



**UNIVERSITÄT  
DES  
SAARLANDES**

---

**Selbstorganisation von Cyclodextrinen und  
Polymeren zu Polyrotaxanen  
und deren biomedizinische Anwendungen**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

---

vorgelegt von

M. Sc. Chem.

**Kerstin Egele**

Saarbrücken, 2019

Tag des Kolloquiums: 31.10.2019  
Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Guido Kickelbick  
Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wenz  
Prof. Dr. Marc Schneider  
Vorsitz: Prof. Dr. Johann Jauch  
Akademischer Mitarbeiter: Dr. Matthias Engel

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.07.2016 bis zum 30.06.2019 am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Wenz an der Universität des Saarlandes angefertigt

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist die Synthese von Cyclodextrin-Polyrotaxanen (CD-PRx) und deren Anwendung in der Gentransfektion sowie als polymere Prodrug beschrieben.

Im ersten Teil wurden kationische PRx auf Basis von Ionenen und einem Polyamidin hergestellt und das Komplexierungsvermögen der PRx mit DNA untersucht. Es wurden ca. 120 nm große kationische Polyplexe erhalten. Mittels *in vitro* Transfektionsstudien wurde gezeigt, dass die Transfektionseffizienzen der PRx vergleichbar mit dem kommerziell erhältlichen Polyethylenimin sind und ein Zusammenhang zwischen der Ladungsdichte des Polykations mit der Transfektionseffizienz besteht. Im nächsten Schritt wurden die kationischen Polyplexe zunächst mit anionischer CD-modifizierter Hyaluronsäure und final mit adamantylisiertem Transferrin beschichtet. Diese oberflächenfunktionalisierten Partikel können *via* rezeptorvermittelter Endocytose verbessert in die Zelle aufgenommen werden.

Im zweiten Teil wurde ein anionisches Hydroxypropyl- $\beta$ -CD-Polyrotaxan auf Basis von biokompatiblen Poly(decamethylen phosphat) hergestellt. Dieses kann als *slow release* Formulierung für Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), einem Wirkstoff zur Solubilisierung des aggregierten Cholesterols in der Niemann-Pick (NPC) Krankheit, eingesetzt werden. Nach Bestimmung der Freisetzungskinetik des HP- $\beta$ -CD wurde das therapeutische Potential des PRx an NPC-Fibroblasten evaluiert. Die zelluläre Aufnahme und der Abbau des PRx konnte mit einem fluoreszenzmarkierten PRx nachgewiesen werden.

## Summary

This thesis was focused on the assembly of cyclodextrin-polyrotaxanes (CD-PRx) and their application in gene transfection and for drug delivery.

In the first part, cationic PRx based on ionenes and an polyamidine were assembled and the polyplex formation of these PRxs with DNA was evaluated. The resulting 120 nm sized polyplexes showed transfection efficiencies being comparable to polyethyleneimine, a commercially available cationic transfection agent. Furthermore, a relation between the charge density and the transfection efficiency of polycations was established. In the next step, the cationic polyplexes were coated first with anionic CD-modified hyaluronic acid, and afterwards with adamantylated transferrin. This surface modification enables an enhanced uptake of the particles via receptor mediated endocytosis leading to higher transfection efficiencies.

The second part of this thesis describes the assembly of an anionic PRx from hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) and poly(decamethylene phosphate) as an biocompatible and degradable polymer backbone. This PRx serves as a slow release formulation for HP- $\beta$ -CD, a therapeutically active compound for the treatment of the Niemann Pick disease type C (NPC). After the investigation of the release of HP- $\beta$ -CD from the PRx, the therapeutic potential of the PRx was evaluated in NPC deficient fibroblast cells. The uptake into and the degradation of the PRx within the cells were followed by using a respective PRx labeled with a fluorescence dye.

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>2 ZIELSETZUNG .....</b>	<b>17</b>
<b>3 KATIONISCHE POLYROTAXANE ALS GENCARRIER .....</b>	<b>18</b>
3.1 Einleitung .....	18
3.2 Synthese der Bausteine .....	26
3.3 Herstellung, Charakterisierung und Stabilität der DNA-Polykation-Nanopartikel .....	56
3.4 Gentransfektion mit Polyrotaxan-Polyplexen .....	63
3.5 Oberflächenmodifizierung der Nanopartikel zur targetvermittelten Aufnahme .....	77
3.6 Zusammenfassung & Ausblick.....	102
<b>4 POLYROTAXANE ZUR THERAPIE DER NIEMANN-PICK KRANKHEIT .....</b>	<b>103</b>
4.1 Einleitung .....	103
4.2 Synthese der Bausteine .....	108
4.3 Herstellung und Stabilität des Polyrotaxans.....	110
4.4 Evaluierung der biologischen Aktivität des HP- $\beta$ -CD-Polyrotaxans in NPC1-Zellen .....	116
4.5 Zusammenfassung und Ausblick .....	130
<b>5 EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>131</b>
5.1 Material .....	131
5.2 Methoden und Geräte .....	132
5.3 Präparativer Teil .....	134
<b>6 ANHANG .....</b>	<b>167</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>169</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>178</b>
<b>SCHEMAVERZEICHNIS .....</b>	<b>185</b>

<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>186</b>
<b>SUBSTANZVERZEICHNIS .....</b>	<b>187</b>
<b>ABKÜRZUNGSVRZEICHNIS .....</b>	<b>188</b>
<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>191</b>

## 1 EINLEITUNG

Noch immer stellt die Therapie von Krebserkrankungen, aber auch neurodegenerativer, Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen eine Herausforderung dar, da die Behandlung mit konventionellen, systemisch verabreichten Wirkstoffen häufig nur zu einem limitierten Therapieerfolg führt. Die meisten der dabei derzeit klinisch eingesetzten Therapeutika (*active pharmaceutical ingredient*, API) sind niedermolekulare Verbindungen (in der Regel < 500 g/mol). Diese APIs haben nur eine kurze Halbwertszeit im menschlichen Körper, da sie schnell durch die Nieren ausgeschieden werden. Niedermolekulare Wirkstoffe verteilen sich im ganzen Körper, und nur wenige Moleküle erreichen letztendlich den gewünschten Wirkort. Daher müssen hohe Dosen verabreicht werden, was wiederum mit unerwünschten Nebenwirkungen einhergeht, sodass der therapeutische Index dieser Verbindungen oft gering ist.<sup>1</sup>

Ein Ansatz zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften und zum zielgerichteten Wirkstofftransport ist das Design makromolekularer Wirkstofftransportsysteme. Im Bereich der interdisziplinären Forschung an der Schnittstelle der Polymerchemie und der Biomedizin wurden in den letzten Jahren eine Reihe neuer polymerer Wirkstofftransportsysteme entwickelt.

Eine gängige Methode, um Wirkstoffsysteme mit verbesserten Transporteigenschaften zu erhalten, ist es, kleine Moleküle mit polymeren Carriern, wie PLGA oder modifizierter Stärke, physikalisch zu mischen.<sup>2,3</sup> Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die schnelle Freisetzung des Wirkstoffes vom Trägermaterial, der sogenannte *burst release*, durch die nur sehr schwachen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Carrier.<sup>2</sup> Weiterhin werden bei makromolekularen Wirkstofftransportsystemen nanopartikuläre Systeme, wie beispielsweise Liposome oder Polyplexe (im Fall von Nukleinsäuren), und Polymer-Wirkstoffkonjugate unterschieden.<sup>1</sup> Bei einem Polymer-Wirkstoffkonjugat werden Wirkstoffe kovalent an ein Polymer, z.B. ein Protein, Polysaccharid oder synthetisches Polymer gebunden. Wird der niedermolekulare Wirkstoff über einen spaltbaren Linker an das Polymer angebunden, spricht man von einer polymeren Prodrug. Dabei können neben dem Wirkstoff zusätzlich targetspezifische Moleküle an das makromolekulare Wirkstofftransportsystem angeknüpft werden. Optional können diverse weitere Funktionalitäten, wie z.B. löslichkeitsvermittelnde Gruppen, die die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffcarriers erhöhen, an das Polymer angeknüpft werden. Nach Erreichen des Wirkortes wird der Wirkstoff schließlich vom Polymer abgespalten und liegt in seiner therapeutisch aktiven Form vor. Idealerweise ist das Polymer biokompatibel und bioabbaubar. Der Begriff der polymeren Prodrugs wurde in den 1960er Jahren von H. Ringsdorf geprägt und später besonders von R. Langer realisiert.<sup>4,5</sup>

Das hohe Molekulargewicht eines polymeren Prodrugs verhindert seine schnelle renale Ausscheidung und erhöht damit die Zirkulationszeit der Verbindung im Blutkreislauf. Des Weiteren können makromolekulare Wirkstoffsysteme grundsätzlich gut mittels Endocytose in Zellen aufgenommen werden, wobei eine zusätzliche Targetfunktionalisierung für einen zielgerichteten Transport und eine spezifische Aufnahme der polymeren Prodrugs sorgt.

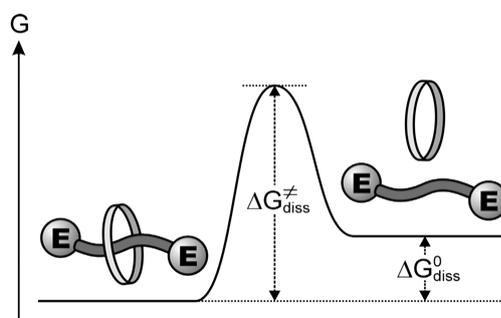
Polymere Wirkstoffcarrier wurden bereits eingesetzt, um die Löslichkeit und die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen zu erhöhen.<sup>6,7</sup> Ein weiterer Vorzug von Polymeren gegenüber kleinen Molekülen ist die Art der Aufnahme: während niedermolekulare Wirkstoffe über Diffusion oder aktiven Transport internalisiert werden, können Polymere schnell via Endocytose aufgenommen werden.<sup>8</sup> Weitere Vorteile von Polymeren sind die geringere To-

xizität und Osmolarität.<sup>6</sup> Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts werden Polymere nur langsam über die Nieren ausgeschieden.<sup>9–11</sup> Insgesamt können somit unerwünschte Nebenwirkungen einerseits durch geringere Dosen, andererseits durch die Maskierung des Wirkstoffs in seiner polymergebundenen Form reduziert werden.<sup>1</sup>

Eine interessante Alternative als polymere Wirkstoffcarrier stellen Polyrotaxane dar. Rotaxane sind supramolekulare Strukturen, welche aus einem oder mehreren Ringe auf einer Achse aufgebaut.<sup>12</sup> Sterisch anspruchsvolle Stoppergruppen an den Enden des Rotaxans verhindern das Abfädeln der Ringe von der Achse. Als Achse dient ein Molekül, welches durch die Kavität des Rings gefädelt wird, üblicherweise handelt es sich dabei um ein lineares Polymer.<sup>13</sup> Als Ringe kommen eine Vielzahl makrozyklischer Moleküle zum Einsatz, beispielsweise Kronenether<sup>14</sup>, Cyclodextrine (CD)<sup>15</sup> oder Cucurbiturile.<sup>16,17</sup> Sind mehrere Makrocyclen auf einem Polymer aufgefüdelt, wird das Konstrukt als Polyrotaxan (PRx), bzw. als Pseudopolyrotaxan bezeichnet, wenn die Endgruppen des Polymers kleiner sind als die Kavität der Makrozyklen. Der schematische Aufbau eines Hauptketten-Polyrotaxans ist in Abb. 1 dargestellt. Es besteht keine kovalente Bindung zwischen dem Polymer und den cyclischen Molekülen. Die aufgefüdelten Ringe können sich entlang des Polymers bewegen und rotieren. Dennoch sind Polyrotaxane kinetisch stabile Konstrukte.<sup>12</sup> Um Ringe von der Achse des Rotaxans zu entfernen, muss eine Aktivierungsenergie aufgebracht werden (Abb. 2). Die Lebensdauer eines Polyrotaxans steigt folglich mit Zunahme dieser Aktivierungsenergie.<sup>12</sup>



**Abb. 1:** Schematische Darstellung eines Polyrotaxans.

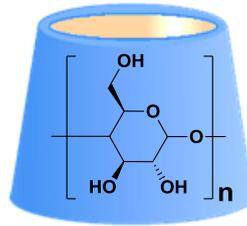


**Abb. 2:** Energiediagramm für ein Rotaxan und seine Bestandteile. E = Endgruppe.

Reprinted with permission from G. Wenz, B.-H. Han and A. Müller, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 782–817.

Copyright 2006, American Chemical Society.

Häufig verwendete Makrocyclen zur Herstellung von Polyrotaxanen sind Cyclodextrine, cyclische Oligomere der Glucose, die über enzymatischen Abbau durch Cyclodextringlycosyltransferasen aus Stärke gewonnen werden.<sup>18</sup> Sie sind aus Anhydroglucoseeinheiten aufgebaut, welche über  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind.<sup>18</sup> Der allgemeine Aufbau eines CD ist in Abb. 3 visualisiert. Die drei industriell produzierten CD,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -CD, bestehen jeweils aus 6, 7 und 8 Glucoseeinheiten. CD haben eine kegelartige Struktur, mit den primären Hydroxygruppen am schmalen Ende, und den sekundären Hydroxygruppen an der weiten Seite.

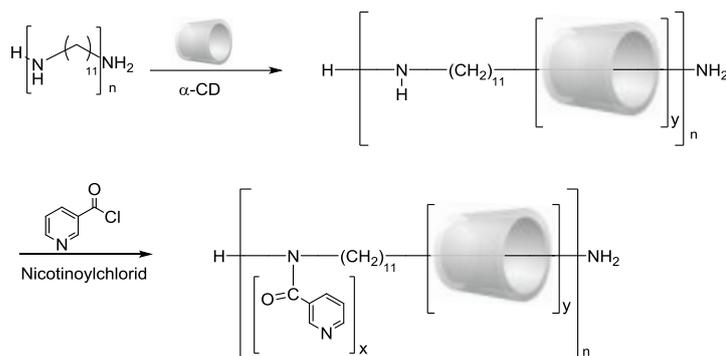


**Abb. 3:** Allgemeiner Aufbau eines Cyclodextrins.

Im Vergleich zu anderen cyclischen Molekülen haben Cyclodextrine diverse Vorteile: CD sind in großen Mengen und hoher Reinheit kostengünstig erhältlich. Sie sind wasserlöslich, biokompatibel und weisen unter physiologischen Bedingungen nur sehr niedrige Toxizitäten auf.<sup>19</sup> An den Hydroxygruppen und primären C-Atomen können CD nahezu unbegrenzt funktionalisiert werden.<sup>20</sup> Durch ihre konische Form mit polarer Außenfläche und hydrophober Kavität sind CD gut wasserlöslich und können Einschlussverbindungen mit apolaren Gastmolekülen eingehen. Die Stabilität der nichtkovalenten Wirt-Gast-Komplexe ist vom Größenverhältnis des Gast-Moleküls zur Kavität abhängig. Von  $\beta$ -CD sind beispielsweise Einschlussverbindungen von 4-*tert*-Butylphenol, Naphthalin, Ferrocen und Adamantanderivaten bekannt, wobei die Adamantanverbindungen die stabilsten Komplexe bilden.<sup>21,22</sup> CD werden bereits erfolgreich als FDA-zugelassene pharmazeutische Hilfsstoffe in Wirkstoffformulierungen kleiner APIs eingesetzt, um beispielsweise deren Wasserlöslichkeit durch den Einschluss zu erhöhen.<sup>23,24</sup>

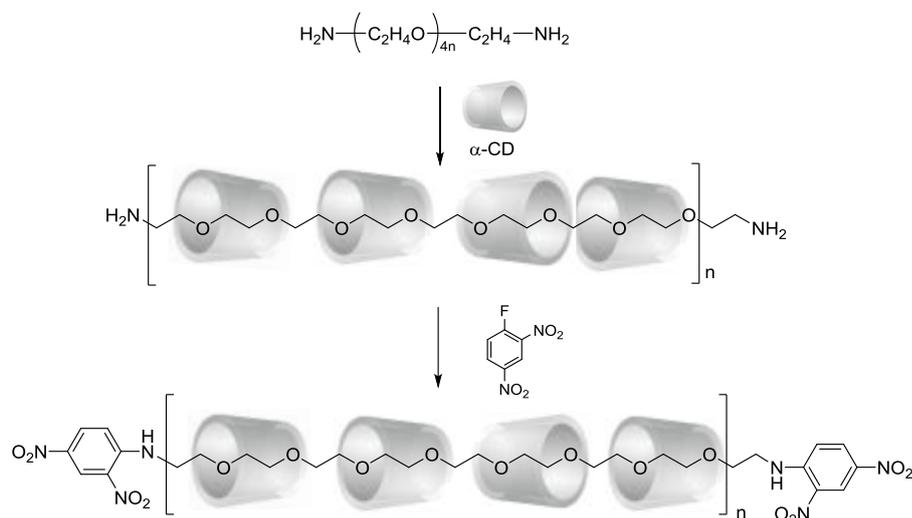
Durch Bildung einer Einschlussverbindung von Cyclodextrinen mit einem linearen Polymer können Polyrotaxane oder Pseudopolyrotaxane erhalten werden. Die Triebkraft für solche Einschlussverbindungen sind hydrophobe Wechselwirkungen, Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den aufgefädelt Ringen, sowie Wasserstoffbrücken zwischen der hydrophoben Kavität des Cyclodextrins und den ebenfalls hydrophoben Segmenten eines Polymers. Des Weiteren wird Energie frei, wenn Wassermoleküle aus der Kavität des CD freigesetzt werden und durch ein hydrophobes Gastpolymer ersetzt werden.<sup>25,26</sup>

Die ersten CD-Polyrotaxane wurden 1992 von Wenz *et al.*<sup>27</sup> und Harada *et al.*<sup>28</sup> beschrieben. 1993 synthetisierte Wenz *et al.*<sup>29</sup> bereits Polyrotaxane aus  $\alpha$ -CD, die auf Poly(iminooligomethylen)en aufgefädelt sind. Die CD fädeln dabei in wässriger Lösung spontan auf die hydrophoben Segmente des Polymers auf. Um das Abfädeln der CD-Ringe zu verhindern, wurden durch Umsetzung des PRx mit Nicotinoylchlorid sterisch anspruchsvollen Gruppen längs der Ketten eingeführt. Das Polyrotaxan ist in Abb. 4 dargestellt. Die Struktur der Polyrotaxane kann mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Jedes hydrophobe Oligomethylen-Segment stellt eine mögliche Bindungsstelle für ein CD dar, während polare oder sogar geladene Gruppen im Polymer eine Energiebarriere darstellen, die überwunden werden muss.



**Abb. 4:** Polyrotaxan nach Wenz *et al.*<sup>29</sup> Mit  $x = 0.025$  und  $y = 0.10$  ist an 2.5 % der Polymereinheiten eine Nicotinoylgruppe eingeführt und 10 % aller Polymereinheiten sind durch ein  $\alpha$ -CD besetzt.

Ein von Harada *et al.*<sup>30</sup> beschriebenes Polyrotaxan besteht aus  $\alpha$ -CD-Ringen, die auf ein  $\alpha$ ,  $\omega$ -Diaminopolyethylenglycol aufgefädelt werden. Nachträglich eingeführte 2,4-Dinitrofluorbenzolgruppen verhindern das Abfädeln der  $\alpha$ -CD, vgl. Abb. 5.



**Abb. 5:** Polyrotaxan nach Harada *et al.*<sup>30</sup>

Entscheidend für die Stabilität der CD-Polyrotaxane ist die Korrelation zwischen dem sterischen Anspruch des Polymers und dem inneren Durchmesser des CD.<sup>13</sup> So können beispielsweise Einschlussverbindungen aus Polyethylenglycol (PEG) mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ -CD, jedoch nicht mit  $\beta$ -CD gebildet werden.<sup>31,32</sup> Im Gegensatz hierzu werden mit dem sterisch anspruchsvolleren Polymer Polypropylenoxid Einschlussverbindungen mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD, nicht aber mit  $\alpha$ -CD eingegangen, da der sterische Anspruch des Polymers im Vergleich zur Kavität des  $\alpha$ -CD zu groß ist.

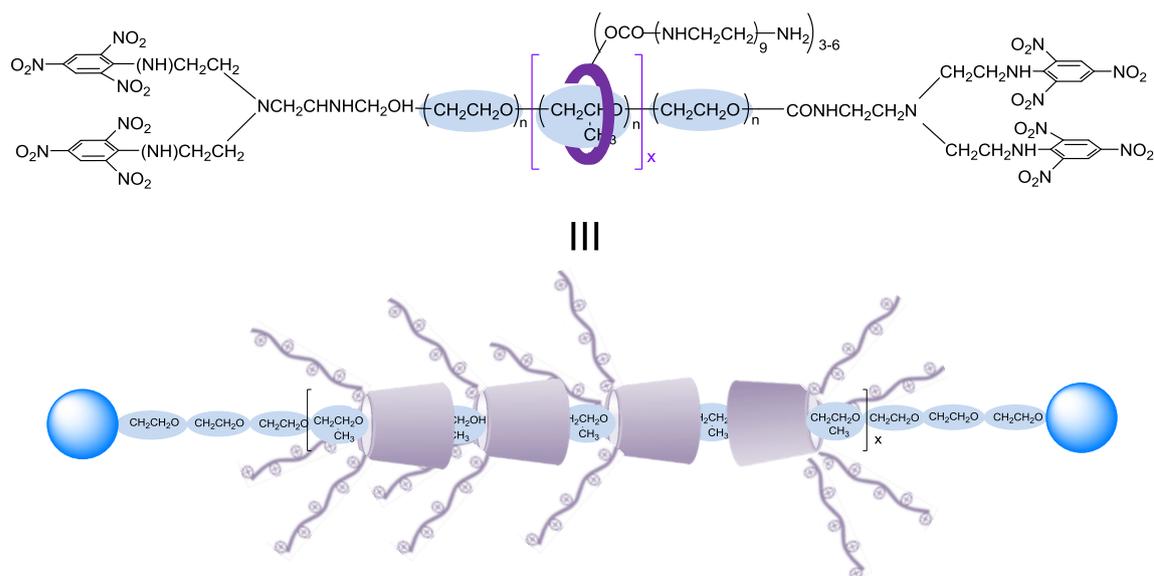
Statt kovalent angeknüpften Stoppergruppen können jedoch auch supramolekulare Stoppergruppen für Pseudopolyrotaxane verwendet werden. Dieses Prinzip wurde von Kräuter und Wenz entwickelt.<sup>33</sup> Dabei wurde an den Enden eines  $\beta$ -CD-Polyrotaxans  $\alpha$ -CD als Stoppergruppen aufgefädelt.  $\alpha$ -CD bilden aufgrund ihres kleineren inneren Durchmessers kinetisch stabile Komplexe mit dem Polymer an den Kettenenden, sodass das Abfädeln der größeren  $\beta$ -CD-Ringe unterbunden wird. Mit diesem einfachen Prinzip kann die aufwendige Modifizierung der Endgruppen des Polyrotaxans zum Einführen kovalenter Stoppergruppen vermieden werden.

Bisher wurden neben PEG<sup>28</sup> bereits diverse Polymere, Polypropylenglycol (PPG)<sup>34,35</sup>, Poly(oligomethylenimin)<sup>27</sup> und Derivate, aber auch Polyamide<sup>36</sup> und Polyester<sup>37</sup> mit CD komplexiert, um Polyrotaxane zu erhalten. Sie fanden materialchemische Anwendungen sowie Verwendung als molekulare Maschinen.<sup>38,39</sup> CD-Polyrotaxane haben jedoch aufgrund ihrer niedrigen Toxizität, kontrollierbaren Größe und vielfältigen supramolekularen Struktur seit Beginn auch ein breites Anwendungsspektrum im biomedizinischen Bereich erlangt.<sup>40–43</sup>

Durch die Möglichkeit, viele Funktionen in einem Polymerstrang zu vereinen, bieten Polyrotaxane eine Reihe von besonderen Vorteilen gegenüber klassischen Polymeren: Zunächst können sie ausgehend von einfachen und mindertoxischen Grundbausteinen in wässriger Lösung hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil stellt die hohe Mobilität des CD entlang des Polymers dar. CD sind lediglich über supramolekulare Wechselwirkungen an das Polymer gebunden, und sind daher besonders beweglich und flexibel. Letztendlich kann die Größe und Gesamtladung des Polyrotaxans einfach gesteuert und variiert werden.<sup>12</sup> Die Hauptanwendungen polyfunktionaler Polyrotaxane im medizinisch-pharmazeutischen Bereich sind der Wirkstofftransport, hauptsächlich als polymere Prodrug, sowie der Nukleinsäuretransport (Gentransfektion).

Die Gentransfektion mit Hilfe von Polykationen wird generell als Herausforderung betrachtet, um Alternativen zu bisherigen viralen Vektorsystemen zu etablieren, da diese zwar hohe Transfektionsraten erzielen, jedoch auch starke Immunreaktionen hervorrufen können.<sup>44</sup> Es wurde gezeigt, dass kationische Polyrotaxane, die aus einem Polymer und kationischen CD bestehen, als Carrier eingesetzt werden können.<sup>45</sup> Durch die freie Beweglichkeit der CD entlang der Kette werden besonders enge und dichte DNA-Komplexe (Polyplexe) gebildet, wodurch nur geringe Mengen des Polyrotaxans zur vollständigen Komplexierung der DNA nötig sind. Bei beginnender Dissoziation der Polyrotaxane wird der Zusammenhalt des Polyplexes schwächer und die komplexierte DNA wird freigesetzt. Zusammen mit der geringen Toxizität der Polyrotaxane (bis zu 100-fach geringer als PEI) und der Option zur Bioabbaubarkeit macht es sie zu vielversprechenden Gencarriern.<sup>46</sup>

Das erste Beispiel hierzu waren Oligoethylenimin-funktionalisierte  $\beta$ -CD-Ringe, die auf ein Pluronic Triblockcopolymer aufgefädelt wurden. Als Endgruppen diente 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonat.<sup>47</sup>  $\beta$ -CD wurde hierbei gewählt, da es in Kombination mit Polypropylenglykol stabile Einschlussverbindungen bildet, und sich das CD dennoch entlang der Kette bewegen kann und somit effizient die DNA komplexieren kann (Abb. 6). Durch die kürzeren Ethyleniminketten am CD wurde die Toxizität im Vergleich zum üblicherweise verwendeten Polyethylenimin (PEI, 25 kDa) reduziert. Die übrigen, nicht durch DNA komplexierten Oligoethyleniminketten dienten der Assoziation des Partikels mit der Zellmembran.<sup>48</sup> Später wurden diverse weitere Polyrotaxan-Systeme zur Gentransfektion entwickelt, wobei auch bioabbaubare Polyrotaxane beschrieben wurden. Dabei wurden beispielsweise Disulfidbrücken als Sollbruchstellen eingeführt, die unter reduktiven Bedingungen gespalten werden, wodurch die Freigabe der DNA aus dem Polyplex induziert wird.<sup>49</sup>



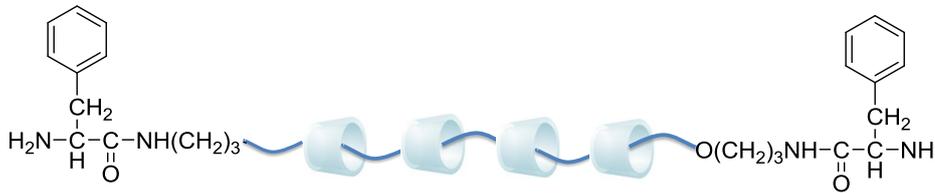
**Abb. 6:** Erstes kationisches Polyrotaxan zur Gentransfektion von Li *et al.*<sup>13,47</sup>

Ein weiteres Einsatzgebiet der Polyrotaxane ist der Transport von Wirkstoffen. CD und Polymere wie PEG und dessen Copolymere verfügen über biokompatible Eigenschaften. Sie stellen damit hervorragende Edukte zur Herstellung supramolekularer Einschlussverbindungen als Basis für Hydrogele zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung dar. Ein typisches Beispiel hierfür sind Polyrotaxane aus PEG mit  $\alpha$ -CD, welche über einen weiten Konzentrationsbereich Gele bilden.<sup>50</sup> Diese Gele haben thixotrope Eigenschaften und können mit bioaktiven Molekülen wie Wirkstoffen, Proteinen oder Plasmid-DNA beladen werden.<sup>51</sup>

Neben dem Einsatz von Polyrotaxanen als Hydrogel-Matrix für Wirkstoffe können Polyrotaxane selbst auch als polymerer Wirkstoffkomplex dienen, indem die Wirkstoffe oder funktionalen Proteine an die CD geknüpft werden und auf ein Polymer aufgefädelt werden.<sup>46</sup> Durch Funktionalisierung der Hydroxygruppen der CD können die Wirkstoffe an CD konjugiert werden und dann auf ein Polymer aufgefädelt werden. Die hohe Beweglichkeit der CD auf dem Polymer ermöglicht eine flexible multivalente Wechselwirkung des konjugierten Wirkstoffs am Polyrotaxan mit dem Wirkstoffrezeptor, ähnlich wie die oben beschriebene Interaktion des kationischen Polyrotaxans mit dem anionischen Phosphatrückgrat der DNA. Durch die multivalenten Wechselwirkungen mit Rezeptoren wurden Polyrotaxane zu attraktiven Transportsystemen im gezielten Wirkstofftransport.<sup>13</sup> Darüber hinaus können CD-Wirkstoffkonjugate vom Polyrotaxan freigesetzt werden, wenn die sterisch anspruchsvollen Endgruppen über biospaltbare Bindungen eingeführt wurden, so dass Polyrotaxane gleichzeitig als polymere *Prodrugs* und *slow release* Formulierungen fungieren können.

Aufgrund der supramolekularen Wechselwirkung sind Polyrotaxan-Prodrugs kinetisch weniger stabil als klassische polymere Prodrugs, da keine kovalenten Bindungen gespalten werden müssen, um den Wirkstoff freizusetzen. Sie sind jedoch weitaus stabiler als physikalische Mischungen von Wirkstoffen und Polymeren und stellen somit die ideale Basis für polymere Wirkstoffcarrier dar.<sup>18,52</sup>

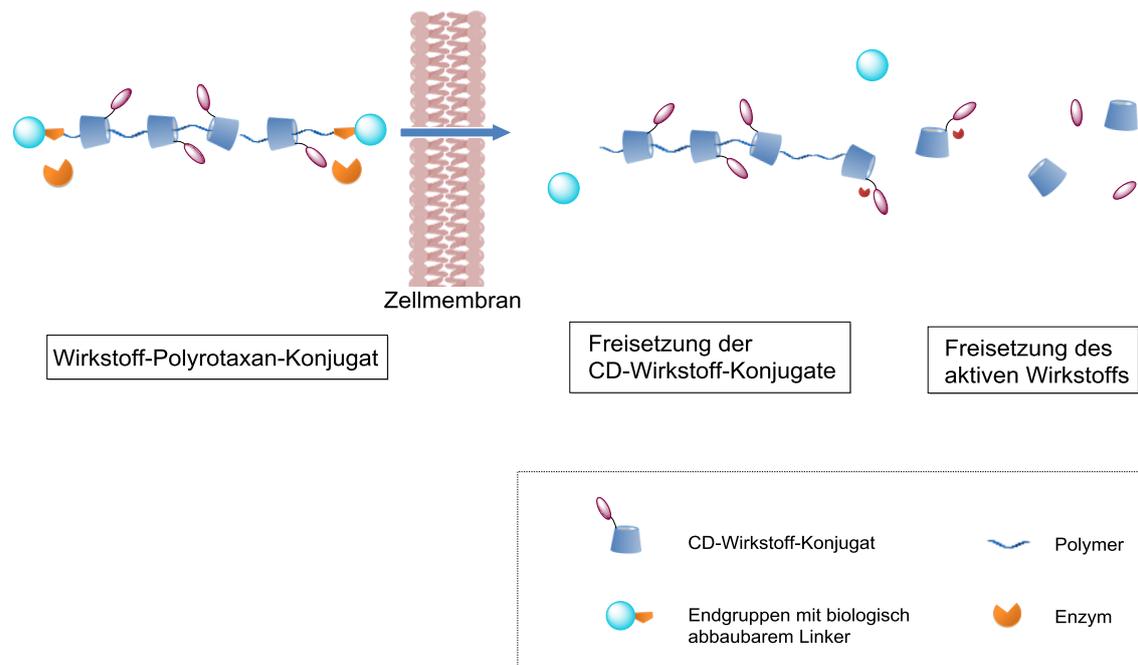
In diesem Zusammenhang wurden bereits 1995 die ersten bioabbaubaren Polyrotaxane von Ooya *et al.* beschrieben.<sup>53</sup> Dabei wurde ein Polyrotaxan aus  $\alpha$ -CD und PEG hergestellt. An den Enden des Polyrotaxans wurde *L*-Phenylalanin als Stoppergruppe über eine spaltbare Peptidbindung eingeführt (Abb. 7).



**Abb. 7:** Erstes bioabbaubares Polyrotaxan nach Ooya *et al.*<sup>53</sup>

Mittlerweile gibt es diverse spaltbare Funktionen, die in ein Polyrotaxan eingebaut werden und beispielsweise durch spontane Hydrolyse (z.B. von Esterbindungen) und enzymatischen Abbau (beispielsweise bei Peptidbindungen) gespalten werden. Auch induzierte Spaltungen des Polymers bei pH-Änderung (z.B. Hydrazonbindung) oder unter reduktiven Bedingungen (z.B. Disulfidbrücken, jedoch ebenfalls enzymatisch spaltbar) sind möglich.

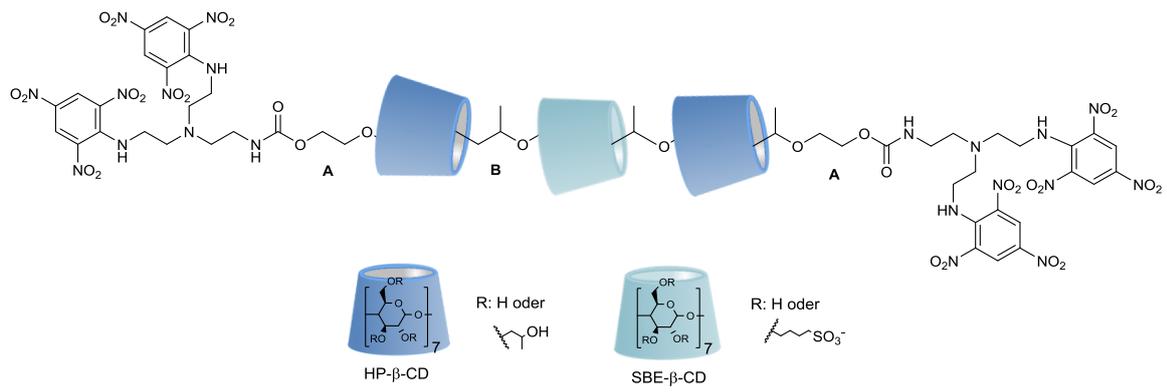
Als Beispiel für ein *slow release* Wirkstofftransportsystem wurden von Ooya und Yui Theophyllin, ein Wirkstoff gegen Bronchialerkrankungen, an  $\alpha$ -CD konjugiert und anschließend ein Polyrotaxan analog zu Abb. 7 hergestellt. Nach enzymatischer Spaltung der Peptidbindungen (z.B. durch Papain) wurde das Polyrotaxan in seine Bestandteile (PEG, Theophyllin- $\alpha$ -CD-Konjugat und *L*-Phenylalanin) abgebaut.<sup>38</sup> Es ist ebenfalls möglich, CD co-aufzufädeln, die mit einer Targetfunktion versehen wurden, sodass die Aufnahme des Polyrotaxans über targetvermittelte Endocytose erfolgen kann. Durch das flexible Baukastensystem gibt es beliebig viele Kombinationsmöglichkeiten zur Funktionalisierung von Polyrotaxanen. Auch der Gehalt der verschiedenen funktionalisierten CD auf dem Polyrotaxan kann gesteuert werden. Der schematische Aufbau eines Wirkstoff-Polyrotaxan-Konjugats ist in Abb. 8 visualisiert.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung eines Wirkstoff-Polyrotaxan-Konjugats und langsame Freisetzung des CD-Wirkstoff-Konjugats nach enzymatischer Spaltung der Stoppergruppen, in Anlehnung an <sup>13</sup>.

Ein Sonderfall des Wirkstofftransports mittels Polyrotaxanen ist der Transport des CD selbst. Bei einigen Krankheiten fungieren Cyclodextrine selbst als API. Beispielsweise wird HP- $\beta$ -CD in klinischen Studien zur Therapie der Niemann-Pick Typ C Erkrankung eingesetzt, da dieses Derivat eine Einschlussverbindung mit Cholesterol eingehen kann und somit angereichertes, aggregiertes Cholesterol solubilisieren kann. In diesem Fall stellen Polyrotaxane die idealen polymeren Prodrugs dar, da freies  $\beta$ -CD Cholesterol aus der Zellmembran von Erythrozyten entzieht und diese damit geschädigt werden. Durch Komplexierung der CDs mit dem Polymer ist die Kavität des CD belegt, sodass kein Cholesterol aus der Zellmembran entzogen werden kann. Die akute Toxizität ist damit verringert. Gleichzeitig ist durch den Einschluss der CDs auf dem Polymer die molekulare Masse des Konstrukts deutlich erhöht, sodass die schnelle Ausscheidung der CD über die Nieren unterbunden wird und das Polyrotaxan mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen werden kann. Dort wird HP- $\beta$ -CD als aktiver Wirkstoff kontinuierlich freigesetzt.

Von D. Thompson<sup>56-58</sup> wurde bereits ein derartiges Polyrotaxan auf PEG-PPG Basis beschrieben. Auf das Polymer wurden HP- $\beta$ -CD-Ringe (und Sulfobutylether- $\beta$ -CD) aufgefädelt, deren vorschnelles Abfädeln durch sterisch anspruchsvolle Endgruppen verhindert wurde. Ein Beispiel für ein solches Polyrotaxan ist in Abb. 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Polyrotaxan auf Pluronic-Basis von Thompson *et al.*<sup>56</sup>

## 2 ZIELSETZUNG

Ziel der Arbeit ist die Herstellung neuer CD-Polyrotaxane und die Evaluierung ihres Potentials in der Gentransfektion und als polymeres Prodrug.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen neue, möglichst biokompatible kationische CD-Polyrotaxane aus Ionen und Polyamidin zur Gentransfektion hergestellt werden. Supramolekulare Stoppergruppen sollen die schnelle Dissoziation der PRx verhindern. Im Vergleich zu Polyethylenimin werden aufgrund der Beweglichkeit der kationischen  $\beta$ -CD entlang des Polymers besonders dichte Komplexe mit DNA erwartet, sodass die benötigte Masse an zellschädigenden Polykation zur Komplexbildung der DNA verringert werden kann.

Nach Herstellung der kationischen Polyrotaxane soll zunächst ihre Zytotoxizität evaluiert werden. Im nächsten Schritt sollen Polyplexe aus DNA und Polyrotaxan hergestellt werden und unter anderem mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert werden. Die Transfektionseffizienz der Polyrotaxane im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Polyethylenimin soll in einem Luciferase- und GFP-Assay bestimmt werden.

