Synthese von hydrophoben Stärkederivaten und Pteroylamidhexylamin-funktionalisiertem Polyvinylalkohol zur Darstellung von Nanopartikeln zum gerichteten Wirkstofftransport

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Thomas Stauner

Saarbrücken, April 2011

Tag des Kolloquiums:

Dekan:	Prof. Dr. W. F. Maier
Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Wenz
	Prof. Dr. CM. Lehr

Vorsitz: Akad. Mitarbeiter:

Prof. Dr. J. Jauch Dr. Christian Neis Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2007 bis April 2011 am Institut für Organischen Makromolekularen Chemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz angefertigt.

Nur wer seine Stärken kennt kann sie auch nutzen! Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zu	SAMM	IENFASSUNG / SUMMARY	1	
	1.1	Zusan	nmenfassung	1	
	1.2	Sumn	nary	2	
2	EIN	NLEIT	UNG	3	
	2.1	Stärke	e als Basispolymer		
		2.1.1	Allgemeines zu Stärke		
		2.1.2	Supramolekulare Struktur von Stärke und anderen Polysacchariden	7	
		2.1.3	Anwendungsgebiete der Stärke		
		2.1.4	Stärkederivatisierung	9	
	2.2	2.2 Polyvinylalkohol			
		2.2.1	Verwendung von Polyvinylalkohol		
		2.2.2	Modifikation von Polyvinylalkohol		
	23	Nanor	nartikal	12	
	2.5	231	Allgemeines		
		2.3.1	Darstellung von Nanopartikeln		
		2.3.2	Verwendung von Stärke für die Formulierung von Nanopartikeln		
	24	1 Medizinischer Hintergrund		16	
	2.7	2 4 1	Allgemeines	10	
		2.4.2	Zvtostatika		
		2.4.3	CAM-Modell		
3	ZII	ELSET	ZUNG	27	
4	DIS	SKUSS	SION DER ERGEBNISSE	28	
	4.1	Allgei	meine Synthese der Stärkederivate		
	4.2	Chara	kterisierung der Stärkederivate		
		4.2.1	Qualitative Charakterisierung durch IR-Spektroskopie		
		4.2.2	Bestimmung des Substitutionsgrades aus ¹ H-NMR-Spektren		
		4.2.3	Bestimmung des Substitutionsgrades aus Elementaranalyse	35	
		4.2.4	Einfluss der Base		
		4.2.5	Einfluss der Reaktionszeit		
		4.2.6	Einfluss der Reaktandenmenge	40	
		4.2.7	Einfluss der Reaktionstemperatur	41	
		4.2.8	Einfluss der Alkylkettenlänge		
		4.2.9	Transesterifikation		
		4.2.10	Bitunktionalisierte Stärkederivate	44	
	4.3	Deriva	ate des Polyvinylalkohols		

		4.3.1	Pteroinsäure-Derivate des PVA		
		4.3.2	Charakterisierung der Pteroylamidhexylaminderivate des PVA		
		4.3.3	Einflusse auf die Synthese der Pyrofolsaure-PVA Derivate		
		4.3.4 4 3 5	Chinin-Derivat des PVA		
	4 4	D		(1	
	4.4	Erzeu	Igung von Nanopartikel		
		4.4.1	Darstellung der Nanopartikel		
	4.5	Besti	mmung der Freisetzungskinetik		
		4.5.1	Partikel ohne Wirkstoff		
		4.5.2	Partikel mit Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure		
		4.5.3	Partikel mit Taxotere		
		4.5.4	Partikel mit Idarubicin		
		4.5.5	Partikel mit Artesunate		
	4.6	Zytot	oxizitätstests		
		4.6.1	Bestimmung der Cytotoxizität mittels MTT-Assay		
		4.6.2	Bestimmung der Cytotoxizität mittels ATPase-Assay		
	4.7	Partik	kel mit Folsäureliganden		
	4.8 Uptake-Studie mittels konvokaler Mikroskopie				
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK				
6	EX	PERIN	MENTELLER TEIL	92	
6	EX	PERI N Gerät	MENTELLER TEIL	92	
6	EX 6.1	PERIN Gerät 6.1.1	MENTELLER TEIL		
6	EX 6.1	PERI Gerät 6.1.1 6.1.2	MENTELLER TEIL e und Methoden Material Geräte und Messmethoden		
6	EX 6.1	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3	MENTELLER TEIL e und Methoden Material Geräte und Messmethoden Reinigung der Derivate		
6	EX 6.1	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4	MENTELLER TEIL e und Methoden Material Geräte und Messmethoden Reinigung der Derivate Synthese der Stärkederivate	92 92 92 92 95 95 97	
6	EX 6.1	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst	MENTELLER TEIL e und Methoden Material Geräte und Messmethoden Reinigung der Derivate Synthese der Stärkederivate ellung der Polyvinylalkoholderivate		
6	Ex 6.1	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1	MENTELLER TEIL		
6	Ex.6.16.2	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1 6.2.2	MENTELLER TEIL	92 92 92 92 92 92 95 97 113 113 114	
6	EX6.16.2	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1 6.2.2 6.2.3	MENTELLER TEIL e und Methoden	92 92 92 92 92 95 95 97 113 113 114 115	
6 7	 EX 6.1 6.2 AB 	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1 6.2.2 6.2.3 SCHL	MENTELLER TEIL e und Methoden		
6 7 8	 EX 6.1 6.2 AB AB 	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1 6.2.2 6.2.3 SCHL KÜRZ	MENTELLER TEIL re und Methoden Material Geräte und Messmethoden Reinigung der Derivate. Synthese der Stärkederivate. ellung der Polyvinylalkoholderivate Synthese des Pteroinsäurederivats. Synthese der Polyvinylalkoholderivate. Chinin-modifiziertes PVA USSBETRACHTUNG UNGSVERZEICHNIS		
6 7 8 9	 EX 6.1 6.2 AB AB AB 	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1 6.2.2 6.2.3 SCHL KÜRZ BILDI	MENTELLER TEIL te und Methoden		
6 7 8 9 10	 EX 6.1 6.2 AB AB AB LIT 	PERIN Gerät 6.1.1 6.1.2 6.1.3 6.1.4 Darst 6.2.1 6.2.2 6.2.3 SCHL KÜRZ BILD	MENTELLER TEIL e und Methoden Material Geräte und Messmethoden Reinigung der Derivate Synthese der Stärkederivate ellung der Polyvinylalkoholderivate Synthese des Pteroinsäurederivats Synthese der Polyvinylalkoholderivate Chinin-modifiziertes PVA UUSSBETRACHTUNG UUNGSVERZEICHNIS UNGS-, FORMEL - UND TABELLENVERZEICHNI IURVERZEICHNIS		

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden in einem ersten Schritt hydrophobe Stärkederivate (SD) mittels Veretherungs- und Veresterungsreaktionen nativer Stärke mit Halogenalkanen und Fettsäure-Estern dargestellt. Diese Derivate werden zur Darstellung von Nanopartikeln verwendet. In einem zweiten Schritt wird ein Folsäurederivat über einen Hexyldiaminlinker an Polyvinylalkohol (PVA) geknüpft und zur Darstellung von Nanopartikel verwendet. Weitere Gegenstände der Arbeit sind die Optimierung der einzelnen Syntheseschritte und eine Untersuchung der Einflüsse auf Synthese und Partikelformulierung.

Eine Verkapselung der hydrophoben Wirkstoffe Taxotere[®] und Idarubicin[®] zeigt eine deutliche Steigerung der Löslichkeit gegenüber den unverkapselten Wirkstoffen.

Es wird gezeigt, dass Nanopartikel mit folsäuremodifiziertem PVA eine verstärkte attraktive Wechselwirkung mit Folsäurerezeptoren exprimierenden Krebszellen eingehen als Partikel ohne diese Liganden. Auch kann eine günstige Freisetzung ohne den so genannten "burst effect", der schlagartigen Freigabe des Wirkstoffes, für Modellwirkstoffe, mit "burst effect" für Zytostatika wie Idarubicin[®] und Taxotere[®], aufgezeigt werden. Die unbeladenen Partikel zeigen keine Zytotoxizität.

Die Verwendung der hydrophoben, biokompatiblen Stärkederivate in Kombination mit zielgerichtetem Transport durch Verwendung von spezifischen Liganden verspricht die Verabreichung potenter hydrophober Wirkstoffe in geringeren Konzentrationen und damit mit geringeren Nebenwirkungen.

1.2 Summary

In this study starch derivatives (SD) were synthesized via etherification- and esterification reactions by the use of native starch, halogen alkanes and fatty acids as the first step of a drug delivery system. These derivatives were used for the formulation of nanoparticles. In the second step a folic acid derivative was coupled over 1,6-diaminhexane onto polyvinylalcohol (PVA) and this derivative was used for the formation of nanoparticles. The influences of the reaction conditions on the synthesis of the starch- and PVA-derivatives were examined and optimized. Also the influence of PVA on the formation of the nanoparticles was determined.

The encapsulation of hydrophobic drugs as there is Taxotere[®] and Idarubicine[®] showed a significant increase of the solubility compared to the free drugs.

It has been shown that nanoparticles made of folated PVA have an increased attractive interaction with cancer cells with folic acid receptors in contrast to such particles without folic acid ligands. Over and above that an auspicious release of the anti cancer drug over a longer period of time without a so called burst effect could be monitored. The unloaded particles themselves showed no cytotoxicity.

The use of the hydrophobic biocompatible starch derivatives in combination with targeted delivery by the use of specific ligands promises the administration of highly potent and hydrophobic drugs in lower concentration und this way with fewer side effects.

2 Einleitung

Diese Arbeit stellt einen Teilbeitrag zum Forschungsprojekt "Nanoskalige Carrier aus Stärkederivaten für den gerichteten Transport von antineoplastischen Pharmaka" in Kooperation mit den Firmen ToromaOrganics und BASF dar, welches sich mit der Derivatisierung von Stärke unter dem Aspekt der Anwendung in der Medizin als Carrier beschäftigt.

2.1 Stärke als Basispolymer

2.1.1 Allgemeines zu Stärke

In der Natur werden Polymere der Glukose, zu denen die Stärke gehört, als Speicherstoff aufgebaut, da zum einen alle benötigten Biomoleküle durch enzymatische Spaltung der Polymere erhalten werden können, zum anderen um zu vermeiden, dass die Zuckereinheiten, zu einer gefährlichen Erhöhung des osmotischen Drucks und damit zu einer schädlichen übermäßigen Wasseraufnahme in die Zellen führen kann. Diese Erhöhung des osmotischen Drucks kann durch die Bildung der osmotisch inaktiven Polymere vermieden werden. Dies macht die Stärke zu einem der Hauptenergiespeicher in der Natur und wird von allen chlorophyllhaltigen Pflanzen bei der Photosynthese produziert^[1]. Sie stellt neben Cellulose eines der Hauptpolysaccharide in fast allen Pflanzen dar. Sie ist strukturell eng verwandt mit dem Polymer Glykogen, dem Reservepolysaccharid von Tieren und Pilzen, und besteht aus einem Gemisch von Amylose und Amylopektin (siehe auch Abbildung 1: Struktur von Amylose (A), Amylopektin (B)) in unterschiedlicher Zusammensetzung, abhängig jeweils von der Quelle der Stärke. Da es sich um ein Naturprodukt handelt lassen sich diese Zusammensetzungen nie genau definieren und lediglich grobe Richtwerte angeben. So variieren die Gehalte an Amylose von etwa 20 bis 30 %, die an Amylopektin von etwa 70 bis 80 %^[1].

Beides, Amylose und Amylopektin, stellen Polymere von Glukose dar, bei denen die einzelnen Zuckereinheiten über α -1,4-glycosidische Bindungen verknüpft sind. Der Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin besteht im Verzweigungsgrad der Polymerketten. Bei Amylopektin kommen zusätzlich zur Hauptkette noch kürzere Seitenketten aus solchen Glukosepolymeren über 1-6-glykosidische Bindungen hinzu, welche ihrerseits wieder über noch kürzere Seitenketten verfügen. Diese Seitenketten fehlen bei der Amylose gänzlich.

Stärke liegt in Pflanzen selten als offenes langkettiges Molekül vor^[2], sondern in der Regel als Stärkegranula (Stärkekörner) mit klar abgegrenzter äußerer Struktur, aber ungeordneter Innenstruktur. Diese haben je nach Herkunft unterschiedliche Erscheinungsformen. So sind die der Kartoffel eher oval mit einem Durchmesser von etwa 15 bis 100 μ m und die aus Reis gewonnene eher polyedrisch, mit einem Durchmesser von nur etwa 3 bis 8 μ m^[2]. So kann die pflanzliche Herkunft einer Stärke schon leicht an Hand des Aussehens der Granula abgeleitet werden.





Abbildung 1: Struktur von Amylose (A), Amylopektin (B)

Stärke ist nur eines der vielen Polysaccharide. Ebenso zählen noch Cellulose sowie die Cyclodextrine dazu. Wie der Name schon verrät sind Cyclodextrine ringförmige Moleküle, die sich in ihrer Ringgröße unterscheiden. So besteht das α -Cyclodextrin (Cyclomaltohexaose) aus sechs Glukoseeinheiten, das β -Cyclodextrin (Cyclomaltoheptaose) aus sieben Glukoseeinheiten und das γ -Cycloedxtrin (Cyclomaltooctaose) aus acht Glukoseeinheiten^[3] (siehe **Abbildung 2**: schematische Darstellung von Cyclodextrin^[4]). Diese und ihre verschiedenen Derivate, bei denen die freien Hydroxygruppen durch diverse Reste ergänzt werden, wurden bereits erfolgreich auf Anwendungen wie Drug Delivery getestet und sind auch weiterhin ein markantes Forschungsprojekt, unter anderem im Arbeitskreis von Herrn Prof. G. Wenz.

Einer der Nachteile ist jedoch, dass pro Cyclodextrinmolekül jeweils nur ein einzelnes Wirkstoffmolekül gebunden und transportiert werden kann. Bei dem angestrebten Stärkederivat soll es möglich sein, viele Wirkstoffmoleküle gleichzeitig zu binden und zu transportieren.



Abbildung 2: schematische Darstellung von Cyclodextrin^[4]

Durch den angestrebten amphiphilen Charakter des Stärkederivats soll eine strukturell bedingte Selbstorganisation zu einem Nanoteilchen in wässrigem Medium erreicht werden. Die Ausbildung von supramolekularen Strukturen ohne Einwirkung von Außen, also lediglich auf Grund physikalischer Eigenschaften und Wechselwirkungen mit der direkten Umgebung, also dem Lösemittel, wird von Akiyoshi et al. bezüglich der Nanopartikelbildung von mit Cholesterol derivatisierten Pullulan beschrieben^[5]. Dass schon native Stärke zu solchen selbstorganisierten Strukturen neigt, wird schon beim Stärkenachweis mit Lugol'scher Lösung genutzt, bei der sich Iodmoleküle in die Helices der Stärke einbauen und eine charakteristische Blauverfärbung der Lösung bewirken (siehe **Abbildung 3**: Einschluss von Iod in die Stärke-Helix^[6]). Diese Verdrillung zu den Helices ist typisch für dieses Polymer. Bei Erwärmung entspiralisiert sich das Gerüst wieder und die typische Blaufärbung, die durch den Einschluss der Iodmoleküle verursacht wird, verschwindet wieder.



Abbildung 3: Einschluss von Iod in die Stärke-Helix^[6]

Dieser Test wird, leicht abgewandelt, auch in der Medizin zur Diagnostik von Hyperhidrose (übermäßiges Schwitzen) eingesetzt (Minor-Test). Der strukturelle Umbruch und die teilweise irreversible Umstrukturierung von Stärke bei Erhitzen werden auch schon beim Phänomen des Verkleisterns, bzw. der Gelatinisierung deutlich.

2.1.2 Supramolekulare Struktur von Stärke und anderen Polysacchariden

Die Stärkederivate sollen letztlich aus einem hydrophoben Teil, beispielsweise einer Alkylkette, Fettsäuren oder ähnlichem, welche man noch zusätzlich mit tumorspezifischen Liganden (Bsp. Folsäure) modifizieren kann, und einer hydrophilen Seite, die die Wasserlöslichkeit sicherstellen soll, gestaltet sein. Dabei stellt die Glukosepolymerkette das Grundgerüst dar. Die Ausbildung von Nanopartikeln durch hydrophobe Modifizierung von Polysacchariden, im Speziellen von Pullulan wird bereits von Akiyoshi beschrieben^[7, 8].



Abbildung 4: Struktur von Pullulan

Die Verbindung zwischen der Selbstorganisation zu Nanopartikeln und der amphiphilen Eigenschaften durch hydrophobe Substituenten, in der Regel Alkylketten oder ähnlichem, beschreibt Akiyoshi im Zusammenhang mit der Komplexierungsreaktion von substituiertem Pullulan und β -Cyclodextrin^[9]. Hierbei wird der Partikelverband des mit Cholesterol hydrophobisierten Pullulans durch den Einschluss der Cholesterolsubstituenten in die Kavitäten der Cyclodextrinmoleküle aufgelöst. Die erneute Freigabe der hydrophoben Seitenketten und damit die Rückbildung der Partikel erfolgt durch Zugabe eines besseren Komplexbildners mit Cyclodextrin, welcher das Cholesterol kompetetiv aus der Kavität verdrängt.

Zur Darstellung der Nanopartikel wird für die Derivate der hier beschriebenen Arbeit ein Verfahren angewandt, bei dem die Derivate in Ethylacetat löslich sein müssen. Mit einer ähnlichen Prozedur lassen sich hydrophobe Wirkstoffe in polymere Micellen einbauen^[10]. Bei der hier von Fournier et al. beschrieben Methode werden allerdings wasserlösliche Nanocarrier verwendet und die Wirkstoffmoleküle in Partikeln mit einer Kern-Hülle-Struktur und nicht in einer Matrix eingeschlossen.

2.1.3 Anwendungsgebiete der Stärke

Die Anwendungsgebiete der Stärke sind reichen von Nahrungsmittel, bzw. der Zubereitung selbiger^[11], über Füllmaterial^[12] bis hin zu Binde- und Verdickungsmittel für Soßen. Auch für die Kunststoffe verarbeitende Industrie ist die Stärke von Interesse, da sie einen ständig nachwachsenden Rohstoff darstellt, der auch für die Herstellung von biologisch abbaubarem Einweggeschirr und andere umweltfreundliche Kunststoffe^[12], wie auch Baumaterialien, geeignet ist. Darüber hinaus wird sie auch für haushaltsübliche Waren wie z.B. Waschmittel oder Stärke für Hemdskrägen verwendet. Außerdem stellt sie die Grundlage für die Herstellung von Hefe, Dextrin, Sorbit, Glukose (Traubenzucker) und Glukosesirup^[11] dar. Die Verkleisterungseigenschaften der Stärke und einiger Derivate macht man sich auch für die Herstellung von Tapetenkleister und Klebstoffen^[11], aber auch für Schmierstoffe^[1] zu Nutze. Die guten Bindungseigenschaften kommen wie beim Kochen auch bei der Herstellung von Farben und Papier zum Tragen. Selbst bei der Sprengstoffherstellung werden Stärkederivate, im Speziellen Stärkenitrate, eingesetzt^[11]. Für die meisten der genannten Verwendungszwecke wie auch die ihnen zu Grunde liegenden Eigenschaften der Stärke wird das Amylopektin verantwortlich gemacht, weswegen auch besonders an der Züchtung von teils genetisch veränderten Pflanzen gearbeitet wird, welche überwiegend oder sogar ausschließlich Amylopektin produzieren^[1].

Auch in der Medizin sind Stärkederivate von wachsendem Interesse. Es wird derzeit neben Dextran und Gelatine an kaltwasserlöslichen Stärkederivaten wie Hydroxyethylstärke aus Amylopektin und Ethylenoxid zur Prophylaxe und Therapie von Blutvolumenmangel geforscht^[13], wo letztere Derivate schon erfolgreich als Plasmaexpander und Kryoprotektoren^[14] eingesetzt werden. Sie bilden außerdem die Grundlage für Tabletten, Zäpfchen oder Salben^[11]. Für die Verwendung im Bereich des Drug Delivery ist Stärke bereits für thermoplastische Materialien für Kapseln erforscht worden^[15], ebenso, wie ihre Derivate als Kontrastmittel ins Auge gefasst werden^[16].

2.1.4 Stärkederivatisierung

Die Hydroxygruppen der Stärke bilden intramolekulare Wasserstoffbrücken aus, wodurch die eigentlich zu erwartende Hydrophilie herabgesetzt wird. Durch eine Modifikation mit hydrophoben Seitenketten werden diese Wasserstoffbrücken gebrochen. Bei einer geringen Derivatisierung ist der Anstieg der Hydrophilie durch den Bruch der H-Brücken stärker gewichtet als der Anstieg der Hydrophobie durch die Einführung hydrophober Seitenketten. Aus diesem Grund werden für die meisten Anwendungen nur niedrige Substitutionsgrade unter 0.2 angestrebt.

Veresterungsreaktionen sind eine bekannte Technik zur Senkung der Gelatinisierungstemperatur, zur Erhöhung der Lösungsstabilität natürlicher Stärkepolymere und zur Einführung von hydrophoben, hydrophilen, ionischen oder nicht-ionischen Gruppen, z.B. in Form von Acetaten oder Formiaten^[17]. Hierbei wird, auch für die Umsetzung mit längerkettigen Fettsäuren oder aromatischen Carbonsäuren auf die jeweiligen Anhydride oder Säurechloride zurückgegriffen^[18]. In ionischen Flüssigkeiten werden Substitutionsgrade (DS) von 0.7 bis zu 3.0 erreicht^[19]. Die vollständige Acetylierung wurde schon 1972 von Mark und Mehltretter^[17] erreicht. Der Einfluss des Amylosegehaltes der Stärke auf den erzielten Substitutionsgrad bei der Acetylierung wurde unter anderem bei Singh et al. untersucht. Hier waren Substitutionsgrade von 1.63 bis 2.55 realisiert worden^[20]. In diesem Zusammenhang stellten Singh et al. fest, dass der Substitutionsgrad direkt abhängig ist von der Stärkesorte und steigendem Amylosegehalt ein niedrigerer Substitutionsgrad einhergeht. Für mit Maleinsäureester sind DS-Grade von bis zu 1.87^[21], für Laurate und Stearate bis zu 2.26 respektive 2.39^[22] erreicht worden. Eine enzymatische Veresterung mit Hilfe von Kokosnussöl mit einem DS von bis zu 1.55 wird von Akhila et al. beschrieben^[23]. Ebenfalls durch Umesterungsreaktionen wie von Aburto et al. beschrieben können Laurinsäureester mit einem DS von bis zu 0.61 erreicht werden^[24]. Amphiphile Stärkederivate können durch hydrophobe Derivatisierung von hydrophhilen Stärkederivaten, z.B. nach Veretherung mit Ethylenoxid^[25], mit Laurin- oder Stearinsäure erhalten werden^[26]. Die Synthese von Hydroxypropyl-Stärke wurde von Schmitz et al. mit einem DS von 0.27^[27] vorgestellt, der höher ist, als der von der Food and Drug Administration für Hydroxypropyl-Stärke erlaubte Wert von 0.2. Andere hydrophobe Derivate erhält man durch Umsetzung von Stärke mit Oxazolin-Derivaten bis zu einem Substitutionsgrad von 0.1^[28]. Die Alkylierung von Stärke mit Methyl- oder Benzylgruppen, ausgehend von der 6-O-thexyldimethylsilyl-Verbindung,

zum regioselektiven 2,3-substituierten Produkt wurde von Petzold et al. beschrieben^[29]. Weitere regioselektiv substituierte Derivate erhält man wie von Chakraborty et al. beschrieben bei enzymkatalysierten Reaktionen^[30], wobei anwendungsbedingt keine DS-Grade über 0.2 angestrebt werden^[31].

Eine vollständige Veretherung der Stärke zu einem DS von nahezu 3 ist bisher nur für Methylierung^[32, 33] und Benzylierung^[34] bekannt, nicht aber für längere Alkylketten. Ein Erreichen eines Substitutionsgrades von drei ist bei Stärke aufgrund der hohen Verzweigung des Amylopektins an Position C6 nicht möglich. Die hohen DS werden überwiegend durch hohe Temperaturen oberhalb der Gelatinisierungstemperatur erreicht. Carboxymethylierte Stärke mit einem DS bis zu 1.4^[35] in einem Schritt, Derivate mit einem DS bis 2.1^[31] in mehreren Schritten, wurden dargestellt. Ebenfalls bekannt sind Acylierungen der Stärke mit Resten von acht bis 18 Kohlenstoffeinheiten und die Umesterung mit n-Oktan-, Laurin- und Palmitinsäure-Methylester oder Essigsäureanhydrid^[36]. Für die Veresterung der Stärke mit Fettsäuren wird üblicherweise das Säurechlorid mit Pyridin verwendet. Doch schon aus ökonomischen Gründen empfiehlt sich der Verzicht auf Säurehalogenide und stattdessen der Gebrauch von Fettsäureester^[37].

Veresterungsreaktionen von Stärke mit den Fettsäuren Vinyl-Laurate und Stearat wurden bereits beschrieben. Hier wurden DS von 0.24 - 2.96 unter Verwendung der Basen Na₂HPO₄, K₂CO₃ und Na-Acetat in DMSO bei 110 °C erreicht^[38]. Aburto et al. gelatinisieren die Stärke vor der Veresterung mit Fettsäurenchloriden um ohne Lösemittel arbeiten zu können^[39]. Im Fall von Oktanylstärke wurden so Substitutionsgrade von bis zu 1.8 erreicht. Für Fettsäuren mit sieben Kohlenstoffeinheiten wurden sogar DS von bis zu 3 beschrieben^[40].

2.2 Polyvinylalkohol

2.2.1 Verwendung von Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) ist neben Polypropylen (PP), Polystyrol (PS) und Polyvinylchlorid (PVC) ein in der Industrie gängiges Polymer und findet Anwendung unter anderem in der Herstellung von Textilfasern, in der Papierindustrie, als Stabilisator für Emulsionen und bei medizinischen Problemstellungen^[41]. Seine Bioverträglichkeit ist bekannt, was zum Beispiel eine Anwendung in sensiblen Gebieten wie dem Auge in Form von Kontaktlinsen^[42] oder bei Langzeitimplantaten^[43] ermöglicht. Auch als Plasmaexpander wird PVA derzeit genutzt^[44]. Die Verträglichkeit und Verteilung im Organismus wurde schon 1995 von Yamaoka et al. untersucht^[45]. Hierbei wurde festgestellt, dass PVA nur geringfügige Interaktionen eingeht mit Zellkomponenten wie Makrophagen und Blutzellen und auch nur geringfügig in den Zellen akkumuliert.

2.2.2 Modifikation von Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol selbst wird durch Polymerisation von Vinyl-Acetat zu Poly-(Vinyl-Acetat) Polyvinylalkohol^[41] anschließender Hydrolyse zu synthetisiert. Über eine und Funktionalisierung des PVA mit Acetylen- und Azid-Gruppen nach vorangehender Aktivierung des Alkohols mit Carbonyl-Diimidazol eröffnete Ossipov et al. die Möglichkeit der Erzeugung von Hydrogelen via "Clickchemie"^[46]. Hierbei wird eine Modifikation von eins bis fünf Prozent angestrebt, um die Wasserlöslichkeit nicht zu gefährden. Über eine Derivatisierung des PVA mit Oleinsäure konnten Micellen mit hydrophoben Wirkstoffen dargestellt werden^[47]. Auch Oster et al. machten sich die Biokompatibilität von PVA zu Nutze und verwendeten es als Rückgrat für ihr Blockcopolymer mit Poly-(D,L-Milchsäure-co-Glykolsäure) (PLGA)^[48]. Eine einfache Methode zur Derivatisierung wird von Gacal et al. via Click-Chemie vorgestellt^[49]. Die Bioabbaubarkeit via Enzyme und der entsprechende Mechanismus wurden von Matsumura et al. beschrieben^[50].

