: Synthese von Stärken mit Pteroylhydrazid **66** als Ligand

	n(Ligand)/n(COOH)	Massenanteil	DS
		Ligand [%]	(Ligand)
69a	0.2	5.51	0.115
69b	0.5	5.34	0.105
69c	1.0	8.60	0.208

Tabelle 42: Synthese von Stärken mit Pteroylamidethylamin **67** als Ligand

	n(Ligand)/n(COOH)	Massenanteil	DS
		Ligand [%]	(Ligand)
81a	0.2	0.85	0.015
81b	0.3	1.38	0.026
81c	0.5	1.85	0.036
81d	1.0	1.57	0.029

Tabelle 43: Synthese von Stärken mit Pteroylamidhexylamin **68** als Ligand

	n(Ligand)/n(COOH)	Massenanteil Ligand [%]	DS (Ligand)
82a	0.1	0.46	0.008
82b	0.2	1.25	0.023
82c	0.3	3.82	0.077
82d	0.5	9.05	0.250
82e	1.0	-	-

Bildung von Nanoplexen

Zur Bildung von Nanoplexen wurden die molekularen Massen pro Ladung berechnet. Die beiden Komponenten wurden einzeln in Wasser oder PBS gelöst und unter Rühren bei 15000 rpm tropfenweise gemischt. Nach beendeter Zugabe wurde 30 s weitergerührt. Die Partikel wurden in wässriger Lösung in braunen Glasgefäßen aufbewahrt oder unter Lichtausschluss lyophilisiert und danach als Feststoff im Dunkeln gelagert.

10 Literatur

- [1] A. Villiers, *Compt. Rend.* **1891**, 112, 536.
- [2] F. Schardinger, *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* **1903**, 6, 865.
- [3] J. A. DePinto, L. L. Campbell, *Biochemistry* **1968**, 7, 121.
- [4] F. C. Armbruster, M. Abdullah, (CPC International Inc.). US 3652398, **1972**.
- [5] H. Bender, *Archives of microbiology* **1977**, 111, 271.
- [6] H. Bender, *Carbohydrate Research* **1990**, 206, 257.
- [7] F. Cramer, F. M. Henglein, *Chem. Ber.* **1958**, 91, 308.
- [8] T. Fujiwara, N. Tanaka, S. Kobayashi, *Chem. Lett.* **1990**, 5, 739.
- [9] M. Sakurai, M. Kitagawa, Y. Inoue, R. Chujo, *Carbohydr. Res.* **1990**, 198, 181.
- [10] C. Betzel, W. Saenger, B. E. Hingerty, G. M. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7545.
- [11] D. French, M. L. Levine, J. H. Pazur, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 356.
- [12] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743.
- [13] K. Lindner, W. Saenger, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 738.
- [14] K. Lindner, W. Saenger, *Carbohydrate Research* **1982**, 99, 103.
- [15] L. Liu, Q.-X. Guo, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, 42, 1.
- [16] S. Yasuda, K. Miyake, J. Sumaoka, M. Komiyama, H. Shigekawa, *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers, Short Notes & Review Papers* **1999**, 38, 3888.
- [17] L. Liu, K.-S. Song, X.-S. Li, Q.-X. Guo, *J. of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2001**, 40, 35.
- [18] M. Singh, R. Sharma, U. C. Banerjee, *Biotechnology advances* **2002**, 20, 341.
- [19] M. Del Valle, *Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **2004**, 39, 1033.
- [20] G. Wenz, *Clin. Drug Invest.* **2000**, 19, Suppl. 2, 21.
- [21] A. Steffen, C. Thiele, S. Tietze, C. Strassnig, A. Kämper, T. Lengauer, G. Wenz, J. Apostolakis, *Chemistry - A European Journal* **2007**, 13, 6801.

- [22] C. Pean, C. Creminon, A. Wijkhuisen, J. Grassi, P. Guenot, P. Jehan, J.-P. Dalbiez, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 853.
- [23] C. Pean, A. Wijkhuisen, F. Djedaini-Pilard, J. Fischer, S. Doly, M. Conrath, J.-Y. Couraud, J. Grassi, B. Perly, C. Creminon, *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research* **2001**, 1541, 150.
- [24] M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nature Reviews: Drug Discovery* **2004**, 3, 1023.
- [25] V. J. Stella, R. A. Rajewski, *Pharmaceutical Research* **1997**, 14, 556.
- [26] H. Matsuda, H. Arima, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36, 81.
- [27] K. Kano, H. Kitagishi, T. Mabuchi, M. Kodera, S. Hirota, *Chem. Asian. J.* **2006**, 1, 358.
- [28] R. Koukielekolo, V. Desseaux, Y. Moreau, G. Marchis-Mouren, S. Marius, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 841.
- [29] C. Desiderio, S. Fanali, *Journal of Chromatography, A* **1995**, 716, 183.
- [30] P. Mikus, D. Kaniansky, S. Fanali, *Electrophoresis* **2001**, 22, 470.
- [31] X. Lu, Y. Chen, *J. Chromatogr. A* **2002**, 955, 133.
- [32] A. R. Hedges, *Chemical Reviews* **1998**, 98, 2035.
- [33] F. W. Lichtenthaler, S. Immel, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 2045.
- [34] A. Müller, G. Wenz, *Chemistry--A European Journal* **2007**, 13, 2218.
- [35] G. Wenz, B.-H. Han, A. Müller, *Chem. Rev.* **2006**.
- [36] M. Bastos, L. E. Briggner, I. Shehatta, I. Wadso, *Journal of Chemical Thermodynamics* **1990**, 22, 1181.
- [37] B. Keller, Dissertation, Johannes Gutenberg Universität (Mainz), **1994**.
- [38] C. Thiele, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes (Saarbrücken), **2006**.
- [39] G. Castronuovo, V. Elia, F. Velleca, G. Viscardi, *Thermochimica Acta* **1997**, 292, 31.
- [40] S. Andini, G. Castronuovo, V. Elia, E. Gallotta, *Carbohydrate Research* **1991**, 217, 87.
- [41] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, R. F. Johnson, D. A. Laufer, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 1869.

- [42] E. E. Tucker, S. D. Christian, *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 1942.
- [43] T. Höfler, G. Wenz, *J. Incl. Phenom.* **1996**, *25*, 81.
- [44] G. M. Escandar, M. A. Boldrini, *Talanta* **2001**, *53*, 851.
- [45] R. Carpignano, M. Marzona, E. Cattaneo, S. Quaranta, *Analytica Chimica Acta* **1997**, *348*, 489.
- [46] A. Gafni, Y. Cohen, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 120.
- [47] H. J. Shu, C. M. Zeng, C. Wang, D. F. Covey, C. F. Zorumski, S. Mennerick, *British Journal of Pharmacology* **2007**, *150*, 164.
- [48] J. Lelievre, J. A. Lewis, K. Marsden, *Carbohydrate Research* **1986**, *153*, 195.
- [49] Z. C. Ma, S. M. Zhao, K. Cheng, X. F. Zhang, X. J. Xu, L. N. Zhang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *104*, 3124.
- [50] D. J. Manners, *Carbohydr. Polym.* **1989**, *11*, 87.
- [51] J. Falbe, M. Regitz, *Römpp Chemie Lexikon A-Z*, 9., erweiterte und neu bearbeitete Ausgabe ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [52] M. D. Teli, N. G. Waghmare, *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 492.
- [53] M. Celik, M. Sacak, *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *86*, 53.
- [54] P. Chen, W. Zhang, W. Luo, Y. Fang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 1748.
- [55] D. Meyer, *Stärke, Schriftenreihe des Fonds der Chemischen Industrie* **1986**, *25*, 5.
- [56] A. A. Ragheb, H. S. El-Sayiad, A. Hebeish, *Starch/Stärke* **1997**, *49*, 238.
- [57] T. Heinze, A. Koschella, *Macromol. Symp-* **2005**, *223*, 13.
- [58] P. D. Pandya, N. K. Patel, V. K. Sinha, *International Journal of Polymeric Materials* **2002**, *51*, 1081.
- [59] Z. Xiaodong, L. Xin, L. Wenying, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *89*, 3016.
- [60] B. Volkert, F. Loth, W. Lazik, J. Engelhardt, *Starch/Stärke* **2004**, *56*, 307.
- [61] W. Lazik, T. Heinze, K. Pfeiffer, G. Albrecht, P. Mischnik, **2002**.
- [62] S. I. Elhinnawy, A. Fahmy, H. M. Elsaied, A. F. Elshirbeeney, K. M. Elsayh, *Starke* **1982**, *34*, 65.
- [63] E. T. Hjermsstad, (Kcinep and Drof, Inc.). US 3706731, **1972**.
- [64] E. T. Hjermsstad, O. J. Rajtora, (Penick and Ford, Ltd.). DE 2109015, **1972**.