Im letzten Schritt soll die Oberfläche der Polyplexe durch Beschichtung mit Hyaluronsäure und Targetfunktionalisierung mit Transferrin modifiziert werden. Nach der Charakterisierung der Partikel soll untersucht werden, ob die Oberflächenmodifikation der Nanopartikel zu einer verbesserten Aufnahme mittels rezeptorvermittelter Endocytose führt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein Polyrotaxan als polymeres Prodrug für HP- $\beta$ -CD zur Therapie der Niemann Pick Typ C Krankheit hergestellt werden. Im Gegensatz zu den bereits existierenden HP- $\beta$ -CD Polyrotaxanen auf Polyethylenglycol-Basis, welche nicht bioabbaubar sind und die enzymatische Abspaltung der Stoppergruppe Voraussetzung für die Freisetzung der HP- $\beta$ -CD ist, soll hier das anionische Poly(decamethylenphosphat) zum Einsatz kommen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit natürlich vorkommenden Phosphatdiestern wird eine hohe Biokompatibilität erwartet, sowie ein möglicher Abbau des Polymers durch Phosphatasen. Auch bei diesem Polyrotaxan sollen supramolekulare Stoppergruppen das schnelle Abfädeln der  $\beta$ -CD verhindern. Zunächst soll die Freisetzung der HP- $\beta$ -CD vom Polyrotaxan untersucht werden, anschließend soll das therapeutische Potential des Polyrotaxans an Niemann Pick Typ C Zellen bestimmt werden. Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme sowie der Dissoziation des PRx soll eine entsprechend fluoreszenzmarkiertes Polyrotaxan zum Einsatz kommen.

### 3 KATIONISCHE POLYROTAXANE ALS GENCARRIER

#### 3.1 Einleitung

##### 3.1.1 Gentherapie mit Polyrotaxanen

Die Zahl der durch Gendefekte bedingten Krankheiten nimmt in den letzten Jahren stark zu. So basieren beispielsweise Krankheiten wie zystische Fibrose, Hämophilie, der Parkinsonschen Krankheit, Alzheimer oder Krebs auf Fehlern durch Mutationen von Erbgut.<sup>59</sup> Diese Gendefekte können sowohl im Laufe des Lebens erworben sein, als auch als defekte Gene geerbt worden sein. Durch klassische Therapiemethoden ist es inzwischen möglich geworden, die Symptome durch operative Behandlungen sowie Chemo- und Strahlentherapie zu lindern oder sogar zu beheben.<sup>60</sup> Dennoch führen hohe Dosierungen der Therapeutika zu starken Nebenwirkungen und schädigen gesunde Zellen. Auch bei der Strahlentherapie kann gesundes Gewebe zerstört werden. Ein anderes Hindernis ist beispielsweise auch die Resistenzentwicklung gegenüber den verabreichten Medikamenten.

Eine vielversprechende Möglichkeit zur Behebung der genetischen Ursachen von Erkrankungen, die gezielte Behandlung von Gendefekten, stellt die Gentherapie dar. Dabei können durch Einführen von Nukleinsäuren (Ribonukleinsäuren, RNA oder DNA) in eukaryotische Zellen mutierte oder defekte Gene ausgeschaltet, oder neue Gene hinzugefügt werden. Auf diese Weise können benötigte Proteine selbst produziert werden oder die Produktion unerwünschter Proteine vermieden werden, sodass eine Heilung der Krankheit möglich wird.<sup>61</sup>

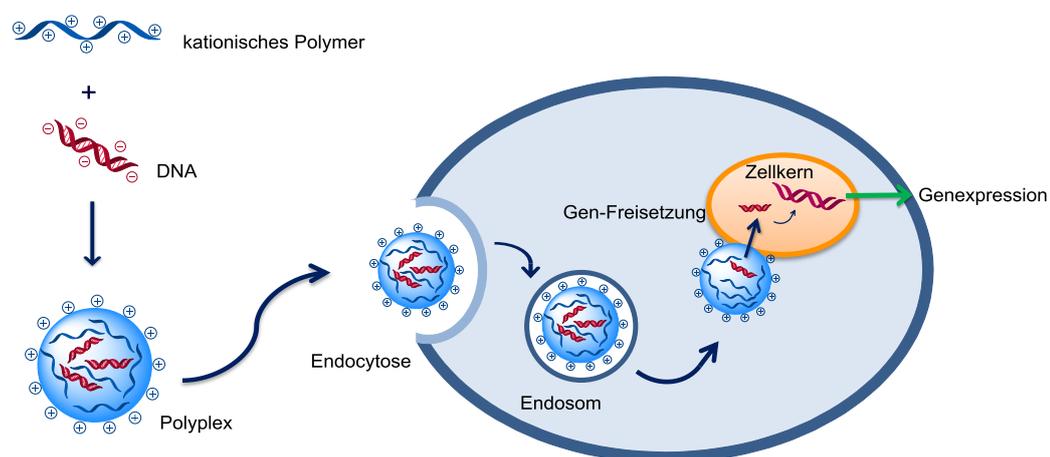
Die erste Modifizierung des humanen Erbguts gelang 1980 Martin Cline.<sup>62</sup> 1990 wurde zum ersten Mal ein gentherapeutischer Ansatz verfolgt.<sup>63</sup> Die zentrale Herausforderung bei der Gentransfektion liegt im Transport der Gene und im Einbringen der Gene in die Zellen. Dabei müssen zunächst Interaktionen mit Blutbestandteilen und vaskulären Endothelzellen verhindert werden. Die therapeutischen Nukleinsäuren müssen weiterhin vor dem Abbau durch Nukleasen im Serum geschützt werden. Ein weiteres Hindernis stellt die negativ geladene Zellmembran dar, die von den ebenfalls negativ geladenen Nukleinsäuren durchdrungen werden muss. Während es bei RNA ausreichend ist, wenn die Nukleinsäuren in die Zelle gelangt, muss DNA den Zellkern erreichen.<sup>64,65</sup>

Grundsätzlich stehen drei Möglichkeiten der Gentransfektion zur Wahl: die virale Transfektion, die physikalische Transfektion und die biochemische Transfektion. Bei der viralen Transfektion (auch Transduktion), beispielsweise mit Retroviren, bleibt die Hülle des Virus erhalten, die enthaltenen virale Gene werden jedoch durch das Transgen ausgetauscht. Durch den Einschluss in die Virushülle wird die RNA automatisch vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Der modifizierte Virus kann dann alle Zellen transfizieren, die über die entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche verfügen. Mit dieser Methode können hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden, jedoch löst sie bei Patienten häufig eine immunogene Reaktion aus, die tödlich sein kann.<sup>66</sup>

Eine weitere Methode ist die physikalische Transfektion. Hierbei wird die DNA durch physikalische Methoden durch die Membran in die Zelle eingeführt. Beispiele hierfür sind die Mikroinjektion durch die Zellmembran, oder die Elektroporation, bei der die Membran durch kleine Spannungspulse durchlässig für Nukleinsäuren gemacht wird. Die physikalische Transfektion ist für alle Zellarten geeignet, weist allerdings nur eine geringe Transfektionseffizienz auf und führt zu Stressreaktionen der Zellen durch die Membranschädigungen.<sup>66</sup>

Die dritte Transfektionsart ist die biochemische Transfektion. Bei dieser Methode wird die negative Ladung der Nukleinsäuren durch Komplexbildung mit kationischen Substanzen abgeschirmt. Es bilden sich Partikel, welche *via* Endocytose in Zellen aufgenommen werden können. Eine häufig verwendete Art der biochemischen Transfektion ist die Calcium-Phosphat-Präzipitation. Dabei wird ein unlöslicher Komplex aus DNA und Calciumphosphat gebildet, welcher sich an der Zellmembran abscheidet und schließlich über Endocytose in die Zelle aufgenommen werden kann.<sup>67</sup> Mit diesem preisgünstigen Verfahren werden jedoch nur geringe Transfektionseffizienzen erreicht.<sup>65,68</sup>

Neben der Calcium-Phosphat-Präzipitation ist eine Komplexbildung der DNA auch mit organischen, kationischen Polymeren möglich. Bei der Komplexbildung der anionischen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats mit kationischen Gruppen des Polymers werden kleine Partikel mit einer Größe von etwa 30 – 200 nm, sogenannte Polyplexe, gebildet. Analog können auch kationische Lipide eingesetzt werden (Lipofektion).<sup>69</sup> Kationische Lipide sind allerdings aufgrund stark hydrophober Bereiche im Gegensatz zu kationischen Polymeren schlechter wasserlöslich.<sup>70,71</sup> In beiden Fällen wird trotz teilweise starker Zelltoxizität eine hohe Transfektionseffizienz erreicht.<sup>72</sup> Das Prinzip der biochemischen Transfektion mit kationischen Polymeren ist in Abb. 10 zusammengefasst.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung der biochemischen Gentransfektion.<sup>73</sup>

Erstmals wurde 1995 von *Boussif et al.*<sup>74</sup> Polyethylenimin als kationisches Polymer zur Komplexbildung von DNA verwendet. Die gebildeten Polyplexe können über ionische Wechselwirkungen zwischen dem Polykation und den anionischen Phosphatgruppen der Membranlipide mittels Endocytose in die Zelle eingeschleust werden und liegen dann in Vesikeln im Zytoplasma vor. Bei Polyethylenimin ist jedes dritte Atom ein protonierbares Stickstoffatom, daher wirkt das Polymer als sogenannter Protonenschwamm.<sup>75</sup> Um den pH-Unterschied zwischen Cytosol (pH 7.2) und den späten Endosomen/Lysosomen (pH 5.5 – 5.0) auszugleichen, wandern Protonen vom Cytosol in die Vesikel, sodass der pH-Wert im Vesikel sinkt und PEI protoniert wird. Diese Protonenakkumulation induziert gleichzeitig das Eindringen von Gegenionen in die Vesikel, wodurch die Ionenkonzentration im Vesikel stark ansteigt. Dies führt zum osmotischen Anschwellen und schließlich zum Platzen der endosomalen Membran, sodass die Polyplexe ins Cytosol ausgeschüttet werden.<sup>76,77</sup> Im Polyplex ist die DNA vor dem Abbau von Nukleasen geschützt und kann in den Zellkern gelangen. Mit PEI werden sehr gute Transfektionsraten erzielt. Das Polymer dient daher als Referenz bei der Evaluierung der Transfektionseffizienz neuer Gencarrier. Ein Nachteil von PEI ist jedoch die mit dem Molekulargewicht steigende Toxizität, außerdem ist PEI nicht bioabbaubar und reichert sich in der Leber an.<sup>78</sup>

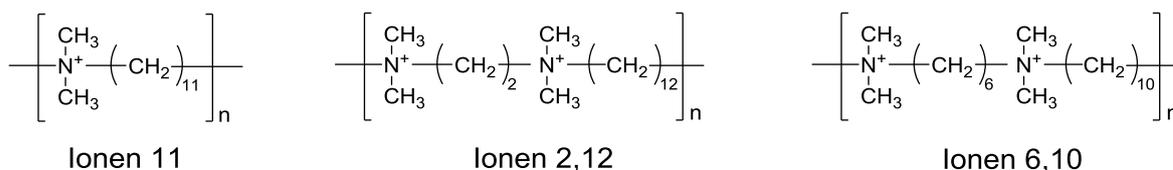
Ausgehend von PEI wurde bereits eine Vielzahl an kationischen Polymeren zur Komplexierung von Nukleinsäuren verwendet, wie beispielsweise Chitosan<sup>79</sup> und Poly-*L*-Lysin.<sup>80</sup> Von Lehr *et al.* wurden bereits PEI-Stärke-Derivate zur Transfektion eingesetzt.<sup>81</sup> Grundsätzlich wird dabei zwischen der Komplexierung von DNA und RNA unterschieden. Während DNA aus mehr als 1000 Basenpaaren (bp) bestehen und daher eher mit langkettigen Polymeren komplexiert werden, werden die deutlich kürzeren siRNA (kleine eingreifende RNA, engl. *small interfering*) mit nur 20 - 25 bp mit kürzeren Polymeren bzw. Oligomeren komplexiert.<sup>82,83</sup>

Auch CD-haltige Polymere<sup>84</sup> sowie CD-Dendrimere<sup>85</sup> wurden in diesem Zusammenhang bereits beschrieben. Unter anderem wurden auch auf CD basierende Polyrotaxan-Systeme entwickelt. Wie bereits eingangs erwähnt eignen sich Polyrotaxane hervorragend zur Gentransfektion, da die Beweglichkeit der CD entlang der Kette eine besonders effiziente Komplexierung der DNA ermöglicht und somit nur geringe Mengen Polyrotaxan zur vollständigen Komplexierung der DNA nötig sind. Weitere Vorteile von Polyrotaxanen gegenüber klassischen Polykationen ist ihre verringerte Toxizität, sowie die Freisetzung der DNA bei beginnender Dissoziation des Polyrotaxans. Das erste Polyrotaxan von Li *et al.*<sup>47</sup>, welches zur Gentransfektion eingesetzt wurde, wurde bereits in Kapitel 1 beschrieben. Inzwischen wurden diverse weitere Polyrotaxane zur Gentransfektion entwickelt.

D. Thompson<sup>86</sup> verwendet kationische Polyethylenglycol-Polyrotaxane verschiedener Größen ( $M_N$  des PEG: 2000, 3400 und 10 000) zur Komplexierung von siRNA. An den  $\alpha$ -CD wurden Dimethylaminoethylgruppen über Carbamatgruppen eingeführt, wodurch die CD kationische Ladungen tragen. Die hergestellten Polyrotaxane waren um den Faktor 100 weniger zelltoxisch sind als handelsübliches verzweigtes PEI desselben Molekulargewichts. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Komplexierungs- und Transportvermögen des Polyrotaxans mit der molaren Masse steigt.

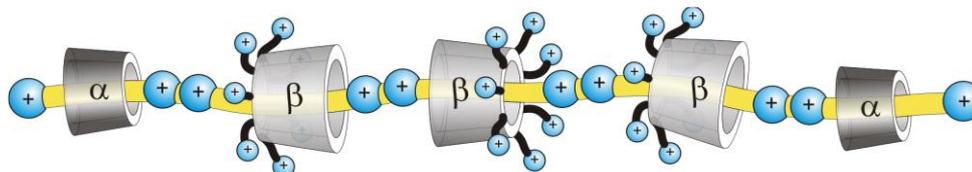
Ein weiteres System, welches ebenfalls auf einem Polyethylenglycol-Polyrotaxan basiert, wurde von Ooya *et al.* beschrieben.<sup>87</sup> Dabei wurden Dimethylaminoethyl-modifizierte  $\alpha$ -CD mit PEG ( $M_N$  4 000) komplexiert. An den Enden des Polyethylenglycol-Polyrotaxans wurden sterisch anspruchsvolle Stoppergruppen über Disulfidbrücken eingeführt. Dieses Polyrotaxan wurde zur Komplexierung von Plasmid-DNA (pDNA) eingesetzt. Nach Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen können die Disulfidbrücken unter reduktiven Bedingungen gespalten werden, wodurch die Freisetzung der DNA aus dem Polyplex ausgelöst wird.

Die Arbeiten von Wenz *et al.* beruhen auf dem Einsatz von wasserlöslichen, kationischen Polyrotaxanen, bestehend aus verschiedenen Ionen (Ionen 11; Ionen 2,12 und Ionen 6,10, s. Abb. 11) und kationischen Cyclodextrinderivaten zur Gentransfektion.<sup>88,43,89</sup> Ionene haben ähnlich wie das Polyamidin eine strukturelle Ähnlichkeit zu Spermin, einem natürlich vorkommenden Polykation mit hervorragenden nukleinsäurestabilisierenden Eigenschaften. Es wurden Polyplexe aus einem  $\alpha$ -CD-Ionen-11-Polyrotaxan mit pDNA sowie mit siRNA gebildet und gezeigt, dass die Verwendung der beschriebenen Polyrotaxane im Vergleich mit PEI sowohl eine bessere Biokompatibilität als auch eine bis zu 10-fach höhere Transfektionsrate in einem Knockdown-Experiment an C2C12 (Zelllinie aus dem Muskelgewebe einer Maus) und A549 (Zelllinie aus einem humanen Lungenkarzinom) bewirkte.<sup>88,89</sup>



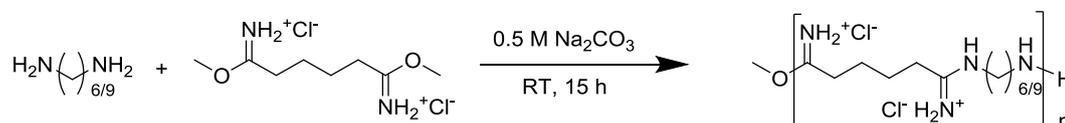
**Abb. 11:** Ionene als Polymerbasis für Polyrotaxane.

Das in dieser Arbeit verwendete Polyrotaxan-System basiert auf dem bereits von Dan-dekar *et al.*<sup>89</sup> beschriebenen System und wurde ausgehend von den drei Ionenen und neuen kationischen  $\beta$ -CD-Derivaten aufgebaut. Als Stoppergruppen wurde natives  $\alpha$ -CD aufgefädelt. Der schematische Aufbau des Polyrotaxans ist in Abb. 12 dargestellt.



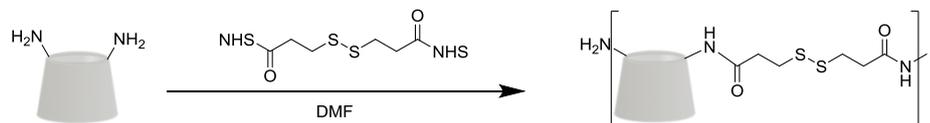
**Abb. 12:** Schematische Darstellung des verwendeten Polyrotaxans aus Ionen-6,10, kationischen  $\beta$ -CD-Derivaten sowie nativem  $\alpha$ -CD als Stoppergruppen an den Enden.<sup>43</sup>

Weiterhin sollen in dieser Arbeit Polyrotaxane basierend auf Polyamidin hergestellt werden. Der Einsatz von Polyamidinen zur Gentransfektion wurde in der Literatur bereits beschrieben. Davis *et al.*<sup>90</sup> synthetisierten zunächst Polyamide aus linearen Diaminen, welche mit Dimethylalkylimidaten in einer wässrigen Polykondensationsreaktion umgesetzt wurden. Die Synthese und Struktur der Polyamide nach Davis *et al.* sind in Schema 1 dargestellt.



**Schema 1:** Synthese der Polyamide 6,6 und 9,6 nach Davis *et al.*<sup>90</sup>

Diese Polyamide konnten bereits erfolgreich zur Transfektion eingesetzt werden. In weiteren Arbeiten derselben Gruppe wurden lineare, cyclodextrinhaltige kationische Polyamide via Polykondensation eines bifunktionalisierten  $\beta$ -CD-Monomers mit Alkylimidaten hergestellt, um die Toxizität der Polymere zu verringern ( $\text{LC}_{50}$  um 3 Größenordnungen erhöht). Des Weiteren wurden Disulfide eingeführt, die zur späteren Spaltung des Polymers unter reduktiven Bedingungen dienen sollten.



**Schema 2:** CD-Polyamidin-Copolymer nach Davis *et al.*<sup>49</sup>

Mit diesen CD-haltigen Polyamidinen konnte pDNA-Polyplexe in einem N/P-Verhältnis von 10 Zellkulturen transfizieren mit einer Effizienz, die mit PEI und Lipofectamin vergleichbar ist. Die von Davis *et al.*<sup>49</sup> beschriebenen CD-Polyamidin-Copolymere sind nicht säureempfindlich, werden allerdings trotz Disulfidbrücken nur langsam abgebaut.

In dieser Arbeit soll zum ersten Mal ein Polyrotaxan auf Polyamidin-Basis hergestellt werden und zur Gentransfektion eingesetzt werden. Die CD sollen im Gegensatz zum System von Davis nicht kovalent im Polymer eingebaut werden, sondern aufgefädelt werden. Durch das sukzessive Abfädeln der CD vom Polyrotaxan sollen die gebildeten Polyplexe langsam dissoziieren. Eine enzymatische Spaltung ist hierbei nicht notwendig. Ein weiterer Vorteil des Polyamidin-Polyrotaxans ist die höhere Ladungsdichte als beim linearen CD-Polyamidin von Davis *et al.*, wenn anstelle neutraler CD sechs bzw. siebenfach kationische CD-Derivate eingesetzt werden. Durch die freie Beweglichkeit der Cyclodextrine entlang der Polymerkette sollte ein besonders guter Zusammenhalt zwischen DNA und Polykation erreicht werden.

### 3.1.2 pDNA-Polykation-Polyplexe

In dieser Arbeit wurde Plasmid-DNA (pDNA) zur Herstellung der Polyplexe verwendet. Dabei handelt es sich um kurze doppelsträngige DNA, welche zirkulär aufgebaut ist. Plasmide liegen extrachromosomal vor und können sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren. Sie sind aus einem Replikationsstart und Selektionsgenen (beispielsweise einer Antibiotika-Resistenz) aufgebaut. Zusätzlich können weitere variable Sequenzen eingefügt werden. Plasmide werden häufig als Vektoren eingesetzt, um die gewünschte DNA in eine Gastzelle zu übertragen. Derartige Plasmidvektoren haben üblicherweise eine Größe von 2.5 – 6 kbp.<sup>91</sup> Sie liegen überwiegend in der aktiven superspiralisierten Form vor. Durch Konformationswechsel kann ein Plasmid auch in offener zirkulärer Form sowie linearisiert vorliegen, in dieser Form ist es jedoch oft inaktiv.<sup>92</sup>

Die Polyplexe bilden sich durch Selbstanordnung, die Triebkraft hierfür sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen anionischer DNA und Polykation, sowie die Entropie durch Freisetzung der niedermolekularen Gegenionen.<sup>93,94</sup> Entscheidend für eine erfolgreiche Transfektion ist dabei das Mischungsverhältnis von Polykation zu Polyanion (N/P-Verhältnis). Als N/P-Verhältnis wird das Verhältnis zwischen kationischen Ladungen des Polykations bei neutralem pH-Wert „N“ (beispielsweise die Aminogruppen des PEI) zu anionischen Ladungen der Phosphatgruppen der DNA „P“ beschrieben. Bei  $N/P = 1$  ist die negative Ladung der DNA vollständig neutralisiert. Ab  $N/P > 1$  entstehen nach außen hin kationische Polyplexe, was vorteilhaft für die Anlagerung an die negativ geladene Zellmembran ist. Das Komplexierungs- und Kondensationsverhalten der Polykationen hängt vom Molekulargewicht und von der Ladungsdichte des Polymers ab.<sup>95</sup> Entscheidende Faktoren für die optimale Aufnahme und damit der Transfektionseffizienz sind einerseits die Größe der Nanopartikel, andererseits ihre Ladung. Beide Größen werden durch das N/P-Verhältnis bestimmt. Durch die Aggregation mit dem Polykation wird das ursprüngliche Volumen der DNA stark verringert. Für DNA-Polyplexe sind Partikel mit einem Durchmesser bis maximal 200 nm ideal. Partikel  $> 200$  nm können zwar auch internalisiert werden, verbleiben jedoch im Lysosom und gelangen nicht in den Zellkern.<sup>76,96</sup> Tendentiell verringert sich die Partikelgröße mit steigendem N/P-Verhältnis.<sup>97,98</sup> Die Partikelgröße steigt jedoch bei steigender Ionenstärke, da die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Polykation und DNA geschwächt werden und somit weniger kompakte Polyplexe entstehen.<sup>96</sup> Die Struktur von Polyplexen konnte anhand von Röntgendiffraktometrie sowie mittels Rasterkraftmikroskopie bestimmt werden. Es wurden bereits je nach Anwendungsgebiet sowohl sphärische Teilchen, als auch scheiben- oder stäbchenförmige Partikel hergestellt, wobei sich letztere beispielsweise besonders für den Nukleinsäuretransport in die Lunge eignen.<sup>70,99</sup>

Grundsätzlich werden kationische und anionische Nanopartikel einfacher aufgenommen als neutrale. Kationische Nanopartikel interagieren allerdings unspezifisch mit fast allen Zellen und Zellbestandteilen. Sie adhären an die meist anionische Zellmembran, und leiten damit

die Endocytose ein<sup>100</sup> oder werden durch nanometergroße Löcher in Zellmembranen aufgenommen.<sup>101</sup> Kationische Partikel werden daher in der Regel noch besser aufgenommen als anionische, zeigen aber auch eine höhere Zytotoxizität. Neutrale Nanopartikel hingegen können nur schwer internalisiert werden, sie können über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen werden.<sup>102,103</sup> Die Interaktion neutraler und anionischer Nanopartikel mit anderen Bestandteilen des Organismus ist ebenfalls geringer als mit kationischen Polyplexen. Es wurde eine schwache elektrostatische Abstoßung zwischen der Zellmembran und dem anionischen Nanopartikel beobachtet.<sup>100</sup>

Unter physiologischen Konditionen können Nanopartikel über passiven und aktiven Transport in die Zelle aufgenommen werden. Der passive Transport von Nanopartikeln wird selten, beispielsweise bei Goldpartikeln, beobachtet. Die meisten Nanopartikel werden jedoch aktiv mittels Endocytose aufgenommen. Es werden zwei grundlegende Mechanismen der Endocytose unterschieden: die Phagozytose und die Pinozytose.<sup>104</sup> Während die Phagozytose (aktive Aufnahme von Feststoffen und großen Partikel bis 10 µm) hauptsächlich in Makrophagen vorkommt, findet die Pinozytose (aktive Aufnahme von Flüssigkeiten und kleinen (Nano-) Partikeln durch Einstülpung der Zellmembran) in allen eukaryotischen Zellen statt. Für die Internalisierung von Nanotherapeutika ist die Pinozytose daher der wichtigere Mechanismus. Er basiert auf der Wechselwirkung des Partikels mit der Zelloberfläche. Es werden verschiedene Arten der Pinozytose unterschieden. Die Internalisierung von Polyplexen verläuft aufgrund ihrer Größe von 100 - 200 nm hauptsächlich via clathrinvermittelter Endocytose.<sup>104</sup>

Besonders für die Behandlung von Tumorgewebe sind Nanopartikel wie Polyplexe aufgrund des *enhanced permeability and retention*-Effekts (EPR-Effekt) günstig.<sup>105</sup> Tumorgewebe zeichnet sich durch besonders gute Blutversorgung aus, sodass die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden und daher schneller proliferieren als gesunde Zellen. Weiterhin führen Fenestrierungen in der vaskulären Struktur der Tumorzellen dazu, dass Nanopartikel bevorzugt in dieses Gewebe eindiffundieren können und sich dort aufgrund der schlechteren Lymphdrainage anreichern und ortsspezifisch Gene ausschalten oder neu hinzufügen können.<sup>105,106</sup>

### 3.1.3 Transfektion mit Polyplexen: Oberflächenmodifizierte Nanopartikel für targetvermittelte Aufnahme in Zellen

Eine Möglichkeit zur verbesserten Aufnahme von Nanopartikeln zur Gentransfektion ist die Oberflächenfunktionalisierung. Polymer-DNA-Komplexe wurden zum Beispiel pegyliert, um einerseits die Kolloidalstabilität der Polyplexe und die Zirkulationszeit zu erhöhen, aber auch um die unspezifische Aufnahme der Partikel in Zellen, sowie auch die Adsorption von Proteinen, beispielsweise dem anionischen Albumin, und anderen Biomolekülen aus dem Serum zu verringern. Ein hoher Pegylierungsgrad kann jedoch die zelluläre Aufnahme behindern.<sup>104,107</sup> Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Hyaluronsäure zur Stabilisierung der Polyplexe, wie beispielsweise von Ito *et al.* beschrieben wurde. Das biokompatible und anionische Polymer verringert ebenfalls unspezifische Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen und stabilisiert PEI/DNA-Polyplexe.<sup>108</sup>

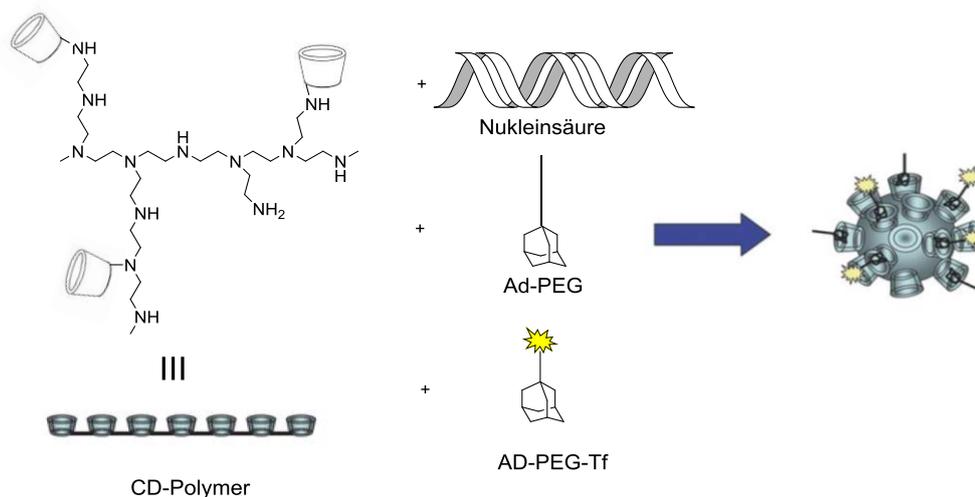
Ein zielgerichteter Nukleinsäuretransport kann durch Modifikation der Partikeloberfläche mit Targetliganden ermöglicht werden, sodass die Nanopartikel mittels rezeptorvermittelter Endocytose aufgenommen werden können. Dies kann einerseits die Aufnahme der Nanopartikel erleichtern, gleichzeitig wäre es bei der späteren Anwendung in einem Organismus wünschenswert, dass die Nanopartikel nur von einer bestimmten Zellart bzw. eine Klasse von Zellen aufgenommen werden würden. Die Vision von „Zauberkugeln“, Wirkstoffen oder Partikel, die hochspezifisch an einer Stelle bzw. auf einen Antikörper wirken, hatte

bereits Paul Ehrlich 1913.<sup>109</sup> Sein Targettherapie-Konzept war damit der Grundstein für die heutige Chemotherapie. Neben Antikörpern<sup>110,111</sup> oder anderen Proteinen (z.B. Transferrin,<sup>112,113</sup> aber auch Octaarginine oder cyclische Peptide mit Arg-Gly-Asp-Sequenz<sup>114–116</sup>) sind auch kleine Moleküle, wie z.B. Zucker als Targetliganden möglich.<sup>117</sup>

Targetspezifisches Gen delivery mit Polyplexen wurde erstmals von Kircheis *et al.*<sup>118</sup> 1997 beschrieben. Hierbei wurde die DNA klassisch nach Boussif *et al.*<sup>74</sup> mit PEI komplexiert, allerdings wurde PEI zuvor mit Transferrin bzw. mit einem Antikörper (CD3 Antikörper für Jurkat Zellen) modifiziert, sodass targetfunktionalisierte Polyplexe erhalten wurden, deren Transfektionseffizienz je nach Zelllinie bis zu 100-fach gesteigert werden konnte (N/P 6).<sup>118</sup> Seither wurden viele verschiedene Gen delivery Systeme mit diversen Targetliganden und Kupplungsstrategien entwickelt, wodurch teilweise auf die kationische Ladung verzichtet werden konnte.<sup>119,120</sup>

Sun *et al.*<sup>121</sup> beschreiben ein ternäres Polyplex-System zur Transfektion, bei dem zunächst PEI/DNA Nanopartikel (N/P 10 für kationischen Ladungsüberschuss) gebildet werden. Durch anschließende Zugabe von Hyaluronsäure (HS) wurde die kationische Ladung teilweise bzw. vollständig neutralisiert. Die ternären Komplexe aus PEI/DNA/HS zeigten an den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 mit dem Ladungsverhältnis HS:PEI 7.5 % das 13-fache an Transfektionseffizienz und eine niedrigere Zelltoxizität, als die entsprechenden PEI/DNA-Polyplexe.

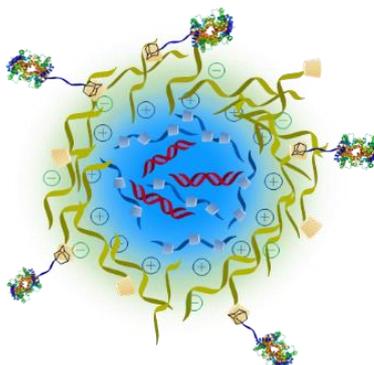
In einem System von Davis *et al.*<sup>122</sup> wurde mit CD modifiziertes, verzweigtes PEI zur Komplexierung von siRNA verwendet. Zu diesem vorgeformten Polyplex wurde im zweiten Schritt adamantyliertes PEG gegeben. Durch die besondere Bindungsaffinität des Adamantans zum  $\beta$ -CD ( $K_A = 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ )<sup>123</sup> bilden sich stabile Einschlussverbindungen, wodurch der Nanopartikel eine sterische Stabilisierung durch PEG-Ketten erlangt. Um einen zielgerichteten Transport und erleichterte Aufnahme des Nanopartikels in die Zelle zu gewährleisten, wurden in Folgearbeiten disubstituierte PEG-Ketten verwendet, wobei an einem Kettenende wieder Adamantan angeknüpft wurde, und an der anderen Seite ein beliebiger Ligand, zunächst Glucose (Glc) oder Galactose (Gal), später Transferrin (Tf). Auf diese Weise wurde ein stabilisierter, funktionalisierter Polyplex erhalten. Der Durchmesser der gebildeten Partikel lag zwischen 100 und 150 nm. Die erfolgreiche Oberflächenmodifikation mit Glc bzw. Gal. konnte mittels Bestimmung des Zeta-Potentials bestätigt werden. Der AD-PEG-Teil mit der Targetfunktion (Glc, Gal oder Tf) dient dabei in erster Linie der besseren Aufnahme der Nanopartikel in Tumorzellen.<sup>124</sup> Das System ist in Abb. 13 schematisch dargestellt. In *in vitro* und *in vivo* Experimenten wurde gezeigt, dass nur die targetmodifizierten Nanopartikel in der Lage waren, die Expression eines Gens in Tumorzellen signifikant zu verringern.<sup>124</sup>



**Abb. 13:** Schematische Darstellung der Nanopartikel nach *Davis et al.*<sup>125</sup>

Reprinted with permission from M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel and A. Ribas, *Nature*, 2010, **464**, 1067–1070, Copyright 2010 Nature.

Die Entwicklung des ternären Nanopartikel-Systems mit Targetligand in dieser Arbeit soll in Anlehnung an die Arbeiten von Sun<sup>121</sup> und Davis<sup>122</sup> erfolgen. Zur Komplexbildung der DNA soll statt PEI aufgrund ihrer geringeren Cytotoxizität und ihrer besseren Freigabe der Nukleinsäuren kationische Polyrotaxane eingesetzt werden. Als dritte Komponente soll anionische Hyaluronsäure zugegeben werden, die mit  $\beta$ -CD modifiziert wurde und die sich ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche des kationischen Polyplexes anlagert. Je nach zugegebener Menge kann so die Ladung des Nanopartikels von kationisch bis anionisch eingestellt werden. Als letzte Komponente soll schließlich adamantyliertes Transferrin von D. Schwarz zugegeben werden, welches wie oben beschrieben in an Hyaluronsäure gebundenen CD komplexiert und somit letztendlich anionische Nanopartikel entstehen, die an ihrer Oberfläche Transferrin als Target- bzw. Internalisierungsliganden tragen (Abb. 14).

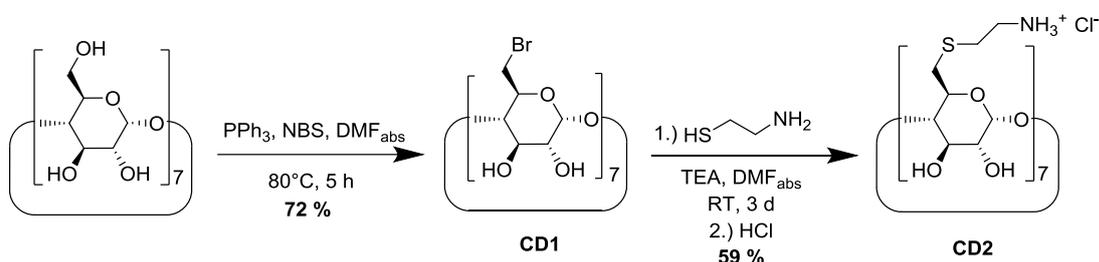


**Abb. 14:** Schematische Darstellung des oberflächenfunktionalisierten Polyplexes.

## 3.2 Synthese der Bausteine

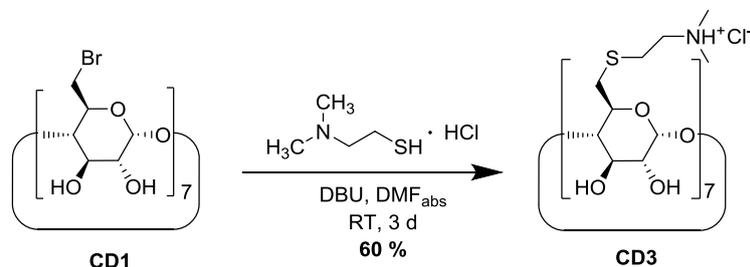
### 3.2.1 Synthese der kationischen CD-Derivate

In diesem Kapitel ist zunächst die Synthese der kationischen CD-Derivate beschrieben, die nachfolgend auf die kationischen Polymere aufgefädelt wurden, um somit die kationischen Polyrotaxane herzustellen. Als Ausgangsverbindung wurde das bereits literaturbekannte Heptakis-[6-brom-6-deoxy]- $\beta$ -Cyclodextrin **CD1** ausgehend von nativem  $\beta$ -CD als allgemeine Vorstufe für die Derivatisierungen synthetisiert.<sup>126</sup> Davon ausgehend wurde das ebenfalls literaturbekannte Heptakis-[6-deoxy-6-cysteaminyl]- $\beta$ -Cyclodextrin **CD2** nach Steffen *et al.* hergestellt (Schema 3).<sup>127</sup> Die Einführung des Thioethers erweitert die hydrophobe Kavität des CDs und führt zu stabileren Einschlussverbindungen, die Aminogruppe ist unter physiologischen Bedingungen kationisch und dient hauptsächlich zur späteren Komplexierung der DNA, erhöht jedoch gleichzeitig die Wasserlöslichkeit des Derivats im Vergleich zum nativen  $\beta$ -CD.



**Schema 3:** Synthese des Heptakis-(6-deoxy-6-cysteaminyl)- $\beta$ -Cyclodextrins **CD2** aus nativem  $\beta$ -Cyclodextrin.

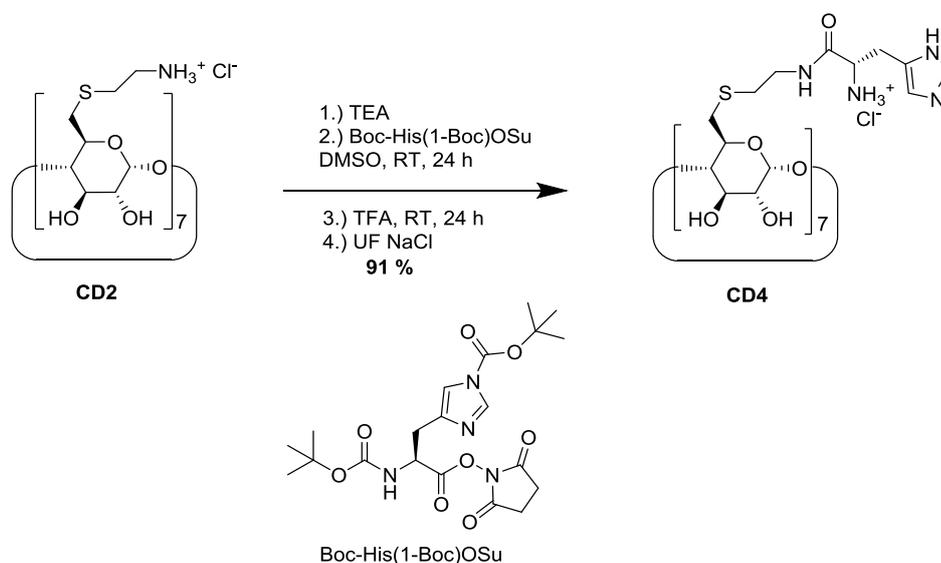
Von diesem Derivat abgeleitet wurde ein weiteres CD-Derivat **CD3** hergestellt, welches sich durch zwei zusätzlich Methylgruppen am Stickstoff auszeichnet. Durch die Methylierung der Aminogruppe wird die Seitenkette sterisch anspruchsvoller und somit können Nebenreaktionen im physiologischen Milieu verringert werden, was zu einer verringerten Toxizität führen kann. Des Weiteren werden weniger Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Während bei Verbindung **CD2** noch Triethylamin als Base verwendet wurde, musste bei Derivat **CD3** eine stärkere Base eingesetzt werden, da hier die Basizität des Edukts durch die induktiven Effekte der beiden Methylgruppen erhöht wird. Daher wurde hier 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als stärkere Amidinbase verwendet (Schema 4).



