

**Synthese und Anwendungen  
funktionalisierter Polyrotaxane  
in biologischen Systemen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften**

**der Naturwissenschaftlich-Technischen-Fakultät III  
(Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften)  
der Universität des Saarlandes**

**von**

**Diplom-Chemiker  
Thomas Albuzat**

**Saarbrücken 2013**

Tag des Kolloquiums: 18.12.2013

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wenz

Prof. Dr. Gregor Jung

Vorsitz: Prof. Dr. Elmar Heinzle

Akad. Mitarbeiterin: Dr. Angelika Ullrich

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese funktionalisierter Polyrotaxane und deren Anwendung in biologischen Systemen.

Zuerst wurde ein Baukastensystem bestehend aus wasserlöslichen Polymeren, sowie verschiedene kationische, zucker- bzw. fluoreszenzfunktionalisierte Cyclodextrine synthetisiert. Je nach Kombination von Polymer und Cyclodextrin wurden so verschiedene Polyrotaxane hergestellt, die auf die jeweilige Anwendung zugeschnitten waren.

Die Kombination von Ionen mit kationischen Cyclodextrinen stellte einen sehr wirksamen Vektor für die Gentransfektion dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Polyplexe aus diesen Rotaxanen gegenüber PEI sowohl in der Transfektionsrate, als auch in der Zellverträglichkeit, überlegen waren. Insbesondere bei gesunden Zelllinien (C2C12) konnte eine 80-fach höhere Transfektionsrate erzielt werden, bei einer gleichzeitigen Überlebensrate der Zellen von mehr als 90%.

Eine weitere Anwendung wurde in der Zellerkennung mittels zuckermodifizierten Cyclodextrinen gefunden. Durch Co-Auffädelung mit fluoreszenzmarkiertem Cyclodextrin konnte die Bindung an Zellen verfolgt werden. Es wurde gezeigt, dass die Rotaxane an rote Blutkörperchen binden und dass eine Differenzierung in der Bindungsstärke zwischen Glucose und Galactose erfolgt.

Insgesamt wurde gezeigt, dass Rotaxane durch ihren modularen Aufbau vielfältige Werkzeuge in biologischen Anwendungen darstellen, insbesondere in der Gentransfektion und der Zellerkennung.

## Summary

The present thesis discusses the synthesis of functionalized polyrotaxanes and their application in biological systems.

Initially, a modular system of water-soluble polymers and different cationic-cyclodextrins and sugar- or fluorescent-modified cyclodextrins were synthesized. Depending on the combination of polymer and cyclodextrins, special polyrotaxanes for the respective application were tailored.

The combination of ionen with cationic cyclodextrins demonstrated a very effective vector for gene transfection. The polyplexes made of rotaxanes revealed a higher transfection rate as well as a higher cell viability compared to PEI. Particularly with regard to benign cell lines (C2C12), the transfection rate was 80-fold higher with a cell viability greater than 90%.

Another application of polyrotaxanes with sugar-modified cyclodextrins is cell recognition using fluorescent-modified cyclodextrins in a co-threading process to monitor the bonding to cells. The rotaxanes bonded to red blood cells showed different bonding strengths between glucose and galactose.

All in all, the modular systems of polyrotaxanes are versatile tools in biological applications, especially with regard to gene transfection and cell recognition.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Supramolekulare Chemie .....	2
1.1.1	Begriff der supramolekularen Chemie .....	2
1.1.2	Cyclodextrine.....	2
1.1.3	Polyrotaxane.....	4
1.2	Genstransfektion .....	7
1.3	molekulare Erkennung.....	9
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>SYNTHESE VON POLYBOLAAMPHIPHILEN.....</b>	<b>14</b>
3.1	Ionene.....	15
3.2	Poly-N-Oxide .....	16
3.3	Piperazin- Alkandioldiacrylat-Copolymere.....	16
<b>4</b>	<b>SYNTHESE VON CYCLODEXTRINDERIVATEN .....</b>	<b>19</b>
4.1	Monofunktionelle Cyclodextrinderivate.....	20
4.1.1	monofunktionalisiertes $\alpha$ -CD .....	20
4.1.2	monofunktionalisiertes $\beta$ -CD.....	22
4.1.3	Synthese von Einfach- und Mehrfachzuckern zur Anbindung an CD.....	24
4.1.4	Kupplung der CD- und Zuckerbausteine .....	26
4.2	Hexafunktionelle Cyclodextrinderivate .....	28
4.3	Fluoreszenzmarkierte Cyclodextrine .....	31
<b>5</b>	<b>HERSTELLUNG UND BILDUNGSKINETIK DER POLYROTAXANE .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>LCST-VERHALTEN DER POLY-<i>N</i>-OXIDE .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>GENTRANSFEKTIONS MITTELS POLYROTAXANEN .....</b>	<b>44</b>
7.1	Herstellung der DNA-Rotaxan-Polyplexe .....	44
7.1.1	Bestimmung der Partikelgröße mittels DLS und Bestimmung $\zeta$ -Potentials .....	45
7.1.2	Bestimmung der Komplexierungsstärke mittels Gelelektrophorese und Farbverdrängungsuntersuchung .....	48
7.1.3	Rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Polyplexe .....	54

7.2	Bestimmung der Transfektionsaktivität der Polyplexe im Zellversuch .....	57
7.2.1	Auswertung der Luciferase-Aktivität.....	58
7.2.2	Bestimmung der Proteinmenge .....	58
7.3	Toxizitätsuntersuchung mittels MTT-Assay.....	61
<b>8</b>	<b>ZELLERKENNUNG DURCH POLYROTAXANE.....</b>	<b>63</b>
8.1	Synthese der Rotaxane für Zellerkennung .....	63
8.2	Zellerkennungsversuche mit Erythrozyten und CACO-2 Zellen...	64
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>70</b>
10.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	70
10.2	Methoden und Geräte .....	70
10.3	Synthesen.....	74
10.3.1	Synthese wasserlöslicher Polymere.....	74
10.3.2	Synthese monofunktionalisierter $\alpha$ -Cyclodextrine .....	87
10.3.3	Synthese monofunktionalisierter $\beta$ -Cyclodextrine .....	90
10.3.4	Synthese funktionalisierter Zucker.....	98
10.3.5	Synthese zuckermodifizierter $\alpha$ -Cyclodextrine.....	114
10.3.6	Synthese zuckermodifizierter $\beta$ -Cyclodextrine.....	120
10.3.7	Synthese kationischer Cyclodextrine .....	128
10.3.8	Synthese fluoreszenzmarkierter Cyclodextrine.....	133
<b>11</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>134</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>137</b>
	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>142</b>

# 1 Einleitung

Eine große Herausforderung der Medizin liegt in der Therapie von genetischen Defekten. Eine Vielzahl von Erkrankungen, insbesondere Immunschwächen beruhen auf einem defekten vererbten Genom. Aber auch Krebs kann von einem erworbenen Gendefekt herrühren, der durch verschiedenartige Umwelteinflüsse, wie z.B. Chemikalien, UV-Licht oder Viren hervorgerufen werden kann und vom Körper nicht mehr korrigiert wird.<sup>[1]</sup>

Eine elegante Lösung wäre nun, fehlende DNA zu ergänzen, defekte DNA zu ersetzen oder aber Krebszellen durch Einschleusung der entsprechenden Nukleotid-Sequenzen zum Absterben zu bringen.<sup>[2]</sup> Zur Transduktion eignen sich naturgemäß Viren, die mit der einzuschleusenden DNA bestückt sind.<sup>[3]</sup> Dass diese Therapien mit Viren in klinischer Anwendung problembehaftet sind, wurde spätestens 1999 bekannt, nachdem insgesamt sechs Patienten nach einer solchen viralen Therapie verstorben sind.<sup>[4, 5]</sup>

Es gilt also neue Wege zu finden, die sicherer, verträglicher und zuverlässiger sind, um DNA in Zellen *in vitro* oder *in vivo* einzuschleusen, mit dem gleichen Ziel, nämlich der Therapie bzw. der Korrektur von Gendefekten.<sup>[6]</sup> In der Vergangenheit hatten sich kationische Liposome und kationische Polymere z.B. Polyethylenimin<sup>[7]</sup> als viel versprechende nonvirale Gentransfersysteme gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun die Möglichkeiten der supramolekularen Chemie bei der Gentransfektion und der molekularen Erkennung von Zellen, insbesondere im Hinblick auf biologische Abbaubarkeit, Toxizität und Effizienz untersucht werden.

## 1.1 Supramolekulare Chemie

### 1.1.1 Begriff der supramolekularen Chemie

Unter dem Begriff supramolekulare Chemie versteht man die Bildung von supramolekularen Strukturen, die aus mehreren Molekülen bestehen und durch komplementäre Wechselwirkungen, z.B. van der Waals oder Wasserstoffbrückenbindungen in einer bestimmten geometrischen Anordnung zusammengehalten werden. Die supramolekulare Chemie beschäftigt sich mit der Bildung und Umwandlung solcher Strukturen, sowie deren thermodynamischen, kinetischen und strukturellen Eigenschaften.<sup>[8]</sup>

Derartige Strukturen sind aus der Natur bestens bekannt. Als Beispiele seien Enzyme, DNA und die Erkennung körpereigener Zellen genannt. Ein Hauptmerkmal für die Wichtigkeit und Anwendung in biologischen Systemen von supramolekularen Verbindungen ist die molekulare Erkennung, also die Selektion von genau definierten Bindungspartnern.

Zur Unterscheidung der beteiligten Moleküle werden die supramolekularen Strukturen auch als Wirt-Gast-Komplexe bezeichnet. Dabei stellt der Wirt das zumeist größere Molekül dar, das in der Lage ist, reversibel ein Gast zu binden.

### 1.1.2 Cyclodextrine

Unter Cyclodextrinen (CDs) versteht man ringförmige Oligomere der  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucopyranose. Sie wurden erstmals von VILLIERS<sup>[9]</sup> 1891 entdeckt und im Jahre 1903 von SCHARDINGER<sup>[10]</sup> strukturell aufgeklärt. Die Reihe der Cyclodextrine bestehend aus 6, 7 und 8 Glucoseeinheiten werden als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine bezeichnet und können mit Hilfe selektiver Fällungsmittel getrennt und gereinigt werden.<sup>[11]</sup> Durch Röntgenstrukturuntersuchungen konnte eine konische Form nachgewiesen werden.<sup>[12]</sup> In Abbildung 1 sind die Form und die Ausmaße der CDs dargestellt.



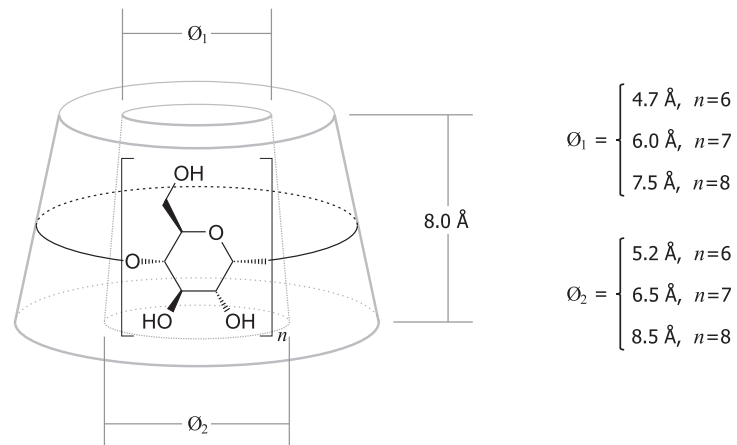


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Cyclodextrine

Cyclodextrine besitzen eine relativ gute Wasserlöslichkeit und haben dennoch ein hydrophobes Inneres.<sup>[13, 14]</sup> Der Grund dafür sind die Hydroxylgruppen der Glucosebausteine, die alle nach außen gerichtet sind. Die primären OH-Gruppen sind an der schmalen Öffnung, die sekundären an der breiten Öffnung zu finden und sind somit Namensgeber für die primäre bzw. sekundäre Seite der CDs. Der Konus wird dabei durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen der primären und sekundären Seite stabilisiert. Diese Wechselwirkungen sind bei  $\beta$ -CD optimal möglich und man findet hier einen lückenlosen Ring aus H-Brücken.<sup>[15]</sup> Durch diesen Effekt lässt sich auch die schlechtere Wasserlöslichkeit von  $\beta$ -CD im Vergleich zu  $\alpha$ - und  $\gamma$ -CD erklären

Die Eigenschaften der Cyclodextrine sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Eigenschaften der Cyclodextrine<sup>[16]</sup>

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Anzahl Glucoseeinheiten	6	7	8
Molares Gewicht	972	1135	1297
Wasserlöslichkeit bei 25°C [mol/l]	0,149	0,016	0,178
Höhe der Cavität [nm]	0,8	0,8	0,8
Innendurchmesser Cavität [nm]	0,47-0,52	0,60-0,65	0,75-0,85

### 1.1.3 Polyrotaxane

Polyrotaxane bestehen aus einem Fadenmolekül auf das ein oder mehrere Ringe aufgefädelt sind und werden daher auch als axiale Einschlussverbindungen bezeichnet.<sup>[17]</sup> Man unterscheidet dabei zwischen Pseudopolyrotaxanen, deren Aktivierungsenergie hinreichend klein ist, so dass bei Raumtemperatur ein Wiederabfädeln möglich ist und dem bei Raumtemperatur stabilen Rotaxan. Der schematische Aufbau eines Pseudorotaxans ist in Abbildung 2 dargestellt.

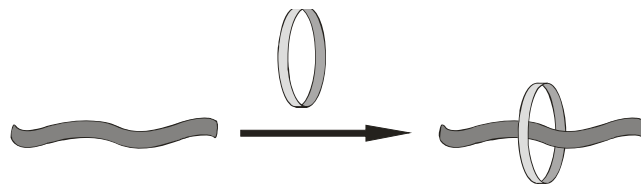


Abbildung 2: Schematische Synthese eines Pseudorotaxans

Zum Aufbau solcher Pseudorotaxane sind Cyclodextrine als Wirte prädestiniert.

Cyclodextrine eignen sich aufgrund Ihrer Eigenschaften zur Bildung von Polyrotaxanen bzw. Pseudopolyrotaxanen.<sup>[18]</sup> Da das Auffädeln nur in Wasser mit freiwerdender Enthalpie verbunden ist, müssen spezielle Polymere, so genannte Polybolaamphiphile<sup>[19]</sup> genutzt werden. Diese benötigen sowohl eine ausreichend lange, hydrophobe Alkankette und besitzen auch hydrophile Gruppen, die das Gesamtmolekül wasserlöslich machen. Beispiele für solche Polybolaamphiphile sind in Abbildung 3 dargestellt.

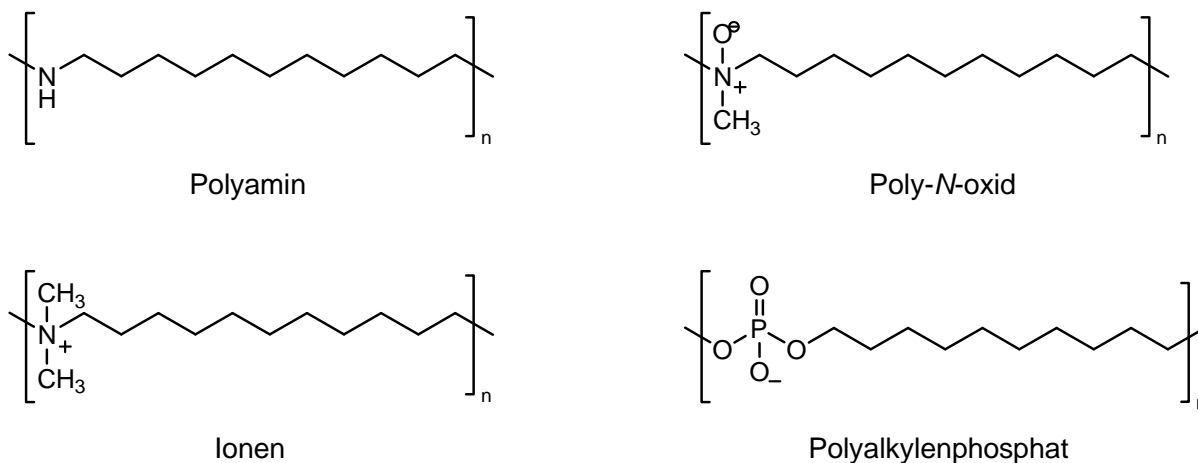


Abbildung 3: Polymere, die zur Bildung von Polyrotaxanen geeignet sind <sup>[20, 21]</sup>

Die Bildung eines Pseudopolyrotaxans stellt also sowohl für das CD als auch für das Polybolaamphiphil eine energetisch günstige Situation dar, da das Innere des CD-Rings (Cavität) nun mit einem hydrophoben Gast statt mit Wasser besetzt ist und damit gleichzeitig die Alkankette mit dem exohydrophilen CD maskiert ist.<sup>[22]</sup> Die Größe der Aktivierungsenergie ist abhängig von Kombination aus Polymer und Cyclodextrin. Die Bindung wird umso stärker je besser der hydrophobe Wirt in die Caviät passt und je größer bzw. geladener die hydrophile Einheit ist und damit das Wiederabfädeln kinetisch hindert. Die Aktivierungsenergie für das überschreiten der hydrophilen Barriere beträgt für das Poly-*N*-Oxid (Abbildung 3) 17 kJ/mol, für das Ionen bereits 25 kJ/mol.<sup>[23]</sup>

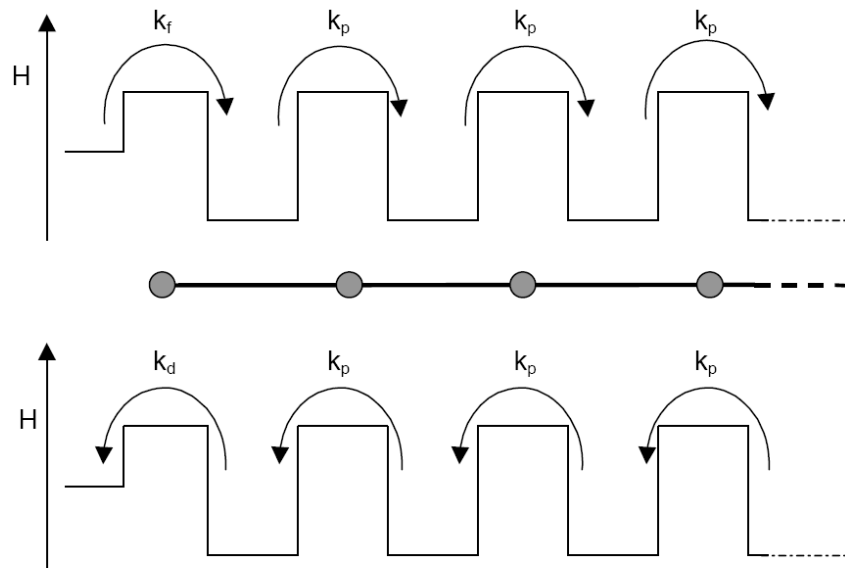


Abbildung 4: Mechanismus des Auf- und Abfädels von CD auf Polybolaamphiphilen<sup>[24]</sup>

Beim Auffädeln der Ringe können prinzipiell alle Stellen belegt werden. Der letztendliche Belegungsgrad hängt vom Verhältnis  $k_f$ , also der Geschwindigkeitskonstanten für das Auffädeln auf die erste Bindungsstelle und der Geschwindigkeitskonstanten  $k_d$  für das Abfädeln ab. Damit ergibt sich für die Gleichgewichtskonstante:  $K = \frac{k_f}{k_d}$ . Das Weiterfädeln ist energetisch gleichwertig und wird nur durch die Entropie beeinflusst.<sup>[24]</sup> Der Mechanismus ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Den Auffädelerungsgrad kann man mit Hilfe des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ermitteln, da die Signale von aufgefädelten und freien  $\alpha$ -Cyclodextrinringen für H-1 unterschiedlich sind. (siehe Abbildung 5)

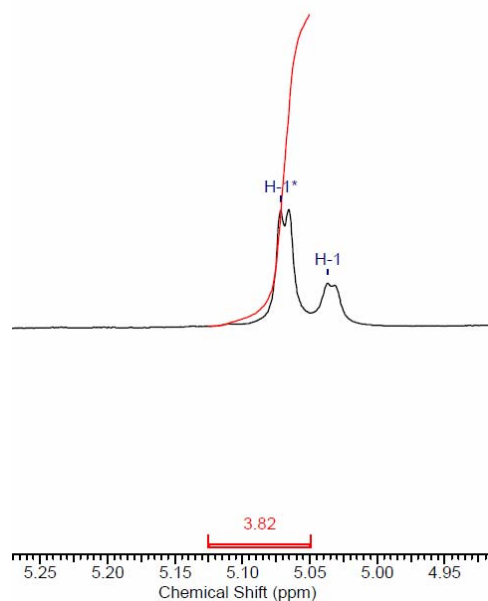


Abbildung 5:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von CD im Rotaxangleichgewicht

In Abbildung 5 ist exemplarisch ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum dargestellt. Durch den Gast im Cyclodextrin erfolgt eine Tieffeldverschiebung des Signals von H-1. H-1\* stellt dabei das Signal des Protons am anomeren Zentrum des aufgefädelt Cyclodextrins dar. Durch Vergleich mit der Integration von Polymerprotonen kann der Auffädelungsgrad bestimmt werden. H-1 stellt das freie Cyclodextrin dar.<sup>[25]</sup>

## 1.2 Gentransfektion

Unter dem Begriff Gentransfektion versteht man allgemein die Einschleusung von fremder DNA in Zellen mittels nicht viraler Carrier.

Die Nutzung viraler Gentransfersysteme wird als Transduktion bezeichnet. Trotz einer vergleichsweise hohen Transduktionsrate<sup>[26]</sup> z.B. durch Adeno- und Retroviren überwiegen bei der viralen Methode eine Vielzahl von Nachteilen. Sie können beispielsweise eine starke Immunreaktion auslösen und werden vom Immunsystem sehr schnell neutralisiert.<sup>[27]</sup> Des Wei-

teren besteht die Gefahr, dass mit den Viren krebsauslösende DNA, sog. Okogene mit eingeschleust werden.<sup>[28]</sup>

Auf der Suche nach nicht viralen Vektoren, die nicht immunogen oder onkogen sind, wurden sowohl physikalische Methoden entwickelt, wie z.B. den DNA-Elektrotransfer<sup>[29]</sup> oder das Beschießen von Zellen mit DNA-haltigen Partikeln.<sup>[30]</sup>

Das Hauptaugenmerk liegt allerdings auf chemischen Transfektionsmethoden, insbesondere mittels kationischer Polymere<sup>[31, 32]</sup>, deren physiologischen Eigenschaften<sup>[33]</sup> und Optimierung.<sup>[34]</sup>

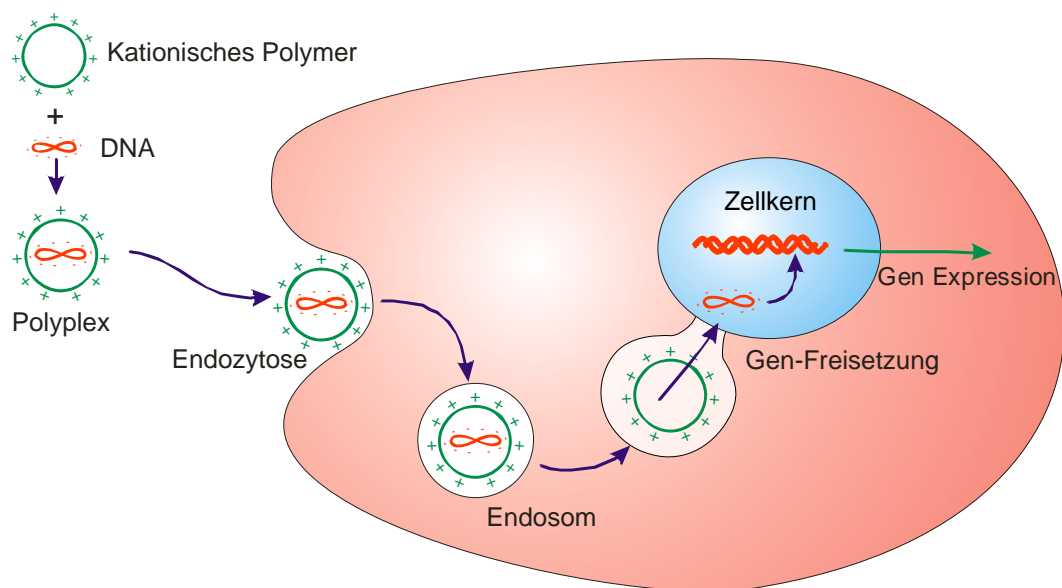


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Gentransfektion mit kationischem Polymer<sup>[31]</sup>

In Abbildung 6 ist der Vorgang der Gentransfektion mittels kationischer Polymere schematisch dargestellt. Im ersten Schritt bilden sich durch Mischung des kationischen Polymers mit der anionischen DNA sogenannte Polyplexe in der Größe von Nanopartikeln, die durch Endozytose in die Zelle gelangen. Nach Freisetzung der DNA aus den Polyplexen bzw. Endosomen erfolgt die Transkription im Zellkern und anschließend die Translation in den Ribosomen, also die Synthese des kodierten Proteins. Eine Übersicht über den aktuellen Stand der nicht-viralen Vektoren ist im *Internati-*

*onal Journal of Pharmaceutics*, 427(1), 2012 als Schwerpunktthema zu finden.<sup>[35]</sup> Das meistbekannte und meistuntersuchte Polymer zur Gentransfektion ist Polyethylenimin (PEI)<sup>[36]</sup>. Des Weiteren sind auch Chitosan<sup>[37]</sup> oder auch Kombinationen aus PEI und Chitosan als Vektoren geeignet.<sup>[38]</sup> Als weitere kationische Polymere haben sich Polyrotaxane als durchaus viel versprechende Vektoren gezeigt.<sup>[39, 40]</sup>

### 1.3 molekulare Erkennung

Die molekulare Erkennung stellt mit die wichtigste Eigenschaft dar, die für die Funktion biologischer Systeme unerlässlich ist. So ist sie beispielsweise Grundvoraussetzung für den Metabolismus in Enzymen, für die Erkennung von Viren, Bakterien und fremden Zellen durch das Immunsystem<sup>[41]</sup> und auch für die Verteidigung von Pflanzen gegen Fressfeinde durch Lectine.<sup>[42]</sup>

Bereits im Jahre 1894 wurde durch EMIL FISCHER<sup>[43]</sup> das anschauliche Modell des Schlüssel-Schloss-Prinzips geprägt, das besagt, dass die Substrate von Enzymen in die Enzymtasche passen, wie ein Schlüssel ins Schloss.

Diese Vorstellung wurde später von Koshland durch das induced-fit Modell erweitert<sup>[44]</sup>, da man festgestellt hat, dass sich nach dem Andocken die Form des Rezeptors im sich bildenden Komplex anpassen kann. (Abbildung 7) Auch er hat mit dem Vergleich von der "Hand im Handschuh" ein anschauliches Modell geprägt.

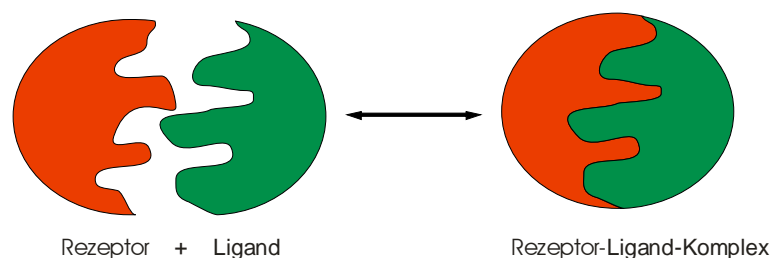


Abbildung 7: Komplexbildung nach dem induced-fit-Modell, wobei der Rezeptor seine Form ändert

Das AB0-Blutgruppensystem ist ein einfaches Beispiel für die molekulare Erkennung. Im Jahre 1900 erkannte KARL LANDSTEINER die agglutinierende Wirkung verschiedener Blutgruppen.<sup>[45]</sup> Durch Untersuchung der Wechselwirkung verschiedener Blutgruppen fand man heraus, dass die Blutgruppen A und B Antikörper im Serum gegen die Antigene der roten Blutkörperchen der jeweils anderen Blutgruppe, die Blutgruppe AB keine und Blutgruppe 0 sowohl Antikörper gegen A und B tragen.<sup>[46]</sup> (Abbildung 8)

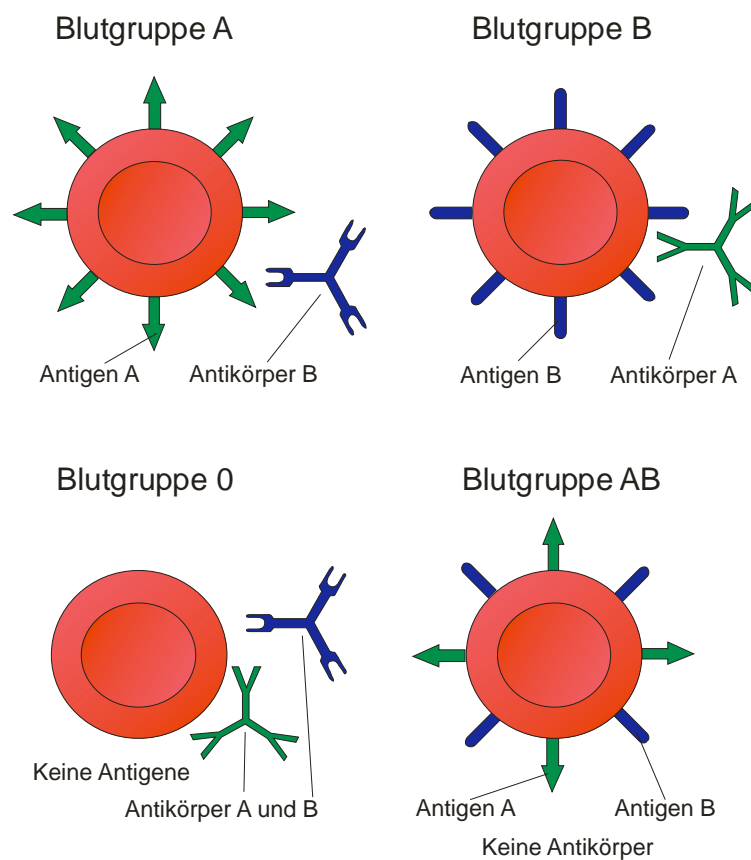


Abbildung 8: schematische Darstellung des AB0-Blutgruppensystems

Es gibt eine Vielzahl weiterer, wesentlich komplizierterer Systeme für die Erkennung zwischen Zellen, Geweben und auch Viren. Sie beruhen oft auf Zuckern und vor allem auf komplexen Oligosaccharid-Wechselwirkungen mit Zellmembranrezeptoren.<sup>[47]</sup> Diese kooperativen



---

Wechselwirkungen können u.a. mithilfe synthetischer Polymere untersucht werden<sup>[48]</sup> und sind potenzielle Diagnose- und Heilmittel für die Zukunft.

Eine Kombination aus der molekularen Erkennung und gleichzeitiger Gentransfektion, könnte eine weitaus spezifischere Transfektion ermöglichen und damit insbesondere bei der Bekämpfung von Krebs eine gezielte Auswahl und Zerstörung der malignen Zellen bewirken. Die Voraussetzungen für ein solches System soll in der vorliegenden Arbeit erforscht werden.

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Synthese von kationischen Polyrotaxanen erarbeitet und untersucht werden. Außerdem sollen diese anschließend auf ihre Anwendung in biologischen Systemen getestet werden, insbesondere in ihrer Anwendung als Vektor für die Gentransfektion und der Erkennung von Zellen.

Im ersten Schritt werden lineare Polymere bzw. Polybolaamphiphile benötigt, die sowohl eine genügende Wasserlöslichkeit, als auch einen ausreichenden Teil an hydrophoben Alkylketten zur Komplexierung von Cyclodextrinen besitzen. Dabei sollen neben den bereits untersuchten Ionen, die als hydrophile Einheiten quarternierte Amine enthalten, auch neutrale bzw. zwitterionische Polybolaamphiphile synthetisiert werden.

Der zweite Teil stellt die Synthese von Cyclodextrinderivaten dar. Insbesondere steht dabei die Herstellung von monofunktionalisiertem  $\alpha$ -Cyclodextrin im Mittelpunkt, da es hier bislang keinen einfachen Weg wie bei  $\beta$ -CD gibt. Es soll dann eine Cyclodextrinbibliothek synthetisiert werden, die für die einzelnen Anwendungen notwendigen Gruppen tragen, wie z.B. kationische Gruppen, verschiedene Zucker oder Fluoreszenzfarbstoffe.

Im nächsten Schritt sollen dann die Polyrotaxane durch Auffädeln von Cyclodextrinen auf die Polymere dargestellt werden und deren physikalischen und biologischen Eigenschaften wie Bildung von Nanopartikeln bzw. DNA-Komplexen und deren biologisches Verhalten untersucht werden.

Das Baukastensystem aus Cyclodextrinderivaten und Polymeren soll so kombiniert werden, dass die Polyrotaxane in verschiedenen Zelltests auf deren mögliche Anwendungen hin untersucht werden können. Dabei sollen kationische Polyrotaxane für die Gentransfektion und eine Kombination aus fluoreszenzmarkierten und zuckermodifizierten Cyclodextrinen für Komplexierungs- und Anbindungstests hergestellt und für die jeweiligen Anwendungen optimiert werden.

## Diskussion der Ergebnisse

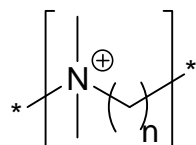
Zur Untersuchung von Polyrotaxanen sowohl für molekulare Erkennung als auch für die Gentransfektion sind zwei grundlegend unterschiedliche Bausteine zu synthetisieren. Dies sind einerseits die Cyclodextrinderivate und andererseits die polybolaamphiphilen Polymere. In den nächsten Kapiteln wird zunächst die Herstellung der Polyrotaxane und schließlich deren Anwendung als Vektoren sowie in der Zellerkennung, diskutiert.

### 3 Synthese von Polybolaamphiphilen

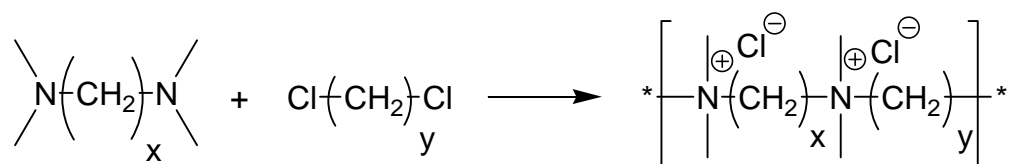
Die zum Aufbau von Polyrotaxane geeigneten Polymere müssen eine Reihe von Anforderungen erfüllen. Einerseits müssen sie die notwendige Wasserlöslichkeit für den Fädelvorgang mit CDs im wässrigen Milieu besitzen, andererseits über genügend lange Alkanketten als hydrophobe Einheiten verfügen, damit die Cyclodextrine diese komplexieren. Dabei sollen die hydrophilen Gruppen zwar energetisch überwindbar sein, aber dennoch eine ausreichend hohe Hürde darstellen, um das Wiederabfädeln zumindest bei Raumtemperatur zu verzögern. Des Weiteren sollen die Polymere möglichst unverzweigt sein, da nur lineare Moleküle vollständig belegbar sind. Die Wahl der Polymere fiel im Rahmen dieser Arbeit auf die bereits bekannten Ionene<sup>[49]</sup> mit quartärem Stickstoff und Poly-*N*-Oxide.<sup>[50]</sup> Als weitere Möglichkeit mit einer noch größeren hydrophilen Barriere, sowie einer besseren biologischen Abbaubarkeit, sollten Piperazin-Alkandioldiacrylat-Copolymere dienen.

### 3.1 Ionene

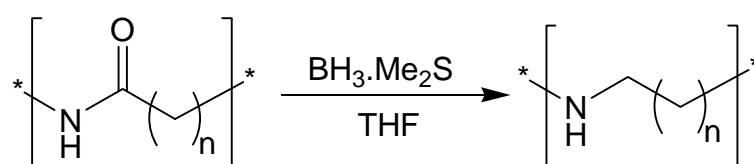
Grundsätzlich können Ionene<sup>[51]</sup>, also lineare Polymere mit quartärem Stickstoffatom und der allgemeinen Formel:



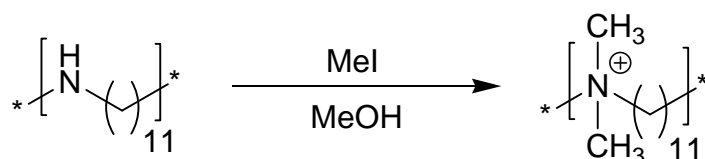
auf verschiedenen Wegen hergestellt werden. Eine Möglichkeit besteht in der Polykondensation von Di-*tert*-Alkylaminen mit Alkandihalogeniden analog der MENSCHUTKIN-Reaktion<sup>[51-53]</sup>:



Eine andere Möglichkeit ist die polymeranaloge Reduktion von Polyamiden und anschließender Methylierung.<sup>[50]</sup> Polyamide (Nylon), die einen geringen Verzweigungsgrad bei gleichzeitig hoher Molmasse aufweisen, sind kommerziell erhältlich und eignen sich gut als Ausgangsmaterial. Sie wurden im ersten Schritt mittels Reduktion vom Amid in die Amine (1, 2, 3) überführt<sup>[25]</sup>:

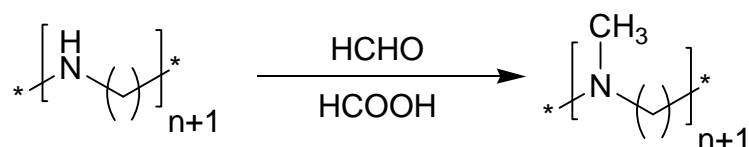


Das entsprechende Ionen-11 (4) wurde anschließend durch Reaktion mit Methyljodid in Methanol gewonnen. Während der Aufarbeitung mittels Ultrafiltration wurde durch Zugabe von HCl das Iodid gegen Chlorid als Gegenion getauscht.

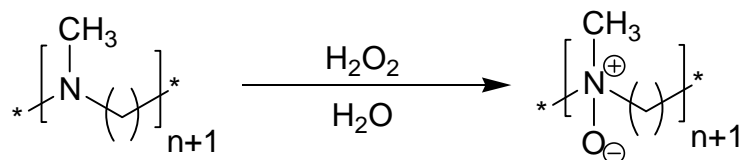


### 3.2 Poly-N-Oxide

Die Synthese der Poly-*N*-Oxide erfolgte ebenfalls ausgehend vom Polyamin und anschließender Eschweiler-Clark-Methylierung<sup>[54]</sup> mit Formaldehyd in Ameisensäure als Reagenz, um die Reaktion auf der Stufe des tertiärenamins (5, 6, 7) zu stoppen.

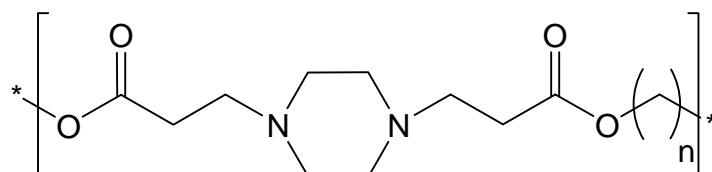


Anschließend erfolgte die Oxidation zum Poly-*N*-Oxid (8, 9) mittels Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung.