2.3 Nanopartikel

2.3.1 Allgemeines

Nanopartikel sind Atom- oder Molekülverbände, die insgesamt einen Größenbereich von etwa 1 – 100 nm abdecken^[51]. Es können sich demnach von wenigen bis zu tausenden Atome oder Moleküle in einem solchen Zusammenschluss befinden. Sie sind keineswegs ein rein synthetisches Phänomen der Neuzeit. Bereits die Ägypter zur Zeit der Pharaonen setzten sie ein. So wurde feiner Russstaub in Tinte, oder Gold in Glasschmelzen (klassische rubinrote Farbe) eingesetzt. Wie man schon aus der unerwarteten Farbgebung von in Glas eingeschmolzenem Gold mit dem heutigen Wissen der Präsenz von Nanoteilchen schließen kann, weisen diese Partikel im Allgemeinen chemische und physikalische Eigenschaften auf, die sich deutlich von denen der Festkörper oder zumindest deutlich größeren Teilchen unterscheiden. Zu diesen Eigenschaften zählen neben bereits erwähnten optischen Eigenschaften der Metall-Nanoteilchen auch noch elektrische Leitfähigkeit und chemische Reaktivität. Erstere wird besonders in der Computerindustrie, letztere bei der Verwendung von Katalysatoren genutzt. Zu den wohl bekanntesten Nanoteilchen zählen die Kohlenstoffverbände der Fullerene und die Nanotubes (siehe Abbildung 5: Fulleren C-60 und Abbildung 6: "bucky balls" und Nanotube^[52]).



Abbildung 5: Fulleren C-60



Abbildung 6: "bucky balls" und Nanotube^[52]

Beide gehören zu den synthetischen Nanoteilchen, die in der Natur in dieser Form nicht auftreten. Im Gegensatz hierzu gibt es dennoch Teilchen, die durch natürliche Prozesse und Gegebenheiten in die Umwelt freigesetzt werden.

2.3.2 Darstellung von Nanopartikeln

Zu den in im vorangehenden Kapitel angesprochenen Nanoteilchen, die in der Natur durch natürliche Prozesse entstehen können zählen unter anderem carbon blacks, feinste Russteilchen, wie sie bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden freigesetzt werden. Polymere Micellen weisen in wässriger Lösung bei einer Größenordnung von 10 - 60 nm einen Kern-Hülle-Aufbau auf. Hierbei zeigt die hydrophile Seite nach außen, die hydrophobe Seite zum Mittelpunkt hin^[53].

Für die Herstellung von Nanoteilchen haben sich mehrere Verfahren etabliert, unter anderem chemische Herstellungsmethoden aus Lösungen, wie zum Beispiel durch das Sol-Gel-Verfahren^[54], eine Ausfällung der Teilchen^[54] oder der Hydrothermalsynthese^[55]. Die Herstellungsmethoden Sprüh-Trocknen, Verdampfung-Kondensation, Flammensynthese, Laser- und Heißwandreaktionen oder chemische Gasphasenabscheidung (CVD-Verfahren) und Reaktionen im Plasma zählen ebenso wie die gezielte Nukleation von Molekülen aus der Gasphase, der Aerosol-Prozess zu den Gasphasenreaktionen^[54]. Durch selbstorganisiertes Wachstum auf Oberflächen oder mit Templaten, direkte mechanische Behandlung von Grundmaterial, also Zermahlen^[56], und Elektrospraying^[57] können ebenfalls nanoskalige Strukturen gewonnen werden.

Für die Synthese von Polymeren, Copolymeren und ähnlichen Strukturen, die für die Darstellung von Nanopartikeln genutzt werden können, hat sich die Atom-Transfer-Radikal-Polymerisation (ATRP) bewährt und es wurden auf diesem Weg schon viele amphiphile Polymere hergestellt^[58]. Die hydrophobe Modifikation von Polymeren welche dann selbständig Nanopartikel ausbilden, wurde für Pullulane von Kuroda beschrieben^[59]. Ebenfalls die Ausbildung von Micellen durch Assoziation von mit langen Alkylketten derivatisiertem Poly(2-vinylpyridin) ist bekannt^[59]. Einige der publizierten Stärkederivate wurden verlinkt um große und stabile Partikel, passend zur jeweiligen Anwendung, zu bilden^[60]. Durch ein solches Vernetzen der Stärkematrix werden die Microsphäreneigenschaften beeinflusst und somit z.B. eine Wirkstofffreisetzung gesteuert^[61].

Nanosphären aus Poly(methylcyanoacrylate) und Poly(ethylcyanoacrylat) werden von Brigger et al. beschrieben^[62]. Ein anderes Polymer, dass bereits für gezielten Wirkstofftransport verwendet wird ist Polyvinylalkohol, welcher mit Oleinsäuregruppen hydrophob modifiziert wurde^[47].

Für die Verkapselung von Wirkstoffen für Haut, Nägel und Haar findet Boltorn H30, ein Polyalkohol mit dendritischer Struktur mit 32 terminalen Hydroxylgruppen (siehe **Abbildung 7**: Struktur des verzweigten Boltorn® Polymers^[63]) und einem Mol-Gewicht von 3600 Dalton, Anwendung^[63].



Abbildung 7: Struktur des verzweigten Boltorn® Polymers^[63]

2.3.3 Verwendung von Stärke für die Formulierung von Nanopartikeln

Viel versprechend sind Nanopartikel aus derivatisierter Stärke wegen ihrer Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit. Letztere ist zwar als geringer zu erwarten bei Stärkederivaten im Vergleich zu nativer Stärke^[64], dennoch sollte sie bei genügend geringer Modifikation ausreichend hoch sein, um eine etwaige Akkumulation im Körper zu vermeiden. Als Naturprodukt ist die native Stärke wegen der großen Präsenz und der relativ einfachen Gewinnung aus großflächig angebauten Agrarprodukten wie Kartoffeln und Mais mit einem Preis von derzeit etwa 390 – 400 € pro Tonne (Stand2010) sehr günstig. Die hohe Molmasse von Stärke beträgt je nach Herkunft um die 2000 kDa und mehr und vereinfacht die Handhabung bei chemischen Modifikationen durch die einfachere Aufreinigung der Produkte. Nanopartikel können auf verschiedene Art und Weise gebildet werden. Zum einen kann durch spontane eigenständige Akkumulation kleinerer Untereinheiten mit unterschiedlich polarisierten Enden Micellen ausgebildet werden. Zum anderen können auch wegen intermolekularer Wechselwirkungen oder durch Zusammenfalten von Polymerketten aufgrund hydrophober Wechselwirkungen der Polymerkette intra- oder intermolekular mit einem dem Lösemittel entgegengesetzt hydrophilen oder hydrophoben kleineren Molekül Partikel ausgeformt werden. Eine solche selbständige Ausbildung von Partikeln von Pullulan mit einer Modifikation mit Cholesterol mit einem DS von 0.016 wird von Akiyoshi et al. vorgestellt^[65]. Sollte nicht auf eine spontane Selbstformulierung von Partikeln zurückgegriffen werden können, besteht auch die Möglichkeit, eine hydrophobe Komponente in einem entsprechenden Lösemittel gelöst mit einem polaren Lösemittel mit einem Emulgator zu vermischen und nach gründlicher Durchmischung das organische Solvent zu entfernen (solvent evaporation method). Bei dieser Methode sollte sich die Partikelgröße bis zu einem bestimmten Maß durch Variation der Konzentrationen beeinflussen lassen können. Rout et al. zeigen in einer Vergleichsstudie den Einfluss Formulierung mittels der angesprochenen "solvent evaporation method", welche bei Losartan-Mikrosphären zu einer Partikelgröße von etwa 40 - 50 nm führt, und der "w/o emulsion solvent evaporation method", die zu Partikeln einer Größe von etwa 126 – 150 nm führt.

2.4 Medizinischer Hintergrund

2.4.1 Allgemeines

Die Medizin steht immer häufiger vor dem Problem, Krankheiten und Erreger zu bekämpfen, welche immer resistenter und aggressiver werden. Auch die auftretenden Nebenwirkungen der bekannten Behandlungsmöglichkeiten fallen entsprechend stärker ins Gewicht. Um dieser Herr zu werden, muss die Medizin auf spezifische Medikamente zurückgreifen, um die schädlichen Nebenwirkungen möglichst einzuschränken und gezielt auf Krankheiten zu reagieren. Allzu oft stellt aber die Pharmakodynamik von Substanzen, die als hochpotente Wirkstoffe bekannt sind, zum Beispiel wegen mangelnder Wasserlöslichkeit, ein Problem dar. Diese Wasserlöslichkeit stellt nun aber eine Grundbedingung für den Transport eines Wirkstoffes im Körper, und damit einer effektiven Wirksamkeit, dar.

Der Transport nahezu jeder Substanz im menschlichen Organismus verläuft über den Blutkreislauf. Dieser stellt ein wässriges Milieu mit einem fest eingestellten pH-Bereich dar, welcher eine nur sehr geringe Abweichung verträgt. Demnach müssen Wirkstoffe, um zu einem Wirkort transportiert werden zu können, wasserlöslich sein und dürfen nur einen geringen bis gar keinen Einfluss auf den pH-Wert des Blutes haben. Je unlöslicher eine Substanz ist, desto länger kann es dauern, bis der Wirkstoff an seinen Bestimmungsort gelangt, sollte überhaupt ein Transport stattfinden. Darüber hinaus ist durch eine geringe Wasserlöslichkeit auch die Aufnahme des Wirkstoffes eingeschränkt, da er bei enteraler Verabreichung zunächst über den Magen-Darm-Trakt resorbiert werden muss. Dies kann zwar durch eine parenterale Verabreichung, z.B. Infusionen oder intravenösen Spritzen, umgangen werden, würde dann aber direkt im wässrigen Medium als wasserunlösliche Substanz zu Schwierigkeiten führen.

Eine völlig andere Form der Verabreichung stellen Implantate dar, welche die Medikamente über einen längeren Zeitraum oder auf Grund eines von Außen einwirkenden Impulses abgeben^[66]. Diese Methode funktioniert jedoch nur mit von vornherein in Wasser löslichen Substanzen.

An diesem Punkt treten nun so genannte Carrier mit hoher Bindungsaffinität für das Wirkstoffmolekül und hoher Hydrophilie, in den Vordergrund. Da auch die Carrier-Moleküle dem normalen Abbau im Organismus unterliegen, ist es besonders wichtig, auf solche Substanzen zurückzugreifen, die in ihren Abbauprodukten aus toxikologisch unbedenklichen Stoffen bestehen. Cho et al. beschreibt diese Methode der Verkapselung von Wirkstoffen in Partikeln oder Micellen aus Polymeren mit einer Größe von drei bis 200 nm^[67]. Für polymere Nanopartikel werden Materialien wie Albumin-Taxol (Abraxane) oder PGA-Taxol (Xyotax) verwendet. Für polymere Micellen werden Materialien wie PEG-pluronic-DOX und PEG-PAA-DOX genutzt. Darüber hinaus werden von Cho et al. hier auch von Carriersystemen aus Dendrimeren (z.B. PAMAM-MTX), Liposomen (z.B. pegyliertes liposomales DOX), viralen Nanopartikeln (z.B. HSP-DOX) und Kohlenstoffnanoröhren (z.B. CNT-MTX) beschrieben. Insbesondere Stärke bietet sich als Gerüstmolekül an, da sie im Organismus zu Glukoseeinheiten abgebaut werden kann. Lediglich bei der Wahl der Substituenten zur Darstellung des amphiphilen Endproduktes ist auf toxikologische Aspekte zu achten. Daher bieten sich bisher besonders Polyphosphate wegen ihrer Biodegradierbarkeit z.B. durch Enzyme (Phosphatasen), und ihrer Biokompatibilität zu natürlich auftretenden Nuklein- und Teichoinsäuren an^[58]. Stärke und andere Polysaccharide als Trägermaterial für die Verkapselung und den Transport von Wirkstoffen werden von Bornschein et al. aufgegriffen^[68].

Für die Medizin ist eine Maskierung negativer Eigenschaften, seien es Geruchs- oder Geschmackseigenschaften, wie auch eine gleichmäßige Abgabe des Wirkstoffes und damit ein Erhalt eines gleichmäßig therapeutisch wirksamen Plasmaspiegels von Interesse^[68]. Die Freigabe des Wirkstoffes über längere Zeit, sei es durch langsamen Abbau einer Hülle, oder langsame Diffusion durch Selbige, würde gerade dies ermöglichen. Im Hinblick der Anwendung zur Krebsbekämpfung wird davon ausgegangen, dass Nanoteilchen für eine längere Aufenthaltszeit im Kreislauf kleiner als etwa 100 nm sein und eine hydrophile Oberfläche aufweisen sollten, um eine körpereigene Abwehrreaktion über Makrophagen zu vermeiden^[53, 62, 69]. Dadurch können sich die Wirkstoffe in dem betreffenden Gewebe ansammeln und die Verteilung der Wirkstoffe in Gewebe und Zellen mittels der Carrier direkt mit beeinflusst werden^[62]. So nutzte Li et al. Nanopartikel aus funktionalisiertem Dextran um das Krebsmedikament Doxorubicin einzuschließen und zu den Nuklei der Krebszellen zu transportieren^[70]. Hierbei liegt die Wirkstoffbeladung bei etwa 9 Gew. %. Allerdings wird der gezielte Transport von Wirkstoffen auch durch die Zeit, welche die Teilchen im Kreislauf zu finden sind, eingeschränkt. Diese wird mit nur etwa drei bis fünf Minuten nach Injektion angegeben^[62]. Die Ausscheidung der Partikel und damit der evtl. noch nicht freigegebenen Wirkstoffe erfolgt größtenteils über Leber, Niere und das Immunsystem^[71]. Die Fähigkeit der

Nanoteilchen, gezielt Wirkstoffmoleküle reversibel zu binden und damit zu transportieren, macht sie geeignet für die angestrebten Anwendungen in der Medizin. Der gezielte Einschluss von Molekülen hydrophober Natur in ein partiell hydrophob modifiziertes Molekül wurde bereits bei Cyclodextrin erreicht^[72, 73]. Der große Nachteil allerdings ist, dass je Cyclodextrinmolekül in der Regel nur ein oder zwei Wirkstoffmoleküle transportiert werden können. Dies führt einen entsprechend großen Materialaufwand mit sich und damit hohe Kosten. Andere Nanopartikel, die sich erst in Lösung bilden und dabei die Wirkstoffmoleküle einschließen, sind in der Lage je Polymermolekül gleich mehrere Wirkstoffmoleküle einzuschließen und zu transportieren.

Eine weitere Anwendung von Nanopartikeln als Carrier im medizinischen Bereich ist die lokale Administration mittels externer Magnetfelder wie von Alexiou beschrieben^[74, 75]. Hierbei werden die Wirkstoffmoleküle über Phosphatreste an ein Stärkerückgrat gebunden. Diese formen Nanopartikel um Eisenoxidmoleküle, welche durch Anlegen eines starken Magnetfeldes in einer deutlich verstärkten Ansammlung im bestrahlten Gewebe nachgewiesen werden kann. Hier soll also nicht der reversible Einschluss des Wirkstoffes die Eigenschaften der Nanopartikel nutzen, sondern der Einschluss der Eisenoxidmoleküle, welche die Transportierbarkeit der Wirkstoffe verstärken soll, indem er einen gerichteten Transport ermöglicht. In diesem Fall sind die Wirkstoffmoleküle aber nicht einfach eingeschlossen und können durch Öffnen der Partikel langsam freigesetzt werden, sondern es müssen zunächst die Bindungen zu den Phosphatgruppen des Stärkerückgrades gelöst werden. Allerdings können auf diesem Weg Nebenwirkungen durch Belastung unbetroffenen Gewebes deutlich minimiert werden. Es wurden von Alexiou unter anderem superparamagnetische Partikel von Eisenoxid (Fe₃O₄) eingesetzt^[75]. Diese bilden, von Stärke ummantelt und mit dem ionisch gebundenen Chemotherapeutikum Mitoxantron, Teilchen der Größenordnung von 100 - 250 nm aus. Durch diese Transportwege aus über Nanoteilchen gebundene Wirkstoffe und gezieltem Transport durch externe Magnetfelder konnte bereits eine Reduktion der Menge an benötigtem Therapeutikum auf etwa 20 % erreicht werden, was zum Ausbleiben von Nebenwirkungen führte^[75]. Die Freisetzung eines Wirkstoffes aus einem Nanoteilchen erfolgt, je nach bildendem Polymer, einmal durch den Abbau der Hülle, sofern der Wirkstoff eingekapselt und nicht an der Oberfläche gebunden vorliegt, oder, besonders bei quellfähigen Polymeren, durch Diffusion des Wirkstoffes aus der Hülle des Nanopartikel^[68]. Eine pH-

abhängige Freisetzung des Wirkstoffes durch Destabilisierung von Micellen wurde bereits beschrieben^[53].

Ein gängiges Problem bei der Verabreichung verkapselter Wirkstoffe ist die Freisetzung. So beschrieb Ringsdorf den prinzipiellen Aufbau eines synthetischen Polymers mit separat gekoppelten Gruppen zur Löslichkeitsvermittlung, zum Targeting und dem reversibel gebundenen Wirkstoff^[76].



Abbildung 8: Ringsdorf-Model für Wirkstofftransportsysteme auf der Basis synthetischer Polymere^[76]

Wird der Wirkstoff, wie im Fall von Alexiou^[77] beschrieben, kovalent über Phosphatgruppen an das Trägermaterial gebunden ist eine Freisetzung erschwert. Außerdem wird in diesem Fall auch die Partikelbildung durch Umhüllen von Eisenoxid von kommerziell erhältlichem Ferrofluid erreicht. Dieses kann zwar zu einem gerichteten Wirkstofftransport durch Anlegen eines externen Magnetfeldes genutzt werden, die Verträglichkeit für den Organismus ist aber zweifelhaft. Für die Freisetzung des Wirkstoffes ist es entscheidend, ob dies langsam über eine längere Zeitspanne geschieht oder der Großteil des Wirkstoffes bereits nach kürzester Zeit die Partikel verlassen hat, welches man den "burst effect" nennt. Eine kovalente Bindung eines Wirkstoffes ist darüber hinaus auch sehr einschränkend, was die Beladbarkeit betrifft. Chakraborty et al. beschreibt Nanopartikel aus Wachsmaisstärke mit Glycerol als Weichmacher und Glyoxal als Vernetzer^[78]. Kataoka entwickelte ein Block-Copolymer aus Polyethylenglycol (PEG), welches für Wasserlöslichkeit sorgen soll, und Poly(α,β-aspartic acid), an welches der Wirkstoff Doxorubicin kovalent gebunden wurde^[79]. Dieses Polymer bildet Partikel mit einem Kern-Hülle-Aufbau. Neben der kovalenten Bindung besteht die Möglichkeit die Wirkstoffe durch hydrophobe, respektive hydrophile, Wechselwirkungen mit den Seitenketten des Backbones nach dem core-shell-Prinzip einzuschließen. Erste Einschlussverbindungen von hydrophoben Wirkstoffen sind bereits mit Cylodextrin von Suzuki^[80] et al und Meister et al.^[80, 81], hydrophile Systeme mit Poly(vinylpyrrolidon) von Brennan - Peppas^[82] veröffentlicht worden. Ein entscheidender Nachteil der Cyclodextrine ist die bereits erwähnte geringe Beladbarkeit und der damit verbundene hohe Materialaufwand. Nanopartikel zeigen, wie andere Makromoleküle auch, den sogenannten EPR - Effekt, den "enhanced permeability and retention effect". Dieser bezeichnet das Phänomen der passiven Anreicherung von Makromolekülen, Liposomen oder Nanopartikeln in Tumorgeweben und stellt eine Variante des passiven drug targeting, also des passiven gezielten Wirkstofftransportes, dar^[83]. Hierbei kommt der Umstand zum Tragen, dass Tumorgewebe von Gefäßen durchzogen ist, welche unorganisiert und löchrig sind^[84]. Über diese größeren Lücken können Teilchen in der Größenordnung der besagten Nanopartikel von bis zu 200 nm in die Zelle eindringen (siehe **Abbildung 9**: Schematische Darstellung des EPR-Effekts^[76]).



Abbildung 9: Schematische Darstellung des EPR-Effekts^[76]

Die Partikel mit dem Wirkstoff sollen über Endocytose von den Zellen aufgenommen werden, den Wirkstoff freisetzen und anschließend wird das Trägermolekül enzymatisch abgebaut und via Exocytose wieder ausgeschieden.



Abbildung 10: Zelluläre Aufnahme durch Endocytose, Freisetzung des Wirkstoffes, Metabolisierung des Trägermaterials und Exkretion durch Endocytose

Bei Anwendungen in der Medizin stellt die Bioverfügbarkeit ebenso wie die Biokompatibilität ein wichtiges Kriterium dar. Die verwendeten Medikamente sollen nach Möglichkeit keine oder nur schwache Nebenwirkungen auf den menschlichen Organismus aufweisen. Außerdem soll das Medikament sich gut applizieren lassen und sich gleichmäßig im Körper verteilen oder im Idealfall direkt an den Wirkort transportiert werden. Ein solcher gerichteter Transport der Wirkstoffe kann einerseits die dort anzutreffende Dosis erhöhen, gleichzeitig aber Schädigungen an gesunden Organen und Geweben deutlich reduzieren. Hierfür ist eine genauere Kenntnis des Organs oder Gewebes notwendig. Yang et al. untersuchte die Möglichkeit des gerichteten Transports durch Anbindung eines Liganden der für Rezeptoren am Wirkziel spezifisch war^[85]. Es exprimieren zum Beispiel einige Krebsarten an der Zelloberfläche Rezeptoren für Folsäure in verstärkter Anzahl. Für die Wirksamkeit der Folsäure als Rezeptor ist nicht zwangsläufig eine unveränderte Struktur nötig. Unter Beibehalt der spezifischen Funktionalität des Moleküls, die eine Wechselwirkung mit den Rezeptoren eingeht, erleichtert eine Verknüpfung der Folsäure, respektive des davon abgeleiteten Derivats, ohne Wirkungsverlust. Leamon stellte einen Zusammenhang her zwischen der Funktionalität der Folsäure und der Spacerlänge mit welcher das Folsäurederivat an den entsprechenden Träger geknüpft wurde^[86, 87].



Abbildung 11: Struktur der Folsäure

Die Kenntnis über diese Überexpression der Folsäurerezeptoren an Krebszellen wurde schon öfter ausgenutzt. So wurden 2005 Micellen aus hydrophob modifiziertem Polyvinylalkohol untersucht, die zusätzlich zu lipophilen Antikrebswirkstoffen auch noch mit freier Folsäure beladen wurden^[47]. Den gezielten Transport von Molekülen in Zellen untersuchte bereits 1991 Leamon et al.^[88]. Die kovalente Bindung von Folsäure für den gerichteten Wirkstofftransport wurde von Lu et al. 1999 beschrieben. Hierbei wird Folsäure an das Enzym Penicillin-V Amidase geknüpft um ein Doxorubicin Pro-Pharmakon zielgerichtet zu Zellen zu transportieren, wo das Pro-Pharmakon durch dort ansässige Enzyme von seiner inaktiven Form in seine aktive Form umgewandelt werden soll^[89]. Darüber hinaus zeigte man mittels in vitro Assays, dass mit Folsäure modifizierte Derivate des Enzyms Penicillin-V Amidase konjugiert mit dem Iodisotop ¹²⁵I spezifisch an Folsäurerezeptoren positive KB Zellen bindet, nicht jedoch an A549 Zellen, welche keine Folsäurerezeptoren aufweisen^[89]. Vinogradov zeigte, dass die Modifizierung eines Nanogel zu einer um das zehnfach höheren Aufnahme in Krebszellen des Typs MCF-7 (menschliche Brustkrebszellen) führt als ohne eine solche Derivatisierung^[90]. Das amphiphile, sehr stark verzweigte Copolymer Boltorn H40 (siehe auch 2.3.2 Darstellung von Nanopartikeln) wurde von Chen et al. mit Folsäureliganden versehen^[91]. Ebenfalls konnte erfolgreich das Mosaic Virus der Augenbohne, ein bekannter Nanopartikel, der bereits zuvor häufiger in der Nanobiotechnologie Anwendung findet, mit einem PEG-Derivat der Folsäure modifiziert werden, wodurch die ihm eigene Interaktion des Mosaic-Virus mit Säugetierzellen überwunden und auf die Interaktion mit speziellen Zellen umgelenkt werden konnte^[92].

2.4.2 Zytostatika

Zytostatika sind bereits seit etwa 100 Jahren als Wirkstoffe zur Bekämpfung von Krebs bekannt^[93]. Zu den ältesten Zytostatika gehören die sogenannten Alkylantien. Dies sind Moleküle, die Alkylgruppen auf die DNA übertragen können^[94]. Zu diesen Alkylantien zählen die N-Lost-Derivate, wie z.B. Cyclophosphamid (Endoxan[®])^[93], Ifosfamid (Haloxan[®])^[93], Trofosfamid (Ixotan[®])^[93], Melphalan^[94] und Chlorambucil^[94]. Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut (siehe **Abbildung 12**: Struktur von (A) Cyclophosphamid (Endoxan[®])^[93], (B) Ifosfamid (Haloxan[®])^[93] und (C) Trofosfamid (Ixotan[®])^[93]).



Abbildung 12: Struktur von (A) Cyclophosphamid (Endoxan[®])^[93], (B) Ifosfamid (Haloxan[®])^[93] und (C) Trofosfamid (Ixotan[®])^[93]

Ebenfalls als Alkylantien wirken Alkylsulfonate wie Busulfan^[93], Nitrosoharnstoffe wie Carmustin und Lomustin^[94], das Triazenderivat Dacarbazin^[94] und Thiotepa^[94, 95].

Als eine der potentesten Chemotherapeutika wird die Gruppe der Platinanaloga angesehen. Zu diesen gehören Cisplatin^[94], Carboplatin^[94, 95] und Oxaliplatin^[95]. Diese Analoga vernetzen durch kovalente Bindung an N7-Position der Guaninreste der DNA^[94].

Interkalantien, eine weitere Gruppe der Chemotherapeutika, verhindern die Anbindung der Polymerasen^[95]. Hierzu gehören Anthracycline wie Doxorubicin (Adriamycin)^[95], Epirubicin^[95] und Idarubicin^[95]. Gerade Idarubicin und Mitoxantron werden als potente Alternative zu Doxorubicin gehandelt^[95].

Aber auch Antibiotika können eine antineoplastische Wirkung aufweisen. Hierzu gehören das Radiomimetikum Bleomycin^[96], Actinomycin D (Dactinomycin)^[95] und Mitomycin-C^[96]. Mitomycin-C z.B. wirkt ähnlich wie die Platinanaloga, aber an O6-Position des Guanins^[94].

Die Gruppe der Taxane ist bereits seit den 60er Jahren als Bestandteil der pazifischen Eibe (Taxus brevifolia) bekannt, allerdings erst seit der Möglichkeit der Synthese auch für die Behandlung von Brust-, Prostata- und Hautkrebs von Interesse^[97]. Hierzu gehören Paclitaxel (Taxol)^[98] und Docetaxel (Taxotere)^[98]. Paclitaxel eghört zu den Wirkstoffen, welche auf das Zytoskelett einwirken^[99]. Ebenfalls auf das Zytoskelett wirken die Mitosehemmer Vincristin (Oncovin)^[99] und Vinblastin^[99].