**Schema 4:** Synthese des Heptakis-(6-deoxy-6-dimethylcysteaminyl)- $\beta$ -Cyclodextrins **CD3** aus **CD1**.

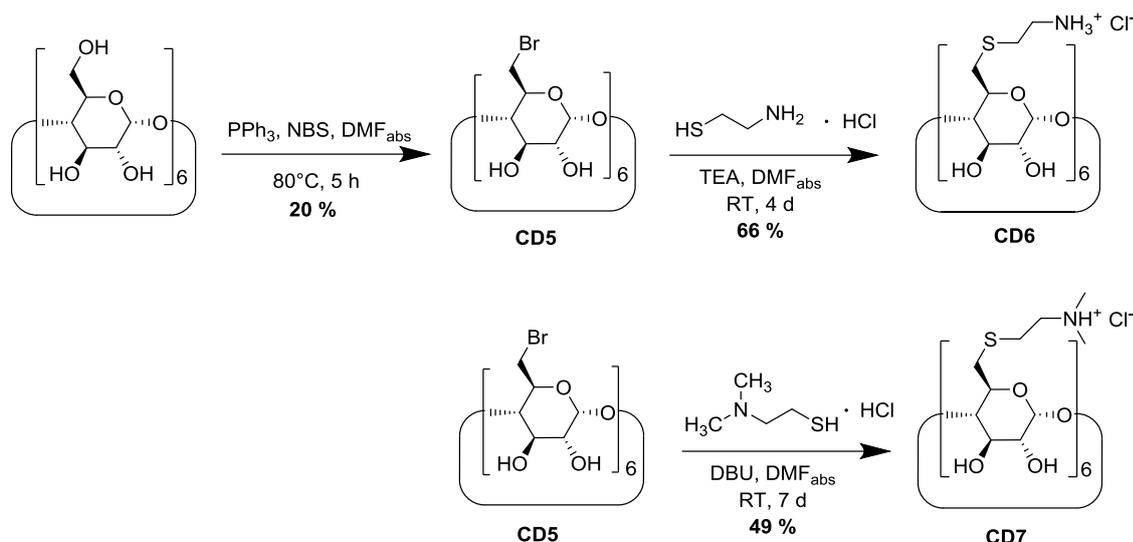
Als weiteres, neues kationisches Derivat wurden sieben Histidinreste an die Seitenkette des CD-Derivats **CD2** eingeführt (**CD3**). Das primäre Amin ist bei physiologischem pH-

Wert vollständig protoniert, während der Imidazolring aufgrund seines pKs-Wertes (6.0) im physiologischen Milieu ebenso wie PEI den Protonenschwammeffekt zeigt. Bei pH 7.4 ist der Imidazolring überwiegend deprotoniert, wird jedoch im leicht sauren Milieu protoniert. Gleichzeitig mit den Protonen strömen ebenfalls Gegenionen (Chlorid) in den Polyplex. Insgesamt nimmt dadurch das Volumen der Verbindung zu, was zu einer Schwellung und letztendlich zu einem schnellen Zerfall des finalen Polyplexes führt.<sup>128</sup> Ein weiterer Vorzug des histidinylierten CD ist die niedrigere Zelltoxizität, die aufgrund der peptidomimetischen und damit biokompatiblen Eigenschaften dieses CD-Derivates erwartet werden. Im Gegensatz zur von *Midoux et al.*<sup>128</sup> publizierten Synthese vom Hexakis-(6-deoxy-6-amino) $\alpha$ -CD zum histidinylierten  $\alpha$ -CD-Derivat wurde hier das entsprechende  $\beta$ -CD-Derivat hergestellt. Für höhere Stabilitätskonstanten der Einschlussverbindungen mit Polymeren wurde wieder vom thiolhaltigen CD-Derivat **CD2** ausgegangen. Die Synthese ist in Schema 5 dargestellt.



**Schema 5:** Synthese des histidinylierten CD-Derivates **CD4**.

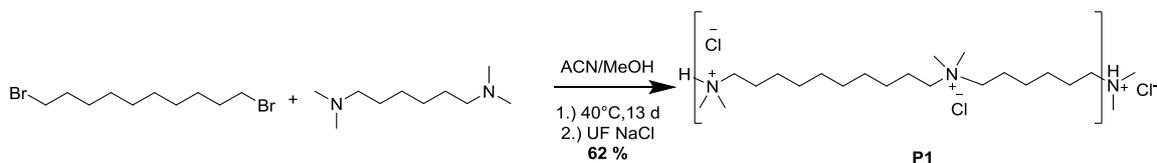
Weiterhin wurden in Anlehnung an die  $\beta$ -CD-Derivate entsprechende kationische  $\alpha$ -CD Derivate synthetisiert.  $\alpha$ -CD Derivate bilden im Vergleich zu  $\beta$ -CD durch ihren kleineren inneren Durchmesser stabilere Komplexe mit sterisch wenig anspruchsvollen Polymeren. Je nach gewünschter Stabilität des Polyrotaxans können somit mit  $\alpha$ -CD Derivaten deutlich stabilere, langsamer dissoziierende Polyrotaxane hergestellt werden. Die Synthese der Derivate verläuft analog zur Synthese der  $\beta$ -CD-Derivate. Hexakis-[6-brom-6-deoxy]- $\alpha$ -CD **CD5** wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von *Chmurski et al.*<sup>129</sup> hergestellt, die Synthese der Derivate verläuft analog zur Synthese der  $\beta$ -CD-Derivate (Schema 6). Aufgrund der schlechteren sterischen Zugänglichkeit des kleineren  $\alpha$ -CD-Rings sind jedoch zur vollständigen Umsetzung aller sechs Seitenketten höhere Reaktionszeiten nötig. Insgesamt wurden bei den  $\alpha$ -CD-Derivaten geringere Ausbeuten als bei den entsprechenden  $\beta$ -CD-Derivaten erhalten.



**Scheme 6:** Synthese der kationischen  $\alpha$ -CD-Derivate **CD6** und **CD7**.

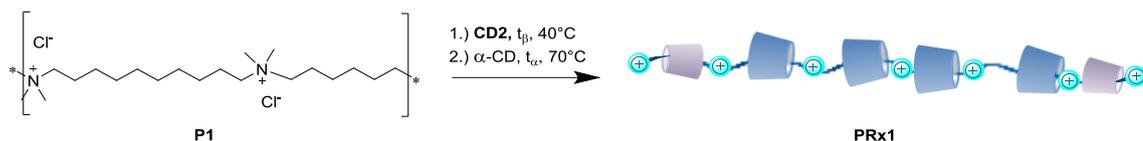
### 3.2.2 Herstellung der Ionen-Polyrotaxane

Als erstes kationisches Polymer zur Herstellung der Polyrotaxane wurden die bereits bekannten Ionene verwendet. Die Synthese des Ionens 6,10 (**P1**) (Schema 7) ist bereits literaturbekannt und erfolgte nach Wenz *et al.*<sup>130</sup> Durch Ultrafiltration des Rohprodukts über eine 10 kDa-Membran wurden Oligomere und Polymere <10 kDa abgetrennt.



**Scheme 7:** Polykondensation zur Herstellung des Ionens 6,10 (**P1**).

Die Herstellung der Polyrotaxane erfolgte in wässriger Lösung. Es wurden jeweils 2 Äquivalente des kationischen  $\beta$ -CD-Derivats bezogen auf die Anzahl Wiederholeinheiten des Polymers eingesetzt. Durch die Zugabe von NaCl konnte eine hohe Belegung an kationischem  $\beta$ -CD erreicht werden. Anschließend wurde natives  $\alpha$ -CD (Zugabe von 1 Äq.  $\alpha$ -CD pro Polymer-Wiederholeinheit) aufgefädelt, welches durch seinen kleineren Durchmesser stabilere Einschlussverbindungen mit Ionen bildet als  $\beta$ -CD.  $\alpha$ -CD dient als supramolekulare Stoppergruppe und verhindert das vorschnelle Abfädeln der  $\beta$ -CD. Das Auffädeln der  $\alpha$ -CDs geht wesentlich langsamer von statten als das Auffädeln der  $\beta$ -CD und erfolgt über einen Zeitraum von 16 h und bei 70 °C. Durch das schrittweise Auffädeln befinden sich die  $\beta$ -CD idealerweise in der Mitte der Kette, während  $\alpha$ -CD als Stoppergruppen an den Kettenenden sitzt. Es wurde zunächst ein Polyrotaxan in Anlehnung an Dandekar *et al.*<sup>43</sup> hergestellt. Das allgemeine Reaktionsschema zur Herstellung der Ionen-Polyrotaxane ist in Schema 8 gezeigt.

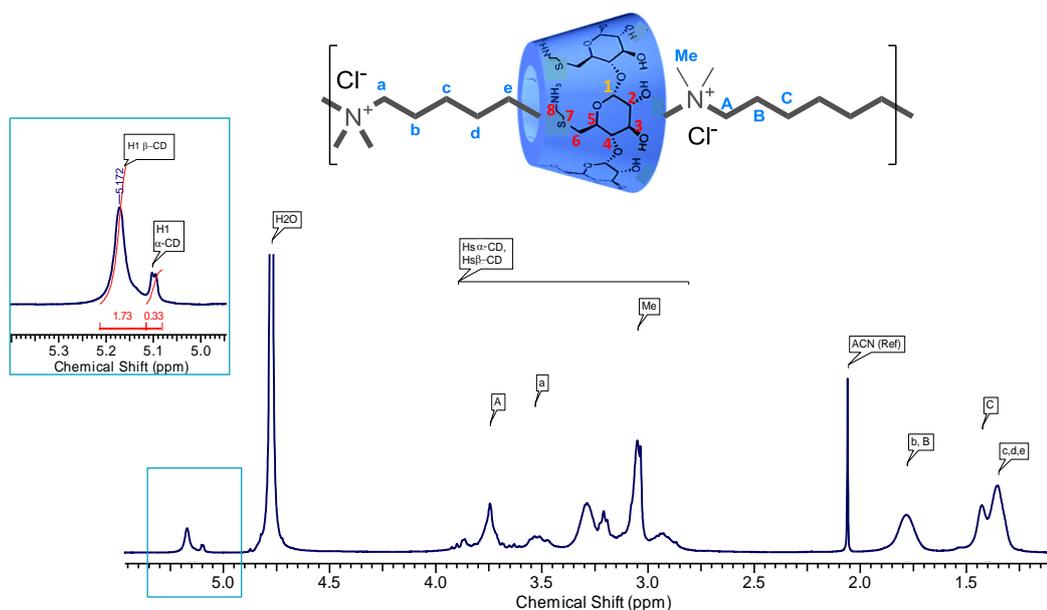


**Scheme 8:** Allgemeine Herstellung der Ionen-Polyrotaxane. Für Polyrotaxan **PRx1** war  $t_{\beta} = 8$  h und  $t_{\alpha} = 16$  h.

Die Belegung des Ions kann anhand des Protonenspektrums (Abb. 15) des Polyrotaxans abgeschätzt werden und erfolgt durch Integration der Signale der H-1 Protonen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD. Als Referenz dient dabei die Integration der Protonen c, d und e des Polymers. Jede Decaneinheit des Polymers kann dabei von maximal einem  $\beta$ -CD komplexiert sein. Für das Polyrotaxan **PRx1** wurde mit Hilfe der Gleichungen Ia und Ib die Belegung durch  $\alpha$ -CD auf 4.3 % und  $\beta$ -CD auf 22.4 % bestimmt.

$$\text{Belegung } (\beta\text{-CD}) = \frac{\int H1 (\beta\text{CD})}{7} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. Ia})$$

$$\text{Belegung } (\alpha\text{CD}) = \frac{\int H1 (\alpha\text{CD})}{6} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. Ib})$$

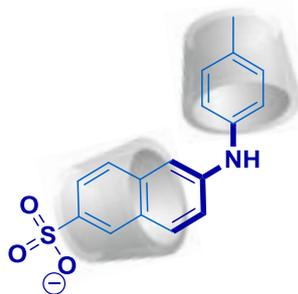


**Abb. 15:** Protonenspektrum des Polyrotaxans **PRx1** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz.<sup>131</sup>

Die Stabilität der DNA-Polyplexe sollte von der Dissoziationsrate des Polyrotaxans abhängen. Der entscheidende Faktor für die Dissoziation der Polyrotaxane ist dabei der Gehalt an Stoppergruppen. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits durch die Abfädelkinetik der CD die optimale Anzahl an Stoppergruppen pro Polyrotaxankette ermittelt (jeweils ein  $\alpha$ -CD-Ring an jedem Kettenende).<sup>131</sup>

Das Polyrotaxan wurde dafür bei 37 °C in PBS inkubiert und über 50 Tage Proben entnommen. Anschließend wurden die Proben ultrafiltriert, um die frei gewordenen CD vom verbleibenden Polyrotaxan und Polymer abzutrennen. Die Konzentration an freiem  $\beta$ -CD im Filtrat wurde schließlich mit Hilfe einer Kalibriergerade über einen Fluoreszenzassay mit Toluidinylnaphtalin-2-sulfonat (TNS) in Anlehnung an Kondo *et al.*<sup>132</sup> bestimmt. TNS

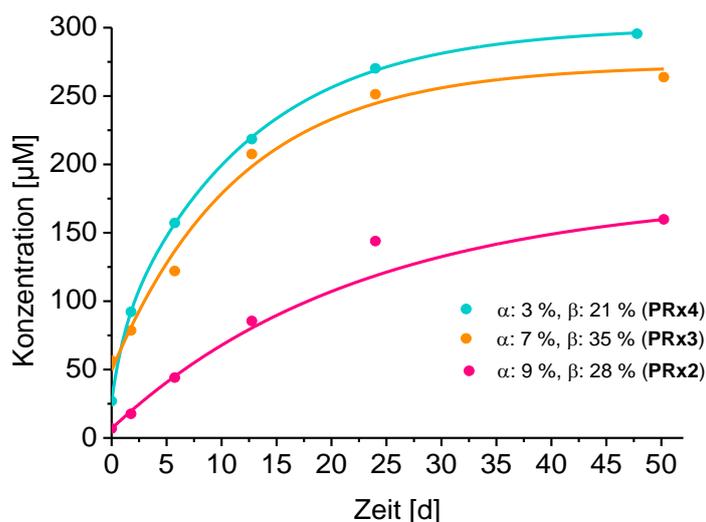
weist in wässriger Lösung keine Fluoreszenz auf, kann jedoch in der hydrophoben Kavität des  $\beta$ -CD eingeschlossen werden und bildet hierbei fluoreszierende 1:1 und 2:1 Komplexe (Abb. 16).<sup>132,133</sup>  $\alpha$ -CD bildet mit TNS keine fluoreszierenden Einschlussverbindungen und stört daher nicht.



**Abb. 16:** Schematische Darstellung des 2:1-Einschlusskomplexes von  $\beta$ -CD und TNS.

Dasselbe Experiment wurde für Polyrotaxane mit variiertem Stoppergruppengehalt durchgeführt: **PRx2**, **PRx3** und **PRx4** mit jeweils 9, 7 und 3 %  $\alpha$ -CD-Belegung durchgeführt. Die Graphen sind in **Abb. 17** gezeigt. Bei vollständigem Abfädeln aller  $\beta$ -CD hätte maximal eine Konzentration von 1000  $\mu$ M vorliegen können. Die freien CDs wurden jedoch nicht mittels Dialyse entfernt. Durch kontinuierliche Dialyse von Polyrotaxanlösungen kann das Gleichgewicht stärker auf die Seite der freien CDs geschoben werden.<sup>134</sup> Die allgemeine Tendenz geht jedoch aus Abb. 17 hervor: mit steigender Belegung durch Stoppergruppen nimmt die Freisetzung der  $\beta$ -CD ab.

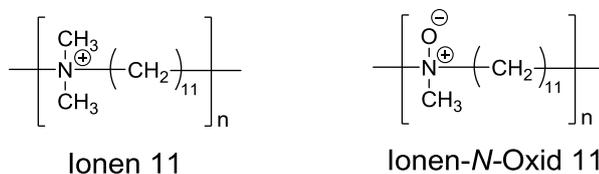
Durch Variation der Auffädelzeiten des  $\alpha$ -CD und den damit erreichten unterschiedlichen Belegungen kann folglich die Freisetzungsgeschwindigkeit des  $\beta$ -CD eingestellt werden. Da der Abfädelprozess verglichen mit der erwünschten Zerfallsgeschwindigkeit der Polyplexe (innerhalb Stunden) generell sehr langsam verläuft, sind für diese Anwendung möglichst wenige Stoppergruppen zweckmäßig. Bei einer Größe des Polymers von durchschnittlich 20 kDa (kleinere Oligomere wurden durch Ultrafiltration abgetrennt), was einem Polymerisationsgrad von etwa 50 entspricht, sind bei einer Stoppergruppenbelegung von 3 % jeweils ein CD an jedem Kettenende. Ohne den Einsatz von  $\alpha$ -CD Stoppergruppen würden die Polyrotaxane schnell dissoziieren, und bereits bei der Ultrafiltration zur Abtrennung freier CD würden die aufgefädelten CDs wieder teilweise dissoziieren. Zielführend für die Anwendung zur Gentransfektion sind folglich eine möglichst geringe Belegung durch Stoppergruppen, mindestens jedoch eine Stoppergruppe pro Kettenende.



**Abb. 17:** Abfädeln des kationischen  $\beta$ -CD-Derivates **CD2** von den Polyrotaxanen **PRx2**, **PRx3** und **PRx4** im Vergleich. Gezeigt ist die Zunahme der Konzentration an freiem  $\beta$ -CD im Filtrat über einen Zeitraum von 50 Tagen bei 37 °C. Puffersystem: PBS (50 mM, 9 g/L NaCl).<sup>131</sup>

Basierend auf diesem Ergebnis wurden im Folgenden weitere Ionen-Polyrotaxane hergestellt, wobei auch die kationischen CD-Derivate **CD4** (histidinylt) und **CD3** (dimethylt) verwendet wurden.

Es wurden zum Vergleich weitere Polyrotaxane auf Basis des bereits vorhandenen Ionen-11<sup>88</sup>, sowie des Ionen-*N*-Oxids-11<sup>135</sup> (Abb. 18) hergestellt. Die beiden Polymere sind strukturell ähnlich zum Ionen 6,10. Das Komplexierungsverhalten dieser beiden Polymere sind bereits von T. Albuzat untersucht worden. Beide Polymere eignen sich für Einschlussverbindungen mit  $\alpha$ -CD, wobei die Auffädelschwindigkeit bei Ionen *N*-Oxid durch den kleineren sterischen Anspruch der *N*-Oxid-Gruppe schneller verläuft.<sup>136</sup> Das Ionen-*N*-Oxid unterscheidet sich von den anderen beiden Ionen in seinem zwitterionischen Charakter. Der sterische Anspruch der ionischen Gruppe ist vergleichbar mit der quartären Ammoniumgruppe des Ions, allerdings könnte die Toxizität des *N*-Oxid-Polymers durch die insgesamt neutrale Ladung im Vergleich zu den Polykationen verringert sein.



**Abb. 18:** Strukturen der Polymere Ionen 11 und Ionen-*N*-Oxid 11 nach Albuzat *et al.*<sup>88,135</sup>

Eine Übersicht über die hergestellten Polyrotaxane ist in Tabelle 1 gezeigt. Neben der Belegung ist jeweils das M/N-Verhältnis angegeben. Das M/N-Verhältnis gibt die Masse pro Mol kationischer Ladung (in g/mol) an und ist später entscheidend für das Mischungsverhältnis von DNA mit Polyrotaxan. Die Berechnung erfolgt durch Division der Masse pro Wiederholeinheit des Polyrotaxans durch die Summe der Ladungen pro Wiederholeinheit.

**Tabelle 1:** Übersicht über die hergestellten Ionen-Polyrotaxane. Angegeben ist jeweils die Belegung durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD, die Masse pro Wiederholeinheit sowie das M/N-Verhältnis.

PRx	Polymer	CD-Derivat	Belegung $\beta$ -CD	Belegung $\alpha$ -CD	M Einheit [g/mol]	M/N [g/mol]
PRx1	Ionen 6,10 (P1)	Hepta-Cys- $\beta$ -CD (CD2)	22 %	4 %	810	240
PRx2	Ionen 6,10 (P1)	Hepta-Cys- $\beta$ -CD (CD2)	28 %	9 %	980	250
PRx3	Ionen 6,10 (P1)	Hepta-Cys- $\beta$ -CD (CD2)	38 %	7 %	1140	240
PRx4	Ionen 6,10 (P1)	Hepta-Cys- $\beta$ -CD (CD2)	21 %	3 %	790	230
PRx5	Ionen 6,10 (P1)	Hepta-His- $\beta$ -CD (CD4)	33 %	11 %	1340	340
PRx6	Ionen 6,10 (P1)	Hepta-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\beta$ -CD (CD3)	11 %	8 %	680	250
PRx7	Ionen 11	Hepta-Cys- $\beta$ -CD (CD2)	38 %	9 %	1000	270
PRx8	N-Oxid 11	Hepta-Cys- $\beta$ -CD (CD2)	27 %	13 %	810	430

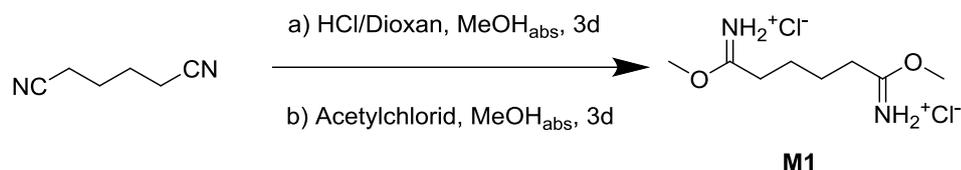
Die Belegungen der Polymere durch die kationischen CD-Derivate liegen zwischen 20 und 40 %. Für **PRx6** mit dimethyliertem heptasubstituierten CD-Derivat **CD3** wurde jedoch eine Belegung von nur 11 % erzielt. Hierbei verhindern die sterisch anspruchsvollen und nahe am CD liegenden Seitenketten möglicherweise das Auffädeln der CD auf das Polymer. Bei **CD2** (nicht methyliert) ist die sterische Hinderung geringer, bei dem heptahistidinylierten CD-Derivat **CD4** sind die Seitenketten sterisch anspruchsvoll, jedoch scheint die Kavität hierbei dennoch gut zugänglich zu sein.

Das Masse-zu-Ladungsverhältnis (M/N) liegt für die meisten Polyrotaxane bei etwa 250 g/mol kationische Ladung. Für PEI in Hydrochloridform ist M/N 80 g/mol. Es ist daher die 3-fache Masse des Polyrotaxans im Vergleich zu PEI nötig, um die anionische Ladung der DNA zu kompensieren. Bei **PRx8** ist M/N etwas höher (430 g/mol kat. Ladung), da das Polymer formal keine kationische Ladung trägt und die kationische Ladung lediglich durch die CD-Ringe bestimmt wird. Für **PRx5** liegt M/N bei 340 g/mol kationische Ladungen, da die Histidinfunktion ein hohes Molekulargewicht des CD und damit des Polyrotaxans bedingt, jedoch bei physiologischem pH-Wert ebenso wie die anderen CD-Derivate nur 7 kationische Ladungen trägt.

### 3.2.3 Synthese des Polyamidins und Herstellung von Polyamidin-Polyrotaxanen

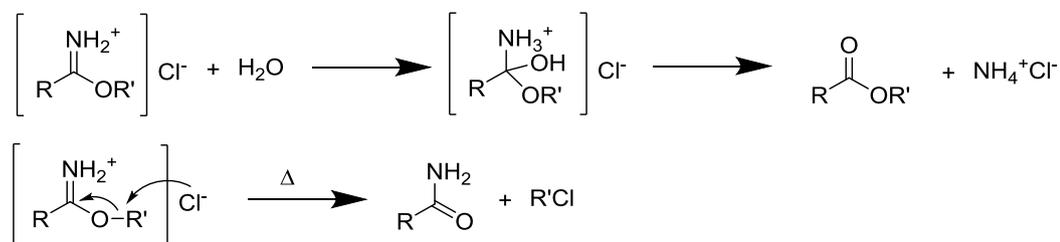
Als weiteres Polymer zur Herstellung der Polyrotaxane soll ein Polyamidin dienen. Zunächst wurde hierzu als Vorstufe zur Polyamidinsynthese das ionische, bifunktionale Co-Monomer Dimethyladipimidat-Dihydrochlorid hergestellt. Die Synthese erfolgte ausgehend von Adiponitril in einer PINNER-Synthese, dabei wurden zwei mögliche Methoden getestet (Schema 9). Zum einen wurde das Dinitril mit HCl in Dioxan (4 M) und Methanol

umgesetzt, zum anderen mit Acetylchlorid in Methanol nach einer Vorschrift von Nudelman<sup>137</sup>. Bei der letzteren Methode wurde HCl *in situ* erzeugt (18 Äquivalente).



**Schema 9:** Synthese des Monomers Dimethyladipimidat-Dihydrochlorid **M1**.

Im NMR-Spektrum, welches in Methanol- $d_4$  aufgenommen wurde, waren neben den erwarteten Produktsignalen auch Signale eines Hydrolyseproduktes zu sehen. Es ist anzunehmen, dass das Produkt hydrolyseempfindlich gegenüber Wasserrückständen in Methanol- $d_4$  ist. Die Hydrochloridsalze hydrolysieren zu den entsprechenden Estern (Schema 10 unten), und zersetzen sich bei Hitze schnell in die entsprechenden Amide und Alkylhalogenide (Schema 10 oben).<sup>138</sup>



**Schema 10:** Hydrolyse von Imidatsalzen zu Estern und thermische Zersetzung von zu Amiden und Alkylhalogeniden.<sup>138</sup>

Da das Produkt in anderen, gängigen deuterierten Lösemitteln nicht ausreichend löslich war, wurde ein Vergleichsspektrum des kommerziell erhältlichen Dimethyladipimidat-Dihydrochlorids ebenfalls in Methanol- $d_4$  aufgenommen. Die beiden Spektren weisen eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf, auch hier sind die entsprechenden Signale des Hydrolyseproduktes zu beobachten. Es ist daher davon auszugehen, dass beide Methoden zur Synthese geeignet sind. Aus preislichen Gründen wurde im Folgenden die AcCl/MeOH-Methode gewählt.

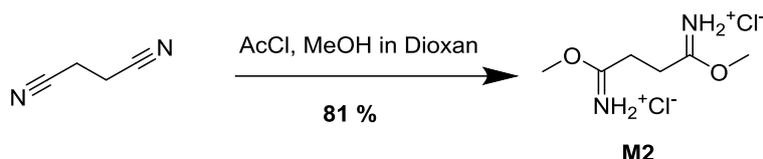
In der nächsten Stufe soll das hergestellte Adipimidat **M1** in einer Polykondensationsreaktion zum Polyamidin umgesetzt werden. Um die Bildung des Hydrolyseproduktes zu vermeiden, wurde das Adipimidat unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt. Verunreinigungen des Adipimidats durch das Hydrolyseprodukt, welches unter diesen Bedingungen nicht mit dem Diamin polymerisiert werden kann, führen zu fehlerhaften Stöchiometrien, was bei Polykondensationen in geringeren Polymerisationsgraden resultiert.

Um den Einschluss der Polyamide durch CD variieren zu können, sollten wurden auch Polyamide mit unterschiedlichen Monomerlängen hergestellt. Der Einsatz kürzerer Alkylketten sollte den Einschluss von CD auf Polyamide verlangsamen, da die sterisch anspruchsvollen Bereiche mit kationischer Ladung näher beieinander liegen und eine höhere Energiebarriere darstellen sollten. Statt C6-Kette wurde als nächstes eine C4-Kette gewählt. Eine C2-Kette wäre zu kurz, da dann die beiden Nitrilgruppen in direkter Nachbarschaft stünden. Möglich wäre noch eine C3-Kette (Malonitril). Je kürzer jedoch die Kette, desto näher stehen sich die Nitrilgruppen. Dies hat später Einfluss auf die Po-

lymerisation der Imidate, da die beiden Endgruppen dann nicht mehr gleich reaktiv sind. Das kann zu kürzeren Kettenlängen und schlechteren Ausbeuten führen.

Eine weitere Variable bei der Synthese des Polyamidins ist die Kettenlänge des Diamins. Eine Kettenlänge von C10 ist mindestens nötig, um von  $\alpha$ -CD eingeschlossen werden zu können. Alternativ wäre auch noch eine Kettenlänge von C12 möglich. Längere Diamine wären theoretisch auch denkbar, jedoch würde dies die Wasserlöslichkeit der Polyamide drastisch verringern.

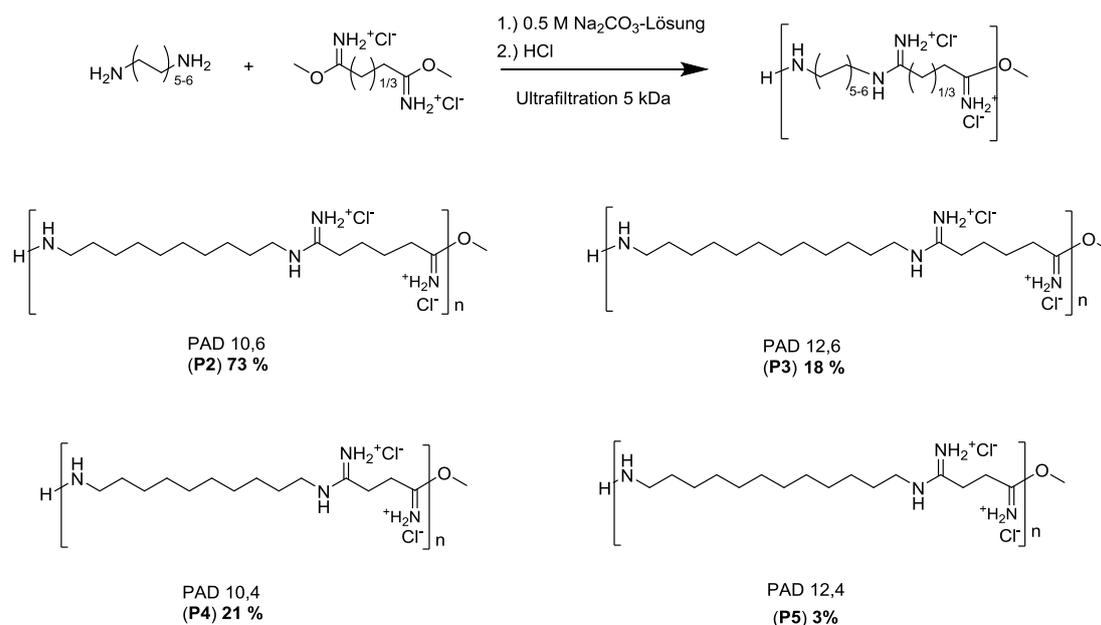
Es wurde folglich das Succinimidat-Dihydrochlorid hergestellt (Schema 11), welches anschließend ebenso wie das Adipimidat mit 1,10-Diaminododecan und mit 1,12-Diaminododecan umgesetzt wurde.



**Schema 11:** Synthese des Succinimidat-Dihydrochlorids mit einer Kettenlänge von vier Kohlenstoffatomen (**M2**).

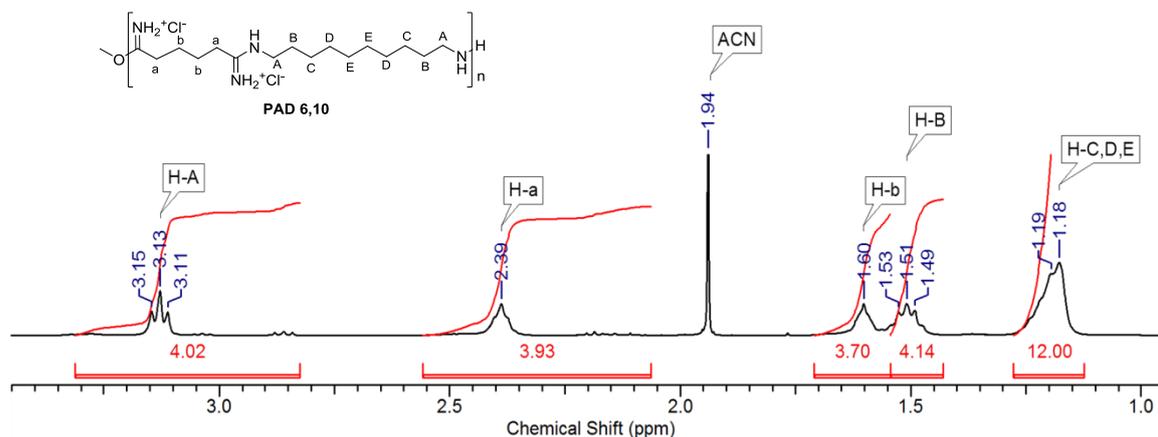
### Polykondensation der Imidate mit Diaminen

Die Synthese der Polyamide erfolgte aus den Dimethyl-Imidat-Dihydrochloriden und 1,10-Diaminododecan bzw. 1,12-Diaminododecan in exakter 1:1 Stöchiometrie (Schema 12). Die beiden Edukte wurden 4 d bei RT gerührt, im Fall des 1,12-Diaminododecans wurde statt in 0.5 M wässriger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zur besseren Löslichkeit des Eduktes ein 1:1 Gemisch mit THF verwendet. Die Polymere bildeten zunächst einen Niederschlag, aber durch Ansäuern der Reaktionsmischung wieder löslich wurde. Nach anschließender Ultrafiltration zum Abtrennen kleinerer Oligomere über eine 5 kDa Membran wurden die gewünschten Polyamide erhalten.



**Schema 12:** Synthese der Polyamide **P2**, **P3**, **P4** und **P5**.

Die Polykondensation ist aufgrund der hohen Reaktivität des Adipimidats gegenüber Nucleophilen bereits bei Raumtemperatur möglich. Abb. 19 zeigt als Beispiel das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des synthetisierten Polyamidins **P2**. Nach Ultrafiltration wurde eine Ausbeute von 73 % erhalten. Über die Integration der Endgruppen konnte ein Polymerisationsgrad  $\text{PD} = 17$  bestimmt werden, was einer mittleren Molmasse von ca. 6 000 entspricht. In vorangehender Literatur wurden bei einer analogen Reaktionsführung bei strukturell ähnlichen Polyamidinen vergleichbare Molmassen (8 800 Da) erhalten.<sup>90</sup>



**Abb. 19:**  $^1\text{H}$ -Protonenspektrum des Polyamidins 6,10 (**P2**) in  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz.

Die Ausbeuten und Polymerisationsgrade der hergestellten Polyamidine sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Bei der Ultrafiltration sollten prinzipiell alle Polymere  $<5$  kDa abgetrennt werden. Durch den größeren hydrodynamischen Radius der Polykationen wurden teilweise nach der Ultrafiltration jedoch auch Polymere  $<5$  kDa erhalten.

**Tabelle 2:** Ausbeuten und Polymerisationsgrade der hergestellten Polyamidine analog Schema 12.

Substanz	Polyamidin	Diamin	Imidat	PD via NMR	Ausbeute
<b>P2</b>	PAD 6,10	C10	C6	17	73 %
<b>P3</b>	PAD 6,12	C12	C6	16	18 %
<b>P4</b>	PAD 10,4	C10	C4	11	21 %
<b>P5</b>	PAD 12,4	C12	C4	n.b.	3 %

Bei der Synthese von **P4** war der Niederschlag nach Verdünnen mit Wasser und Ansäuern nicht mehr vollständig löslich. Bei pH 4 wurde schließlich eine schwach trübe Lösung erhalten. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und anschließend über eine 5 kDa-Membran mit  $\text{NaCl}$  ultrafiltriert, das gewünschte Produkt wurde erhalten, jedoch nur in geringer Ausbeute (21 %). Die Amidine reagieren im stark basischen nach und nach zum unlöslichen Amid, was die leichte Trübung der angesäuerten Reaktionsmischung erklärt und durch das Protonenspektrum bestätigt wurde. Die Reaktion wurde erneut in Natriumhydrogen-carbonatlösung durchgeführt, jedoch wurde hierbei eine ebenso geringe Ausbeute erhalten.

Aufgrund des geringeren Abstands der Imidat-Hydrochloridgruppen im Succinimidat im Vergleich zum Adipimidat wäre aufgrund der höheren Elektrophilie eine höhere Reaktivität bei der Polykondensation erwartet worden. Die beobachtete geringere Reaktivität ist evtl. auf die schnellere spontane Hydrolyse des Succinimidats oder auf sterische Hinderung zurückzuführen.

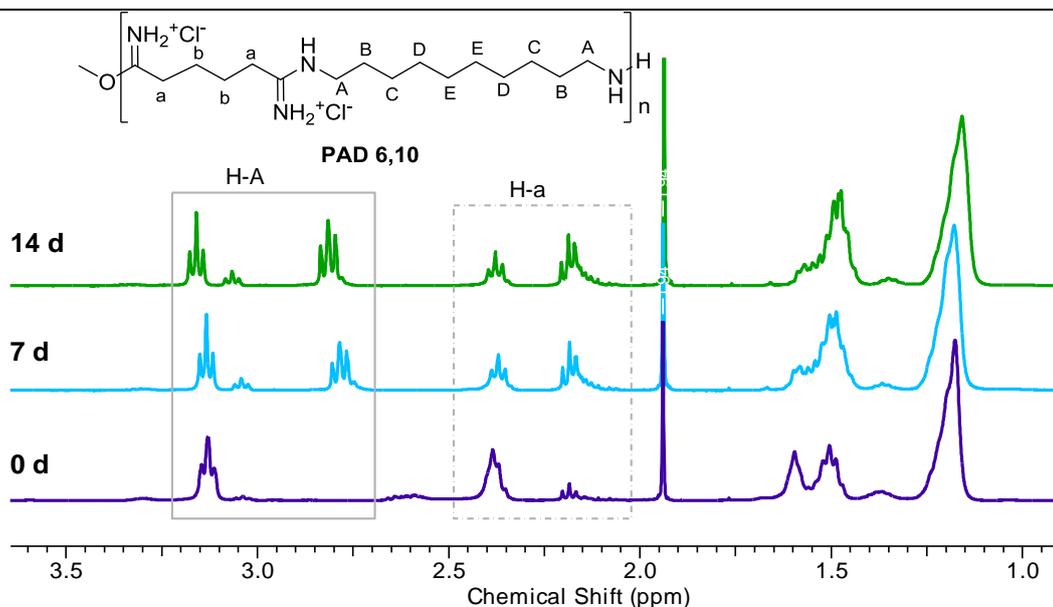
Während 1,10-Diaminododecan noch mäßig gut wasserlöslich ist, ist 1,12-Diaminododecan durch seine längere Alkylkette jedoch (fast) nicht mehr wasserlöslich, sodass sich eine Reaktion im Wässrigen als schwierig herausstellte. 1,12-Diaminododecan löst sich gut in MeOH/EtOH. Ein MeOH/Wassergemisch war jedoch im 1:1 bzw. 1:5-Verhältnis auch nicht möglich, da bei Zugabe von MeOH das Adipimidat ausgefallen ist. Das beste Ergebnis (Ausbeute von 18 %) wurde für den Ansatz in 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung:THF 1:1 erreicht.