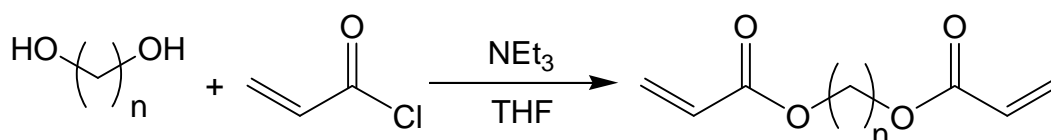


### 3.3 Piperazin- Alkandioldiacrylat-Copolymere

Auf der Suche nach Rotaxanen, die eine bessere biologische Abbaubarkeit zeigen, wurde nach neuen Polymeren gesucht, die eine Estergruppe tragen und damit leicht in die Monomere gespalten und verstoffwechselt werden können. Diese "Sollbruchstellen" in der Kette haben den weiteren Vorteil, dass ein Zerfall des Rotaxans sowohl über Abfädeln der Ringe als auch über ein Aufbrechen der Kettenglieder erfolgen kann. Zusätzlich sollten die Polymere eine höhere Aktivierungsenergie besitzen und damit ein Wiederabfädeln bei RT verhindern. Die Wahl fiel auf Piperazin-Alkandioldiacrylat-Copolymere mit der allgemeinen Strukturformel:

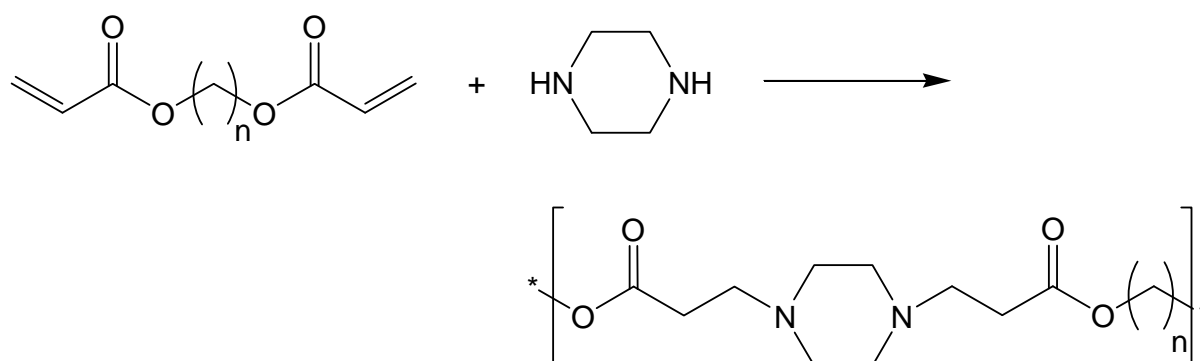


Ausgangsstoff für die Synthese waren jeweils die Alkandiole. Sie wurden mit Acrylsäurechlorid in die Alkandioldiacrylate umgesetzt. Die Reaktion erfolgte in absolutiertem THF mit Triethylamin als Base und anschließender säulenchromatographischer Reinigung.



Die Ausbeuten lagen zwischen 37% und 55% für 1,10-Decandiol (10) bzw. Ethylenglycol (11).

Im nächsten Schritt wurden die Diacrylate mit der stöchiometrischen Menge Piperazin in 1,2-Dioxan zuerst bei Raumtemperatur, dann bei 50°C umgesetzt. Die Produkte erhielt man jeweils durch Fällung in Diethylether.



Neben dem PIP-10 Derivat (12) wurden weitere Polymere mit unterschiedlichen Kettenlängen synthetisiert. Es wurde weiterhin PIP-2 (13), wobei die Ziffer für die Anzahl an Methylengruppen steht, analog hergestellt. Neben der oben beschriebenen Polykondensation von Piperazin mit den Diacrylaten wurde auch die Reaktion von Acrylsäuremethylester mit Piperazin zum Piperazin-1,4-dipropionsäuremethylester und anschließende Copolykondensation mit Diolen und Diaminen.

Im Endeffekt haben sich die Piperazin-Copolymere als schwer synthetisier- und reproduzierbar gezeigt und nur geringe Polymerisationsgrade ge-

zeigt auch bei langen Reaktionszeiten. Nur das PIP-10 hatte mäßig zufrieden stellende Eigenschaften als Polybolaamphiphil gezeigt. Es war präparativ nicht möglich, die Stickstoffatome zu Ammoniumgruppen zu quaternisieren oder sie zu N-Oxiden zu oxidieren analog zu den Ionenen bzw. Poly-N-Oxiden. Die Estergruppe als Sollbruchstelle hat sich zudem als zu instabil herausgestellt, sodass sich das Polymer teilweise bereits beim Auffädelvorgang bei erhöhter Temperatur zersetzte.

Damit stellten sich für die folgenden Tests hauptsächlich die Ionene und Poly-N-Oxide als geeignet heraus.

Die synthetisierten Polymere sind in Tabelle 2 aufgelistet:

Tabelle 2: Übersicht Polymere

Polymer	M <sub>w</sub>	M <sub>n</sub>	PD	Ladung (unprotoniert)
PA-10 <b>1</b>	88.300 Da) <sup>1</sup>	55.400 Da) <sup>1</sup>	1,59	neutral
PA-11 <b>2</b>	61.600 Da) <sup>1</sup>	42.900 Da) <sup>1</sup>	1,44	neutral
PA-12 <b>3</b>	18.300 Da) <sup>1</sup>	11.500 Da) <sup>1</sup>	1,59	neutral
Ionen-11 <b>4</b>	---) <sup>2</sup>	---) <sup>2</sup>	---) <sup>2</sup>	kationisch
Me-PA-10 <b>5</b>	2.600.000 Da	1.100.000 Da	2,36	neutral
Me-PA-11 <b>6</b>	390.000 Da	240.000 Da	1,63	neutral
Me-PA-12 <b>7</b>	840.000 Da	740.000 Da	1,14	neutral
N-Oxid-10 <b>8</b>	---) <sup>2</sup>	---) <sup>2</sup>	---) <sup>2</sup>	zwitterionisch
N-Oxid-11 <b>9</b>	---) <sup>2</sup>	---) <sup>2</sup>	---) <sup>2</sup>	zwitterionisch
PIP-10 <b>12</b>	25.000 Da	10.000 Da	2.5	neutral
PIP-2 <b>13</b>	2.800 Da	1.600 Da	1.75	neutral

<sup>1</sup>) GPC-Messwerte durch Wechselwirkung mit stationärer Phase sehr ungenau

<sup>2</sup>) GPC-Messung durch Wechselwirkung mit stationärer Phase nicht möglich

Eine genaue Bestimmung der Molmassen, insbesondere bei den geladenen Polymeren, war aufgrund der Wechselwirkungen mit der stationären Phase der GPC nur schwer oder gar unmöglich. Dennoch lieferten die Me-



PA's recht brauchbare Ergebnisse, sodass im Folgenden davon ausgegangen wurde, dass die polymeranalogen Reaktionen ohne Polymerabbau oder –aufbau stattgefunden haben.

## 4 Synthese von Cyclodextrinderivaten

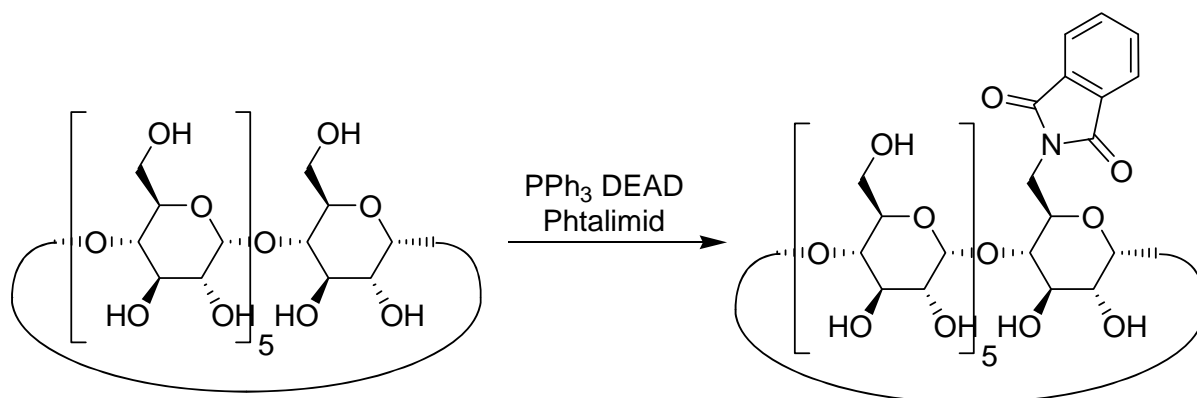
Die Synthese von Cyclodextrinderivaten stellt aufgrund von möglichen Reaktionstellen und deren mehrfaches Vorkommen im Cyclodextrin eine große Herausforderung insbesondere in der Aufarbeitung und Reinigung dar. Da die OH-Gruppen eine unterschiedliche Reaktivität und eine unterschiedliche sterische Hinderung besitzen, kann man dennoch gezielt bestimmte OH-Gruppen substituieren.<sup>[55]</sup> In der Literatur sind u.a. Reaktionen der OH-Gruppen mit Alkylhalogeniden<sup>[56]</sup>, Silylchloriden<sup>[57]</sup> und Sulfonsäurechloriden<sup>[58]</sup>, sowie die nucleophile Substitution mittels Halogeniden<sup>[59]</sup> oder Aminen<sup>[60]</sup> bekannt.

Bei monosubstituierten CDs liegt die Herausforderung im Ausschluss von mehrfach substituierten Derivaten durch gezielt Reaktionsführung oder aber in einer aufwändigen Reinigung. Bei  $\beta$ -CD kann eine Monosubstitution mit Tosylchlorid unter Verwendung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im basischen wässrigen Milieu nach der Vorschrift von DEFAYE ET AL.<sup>[61]</sup> durchgeführt werden. Eine Übertragung dieser Vorschrift auf  $\alpha$ -CD ist wegen der kleineren Cavität nicht möglich. Zur Herstellung von Mono- $\alpha$ -CDs kommen daher nur aufwendige Reinigungen der Reaktionsgemische in Frage, die meist nur geringe Ausbeuten liefern.<sup>[25]</sup>

## 4.1 Monofunktionelle Cyclodextrinderivate

### 4.1.1 monofunktionalisiertes $\alpha$ -CD

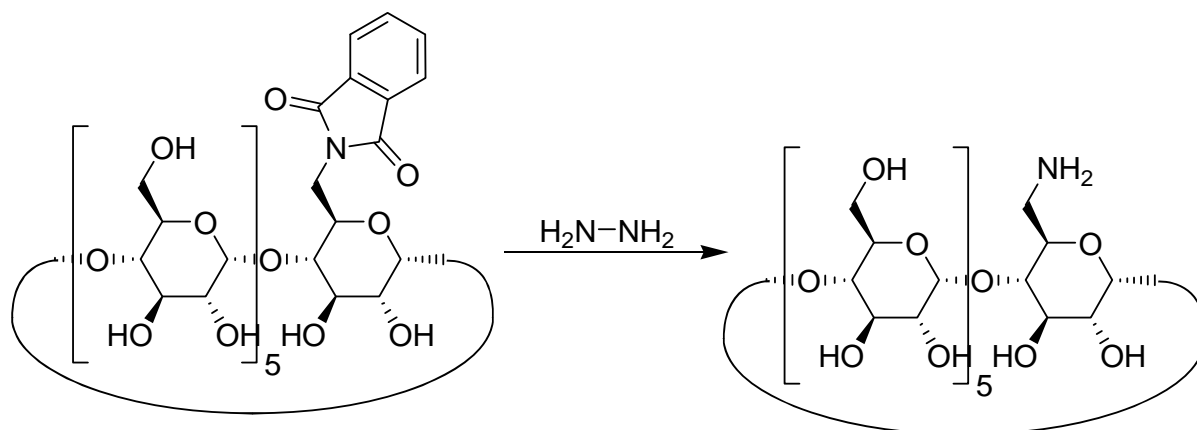
Neben der Synthese der nun folgenden CD-Derivate wurde in der vorliegenden Arbeit nach einer neuartigen Möglichkeit gesucht,  $\alpha$ -CDs zu Monofunktionalisieren. Zur Untersuchung der Zellerkennung durch zuckermodifizierte CDs müssen diese Zucker über einen geeigneten Linker an das CD gebunden werden. Dabei sollte pro CD möglichst nur ein Zucker gebunden sein, um kooperative Effekte intramolekular auszuschließen und um diese Effekte den Rotaxanen zuordnen zu können. Da die synthetisierten Polymere die stabilsten Komplexe mit  $\alpha$ -CD eingehen, musste nach einem verbesserten Weg der Synthese von monofunktionalisiertem  $\alpha$ -CD gesucht werden. Die in der Literatur beschriebene Wege führten jeweils zu nativem und mehrfachsubstituierten Produkte, die anschließend nicht mehr trennbar waren.<sup>[62]</sup> Ein neuartiger Weg wurde in der Umsetzung von  $\alpha$ -CD mit Triphenylphosphan, Diethylazodicarboxylat (DEAD) und Phtalsäureimid entsprechend der Mitsunobu Reaktion<sup>[63]</sup> gefunden.



Das entstehende Mono-(6-deoxy-6-*N*-phtalimido)- $\alpha$ -Cyclodextrin (**14**) hat dadurch einen ausreichend hohen Polaritätsunterschied zum nativen sowie den mehrfachsubstituierten CDs, sodass eine Trennung des Reaktionsgemischs möglich wird. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC und man erhält das Produkt in einer Ausbeute von 31%. In der vorliegen-

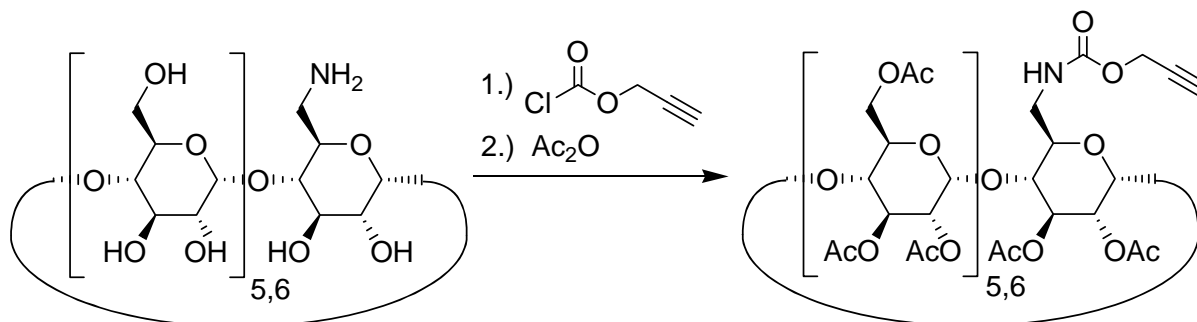
den Arbeit konnten so 7g für die weiteren Synthesestufen problemlos hergestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde das Mono-(6-deoxy-6-*N*-phthalimido)- $\alpha$ -Cyclodextrin in das Mono-(6-amino-6-deoxy)- $\alpha$ -CD (**15**) überführt. Dies erfolgte mit einer Ausbeute von 83% analog der Gabriel-Synthese<sup>[64]</sup> durch Abspaltung des Phthalimidrestes mit Hydrazin in Wasser.



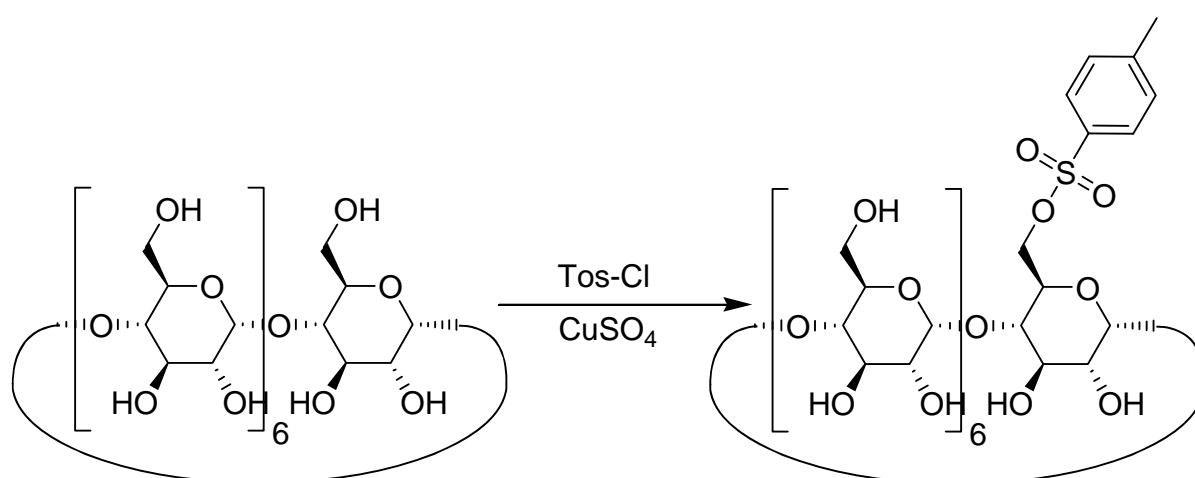
Man erhält somit ein monofunktionalisiertes  $\alpha$ -Cyclodextrin als Ausgangsbasis für die weiteren Syntheseschritte.

Um das Mono-amino- $\alpha$ -CD für die Kupplungsreaktionen weiter zu modifizieren wurde es mit Propargylchloroformat umgesetzt. Dies erfolgte in DMF unter Zugabe von DMAP und Triethylamin. Nach Trocknung des Reaktionsgemisches im HV wurde mit Essigsäureanhydrid in Pyridin das Produkt acetyliert und am Ende säulenchromatographisch gereinigt. Diese Reaktion war sowohl mit dem  $\alpha$ - (**16**) als auch mit dem  $\beta$ -CD-Derivat (**22**) möglich.



### 4.1.2 monofunktionalisiertes $\beta$ -CD

Neben der neuartigen Methode monofunktionalisiertes  $\alpha$ -CD herzustellen wurde auch  $\beta$ -CD nach der Methode von DEFAYE ET AL.<sup>[61]</sup> tosyliert. Dabei wird  $\beta$ -CD in einer alkalischen Lösung von Kupfersulfat mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid umgesetzt. Da die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen dabei einen Chelatkomplex mit den sekundären OH-Gruppen an C-2 und C-3 zwischen zwei Cyclodextrinen bildet und gleichzeitig das Tosylchlorid von den Cyclodextrinen komplexiert wird, bildet sich bei dieser Reaktion trotz des großen Überschusses an Tosylchlorid ausschließlich das Mono-Produkt an C-6.

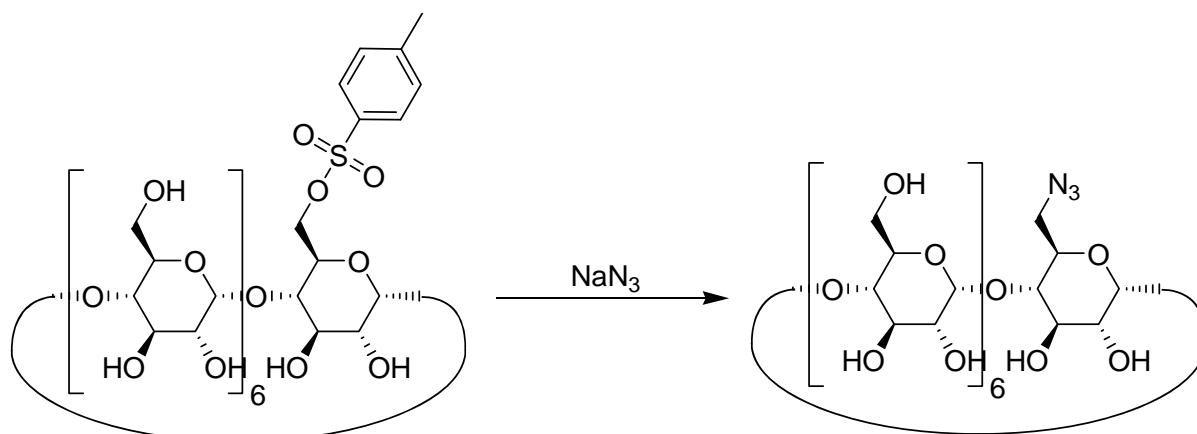


Die Aufreinigung erfolgt durch Neutralisation und Umkristallisation aus einer EDTA-Lösung zur Entfernung des Kupfers. Man erhält das Mono-[6-deoxy-6-(*p*-toluolsulfonyl)]- $\beta$ -cyclodextrin (**17**) zwar nur in geringer Ausbeute von ca. 10%, aber in guter Reinheit.

Ausgehend von den nun gewonnenen Cyclodextrinen wurde nun nach verschiedenen Möglichkeiten gesucht, diese weiter zu modifizieren, um die entsprechenden Zuckerderivate daran zu koppeln. Da die Synthese von den Zuckern und den Cyclodextrinen recht aufwendig ist bzw. nur geringe Ausbeuten bietet, sollten die weiteren Schritte bzw. die Kuppelung der beiden möglichst quantitativ ablaufen. Die Wahl fiel auf "Click"-Reaktionen, die ausgehend von den monofunktionellen Cyclodextrinen durchgeführt werden können. Dies war einerseits die Kuppelung von Isothiocyanaten sowohl an

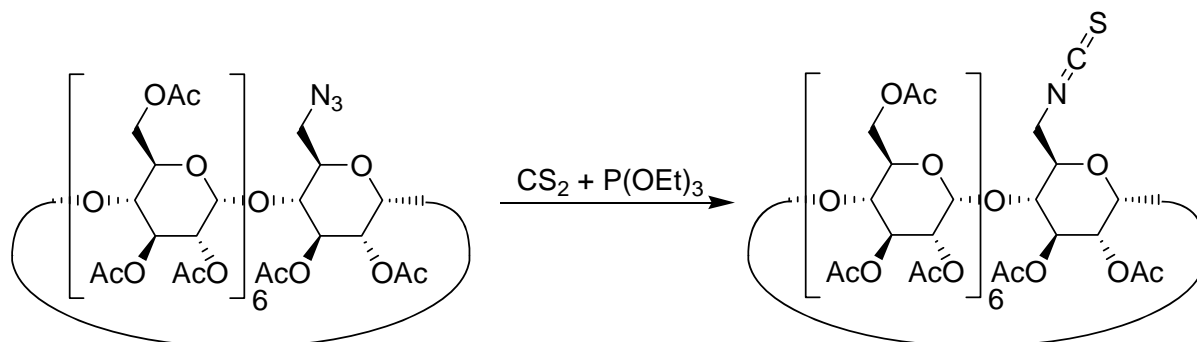
CD oder Zucker mit dem entsprechenden Amin als Gegenstück und andererseits die Kupplung von Aziden an Propinyl-Resten.<sup>[65]</sup>

Die Herstellung der Mono-Azide konnte nur im Falle des  $\beta$ -CDs aus dem Mono-Tosyl- $\beta$ -CDs erfolgen. Das Mono-(6-azido-6-deoxy)- $\beta$ -CD (**18**) wurde mit einer Ausbeute von 70% durch eine nucleophile Substitution mit Natriumazid in Wasser hergestellt.



Das Mono-(6-azido-6-deoxy)- $\beta$ -CD war damit Ausgangstoff für die Synthese des Isothiocyanates und des Amins (**19**) in Kapitel 4.2 und gleichzeitig ein Baustein für die Click-Reaktion mit einem Propinyl-Zucker.

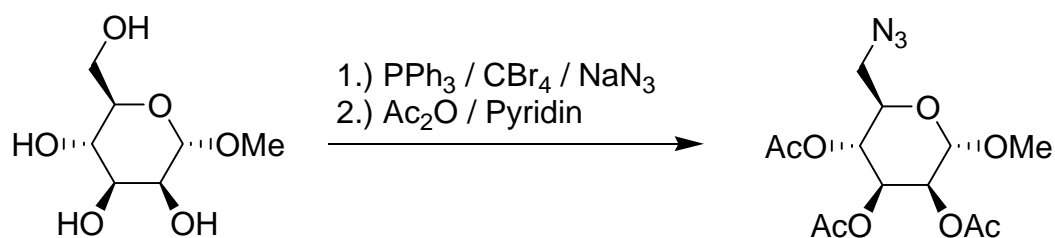
Zur Umsetzung der Azid-Verbindung zum Mono-(6-deoxy-6-isothiocyanato)- $\beta$ -CD (**21**) wurde die Azid-Verbindung im ersten Schritt mit Essigsäureanhydrid acetyliert (Ausbeute 92%) und im zweiten Schritt mittels Schwefelkohlenstoff und Triethylphosphit zur gewünschten Verbindung umgesetzt. (Ausbeute: 52%)



### 4.1.3 Synthese von Einfach- und Mehrfachzuckern zur Anbindung an CD

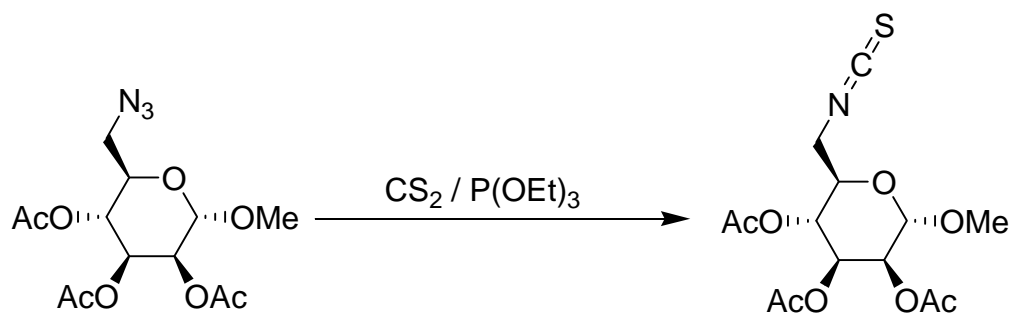
Zur Kupplung an die CD-Derivate wurden nun die entsprechenden Gegenstücke der folgenden Zucker hergestellt: Glucose, Mannose, Galaktose, Laktose, sowie Maltose.

Bei der Synthese der Azido-Verbindungen gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Die Azidgruppe kann entweder an C-6 oder C-1 eingeführt werden. Für die C-6 Derivate wurden nur der Einfachzucker  $\alpha$ -Methylmannose gewählt. In einer nach ROLF APPEL<sup>[66]</sup> benannten analogen Reaktion wurde der Zucker mit Triphenylphosphan und Tetrabrommethan umgesetzt, worauf eine S<sub>N</sub>2 Reaktion mit Natriumazid in einer Eintopfreaktion erfolgte. Nach der Trocknung im HV erfolgte auch hier die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin.<sup>[25]</sup>

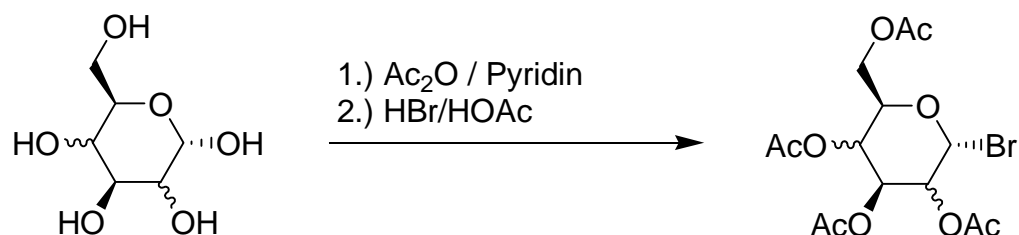


Durch das sterisch anspruchsvolle Triphenylphosphan erhält man bei dieser Reaktion ausschließlich das oben genannte Produkt.

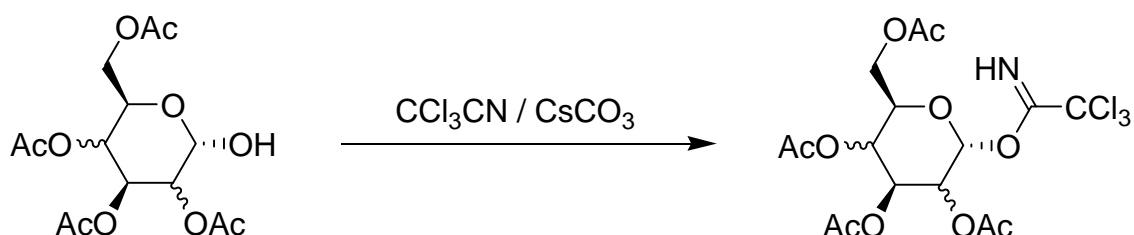
Analog zur Reaktion des Mono-(6-azido-6-deoxy)- $\beta$ -CD zum Mono-(6-deoxy-6-isothiocyanato)- $\beta$ -CD wurde auch das C-6 Azid der  $\alpha$ -Methylmannose zum Isothiocyanat (**23**) umgesetzt. Dies erfolgte ebenfalls mittels Schwefelkohlenstoff und Triethylphosphit in Toluol.



Für die Einführung der Azidgruppe an die Position C-1 wurde zuerst 2-Azidoethanol (**24**) aus 2-Chlorethanol durch nukleophile Substitution mit  $\text{NaN}_3$  hergestellt. Zur Anbindung dieser Linker wurden die Zucker zuerst in Essigsäureanhydrid und Pyridin peracetyliert (**25**, **28**, **30**, **32**). Anschließend wurde das Peracetylprodukt mit 30%iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig zum 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-bromid nach der Vorschrift von ERNST REDEMANN und CARL NIEMANN<sup>[67]</sup> umgesetzt.

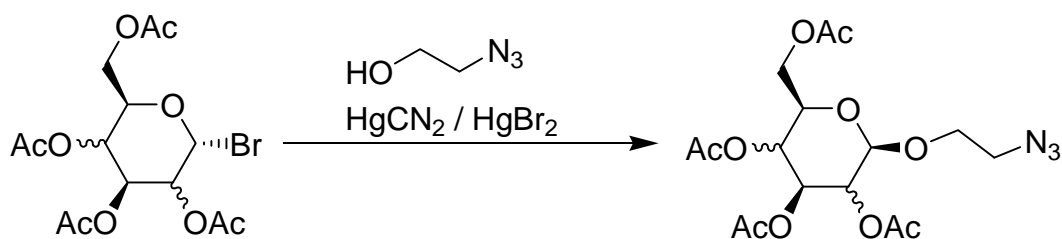


Eine weitere Variante der Einführung einer guten Abgangsgruppe war die Umsetzung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-glucofuranose mit Trichloracetonitril zum 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-glucofuranosyl-trichloracetimidat(**33**).<sup>[68]</sup>



Da die Reaktion mit HBr ausgehend von peracetylierten Zucker durchgeführt werden konnte und diese Reaktion auch in guten Ausbeuten verlief, wurden alle weiteren Zucker (**26**, **27**, **29**, **31**) nach der REDEMANN Methode hergestellt.

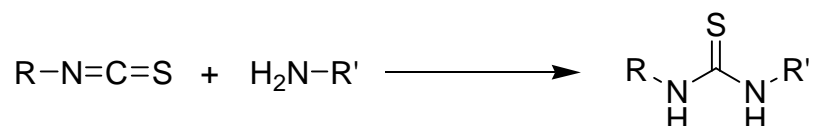
Im nächsten Schritt wurde dann das Bromid mit der HELFERICH-Variante<sup>[69]</sup> der KÖNIGS-KNORR<sup>[70]</sup> Reaktion gegen das 2-Azidoethanol ausgetauscht. Dazu wurde das 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-glycosylbromid in trockenem Acetonitril gelöst und zu einer Suspension von Quecksilbercyanid/Quecksilberbromid und 2-Azidoethanol in Acetonitril getropft und 72h bei RT gerührt. Die Isolation der Produkte (**34-38**) erfolgte anschließend säulenchromatographisch.



#### 4.1.4 Kupplung der CD- und Zuckerbausteine

Der nächste Schritt in der Synthese der zuckermodifizierten Cyclodextrine war die Kupplung der verschiedenen Bausteine. Dabei konnten einerseits die Isothiocyanate mit Aminen in einer nukleophilen Addition unter Bildung einer Thioharnstoffbrücke gekuppelt werden oder aber die Azide mit den Propinylgruppen in einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition verbunden werden. Demnach war es unerheblich, welche Gruppe an welchem Rest hing und wie diese kombiniert wurden.

Bei der Kupplung der Zuckerisothiocyanate mit dem  $\beta$ -Cyclodextrinamin wurden die Bausteine in Pyridin gelöst und über Nacht bei RT gerührt.

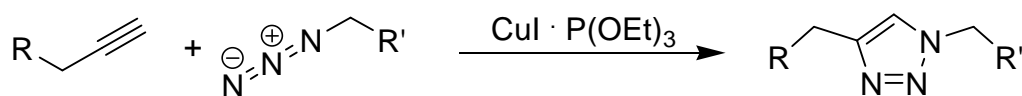


Die Aufarbeitung erfolgte durch Trocknung im Hochvakuum und anschließendem Digerieren und Waschen mit Chloroform.

Das so hergestellte zuckermodifizierte Cyclodextrin (51), das noch teilweise acetyliert war, wurde zum Schluss mit Natriummethylat in Methanol entschützt. (52)

Bei der kupferkatalysierten Methode<sup>[71]</sup> der 1,3-dipolaren Cycloaddition<sup>[72]</sup> wurden die Edukte in wasserfreiem Toluol gelöst und mit Kupfer-(I)-iodid-triethylphosphit-Komplex sowie Diisopropylethylamin versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt.





Die Aufreinigung der acetylierten  $\alpha$ -Cyclodextrine (**39**, **41**, **43**) sowie der  $\beta$ -Cyclodextrine (**45**, **47**, **49**) erfolgte durch Säulenchromatographie. Anschließend wurde mit Natriummethylat in Methanol entschützt.

Aufgrund des komplexen Aufbaus dieser Moleküle mit sieben bis neun Glucoseeinheiten bzw. sechs oder sieben Glucoseeinheiten plus Galaktose, Mannose oder Laktose und der verringerten Symmetrie der Cyclodextrine, sind die NMR-Spektren sehr schwer auszuwerten und eine genaue Zuordnung der Peaks ist oft kaum möglich. Die Bildung des aromatischen Triazolrings bei dieser Reaktion ist daher für die Verfolgung des Umsatzes extrem hilfreich, da dessen Signal bei 7,6 bis 7,7ppm mit dem Signal von H-1 in Relation gesetzt werden kann.

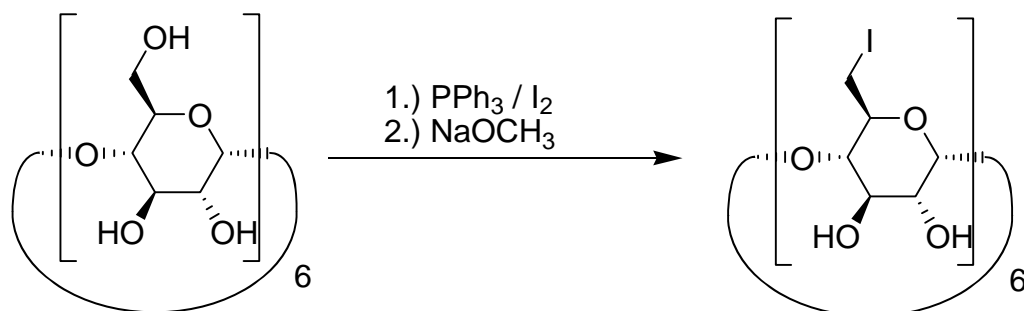
Insgesamt hat sich als beste Methode für die Herstellung monozuckerfunktionalisierter Cyclodextrine die Kupplung aus Propargyl-CD mit den Azidozuckern über 1,3-dipolare Cycloaddition herausgestellt. Diese wurden in der Folge für die Bindungsstudien an Zellen genutzt. Die zuckermodifizierten CDs sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: zuckermodifizierte Cyclodextrine

Cyclodextrine	CD	Zucker	Linker	Molmasse
Man-TA- $\alpha$ -CD <b>40</b>	$\alpha$ -CD	Mannose	Triazolylmethylurethan	1303,14 g/mol
Gal-TA- $\alpha$ -CD <b>42</b>	$\alpha$ -CD	Galactose	Triazolylmethylurethan	1303,14 g/mol
Glu-TA- $\alpha$ -CD <b>44</b>	$\alpha$ -CD	Glucose	Triazolylmethylurethan	1303,14 g/mol
Gal-TA- $\beta$ -CD <b>46</b>	$\beta$ -CD	Galactose	Triazol	1378,20 g/mol
Mal-TA- $\beta$ -CD <b>48</b>	$\beta$ -CD	Maltose	Triazol	1540,34 g/mol
Lac-TA- $\beta$ -CD <b>50</b>	$\beta$ -CD	Lactose	Triazolylmethylurethan	1627,42 g/mol
Man-TU- $\beta$ -CD <b>52</b>	$\beta$ -CD	Mannose	Thioharstoff	1369,26 g/mol

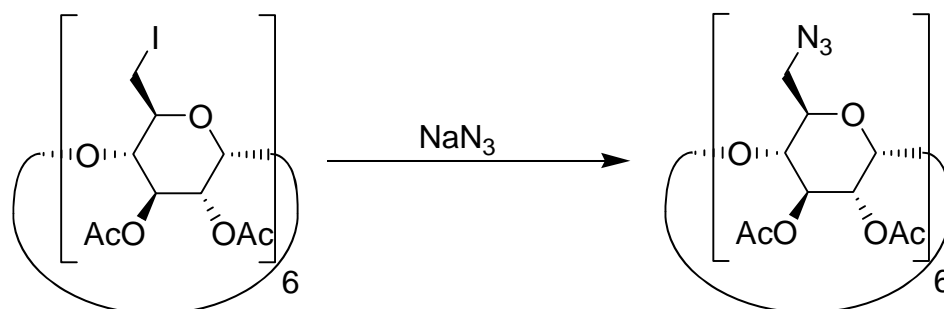
## 4.2 Hexafunktionelle Cyclodextrinderivate

Bei der Synthese der kationischen Cyclodextrine sollten CDs mit nur einer Aminogruppe als Ladungsträger, vor allem aber Cyclodextrine mit hoher Ladungsdichte hergestellt werden. Die Synthese der monofunktionalisierten CDs **15** und **19** wurde bereits in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben. Im Gegensatz dazu ist die Synthese der an C-6 persubstituierten CDs vergleichsweise einfach und kann für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin gleichermaßen angewendet werden. Beginnend mit dem nativen  $\alpha$ -Cyclodextrinen wurden im ersten Schritt die OH-Gruppen an C-6 gegen Iod ausgetauscht. Dies erfolgt ähnlich einer APPEL-Reaktion nach einer Vorschrift von Gabelle.<sup>[73]</sup> Dabei wurde das Cyclodextrin zu einer Lösung von Triphenylphosphan und Iod in trockenem DMF gegeben und 24h bei 80°C gerührt. Anschließend wurde Natriummethylat in Methanol hinzugegeben und das Produkt in Methanol gefällt.