Topoisomerasen I und II sind Enzyme, die gezielte und reversible Unterbrechungen im DNA-Strang verursachen und z.B im Fall von Topoisomerase I durch Camptothecin^[100] oder im Fall der Topoisomerase II durch Etoposid (VP16)^[101] oder Teniposid (VM26)^[101] gehemmt werden können.

Antimetabolite wie der Folsäureantagonist Methotrexat werden als falsche Bausteine in DNA und RNA eingebaut. Folsäure und Methotrexat hemmen sich hierbei gegenseitig^[102].

Die genannten Zytostatika sollen hier nur einen knappen Überblick darstellen und können natürlich noch erweitert werden.

2.4.3 CAM-Modell

Die chorioallantoische Membran von Hühnerembryos (CAM) ist eine bekannte Alternative zu humanen in vivo Modellen für Angiogenese- und Toxizitätstests. Im Zuge des einführend beschriebenen BMBF-Projektes, zu dem diese Arbeit einen Teilbeitrag darstellt, wird das CAM-Modell als alternatives in vivo Testsystem entwickelt und evaluiert, um die Effizienz des gezielten Transportes auf dem Level eines voll funktionstüchtigen Gewebes unter reellen Bedingungen zu untersuchen, ohne dabei auf arbeitsintensive oder schmerzhafte in vivo Tests zurückgreifen zu müssen. Außerdem verursachen Tests am lebenden Organismus in Deutschland einen bürokratischen Aufwand und sollten auch aus Tierschutzgründen solange wie irgend möglich umgangen werden.



Abbildung 13: CAM-Modell^[103]

Nach insgesamt etwa 17 Tagen nach Beginn des Experimentes muss abgebrochen werden, da ab diesem Zeitpunkt die Entwicklung des Embryos soweit fortgeschritten ist, dass von einem Tierversuch gesprochen werden müsste. Die neu entwickelte Methode erlaubt die Kultivierung und Quantifizierung von CaCo-2 Krebsgeweben auf dem CAM-Gewebe. Dieses Modell verspricht ein ausgesprochen nützliches Werkzeug zu sein zur Untersuchung von parenteraler Verabreichung von Medikamenten oder dem Wirkstofftransport aktueller Zytostatika.

3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Formulierung von Nanopartikeln zum effektiven und gerichteten Transport von hydrophoben Krebsmedikamenten. Hierfür gilt es verschiedene Vorraussetzungen zu beachten. Angefangen bei einem Ausgangsmaterial, das wegen der Anwendung in der Medizin eine hohe Biokompatibilität und um Akkumulation im Organismus zu vermeiden auch Bioabbaubarkeit aufweisen muss. Stärke erfüllt bekannterweise beide Bedingungen. Für den erfolgreichen Einschluss der zumeist hydrophoben potenten Antineoplastika muss dieses Grundmaterial entsprechend hydrophob modifiziert werden um attraktive Wechselwirkungen zwischen der Partikelmatrix und dem Wirkstoffmolekül zu erreichen. Diese Synthese soll ökonomisch und reproduzierbar sein und einem upscaling nicht entgegenstehen. Bei der Beladung der Partikel soll eine hohe Beladungseffizienz, also eine möglichst vollständige Verkapselung des vorliegenden Wirkstoffes, und eine hohe Beladungskapazität, also ein günstiges Massenverhältnis von Wirkstoff und Matrixmaterial, erreicht werden. Die Freisetzung des Wirkstoffes soll ebenfalls ins Auge gefasst werden. Zusätzlich soll die Partikelgröße in einem Rahmen von 100 - 200 nm liegen, um die Distribution im Körper und die Aufnahme in die Zellen zu ermöglichen und eine enge Größenverteilung besitzen. In einem nächsten Schritt soll eine Modifikation der Partikel mit zellspezifischen Liganden erfolgen. Dadurch wird der zielgerichtete Transport ermöglicht. Die unbeladenen Partikel sollen möglichst keine Nebenwirkungen wie eine eigene Cytotoxizität aufweisen.

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Allgemeine Synthese der Stärkederivate

Es konnten über die bereits beschriebenen Stärkederivate^[104] mit Alkylketten bis Hexylketten und Substitutionsgraden von bis zu 1.45 hinaus Derivate mit höheren Substitutionsgraden von bis zu 2.95 und längeren Alkylketten bis zu einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffeinheiten synthetisiert werden. Dieser Reaktion liegt eine Williamsonsche Ethersynthese zu Grunde (siehe **Abbildung 14**: Allgemeines Reaktionsschema zur Synthese der Stärkederivate). Dabei werden zunächst die OH-Gruppen durch die Base deprotoniert um im Anschluss nukleophil am Halogenalkan angreifen zu können.

Der Synthese der Stärkeether liegt eine Williamsonschen Ethersynthese zu Grunde.



Abbildung 14: Allgemeines Reaktionsschema zur Synthese der Stärkederivate

Der allgemeine Mechanismus der Reaktion ist bekannt und soll hier nur in groben Zügen am Beispiel der Synthese von Propylstärke mit einem DS von 1.0 bei einer Derivatisierung an der C6-Position aufgezeigt werden. Dabei werden zunächst die Hydroxygruppen der Stärke durch NaH deprotoniert, wobei H₂ entsteht.



Abbildung 15: Deprotonierung der AGU (Anhydro-Glukose-Unit)
Dieses Molekül seinerseits greift mit einem freien Elektronenpaar nucleophil am halogenierten Kohlenstoffatom eines Halogenalkanmoleküls an und bildet durch Eliminierung des Halogens den Ether.



Abbildung 16: Nucleophiler Angriff der deprotonierten AGU am Halogenalkan

Es wurde für die Synthesen Stärke von unterschiedlichen natürlichen Quellen verwendet, um den Einfluss des Amylosegehaltes auf die Reaktion und den erreichten Substitutionsgrad zu untersuchen (siehe **Tabelle 1**: Verwendete Stärkesorten).

Es wurden folgende Stärkesorten getestet:

	Anteil	Molare
	Amylose	Masse
Stärke	[%]	[kDa]
Wachsmaisstärke	0%	2000
Maisstärke	23%	2000
Kartoffelstärke	33%	2000
Kartoffelstärke (partiell Säure-abgebaut)	33%	1500
Erbsenstärke (genmodif. Erbse)	50%	

Der Amyloseanteil wurde hierbei den Daten der Lieferanten entnommen.

Es konnte festgestellt werden, dass die Stärkesorten mit höheren Amylosegehalten vorwiegend eine bessere Löslichkeit in Wasser und DMSO aufweisen. Dies ist wichtig für eine homogene Reaktionsführung und damit ein gleichmäßiges Derivatisieren über die gesamte Polymerkette. Auf Grund dieser verbesserten Löslichkeitseigenschaften wurde überwiegend mit der teilweise mit Säure hydrolisierten Kartoffelstärke von AVEBE und der Stärke einer amylosereichen Erbse von NationalStarch gearbeitet.

Bei der Derivatisierung von Stärke musste man auch beachten, dass Amylose und Amylopektin der Stärke nicht frei vorliegen, sondern (siehe auch 2.1.1 Allgemeines zu Stärke) in Form von kompakten Granula. Um einen homogenen Umsatz zu erreichen war es notwendig, dass diese Überstruktur aufgebrochen wird. Dies erreicht man in der Regel durch Behandlung mit Hitze. Die Notwendigkeit, bei Stärkederivatisierungen zunächst die Granula aufzubrechen, wird auch von Hauber et al. am Beispiel von Maisstärke beschrieben^[105].

Die Temperatur, bei der die Stärke im Lösemittel gequollen wird, stellte einen signifikanten Gesichtspunkt der Synthese dar. Wie in der Literatur nachzulesen^[106] beginnt Stärke je nach Herkunft schon ab etwa 60°C zu quellen, jedoch schon ab Temperaturen von etwa 58 - 87°C gelatinisieren, bzw. zu verkleistern. Die Gelatinisierungstemperatur und die zu Verkleisterungstemperatur liegen sehr dicht beieinander^[107]. Es weisen unter anderem Kartoffelstärke und Cassavastärke sehr niedrige Gelatinisierungstemperaturen auf, wohingegen tropische Stärken eher höhere Temperaturen aufzeigen. So beginnt für die meisten untersuchten Stärken die Gelatinisierung bereits bei etwa 70 - 75°C, die Verkleisterung dann schon bei 80 - 85°C. Die hohe Bandbreite an Gelatinisierungstemperaturen mit deren Abhängigkeit von der natürlichen Quelle und Zusammensetzung aus Amylose, Amylopektin und eingebetteten Lipiden zeigte sich bei einer Untersuchung von Fredriksson et al.^[108]. Hier werden unter anderem Weizen- und Erbsenstärke, mit einem Beginn der Gelatinisierung bei etwa 50°C, Kartoffelstärke, welche bei etwa 60°C gelatinisiert, und Wachsmaisstärke, mit einer Gelatinisierungstemperatur von ungefähr 65 - 70°C, miteinander verglichen. Aus diesem Grund wurde eine maximale Temperatur von 80°C nie überschritten. Höhere Temperaturen führten jedoch ausschließlich zu Produkten mit einer kleisterartigen Konsistenz, welche nicht weiter verwendet werden können.

4.2 Charakterisierung der Stärkederivate

4.2.1 Qualitative Charakterisierung durch IR-Spektroskopie

Eine Identifikation über die IR-Spektroskopie zeigte sich qualitativ durch die Zunahme der Schwingungen im Alkylbereich bei etwa 2875 cm⁻¹ und der Abnahme des Bereichs der OH-Schwingungen bei etwa 3431cm⁻¹. Die wichtigsten betrachteten Schwingungen waren bei 3431 (OH Streckung); 2960/2932/2874 (asymmetrische C-H Streckung, Alkylkette, C6); 1636 (schwach, adsorbiertes Wasser); 1461/1361 (Winkeldeformierung C-H), 1153 (C-O Ether-Streckungsbande); 1090; 1020 (Alkohol Streckungsbande)



Abbildung 17: Vergleich IR-Spektren nativer Stärke (rot) mit Propylstärke (schwarz), DS 1.45

4.2.2 Bestimmung des Substitutionsgrades aus ¹H-NMR-Spektren

Zur Auswertung der NMR-Daten wurde auf ACD Labs 7.0 und ACD Labs 10.0 von Advanced Chemistry Development Inc. zurückgegriffen. Die chemische Verschiebung wird in ppm (parts per million) angegeben. Der Substitutionsgrad (DS) wurde nach Abbau der Stärkederivate mit deuterierter Schwefelsäure in Deuteriumoxid (2:1) oder mit Trifluoressigsäure bei 60°C über Nacht in einem Schüttler aus dem ¹H-Spektrum bestimmt. Hierfür wird nach der Messung des ¹H-Spektrums (Bruker NMR, 27 °C, 64 Pulse) mit DSS als internem Standard (1 mg mL⁻¹) der Substitutionsgrad aus dem Verhältnis der Integrale über den Signalen der Methyl- oder der Methylengruppe zum Integral des Signals des αanomeren Protons im Bereich von 5.4 ppm und des β-anomeren Protons bei 4.7 ppm berechnet. Die Signale des sauren D₂O sind verschoben nach etwa 7.7 ppm und kollidieren somit nicht mehr mit relevanten Signalen^[13]. Die Messungen nach einem Abbau in deuterierter Schwefelsäure wurden direkt aus der entsprechenden Lösung vorgenommen.



Abbildung 18: ¹H-NMR Spektrum von Propylstärke ohne Abbau (DS 1.5)

Formel 1: Berechnung des Substitutionsgrades mittels ¹H-NMR Spektroskopie

$$DS = \frac{I_{methylene}}{2(I_{\alpha} + I_{\beta})}$$
(1)

In der Analytik zeigte sich die Schwierigkeit in der klar differenzierten Darstellung einzelner Signale des ¹H-NMR-Spektrums. Ein Abbau des Derivates führte zu deutlich besser aufgelösten Spektren als das Spektrum des Polymers.



Abbildung 19: 1H-NMR Spektrum von Propylstärke nach vollständigem Säure-Abbau (DS 1.5)

Für Derivate höherer Substitutionsgrade allerdings war ein Abbau in deuterierter Schwefelsäure nicht möglich, da die Löslichkeit, bzw. Benetzbarkeit, für eine ausreichende Hydrolysereaktion zu gering war. Hier erwies sich ein Abbau mit Trifluoressigsäure (TFA) als effektiver.



Abbildung 20: ¹H-NMR Spektrum von Propylstärke, DS 2.36, abgebaut in TFA ohne Entfernen der TFA

Im Gegensatz zu den Messungen in situ wie nach dem Abbau in D_2O/D_2SO_4 musste die TFA vor der Messung entfernt und durch DMSO-d₆ ersetzt werden, um Veresterungsreaktionen von TFA mit den freien Hydroxygruppen entgegen zu wirken.



Abbildung 21: ¹H-NMR Spektrum von Propylstärke, DS von 2.39, abgebaut in TFA nach Ersetzen der TFA durch $DMSO-d_6$

4.2.3 Bestimmung des Substitutionsgrades aus Elementaranalyse

Die Berechnung des Substitutionsgrades soll hier an dem Beispiel der Propylstärke näher beschrieben werden. Ausgegangen wird hierbei von der eingewogenen Masse für die Analyse. Die Elementaranalyse gibt, unter der Vorraussetzung eines reinen Produktes, den Gehalt an Kohlenstoff und Wasserstoff des Produktes an. Da im Fall der Stärke außer Kohlenstoff und Wasserstoff nur noch Sauerstoff vorhanden ist kann man so den Gehalt an Wasserstoff berechnen.

Formel 2: Berechnung des Gehaltes an Sauerstoff

C:
$$60.407 \% \Rightarrow 2.032 \text{ mg}$$

H: $10.213 \% \Rightarrow 0.344 \text{ mg}$
N: 0%
O: $29.370 \% \Rightarrow 0.988 \text{ mg}$ (2)

Sauerstoff kommt ausschließlich im Stärkebackbone, also in den Glukosebausteinen vor. Durch Rückrechnung aus der Masse des Sauerstoffs erhält man die Molmenge an AGU, den Glukosemonomeren.

Formel 3: Berechnung der Molmenge an AGU

$$\frac{0.988 \text{ mg}}{15.99 \text{ g/mol}} = 0.0617 \text{ mmol}$$

$$\frac{0.0617 \text{ mmol}}{5} = 0.0123 \text{ mmol AGU}$$
(3)

Aus dem Überschuss der abgezogenen Masse des Kohlenstoffs erhält man als Rest die Masse an Kohlenstoff im Substituent.

Formel 4: Berechnung der Masse an Kohlenstoff im Rückgrat

$$\frac{0.0123 \text{ mmol AGU}}{5} * 6 = 0.0742 \text{ mmol}$$

$$0.0742 \text{ mmol} * 12.01 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.8911 \text{ mg}$$

$$2.032 \text{ mg} - 0.8911 \text{ mg} = 1.141 \text{ mg}$$

(4)

Ausgehend von einem Molgewicht von 36.03 für den Kohlenstoffanteil im Substituenten lässt sich die Molmenge an Substituent berechnen.

Formel 5: Berechnung der Molmenge an Substituent im Derivat

$$\frac{1.141 \text{ mg}}{36.03 \text{ g/mol}} = 0.0317 \text{ mmol}$$
(5)

Aus dem Verhältnis der Molmenge an Substituent zur Molmenge an AGU wird der Substitutionsgrad erhalten.

Formel 6: Berechnung des Substitutionsgrades durch das Molverhältnis von Substituent zum Rückgrat

$$\frac{0.0617 \text{ mmol}}{0.0317 \text{ mmol}} = 1.95 \tag{6}$$

4.2.4 Einfluss der Base

Es wurden die Basen LiH, NaH und NaOH getestet. Letztere setzt ein wässriges Milieu voraus. Auf Wasser sollte aber zu Gunsten geringerer Reaktandenverluste durch Hydrolyse des Alkylbromids zum entsprechenden Alkohol verzichtet werden. In reinem DMSO ist NaOH jedoch nicht löslich und wurde deswegen in einem frühen Versuchsstadium aufgegeben. Sofern nur niedrige Substitutionsgrade erforderlich sind kann selbstverständlich auf NaOH in vollständig oder teilweise wässrigem Milieu verwendet werden, da in dem Fall ein Reaktandenverlust weniger ins Gewicht fällt. Bei keiner der durchgeführten Synthesen mit LiH als Base konnte eine Veretherung von Stärke mit Propylbromid oder anderen Halogen-

Die optimale Base stellte NaH dar, welches mit DMSO auch teilweise zu Methylsulfinylmethylcarbanion, auch als Dimsyl bezeichnet, reagiert (siehe **Abbildung 22**: Darstellung des Methylsulfinylmethylcarbanion als Base). Dieses wird ebenfalls als die als Base aktive Spezie angenommen. So wird unter anderem für die Permethylierung und die Perbenzylierung laut Literatur^[109, 110] auf Methylsulfinylmethylcarbanion als Base verantwortlich gemacht, da eine vollständige Alkylierung mittels NaH alleine nicht möglich ist. Es ist davon auszugehen, dass bei den vorliegenden Reaktionsbedingungen und der Vorgehensweise beide Spezies als Base vorlagen, also NaH und Dimsyl Natrium.



Abbildung 22: Darstellung des Methylsulfinylmethylcarbanion als Base

4.2.5 Einfluss der Reaktionszeit

Es wurde der Einfluss der Reaktionszeit auf den Substitutionsgrad untersucht. Es zeigte sich, dass bereits durch eine Verlängerung der Zeit von einem auf zwei Tage eine deutliche Erhöhung des erreichten Substitutionsgrades erreicht werden konnte. Jedoch führte eine weitere Erhöhung zu keiner nennenswerten Veränderung des Substitutionsgrads. Hierbei wurde ebenfalls der Einfluss des Lösemittels mit betrachtet. Wie erwartet führte die heterogene Reaktionsführung in DMF wegen der geringen Löslichkeit der Stärke in selbigem selbst nach acht Tagen nur zu Substitutionsgraden unter 0.5. Diese Derivate waren in Ethylacetat völlig unlöslich.



Abbildung 23: Einfluss der Reaktionszeit auf den Substitutionsgrad bei teilhydrolisierter Kartoffelstärke in DMSO (Punkte) und DMF (Dreiecke), 20 Äq Brompropan, 70°C

Auf die Ausbeute der Reaktionen hatte die Reaktionszeit einen großen Einfluss. So erhielt man nach einem Tag nur wenig mehr als 15 % der theoretischen Ausbeute, nach zwei Tagen aber schon mehr als 25 % und nach vier Tagen sogar schon etwa 65 %. Hierbei wurden nur die Reaktionen von teilweise hydrolisierter Stärke von AVEBE unter ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen betrachtet (siehe **Abbildung 24**: Einfluss der Reaktionszeit auf die Ausbeute bei einer Propylierungsreaktion mit teilhydrolisierter Kartoffelstärke).



Abbildung 24: Einfluss der Reaktionszeit auf die Ausbeute bei einer Propylierungsreaktion mit teilhydrolisierter Kartoffelstärke, 20 Äq Brompropan, 70°C

4.2.6 Einfluss der Reaktandenmenge

Im Folgenden wurde der Einfluss der Menge an Reaktand in der Reaktion auf den Substitutionsgrad betrachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass im Fall der Propylierungs-Reaktionen bei Verwendung von sechs Äquivalenten NaH (in Bezug auf die Menge an eingesetzten Glukoseeinheiten) bei Raumtemperatur über drei Tage hinweg die amylosereiche Stärke bei niedrigen Mengen an Brompropan einen deutlich höheren Substitutionsgrad erreichte als die teilhydrolisierte Kartoffelstärke. Jedoch ab etwa 19 Äquivalenten Brompropan wurde dieser Umstand umgekehrt. Die erreichten Substitutionsgrade bei der amylosenreichen Stärke von NationalStarch variierten nur wenig über den gesamten Testbereich. Die teilhydrolisierte Stärke von AVEBE dahingegen begann mit eher niedrigen Substitutions-graden von etwa 1.3 (im Gegensatz zu einem DS von etwa 2.0 bei NationalStarch-Stärke), erreichte aber bei 25 Äquivalenten einen DS von 2.9 (im Gegensatz zu NationalStarch-Stärke mit einem DS von maximal 2.4). Ein Substitutionsgrad von mehr als 2.9 war nicht zu erwarten, da die dritte Position der Glukosemonomereinheit, die am primären Sauerstoff, teilweise durch die Querverzweigung des Amylopektins blockiert ist.



Abbildung 25: Einfluss des Reaktandenverhältnisses auf den Substitutionsgrad bei teilhydrolisierter Kartoffelstärke (schwarz) und amylosereicher Erbsenstärke (grau) (RT, 6 Äq NaH, 3 d)

4.2.7 Einfluss der Reaktionstemperatur

Eine Temperaturänderung bei einer Erhöhung von Raumtemperatur zu 30°C zeigte eine Steigerung des erreichbaren Substitutionsgrades. Weitere Temperaturerhöhungen allerdings führten nur zu einer geringfügigen Erhöhung des Substitutionsgrades. Ein Maximum der Temperatur wird durch die Stärke selbst gegeben. Wie bereits zuvor beschrieben stellte die Gelatinisierung, bzw. die Verkleisterung der Stärke bei höheren Temperaturen als etwa 70°C ein Problem dar.



Abbildung 26: Einfluss der Temperatur auf den Substitutionsgrad, Propylierung von Kartoffelstärke mit 25 Äq Brompropan, 6 Äq NaH, 3 d

4.2.8 Einfluss der Alkylkettenlänge

Der DS der Stärkederivate halbierte sich nahezu bei Zunahme der Alkylkettenlänge im Fall der amylosereichen Stärke von NationalStarch schon bei einer Verlängerung der Kette von drei auf sechs Kohlenstoffeinheiten von etwa 2.7 auf etwa 1.3, wohingegen die teilweise hydrolisierten Stärke von AVEBE auch bei größeren Kettenlängen einen deutlich geringeren Abfall des Substitutionsgrades vorweisen konnte. Maisstärke besitzt mit 23 % einen nur wenig geringeren Anteil an Amylose als Kartoffelstärke mit 33 %, zeigte aber bereits bei einer Alkylierung mit Brompropan einen deutlich niedrigeren Substitutionsgrad mit 2.0 als die Kartoffelstärke von AVEBE mit 2.75. Deshalb wurde auf eine weitere Untersuchung von Maisstärke verzichtet. Die höhere Substituierbarkeit im Fall der Kartoffelstärke von AVEBE wurde auf den partiellen Abbau und die damit verbundene geringere Molmasse zurückgeführt.



Abbildung 27: Einfluss der Alkylkettenlänge auf den maximal erreichbaren Substitutionsgrad im Vergleich von teilhydrolisierter Kartoffelstärke (schwarz) und amylosereicher Erbsenstärke (grau), 25 Äq Reaktand, 70°C, 3 Tage

Zur Kopplung längerer Ketten als C1 bis C3 wurde eine Anpassung der Reaktionsbedingungen benötigt. Da für die Knüpfung einer Dodecylkette bei Verwendung von 20 Äq Dodecylbromid (je AGU) nur zu einem DS von 0.45 führte, wäre eine Erhöhung dieser Menge an Reaktand für einen DS von über 1.0 eher unwirtschaftlich. Gleichzeitig erreichte man unter Verwendung längerer Ketten schon bei niedrigeren DS ähnliche hydrophobe Eigenschaften wie bei kurzen Ketten mit höheren DS.

4.2.9 Transesterifikation

Halogenalkane sind wegen ihrer eher geringeren gesundheitlichen Verträglichkeit nicht optimal für die Verwendung in medizinischen Applikationen. Daher ist bei der Aufreinigung der Produkte ein vollständiges Entfernen der Reaktanden wichtig. Bei einem Abbau der Nanopartikel in den Zellen sollen die Abbauprodukte ebenso verträglich sein wie die Partikel zuvor. Ein zu hoher DS wirkt sich zudem negativ auf den Abbau im Organismus aus^[111]. Daher sollte ein besonderes Augenmerk auf längere Ketten bei einem niedrigeren DS gelegt werden. Da die Reaktionen mit langkettigen Halogenalkanen sehr schwierig waren, wird als Alternative auch eine Veresterung mit langkettigen Säuren, bevorzugt Fettsäuren, ins Auge gefasst. Diese sind wegen der Biokompatibilität (Fettsäuren in Ölen und Fetten bei Lebensmitteln) von Interesse. Hierfür wurde die Transesterifikation herangezogen. Mit Laurinsäure-Methylester wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen ausgetestet. Hierbei wurde zunächst die Temperatur im Gegensatz zur Literatur^[37] unter 100°C gehalten, um einer Gelatinisierung entgegenzuwirken. Dabei wurde ein niedriger DS erreicht, der nicht genügt um eine Löslichkeit in EE zu erhalten. Um diesen zu erhöhen wird ein Temperaturgradient eingeführt. Hierzu wurde die Temperatur schrittweise während der Reaktion auf bis zu 100°C erhöht. Durch die langsame Erhöhung der Temperatur und den zwischenzeitlich eingetretenen geringen Substitutionszustand des Polymers blieb die befürchtete Gelatinisierung aus.



Abbildung 28: Einfluss der Reaktionsbedingungen der Transesterifikation mit Laurinsäure-Methylester auf den DS, im Vakuum bei 80°C(schwarz), ohne Vakuum bei 80°C (rot), mit T-Gradient 80-90-100°C (grün), 3d bei 100°C (blau), mit T-Gradient (türkis)

4.2.10 Bifunktionalisierte Stärkederivate

Die Synthese eines bifunktionalisierten Derivates konnte durch die Funktionalisierung einer enzymatisch teilweise hydrolisierten Stärke erreicht werden (siehe 6.1.4.7 Bifunktionalisierte Stärke).

Hierfür wurde nach einer Propylierung eine Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid durchgeführt. Es zeigte eine gute Löslichkeit in Ethylacetat, aber auch eine schwache Löslichkeit in Wasser.



Abbildung 29: mögliche Struktur des bifunktionalen Derivates

Die Struktur des Derivats ließ sich qualitativ durch ¹H-NMR-Spektren bestimmen. Weitere Tests sind auf Grund von Verunreinigung der Probe mit Ferrocen nicht mehr möglich.

Für großtechnische Anwendungen wurde die ökonomischere Variante der Umesterung hervorgehoben. Außerdem bot sie durch die Verwendung von Triethylamin eine leichter zu handhabende und kostengünstigere Base als NaH die Möglichkeit auch größere Mengen ohne nennenswerte Risiken einzusetzen. Das benötigte Alkoholat kann auch sehr einfach in größeren Mengen hergestellt werden. Der nächste gedankliche Schritt zur großtechnischen Produktion führte zur Vereinfachung der Reaktanden und deren Verfügbarkeit. Da Laurinsäure-Methylester eine Fraktion des durch Umesterung aus Bioölen gewonnenen Biodiesels darstellt, wäre die Verwendung des selbigen nahe liegend gewesen. Leider war Biodiesel nicht mehr in Deutschland in Chargen unter 2000 L erhältlich. Im Labormaßstab wären Mengen von maximal 1 L für erste Testreaktionen mehr als ausreichend. Der nächste gedankliche Schritt rückwärts in der Synthesekette führte zu Pflanzenöl, z.B. Sonnenblumenöl. Die Produktion von Biodiesel im Labormaßstab würde das Problem mit sich bringen, eine geeignete Charakterisierung dieses Zwischenproduktes zu entwickeln und eine zuverlässige Reproduzierbarkeit zu erreichen. Der zunächst befürchtete Mangel an Reaktivität des Triglycerids auf Grund fehlender Triebkraft konnte schon durch erste Synthesen entkräftet werden. Jedoch war das Produkt mit dem bisher höchsten erreichten Substitutionsgrad von etwa 1.1 nicht löslich in Ethylacetat.