- [65] J. Boldt, *Anesthesia and Analgesia* **2009**, *108*, 1574.
- [66] D. Grull, U. Stifter, (Sudzucker A.-G. Mannheim/ochsenfurt, Germany). EP 1075839, **2001**.
- [67] J. M. I. V. Mishler, *Pharmacology of Hydroxyethyl Starch: Use in Therapy and Blood Banking*, **1982**.
- [68] A. M. Ehrly, H. Landgraf, K. Saeger-Lorenz, S. Hasse, *Infusionstherapie und Klinische Ernaehrung - Forschung und Praxis* **1979**, *6*, 331.
- [69] K. Holzer, (Laevosan G.m.b.H. und Co. K.-G., Austria). DE 2814032, **1978**.
- [70] W. Banks, C. T. Greenwood, D. D. Muir, *Staerke* **1972**, *24*, 181.
- [71] S. A. Kozek-Langenecker, C. Jungheinrich, W. Sauermann, P. Van der Linden, *Anesthesia and Analgesia* **2008**, *107*, 382.
- [72] W. Jarowenko, (National Starch and Chemical Corp., USA). GB 2029431, **1980**.
- [73] A. N. Jyothi, S. N. Moorthy, K. N. Rajasekharan, *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1964.
- [74] R. A. De Graaf, L. P. B. M. Janssen, *Adv. Polym. Technol.* **2003**, *22*, 56.
- [75] J. Pal, R. S. Singhal, P. R. Kulkarni, *Carbohydr. Polym.* **2000**, *43*, 155.
- [76] W. Vorweg, S. Radosta, A. Kroger, *Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003* **2003**, CELL.
- [77] B. Zamek, (Bernhard Zamek GmbH & Co. KG, Germany). DE 202006008901, **2006**.
- [78] B. Boursier, C. Quettier, D. Lesage, (Roquette Freres, Fr.). FR 2876003, **2006**.
- [79] T. J. Armstrong, C. Sullivan, (Grain Processing Corporation, USA). US 2005191387, **2005**.
- [80] S. Schellhaass, L. Skarra, J. Yasosky, R. C. Hoseney, (USA). US 2004091596, **2004**.
- [81] R. Jeffcoat, W. R. Mason, J. L. Emling, C.-W. Chiu, (National Starch and Chemical Investment Holding Corporation, USA). US 6488980, **2002**.
- [82] G. Graefe, *Starch/Staerke* **1951**, *3*, 99.
- [83] I. Koubek, *Starch/Staerke* **1972**, *26*, 81.

-
- [84] W. Jetten, E. J. Stamhius, G. E. Joosten, *Starch/Staerke* **1980**, *32*, 364.
- [85] G. E. Joosten, E. J. Stamhius, W. A. Roelfsema, *Starch/Staerke* **1982**, *34*, 402.
- [86] W. Nierle, *Starch/Staerke* **1969**, *21*, 13.
- [87] W. Bergthaller, *Starch/Staerke* **1971**, *23*, 73.
- [88] J. F. Bishop, J. Dewar, G. C. Toner, J. Smith, M. H. N. Tattersall, I. N. Olver, S. Ackland, I. Kennedy, D. Goldstein, H. Gurney, E. Walpole, J. Levi, J. Stephenson, R. Canetta, G. Taxol Investigational Trials, *Journal of Clinical Oncology* **1999**, *17*, 2355.
- [89] C. N. Sternberg, P. H. M. de Mulder, J. H. Schornagel, C. Theodore, S. D. Fossa, A. T. van Oosterom, F. Witjes, M. Spina, C. J. van Groeningen, C. de Balincourt, L. Collette, G. European Org Res Treatment Canc, *Journal of Clinical Oncology* **2001**, *19*, 2638.
- [90] J. Picus, M. Schultz, *Seminars in Oncology* **1999**, *26*, 14.
- [91] J. H. Yoon, J. A. Park, E. K. Kim, H. J. Kang, H. Y. Shin, H. S. Ahn, *Journal of Korean Medical Science* **2009**, *24*, 281.
- [92] M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert, *Pharmazie* **1989**, *44*, 585.
- [93] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 631.
- [94] H. Maeda, K. Greish, J. Fang, *Advances in Polymer Science* **2006**, *193*, 103.
- [95] R. Satchi-Fainaro, R. Duncan, C. M. Barnes, *Advances in Polymer Science* **2006**, *193*, 1.
- [96] M. J. Vicent, R. Duncan, *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 39.
- [97] D. B. Shenoy, J. S. Chawla, M. M. Amiji, (Eds.: C. T. Laurencin, E. A. Botchwey), Materials Research Society, Boston, MA, **2004**, pp. 369.
- [98] L. Illum, S. S. Davis, R. H. Muller, E. Mak, P. West, *Life Sciences* **1987**, *40*, 367.
- [99] A. Besheer, J. Vogel, D. Glanz, J. Kressler, T. Groth, K. Mader, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 407.
- [100] D. E. Owens, N. A. Peppas, *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307*, 93.

- [101] P. Somasundaran, S. Chakraborty, Q. Qiang, P. Deo, J. Wang, R. Zhang, *Journal of Cosmetic Science* **2004**, *55*, S1.
- [102] S.-Y. Jeong, I.-C. Kwon, H. Chung, (Korea Institute of Science and Technology, S. Korea). WO 2002064166, **2002**.
- [103] H. Chung, S. Y. Jeong, I. C. Kwon, J. H. Park, J. W. Chung, Y. M. Kim, I.-H. Lee, (Korea Institute of Science and Technology, S. Korea; Daehwa Pharm. Co., Ltd.). WO 2003022265, **2003**.
- [104] H. Chung, S.-Y. Jeong, I.-C. Kwon, Y.-T. Park, I.-H. Lee, (Korea Institute of Science and Technology, S. Korea). WO 2004009122, **2004**.
- [105] C. D. Wright, (Novavax, Inc., USA). WO 9623409, **1996**.
- [106] M. J. Alonso Fernandez, P. Calvo Salve, C. Remunan Lopes, J. L. Vila Jato, (Universidad de Santiago de Compostela, Spain). WO 9804244, **1998**.
- [107] P. J. Stevens, M. Sekido, R. J. Lee, *Pharmaceutical Research* **2004**, *21*, 2153.
- [108] E. C. Unger, V. Ramaswami, R. Zutshi, R. Y. Labell, E. A. Pigman, B02s, (USA). US 2004247624, **2004**.
- [109] H. S. Yoo, T. G. Park, *Journal of Controlled Release* **2004**, *100*, 247.
- [110] M. Herold, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2003**, *204*, 770.
- [111] D. Mueller-Schulte, (Magnamedics G.m.b.H., Germany). Wo 2005042142, **2005**.
- [112] A. McRae-McFarland, A. B. Dahlstrom, D. L. Dillon, T. R. Tice, D. W. Mason, (Southern Research Inst., USA; Edens, Charles R.). WO 9600537, **1996**.
- [113] T. Kissel, A. Breitenbach, T. Jung, W. Kamm, (Germany). DE 19839515, **2000**.
- [114] M. K. Chourasia, S. K. Jain, *Drug Delivery* **2004**, *11*, 129.
- [115] S. H. Kim, J. H. Jeong, K. W. Chun, T. G. Park, *Langmuir* **2005**, *21*, 8852.
- [116] R. Mueller, M. Lueck, J. Kreuter, (DDS Drug Delivery Service Gesellschaft zur Foerderung der Forschung in pharmazeutischer Technologie und Biopharmazie m.b.H., Germany). DE 19745950, **1999**.