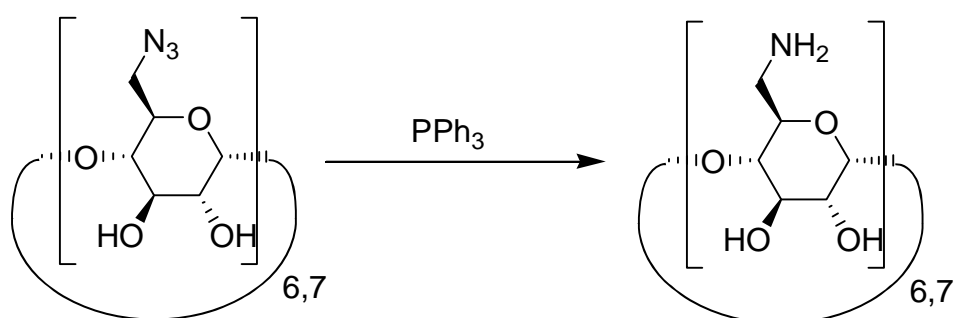


Der Unterschied zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD besteht lediglich in der Aufreinigung. Die kleinere Cavität des  $\alpha$ -CDs besitzt eine größere Bindung zu elementarem Iod als  $\beta$ -CD. Der Effekt der Iod-Bindung zu  $\alpha$ -CD ist vergleichbar mit der Bindung zu Stärke. Während bei  $\beta$ -CD das Waschen mit Methanol bzw. die Extraktion des überschüssigen Iods mittels Soxhlet Verfahren ausreichend war, konnte eine vollständige Reinigung des  $\alpha$ -CDs nur durch eine Acetylierung der sekundären OH-Gruppen und anschließender säulenchromatographischer Reinigung erfolgen.<sup>(53)</sup> Bedingt war auch eine Reinigung durch Zugabe von Silberlösungen und Ausfällung des Silberiodids nach Reduktion mit Natriumsulfit möglich.

Das acetylierte Hexakis-(6-deoxy-6-iodo)- $\alpha$ -cyclodextrin (**53**) war dann das Edukt für die folgenden Reaktionen. Zur Herstellung des Amins wurde nun das Iod gegen Azid in einer  $S_N2$  Reaktion ausgetauscht. Dies erfolgte über 48h bei 75°C in DMF mit Natriumazid. Da es sich bei dem Ausgangsstoff um ein acetyliertes  $\alpha$ -CD handelte, wurde das Produkt (**54**) säulenchromatographisch gereinigt.

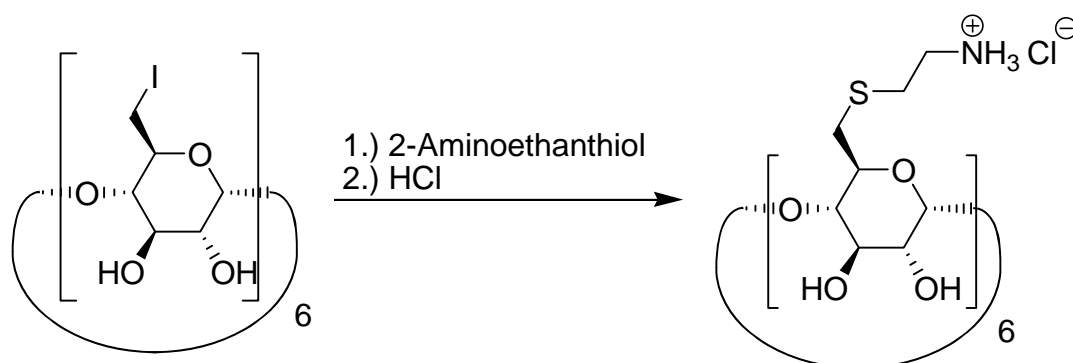


Im weiteren Verlauf wurde das Azid entschützt und mittels STAUDINGER Reduktion<sup>[74]</sup> zum Amin reduziert. Auch hierbei kam Triphenylphosphan zum Einsatz, das mit dem Azid ein Phosphazid bildet und unter Cyclisierung über einen Vierring Stickstoff abspaltet. Nach wässriger Aufarbeitung entstand dann das gewünschte Amin. (**55**)



Eine weitere Möglichkeit der Reduktion zum Amin stellte die Umsetzung der peracetylierten Azide mit elementarem Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle in Essigsäureethylester dar. Da diese Reaktion meist unvollständig verlief, wurde die STAUDINGER Reduktion bevorzugt.

Eine weitere Variante der Einführung von sechs Aminogruppen über einen Linker war die Umsetzung der 6-Iodo-Verbindungen mit Cysteamin bzw. 2-Aminoethanthiol.<sup>[75]</sup> Das Hexakis-[6-deoxy-(2-amino-ethylsulfanyl)]- $\alpha$ -cyclodextrin (**56**) erhält man durch Umsetzung des Hexakis-(6-deoxy-6-iodo)cyclodextrins mit 2-Aminoethanthiol und Triethylamin in DMF. Nach der Aufarbeitung durch Fällung der wässrigen Lösung in Aceton und Zugabe von HCl erhält man die Produkte als Hydrochloride.



In den folgenden Versuchen hat sich gezeigt, dass das Hexakis-[6-deoxy-(2-amino-ethylsulfanyl)]- $\alpha$ -cyclodextrin gut geeignet ist, da es als  $\alpha$ -CD eine stabile Bindung zu den Polymeren zeigt, der Auffädelungsgrad im NMR verfolgt werden kann und es mit sechs Aminogruppen eine hohe Ladungsdichte besitzt, die zudem noch flexibel ist.

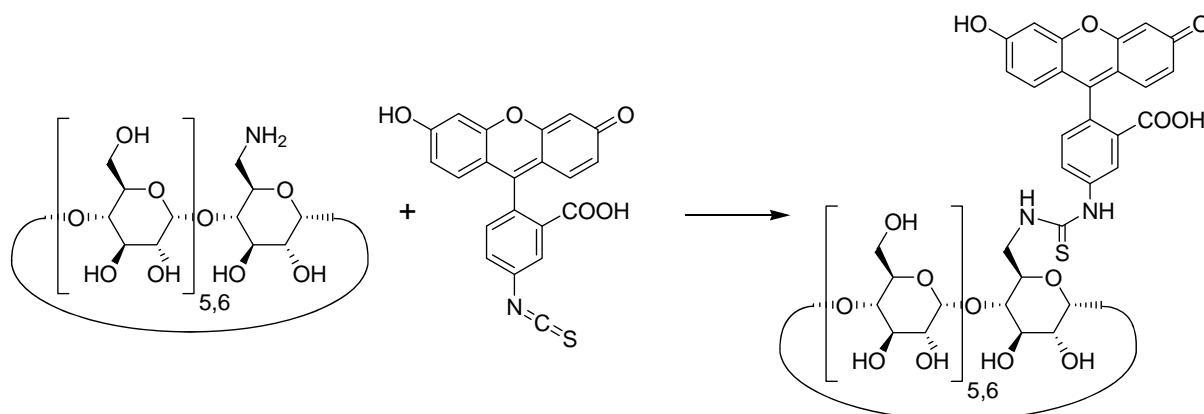
Die kationischen Cyclodextrine sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 4: kationische Cyclodextrine

Cyclodextrin	Molmasse	Ladung/CD (in protonierter Form)
Mono-Amino- $\alpha$ -CD <b>15</b>	971,86 g/mol	1
Mono-Amino- $\beta$ -CD <b>19</b>	1133,99 g/mol	1
Hexa-Amino- $\alpha$ -CD <b>55</b>	966,94 g/mol	6
Hexa-Cysteaminyl- $\alpha$ -CD <b>56</b>	1327,64 g/mol	6

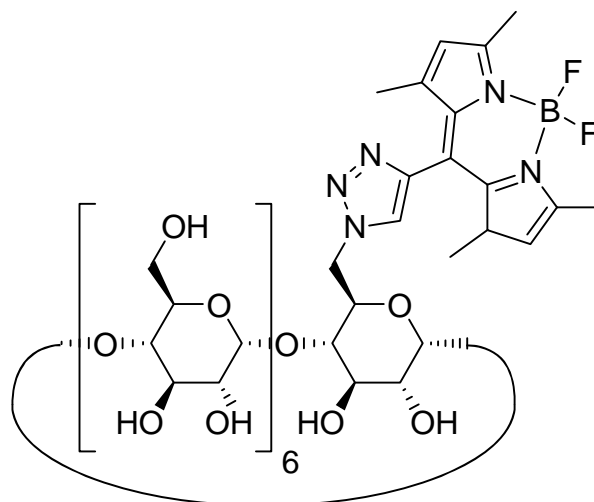
### 4.3 Fluoreszenzmarkierte Cyclodextrine

Zur Detektion der Rotaxane in Zellbindungsexperimenten mussten passende Fluoreszenzfarbstoffe gefunden werden. Eine Möglichkeit war Fluorescein, das als Isothiocyanat kommerziell erhältlich ist und in gleicher Weise an die aminofunktionalisierten Cyclodextrine gekuppelt werden konnte, wie die Isothiocyanate in Kapitel 4.1.<sup>[49, 76]</sup>



Die Nachteile von Fluorescein sind das Photobleichen, also das Nachlassen der Fluoreszenz bei Lichteinstrahlung, vor allem aber die pH-Abhängigkeit und die Ladung der Carboxylat-Gruppe.

Als Alternative dazu stellten sich die BODIPY-Fluoreszenzfarbstoffe dar. Der Name BODIPY leitet sich von der Grundstruktur der Farbstoffe Boron-DIPYrrin-Komplex ab und kann durch Variation der Substituenten im Emissionsmaximum, also der Fluoreszenzfarbe, variiert werden. Der Hauptvorteil für die Anwendung in der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass die BODIPY-Farbstoffe nach außen neutral sind und eine hohe Quantenausbeute besitzen. Zum Einsatz kam ein BODIPY-funktionalisiertes  $\beta$ -CD, das ausgehend vom Mono-(6-azido-6-deoxy)- $\beta$ -cyclodextrin hergestellt werden konnte und folgende Struktur besitzt:



Die Vorstufe wurde von RONNY HEISEL analog der Vorschrift von GU et al.<sup>[77]</sup> synthetisiert und übernommen, sodass im Rahmen dieser Arbeit nur die Acetylgruppe durch Natriummethylat in Methanol abzuspalten wurden. Das so erhaltene fluoreszenzmarkierte Cyclodextrin (**57**) ist ein roter Feststoff, der selbst in hoher Verdünnung eine kräftige grüne Fluoreszenz in wässriger Lösung zeigt. Mit diesem Cyclodextrinderivat konnte ein weiterer Nachweis des Auffädelsns von Cyclodextrinen auf die Polymere gezeigt werden. Während das reine BODIPY-CD in der Gelelektrophoresekammer keine Wanderung zeigte, bewegte sich das Polyrotaxan bestehend aus BODIPY-CD und dem polykationischen Ionen-11 zur Kathode hin. (Abbildung 9)

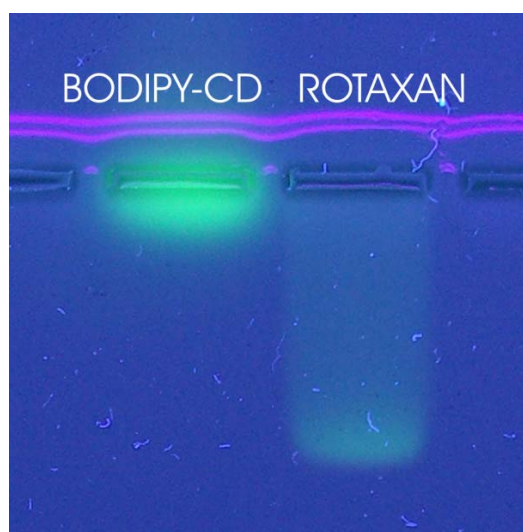


Abbildung 9: Gelelektrophorese BODIPY-CD vs. Rotaxan in Agarose bei 110V

Eine quantitative Auswertung mit der Software UN-SCAN-IT gel 6.1 von Silk Scientific Inc.<sup>[78]</sup> zeigte die Verteilung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Abstand zur Geltasche.

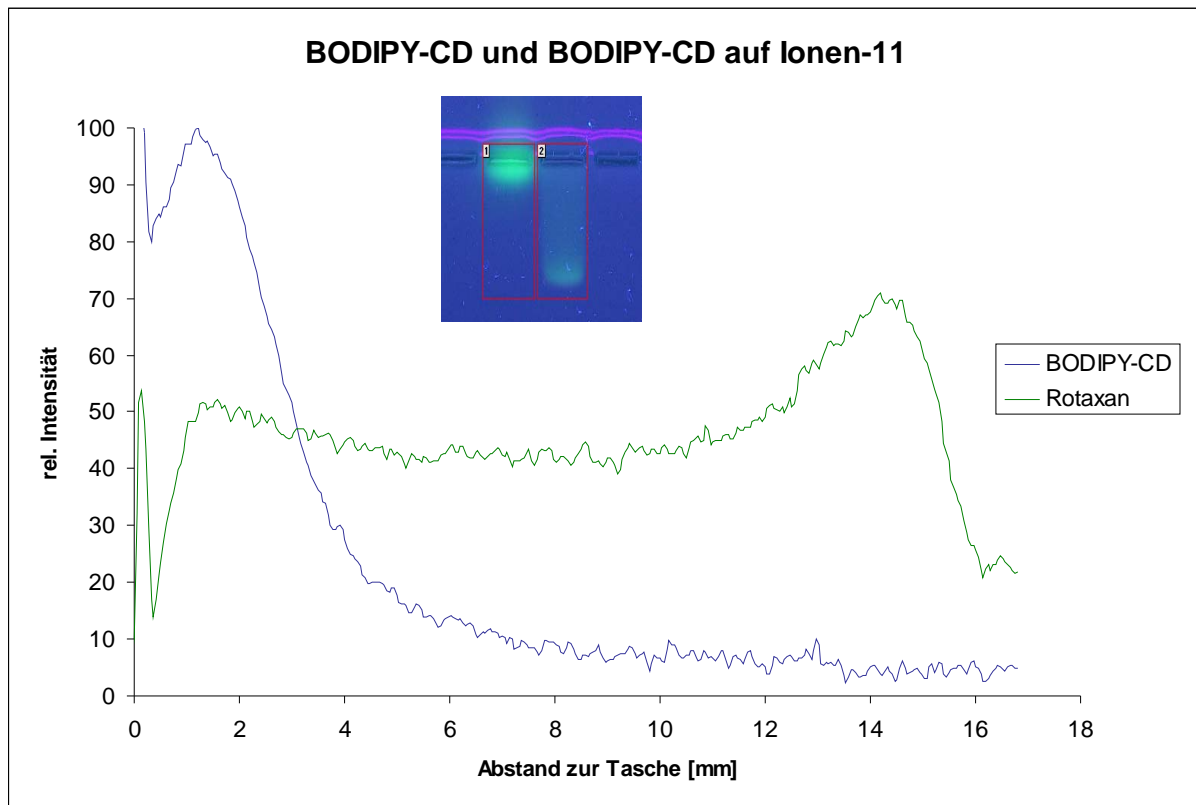


Abbildung 10: Relative Fluoreszenzintensität bei der Gelelektrophorese von BODIPY-CD und BODIPY-Rotaxan

Während die Intensität beim reinen BODIPY-CD bereits in kurzem Abstand zur Tasche gegen Null tendiert, erkennt man beim kationischen Rotaxan eine deutliche Wanderung zur Kathode hin, mit der stärksten Intensität am Ende der Laufstrecke von immer noch 70% der Maximalintensität. Dennoch scheint Fluoreszenz bei der Wanderung durch das Gel auf der "Strecke" zu bleiben. Eine mögliche Erklärung ist die Polydispersität des Ionen-11. Eine weitere Erklärung ist ein allmähliches Abfädeln der Cyclodextrine vom Ionen-11 während der Wanderung durch das Gel.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass sich das BODIPY-CD auf Ionen-11 auffädeln lässt und anhand seiner Fluoreszenz gut zu erkennen ist und sich damit für die folgenden Zellexperimente eignet.

## 5 Herstellung und Bildungskinetik der Polyrotaxane

In Kapitel 1.1.3 wurde bereits beschrieben, dass die treibende Kraft für das Auffädeln von Cyclodextrinen auf Polybolaamphiphile in den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylabschnitten des Fadens und der hydrophoben Cavität des Cyclodextrins zu finden ist. Aus diesem Grund ist die Auffädelerung nur in wässrigem Milieu möglich. Die Geschwindigkeit der Rotaxanierung von Polybolaamphiphilen ist im Gegensatz zu Homopolymeren wie Polyether,<sup>[79]</sup> Polyamine<sup>[80]</sup> und Polyester<sup>[81]</sup> hauptsächlich von der "Dicke" der hydrophilen Gruppe, sowie der Temperatur abhängig.<sup>[82]</sup> Da bei großen hydrophilen Gruppen, wie die hier verwendeten quartären Amine der Ionen Auffädelerzeiten von bis zu zwei Jahren für den nahezu quantitativen Umsatz bei Raumtemperatur beobachtet wurden,<sup>[83]</sup> war die Kinetik und Temperaturabhängigkeit der verwendeten Polymere von großer Bedeutung. Zur Bestimmung der Kinetik eignet sich die Beobachtung des NMR-Signals von H-1 der Glucoseeinheiten, welches einen deutlichen Unterschied zwischen aufgefädelt und freiem CD zeigt. Zur besseren Auswertbarkeit wurden jeweils Lösungen der Polymere Ionen-11 und N-Oxid-11 mit  $\alpha$ -CD Lösungen gemischt, sodass in der Lösung anschließend ein Molverhältnis von CD zu den Monomereinheiten der Polymere von 1:2 bestand. Durch Integration der Peaks für aufgefädelt und freies CD konnte dann der Auffädelerungsgrad bestimmt werden. Die Kinetiken von Ionen-11 und N-Oxid-11 wurden jeweils bei 70°C und 50°C gemessen.



Es hat sich gezeigt, dass die beste Vergleichsmöglichkeit die Auftragung des Belegungsgrades gegen die Wurzel der Zeit bietet.<sup>[82]</sup> Diese Vorgehensweise ist in der Literatur für die Beschreibung eindimensionaler Diffusionsprozesse bekannt,<sup>[84, 85]</sup> welche vergleichbar sind mit dem Auffädelungsprozess von Cyclodextrin auf Polymere. Eine gute Beschreibung der Kinetik liefert daher die Funktion:

$$Y = Y_{\infty} \cdot (1 - e^{-k \cdot \sqrt{t}})$$

wobei  $Y_{\infty}$  den maximalen Belegungsgrad und  $k$  die Konstante für die Auffädelungsrate beschreibt. Im folgenden Diagramm ist die Auffädelungskinetik von Ionen-11 mit  $\alpha$ -CD im Verhältnis 1:2 und einer Konzentration von 3 bzw. 6 mM (beim Polymer bezogen auf die Wiederholeinheit) bei einer Temperatur von 70 °C dargestellt.

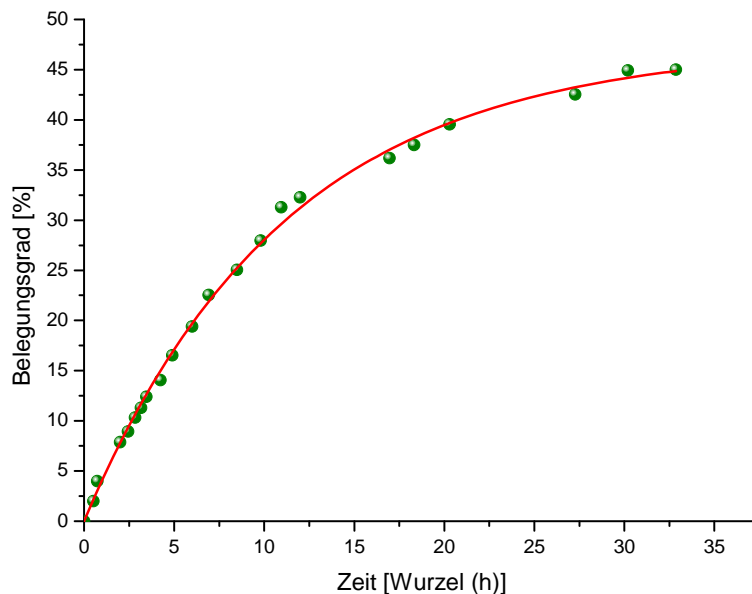


Abbildung 11: Kinetik Ionen-11 bei 70°C

Unter den gegebenen Bedingungen konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Theorie erreicht werden bei einem  $R^2$  von 0,99. Die rechnerische Maximalbelegung betrug dabei 47,3% und die Konstante für die Geschwindigkeit 0,089.

Der gleiche Versuch lieferte bei einer Temperatur von 50°C folgendes Ergebnis:

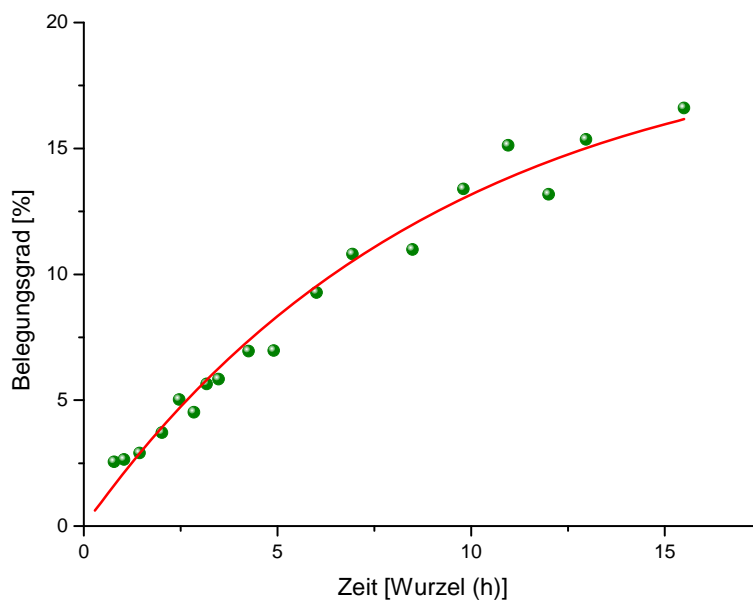


Abbildung 12: Kinetik Ionen-11 bei 50°C

Obwohl nur ein Temperaturunterschied von 20°C bestand, ist die Geschwindigkeit des Auffädels deutlich zurückgegangen. Der rechnerische Grenzumsatz beträgt dabei nur noch 19,7%, dies jedoch bei einer rechnerisch schnelleren Geschwindigkeitskonstanten von 0,109. Dies lässt sich entweder durch eine zu geringe Anzahl an Messwerten für den langsamen Umsatz erklären und/oder durch das schlechtere Bestimmtheitsmaß von 0,88.

Die gleichen Versuche wurden parallel mit dem N-Oxid-11 durchgeführt. Auch hier betragen die Konzentrationen von Polymer 3 mM und von  $\alpha$ -CD 6 mM. Erwartungsgemäß ist die Auffädungsgeschwindigkeit durch die kleinere N-Oxid-Gruppe wesentlich schneller als beim Ionen-11.

Bei 70°C erhielt man folgendes Ergebnis:

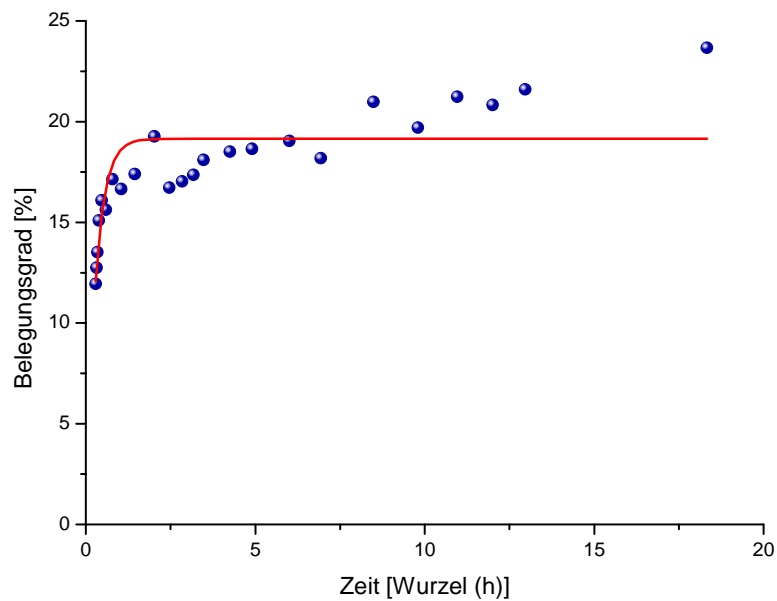


Abbildung 13: Kinetik N-Oxid-11 bei 70°C

Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass die Auswertung der NMR-Daten zur Auffädelerung von  $\alpha$ -CD auf das Poly-*N*-Oxid weit von der Theorie abweichen und die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten bzw. des maximalen Auffädelerungsgrades bei einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,64 nicht sehr verlasslich ist. Dennoch zeigt der Graph deutlich, dass der Großteil der Auffadelerung in den ersten Minuten erfolgt ist und bereits nach ca. 1h fast den Maximalwert erreicht hat. Rechnerisch ergab sich ein Grenzumsatz von 19,15% bei einer Geschwindigkeitskonstanten von 3,45 (vgl. 0,089 bei Ionen-11)

Auch der Versuch mit dem *N*-Oxid-11 wurde bei einer Temperatur von 50°C wiederholt:

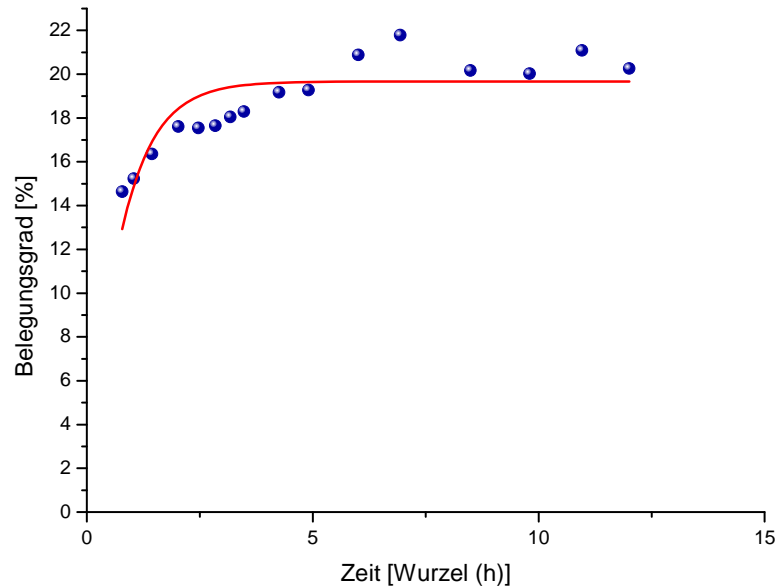


Abbildung 14: Kinetik *N*-Oxid-11 bei 50°C

Auch hier zeigte sich wieder die deutliche Abweichung von der theoretischen Kinetik und ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,65. Erstaunlicherweise war der Belegungsgrad mit ca. 19% vergleichbar mit dem Ergebnis von der Kinetik bei 70°C und auch die geringere Geschwindigkeitskonstante von 1,36 im Vergleich zu 3,45 bei 70°C passt prinzipiell zur geringeren Temperatur.

Der Grund für die schlechten Ergebnisse beim *N*-Oxid-11 liegt vermutlich in dem Auftreten einer Phasentrennung bei einer LCS-Temperatur. Das Auftreten dieser Entmischungstemperatur (vgl. Kapitel 6) wurde erst im späteren Verlauf dieser Arbeit entdeckt. Vergleicht man die Konzentration von 3 mM (entspricht 1,2 mg/ml) mit Abbildung 17 so stellt sich bei dieser Konzentration eine LCS-Temperatur von ca. 35°C bis 40°C ein. Die Versuchstemperaturen hingegen lagen bei 50°C bzw. 70°C und damit oberhalb der LCST. Inwieweit eine Phasentrennung stattgefunden hat ist nicht

bekannt. Der geringe Grenzumsatz von 19% lässt jedoch vermuten, dass das Polymer nicht mehr vollständig in Lösung war. Im Rahmen der Veröffentlichung<sup>[82]</sup> wurde die Kinetik des Ionen-11 und des *N*-Oxid-11 in einer 0,1 M NaCl Lösung gemessen. Möglicherweise hat dies die LCST erhöht und somit den Grenzumsatz auf 45% mehr als verdoppelt. Der Einfluss von Salzen auf die LCST ist aus der Literatur bekannt.<sup>[86-88]</sup>

Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen im Zusammenhang mit Auffädelskinetik konnten nun die benötigten Polyrotaxane für die folgenden Transfektions- und Bindungsversuche hergestellt werden. Die Tabelle 5 enthält die Rotaxane, die in den folgenden Kapiteln zur Anwendung kommen:

Tabelle 5: Rotaxane

Rotaxan	Polymer	Polymersationsgrad (aus $M_w$ )	Cyclodextrin	Belegungsgrad
<b>R1</b>	Ionen-11	2.100	Cysteaminyl $\alpha$ -CD	45%
<b>R2</b>	Ionen-11	2.100	$\alpha$ -CD	50%
<b>R3</b>	Me-PA-11	2.100	$\alpha$ -CD	35%
<b>R4</b>	<i>N</i> -Oxid-10	15.300	Gal-TA- $\alpha$ -CD	38%
<b>R5</b>	<i>N</i> -Oxid-10	15.300	Glu-TA- $\alpha$ -CD	44%

Die Belegung der Rotaxane R3 und R4 mit BODIPY-CD lag im Bereich < 1%

## 6 LCST-Verhalten der Poly-*N*-Oxide

Eine interessante Eigenschaft, die sich während der Arbeit mit den Poly-*N*-Oxiden gezeigt hatte, war das Auftreten einer Lower-Critical-Solution-Temperatur (LCST). Im Gegensatz zum "normalen" Lösungsverhalten von Stoffen mit einer Upper-Critical-Solution-Temperatur (UCST), bei dem sich mit zunehmender Temperatur die Löslichkeit verbessert bzw. in Abhängigkeit vom Molenbruch  $x$  eine homogene Lösung entsteht (Abbildung 15), verschlechtert sich die Löslichkeit bei Stoffen mit LCST beim Erwärmen und

es bilden sich schließlich zwei Phasen. (Abbildung 16) Der Vorgang ist reversibel und bei Abkühlung unter die LCST entsteht wieder eine Lösung.

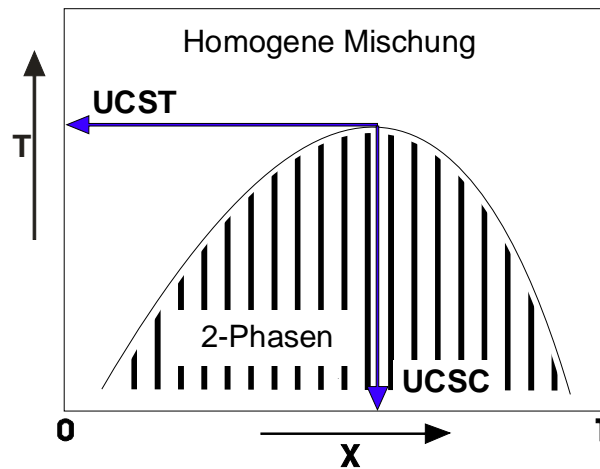


Abbildung 15: Phasendiagramm für Stoffe mit UCST

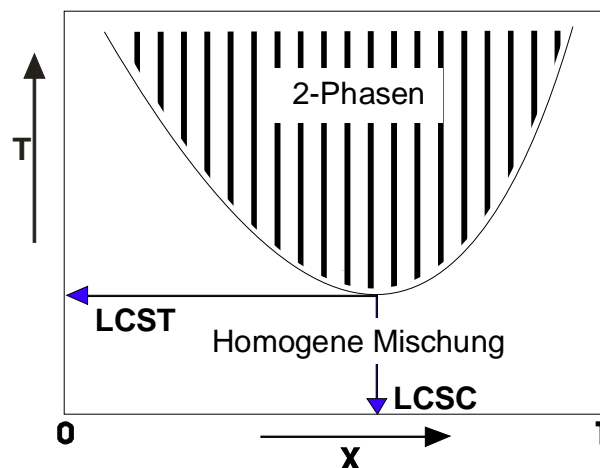


Abbildung 16: Phasendiagramm für Stoffe mit LCST

Beim vorliegenden Poly-*N*-Oxid-11 konnte in Abhängigkeit von der Konzentration des Polymers in wässriger Lösung bei Überschreitung der LCST ein Ausfallen des Polymers aus der zuvor klaren Lösung beobachtet werden. Dieses Verhalten ist in der Literatur unter anderem für die Polymere Polyethylenglycol,<sup>[89]</sup> Polyvinylmethylether,<sup>[90]</sup> Poly-*N*-isopropylacrylamid<sup>[90]</sup> und Poly-*N*-vinylcaprolactam<sup>[91]</sup> bekannt. Der LCST-Effekt ist auf eine negative Mischungsenthalpie und –entropie zurückzuführen.<sup>[92]</sup> Beim Erwärmen auf bzw. über die LCS-Temperatur werden die

intramolekularen Van-der Waals-Kräfte der hydrophoben Polymerteile größer als die Hydratation selbiger und es kommt zur Bildung eines hydrophoben Kerns, sowohl intra- als auch intermolekular. Insbesondere Poly-*N*-isopropylacrylamid und Poly-*N*-vinylcaprolactam sind von großem Interesse, da ihre LCST mit einer Temperatur von 32 bis 34 °C im physiologischen Bereich liegt und Anwendungen im Bereich der Pharmakologie oder sogar der Textilindustrie ermöglichen.<sup>[90]</sup>

Bei dem Poly-*N*-Oxid-11 wurden die LCS-Temperaturen mittels Transmissionsmessung bestimmt. Sie reichen von 8°C bei einer Polymerkonzentration von 10 mg/ml bis ca. 40 °C bei einer Konzentration von 1 mg/ml. (Abbildung 17)

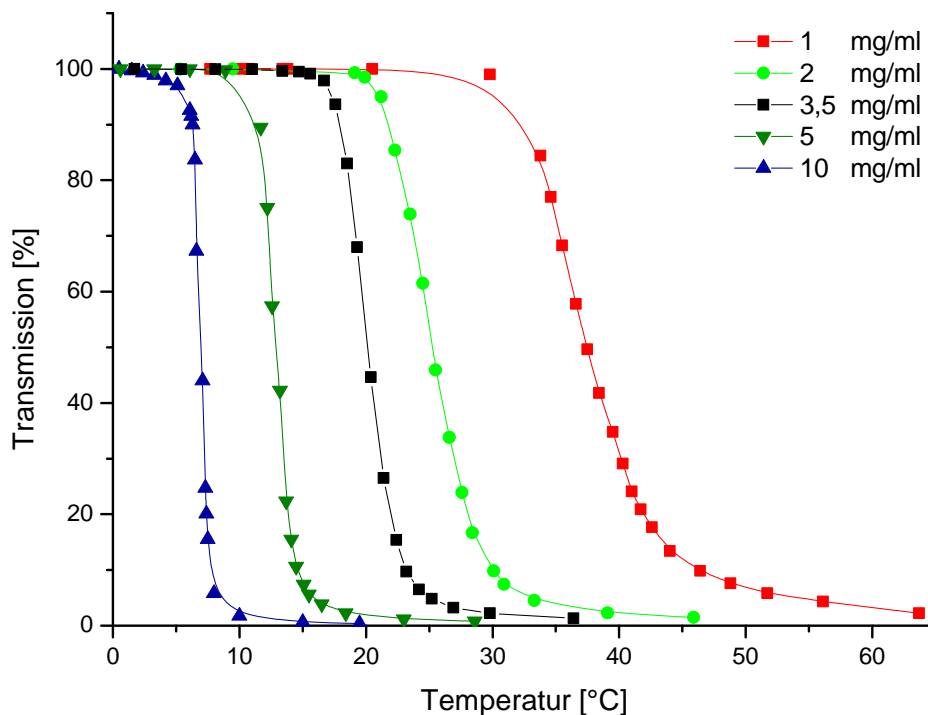


Abbildung 17: LCST Verhalten von Poly-*N*-Oxid in Abhängigkeit von der Temperatur

Bei der Auftragung der LCS-Temperaturen (Wendepunkte der Transmissionsmessungen) gegen die Konzentration erhält man folgenden Graphen:

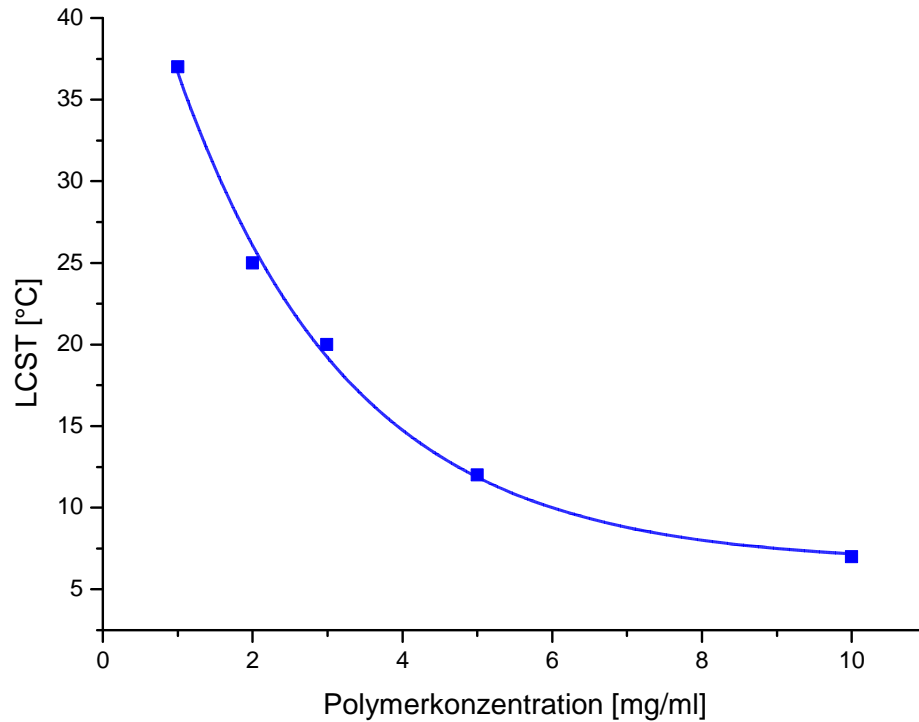


Abbildung 18: LCS-Temperatur in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration

Da das Poly-*N*-Oxid im Gegensatz zu den oben genannten Polymeren neben dem LCST Effekt außerdem die Fähigkeit besitzt, Polyrotaxane zu bilden, war die Kombination aus beidem und der Einfluss der Rotaxanierung auf die LCST bei gegebener Polymerkonzentration von großem Interesse.