Bei der Polykondensation des Succinimidat-Hydrochlorids mit 1,12-Diaminododecan konnte kein Produkt erhalten werden. Dies ist vermutlich zurückzuführen auf die geringe Wasserlöslichkeit des 1,12-Diaminododecans in Kombination mit der geringen Reaktivität des Succinimidat-Hydrochlorids. Längere Reaktionsdauern (1 Woche) führten zu keiner Verbesserung der Ausbeuten, möglicherweise läuft in diesem Fall die Hydrolyse des Imidats schneller ab als die Polykondensationsreaktion.

Längerkettige Adipimide und entsprechende Polyamide wurden nicht hergestellt, da die Wasserlöslichkeit der Polymere dadurch abnehmen würde. Da die Herstellung des PAD 6,10 besonders gut funktioniert hat, und das Polymer wasserlöslich ist (>810 µg/mL), wurde dieses Polymer als Ausgangsverbindung für die folgenden Schritte verwendet.

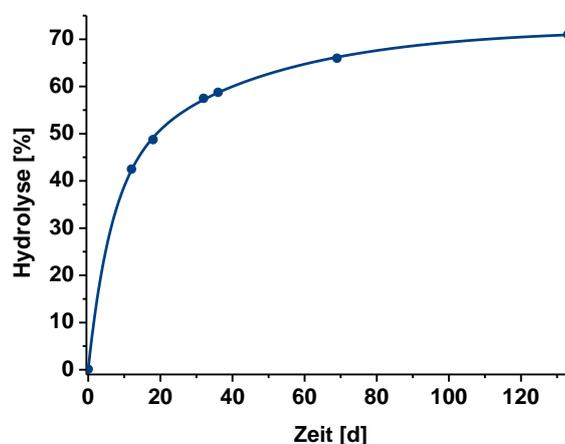
#### 3.2.4 Hydrolyse des Polyamidins zum Polyamid

Da Polykationen im Allgemeinen eine höhere Toxizität aufweisen als neutrale Polymere, könnte potentiell Polyamidin nach Herstellung des Polyrotaxans zum peptidomimetischen und damit biokompatiblen Polyamid umgesetzt werden. Hierzu wurde untersucht, ob und unter welchen sehr milden, wässrigen Bedingungen die Hydrolyse abläuft. Es wurde jeweils eine Lösung des Polyamidins **P2** in D<sub>2</sub>O angesetzt, und jeweils mit DCI und NaOD auf pD 3 und pD 10.5 eingestellt und in definierten Abständen <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren aufgenommen. Während im Säuren nach einer Woche bei RT fast keine Unterschiede im <sup>1</sup>H- NMR und <sup>13</sup>C-Spektrum zu erkennen waren, war nach einer Woche im Basischen eine deutliche Verschiebung der H- $\alpha$ - und H-A-Signale zu erkennen (Abb. 20).



**Abb. 20:** Umsetzung des Polyamidins **P2** zum Polyamid im Basischen ( $^1\text{H}$  Protonenspektrum in  $\text{D}_2\text{O}$  mit  $\text{NaOD}$  auf pD 10.5 eingestellt, 400 MHz).

Die Hydrolyse kann anhand des Signals H-A verfolgt werden. Während das Signal bei 3.15 ppm kleiner wird, nimmt die Integration des neuen Signals bei 2.76 ppm zu. Auffällig ist jedoch auch, dass die Integration des H-a insgesamt abnimmt (anfangs 4H, nach zwei Wochen nur noch etwa 3H). Abb. 21 zeigt die Kinetik der Umsetzung des Polyamidins anhand der Zunahme der Integration des Signals von H-A.



**Abb. 21:** Umsetzung des Polyamidins **P2** zum Polyamid bei pD 10.5.

Auch im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum sind nach einer Woche deutliche Veränderungen zu beobachten. Hauptsächlich ist ein neuer Peak bei 144 ppm zu erkennen, welcher charakteristisch für das Amid-C ist. Außerdem sind bei C-A und C-a jeweils neue Peaks hinzugekommen, die sich mit Hilfe des C-H-COSY-Spektrums den C-A und C-a in Nachbarschaft der  $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe zuordnen lassen.

Die Hydrolyse der Probe ist auch optisch zu beobachten: während die Lösung des Polyamidins in  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ -Lösung zu Beginn noch klar war, ist mit der Zeit eine Trübung der Probe zu erkennen, welche sich zum Ende der Hydrolyse hin zu einem deutlich sichtbaren weißen Niederschlag an den Wänden des NMR-Röhrchens hin entwickelt hat. Da

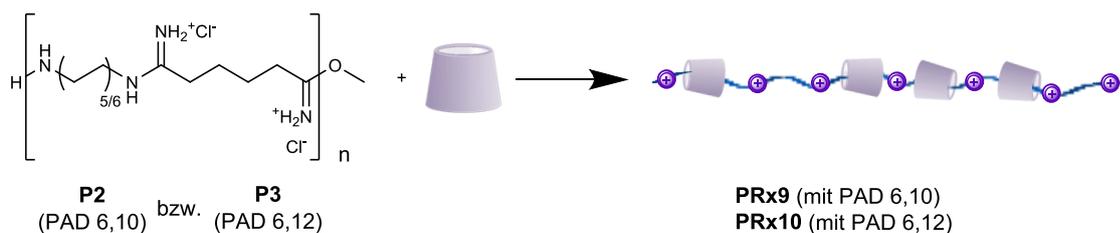
Polyamide allgemein nicht wasserlöslich sind<sup>139</sup>, entspricht die Beobachtung der Erwartung der Entstehung eines wenig wasserlöslichen Produktes.

Die Hydrolyse des Amidins zum Amid verläuft viel langsamer als erwartet. Es wäre vorteilhaft gewesen, dass die Hydrolyse innerhalb weniger Stunden in wässriger Lösung abläuft. So hätten die Amidgruppen zum Amid hydrolysiert werden können, nachdem auf das Polyamidin Cyclodextrine aufgefädelt wurden. Durch die zuvor aufgefädelt CDs hätte möglicherweise die Wasserlöslichkeit des Polyrotaxans gewährleistet werden können, während reines Polyamid wasserunlöslich ist. Hierfür wären jedoch kurze Reaktionszeiten für die Hydrolyse nötig gewesen, da im wässrigen grundsätzlich ein stetiges Abfädeln der CD vom Polymer von statten geht. Idealerweise wäre die Hydrolyse des Polyamidins direkt nach Auffädeln durchgeführt worden, noch in der wässrigen CD-Lösung, um das Gleichgewicht beizubehalten. Eine Beschleunigung der Hydrolyse hätte bei höherem pH-Wert erreicht werden können. Dabei dürfte jedoch der pH-Wert von 12 nicht überschritten werden, da in diesem Bereich die Deprotonierung des Cyclodextrins einsetzt, wodurch sie eine negative Ladung erhalten und das Polyrotaxan aller Wahrscheinlichkeit nach einen unlöslichen Niederschlag bilden würde (positives Backbone mit negativen CD). Ferner würde auch eine Erhöhung des pH-Wertes um 1.5 – 2 pH-Einheiten die Hydrolyse-Halbwertszeit vermutlich nicht von mehreren Wochen auf wenige Stunden verringern. Das Polyamid wäre zwar aufgrund seiner neutralen Ladung höchstwahrscheinlich deutlich weniger toxisch als Polyamidin, jedoch würde durch die fehlende kationische Ladung des Polymerbackbones auch insgesamt die Ladungsdichte der späteren Polyrotaxane verringert werden. Des Weiteren wäre die Hydrolyse des Polyrotaxans auf jeden Fall auch mit einem partiellen Abfädeln der CDs verbunden, was die Ladungsdichte noch weiter verringern würde. Je geringer die Ladungsdichte, desto mehr Polyrotaxan müsste später zur vollständigen Komplexierung der DNA eingesetzt werden.

Daher wird auf die Hydrolyse zum Polyamid verzichtet und Polyamidin wird im Folgenden als kationisches Polymer verwendet, mit Fokus auf die positiven Eigenschaften: die gute Wasserlöslichkeit des Polymers bleibt erhalten, und die kationischen Ladungen des Polyamidins erhöhen nochmal die Ladungsdichte des Polyrotaxans. Durch die hohe Ladungsdichte kann die DNA später besonders effektiv komplexiert werden.

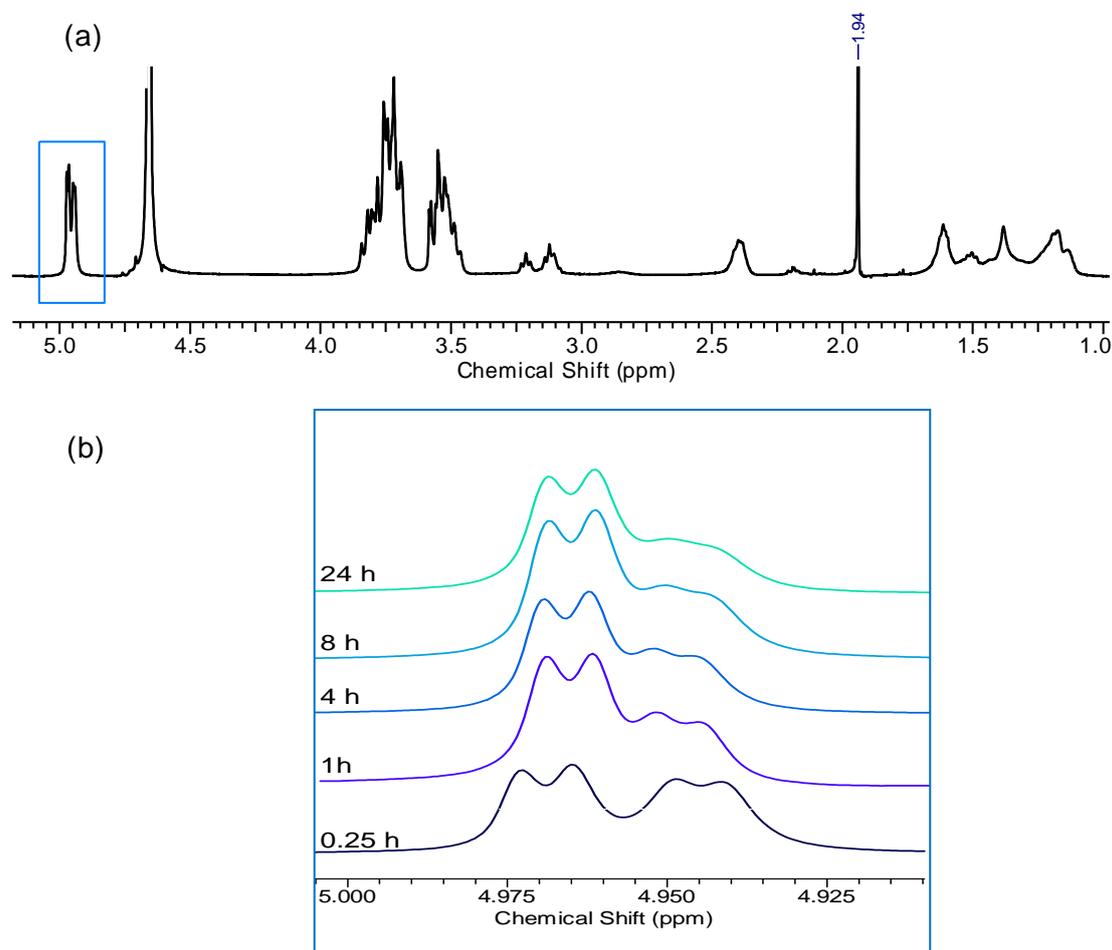
### 3.2.5 Bildung einer Einschlussverbindung des Polyamidins mit $\alpha$ -CD

Da sich bei der Untersuchung von CD-Einschlussverbindungen von Polymeren wie z.B. PEG, aber auch dem Polyamidin strukturell ähnlichen Ionen gezeigt hat, dass die Komplexierung des  $\alpha$ -CD zeitlich mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie verfolgbar ist, wurde auch hier zunächst der Einschluss des Polyamidins in  $\alpha$ -CD untersucht (Schema 13). Bei geeigneter Komplexierung des Polymers könnten  $\alpha$ -CD-Ringe wieder als Stopper verwendet werden.



**Schema 13:** Bildung des Polyrotaxans **PRx9** (aus Polyamidin **P2**) und **PRx10** (aus Polyamidin **P3**) mit nativem  $\alpha$ -CD.

In einem Testansatz wurden hierzu Lösungen von Polyamidin **P2** und  $\alpha$ -CD in  $D_2O$  im Verhältnis 1:1 (bezogen auf die Wiederholeinheiten des Polyamidins) gemischt und ein  $^1H$ -NMR-Spektrum aufgenommen. In der Zeit zwischen dem Ansetzen des Gemischs bis zur Beendigung der Messung (15 min) waren jedoch schon über 50 % der Polyamidin-Wiederholeinheiten von  $\alpha$ -CD eingeschlossen, wie im Protonenspektrum der Mischung in Abb. 22(a) zu sehen ist. Beachtenswert sind die Signale des anomeren Protons des  $\alpha$ -CD um 5.0 ppm. Dieser Bereich ist in Abb. 22(b) vergrößert dargestellt.



**Abb. 22:** (a)  $^1H$ -NMR-Spektrum der 1:1-Mischung von  $\alpha$ -CD und Polyamidin **P2** in  $D_2O$  (Polyrotaxan **PRx9**) nach 15 min, 400 MHz. Zu sehen ist einerseits eine Signalverbreiterung bei den Signalen der aliphatischen Kohlenstoffkette des Polymers sowie neue Signale des CDs im Bereich 3.8 – 3.4 ppm.

(b) Ausschnitt aus dem Protonenspektrum der 1:1-Mischung von  $\alpha$ -CD und Polyamidin **P2** (Polyrotaxan **PRx9**) in  $D_2O$  über 24 h. Gezeigt ist der Bereich von 5.01 - 4.90 ppm. In diesem Bereich sind die beiden Signale des freien  $\alpha$ -CDs (4.955 – 4.930 ppm) und des aufgefädelten  $\alpha$ -CDs (tieffeldverschoben, 4.985 – 4.955). Nach 0.25 h ist das Signal des aufgefädelten  $\alpha$ -CD bereits intensiver als das des freien CD.

In einem NMR-Kinetik-Experiment wurde die Messung wiederholt. Vom Zeitpunkt des Mischens der Polyamidin-Lösung mit der CD-Lösung bis zum Start des Aufzeichnens der Daten vergingen jeweils 5.00 min. Zu Beginn wurden jeweils alle 2 min ein Spektrum aufgenommen, später alle 5 min und am Ende jeweils im stündlichen Abstand. Da die beiden Signale des freien und des aufgefädelten anomeren CD-H nicht basisliniengetrennt im NMR erscheinen, mussten die Spektren zur Auswertung bearbeitet werden. Die Auswertung der Spektren erfolgte dabei auf zwei Arten: einmal durch Gaußen der Funktionen,

wobei das Programm aus den zwei (jeweils nochmal aufgespaltenen) Peaks zwei (fast) basisliniengetrennte Peaks bildet. Die Bereiche dieser beiden Peaks können im Programm Bruker Dynamics Center als Zone, die integriert werden soll, definiert werden. Das Programm gibt anschließend die fertige Kinetik der Zunahme der Integration des Peaks der aufgefädelten CD sowie die Abnahme der Integration des Peaks der freien CD aus. Die durch das Programm gelieferten Daten können einfach in Excel oder Origin exportiert werden, wo anschließend über das Verhältnis der Peakflächen der Auffädelgrad zu jedem Zeitpunkt aufgetragen werden kann. Die erhaltene Kinetik-Kurve, bei dem die Belegung gegen die Zeit aufgetragen ist, ist in Abb. 23 dargestellt.

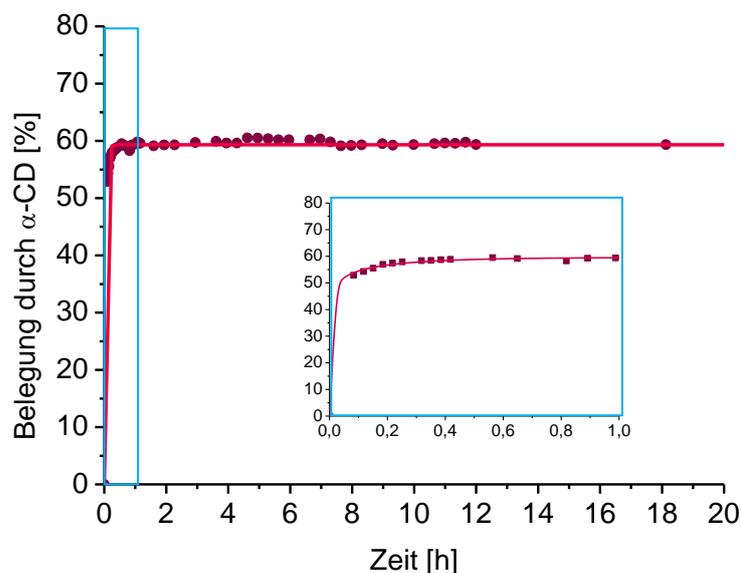
Eine weitere Möglichkeit ist das Bearbeiten der Spektren über Deconvolution, dabei werden für den nicht vollständig aufgelösten Peak zwei digitale Funktionen berechnet, deren Summe wiederum dem analogen Peak entspricht. Diese Funktionen können manuell integriert werden und durch manuelles Auftragen der Flächen gegen die Messzeiten kann ebenfalls die Kinetikkurve erhalten werden, jeweils wieder einmal die Zunahme der Peakfläche des Signals des aufgefädelten CD, und einmal die Abnahme der Peakfläche des Signals des freien CD. Die beiden erhaltenen Kurven sind nahezu identisch. Da die Bearbeitung der Spektren über Gaußen und anschließende Auswertung im Dynamics Center Programm deutlich weniger zeitaufwändig ist, ist diese Auswertung im Folgenden die Methode der Wahl.

Insgesamt ist festzustellen, dass bereits in den ersten 5 Minuten (dem Zeitpunkt zwischen dem Mischen der beiden Lösungen bis zur 1. NMR-Messung) mehr als die Hälfte aller CD eine Einschlussverbindung gebildet haben. Das Auffädeln könnte verlangsamt werden, in dem die Temperatur erniedrigt würde. Hierbei ergab sich jedoch bei diesem System (Polyamidin 6,10 **P2** mit  $\alpha$ -CD) das Problem, dass durch die Temperaturerniedrigung (20, 15 und 12° C) nicht nur der DHO-Peak näher an den Peak des anomeren H-1 des CDs verschoben wird, sondern auch die beiden Signale des aufgefädelten sowie des freien CDs noch enger zusammen liegen, als bei Raumtemperatur.

Die Kinetik folgt einer gestreckten Exponentialfunktion (Gleichung II), die typisch für eine eindimensionale Diffusion ist.<sup>140,141</sup> Der Belegungsgrad  $y$  nähert sich einem Grenzwert von  $y_{\infty} = 59.3\%$  für eine unendliche Komplexierungszeit  $t$  und eine Zeitkonstante  $\tau$  von 0.043 d. Die Gleichgewichtskonstante  $K$  wurde ausgehend von  $y_{\infty}$  mit Hilfe von Gleichung (III) berechnet, wobei  $[CD]_0$  die gesamte molare Konzentration des Cyclodextrins ist,  $x$  der molare Anteil der gesamten Konzentration an Gast-Wiederholungseinheiten im Bezug auf den Wirt, und  $y$  der Belegungsgrad an Cyclodextrinen, definiert als der molare Anteil des aufgefädelten Cyclodextrins im Bezug auf das gesamte Cyclodextrin. Die bestimmte Gleichgewichtskonstante  $K$  ist  $180 \text{ M}^{-1}$ .

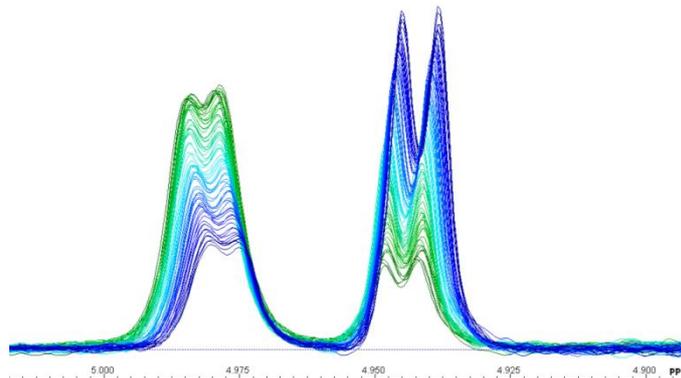
$$y = y_{\infty} \left(1 - e^{-\sqrt{t/\tau}}\right) \quad (\text{Gl. II})$$

$$K = \frac{y_{\infty}}{[CD]_0(x - y_{\infty})(1 - y_{\infty})} \quad (\text{Gl. III})$$

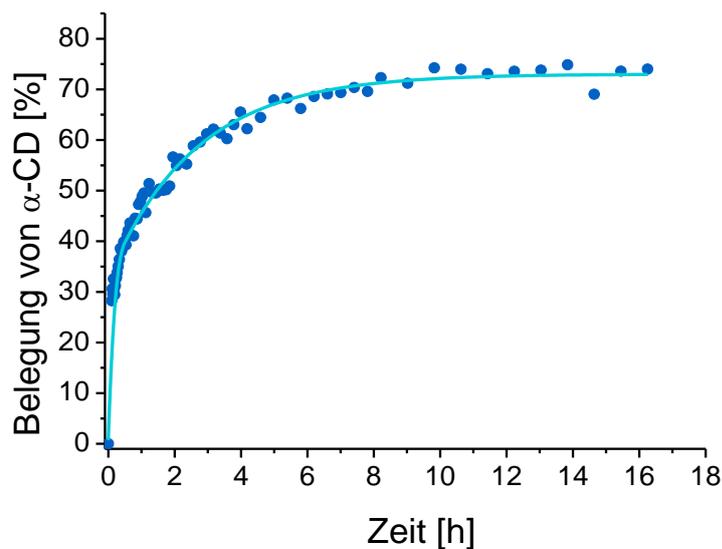


**Abb. 23:** Kinetik des Auffädels von  $\alpha$ -CD auf Polyamidin 6,10 (**P2**) bei 27 °C über Gaußen der Spektren und anschließender Auswertung mit Bruker Dynamics. Die Daten wurden gefittet mit Gleichung II, wobei  $y_{\infty} = 59.3\%$ ,  $\tau = 0.043$ .

Als nächstes wurde die Kinetik des Einschusses für ein weiteres Polyamidin (PAD 6,12; **P3**) bestimmt. Es wurden hierzu wieder beide Komponenten gelöst, gemischt und Protonen-NMR-Spektren bei 27, 20, 15 und 12 °C aufgenommen. Die Kinetik scheint ähnlich schnell zu verlaufen wie bei PAD 6,10. Im Gegensatz zu PAD 6,10 ließ sich die Probe mit PAD 6,12 problemlos kühlen und es konnten auch bei niedrigeren Temperaturen Spektren mit basisliniengetrennten anomeren Protonensignalen aufgenommen werden. Um eine möglichst langsame Kinetik zu erzielen wurde die Messung bei 12 °C durchgeführt. Diesmal erfolgte die Bearbeitung der Spektren ausschließlich durch Gaußen und anschließende Auswertung mit Dynamic Center. In Abb. 24 ist die Überlagerung der bearbeiteten Spektren zu sehen. Während zu Beginn der Messung (dunkelblau) das Gleichgewicht noch auf dem niedriger verschobenen Signal liegt (dem des freien CD), verlagert es sich im Laufe der Zeit ins Tieffeld. Zum Ende hin liegt nur noch ein kleiner Anteil des CD frei vor und der größte Teil des CD hat das Polymer umschlossen (grün). In Abb. 25 ist das Auffädeln der CD als Funktion der Zeit dargestellt.



**Abb. 24:** Überlagerung der gegaußten NMR-Spektren des Einschusses von Polyamidin 6,12 in  $\alpha$ -CD über 20 h bei 12 °C. Gezeigt ist der Ausschnitt von 4.9 bis 5.1 ppm, zu sehen sind das Signal des freien CDs (um 4.94 ppm) zu Beginn der Messung in dunkelblau, welches sich im Laufe des fortschreitenden Einschusses zugunsten des Signals des komplexierenden  $\alpha$ -CDs (tieffeldverschoben, um 4.98 ppm) verschiebt. Nach 20 h liegt nur noch ein kleiner Anteil des CDs frei vor und der größte Teil des CDs hat das Polymer umschlossen (grün).



**Abb. 25:** Kinetik des Auffüllens von  $\alpha$ -CD auf PAD 6,12 (**P3**) bei 12 °C über Gaußen der Spektren und anschließender Auswertung mit Bruker Dynamics. Die Daten wurden gefittet mit Gleichung II, wobei  $y_{\infty} = 72.9\%$ ,  $\tau = 0.33$ .

Die Kinetik läuft für Polyamidin 6,12 (**P3**) bei 12 °C bereits deutlich langsamer ab als für Polyamidin 6,10 (**P2**) bei RT. Dennoch ist nach 6 Minuten zwischen Mischen der Proben bis zur ersten Messung bereits eine Belegung von fast 30 % erreicht. Bereits nach etwa 6 Stunden ist annähernd ein Gleichgewichtszustand erreicht, die maximale Belegung liegt bei 75 %. Die Auswertung erfolgte wieder mit Gl. (II) und Gl. (III). Der Belegungsgrad  $y$  nähert sich einem Grenzwert von  $y_{\infty} = 72.9\%$  für eine unendliche Komplektierungszeit  $t$  und eine Zeitkonstante  $\tau$  von 0.33 d. Die Gleichgewichtskonstante wurde bei 12 °C bestimmt auf  $K = 500 \text{ M}^{-1}$ .

Der Einschluss des Polyamidins 6,12 in natives  $\alpha$ -CD ist zwar langsamer als der Einschluss von Polyamidin 6,10 **P2** bei 25 °C, jedoch immer noch deutlich schneller als der Einschluss des Ionen 6,10 in natives  $\alpha$ -CD (bei 25°C Halbwertszeit ca. 500 Tage).<sup>134</sup>

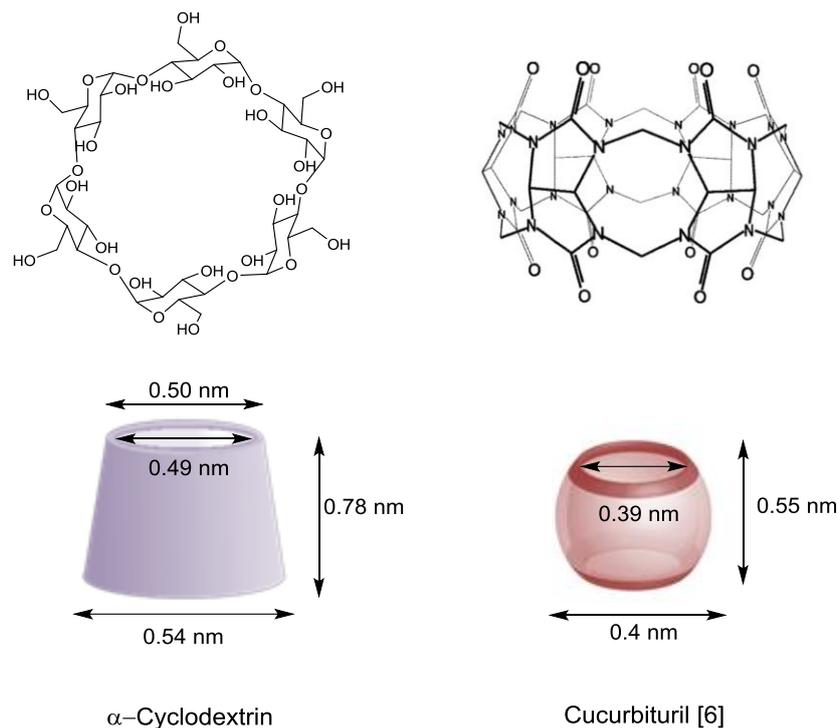
Die Kinetik läuft jedoch generell viel schneller ab als erwartet. Ebenso schnell, wie die CD auf das Polymer auffädeln, würden sie auch in einer Umgebung, in der sich keine freien CD befinden, wieder abfädeln, sodass die Polyrotaxane für eine DNA-Komplexierung und langsame Freigabe zu instabil sind. Selbst wenn die Polyrotaxane als DNA-Polyplex stabil wären, würden die CD bereits in der kurzen Zeit, in der das Polyrotaxan in Wasser gelöst worden wäre und mit DNA gemischt worden wären, wieder größtenteils dissoziieren. Demnach wäre es auch nicht zweckmäßig, statt kationischer  $\beta$ -CD kationische Derivate des  $\alpha$ -CD einzusetzen, da diese fast ebenso schnell dissoziieren würden.

### 3.2.6 Polyrotaxane aus Polyamidinen mit Cucurbituril-Stoppergruppen

Da der Einschluss von  $\alpha$ -CD mit Polyamidin zu schnell verläuft, um als geeignete Stoppergruppe zu fungieren, wurde eine alternative Stoppergruppe gewählt, die an den Enden des Polymers das schnelle Abfädeln der kationischen  $\beta$ -CDs verhindert. Das Einführen kovalenter Stoppergruppen ist grundsätzlich aufwändiger als bei supramolekularen Stoppnern, und haben außerdem den Nachteil, dass sie entweder eine pH-Änderung oder Enzyme zur Spaltung benötigen. Ein naheliegendes supramolekulares, dem  $\alpha$ -CD ähnliches macrocyclisches Molekül ist Cucurbituril [6].

Cucurbiturile (CB) sind makrocyclische Moleküle, die aus Glycoluril-Einheiten aufgebaut sind. Die Sauerstoffatome zeigen dabei ins Innere des Moleküls, sodass eine teilweise geschlossene Kavität entsteht. Der Name „Cucurbituril“ leitet sich von der Ähnlichkeit des Moleküls mit einem Kürbis ab. Cucurbiturile können in verschiedenen Größen hergestellt werden: mit 5, 6, 7, 8 und 10 Glycoluril-Untereinheiten. Die am häufigsten verwendeten Homologen im Wirkstofftransport sind CB[6], CB[7] und CB[8]. Die Kavität von CB[5] ist zu klein, um Wirkstoffmoleküle zu komplexieren, CB[10] wiederum hat eine zu große Kavität, sodass Wirkstoffmoleküle nicht mehr effizient komplexiert werden können. Es wurde gezeigt, dass CB mit einer Vielzahl an organischen und anorganischen, kationischen und neutralen Verbindungen Wirt-Gast-Komplexe bildet.<sup>142</sup> CB[6] hat eine ähnliche Größe wie  $\alpha$ -Cyclodextrin. Ein Vergleich der beiden Makrocyclen ist in Abb. 26 dargestellt.

Die hydrophobe Kavität des CD wird von Hydroxylgruppen abgeschirmt, während die ebenfalls hydrophobe Kavität des CBs von Carbonylgruppen abgeschirmt wird. Die Carbonylgruppen zeigen ein stärkeres Dipolmoment als die Hydroxylgruppen, daher sind bei der Komplexierung mit CB die Ion-Dipolwechselwirkungen stärker als mit CD. Der CB-Makrocyclen ist darüber hinaus starrer als  $\alpha$ -CD. Im Allgemeinen werden Gastmoleküle in CB[6] daher mit höherer Affinität und höherer Selektivität komplexiert als in  $\alpha$ -CD.<sup>142</sup>

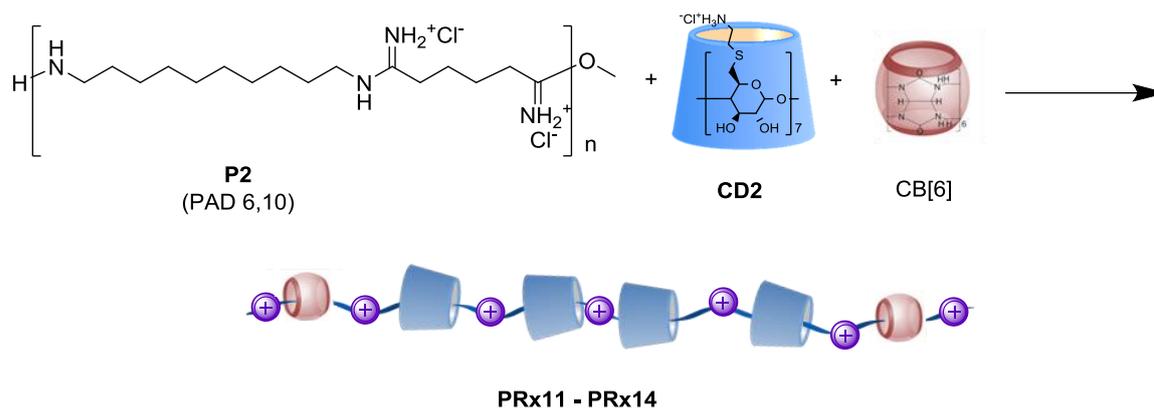


**Abb. 26:** Vergleich von  $\alpha$ -Cyclodextrin mit CB[6].<sup>141,142</sup>

Die Stabilität des CB-Gast-Komplexes nimmt analog zum CD zu, wenn der Kontakt zwischen dem hydrophoben Gastmolekül und der ebenfalls hydrophoben Kavität des CBs maximal wird. Eine von Buschmann *et al.*<sup>143,144</sup> ausführlich untersuchte Gruppe von Einschlussverbindungen in CB[6] sind die Alkylammoniumionen. Es wurde gezeigt, dass mit  $\alpha,\omega$ -Diammoniumalkanen besonders stabile Einschlussverbindungen gebildet werden, da zwischen dem Inneren des CB und der Alkylkette hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden, gleichzeitig jedoch die kationische Ammoniumgruppe durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen sowie über Wasserstoffbrücken mit den Glycoluril-Einheiten stabilisiert ist. Die optimale Kettenlänge liegt bei 6  $\text{CH}_2$ -Einheiten. Die Stabilitätskonstante für diesen Komplex ist  $2.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Auch Polyrotaxane mit CB wurden bereits beschrieben,<sup>145</sup> sowie ein gemischtes Polyrotaxan aus  $\alpha$ -CD und CB.<sup>146</sup> Auch wurden bereits Polyrotaxane aus CB und dem Polyamidin strukturell ähnlichen Polyamid hergestellt.<sup>36</sup> Neu ist jedoch der Einsatz des CB[6] als supramolekulare Stoppergruppe für  $\beta$ -CD auf einem gemischten Polyrotaxan.

Die Toxizität von CB ist wie die von CD gering. In vitro Zellassays mit Tierzelllinien sowie humanen Zelllinien war bis in den millimolaren Konzentrationsbereich praktisch keine Toxizität der freien CBs feststellbar.<sup>147</sup> Eine oral verabreichte 1:1-Mischung von CB[7] und CB[8] führte bei Mäusen zu keinerlei toxischen Effekten bis zu Konzentrationen von  $600 \mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht.<sup>148</sup> Da für den Wirkstofftransport bzw. die hier angestrebte Gentransfektion nur sehr geringe Mengen an CB verwendet werden, sollte der toxische Konzentrationsbereich weit unterschritten werden.

Es soll sequentiell zunächst ein  $\beta$ -CD Derivat auf das Polyamidin aufgefädelt werden, und anschließend CB[6] zugegeben werden, sodass die CD in der Mitte der Kette sitzen und CB außen. Durch Ultrafiltration können anschließend alle freien CD und CB vom Polyrotaxan abgetrennt werden. Das Prinzip ist in Schema 14 dargestellt.



**Schema 14:** Polyrotaxane aus Polyamidin **P2** mit Hepta-Cys- $\beta$ -CD **CD2** und CB-Stoppergruppen (**PRx11** – **PRx14**, wobei für **PRx11** und **PRx12** natives  $\beta$ -CD eingesetzt wurde).

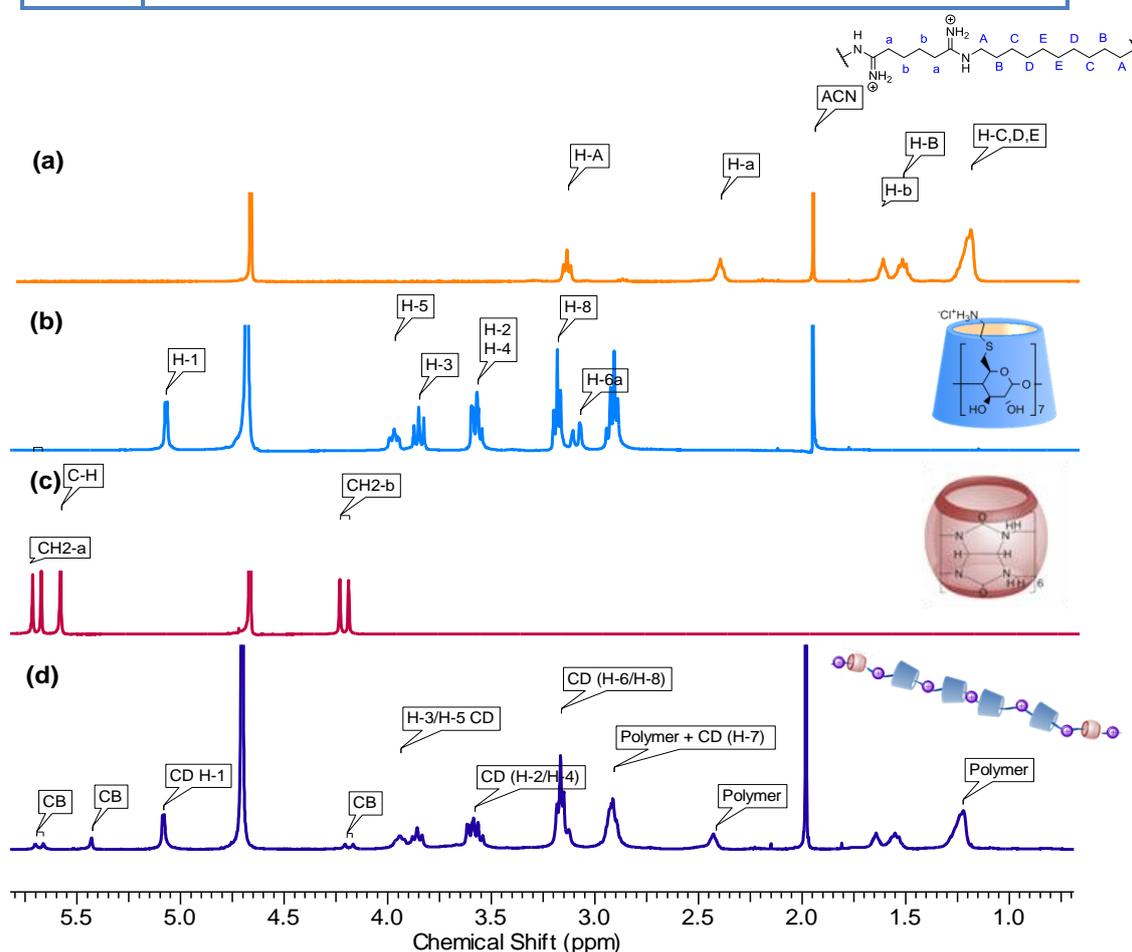
Um ein optimales Abstoppen des Polyrotaxans zu erreichen, wurden zunächst in mehreren Testansätzen die besten Bedingungen ermittelt. Alle Polyrotaxane wurden über eine 5 kDa Membran ultrafiltriert, bevor die Belegung via  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt wurde.