Da die Zusammensetzung des Naturproduktes Sonnenblumenöl nicht eindeutig festzulegen ist, konnte bisher der Substitutionsgrad auch nicht eindeutig bestimmt werden. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Sonnenblumenöls und damit die verschiedenen möglichen Substituenten auf.

Fettsäure	Strukturformel	Anteil
		[Gew.%]
Laurinsäure (12:0)	0 HO	0-0.1
Palmitinsäure (16:0)	O HQ	5-7.6
Stearinsäure (18:0)	HOHO	2.7-6.5
Ölsäure (18:1)	HO	14-39.4
Linolsäure (18:2)	HOHO	48.3-74
C14-17, 20-24	z.B. Linolensäure	max. 0-0.5

Tabelle 2: Zusammensetzung von Sonnenblumenöl^[112]

Die Estergruppen im Produkt ließen sich qualitativ über IR-Spektroskopie nachweisen. Hier waren eindeutig die Schwingungen der Alkylbanden, wie auch die der Carbonylbanden zu erkennen. Das folgende Spektrum enthält neben dem Spektrum nativer Stärke (rot) das Spektrum eines Derivates mit Sonnenblumenöl.



Abbildung 30: IR-Spektrum von nativer Stärke (rot) und Sonnenblumen-Stärke (schwarz) mit 1 Äq NaOMe, 2 h bei 150°C, anschließend 16 h bei 100°C

Ebenfalls konnten entsprechende Signale nach saurem Abbau im ¹H-NMR nachgewiesen werden, die allerdings nicht eindeutig einer Spezies der Substituenten zuzuordnen waren. Daher war eine Berechnung des DS über das ¹H-NMR nicht für die einzelnen potentiellen Reste möglich, sondern nur als Ganzes.



Abbildung 31: 1H NMR-Spektrum des Transesterproduktes der Reaktion von Stärke mit Sonnenblumenöl, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄, gemessen in dieser Lösung

Das Produkt stellte durch seine Unlöslichkeit in Wasser, den Alkoholen Methanol, Ethanol und Isopropanol und den organischen Lösemitteln Aceton, Chloroform, Dichlormethan, DMF, DMSO, Ethylacetat und n-Hexan ein Problem für die Aufarbeitung dar. Es wurde sich daher auf ein Waschen mit Wasser, Aceton und Ethylacetat zum Entfernen der darin löslichen Bestandteile beschränkt. Die einzelnen Lösemittelfraktionen wurden gesondert vom Lösemittel befreit, lieferten jedoch keinerlei Rückstände die sich als Stärke oder Stärkederivat identifizieren ließen. Aus den Signalen der anomeren Protonen bei etwa 4.6 und 5.3 ppm und dem Integral über dem Signal der Methylgruppe bei 0.9 ppm, welche für alle möglichen Substituenten gleich bleiben sollte, ließ sich der Substitutionsgrad von 0.13 berechnen. Die Signale bei etwa 1.0 ppm bis 2.0 ppm gehörten zu den Methylengruppen der unterschiedlichen Reste, die sich teilweise überlagerten und somit bei der gegebenen Auflösung nicht eindeutig zuzuordnen oder separat zu integrieren waren. Dass bei langkettigen Substituenten auch niedrigere Substitutionsgrade von etwa 0.5 genügen, um eine Löslichkeit in Ethylacetat zu erreichen, wurde bereits bei der Untersuchung des Einflusses der Alkylkettenlänge unter den hydrophoben Stärkederivaten mit einfachen Alkylketten beschrieben. Ebenfalls wurde bereits erwähnt, dass langkettige Substituenten, wie die hier verwendeten Carbonsäuren, mit einer Erhöhung des Substitutionsgrades eine deutlich stärkere Zunahme der Hydrophobizität erreichen, als bei einer gleichwertigen Zunahme des DS bei kurzen Ketten wie Propyl oder Butyl der Fall wäre. Demnach war hier davon auszugehen, dass mit einem DS von 1.1 eine Unlöslichkeit in nahezu allen gängigen organischen Lösemitteln erreicht wurde. Es sollte also ein Substitutionsgrad erreicht werden, der deutlich näher an 0.5 reicht. Für die Charakterisierung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie war daher ein saurer Abbau wie bei den höher substituierten Stärkeethern notwendig. Die beim Abbau freiwerdenden OH-Gruppen gleichen mit ihrer Hydrophilie die Hydrophobizität der Substituenten genügend aus um eine Löslichkeit zu erhalten.

4.3 Derivate des Polyvinylalkohols

Für die Formulierung der Nanopartikel wurde Polyvinylalkohol als Detergenz eingesetzt. Durch den PVA wurden reproduzierbare Partikel mit einer homogeneren Größenverteilung erreicht. Die genaueren Einflüsse des Gehalts an PVA werden in Kapitel 4.5.1 "Partikel ohne Wirkstoff" näher erläutert. Durch die Derivatisierung des PVA wurde zusätzlich eine Modifikation der Partikel mit Folsäure für den gerichteten Wirkstofftransport erreicht, ohne das Matrixmaterial Stärke zusätzlich modifizieren zu müssen. Außerdem konnte auf diesem Weg ein Baukastensystem entwickelt werden, bei dem ein Baustein, die Stärke, auf den Wirkstoff und dessen Freisetzung zugeschnitten wurde und der zweite Baustein, das Detergenz Polyvinylalkohol, auf den angestrebten Zelltyp und Rezeptor.

4.3.1 Pteroinsäure-Derivate des PVA

Polyvinylalkohol als solches stellt wie andere Alkohole selbst keine sehr reaktive Funktionalität. Es sind bereits einige Reagenzien bekannt, die eine Aktivierung und eine weiterführende Kupplung zu einem Amid ermöglichen. Solche sind über das in dieser Arbeit verwendete Carbonyldiimidazol (CDI)^[113] hinaus noch EDCI^[114], DCC^[115], DCC/N-Hydroxysuccinimid^[116], DCC/N-Hydroxyphthalimid^[117], DCC/Nitrophenol^[118], DCC/Penta-chlorphenol^[119], DCC/Pentafluorphenol^[120], DCC/Hydroxypiperidin^[121], DCC/HOBt^[122], DCC/HOAt^[123], HBTU^[124], HATU^[123], TBTU^[125], BOP^[126], PyBOP^[127].

Üblicherweise werden Folsäurederivate über PEG-Spacer angeknüpft^[128]. Hier wird davon abweichend mit Alkylketten, genauer mit Hexylendiamin, gearbeitet. PEG (Polyethylenglykol) bietet üblicherweise zu der Spacerfunktion auch noch eine lösungsvermittelnde Funktion bezüglich der Löslichkeit in wässrigen Medien. In diesem Fall sollte aber eine zu hohe Löslichkeit der Derivate vermieden werden, da bei der Formulierung der Nanopartikel die Gefahr bestünde, dass sich das Pteroinsäurederivat nicht an den hydrophoben Stärkepartikeln anlagert und stattdessen in der wässrigen Phase in Lösung bleibt. Andererseits könnte auch eine gegensätzlich gerichtete Wechselwirkung zwischen dem hydrophoben Stärkederivat und einem hydrophilen Pteroinsäurederivat sich negativ auf die Beschichtung der Partikel auswirken.

Die Knüpfung von Aminen, Amiden oder aminofunktionalisierten Derivaten an Polyvinylalkohol wird bereits beschrieben durch Ossipov et. al.^[46]. Es wird die Alkoholfunktion des PVA mit Carbonyldiimidazol aktiviert, was einen nukleophilen Angriff durch die Aminfunktion des Pteroylamidhexylamins ermöglicht. Analog zu dieser Vorschrift wurden die PVA-Derivate in dieser Arbeit dargestellt. Die ersten beiden Stufen wurden im Rahmen des Projektes freundlicherweise von ToromaOrganics synthetisiert und zur Verfügung gestellt.



Abbildung 32: Syntheseroute für die Darstellung von PVA, modifiziert mit Pteroylamidhexylamin

In einem ersten Schritt wurde die Folsäure durch Ausbilden eines Imids in die Pyrofolsäure überführt. Anschließend wurde in einer Stufe die *L*-Glutaminsäure abgekoppelt und Hexyldiamin als Linker an die Säurefunktion der *p*-Aminobenzoesäure gebunden. Dieses Pteroylamidhexylamin wurde anschließend an PVA gekoppelt.



Abbildung 33: Synthese der PVA-Derivate mit Pteroylamidhexylamin

Da Folsäure eine lichtempfindliche Substanz ist mussten die Reaktionen wie auch die Produkte der Synthesen unter Lichtausschluss geführt und aufbewahrt werden.

4.3.2 Charakterisierung der Pteroylamidhexylaminderivate des PVA

Da die Signale der Pteroinsäure nur bei hohen Konzentrationen zu erkennen sind (vgl. Charakterisierung des Pteroinsäurederivats) und durch den sehr niedrigen DS eine entsprechend notwendige Konzentration nicht erreichbar ist, wurde an dieser Stelle auf eine NMR-Charakterisierung verzichtet und der Substitutionsgrad mittels UV-Vis Messung ermittelt. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient ɛ wurde bei einer Wellenlänge von 307 nm aus einer 0.5 M HCl-Lösung des Pteroylamidhexylamins zu 6804 L mol⁻¹ cm⁻¹ bestimmt. Die Substitutionsgrade der einzelnen PVA-Derivate wurden ebenfalls aus Lösungen in 0.5 M HCl-Lösung bestimmt. Der Küvettendurchmesser betrug 1 cm. Hierfür wurden bekannten Messungen Lösungen mehreren Konzentrationen von mit der aminofunktionalisierten Pteroinsäure durchgeführt.

Gemäß Lambert-Beer gilt:

$$E = \varepsilon^* c^* d$$

$$\varepsilon = \frac{E}{c^* d}$$
(7)

Hierbei sind E die gemessene Extinktion, d der Küvettendurchmesser und c die molare Konzentration des Derivates in der HCl-Lösung.



Abbildung 34: UV/Vis-Messungen der Kalibrierlösungen mit aminofunktionalisierten Pteroinsäure für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in 0.5 M HCl

Die Auftragung der Extinktionen der Maxima gegen die molare Konzentrationen ergibt:



Abbildung 35: Bestimmung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten durch UV-Messungen von Pteroylamidhexylam in 0.5 M HCl-Lösung bei 307 nm

Aus der Steigung der Geraden durch die Messpunkte ließ sich der Extinktionskoeffizient ableiten.

Für die Messung wurde eine Küvette mit einem Durchmesser von 1 cm benutzt. Die salzsaure Lösung war nötig, da das Pteroylamidhexylamin in Wasser sonst nicht löslich war. Nach Derivatisierung des Polyvinylalkohols mit dem Pyrofolsäurederivat lag eine ausreichende Löslichkeit in Wasser vor. Es war zwar auch nach Messungen der Derivate in rein wässriger wie auch in salzsaurer Lösung kein Unterschied in den Ergebnissen festzustellen, trotzdem empfiehlt es sich schon aus Gründen der Reproduzierbarkeit, auch bei den PVA-Derivaten auf die Lösung von 0.5 M HCl zurückzugreifen.



Abbildung 36: UV/Vis-Spektrum eines PVA-Derivates mit Pteroylamidexylamin, 1 mg mL⁻¹

Mit Lambert Beer war es möglich den Gehalt an Pteroinsäure in der Lösung der Massenkonzentration 1 mg mL⁻¹ des fertigen Produktes in 0.5 M HCl-Lösung zu bestimmen. Hierbei wurde das Signal bei etwa 305 nm ausgewertet.

Formel 7: Berechnung der Pyrofolsäurekonzentration im Derivat

$$c(PA) = \frac{E}{6804 \frac{L}{mol * cm} * 1 cm} = x \frac{mol}{L}$$
(8)

In der folgenden Rechnung wird sich auf die Betrachtung von 1 mL der Lösung beschränkt, wodurch es möglich ist, die Einheit mL durch Anpassen des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten aus der Rechnung zu streichen. Dadurch erhalten wir:

Formel 8: Berechnung der Pyrofolsäuremenge im Derivat

$$n(PA) = \frac{E}{6.804*10^{6} \frac{1}{\text{mol}*\text{cm}}*1 \text{ cm}} = x \text{ mol}$$
(9)

Im gegebenen Beispiel (siehe auch **Abbildung 36**: UV/Vis-Spektrum eines PVA-Derivates mit Pteroylamidexylamin, 1 mg mL⁻¹) bedeutet dies bei einer Extinktion von 1.5852 eine Menge von $0.233*10^{-6}$ mmol, respektive 0.102 mg, an Pteroinsäurehexylamin in der gemessenen Lösung.

Zur Berechnung der Masse des PVA in der betrachteten Lösung muss die Masse des Carbonyl-Linkers im Derivat zu der der Pteroinsäure hinzuaddiert werden. So lässt sich die Formel modifizieren zu:

Formel 9: Berechnung der PVA-Masse im Derivat

$$m(PVA) = m(compl.) - m(PA + CO) = m(compl.) - (n(PA) * M(PA + CO))$$
(10)

Da wir hier nur Lösungen der Konzentration 1 mg mL⁻¹ betrachten kann die Gesamtmasse auf 1 mg festgesetzt werden, wodurch wir erhalten

$$m(PVA) = 1 mg - (n(PA) * 438.2 \frac{g}{mol})$$

was zu einer Masse für PVA von 0.898 mg führt. Durch Berechnen der Stoffmenge an Monomereinheiten des eingesetzten PVA in der betrachteten Lösung zu 0.0204 mmol lässt sich der DS folgendermaßen berechnen

Formel 10: Berechnung des Substitutionsgrades an Pyrofolsäure im Derivat

$$DS = \frac{n(PA)}{n(PVA)} = \frac{\frac{M(PA)}{M(PA)}}{\frac{m(PVA)}{M(PVA)}}$$
(11)

Man erhält auf diesem Weg einen Wert für den Substitutionsgrad von 0.011.

4.3.3 Einflüsse auf die Synthese der Pyrofolsäure-PVA Derivate

Bei der Synthese wurde die Temperatur bei Raumtemperatur gehalten. Zwischen der Zugabe des CDI und der Zugabe des Pyrofolsäurederivats wurde zwei Stunden gerührt.

Es wurde gezeigt, dass der Substitutionsgrad der Folsäurederivate direkt mit der Konzentration an Pteroinsäure-Hexyldiamin zusammenhängt, nicht aber durch eine Erhöhung der Konzentration an Carbonyldiimidazol als Aktivator erhöht werden kann. Die Reproduzierbarkeit ließ sich an Hand einer wiederholten Synthese eines bestimmten DS überprüfen und die erreichte Abweichung des Substitutionsgrades von weniger als 0.003 war schon wegen der Messungenauigkeiten beim Abwiegen und der UV-Vis-Spektroskopie (Konzentrationen, Rundungen bei den Berechnungen) als verschwindend gering zu betrachten.



Abbildung 37: Einfluss der Reaktandenmenge auf den Substitutionsgrad der Pyrofolsäurederivate an PVA bei 0.5 Äq CDI (weiß), 1 Äq CDI (grau) und 2 Äq (schwarz), Äq bezogen auf OH-Gruppen

4.3.4 Chinin-Derivat des PVA



Abbildung 38: Syntheseroute der PVA-Derivate mit Chinin

Chinin ist ein Alkaloid, das in seiner natürlichen Form aus der Chinarinde gewonnen werden kann (siehe **Abbildung 39**: Struktur von Chinin).

besitzt eine Anregungswellenlänge λ_{An} von etwa Chinin 350 nm und eine Emissionswellenlänge λ_{Em} von 340 – 750 nm^[129]. Dies lässt sich gut einsetzen bei Zelltests die zeigen sollen, dass sich ein Wirkstoff oder Partikel innerhalb der Zellen und nicht nur an der äußeren Peripherie befindet. Die Wahl für das Anfärben fiel deswegen auf Chinin, da es neben der günstigen Fluoreszenzfarbe auch noch leicht zu modifizierende Bauteile besitzt, über die das Molekül an das Trägerpolymer, in diesem Fall PVA, geknüpft werden kann. Darüber hinaus erschien es für die Verwendung in organischen Systemen weniger bedenklich, da es bereits in Lebensmittel (u.a. Schweppes[®]) eingesetzt wird. Bei Aufbringung auf Zellen zeigte sich aber eine geringe und nicht von der Hand zu weisende Zelltoxizität. Es konnten Nanopartikel mit Chinin-PVA-Derivat und Propylstärke, mit einem DS von 2.0 ohne einen Wirkstoff und mit Taxotere dargstellt werden. Die Partikelgröße und der PDI (poly dispersity index) als Maß der Größenkonstanz waren vergleichbar mit den Werten für Partikel, welche ohne Chinin-modifiziertem PVA dargestellt wurden.



Abbildung 39: Struktur von Chinin

4.3.5 Charakterisierung der Chininderivate des PVA

Die Bestimmung der Substitutionsgrade der PVA-Derivate mit Chinin erfolgte analog zur Charakterisierung der Pteroylamidhexylaminderivate. Zunächst wurde der molare dekadische Extinktionskoeffizient wie bereits beschrieben zu $\varepsilon = 1720 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Hierbei war der Bereich um eine Wellenlänge von 327 nm zu betrachten. Die Messungen wurden in einer 1 cm Quarz-Küvette durchgeführt.



Abbildung 40: UV-Spektrum des mit Chinin modifizierten PVA, DS 0.01

Ein Vergleich der 3D-Fluoreszenzspektren sollte die Anwendbarkeit des Chinins als Marker aufzeigen.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Lösungen mit den Derivaten des PVA hergestellt wie im experimentellen Teil beschrieben. Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen betrugen jeweils 1 mg mL⁻¹ der PVA-Derivate in Wasser, bzw. 1 mg mL⁻¹ des Stärkederivates in Ethylacetat. Die Fluoreszenz der Partikel mit Chinin-modifiziertem PVA ließen sich bei einer Anregung von etwa 295 nm mit einer Emission bei 450 nm nachweisen. Bei derselben Anregungswellenlänge war zusätzlich eine deutlich schwächere Emission bei 370 nm erkennbar.



Abbildung 41: 3D-Fluoreszenzspektrum von Propylstärke (DS 2.0) mit Chinin (DS 0.01)

Ein 3D-Fluoreszenzspektrum von Partikeln aus Propylstärke mit einem DS von 2.0 und nativem PVA zeigte keinerlei nennenswerte Fluoreszenzaktivität im Bereich einer Anregung von 240 bis 350 nm und einer Emission von 300 bis 480 nm. Lediglich bei einer Anregung bei etwa 245 nm zeigte sich bei 365 nm eine Emission, welche aber eine vernachlässigbar kleine Intensität aufwies. Bei Kontrollmessungen war diese Intensität noch geringer und nicht reproduzierbar. Es ist davon auszugehen, dass es sich um geringe Nebeneffekte aus unreinen Lösemitteln oder Glasgeräten handelt. Was ebenfalls für diese Annahme spricht ist die Tatsache, dass diese Signale bei den Messungen der Proben mit derivatisiertem PVA gänzlich fehlten.



Abbildung 42: 3D-Fluoreszenzspektrum von Propylstärke (DS 2.0) ohne Chinin

Erste Tests mit solchen Partikeln wiesen auf eine positive Interaktion mit den Zellen hin, jedoch war die Fluoreszenzaktivität zu gering um für nähere Untersuchungen genutzt werden zu können. Es ließ sich dagegen sogar eine gewisse Zelltoxizität dieser mit Chinin versetzten Partikel nachweisen, was auch die Anwendung in dem angestrebten Verfahren ausschloss. Auch Pyrofolsäure und damit die Pyrofolsäurederivate des PVA, wiesen eine gewisse Fluoreszenzaktivität auf. Bei einer Anregung bei einer Wellenlänge von etwa 330 nm war eine deutliche Emission bei einer Wellenlänge von 360 nm erkennbar. Eine weitere Emission mit deutlich geringerer Intensität war bei gleicher Anregung noch bei einer Wellenlänge von etwa 480 nm zu beobachten.



Abbildung 43: 3D-Fluoreszenzspektrum von Propylstärke (DS 2.0) mit Pyrofolsäure (DS 0.1)

Die dafür hergestellten Partikel aus Propylstärke mit einem DS von 2.0 und PVA, entsprechend modifiziert mit Chinin, Pyrofolsäure und ohne Ligand, zeigten folgende Eigenschaften bezüglich der relevanten Absorptions- bzw. Emissionsmaxima:

Tabelle 3: Haupt- Absorptions- und Emissionswellenlängen von Partikeln mit unterschiedlichen PVA-Liganden

PVA-Ligand	$\lambda_{Anregung}$	$\lambda_{ m Emission}$
	[nm]	[nm]
Ohne	245	-
Chinin	295	450
Pyrofolsäure	330	360

4.4 Erzeugung von Nanopartikel

4.4.1 Darstellung der Nanopartikel

Die Darstellung der Nanoteilchen wurde zusammen mit deren graphischen Darstellung und Analyse im AK des Herrn Prof. Lehr an der Universität des Saarlandes durchgeführt^[130]. Es wurde die zu untersuchende Substanz in Ethylacetat gelöst (1.0 mg mL⁻¹) und ein mL dieser organischen Lösung auf 4.0 mL einer wässrigen Phase mit wechselnden Konzentrationen an PVA gegeben. Dieses heterogene Gemisch wurde mit einem Hochgeschwindigkeitshomogenisator homogenisiert und anschließend mit Wasser auf ein Volumen von 10 mL aufgefüllt, um eine vollständige Verteilung der organischen Phase in der wässrigen Phase zu forcieren. Dann wurde das organische Lösungsmittel über einen Rotationsverdampfer abdestilliert.



Abbildung 44: Darstellung der Nanopartikel nach der Emulsions-Evaporations-Methode^[131]

4.5 Bestimmung der Freisetzungskinetik

Die Freisetzung der Wirkstoffe aus den hydrophoben Stärke-Nanopartikeln wurde mittels einer Franz'schen Diffusionszelle bestimmt (siehe Abbildung **45**: Franz'sche Diffusionszelle). Als Medium diente hierbei eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7.4) und eine von 0.1 prozentig ansteigend variierte Lösung von Tween 80 in besagter PBS-Lösung. Es zeigte sich, dass ein erhöhter Gehalt an Tween 80 eine Verbesserung der Akzeptorphase bedeutet und diese so den Wirkstoff besser aufnehmen konnte. Donor- und Probenvolumen betrug 1 mL, das Rezeptorvolumen ungefähr 12 mL. Als Membran wurde eine Regeneratcellulose-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa eingesetzt. Für Taxotere wurde auf Grund der Unlöslichkeit des Wirkstoffes in Wasser auf n-Oktanol als external Sink, als Akzeptormedium, zurückgegriffen.



Abbildung 45: Franz´sche Diffusionszelle

4.5.1 Partikel ohne Wirkstoff

Für die Weiterverwendung der Derivate wurde wie bereits beschrieben eine Löslichkeit in Ethylacetat (EE) benötigt. Daher wurde sich bei der Aufarbeitung und der Aufreinigung lediglich auf in Essigester lösliche Bestandteile beschränkt. Es wurde der Zusammenhang zwischen Alkylkettenlänge und Substitutionsgrad mit der Löslichkeit in Wasser und Ethylacetat untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Derivate mit einer Propylkette einen Substitutionsgrad von mindestens etwa 1.0 benötigen um in Ethylacetat gut löslich zu sein (siehe auch **Abbildung 46**: Einfluss der Alkylkettenlänge auf die Löslichkeit in Wasser (blauer Bereich) und Ethylacetat, gelbe Zone). Derivate mit niedrigeren DS zeigen je nach Kettenlänge eine verstärkte Löslichkeit in Wasser (blaue Zone). Bei einer Kettenlänge von C12, also bei Dodecylketten, hingegen genügte bereits ein Substitutionsgrad von 0.45. Außerdem zeigte sich, dass ein Derivat mit einer C12-Alkylkette mit einem Substitutionsgrad von etwa 0.5 nicht mehr in Ethylacetat löslich war, dahingegen aber in Hexan.



Abbildung 46: Einfluss der Alkylkettenlänge auf die Löslichkeit in Wasser (blauer Bereich) und Ethylacetat (gelber Bereich)

Zunächst wurde für die Partikelherstellung ein Gehalt von 1.0 Gew. % an PVA als Stabilisator eingesetzt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit in den Partikelgrößen, angegeben als Partikeldurchmesser. Es war erkennbar, dass sowohl die Größenordnung als auch die Größenverteilung, angegeben durch den PDI, auch bei mehrmaliger Formulierung der Nanopartikel aus demselben Stärkederivat kaum voneinander abweichten. Der PDI, der "Poly Dispersitäts Index", gibt an, wie stark die Kurve der Größenverteilung verbreitert ist. Je kleiner der PDI-Wert, desto enger ist die Verteilung, da umso geringer die einzelnen Abweichungen vom ermittelten Mittelwert ist. Dieser ist mathematisch definiert als Quotient der Standardabweichung der Teilchengrößenverteilung durch ihren Mittelwert^[132]. Die Partikelgrößen und PDI wurden mittels eines ZetaSizers ermittelt (siehe 6.1.2 Geräte und Messmethoden). Es wurden für jede Probe drei Messungen derselben Lösung vorgenommen.



Abbildung 47: Vergleich der Größenverteilung und deren Reproduzierbarkeit für Nanopartikel aus Propylstärke (DS 1.45), PDI 0.053

Es konnte festgestellt werden, dass weder der Ursprung der Stärke, noch der Substitutionsgrad einen Einfluss auf die Größe der gebildeten Partikel ausübten. Der Streubereich der gemessenen Partikelgrößen lag mit etwa 20 nm im Rahmen der Meßgenauigkeit.
Alkyl	DS	Größe [nm]
propyl	2.09	190
	2.16	182
	2.25	187
	2.32	184
	2.56	176
	2.75	173
butyl	2.20	173
	1.32	187
hexyl	1.21	172

Tabelle 4: Alkylkettenlängen und die zugehörigen Substitutionsgrade und Partikelgrößen

Dahingegen konnte für die eingesetzte Menge an PVA ein entscheidender Einfluss auf Partikelgröße und PDI festgestellt werden. Je geringer die Konzentration an PVA ist, desto größer war der Partikeldurchmesser und der Einfluss der Substitutionsgrade des Derivats nahm zu.



Abbildung 48: Einfluss der PVA-Konzentration auf die Partikelgröße von Propylstärke bei unterschiedlichem DS, Konzentration der Stärkederivate 1 mg mL⁻¹, gemessen bei RT

Da unter anderem für den in der Einleitung beschriebenen EPR-Effekt eine Partikelgröße von nicht mehr als etwa 200 nm empfohlen wird, sind solche Partikel aus Formulierungen mit weniger als 0.2 % PVA ungeeignet. Ab einer Menge von 0.2 % PVA ließen sich Partikel von stabiler Größe und ohne Beeinflussung durch Substitutionsgrade formulieren.

Ähnliches konnte auch bei der Betrachtung der unterschiedlichen Kettenlängen gezeigt werden. Erst ab einem Gehalt von mindestens 0.2 % an PVA ließen sich Partikel mit gleich bleibender Größe unabhängig von der Alkylkettenlänge formulieren. Auffällig war auch, dass ohne die Verwendung von PVA nur die Partikelgröße des Hexylstärkederivats relativ konstant bei einem Wert um die erwünschten 200 nm lagen.



Abbildung 49: Einfluss der PVA-Konzentration auf die Partikelgröße für unterschiedliche Kettenlängen, Propylstärke (grün, DS 1.6), Butylstärke (schwarz, DS 1.6), Hexylstärke (rot, DS 1.4)

Vor einer Deutung, ohne PVA könnten bessere Partikel formuliert werden als mit PVA, musste auch der PDI betrachtet werden, um eine Aussage über die Qualität der Teilchen treffen zu können. Hier zeigte sich, dass bei der Verwendung von 0.2 % PVA der PDI-Wert konstant und am niedrigsten war. Ohne PVA betrug der PDI-Wert über 0.25, was eine für angestrebte Verwendungszwecke inakzeptable Streuung der Größen spricht. Ähnlich wie bei der Betrachtung der Partikelgrößen war auch hier der Einfluss der DS-Grade lediglich bei weniger als 2 % PVA gravierend gegeben.