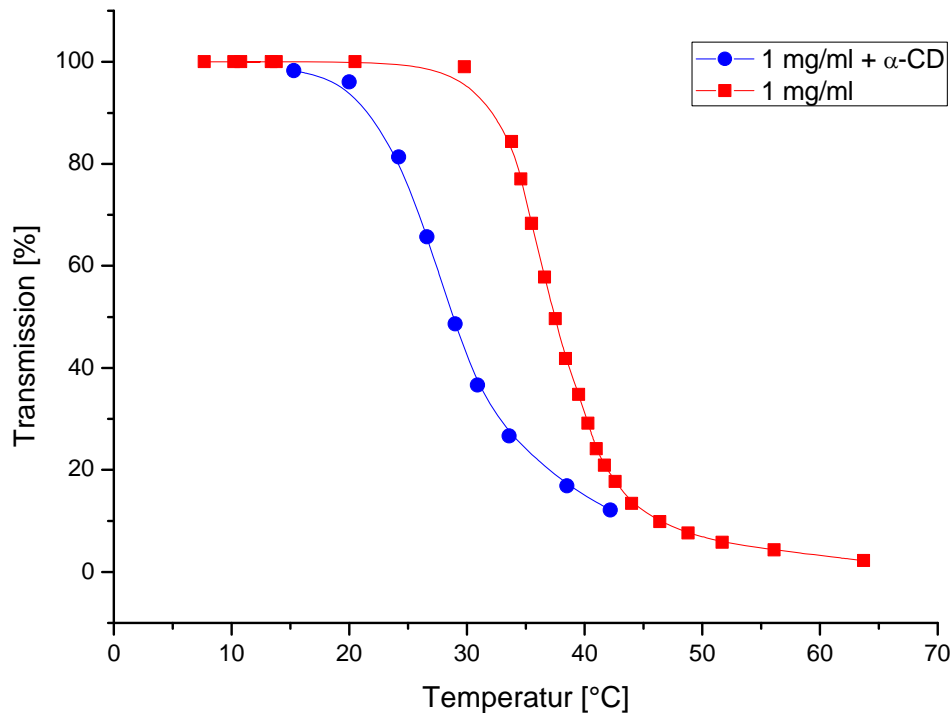


Abbildung 19: Einfluss der Rotaxanierung des Polymers auf die LCST

Abbildung 19 zeigt den Einfluss der Rotaxanierung auf die LCST. Durch das Auffädeln von Cyclodextrin hatte sich eine Verringerung der LCST-Temperatur gezeigt. Bei gleicher Konzentration des Poly-*N*-Oxids erfolgte durch Zugabe von  $\alpha$ -CD eine Verringerung der LCST um ca. 10°C und der Verlauf bzw. die Bildung des Gelzustandes verlief weniger diskret als beim freien Polymer. Die Auffädellung von CDs auf geeignete thermosensible Polymere stellt somit nicht nur die Möglichkeit einer Funktionalisierung dar, sondern bietet gleichzeitig auch die Möglichkeit sowohl Temperatur als auch Verlauf der LCST entsprechend zu beeinflussen. Dies eröffnet eine weitere Dimension in einer möglichen Anwendung als Gentransfer- oder Drug-Delivery-System.

## 7 Gentransfektions mittels Polyrotaxanen

Grundvoraussetzung für die Gentransfektion mit Polymeren und auch Rotaxanen ist die Fähigkeit, mit DNA kleine Komplexe bzw. Partikel zu bilden, die nach außen hin positiv geladen sind und durch die Zellmembran eingeschleust werden können. (vgl. Abbildung 6) Bekanntester Vertreter ist PEI (Polyethylenimin). PEI zeigt eine hohe Transfektionsrate sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.<sup>[93-98]</sup> Leider besitzt PEI gleichzeitig eine zu große Toxizität, um bei einer Gentherapie beim Menschen Anwendung finden zu können.<sup>[99]</sup> Eine Verbesserung der Zellverträglichkeit bei gleichzeitig hoher Transfektionsrate durch die Nutzung von Rotaxanen bzw. Cyclodextrinpolymeren konnte bereits gezeigt werden.<sup>[39, 100, 101]</sup> In den folgenden Kapiteln wird nun die Anwendung der zuvor synthetisierten kationischen Polyrotaxane untersucht.

### 7.1 Herstellung der DNA-Rotaxan-Polyplexe

Für die Herstellung der Polyplexe zur Bestimmung von Partikelgröße und  $\zeta$ -Potential sowie der Komplexierungsstärke durch Gelelektrophorese und Farbverdrängungsuntersuchung wurde CT-DNA verwendet. CT steht für Calf Thymus und wird aus dem Kälberthymus gewonnen. CT-DNA ist preisgünstig kommerziell erhältlich und ist für die oben genannten Tests vollkommen ausreichend. Die Bestimmung der Transfektionsrate sowie die Rasterkraftmikroskopie erfolgte mit gWIZLuc einer Plasmid-DNA, die Luciferase aus dem Leuchtkäfer oder Glühwürmchen kodiert und deren erfolgreiche Transfektion durch das Auftreten von Biolumineszenz quantifiziert werden kann.<sup>[102]</sup>

Die Polyplexe wurden jeweils durch Mischen einer Stammlösung von 80  $\mu\text{g/ml}$  DNA mit den Stammlösungen an Ionen-11 bzw. den Rotaxanen mit 1  $\text{mg/ml}$  entsprechend dem gewünschten N:P Verhältnis (Verhältnis aus der Anzahl der Stickstoffatome im Polymer/Rotaxan und der Anzahl der Phosphoratome in der DNA) hergestellt. Dazu wurden zur DNA-Lösung

die Polymer/Rotaxan-Lösungen hinzu pipettiert und mittels Pipette gemischt. Anschließend wurden die Polyplexe bei Raumtemperatur mindestens 30-60 min., zur Ausbildung möglichst homogener Polyplexe, aufbewahrt.

### 7.1.1 Bestimmung der Partikelgröße mittels DLS und Bestimmung $\zeta$ -Potentials

Zur Klärung der Frage, ob die Polyplexe überhaupt für die Gentransfektion in Frage kommen und welche Konzentrationen an Polymer/Rotaxan notwendig sind, um stabile und positiv geladene Partikel zu erhalten, wurden im ersten Schritt Polyplexe mit Ionen-11 und den Rotaxanen **R1** bis **R3** mit N:P Verhältnissen von 0,3:1 bis 4:1 hergestellt. Anschließend wurden die hydrodynamischen Radien mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt und das  $\zeta$ -Potentials von den selben Proben gemessen. Die Werte sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Tabelle 6: Polyplexradius und  $\zeta$ -Potential CT-DNA mit **Ionen-11**

N:P	DLS-Radius [nm]	$\zeta$ -Potential [mV]
0,5	110	-17,1
0,8	79	+18,2
1	65	+18,2
1,5	39 (72%) + 180 (23%)	+11,9
2	31 (65%) + 103 (32%)	+10,2
2,5	32 (65%) + 154 (31%)	+12,0

Tabelle 6 zeigt, dass Polyplexe in der Größenordnung von 31 bis 110 nm gebildet wurden. Mit zunehmendem N:P Verhältnis werden die Polyplexe immer kompakter. Ab einem N:P von 1 treten zwei unterschiedlich große Partikel auf. Da bei einem N:P >1 ein Überschuss an Polymer vorliegt, liegt

die Erklärung nahe, dass einzelne Polyplexe durch Polymerketten miteinander verknüpft wurden und dadurch der größere Radius zustande kommt.

Das  $\zeta$ -Potential ist anfänglich bei einem N:P von 0,5 mit einem Wert von -17,1 mV noch negativ, ändert aber bereits bei N:P 0,8 das Vorzeichen und hat einen Wert von 18,2.

Die gleichen Messungen wurden auch mit den Rotaxanen **R1** bis **R3** durchgeführt:

Tabelle 7: Polyplexradius und  $\zeta$ -Potential CT-DNA mit **R1**

N:P	DLS-Radius [nm]	$\zeta$ -Potential [mV]
0,3	87 (96%) 17 (4%)	-30
0,5	86 (93%) 20 (7%)	-35
0,8	96 (95%) 16 (5%)	+24
1	56 (99%)	+21
1,5	56 (95%)	+31
2	60 (93%) + 427 (7%)	+32
4	59 (90%) + 809 (3%)	+23

Bei dem Cysteaminyl-Rotaxan **R1** treten bereits bei N:P Verhältnissen von 0,3 bis 0,8 zwei Populationen auf. Dies sind zum einen Polyplexe um 90nm und vergleichsweise sehr kleine Partikel um 20nm. Das  $\zeta$ -Potential bei **R1** ist vom Betrag zwar vom Betrag her größer, der Wechsel des Vorzeichens erfolgt aber ebenso wie beim Ionen-11 zwischen N:P von 0,5 und 0,8.

Tabelle 8: Polyplexradius und  $\zeta$ -Potential CT-DNA mit **R2**

N:P	DLS-Radius [nm]	$\zeta$ -Potential [mV]
0,3	193 (96%)	-33,2
0,5	105 (96%)	-27,1
0,8	53 (99%)	+16,7
1	52 (98%)	+18,6
1,5	47 (95%)	+17,2
2	48 (88%) 326 (12%)	+17,9
4	59 (93%)	+24,8

Rotaxan **R2** hatte einen ähnlichen Verlauf von Partikelgröße und  $\zeta$ -Potential wie R1. Der Vorzeichenwechsel erfolgte ebenfalls zwischen N:P von 0,5 und 0,8 jedoch bei geringeren Absolutwerten des Potentials.

Die gleichen Messungen wurden zuletzt mit dem Rotaxan **R3** durchgeführt, welches im Gegensatz zu den vorherigen Polymeren bzw. Rotaxanen aus Me-PA-11 **6** und  $\alpha$ -Cyclodextrin bestand.

Tabelle 9: Polyplexradius und  $\zeta$ -Potential CT-DNA mit **R3**

N:P	DLS-Radius [nm]	$\zeta$ -Potential [mV]
0,5	78,1 (94%)	-21
1	243 (11%) + 532 (87%)	-15
2	237 (23%)+ 1208(11%)+ 2668(66%)	-6
4	179 (7%) + Aggregate	+6

Das Rotaxan **R3** hat sich als ungeeignet für weitere Versuche herausgestellt. Obwohl bei N:P von 0,5 noch ein zu erwartender Radius im Vergleich

zu den anderen Versuchen zu finden war, so waren ab N:P 1 hauptsächlich Partikel zu finden. Insbesondere zum Wechsels des Vorzeichens des  $\zeta$ -Potentials war ein N:P Verhältnis  $> 3$  notwendig, wobei bei diesem Verhältnis keine Erfolg versprechenden Polyplexe mehr zu finden waren. Alle weiteren Untersuchungen wurden daher auf Ionen-11 und die Rotaxane **R1** und **R2** beschränkt.

### 7.1.2 Bestimmung der Komplexierungsstärke mittels Gelelektrophorese und Farbverdrängungsuntersuchung

In diesem Kapitel sollte nun untersucht werden, wie stark die Polyplexe im Vergleich zu den Interkalationsfarbstoffen Ethidiumbromid und SYBR-Safe sind und wurden mittels Gelelektrophorese untersucht. Es wurde bestimmt, bei welchem N:P Verhältnis die DNA vollständig komplexiert ist und ob diese Ergebnisse mit den Werten aus Kapitel 7.1.1 kongruent ist.

Ethidiumbromid und SYBR-Safe sind Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der DNA starke Komplexe bilden und im komplexierten Zustand fluoreszieren. In den folgenden Versuchen wurden zur CT-DNA-Lösung mit Fluoreszenzfarbstoff, jeweils Lösungen von den Polymeren bzw. Polyrotaxanen gegeben und anschließend die verbleibende Fluoreszenz gemessen. Begonnen wurde mit Ionene-11 und Ethidiumbromid als bekannter Farbstoff für diesen Versuch. Aufgrund der stark krebserregenden Wirkung von Ethidiumbromid wurde der gleiche Versuch mit SYBR-Safe durchgeführt und an die Bedingungen angepasst. SYBR Safe besitzt neben der geringeren Karzinogenität auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis.<sup>[103]</sup> Die Lösungen enthielten jeweils 60  $\mu\text{g}$  CT-DNA in 3 ml HEPES-Puffer. Zu dieser Lösung wurden Polymer/Polyrotaxan Lösungen von 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 10  $\mu\text{l}$  Schritten zugegeben und jeweils die Fluoreszenz bei 530 nm gemessen. Anschließend wurde die relative Fluoreszenz gegen das N:P Verhältnis aufgetragen. Bei der Berechnung des N:P Verhältnisses wurde dabei die Verdünnung durch Zugabe der Polymerlösung berücksichtigt bzw. mit den Massen von Polymer und DNA gerechnet. Es stellte sich heraus, dass eine Menge von 1  $\mu\text{l}$  SYBR-Safe (1:10.000 Konzentrat in DMSO) die besten Resultate lieferte.

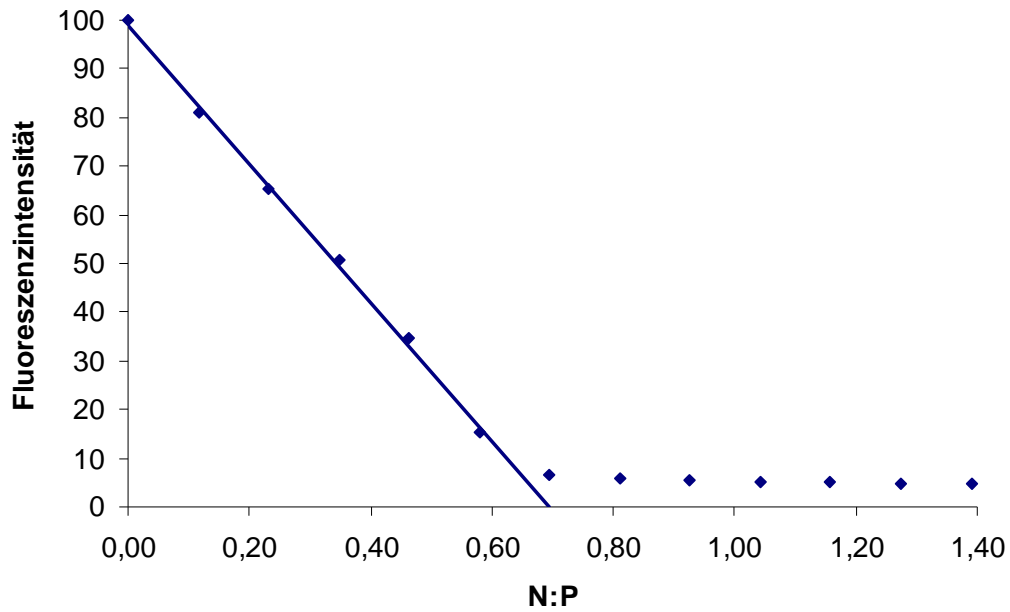


Abbildung 20: Farbverdrängungsversuch von Ionen-11

In Abbildung 20 ist das Ergebnis der Fluoreszenzmessung mit Ionen-11 dargestellt. Es zeigt, dass das Polymer eine stärkere Bindung zur DNA eingeht als SYBR-Safe und diesen verdrängt. Eine nahezu vollständige Verdrängung ist bereits bei einem N:P Verhältnis von 0,7 zu erkennen. Demnach sind weniger positive Stickstoffatome des Polymers nötig, um den Farbstoff zu verdrängen. Der Wert von 0,7 stimmt auch mit dem Vorzeichenwechsel des  $\zeta$ -Potentials aus Kapitel 7.1.1 überein.

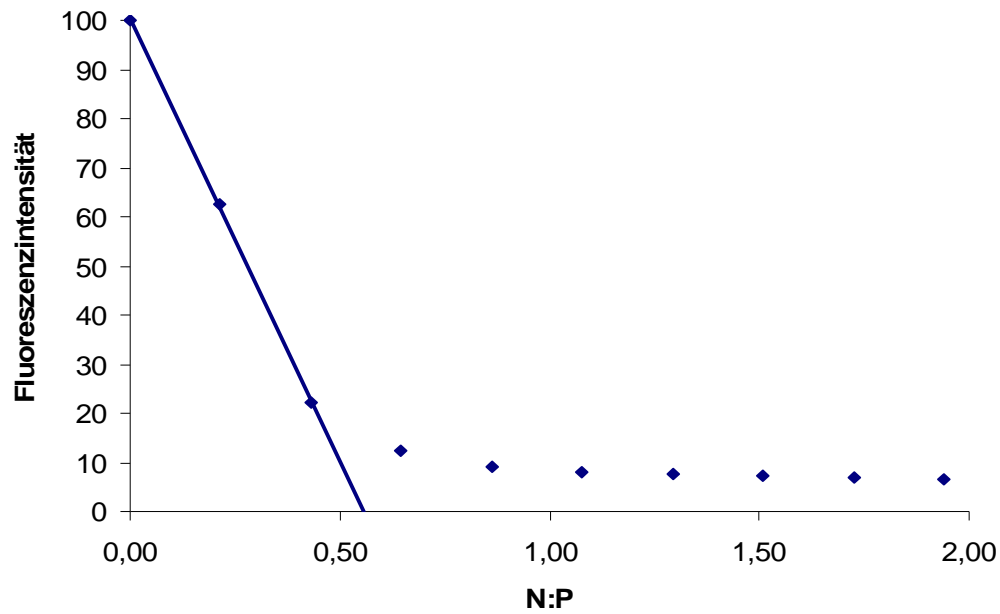


Abbildung 21: Farbverdrängungsversuch von **R1**

Bei Rotaxan **R1** war das Ergebnis ähnlich (Abbildung 21). Auch hier wurde eine fast vollständige Verdrängung des Farbstoffs bei einem N:P von 0,6 erreicht und war in Übereinstimmung mit dem Vorzeichenwechsel des  $\zeta$ -Potentials in 7.1.1. Die geringere Messpunktdichte zwischen 0 und 1 im Vergleich zu Ionen-11 und R2 kommt durch den kleineren Wert von M:N aufgrund des aufgefädelten Hexakis-(6-cysteaminyl-6-deoxy)- $\alpha$ -cyclodextrin zustande.



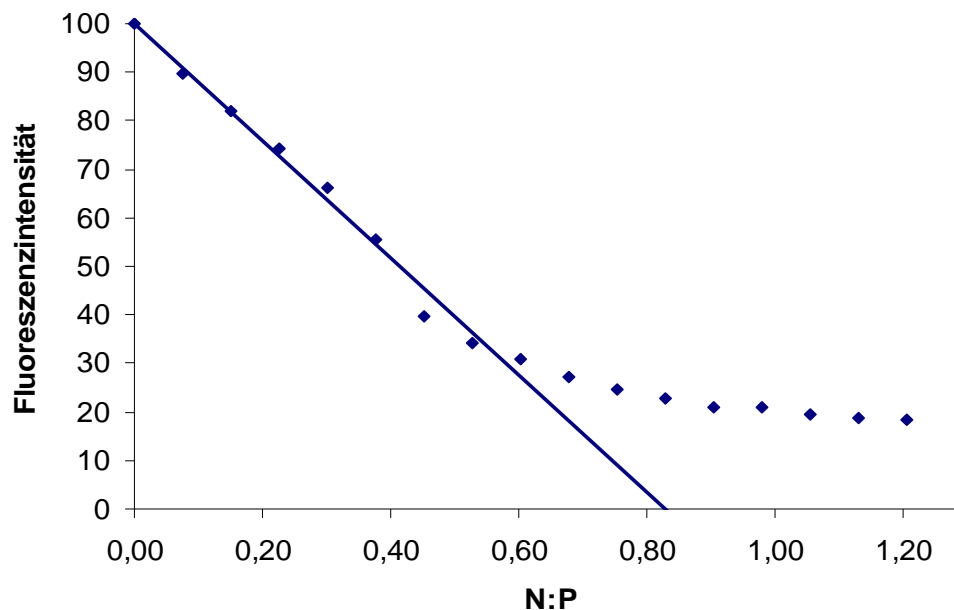


Abbildung 22: Farbverdrängungsversuch von **R2**

Beim Farbverdrängungsversuch von **R2** zeigte sich ein anderes Bild. Es wurde zwar ebenfalls eine Verdrängung des Farbstoffs festgestellt, jedoch war ein N:P Verhältnis von ca. 0,8 notwendig und es blieb eine Restfluoreszenz von ca. 20% bestehen, im Gegensatz zu ca. 5% bei Ionen-11 und **R1**. Dies ist dadurch zu erklären, dass **R2** ausschließlich natives  $\alpha$ -Cyclodextrin trägt und dieses die Ladungen des Polymers eher abschirmt. Trotzdem ist eine Komplexierung der DNA erkennbar, wenn auch schwächer, als bei den vorherigen Versuchen.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Polyplexe und der Komplexierungsstärke, sowie dem notwendigen N:P Verhältnis, besteht in der Gelelektrophorese der Polyplexe. Hierbei wird DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polymer/Rotaxan komplexiert und anschließend mittels elektrischem Feld durch ein Agarosegel bewegt. Die komplexierte DNA verbleibt dabei in der Geltasche und die freie DNA wandert zur Anode.

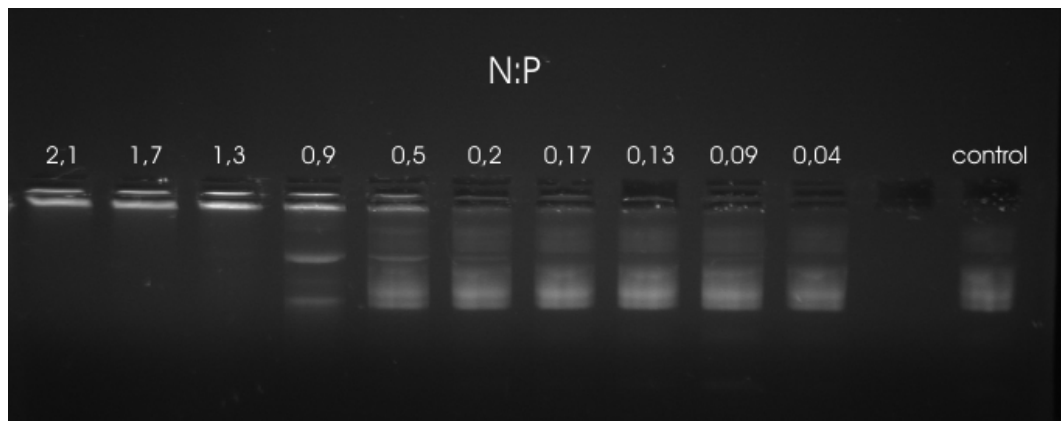


Abbildung 23: Gelelektrophorese DNA mit Ionen-11

In Abbildung 23 ist die Komplexierung von DNA mit Ionen-11 dargestellt. Die verschiedenen N:P Verhältnisse sind über der Geltasche angegeben. Es ist zu erkennen, dass eine vollständige Komplexierung der DNA zwischen  $N:P = 0,9$  und  $1,3$  liegt.

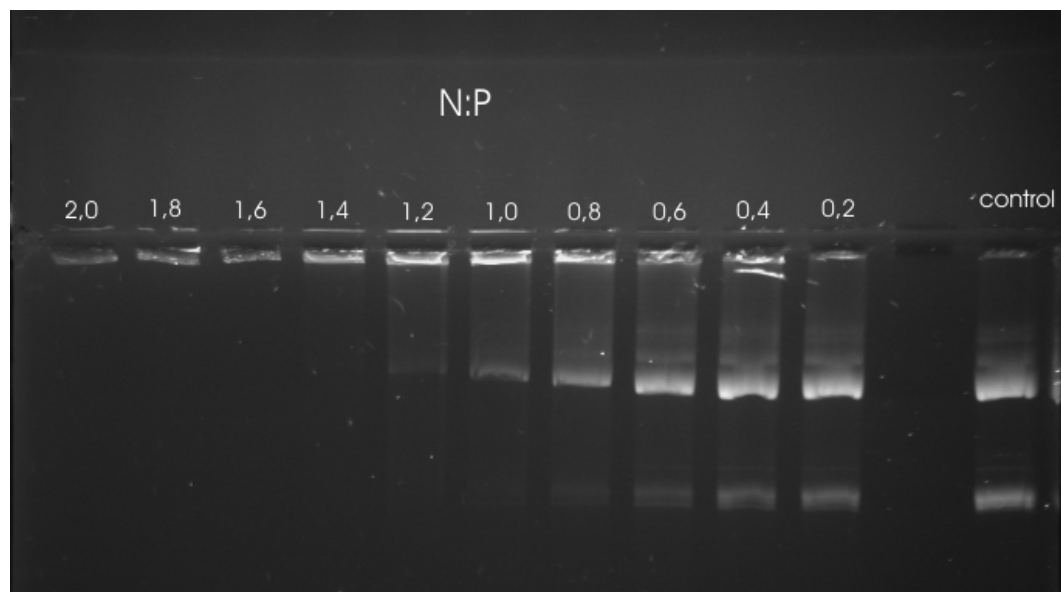


Abbildung 24: Gelelektrophorese DNA mit **R1**

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis für **R1**. Bei diesem Rotaxan liegt die vollständige Komplexierung bei ca. 1,4.

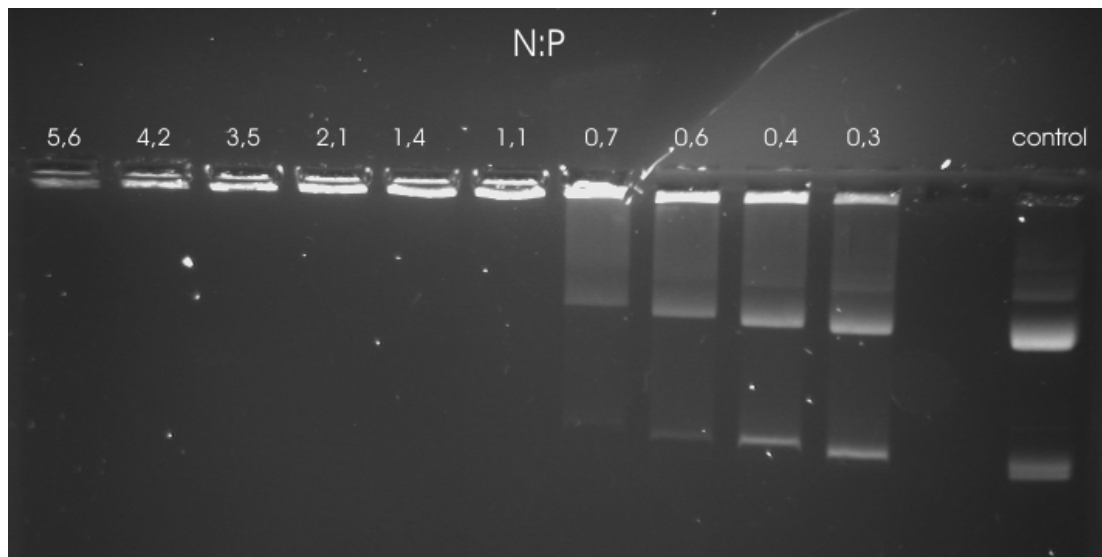


Abbildung 25: Gelelektrophorese DNA mit **R2**

Das Ergebnis für **R2** in Abbildung 25 zeigt für dieses Rotaxan eine vollständige Polyplexbildung bei N:P 1,1. Durch die Gelelektrophoreseuntersuchungen konnten ebenfalls die Bildung von Partikeln mit den Polymer/Rotaxanen gezeigt werden. Die vollständigen Umsetzungen im Bezug auf die N:P Werte liegen zwar leicht oberhalb der Ergebnisse von DLS,  $\zeta$ -Potential und Farbverdrängungsuntersuchung, sind aber immer noch wesentlich kleiner als die von PEI.<sup>[104]</sup> In vergleichbaren Versuchsanordnungen findet man Werte von N:P von größer zwei<sup>[105]</sup> und damit eine höhere positive Ladung für das gleiche Ergebnis im Vergleich zu Ionen-11 und den Polyrotaxanen **R1** und **R2**. Es lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine geringere Gesamtladung notwendig ist, wenn die Ladungsträger eine vergleichbare Ladungsdichte zur DNA besitzen. Bei Polyethylenimin findet sich ein Verhältnis von Molmasse zu Ladung (M:N) von 43,7. Vergleicht man diese mit der DNA (als Molmasse pro negativer Ladung der Phosphatgruppe) (M:P) von ca. 305, so sieht man, dass die Ladungsdichte bei PEI ca. sieben mal so groß ist. Im Vergleich dazu findet man bei Ionen-11 ein M:N Verhältnis von 233,8 und bei **R1** und **R2** ein Verhältnis von 251,3 bzw. 720,2.

### 7.1.3 Rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Polyplexe

Als weitere Charakterisierungsmethode wurden die Polyplexe mittels Rasterkraftmikroskop (AFM) untersucht. Dazu wurden Polyplexe aus gWIZLuc-pDNA mit Ionen-11 und den Polyrotaxanen **R1** und **R2** hergestellt. Die gWIZLuc-pDNA kam hier zum Einsatz, da diese im Gegensatz zur CT-DNA monodispers ist und damit einheitlichere Ergebnisse liefert. Es wurden mit den genannten Polymer/Rotaxanen und der pDNA Polyplexe mit einem N:P Verhältnis von 2 in HEPES Puffer synthetisiert und anschließend auf eine frische Muskovit-Glimmer Platte (Mica) gegossen. Nach 30 Sekunden wurde die überstehende Lösung abgesaugt und die Platte zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen. Die Aufnahmen erfolgten anschließend im "Tapping"-Mode in Lösung.

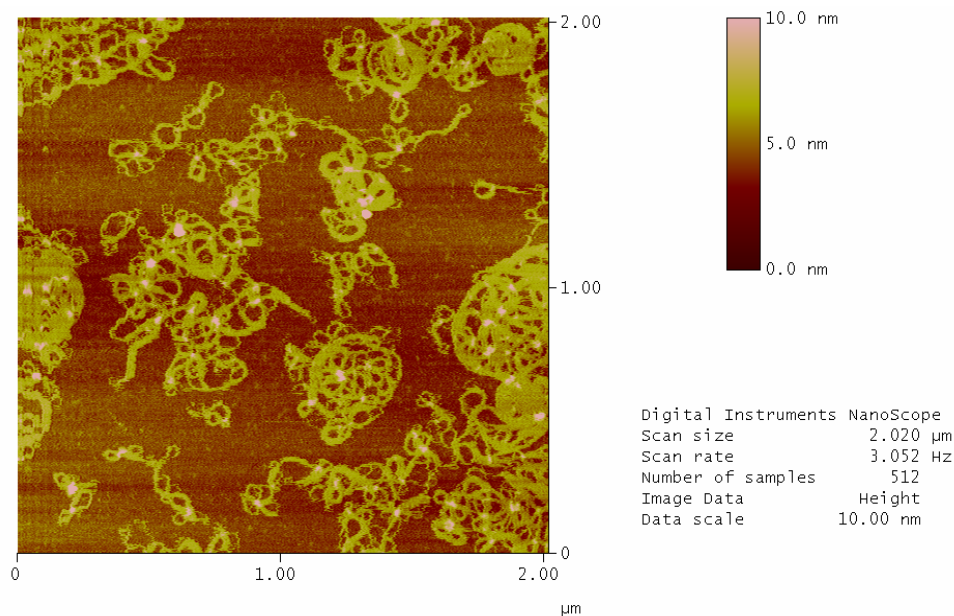


Abbildung 26: AFM Aufnahme von gWIZLuc-pDNA mit Ionen-11

Insbesondere die Aufnahme der Polyplexe mit Ionen-11 (Abbildung 26) zeigte ein erstaunliches Ergebnis. Es hatten sich deutlich zu erkennende Polyplexe gebildet. Allerdings waren Teile der DNA außerhalb des Komplexkernes zu finden. Sie waren teilweise blütenartig um den Kern angeordnet. Obwohl die Komplexierung mit Ionen-11 offensichtlich nicht vollständig war, konnten dennoch gute Transfektionsergebnisse mit Ionen-11

bei gleichen N:P Verhältnissen erreicht werden. (vgl. Kapitel 7.2) Das negative  $\zeta$ -Potential sowie die Größe der Partikel waren ausreichend für eine erfolgreiche Aufnahme und Expression des Luciferase-Gens.

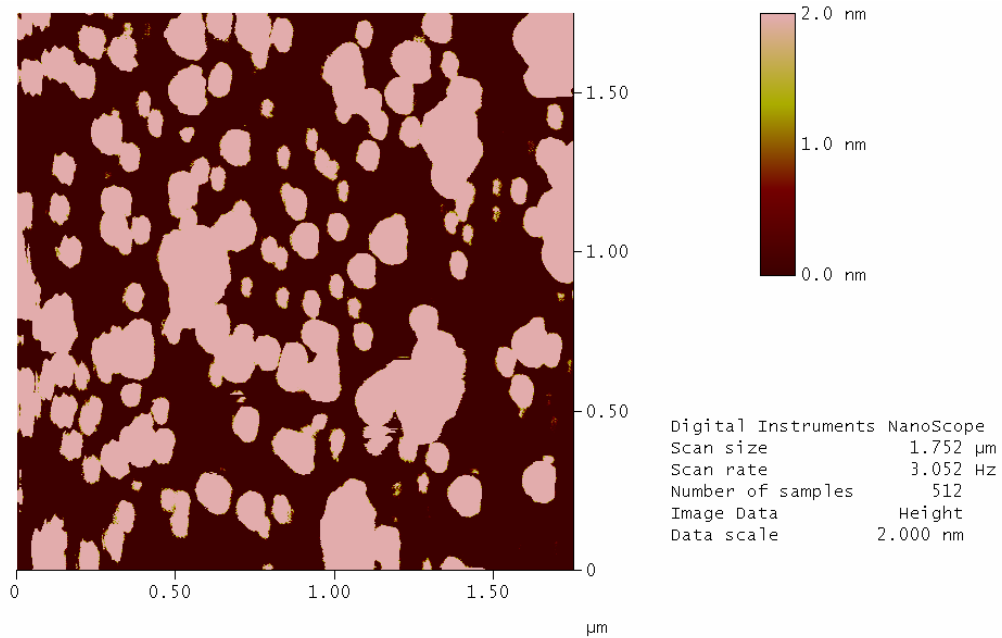


Abbildung 27: AFM Aufnahme von gWIZLuc-pDNA mit **R1**

Bei der AFM-Aufnahme der Polyplexe mit **R1** wurden die Partikel mit vergleichbaren Größen von den DLS Messung (siehe Tabelle 6Tabelle 7

Tabelle 8) gefunden (Abbildung 27) Neben den diskreten Partikeln wurden hier auch Aggregate gefunden. Die Tiefenauflösung bei dieser Messung war allerdings unzureichend und konnte bei Wiederholungsmessungen auch nicht verbessert werden. Dennoch konnte eine zweidimensionale Darstellung erreicht werden.

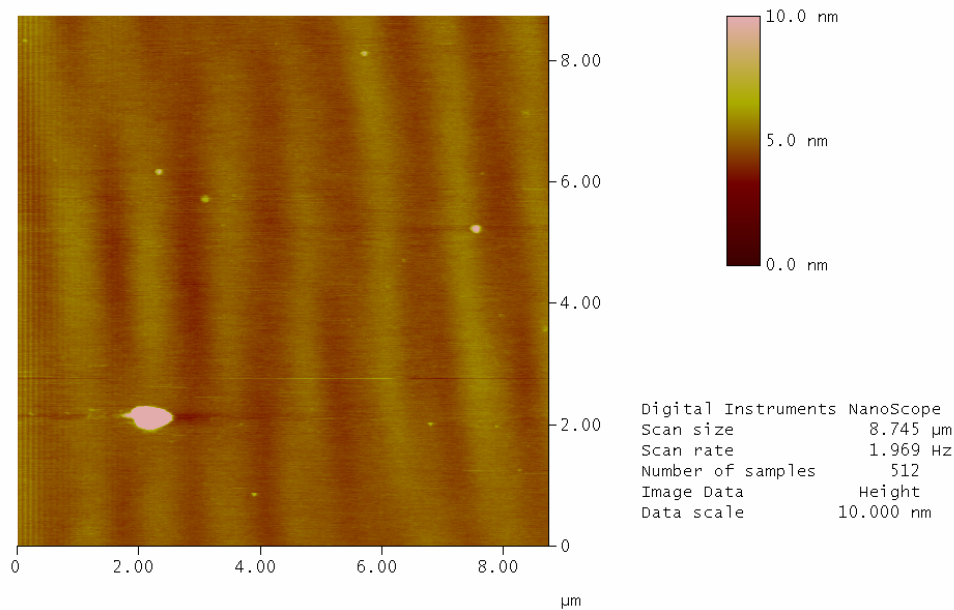


Abbildung 28: AFM Aufnahme von gWIZLuc-pDNA mit **R2**

Die Aufnahmen mit **R2** zeigten das beste Ergebnis in Bezug auf Komplexbildung. Es wurden hier ausschließlich diskrete, ungefähr gleich große Partikel gefunden (großer Partikel unten links war eine Verunreinigung), die auch keine freie DNA mehr zeigte. Die Größe der Partikel korrelierten mit den durch DLS Messungen erhaltenen Partikeldurchmessern.

Die folgenden Transfektionsexperimente wurden mit Polyplexen, bestehend aus gWIZLuc-pDNA und Ionen-11 sowie **R1** und **R2**, durchgeführt. Bei der Herstellung wurde HEPES-Puffer verwendet, der Hauptbestandteil des OptiMEM Reduced Serum Media ist und die gleiche Zeit zur Bildung der Komplexe abgewartet. Es ist also davon auszugehen, dass die in Kapitel 7.2

verwendeten Polyplexe in Größe und Gestalt vergleichbar sind, mit denen aus den AFM-Aufnahmen.

## 7.2 Bestimmung der Transfektionsaktivität der Polyplexe im Zellversuch

Zur Bestimmung der Transfektionsrate der Polymer/Rotaxane wurden drei Zelllinien gewählt: A549 (menschliche alveolare basal Epithelzellen aus einer Lungenkrebszelllinie), MCF7 (menschliche Brustkrebszellen) und gesunde Zellen C2C12 aus Mäuse-Myoblasten. In diesem Zellversuch wurden Polyplexe aus Ionen-11, den Polyrotaxanen **R1** und **R2** und gWIZLuc-pDNA mit einem N:P Verhältnis von 2 hergestellt, vergleichbar derer aus Kapitel 7.1.3.

Im ersten Schritt wurden die Zellen für das Experiment mit einer Seeding-Dichte von 140.000 Zellen pro Well präpariert:

- A549-Zellen in RPMI-1640 zusammen mit 10% FCS, AB/AM (Antibiotikum/Antimykotikum: 100 Einheiten/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 250 ng/ml Amphotericin B), 2 mM L-Glu
- MCF7-Zellen in RPMI-1640 mit 10% FCS, AB/AM und 2 mM L-Glu
- C2C12-Zellen in DMEM mit 10% FCS, AB/AM, 2 mM L-Glu und 2 ml NEAA (nicht essentielle Aminosäuren)

Nach 24 Stunden wurde die Lösung abpipettiert und gegen die Transfektions-Lösung mit den Komplexen ersetzt. Diese wurden durch Zugabe der Polymer/Rotaxane, entsprechend dem N:P Verhältnis von 2, zur gWIZLuc-pDNA (4µg pro Well) in 10 ml OptiMEM hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Transfektions-Mischung entfernt und Zellen mit auf 37°C vorgewärmter RPMI-1640-Lösung bedeckt. Daraufhin folgten weitere 48 Stunden Inkubationszeit.

Parallel zu Ionen-11 sowie **R1** und **R2** wurden Polyplexe mit PEI als positive Kontrolle benutzt, die gleichzeitig auch eine Vergleichbarkeit mit Literaturdaten gewährleisten.

### 7.2.1 Auswertung der Luciferase-Aktivität

Als Maß für die erfolgreiche Transfektion und Expression der durch gWIZLuc-pDNA kodierten Luciferase konnte nun deren Aktivität als Lumineszenz, nach Zugabe des Luciferin-Reagenz, gemessen werden.