Im Gegensatz zu  $\alpha$ -CD ist CB nur in sehr geringen Mengen in Wasser löslich (0.018 mM).<sup>142</sup> Die Löslichkeit kann jedoch durch Zugabe von Säure oder aber durch Alkalisalze wie Natriumsulfat deutlich erhöht werden. Die Protonen bzw. Natriumionen interkalieren in die Kavität des CB und erhöhen damit die Wasserlöslichkeit. Das gleiche Phänomen wurde im Sauren beobachtet, da hier ein Proton in die Kavität des CB einlagert und ebenfalls zu besserer Löslichkeit führt. Die Löslichkeit des CB steigt folglich mit der Natriumsulfatkonzentration. Allerdings steht der Einschluss des Natriumkations in der Kavität des CB in Konkurrenz zum Einschluss des Polymers. Daher wurde nur so viel Natriumsulfat zugegeben, bis CB[6] gerade gelöst war. Insgesamt wurden auf diese Weise jedoch hohe Belegungen (54 % bei **PRx11**) erreicht. Für supramolekulare Stoppergruppen sind Belegungen bis maximal 10 % erstrebenswert. Durch verringern der eingesetzten Äquivalente an CB konnte die Belegung auf 22 % (**PRx12**) reduziert werden. Letztendlich wurde LiCl statt  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  als Salz verwendet. Das Lithiumkation zeigt aufgrund seiner Größe etwa ein Zehntel der Komplexstabilität, sodass der Einschluss des Polymers begünstigt wird. Insgesamt konnte die CB Konzentration so gering gewählt werden, dass sich CB vollständig in der LiCl-Lösung löste. Chlorid wurde als Gegenion gewählt, da die kationischen CD-Derivate ebenfalls Chlorid als Gegenion haben. Mit einer LiCl-Konzentration von 0.2 M und 0.1 Äquivalenten CB[6] konnte schließlich eine Belegung von 8 % erreicht werden. Die höhere Ionenstärke hat gleichzeitig auch einen positiven Einfluss auf den Einschluss des kationischen  $\beta$ -CD. Während die Salzkonzentration bei nativem  $\beta$ -CD keinen Einfluss hat, wurde gezeigt, dass der Einschluss geladener CD-Derivate auf Polymeren durch Zugabe von Salzen erhöht werden kann, da die intermolekulare Coulombabstoßung der aufgefädelten kationischen Ringen verringert wird.

Eine Zusammenfassung der Bedingungen und der erhaltenen Belegungen der Testreihe ist in Tabelle 3 gegeben. Das optimale Polyrotaxan **PRx14** hat eine Belegung von 58 % Hepta-Cysteaminyl- $\beta$ -CD (**CD2**) und 8 % CB[6]. Das Protonenspektrum des Polyrotaxans **PRx14** ist in Abb. 27 dargestellt.

**Tabelle 3:** Polyamidin-basierte Polyrotaxane mit CB als Stoppergruppe, hergestellt nach **Schema 14**. Die angegebenen Äquivalente sind jeweils bezogen auf die Wiederholeinheiten des Polyamidins. Die Belegung durch  $\beta$ -CD und CB[6] ist ebenfalls auf die Wiederholeinheiten des Polyamidins bezogen und wurde nach Ultrafiltration über eine 5 kDa Membran via NMR bestimmt.

PR <sub>x</sub>	Äq. $\beta$ -CD	Äq. CB[6]	Salz	Belegung $\beta$ -CD	Belegung CB[6]
PR <sub>x11</sub>	1 (nativ)	1	0.03 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11 %	54 %
PR <sub>x12</sub>	5 (nativ)	0.33	0.03 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6 %	22 %
PR <sub>x13</sub>	2 (CD2)	0.1	0.1 M LiCl	19 %	15 %
PR <sub>x14</sub>	2 (CD2)	0.1	0.2 M LiCl	58 %	8 %



**Abb. 27:** Überlagerung der Protonenspektren des Polyamidins **P2** (a), des kationischen CD-Derivates **CD2** (b), des Cucurbiturils CB[6] (c) und des Polyrotaxans **PR<sub>x14</sub>** (d).

Die Belegung des Polymers durch CD wurde via <sup>1</sup>H-NMR (Abb. 28) bestimmt, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Bestimmung der Belegung durch CB erfolgte nach demselben Prinzip. Die Integration der CB-Signale wurde im Bezug zur Integration der Signale des Polymers gesetzt. Besonders gut integriert werden können die Signale im Bereich 0.75 – 1.75 ppm. Diese Signale werden als 20 H definiert, was einer Wiederholeinheit des Polymers entspricht. Im Protonenspektrum des CB gibt es 3 Signale, zwei Dubletts bei

5.7 und 4.3 ppm, sowie ein Singulett bei 5.1 ppm. Jedes der drei Signale haben normalerweise die Integration 2 H (bezogen auf eine Wiederholeinheit des CB). CB[6] hat 6 dieser Wiederholeinheiten. Wäre jede Polymereinheit von einem CB umschlossen, wäre die Integration jedes CB-Signals 12 H. Durch Division der tatsächlichen Integration eines Signals (0.95 H) mit 12 H lässt sich die Belegung auf 0.08, d.h. 8 % berechnen.

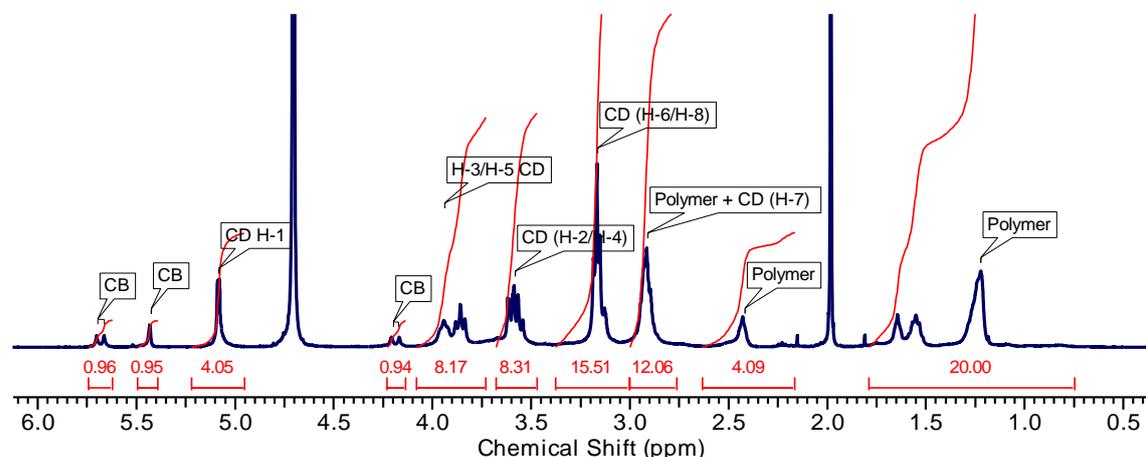
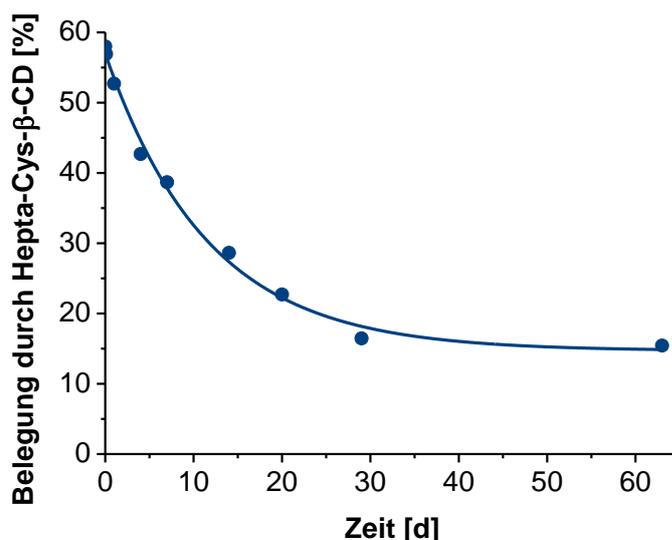


Abb. 28:  $^1\text{H}$ -Protonenspektrum des Polyrotaxans **PRx14** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).

Die Freisetzung des kationischen  $\beta$ -CD **CD2** vom Polyrotaxan wurde bei semikontinuierlicher Dialyse verfolgt. Dazu wurde das Polyrotaxan in PBS bei 37 °C inkubiert und in definierten zeitlichen Abständen ultrafiltriert. Der Rückstand wurde jeweils in frischem PBS-Puffer aufgenommen und weiter inkubiert. Der Gehalt an CD im Filtrat wurde mittels TNS-Assay bestimmt und für den Plot aufsummiert, um die Gesamtmenge an freigesetztem CD zu bestimmen. Über die eingesetzte Menge Polyrotaxan und die ursprüngliche Belegung an  $\beta$ -CD kann über die Menge der freigesetzten CD die Belegung des Polymers zum Zeitpunkt  $t$  bestimmt werden. Diese ist in Abb. 29 dargestellt. Nach 10 Tagen ist die Belegung nur noch 50 % der ursprünglichen Belegung. Im finalen Gleichgewicht beträgt der Restgehalt an CD immer noch 15 %. Bei einer idealen Dialyse wäre eine vollständige Dissoziation des Polyrotaxans erwartet worden. In diesem Fall wurde jedoch nicht kontinuierlich dialysiert, sondern nur in definierten Abständen. Weiterhin kann bei der Ultrafiltration im Vivaspin (3 kDa MWCO) durch die Hydrathülle des kationischen CD ein Rückstand im Retentat sowie in der Membran verbleiben, die im Filtrat nicht erfasst werden. Die Wiederfindungsrate bei einem ähnlichen Experiment lag bei etwa 75 %.<sup>131</sup> Somit ist die finale Belegung des Polymers durch CD möglicherweise sogar geringer als 15 %.



**Abb. 29:** Dissoziation des Polyrotaxans **PRx14** mit CB als Stoppergruppe. Gezeigt ist die Abnahme der Belegung des Polymers durch **CD2** bei semikontinuierlicher Dialyse über 65 Tage.

Weitere auf Polyamidin 6,10 basierende Polyrotaxane wurden mit dem kationischen  $\beta$ -CD-Derivat **CD3**, sowie mit den kationischen  $\alpha$ -CD-Derivaten Hexa-Cysteaminyl- $\alpha$ -CD **CD6** und dem entsprechenden dimethylierten  $\alpha$ -CD-Derivat **CD7** hergestellt.  $\alpha$ -CDs bieten sich in diesem Fall an, da sie durch ihre kleinere Kavität eine höhere Bindungsaffinität zum Polyamidin haben und dadurch potentiell höhere Belegungen erreicht werden könnten als mit  $\beta$ -CD. In Tabelle 4 sind die Zusammensetzungen der Polyamidin-Polyrotaxane zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Übersicht über die hergestellten Polyamidin-Polyrotaxane. Angegeben ist jeweils die Belegung durch  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -CD und CB[6], die Masse pro Wiederholeinheit sowie das M/N-Verhältnis.

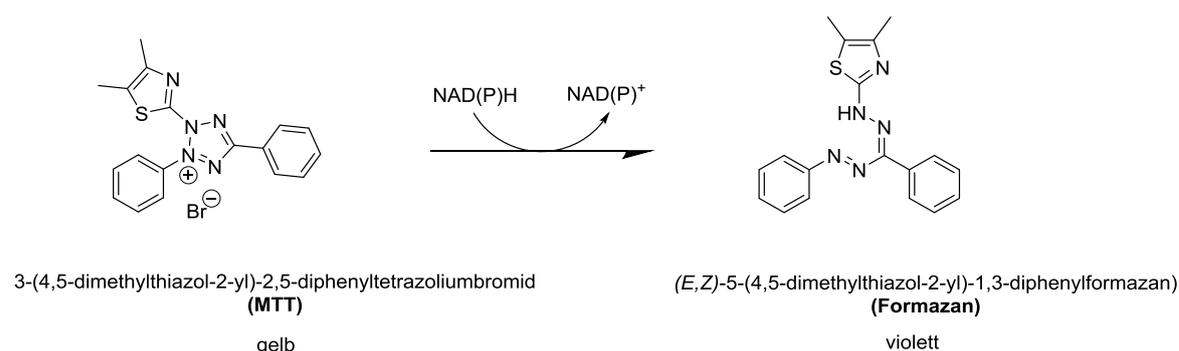
PRx	Polymer	CD-Derivat	Belegung CD	Belegung CB[6]	M Einheit [g/mol]	M/N [g/mol]
<b>PRx14</b>	<b>P2</b> PAD 6,10	<b>CD2</b> (Hepta-Cys- $\beta$ -CD)	58 %	8 %	1480	240
<b>PRx15</b>	<b>P2</b> PAD 6,10	<b>CD3</b> (Hepta-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\beta$ -CD)	8 %	5 %	560	220
<b>PRx16</b>	<b>P2</b> PAD 6,10	<b>CD6</b> (Hexa-Cys- $\alpha$ -CD)	61 %	5 %	1340	210
<b>PRx17</b>	<b>P2</b> PAD 6,10	<b>CD7</b> (Hexa-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\alpha$ -CD)	7 %	5 %	520	210

Während bei **PRx14** mit CD-Derivat **CD2** eine Belegung von 58 % erzielt wurde, wurde unter sonst identischen Bedingungen mit dem dimethylierten CD-Derivat **CD3** nur eine Belegung von 8 % erreicht (**PRx15**). Möglicherweise ist die Kavität des CD-Derivats **CD3** durch die Methylgruppen der sieben Cysteaminylreste sterisch abgeschirmt, sodass das Auffädeln auf das Polymer verhindert wird. Ähnliches ist im Vergleich der Belegung von **PRx16** (mit Hexakis-Cysteaminyl- $\alpha$ -CD) mit **PRx17** (mit dimethyliertem  $\alpha$ -CD-Derivat) zu beobachten. Die Belegung des Polymers mit **CD6** ist mit 61 % neunmal so groß wie mit **CD7**. Die sterische Hinderung führt demnach bei den dimethylierten CD-Derivaten zu einer geringeren Belegung, wie auch bereits bei dem Ionen-Polyrotaxan **PRx6** beobachtet wurde. Grundsätzlich sind keine Unterschiede in der Belegung der jeweils äquivalenten  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD-Derivate festzustellen, trotz des Größenunterschieds der Kavität der beiden CD und der damit erwarteten höheren Komplexierungsaffinität des  $\alpha$ -CD.

### 3.2.7 Toxizitätsbestimmungen der CD-Derivate, Polymere und Polyrotaxane mittels MTT Assay

Zelltoxizitätsassays werden eingesetzt, um den Einfluss von chemischen Verbindungen auf die Zellproliferation zu untersuchen, oder direkte cytotoxische Effekte zu zeigen, die zum Zelltod führen können. Zur Bestimmung der Viabilität, Proliferation und der Aktivität von Zellen wurde bereits eine Vielzahl an Assays entwickelt. Neben relativ aufwändigen radioaktiven Tests, die darauf basieren, dass Zellen ein radioaktives Substrat wie beispielsweise  $[3H]$ -Thymidin aufnehmen<sup>149</sup>, wurden deutlich günstigere und weniger zeitintensivere colorimetrische Assays entwickelt. Die Durchführung in Multiwellplatten sowie das Auslesen an Mikrotiter-plattenlesern erlaubt einen großen Probendurchsatz.

Der bekannteste colorimetrische MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität und Zellproliferation wurde 1983 von Mosmann beschrieben.<sup>150</sup> Er basiert auf der Umsetzung des gelben MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid), eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalses, zum unlöslichen, violetten Formazan (Abb. 30). Nur lebende, metabolisch aktive Zellen sind in der Lage, MTT umzusetzen. Das gebildete Produkt ist nicht wasserlöslich und reichert sich daher in lebenden Zellen an. Insgesamt ist die Farbbildung durch Formazan-Bildung proportional zur Anzahl an metabolisch aktiven lebenden Zellen.<sup>150</sup>



**Abb. 30:** Prinzip des MTT-Assays: Reduktion des gelben MTT zum violetten Formazan.<sup>150</sup>

Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass MTT durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen reduziert wird,<sup>151</sup> ist mittlerweile bekannt, dass MTT zwar auch in den Mitochondrien reduziert wird, die Reduktion jedoch hauptsächlich nicht-mitochondrial, cytosolisch und microsomal stattfindet. Sie ist abhängig von Oxidoreduktasen, die wiederum abhängig von NADH und NADPH sind. Die Reduktion des MTT zum

Formazan ist folglich kein Maß für die Anzahl der lebenden Zellen oder ihres Wachstums, sondern für diverse enzymatische Aktivitäten im Zellmetabolismus.<sup>152</sup> Zellen mit einem niedrigen Metabolismus reduzieren nur wenig MTT, im Gegensatz dazu zeigen Zellen mit hohem Metabolismus und einer schnellen Zellproliferation eine hohe Reduktionsrate.

Ausgehend vom MTT-Assay wurden noch weitere, ähnliche Farbstoffe auf Tetratzoliumbasis entwickelt, z.B. MTS<sup>153</sup>, XXT<sup>153,154</sup> und WST<sup>155</sup> Assays. Sie unterscheiden sich von MTT, welches durch seine positive Ladung membrangängig ist, wohingegen MTS, XTT und WST-1 eine negative Ladung haben und deswegen weniger zellpermeabel sind. Weiterhin ist für die Reduktion von MTS, XTT und WST-1 ein intermediärer Elektronenakzeptor nötig, um die entsprechenden wasserlöslichen Formazane zu bilden.<sup>152</sup>

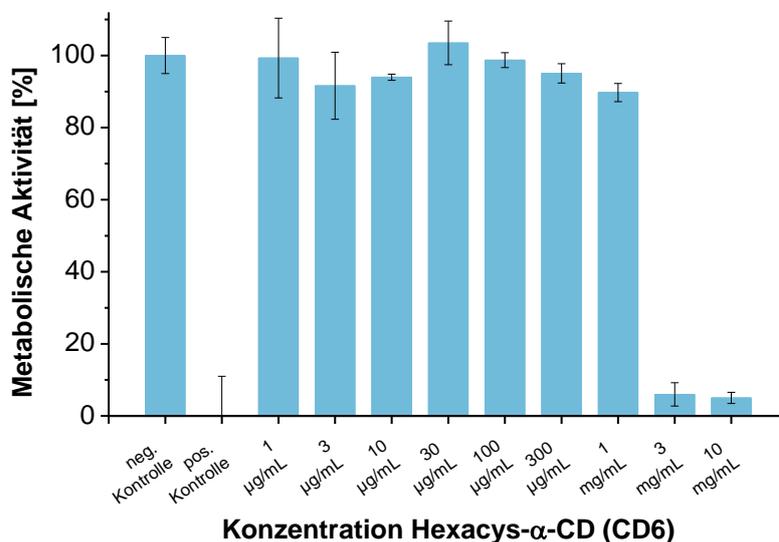
In dieser Arbeit wurde der ursprüngliche MTT-Assay verwendet, da er einfach durchzuführen ist, kostengünstig ist und reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Als Zelllinien wurde HEK293T und HepG2 Zellen verwendet. HEK293T sind humane embryonale Nierenzellen, die als besonders gut zu transfizierende und einfach zu handhabende Zellen gelten. Diese Zellen werden in DMEM Medium mit 10 % FCS Zusatz kultiviert, zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus.<sup>156,157</sup> HepG2 Zellen entstammen einem humanen hepatozellulärem Karzinom und werden in RPMI Medium mit 10 % FCS Zusatz kultiviert.<sup>158</sup> Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Die beiden Zelllinien sind für Toxizitätsbestimmungen geeignet. Gerade die humane Zelllinie HepG2 ist die am besten charakterisierte Leberzelllinie, und wird häufig als Modellsystem verwendet, um die Toxizität xenobiotischer Substanzen zu untersuchen.<sup>159,160</sup> Weiterhin ist die Leber das Haupt-Entgiftungsorgan des Körpers, viele Substanzen gelangen langfristig in die Leber, werden dort ggf. metabolisiert werden und schließlich über die Nieren ausgeschieden werden.<sup>161</sup> Daher sind ergänzend auch Toxizitätsbestimmungen an einer Nierenzelllinie nützlich. Da die Nieren-Zelllinie HEK293T später ohnehin für die Transfektionsstudien verwendet wurde, war es naheliegend, die Toxizitäten zugleich für diese Zelllinie zu bestimmen.

Zunächst wurden als optimale Bedingungen eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well gewählt. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 h wurden die zu testenden Substanzen (CD-Derivate, Polymere und Polyrotaxane) in halblogarithmischen Verdünnungsreihen auf die Zellen aufgetragen. Nach 24 h Inkubation wurde die MTT Lösung zugegeben. Innerhalb von 4 h bildete sich das violette Formazan. Durch Zugabe eines Lysepuffers war das gebildete Formazan nach weiteren 24 h vollständig gelöst und die Absorption der nun homogenen Lösung konnte im Platerreader bei 570 nm bestimmt werden.

Zum Lösen des Formazans wird je nach Protokoll angesäuerte Isopropanollösung<sup>150</sup>, DMSO<sup>162</sup> oder eine Natriumlaurylsulfatlösung (SDS)<sup>163</sup> verwendet. Die besten Ergebnisse konnten in dieser Arbeit mit einer 10 % SDS-Lösung erzielt werden. Für die Lyse mit DMSO musste für ein deutliches Farbergebnis zuvor das Medium von den Zellen entfernt werden. Jedoch entstanden gerade bei den leicht von der Oberfläche abzulösenden HEK293T Zellen beim Absaugen des Mediums große Abweichungen in den Messwerten durch zuvor abgelöste Zellen. Daher wurde die Lyse durch direkte Zugabe der SDS-Lösung zum Medium durchgeführt. Da dem Medium Phenolrot zugesetzt ist, wurde die SDS-Lösung in 0.01 M HCl-Lösung angesetzt, um Interferenzen beim Bestimmen der Absorption zu vermeiden. Auf diese Weise konnte ein klarer, intensiver und reproduzierbarer Farbunterschied erhalten werden.

Bei der Negativkontrolle wurde Wasser zugesetzt, bei der Positivkontrolle wurde 20 % Ethanol verwendet. Die Absorptionswerte der Negativkontrollen (maximale Zellviabilität) wurden = 100 % Viabilität gesetzt, die Absorptionswerte der Positivkontrollen = 0 % Viabilität. Von allen weiteren Messwerten wurde zunächst der durchschnittliche Messwert der

Positivkontrolle abgezogen und anschließend die prozentuale Viabilität der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet. Die Ergebnisse sind am Beispiel des Hexakis-Cysteaminylnyl- $\alpha$ -CD **CD6** und der Zelllinie HEK293T in Abb. 31 dargestellt.



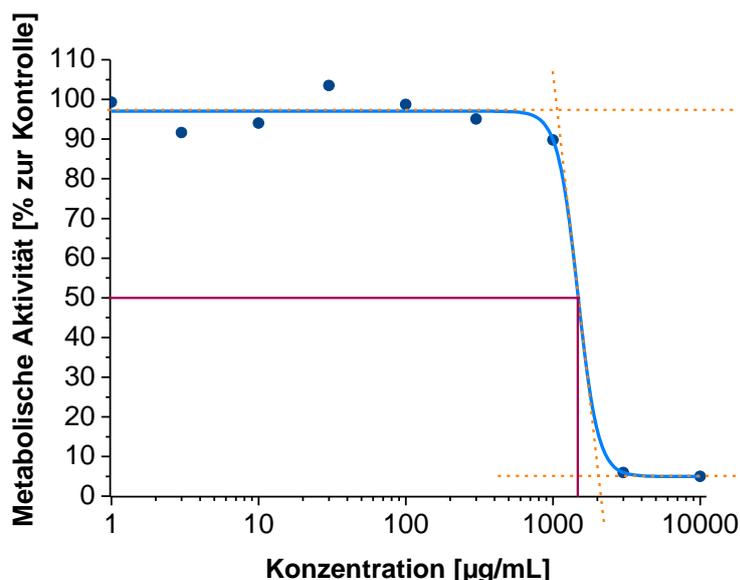
**Abb. 31:** Metabolische Aktivität der HEK293T-Zellen nach 24 h Inkubation mit Hexakis-Cysteaminylnyl- $\alpha$ -CD **CD6**.

Die minimalen Abweichungen der metabolischen Aktivität bei nicht-toxischen Konzentrationen ergeben sich aus minimalen Unterschieden in der Zellzahl, entweder beim Aus säen oder durch Ablösen der Zellen während des Assays. Bis zu 100  $\mu$ g/mL ist kein Einfluss auf die metabolische Aktivität zu beobachten, bei 1 mg/mL ist bereits eine leichte Abnahme der Vitalität zu verzeichnen und bei 3 m/mL ist nur noch etwa 5 % der ursprünglichen metabolischen Aktivität erhalten.

Aus den Daten wurde anschließend der  $LC_{50}$ -Wert für jede Substanz bestimmt. Die  $LC_{50}$  Konzentration ist als mittlere letale Konzentration definiert und entspricht der Konzentration eines Wirkstoffs, die über den getesteten Zeitraum bei 50 % der Zellen zum Zelltod führt.<sup>164–166</sup> Die relative metabolische Aktivität wurde logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus 3 Experimenten ( $n=3$ ). Die Daten wurden mit einer Hill Funktion (Gl. IV) nach Weyermann *et al.*<sup>167</sup> geplottet. Dabei entspricht  $y_{100} = 100$  % Viabilität,  $y_0 = 0$  % Viabilität.  $[c]$  ist die Konzentration,  $H$  ist der Hill-Koeffizient. Als  $LC_{50}$  ist dann die Konzentration definiert, die einer Zellviabilität 50 % entspricht.<sup>167</sup>

$$y = y_0 + \frac{(y_{100} - y_0) [c]^H}{[LC_{50}]^H + [c]^H} \quad (\text{Gl. IV})$$

Die Auswertung ist am Beispiel der Daten des Hexa-Cystaminylnyl- $\alpha$ -CD an HepG2 Zellen gezeigt. Die Rohdaten wurden mit Gleichung IV gefittet. Die Auswertung mit ORIGIN liefert die halbe letale Dosis  $LC_{50} = 1471$   $\mu$ g/mL.



**Abb. 32:** Hill-Plot nach Gleichung IV zur Bestimmung des  $LC_{50}$ -Wertes von Hexa-Cystaminy- $\alpha$ -CD (**CD6**) an HepG2 Zellen über 24 h.  $y_{100} = 98.1\%$ ,  $y_0 = 5.6\%$  mit  $H = 6.3$ , und  $LC_{50} = 1471$  ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Die Auswertung erfolgte analog für alle getesteten Substanzen. Die bestimmten  $LC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 5 - Tabelle 7 zusammengefasst. Die teilweise hohen Standardabweichungen sind durch den großen logarithmischen getesteten Konzentrationsbereich bedingt. Im Allgemeinen ergeben sich für die synthetisierten kationischen CD-Derivate  $LC_{50}$ -Werte zwischen knapp 1 und 10 mg/mL. Zwischen beiden getesteten Zelllinien stimmen die  $LC_{50}$ -Werte gut miteinander überein, und liegen auch im Bereich der Literaturdaten für natives  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD. Für natives  $\alpha$ -CD wurde beispielsweise an CaCo2-Zellen über 30 min ein  $LC_{50}$ -Wert von 50 mg/mL bestimmt.<sup>168</sup>

Grundsätzlich sind alle kationischen CD-Derivate toxischer als die nativen bzw. neutralen CD-Derivate. Dies war zu erwarten, da kationische Makromoleküle mit der anionischen Zellmembran sowie anionischen Zellbestandteilen wechselwirken können.

Beim Vergleich der  $LC_{50}$ -Werte der Cysteaminy-Derivate mit freien Aminogruppen (**CD6** und **CD2**) mit den entsprechend dimethylierten Aminogruppen (**CD7** und **CD3**) ist für beide CD-Größen der  $LC_{50}$  Wert für das dimethylierte Derivat größer. Dies könnte auf die tertiäre Aminogruppe zurückzuführen sein, die deutlich weniger reaktiv ist als die freie Aminogruppe und somit weniger Angriffsmöglichkeiten in der Zelle bzw. dem Zellmetabolismus hat. Während sich die  $LC_{50}$  Werte von **CD6** und **CD2** nur marginal unterscheiden, ist bemerkenswert, dass der  $LC_{50}$  Wert von **CD3** etwa dreimal größer ist als der  $LC_{50}$  Wert von **CD7**. Es wäre denkbar, dass dieses  $\alpha$ -CD-Derivat besonders gut Zellmembranbestandteile wie z.B. Phospholipide komplexieren kann.<sup>169</sup>

Das histidinylierte  $\beta$ -CD-Derivat **CD4** gehört mit einem  $LC_{50}$  Wert um 5.5 mg/mL ebenfalls zu den weniger toxischen Derivaten. Durch die Histidin-Funktion ist dieses CD-Derivat wie erwartet biokompatibler als das Hepta-Cysteaminy-Derivat. Durch seinen isoelektrischen Punkt im Neutralbereich ist die kationische Ladungsdichte pro Masse vergleichsweise geringer als bei den anderen Derivaten, was ebenfalls zu einer niedrigeren Toxizität führen kann.

Prinzipiell sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD sowie ihre Derivate in der Lage, Einschlussverbindungen mit Zell- und Zellmembranbestandteilen zu bilden. So kann beispielsweise  $\alpha$ -CD z.B.

Phosphatidylinositol<sup>170</sup>,  $\beta$ -CD unter anderem Cholesterol aus der Zellmembran zur Disruption der Membran führen, was langfristig zum Zelltod führt.<sup>171,172</sup>

Da in dieser Arbeit jedoch die CD vor allem in Form von Polyrotaxanen verwendet werden, ist die direkte Toxizität durch Entzug von Zellmembranbestandteilen gering, da die CD bereits als Einschlussverbindung vorliegen. Ein Vergleich mit den nativen CD-Derivaten zeigt, dass die kationischen Derivate grundsätzlich toxischer sind. Dies ist mit ihrer Eigenschaft, unspezifisch an die anionische Zellmembran zu adsorbieren, zu begründen. Über die elektrostatische Wechselwirkung mit der Zellmembran ist eine schnelle Internalisierung der CDs möglich.<sup>169</sup>

**Tabelle 5:** LC<sub>50</sub>-Werte aller synthetisierten CD-Derivate im Vergleich zu nativen CD und CB[6], getestet an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) sowie an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) über 24 h. Die Werte sind angegeben in mg/mL mit  $\pm$ Standardabweichung mit 3 Proben (n=3).

Substanz/Zelllinie	LC <sub>50</sub> [mg/mL]	
	HEK293T	HepG2
$\alpha$ -CD	>100*	40 $\pm$ 3
CD6 (Hexa-Cys- $\alpha$ -CD)	0.9 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.5
CD7 (Hexa-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\alpha$ -CD)	2.9 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2
$\beta$ -CD	>30*	>30*
CD2 (Hepta-Cys- $\beta$ -CD)	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1
CD3 (Hepta-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\beta$ -CD)	8.0 $\pm$ 2.5	9.3 $\pm$ 0.6
CD4 (Hepta-His- $\beta$ -CD)	5.6 $\pm$ 0.9	5.5 $\pm$ 0.7
CB[6]	>3*	>3*

\* Löslichkeitslimit erreicht.

In Tabelle 6 sind die LC<sub>50</sub> Werte aller Polymere aufgelistet. Die für das kommerzielle Polykation PEI (linear, 25 kDa) bestimmten LC<sub>50</sub> = 53 bzw. 16  $\mu$ g/mL stimmt mit Literaturdaten überein.<sup>173</sup> Die höchste Zytotoxizität ist für die Polykationen Ionen 6,10 und Ionen-11 festzustellen. Der LC<sub>50</sub> Wert liegt hier im Bereich einiger  $\mu$ g/mL, ebenso wie für Poly-N-Oxid-11. Für Poly-N-Oxid 11 war eine etwas geringere Toxizität erwartet worden, da durch den zwitterionischen Charakter die Gesamtladung des Polymers neutral ist. Im direkten Vergleich zum nicht oxidierten Ionen 11 (mit 2 Methylengruppen) ist jedoch nur eine minimale Verringerung der Toxizität zu beobachten (ca. 3  $\mu$ g/mL für das N-Oxid, 0.5  $\mu$ g/mL für Ionen-11). Die Toxizität des ebenfalls kationischen Polyamidins liegt mit 60 bzw. 30  $\mu$ g/mL im Bereich des PEIs. Möglicherweise kann Polyamidin in der Zelle zu Polyamid umgesetzt werden und dadurch die Gesamtoxizität verringert werden.<sup>174</sup>

Von Davis *et al.*<sup>49</sup> wurde bereits die Toxizität verschiedener Polyamide (PAD 6,6 bzw. PAD 9,6) in einem MTT Assay über 24 h bestimmt. Für PAD 6,6 wurde ein LC<sub>50</sub>-Wert von 4.6  $\mu$ M, für PAD 9,6 34  $\mu$ M gefunden. Die molare Masse von PAD 6,6 pro Einheit ist 326 g/mol, der LC<sub>50</sub>-Wert liegt damit etwa 1500  $\mu$ g/mL. Damit scheinen die Polyamide von Davis um das mehr als hundertfache weniger toxisch zu sein. Die Toxizität ist jedoch immer abhängig von verwendetem Zelltyp (BHK-21 d.h. Hamster-Nieren-Zellen

bei Davis) und dem verwendeten Medium. Je höher die Anzahl an ausgesäten Zellen, desto geringer die Toxizität auf jede einzelne Zelle.

Der größte Unterschied in der Synthese im Vergleich zu Davis ist die 5-fache Reaktionsdauer und die damit verbundene deutlich erhöhte Kettenlänge der Polymere. Davis *et al.*<sup>49</sup> wählten eine Reaktionsdauer von 15 h und erhielten nach Ultrafiltration über eine 1 kDa-Membran (ohne Salze) eine Ausbeute von 13 bzw. 21 %. In dieser Arbeit wurde als Reaktionsdauer jedoch 3 Tage gewählt und anschließend mit NaCl über eine 5 kDa-Membran ultrafiltriert. Die höhere Kettenlänge kann bei Polymeren eine starke Erhöhung der Toxizität bewirken.

Die Toxizität der Polymere nimmt ab in der Reihenfolge Polykation > neutrales Polymer > Polyanion.<sup>175,176</sup> Die Ursache für die Toxizität von Polykationen wie PEI ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass Polykationen keine Apoptose (d.h. programmierter Zelltod) hervorrufen, sondern eher eine Nekrose (d.h. irreversibler Ausfall von Zellfunktionen nach starker Beschädigung der Zelle), einhergehend mit der Zerstörung von Zellorganellen.<sup>177</sup> Es gibt zwei Theorien, die die Toxizität erklären: die Hydrolyse von zellulären Phospholipiden durch Aktivierung der Phospholipase, und der Tensid-Effekt.<sup>178</sup> Grundsätzlich steigt jedoch die Toxizität der Polykationen mit Zunahme des Molekulargewichts und ihres pKs. Nach Parhamifar *et al.* kommt es auch bei niedermolekularen Polykationen langfristig zu Zerstörung der Zellmembran.<sup>177</sup>

**Tabelle 6:** LC<sub>50</sub>-Werte aller Polymere im Vergleich zu PEI, getestet an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) sowie an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) über 24 h. Die Werte sind angegeben in µg/mL, mit ±Standardabweichung mit 3 Proben (n=3) pro Experiment.

Substanz/Zelllinie	LC <sub>50</sub> [µg/mL]	
	HEK293T	HepG2
PEI 25kDa, linear	38 ± 8	16 ± 2
<b>P1</b> (Ionen 6,10)	2.6 ± 0.3	6.4 ± 0.1
Ionen11	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0
N-Oxid 11	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.4
<b>P2</b> (PAD10,6)	57 ± 3	29.2 ± 0.3

In Tabelle 7 sind die LC<sub>50</sub> Werte der aus Polymeren und CD-Derivaten hergestellten kationischen Polyrotaxane zusammengefasst. Die LC<sub>50</sub>-Werte liegen im Bereich von 10 bis 50 µg/mL. Kleine Unterschiede ergeben sich hier durch die variierende Belegung der Polymere durch CD und der teilweise damit einhergehenden unterschiedlichen molaren Masse pro Polyrotaxan-Wiederholeinheit. Die Toxizität der Polyrotaxane ist durch die Toxizität der Polymere bedingt. Insgesamt handelt es sich bei den Polyrotaxanen als Ganzes auch um Polykationen mit den entsprechenden toxischen Eigenschaften.

In der Literatur finden sich nur wenige Daten über die akute Toxizität von kationischen Polyrotaxanen zur Gentransfektion. Häufig wird direkt die Toxizität des finalen Nanopartikels getestet. Für ein Polyrotaxan bestehend aus PEI-modifizierten α-CD auf einem PEG-Rückgrat, ähnlich wie in Kapitel 1 beschrieben, wurde an HeLa Zellen ein LC<sub>50</sub>-Wert von 163 µg/mL festgestellt<sup>179</sup>, wodurch alle in Tabelle 7 gelisteten Polyrotaxane um das mindestens dreifache toxischer sind. Dies ist auf das im Vergleich zu Ionen und Polyamidin

weniger toxische PEG-Rückgrat zurückzuführen. Jedoch wurden die Zellen nur 4 h mit Polyrotaxan inkubiert und anschließend durch einen Mediumswechsel das nicht aufgenommene Polyrotaxan entfernt, bevor die Zellen für weitere 20 h inkubiert wurden. Durch die kürzere Inkubationszeit der Zellen mit dem Polyrotaxan ergibt sich eine niedrigere Toxizität, als sie in der vorliegenden Arbeit über 24 h ermittelt wurde.

**Tabelle 7:** LC<sub>50</sub>-Werte ausgewählter Polyrotaxane, getestet an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) sowie an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) über 24 h. Die Werte sind angegeben in µg/mL mit ±Standardabweichung mit 3 Proben (n=3) pro Experiment.

Substanz/Zelllinie	LC <sub>50</sub> [µg/mL]	
	HEK293T	HepG2
<b>PRx1</b> (Ionen 6,10 + Hepta-Cys)	14 ± 2	21 ± 2
<b>PRx5</b> (Ionen 6,10 + Hepta-His)	9 ± 3	11 ± 1
<b>PRx6</b> (Ionen 6,10 + Hepta-Cys(Me) <sub>2</sub> )	8 ± 1	10 ± 0
<b>PRx7</b> (Ionen 11 + Hepta-Cys)	18 ± 2	19 ± 5
<b>PRx8</b> (N-Oxid 11 + Hepta-Cys)	43 ± 5	43 ± 17
<b>PRx14</b> (PAD + Hepta-Cys)	27 ± 6	38 ± 21
<b>PRx15</b> (PAD + Hepta-Cys(Me) <sub>2</sub> )	20 ± 1	38 ± 8
<b>PRx16</b> (PAD + Hexa-Cys)	55 ± 3	48 ± 11

Die hier bestimmten Toxizitäten der Polyrotaxane stellen jedoch den ungünstigsten Fall dar. Zunächst liegen die Konzentrationen, in denen die Polyrotaxane für die Gentransfektion eingesetzt werden unterhalb der LC<sub>50</sub>. Für ein Standard-Transfektionsexperiment in einer 96 Wellplatte mit 20 000 Zellen und 100 µL Medium pro Well werden Polyplexe aus 200 ng DNA mit ca. 300 ng Polyrotaxan hergestellt. Final entspricht dies einer Konzentration von 3-4 µg/mL. Damit liegen die eingesetzten Konzentrationen im toxischsten Fall um das 3-5 fache, bestenfalls um das ca. 18-fache niedriger als die LC<sub>50</sub>-Werte.

Für die Transfektion wird ein Zeitfenster von 24 h veranschlagt. Über diesen Zeitraum wurde demnach auch die Toxizitätsstudie geführt. Üblicherweise ist die Aufnahme der Nanopartikel innerhalb von 4 h abgeschlossen,<sup>180</sup> sodass in vielen Protokollen ein Mediumswechsel nach dieser Zeit durchgeführt wird, um alle nicht aufgenommenen Partikel zu entfernen. So würde nur der kleine Anteil der aufgenommenen Partikel über 24 h auf die Zellen wirken, was die finale Konzentration an Polymeren und Polyrotaxanen in der Zelle verringern würde.