- [117] I. Kwon, I.-S. Kim, S. Jeong, H. Chung, Y. Cho, Y. Son, C. Park, S. B. Seo, (Korea Institute of Science and Technology, S. Korea; Jakwang Co., Ltd.). WO 2003015827, **2003**.
- [118] A. Bernkop-Schnuerch, H. Schuhbauer, (Degussa A.-G., Germany). DE 10305661, **2004**.
- [119] J.-H. Kim, Y.-S. Kim, S. Kim, J. H. Park, K. Kim, K. Choi, H. Chung, S. Y. Jeong, R.-W. Park, I.-S. Kim, I. C. Kwon, *Journal of Controlled Release* **2006**, *111*, 228.
- [120] A. M. Reisenauer, *Biochem. J.* **1990**, *267*, 249.
- [121] K. B. Chalasani, P. V. Diwan, K. V. Raghavan, G. J. Russell-Jones, S. K. Jain, K. K. Rao, (Council of Scientific and Industrial Research, India). WO 2002067995, **2002**.
- [122] R. Goldshtein, (Israel). Us 2003129239, **2003**.
- [123] K. Sommermeyer, (Supramol Parenteral Colloids G.m.b.H., Germany). DE 10135694, **2003**.
- [124] R. Goldshtein, I. Jaffe, B. Tulbovich, (Solubest Ltd., Israel). US 2005249786, **2005**.
- [125] R. Goldshtein, R. Kamburg, G. Ratner, M. Kopylov, I. Zelkind, V. Goldshtein, O. Skylarsky, B. Tulbovich, E. Stern, (Solubest Ltd., Israel). US 2005191359, **2005**.
- [126] M. K. Chourasia, S. K. Jain, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **2003**, *6*, 33.
- [127] J. S. Rodrigues, N. S. Santos-Magalhaes, L. C. B. B. Coelho, P. Couvreur, G. Ponchel, R. Gref, *Journal of Controlled Release* **2003**, *92*, 103.
- [128] C. Kopsel, J. Feldthusen Jensen, K. Kramer, (BASF A.-G., Germany). WO 2006000347, **2006**.
- [129] D. Kirpotin, D. C. F. Chan, P. Bunn, (Kirpotin, Dmitri, USA; Chan, Daniel C. F.; Bunn, Paul). WO 9814180, **1998**.
- [130] Y. Lu, P. S. Low, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 675.
- [131] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396.
- [132] H. S. Yoo, T. G. Park, B02z, *J. Control. Release* **2004**, *100*, 247.

- [133] S. H. Kim, J. H. Jeong, K. W. Chun, T. G. Park, B03z, *Langmuir* **2005**, *21*, 8852.
- [134] D. Pan, J. L. Turner, K. L. Wooley, *Chem. Commun.* **2003**, 2400.
- [135] S. Nayak, H. Lee, J. Chmielewski, A. L. Lyon, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10258.
- [136] U. Gawlick, D. M. Kranz, V. D. Schepkin, E. J. Roy, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 1137.
- [137] G. Zheng, J. Chen, H. Li, J. D. Glickson, *PNAS* **2005**, *102*, 11757.
- [138] P. Caliceti, S. Salmaso, A. Semenzato, T. Carofiglio, R. Fornasier, M. Fermeglia, M. Ferrone, S. Pricl, *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 899.
- [139] S. Salmaso, A. Semenzato, P. Caliceti, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 997.
- [140] A. Quintana, E. Raczka, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Majoros, A. K. Patri, T. Thomas, J. Mule, J. R. Baker, Jr., *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 1310.
- [141] R. J. Lee, P. S. Low, *Biochim. Biophys Acta* **1995**, *1233*, 134.
- [142] R. J. Lee, P. S. Low, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 3198.
- [143] C. P. Leamon, J. A. Reddy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1127.
- [144] E. K. Park, S. B. Lee, Y. M. Lee, *Biomaterials* **2004**, *26*, 1053.
- [145] W. Guo, R. J. Lee, *AAPS Pharmsci* **1999**, *1*, 1.
- [146] G. Wenz, C. Strassnig, C. Thiele, A. Engelke, B. Morgenstern, K. Hegetschweiler, *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 7202.
- [147] T. Höfler, G. Wenz, *J. Incl. Phenom.* **1996**, *25*, 81.
- [148] H. Yamamura, K. Fujita, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1991**, *39*, 2505.
- [149] W. Lautsch, R. Wiechert, H. Lehmann, *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere* **1954**, *135*, 134.
- [150] F. Cramer, G. Mackense, *Chemische Berichte-Recueil* **1970**, *103*, 2138.
- [151] R. Breslow, P. Bovy, C. L. Hersh, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 2115.
- [152] A. Gadelle, J. Defaye, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1991**, *30*, 78.
- [153] P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903.

- [154] V. A. Karginov, S. M. Hecht, N. Fahmi, K. Aliben, WO 2006/001844, **2006**.
- [155] F. Guillo, B. Hamelin, L. Jullien, J. Canceill, J.-M. Lehn, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, *132*, 587.
- [156] L. D. Melton, K. N. Slessor, *Carbohydrate Research* **1971**, *18*, 29.
- [157] S. E. Brown, J. H. Coates, D. R. Coghlan, C. J. Easton, S. J. van Ek, W. Janowski, A. Lepore, S. F. Lincoln, Y. Luo, B. L. May, D. S. Schiesser, P. Wang, M. L. Williams, *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 953.
- [158] N. Zhong, H.-S. Byun, R. Bittman, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 2919.
- [159] J. Defaye, S. Crouzy, N. Evrard, H. Law, WO99/614583 99/614583, **1999**.
- [160] R. Fuchs, N. Habermann, P. Klüfers, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 895.
- [161] S. Hanessian, A. Benalil, C. Lafreriere, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4786.
- [162] B. Ekberg, L. I. Andersson, K. Mosbach, *Carbohydrate Research* **1989**, *192*, 111.
- [163] C. Straßnig, Dissertation, Universität des Saarlandes (Saarbrücken), **2007**.
- [164] I. Tabushi, T. Nabeshima, K. Fujita, A. Matsunaga, T. Imoto, *Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 2638.
- [165] R. Breslow, J. W. Canary, M. Varney, S. T. Waddell, D. Yang, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 5212.
- [166] I. Tabushi, K. Yamamura, T. Nabeshima, *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 5267.
- [167] I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, L. C. Yuan, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 711.
- [168] P. Sinay, A. J. Pearce, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610.
- [169] O. Bistri, P. Sinay, M. Sollogoub, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 7757.
- [170] T. Lecourt, A. Herault, A. J. Pearce, M. Sollogoub, P. Sinay, *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*, 2960.
- [171] O. Bistri, P. Sinay, M. Sollogoub, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 4137.
- [172] C. H. Takimoto, J. Wright, S. G. Arbuck, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1400*, 107.
- [173] B. B. Lundberg, *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, *13*, 453.

- [174] N. J. Rahier, B. M. Eisenhauer, R. Gao, S. H. Jones, S. M. Hecht, *Organic letters* **2004**, *6*, 321.
- [175] T. G. Burke, A. E. Staubus, A. K. Mishra, H. Malak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8318.
- [176] B. Ertl, P. Platzner, M. Wirth, F. Gabor, *J. Controlled Release* **1999**, *61*, 305.
- [177] S. M. Sugarman, Y. Zou, K. Wasan, R. Poirot, R. Kumi, S. Reddy, R. Perez-Soler, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *37*, 531.
- [178] R. Cortesi, E. Esposito, A. Maietti, E. Menegatti, C. Nastruzzi, *Int. J. Pharm.* **1997**, *159*, 95.
- [179] J. Kang, V. Kumar, D. Yang, P. R. Chowdhury, R. J. Hohl, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *15*, 163.
- [180] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470.
- [181] G. Jones, P. Willet, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727.
- [182] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739.
- [183] T. J. A. Ewing, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1175.
- [184] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639.
- [185] G. Klebe, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 580.
- [186] M. R. de Jong, R. M. A. Knegtel, P. D. J. Grootenhuis, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *114*, 1046.
- [187] A. Steffen, Dissertation, Universität des Saarlandes (Saarbrücken), **2008**.
- [188] S. Ebel, A. Karger, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1989**, *6*, 301.
- [189] A. Ueno, Q. Chen, I. Suzuki, T. Osa, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1650.
- [190] K. Hamasaki, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuki, T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5035.
- [191] S. E. Brown, J. H. Caotes, S. F. Lincoln, D. R. Coghlan, C. J. Easton, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1991**, *87*, 2699.
- [192] M. P. Eastman, B. Freiha, C. C. Hsu, K. C. Lum, C. Allen Chang, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1953.