Abbildung 50: Einfluss der PVA-Konzentration auf den PDI für Propylstärke bei unterschiedlichen DS

Dasselbe galt auch für die Betrachtung der Alkylkettenlänge der Stärkederivate. Der konstanteste und auch kleinste PDI-Wert stellte sich bei der Verwendung von 0.2% PVA ein.



Abbildung 51: Einfluss der PVA-Konzentration auf den PDI bei unterschiedlichen Kettenlängen, Propylstärke (grün, DS 1.6), Butylstärke (schwarz, DS 1.6), Hexylstärke (rot, DS 1.4)

Wie auch auf die Partikelgröße hatte der Substitutionsgrad keinen nennenswerten Einfluss auf das Zetapotential. Dieses Potential beschreibt die Oberflächenladung der Partikel.



Abbildung 52: Einfluss des DS auf das Zetapotential für Propylstärkepartikel mit 0.2 % PVA

Die Nanopartikel aus Propylstärke mit einem DS von 2.0 und dem Chinin-modifizierten PVA zeigten sowohl ohne Beladung als auch mit Taxotere beladen eine Partikelgröße unterhalb der maximalen 200 nm (siehe **Tabelle 5**: Partikelgröße und PDI für Chinin-modifizierte Nanopartikel aus Propylstärke).

Wirkstoff	Größe [nm]	PDI
Kein Wirkstoff	162.5	0.217
Taxotere	179.6	0.137

Tabelle 5: Partikelgröße und PDI für Chinin-modifizierte Nanopartikel aus Propylstärke

Die dafür hergestellten Partikel aus Propylstärke mit einem DS von 2.0 und PVA, entsprechend modifiziert mit Chinin, Pyrofolsäure und ohne Ligand, zeigten folgende Eigenschaften bezüglich Größe, PDI und relevanter Absorptions- bzw. Emissionsmaxima:

PVA-Ligand	Durchmesser	PDI
	[nm]	
Ohne	195.8	0.044
Chinin	410.8	0.199
Pyrofolsäure	239.7	0.352

Tabelle 6: Durchmesser der Partikel mit unterschiedlichen PVA-Liganden

Der fast doppelt so große Durchmesser der Partikel mit Chinin als Ligand lässt diese Partikel eher ungünstig erscheinen für die angestrebten Anwendungen.

4.5.2 Partikel mit Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure

Für die ersten Verkapselungstests werden auf günstige und verbreitete Wirkstoffe zurückgegriffen, die unterschiedlich starke hydrophobe Eigenschaften aufweisen. Die Wahl fällt auf Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure. Alle drei Stoffe ließen sich mit einer hohen Verkapselungseffizienz von über 80 %, für den hydrophilsten der drei Testsubstanzen, und mit über 95 %, für die beiden eher hydrophoben Substanzen, einschließen. Die niedrigen PDI-Werte sprechen für eine Verkapselung mit sehr enger Partikelgrößenverteilung.

Tabelle 7: Partikelgrößen, PDI und Verkapselungseffizienzen für die Modellwirkstoffe Flufenaminsäure,Testosteron und Koffein, DS der Propylstärke 1.45

Eingeschlossener	Größe	PDI	Verkapselungs-
Wirkstoff	[nm]		Effizienz (%)
Ohne Wirkstoff	182±6.7	0.08±0.01	
Flufenaminsäure	185±3.4	0.06±0.02	>95
Testosteron	176±6.0	0.11±0.04	>95
Koffein	183±5.4	0.11±0.01	>80

Unter dem Elektronenmikroskop erkennt man die Partikel als sphärische Objekte mit glatter Oberfläche und gleichmäßiger Größe. Weder Form noch Größe wurden entscheidend durch eine Beladung verändert.



Abbildung 53: Propylstärke-Nanopartikel, DS 1.0 ohne Wirkstoff



Abbildung 54: Propylstärke-Nanopartikel, DS 1.0 mit Flufenaminsäure

Beim Aufbau der Partikel wurde davon ausgegangen, dass die hydrophoben Wirkstoffmoleküle in einer Art von Matrix aus dem hydrophoben Stärkederivat eingeschlossen werden. Dieser Vorgang wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Wirkstoffmolekülen und den Alkylseitenketten unterstützt. Als Emulgator und Stabilisator der Partikel fungierte der Polyvinylalkohol, welcher sich wie eine Hülle um diese legt.



Abbildung 55: Darstellung und Aufbau eines mit Flufenaminsäure beladenen Partikel^[103]

Für die Freisetzungskinetiken wurde auf eine Franz´sche Diffusionszelle zurückgegriffen. Der genaue Ablauf wird im experimentellen Teil näher beschrieben.



Abbildung 56: Freisetzung der Modellverbindungen Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure aus Propylstärke-Nanopartikel (DS 1.45)^[103]

Ausgehend von der Menge an freigesetztem Wirkstoff nach 70 h zeigte sich, dass 50 % des insgesamt freigesetzten Koffeins schon nach etwa drei Stunden freigesetzt wurde. Im Fall der hydrophoberen Wirkstoffe Testosteron und Flufenaminsäure lag die Halbwertszeit bei 20 h (siehe **Abbildung 56**: Freisetzung der Modellverbindungen Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure aus Propylstärke-Nanopartikel (DS 1.45)^[103]). Dazu kommt, dass im Fall der Partikel mit Propylstärke mit einem DS von etwa 1.45 bei Koffein bereits nach nur etwa 10 h mit über 70 % der insgesamt verkapselten Menge sein Maximum der Freisetzung erreicht hatte, während Testosteron nach über 70 h noch immer nur etwa die Hälfte und Flufenaminsäure nur etwa ¹/₄ der Gesamtmenge freigesetzt hatte. Dies deutet auf eine verstärkte attraktive Wechselwirkung der Wirkstoffe mit der Partikelmatrix.

Es zeigte sich, dass ein höherer Substitutionsgrad, also eine stärkere Hydrophobizität des Partikels, die Freisetzung der Wirkstoffe verlangsamte. Ebenso wurden hydrophobere Wirkstoffe langsamer freigesetzt als hydrophile Wirkstoffe (siehe **Abbildung 57**: Freisetzung der Modellverbindungen Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure aus Propylstärke-Nanopartikel (DS 1.0)^[103]). Außerdem wurde im Fall des Koffeins bei Propylstärke mit einem DS von nur noch 1.0 nur noch etwa 55 % des Wirkstoffes im selben Zeitraum von 20 h freigesetzt im Gegensatz zu über 70 % bei der Propylstärke mit einem DS von 1.45. Dies

verweist auf eine stärkere Wechselwirkung des hydrophileren Wirkstoffs Koffein mit den weniger hydrophoben Partikeln aus Propylstärke mit einem DS von nur noch 1.0 als mit den hydrophoberen Partikeln mit einem DS von 1.45. Genauso wurden die attraktiven Wechselwirkungen der Partikelmatrix mit dem hydrophoben Wirkstoff Flufenaminsäure herabgesetzt, was sich in einer erhöhten Freisetzung von etwa 45 % nach 70 h im Gegensatz zu den 25 % im Fall der höher substituierten Stärkepartikel zeigte. Die Freisetzung des Testosterons wurde ebenso wie die des Koffeins reduziert.



Abbildung 57: Freisetzung der Modellverbindungen Koffein, Testosteron und Flufenaminsäure aus Propylstärke-Nanopartikel (DS 1.0)^[103]

Die Hydrophobizität eines Stoffes wird unter anderem mittels des logP-Wertes angegeben. Je höher dieser Wert, desto hydrophober ist der untersuchte Stoff. Der logP-Wert wird bestimmt aus dem Verteilungskoeffizienten der gelösten Substanz in gleichen Volumina an Wasser und n-Octanol.

Formel 11: Berechnung des logP

$$logP = log\left(\frac{c_{Stoff} (n - Octanol)}{c_{Stoff} (Wasser)}\right)$$

4.5.3 Partikel mit Taxotere

Taxotere ist ein hochpotenter Wirkstoff zur Bekämpfung von Lungen- und Brustkrebs.



Abbildung 58: Struktur von Taxotere®

Die Darstellung der Partikel war analog zu der im experimentellen Teil beschriebenen Methode. Die Verkapselungseffizienz betrug mehr als 80 % und etwa 86 % des theoretisch verkapselten Materials können nach Aufbrechen der Partikel wieder gefunden werden (Entnommen dem Abschlussvortrag von Dr. P. Dandekar, Abschlusstreffen BMBF-Projekt 2010). Das bedeutet dass der Wirkstoff mit hoher Effizienz eingeschlossen und auch nicht wieder abgegeben wurde und damit wenige Verluste bei der Formulierung auftreten. Der hohe Anteil an eingeschlossenem Material verspricht eine ausreichende Verkapselung, Transportierbarkeit und damit Effizienz des Nanopartikels als Transportmedium. Ebenso lag die Partikelgröße mit 245 nm im akzeptablen Bereich.



Abbildung 59: SEM-Aufnahme der mit Taxotere beladenen Propylstärke-Nanopartikel

Die Bestimmung der Freisetzung stellte wegen der Unlöslichkeit des Wirkstoffes in Wasser ein Problem dar. Unter den üblichen Bedingungen für die Kinetikmessungen mittels einer Franz'schen Diffusionszelle mit PBS-Medium, auch mit höheren Konzentrationen an Tween 80, konnte ebenso wie im parallel durchgeführten Vergleich durch Testungen mit gesättigten Lösungen an Taxotere, um den Durchgang des Wirkstoffes durch die Membran zu untersuchen, kein freier Wirkstoff im Akzeptormedium gefunden werden. Tween 80, auch Polysorbat 80 genannt, ist ein Polyoxyethylensorbitanmonooleat und findet als nichtionisches Tensid und Emulgator Anwendung. Die Hydrophilie der Membran stellt ebenfalls eine Barriere für die hydrophoben Wirkstoffe dar, welche nicht zu vernachlässigen ist. Die Freisetzung des Taxotere mit n-Oktanol als external sink zeigt einen deutlichen "burst effect" (siehe **Abbildung 60**: Freisetzungskinetik von Taxotere® mit Octanol als external sink). Das bedeutet, dass nahezu der vollständige eingeschlossene Wirkstoff in kürzester Zeit wieder freigesetzt wurde. Es wird davon ausgegangen, dass die sehr hohe Löslichkeit des Taxotere in n-Octanol zu diesem Effekt führte.



Abbildung 60: Freisetzungskinetik von Taxotere® mit Octanol als external sink

4.5.4 Partikel mit Idarubicin

Idarubicin ist ein bekannter Wirkstoff zur Behandlung von Leukämie. Hier wird meist auf das Hydrochlorid zurückgegriffen, da die freie Base in Wasser nur schwer löslich ist. Dennoch ist die freie Base aber die Substanz mit der höheren Wirksamkeit.



Abbildung 61: Struktur von Idarubicin Hydrochlorid

Durch die Verkapselung des Wirkstoffes wurde eine höhere Löslichkeit ermöglicht. Für die Verkapselung selbst war die Form des Idarubicin entscheidend. Zwar unterscheiden sich die Größen der beladenen Partikel nur unbedeutend, aber die Ladekapazität der Partikel war für die freie Base mit 32 Gew % 16 mal so hoch wie die für das Hydrochlorid. Ebenso lag für die freie Base eine Steigerung der Verkapselungseffizienz um mehr als das 12-fache vor.

Tabelle 8: Größe, PDI, Wirkstoffgehalt und Verkapselungseffizienz von Idarubicin als Hydrochlorid und als freie Base

Wirkstoff	Größe [nm]	PDI	Wirkstoff- Beladung [Gew%]	Verkapselungs- Effizienz [Gew%]
Ohne Wirkstoff	197	0.05	-	-
Idarubicin HCl	212	0.04	2	5
Idarubicin freie	223	0.03	32	62
Base				

Eine Untersuchung der mit Partikeln behandelten Zellen zeigte eindeutig ein Vorhandensein des Wirkstoffes in den Zellen. Hierfür wurden die gefärbten Zellen mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und die Bilder übereinander gelagert. Die Zellmembranen wurden für diesen Zweck mit dem Farbstoff "CellMaskTM DeepRed" von Invitrogen rot eingefärbt. Das Idarubicin besitzt von Natur aus eine grüne Fluoreszenz. Zum Vergleich wurden auch Zellen ohne Nanopartikelbehandlung angeregt und abfotografiert.



Abbildung 62: Colon Carcinom 2 (CaCo2) Zellen mit angefärbten Zellmembranen (rot) und Idarubicin (grün)



Abbildung 63: Referenz CaCo2-Zelle ohne Idarubicin

Durch entsprechende Aufnahmen ließ sich zeigen, dass die Partikel sich tatsächlich innerhalb der Zellen befanden und nicht nur an der Oberfläche assoziiert waren. Bei dieser Darstellungsform stellen die beiden Randstreifen des Bildes eine Aufsicht aus einer um 90° verdrehten Perspektiven dar, also einen Blick von der Seite auf dieselbe Stelle. Dadurch wurde erkennbar, dass die grüne Fluoreszenz des Idarubicin nicht nur lokal über oder unter einer Zelle sich befanden, sondern von der Seite betrachtet tatsächlich innerhalb des von Zellmembranen umschlossenen Raums.



Abbildung 64: 3D-Aufnahme von CaCo2-Zellen mit Idarubicin beladenen Stärke-Nanopartikeln

4.5.5 Partikel mit Artesunate

Als weiterer Wirkstoff wurde Artesunate in Partikel aus Propylstärke mit einem DS von 2.0 verkapselt. Dieser Wirkstoff wird zur Bekämpfung von Malaria eingesetzt^[133] und wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Efferth vom Institut für Pharmazie der Universität in Mainz.



Abbildung 65: Struktur von Artesunate

Es handelt sich hierbei um ein Artesiminin-Derivat. Seine Verabreichung, stets in Kombination mit anderen Anti-Malaria Präparaten, um einer Immunisierung vorzubeugen, kann in einer oralen^[134], intravenösen^[135], intramuskülären^[136] oder rektalen^[137] Darreichungsform erfolgen. Als freies Molekül ist Artesunate auch wasserlöslich. Kritisch zu betrachten ist jedoch die Peroxidbrücke, welche empfindlich ist und bei freiem Transport in wässrigem Milieu im Körper schnell hydrolytisch gespalten werden könnte. Sobald dies geschieht ist keine Wirksamkeit des Moleküls mehr vorhanden.



Abbildung 66: Struktur von Artesiminin

Daher ist eine Verkapselung des Wirkstoffes sinnvoll, um diese Peroxidgruppe zu schützen bis zum Erreichen des Wirkortes. Die Verkapselung führte zu Partikeln mit einer Größe von etwa 193 nm bei einem PDI von nur etwa 0.01.

Um die Partikel bei der Gefriertrocknung zu schützen und eine Redispergierbarkeit zu garantieren wurde auf einen so genannten Kryoprotektor zurückgegriffen. In diesem Fall war

dies der Zucker Trehalose. Es wurde die Auswirkung der Zugabe von Trehalose auf Partikelgröße und PDI bestimmt und untersucht, welchen Gehalt an Protektor zugeben werden muss, um eine reproduzierbare Partikelgröße mit möglichst niedrigem PDI zu erhalten. Hierbei stellte sich bei Nanopartikeln, die mit Artesunate beladen wurden, die Zugabe von 0.4 mg Trehalose je mg Stärkederivat als optimal heraus (siehe Tabelle 9: Einfluss der Zugabe von Kryoprotektant auf die Partikelgröße nach Gefriertrocknen und Redispersion). Bei dieser Konzentration an Kryoprotektor wird weder die Partikelgröße noch der PDI stark abgeändert nach einer Redispersion. Es wurden auch größere Volumina von etwa 20 mL mit etwa 56 mg gelöster Substanz (Partikel mit Artesunate, PVA und Kryoprotektor Trehalose) gefriergetrocknet und erfolgreich redispergiert. Diese Partikel hatten nach Redispersion einen Durchmesser von 192.5 nm und einen PDI von 0.034. Diese Werte sind vergleichbar mit denen der entsprechenden Werte nach Gefriertrocknung nur eines kleineren Bestandteils. Dies zeigt, dass das Volumen an behandelter Partikellösung keinen Einfluss auf die Gefriertrocknung und Redispersion hat. Das Gefriertrocknen mit dem Nährmedium RPMI anstelle des Kryoprotektor Trehalose zeigte, dass die im Nährmedium enthaltenen Bestandteile ausreichen, um auf eine externe Zugabe von Kryoprotektoren zu verzichten. Die genaue Zusammensetzung des RPMI-Mediums ist dem experimentellen Teil unter Materialien zu entnehmen. Bei der optimalen Menge an Kryoprotektor von jeweils 0.4 mg je mg Stärkederivat werden Nanopartikel erhalten, die im Durchmesser mit den Partikeln ohne Kryoprotektor vergleichbar sind.

Tabelle 9: Einfluss der Zugabe von Kryoprotektant auf die Partikelgröße nach Gefriertrocknen und Redispersion

Trabalasa	DDMI	Partikeldurchmesser vor Zugabe von		Partikeldurchmesser nach Zugabe von	
[mg]	[mg]	[nm]	PDI	[nm]	PDI
0.2	-	193.3	0.012	248.7	0.163
0.4	-	188.7	0.028	194.0	0.030
-	0.4	-		202.1	0.057
0.6	-	187.9	0.019	247.2	0.139

Diese Partikel wurden an einer Zelllinie von HaCaT-Zellen getestet werden. Die mit dem Wirkstoff beladenen Partikel zeigten keinerlei Effekt auf die Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass der Wirkstoff strukturelle Schäden davon getragen hat und daher, wie einleitend beschrieben, seine Wirksamkeit verloren hat. Ob die Formulierungsprozedur, die Gefriertrocknung und Redispersion oder Transport und Lagerung dies verursacht haben lässt sich im gegebenen Zeitrahmen nicht mehr bestimmen und ist Bestandteil weiterführender Untersuchungen.

4.6 Zytotoxizitätstests

Für die verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Medien genutzt.

Zelllinie	Medium	Fötales Kälberserum	Zusatz
CaCo2	DMEM	Ja	1% nicht essentielle Aminosäuren
A549	RPMI	Ja	ohne
HT29	RPMI	Ja	ohne

Tabelle 10: Nährmedien der einzelnen Zellkulturen

Durch die unterschiedlichen Nährmedien, angepasst an die jeweils verwendete Zellkultur, wird ein optimales Wachstum dieser Zellen erreicht. Damit wurde vermieden, dass schlechtes Wachstum, oder sogar ein Absterben der Zellen, nur auf Grund der ungünstigen Nährmedien fälschlicherweise als negativer Einfluss der Partikel auf die Zellkulturen fehlinterpretiert werden hätte werden können.

4.6.1 Bestimmung der Cytotoxizität mittels MTT-Assay

Um die Cytotoxizität des Wirkstoffs mit den respektiven Nanopartikeln zu bestimmen und zu vergleichen wurde der so genannte MTT-Cytotoxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden Colon-Carcinom Zellen vom Typ CaCo2 C2Bbe1 dem Wirkstoff ausgesetzt. Das Prinzip das diesem Test zu Grunde liegt ist die Umwandlung des gelben Tetrazolium Salzes (MTT) zum tiefblauen Formazan-Produkt (Absorption bei etwa 550 nm) durch Reduktion durch das mitochondriale Dehydrogenase-Enzym lebender Zellen. Nach einer gewissen Inkubationszeit, bei der Wirkstoff und Partikel auf die Zellen einwirken konnten, wurde der Gehalt an lebenden Zellen dadurch bestimmt, wie viel Umsatz des Tetrazolium Salzes noch möglich ist im Vergleich zu einer Probe mit unbehandelten Zellen.

MTT Cytotoxizitäts-Assay für Taxotere und Idarubicin

Es konnten sowohl für Taxotere als auch für Idarubicin nur unregelmäßige Ergebnisse ohne besonderen Trend, unabhängig von verschiedenen eingesetzten Konzentrationen, beobachtet werden. Dies wird zurückgeführt auf Wechselwirkungen des Farbstoffes mit dem Wirkstoff oder mit einigen zellulären Stoffwechselprodukten durch die Inkubation mit dem Wirkstoff. Aus diesen Gründen wurden die Studien für die Testungen mit in Nanopartikel eingeschlossenem Wirkstoff abgebrochen.

4.6.2 Bestimmung der Cytotoxizität mittels ATPase-Assay

Ein weiterer Test auf die Cytotoxizität ist der ATPase Cytotoxizitätstest. Dieser wurde ebenfall an Colon-Carcinom Zellen vom Typ CaCo2 C2Bbe1 mit dem Wirkstoff durchgeführt. Bei diesem Test wird die Aktivität des zelleigenen Enzyms ATPase nach Behandlung mit den Nanopartikeln betrachtet. Dieses Enzym ist nur bei vitalen Zellen funktionell und eine reduzierte Aktivität ist demnach ein Maß für das Absterben der Zellen. Unbeladene Partikel zeigten keine Toxizität und damit auch keinen Einfluss auf die Aktivität der ATPase.

ATPase Zytotoxizitäts-Assay für Taxotere



Abbildung 67: Zellvitalität im Vergleich bei freiem Taxotere® und in Partikel verkapseltem Taxotere®

Die Zellvitalität war bei allen Testkonzentrationen nach einer Inkubation mit Nanopartikeln signifikant niedriger als bei einer Behandlung mit dem freien Wirkstoff. Das Signifikanzniveau α betrug hierbei weniger als 0.05, was auf eine merkenswert höhere Einwirkung durch die mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel hinweist, als es bei vergleichbaren Konzentrationen von freiem Wirkstoff der Fall wäre. Der verbesserte Effekt kann vermutlich auf die Partikelgröße zurückgeführt werden. Dies geht einher mit dem in der Einleitung beschriebenen EPR-Effekt, wonach besonders Partikel in einem Größenbereich von 100 - 200 nm verstärkt malignes Gewebe zu durchdringen.

ATPase Cytotoxizitäts-Assay für Idarubicin

Wegen des Scheiterns des primären Cytotoxizitätstests mit einem MTT-Assay wurde wie zuvor auf den ATPase Assay zurückgegriffen.



Abbildung 68: Zellvitalität im Vergleich bei freiem Idarubicin und in Partikel verkapseltem Idarubicin

Bei jeder der getesteten Konzentrationen zeigte sich nach Inkubation mit Nanopartikeln mit Idarubicin eine signifikant niedrigere Zellvitailität als bei einer Behandlung mit dem freien Wirkstoff. Auch hier lag ein Signifikanzniveau von weniger als 0.05 vor. Dies verwies auf eine merkenswert höhere Liquidation durch die wirkstoffbeladenen Nanopartikel als bei freiem Wirkstoff vergleichbarer Konzentration. Der verbesserte Effekt kann auf die Erhöhung der lokalen Konzentrationen des Wirkstoffes zurückgeführt werden. Dies geht einher mit dem in der Einleitung beschriebenen EPR-Effekt, wonach Partikel in einem Größenbereich von 100 – 200 nm verstärkt malignes Gewebe zu durchdringen.

4.7 Partikel mit Folsäureliganden

Es ist bekannt, dass Partikel der Größenordnung von 100 – 200 nm verstärkt von Krebszellen aufgenommen werden. Dieser Vorgang wurde bereits in der Einleitung erwähnt. Eine zusätzliche Möglichkeit, gezielt bestimmte Zellen anzugreifen, liegt in der Verwendung von zellspezifischen Liganden, in diesem Fall Folsäure. Es wurden Vergleiche zwischen der Aufnahme durch Zellen des Typs A549 mit nur wenigen Folsäurerezeptoren und des Typs HAT-29, welche durch Folsäure-Mangelernährung auf eine hohe Expression des Folsäurerezeptors getrimmt wurden, aufgestellt. Es stellte sich kein Unterschied in der Aufnahme der Partikel durch beide Zellkulturen dar.



Abbildung 69: Schematischer Aufbau eines Wirkstoff-beladenen Nanopartikels mit Folsäureliganden

Im nächsten Schritt wurden Partikel mit Pteroinsäure-modifiziertem PVA hergestellt und mit Idarubicin beladen. Diese Partikel wiesen eine Größe von etwa 218 nm bei einem PDI von nur 0.067 bei einer Verkapselungseffizienz von etwa 80 % auf und waren mit ihrer sphärischen Form vergleichbar mit den Partikeln ohne Folsäureligand. Es zeigte sich, dass Partikel ohne jegliche Rezeptormodifikation nur eine schwache Aufnahme durch die untersuchten Zellen aufwiesen. Solche Partikel mit Folsäuremodifikationen zeigten im Allgemeinen eine verbesserte Aufnahme durch die Zellen der Zelllinien CaCo2 und A549.

4.8 Uptake-Studie mittels konvokaler Mikroskopie

Für die Betrachtungen der Aufnahme der Wirkstoffe mittels Konfokal-Mikroskopie wurden C2Bbe1-Klone einer CaCo2-Zelllinie, einer Darmkrebszelle, und Zellen vom Typ A549 verwendet. A549-Zellen sind adenocarcinomische menschliche Alveolar basale Epithelzellen. Zur Lokalisation der Partikel selbst wurde zur Formulierung der Partikel PVA mit kovalent gebundenem Chinin eingesetzt. Die blaue Fluoreszenz des Chinins ermöglichte eine differenzierte Erkennung der Partikel innerhalb der gefärbten Zellen, da seine Emissionswellenlänge gut differenzierbar ist von der der anderen eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. Für die Experimente wurden Partikel ohne Wirkstoffbeladung, Partikel mit Taxotere, mit FITC-dextran (Fluoresceinisothiocyanato-dextran) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil



Abbildung 70: Struktur von DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate)

FITC-Dextran ist ein Derivat nativen Dextran B512F's, welches mit Fluorescein gekoppelt ist^[138]. Das FITC-Dextran besitzt einen Substitutionsgrad an Fluorescein von 0.002 - 0.008 mol pro Glukoseeinheit.

Es zeigte sich eine Verklumpung der Partikel im Nährmedium DMEM. Dies wurde durch DLS-Messungen bestätigt durch einen Anstieg des PDI. Der Krebs-Ringer Puffer führte nicht zu merkenswerten Verklumpungen und wurde daher für die fortführenden Experimente eingesetzt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass vier, bzw. sechs, Stunden für die zelluläre Aufnahme der Partikel nicht ausreichend waren. Dennoch konnte eine Anhäufung der Partikel durch Assoziation an der Zellmembran trotz Waschen während des Fixierens und Anfärbens beobachtet werden (siehe Abbildung 72: Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zellen des Typs CaCo2 mit gefärbtem Zellkern (blau), Zellmembran (grün) und Dil beladene Propylstärkepartikeln mit Dil beladen (rosa)). Daher wurde für die Inkubation der Zellen mit den Nanopartikeln eine Zeit von sechs Stunden festgesetzt. Anschließend wurde das Medium ersetzt durch ein Medium mit einprozentiger Antibiotikalösung und für weitere sechs Stunden inkubiert. Das Chinin-modifizierte PVA zeigte nur eine schwache Fluoreszenz. Daher konnte auf diesem Weg die Zellaufnahme der Nanopartikel nicht klar visualisiert werden. Das FITCdextran konnte nicht effizient in die Partikel eingebracht werden. Dies lag vermutlich an der hohen Löslichkeit des Farbstoffes im wässrigen Medium. Daher wurde auf den Farbstoff Dil zurückgegriffen. Seine Hydrophobizität ermöglichte eine bessere Beladung und damit eine bessere Visualisierung.