Dazu wurde nach den 48 Stunden die überstehende Lösung entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 600µl Lysepuffer zugegeben und nach 5 Minuten das Lysat bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Die Messung der Lumineszenz erfolgte anschließend in einem Luminometer (TD20/20, Promega) nach Mischung von 100 µl des Luciferin-Reagenz mit 20 µl der Probe. Man erhält den Messwert in der Einheit LU/ml. (LU=light unit)

### 7.2.2 Bestimmung der Proteinmenge

Damit ein Vergleich der gemessenen Lichteinheiten zwischen den Proben und mit PEI möglich war, musste die Lichtintensität von LU/ml in LU/mg an Protein umgerechnet werden. Dazu war es notwendig die Menge an Protein pro Milliliter für jede Probe zu bestimmen. Dies erfolgte mittels Bradford Test.<sup>[106]</sup> Hierbei werden die Proben mit Coomassie Brilliant Blue G-250 versetzt. Dieser Farbstoff ist in seiner ungebundenen Form rot mit einem Absorptionsmaximum von 465 nm. Der Farbstoff verbindet sich mit Proteinen unter Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm und färbt sich damit blau. Die Absorptionsstärke der Lösung im Bereich von 595 nm ist somit ein Maß für die Menge an Proteinen in der Lösung.



Im ersten Schritt wurde eine Kalibrierung mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard durchgeführt. Die Stammlösung von BSA (1 mg/ml) wurde dazu mit Lysepuffer auf 0,6 bis 0,1 mg/ml in 0,1 mg/ml Schritten verdünnt und jeweils 10 µl dieser Lösungen mit 200 µl Bradford-Assay-Reagenz versetzt. Nach 15 Minuten wurden dann die Absorptionswerte bei 595 nm gemessen und diese Werte zur Erstellung einer Kalibrierkurve verwendet. In gleicher Weise wurden die Proben aus 7.2.1 gemessen. Dazu wurden 20µl der Proben mit 180µl Wasser verdünnt und wiederum 10µl dieser Lösung mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt. Die Absorptionsmesswerte wurde dann durch Vergleich mit der Kalibrierkurve ausgewertet und so die Konzentration an Protein in den Proben aus 7.2.1 in mg/ml bestimmt. Mit dieser Information konnte anschließend die Lumineszenz pro Milligramm Protein berechnet werden.

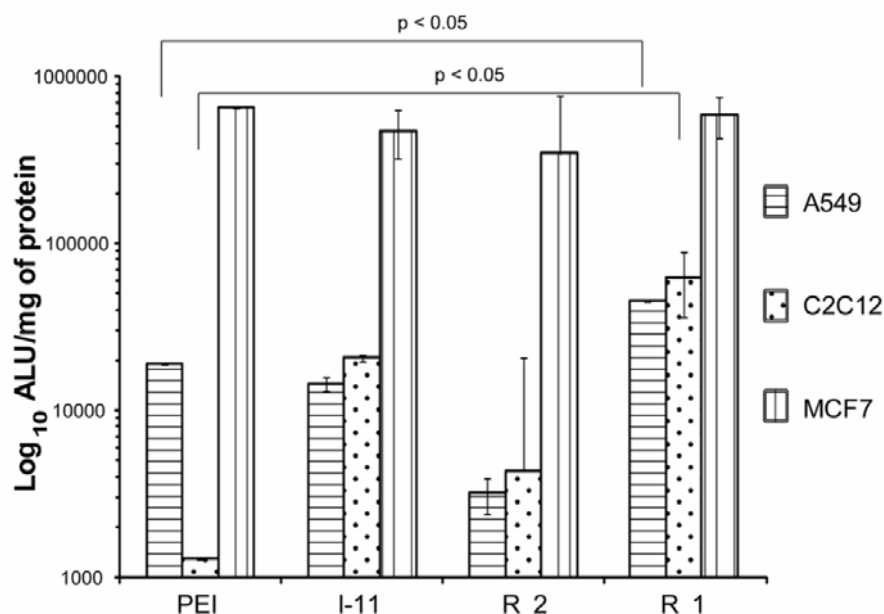


Abbildung 29: Ergebnis der Transfektion von gWIZLuc-pDNA

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Transfektion von gWIZLuc in die Zellen A549, C2C12 und MCF7 mithilfe von Ionen-11, **R2** und **R1**, sowie zu Vergleichszwecken mit PEI, dargestellt. Es ist erkennbar, dass alle Polymere und Rotaxane in Lage waren, das Gen in die Zellen einzuschleusen

---

und dass die Zelle anschließend Luciferase produziert hat. Das beste Ergebnis lieferte dabei das Rotaxan **R1**. Da es sich bei A549 und MCF7 um Krebszellen handelt, die bekanntermaßen eine hohe Zellteilungsrate haben und auch relativ leicht zu transfektieren sind, ist besonders der Vergleich der benignen C2C12 Zellen interessant. Hierbei konnte sowohl das Ionen-11 als auch die Rotaxane eine wesentlich bessere Transfektionsrate als PEI erzielen. Insbesondere **R1** zeigte eine ca. 80-fach höhere Konzentration an Luciferase als PEI. Auch Ionen-11 und **R2** zeigten eine höhere Transfektionsrate bei C2C12 als PEI, waren jedoch vergleichsweise schwächer als PEI bei A549 und MCF7. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass **R1** bei allen Zelllinien das beste Ergebnis lieferte, insbesondere gegenüber PEI und dies vor allem bei den gesunden Zellen.

### 7.3 Toxizitätsuntersuchung mittels MTT-Assay

Eine der wichtigsten Eigenschaften eines potentiellen Genvektors auf Polymerbasis, neben einer hohen Transfektionsrate, ist eine geringe Toxizität. Insbesondere bei PEI als Standard in der Gentransfektion ist diese für den in-vivo Einsatz zu hoch.

Aus diesem Grund wurden die Proben aus 7.2 abschließend noch auf ihre Zelltoxizität hin untersucht. Dies erfolgte durch Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels MTT-Assay.<sup>[107]</sup>

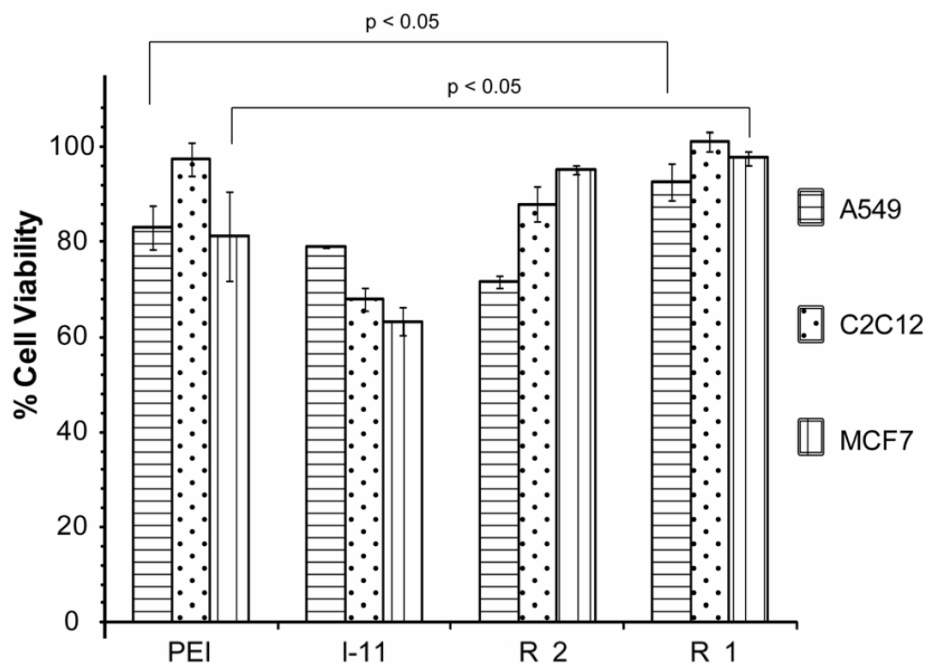


Abbildung 30: Zytotoxizitätstest der Polymere/Rotaxane

Erfreulicherweise zeigte der MTT-Test eine geringere Toxizität von **R1** gegenüber allen anderen Polymeren bzw. Rotaxan. Die Überlebensrate der Zellen lagen bei R1 für alle drei Zelllinien weit über 90% und für C2C12 sogar nahe 100%. Ionen-11 zeigte die schlechteste Zellverträglichkeit im Test. Insbesondere bei MCF7 lag die Überlebensrate nur bei knapp über 60%. Das Rotaxan **R2** schnitt vergleichbar mit Ionen-11 ab und war etwas besser bei MCF7, aber schlechter bei A549 und C2C12.

Da alle Polyplexe mit einem N:P Verhältnis von 2 hergestellt wurden und **R1** zusätzlich zu den Ladungen im Polymer noch sechs weitere Aminogruppen am Cyclodextrin tragen, war hier die Gesamtmenge an Rotaxan wesentlich geringer als bei Ionen-11 und vor allem R2. Außerdem war dadurch auch die geringste Menge an Polymerfaden im Test notwendig. Durch die supramolekulare Struktur des Rotaxans **R1** konnten die kooperativen Effekte der Aminogruppen der Cyclodextrine ausgenutzt werden und eine deutliche Reduktion an Polymerbestandteilen durch Austausch gegen kationisches CD erzielt werden.

**R1** hat damit in allen Tests überzeugen können und hat die höchste Transfektionsrate bei gleichzeitig bester Zellverträglichkeit. Zudem war aufgrund der hohen Ladungsdichte die geringste Menge an Rotaxan im Test notwendig.

Es konnte also gezeigt werden, dass supramolekulare Strukturen mit einem kationischen Backbone und kationischem Cyclodextrin nicht nur zur Bildung von Polyplexen mit DNA fähig ist, sondern PEI sowohl in der Transfektionsrate als auch in der Zellverträglichkeit übertrifft.

## 8 Zellerkennung durch Polyrotaxane

Neben dem Aufbau von Polyrotaxanen zur Gentransfektion bietet sich das Baukastensystem auch für weitere Anwendungen an. Insbesondere die Erkennung von bestimmten Zellen und deren zielgerichtete Therapie stellen eine große Herausforderung dar. In den folgenden Kapiteln sollen nun Rotaxane hergestellt werden und auf ihre prinzipielle Tauglichkeit in der Erkennung von Zellen untersucht werden.

### 8.1 Synthese der Rotaxane für Zellerkennung

Die Synthese der Rotaxane für die Zellerkennung erfolgte analog zu denen in Kapitel 7. Hier wurde jedoch das *N*-Oxid-10 als Polymer gewählt, da es einen zwitterionischen Aufbau hat und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Rotaxan und Zellen geringer ausfallen.

Es wurden verschiedene Kombinationen aus Cyclodextrinen aus Kapitel 4.1.4 und 4.3 gewählt und auf das Polymer *N*-Oxid-10 aufgefädelt. Zur Anwendung in den Zelltests kamen schließlich die beiden Rotaxane aus Tabelle 10.

Tabelle 10: Rotaxane für Zellerkennung

Rotaxan	Polymer	Cyclodextrin	Belegungsgrad [%]
R4	<i>N</i> -Oxid-10 <b>8</b>	Gal-TA- $\alpha$ -CD	38
R5	<i>N</i> -Oxid-10 <b>8</b>	Glu-TA- $\alpha$ -CD	44

## 8.2 Zellerkennungsversuche mit Erythrozyten und CACO-2 Zellen

Zur Untersuchung der Bindungsstärke von den zuckermodifizierten Polyrotaxanen wurden zwei verschiedenen Zelltypen gewählt. Dies waren zum einen rote Blutkörperchen (RBC) und zum anderen CACO-2 Zellen. Die roten Blutkörperchen besitzen keinen Zellkern und sind nicht zur Endozytose fähig. CACO-2 Zellen sind Darmepithelzellen, die vielfach Anwendung in der Untersuchung von transepithelalem Transport von Wirkstoffen findet.<sup>[108]</sup>

Zur qualitativen Bestimmung der Bindung von galaktosemodifiziertem Rotaxan (**R4**) und glucosemodifiziertem Rotaxan (**R5**) wurden Lösungen mit einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt und mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen, um ungebundenes Rotaxan aus der Lösung zu entfernen. Die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 488nm zeigte, dass insbesondere das Rotaxan R4 eine deutlich erkennbare Bindung zu den roten Blutkörperchen eingegangen ist. (Abbildung 31)

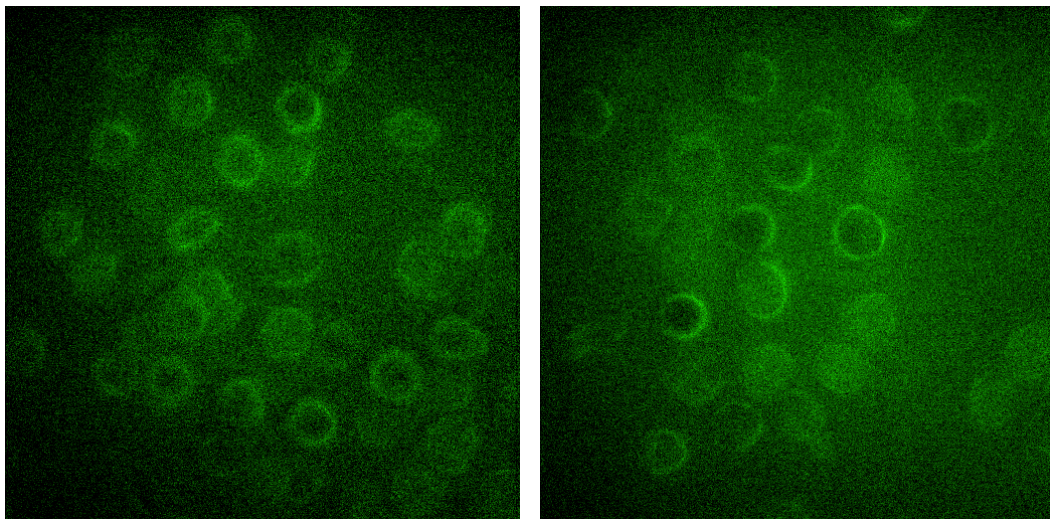


Abbildung 31: RBC mit Rotaxan **R4** (Galactose)

Auch bei Rotaxan **R5** war eine Bindung an die RBC zu erkennen (Abbildung 32), jedoch unter gleichen Messbedingungen war eine geringere Affinität zu finden.

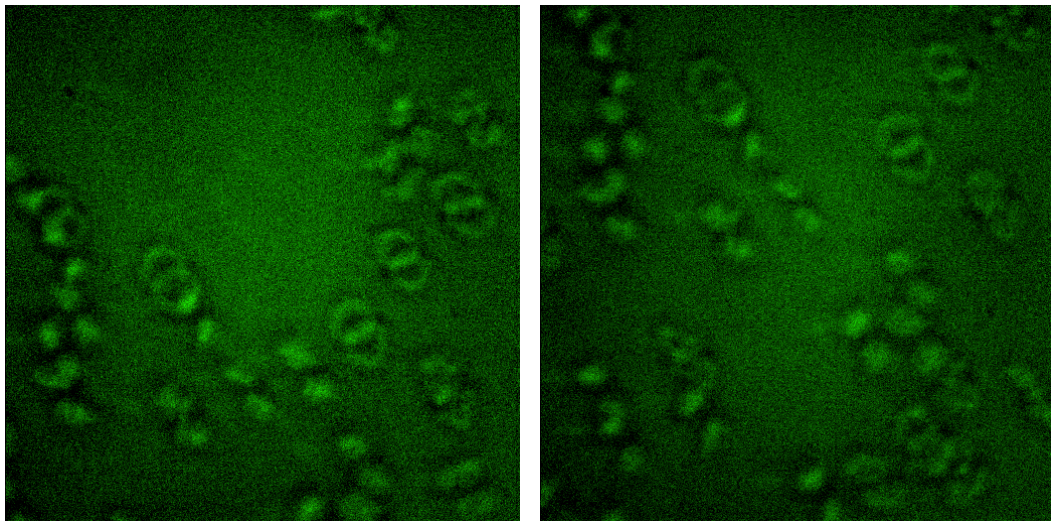


Abbildung 32: RBC mit Rotaxan **R5** (Glucose)

Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass Rotaxane grundsätzlich zur Bindung an RBCs in der Lage sind und weiterhin dass die Bindung von Galactose stärker ist als die von Glucose.

In einem weiteren Versuch wurde das Rotaxan **R5** mit CACO-2 Zellen getestet. Auch hier wurden die Zellen mit einer 100 µg/ml Lösung an **R5** inkubiert und das nicht gebundene Rotaxan durch dreimaliges Spülen entfernt. Abbildung 33 zeigt, dass die Zellen durch das Rotaxan fluoreszenzmarkiert wurden. Anders als bei den RBCs sind hier auch kleine Punkte von konzentrierter Fluoreszenz zu entdecken. Dies könnte auf eine Endozytose des Rotaxans hindeuten.

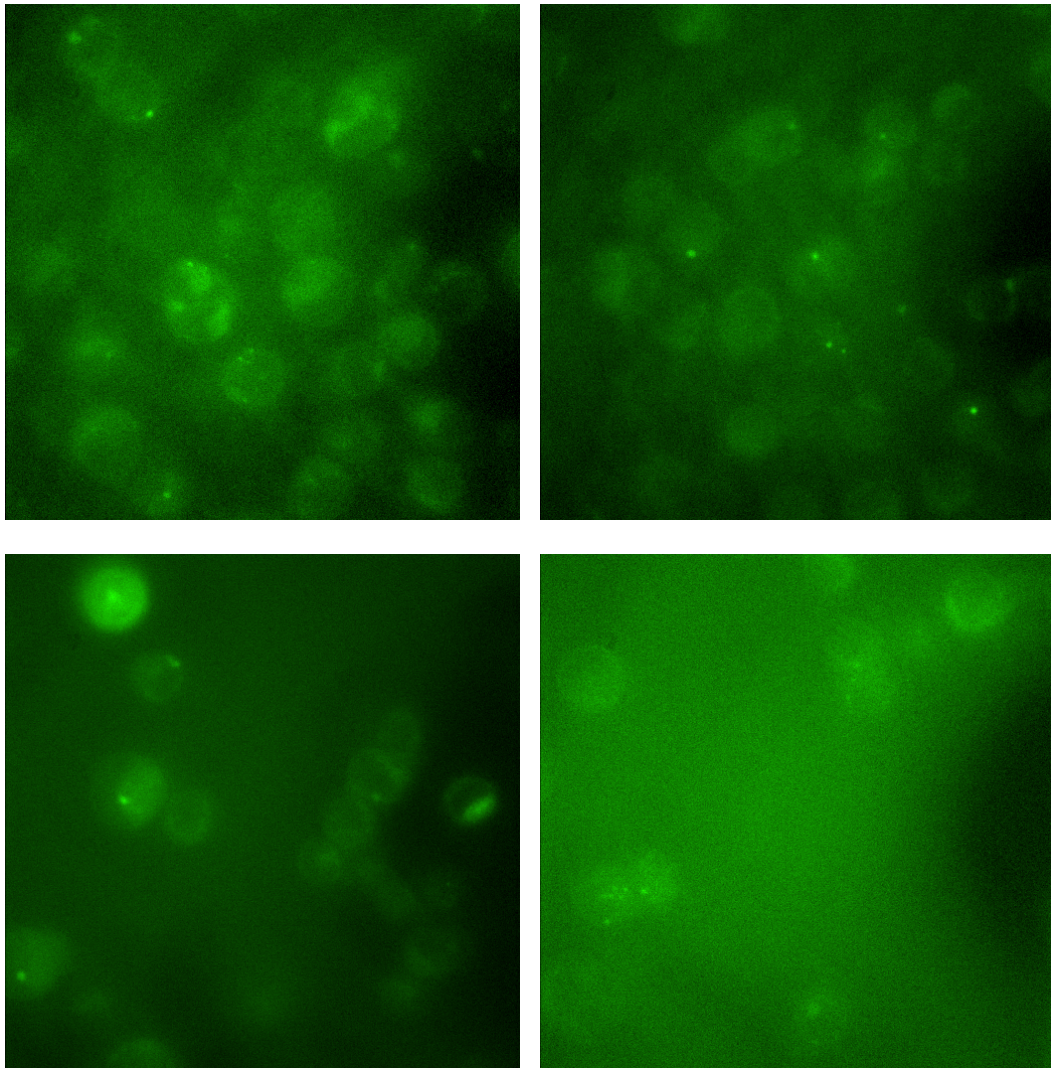


Abbildung 33: CACO-2 Zellen mit Rotaxan **R5** (Glucose)

Es konnte gezeigt werden, dass sich die fluoreszenzmarkierten, zucker-modifizierten Rotaxane an die Zellen angelagert hatten. Qualitativ konnte gezeigt werden, dass Rotaxan **R4** mit Galaktose stärker an RBCs bindet als **R5** mit Glucose. Es konnten ebenfalls Anzeichen für eine Endozytose von Rotaxan **R5** bei den CACO-2 Zellen gefunden werden. Eine weitere Untersuchung wurde nicht mehr durchgeführt und sollte Inhalt weiterer Untersuchungen sein. Dabei sollten dann neben Zuckern vor allem hochspezifische Moleküle für bestimmte Zellen genutzt werden. Durch Kombination



der erfolgreichen Gentransfektion aus Kapitel 7 mit einer potentiellen Erkennung von malignen Zellen, könnte durch das baukastenartige Aufbau-system speziell auf die Anwendung zugeschnittene Rotaxane, durch einfaches Auffädeln in wässriger Lösung, realisiert werden.

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil der Arbeit konnten sowohl die notwendigen Polymere bzw. Polybolaamphiphile als auch die funktionalisierten Cyclodextrine hergestellt werden. Dabei wurden bereits bekannte Polymere synthetisiert aber auch nach neuen Möglichkeiten gesucht. Bei den Cyclodextrinen konnten kationische- und zuckermodifizierte sowie fluoreszenzmarkierte Cyclodextrine hergestellt werden. Hierbei sind insbesondere die monofunktionalisierten  $\alpha$ -CDs zu erwähnen. Es wurde erstmals Mono-(6-amino-6-deoxy)- $\alpha$ -CD durch die Synthese von *N*-Phthalimido- $\alpha$ -CD und dessen Trennung mittels präparativer HPLC in ausreichender Menge verfügbar gemacht. Ausgehend davon konnten dann insbesondere die zuckermodifizierten  $\alpha$ -CDs für die Bindungsexperimente synthetisiert werden.

Es folgten anschließend Kinetikmessungen des Auffädels von  $\alpha$ -CD auf Ionen und N-Oxid. Hierbei konnte die Auffädelcharakteristik aus der Literatur bestätigt werden und aufgrund der gewonnenen Ergebnisse konnte Ionen-11 als das am besten geeignete Polymer zur Bildung der Rotaxane für die Gentransfektion ermittelt werden, da es die höchste Stabilität besitzt.

Der Hauptbestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung der Polyrotaxane in ihrer Anwendung als Gentransfervektoren. Dazu wurden die Rotaxane **R1** und **R2** mit Ionen-11 und PEI als Standard untersucht. Es wurden von den Rotaxanen und Ionen-11 jeweils Polyplexe mit DNA hergestellt und diese mittels DLS, Farbverdrängungsuntersuchung, Gelelektrophorese und AFM charakterisiert und das  $\zeta$ -Potential der Polyplexe bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Polyplexe mit den Rotaxanen und dem Ionen-11 aus dieser Arbeit in der Lage sind geeignete Polyplexe für die Gentransfektion zu bilden.

Besonders erfreulich waren die Ergebnisse bei der eigentlichen Transfektion von Zellen. Hier konnte durch Einschleusen von gWIZLuc-pDNA in die

Zelllinien A549, C2C12 und MCF7 gezeigt werden, dass alle Polyplexe zur Gentransfektion geeignet sind und dass insbesondere **R1** bei allen Zelllinien eine höhere Transfektionsrate als PEI zeigt und vor allem bei den gesunden Zellen C2C12 eine bis zu 80-fach höhere Konzentration von Luciferase gefunden wurde als bei PEI.

In den abschließenden Zellverträglichkeitstest schnitt **R1** ebenfalls am besten ab. Hier konnte für alle Zellen eine Überlebensrate größer als 90% nachgewiesen werden.

Da in allen Tests ein niedrigeres N:P-Verhältnis zur Bildung der Polyplexe im Gegensatz zu PEI notwendig waren und insbesondere bei **R1** die Hauptladung der Aminogruppen an den Cyclodextrinen sitzt, konnte gezeigt werden, dass eine höhere Zellüberlebensrate durch Verwendung von kationischen Cyclodextrinen möglich ist, die durch Auffädeln auf ein Polymer und Bildung eines Rotaxans die kooperativen Effekte gewinnt, die zur Bildung von Polyplexen notwendig sind.

Nach der erfolgreichen Gentransfektion wurde nun die Möglichkeit der Nutzung von Rotaxanen bei der molekularen Erkennung von Zellen untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit den Rotaxanen **R4** und **R5**, die neben BODIPY auch zuckermodifizierte Cyclodextrine trugen. Dabei konnte qualitativ gezeigt werden, dass sich sowohl **R4** (Galactose) als auch **R5** (Glucose) an rote Blutkörperchen (RBC) anlagern, **R4** aber stärker an die RBCs gebunden werden.

Ein Erfolg versprechender Ausblick ist die Kombination beider Effekte, sowohl Gentransfektion als auch molekulare Erkennung von Zellen. Kann beides kombiniert werden, so würde eine neue Möglichkeit der gerichteten Gentransfektion zur Verfügung, die durch das Baukastenprinzip enorm vielseitig wäre.

## 10 Experimenteller Teil

### 10.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin wurde in Pharmaqualität von der Firma Wacker-Chemie erworben. Das Nylon-11 und Nylon-12 als Ausgangsstoffe für die Polymersynthesen wurde freundlicherweise von der Firma Degussa zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Feinchemikalien wurden von den Firmen Merck, Fluka oder Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Lösungsmittel zur Synthese wurden in technischer Reinheit erworben. Absolutierte Lösemittel wurden über gängige Verfahren getrocknet und destilliert bzw. in wasserfreier Form p.a. eingesetzt.

### 10.2 Methoden und Geräte

#### Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die NMR-Spektren wurden mit dem NMR-Spektrometer Avance 500 der Firma Bruker BioSpin GmbH bei Raumtemperatur aufgenommen ( $^1\text{H}$ : 500.00 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125.71 MHz). Als interner Standard dienten jeweils die Resonanzen der nicht vollständig deuterierten Lösungsmitteln ( $\delta_{\text{H}}(\text{DMSO-d}_6) = 2,49 \text{ ppm}$ ,  $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3) = 7,25 \text{ ppm}$ ,  $\delta_{\text{H}}(\text{D}_2\text{O}) = 4,75 \text{ ppm}$ ,  $\delta_{\text{C}}(\text{DMSO-d}_6) = 39,50 \text{ ppm}$ ,  $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3) = 77,00 \text{ ppm}$ ). Für  $^{13}\text{C}$  Spektren wurde Acetonitril als interner zugegeben und das  $\text{CH}_3$ -Signal bei 1,32 ppm herangezogen.

Die NMR-Spektren wurden mit dem SpecManager der Software ACD-Labs Version 7.0 oder Version 12.0 der Firma Advanced Chemistry Development Inc. ausgewertet. Die chemische Verschiebung ist jeweils relativ zu Tetramethylsilan in parts per million (ppm) angegeben. Die Multiplizitäten

in den  $^1\text{H}$ -Spektren wurden gekennzeichnet mit **s** für Singulett, **d** für Duplett, **t** für Triplett und **m** für Multipllett.

### **Infrarotspektroskopie (IR)**

Infrarotspektroskopische Untersuchungen wurden mit dem FT-IR-Spektrometer Tensor 27 der Firma Bruker Optik GmbH als Reflexionspektren mit der GoldenGate-ATR-Technik aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software OPUS 4.2 der Firma Bruker Optik GmbH.

### **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Fertigfolien (ALUGRAM SIL G/UV<sub>254 nm</sub> der Firma Marcherey-Nagel & Co.) durchgeführt. Die Substanzen wurden mit einem Tauchreagenz (Ethanol/Schwefelsäure/ Anisaldehyd 190:2:8 oder Ethanol/Schwefelsäure 98:2) und anschließendem Erwärmen sichtbar gemacht oder durch deren Fluoreszenzlöschung unter der UV-Lampe (254 nm) identifiziert.

### **Massenspektrometrie (MS)**

Die Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer des Typs ZQ 4000 der Firma Waters gemessen. Die Ionisierung erfolgte dabei nach der Electron Spray Ionisationsmethode (ESI+ bzw. ESI-).

### **Gel Permeations Chromatographie (GPC)**

Bei der Gel Permeations Chromatographie wurden die Säulen PSS-Novema 30 und PSS-Novema 300 für kationische Proben verwendet (Eluent: THF mit 1% Triethylamin). Als Pumpe diente eine Waters 515. Injiziert wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  über ein Rheodyne Ventil. Die Proben wurden mit einem Refraktometer der Firma Viskotek LR40 und einem Lichtstreu-

detektor PSS SLD 7000/BI-MwA analysiert. Die Kalibrierung erfolgte mit Pululan-Standards und die Auswertung mit der Software PSS WingPC 7.

### **Ultrafiltration (UF)**

Die Ultrafiltration der Polymere erfolgte in 400 ml UF-Zellen. Zur Reinigung von niedermolekularen Verunreinigungen wurden die methanolischen bzw. wässrigen Lösungen mit dem 5- bis 10-fachen Volumen an Lösungsmittel gegen eine P005F-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa kontinuierlich filtriert.

Zur Reinigung der Rotaxane dienten VivaSpin Zentrifugalkonzentratoren der Firma Sartorius mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa und einem Volumen von 4 bzw. 20 ml. Die Proben wurden jeweils auf ca. 10% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert und anschließend mit Lösungsmittel wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde drei- bis fünfmal wiederholt.

### **Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Zur Aufnahme von AFM-Bildern der DNA-Polymer-Komplexe diente ein Rasterkraftmikroskop der Firma Veeco Instruments, Santa Barbara CA, USA mit einem E-type-Scanner und einem NanoScope IIa oder V controller. Zur Messung in Luft wurde ein Silizium-Cantilever (OMCL-AC160TS, Olympus) mit einer Federkonstanten von 40-52 N m<sup>-1</sup> bei einer Resonanzfrequenz von ca. 250-300 kHz im Tapping-Mode mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel und einer Scangeschwindigkeit von 0,5 bis 1 Hz genutzt. Die topographischen Bilder wurden mit Hilfe der Software Nanoscope v 7.3 oder SPIP v 3.3.6 analysiert.

### **Farbverdrängungsuntersuchung/Fluoreszenzspektroskopie**

Zur Untersuchung der Bindungsstärke zwischen DNA und den Polymeren/Polyrotaxanen wurde CT-DNA (60µg ml<sup>-1</sup>) mit SYBR-Safe™ in HEPES

Puffer versetzt und anschließend durch Zugabe der Probenlösungen die Reduktion der Fluoreszenzintensität mittels Spektrometer bei 530 nm verfolgt.

### **Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

Die Bestimmung der Partikelgrößen bzw. der hydrodynamischen Radien der DNA-Polymer-Komplexe erfolgte mit einem DLS-Gerät Viscotek 802 mit einem internen 50 mW Laser der Wellenlänge 830 nm. Die Partikelgrößen wurden durch Aufnahme des gestreuten Lichtes in einem Winkel von 90° zum einfallenden Laserlichts, unter der Annahme, dass die Partikel sphärisch sind und nicht miteinander interagieren, durch Bestimmung der Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der Stokes-Einstein Funktion berechnet. Die Berechnung erfolgte jeweils durch Messung von drei Proben mit zehn Wiederholungsmessungen.

### **Zeta-Potential ( $\zeta$ )**

Das  $\zeta$ -Potenzial der CT-DNA-Polymer-Komplexe wurde durch den Zetasiizer 2000 der Firma Malvern mit einem 10 mW He-Ne Laser bei einer Wellenlänge von 633 nm, durch Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Proben bei Raumtemperatur bestimmt. Die Proben wurden jeweils fünfmal gemessen und der Mittelwert bestimmt.

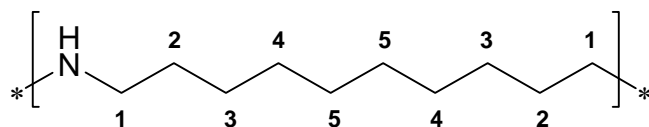
### **Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzanalysen wurden mithilfe eines Eclipse TE 2000-E Mikroskops der Firma Nikon mit einer DCC Kamera, Model 512B der Firma Cascade Photometrics (USA) als Detektor und eines VisiChrome high speed Polychromator System der Firma Visitron Systems als Lichtquelle durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software MetaVue der Firma MDS Analytical Technologies.

## 10.3 Synthesen

### 10.3.1 Synthese wasserlöslicher Polymere

#### Poly(iminodecamethylen) - 1



Es werden 5g Nylon 10 (30 mmol) in 400 ml absolutiertem THF suspendiert und unter Stickstoff und Rückfluß (85°C) erhitzt. Innerhalb 1 h werden 50 ml einer 2 M Lösung  $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$  in THF zugetropft und über Nacht unter Rückfluß gerührt. Es entsteht eine galertartige leicht trübe Masse, die unter Rückfluß 1 Woche gerührt wird. Nach Abkühlen auf RT wird die zähe Masse vorsichtig mit 200 ml Wasser versetzt. Es entsteht unter Gasentwicklung eine feste weiße Masse, die für 3 h gerührt wird. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert. Dann gibt man 200 ml Wasser und 100 ml Eisessig hinzu und rührt unter Rückfluss, bis der Feststoff vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen auf RT wird die leicht milchige Lösung gegen eine P005F Membran in Methanol ultrafiltriert. (Druck: 3-4 bar; Volumen MeOH: 1 l), wobei die Lösung aufklart.

Das Retentat wird zu 1000 ml 15%iger NaOH langsam zugetropft, wobei sich ein feiner weißer Niederschlag bildet. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser dreimal neutral gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,5 g weißes Pulver (54 % der Theorie)

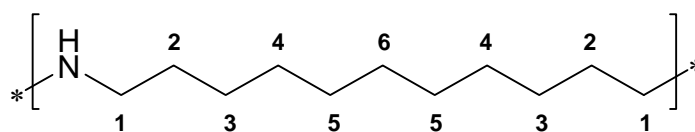
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,21-1,24 (m, 12H, 3-5); 1,6 (t, 4H, 2); 2,88 (t, 4H, 1)

GPC:  $M_w$ : 88.300 Da

$M_n$ : 55.400 Da



### Poly-(iminoundecamethylen)<sup>[82]</sup> -2



Es werden 35g Nylon 11 (191 mmol) in 400 ml absolutiertem THF suspendiert und unter Stickstoff und Rückfluß (85°C) erhitzt. Innerhalb 1 h werden 300 ml einer 2 M Lösung  $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$  in THF zugetropft und über Nacht unter Rückfluß gerührt. Es entsteht eine galertartige leicht trübe Masse, die durch Schütteln zerkleinert, mit weiteren 400 ml THF versetzt und unter Rückfluß über Nacht gerührt wird. Nach Abkühlen auf RT wird die zähe Masse vorsichtig mit 210 ml Wasser versetzt. Es entsteht unter Gasentwicklung eine feste weiße Masse, die zerkleinert und für 3 h gerührt wird. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert. Dann gibt man 300 ml Wasser und 150 ml Eisessig hinzu und rührt unter Rückfluss, bis der Feststoff vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen auf RT wird die leicht milchige Lösung gegen eine P005F Membran in Methanol ultrafiltriert. (Druck: 3-4 bar; Volumen MeOH: 4 l), wobei die Lösung aufklart.

Das Retentat wird zu 1500 ml 15%iger NaOH langsam zugetropft, wobei sich ein feiner weißer Niederschlag bildet. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser dreimal neutral gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 23,38 g weißes Pulver (72 % der Theorie)

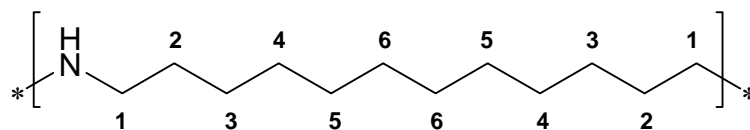
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,25-1,26 (m, 14H, 3, 4, 5, 6); 1,45 (m, 4H, 2); 2,56 (t, 4H, 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 27,43 (2); 29,59 (4, 5, 6); 30,26 (3); 50,20 (1)

GPC:  $M_w$ : 61.600 Da

$M_n$ : 42.900 Da

### Poly-(iminododecamethylen) - 3



Es werden 35,72 g Nylon 12 (181 mmol) in 400 ml absolutiertem THF suspendiert. Unter Stickstoff werden innerhalb 1 h 50 ml einer 10 M Lösung  $\text{BH}_3\text{Me}_2\text{S}$  zugetropft. Anschließend wird über Nacht unter Rückfluß (95°C) erhitzt. Es entsteht eine galertartige leicht trübe Masse, die durch Schütteln zerkleinert, mit weiteren 200 ml THF versetzt und unter Rückfluß 2 Tage gerührt wird. Nach Abkühlen auf RT wird die zähe Masse vorsichtig mit 250 ml Wasser versetzt. Es entsteht unter starker Gas- und Wärmeentwicklung eine feste weiße Masse, die zerkleinert und für 2 h gerührt wird. Anschließend wird das Lösungsmittel abdekantiert und das restliche LM im HV weitgehend entfernt. Dann gibt man 500 ml Wasser und 250 ml Eisessig hinzu und rührt unter Rückfluss, bis der Feststoff vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen auf RT wird die leicht milchige Lösung gegen eine P005F Membran in Methanol ultrafiltriert. (Druck: 4-6 bar; Volumen MeOH: 5 l).

Das Retentat wird zu 2000 ml 15%iger NaOH langsam zugetropft, wobei sich ein feiner weißer Niederschlag bildet. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser dreimal neutral gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

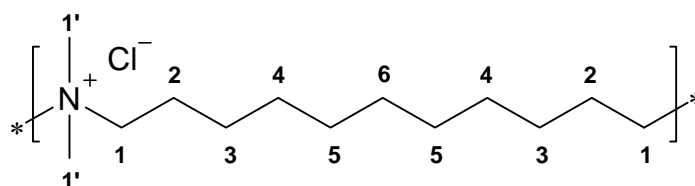
Ausbeute: 20,50 g weißes Pulver (62 % der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,21-1,24 (m, 16H, 3-5); 1,59 (m, 4H, 2); 2,9 (t, 4H, 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{MeOD-}d_4$ ) = 27,38 (2); 27,74(6); 30,37(5); 30,64 (4); 30,75(3);49,04 (1)

GPC:  $M_w$ : 18.300 Da

$M_n$ : 11.500 Da

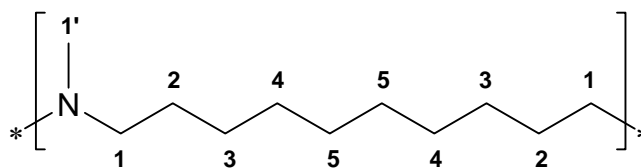
Poly-(N,N-Dimethylammoniumundecamethylenchlorid)<sup>[82]</sup> - 4

1,18 g Poly-(iminoundecamethylen) **2** (6,97 mmol) werden in 80 ml Methanol suspendiert und mit 1,8 g Natriumcarbonat (17,0 mmol) versetzt. Nach dem Zutropfen von 2,7 g Methyljodid (19,0 mmol) wird die Temperatur auf 80°C erhöht und für 24 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird der Feststoff abfiltriert und mit 6 ml konz. Ammoniak versetzt. Anschließend wird mit 2 N HCl neutralisiert und die Lösung gegen eine UF-PES-4H-Membran (3 l Wasser/Methanol 1:1, 3 bar) ultrafiltriert. Dann gibt man 20 ml 1 N HCl hinzu und engt am Rotationsverdampfer ein. Das Produkt wird in Wasser gegen eine UF-C-10 Membran (4 l, 2,5 bar) ultrafiltriert.