- [193] M. L. Vasquez, C. M. Franco, A. Cepeda, P. Prognon, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta* **1992**, *269*, 239.
- [194] D. J. Jobe, R. E. Verrall, R. Palepu, V. C. Reinsborough, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 3582.
- [195] J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6927.
- [196] K. A. Connors, *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 1325.
- [197] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875.
- [198] T. Kitae, T. Nakayama, K. Kano, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry* **1998**, 207.
- [199] M. Rekharsky, H. Yamamura, M. Kawai, Y. Inoue, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 5360.
- [200] F. Guillo, B. Hamelin, L. Jullien, J. Canceill, J. M. Lehn, L. Derobertis, H. Driguez, *Bulletin De La Societe Chimique De France* **1995**, *132*, 857.
- [201] J. M. Adam, D. J. Bennett, A. Bom, J. K. Clark, H. Feilden, E. J. Hutchinson, R. Palin, A. Prosser, D. C. Rees, G. M. Rosair, D. Stevenson, G. J. Tarver, M.-Q. Zhang, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1806.
- [202] B. Hamelin, L. Jullien, C. Derouet, C. Herve du Penhoat, P. Berthault, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 8438.
- [203] L. Jullien, H. Cottet, B. Hamelin, A. Jardy, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 10866.
- [204] V. Zia, R. A. Rajewski, V. J. Stella, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 667.
- [205] H.-J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 263.
- [206] F. Hacket, S. Simova, H. Schneider, *Journal of Physical Organic Chemistry* **2001**, *14*, 159.
- [207] W. Chen, C.-e. Chang, M. K. Gilson, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 4675.
- [208] H.-J. Schneider, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 3924.
- [209] G. Wenz, C. Strassnig, C. Thiele, A. Engelke, B. Morgenstern, K. Hegetschweiler, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7202.
- [210] E. Mavridou, K. Giannakopoulou, K. Iliadou, N. Mourtzis, C. Angelidou, (Ethniko Kentro Erevnas Fysikon Epistimon "Dimokritos", Greece). GR 1004952, **2005**.

- [211] N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, I. M. Mavridis, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 125.
- [212] K. Kano, Y. Ishida, K. Kitagawa, M. Yasuda, M. Watanabe, *Chem. Asian. J.* **2007**, *2*, 1305.
- [213] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, *J. Incl. Phenom.* **1989**, *7*, 537.
- [214] M. Sakurai, M. Kitagawa, H. Hoshi, *Carbohydrate Research* **1990**, *198*, 181.
- [215] A. Botsi, K. Yannakopoulou, E. Hadjoudis, J. Waite, *Carbohydrate Research* **1996**, *283*, 1.
- [216] X.-S. Li, L. Liu, T.-W. Mu, Q.-X. Guo, *Monatshefte Chemie* **2000**, *131*, 849.
- [217] W. M. Meylan, P. H. Howard,
http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm **1995**, *84*, 83.
- [218] L. L. Onsager, *Physik Z.* **1926**, *27*, 388.
- [219] K. K. Lee, C. A. Fitch, B. E. Garcia-Moreno, *Protein Science* **2002**, *11*, 1004.
- [220] V. Stella, R. Rajewski, (University of Kansas, USA). WO 9111172, **1991**.
- [221] H. Ueda, D. Ou, T. Endo, H. Nagase, K. Tomono, t. Nagai, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 863.
- [222] T. Irie, K. Uekama, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147.
- [223] R. Arun, K. C. K. Ashok, V. V. N. S. S. Sravanthi, *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 567.
- [224] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888.
- [225] J. Dancey, E. A. Eisenhauer, *Br. J. Cancer* **1996**, *74*, 327.
- [226] D. O. Scott, D. Bindra, S., V. J. Stella, *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1451.
- [227] J. Fassberg, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 676.
- [228] Y.-H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. L. F., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14873.
- [229] J. A. Gottlieb, J. K. Luce, *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *56*, 103.
- [230] C. G. Moertel, A. J. Schutt, R. J. Reitemeier, *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *56*, 515.
- [231] T. Higuchi, J. L. Lach, *Journal of the American Pharmaceutical Association* **1954**, *43*, 527.

- [232] T. Higuchi, K. A. Connors, *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* **1965**, 117.
- [233] L. M. Hollingshead, D. Faulds, *Drugs* **1991**, 42, 690.
- [234] A. Jablonski, *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Serie des Sciences, Mathematiques, Astronomiques et Physiques* **1960**, 8, 259.
- [235] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **1983**.
- [236] K. A. Lyseng-Williamson, C. Fenton, *Drugs* **2005**, 65, 2513.
- [237] D. P. Figitt, L. R. Wiseman, *Drugs* **2000**, 59, 621.
- [238] J. Defaye, C. Ortiz-Mellet, J. M. G. Fernandez, S. Maciejewski, in *Molecular Recognition and Inclusion* (Ed.: A. W. Coleman), Kluwer Acad., **1998**, pp. 313.
- [239] J. M. Benito, M. Gomez-Garcia, C. Ortiz Mellet, I. Baussanne, J. Defaye, J. M. G. Fernandez, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 10355.
- [240] G. Reinisch, U. Radics, B. Roatsch, *Angew. Makromol. Chem.* **1995**, 233, 113.
- [241] J. K. Chowdhuy, *Biochem Z.* **1924**, 148, 76.
- [242] D. Bhattacharyya, R. S. Singhal, P. R. Kulkarni, *Carbohydr. Polym.* **1995**, 27, 247.
- [243] Z. Xiaodong, L. Xin, L. Wenying, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 89, 3016.
- [244] T. Heinze, K. Pfeiffer, W. Lazik, *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 81, 2036.
- [245] M. I. Khalil, A. Hashem, A. Hebeish, *Starch/Stärke* **1990**, 42, 60.
- [246] T. Heinze, T. Liebert, U. Heinze, K. Schwikal, *Cellulose* **2004**, 11, 239.
- [247] D. Bhattacharyya, R. S. Singhal, P. R. Kulkarni, *Carbohydr. Polym.* **1996**, 31, 79.
- [248] K. Sangseethong, S. Ketsilp, K. Sriroth, *Starch/Stärke* **2005**, 57, 84.
- [249] Z. Stojanovic, K. Jeremic, S. Javanovic, *Starch/Stärke* **2000**, 52, 413.
- [250] M. Ceh, *Starch/Stärke* **1972**, 24, 124.
- [251] C.-N. Bordeanu, Dissertation, Universität des Saarlandes (Saarbrücken), **2005**.
- [252] A.-C. B. Salomonsson, O. Theander, *Starch/Stärke* **1992**, 44, 260.
- [253] R. Kesselmans, I. Bleeker, WO 97/35890, **1997**.

- [254] R. Kesselmans, WO 27118, **1998**.
- [255] A. Hebeish, A. Abdel-Rahman, Z. El-Hilw, M. Hashem, *Starch/Staerke* **2005**, *57*, 616.
- [256] R. Kesselmans, I. Bleeker, WO 15670, **2000**.
- [257] P. L. Bragd, H. van Bekkum, A. C. Besemer, *Topics in Catalysis* **2004**, *27*, 49.
- [258] N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen, *Analytical Biochemistry* **1973**, *54*, 484.
- [259] Y. Kato, R. Matsuo, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* **2003**, *51*, 69.
- [260] F. K. Chen, K., N. Benoiton, *Synthesis* **1978**, 928.
- [261] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.
- [262] H. A. Staab, *Justus Liebigs Ann Chem* **1957**, *609*, 75.
- [263] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3039.
- [264] G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1263.
- [265] M. Bodansky, V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6072.
- [266] J. Kovacs, L. Kisfaludy, M. Q. Ceprini, R. H. Johnson, *Tetrahedron* **1969**, *25*, 2555.
- [267] J. Kovacs, L. Kisfaludy, M. Q. Ceprini, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 183.
- [268] B. O. Handford, J. H. Jones, G. T. Young, T. Johnson, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6814.
- [269] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- [270] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [271] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 1927.
- [272] B. S. Patil, G.-R. Vasanthakumar, S. Babu, *Synthetic Communications* **2003**, *33*, 3089.
- [273] B. Castro, J.-R. Dormoy, B. Dourtoglou, G. Evin, C. Selve, J.-C. Ziegler, *Synthesis* **1976**, *11*, 751.
- [274] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205.