Letztendlich wurde jedoch in mehreren Studien gezeigt, dass Polykation/DNA Komplexe weniger toxisch sind als die nicht komplexierten Polykationen. Dies ist zurückzuführen auf das Vermögen der anionischen DNA, zumindest teilweise (ca. 25 %), die toxischen Eigenschaften des Polykations zu maskieren.<sup>74,181,182</sup>

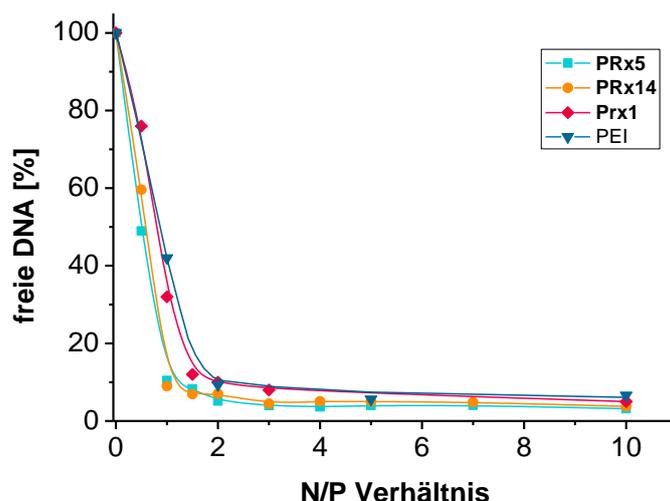
### 3.3 Herstellung, Charakterisierung und Stabilität der DNA-Polykation-Nanopartikel

#### 3.3.1 Herstellung der Polyplexe

Die Polyplexe wurden durch Mischen einer Lösung des Polykations mit einer Lösung der DNA gebildet. Zur Analytik der Polyplexe wurde die leicht erhältliche *calf thymus* (ct) DNA verwendet. Die Bildung der Polyplexe erfolgt spontan, die treibende Kraft ist dabei die Entropie durch Freisetzung der Gegenionen.<sup>183</sup> Entscheidend für den späteren Transfektionserfolg ist das Mischungsverhältnis zwischen kationischer Ladung des Polykations und der anionischen Ladung der DNA. Das Mischungsverhältnis ist definiert als N/P Verhältnis, wobei N die Anzahl der kationischen Ladungen angibt (ursprünglich N für die kationischen Ammoniumgruppen), und P die Anzahl der anionischen Phosphatgruppen der DNA. Im Allgemeinen wird mit einem Überschuss an kationischen Ladungen gearbeitet, um eine vollständige Komplexierung der Nukleinsäuren zu gewährleisten.<sup>183</sup> PEI als Hydrochlorid hat ein Molmasse-Ladungsverhältnis von 80 g/mol pro kationischer Ladung. Optimale Transfektionsergebnisse werden mit PEI mit einem N/P-Verhältnis von 10 erreicht.<sup>75</sup> Polyrotaxane haben eine geringere Ladungsdichte (M/N um 230 g/mol), optimale Transfektionsergebnisse wurden jedoch bereits ab N/P 2 erreicht.<sup>88</sup>

Neben dem Mischungsverhältnis hat auch die Anwesenheit von Salzen einen Einfluss auf die Bildung der Polyplexe: je höher die Ionenstärke, desto diffuser und größer sind die entstehenden Polyplexe.<sup>131,183</sup> Die Nanopartikel wurden im Folgenden fast ohne Zusatz von Salzen gebildet (lediglich 10 mM Phosphatpuffer), um möglichst kleine und kompakte Partikel herzustellen. Weiterhin besteht bei der Bildung von Polyplexen aus Polykationen eine Abhängigkeit der Partikelgröße vom pH-Wert, da der Protonierungsgrad und damit die Ladung der Polykationen mit steigendem pH-Wert abnehmen. Während bei pH 6.5 Partikel von 90 nm erhalten wurden, sind die bei pH 8.1 gebildeten Partikel mit 148 nm deutlich größer. Für reproduzierbare Partikelgrößen wurden die Partikel stets bei pH 7.0 gebildet.

Das optimale N/P Verhältnis, bei dem die DNA vollständig durch das Polykation komplexiert ist, kann einerseits über Gelelektrophorese bestimmt werden, andererseits in einem Verdrängungsassay mit einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff. Da die angelegte Spannung bei der Gelelektrophorese zu einem Zerfall der Polyplexe führen kann, wurde die Komplexierung der DNA mit Polykationen in dieser Arbeit in einem Verdrängungsassay mit SYBRSafe™ bestimmt. Dazu wurde eine definierte Menge an DNA mit PEI und drei Polyrotaxanen in Ladungsverhältnissen von 0 (d.h. nur DNA) bis 10 (10 fache kationische Ladung im Vergleich zur anionischen Ladung der DNA) in 10 mM Phosphatpuffer gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Partikelbildung wurde der Anteil an frei vorliegender DNA durch Anfärben mit SYBRSafe™ bestimmt. SYBRSafe™ ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in wässriger Lösung nur schwach fluoresziert, jedoch aufgrund seiner planaren Form zwischen die Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren interkalieren kann und in dieser Umgebung eine intensive Fluoreszenz 531 nm bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufweist. SYBRSafe™ wurde aufgrund seiner geringeren Karzinogenität dem klassischen DNA-Färbereagenz Ethidiumbromid vorgezogen.<sup>184</sup> Die Ergebnisse des Verdrängungsassays zur Bestimmung des optimalen N/P Verhältnisses sind in Abb. 33 dargestellt.



**Abb. 33:** Bestimmung des optimalen N/P Verhältnisses für PEI und die Polyrotaxane **PRx1**, **PRx5** und **PRx14** im Verdrängungsassay mit SYBRSafe™.

Während bei  $N/P = 0$  kein Polykation zugegeben wird und die gesamte DNA frei vorliegt, nimmt der Anteil an freier, nicht komplexierter DNA mit der Zugabe des Polykations und damit steigendem N/P-Verhältnis ab. Für alle getesteten Polykationen ist die DNA ab  $N/P = 2$  vollständig komplexiert. Bei **PRx5** und **PRx14** ist die Komplektierung der DNA bereits ab  $N/P = 1$  abgeschlossen. Die Restfluoreszenz von etwa 6 %, die bis zu  $N/P = 10$  zu beobachten ist, ist auf die Interkalation des Farbstoffs in DNA-Stränge, die sich auf der Oberfläche oder in weniger dichten Bereichen des Partikels befinden, zurückzuführen.

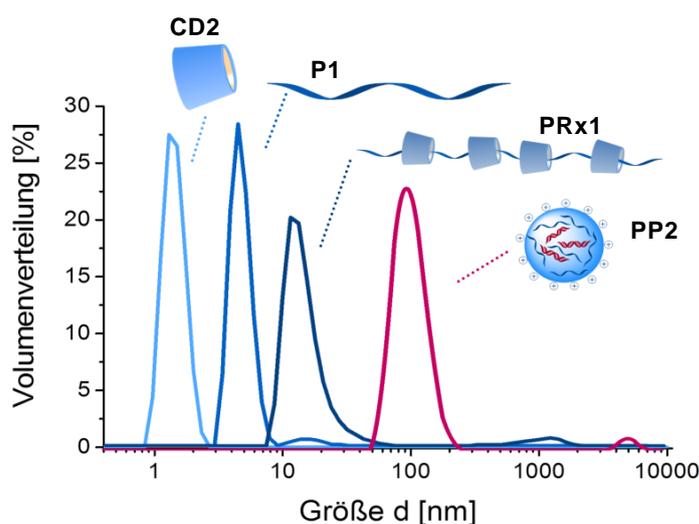
Die Titrationskurve für PEI deckt sich mit Befunden in der Literatur<sup>185</sup>. Nach Utsuno *et al.* entstehen ab  $N/P = 2$  auch thermodynamisch stabile Nanopartikel.<sup>75</sup> Dennoch konnte für PEI die maximale Transfektionseffizienz bei  $N/P = 10$  beobachtet werden.<sup>95</sup> Daher sollen auch für die Polyrotaxane die Transfektionseffizienzen bei N/P-Verhältnisse  $\geq 2$  getestet werden.

Für ein dem Polyrotaxan **PRx1** analoges Polyrotaxan wurde bereits in früheren Arbeiten  $N/P = 2$  als optimales Verhältnis bestimmt, sowohl über einen Farb-Verdrängungsassay, als auch mittels Gelelektrophorese.<sup>43</sup> Mit Polyrotaxanen können durch die Flexibilität der kationischen CD auf dem Polymerfaden dichtere DNA-Komplexe gebildet werden als mit dem starrereren PEI. Weiterhin ist das Masse-zu-Ladungsverhältnis (M/N) der Polyrotaxane durchschnittlich um das 3-4 - fache höher als bei Polyethylenimin, sodass für die gleiche Ladungsmenge entsprechend auch das 3–4 - fache an Masse für die Komplektierung nötig ist.

### 3.3.2 Charakterisierung der Nanopartikel

Als nächstes wurden die Partikelgrößen der gebildeten Polyplexe mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS, engl. *dynamic light scattering*) bestimmt. Durch Intensitätsänderungen des Streulichts diffundierender Partikel in Lösung über die Zeit kann dabei bei bekannter Temperatur und Viskosität des Lösungsmittels der hydrodynamische Radius der Partikel aus dem Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung bestimmt werden.<sup>186</sup> Des weiteren können Informationen über die Partikelgrößenverteilung erhalten werden (Polydispersitätsindex, PDI), sowie das Zetapotential der Partikel. Bereits die Bildung der Partikel kann bereits durch den steigenden hydrodynamischen Radius im Vergleich zum Polyrotaxan nachgewiesen werden (Abb. 34). Das kationische CD-Derivat

**CD2** hat in wässriger Lösung einen hydrodynamischen Durchmesser von 1.5 nm, das Polymer **P1** (Ionen 6, 10) hat einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 6 nm. Für das Polyrotaxan **PRx1** wurde ein hydrodynamischer Durchmesser von 15 nm beobachtet. Durch die Komplexierung des Polymers mit Cyclodextrinen verringert sich die Flexibilität des Polymers, und es werden im Vergleich zum freien Polymer die kettensteiferen Polyrotaxane erhalten, wodurch der hydrodynamische Radius größer wird. Während die freie DNA eine bimodale Verteilung des hydrodynamischen Durchmesser aufweist (65 nm und 265 nm, superspiralisierte und entspannt zirkuläre bzw. linearisierte Form), haben die Polyplexe aus **PRx1** und DNA einen Durchmesser von 120 nm. Der Vergleich der Partikelgrößen der Polyplexe aus PEI, **PRx1** und **PRx14** sowie das Zetapotential sind in Tabelle 8 zusammengefasst.



**Abb. 34:** Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser des CD-Derivates **CD2** (1.5 nm) des Ionen 6,10 **P1** (6.0 nm), des Polyrotaxans **PRx1** (15.0 nm) sowie des Polyplexes **PP2** (120 nm), N/P = 2.

Die hydrodynamischen Durchmesser der Polyplexe liegen für alle drei getesteten Polykationen um 120 nm. Für Polyplexe aus pDNA und PEI (25 kDa) wurden in der Literatur hydrodynamische Durchmesser von 81 nm<sup>187</sup> bis 140 nm bei Herstellung in 10 mM HEPES-Puffer beschrieben.<sup>75</sup> Der Durchmesser von 116 nm der Polyplexe **PP1** ist daher realistisch. Kulkarni *et al.*<sup>188</sup> beschreiben Partikelgrößen um 150 nm für PRx-siRNA-Polyplexe, Ooya *et al.*<sup>87</sup> größere PRx-pDNA-Polyplexe um 180 nm. Davis beobachtete mit CD-haltigen Polyamidin als Polykation mit pDNA Partikelgrößen zwischen 100 – 150 nm.<sup>49</sup> Die Partikelgröße hängt jedoch neben der Ionenstärke auch von der Mischungsart ab,<sup>75</sup> und steigt mit der Konzentration der eingesetzten DNA- und Polymerlösung,<sup>49</sup> sodass die etwas geringere Partikelgrößen um 120 nm für **PP2** und **PP3** im Rahmen der bisher bestimmten hydrodynamischen Radien von Polyplexen liegen und mit dieser Größe eine Aufnahme der Partikel mittels clathrinvermittelter Endocytose möglich ist.

Neben der zellulären Aufnahme der Nanopartikel ist die Größe der Nanopartikel bei einer späteren potentiellen Anwendung *in vivo* ebenfalls entscheidend. Nanopartikel <10-20 nm werden schnell von den Nieren ausgeschieden, und auch Partikel >200 nm werden infolge von Immunreaktionen des Komplementsystems schnell aus dem Blutkreislauf entfernt. Weiterhin nimmt die Zirkulationsdauer mit abnehmendem Partikeldurchmesser tendenziell zu.<sup>189</sup> Grundsätzlich haben die hergestellten Polyplexe daher eine optimale Grö-

ße. Für die 120 nm großen Polyplexe ist sogar eine längere Zirkulationszeit im Körper zu erwarten als beispielsweise für die 180 nm großen Polyrotaxan-Polyplexe von Ooya *et al.*<sup>87</sup>

Der Polydispersitätsindex der hier hergestellten Polyplexe liegt zwischen 0.1 und 0.18, wobei der PDI der Polyrotaxan-Nanopartikel (**PP2** und **PP3**) größer ist als der von PEI. Beim verwendeten PEI handelt es sich um kommerzielles PEI mit einer Molmasse von 25 kDa. Damit ist die Größenverteilung dieses Polymers einheitlich, wohingegen die selbst synthetisierten Polymere, die als Basis für die Herstellung der Polyrotaxane dienten, zwar über Ultrafiltration von kurzkettigen Polymeren (<10 kDa für Ionen, <5 kDa für Polyamidin) befreit wurden, jedoch kein zweiter Ultrafiltrationsschritt durchgenommen wurde, um besonders langkettige Polymere abzutrennen. Daher liegt bei den Polyrotaxanen bereits eine breitere Molmassenverteilung und damit ein größerer PDI vor, was die leicht erhöhten PDI der Polyplexe erklären könnte. Grundsätzlich sind für Polyplexe etwas größere PDI zu erwarten als für Lipoplexe (PDI = 0.1 für durch Extrusion hergestellte Lipoplexe<sup>190</sup>). Die hier bestimmten PDI entsprechen den für Polyplexe üblichen Werten (etwa 0.15 bis 0.3).<sup>75,191</sup> Je besser die Durchmischung der Polymer- und DNA-Lösung ist, desto einheitlichere Partikelgrößenverteilungen werden erhalten.

Das Zetapotential der drei Polyplexe **PP1**, **PP2** und **PP3** liegt zwischen +20 und +28 mV (Tabelle 8). Die positive Ladung ist begründet durch den Ladungsüberschuss durch Polykationen. Die Ladung ist ausreichend, um die Partikel in dieser Größe zu stabilisieren. Wäre der Ladungsüberschuss des Polykations zu gering, hätten die Partikel eine Oberflächenladung nahe am Neutralpunkt und wären instabil. Die Partikel würden in diesem Fall aggregieren, bis ein günstiges Größe-zu-Ladungsverhältnis erreicht wäre.<sup>192,193</sup> Sun *et al.* beobachteten für PEI-pDNA Polyplexe mit N/P 10 ebenfalls ein Zetapotential um 27 mV.<sup>121</sup>

Der Vergleich des Zetapotentials der drei Nanopartikel zeigt, dass bei PEI-Nanopartikeln ein 5-fach höherer Ladungsüberschuss benötigt wird, um etwa eine gleiche Ladung zu erhalten, wie sie mit einfachem Ladungsüberschuss der Polyrotaxane erhalten werden kann. Mit N/P 2 wurden noch anionische Partikel erhalten. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass bei PEI ein N/P > 3 nötig ist, um kationische Partikel zu erhalten. Ab N/P 5 liegt das Zetapotential um +20 mV und erhöht sich bei steigendem N/P-Verhältnis nur noch wenig.<sup>194</sup>

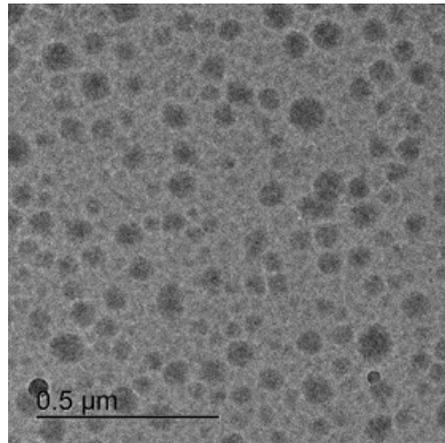
Im Vergleich zu anderen Polyrotaxan-Systemen ist festzustellen, dass oftmals ein großer Überschuss des Polyrotaxans nötig war, um kationische Partikel herzustellen. Beim Polyrotaxan-System von Kulkarni *et al.*, bestehend aus PEG, auf welches kationische  $\alpha$ -CD aufgefädelt wurden, liegt das Zetapotential je nach N/P-Verhältnis zwischen 15 und 25 mV.<sup>194</sup> Yui *et al.* beobachteten für PEG-Dimethylaminoethyl- $\alpha$ -CD-Polyplexe ab N/P 2 schwach positive Partikel, erst ab N/P 5-10 wurden je nach Polyrotaxan Zetapotentiale zwischen 15-40 mV erreicht.<sup>195</sup> Sowohl bei den Ionen- als auch beim Polyamidinpolyrotaxanen in dieser Arbeit werden bereits bei N/P 2 thermodynamisch stabile, kationische Polyplexe erhalten, wodurch im Vergleich mit PEI und anderen Polyrotaxanen eine geringere Menge des Polyrotaxans zur erfolgreichen Komplexierung der DNA eingesetzt werden muss.

**Tabelle 8:** Übersicht über die hydrodynamischen Durchmesser von Polyplexen aus DNA und PEI (N/P 2 und 10), eines Ionen-Polyrotaxans (**PRx1**) sowie eines Polyamidin-Polyrotaxans (**PRx14**) (jeweils N/P 2).

Polykation-Polyplexe	Größe [nm]	PDI	Zetapotential [mV]
<b>PP0</b> (PEI, N/P 2)	144 ± 4	0.124	- 4 ± 5
<b>PP1</b> (PEI, N/P 10)	116 ± 3	0.109	+27 ± 1
<b>PP2</b> ( <b>PRx1</b> , Ionen-PRx, N/P 2)	120 ± 3	0.163	+20 ± 2
<b>PP3</b> ( <b>PRx14</b> , PAD-PRx, N/P 2)	117 ± 1	0.179	+28 ± 1

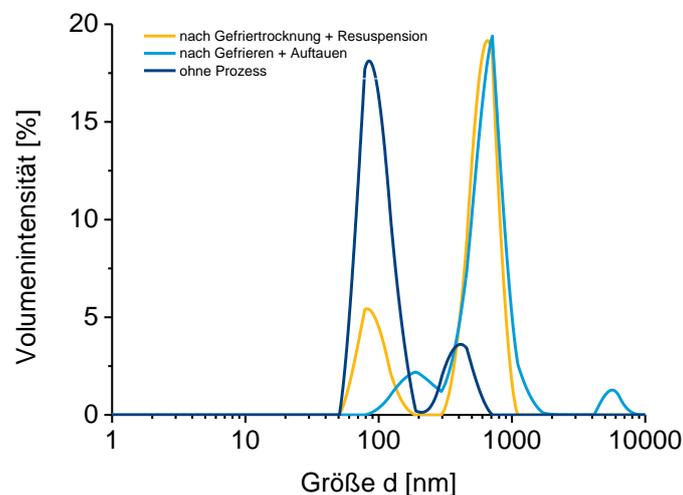
Eine weitere Analyse­methode zur Bestimmung der Größe und Morphologie der Nanopartikel ist die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Da bei der Probenvorbereitung für klassische TEM Aufnahmen das Wasser aus den Proben entzogen wird, sich jedoch beim Eintrocknen der Polyplexe Struktur- und Größenänderungen ergeben, ist die Methode nur bedingt zur Charakterisierung der Polyplexe geeignet. In diesem Fall wurde daher auf die Kryotransmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) zurückgegriffen. Bei dieser Variante der TEM werden die Proben (hauptsächlich biologische Proben) bei einer Temperatur von etwa -150°C untersucht. Kleine Tropfen der Nanopartikelsuspension werden auf einem Gitter schockgefroren und dabei in einen festen glasartigen Zustand gebracht. Die Bildung von Eiskristallen wird dabei vermieden. Es wird idealerweise eine dünne Schicht amorphen Eises enthalten, in der sich die Nanopartikel in ihrer originalen Form und Größe befinden.

In der Cryo-TEM Aufnahme (Abb. 35) sind die Polyplexe **PP2** aus DNA und **PRx1** zu sehen. Die Partikel haben keine definierte Abgrenzung, wie sie beispielsweise bei Vesikeln oder Polystyrol-Nanopartikeln beobachtet wird, sondern eine unscharfe Kontur. Dies ist begründet durch die diffuse Morphologie der Polyplexe. Die Größenverteilung der Primärpartikel liegt zwischen 70 und 90 nm. Einige Partikel >100 nm sind ebenfalls zu beobachten, hierbei handelt es sich um Aggregate. Die durch Cryo-TEM bestimmten Durchmesser der Partikel sind kleiner als die in der DLS bestimmten Durchmesser. In der DLS wird jedoch der hydrodynamische Durchmesser bestimmt, der bei Polyplexen aus Polykation und Polyanion (DNA) größer erscheint, als er tatsächlich ist. Des Weiteren werden in der DLS größere Partikel und Aggregate stärker gewichtet. Die Beobachtung, dass Elektronenmikroskopaufnahmen meist einen kleineren Durchmesser als in der DLS bestimmt wurde, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.<sup>122</sup>

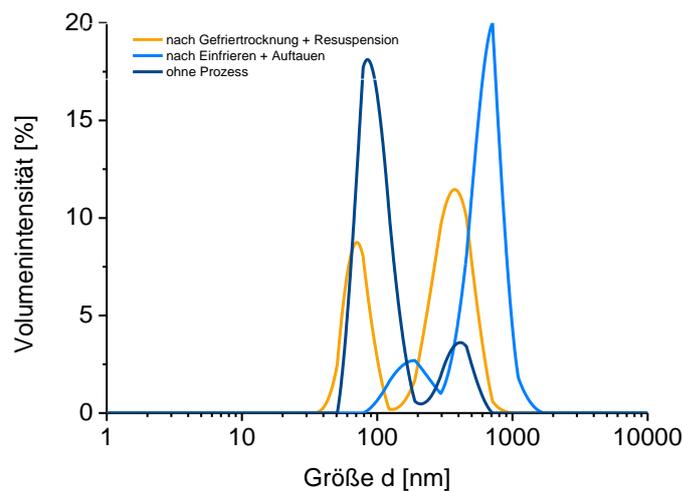


**Abb. 35:** Cryo-Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme von Polyrotaxan-Polyplexen **PP2** aus pDNA und **PRx1**.

Da Suspensionen von Polyplexen thermodynamisch instabil sind und langfristig zur Aggregation neigen, wurde eine Haltbarmachung der Polyplexe durch Gefriertrocknung angestrebt.<sup>196</sup> Nach erneutem Lösen der gefriergetrockneten Partikel wurden mittels DLS jedoch hauptsächlich Aggregate um 500 nm detektiert. Bereits nach einem Einfriervorgang in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen wurden überwiegend Aggregate beobachtet (Abb. 36). Auch durch Zusatz gängiger Cryoprotektoren wie Trehalose, Glucose, Harnstoff oder Glycerin von 1 bis 1000 % bezogen auf die finale Konzentration der Nanopartikel in Anlehnung an Abdelwahed *et al.*<sup>197</sup> konnte die Aggregation der Partikel beim Einfrieren nicht verhindert werden (Abb. 37).

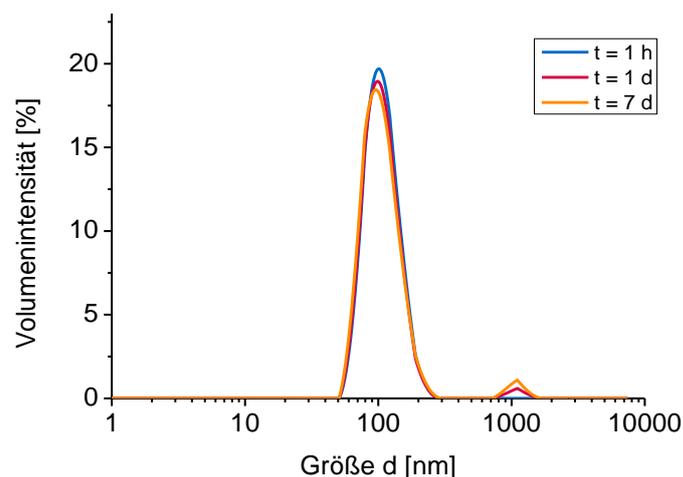


**Abb. 36:** Hydrodynamischer Radius der Polyplexe bei Gefriertrocknung von der Polyplexe **PP2**. Nach Bildung der Polyplexe und 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz gedrittelt, eine Probe blieb unbehandelt (dunkelblau), die zweite Probe wurde einem Einfrier- und Auftau-Zyklus unterzogen (hellblau) und die dritte Probe wurde gefriergetrocknet und resuspendiert (gelb).



**Abb. 37:** Größe der Polyplexe **PP2** bei Zugabe des Cryoprotectants Trehalose (100 w% im Bezug auf die Masse an Polyplexen) nach Bildung der Polyplexe und 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz gedrittelt, eine Probe blieb unbehandelt (dunkelblau), die zweite Probe wurde einem Einfrier- und Auftau-Zyklus unterzogen (hellblau) und die dritte Probe wurde gefriergetrocknet und resuspendiert (gelb).

Die Polyplexe sind jedoch in wässriger Suspension bei Lagerung bei 4 °C >1 Woche stabil. Die Partikelgröße änderte sich dabei nicht. Nach einwöchiger Lagerung der Nanopartikelsuspension war jedoch eine leichte Zunahme der Aggregation der Partikel zu beobachten (Abb. 38). Die Partikel wurden daher für Analysen und zellbiologische Experimente jeweils frisch hergestellt.



**Abb. 38:** Stabilität der Nanopartikelsuspension **PP2** über eine Woche bei Lagerung bei 4 °C.

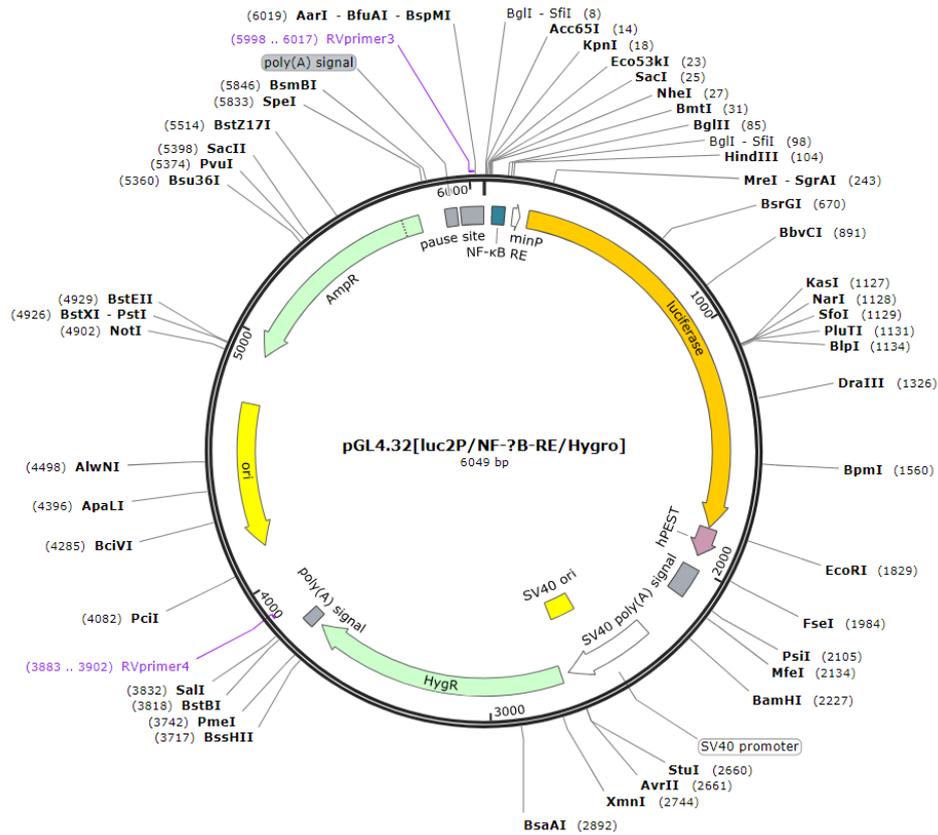
Eine Aufkonzentrierung der Polyplexe über Ultrafiltration in Vivaspins war nicht möglich. Auch hierbei wurden Aggregate erhalten und es waren nur noch wenige Primärpartikel in der DLS zu beobachten. Durch die starken Zentrifugalkräfte aggregieren die Partikel und können anschließend nicht mehr getrennt werden.

### 3.4 Gentransfektion mit Polyrotaxan-Polyplexen

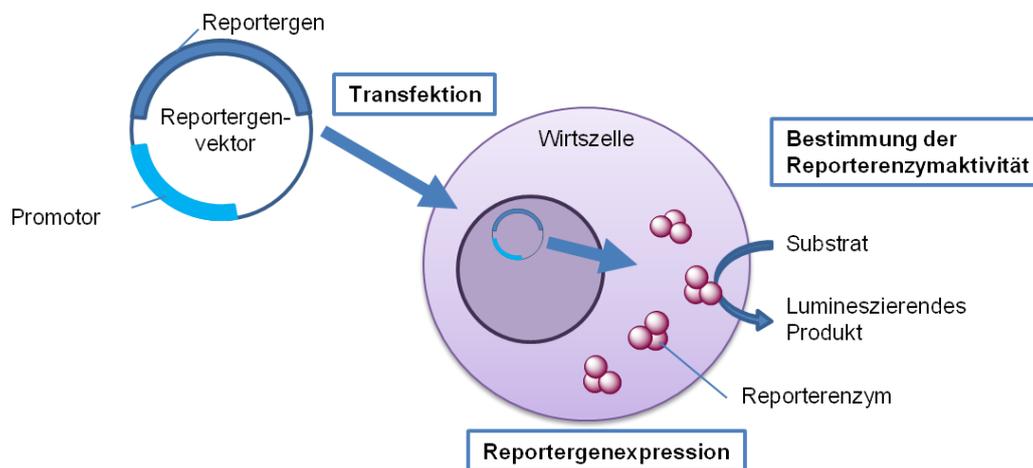
Gentransfektionen sind im Allgemeinen effizienter mit geknäulter DNA im Gegensatz zu linearer DNA, da erstere weniger Angriffsfläche für Nukleasen bietet.<sup>198,199</sup> Des Weiteren spielt die Reinheit und Qualität der DNA eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Transfektion. Es wurde daher mit ultrareiner Plasmid-DNA gearbeitet, die frei von Phenol, Salzen und Endotoxinen ist.

Im Folgenden wurde das Plasmid pGL4.32 (Plasmidkarte in Abb. 39) mit Promotor verwendet. Es handelt sich dabei um ein Luciferase-Gen, welches für Biolumineszenz-Enzyme codiert. Die Luciferase ist als Reporter besonders gut für Transfektionsexperimente geeignet, da das funktionale Protein unmittelbar nach der Translation gebildet wird. Der Assay ist schnell und einfach durchzuführen.<sup>200,201</sup> Das Gen wird am Promotor abgelesen und dort startet die Transkription. Ein Promotor ist die Voraussetzung zum Ablesen und zur Expression des Proteins. In diesem Fall handelt es sich dabei um einen induzierbaren Promotor, welcher dazu dient, die Genexpression zu regulieren. Durch die Zugabe eines Induktor-Moleküls (*inducer*), dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), wird erst die Transkription des Gens hervorgerufen. Der Induktor bindet an ein Repressorprotein, welches sich dann von seiner Bindungsstelle auf der DNA löst. Dadurch kann die RNA-Polymerase an den Promotor binden und die Transkription einleiten.<sup>202</sup>

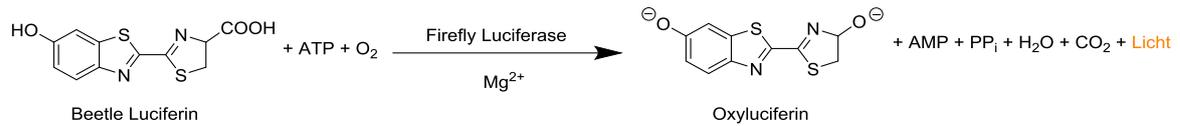
Das Prinzip der Reporterexpression ist in Abb. 40 dargestellt. Zunächst erfolgt die Transfektion des Promotor-Reportergens in Zellen, als nächstes wird der Induktor TNF $\alpha$  zugegeben, welche die Transkription des Reportergens und die anschließende Synthese des Reportergenenzym stimuliert. Durch Zugabe eines Substrats (im Fall des Luciferase-Assays (Luc-Assay) ein Luciferin) und der enzymatischen Bildung lumineszenter Produkte kann die Aktivität der Enzyme bestimmt werden (Schema 15). Diese Lumineszenz kann einfach gemessen werden und ist direkt proportional zur Transfektionsrate. Im Allgemeinen sind für Zellassays Biolumineszenzreporter gegenüber Fluoreszenzreportern zu bevorzugen, da manche Zellbestandteile autofluoreszieren. Dadurch entsteht bei der Fluoreszenzbestimmung ein Hintergrundsignal. Im Gegensatz dazu zeigen Zellbestandteile von Natur aus keine Biolumineszenz, was die Methode im Zellassay deutlich empfindlicher macht.<sup>203</sup> Nachteil des Lumineszenzassays ist jedoch, dass die Zellen zum Auslesen des Assays lysiert werden müssen, sodass die Transfektionseffizienz pro Well nur zu einem Zeitpunkt bestimmt werden kann.



**Abb. 39:** Plasmidkarte des zur Gentransfektion verwendeten Plasmids pGL4.32 [luc2p/NF-kB-RE/Hygro] mit 6049 bp.

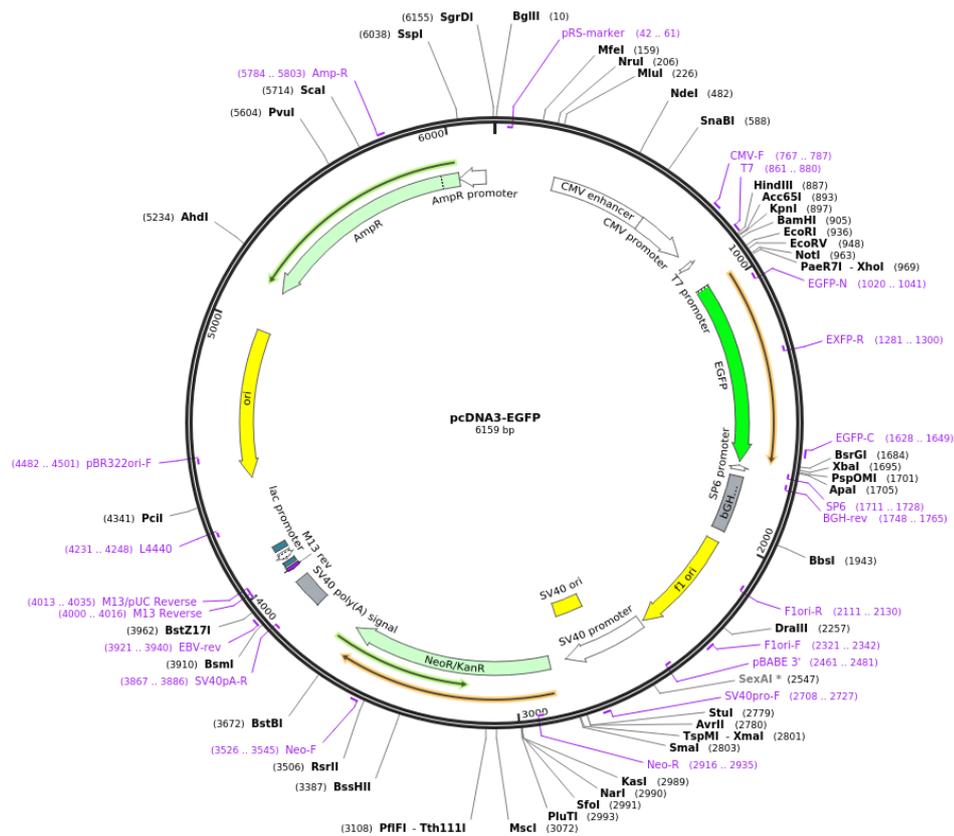


**Abb. 40:** Prinzip der Reporterexpression. Nach erfolgreicher Transfektion und der Expression des Reportergens kann die Reporterenzymaktivität durch Zugabe eines Substrats bestimmt werden, welches in ein lumineszierendes Produkt umgesetzt wird.



**Schema 15:** Luciferase-Reaktion: Die Umsetzung des Luciferins zum Oxyluciferin wird katalysiert durch die Luciferase in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup>, ATP und Sauerstoff.

Ein weiterer Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ist die Verwendung von grün fluoreszenzierendem Protein (GFP)-codierender pDNA. Der größte Vorteil des GFP ist, dass die Expression des Proteins hauptsächlich von der Transfektionseffizienz abhängt, aber nicht von einem Induktor wie TNF $\alpha$  abhängig ist. Weiterhin wird kein Substrat benötigt. Der Fortschritt der Proteinexpression kann durch Beobachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu jedem Zeitpunkt verfolgt werden. Zur Quantifizierung des exprimierten GFP können die Zellen zum Schluss lysiert werden und im Platerreader die Fluoreszenz des Zelllysates bestimmt werden. Als Plasmid wurde hierbei pcDNA3-EGFP verwendet, welches häufig zur Evaluierung der Transfektionseffizienz eines Carriers an HEK293 Zellen verwendet wurde.<sup>190</sup> Die Plasmidkarte des Plasmids ist in Abb. 41 gezeigt.



**Abb. 41:** Plasmidkarte des zur Gentransfektion verwendeten Plasmids pcDNA3-EGFP mit 6159 bp.

### 3.4.1 Auswahl der Zelllinie

Um die potentielle Wirksamkeit in der Gentransfektion der Polyrotaxane zu testen sollten Transfektionstests an schwer zu transfizierenden U937 Zellen durchgeführt werden. Die Zelllinie wurde 1974 von C. Sundstrom und K. Nilsson eingeführt. Sie entstammt einer übermäßigen Flüssigkeitsansammlung in der Pleurahöhle (d.h. zwischen dem Lungenfell und dem Brust- bzw. Rippenfell), eines 37-jährigen Mannes mit einem diffusen histiozytären Lymphom (malignem Tumor).<sup>204</sup> Es wurde jedoch festgestellt, dass im durchgeführten Experiment bereits durch nackte DNA ohne Carrier eine signifikante Transfektion erreicht wird. Generell wird unter nackter DNA ein Plasmid bezeichnet, die über nicht-virale Methoden in Zellen eingeschleust wird, in den meisten Fällen wird die nackte DNA jedoch durch physikalische Methoden wie Elektroporation oder Mikroinjektion in die Zelle eingebracht. Methoden, bei denen nackte DNA verwendet wird, bieten gegenüber den viralen Vektoren wie retro-, adeno- und adenoassoziierten Viren einige Vorteile: sie ist relativ einfach herzustellen, lässt sich lagern, kann große Mengen an Inserts beinhalten und ruft im Gegensatz zu viralen Carriern keine Immunreaktionen aus. Der größte Nachteil der Transfektionsmethoden mit nackter DNA ist die niedrigere Transfektionsrate im Vergleich mit viralen Vektoren.<sup>205</sup> Die Aufnahme und Expression nackter DNA ohne Carrier wurde in der Vergangenheit nur selten in der Literatur beschrieben. Grundsätzlich wäre es ungewöhnlich, dass die negative geladene DNA direkt mit der ebenfalls negativ geladenen Zellmembran interagiert bzw. diese durchdringt. Dennoch wäre es denkbar, dass die DNA mit anderen Biomolekülen interagiert, die dann als Vektor agieren, sodass die DNA leichter über Endocytose aufgenommen werden kann. Nach Einbringen der DNA in die Zelle muss sie weiter in den Zellkern gelangen, damit die Expression eingeleitet werden kann. Aus diesem Grund wurden Techniken wie die Elektroporation und Mikroinjektion entwickelt. Von Kong *et al.*<sup>206</sup> wurde 2017 die Aufnahme nackter DNA von Krebszellen ohne Transfektionsreagenz beschrieben. Es wurde gezeigt, dass hepatozelluläre Karzinomzellen große DNA Fragmente aufnehmen können, im Gegensatz zu normalen Leberzellen. Die Aufnahme der DNA erfolgt über einen endocytoseähnlichen Mechanismus. Ähnliche Beobachtungen wurden für weitere Krebszelllinien gemacht, unter anderen für MDA-MB-231 (Brustkrebszelllinie), jedoch nicht für nicht-Krebszelllinien. In der Veröffentlichung wurde allerdings nur die Aufnahme der DNA in die Zellen beschrieben, nicht die Expression eines kodierten Proteins im Zellkern. Mit ebenfalls schwer zu transfizierenden THP-1 Zellen wurde unter denselben Bedingungen keine Transfektion mit nackter DNA beobachtet. Letztendlich waren die U937 Zellen für das geplante Transfektionsexperiment mit Polyplexen ungeeignet, da für die Transfektion mit Polyrotaxanen Zelllinien benötigt werden, bei denen Zellen nicht bereits durch nackte DNA transfiziert werden können.