Die Versuchsreihen wurden zusätzlich in A549-Zellen durchgeführt um zu untersuchen, ob der Mangel an zellulärer Aufnahme in den einführenden Untersuchungen auf die Natur der CaCo2-Zellen zurückzuführen war. Diese Studien zeigten eine mögliche Aufnahme der mit Dil beladenen Partikel durch CaCo2-Zellen, aber die Fluoreszenzfarben von Dil und dem für die Anfärbung der Zellmembranen benutzten Rhodamine überlappten. Dennoch war eine deutliche Akkumulation der Partikel um die Zellkerne zu beobachten. Weiterführende Experimente mit FITC gefärbten Zellmembranen sollen diese Beobachtungen bestätigen. Bei den A549-Zellen ließ sich eine eindeutige Aufnahme, bzw. eine Akkumulation im Bereich der Zellkerne, beobachten (siehe **Abbildung 71**: Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zellen des Typs A549 mit gefärbtem Zellkern (blau), Zellmembran (grün) und Dil beladene Propylstärkepartikeln mit Dil beladen (rosa)).



Abbildung 71: Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zellen des Typs A549 mit gefärbtem Zellkern (blau), Zellmembran (grün) und Dil beladene Propylstärkepartikeln mit Dil beladen (rosa)



Abbildung 72: Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zellen des Typs CaCo2 mit gefärbtem Zellkern (blau), Zellmembran (grün) und Dil beladene Propylstärkepartikeln mit Dil beladen (rosa)

Es ließ sich feststellen, dass die Folsäureligangen zu einer deutlichen Ansammlung der Nanopartikel in den Zellen führte, dabei aber keinen Unterschied ausmachte, ob Folsäurerezeptoren exprimierende Zellen vorliegen wie HAT-29-Zellen oder A549-Zellen mit nur wenig Folsäurerezeptoren. Dahingegen ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen Partikeln mit und Partikeln ohne Pteroinsäureliganden feststellen. Mit Liganden werden Partikel deutlich besser aufgenommen als ohne diesen.

Uptake Studie mittels TEM:

Für die Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wird ebenfalls die C2Bbe1 Variante der Darmkrebszellen CaCo2 genutzt. Zum Vergleich werden Bilder von unbehandelten CaCo2 Zellen aufgenommen. Diese zeigen eine glatte Oberfläche.



Abbildung 73: TEM Studie einer CaCo 2 Kontroll-Zellkultur

Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden lassen sich die Partikel aus Propylstärke mit einem DS von 2.0 an der Oberfläche der Zellen angehaftet nachweisen. Dies indiziert die Möglichkeit der Aufnahme durch die Zellen.



Abbildung 74: TEM-Studie der Membranassoziation unbeladener Nanopartikel an CaCo 2 Zellen

Weitere Experimente mit längerer Inkubationszeit sollen noch folgen um die Möglichkeit der Visualisierung der Zellaufnahme zu untersuchen.

Stärkederivate mit Alkylketten bis zu einer Länge von 12 Kohlenstoffeinheiten konnten synthetisiert werden, wobei sich zeigte, dass mit zunehmender Kettenlänge sowohl der erreichbare Substitutionsgrad als auch die Ausbeute sehr stark abnahmen. So wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen bei einer Alkylierung mit Brompropan ein Substitutionsgrad von bis zu 2.8 erreicht, mit Bromdodecan nicht mehr als 0.5. Gleichzeitig stieg die Löslichkeit der Derivate in organischen Lösemitteln, in diesem Fall überwiegend in Ethylacetat getestet. Dodecylstärke brauchte nur einen DS von 0.5, Propylstärke einen DS von mindestens 1.0 um gut löslich in Ethylacetat zu sein. Für die Synthese zeigte sich NaH als optimale Base, ist aber für großtechnische Anwendungen eher ungeeignet. Reaktionen mit NaOH in wässrigem Milieu erreichen deutlich niedrigere Substitutionsgrade. Ebenso konnte mit einer heterogenen Reaktionsführung kein ausreichend substituiertes Derivat erhalten werden. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur von 20 auf 30°C führte zu einer deutlichen Zunahme des DS, bei Temperaturen über 30°C nur zu besseren Ausbeuten. Ebenfalls brachte eine Verlängerung der Reaktionszeit lediglich größere Ausbeute hervor, aber keine bemerkenswerte Steigerung des Substitutionsgrades. Mit zunehmender Kettenlänge jedoch empfiehlt sich eine Reaktionszeit von nicht weniger als einem, am Besten aber drei Tagen, da mit der höheren Kettenlänge auch die Ausbeute deutlich abnimmt, dem durch die längere Reaktionsführung zumindest teilweise entgegengewirkt werden kann.

Polyvinylalkohol konnte mit Pteroinsäure-Hexyldiamin mittels Carbonyldiimidazol als Kupplungsreagenz funktionalisiert werden. Der DS konnte über die Menge an zeigt keinen Zusammenhang der Substitutionsgrade und der eingesetzten Menge an Ligand eingestellt werden. Auf diesem Weg wurde eine Bibliothek verschiedener Substitutionsgrade erstellt.

Die dargestellten Derivate der Stärke zeigten ein sehr gutes Einschluss- und Freisetzungsvermögen für hydrophobe Wirkstoffe. Die nicht vorhandene Toxizität der unbeladenen Partikel gegenüber den getesteten Zellkulturen CaCo2 und A549 erfüllte die in das Material gesetzten Erwartungen. Die Freisetzung der Modelwirkstoffe erfolgte über einen längeren Zeitraum, in Abhängigkeit von der Hydrophobizität des Wirkstoffs. Bei den hydrophoben Wirkstoffen Flufenaminsäure und Testosteron war die Freisetzung langsamer als bei dem hydrophileren Koffein. Für das Krebsmedikamente Idarubicin zeigte sich eine deutlich schnellere Freisetzung wohingegen Taxotere nahezu keine Freisetzung zeigte. Die ersten Tests von Partikeln mit Pteroin-derivatisiertem PVA zeigten keinen Unterschied in der Anreicherung dieser Partikel in den Zellen im Bereich der Nuklei gegenüber den Partikeln ohne den zellspezifischen Liganden. Dennoch konnte festgestellt werden, dass beide Arten von Partikeln eine deutliche Aufnahme in den getesteten Zellen erreichten als der freie Wirkstoff. In weiteren Untersuchungen sollen zusätzliche Wirkstoffe verkapselt werden. Ebenfalls sollen weitere Zellkulturen mit den Nanopartikeln versetzt und auch in vivo Tests durchgeführt werden. Hierbei ist von besonderem Interesse, die Freisetzung zu optimieren und die verbesserte Wirkstoffakkumulation am Wirkort näher zu betrachten. Die Visualisierung der Partikel in den Zellen erfordern noch weitere Optimierungen zur Differenzierung der verschiedenen Wirkstoffe und der Bestandteile der Zellen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Methoden

6.1.1 Material

Die beschriebenen Synthesen sind exemplarisch für die verschiedenen Routen. Vor Reaktionsbeginn werden die Kolben unter Stickstoffstrom ausgeheizt. Die Reaktionen werden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Lösemittel und die Chemikalien werden ohne weitere Aufreinigung verwendet wie vom Hersteller erhalten. NaH wird ungereinigt ohne Abtrennung des Paraffinöls eingesetzt. Sofern wasserfreies DMSO eingesetzt wird, wird solches von Acros Organics (99.7 %, extra trocken über Molsieb, AcroSeal[®]) verwendet. Die Stärke wird im Vakuumtrockenschrank bei 60°C über Nacht getrocknet.

6.1.2 Geräte und Messmethoden

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

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

Für die Aufnahme der **NMR-Spektren** wurden Messungen mit einem Bruker NMR Magnet System 400 MHz Ultra shield plus bei 27°C und 400 MHz durchgeführt. Die ¹H-Spektren werden bei 400.0 MHz mit 64 Pulsen und die ¹³C-Spektren bei 100.6 MHz mit 1024 Pulsen aufgenommen. Zur Auswertung der Spektren wird die Software ACD Labs 7.0 bzw. 10.0 von Advanced Chemistry Development Inc. verwendet.

Für die **IR-Spektroskopie** wird ein Bruker Tensor 27 verwendet. Vermessen werden pulverisierte Proben auf einer golden gate diamond ATR Einheit. Die IR-Spektren werden durch Scannen von 4000 nm bis 400 nm aufgenommen, mit der Software OPUS bearbeitet und mit der Literatur verglichen^[140].

Die **UV/Vis-Spektren** werden mit einem UV/Vis Spektrometer Lambda 2 von Perkin Elmer in Lösungen in einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ in Wasser in Quarzküvetten mit einem Durchmesser von 1 cm aufgenommen und mittels Origin 7.5G ausgewertet. Mittels der UV/Vis-Spektroskopie wurden die Substitutionsgrade der PVA-Derivate ermittelt.

Die Gel Permeations Chromatographie (GPC) wird in DMAc*LiBr durchgeführt. Hierfür wird eine SDV Säule (Polymer Standard Service.GmbH (PSS), Partikelgröße 10^5 Å, Trennbereich 1000 - 1000000 Da, RI-Detektor 2410 von der Firma Waters, 1515 Isocratic HPLC Pumpe von Waters) bei einem Fluss von 1 mL pro Minute verwendet. Als Standard wird Polystyrol mit Molmassen von 1620 Da bis 1090 kDa (PDI = 1.04 - 1.06) zur Kalibrierung genutzt.

Die Partikelgröße, bzw. der Partikeldurchmesser, wird mittels **dynamischer Lichtstreuung** (**DLS**) in wässriger Lösung bestimmt. Hierfür wird ein Nano-Zetasizer von Malvern Instruments (Malvern, UK) benutzt. Die Messungen werden bei 25°C mit einem He-Ne-Laser bei 633 nm durchgeführt.

Das **Zeta-Potential** wird mittels dynamischer Elektrophorese mit einem Nano-Zetasizer von Malvern Instruments (Malvern, UK) bestimmt.

Die Morphologie der Partikel wird mittels **Atomkraftmikroskopie** (**AFM**) mit einem Nanoscope IV Bio-scopeTM (Veeco instruments, Santa Barbara, CA, USA) untersucht. Die Messung erfolgt im taping mode auf einem Siliziumträger mit einer Federkonstante von annähernd 40 N m⁻¹ und einer Resonanzfrequenz von 170 kHz. Es wird mit einer Scanngeschwindigkeit von 0.2 Hz gemessen.

Für die Aufnahme der 3D **Fluoreszenzspektren** und der vorangehenden Absorptionsspektren zur Ermittlung der Absorptionsmaxima wird ein Absorptionsspektrometer V650 und ein Fluoreszenzspektrometer FP6500 der Firma Jasco verwandt. Mit einem **Rasterelektronenmikroskop** (**REM**, **bzw. SEM**) werden Bilder der mit Partikeln beimpften Zellen dargestellt. 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.

Mittels **Konfokalmikroskopie** (confocal laser scanning microscopy, CLSM) wurden die Partikel in den Zellen sichtbar gemacht. Hierfür werden die Zellen mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt. Die Partikel erhalten Farbigkeit einerseits durch fluoreszenzaktive Wirkstoffe (Idarubicin). durch gebundene (Chinin) oder verkapselte (DIL) fluoreszenzaktive Substanzen. Es wird ein Gerät des Typs LSM 510 META NLO (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einem Argon/Neon Laser und 63X Wasser Immersionsobjektiv verwendet. Die zugehörige Software zur Bildbearbeitung ist Volocity[®] (Improvision, Tübingen, Deutschland). Für die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzfarbstoff cellmask deep red wird ein He/Ne Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem Detektionsbereich von 650 – 710 nm verwendet.

Als Dispersionsmedium für die zu testenden Nanopartikel wird Dulbecco's Modified Eagle's Medium, kurz DMEM, benutzt. Dies ist ein standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen welches mehr Nährstoffen als das Eagle's Minimum Essential Medium enthält. Der pH wird mit einem Krebs-Ringer Puffer auf 7.4 eingestellt. Dieser wird aus 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 10 mM Glukose, 200 mM Sulphinpyrazon und zehn mM Hepes^[139] zusammengestellt. Nach vier Stunden Inkubation wird fixiert und angefärbt. Dieser Vorgang wird nach weiteren sechs Stunden wiederholt. Nach zusätzlichen sechs Stunden wird der Krebs-Ringer Puffer durch ein Medium mit 1 % Antibiotika ersetzt und weitere 18 Stunden inkubiert.

6.1.3 Reinigung der Derivate

6.1.3.1 Aufreinigung der Stärkederivate

Für die weiteren Tests und Anwendungen der einzelnen Stärkederivate waren nur diejenigen von Interesse, die vollständig in Ethylacetat löslich waren. Um diese vom Übrigen abzutrennen und aufzureinigen wurden zwei verschiedene Wege beschritten. Zum einen wurde das Reaktionsgemisch auf Wasser gegeben und mit wenig Phosphorsäure angesäuert um die Base zu neutralisieren und eine vollständige Protonierung der Stärke zu gewährleisten. Anschließend wurde der vorliegende Feststoff abfiltriert oder dekantiert, mit Wasser gewaschen und mit Ethylacetat gerührt. Die entstehende Lösung wurde über ein Faltenfilter filtriert und gegen Ethylacetat ultrafiltriert (Koch membranes, flat sheet MPF-U20-S 8.5*11′′). Das Produkt erhält man dann durch Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer im Vakuum.



Abbildung 75: Beispielhafter Aufbau einer Ultrafiltrationsanlage für die Verwendung organischer Lösemittel

Eine andere Möglichkeit der Produktseparation besteht darin, das Reaktionsgemisch mit Wasser zu verdünnen, mit Phosphorsäure leicht anzusäuern und anschließend direkt mit Ethylacetat auszuschütteln. Hierbei kann die Phasentrennung durch Zugabe von konzentrierter Kochsalzlösung erleichtert werden. Nach Abtrennen der wässrigen Phase wird mit der organischen Phase entsprechend der anderen Methode verfahren.

6.1.3.2 Aufreinigung der PVA-Derivate

Die Polyvinylalkoholderivate werden mit Wasser verdünnt, durch ein Faltenfilter filtriert, gegen Wasser ultrafiltriert (Celgard membrane P20F, cut off 20 kDa) und gefriergetrocknet. Die fertigen Chargen müssen wegen der Lichtempfindlichkeit der Folsäure und deren Derivate unter Lichtausschluss und idealerweise kühl gelagert werden.

6.1.4 Synthese der Stärkederivate

6.1.4.1 Propylstärke mit NaH in DMSO



Abbildung 76: Struktur von Propylstärke

25.0 g Stärke (145 mmol AGU) werden in 300 mL DMSO bei 70°C für ½ h gequollen. Dann werden 22.2 g NaH (~60 % Suspension in Paraffinöl, ~462 mmol NaH, 6 Äq) und 141 mL Brompropan (99 %, 1.55 mol, 10 Äq) bei Raumtemperatur in kleinen Portionen hinzu gegeben und das Reaktionsgemisch für drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Feststoff dekantiert und zweimal mit Wasser gewaschen und mit Phosphorsäure neutralisiert. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und durch ein Faltenfilter filtriert. Anschließend wird die Lösung gegen Essigester ultrafiltriert (siehe auch 6.1.3.1). (Koch membranes cut off 20 kDa, flat sheet MPF-U20-S 8.5x11′′). Man erhält eine Ausbeute von etwa 56 % (18.2 g, ausgehend von 100 % AGU mit einem DS von 2.0).

Die ¹H-NMR Auswertung zeigt einen DS von 2.0 bei der Messung des NMR ohne Abbau, gemessen in CDCl₃, (¹H: 400 MHz) 27°C, 64 Pulse): 0.87 (methyl H9, 3H); 1.57 (methylen H8, 2H); 3.28-3.85 (Stärkerückgrat, methylen H7); 4.78 (H1); 5.0-5.1 (OH-Gruppen) 5.5-5.7 (α -anomere H1).

¹H NMR (gemessen in DMSO-d₆) (¹H: 400 MHz), 27°C, 64 Pulse): 0.93 (methyl H9, 3H); 1.64 (methylen H8, 2H); 3.18-4.2 (Glukose, methylen H7); 4.7 (β-anomere H); 5.4 (αanomere H).

¹³C NMR (nach Abbau mit TFA, gemessen in DMSO-d₆ Bruker NMR Magnet System 400 MHz Ultra shield plus (¹³C: 100.6 MHz), 27°C, 1024 Pulse): 89.7 (C1); 78.6 (C2); 77.5 (C3); 74.5/73.1/72.5 (O-CH₂); 72.2 (C5); 71.3 (C6); 66.7 (C4); 22.8/22.6/22.0 (-CH₂-); 10.3/10.1/10.0 (-CH₃).

IR-Spektrum: 3431 (OH Dehnung); 2960/2932/2874 (asymmetrische C-H Dehnung, Alkylkette, C6); 1636 (schwach, adsorbiertes Wasser); 1461/1361 (Winkeldeformation C-H), 1153 (C-O Ether-Dehnungsbande); 1090; 1020 (Alkohol-Dehnungsbande).

GPC-Messungen zeigen ein Molgewicht von etwa 1500 kDa. Da ein derartiger Abbau nicht zu erwarten ist, ist davon auszugehen, dass der GPC-Messung der falsche Standard zur Kalibrierung vorlag.

CHN-Analyse (gefunden): C (60.4 %); H (10.2 %); Die Berechnung über den Gehalt an C führt zu einem DS von 1.95.

CHN-Analyse (berechnet): C (58.1 %); H (9.3 %); O (32.6 %)



Abbildung 77: ¹H-NMR Spektrum Propylstärke, DS 2.0 nach Abbau mit TFA und Entfernen des TFA, gemessen in D₂O

6.1.4.2 Butylstärke mit NaH in DMSO



Abbildung 78: Struktur von Butylstärke

5.00 g Stärke (30.8 mmol AGU) werden in 170 mL DMSO gelöst und bei 70°C für 1 h gequollen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 8.88 g NaH (185 mmol) und 83.2 mL Brombutan (771 mmol) in kleineren Portionen hinzugefügt und das Reaktionsgemisch über drei Tage gerührt. Dann wird der Feststoff dekantiert und zweimal mit Wasser gewaschen. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und über einen Faltenfilter filtriert und anschließend mit Ethylacetat ultrafiltriert (siehe Kapitel 2.2.2.). Die Ausbeute beträgt 3.11 g eines Derivates mit einem Substitutionsgrad von 1.6.

¹H NMR (nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄): 0.9 (methyl H10, 3H); 1.4 (methylen H9, 2H); 1.3 (methylen H8, 2H); 2.7 - 4.0 (Glukose, methylen H7); 4.7 (β-anomere H); 5.4 (α-anomere H). CHN-Analyse (gefunden): C (61.3 %); H (10.8 %); Die Berechnung über den Gehalt an C

führt zu einem DS von 1.4.

CHN-Analyse (berechnet): C (58.9 %); H (9.3 %); O (31,8 %)



Abbildung 79: ¹H-NMR Spektrum Butylstärke DS1.6, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄

6.1.4.3 Hexylstärke mit NaH in DMSO



Abbildung 80: Struktur von Hexylstärke

Es werden 2.50 g Stärke (15.4 mmol, amylosereiche Erbsenstärke) in 170 mL DMSO (wasserfrei, über Molsieb) eine Stunde bei 70°C gequollen. Anschließend werden bei
Raumtemperatur portionsweise 8.88 g NaH (185 mmol, 50 - 60 % in Öl) zugegeben und für eine Stunde gerührt. Dann werden 100.2 mL Bromhexan (771 mmol) zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für drei Tage gerührt. Dann wird das Gemisch filtriert über einen Faltenfilter, der Feststoff in etwa 400 mL Wasser suspendiert und die Suspension mit Phosphorsäure neutralisiert. Der Feststoff wird anschließend mit Wasser gewaschen und nach Dekantieren in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird erneut über ein Faltenfilter filtriert und gegen Ethylacetat ultrafiltriert. Es werden 1.80 g eines Produkts mit dem DS von 1.1 erhalten.

1H NMR (nach Abbau mit D_2O/D_2SO_4): 0.9 (methyl H12, 3H); 1.5 (methylen H11, 2H); 1.3 (methylen H8-10, 6H); 3.0-3.9 (Glukose, methylenH7); 4.5 (β -anomere H); 5.2 (α -anomere H) CHN-Analyse: C (63.3 %); H (10.9 %); Die Berechnung über den Gehalt an C führt zu einem DS von 1.0.

CHN-Analyse (berechnet): C (61.3 %); H (9.4 %); O (29.3 %)



Abbildung 81: ¹H-NMR Spektrum Hexylstärke DS 1.10, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄

6.1.4.4 Octylstärke mit NaH in DMSO



Abbildung 82: Struktur von Octylstärke

2.00 g Stärke (12.4 mmol, teilhydrolisierte Kartoffelstärke) werden in 100 mL DMSO (wasserfrei, über Molsieb) eine Stunde bei 70°C gequollen. Anschließend werden bei Raumtemperatur portionsweise 3.55g NaH (74.0 mmol, 50 – 60 % in Öl) zugegeben und für eine Stunde gerührt. Dann werden 54.1mL Bromoctan (311 mmol) zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für drei Tage gerührt. Da nur wenig Feststoff vorliegt wird das Gemisch mit der gleichen Menge an Wasser versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Nach Entfernen des organischen Lösemittels am Rotationsverdampfer wird der Feststoff erneut in Ethylacetat gelöst und mit Aceton gefällt. Es werden 0.20 g des Produkts mit dem DS von 1.26 erhalten.

¹H NMR (nach Abbau mit D_2O/D_2SO_4): 0.90 (methyl H14, 3H); 1.5 (methylen H13, 2H); 1.3 (methylen H8-12, 10H); 2.9 – 3.9 (Glukose, methylen H7); 4.6 (β-anomere H); 5.2 (α-anomere H).



Abbildung 83: ¹H-NMR Spektrum Octylstärke DS 1.26, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄

6.1.4.5 Decylstärke mit NaH in DMSO



Abbildung 84: Struktur von Decylstärke

1.00 g Stärke (6.17 mmol, teilhydrolisierte Kartoffelstärke) wird in 100 mL DMSO (wasserfrei, über Molsieb) eine Stunde bei 70°C gequollen. Anschließend werden bei Raumtemperatur portionsweise 1.78 g NaH (37.0 mmol, 50 – 60 % in Öl) zugegeben und für eine Stunde gerührt. Dann werden 25.5 mL Bromdecan (108 mmol) vorsichtig unter Eisbadkühlung zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für einen Tag gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf die gleiche Menge Wasser gegeben, intensiv gerührt und mit Phosphorsäure neutralisiert. Der Feststoff wird mit Wasser gewaschen und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser und konzentrierter Kochsalzlösung gewaschen und das organische Lösemittel schließlich entfernt. Es werden nur etwa 90 mg des Produkts mit dem DS von 0.94 erhalten.

¹H NMR (nach Abbau mit D_2O/D_2SO_4): 0.9 (methyl H16, 3H); 1.7 (methylen H14/15, 4H); 1.3 (methylen H8-13, 12H); 2.7 – 4.0 (Glukose, methylen H7); 4.6 (β-anomere H); 5.2 (αanomere H)



Abbildung 85: ¹H-NMR Spektrum Decylstärke DS 0.94, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄

6.1.4.6 Dodecylstärke mit NaH in DMSO



Abbildung 86: Struktur von Dodecylstärke

1.00 g Stärke (6.17 mmol, teilhydrolisierte Kartoffelstärke) werden in 100 mL DMSO bei 70°C gequollen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 1.78 g NaH (37.0 mmol, 6 Äq) und 12.4 mL Bromdodecan (30.8 mmol, 5 Äq) abwechselnd in kleineren Portionen zugegeben und das Gemisch auf 40°C erhitzt. Es wird für einen Tag bei dieser Temperatur gerührt und anschließend aus Ethylacetat gefällt, abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Dann wird das Produkt durch Extraktion aus einem Gemisch von Wasser mit Hexan als in der organischen Phase gelöster Bestandteil gewonnen mit einem Substitutionsgrad von 0.52. Die Ausbeute beträgt etwa 75 mg.

¹H NMR (nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄): 0.74/0.85 (methyl H14, 3H); 1.14/1.24 (methylen H8-13, 10H); 2.9 – 3.8 (Glukose, methylen H7); 4.4 (β-anomere H); 5.5 (α-anomere H).



Abbildung 87: ¹H-NMR Spektrum Dodecylstärke DS 0.52, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄

6.1.4.7 Bifunktionalisierte Stärke



Abbildung 88: mögliche Struktur des bifunktionalisierten Derivates

Als Ausgangssubstanz diente Wachsmaisstärke mit einem Molgewicht von etwa 100 kDa. Nach dem Abbau mit 0.02 % α-Amylase und einer Reaktionszeit von einer Stunde zeigen sich bei einer GPC-Messung zwei größere Fraktionen. Diese werden durch Filtration mittels einer Großanlage mit einer Ausschlussgrenze von etwa 5 kDa des eingebauten Keramikmoduls getrennt. Die Effizienz der Trennung zeigt sich durch Vergleich der GPC Messungen der getrennten Fraktionen:



Abbildung 89: Größenverteilung der enzymatisch abgebauten Stärke vor der Ultrafiltration (grün) und der beiden Fraktionen (rot und blau) nach der Ultrafiltration

Stufe 1: Propylierung 5 Äq

Die Synthese ist analog zur Synthese der Propylstärke wie zuvor beschrieben. Der Feststoff wird in Ethylacetat gelöst und ungereinigt für die nächste Stufe weiter genutzt. Es wird ein DS von 1.8 erreicht.

¹H NMR (nach Abbau mit D_2O/D_2SO_4)(400.0, MHz, 27°C, 64 Pulse): 0.89 (methyl H9, 3H); 1.55 (methylen H8, 2H); 2.84-4.06 (Glukose, methylen H7); 4.4 (β-anomere H); 5.1 (αanomere H).

¹³C NMR (nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄, (100.6 MHz), 27°C, 1024 Pulse): 89.7 (C1); 80.2 (C2); 77.5 (C3); 74.0/73.4/72.5 (O-CH₂); 72.2 (C5); 71.3 (C6); 69.9 (C4); 22.9/22.3/22.0 (-CH₂-); 10.3/10.1/10.0 (-CH₃).

Stufe 2: Bernsteinsäureanhydrid 10 Äq

Die Lösung aus Stufe 1 in Ethylacetat wird mit 9.4 mL Triethylamin (67.9 mmol, 5 Åq) versetzt und etwa eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird hierzu eine Lösung von 13.6 g Bernsteinsäureanhydrid (135 mmol) in 10 mL Ethylacetat zugegeben und einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend abfiltriert und drei Tage ruhen gelassen. Dann wird die Lösung auf 500 mL mit Ethylacetat verdünnt, über Cellite schnellfiltriert, auf 600 mL aufgefüllt und analog zu den monoderivatisierten Stärkeethern in mehreren Portionen ultrafiltriert mit Ethylacetat über eine Membran mit 20 kDa Ausschlussgrenze. Nach Vereinen der Fraktionen wird am Rotationsverdampfer das Lösemittel entfernt. An dieser Stelle kam es zur Verunreinigung der Probe mit Ferrocen durch Dritte. Diese Verunreinigung lässt sich auch nach mehrmaligem behandeln mit einem Magneten und nach mehrmaligem Filtrieren, sowohl über Faltenfilter als auch über Kieselgel, nicht entfernen. Davon ausgehend, dass es bei dem Signal bei etwa 2.7 ppm um die Methylengruppen der Bernsteinsäure handelt, die bei einem DS von 1 eine Integration von 4 aufweisen sollten, kann ein DS von 0.1 für dieses Derivat errechnet werden.