- [275] Y. Zheng, X. R. Song, M. Darby, Y. F. Liang, L. He, Z. Cai, Q. H. Chen, Y. Q. Bi, X. J. Yang, J. P. Xu, Y. B. Li, Y. Y. Sun, R. J. Lee, S. X. Hou, *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 47.
- [276] Z. Du, S. R. Pan, Q. Yu, Y. P. Li, Y. T. Wen, W. Zhang, M. Feng, C. B. Wu, *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, *353*, 140.
- [277] C. P. Leamon, R. B. DePrince, R. W. Hendren, *J. Drug Target.* **1999**, *7*, 157.
- [278] J. Luo, M. D. Smith, D. A. Lantrip, S. Wang, P. L. Fuchs, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10004.
- [279] V. Mailänder, K. Landfester, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2379.
- [280] I. I. Marty, R. C. Oppenheim, P. Speiser, *Pharm. Acta Helv.* **1978**, *53*, 17.
- [281] J. S. Wang, A. B. Smetana, J. J. Boeckl, G. J. Brown, C. M. Wai, *Langmuir*, *26*, 1117.
- [282] S. K. C. Lee, Y. H. Yu, O. Perez, S. Puscas, T. H. Kosel, M. Kuno, *Chem. Mat.*, *22*, 77.
- [283] C. H. Hsieh, *J. Chin. Chem. Soc.* **2007**, *54*, 31.
- [284] D. M. Fernandes, A. A. W. Hechenleitner, M. F. Silva, M. K. Lima, P. R. S. Bittencourt, R. Silva, M. A. C. Melo, E. A. G. Pineda, *Mater. Chem. Phys.* **2009**, *118*, 447.
- [285] R. Tong, J. Cheng, *Bioconjug Chem* **2010**, *21*, 111.
- [286] P. Anand, H. B. Nair, B. Sung, A. B. Kunnumakkara, V. R. Yadav, R. R. Tekmal, B. B. Aggarwal, *Biochem Pharmacol* **2009**, *79*, 330.
- [287] C. E. Astete, C. M. Sabliov, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* **2006**, *17*, 247.
- [288] R. Jayakumar, K. P. Chennazhi, R. A. A. Muzzarelli, H. Tamura, S. V. Nair, N. Selvamurugan, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 1.
- [289] S. J. Shu, C. Y. Sun, X. G. Zhang, Z. M. Wu, Z. Wang, C. X. Li, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 210.
- [290] F. van de Manakker, T. Vermonden, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3157.
- [291] R. I. Pinhassi, Y. G. Assaraf, S. Farber, M. Stark, D. Ickowicz, S. Drori, A. J. Domb, Y. D. Livney, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 294.

- [292] A. Paillard, C. Passirani, P. Saulnier, M. Kroubi, E. Garcion, J.-P. Benoit, D. Betbeder, *Pharm Res* **2009**, *27*, 126.
- [293] Y. J. Yang, C. H. Liu, P. R. Chang, Y. Chen, D. P. Anderson, M. Stumborg, *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *115*, 1089.
- [294] J. Szymonska, M. Targosz-Korecka, F. Krok, in *Nano 2008: 2nd National Conference on Nanotechnology, Vol. 146* (Eds.: J. Kolodziej, J. Konior, P. Czuba, M. Szymonski), Iop Publishing Ltd, Bristol, **2009**, pp. 12027.
- [295] M. J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, G. Wenz, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, *J Control Release* **2010**, *141*, 85.
- [296] H. P. Merkle, *Pharm. Int.* **1984**, *5*, 88.
- [297] S. P. Li, C. R. Kowarski, K. M. Feld, W. M. Grim, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1988**, *14*, 353.
- [298] C. O. Sullivan, C. Birkinshaw, *Biomaterials* **2004**, *25*, 4375.
- [299] Y. Y. Jiao, N. Ubrich, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, T. Lecompte, P. Maincent, *Circulation* **2002**, *105*, 230.
- [300] J. Faucheu, C. Gauthier, L. Chazeau, J. Y. Cavaille, V. Mellon, E. B. Lami, *Polymer* **2010**, *51*, 6.
- [301] E. VivaldoLima, P. E. Wood, A. E. Hamielec, A. Penlidis, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1997**, *36*, 939.
- [302] G. K. Xu, X. Q. Feng, Y. Li, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1257.
- [303] H. Ai, C. Flask, B. Weinberg, X. Shuai, M. D. Pagel, D. Farrell, J. Duerk, J. M. Gao, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1949.
- [304] S. H. Hua, Y. Y. Li, Y. Liu, W. Xiao, C. Li, F. W. Huang, X. Z. Zhang, R. X. Zhuo, *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31*, 81.
- [305] A. S. Zidan, Z. Rahman, M. J. Habib, M. A. Khan, *J Pharm Sci* **2010**, *99*.
- [306] F. P. Gao, Y. Y. Cai, J. Zhou, X. X. Xie, W. W. Ouyang, Y. H. Zhang, X. F. Wang, X. D. Zhang, X. W. Wang, L. Y. Zhao, J. T. Tang, *Nano Res.* **2010**, *3*, 23.
- [307] F. Fawaz, F. Bonini, M. Guyot, A.-M. Lagueny, H. Fessi, J.-P. Devissaguet, *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 750.

- [308] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, J. P. Benoit, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, 78A, 620.
- [309] Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, *J. Control. Release* **2001**, 77, 27.
- [310] S. Unezaki, K. Maruyama, O. Ishida, A. Suginaka, J. Hosoda, M. Iwatsuru, *Int. J. Pharm.* **1995**, 126, 41.
- [311] T. Tabata, Y. Murakami, Y. Ikada, *J. Control. Release* **1998**, 50, 123.
- [312] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387.
- [313] Z. H. Li, H. Sai, S. C. Warren, M. Kamperman, H. Arora, S. M. Gruner, U. Wiesner, *Chem. Mat.* **2009**, 21, 5578.
- [314] A. Lavasanifar, J. Samuel, G. S. Kwon, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 169.
- [315] F. Gröhn, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, 209, 2295.
- [316] J. Y. Cherng, P. vandeWetering, H. Talsma, D. J. A. Crommelin, W. E. Hennink, *Pharm. Res.* **1996**, 13, 1038.
- [317] Y. Li, U. H. Yildiz, K. Müllen, F. Gröhn, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 530.
- [318] Y. Fang, H. Hoh, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8903.
- [319] D. Störkle, S. Duschner, N. Heimann, M. Maskos, M. Schmidt, *Macromolecules* **2007**, 40, 7998.
- [320] E. He, C. Y. Yue, F. Simeon, L. H. Zhou, H. P. Too, K. C. Tam, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, 91A, 708.
- [321] S. Holappa, L. Kantonen, F. M. Winnik, H. Tenhu, *Macromolecules* **2004**, 37, 7008.
- [322] G. W. Jin, X. Y. Ji, J. S. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, 30, 931.
- [323] I. Willerich, F. Grohn, *Chem.-Eur. J.* **2008**, 14, 9112.
- [324] N. Sreenivasachary, J. M. Lehn, *Chem.-Asian J.* **2008**, 3, 134.
- [325] J. T. Davis, G. P. Spada, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 296.
- [326] S. Lena, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chemistry* **2009**, 15, 7792.
- [327] A. Wong, R. Ida, L. Spindler, G. Wu, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 6990.
- [328] P. Hugouneng, Diplomarbeit, Saarland University (Saarbrücken), **2009**.