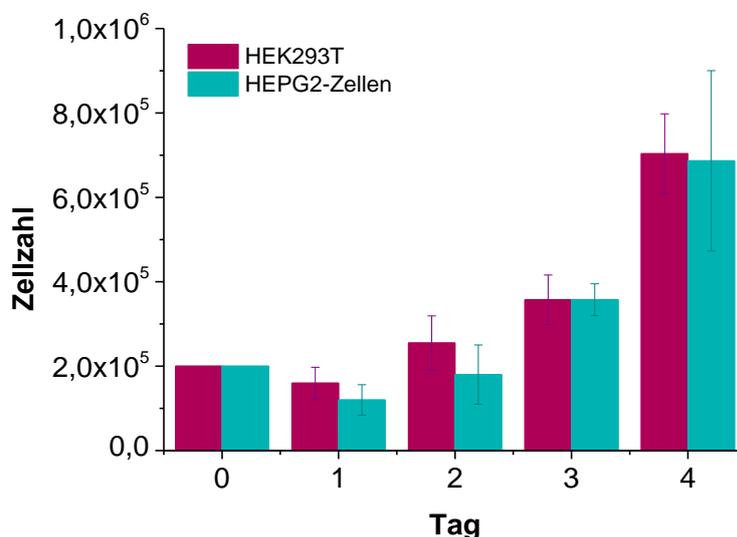
Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyrotaxane wurden als nächstes die beiden Zelllinien HEK293T sowie HepG2 gewählt. Beide Zelllinien gelten als besonders gut zu handhaben und gut zu transfizieren.<sup>122,190,207</sup>

### 3.4.2 Optimierung der Konditionen

Zunächst wurde die Wachstumsrate der Zellen bestimmt. Es gibt keinen aktiven Transportprozess der DNA in den Zellkern, sodass die Plasmide in erster Linie bei der Zellteilung in den Zellkern gelangen.<sup>208</sup> Es ist demnach zielführend, die Transfektion mit Polyplexen zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen zu beginnen.

Es wurden an Tag 0 jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well ausgesät und täglich die Zellzahl bestimmt (Abb. 42). Die an Tag 1 bestimmte Zellzahl liegt für beide Zelllinien unter der an

Tag 0 ausgesäten Zellzahl. Nicht alle ausgesäten Zellen sind angewachsen, nicht angewachsene bzw. tote Zellen wurden beim Mediumswechsel entfernt. Ab dann verdoppelt sich etwa die Zellzahl jeweils über 24 h. Das Transfektionsexperiment wurde daher 24 h nach dem Aussähen der Zellen begonnen, sodass diese angewachsen sind und etwa 40–50 % konfluent.



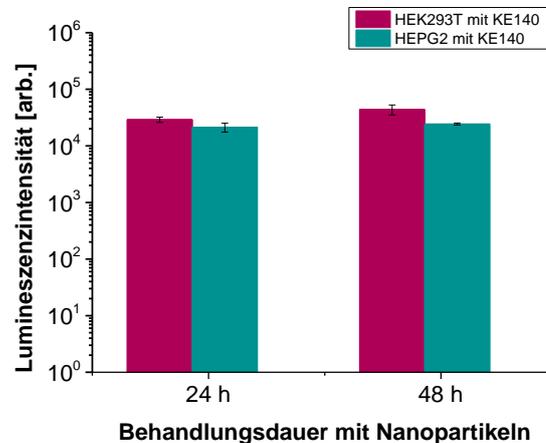
**Abb. 42:** Bestimmung der Zellvermehrung über 5 Tage. Ausgesät wurden an Tag 0  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in serumhaltigem Medium auf einer 12-Well Platte, täglich wurde die Zellzahl in 4 Wells bestimmt.

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde Luciferase-DNA verwendet, da hierbei das Auslesen bzw. die Quantifizierung des exprimierten Proteins einfach und schnell durchführbar ist. Der erste Transfektionsversuch wurde in 12 Well Platten durchgeführt. Dazu wurden an Tag 0  $2 \cdot 10^5$  Zellen in serumhaltigem Medium ausgesät, an Tag 1 vorsichtig die Nanopartikelsuspension ( $1 \mu\text{g}$  DNA/Well) auf die Zellen getropft. Nach 20 h Inkubation wurde der Wachstumsfaktor TNF $\alpha$  zugegeben und weitere 4 h inkubiert. Anschließend wurde unmittelbar nach Zugabe des Luciferase-Substrates die zur Transfektionseffizienz proportionale Lumineszenzintensität bestimmt. Als Kontrolle wurden jeweils PEI-Polyplexe (N/P = 10), sowie nackte DNA eingesetzt. Da erwartet wurde, dass sich die hergestellten Polyrotaxane ähnlich verhalten, wurde die Optimierung der Bedingungen für **PRx1** als Ionen-Polyrotaxan und **PRx14** als Polyamidin-Polyrotaxan durchgeführt.

Im Rahmen der Optimierung der Bedingungen für die Transfektion mit Polyrotaxan-Nanopartikeln wurde als nächstes der Einfluss des fötalen Kälberserums (FCS) untersucht. Dazu wurden jeweils Experimente mit 10 % FCS-haltigem Medium, sowie Ansätze mit 0.1 % FCS-haltigem Medium durchgeführt und die Transfektionseffizienz verglichen. Für beide Zelllinien wurde kein signifikanter Unterschied in der Lumineszenzintensität beobachtet. Da der Entzug von Serum für die Zellen zusätzlichen Stress bedeutet, die Wachstumsrate verringert und die Aufnahme der Nanopartikel und die Expression mehrere Stunden dauert, wurde die Transfektion in 10 % FCS-haltigem Medium durchgeführt.

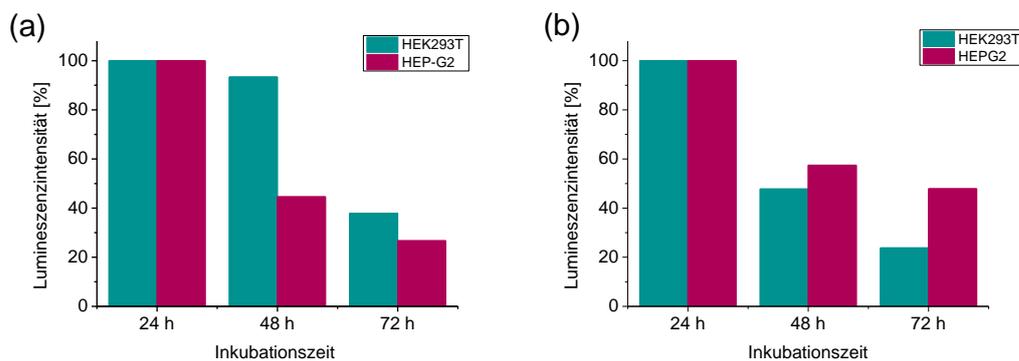
Um den Zeitraum abzuschätzen, über den die Nanopartikel aufgenommen werden, wurde die Nanopartikelsuspension auf die Zellen aufgetragen. Bei einem Ansatz wurde nach 24 h ein Mediumswechsel durchgeführt, um nicht aufgenommene Nanopartikel zu entfernen. Beim zweiten Ansatz wurde die Nanopartikelsuspension für weitere 24 h ein-

wirken gelassen. Nach 48 h wurde die Lumineszenzintensität beider Ansätze verglichen (Abb. 43). Die Intensitäten nach 24- bzw. 48 h Inkubationsdauer unterscheiden sich für die jeweiligen Systeme nicht. Die Aufnahme der Nanopartikel ist folglich nach 24 h abgeschlossen.



**Abb. 43:** Vergleich der Lumineszenzintensität (proportional zur Transfektionseffizienz) nach 24 und 48 h Behandlung mit Nanopartikeln aus pDNA und **PRx1** ( $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in serumhaltigem Medium auf einer 12-Wellplatte,  $1 \mu\text{g}$  DNA/Well, N/P = 2).

Als nächstes wurde untersucht, in welchem Zeitraum das Protein Luciferase nach erfolgreicher Aufnahme der Nanopartikel gebildet wird. Dazu wurde jeweils nach 24, 48 und 72 h eine Probe entnommen, mit  $\text{TNF}\alpha$  induziert und anschließend mit dem Luciferase Substrat versetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 dargestellt. Bei HEK293T sowie HepG2 ist die höchste Lumineszenz nach 24 h zu beobachten. Während bei der Transfektion mit PEI der HEK293T Zellen die Lumineszenz nach 48 h noch ebenso hoch ist wie nach 24 h, war die Lumineszenzintensität für PEI und HepG2 Zellen, sowie für beide Zelllinien mit **PRx1** etwa auf 50 % der ursprünglichen Lumineszenz reduziert. Nach 72 h ist eine weitere Reduktion der Intensität zu beobachten, die auf einen Abbau der Luciferase zurückzuführen ist. Nach der Biosynthese beträgt die Halbwertszeit der Luciferase in Säugerzellen 3 – 4 h.<sup>209</sup> Daher wurde, wie in der Literatur üblich, eine Inkubationszeit von 24 h gewählt.



**Abb. 44:** Abnahme der Lumineszenzintensität als Funktion der Inkubationsdauer (a) mit PEI-Polyplexen (**PP1**), (b) mit Polyrotaxan-Polyplexen (**PP2**).

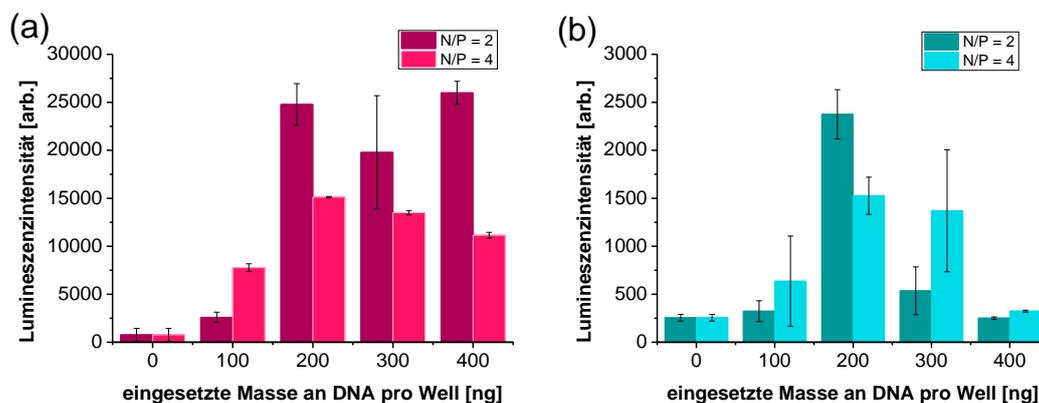
Als nächstes wurden die optimalen Bedingungen für die Transfektion mit Polyplex **PP2** (mit Polyrotaxan **PRx1**) bestimmt. Das Experiment wurde auf 96 Wellplatten mit  $100 \mu\text{L}$

Medium und  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well durchgeführt. Untersucht wurde einerseits der Einfluss des N/P-Verhältnis (2 und 4), sowie die Menge an eingesetzter DNA pro Well.

Für HEK293T-Zellen sind mit 100 ng DNA/Well für beide N/P-Verhältnisse nur eine geringe Transfektionseffizienz zu beobachten. Zwischen 200 und 400 ng DNA ist eine ähnlich hohe Transfektionseffizienz zu erkennen, wobei bei N/P = 4 grundsätzlich zu einem schwächeren Signal führt, zusätzlich mit abnehmender Tendenz. Als optimale Kondition wurde N/P = 2 mit 200 ng DNA bestimmt (Abb. 45a)

Für HepG2 Zellen wurden die besten Ergebnisse ebenfalls mit N/P = 2 und 200 ng DNA/Well erzielt (Abb. 45b). Mit 100 ng wird nur eine Transfektionseffizienz von etwa 20 % erreicht im Vergleich zum Ansatz mit 200 ng DNA bei gleichem N/P-Verhältnis. Größere Mengen DNA (und damit auch höhere Mengen an Polyrotaxan) führen zu einer geringeren Transfektionseffizienz.

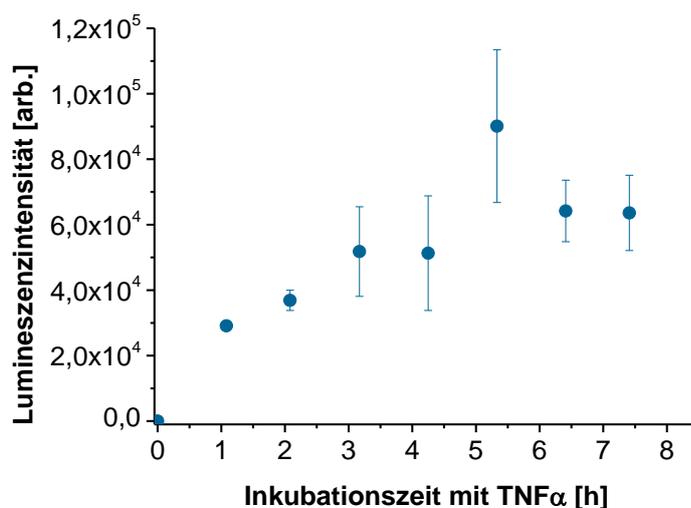
Die überwiegend schwachen Lumineszenzintensitäten bei N/P = 4 könnten auf die höhere eingesetzte Menge an Polyrotaxan zurückzuführen sein. Zwar sollte das Polyrotaxan in der geringen eingesetzten Konzentration keine akut toxischen Effekte haben, jedoch wären Membranschädigungen, wie sie von PEI bekannt sind, denkbar. Die Polyrotaxane wurden daher im Folgenden im N/P-Verhältnis 2 eingesetzt.



**Abb. 45:** Transfektionseffizienz in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses und der Menge an eingesetzter DNA pro well (96 Wellplatte, 100  $\mu$ L Medium,  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well über 24 h) mit **PP2** (Polyrotaxan **PRx1**) an HEK293T-Zellen (rot) und HepG2-Zellen (blau).

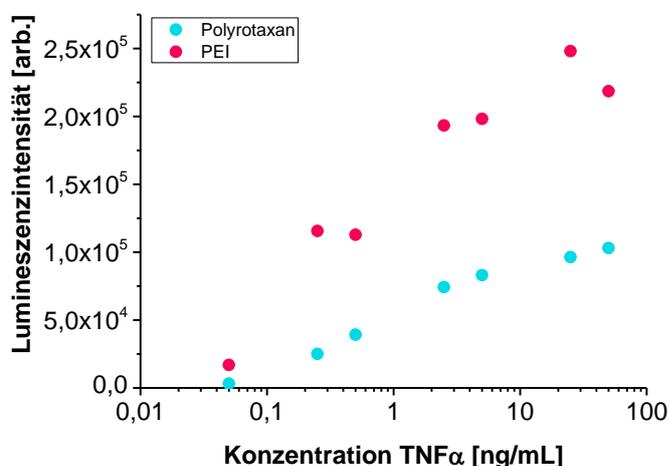
Insgesamt ist zu beobachten, dass die Lumineszenzintensität beim Experiment mit HEK293T-Zellen um das etwa 10-fache höher sind, als bei HepG2 Zellen, bei gleicher Anzahl an ausgesäten Zellen. Die Transfektion der HEK293T-Zellen funktioniert deutlich besser als an HepG2-Zellen.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Wachstumsfaktor TNF $\alpha$ . Variiert werden kann einerseits die Inkubationsdauer, andererseits die eingesetzte Konzentration. Zur Bestimmung der optimalen Induktionsdauer wurde nach Zugabe des TNF $\alpha$  jeweils nach 1 bis 7.5 h das Luciferase-Substrat zugegeben und die Lumineszenz bestimmt. Die Induktion scheint nach 5 h abgeschlossen zu sein (Abb. 46).



**Abb. 46:** Einfluss der Inkubationszeit mit TNF $\alpha$  auf die Lumineszenzintensität. Transfektion mit **PP2**, 200 ng DNA/well über 20 h, 50 ng/mL TNF $\alpha$ .

Der Einfluss der Konzentration des TNF $\alpha$  wurde ebenfalls untersucht (Abb. 47). Es ist ein linearer Bereich bis etwa 4 ng/mL zu beobachten, bei höheren Konzentrationen ist tendenziell ein Sättigungsbereich zu erkennen. Im Sättigungsbereich sind Unterschiede in der Lumineszenzintensität später nicht mehr signifikant zu erkennen. Es wurde im Folgenden daher eine Konzentration von 0.25 ng/mL gewählt.



**Abb. 47:** Einfluss der TNF $\alpha$ -Konzentration auf die Lumineszenzintensität bei der Transfektion mit einem Ionen-Polyrotaxan **PRx5** und PEI (200 ng DNA/well, N/P = 2 für **PRx5** und N/P = 10 für PEI) nach 5 h.

### 3.4.3 Evaluierung des Transfektionspotentials der Polyrotaxane

Unter den optimierten Bedingungen wurde schließlich die Transfektionseffizienz der Polyrotaxane im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Polyethylenimin (linear, 25 kDa) evaluiert, einmal im Luciferase-Assay, und einmal in einem GFP-Assay. Weiterhin wurden neben den Polyrotaxanen auch die kationischen CD-Derivate selbst eingesetzt. Verglichen wurde auch jeweils das N/P-Verhältnis 2 und 10. Die Ergebnisse sind in den Abb. 48 und Abb. 49 dargestellt.

Zu beobachten ist zunächst, dass mit reiner DNA ohne Carrier wie zu erwarten war eine minimale Transfektionseffizienz erreicht wird. Polyplexe aus pDNA und PEI im N/P-Verhältnis 2 und 10 diente als Positivkontrolle und Referenz zum Vergleich der Polyrotaxane mit einem kommerziellen Transfektionsreagenz.

Mit den kationischen CD-Derivaten **CD2**, **CD3** und **CD4** wurden für beide N/P-Verhältnisse nur sehr schwache Lumineszenzintensitäten erreicht. Durch die im Vergleich zur DNA geringe Größe der CD wird die DNA nicht hinreichend komplexiert, sodass keine stabilen Polyplexe gebildet werden und die Transfektionseffizienz sehr gering ist. Die schlechten Komplexierungseigenschaften der freien kationischen CD waren bereits in einem Verdrängungsassay mit SYBRSafe sowie einer entsprechenden DLS-Messung beobachtet worden. Im Verdrängungsassay mit den kationischen CD-Derivaten wurde für bis zu N/P 10 noch 25 % freie DNA detektiert. Mit **CD4** wurden Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 128 nm gebildet, mit **CD2** wurden lediglich diffuse Partikel um 400 nm detektiert. Vermutlich eignet sich **CD4** aufgrund der sterisch größeren Seitenketten besser zur Komplexierung des Plasmids als **CD2**. Grundsätzlich wurden jedoch nur sehr geringe Transfektionseffizienzen erreicht. Das N/P-Verhältnis 10 ist bei **CD2** etwa gleich gut wie N/P = 2, bei **CD3** sowie **CD4** führt das höhere N/P-Verhältnis jedoch zu noch schwächerer Transfektionseffizienz.

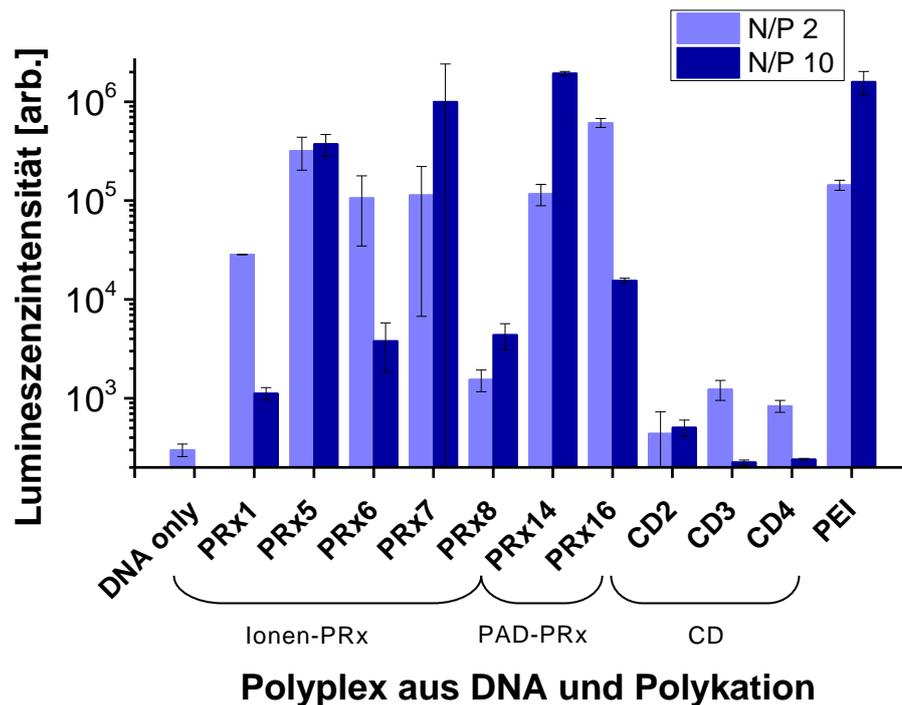
Die Polyrotaxane unterscheiden sich stark in ihrem Potential als Transfektionsreagenz. Dabei hat auch das N/P-Verhältnis einen entscheidenden Einfluss auf die Transfektionseffizienz, jedoch ist hierbei kein Trend zu erkennen.

Die Polyrotaxane auf Polyamidin-Basis **PRx14** (N/P = 10) und **PRx16** (N/P = 2) zeigen Transfektionseffizienzen in der Größenordnung des PEI (N/P = 10). Es waren ähnliche Transfektionseffizienzen für beide Polyrotaxane erwartet worden, da das Masse pro Ladungsverhältnis mit 240 und 210 jeweils für **PRx14** und **PRx16** trotz unterschiedlicher CD-Derivate (Hepta-Cys- $\beta$ -CD bei **PRx14** und Hexa-Cys- $\alpha$ -CD für **PRx16**) sehr ähnlich ist.

Eine ebenfalls hohe Transfektionseffizienz in der Größenordnung des PEI wurde mit dem Ionen-11 Polyrotaxan **PRx7** erreicht. Hierbei wurden bei N/P = 10 um den Faktor 5 höhere Lumineszenzintensität erreicht als mit N/P = 2.

Das entsprechende Ionen-N-Oxid 11-Polyrotaxan **PRx8** erwies sich als wenig effizientes Transfektionsreagenz im Vergleich zu **PRx7** und anderen Polyrotaxanen. Aufgrund der Ladungsneutralität des Polymerrückgrats bei physiologischem pH-Wert hat dieses Polyrotaxan ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis M/N von 430, während für alle anderen Polyrotaxane ein M/N-Verhältnis zwischen 230 und 270 berechnet wurde. Trotz Einsatz der entsprechenden Masse wäre es möglich, dass für dieses Polyrotaxan ein N/P-Verhältnis >10 zu einer höheren Transfektionseffizienz führen würde.

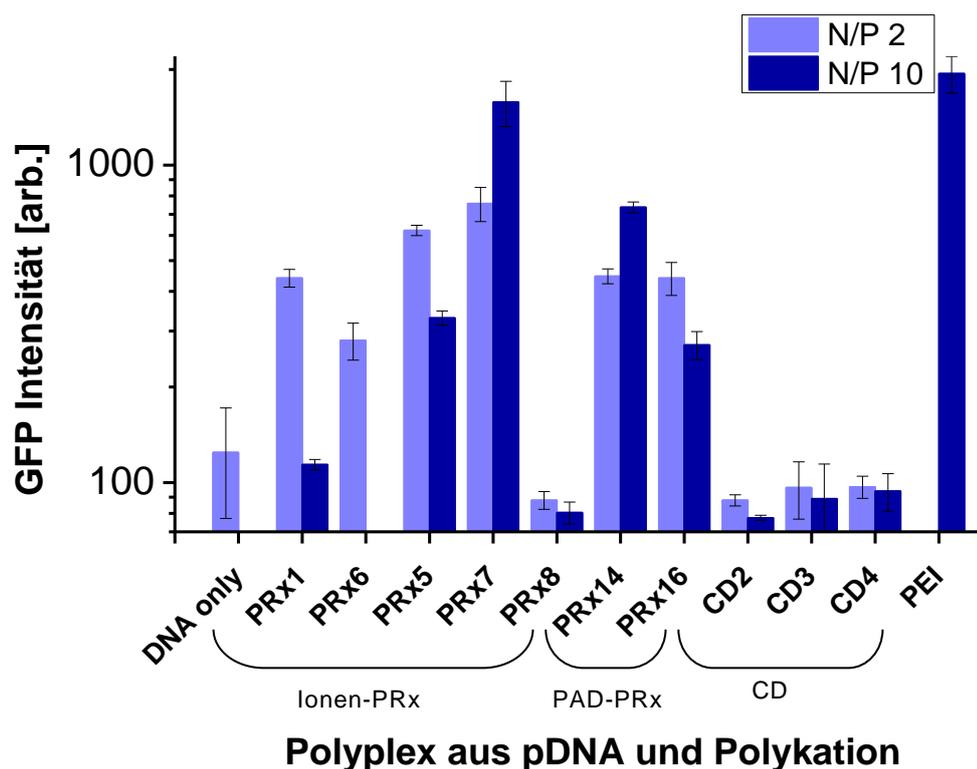
**PRx1** und **PRx6** mit nahezu identischen Masse-zu-Ladungsverhältnissen unterscheiden sich lediglich im CD-Derivat (**PRx1** mit Hepta-Cys- $\beta$ -CD, **PRx6** mit entsprechend dimethyliertem  $\beta$ -CD-Derivat). Bei beiden Polyrotaxanen wurde mit N/P = 2 eine höhere Transfektionseffizienz erreicht als bei N/P = 10. Dennoch sind sie bezogen auf die Transfektionseffizienz um den Faktor 10 bis 50 schlechtere Gencarrier als PEI (N/P = 10). **PRx5** mit histidinylisiertem  $\beta$ -CD-Derivat ist ebenfalls um den Faktor 5 schlechterer Gencarrier als PEI (N/P = 10), wobei bei diesem Polyrotaxan kein signifikanter Unterschied zwischen N/P = 2 und N/P = 10 zu beobachten ist.



**Abb. 48:** Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyplexe aus den hergestellten Polyrotaxane in den N/P-Verhältnissen 2 und 10, durchgeführt über 24 h an HEK293T-Zellen ( $2 \cdot 10^4$  Zellen/Well) in Triplikaten im Luciferase-Assay mit 200 ng DNA/Well.

Die Ergebnisse des GFP-Assays sind in Abb. 49 dargestellt. Das Auslesen des GFP-Assays erfolgt erst 48 h nach der Plasmid-Transfektion, da erst nach 30 h grün fluoreszierende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet wurden.

Die Abstufung der GFP-Intensität und damit der Transfektionseffizienz ist hier deutlich geringer, da sich die GFP-Intensität mit der reinen DNA und der des Ansatzes mit PEI nur um den Faktor 11 unterscheiden. Der Luciferase-Assay liefert daher die genaueren Ergebnisse. Dennoch sind die Tendenzen ähnlich: Mit den kationischen CD-Derivaten sowie mit **PRx8** entspricht die Transfektionseffizienz der der freien DNA. Die höchste Transfektionseffizienz, vergleichbar mit der des PEI, wurde mit **PRx7** erreicht. Auch **PRx14** führte zu einer hohen GFP-Intensität, etwa um den Faktor 2 schlechter als PEI. **PRx1**, **PRx6** und **PRx16** sind ähnlich effiziente Gencarrier, knapp 50 % der Transfektionseffizienz des PEI werden erreicht, wobei hier N/P = 2 deutlich effizienteres Mischungsverhältnis ist als N/P = 10.

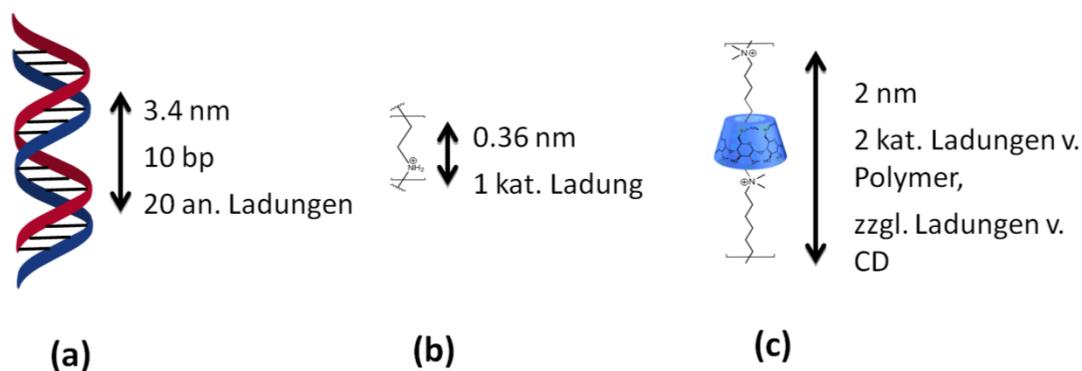


**Abb. 49:** Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyplexe aus den hergestellten Polyrotaxane in den N/P-Verhältnissen 2 und 10, durchgeführt über 48 h an HEK293T-Zellen ( $1.5 \cdot 10^4$  Zellen/Well) in Triplikaten im GFP-Assay.

Im Folgenden wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der Ladungsdichte (d.h. Ladung pro nm Polymer) der Polyrotaxane zur erreichten Transfektionseffizienz zu finden. Es wurde hierbei die Hypothese aufgestellt, dass Polykationen die DNA besonders effizient komplexieren, wenn die Ladungsdichte möglichst ähnlich zur Ladungsdichte der DNA ist.

Die häufigste DNA-Konformation ist eine Helix mit einer Ganghöhe von 3.4 nm und 10 Basenpaaren pro Windung. Das entspricht 20 anionischen Ladungen auf einer Länge von 3.4 nm, dementsprechend 5.9 P/nm.

Für die PEI und die hergestellten Polyrotaxane kann ebenfalls die Ladungsdichte pro nm Polymer berechnet werden. Dazu wurde die durchschnittliche Ladung einer Polyrotaxan-Wiederholeinheit durch die Fadenendenlänge einer Wiederholeinheit des jeweiligen Polymers dividiert (Abb. 50 und Tabelle 9)



**Abb. 50:** Bestimmung der Ladungsdichte (Ladung pro nm Polymer) für (a) DNA in Helixform, (b) PEI und (c) exemplarisch für ein Ionen-Polyrotaxan)

**Tabelle 9:** Übersicht über die Ladungsdichte der Polykationen bezogen auf die Masse sowie auf die Länge des Polymers

Polykation	Ladungsdichte Masse pro Ladung (M/N)	Ladungsdichte Ladung pro Länge [N/nm]
PEI	80	2.7
<b>PRx1</b>	240	1.8
<b>PRx2</b>	250	2.0
<b>PRx3</b>	240	2.3
<b>PRx4</b>	230	1.7
<b>PRx5</b>	340	2.1
<b>PRx6</b>	250	1.4
<b>PRx7</b>	270	2.5
<b>PRx8</b>	430	1.3
<b>PRx14</b>	240	2.5
<b>PRx15</b>	220	1.0
<b>PRx16</b>	210	2.3
<b>PRx17</b>	210	1.0

Die im Luciferase-Assay bestimmte Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Ladungsdichte ist für ausgewählte Polyrotaxane für N/P 2 und N/P 10 in den Abb. 51 (a) und (b) dargestellt, sowie im jeweils optimalen N/P-Verhältnis in Abb. 51 (c). Tendentiell ist eine Steigerung der Transfektionseffizienz zu beobachten, wenn sich die Ladungsdichte der der DNA annähert.

Ohne Polyrotaxan und bei Polyrotaxanen mit geringen Ladungsdichten (z.B. **PRx8**, welches eine besonders geringe Ladungsdichte von 1.3 Ladungen/nm aufweist, da das Polymerrückgrat Ionen N-Oxid 11 bei physiologischem pH-Wert ladungsneutral ist und die kationischen Ladungen des Polyrotaxans lediglich durch die aufgefädelten CDs bestimmt werden), ist bei beiden N/P Verhältnissen nur eine geringe Transfektionseffizienz zu beobachten.

Im Gegensatz hierzu wurden bei N/P 2 für Polyrotaxane mit Ladungsdichten zwischen 2.1 und 2.3 (**PRx16** und **PRx5**) die höchsten Transfektionsraten erzielt, bei N/P 10 wur-

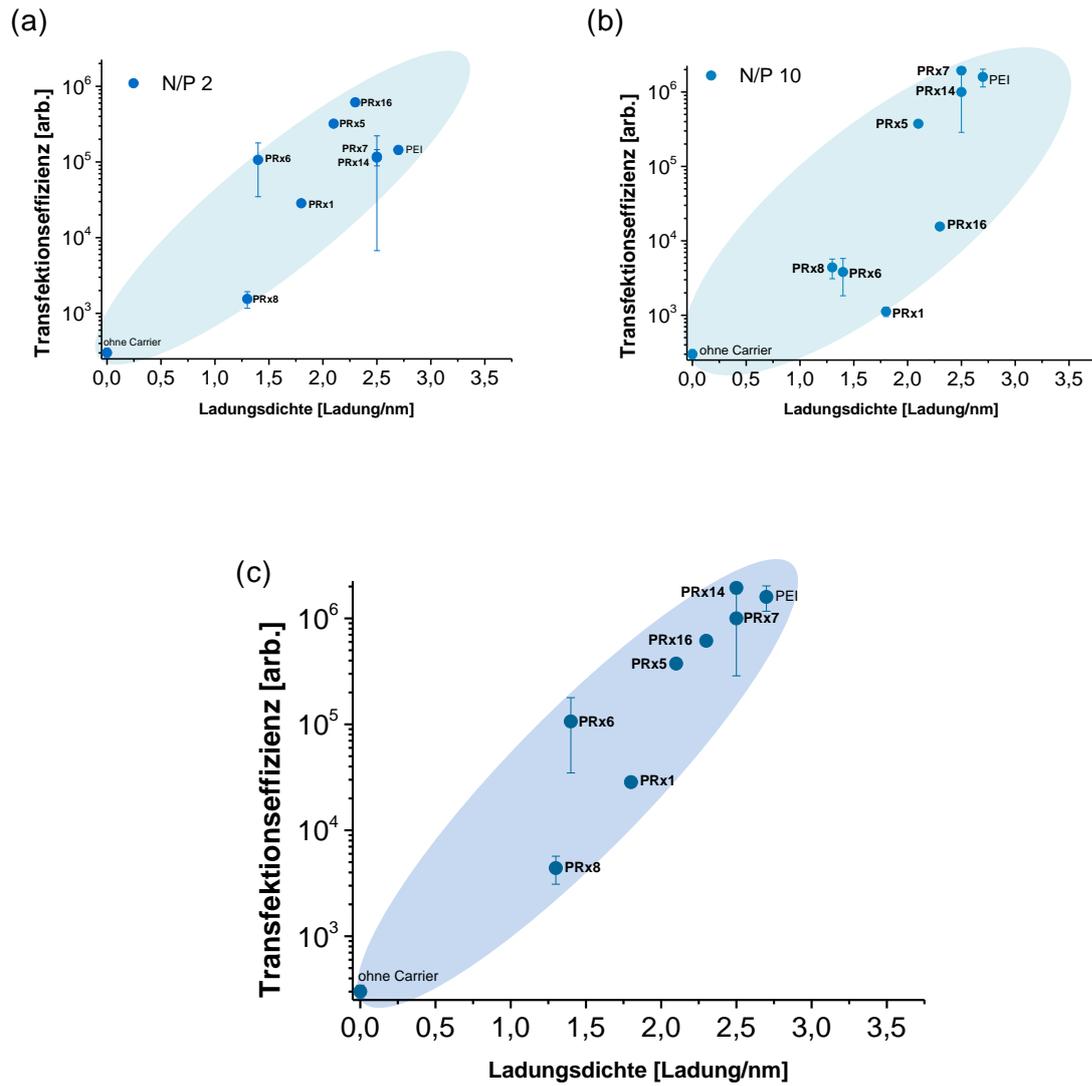
den mit Ladungsdichten von 2.3 und 2.5 (**PRx14** und **PRx7**), sowie für PEI (2.7 Ladungen/nm) die höchsten Transfektionsraten erreicht.

**PRx6** bildet bei N/P 2 eine Ausnahme von der beobachteten Tendenz. Mit diesem Polyrotaxan aus Ionen und dem dimethylierten Heptakis-cysteaminyll- $\beta$ -CD-Derivat (Belegung 11 %) wurden trotz niedrigerer Ladungsdichte als **PRx1** eine höhere Transfektionsrate erzielt. Die Toxizität der Polyrotaxane **PRx6** und **PRx1** sind ähnlich, sodass die verbesserten Carriereigenschaften von **PRx6** auf das dimethylierte CD-Derivat zurückzuführen sein müssen. Vermutlich werden mit der tertiären Ammoniumgruppe etwas stabilere Komplexe mit den Phosphatgruppen der DNA gebildet. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die stärkere Basizität des tertiärenamins im Vergleich zum primären Amin sein. Das tertiäre Amin ist stärker protoniert und trägt daher eine positivere Ladung, wodurch stärkere elektrostatische Wechselwirkungen zu den Phosphatgruppen ausgebildet werden können.

Für das Polyrotaxan **PRx5** aus Ionen und dem histidinylierten CD-Derivat wäre aufgrund des Protonenschwammeffekts eine höhere Transfektionseffizienz erwartet worden als für Polyrotaxane mit vergleichbaren Ladungsdichten. Dennoch ist zwar bei beiden N/P-Verhältnissen eine gute Transfektionseffizienz für die Ladungsdichte von 2.1 zu beobachten, jedoch keine außerordentliche Steigerung der Transfektionseffizienz im Vergleich zu den anderen Polyrotaxanen.

Optimale Polyrotaxane als Gencarrier sollten demnach ein kationisches Polymerrückgrat haben, und eine möglichst hohe Belegung durch kationische CD. Unter den Ionen-Polyrotaxanen sind Ionen 6,10 sowie Ionen-11 sind gleichermaßen geeignet, lediglich Ionen N-Oxid-11 ist aufgrund seiner Ladungsneutralität weniger geeignet, da die Gesamtladung des Polyrotaxans auch bei Belegung mit CD gering ist. Das am besten geeignete CD-Derivat war hierbei das dimethylierte  $\beta$ -CD-Derivat **CD3**.