Abbildung 90: ¹H-NMR Spektrum von Propylstärke mit Bernsteinsäure funktionalisiert, DS 0.1, nach Abbau mit D₂O/D₂SO₄

6.1.4.8 Veresterung mit Methyl-Laurat



Abbildung 91: Struktur des Laurinsäure-Stärkeesters

10 g Stärke (61.7 mmol) werden in 500 mL absolutem DMSO bei 70°C für ½ h gequollen. Hierzu werden 0.45 g (14.2 mmol) Natrium-Methanolat dazugegeben und 66.1 g (308 mmol) Methyl-Laurat schnell zugetropft. Das Gemisch wird auf 80°C erhitzt und schwaches Vakuum über Nacht angelegt. Das Gemisch wird über Nacht gerührt und am nächsten Tag die Temperatur auf 90°C erhöht. Nach Anpassen des Vakuums bis zum schwachen Destillieren wird weiter über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wird die Temperatur weiter auf 100°C erhöht und das Vakuum erneut angepasst. Am nächsten Tag wird das Gemisch auf 3.5 L Wasser getropft, der Niederschlag abgesaugt und das Produkt in Ether gerührt. Anschließend wird in Aceton gerührt und über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Es werden 9.35 g Produkt mit einem DS von 0.3 erhalten. Hierbei dient die Methylengruppe wie bei den Alkylstärkeether als Referenz.



Abbildung 92: ¹H-NMR Spektrum Transesterstärke mit Laurinsäure, DS 0.3, in DMSO d_6

6.1.4.9 Veresterung via Transesterifikation mit Sonnenblumenöl

5.00 g Stärke werden bei 70°C in 100 mL DMSO für etwa ½ h gequollen. Anschließend werden 1.66 g NaOMe (30.8 mmol) zugegeben und das Gemisch auf 80°C erhitzt. Hierzu werden 100 mL auf 80°C vortemperiertes Öl dazugegeben und das gesamte Gemisch auf 150°C erhitzt. Dabei wechselt die Farbe von rot über braun nach schwarz). Es wird noch zwei Stunden gerührt, dann über Nacht bei 100°C weitergerührt. Nach Einengen auf etwa 100 mL wird überschüssiges Öl im Scheidetrichter abgetrennt und das Produkt aus Wasser gefällt. Der Rückstand wird in Aceton aufgenommen, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Der allgemeine DS lässt sich berechnen zu 0.07. Das Produkt ist nicht in Ethylacetat löslich.



Abbildung 93: ¹H-NMR Spektrum Transesterstärke mit Sonnenblumenöl mit einem allgemeinen DS von 0.07, gemessen in DMSO-d₆

6.2 Darstellung der Polyvinylalkoholderivate

6.2.1 Synthese des Pteroinsäurederivats

Die Derivatisierung der Folsäure zu Pyrofolsäure und Pteroyl-Aziden wird beschrieben von Luo et al.^[141].

6.2.1.1 Synthese der Pyrofolsäure^[142]

Die Synthese der Pyrofolsäure (Pteroinsäure) aus Folsäure wird von ToromaOrganics durchgeführt.

25.0 g Folsäure (56.5 mmol) werden in 250 mL THF suspendiert und auf 2 °C gekühlt. 64 mL Trifluoressigsäureanhydrid (453 mmol) werden langsam zugegeben, so dass die Temperatur 8°C nicht überschreitet. Das Reaktionsgemisch wird unter Eisbadkühlung sechs Stunden gerührt und über Nacht gekühlt aufbewahrt. Nach vorsichtigem Entfernen des Lösemittels, wobei die Temperatur unter 40°C bleiben muss, wird das Produkt aus 1.5 L Diethylether ausgefällt und bis zur Vollständigen Fällung noch zwei Stunden gerührt. Der Niederschlag wird mit Diethylether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Man erhält eine Ausbeute von 93 % (bezogen auf die eingesetzte Menge Folsäure).

 $\delta_{\rm H}(500 \text{ MHz}; \text{DMSO-d}_6) = 8.67 \text{ (s, 1H, 6-H)}, 7.65 \text{ (m, 2H, 16-H)}, 7.58 \text{ (d, 2H, 15-H)}, 5.12 \text{ (m, 2H, 12-H)}, 4.69 \text{ (m, 1H, 23-H)}, 2.52-1.99 \text{ (m, 4H, 21/22-H)}.$

6.2.1.2 Synthese des Pteroylamidhexylamins^[142]

1,6-Diaminohexan (44.8 g, 385 mmol, 20 Äq) werden in 250 mL DMSO (trocken, über Molsieb) gerührt und 10.0 g Pyrofolsäure (Pteroinsäure, 19.3 mmol, 1 Äq) in kleinen Portionen zugegeben. Die dabei resultierende klare orange-rote Lösung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf etwa 30 mL Volumen reduziert und das orange Produkt aus 400 mL Aceton gefällt. Der Niederschlag wird mit Diethylether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Die Reaktion liefert eine Ausbeute von etwa 89 %. Das Produkt wird unter Lichtausschluss bei vier °C im Kühlschrank gelagert.

 $\delta_{\rm H}(500 \text{ MHz}; \text{DMSO-d}_6/\text{TFA})$ 1.23, 1.40 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂), 2.62 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-), 3.14 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-), 4.45 (d, 2H, NH-CH₂-Ar), 6.58 (d, 2H, aryl), 7.55 (d, 2H, aryl), 8.53 (s, 1H, purine), 8.58 (s, 1H, Ar-H),

δ_C(100.6 MHz; DMSO/TFA) 25.7, 26.3, 27.2, 29.5 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂), 39.2, 40.4 (NH-CH₂-CH₂-), 46.2 (NH-CH₂-aryl), 111.8, 128.0, 129.0 (aryl), 152.7 Ar-NH), 122.8, 148.0, 150.6, 152.7, 152.8, 153.0 (Purin); MS(ESI, DMSO/H₂O) m/z: 411.5 (M+H)⁺.

6.2.2 Synthese der Polyvinylalkoholderivate

Die Synthese wird unter Schutzgas (N_2) und Lichtausschluss mit trocknen Lösemitteln durchgeführt. Hierbei liegt die Synthesevorschrift von Ossipov und Hilborn^[46] zu Grunde.

Im Unterschied zur Literatur wird auf Stickstoff anstelle von Argon als Schutzgas zurückgegriffen und das Lösemittel nicht azeotrop mit Toluol getrocknet. Außerdem wird die Wartezeit zwischen der Zugabe von CDI und der Zugabe von Pteroinsäure von drei auf zwei Stunden verkürzt.

2.00 g PVA (45 mmol, M~31 kDa) werden in 40 mL DMSO (trocken, über Molsieb) gelöst. Nach etwa 30 Minuten werden 3.65 g CDI (22.5 mmol, 0.5 Äq) zu dieser Lösung gegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von weiteren 20 mL DMSO wird 0.81 g Pteroylamidhexylamin (1.97 mmol, 0.042 Äq) auf einmal hinzu gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht (ca. 20 h) gerührt. Die überschüssigen CDI-Funktionalitäten werden anschließend mit 5 mL NH₃ conc. zerstört und das Gemisch für 1 h gerührt. Die Reaktionslösung wird zu etwa 60 mL Wasser gegeben, durch ein Faltenfilter filtriert und gegen Wasser ultrafiltriert (Celgard membrane P20F, cut off 20 kDa) und im Anschluss daran gefriergetrocknet. Eine Ausbeute von etwa 90 % wird erreicht. Der Substitutionsgrad lässt sich zu 0.01 bestimmen. Eine Charakterisierung über ¹H-Spektroskopie analog zur Charakterisierung der Stärkederivate ist wegen der schlechten Abbildbarkeit der Folsäure im ¹H-NMR Spektrum nicht möglich. Es wurden über 100 mg Substanz gelöst in mit TFA angesäuertem DMSO-d₆ benötigt um alle Signale des reinen Pteroinsäure-Hexylamins zu erkennen. Bei einem DS von 0.01 würde entsprechend mehr Substanz benötigt werden, was die Messung allerdings unmöglich macht. Der Zusammenhang zwischen dem Substitutionsgrad und der eingesetzten Menge an Folsäurederivat lässt sich mit einem Polynom der vierten Potenz beschreiben.

Formel 12: Formel der Fit-Kurve für die Darstellung der PVA-Pteroinsäure Derivate

$$Y = A + BX + CX2 + DX3 + EX4$$

$$A = -3.33566 * 10-4$$

$$B = 0.50682$$

$$C = -21.36581$$

$$D = 447.87484$$

$$E = -1811.16957$$

Der Fehler dieser mit Origin berechneten Kurve liegt mit einer Standardabweichung von nur $1.99277*10^{-4}$ und einem R² von 0.99992 in einem repräsentativen Bereich. An Hand dieser Kurve lassen sich fortführende Substitutionsgrade bereits erfolgreich abschätzen.

6.2.3 Chinin-modifiziertes PVA

Die Modifikation des PVA mit Chinin besteht aus zwei Schritten, der Aminofunktionalisierung des Chinin und der anschließenden Kopplung an CDI-aktiviertes PVA. Da es sich hierbei um einen Testlauf handelte wurde die Vorstufe, das aminofunktionalisierte Chinin, nicht aufgereinigt, sondern direkt weiter eingesetzt.

6.2.3.1 Chinin-O-6-aminohexylcarbamat Chinin:

1.50 g (4.6 mmol) Chinin werden unter N₂-Atmosphäre in 50 mL DMSO (trocken über Molsieb) gelöst. Hierzu werden 1.49 g (9.20 mmol) CDI gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 1.07 g (9.20 mmol) Hexyldiamin dazugegeben und drei Tage bei 60°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird aus Wasser ausgefällt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

6.2.3.2 Kopplung des aminofunktionalisierten Chinin an PVA

In einer ausgeheizten Apparatur werden 1.00 g PVA (22.5 mmol) in 20 mL DMSO (wasserfrei über Molsieb) gerührt, bis es fast vollständig gelöst ist. Dann werden 1.84 g (11.3 mmol) CDI zugegeben und für etwa 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu diesem

Reaktionsgemisch werden dann weitere 4 mL DMSO und das aminofunktionalisierte Chinin (C6-Spacer, 0.56 g) zugegeben. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das überschüssige CDI mit 2.5 mL konzentrierter Ammoniaklösung zerstört und etwa eine Stunde gerührt. Das Gemisch wird dann auf 12 mL Wasser gegeben und über ein Faltenfilter abfiltriert. Die Lösung wird zunächst an der Gefriertrocknungsanlage eingeengt, da die übliche Methode am Rotationsverdampfer eine zu hohe Hitzebehandlung darstellen würde und die Folsäure hitzeempfindlich ist. Nach Einengen an der Gefriertrocknungsanlage wird gegen Wasser ultrafiltriert. Hierbei wird eine Celgard-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 20 kDa (Celgard, P20F) benutzt. Der Substitutionsgrad wird mittels UV-Essay aus einer Lösung von 1 mg mL⁻¹ bestimmt zu 0.03.

7 Abschlussbetrachtung

Es müssen nur Materialien eingesetzt werden, deren Unbedenklichkeit für den menschlichen Organismus garantiert ist. Durch die hohe Beladbarkeit und die freie Verfügbarkeit wegen fehlender kovalenter Bindungen besteht ein gutes Verhältnis zwischen Wirkstoffmenge und Trägermaterial. Erste Tests bezüglich der Wirkstofffreisetzung zeigen für bestimmte Wirkstoffe (hydrophobe Modellwirkstoffe wie Testosteron) kaum einen "burst effect"^[103], eine schlagartige Freisetzung des Wirkstoffes. Für die angestrebte Anwendung, dem Transport von Zytostatika, sollte die Größe der Partikel nicht viel größer sein als etwa 100 nm, um eine Abbaubarkeit durch Makrophagen zu ermöglichen^[62, 82, 143]. Der Einfluss der Derivatisierung auf einen enzymatischen Abbau wurde bereits bei niedrigen Substitutionen mit einem DS bis 0.11 von Viswanathan untersucht und als nicht unbedeutend beschrieben^[111].

Die hier dargestellten Partikel weisen eine Größe von etwa 160 – 180 nm auf und konnten bereits erfolgreich in Zellen eingeführt werden. Prinzipiell muss man beachten, dass Nanopartikel und andere Nanostrukturen, wie Carbo-Nanotubes, schon aufgrund ihrer Struktur toxisch auf Zellen wirken können.

8 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
AFM	Atom Force Microskopy / Rasterkraftmikroskopie
AGE	AnhydroGlukoseeinheit
AGU	Anhydro Glukose unit (siehe auch AGE)
Äq	Äquivalent
ATRP	Atom Transfer Radikal Polymerisation
BOP	Benzotriazolyloxytris(dimethylamino)-
	phosphoniumhexafluorophosphat
But-Br	Butylbromid
CaCo2	Colon carcinom 2 / Darmkrebszellen – Kulturlinie
CAM	chorioallantoische Membran
CDI	Carbonyl diimidazol
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CNT	Carbonanotubes
d	Tag
∂	chem. Verschiebung in ppm
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DLS	dynamische Lichtstreuung / dynamic light scattering
DMAc	Dimethylacetamid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DOX	Doxorubicin
DS	degree of substitution / Substitutionsgrad
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
EDCI	N-(3-Dimethylamino-propyl-N-ethyl-carbodiimid
EE	Ethylacetat / Essigsäure-Ethylester
Et ₂ O	Diethylether

Fetal Calf Serum
Fluoresceinisothiocyanat
Flufenamic acid / Flufenaminsäure
Gramm
Gewichtsprozent
Stunde
2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyl uronium
hexafluorophosphate Methanaminium
$2\-(1H-benzotriazol-1\-yl)\-1,1,3,3\-tetramethyluronium hexa fluorophosphat$
1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
Hydroxybenzotriazol
High Performance Liquid Chromatography /
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Infrarot
Liter
Molar
Megahertz
Milliliter
Methotrexat
Molecular weight / Molgewicht
Massenwirkungsgesetz
Di-Natrium Hydrogenphosphat
Nanometer
Kernresonanzspektroskopie
Niederschlag
Pteroic acid / Pteroinsäure
Poly acrylic acid
Polyaminoamin
Phosphatgepufferte Salzlösung, pH=7.4
Polydispersitätsindex
Polyethylenglykol
negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration

PLGA	Poly-(D,L-lactic-co-glycolic acid)
Propyl-Br	1-Brom-Propan
PVA	Polyvinylalkohol
РуВОР	$Benzotriazol \hbox{-} 1-yl-oxy tripyrrolid in ophosphonium\ hexa fluorophosphat$
REM	Rasterelektronenmikroskopie (siehe auch SEM)
RPMI	Roswell Park Memorial Insitute
RT	Raumtemperatur
S	Singulett
SEM	Scanning-Electron-Microskopy (siehe auch REM)
sh	Signalhaufen
t	Triplett
Т	Temperatur
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
Vol%	Volumenprozent

9 Abbildungs-, Formel - und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Amylose (A), Amylopektin (B)	4
Abbildung 2: schematische Darstellung von Cyclodextrin ^[4]	5
Abbildung 3: Einschluss von Iod in die Stärke-Helix ^[6]	6
Abbildung 4: Struktur von Pullulan	7
Abbildung 5: Fulleren C-60	. 12
Abbildung 6: "bucky balls" und Nanotube ^[52]	. 12
Abbildung 7: Struktur des verzweigten Boltorn® Polymers ^[63]	. 14
Abbildung 8: Ringsdorf-Model für Wirkstofftransportsysteme auf der Basis synthetischer	10
Polymere ¹⁷⁵¹	. 19
Abbildung 9: Schematische Darstellung des EPR-Effekts ^{1/9}	. 20
Abbildung 10: Zellulare Aufnahme durch Endocytose, Freisetzung des Wirkstoffes,	0.1
Metabolisierung des Tragermaterials und Exkretion durch Endocytose	.21
Abbildung II: Struktur der Folsaure	. 22
Abbildung 12: Struktur von (A) Cyclopnospnamid (Endoxan [*]) ^{e*3} , (B) Itostamid (Itolawar [®]) ^[93]	24
(Haloxan) ⁽⁻⁾ und (C) Ifolosiamid (ixotan) ⁽⁻⁾	. 24
Abbildung 14: Allgemaines Dealtionsscheme zur Sunthass der Störkederivate	. 20
Abbildung 14: Angemeines Reaktionsschema zur Synnese der Starkedenvale	. 20
Abbildung 15. Depiolometung der AGU (Annyaro-Glukose-Unit)	. 20
Abbildung 17: Vergleich IP. Spektren netiver Stärke (rot) mit Propylstärke (schwarz), DS	. 29
1 A5	31
Abbildung 18: ¹ H-NMR Spektrum von Propylstärke ohne Abbau (DS 1.5)	32
Abbildung 19 : 1H-NMR Spektrum von Propylstärke nach vollständigem Säure-Abbau (DS	S. 52
1.5)	.33
Abbildung 20 : ¹ H-NMR Spektrum von Propylstärke, DS 2.36, abgebaut in TFA ohne	
Entfernen der TFA	. 34
Abbildung 21: ¹ H-NMR Spektrum von Propylstärke, DS von 2.39, abgebaut in TFA nach	
Ersetzen der TFA durch DMSO-d ₆	. 34
Abbildung 22: Darstellung des Methylsulfinylmethylcarbanion als Base	. 37
Abbildung 23: Einfluss der Reaktionszeit auf den Substitutionsgrad bei teilhydrolisierter	
Kartoffelstärke in DMSO (Punkte) und DMF (Dreiecke), 20 Äq Brompropan, 70°C	. 38
Abbildung 24: Einfluss der Reaktionszeit auf die Ausbeute bei einer Propylierungsreaktion	n
mit teilhydrolisierter Kartoffelstärke, 20 Äq Brompropan, 70°C	. 39
Abbildung 25: Einfluss des Reaktandenverhältnisses auf den Substitutionsgrad bei	
teilhydrolisierter Kartoffelstärke (schwarz) und amylosereicher Erbsenstärke (grau) (R	.Т,
6 Aq NaH, 3 d)	. 40
Abbildung 26: Einfluss der Temperatur auf den Substitutionsgrad, Propylierung von	
Kartoffelstärke mit 25 Aq Brompropan, 6 Aq NaH, 3 d	.41
Abbildung 27: Einfluss der Alkylkettenlänge auf den maximal erreichbaren Substitutionsg	rad
Im Vergleich von teilhydrolisierter Kartoffelstärke (schwarz) und amylosereicher	40
Erbsenstarke (grau), 25 Aq Keaktand, $/0^{\circ}$ C, 3 Tage	. 42
Addition 25: Einfluss der Keaktionsbedingungen der Transesterifikation mit Laurinsaure	;-
with T Cradient 80, 00, 100% (arite), 2d bai 100% (then), with T Cradient ((i) 10% (rot)	, 12
mit 1-Gradient 80-90-100°C (grun), 3d bei 100°C (blau), mit 1-Gradient (turkis)	.43

Abbildung 29: mögliche Struktur des bifunktionalen Derivates	44
Abbildung 30: IR-Spektrum von nativer Stärke (rot) und Sonnenblumen-Stärke (schwarz)) mit
1 Äq NaOMe, 2 h bei 150°C, anschließend 16 h bei 100°C	46
Abbildung 31: 1H NMR-Spektrum des Transesterproduktes der Reaktion von Stärke mit	
Sonnenblumenöl, nach Abbau mit D ₂ O/D ₂ SO ₄ , gemessen in dieser Lösung	46
Abbildung 32: Syntheseroute für die Darstellung von PVA, modifiziert mit	
Pteroylamidhexylamin	49
Abbildung 33: Synthese der PVA-Derivate mit Pteroylamidhexylamin	50
Abbildung 34: UV/Vis-Messungen der Kalibrierlösungen mit aminofunktionalisierten	
Pteroinsäure für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in 0.5 M HCl	51
Abbildung 35: Bestimmung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten durch UV	-
Messungen von Pteroylamidhexylam in 0.5 M HCl-Lösung bei 307 nm	52
Abbildung 36: UV/Vis-Spektrum eines PVA-Derivates mit Pteroylamidexylamin, 1 mg m	L^{-1}
	53
Abbildung 37: Einfluss der Reaktandenmenge auf den Substitutionsgrad der	
Pyrofolsäurederivate an PVA bei 0.5 Äq CDI (weiß), 1 Äq CDI (grau) und 2 Äq	
(schwarz), Äg bezogen auf OH-Gruppen	55
Abbildung 38: Syntheseroute der PVA-Derivate mit Chinin	56
Abbildung 39: Struktur von Chinin	57
Abbildung 40: UV-Spektrum des mit Chinin modifizierten PVA, DS 0.01	57
Abbildung 41: 3D-Fluoreszenzspektrum von Propylstärke (DS 2.0) mit Chinin (DS 0.01)	58
Abbildung 42: 3D-Fluoreszenzspektrum von Propylstärke (DS 2.0) ohne Chinin	59
Abbildung 43 : 3D-Fluoreszenzspektrum von Propylstärke (DS 2.0) mit Pyrofolsäure (DS	0.1)
	60
Abbildung 44 : Darstellung der Nanopartikel nach der Emulsions-Evaporations-Methode ^[1]	31]
	61
Abbildung 45: Franz´sche Diffusionszelle	62
Abbildung 46: Einfluss der Alkvlkettenlänge auf die Löslichkeit in Wasser (blauer Bereic	h)
und Ethylacetat (gelber Bereich)	63
Abbildung 47 : Vergleich der Größenverteilung und deren Reproduzierbarkeit für	
Nanopartikel aus Propylstärke (DS 1.45), PDI 0.053	64
Abbildung 48 : Einfluss der PVA-Konzentration auf die Partikelgröße von Propylstärke be	ei
unterschiedlichem DS. Konzentration der Stärkederivate 1 mg mL ⁻¹ , gemessen bei RT	Г 65
Abbildung 49 : Einfluss der PVA-Konzentration auf die Partikelgröße für unterschiedliche	<u>,</u>
Kettenlängen, Propylstärke (grün, DS 1.6), Butylstärke (schwarz, DS 1.6), Hexylstärk	ce
(rot, DS 1.4)	. 66
Abbildung 50 : Einfluss der PVA-Konzentration auf den PDI für Propylstärke bei	
unterschiedlichen DS.	67
Abbildung 51 : Einfluss der PVA-Konzentration auf den PDI bei unterschiedlichen	
Kettenlängen, Propylstärke (grün, DS 1.6), Butylstärke (schwarz, DS 1.6), Hexylstärk	æ
(rot, DS 1.4)	67
Abbildung 52 : Einfluss des DS auf das Zetapotential für Propylstärkepartikel mit 0.2 % P	VA
	68
Abbildung 53: Propylstärke-Nanopartikel, DS 1.0 ohne Wirkstoff	70
Abbildung 54 : Propylstärke-Nanopartikel, DS 1.0 mit Flufenaminsäure	71
Abbildung 55 : Darstellung und Aufbau eines mit Flufenaminsäure beladenen Partikel ^[103]	71

Abbildung 56: Freisetzung der Modellverbindungen Koffein, Testosteron und	
Flufenaminsäure aus Propylstärke-Nanopartikel (DS 1.45) ¹¹⁰³	72
Abbildung 57: Freisetzung der Modellverbindungen Koffein, Testosteron und	
Flufenaminsäure aus Propylstärke-Nanopartikel (DS 1.0) ^[103]	73
Abbildung 58: Struktur von Taxotere®	74
Abbildung 59: SEM-Aufnahme der mit Taxotere beladenen Propylstärke-Nanopartikel.	74
Abbildung 60: Freisetzungskinetik von Taxotere® mit Octanol als external sink	75
Abbildung 61: Struktur von Idarubicin Hydrochlorid	76
Abbildung 62: Colon Carcinom 2 (CaCo2) Zellen mit angefärbten Zellmembranen (rot)	und
Idarubicin (grün)	77
Abbildung 63: Referenz CaCo2-Zelle ohne Idarubicin	77
Abbildung 64: 3D-Aufnahme von CaCo2-Zellen mit Idarubicin beladenen Stärke-	
Nanopartikeln	78
Abbildung 65: Struktur von Artesunate	79
Abbildung 66: Struktur von Artesiminin	79
Abbildung 67: Zellvitalität im Vergleich bei freiem Taxotere® und in Partikel verkapse	ltem
Taxotere®	83
Abbildung 68: Zellvitalität im Vergleich bei freiem Idarubicin und in Partikel verkapsel	tem
Idarubicin	84
Abbildung 69: Schematischer Aufbau eines Wirkstoff-beladenen Nanopartikels mit	
Folsäureliganden	85
Abbildung 70: Struktur von DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanin	e
perchlorate)	86
Abbildung 71: Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zellen des Typs A549 mit gefä	rbtem
Zellkern (blau), Zellmembran (grün) und Dil beladene Propylstärkepartikeln mit Di	1
beladen (rosa)	88
Abbildung 72 : Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zellen des Typs CaCo2 mit	
gefärbtem Zellkern (blau). Zellmembran (grün) und Dil beladene Propylstärkepartik	eln
mit Dil beladen (rosa)	88
Abbildung 73: TEM Studie einer CaCo 2 Kontroll-Zellkultur	89
Abbildung 74 : TEM-Studie der Membranassoziation unbeladener Nanopartikel an CaCo	o 2
Zellen	
Abbildung 75 : Beispielhafter Aufbau einer Ultrafiltrationsanlage für die Verwendung	
organischer Lösemittel	95
Abhildung 76 [.] Struktur von Propylstärke	97
Abbildung 77 . ¹ H-NMR Spektrum Propylstärke, DS 2.0 nach Abbau mit TFA und Entfe	ernen
des TFA gemessen in D ₂ O	98
Abbildung 78: Struktur von Butylstärke	90
Abbildung 70 . ¹ H-NMR Spektrum Butylstärke DS1.6. nach Abbau mit D ₂ O/D ₂ SO ₄	100
Abbildung 80: Struktur von Hexylstärke	100
Abbildung 81: ¹ H-NMR Spektrum Heyylstärke DS 1 10. pach Abbau mit D ₂ O/D ₂ SO.	101
Abbildung 82: Struktur von Octulstärke	101 102
Abbildung 82. ¹ U NMD Spoktrum Octyletörke DS 1.26 noch Abbay mit D O/D SO	102 102
Abbildung 93. II-ININK Spektrulli Octyfstarke DS 1.20, llach Addau llill D_2O/D_2SO_4	103 102
Abbildung 85. ¹ H NMD Spolttrum Decylstärke DS 0.04 nach Akhay mit D 0/D 50	103 104
Abbildung 65. II-INIVIK Spektrum Decyistarke DS 0.94, nach Addau mit D_20/D_2SO_4	104 10 <i>5</i>
Abbildung 07. ¹ UNMD Spelterer Dedeedstarke	105
ADDIIGUNG 57: H-NMK Spektrum Dodecylstarke DS 0.52, nach Abbau mit D_2O/D_2SO_2	i 106