11 Verzeichnisse

11.1 Verzeichnis der Abkürzungen

[CD]	Konzentration des Cyclodextrins
[G]	Konzentration des Gastes
[G] ₀	Nullpunktlöslichkeit
[W] ₀	Ausgangskonzentration des Wirtes
Å	Angström (10 ⁻¹⁰ m)
α-CD	alpha-Cyclodextrin
AFM	Rasterkraftmikroskopie
AGU	Anhydroglucoseeinheit
<i>B</i>	Steigung der Löslichkeitsisothermen
β-CD	beta-Cyclodextrin
BOP	Benzotriazolylxytris(dimethylamino)- phosphoniumhexafluorophosphat
CDI	Carbonyldiimidazol
CGTase	Cyclodextrin-glycosyltransferase
CMS	Carboxymethylstärke
COSY	Korrelationsspektroskopie
CPT	Camptothecin
CSD	Cambridge Structural Database
D	Debye
<i>d</i>	Schichtdicke der Küvette
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
$\Delta\Delta G^0$	Bindungsselektivität
ΔG^0	Änderung der freien Energie

ΔG^{00}	Bindungsaffinität
ΔH^0	Enthalpie
DHA	Dihydroxyanthrachinon
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Substitutionsgrad
ΔS^0	Änderung der Entropie
e	Elementarladung
E	Extinktion
ε	Ektinktionskoeffizient
ε_0	allgemeine Dielektrizitätskonstante
E_{Coul}	Coulomb-Energie
EDCI	N-(3-Dimethylamino-propyl-N-ethyl-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ε_r	spezielle Dielektrizitätskonstante
f_j	Anteil der j-ten Komponente an der Anisotropie
g	Gramm
G	Gerätefaktor bei der Anisotropiemessung
γ -CD	gamma-Cyclodextrin
h	Stunden
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HES	Hydroxyethylstärke
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HP- β -CD	Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPS	Hydroxypropylstärke
I	Ionenstärke
I_{\perp}	Fluoreszenzintensität bei senkrechter Polarisator/Analysator-Stellung
I_{\parallel}	Fluoreszenzintensität bei paralleler Polarisator/Analysator-Stellung
IR	Infrarot
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K	reduzierte Stabilitätskonstante
k_B	Boltzmann-Konstante
kJ	kilojoule
K_S	Komplexstabilitätskonstante
l	Liter
λ_{Δ}	Debye-Länge
l_i	Bindungslänge
$\lambda_{\xi_{\alpha\mu}}$	Wellenlänge der maximalen Extinktion
$\log P$	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten Octanol/Wasser
M	molar
M^{-1}	Molar
MCA	Monochloressigsäure
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mM	millimolar
mV	millivolt
M_W	Molekulargewicht

MWG	Massenwirkungsgesetz
N	Stöchiometrie
v	Wirt-Gast-Komplex
N_A	Avogadro-Konstante
NaOCl	Natriumhypochlorit
NEt ₃	Triethylamin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOE	Kern-Overhauser
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, pH=7.4
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglycol
PEO-b-DMAEMA	Poly(ethylenoxid)-block-poly(dimethylaminoethylmethacrylsäure)
PEO-b-PMAA	Poly(ethylenoxid)-block-poly(methacrylsäure)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstanten
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
ppm	parts per million
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
r	Abstand zwischen zwei Ladungen
R	allgemeine Gaskonstante
RBC	rote Blutkörperchen
RDM- β -CD	Statistisch methyliertes beta-Cyclodextrin
r_{eff}	effektive Länge, bei der es zu Abschirmung kommt

r_j	Anisotropie der Komponente j
ROESY	Rotating frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
rpm	Umdrehungen pro Minute
r_s	Spacerlänge
RT	Raumtemperatur
SB- β -CD	Sulfobutylether-beta-cyclodextrin
T	Temperatur
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
Tos	Toluolsulfonylgruppe
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
W@G	Wirt-Gast-Komplex
X	Komplexierungsgrad
z_g	Ladung des Gastes
z_h	Ladung des Wirtes
ϑ_i	Bindungswinkel

11.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: α -, β - und γ -CD 1	3
Abbildung 2: Logarithmischer Anstieg der CD-Publikationen ^[12]	5
Abbildung 3: Querschnitt durch die Kavität von α -CD ^[33] 1α und idealisierte Darstellungen ^[35]	6
Abbildung 4: Struktur von Amylose und Amylopektin	7
Abbildung 5: Stärkekörner von verschiedenen Pflanzen (200fach vergrößert) ^[51]	8
Abbildung 6: Stärkederivate und aus Stärke hergestellte Produkte ^[55]	9
Abbildung 7: Nanosphären (Matrixsystem) und Nanokapseln (Reservoirsystem) ^[93]	11
Abbildung 8: Schema des geplanten nanoskaligen Transportsystems auf Stärkebasis für die Tumorthapie	14
Abbildung 9: Komplexbildung	17
Abbildung 10: Überkappte β -Cyclodextrine	19
Abbildung 11: Polare (rot) und apolare (blau) Regionen von CPT 23	21
Abbildung 12: Thiolbausteine 24 - 32 als Ergebnis des virtuellen Screening	24
Abbildung 13: ¹ H-NMR-Spektrum von Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfonyl)]- β -cyclodextrin 12	27
Abbildung 14: Geladene para-substituierte tert-Butylphenylderivate 50 - 56	35
Abbildung 15: Guanidin-funktionalisierte CD Derivate	36
Abbildung 16: Teilchenverteilung für Heptakis-(6-deoxy-6-amino)- β -CD 5 als Funktion des pH-Werts	37
Abbildung 17: Änderung der Freien Energien ΔG^0 für β -CD 1β und Mono-amino- β -CD 11 und den Gästen 50 - 56	41
Abbildung 18: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss von 51, 54 und 55 in kationische β -CD Derivate	43
Abbildung 19: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss von 51, 54 und 55 in anionische β -CD Derivate	44
Abbildung 20: $\log P$ der CD Derivate	45
Abbildung 21: Änderung der Freien Energie in Abhängigkeit des $\log P$ beim Einschluss des neutralen Gastes 54 in substituierte CD Derivate	46

Abbildung 22: Orientierungsmöglichkeiten beim Einschluss eines geladenen Gastes in ein hepta-substituiertes CD-Derivat.....	49
Abbildung 23: ROESY-Spektrum von 48 mit 55	50
Abbildung 24: Schnittbilder verschiedener CD-Komplexe mit Integration der ROESY-Spektren	51
Abbildung 25: Berechnete Coulomb-Energien in Abhängigkeit von den gemessenen elektrostatischen Wechselwirkungen $\Delta\Delta G^0$	53
Abbildung 26: Strukturen von Sugammadex und Rucoronium sowie Struktur des resultierenden Komplexes	54
Abbildung 27: pH-abhängiges Gleichgewicht bei CPT 23 . rechts: Lactonform, links: Carboxylatform	56
Abbildung 28: Zunahme der Löslichkeit von Camptothecin als Funktion der Konzentration der CD Derivate.....	59
Abbildung 29: Wechselwirkungen in CPT-CD Komplexen. Links: 7-CPT , rechts: 33-CPT	61
Abbildung 30: Strukturen von Idarubicin 60 und der Modellverbindung 1,4-Dihydroxy-anthrachinon 61	62
Abbildung 31: Änderung der Freien Energien ΔG^0 beim Einschluss von DHA in hepta-substituierte CD Derivate	64
Abbildung 32: Differenz der Anisotropien des Komplexes und freiem Gast in Abhängigkeit des Wirt-Gast-Verhältnisses	69
Abbildung 33: Änderung der Freien Energien beim Einschluss von DHA und Idarubicin Hydrochlorid in heptasubstituierte CD Derivate.....	70
Abbildung 34: Struktur von Docetaxel	70
Abbildung 35: Zunahme der Löslichkeit von Docetaxel als Funktion	71
Abbildung 37: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von CMS nach säurehydrolytischem Abbau. (Indices s und u stehen für substituiert und unsubstituiert)	81
Abbildung 38: Kalibrierlösungen zur Bestimmung des Glucuronsäureanteils, Zahlen stehen für die enthaltene Menge an Glucuronsäure in μg	85
Abbildung 39: Lineare Abhängigkeit der Absorption vom Anteil an Glucuronsäure	85