Die Lösung wird filtriert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute:	535 mg gelblicher, klebriger Feststoff (33 % d. Theorie)
<sup>1</sup> H-NMR:	δ/ppm (D <sub>2</sub> O) = 1,29-1,34 ( <b>m</b> , 14H, 3,4,5,6); 1,72 ( <b>m</b> , 4H, 2); 3,02 ( <b>s</b> , 6H, 1'); 3,24 ( <b>m</b> , 4H, 1)
<sup>13</sup> C-NMR:	δ/ppm (D <sub>2</sub> O) = 22,26 (2); 25,95 (3); 28,65-28,95 (4,5,6); 50,99 (1'); 64,40 (1)
GPC:	M <sub>w</sub> : 421.900 Da) <sup>1</sup> M <sub>n</sub> : 259.700Da) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>) berechnet aus **6**

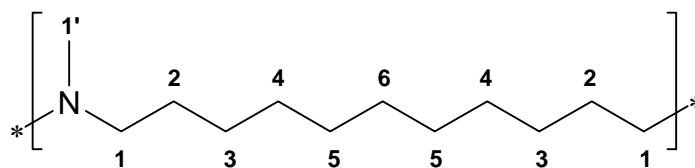
Poly-(*N*-methyl-iminodecamethylen) - 5

2,00 g Poly-(iminodecamethylen) **1** (12,9 mmol) werden unter Rühren bei 60 °C in 50 ml Ameisensäure gelöst. Die klare Lösung wird mit 3 ml Formaldehyd-Lösung (36%) versetzt und 2 Tage bei 80 °C gerührt. Anschließend wird mit Methanol aufgefüllt und gegen eine P005F Membran ultrafiltriert. (Volumen: 2,5 l; Druck: 6 bar)

Das Retentat wird zu 600 ml NH<sub>3</sub>-Lösung (12%) zugetropft. Das Produkt ballt sich zusammen und die Lösung wird abdekantiert. Der klebrige Feststoff wird in Chloroform gelöst und mit Wasser gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute:	1,34g gelblicher gummiartiger Feststoff (61 % d. Th.)
<sup>1</sup> H-NMR:	δ/ppm (CDCl <sub>3</sub> ) = 0,97 ( <b>m</b> , 12H, 3,4,5); 1,14 ( <b>m</b> , 4H, 2); 1,89 ( <b>s</b> , 3H, 1'); 2,01 ( <b>t</b> , 4H, 1)
GPC:	M <sub>w</sub> : 2.600 kDa
	M <sub>n</sub> : 1.100 kDa

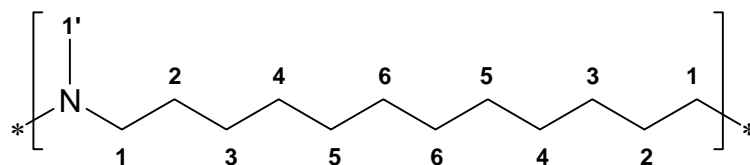
## Poly-(N-methyl-iminoundecamethylen) - 6



9,41g Poly-(iminoundecamethylen) **2** (55,6 mmol) werden unter Rühren bei 60 °C in 180 ml Ameisensäure gelöst. Die klare Lösung wird mit 7 ml Formaldehyd-Lösung (36%; 91,5 mmol) versetzt und 2 Tage bei 80 °C gerührt. Anschließend wird mit Methanol aufgefüllt und gegen eine P005F Membran ultrafiltriert. (Volumen: 2,5 l; Druck: 6 bar)

Das Retentat wird zu 600 ml NH<sub>3</sub>-Lösung (12%) zugetropft. Das Produkt ballt sich zusammen und die Lösung wird abdekantiert. Der klebrige Feststoff wird in Chloroform gelöst und mit Wasser gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute:	7,53 g gelblicher gummiartiger Feststoff (74 % d. Th.)
<sup>1</sup> H-NMR:	δ/ppm (CDCl <sub>3</sub> ) = 1,26 ( <b>m</b> , 14H, 3,4,5,6); 1,44 ( <b>m</b> , 4H, 2); 2,19 ( <b>s</b> , 3H, 1'); 2,28 ( <b>t</b> , 4H, 1)
<sup>13</sup> C-NMR:	δ/ppm (CDCl <sub>3</sub> ) = 27,32 (2); 27,63 (3); 29,56 (4); 29,59 (5); 29,62 (6); 42,32 (1'); 57,96 (1)
GPC:	M <sub>w</sub> : 390.000 Da M <sub>n</sub> : 240.000 Da

**Poly-(N-methyl-iminododecamethylen) - 7**

10,0 g Poly-(iminododecamethylen) **3** (54,6 mmol) werden unter Rühren bei 60 °C in 180 ml Ameisensäure gelöst. Die klare Lösung wird mit 7 ml Formaldehyd-Lösung (36%; 91,5 mmol) versetzt und 2 Tage bei 80 °C gerührt. Anschließend wird mit Methanol aufgefüllt und gegen eine P005F Membran ultrafiltriert. (Volumen: 2,5 l; Druck: 6 bar)

Das Retentat wird zu 600 ml NH<sub>3</sub>-Lösung (12%) zugetropft. Das Produkt ballt sich zusammen und die Lösung wird abdekantiert. Der klebrige Feststoff wird in Chloroform gelöst und mit Wasser gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

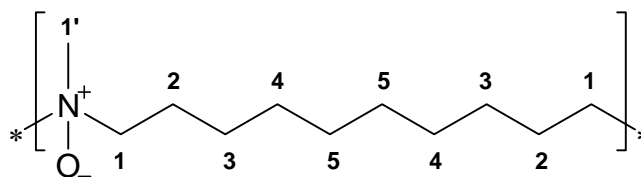
Ausbeute: 7,5 g klebriger farbloser Feststoff (70 % d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,24 (m, 16H, 3,4,5,6); 1,45 (m, 4H, 2); 2,18 (s, 3H, 1'); 2,28 (t, 4H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 27,36 (2); 27,66 (3); 29,59 (4); 29,61 (5); 29,65 (6); 42,35 (1'); 57,98 (1)

GPC: M<sub>w</sub>: 840.000 Da

M<sub>n</sub>: 740.000 Da

Poly-(*N*-methyl-iminodecamethylen-*N*-oxid) - 8

300 mg Poly-(*N*-methyl-iminodecamethylen) **5** werden in 20 ml Chloroform und 20 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) zugegeben und 1 Tag bei RT gerührt. Anschließend werden weitere 8 ml Wasserstoffperoxid zugesetzt und kurz erwärmt. Chloroform und Methanol werden weitgehend abdestilliert. Es wird mit 50 ml Wasser aufgefüllt, wobei sich eine trübe Lösung bildet. (das Polymer ist in der Kälte löslich!) Anschließend wird die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

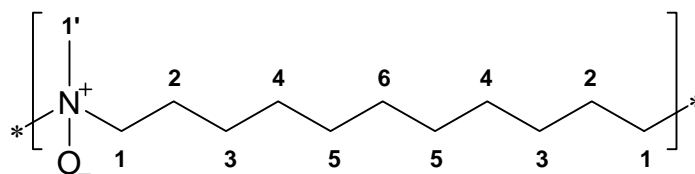
Ausbeute: 320 mg farbloser zäher Feststoff (97% d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (D<sub>2</sub>O) = 1,33 (**m**, 12H, 3,4,5); 1,52 (**m**, 4H, 2); 2,26 (**s**, 3H, 1'); 2,39 (**t**, 4H, 1)

GPC: M<sub>w</sub>: 2.850 kDa)<sup>1</sup>

M<sub>n</sub>: 1.200 kDa)<sup>1</sup>

)<sup>1</sup> berechnet aus **5**

Poly-[(*N*-methyl-iminoundecamethylen)-*N*-Oxid] - 9

350 mg Poly-(*N*-methyl-iminoundecamethylen) **6** (1,91 mmol) werden in 25 ml Chloroform gelöst und mit 2,4 g Wasserstoffperoxid-Harnstoff (7,64 mmol) gelöst in 25 ml Methanol langsam versetzt. Anschließend wird über Nacht bei RT gerührt. Es werden 5 ml Wasserstoffperoxid zugegeben und 2 Tage bei RT gerührt. Dann wird eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (5%) zur Vernichtung des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt und 2 Tage bei RT gerührt. Nach Abfiltrierung des Katalysators wird die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute:

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (MeOD-*d*<sub>4</sub>) = 1,28 (m, 14H, 3,4,5,6); 1,52 (m, 4H, 2); 2,36 (s, 3H, 1'); 2,52 (t, 4H, 1)

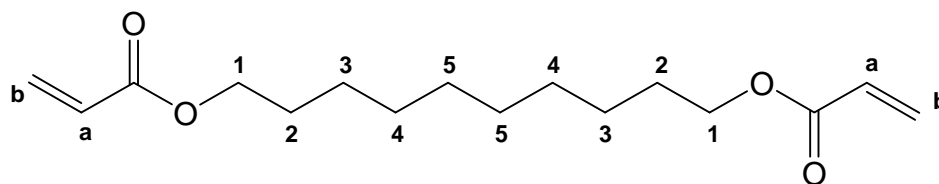
<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (MeOD-*d*<sub>4</sub>) = 27,90 (2); 29,97-30,06 (3-6); 41,59 (1'); 57,75 (1)

GPC: M<sub>w</sub>: 424.000 Da)<sup>1</sup>

M<sub>n</sub>: 260.900Da)<sup>1</sup>

)<sup>1</sup> berechnet aus **6**



1, 10-Decandioldiacrylat<sup>[109]</sup> -10

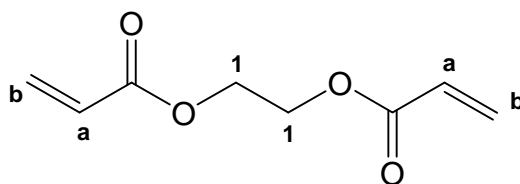
10 g 1,10-Decandiol (57,0 mmol) werden im Hochvakuum vorgetrocknet und in 400 ml absolutiertem THF gelöst. Dazu gibt man 26 g Triethylamin (258 mmol) und kühlt mit einem externen Eisbad. Zu dieser Lösung tropft man unter starkem Rühren 21 g Acrylsäurechlorid (18,6 ml, 230 mmol) in 50 ml abs. THF, so dass die Innentemperatur zwischen 30 und 35°C liegt. Anschließend werden noch 2 h bei RT weitergerührt. Durch Zugabe von Methanol wird überschüssiges Säurechlorid vernichtet. Das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird abgesaugt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel, Hexan/Ethylacetat 15:1).

Ausbeute: 5,97 g farbloses Öl (37 % d. Theorie)

Rf: 0,34 (Hexan/Ethylacetat 15:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,23-1,35 (m, 12H, 3-5); 1,61-1,67 (quint., 4H, 2), (t, 4H, 1); 5,77-5,80+6,35-6,39 (ddd, 4H, b); 6,07-6,12 (dd, 2H, a)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 25,86 (3); 28,58 (2); 29,15 (5); 29,34 (4); 64,63 (1); 128,65 (a), 130,30 (b), 166,26 (C=O)

**Ethylenglycoldiacrylat<sup>[109]</sup> - 11**

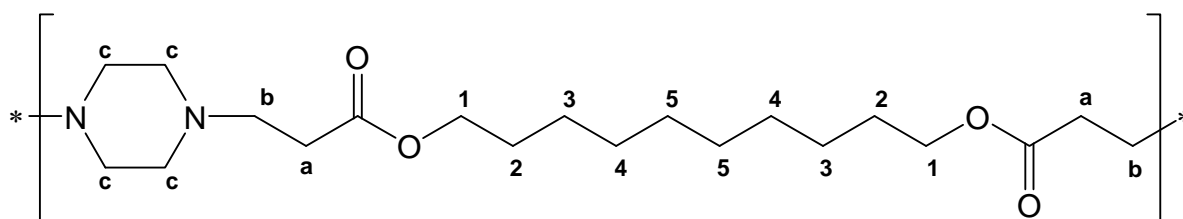
26 g Ethylenglycol p.a. (23,4 ml; 419 mmol), 140 ml Triethylamin (838 mmol) und 0,2 g Pyrogallol werden in 200 ml trockenem Toluol gelöst und auf ca. 5°C gekühlt. Anschließend tropft man 67,8 ml Acrylsäurechlorid (838 mmol) in 80 ml trockenem Toluol innerhalb von 0,5 h zu. Anschließend wird für 0,5 h bei 60°C gerührt. (Besser wäre ein KPG-Rührer, da eine zähe Masse entsteht). Der Niederschlag wird abgesaugt (sehr viel) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das rotgelbe Öl wird destillativ gereinigt (68°C - 71°C; 1 mbar).

Ausbeute: 39,12 g farbloses Öl (55 % der Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 4,32 (s, 4H, 1); 5,77-5,79 (dd, 2H, b-cis); 6,03-6,09 (dd, 2H, a); 6,33-6,36 (dd, 2H, b-trans)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 62,02 (1); 127,80 (a); 131,16 (b); 165,63 (C=O)

**Poly-(1,10-Decandioldiacrylat-*alt*-Piperazin)<sup>[109]</sup> - 12**



0,762 g Piperazin (8,85 mmol) werden in 10 ml trockenem 1,4-Dioxan gelöst (im Ultraschallbad) und mit 2,5 g 1,10-Decandioldiacrylat **10** (8,85 mmol) versetzt. Man läßt unter Stickstoff für 10 Tage bei RT stehen. Anschließend erwärmt man für 4 Wochen bei 50 °C. Die zähe gelbliche Masse wird in 80 ml Chloroform gelöst und langsam unter Rühren in 1,5 l Diethylether getropft. Es bildet sich ein weißer Niederschlag. An der Gefäßwand bildet sich ein zäher Film aus, der nach zwei Tagen rühren ebenfalls erstarrt ist. Der Feststoff wird abgesaugt und im HV getrocknet.

Ausbeute: 2,6 g leicht gelblicher gummiartiger Feststoff (80 % d. Th.)

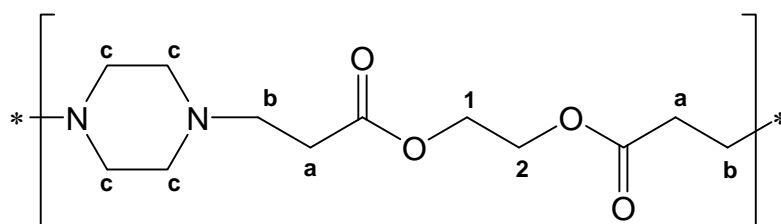
<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,28 (**m**, 12H, 3-5); 1,59-1,62 (**q**, 4H, 2); 2,48-2,51 (**m**, 12H, a,c); 2,68-2,71 (**t**, 4H, b); 4,05-4,07 (**t**, 4H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 25,85 (5); 28,57 (2); 29,18 (4); 29,40 (3); 32,23 (a); 52,71 (b); 53,45 (c); 64,61 (1); 172,48 (C=O)

GPC: M<sub>w</sub>: 25.000 Da

M<sub>n</sub>: 10.000 Da

### Poly-(Etylenglycoldiacrylat-*alt*-Piperazin) - 13



10,12 g Piperazin (118 mmol) werden in 100 ml trockenem 1,4-Dioxan unter erwärmen und schütteln gelöst und mit 20,0 g Ethylenglycoldiacrylat (118 mmol) in einem 250 ml Schraubdeckelglas versetzt und 3 Tage bei 65°C stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wird in 250 ml Chloroform gelöst und langsam unter Rühren in 2 l Diethylether getropft. Der Feststoff wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 19,6 g weißer Festoff (65% d. Th.)

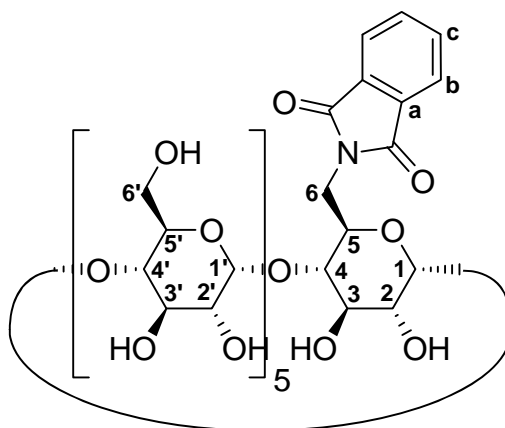
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,42 (**bs**, 8H, c); 2,43-2,46 (**t**, 4H, a); 2,60-2,63 (**t**, 4H, b); 4,21 (**s**, 4H, 1)

GPC:  $M_w$ : 2.800 Da

$M_n$ : 1.600 Da

### 10.3.2 Synthese monofunktionalisierter $\alpha$ -Cyclodextrine

#### Mono-(6-deoxy-6-phthalimido)- $\alpha$ -cyclodextrin - 14



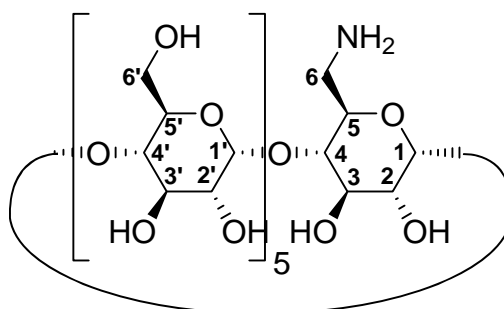
20 g  $\alpha$ -Cyclodextrin (20,56 mmol), 13,5 g Triphenylphosphin (51,4 mmol) und 10,6 g Phthalimid (71,59 mmol) werden in 700 ml wasserfreiem DMF gelöst und 2 h unter Stickstoff bei RT gerührt. Anschließend tropft man 16 ml DEAD-Lösung (40 % Diethylazodicarboxylat in Toluol) (16,11 g; 37 mmol) zu und rührt weitere 4 h. Das Reaktionsgemisch wird zur Trockne eingengt und in 1 l Aceton digeriert. Der weiße Feststoff wird abfiltriert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im HV getrocknet. Rohausbeute dieser Stufe (22,5 g). Anschließend wird mittels präparativer HPLC gereinigt (Lösemittelgradient Ethanol/Wasser von 5% Ethanol nach 95 % Ethanol; Säule trentec Analysetechnik, Reprosil 100, C18, 10 mm 250 x 30 mm)

Ausbeute: 7,00 g weißer Feststoff (31 % d. Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,49-3,74 (**m**, 12H, 2,2',4,4'); 3,82-4,05 (**m**, 24H, 6,6',5,5',3,3'), 5,04-5,05 (**d**, 5H, 1'); 5,18-5,19 (**d**, 1H, 1); 7,90 (**bs**, 4H, b,c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 60,38 (6,6'); 71,81 (2,2'); 72,00(5,5'); 73,38 (3,3'), 81,25 (4,4'); 101,60 (1,1'); 123,47 (c); 131,11 (a); 135,14 (b); 169,97 (C=O)

### Mono-(6-amino-6-deoxy)- $\alpha$ -cyclodextrin - 15



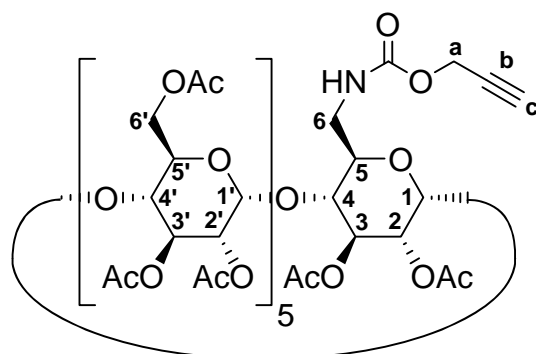
7,00 g Mono-(6-deoxy-6-phthalimido)- $\alpha$ -Cyclodextrin **14** (6,35 mmol) werden in 100 ml Wasser gelöst und mit 3,18 g Hydrazin-Monohydrat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei 60°C 24 h gerührt. Dabei entsteht ein weißer Niederschlag. Nach Abkühlen auf RT wird der NS abfiltriert und die Lösung in 1800 ml Aceton getropft. Der dabei anfallende Niederschlag wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,15 g weißer Feststoff (83% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,55-3,64 (**m**, 12H, 2,2',4,4'); 3,82-3,98 (**m**, 24H, 6,6',5,5',3,3'); 5,04 (**d**, 5H, 1'); 5,06-5,07(**d**, 1H, 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 59,08 (6'); 59,13 (6); 70,26 (2); 70,37 (2'); 70,71 (5,5'); 71,90 (3); 72,00 (3'); 79,92 (4'); 80,01 (4); 99,92 (1); 100,10 (1')

**Propargyl-*N***[Mono-(6-deoxy-6-amino)- $\alpha$ -Cyclodextrin]-carbamat-  
heptadecaacetat - 16



1 g **15** (1,03 mmol) werden in 20 ml DMF gelöst und mit 104 mg Triethylamin (1,03 mmol) und 13 mg DMAP (103  $\mu$ mol) versetzt. Anschließend werden 134 mg Propargylchlorformiat (1,13 mmol) zugegeben und 3 Tage bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Hochvakuum getrocknet, mit 30 ml Pyridin und 40 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 2 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf 200 ml Eiswasser gegossen und dreimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 2 M HCl, mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wird säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel; Eluent: Ethylacetat; R<sub>f</sub> 0,22)

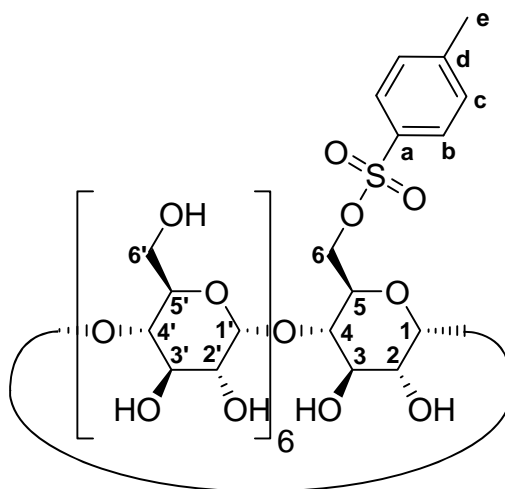
Ausbeute: 1,49 g weißer Feststoff (82 % d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,03-2,19 (m, 51H, OAc); 2,48 (t, 1H, c); 3,70-3,87 (m, 6H, 2,2'); 4,11-4,24 (dd, 2H, a); 4,31-4,51 (m, 6H, 4,4'); 4,70-4,80 (m, 6H, 5,5'); 5,06-5,09 (m, 5H, 1'); 5,16 (d, 1H, 1); 5,44-5,59 (m, 6H, 3,3')

MS:  $m/z$  (MeCN) = 1790,0 [M+Na]<sup>+</sup>

### 10.3.3 Synthese monofunktionalisierter $\beta$ -Cyclodextrine

#### Mono-[6-deoxy-6-(p-toluolsulfonyl)]- $\beta$ -cyclodextrin<sup>[61]</sup> - 17



170,25 g  $\beta$ -Cyclodextrin (150 mmol) werden in 7,5 l Wasser gelöst und mit 112,5 g  $\text{CuSO}_4$  (450,6 mmol, gelöst in 7,5 l Wasser) versetzt. Dabei klart die Lösung auf. Anschließend wird mit 150 g  $\text{NaOH}$  (3,75 mmol, gelöst in 7,5 l Wasser) versetzt. Zur dunkelblauen Lösung werden 225 g p-Toluolsulfonsäurechlorid (1,18 mol, gelöst in 1,5 l Acetonitril) langsam zugetropft und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Beim Eintropfen bildet sich ein Niederschlag, der durch Rühren wieder in Lösung geht. Anschließend wird mit 2 M  $\text{HCl}$  neutralisiert und der hellblaue Niederschlag abgesaugt. Der Niederschlag wird verworfen und das Filtrat zum Ausfällen im Kühlschrank aufbewahrt.

Der leicht bläuliche Niederschlag wird abgesaugt und aus 250 ml einer 10 mM EDTA-Lösung umkristallisiert und der weiße Rückstand gefriergetrocknet.

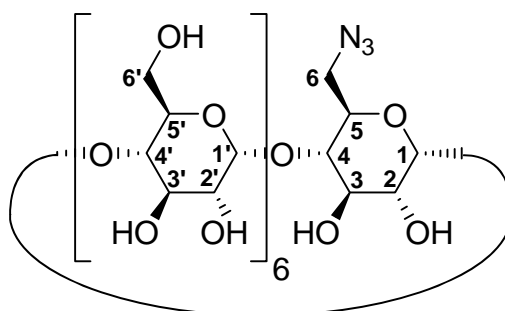
Ausbeute: 14 g (7,25 % der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) = 2,42 (s, 3H, e); 3,19-3,42 (m, 14 H, 2, 2', 4, 4'); 3,50-3,67 (m, 28 H, 3, 3', 5, 5', 6, 6'); 4,16-4,46



(**m**, 6H, 6-OH); 4,76 (**s**, 1H, 1); 4,83 (**m**, 6H, 1'); 5,60-5,80  
(**m**, 14H, 2-, 2'-, 3-, 3'-OH); 7,42 (**d**, 2H, c); 7,74 (**d**, 2H, b)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 21,17 (e); 59,79 (6); 59,92 (6'); 72,00  
(5, 5'); 72,44 (2, 2'); 73,08 (3, 3'); 81,51 (4, 4'); 101,94 (1,  
1'); 127,53 (c); 129,84 (b); 132,68 (d); 144,76 (a)

**Mono-(6-azido-6-deoxy)- $\beta$ -cyclodextrin<sup>[55]</sup> - 18**


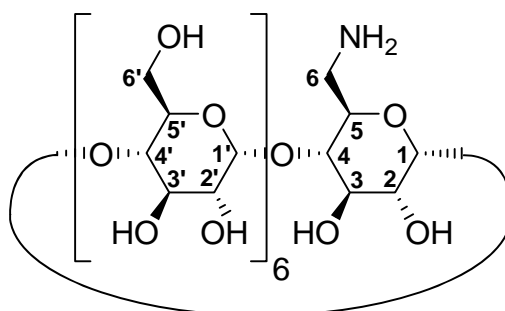
3,30 g **17** (2,56 mmol) und 3,00 g Natriumazid (46,1 mmol) werden in jeweils 25 ml Wasser suspendiert bzw. gelöst und anschließend gemischt. Die gelbe Suspension wird 4 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wird im Eisbad rasch abgekühlt und mit 50 ml Aceton versetzt. Man läßt 24 h bei RT auskristallisieren. Der entstandene weiße Niederschlag wird abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,06 g weißer Feststoff (70% der Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 3,25-3,37 (m, 14 H, 2, 2', 4, 4'); 3,53-3,77 (m, 28 H, 3, 3', 5, 5', 6, 6'); 4,35-4,60 (m, 6H, 6-OH); 4,82 (d, 6H, 1'); 4,86 (d, 1H); 5,60-5,80 (m, 14H, 2-, 2'-, 3-, 3'-OH)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 59,76 (6'); 59,91 (6); 71,95 (5, 5'); 72,36 (2, 2'); 73,01 (3, 3'); 81,52 (4, 4'); 101,43 (1); 101,94 (1')

IR:  $\nu$ /cm<sup>-1</sup> = 3299 (s, O-H); 2923 (m, C-H); 2102 (m, C-N<sub>3</sub>); 1151 (m, C-O); 1021 (s, C-O)

**Mono-(6-amino-6-deoxy)- $\beta$ -cyclodextrin<sup>[55]</sup> - 19**


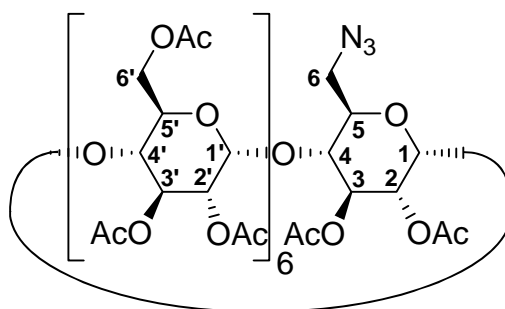
1000 mg **18** (862  $\mu\text{mol}$ ) werden in 40 ml DMF gelöst und mit 900 mg Triphenylphosphin (3,00 mmol) versetzt. Anschließend gibt man 8 ml konz. Ammoniumhydroxid-Lösung hinzu (Gasentwicklung) und rührt über Nacht bei RT. Danach wird das Lösungsmittel vollständig entfernt und der weiße Rückstand über Nacht mit 100 ml Wasser digeriert. Der weiße Feststoff aus Triphenylphosphinoxid wird abgesaugt und das Filtrat gefriergetrocknet.

Ausbeute: 977 mg weißer Feststoff (100 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) = 3,20-3,44 (m, 14H, 2,2',4,4'); 3,45-3,73 (m, 28H, 3,3',5,5',6,6'); 4,37-4,50 (m, 6H, 6-OH); 4,82-4,83 (d, 6H, 1'); 4,89-4,90 (d, 1H, 1); 5,59-5,82 (m, 14H, 2-,2'-,3-,3'-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) = 59,70 (6,6'); 71,68 (5,5'); 72,20 (2,2'); 72,83 (3,3'); 81,33 (4,4'); 101,51 (1); 101,76 (1')

IR:  $\nu/\text{cm}^{-1}$  = 1024, 1152 (s, C-O); 1366 (w); 1654 (w, N-H); 2925 (m, C-H); 3290 (s, O-H)

**Mono-(6-azido-6-deoxy)- $\beta$ -cyclodextrin-icosaacetat<sup>[110]</sup> -20**


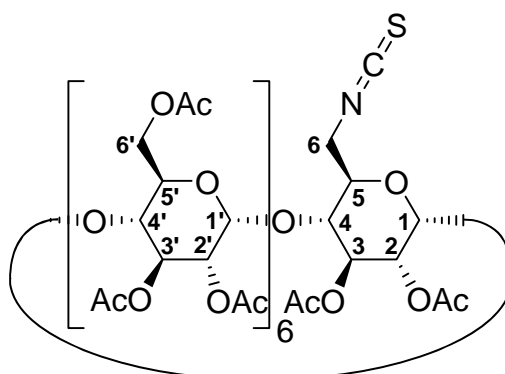
1 g **18** (0,86 mmol) wird in 30 ml Pyridin gelöst und mit 30 ml Acetanhydrid versetzt. Man rührt über Nacht bei RT. Nach DC Kontrolle (EE/EtOH/H<sub>2</sub>O 45:5:3) zeigt sich, dass die Acetylierung noch nicht vollständig ist. Man fügt weitere 20 ml Acetanhydrid zu und rührt erneut 2 Tage bei RT. Anschließend gießt man auf 250 ml Eis und extrahiert dreimal mit 60 ml Dichlormethan. Danach wird zweimal mit je 100 ml 2 N HCl und dann mit 100 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutral gewaschen. Die org. Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Dichlormethan am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,58 g weißer Feststoff (92 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 1,99-2,07 (m, 60 H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,57-3,78 (m, 2H, 6); 3,80-3,89 (m, 7H, 4, 4'); 3,97-4,14 (m, 7H, 5, 5'); 4,18-4,44 (m, 12H, 6'); 4,65-4,75 (m, 7H, 2, 2'); 4,95-5,13 (m, 7H, 3, 3'); 5,17-5,26 (m, 7H, 1, 1')

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 20,33-20,51 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 50,31 (6); 62,36 (6'); 69,38 (5, 5'); 70,00 (2, 2'); 70,68 (3, 3'); 76,55 (4, 4'); 96,68 (1, 1'); 169,31-170,02 (Acetyl-C=O)

IR:  $\nu$ /cm<sup>-1</sup> = 1024 (s, C-O); 1213 (s, CO-OR); 1368 (m, CO-OR); 1737 (s, C=O); 2105 (w, C-N<sub>3</sub>)

Mono-(6-deoxy-6-isothiocyanato)- $\beta$ -cyclodextrin-icosacetat - 21

1,50 g **20** (750  $\mu$ mol), 3,6 ml (60 mmol) Schwefelkohlenstoff und 1,0 ml (6 mmol) Triethylphosphit werden in 25 ml wasserfreiem Toluol gelöst und für 16 h bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen wird über Nacht bei RT weitergerührt. Anschließend fügt man 120 ml Wasser hinzu und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit je 120 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das gelbe Öl im HV getrocknet. Der gelbliche Feststoff (roh: 1,633 g) wird säulenchromatographisch (Kieselgel, Ethylacetat) gereinigt wird.

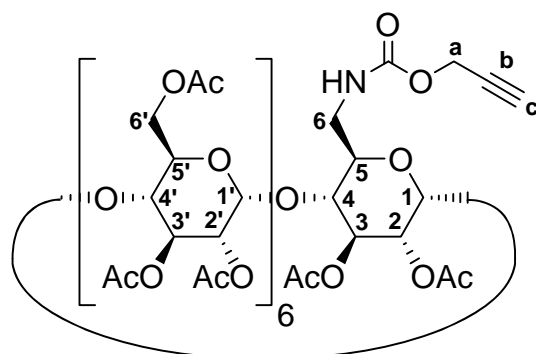
Ausbeute: 783 mg weißer Feststoff (52 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 1,99-2,06 (m, 60 H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,57-3,77 (m, 2H, 6); 3,81-3,90 (m, 7H, 4, 4'); 3,96-4,12 (m, 7H, 5, 5'); 4,18-4,45 (m, 12H, 6'); 4,66-4,75 (m, 7H, 2, 2'); 4,95-5,13 (m, 7H, 3, 3'); 5,17-5,26 (m, 7H, 1, 1')

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>) = 20,3-20,5 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 50,3 (6); 62,3 (6'); 69,4 (5, 5'); 70,0 (2, 2'); 70,7 (3, 3'); 76,6 (4, 4'); 96,7 (1, 1'); 134,4 (NCS); 169,3 (Acetyl-C=O); 170,0 (Acetyl-C=O)

MS: *m/z* (MeOH/CHCl<sub>3</sub>) = 2016,57 [M+H]<sup>+</sup>, 2038,63 [M+Na]<sup>+</sup>

**Propargyl-*N*-[Mono-(6-deoxy-6-amino)- $\beta$ -Cyclodextrin]-carbamat-  
icosaacetat- 22**



160 mg **19** (141  $\mu\text{mol}$ ) werden in 2 ml DMF gelöst und mit 14,3 mg Triethylamin (141  $\mu\text{mol}$ ) und 1,7 mg DMAP (14  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Anschließend werden 18,4 mg Propargylchlorformiat (155  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben und 3 Tage bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Hochvakuum getrocknet, mit 5 ml Pyridin und 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 2 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf 50 ml Eiswasser gegossen und dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit 1 M HCl, zweimal mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wird säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel; Eluent: Ethylacetat;  $R_f$  0,22)

Ausbeute: 175 mg weißer Feststoff (60 % d. Th.)

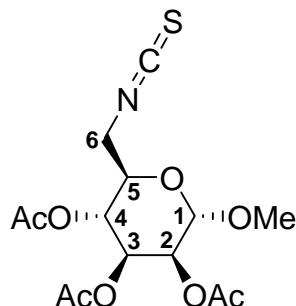
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,05-2,14 (m, 60H, OAc), 2,52-2,53 (t, 1H, c); 3,68-3,79 (m, 7H, 2,2'); 4,05-4,39 (m, 28H, 3,3',4,4',6,6'); 4,70-4,73(dd, 2H, a); 4,73-4,85 (m, 7H, 5,5'); 5,01-5,02 (d,1H, 1); 5,07-5,14 (m, 6H, 1')

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,76-21,03 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 60,38 - 62,69 (6,a,c); 69,65-71,08 (2,3,4,5); 96,80 (b); 100,00 (1); 138,74 (7); 169,30-170,64 (Acetyl-C=O)

MS:  $m/z$  (MeOH) = 2056,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 2078,5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

### 10.3.4 Synthese funktionalisierter Zucker

#### 1-Methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- $\alpha$ -D-mannopyranosid<sup>[111]</sup> - 23



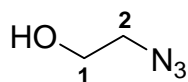
1,45 g (4,20 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-azido-6-desoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosid, 10,0 ml (166 mmol) Schwefelkohlenstoff und 2,88 ml (16,8 mmol) Triethylphosphit werden in 25 ml wasserfreiem Toluol gelöst und für 16 h bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen wird über Nacht bei RT weitergerührt. Anschließend fügt man 120 ml Wasser hinzu und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit je 120 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das leicht gelbliche Öl im HV getrocknet. Nach Entfernen des Solvens erhält man einen gelblichen Feststoff (1,4212g), der säulenchromatographisch (Kieselgel, Toluol/Ethylacetat 5 : 1) gereinigt wird und erhält das Produkt als weißen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 1,12 g weißer Festoff (74 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,97-2,13 (3s, 9H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,42 (s, 3H, Methoxy-CH<sub>3</sub>); 3,62 (d, 2H, 6); 3,95 (m, 1H, 5); 4,75 (d, 1H, 1); 5,20 (t, 1H, 4); 5,23 (dd, 1H, 2); 5,35 (dd, 1H, 3),

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,5-20,7 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 46,0 (6); 55,6 (OMe); 67,1 (4); 68,4 (5); 69,1 (2); 69,9 (3); 98,4 (1); 134,1 (NCS); 169,6-169,9 (C=O)

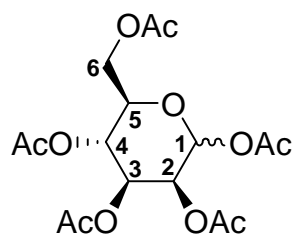


**2-Azidoethanol - 24**

30,24 g 2-Chlorethanol (25,2 ml, 375 mmol) werden zu einer Lösung von 30 g Natriumazid (461 mmol) und 1,5 g Natriumhydroxid (37,5 mmol) in 120 ml Wasser zugegetropft. Die Reaktionslösung wird 3 Tage bei RT gerührt. Die gelbe Lösung wird mit 35 g Natriumsulfat versetzt, 2 h bei RT gerührt, anschließend abdekantiert und 3 mal mit je 70 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Die gelbe Flüssigkeit wird anschließend bei 78-80°C bei 34 mbar destilliert.

Ausbeute: 23 g farblose Flüssigkeit (70% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,78 (s, 1H, OH); 3,38-3,40 (t, 2H,2); 3,72-3,74 (t, 2H, 1)

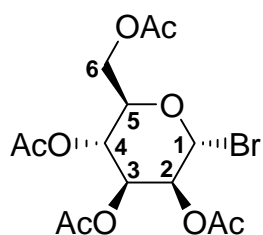
**Mannose-pentaacetat<sup>[112]</sup> - 25**

23,3 g Mannose werden in 150 ml Pyridin suspensiert, mit 200 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 1 Tag bei RT gerührt. Der Ansatz wird auf 400 ml Eiswasser gegossen und zweimal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit 2 M HCl, anschließend mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im HV getrocknet.