Abbildung 88: mögliche Struktur des bifunktionalisierten Derivates	107
Abbildung 89: Größenverteilung der enzymatisch abgebauten Stärke vor der Ultrafiltration	n
(grün) und der beiden Fraktionen (rot und blau) nach der Ultrafiltration	107
Abbildung 90: ¹ H-NMR Spektrum von Propylstärke mit Bernsteinsäure funktionalisiert, I)S
0.1, nach Abbau mit D_2O/D_2SO_4	109
Abbildung 91: Struktur des Laurinsäure-Stärkeesters	110
Abbildung 92: ¹ H-NMR Spektrum Transesterstärke mit Laurinsäure, DS 0.3, in DMSO d_6	5
	111
Abbildung 93: ¹ H-NMR Spektrum Transesterstärke mit Sonnenblumenöl mit einem	
allgemeinen DS von 0.07, gemessen in DMSO-d ₆	112
Formel 1: Berechnung des Substitutionsgrades mittels ¹ H-NMR Spektroskopie	33
Formel 2: Berechnung des Gehaltes an Sauerstoff	35
Formel 3: Berechnung der Molmenge an AGU	35
Formel 4: Berechnung der Masse an Kohlenstoff im Rückgrat	35
Formel 5: Berechnung der Molmenge an Substituent im Derivat	36
Formel 6: Berechnung des Substitutionsgrades durch das Molverhältnis von Substituent zu	um
Rückgrat	36
Formel 7: Berechnung der Pyrofolsäurekonzentration im Derivat	53
Formel 8: Berechnung der Pyrofolsäuremenge im Derivat	53
Formel 9: Berechnung der PVA-Masse im Derivat	54
Formel 10: Berechnung des Substitutionsgrades an Pyrofolsäure im Derivat	54
Formel 11: Berechnung des logP	73
Formel 12: Formel der Fit-Kurve für die Darstellung der PVA-Pteroinsäure Derivate	115
Tabelle 1: Verwendete Stärkesorten	29
Tabelle 2: Zusammensetzung von Sonnenblumenöl ^[112]	45
Tabelle 3: Haupt- Absorptions- und Emissionswellenlängen von Partikeln mit	
unterschiedlichen PVA-Liganden	60
Tabelle 4: Alkylkettenlängen und die zugehörigen Substitutionsgrade und Partikelgrößen	65
Tabelle 5: Partikelgröße und PDI für Chinin-modifizierte Nanopartikel aus Propylstärke	68
Tabelle 6: Durchmesser der Partikel mit unterschiedlichen PVA-Liganden	69
Tabelle 7: Partikelgrößen, PDI und Verkapselungseffizienzen für die Modellwirkstoffe	
Flufenaminsäure, Testosteron und Koffein, DS der Propylstärke 1.45	70
Tabelle 8: Größe, PDI, Wirkstoffgehalt und Verkapselungseffizienz von Idarubicin als	
Hydrochlorid und als freie Base	76
Tabelle 9: Einfluss der Zugabe von Kryoprotektant auf die Partikelgröße nach	
Gefriertrocknen und Redispersion	80
Tabelle 10: N\u00e4hrmedien der einzelnen Zellkulturen	81

10 Literaturverzeichnis

- [1] <u>http://www.biosicherheit.de/de/lexikon/</u>.
- [2] J. Lehmann, Buch, Georg Thieme Verlag, Stuttgart * New York 1996.
- [3] G. Wenz, T. Höfler, Carbohydrate research 1999, 153.
- [4] C. Strassnig, *Dissertation* **2007**.
- [5] I. Lee, K. Akiyoshi, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2911.
- [6] <u>http://ghag.gh.funpic.de/chemielexikon/lexikon2.html</u>.
- [7] K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, *Macromolekules* **1993**, *26*, 3062.
- [8] K. Akiyoshi, J. Sunamoto, Supramolecular Science 1996, 3, 157.
- K. Akiyoshi, Y. Sasaki, K. Kuroda, J. Sunamoto, *Chemistry Letters* 1998, 93.
- [10] E. Fournier, M.-H. Dufresne, D. C. Smith, M. Ranger, J.-C. Leroux, *Pharmaceutical Research* **2004**, *21*, 962.
- [11] <u>http://www.seilnacht.com/Chemie/ch_staer.htm</u>.
- [12] H.-G. Fritz, B. Widmann, Starch/Stärke 1993, 45, 314.
- [13] F. Böttger, Dissertation 2003.
- [14] A. Besheer, G. Hause, J. Kressler, K. Mäder, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 359.
- [15] R. F. T. Stepto, Polymer International 1997, 43, 155.
- [16] S. L. Fossheim, M. D. P. Spiller, K. E. P. Kellar, *Investigative Radiology* 1999, 34, 287.
- [17] A. M. Mark, C. L. Mehltretter, *Staerke* **1972**, *24*, 73.
- [18] H. Weyl, Makromolekulare Stoffe Teil2 4 Aufl. "Polyester".
- [19] A. Lehmann, B. Volkert, *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114*, 369.
- [20] V. Singh, S. Isobe, H. Toyoshima, H. Okadome, K. Ohtsubo, *Trends in Applied Sciences Research* **2007**, *2*, 175.
- [21] M. Zhao-rong, Guangzhou Huagong 2009, 37, 67.
- [22] L. Junista, A. K. Sugih, R. Manurung, F. Picchioni, L. P. B. M. Janssen, H. J. Heeres, *Staerke* 2009, 61, 69.
- [23] A. Rajan, V. S. Prasad, T. E. Abraham, International Journal of Biological Macromolecules **2006**, *39*, 265.
- [24] J. Aburto, I. Alric, E. Borredon, Starch-Starke 2005, 57, 145.
- [25] F. Böttger, **2003**.
- [26] A. Besheer, G. Hause, J. Kressler, K. Mäder, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 359.
- [27] C. S. Schmitz, N. de Simas, K. Santos, J. J. Joao, R. de Mello Castanho Amboni, E. Amante, *International Journal of Food Science and Technology* 2006, 41, 681.
- [28] B. Kosan, F. Meister, T. Liebert, T. Heinze, D09, Cellulose 2006, 13, 105.
- [29] K. Petzold, D. Klemm, A. Stein, W. Gunther, *Designed Monomers and Polymers* **2002**, *5*, 415.
- [30] S. Chakraborty, B. Sahoo, I. Teraoka, L. M. Miller, R. A. Gross, *Macromolecules* 2005, 38, 61.

- [31] W. Lazik, T. Heinze, K. Pfeiffer, G. Albrecht, P. Mischnik, 2002.
- [32] G. Keilich, P. Salminen, E. Husemann, Makrom. Chem. 1971, 141, 117.
- [33] S. Hakamori, J. Biochem. (Tokyo) 1964, 55, 205.
- [34] G. Keilich, N. Frank, E. Husemann, Makromol. Chem. 1975, 176, 3269.
- [35] T. Heinze, T. Liebert, U. Heinze, K. Schwikal, Cellulose 2004, 11, 239.
- [36] C. Grote, T. Heinze, *Cellulose* **2005**, *12*, 435.
- [37] M. L. Rooney, Polymer 1976, 17, 555.
- [38] L. Junista, A. Sugih, R. Manurung, F. Picchioni, L. P. B. M. Janssen, H. J. Heeres, *Starch/Stärke* 2008, 60, 667.
- [39] J. Aburto, H. Hamaili, G. Mouysset-Baziard, F. Senocq, I. Alric, E. Borredon, *Starch/Stärke* 1999, 51, 302.
- [40] J. Aburto, I. Alric, E. Borredon, Starch/Stärke 1999, 51, 132.
- [41] Y. Kaneo, S. Hashihama, A. Kakinoki, T. Tanaka, T. Nankano, Y. Ikeda, Drug Metab. Pharmacokinet. 2005, 20, 435.
- [42] L. C. Winterton, J. M. Lally, K. B. DSentell, L. L. Chapoy, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2006, 80B, 424.
- [43] A. Samide, A. Ciuciu, C. Logofatu, M. Freda, *Materiale Plastice* **2010**, *47*, 173.
- [44] Y. Kojima, H. Maeda, Journal of Bioactive and Compatible Polymers 1993, 8, 115.
- [45] T. Yamaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, J. Pharm. Pharmacol. 1995, 47, 479.
- [46] Dmitri A. Ossipov, Jns Hilborn, Macromolecules 2006, 39, 1709.
- [47] B. Luppi, T. Bigucci, T. Cerchiara, V. Andrisano, V. Pucci, R. Mandrioli, V. Zecchi, *Drug Delivery* 2005, 12, 21.
- [48] C. G. Oster, M. Wittmar, F. Unger, L. Barbu-Tudoran, A. K. Schaper, T. Kissel, *Pharmaceutical Research* 2004, 21, 927.
- [49] B. N. Gacal, B. Koz, B. Gacal, B. Kiskan, M. Erdogan, Y. Yagci, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2009, 47, 1317.
- [50] M. Shuichi, T. Noriyasu, T. Atsuko, N. Kimihito, T. Kazunobu, *Macromolecules* **1999**, *32*, 7753.
- [51] <u>http://www.nanopartikel.info/cms/FAQ</u>, 21.02.2011.
- [52]

<u>http://www.uniaktuell.unibe.ch/lenya/uniaktuell/live/unileben/hinter</u> grund/2007/nanotechnologie.html.

- [53] S. Osamu, C. F. van Nostrum, M. Fens, C. J. F. Rijcken, R. M. Schiffelers,
 G. Storm, W. E. Hennink, *Journal of controlled release* 2005, 103, 341.
- [54] <u>http://epub.oeaw.ac.at/ita/nanotrust-dossiers/dossier006.pdf</u>, 03.04.2011.
- [55] T. N. Hoheisel, S. Schrettl, R. Szilluweit, H. Frauenrath, *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 6644.
- [56] L. Ling-Yi, C. Chienchih, B. Hsunling, Earozoru Kenkyu 2010, 25, 121.
- [57] A. Jaworek, Powder Technology 2007, 176, 18.
- [58] Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, Biomacromolecules 2006, 7, 1433.
- [59] K. Kuroda, K. Fujimoto, J. Sunamoto, K. Akiyoshi, *Langmuir* **2002**, *18*, 3780.
- [60] S. L. Fossheim, M. Spiller, K. E. Kellar, *Investigative Radiology* **1999**, *34*, 287.

- [61] F. Atyabi, S. Manoochehri, S. H. Moghadam, R. Dinarvand, Archives of pharmacal research 2006, 29, 1179.
- [62] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Advanced Drug Delivery Reviews **2002**, *54*, 631.
- [63] <u>http://www.perstorp.com/upload/boltorn_0910.pdf</u>, 03.04.2011.
- [64] P. Kedziora, G. Lewandowicz, K. Prochaska, *Politechnika Poznanska Pol. Przemsyl Chemiczny* **2006**, *85*, 8.
- [65] K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, C06s, Macromolecules 1993, 26, 3062.
- [66] Jos T. F. Keurentjes, Maartje F. Kemmere, H. Bruinewoud, Micky A. M. E. Vertommen, Stefan A. Rovers, R. Hoogenboom, Léon F. S. Stemkens, Fabiènne L. A. M. A. Péters, Naomi J. C. Tielen, Dirk T. A. van Asseldonk, Anne F. Gabriel, Elbert A. Joosten, Marco A. E. Marcus, Angewandte Chemie International Edition 2009, 48, 9867.
- [67] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D. M. DShin, *Clin Cancer Res* 2008, 14, 1310.
- [68] M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert, *Die Pharmazie* **1989**, 9, 585.
- [69] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette, Advanced Drug Delivery Reviews **2004**, *56*, 1649.
- [70] Y.-L. Li, L. Zhu, Z. Liu, R. Cheng, F. Meng, J.-H. Cui, S.-J. Ji, Z. Zhong, Angewandte Chemie International Edition 2009, 48, 9914.
- [71] H. Cheng, C. J. Kastrup, R. Ramanathan, D. J. Siegwart, M. Ma, S. R. Bogatyrev, Q. Xu, K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, ACSNano 2010, 4, 625.
- [72] T. Suzuki, Journal of Chemical Information and Computer Science 2001, 41, 1266.
- [73] A. Meister, G. Wenz, *Minutes of the 5th Symposium on Cyclodextrins, Paris* **1990**, 188.
- [74] C. Alexiou, R. J. Schmid, R. Jurgons, K. Marcus, G. Wanner, C. Bergemann, E. Huenges, T. Nawroth, W. Arnold, F. G. Parak, *Eur. Biophys. J.* 2006, 35, 446.
- [75] C. Alexiou, R. Jurgons, C. Seliger, S. Kolb, B. Heubeck, H. Iro, Z. Phys. Chem. 2006, 220, 235.
- [76] R. Haag, F. kratz, angew. Chem. 2006, 118, 1218.
- [77] C. Alexiou, R. J. Schmid, R. Jurgons, M. Kremer, G. Wanner, C. Bergemann, E. Huenges, T. Nawroth, W. Arnold, F. G. Parak, *European Biophysics Journal* 2006, 35, 446.
- [78] S. Chakraborty, B. Sahoo, I. Teraoka, R. A. Gross, Carbohydrate Polymers 2005, 60, 475.
- [79] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 2001, 47, 113.
- [80] T. Suzuki, Journal of Chemical Information and Computer Sciences 2001, 41, 1266.
- [81] A. Meister, G. Wenz, in *Minutes of the 5th Symposium on Cyclodextrins, Paris* (Ed.: D. Duchene), Editions de Santé, **1990**, pp. 188.

- [82] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette, Advanced Drug Delivery Reviews **2004**, *56*, 1649.
- [83] J. Fang, T. Sawa, H. Maeda, Advances in Experimental Medicine and Biology 2003, 519, 29.
- [84] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D. M. Shin, *Clinical Cancer Research* 2008, 14, 1310.
- [85] L. Yang, P. Alexandridis, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2000**, *5*, 132.
- [86] C. P. Leamon, J. A. Reddy, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004, 56, 1127.
- [87] C. P. Leamon, R. B. DePrince, R. W. Hendren, J. Drug Target. 1999, 7, 157.
- [88] C. P. Leamon, P. S. Low Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 5572.
- [89] J. Y. Lu, D. A. Lowe, M. D. Kennedy, P. S. Low, Journal of Drug Targeting 1999, 7, 43.
- [90] S. V. Vinogradov, A. D. Zeman, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Journal of Control Release* 2006, 107, 143.
- [91] S. Chen, X.-Z. Zhang, S.-X. Cheng, R. X. Zhuo, Z.-W. Gu, *Biomacromolecules* 2008, 9, 2578.
- [92] G. Destito, R. Yeh, C. S. Rae, M. G. Finn, M. Manchester, *Chemistry & Biology* 2007, 14, 1152.
- [93] U. Meyer, *Pharmaz unserer Zeit* 2006, 2.
- [94] O. Pauwels, G. Atassi, R. Kiss, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **1995**, 33, 35.
- [95] H. Lünenbürger, C. Lanvers-Kaminsky, B. Lechtape, M. C. Frühwald, Anti-Cancer Drugs 2010, 21, 514.
- [96] P. K. Gadhia, M. Gadhia, S. Georje, K. R. Vinod, M. Pithawala, *Indian Journal of Science and Technology* **2008**, *1*.
- [97] D. T. Brown, From medicinal and aromatic plants Industrial Profiles **2003**, *32*, 387.
- [98] C. Ferlini, I. Ojima, M. Distefano, D. Gallo, A. Riva, P. Morazzoni, E. Bombardelli, S. Manucuso, G. Scambia, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* 2003, 3, 133.
- [99] P. Mabeta, M. S. Pepper, Angiogenesis 2009, 12, 81.
- [100] V. Nekkanti, P. Karatgi, S. Paruchuri, R. Pillai, Drug Delivery, 18.
- [101] F. Darroudi, A. T. Natarajan, Mutant Research 1989, 212, 137.
- [102] H. Sauer, Fortschritte der Medizin 1983, 101, 705.
- [103] M. J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, G. Wenz, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, *Journal of Controlled Release* 2010, 141, 85.
- [104] T. Stauner, *Diplomarbeit* 2007.
- [105] R. J. Hauber, J. N. BeMiller, J. E. Fannon, Starch/Stärke 1992, 9, 323.
- [106] F. A. Tetchi, A. Rolland-Sabaté, G. N. G. Amani, P. Colonna, Journal of the Science of Food and Agriculture 2007, 87, 1906.
- [107] G. N. G. Amani, A. Buléon, A. Kamenan, P. Colonna, Journal of the Science of Food and Agriculture 2004, 84, 2085.

- [108] H. Fredriksson, J. Silverio, R. Andersson, A. C. Eliasson, P. Aman, Carbohydrate Polymers 1998, 35, 119.
- [109] G. Keilich, P. Salminen, E. Husemann, *Makromolekulare Chemie* **1971**, *141*, 117.
- [110] G. Keilich, N. Frank, E. Husemann, Die Makromolekulare Chemie 1975, 176, 3269.
- [111] A. Viswanathan, Journal of Environmental Polymer Degradation 1999, 7, 185.
- [112] L. u. V. Bundesministerium für Ernährung, 2008, 17.4.1997 (BAnz.Nr. 239a vom 20.12.1997, GMB1. Nr. 45 S864 vom 19.12.1997), geändert am 2.10.2001 (BAnz.Nr. 199 vom 24.10.2001. GMB1 Nr. 38 S.754 ff vom 3.10.2001).
- [113] H. A. Staab, Justus Liebigs Ann Chem 1957, 609, 75.
- [114] F. K. Chen, K., N. Benoiton, Synthesis 1978, 928.
- [115] J. C. Sheehan, G. P. Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067.
- [116] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 3039.
- [117] G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser, J. Am. Chem. Soc. 1961, 83, 1263.
- [118] M. Bodansky, V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 6072.
- [119] J. Kovacs, L. Kisfaludy, M. Q. Ceprini, R. H. Johnson, *Tetrahedron* 1969, 25, 2555.
- [120] J. Kovacs, L. Kisfaludy, M. Q. Ceprini, J. Am. Chem. Soc. 1967, 89, 183.
- [121] B. O. Handford, J. H. Jones, G. T. Young, T. Johnson, J. Chem. Soc. 1965, 6814.
- [122] W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 788.
- [123] L. A. Carpino, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4397.
- [124] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Letters* 1989, 30, 1927.
- [125] B. S. Patil, G.-R. Vasanthakumar, S. Babu, Synthetic Cummunications 2003, 33, 3089.
- [126] B. Castro, J.-R. Dormoy, B. Dourtoglou, G. Evin, C. Selve, J.-C. Ziegler, Synthesis 1976, 11, 751.
- [127] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, Tetrahedron Letters 1990, 31, 205.
- [128] H. S. Yoo, T. G. Park, *Journal of Controlled Release* 2004, 100, 247.
 [129] <u>http://www.dcb-</u>

server.unibe.ch/dcbneu/studies/pharmazie/PCI/FLUORO.pdf.

- [130] M. J. Santander Ortega, U. Schäfer, C. M. Lehr, *unveröffentlichter* Arbeitsbericht **2007**.
- [131] B. Weiss, M. Marc Schneider, L. Muys, S. Taetz, D. Neumann, U. F. Schaefer, C.-M. Lehr, *Bioconjugate Chemistry* 2007, 18, 1087.
- [132] P. N. Pusey, Journal de Physique (Paris) 1987, 48, 709.
- [133] Q. Li, P. Weina, *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 2322.
- [134] R. L. Clark, W. E. Gristwood, R. Lewsley, R. Wilson, A. W. Harrell, Birth Defects Research (Part B) 2010, 89, 364.

- [135] K. T. Batty, L. T. A. Thu, T. M. E. Davis, I. K. F., T. X. Mai, N. Canh Hung, N. Phuc Tien, H. Van Thien, T. Q. Binh, N. Van Kim, Br. J. Clin. Pharmacol. 1998, 45, 123.
- [136] T. T. Hien, T. M. E. Davis, L. V. Chuong, K. F. Ilett, D. X. T. Sinh, N. H. Phu, C. Agus, G. M. Chiswell, N. J. White, J. Farrar, *antimicrobial Agents* and Chemotherapy 2004, 48, 4234.
- [137] M. F. Gomes, M. A. Faiz, J. O. Gyapong, M. Warsame, T. Agbenyega, A. Babiker, F. Baiden, E. B. Yunus, F. Binka, C. Clerk, P. Folb, R. Hassan, M. A. Hossain, O. Kimbute, A. Kitua, S. Krishna, C. Makasi, N. Mensah, Z. Mrango, P. Olliaro, R. Peto, T. J. Peto, M. R. Rahman, I. Ribeiro, R. Samad, N. J. White, <u>www.thelancet.com</u> 2009, 373, 557.
- [138] A. N. De Belder, K. Granath, Carbohydrate Research 1973, 30, 375.
- [139] <u>http://www.med.upenn.edu/kaestnerlab/documents/Krebs.pdf</u>, 08.02.2011.
- [140] D. C. Dragunski, A. Pawlicka, *Material Research* 2001, 4, 77.
- [141] J. Luo, M. D. Smith, D. A. Lantrip, S. Wang, P. L. Fuchs, Journal of the American Chemical Society 1997, 119, 10004.
- [142] C. Thiele, *Dissertation* **2010**.
- [143] O. Soga, C. F. van Nostrum, M. Fens, C. J. F. Rijcken, R. M. Schiffelers, G. Storm, W. E. Hennink, J. Controlled Release FIELD Full Journal Title: Journal of Controlled Release 2005, 103, 341.

11 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich meinen persönlichen Dank für alle diejenigen aussprechen, die meine Arbeit überhaupt ermöglicht und mich tatkräftig unterstützt haben:

Professor Dr. Gerhard Wenz, für die mehr als interessante Aufgabenstellung, die fruchtbaren Diskussionen und die aufmunternden Worte bei Rückschlägen oder Stagnation;

Herrn Professor Dr. Claus-Michael Lehr für die Übernahme des Zweitgutachtens und der wissenschaftlichen Begleitung meiner Arbeit.

Frau Gerti Radünz und Frau Petra Thinnes, die mir einen Großteil der bürokratischen Lasten von den Schultern nehmen konnten;

Die Angestellten des Arbeitskreises für die technische und praktische Unterstützung: Joachim Kriesamer für die notwendigen passgenauen Spezialanfertigungen, Thomas Scherer für die häufigen Reparaturen, Anne Engelke für die vielen Messungen, vor allem gegen Ende, Jutta Ganz und Blandine Bossmann,

Die aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Arbeitskreises für die konstruktiven Gespräche und Unterstützung auch außerhalb der Dienstzeit: Manuel Keil, Devid Hero (der mir eine Menge Synthesearbeit abgenommen hat, aber auch immer gute Ideen beisteuern konnte), Dr. Masayuki Hirosue, Haiming Wang, Michael Hahn, Tanja Seibert, Daniela Hausen, Sebastian Witti, Christian Teuchert, Jennifer Ax (ohne die die bestechenden Bilder nicht möglich gewesen wären), Dr. Melanie Schnabel, Andreas Lippach, Dr. Prajaktar Dandekar (für die Geduld bei den Messungen der Freisetzungskinetiken von Taxotere), Dr. Thomas Stöhr, Thomas Albuzat, Dr. Thomas Jung, Dr. Carolin Thiele und Dr. Katrin Ohliger. Den Vertiefungsstudenten Joseph Adjei Danso und Lisa Becker für die kooperative Zusammenarbeit;

Marcel Wirtz und Dagmar Auerbach für die wertvolle Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen und -auswertungen,

Den Kooperationspartnern des BMBF-NanoStarch Projektes für die bemerkenswerte Zusammenarbeit und die konstruktiven Meetings.

Den Mitarbeitern der BASF, Dr. Harald Keller, Dr. Hans-Michael Walter, Dr. Masayuki Hirosue Den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreis Lehr, Prof. Dr. Claus-Michael Lehr, Dr. Brigitta Loretz, Dr. Noah Nafee, Dr. Ulrich Schäfer und Dr. Jain Ratnesh, für die Formulierungen, Messungen, Bilder und Testungen.

Der Firma ToromaOrganics, Dr. Tobias Schulz, Dr. Michael Bauer, Dr. Thomas Jung, Dr. Mathias Großer

Nicht zu vergessen Nicole Bach und Petra Schmitz, zwei Leidensgenossen und unvergessene Freunde. Danke für den Rückhalt und den Zuspruch, wenn es mal gar nicht laufen wollte! Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Peter und Elke Stauner und meiner Schwester Bettina Rubeck, die mir in allen Lagen den Rücken gestärkt haben, mir immer zur Seite standen und meine Hochs und Tiefs zusammen mit mir durch gestanden haben.

Alleine erreicht niemand ein hochgestecktes Ziel. Hinter jedem Erfolg steht immer eine Anzahl helfender Hände, die man nie vergessen sollte.

DANKE!

Lebenslauf

<u>Name:</u>		Stauner, Thomas
<u>Geburtsdatum/Geb</u>	ourtsort:	27.09.1980 in Völklingen
Familienstand:		ledig
<u>Telefon/Mail:</u>	Festnetz: mobil: Mail:	06894/887123 0151/17200695 TStauner@aol.com
<u>Adresse:</u>		Ensheimer Str. 8 in 66386 St.Ingbert
<u>Schulausbildung:</u>		
1986 - 1990 1990 - 2000 WS 2001/2002 06/2007-12/2007 12/2007 - 12/2010		Schillerschule in St.Ingbert Leibniz-Gymnasium in St.Ingbert Beginn Studium Chemie (Diplom) an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken Diplomarbeit Arbeitskreis Prof. G. Wenz, Org. Makromolekulare Chemie, UdS Promotion Arbeitskreis Prof. G. Wenz, Org. Makromolekulare Chemie, UdS
Leistungskurse:		Mathematik, Biologie und Englisch
<u>Zivildienst:</u> 07/2000 – 05/2001	niabar	Pflegedienst auf der aseptischen Chirurgie des Kreiskrankenhauses St.Ingbert
08/1997	<u>njods:</u>	2-wöchiges Schulpraktikum in der Metzgerei
12/1997		Wahrheit, Werner in Rohrbach 2-wöchige Aushilfe in der Metzgerei Wahrheit, in
06/2001 - 09/2001		Aushilfskraft im Pflegedienst im Kreiskrankenhaus
02/2002 - 04/2003		Kassierer an der Tankstelle Rubeck, Klaus in Rohrbach
05/2003 - 06/2006		Buchhaltungs- und Rechnungswesen in der
07/2006 - 07/2006		stud./wissenschaftl. Hilfskraft, Prof. Beck, UdS,
06/2007 – 12/2007		stud./wissenschaftl. Hilfskraft, Prof. Wenz, UdS, Studentenbetreuung in Praktikum

bisherige Arbeitsverhältnisse als Diplomchemiker:

12/2007 – 12/2010	wissenschaftl. Mitarbeiter, Prof. Wenz, UdS,
	Studentenbetreuung in Praktikum u.a.

Studium:

medizinische Chemie, Prof. Hartman, Dr. Engel, Dr. Frotscher
03-04-2007: organische Chemie, Prof. Jauch, Optimierung der Synthese von Myrtucommulon A"
06-11-2007: Makromolekulare Chemie, Prof. Wenz, "Synthese amphiphiler Stärkederivate"
23.11.2007, Diplom Chemiker
12-2007: "Synthese von hydrophoben Stärkederivate und Pteroylamidhexylamin-funktionalisiertem Polyvinylalkohol zur Darstellung von Nanopartikeln zum gerichteten Wirkstofftransport"
2011

M. J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, G. Wenz, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, *Journal of Controlled Release* **2010**, *141*, 85 Prajakta Dandekar, Ratnesh Jain, Thomas Stauner, Brigitta Loretz, Marcus Koch, Gerhard Wenz, Claus-Michael Lehr *ACS Nano* (eingereicht)

<u>Patente:</u> PF0000061718/CHW PF0000061722/CHW

Derzeit eine weitere Publikation als Co-Autor und eine weitere als Autor in Arbeit

Tagungen/Kongresse:

Stärke-Tagung, Detmold, 16./17. April 2008
European Polymer Congress, Graz, 12.-17. Juli 2009 (Poster)
Wing/Nano-Conference, Ulm, 1.-3. April 2009 (Poster)
14th Annual Green Chemistry & Engineering Conference, Washington, 20.-23. Juni 2010 (Vortrag)
Polymers in Biomedicine and Electronics, Berlin, 3.-5. Oktober 2010 (Poster)

Fremdsprachen:

- Französisch, fünfte bis zehnte Klasse
- Englisch, neunte bis dreizehnte Klasse
- Latinum
- Portugiesisch, Grundkenntnisse im Eigenstudium

St.Ingbert, den 06. Januar 2010