Abbildung 40: Substitutionsgrad der oxidierten Stärken 63 in Abhängigkeit des Natrium-hypochlorit/AGU-Verhältnisses	86
Abbildung 41: Substitutionsgrad in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente NaOCl/AGU unter Verwendung von 4 bzw. 8 mg TEMPO/g Stärke	88
Abbildung 42: Struktur von Folsäure	90
Abbildung 43: IR-Spektrum von oxidierter Stärke 63 vor und nach Behandlung mit Ionentauscher (Dowex 50WX2-200)	93
Abbildung 44: Strukturen aus Polyelektrolyten ^[310]	100
Abbildung 45: Struktur von PEO-b-PMAA	103
Abbildung 46: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe 72 und 73 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in Wasser und PBS	107
Abbildung 47: AFM-Bild des Nanoplexes 72j aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7	108
Abbildung 48: Stabilität der gebildeten Komplexe in Abhängigkeit vom Ladungsverhältnis ^[323]	109
Abbildung 49: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe 72 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in Wasser vor und nach Lyophilisieren	111
Abbildung 50: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe 73 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in PBS vor und nach Lyophilisieren	113
Abbildung 51: Struktur von Polyethylenoxid-b-poly(dimethylaminoethylmethacrylsäure) (PEO-b-PDMAEMA), n=114, m=95	114
Abbildung 52: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe 74 und 75 aus PEO-b-PDMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD 48 in Wasser und PBS	115
Abbildung 53: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe 75 aus PEO-b-PDMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD 48 in PBS vor und nach Lyophilisieren	118
Abbildung 54: Struktur der synthetisierten Stärkederivat mit zellspezifischen Liganden	120

Abbildung 55: Hydrodynamische Radien in Abhängigkeit des Massenanteils Ligand bei Pteroylamidhexylamin 79	122
Abbildung 56: Nanoplexe aus oxidierter Stärke mit zellspezifischem Ligand 71b und Hepta-cysteaminy- β -CD 7 in Wasser, Partikelgrößen in Abhängigkeit vom stöchiometrischen Verhältnis CD zu Stärke.....	125
Abbildung 57: Hydrodynamische Radien der Nanoplexe 76 und 77 aus oxidierter Stärke mit zellspezifischem Ligand 71b und Hepta-cysteaminy- β - CD 7 in PBS und Wasser	128
Abbildung 58: Hydrodynamische Durchmesser der Nanoplexe 77 aus oxidierter Stärke mit zellspezifischem Ligand 71b und Hepta-cysteaminy- β -CD 7 in PBS vor und nach Lyophilisieren.....	129
Abbildung 59: Kontrollexperiment, Erythrozyten und Caco2-Zellen ohne Nanoplex. Links: Betrachtung bei 488 nm, rechts: Betrachtung unter Tageslicht ^[328]	131
Abbildung 60: Erythrozyten und Caco-2-zellen nach Inkubation mit Nanoplexlösung. links: Betrachtung im Tageslicht, mitte: Betrachtung bei 488 nm, rechts: Überlagerung der Beobachtung im Tageslicht und bei 488 nm mit dem konfokalen Mikroskop ^[328]	132
Abbildung 61: Aufnahme einer Caco-2-zelle mit wirkstoffbeladenem Nanoplex mit dem konfokalen Mikroskop, Beobachtung bei 488 nm ^[328]	132
Abbildung 62: Rechts: UV-Spektren von CPT in DMSO Links: Extinktion als Funktion der Konzentration.....	140
Abbildung 63: Rechts: UV-Spektren von DHA in DMSO Links: Extinktion als Funktion der Konzentration.....	140
Abbildung 64: Rechts: UV-Spektren von Pteroat 66 in Wasser/Hydrazin (99:1) Links: Extinktion als Funktion der Konzentration	140

11.3 Verzeichnis der Schemata

Schema 1: Synthese von heptafunktionalisierten β -CDs, Funktionalisierung nur an C6.....	16
Schema 2: Synthese von monofunktionalisiertem β -CD, Funktionalisierung nur an C6.....	18
Schema 3: Darstellung von Per-benzyl- β -CD 19 und regioselektive Debenzylierung zum Diol 20	19
Schema 4 ^[171] : Synthese und regioselektive Didebenzylierung von 21 i) NaH, RT, 2h, 92%, ii) DIBAL-H, Toluol, 50°C, 1h, 90%	20
Schema 5: pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen der Lactonform (aktiven Form) 23a und der Carboxylatform (inaktiven Form) 23b von CPT	22
Schema 6: Durchführung des inversen virtuellen Screenings.....	23
Schema 7: Synthese mono-funktionalisierter β -CDs. a) Tos-Cl, NaOH, ACN/H ₂ O b) 6-Mercapto-9H-purin 31 , NEt ₃ , DMF c) 2-Mercapto-pyridin 32 , NEt ₃ , DMF d) 5-Mercapto-1-methyl-tetrazol 24 , NEt ₃ , DMF e) 3-Mercapto-propan-1,2-diol 28 , NEt ₃ , DMF f) 2-Mercapto-ethylamin Hydrochlorid 25 , NH ₄ HCO ₃ , DMF/H ₂ O g) 2-Mercapto-ethansulfonat Natriumsalz 30 , NEt ₃ , DMSO h) 1) 3-Mercapto-propionsäuremethylester, NEt ₃ , DMF 2) NaOH i) 1) 2-Mercapto-essigsäuremethylester, NEt ₃ , DMF 2) NaOH j) 1) 2-Mercapto-propionsäuremethylester, NEt ₃ , DMF 2) NaOH	26
Schema 8: Synthese von Heptakis-(6-deoxy-6-iodo)- β -cyclodextrin 3	28
Schema 9: Synthese von hepta-funktionalisierten β -CDs mit aromatischen Gruppen. a) 6-Mercapto-9H-purin 31 , NEt ₃ , DMF b) 5-Mercapto-1-methyl-tetrazol 24 , NEt ₃ , DMF c) 2-Mercapto-pyridin 32 , NEt ₃ , DMF	29
Schema 10: Synthese von hepta-funktionalisierten β -CDs mit neutralen aliphatischen Gruppen. a) 3-Mercapto-propan-1,2-diol 28 , NEt ₃ , DMF, b) 1-Mercapto-2-propanol, NEt ₃ , DMF, c) 2-Mercapto-ethanol, NEt ₃ , DMF	30
Schema 11: Synthese von hepta-funktionalisierten β -CDs mit aliphatischen Gruppen. a) 2-Mercapto-ethylamin Hydrochlorid 25 , NEt ₃ , DMF b)) 1) 2-Mercaptoessigsäuremethylester, NEt ₃ , DMF 2) NaOH c) 1) 2-Mercapto-propionsäuremethylester, NEt ₃ , DMF 2) NaOH d) 1) 3-	

Mercaptopropionsäuremethylester, NEt ₃ , DMF 2) NaOH e) 2-Mercaptoethansulfonat Natriumsalz 30 , NEt ₃ , DMSO f) Thiosulfat, DMSO	31
Schema 12: Synthese von CMS 62	75
Schema 13: Darstellung von oxidierte Stärke 63	83
Schema 14: Mechanismus der TEMPO-Oxidation.....	84
Schema 15: Darstellung von aminofunktionalisierten Pteroaten.....	91
Schema 16: Kupplung von aminofunktionalisierten Pteroaten 66 – 68 an oxidierte Stärke.....	92
Schema 17: Bildung von Nanoplexen aus einem hepta-kationischen CD-Derivat und einem polyanionischen Polymer	102
Schema 18: Selbstorganisation von Guaninderivaten in G4-Quartette in Gegenwart von Metallionen ^[324]	121