Ausbeute : 49,7 g weißer Feststoff (98% d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,01, 2,05, 2,09, 2,17, 2,18 (5s, 15H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 4,03-4,07 (m, 1H, 5); 4,09-4,30 (2 dd, 2H, 6); 5,26-5,36 (m, 3H, 2,3,4), 6,09 (d, 1H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,50, 20,59, 20,62, 20,73, 20,82 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 62,09(6); 65,54, 68,32, 68,72 (2,3,4); 70,60 (5); 90,59 (1); 168,01, 169,48, 169,69, 169,94, 170,59 (C=O)

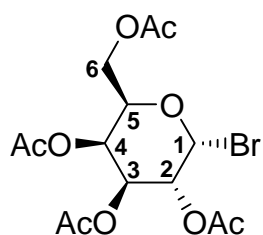
**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -mannopyranosylbromid<sup>[112]</sup> - 26**

10,0 g **25** werden mit 50 ml HBr-HOAc versetzt und 1h bei RT gerührt. Anschließend gießt man die Reaktionslösung auf 500 ml Eiswasser und extrahiert zweimal mit 150 ml Dichlormethan. Die org. Phase wird anschließend mit 500 ml Wasser, 500 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und erneut mit 500 ml Wasser gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 9,94 g gelbliches hochviskoses Öl (94 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,01, 2,08, 2,11, 2,18 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 4,12-4,16 (dd, 1H, 6a), 4,20-4,25 (m, 1H, 5); 4,31-4,35 (dd, 1H, 6b); 5,35-5,40 (pseudo-t, 1H, 4); 5,44-5,46 (dd, 1H, 2); 5,70-5,74 (dd, 1H, 3); 6,30 (d, 1H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,54, 20,61, 20,64, 20,73 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 61,44 (6); 65,31 (4); 67,92 (3); 72,14 (2); 72,83 (5); 83,04 (1); 169,51, 169,53, 169,64, 170,46 (C=O)

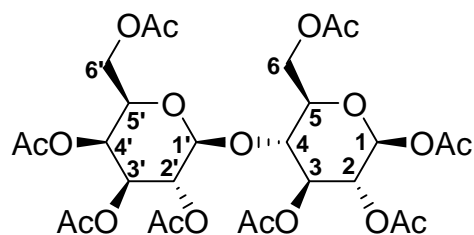
**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -galactopyranosylbromid<sup>[113]</sup> - 27**

15 g Galactose-pentaacetat werden mit 80 ml HBr-HOAc versetzt und 1h bei RT gerührt. Anschließend gießt man die Reaktionslösung auf 500 ml Eiswasser und extrahiert zweimal mit 200 ml Dichlormethan. Die org. Phase wird anschließend mit 1000 ml Wasser und zweimal mit je 500 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 15,11 g weißer Feststoff (96 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,02, 2,06, 2,12, 2,15 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 4,09 – 4,21 (m, 2H, 6); 4,47-4,51 (t, 1H, 5); 5,03-5,07 (dd, 1H, 2); 5,39-5,43 (dd, 1H, 3); 5,52-5,53 (dd, 1H, 4); 6,70-6,71 (d, 1H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,51, 20,54, 20,59, 20,70 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 60,79 (6); 66,96 (4); 67,75 (2); 67,97 (3); 71,04 (5); 88,10 (1); 169,71, 169,85, 170,02, 170,27 (C=O)

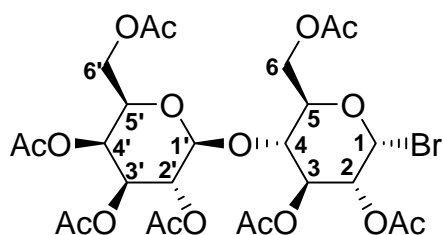
**Lactose-oktaacetat<sup>[113]</sup> - 28**

100 g Lactose werden in 350 ml Pyridin suspendiert und mit 400 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 2 Tagen werden weitere 200 ml Acetanhydrid zugegeben und 5 Tage bei RT gerührt. Nachdem sich eine leicht bräunliche Lösung gebildet hat, wird am Rotationsverdampfer auf 400 ml eingengt. Anschließend gießt man die Lösung auf 1500 ml Eiswasser und extrahiert mit dreimal 150 ml Chloroform. Die vereinigten org. Phasen werden mit 500 ml 2 M HCl und 700 ml Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 198 g weißer Feststoff (99% d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,69, 2,03, 2,04, 2,05, 2,07, 2,09, 2,12, 2,15 (8s, 24H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,74-4,17 (m, 3H, 4, 5, 5'); 4,43-4,50 (m, 4H, 6, 6'); 4,93-5,14 (m, 4H, 1', 2, 2', 4'); 5,22-5,26 (dd, 1H, 3); 5,44-5,48 (dd, 1H, 3'); 5,66-5,68 (d, 1H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,9-20,5 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 60,8, 61,5 (6, 6'); 66,6, 69,2, 69,4, 69,6 (2, 3, 4, 2', 3', 4'), 71,0, 75,8 (5, 5'); 88,9 (1'); 101,2 (1); 168,8-170,5 (C=O)

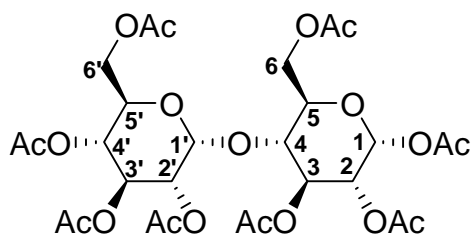
**2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-acetyl- $\alpha$ -lactopyranosylbromid<sup>[114]</sup> - 29**


5 g **28** werden mit 20 ml HBr-HOAc versetzt und eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend gießt man die Reaktionslösung auf 300 ml Eiswasser und extrahiert zweimal mit 100 ml Chloroform/Diethylether 1:1. Die org. Phase wird anschließend mit 200 ml Wasser, 200 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und erneut mit 200 ml Wasser gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 4,73 g weißer Feststoff (92 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,98-2,10 (7s, 21H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 4,08-4,24 (m, 4H, 6, 6'); 4,49-4,53 (m, 2H, 5, 5'); 4,77-5,13 (m, 3H, 2, 2', 4'); 4,97 (dd, 1H, 4), 5,13 (dd, 1H, 3'); 5,36 (d, 1H, 1); 5,57 (d, 1H, 3); 6,54 (d, 1H, 1')

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,54-20,85 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 60,84+61,06 (6,6'); 66,62, 69,04, 69,62, 70,81, 70,89, 71,02, 72,98, 75,00 (2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'); 86,40 (1); 100,85 (1'); 168,98 – 170,38 (C=O)

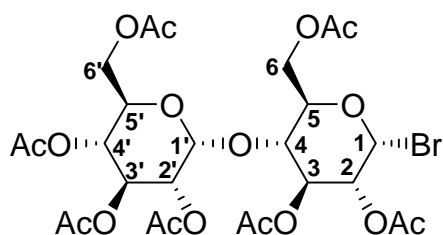
**Maltose-oktaacetat<sup>[115]</sup> - 30**

20,43 g Maltose werden in 150 ml Pyridin suspensiert, mit 200 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 1 Tag bei RT gerührt. Der Ansatz wird auf 400 ml Eiswasser gegossen und zweimal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit 2 M HCl, anschließend mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im HV getrocknet.

Ausbeute : 38,87 g weißer Feststoff (95% d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,00-2,13 (8s, 24H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,81-3,85+3,92-3,96 (2m, 2H, 5, 5'); 4,01-4,06+4,20-4,25 (2m, 4H, 6, 6'); 4,43-4,47+4,84-5,08+5,27-5,37 (m, 6H, 2, 2', 3, 3', 4, 4'), 5,39-5,40 (d, 1H, 1'); 5,73-5,75 (d, 1H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,49-20,82 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 61,43, 62,50 (6, 6'); 67,94, 68,56, 69,27, 69,98, 70,91, 72,44, 72,98, 75,20 (2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'); 91,24, 95,69 (1, 1'); 168,75, 169,39, 169,54, 169,82, 170,00, 170,37, 170,44, 170,51 (C=O)

**2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-acetyl- $\alpha$ -maltopyranosylbromid<sup>[116]</sup> - 31**

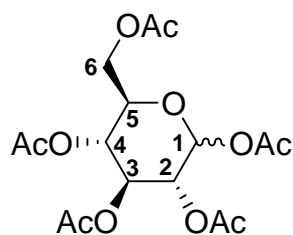
10 g **30** werden mit 40 ml HBr-HOAc versetzt und eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend gießt man die Reaktionslösung auf 400 ml Eiswasser und extrahiert zweimal mit 200 ml Dichlormethan. Die org. Phase wird anschließend mit 500 ml Wasser, 500 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und erneut mit 500 ml Wasser gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 9,72 g weißer Feststoff (94 % d. Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,01-2,15 (7s, 21H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,93-3,97+4,04-4,15 (2m, 2H, 5, 5'); 4,23-5,35 (m, 4H, 6, 6'); 4,50-4,54 (d, 1H, 1); 5,05-5,18 (2t, 2H, 2, 2'); 5,35- 5,42 (2t, 2H, 4, 4'); 5,53-5,63 (2t, 2H, 3, 3'); 6,50-6,51 (d, 1H, 1');

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,50, 20,54, 20,59, 20,61, 20,63, 20,73, 20,81 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 60,92, 61,32 (6, 6'); 67,15, 67,91, 68,62, 69,23, 70,57, 70,99, 72,32, 72,52 (2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'); 86,03 (1'); 95,76 (1); 169,38-170,63 (C=O)



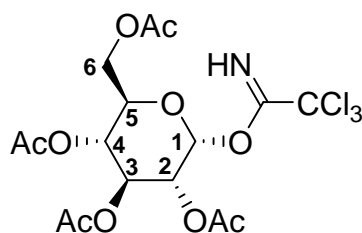
Glucose-pentaacetat<sup>[117]</sup> - 32

10,0 g Glucose werden in 150 ml Pyridin suspensiert, mit 200 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 1 Tag bei RT gerührt. Der Ansatz wird auf 400 ml Eiswasser gegossen und zweimal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit 2 M HCl, anschließend mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im HV getrocknet.

Ausbeute : 20,5 g weißer Feststoff (95% d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,02, 2,03, 2,04, 2,09, 2,18 (5s, 15H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 4,08-4,31 (m, 3H, 5,6); 5,08-5,50 (m, 2H, 2,3); 6,33 (d, 1H, 1)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,40, 20,52, 20,62, 20,65, 20,83 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 61,43 (6); 67,88, 69,17, 69,80, 69,81 (2,3,4,5); 89,05 (1); 168,70, 169,34, 169,61, 170,18, 170,58 (C=O)

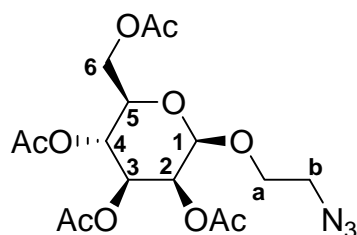
**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- $\alpha$ -glucopyranose<sup>[68]</sup>- 33**


4,32 g 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl glucopyranose (12,4 mmol) werden in 50 ml trockenem Dichlormethan gelöst und unter Stickstoff mit 12,5 ml Trichloracetoneitril (17,91 g; 124 mmol) und 4,45 g Cäsiumcarbonat (13,6 mmol) versetzt. Es wird 2 h bei RT gerührt und nach DC Kontrolle (EE/Hexan 1:1) die Reaktionsmischung über Celithe abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute : 6,1 g weißer Feststoff (99% d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,99-2,06 (4s, 12H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 4,07-4,12 (m, 1H, 6a); 4,18 (m, 1H, 5); 4,25 (dd, 1H, 6b); 5,11 (dd, 1H, 2); 5,14 (t, 1H, 4); 5,52 (t, 1H, 3); 6,53 (d, 1H, 1); 8,67 (s, 1H, NH)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,65-20,87 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 61,55 (6); 67,95, 69,90,70,05, 70,19 (2, 3, 4, 5); 90,86 (CCl<sub>3</sub>); 93,08 (1); 160,97 (C=NH<sub>2</sub>); 169,70-170,76 (C=O)

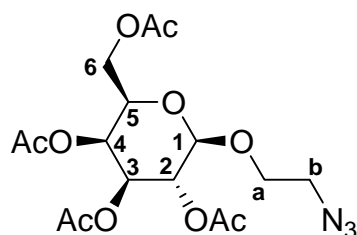
2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(2-azidoethyl)- $\beta$ -mannopyranose - 34

1,8 g gepulvertes Molsieb, 1,52 g  $\text{HgCN}_2$  (6 mmol) und 2,16 g  $\text{HgBr}_2$  (6 mmol) werden unter Stickstoff mit 15 ml trockenem Acetonitril versetzt. Zur Suspension gibt man 1,05 g 2-Azidoethanol (12 mmol) und rührt 1 h bei RT. Anschließend werden 4,1 g **26** (10 mmol) gelöst in 15 ml trockenem Acetonitril langsam zugetropft und 72 h gerührt. Anschließend wird über Celithe abfiltriert und mit 250 ml Chlorform nachgespült. Das Filtrat wird mit 400 ml Wasser und zweimal mit je 300 ml einer 1 M NaI Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der gelbe Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Toluol/EE 3:1;  $R_f=0,29$ ).

Ausbeute: 2,14 g weißer Feststoff (52 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,99, 2,05, 2,10, 2,16 (4s, 12H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,41-3,53 (m, 2H, b); 3,65-3,70 + 3,84-3,90 (2m, 2H, a); 4,02-4,07 (m, 1H, 5); 4,11-4,31 (ddd, 2H, 6); 4,87 (d, 1H, 1); 5,27 -5,38 (m, 3H, 2, 3, 4)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,60, 20,65, 20,68, 20,81 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 50,32 (b); 62,42 (6); 65,98 (4); 67,00 (a); 68,81 (3); 68,83 (5); 69,36 (2); 97,71 (1); 169,69, 169,74, 169,94, 170,55 (C=O)

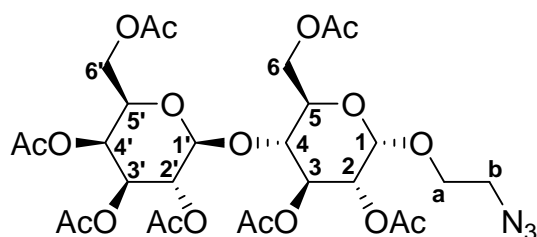
2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(2-azidoethyl)- $\beta$ -galactopyranose - 35

1,8 g gepulvertes Molsieb, 1,52 g  $\text{HgCN}_2$  (6 mmol) und 2,16 g  $\text{HgBr}_2$  (6 mmol) werden unter Stickstoff mit 15 ml trockenem Acetonitril versetzt. Zur Suspension gibts man 1,05 g 2-Azidoethanol (12 mmol) und rührt 1 h bei RT. Anschließend werden 4,1 g **27** (10 mmol) gelöst in 15 ml trockenem Acetonitril langsam zugetropft und 48 h gerührt. Anschließend wird mit 20 ml Chloroform versetzt über Celithe abfiltriert und mit 200 ml Chloroform nachgespült. Das Filtrat wird mit 400 ml Wasser, zweimal mit je 300 ml einer 1 M NaI Lösung und erneut mit 200 ml Wasser gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der gelbe Rückstand (4,19 g) wird im Hochvakuum getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Toluol/EE 2:1;  $R_f=0,37$ ).

Ausbeute: 2,79 g weißer Feststoff (67 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,98, 2,04, 2,06, 2,15 (4s, 12H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,27-3,32 + 3,46-3,53 (2m, 2H, b); 3,66-3,72 + 4,01-4,06 (2m, 2H, a); 3,90-3,94 (m, 1H, 5); 4,10-4,20 (m, 2H, 6); 4,55-4,57 (d, 1H, 1); 5,00-5,04 (dd, 1H, 3); 5,21-5,26 (dd, 1H, 2); 5,38-5,40 (dd, 1H, 4);

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,48, 20,57, 20,58, 20,68 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 50,50 (b); 61,20 (6); 66,96 (4); 68,29 (a); 68,49 (2); 70,77 (5); 70,84 (3); 101,08 (1); 169,38, 170,05, 170,14, 170,28 (C=O)

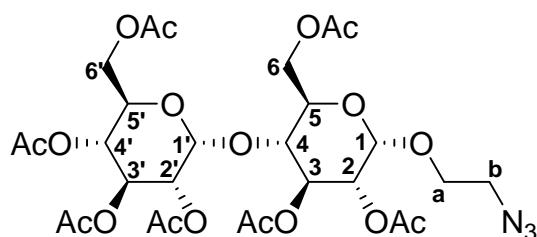
**2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-acetyl-1-*O*-(2-azidoethyl)- $\beta$ -lactopyranose<sup>[114]</sup> - 36**


1,2 g gepulvertes Molsieb, 938 mg  $\text{HgCN}_2$  (3,7 mmol) und 1,34 g  $\text{HgBr}_2$  (3,7 mmol) werden unter Stickstoff mit 10 ml trockenem Acetonitril versetzt. Zur Suspension gibts man 650 mg 2-Azidoethanol (7,4 mmol) und rührt 1 h bei RT. Anschließend werden 4,5 g **29** (6,4 mmol) gelöst in 10 ml trockenem Acetonitril langsam zutropft und 48 h gerührt. Anschließend wird über Celithe abfiltriert und mit 100 ml Chlorform nachgespült. Das Filtrat wird zweimal gewaschen mit Wasser und einer 1 M NaI Lösung. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der gelbe Rückstand (4,15 g) wird im Hochvakuum getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 1,97 g weißer Feststoff (44 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,97-2,15 (7s, 21H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,24-3,30+3,44-3,49 (2m, 2H, b); 3,60-3,64+3,96-4,01 (2m, 2H, a); 3,66-3,71+4,09-4,16 (2m, 4H, 6, 6'); 3,80-3,89 (2t, 2H, 5, 5'), 4,49-4,57 (2d, 2H, 1, 1'); 4,52-4,54 (dd, 1H, 4); 4,90-4,98 (m, 2H, 3, 3'); 5,09-5,23 (m, 2H, 2, 2'); 5,34-5,35 (dd, 1H, 4)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,47-20,80 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 50,49 (b); 60,76, 61,77 (6, 6'); 68,60 (a); 66,58, 69,11, 70,68, 70,94, 71,48, 72,72, 72,79, 76,13 (2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'); 100,42, 101,06 (1, 1'); 169,01, 169,63, 169,70, 169,71, 170,00, 170,09, 170,29 (C=O)

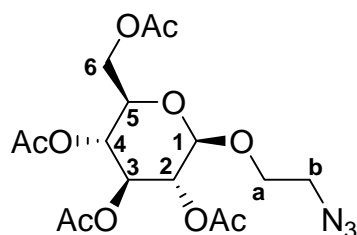
2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-acetyl-1-*O*-(2-azidoethyl)- $\beta$ -maltopyranose - 37

1,8 g gepulvertes Molsieb, 1,52 g  $\text{HgCN}_2$  (6 mmol) und 2,16 g  $\text{HgBr}_2$  (6 mmol) werden unter Stickstoff mit 15 ml trockenem Acetonitril versetzt. Zur Suspension gibts man 1,05 g 2-Azidoethanol (12 mmol) und rührt 1 h bei RT. Anschließend werden 7,5 g **31** (10 mmol) gelöst in 15 ml trockenem Acetonitril langsam zugetropft und 48 h gerührt. Anschließend wird über Celithe abfiltriert und mit 200 ml Chlorform nachgespült. Das Filtrat wird zweimal mit Wasser und einer 1 M NaI Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der gelbe Rückstand (6,09 g) wird im Hochvakuum getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Toluol/EE 2:1).

Ausbeute: 2,23 g weißer Feststoff (32 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,00-2,14 (7s, 21H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,25-3,30+3,44-3,51 (2m, 2H, b); 3,67-3,72 (m, 2H, a<sub>1</sub>, 5); 3,94-4,07 (m, 4H, a<sub>2</sub>, 5', 6<sub>a</sub>, 3); 4,20-5,27 (m, 2H, 6<sub>b</sub>, 6'<sub>a</sub>); 4,51-4,54 (m, 1H, 6'<sub>b</sub>); 4,61-4,63 (d, 1H, 1'); 4,83-4,88 (m, 2H, 3', 4'); 5,03-5,08 (t, 1H, 4); 5,23-5,28 (t, 1H, 2); 5,34-5,39 (t, 1H, 2'); 5,41-5,42 (d, 1H, 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,52-20,85 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 50,46 (b); 61,47, 62,57 (6, 6'), 68,48 (a); 68,01, 68,66, 69,30, 69,97, 71,04, 72,25, 72,55, 75,31 (2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'); 95,53 (1); 100,18 (1'); 169,36-170,48 (C=O)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(2-azidoethyl)- $\beta$ -glucopyranose - 38

2 g **33** (4,06 mmol) und 425 mg Azidoethanol (4,87 mmol) werden unter Stickstoff in 50 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 30 min. über 4 Å Molsieb gerührt. Nach Abkühlen auf -10 °C werden 700  $\mu$ l Bortrifluorid-Etherat Lösung zugegeben, das Kältbad entfernt und 20 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Molsieb abfiltriert und mit 40 ml Dichlormethan nachgespült. Die org. Phase wird dreimal mit 100 ml ges Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wird im Hochvakuum getrocknet und der braune ölige Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel; Hexan/EE 2:1)

Ausbeute: 364 mg weißer Feststoff (21 % d. Theorie)

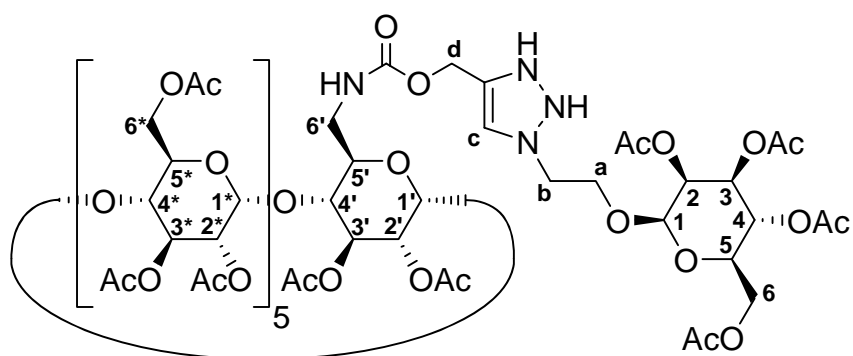
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ /ppm ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,01, 2,03, 2,05, 2,09 (4s, 12H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,27-3,32 (m, 1H, b<sub>1</sub>); 3,47-3,50 (m, 1H, b<sub>2</sub>); 3,67-3,74 (m, 2H, a<sub>1</sub>, 5); 4,01-4,06 (m, 1H, a<sub>2</sub>); 4,14-4,28 (m, 2H, 6); 4,59-4,61 (d, 1H, 1); 5,00-5,04 (dd, 1H, 2); 5,07-5,12 (t, 1H, 4); 5,19-5,24 (t, 1H, 3)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ /ppm ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,54, 50,54, 20,62, 20,68 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 50,50 (b); 61,80 (6); 68,31 (4); 68,48 (a); 71,04 (2); 71,93 (5); 72,76 (3); 100,64 (1); 169,34, 169,34, 170,21, 170,58 (C=O)

### 10.3.5 Synthese zuckermodifizierter $\alpha$ -Cyclodextrine

Bei den folgenden Verbindungen steht die Bezeichnung TA für die Verknüpfung von Zucker mit Cyclodextrin über einen Triazolring und TU für die Verknüpfung mittels Thioharnstoff.

#### Man-TA- $\alpha$ -CD (acetyliert) - 39

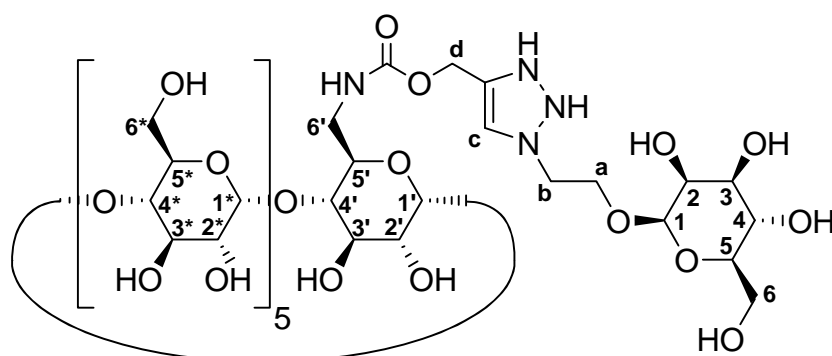


800 mg **16** (452  $\mu\text{mol}$ ) und 566 mg **34** (1,36  $\mu\text{mol}$ ) werden in 50 ml Toluol gelöst, mit 1 Spatelspitze  $\text{P}(\text{EtO})_3\cdot\text{CuI}$  und 2 ml Hünigbase (DIPEA) versetzt und 3 Tage bei RT gerührt. Es wird mit 130 ml Essigsäureethylester versetzt und weitere 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand im HV getrocknet. Es wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat,  $R_f = 0,23$ )

Ausbeute: 321 mg weißer Feststoff (33 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,99-2,14 (m, 63H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,61 - 4,82 (m, 28H, 2, 2', 2\*, 4, 4', 4\*, 6, 6', 6\*, a, b, d); 5,01-5,08 (m, 7H, 3, 3', 3\*); 5,20-5,23 (d, 7H, 1, 1', 1\*); 5,46-5,60 (m, 7H, 5, 5', 5\*); 8,03 (bs, 1H, c)



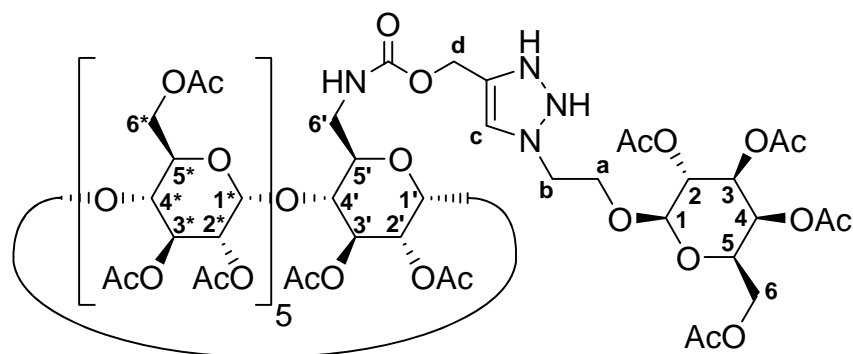
Man-TA- $\alpha$ -CD - 40

308 mg **39** werden in 10 ml Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Es bildet sich ein Niederschlag, der durch Zugabe von 50 ml Wasser gelöst wird und rührt eine halbe Stunde. Anschließend wird mit Amberlist 15 neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 187 mg weißer Feststoff (quantitativ)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,40-3,45 (t, 2H, b) 3,57-3,99 (m, 42H, 2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*, 6, 6', 6\*); 4,07-4,11 (m, 2H, a), 4,67-4,69 (t, 2H, d), 5,02-5,03 (d, 1H, 1'); 5,06 (d, 6H, 1, 1\*), 8,01 (s, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 50,68 (b); 60,86 (6, 6\*); 61,19 (6'); 66,06 (a); 70,46, 70,99, 72,24, 73,91 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 81,67 (d); 100,13 (1, 1\*); 100,57 (1'); 119,64 (c)

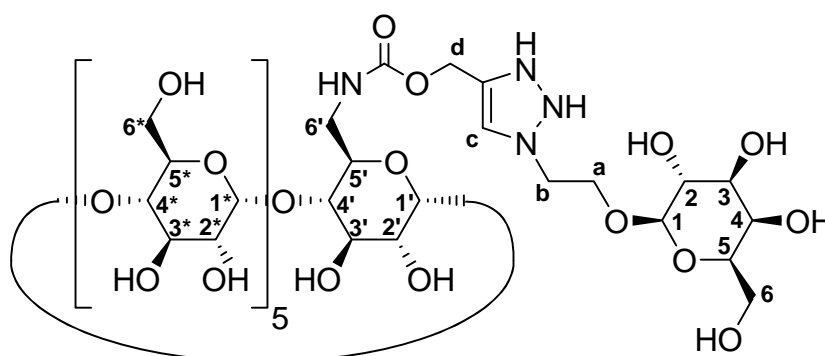
Gal-TA- $\alpha$ -CD (acetyliert) - 41

800 mg **16** (452  $\mu\text{mol}$ ) und 566 mg **36** (1,36 mmol) (TA076) werden in 50 ml Toluol gelöst, mit 1 Spatelspitze  $\text{P}(\text{EtO})_3 \cdot \text{CuI}$  und 2 ml Hünigbase (DIPEA) versetzt und 3 Tage bei RT gerührt. Es wird mit 130 ml Essigsäureethylester versetzt und weitere 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand im HV getrocknet. Es wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat,  $R_f = 0,23$ )

Ausbeute: 182 mg weißer Feststoff (19 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,98-2,20 (**m**, 63H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,63-3,93+4,10-4,51+4,70-4,81+4,97-5,20+5,38-5,61 (**5m**, Glucose-/Galactose-H, a, b, d); 7,90 (**bs**, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,53-20,86 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 54,95 (**b**); 61,13-63,51 (6, 6', 6\*); 68,35 (**a**); 66,84-70,86 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 96,36 (**d**); 99,97 (1, 1\*); 100,83 (1'); 141,50 (**c**); 169,58-170,72 (C=O)

Gal-TA- $\alpha$ -CD - 42

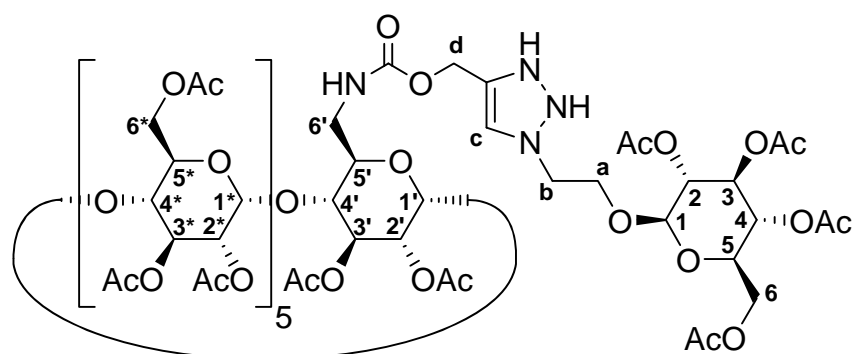
168 mg **41** werden in 10 ml Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Es bildet sich ein Niederschlag, der durch Zugabe von 20 ml Wasser gelöst wird und rührt eine halbe Stunde. Anschließend wird mit Amberlist 15 neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 104 mg weißer Feststoff (quantitativ)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,40-3,50 (m, 2H, b) 3,59-3,99 (m, 42H, 2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*, 6, 6', 6\*); 4,10-4,14 (m, 2H, a), 4,68-4,70 (t, 2H, d), 5,02 (d, 1H, 1'); 5,05-5,06 (d, 6H, 1, 1\*), 8,12 (s, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 50,97 (b); 60,29, 60,78, 61,46 (6, 6', 6\*); 68,57 (a); 71,13-75,68 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 81,64 (d); 102,05 (1, 1\*); 103,59 (1'); 119,65 (c)

MS:  $m/z$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) = 1325,45  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

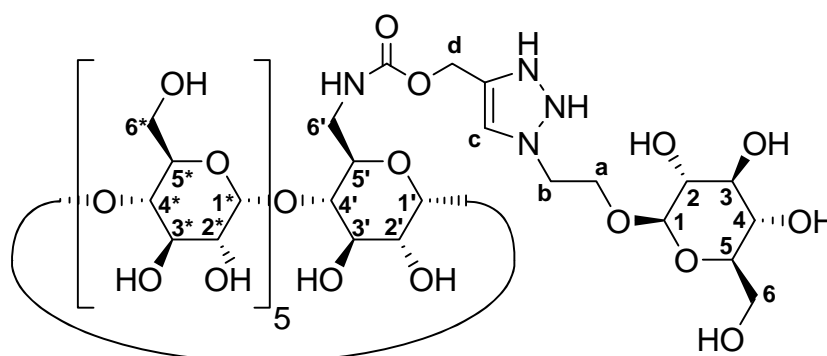
Glu-TA- $\alpha$ -CD (acetyliert) - 43

800 mg **16** (452  $\mu\text{mol}$ ) und 295 mg **38** (707  $\mu\text{mol}$ ) (TA088) werden in 50 ml Toluol gelöst, mit 1 Spatelspitze  $\text{P}(\text{EtO})_3 \cdot \text{CuI}$  und 2 ml Hünigbase (DIPEA) versetzt und 24h bei RT gerührt. Es wird mit 50 ml Essigsäureethylester versetzt und weitere 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand im HV getrocknet. Es wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat,  $R_f = 0,10$ )

Ausbeute: 364 mg gelblicher Feststoff (37 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,97-2,15 (**m**, 63H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,63-3,89+4,10-4,40+4,70-4,84+4,96-5,22+5,40-5,66 (**5m**, Glucose-H, a, b, d); 7,74 (**bs**, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,54-21,02 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 49,84 (b); 60,36-61,75 (6, 6', 6\*); 67,67 (a); 68,25-72,53 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 98,57 (d); 100,54 (1, 1\*, 1'); 125,06 (c); 169,36-170,61 (C=O)

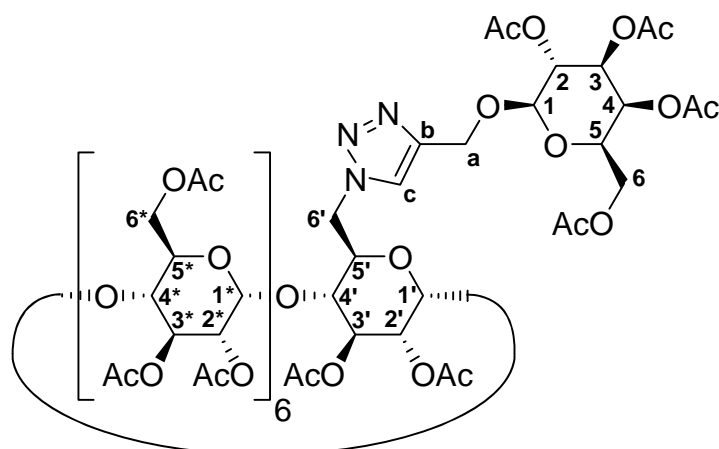
Glu-TA- $\alpha$ -CD - 44

345 mg **43** werden in 10 ml Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Es bildet sich ein Niederschlag, der durch Zugabe von 20 ml Wasser gelöst wird und rührt eine halbe Stunde. Anschließend wird mit Amberlist 15 neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 211 mg weißer Feststoff (quantitativ)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,22-3,26 (t, 2H, b) 3,58-4,00 (m, 42H, 2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*, 6, 6', 6\*); 4,11-4,28 (2m, 2H, a), 4,41-4,43 (d, 2H, d), 5,02 (d, 1H, 1'); 5,06 (d, 6H, 1, 1\*), 8,13 (s, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 49,55 (b); 59,45-59,88 (6, 6', 6\*); 67,20 (a); 68,74-75,09 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 80,29 (d); 99,15 (1); 100,62, 101,6 (1\*, 1'); 118,21 (c)

10.3.6 Synthese zuckermodifizierter  $\beta$ -CyclodextrineGal-TA- $\beta$ -CD (acetyliert) - 45

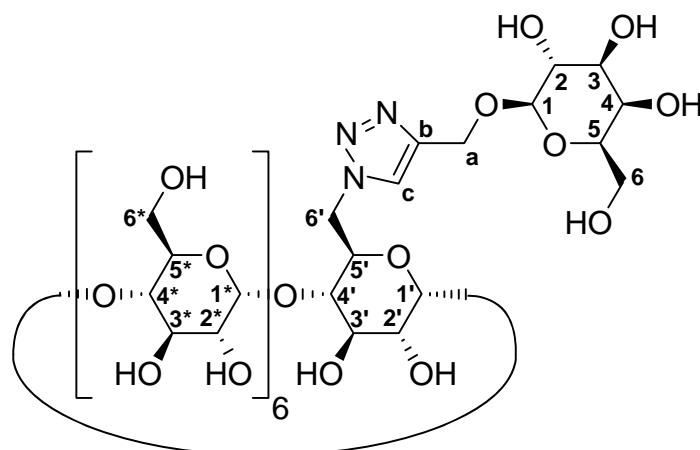
1 g **20** und 386 mg  $\beta$ -1-*O*-Propargyl-galactose-tetraacetat werden in 60 ml trockenem Toluol gelöst und mit 69 mg Kupfer-(I)-iodid-triethylphosphit-Komplex versetzt. Anschließend gibt man 1,5 ml Hünigbase hinzu und rührt 3 Tage bei RT. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der gelbliche Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel; Eluent: EE/Toluol 9:1). Man erhält das Produkt mit einem  $R_f$ -Wert von 0,23.

Ausbeute: 721 mg weißer Feststoff (60 % der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 1,98-2,16 (m, 72H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,71-3,79+4,11-4,34+4,49-4,52+4,56-4,61+4,70-4,87+4,95-5,15+5,20-5,41 (6m, Glucose-/Galactose-H, a); 7,66 (bs, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,65-20,80 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 38,70 (a); 61,24-62,46 (6, 6', 6\*); 69,66-71,34 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 94,97-96,42 (1, 1\*, 1'); 162,62 (b+c); 169,19-170,26 (C=O)

MS:  $m/z$  (MeOH) = 2386,71  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 2408,83  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gal-TA- $\beta$ -CD - 46

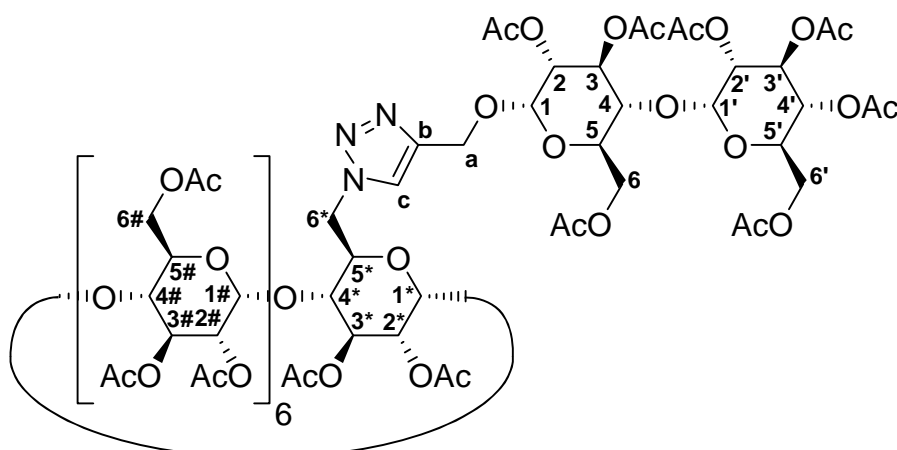
680 mg **45** werden in 15 ml Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt. Man rührt über Nacht bei RT, wobei sich ein Niederschlag bildet. Anschließend gibt man soviel Wasser hinzu, bis dieser wieder in Lösung ist und versetzt mit sehr wenig NaOH und läßt 3 h bei RT stehen. Dann wird mit Amberlist 15 neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 398 mg weißer Feststoff (quantitativ)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,19 (s, 2H, a) 3,51-4,01 (m, 48H, 2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*, 6, 6', 6\*); 4,97-5,07 (m, 7H, 1', 1\*); 5,16-5,17 (d, 1H, 1), 8,10 (s, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 48,12 (a); 59,40-60,15 (6, 6', 6\*); 69,84-72,21 (2, 2', 2\*, 3, 3', 3\*, 4, 4', 4\*, 5, 5', 5\*); 101,01-101,23 (1, 1\*, 1'); 150,37 (b, c)

MS:  $m/z$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) = 1325,45  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Mal-TA- $\beta$ -CD (acetyliert) - 47

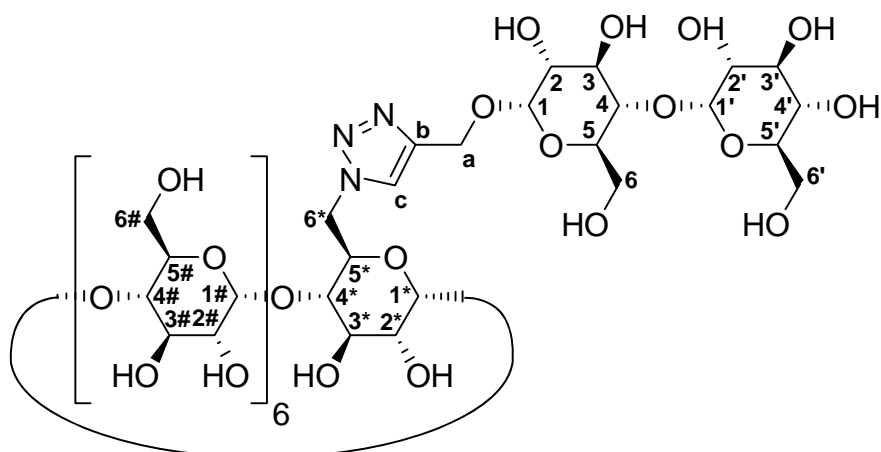
1 g **20** und 674 mg  $\beta$ -1-*O*-Propargyl-galactose-heptaacetat werden in 60 ml trockenem Toluol gelöst und mit 69 mg Kupfer-(I)-iodid-triethylphosphit-Komplex versetzt. Anschließend gibt man 1,5 ml Hünigbase hinzu und rührt 1 Tage bei RT. Nach DC-Kontrolle (EE/Toluol 10:1) zeigt sich, dass noch unumgesetztes Edukt vorhanden ist. Man gibt zwei weitere Spatelspitzen Kupferkatalysator und 2 ml Hünigbase zu und rührt über Nacht bei RT. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der grünliche Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel; Eluent: EE/Toluol 9:1). Man erhält das Produkt mit einem R<sub>f</sub>-Wert von 0,21.

Ausbeute: 644 mg weier Feststoff (48 % der Theorie)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 1,98-2,17 (**m**, 81H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,72-3,79+4,14-4,35+4,48-4,52+4,57-4,65+4,70-4,88+4,96-5,15+5,21-5,45 (**6m**, Glucose-/Maltose-H, a); 7,74 (**bs**, 1H, c)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,63-20,81 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 39,00 (a); 62,24-62,99 (6, 6', 6\*); 69,62-71,55 (2, 2', 2\*, 2#, 3, 3', 3\*, 3#, 4, 4', 4\*, 4#, 5, 5', 5\*, 5#); 96,28-100,07 (1, 1\*, 1', 1#); 161,63-161,72 (b+c); 169,76-171,13 (C=O)



Mal-TA- $\beta$ -CD - 48

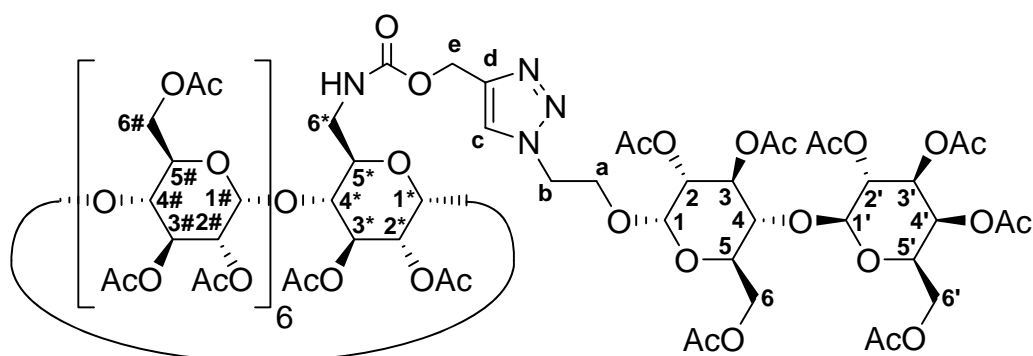
644 mg **47** werden in 15 ml Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt. Man rührt über Nacht bei RT, wobei sich ein Niederschlag bildet. Anschließend wird das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst (trübe Lösung) und mit sehr wenig NaOH versetzt. Man läßt 1 h bei RT stehen. Dann wird mit Amberlist 15 neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 331 mg weißer Feststoff (90% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,25 (s, 2H, a) 3,52-4,03 (m, 54H, 2, 2', 2\*, 2#, 3, 3', 3\*, 3#, 4, 4', 4\*, 4#, 5, 5', 5\*, 5#, 6, 6', 6\*, 6#); 4,98-5,19 (m, 9H, 1, 1', 1\*, 1#), 8,16 (s, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 49,20 (a); 60,36-61,55 (6, 6', 6\*, 6#); 70,77-73,25 (2, 2', 2\*, 2#, 3, 3', 3\*, 3#, 4, 4', 4\*, 4#, 5, 5', 5\*, 5#) 99,96-102,01 (1, 1', 1\*, 1#); 151,08-151,33 (b, c)

MS:  $m/z$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) = 1540,61  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1562,46  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Lac-TA- $\beta$ -CD (acetyliert) - 49

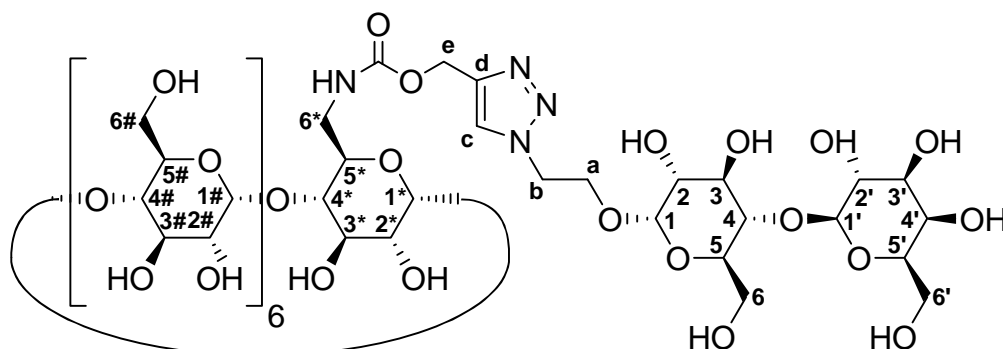
100 mg **22** (4,86  $\mu\text{mol}$ ) und 172 mg **36** (24,2  $\mu\text{mol}$ ) werden in 20 ml Toluol gelöst, mit 20 mg  $(\text{EtO})_3\text{CuI}$  und 1 ml Hünigbase (DIPEA) versetzt und 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand im HV getrocknet. Es wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat,  $R_f = 0,08$ )

Ausbeute: 92 mg weißer Feststoff (69% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,01-2,17 (**m**, 81H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,66-3,90+4,11-4,42+4,73-4,85+4,95-5,23+5,40-5,67 (**5m**, Glucose-/Lactose-H, a, b, e); 7,82 (**bs**, 1H, c)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,50-21,01 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 49,91 (b); 60,42-61,73 (6, 6', 6\*, 6#); 67,68 (a); 68,21-72,55 (2, 2', 2\*, 2#, 3, 3', 3\*, 3#, 4, 4', 4\*, 4#, 5, 5', 5\*, 5#); 98,66 (e); 99,85-100,68 (1, 1', 1\*, 1#); 124,92 (c); 169,21-170,55 (C=O)

MS:  $m/z$  (MeOH) = 2783,7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

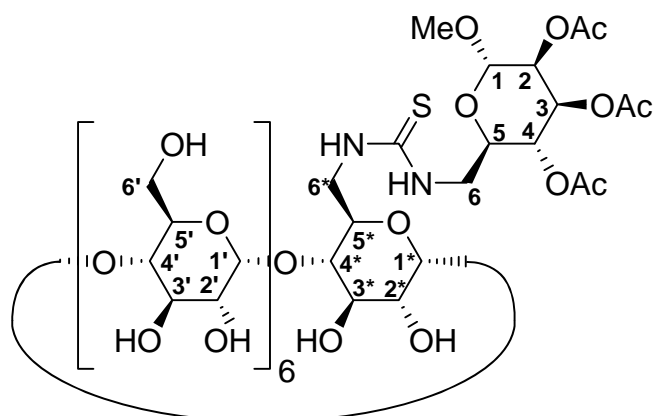
Lac-TA- $\beta$ -CD - 50

90 mg **49** werden in 5 ml Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Es bildet sich ein Niederschlag, der durch Zugabe von 50 ml Wasser gelöst wird und rührt eine halbe Stunde. Anschließend wird mit Amberlist 15 neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 56 mg weißer Feststoff (quantitativ)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,23-3,27 (t, 2H, b) 3,57-4,02 (m, 54H, 2, 2', 2\*, 2#, 3, 3', 3\*, 3#, 4, 4', 4\*, 4#, 5, 5', 5\*, 5#, 6, 6', 6\*, 6#); 4,11-4,27 (2m, 2H, a), 4,41-4,44 (d, 2H, e), 5,02-5,09 (m, 9H, 1, 1', 1\*, 1#), 8,15 (s, 1H, c)

MS:  $m/z$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ ) = 1649,5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

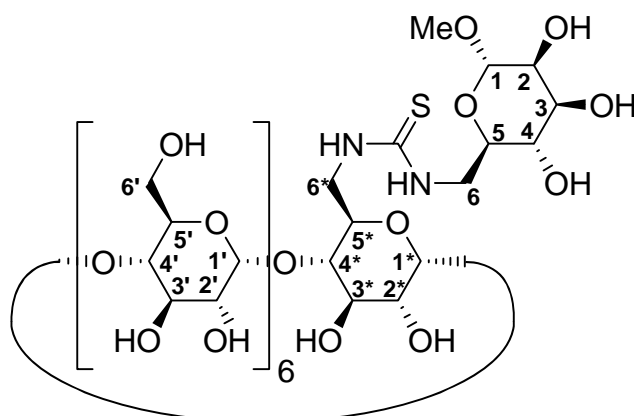
Man-TU- $\beta$ -CD (acetyliert) - 51

300 mg **19** (264  $\mu\text{mol}$ ) werden in 6 ml Pyridin suspendiert. Anschließend gibt man 200 mg **23** (553  $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 6 ml Pyridin zu. Es werden weitere 8 ml Pyridin zugesetzt und über Nacht bei 60°C gerührt. Anschließend wird das Pyridin nach Gefrieren im Hochvakuum entfernt. Danach wird in 50 ml Chloroform digeriert und das Produkt abgesaugt.

Ausbeute: 307 mg weißer Feststoff (78 % d. Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ : nicht meßbar, da kein geeignetes LM

MS:  $m/z$  (MeOH) = 1495,37  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1493,4  $[\text{M}-\text{H}]^-$

Man-TU- $\beta$ -CD - 52

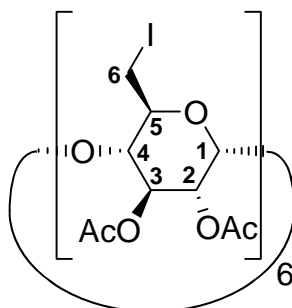
Es werden 274 mg **51** in 50 ml Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt. Die Lösung wird trübe. Es wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird das LM abdestilliert, mit Wasser versetzt und mit Amberlyst 15 Ionentauscher neutralisiert. Dieser wird abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 218 mg weißer Feststoff (87 % d. Th)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,38 (s, 3H, OMe); 3,56-3,67 (m, 16H, 2, 2', 2\*, 4, 4', 4\*); 3,80-4,00 (m, 24H, 3, 3', 3\*, 5, 5', 5\*, 6, 6', 6\*); 5,07 (m, 7H, 1, 1'); 5,12-5,13 (d, 1H, 1\*)

### 10.3.7 Synthese kationischer Cyclodextrine

#### Hexakis-(6-deoxy-6-iodo)- $\alpha$ -Cyclodextrin-dodekaacetat - 53

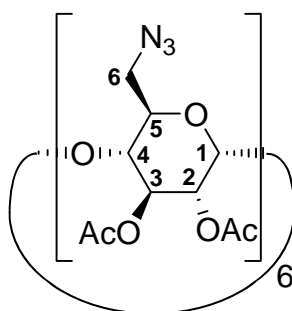


48,5 g Triphenylphosphin (185 mmol) und 46,9 g Iod (185 mmol) werden in 100 ml trockenem DMF gelöst. Zu dieser Lösung werden unter Rühren 10 g getrocknetes  $\alpha$ -Cyclodextrin (10,3 mmol) zugegeben und unter Stickstoff bei 80 °C 20 h gerührt. Anschließend wird eine Suspension von 10,26 g Natriummethylat in 50 ml Methanol unter Eiskühlung zugegeben und 1 h gerührt. Der Ansatz wird dann auf 2 l Eiswasser gegossen und 1 l Methanol zugegeben. Nachdem sich ein feiner Feststoff gebildet hat, wird dieser abgesaugt und ein weiteres mal in 1 l Methanol digeriert. Der Feststoff wird anschließend getrocknet, in 100 ml Pyridin suspendiert und mit 100 ml Acetanhydrid versetzt. Es wird 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend gießt man den Ansatz auf 400 ml Eiswasser und extrahiert dreimal mit je 200 ml Dichlormethan. Die vereinigten org. Phasen werden mit 2 M HCl, mit 2 M Natriumsulfatlösung und zuletzt mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird anschließend säulenchromatographisch gereinigt. (Kieselgel; EE/EtOH/Wasser 45:5:3; Rf=0,77 )

Ausbeute: 8,5g schwach bräunlicher Feststoff (39 % d. Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 2,02-2,04 (2s, 36H, Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 3,32-3,70 (m, 12H, 6); 3,74-3,75 (m, 12H, 2, 4); 4,83-4,86 (dd, 6H, 3); 5,12-5,13 (d, 6H, 1); 5,46-5,51 (m, 6H, 5)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 20,71, 20,76 (Acetyl- $\text{CH}_3$ ); 60,36 (6); 69,93, 70,60, 70,60, 70,83 (2, 3, 4, 5); 81,20 (1); 169,17, 170,50 (C=O)

**Hexakis-(6-deoxy-6-azido)- $\alpha$ -Cyclodextrin-dodekaacetat - 54**

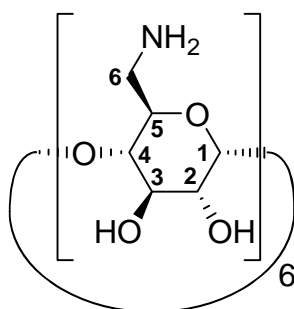
6 g **53** (2,8 mmol) und 11 g Natriumazid (168 mmol) werden in 50 ml trockenem DMF gelöst und für 48 h bei 75°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit Wasser gewaschen. Es wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM abdestilliert. Der gelbe Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, EE/Hexan 5:1 -> EE, R<sub>f</sub> (EE)= 0,39)

Ausbeute: 2,77 g weißer Feststoff (60 % d. Th.)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 2,04-2,05 (2s, 36H, Acetyl-CH<sub>3</sub>); 3,62-3,73 (m, 12H, 6); 3,81-3,85 (t, 6H, 4); 4,02-4,06 (m, 6H, 5); 4,84-4,87 (dd, 6H, 2); 5,05-5,06 (d, 6H, 1); 5,43-5,48 (dd, 6H, 3)

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 20,67, 20,78 (Acetyl-CH<sub>3</sub>); 51,77 (6); 70,44 (2); 71,07 (5); 71,10 (3); 77,72 (4); 96,90 (1); 169,23, 170,44 (C=O)



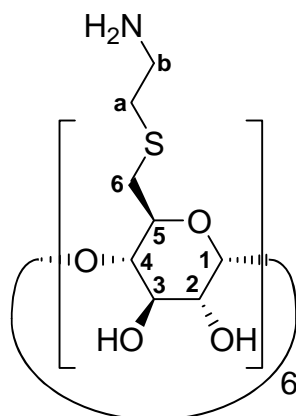
**Hexakis-(6-amino-6-deoxy)- $\alpha$ -Cyclodextrin - 55**

2 g **54** (1,23 mmol) werden in 200 ml Essigsäureethylester gelöst und mit 100 mg 5% PD auf Aktivkohle versetzt. Anschließend wird bei 34 psi Wasserstoffdruck für 20 h bei RT hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird das LM abdestilliert, mit Wasser versetzt und mit Amberlyst 15 Ionentauscher neutralisiert. Dieser wird abfiltriert, das LM abdestilliert und der Rückstand im HV getrocknet.

Ausbeute: 725 mg weißer Feststoff (61% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 3,57-3,65 (**m**, 12H, 2, 4); 3,83-3,97 (**m**, 24H, 6, 5, 3); 5,03 (**d**, 6H, 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 59,16 (6); 70,30 (2); 70,72 (5); 71,91 (3); 79,92 (4); 99,95 (1)

Hexakis-(6-cysteaminy-6-deoxy)- $\alpha$ -Cyclodextrin - 56

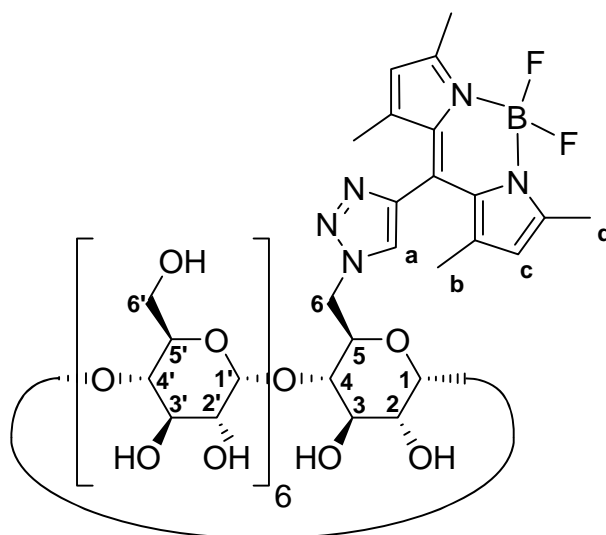
1,14 g 2-Aminoethanthiol Hydrochlorid (14,8 mmol) und 1,5 g Triethylamin (14,8 mmol) werden in 30 ml absolutiertem DMF gelöst und mit 2,0 g Hexakis-(6-deoxy-6-iodo)- $\alpha$ -CD (1,23 mmol) versetzt. Die Suspension wird drei Tage bei RT gerührt, der Rückstand filtriert und in 20 ml Wasser gelöst. Der pH Wert wird mit HCl auf 4,0 eingestellt und anschließend gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird in 3 ml Wasser gelöst und durch Eintropfen in 100 ml Ethanol gefällt. Das Produkt wird filtriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,1 g weißer Feststoff (67% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) = 2,81-2,94 (**m**, 18H, 6a, a); 2,97-3,05 (**m**, 12H, b); 3,07-3,14 (**m**, 6H, 6b); 3,25-3,40 (**m**, 6H, 2); 3,47 (**t**, 6H, 4); 3,74 (**t**, 6H, 3); 3,86-4,01 (**m**, 6H, 5); 4,87 (**d**, 6H, 1); 5,54 (**bs**, 6H, 3-OH); 5,62 (**bs**, 6H, 2-OH), 8,26 (**bs**, 18H,  $\text{NH}_3^+$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) = 29,5 (a); 33,0 (6); 38,4 (b); 70,8 (5); 71,8 (2); 72,8 (3); 84,7 (4); 101,8 (1)

## 10.3.8 Synthese fluoreszenzmarkierter Cyclodextrine

Bodipy- $\beta$ -CD - 57

500 mg acetylgeschütztes Bodipy- $\beta$ -CD werden in 50 ml Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Es bildet sich ein Niederschlag. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 100 ml Wasser gelöst. Es wird mit Amberlist-15 neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert und die dunkelrote Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 315 mg roter Feststoff (quantitativ)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 1,32-1,35 (m, 12H, b, d); 3,55-3,60 (t, 7H, 4, 4'); 3,63-3,66 (dd, 7H, 2, 2'); 3,84-3,87 (m, 21H, 6, 6', 5, 5'); 3,93-3,98 (t, 7H, 3, 3'); 4,13-4,21 (m, 2H, c); 5,06-5,07 (d, 7H, 1, 1'); 8,44 (s, 1H, a)

MS:  $m/z$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) = 1455,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

## 11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
Ac	Acetyl- ( $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ )
BODIPY	BOron-DIPYrrin
br	breites Signal (NMR- und IR-Spektroskopie)
c	Konzentration (in mol/l)
CD	Cyclodextrin
$\delta$	chemische Verschiebung NMR-Spektroskopie (in ppm)
<b>d</b>	Dublett (NMR-Spektroskopie)
d	Tage
<i>d</i>	Durchmesser
<i>D</i>	Polydispersität
Da	Masseneinheit Dalton (g/mol)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Energie
eq.	Äquivalent(e)
Et	Ethyl ( $\text{C}_2\text{H}_5$ )
f	Präfix "Femto" ( $10^{-15}$ )
g	Gramm
Gal	Galactose-Einheit
Glu	Glucose-Einheit
GPC	Gel Permeations Chromatographie
h	Stunde
H	Proton
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

---

iPr	<i>iso</i> -Propyl (CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )
IR	Infrarot-Spektroskopie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k	Präfix "Kilo" (10 <sup>3</sup> )
Kat.	Katalysator
λ	Wellenlänge
l	Liter (dm <sup>3</sup> )
Lac	Lactose-Einheit
LC	Flüssigchromatographie
m	Präfix "Mikro" (10 <sup>-6</sup> )
m	Masse
m	Multiplett
m	Präfix "Milli" (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar (mol/l)
M	Präfix "Mega" (10 <sup>6</sup> )
M	Molekulargewicht(in g/mol)
Mal	Maltose-Einheit
Man	Mannose-Einheit
<i>M<sub>w</sub></i>	Massenmittel der Molmasse (in g/mol)
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl (in cm <sup>-1</sup> ) (IR-Spektroskopie)
$\nu$	Valenzschwingung (IR-Spektroskopie)
N	Stöchiometriefaktor
n	Oligomerisierungsgrad
n	Stoffmenge
n	Präfix "Nano" (10 <sup>-9</sup> )
<sup>n</sup> Bu	<i>n</i> -Butyl (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
NMR	Kernmagnetische Resonanz

---

p	Gewichtsprozent
p	Präfix "Pico" ( $10^{-12}$ )
Ph	Phenyl ( $C_6H_5$ )
ppm	parts per million
q	Quintett (NMR-Spektroskopie)
R	beliebiger organischer Rest
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
RI	Brechungsindex
ROESY	Rötating-frame Overhauser enhancement spectroscopy (NMR)
s	Singulett (NMR-Spektroskopie)
s	starkes Signal (IR-Spektroskopie)
s	Sekunde
t	Zeit
T	Temperatur (in °C)
t <sub>90</sub>	Zeitkonstante bei 90% Umsatz der Auffädellung
t	Triplet (NMR-Spektroskopie)
TA	Triazol-Linker bzw. Triazolylmethylurethan-Linker
TU	Thioharnstoff-Linker
UV/Vis	Ultraviolett- und sichtbares Licht-Spektroskopie
V	Volumen
w	schwaches Signal (IR-Spektroskopie)
x	Koordinate der x-Achse
y	Koordinate de y-Achse
z	Ladungszahl (Massenspektroskopie)

## 12 Literaturverzeichnis

- [1] C. M. Croce, *New England Journal of Medicine* **2008**, *358*, 502.
- [2] T. Dingermann, *Gentechnik-Biotechnik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1999**.
- [3] C. L. Cepko, B. E. Roberts, R. C. Mulligan, *Cell* **1984**, *37*, 1053.
- [4] S. Lehrman, *Nature* **1999**, *401*, 517.
- [5] J. Fox, *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 1153.
- [6] A. G. Dalglish, J. Wing, *Gene Therapy* **1997**, *4*, 629.
- [7] I. C. Schulze, Martin-Luther-Universität (Halle Wittenberge), **2006**.
- [8] J. Falbe, M. Regitz, *Römpp Chemie Lexikon A-Z*, 9., erweiterte und neu bearbeitete Ausgabe ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [9] A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **1891**, *112*, 536.
- [10] F. Schardinger, *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* **1903**, *6*, 865.
- [11] F. Cramer, F. M. Henglein, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 308.
- [12] T. Fujiwara, N. Tanaka, S. Kobayashi, *Chem. Lett.* **1990**, *5*, 739.
- [13] W. Saenger, *Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Acad. Press ISB 0-12-067101-8, **1984**.
- [14] W. Saenger, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1980**, *19*, 344.
- [15] H.-J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755.
- [16] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
- [17] G. Schill, H. Zollenkopf, *Lieb. Ann. Chem.* **1969**, *721*, 53.
- [18] G. Wenz, B. Keller, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 201.
- [19] R. M. Fouss, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 269.
- [20] C. Schilli, *Synthese tertiärer Polyamin-N-oxide und Einschluß in alpha-Cyclodextrin* **2000**, *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe.
- [21] N. Baudendistel, *Darstellung und Nachweis von anionischen Polyrotaxanen* **2001**, *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe.
- [22] G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851.
- [23] B. Keller, *Synthesis of hydrophilic rotaxane structures by self-organization of cyclodextrins and polymers*, Thesis Universität Mainz, **1994**.
- [24] C. Gruber, Dissertation thesis, University of Karlsruhe **2002**.
- [25] T. Albuzat, Diploma thesis, Universität des Saarlandes (Saarbrücken), **2005**.
- [26] K. K. Hunt, S. A. Vorburger, *Science* **2002**, *297*, 415.
- [27] V. Gieselmann, *Naturwissenschaftliche Rundschau* **2001**, *10*, 513.
- [28] A. Fischer, *Cell. Mol. Biol. (Paris, Fr.)* **2001**, *47*, 1269.

- 
- [29] S. Satkauskas, M. F. Bureau, M. Puc, A. Mahfoudi, D. Scherman, D. Miklavcic, L. M. Mir, *Molecular Therapy* **2002**, *5*, 133.
- [30] T. L. Burkoth, B. J. Bellhouse, G. Hewson, D. J. Longridge, A. G. Muddle, D. F. Sarphie, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1999**, *16*, 331.
- [31] S. Agarwal, Y. Zhang, S. Maji, A. Greiner, *Mater. Today (Oxford, U. K.)* **2012**, *15*, 388.
- [32] F. J. Xu, W. T. Yang, *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 1099.
- [33] Y. W. Cho, J.-D. Kim, K. Park, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2003**, *55*, 721.
- [34] E. Piskin, S. Dincer, M. Tuerk, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2004**, *15*, 1181.
- [35] A. K. Salem, S. D. Patil, D. J. Burgess, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **2012**, *427*, 1.
- [36] B. Demeneix, J.-P. Behr, *Adv. Genet.* **2005**, *53*, 217.
- [37] M. Koping-Hoggard, I. Tubulekas, H. Guan, K. Edwards, M. Nilsson, K. M. Varum, P. Artursson, *Gene Therapy* **2001**, *8*, 1108.
- [38] H.-L. Jiang, T.-H. Kim, Y.-K. Kim, I.-Y. Park, M.-H. Cho, C.-S. Cho, *Biomedical Materials (Bristol, United Kingdom)* **2008**, *3*, 025013/1.
- [39] T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, R. Ito, K. Kogure, H. Harashima, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 3852.
- [40] T. Albuzat, M. Keil, J. Ellis, C. Alexander, G. Wenz, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 8558
- [41] W. C. Boyd, R. M. Reguera, *Journal of Immunology* **1949**, *62*, 333.
- [42] W. J. Peumans, D. E. J. M. Van, *Plant Physiology* **1995**, *109*, 347.
- [43] E. Fischer, *Chemische Berichte* **1894**, *27*, 2985.
- [44] D. E. Koshland, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2468.
- [45] K. Landsteiner, *Zbl Balk* **1900**, *27*, 367.
- [46] H. Goubran, *ISBT Sci. Ser.* **2009**, *4*, 1.
- [47] H. J. Gabius, H. C. Siebert, S. Andre, J. Jimenez-Barbero, H. Rudiger, *Chembiochem* **2004**, *5*, 741.
- [48] T. Stöhr, A.-R. Blaudszun, U. Steinfeld, G. Wenz, *Polymer Chemistry* **2011**, *2*, 2239.
- [49] I. Kräuter, Dissertation thesis, Universität Karlsruhe (TH) **1999**.
- [50] C. Gruber, Dissertation thesis, Karlsruhe (Karlsruhe), **2002**.
- [51] A. Rembaum, *J. Macromol. Sci., Chem.* **1969**, *3*, 87.
- [52] W. Kern, E. Brenneisen, *J. Prakt. Chem. (Leipzig)* **1941**, *159*, 219.
- [53] C. F. Gibbs, E. R. Littmann, C. S. Marvel, *Journal of the American Chemical Society* **1933**, *55*, 753.
- [54] W. Eschweiler, *Ber.* **1905**, *38*, 880.



- [55] C. Straßnig, Dissertation thesis, Universität des Saarlandes (Saarbrücken), **2007**.
- [56] J. Szejtli, A. Liptak, I. Jodal, P. Fügedi, P. Nanasi, A. Neszmelyi, *Starch/Stärke* **1980**, *32*, Nr.5, 162.
- [57] K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydrate Research* **1989**, *187*, 203.
- [58] K. Takahashi, K. Hattori, F. Toda, *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 3331.
- [59] K. Takeo, K. Uemura, H. Mitoh, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 293.
- [60] R. C. Petter, J. S. Salek, C. T. Sikorski, G. Kumaravel, F.-T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.
- [61] J. Defaye, S. Crouzy, N. Evrard, H. Law, in *PCT Int. Appl.*, WO99/614583, **1999**.
- [62] W. Tang, S.-C. Ng, *Nature Protocols* **2008**, *3*, 691.
- [63] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1.
- [64] S. Gabriel, *Ber.* **1887**, *20*, 2224.
- [65] V. V. Fokin, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**, pp. 247.
- [66] R. Appel, *Angewandte Chemie* **1975**, *87*, 863.
- [67] C. E. Redemann, C. Niemann, *Organic Syntheses* **1942**, *22*.
- [68] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Annalen der Chemie* **1984**, 1343.
- [69] B. Helferich, J. Goerdeler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1940**, *73B*, 532.
- [70] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **1901**, *34*, 957 to 981.
- [71] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [72] R. Huisgen, *Vol. 1*, Wiley, **1984**, pp. 1.
- [73] A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 94.
- [74] H. Staudinger, J. Meyer, **1919**, *2*, 635.
- [75] G. Wenz, C. Strassnig, C. Thiele, A. Engelke, B. Morgenstern, K. Hegetschweiler, *Chemistry-a European Journal* **2008**, *14*, 7202.
- [76] I. Krauter, W. Herrmann, G. Wenz, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1996**, *25*, 93.
- [77] Z.-Y. Gu, D.-S. Guo, M. Sun, Y. Liu, *Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 3600.
- [78] Silk Scientific, Inc., **2006**.
- [79] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Nature* **1994**, *370*, 126.
- [80] H. S. Choi, T. Ooya, S. C. Lee, S. Sasaki, M. Kurisawa, H. Uyama, N. Yui, *Macromolecules* **2004**, *37*, 6705.
- [81] A. Harada, T. Nishiyama, Y. Kawaguchi, M. Okada, M. Kamachi, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7115.
- [82] G. Wenz, C. Gruber, B. Keller, C. Schilli, T. Albusat, A. Mueller, *Macromolecules* **2006**, *39*, 8021.

- 
- [83] W. Herrmann, B. Keller, G. Wenz, *Macromolecules* **1997**, *30*, 4966.
- [84] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion, 2nd Edition*, Oxford University Press, Oxford UK, **1975**.
- [85] J. Crank, *The Philosophical Magazine* **1948**, *39*, 362.
- [86] H. Uyama, S. Kobayashi, *Chemistry Letters* **1992**, 1643.
- [87] P. Lin, C. Clash, E. M. Pearce, T. K. Kwei, M. A. Aponte, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **1988**, *26*, 603.
- [88] S. Huber, Dissertation thesis, Technische Universität (München), **2009**.
- [89] C. Weber, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2012**, *37*, 686.
- [90] D. Crespy, R. R. M, *Polymer International* **2007**, *56*, 1461.
- [91] A. S. Dubovik, E. E. Makhaeva, V. Y. Grinberg, A. R. Khokhlov, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, *206*, 915.
- [92] A. A. Tager, A. P. Safronov, S. V. Sharina, I. Y. Galaev, *Colloid and Polymer Science* **1993**, *271*, 868.
- [93] J. Nguyen, X. Xie, M. Neu, R. Dumitrascu, R. Reul, J. Sitterberg, U. Bakowsky, R. Schermuly, L. Fink, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, *Journal of Gene Medicine* **2008**, *10*, 1236.
- [94] S.-B. Seo, J. Yang, W. Hyung, E.-J. Cho, T.-I. Lee, Y. J. Song, H.-G. Yoon, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, S. Haam, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 475105/1.
- [95] S. Sundaram, L. K. Lee, C. M. Roth, *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, 4396.
- [96] Y. H. Kim, J. H. Park, M. Lee, Y.-H. Kim, T. G. Park, S. W. Kim, *Journal of Controlled Release* **2005**, *103*, 209.
- [97] K. Gersdorff von, M. Ogris, E. Wagner, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *60*, 279.
- [98] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, A. Goepferich, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *60*, 247.
- [99] S. M. Moghimi, P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska, A. Szewczyk, *Molecular Therapy* **2005**, *11*, 990.
- [100] M. E. Davis, *Molecular Pharmaceutics* **2009**, *6*, 659.
- [101] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature* **2010**, *464*, 1067.
- [102] W. D. McElroy, A. A. Green, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1955**, *56*, 240.
- [103] C. Martineau, L. G. Whyte, C. W. Greer, *Journal of Microbiological Methods* **2008**, *73*, 199.
- [104] M. Thomas, J. J. Lu, Q. Ge, C. Zhang, J. Chen, A. M. Klibanov, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 5679.

- [105] H. H. Ahn, M. S. Lee, M. H. Cho, Y. N. Shin, J. H. Lee, K. S. Kim, M. S. Kim, G. Khang, K. C. Hwang, I. W. Lee, S. L. Diamond, H. B. Lee, *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *313+314*, 116.
- [106] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248.
- [107] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55.
- [108] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 27.
- [109] M. K. Nguyen, D. S. Lee, B. S. Kim, in *PCT Int. Appl.*, WO2009031861A2, **2009**.
- [110] Y.-J. Lin, B.-K. Tsai, C.-J. Tu, J. Jeng, C.-C. Chu, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1801.
- [111] M. I. Garcia-Moreno, P. Diaz-Perez, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. Garcia Fernandez, *Carbohydrate Research* **2002**, *337*, 2329.
- [112] L. Deng, P. Tsybina, K. J. Gregg, R. Mosi, W. F. Zandberg, A. B. Boraston, D. J. Vocadlo, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 4839.
- [113] V. Percec, P. Leowanawat, H.-J. Sun, O. Kulikov, C. D. Nusbaum, T. M. Tran, A. Bertin, D. A. Wilson, M. Peterca, S. Zhang, N. P. Kamat, K. Vargo, D. Moock, E. D. Johnston, D. A. Hammer, D. J. Pochan, Y. Chen, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, M. Bergeron-Brlek, S. Andre, R. Roy, H.-J. Gabius, P. A. Heiney, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 9055.
- [114] A. Chernyak, S. Oscarson, D. Turek, *Carbohydrate Research* **2000**, *329*, 309.
- [115] J. H. Pazur, *Methods Carbohydr. Chem.* **1962**, *1*, 335.
- [116] V. Laine, A. Costesarguet, A. Gabelle, J. Defaye, B. Perly, F. Djedainipilard, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1995**, 1479.
- [117] E. Manzo, M. L. Ciavatta, D. Pagano, A. Fontana, *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 879.

## Danksagungen

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die interessante Themenstellung, für seine engagierte Unterstützung und vor allem seiner Geduld bei der Anfertigung dieser Arbeit. Er konnte mich auch bei Rückschlägen immer wieder mit neuen Ideen beeindrucken und mich aufs Neue motivieren.

Herrn Prof. Dr. Gregor Jung möchte ich danken für sein Interesse an meiner Arbeit und seiner Bereitschaft, die Aufgabe des Zweitgutachters zu übernehmen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Prof. Cameron Alexander und seine Arbeitsgruppe an der University of Nottingham in England. Ich hatte dort die Möglichkeit drei wichtige Monate meiner Arbeit auf dem Gebiet der Gentransfektion zu forschen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ingolf Bernhardt sowie den beteiligten Arbeitsgruppenmitgliedern, insbesondere Pierre Hugounenq, danke ich für die Zellversuche und Fluoreszenzmikroskopaufnahmen.

Für die Charakterisierung meiner Proben danke ich besonders Dr. Josef Zapp für die Messung der NMR-Spektren und insbesondere der Kinetikmessungen, Jutta Ganz für die GPC-Messungen und Dr. Mathias Großer für die MS- und LC/MS-Spektren sowie der präparativen HPLC. Für die Unterstützung bei einigen Synthesen möchte ich mich hiermit bei Ronny Heisel bedanken, der einige hilfreiche Substanzen und Vorstufen für mich hergestellt hat

An dieser Stelle möchte ich mich natürlich auch bei meinen Laborkollegen Thomas Stöhr, Irina Grasmück, Christian Teuchert und Sebastian Witt bedanken, mit denen stets eine produktive und freundliche Zusammenarbeit im Labor möglich war.

Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis: Annegret Engelke, Anja Kasten, Axel Müller, Carolin Thiele, Christian Straßnig, Christoph Michel, Daniela Hausen, Katrin Ohliger, Manuel Keil, Melanie Schnabel, Thomas Jung, Thomas Stauner und Tanja Seibert, sowie allen aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises für die immer hilfsbereite Unterstützung, die gute Stimmung und das produktive Arbeitsklima.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern Kornelia und Wilfried Albusat bedanken, die mich bis zuletzt immer auf meinem Lebensweg begleitet hatten. Sie haben alle meine Entscheidungen mitgetragen, wodurch mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht wurden.

Des Weiteren möchte ich allen Freunden, Verwandten und Bekannten danken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2005 bis September 2013 am Institut für Organische Makromolekulare Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Wenz an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

T. Albuzat, M. Keil, J. Ellis, C. Alexander, G. Wenz, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 8558

G. Wenz, C. Gruber, B. Keller, C. Schilli, T. Albuzat, A. Mueller, *Macromolecules* **2006**, *39*, 8021