11.4 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrin ^[12]	4
Tabelle 2: Durchmesser der Engstelle der Kavität von α -, β - und γ -CD.....	6
Tabelle 3: Experimentell bestimmte pK_S -Werte	36
Tabelle 4: Ladungszahlen aus den potentiometrischen Titrationsen bei pH 6.8.	37
Tabelle 5: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Titration von β -CD Derivaten und tert-Butylphenylderivaten in wässrigem 50 mM Phosphatpuffer	38
Tabelle 6: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss der <i>tert</i> - Butylphenylderivate 50 - 66 in β -CD 1β und in Mono-(6-deoxy-6-amino)- β -CD 11	41
Tabelle 7: Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss der Gäste 51 , 54 , und 55 in verschiedene CDs	42
Tabelle 8: Bindungslängen l_i und Inkremente r_i zur Berechnung der Spacerlängen r_s	47
Tabelle 9: Bindungsselektivitäten der Wirte 1β , 5 , 7 , 8 , 11 , 12 , 13 , 43 , 46 - 49 , 57 und 58 sowie Spacerlängen r_s und Ladungszahlen z_w	48
Tabelle 10: β -CD-Derivate mit pharmazeutischer Anwendung	55
Tabelle 11: Bindungskonstanten K_S und Freie Bindungsenergien ΔG^0 für CPT 23 in 20mM HCl ^[179]	57
Tabelle 12: Bindungskonstanten K_S und Änderung der Freien Energie ΔG^0 für CPT 23	60
Tabelle 13: Bindungskonstanten K_S und Änderung der Freien Energie ΔG^0 für den Einschluss von 1,4-Dihydroxyanthrachinon (DHA) in hepta-substituierte β -CD Derivate	63
Tabelle 14: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Titration von heptasubstituierten CD Derivaten und Idarubicin Hydrochlorid 60 in PBS bei pH = 7,4; T = 25°C.....	65
Tabelle 15: Bindungskonstanten K_S für CPT, DOC, IDA und DHA mit C6- substituierten β -CD Derivaten, bestimmt durch Mikrokalorimetrie (i), Löslichkeitsisothermen (s) oder Fluoreszenzanisotropie (f).....	73
Tabelle 16: Einfluss der Temperatur bei der Synthese von CMS.	78

Tabelle 17: Einfluss des Isopropanol/Wasser-Verhältnisses bei der Darstellung von CMS	79
Tabelle 18: Einfluss des Amylosegehalts der verwendeten Stärke bei der Darstellung von CMS. ($n(\text{MCA})/n(\text{AGU}) = 1.4$, $n(\text{NaOH})/n(\text{AGU}) = 3.0$, Reaktionszeit 2h, $T = 40^\circ\text{C}$, Isopropanol/ $\text{H}_2\text{O} = 6.25:1$)	80
Tabelle 19: Einfluss des Monochloressigsäure/AGU-Verhältnisses bei der Darstellung von CMS	80
Tabelle 20: Partielle Substitutionsgrade von CMS (Zahlen in Klammern geben den Ort der Substitution an)	82
Tabelle 21: Einfluss des NaOCl/AGU-Verhältnisses bei der Darstellung von oxidierten Stärke (verwendete Stärke: Avebe, 8 mg TEMPO/g Stärke) 63	86
Tabelle 22: Einfluss der TEMPO-Menge bei der Oxidation von Stärke	87
Tabelle 23: Einfluss der verwendeten Stärke auf den Substitutionsgrad	89
Tabelle 24: Synthese von Stärken mit Pteroylhydrazid 66 als Ligand.....	94
Tabelle 25: Synthese von Stärken mit Pteroylamidethylamin 67 als Ligand	94
Tabelle 26: Synthese von Stärken mit Pteroylamidhexylamin 68 als Ligand ...	94
Tabelle 27: Nanoplexe 72 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in 50 mM wässriger NaCl-Lösung.....	104
Tabelle 28: Nanoplexe 73 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in PBS	105
Tabelle 29: Nanoplexe 72 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in Wasser nach Lyophilisieren	110
Tabelle 30: Nanoplexe 73 aus PEO-b-PMAA und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in PBS nach Lyophilisieren	112
Tabelle 31: Nanoplexe 74 aus PEO-b-DMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD 48 in Wasser.....	115
Tabelle 32: Nanoplexe aus PEO-b-DMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD 48 in PBS	116
Tabelle 33: Nanoplexe aus PEO-b-DMAEMA und Hepta-mercaptoethansulfonat- β -CD 48 in PBS nach Lyophilisieren	118
Tabelle 34: Hydrodynamische Durchmesser und Zetapotential der pteroylfunktionalisierten amphiphilen Stärkederivate in PBS	120

Tabelle 35: Nanoplexe 76 aus oxidiertes Stärke mit zellspezifischem Ligand und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in Wasser	124
Tabelle 36: Nanoplexe 76 aus oxidiertes Stärke mit zellspezifischem Ligand 71b und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in Wasser	126
Tabelle 37: Nanoplexe 77 aus oxidiertes Stärke mit zellspezifischem Ligand 71b und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in PBS	127
Tabelle 38: Nanoplexe aus oxidiertes Stärke mit zellspezifischem Ligand 71b und Hepta-cysteaminyl- β -CD 7 in PBS nach Lyophilisieren.....	129
Tabelle 39: Reaktionsbedingungen, Substitutionsgrad D_S und Ausbeute bei der Darstellung von CMS 62	169
Tabelle 40: Reaktionsbedingungen bei der Oxidation von Stärke	170
Tabelle 41: Synthese von Stärken mit Pteroylhydrazid 66 als Ligand.....	174
Tabelle 42: Synthese von Stärken mit Pteroylamidethylamin 67 als Ligand..	174
Tabelle 43: Synthese von Stärken mit Pteroylamidhexylamin 68 als Ligand .	175

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben:

- Prof. Dr. Gerhard Wenz für die interessante Themenstellung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeiten zur Weiterentwicklung
- Prof. Dr. Claus-Michael Lehr für die Übernahme des Zweitgutachtens und sein Interesse an meiner Arbeit im Rahmen des gemeinsamen Forschungsprojekts sowie der Nutzung des Zetasizers
- allen Mitgliedern des BMBF-Projektes „Nanostarch-Carriers“ für die gute fächerübergreifende Zusammenarbeit:
 - o den Mitgliedern der BASF: Masayuki Hirose, Dr. Harald Keller, Dr. Hans-Michael Walter
 - o den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lehr: Dr. Brigitta Loretz, Dr. Noha Nafee, Dr. Ulrich Schäfer
 - o den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wenz: Manuel Keil, Thomas Stauner
 - o der Firma Toroma: Dr. Tobias Schulz, Dr. Michael Bauer, Dr. Thomas Jung, Dr. Matthias Großer
- allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises für das stets sehr gute Arbeitsklima und viele sowohl fachliche als auch private Gespräche: Thomas Albuzat, Jennifer Ax, Prajaktar Dandekar, Michael Hahn, Daniela Hausen, Ronny Heisel, Thomas Jung, Anja Kasten, Manuel Keil, Nadine Koch, Axel Müller, Katrin Ohliger, Gerti Radünz, Thomas Stauner, Thomas Stöhr, Irina Straßnig, Christian Teuchert, Petra Thinner, Haiming Wang und Sebastian Witt. Besonders danken möchte ich dieser Stelle meinen Laborkollegen Andreas Lippach, Christoph Michel, Melanie Schnabel und Christian Straßnig sowie Jennifer Ax, die meine Zeichnungen mit viel Kreativität in kleine Kunstwerke verwandelt hat.
- den Angestellten des Arbeitskreises für die Unterstützung bei Messungen, Synthesen, Reparaturen oder Verwaltungsangelegenheiten: Devid Hero, Joachim Kriesamer, Gerti Radünz, Thomas Scherer, Tanja Seibert, Petra

Thinnes, Jutta Ganz und Blandine Bossmann. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Anne Engelke für zahllose Messungen speziell in der Endphase meiner Promotion.

- meinen Vertiefungsstudenten und HiWis für Ihre gute Mitarbeit: Oliver Clemens, Momchill Ninov, Stefan Roos, Christian Teuchert und Sebastian Witt
- Helga Feuerhake (Institut für Anorganische Chemie, UdS) für die Durchführung der Elementaranalysen
- Dr. Joseph Zapp (UdS) für die Messungen der ROESY-Experimente
- Dagmar Auerbach und Jun.-Prof. G. Jung (Institut für Biophysikalische Chemie, UdS) für die Unterstützung bei den Fluoreszenz-Anisotropie Messungen
- Qiong Lian und Jun.-Prof. Marc Schneider (Institut für Pharmazeutische Nanotechnologie, UdS) für die Aufnahme der AFM-Bilder
- Pierre Hugounenq, Daniel Mörsdorf und Prof. I. Bernhardt (Institut für Biophysik/Zentrales Isotopenlabor, UdS) für die Untersuchungen der Nanopartikel an Caco-2-Zellen und roten Blutkörperchen
- Nadine Koch für 10 Jahre einer sehr schönen Freundschaft in allen Höhen und Tiefen
- meiner Familie für die Unterstützung, Motivation, Ablenkung oder was auch immer gerade nötig war

Ohne Ihre/Eure Mitwirkung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

DANKE!