Des Weiteren sticht **PRx16** aus Polyamidin und Hexa-Cys(Me)<sub>2</sub>- $\alpha$ -CD heraus, welches bereits bei N/P 2 fast so gute Transfektionsraten erzielt wie PEI mit einem N/P von 10, wobei der LC<sub>50</sub> von **PRx16** ist dreimal so groß ist wie der des PEI.



**Abb. 51:** Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Ladungsdichte ist für ausgewählte Polyrotaxane, (a) für N/P 2, (b) für N/P 10 und (c) im jeweils optimalen N/P-Verhältnis.

### 3.5 Oberflächenmodifizierung der Nanopartikel zur targetvermittelten Aufnahme

#### 3.5.1 Herstellung und Analytik der Core-Shell-Nanopartikel

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit kationischen Polyrotaxanen grundsätzlich funktioniert, und mit PEI vergleichbare Transfektionseffizienzen erreicht werden können, beispielsweise mit Polyrotaxan **PRx14** und **PRx7**. Dennoch sind nicht alle Polyrotaxane gleich gute Transfektionsreagenzien. Mit PEI können vermutlich hohe Transfektionseffizienzen erzielt werden, da es stark membranschädigende Eigenschaften hat.<sup>71,210</sup> Durch Membranschäden im Nanobereich wird einerseits die Aufnahme von Nanopartikeln in die Zelle erleichtert, andererseits macht es auch die Membran der Endosomen löchrig und ermöglicht so wiederum die Freisetzung der Nanopartikel ins Cytoplasma.<sup>177,211</sup> Bei Polyrotaxan-Nanopartikeln wird eine geringe Membranschädigung erwartet.

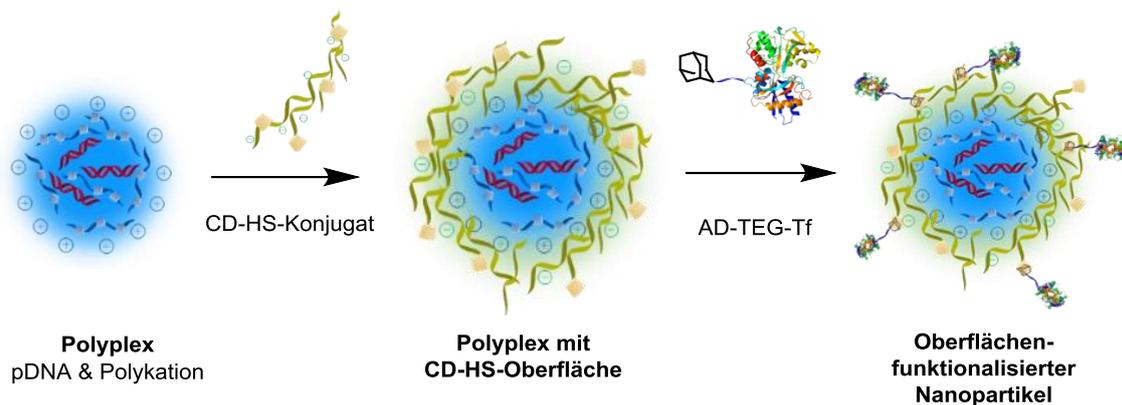
Die Aufnahme der PRx-Nanopartikel könnte allerdings durch targetvermittelte Endocytose noch verbessert werden, gleichzeitig könnten so selektiv die Zellen transfiziert werden, die über die entsprechenden Rezeptoren an ihrer Oberfläche verfügen.

Die bisher hergestellten und verwendeten Nanopartikel aus pDNA und kationischen Polyrotaxanen verfügten insgesamt über einen positiven Ladungsüberschuss. Grundsätzlich werden geladene Nanopartikel einfacher aufgenommen als neutrale.<sup>103,212</sup> Daher soll die Oberfläche der Partikel anionisch werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass beispielsweise Hyaluronsäure, ein natürliches anionisches Mucopolysaccharid, die kationische Ladung von Polyplexen maskieren kann und vor unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen schützen kann.<sup>213</sup> In Anlehnung an Sun *et al.*<sup>121</sup> sollten die Nanopartikel in dieser Arbeit zunächst mit Hyaluronsäure beschichtet werden, wobei in diesem Fall cyclodextrinmodifizierte Hyaluronsäure (CD-HS) verwendet wurde. Auf diese Weise wird einerseits die Oberflächenladung des Nanopartikels negativ, andererseits befinden sich durch die CD-Modifikation freie CDs auf der Oberfläche des Nanopartikels. Im nächsten Schritt soll adamantyliertes Transferrin (Ad-Tf) zu den Partikeln gegeben werden. Durch Bildung einer Einschlussverbindung des Adamantans mit den freien CD der Hyaluronsäure sollen die Nanopartikel an ihrer Oberfläche über Transferrinliganden verfügen und somit an Transferrinrezeptoren an Zelloberflächen andocken können.

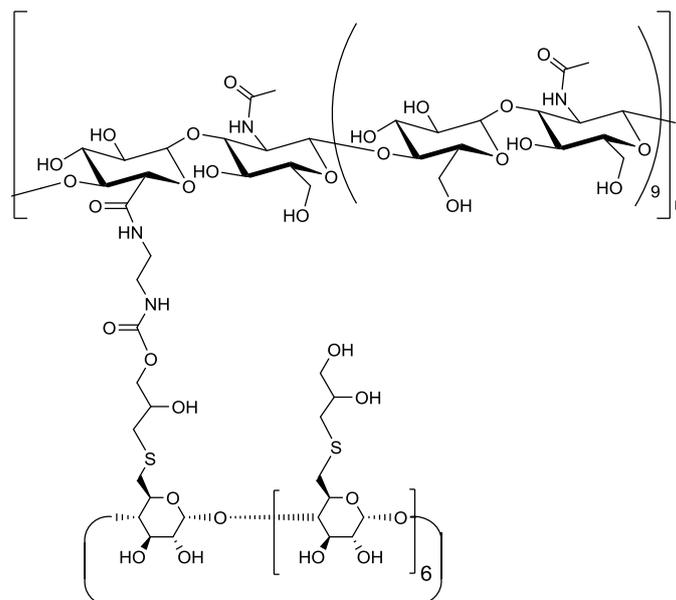
Der Transferrinrezeptor (TfR, genau TfR1 oder CD71) wurde ausgewählt, da er auf den meisten humanen Zellen moderat exprimiert wird, jedoch auf vielen Tumorzellen überexprimiert wird. Der TfR dient zur Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen in die Zelle, welches ein essentielles Element für die Zellproliferation ist. Bei schnell proliferierenden Zellen wird mehr Eisen verbraucht, sodass mit Fortschritt des Tumors auch die TfR Expression der Tumorzellen steigt, um mehr Eisen aufnehmen zu können.<sup>112,113</sup> Er stellt ein gut erforschtes Oberflächenprotein dar, welches bereits erfolgreich als Target für die Tumorthherapie verwendet wurde, sowohl als Konjugat mit Chemotherapeutika (z.B. „Adriamycin“, ein Doxorubicin-Tf-Konjugat),<sup>214</sup> aber auch als Targetligand für Nanopartikel wie Polyplexe.<sup>65,215,216</sup>

Zur TfR-vermittelten Aufnahme wurde daher Transferrin als Ligand an die Oberfläche der Polyplexe gebunden. Die Größe des Nanopartikels nimmt durch das Anbinden des Transferrins etwas zu, und auch die Gesamtladung des Nanopartikels wird unter physiologischen Bedingungen weiterhin negativ geladen sein. Das Prinzip der Herstellung der oberflächenfunktionalisierten Nanopartikel ist in Abb. 52 dargestellt.



**Abb. 52:** Schrittweise Herstellung der oberflächenfunktionalisierten Nanopartikel.

Im ersten Schritt wurden die Nanopartikel mit einem CD-Hyaluronsäurekonjugat von D. Schwarz (Abb. 53) beschichtet. Die anionische Hyaluronsäure ist ein sehr gut wasserlösliches anionisches Polymer und ist aufgrund ihrer besonders hohen Biokompatibilität bereits in diversen Wirkstoffen und Wirkstoffformulierungen enthalten.<sup>121,217–219</sup> Damit macht die Beschichtung der Polyplexe mit CD-HS die Partikel insgesamt besonders biokompatibel. Es wurde weiterhin gezeigt, dass durch die anionische Hyaluronsäure die Wechselwirkung der Polyplexe mit Blutbestandteilen verringert werden konnte.<sup>108</sup> Die Struktur des CD-HS-Konjugats ist in Abb. 53 dargestellt. Im Mittel ist jede 10. Säurefunktion durch ein CD substituiert. Die Modifizierung der Hyaluronsäure mit Cyclodextrinen hat keinen Einfluss auf die Biokompatibilität. In einem MTT-Assay an HEK293T und HepG2 Zellen wurden bis zu einer Konzentration von 10 mg/mL keine toxischen Effekte des Polymers festgestellt.



**Abb. 53:** Monoaminoethylcarbammat-hepta-thioglycerin- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Konjugat (CD-HS) von D. Schwarz.

Das System der oberflächenfunktionalisierten Nanopartikel wurden am Modellsystem mit Polyethylenimin optimiert. Zunächst wurden die bereits bekannten Polyplexe herge-

stellt. Es wurden Polyplexe aus DNA und PEI im N/P-Verhältnis 10 gebildet, bei den Polyplexen aus DNA und Polyrotaxan wurde das optimale N/P-Verhältnis von 2 gewählt. Damit haben die Nanopartikel eine Ladung von „+9“ im Falle des PEI und „+1“ im Falle des Polyrotaxans. Um die geeignete Menge an CD-HS zu bestimmen, wurde eine Titration durchgeführt von 0 bis 100 % CD-HS bezogen auf die Ladung des Polykations. Mit steigender Menge HS nimmt die kationische Ladung ab. Bei Zugabe einer äquivalenten Menge HS (100 %) wäre die kationische Ladung des Polykations vollständig neutralisiert und der Partikel wäre insgesamt schwach anionisch aufgrund der anionischen DNA.

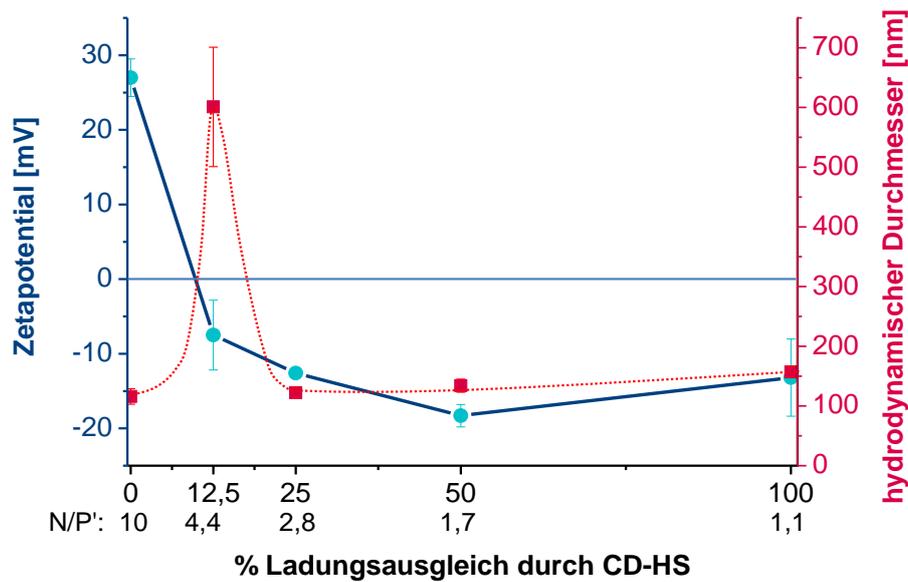
Es wurde im Folgenden jeweils ein N/P'-Verhältnis definiert, wobei N wieder als die Anzahl der kationischen Ladungen des Polykations, hier des PEIs definiert sind, P' ist definiert als die Summe aller anionischen Ladungen, d.h. der anionischen Ladungen der der DNA und der Ladungen der CD-HS (Gleichung V).

$$N/P' = \frac{\text{positive Ladungen (Polykation)}}{\sum \text{negative Ladungen (DNA + HS)}} \quad (\text{Gl. V})$$

Es wurde zunächst der Einfluss der Mischungsreihenfolge untersucht. In der Literatur wurden teilweise alle Bestandteile des Polyplexes gleichzeitig gemischt, sodass ein ternärer bzw. quartärer Komplex entsteht.<sup>220</sup> Bei Vorversuchen wurde jedoch gezeigt, dass mit steigender Menge der HS weniger dichte Partikel gebildet werden, und freie DNA detektiert werden kann (bei 100 % HS bis zu 20 % frei vorliegende DNA). Ein erheblicher Nachteil des ternären Systems von Sun *et al.*<sup>121</sup> besteht außerdem darin, dass ein sich ein Großteil der CD der modifizierten HS im Inneren des Partikels befinden und für adamantyliertes Protein nicht mehr zugänglich sind. Aus diesen Gründen wurde im Folgenden sogenannte Core-Shell Partikel gebildet, wobei jeweils zunächst der Polyplex aus pDNA und Polykation (**PP1**) gebildet und im zweiten Schritt mit anionischer CD-HS beschichtet wurde (**PP1a**). Um freie, nicht gebundene CD-HS abzutrennen, wurden die Partikel jeweils 18 h gegen eine 100 kDa-Membran dialysiert, da im nächsten Schritt adamantyliertes Transferrin zugegeben werden soll, welches möglichst nur in nanopartikelgebundene CD der CD-HS eingeschlossen werden soll.

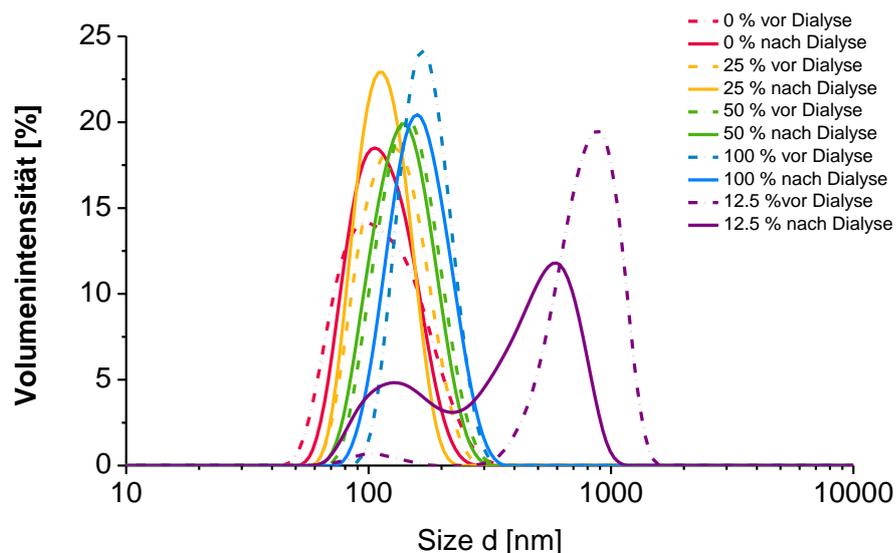
Ein erster Anhaltspunkt für die Anlagerung der anionischen Hyaluronsäure um die kationischen Polyplexe ist die Abnahme des Zetapotentials. In Abb. 54 ist jeweils das Zetapotential der Nanopartikel in Abhängigkeit der Menge CD-HS in % im Bezug auf die kationischen Ladungen des PEIs angegeben. Die Polyplexe aus DNA und Polykation ohne zugegebene CD-HS haben wie erwartet eine kationische Oberfläche (27 mV). Das Zetapotential der Oberfläche ist bereits bei der Zugabe von 12.5 % CD-HS schwach anionisch. Die Ladung nimmt bei 50 % bis zu -18 mV ab. Bei maximalem Ladungsausgleich durch Hyaluronsäure beobachteten Sun *et al.*<sup>121</sup> sowie Ito *et al.*<sup>213</sup> ebenfalls Zetapotentiale von -19 bzw. -18 mV.

Bei 100 % CD-HS ist das Zetapotential ähnlich, hierbei ist jedoch, ebenso wie bei den Partikeln mit 12.5 % HS eine höhere Standardabweichung zu beobachten, möglicherweise bedingt durch den diffusen Charakter der HS-Schicht um den Partikel, da die kationische Ladung des DNA-Polykation-Kerns vollständig abgesättigt ist und das Bestreben des Partikels, weitere HS anzubinden, sinkt.



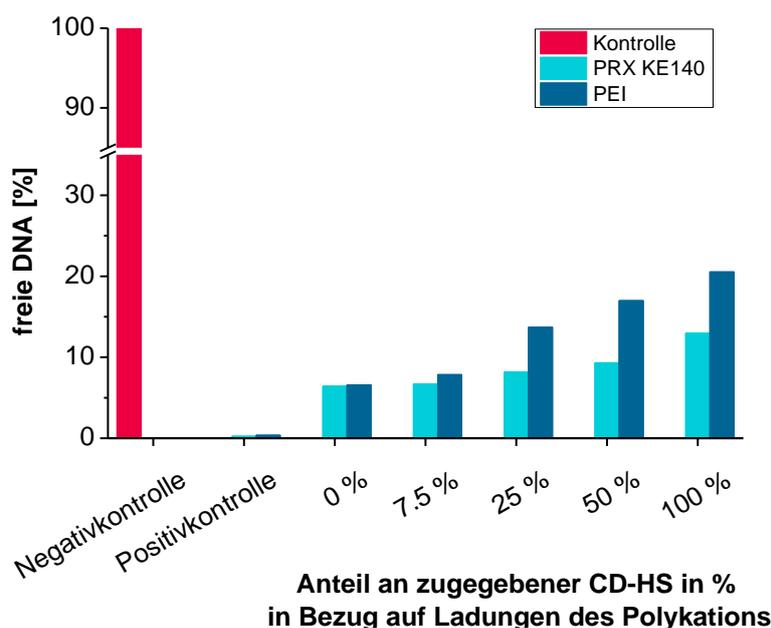
**Abb. 54:** Zetapotential und hydrodynamischer Durchmesser der Nanopartikel in Abhängigkeit der zugegebenen Menge CD-HS in % bezogen auf die kationischen Ladungen des PEI.

Ein weiterer Beleg für die Anlagerung der anionischen Hyaluronsäure um die kationischen Polyplexe ist die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers. Die Größe nimmt von 110 nm für die reinen PEI-DNA Polyplexe auf bis zu 160 nm für 100 % HS zu (Abb. 55). Die Dialyse über eine 100 kDa Membran hat keinen signifikanten Einfluss auf die Größenverteilung, es werden keine Aggregate gebildet. Es ist jedoch festzustellen, dass bei 12.5 % HS Aggregate entstanden sind (ca. 600 nm). Die Oberfläche der Nanopartikel liegt bei diesem Verhältnis gerade im Bereich der Elektroneutralität, daher neigen die Nanopartikel zur Aggregation, bis das Größe/Ladungsverhältnis günstig ist.<sup>192,193</sup> Die Aggregation spiegelt sich auch in der vergleichsweise hohen Standardabweichung des Zetapotentials des Messpunktes bei 12.5 % Ladungsausgleich in Abb. 54 wider.



**Abb. 55:** Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers der Nanopartikel in Funktion der zugegebenen Menge an CD-HS in % bezogen auf die kationischen Ladungen des PEIs, bestimmt über DLS.

Zuletzt wurde das DNA-Komplexierungsvermögen der gebildeten Core-Shell Nanopartikel untersucht. Dazu wurden die Polyplexe wieder mit bis zu 100 % CD-HS versetzt, 30 min inkubiert und anschließend die freie, nicht komplexierte DNA mit SYBRSafe™ angefärbt. Das Ergebnis ist für PEI sowie für das Polyrotaxan **PRx1** in Abb. 56 dargestellt. Ein kleiner Teil von etwa 5 % der DNA liegt bereits beim Polyplex aus DNA und Polykation an der Oberfläche des Partikels vor und kann deswegen fluoreszierende Einschlussverbindung mit SYBRSafe™ bilden. Mit Zugabe der HS steigt der Anteil an freier bzw. frei zugänglicher DNA bis zu 15 % für Polyrotaxan **PRx1** und bis zu 20 % für PEI an bei 100 % CD-HS. Insgesamt bleibt jedoch über den gesamten getesteten Bereich der größte Teil (75 bzw. 80 %) der DNA im Partikel eingeschlossen. Nebenbei ist festzustellen, dass das Polyrotaxan **PRx1** eine etwas höhere Bindungsaffinität zur DNA hat als PEI.

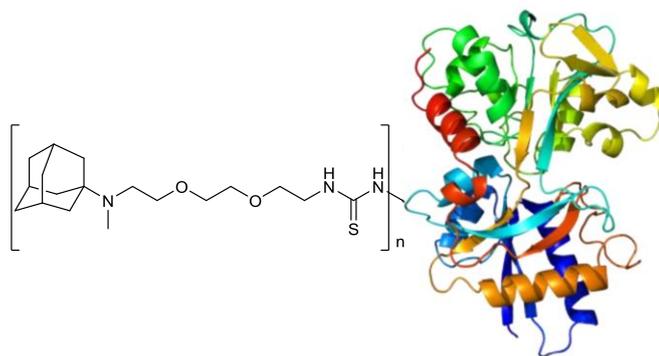


**Abb. 56:** Dye Displacement Assay mit SYBRSafe™ zur Bestimmung der potentiellen Freisetzung von DNA bei Zugabe der Hyaluronsäure. Die Polyplexe wurden jeweils im vorher bestimmten optimalen N/P-Verhältnis angesetzt, für das Polyrotaxan **PRx1** war N/P = 2, für die PEI-Polyplexe war N/P = 10. Als Negativkontrolle wurde dieselbe Menge der in den Polyplexen enthaltenen DNA mit SYBRSafe™ angefärbt, als Positivkontrolle wurden jeweils nur PEI bzw. **PRx1** mit SYBRSafe™ gemischt und ausgeschlossen, dass hierbei fluoreszierende Komplexe entstehen.

Insgesamt ist zu beobachten, dass bereits eine kleine Menge CD-HS ( $\geq 12.5\%$ ) ausreichend ist, um eine anionische Partikeloberfläche zu bilden. Ein HS-Gehalt von 25 bis 50 % bezogen auf die kationischen Ladungen des PEI scheint ideal zu sein. Um eine hohe Anzahl an CD auf der Oberfläche zu erhalten wurde im Folgenden daher ein Gehalt von 50 % CD-HS gewählt (**PP1a**). Es wurde gezeigt, dass mehrere Transferrin-Moleküle auf der Oberfläche des Nanopartikels multivalentes Anbinden an der Zelloberfläche mit hoher TfR-Dichte ermöglicht, wodurch die Bindungsaffinität steigt.<sup>221</sup> Daher sollten möglichst viele Bindungsstellen für das adamantylierte Transferrin zur Verfügung gestellt werden.

Wie erwartet waren die Nanopartikel mit HS-Gehalt von 0 bis 100 % CD-HS in der final zur Transfektion eingesetzten Konzentration (200 ng DNA/well) nicht toxisch.

Im nächsten Schritt wurde adamantyliertes Transferrin von D. Schwarz als Targetligand auf die CD-HS-Oberfläche des Nanopartikels angebunden. Die Struktur des adamantylierten Proteins ist in Abb. 57 dargestellt. Das Adamantan ist über einen Tetaethylenglycol-Spacer über eine Thioharnstoffbindung an das Protein angebunden. Durch den TEG-Spacer erhöht sich die Bindungskonstante des Adamantan-Cyclodextrin Komplexes im Vergleich zu ohne Spacer modifiziertem adamantylierten Transferrin.



**Abb. 57:** Adamantyliertes Transferrin (Ad-Tf) von D. Schwarz. Pro Transferrin sind etwa sechs Adamantangruppen angeknüpft.

Es wurde bereits von D. Schwarz mittels Oberflächenplasmonresonanz-Analyse gezeigt, dass das adamantylierte Transferrin stabile Einschlussverbindungen mit oberflächenimmobilisierten  $\beta$ -CD bilden kann.<sup>222</sup> Die Anbindung des Ad-Tfs soll nun mit den CD-Ringen auf der Oberfläche des Nanopartikels erfolgen.

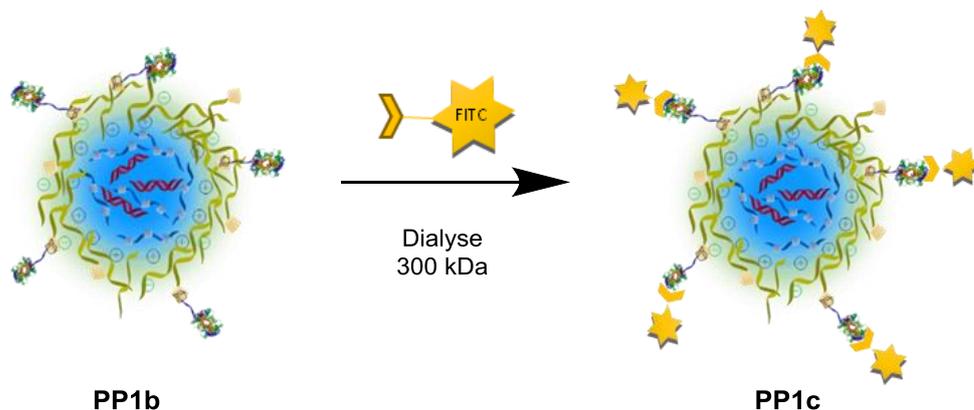
Die Menge an eingesetztem Ad-Tf zur Modifikation der Oberfläche wurde zunächst in Anlehnung an Davis *et al.*<sup>220</sup> gewählt, deren Partikel mit 0 %, 0,5 % und 1 % Ad-PEG-Tf, bezogen auf die gesamte Stoffmenge an CD, gebildet wurden. Es wurde angenommen, dass bei den Core-Shell Partikeln dieser Arbeit etwa 10 % aller CD der CD-HS auf der Oberfläche zugänglich sind für Ad-Tf. Weiterhin ist es unwahrscheinlich, dass Ad-Tf mit allen sechs Adamantangruppen gleichzeitig an der CD-HS anbindet. Es wird daher zunächst davon ausgegangen, dass eine bis zwei Adamantanfunktionen pro Transferrin in CD eingeschlossen werden. Um etwa jedes zehnte CD der Oberfläche durch ein Ad-Tf zu belegen, ergibt sich insgesamt auch eine Menge von 1 % Ad-Tf bezogen auf die Gesamtmenge an CD. Jedoch konnte der Einschluss des 1 % Ad-Tf in die CD auf der Oberfläche des Nanopartikels mittels Änderung des hydrodynamischen Radius oder des Zeta-potentials der Partikel nicht nachgewiesen werden. Vermutlich bindet nur ein kleiner Teil an, und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem und komplexiertem Ad-Tf in Lösung ein. Die Anbindung des Ad-Tfs an die Oberfläche des Nanopartikels konnte jedoch mit 10 % Ad-Tf bezogen auf die Gesamtmenge an CD über die Größenzunahme mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen werden. Durch erneute Dialyse der Nanopartikel über eine 100 kDa Membran wurde freies Ad-Tf, welches innerhalb 4 h nicht komplexiert wurde, abgetrennt.

Das adamantylierte (Holo-)Transferrin selbst zeigte unter den gewählten Bedingungen einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 10 – 20 nm. Bei Anbindung des Ad-Tfs an die CD-HS beschichteten Nanopartikel **PP1a** erhöhte sich deren hydrodynamischer Radius um etwa 80 nm (Abb. 59 und Tabelle 10). Nach einwöchiger Lagerung der Nanopartikel **PP1b** sind in der Größenverteilung auch kleinere Teilchen zu sehen (ca. 20 nm). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um freies Ad-Tf. Nach der Dialyse der Partikel (und der Entfernung aller nicht gebundenen Ad-Tf aus dem Gleichgewicht) stellt sich in der Partikelsuspension nach und nach wieder ein neues Gleichgewicht zwischen dem CD-Ad-Tf-Komplex und den dissoziierten Teilchen ein. Insgesamt sind die Tf-modifizierten Partikel **PP1b** mit etwa 220 nm etwas größer als die Partikel aus dem quartären System von Davis *et al.*,<sup>220</sup> allerdings wurden die Partikel nicht beschichtet, sondern alle Bestandteile gemischt und nur 0,1 bis 1 % Tf-PEG-Ad eingesetzt, wodurch sich die etwas geringere Größe der Partikel erklären lässt.

Durch ein Kontrollexperiment, bei dem die Nanopartikel mit nicht modifizierter HS beschichtet wurden (**PP1a'**), sollte eine unspezifische Anbindung des Transferrins an die Nanopartikel ausgeschlossen werden. Die analog hergestellten Partikel mit unmodifizierter Hyaluronsäure (**PP1a'**) wurden ebenfalls mit äquivalenten Mengen Ad-Tf behandelt und dialysiert. Die Partikelgröße der **PP1b'** war identisch zu vorher (**PP1a'**), ein Beleg dafür, dass keine unspezifische Anbindung des Ad-Tfs an nicht modifizierte Hyaluronsäure stattgefunden hat (Abb. 60 und Tabelle 10).

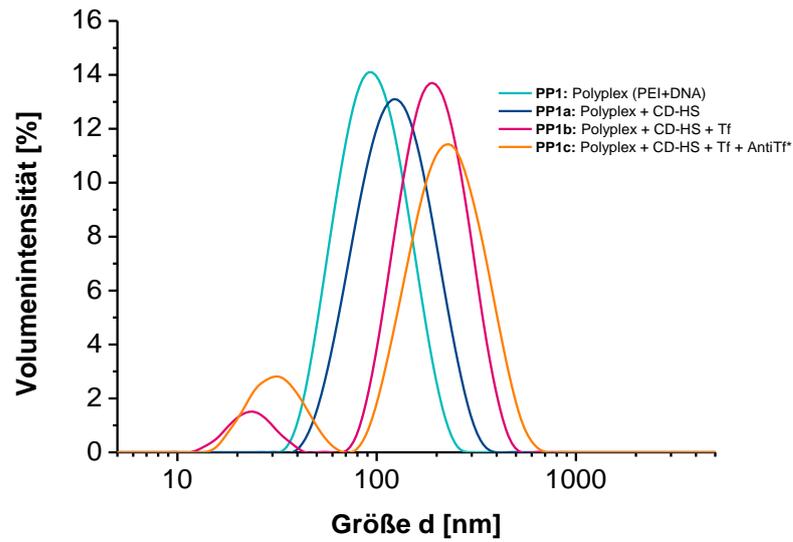
Als zweite Größe wurde das Zetapotential der Partikel untersucht. Transferrin ist ein bei neutralem pH-Wert anionisches Protein (IEP 5.5). Die Anbindung von Transferrinkonjugaten an kationische Partikel wurde dabei in der Literatur bisher über eine Abnahme des Zetapotentials belegt.<sup>118,220</sup> In diesem Fall sind die HS-beschichteten Partikel jedoch bereits anionisch und haben ein negatives Zetapotential. Für **PP1b** wurde ein Zetapotential von - 8 mV bestimmt, das Zetapotential ist damit gestiegen. Dies erschien zunächst überraschend, jedoch wurde zum Vergleich das Zetapotential einer vergleichbaren Transferrinlösung bestimmt, welches ebenfalls gerade - 8 mV beträgt. Vermutlich ist die Oberfläche der Partikel weitestgehend von Transferrin besetzt, was das beobachtete Zetapotential von - 8 mV erklären würde.

Als dritte Methode zum Beweis der Oberflächenmodifikation der Partikel wurden die Tf-modifizierten Partikel **PP1b** und **PP1b'** mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Transferrin (AntiTf\*) gelabelt (Abb. 58). Hierzu wurden **PP1b** und **PP1b'** mit einem Überschuss AntiTf\* behandelt (4h) und anschließend über eine 300 kDa Membran dialysiert, sodass überschüssiges AntiTf\* (sowie mögliche freie Tf-AntiTf\* Komplexe) abgetrennt wurden.

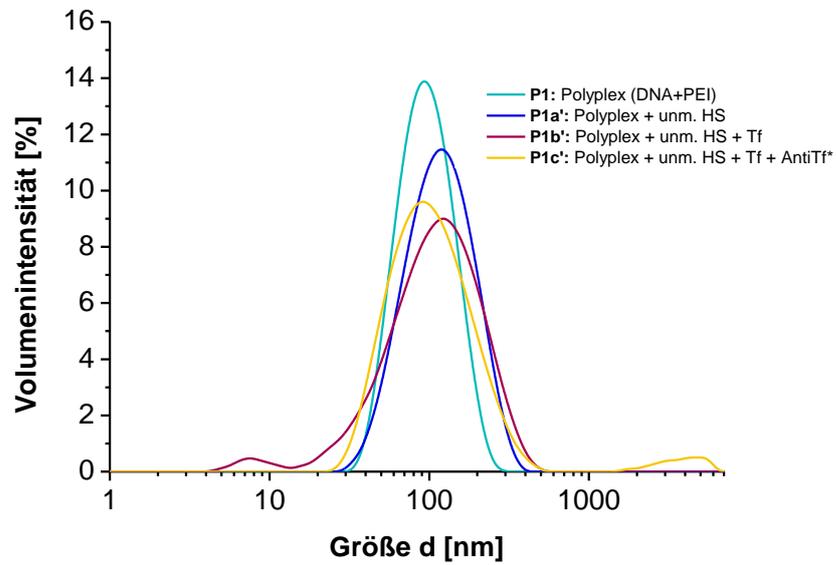


**Abb. 58:** Fluoreszenzmarkierung des Tf-funktionalisierten Nanopartikels **PP1b** mit AntiTf\*.

Durch die Markierung mit AntiTf\* vergrößerte sich der hydrodynamische Durchmesser von ca. 220 (**PP1b**) auf 250 nm (AntiTf\*-markierte Partikel **PP1c**), während für die Partikel **PP1c'** mit unmodifizierter Hyaluronsäure keine signifikante Erhöhung des hydrodynamischen Radius zu beobachten war (Abb. 59, Abb. 60 und Tabelle 10). Die unspezifische Adsorption des Transferrins an die unmodifizierte anionische Hyaluronsäure wurde aufgrund des bei neutralem pH-Wert anionischen Charakters des Transferrins für unwahrscheinlich erachtet und konnte durch dieses Experiment weitgehend ausgeschlossen werden.



**Abb. 59:** Größenverteilung der PEI-Polyplexe im Verlauf der Oberflächenfunktionalisierung bei Verwendung von CD-modifizierter HS.



**Abb. 60:** Größenverteilung der PEI-Polyplexe im Verlauf der Oberflächen-funktionalisierung bei Verwendung von nicht modifizierter HS.

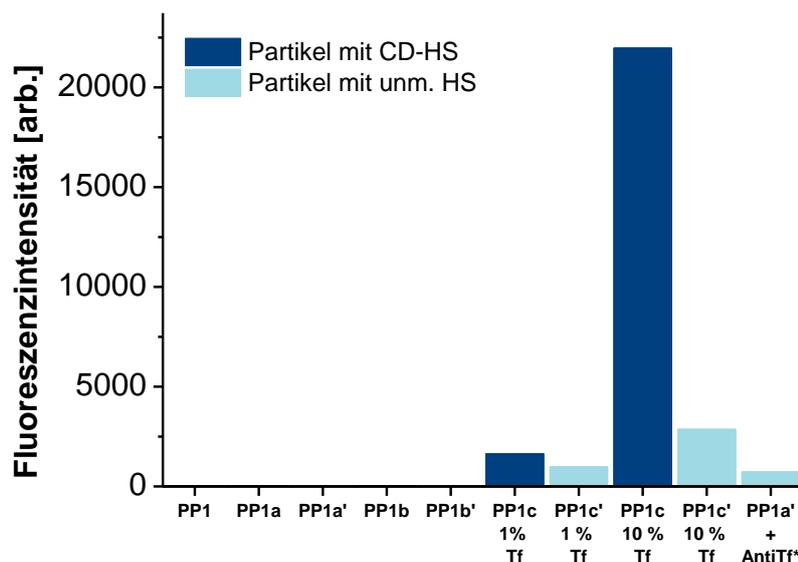
**Tabelle 10:** Übersicht über die Größenverteilungen, Polydispersitätsindices und Zetapotential der modifizierten PEI-Nanopartikel.

Partikel	Größe d [nm]	PDI	Zeta-potential [mV]
<b>PP1:</b> Polyplex (DNA+PEI)	116 ± 13	0.18 ± 0.05	27 ± 1
<b>Partikel mit CD-modifizierter HS</b>			
<b>PP1a:</b> Polyplex + CD-HS	134 ± 11	0.19 ± 0.03	- 18 ± 2
<b>PP1b:</b> Polyplex + CD-HS + Tf	217 ± 13	0.32 ± 0.01*	- 8 ± 1
<b>PP1c:</b> Polyplex + CD-HS + Tf + AntiTf*	254 ± 14	0.42 ± 0.03*	n.b.
<b>Kontrolle: Partikel mit unmodifizierter HS</b>			
<b>PP1a':</b> Polyplex + unmodif. HS	123 ± 4	0.19 ± 0.01	n.b.
<b>PP1b':</b> Polyplex + unmodif. HS + Tf	123 ± 6	0.29 ± 0.06*	n.b.
<b>PP1c':</b> Polyplex + unmodif. HS + Tf + AntiTf*	127 ± 8	0.28 ± 0.05*	n.b.

\* Die hohen PDI sind auf eine bimodale Verteilung der Größen zurückzuführen. Es liegt einerseits der untersuchte Nanopartikel vor, jedoch können ebenfalls noch freies Transferrin sowie Transferrin-Antitransferrin-Komplexe mit Größen zwischen 20 und 50 nm vorliegen.

Als einfacher und direkter Nachweis der AntiTf\*-Markierung diene zunächst eine Bestimmung der Fluoreszenzintensität der dialysierten Proben (Abb. 61). Wie erwartet ist für **PP1**, **PP1a**, **PP1a'**, **PP1b** und **PP1b'** keine Fluoreszenz zu erkennen. Spektroskopisch kann auch die Anbindung von nur 1% Tf nachgewiesen werden (**PP1c** 1% Tf). Bei **PP1c** mit 10 % Tf ist die höchste Fluoreszenz zu erkennen, was darauf hindeutet, dass an diesen Partikeln die meisten AntiTf\* an den Tf der Oberfläche angebinden sind. Im Gegensatz hierzu ist für **PP1c'** für die unspezifische Bindung eine zehnfach schwächere Fluoreszenz zu beobachten. Trotz Dialyse können nie alle freien AntiTf\* aus der Nanopartikelsuspension abgetrennt werden, dennoch wurde ein noch geringerer Wert für die Fluoreszenz der Probe **PP1c'** erwartet. Als Vergleichsprobe wurde zu **PP1a'** Partikeln (nur mit unmodifizierter HS) direkt mit AntiTf\* markiert, wobei auch eine geringe Fluoreszenzintensität vergleichbar mit **PP1c'** mit 1 % Tf, erhalten wurde. Es scheint, als wäre eine Hintergrundfluoreszenz vorhanden, die sich zusammensetzt aus unspezifisch an den Nanopartikel angelagertem AntiTf\*, sowie einem kleinen Anteil an freiem AntiTf\*, welches durch Dialyse nicht abgetrennt werden konnte. Die Fluoreszenzintensität von **PP1c'** mit 10 % ist jedoch 4 Mal größer und weist auf unspezifisches Anbinden des Ad-Tf hin.

Die unspezifische Bindung von Transferrin an HS kann folglich nicht komplett ausgeschlossen werden. Aus den Daten ist zu schließen, dass bei **PP1c** mit 10% Tf >90 % des Ad-Tfs spezifisch an die HS gebunden ist. Bei **PP1c** mit 1 % ist der Anteil der unspezifischen Bindung bzw. der nicht vollständig abgetrennten AntiTf\* (**PP1c'**) vergleichsweise höher als bei 10 % Tf. Für spätere Zellexperimente wurde daher **PP1c** mit 10 % Tf gewählt.



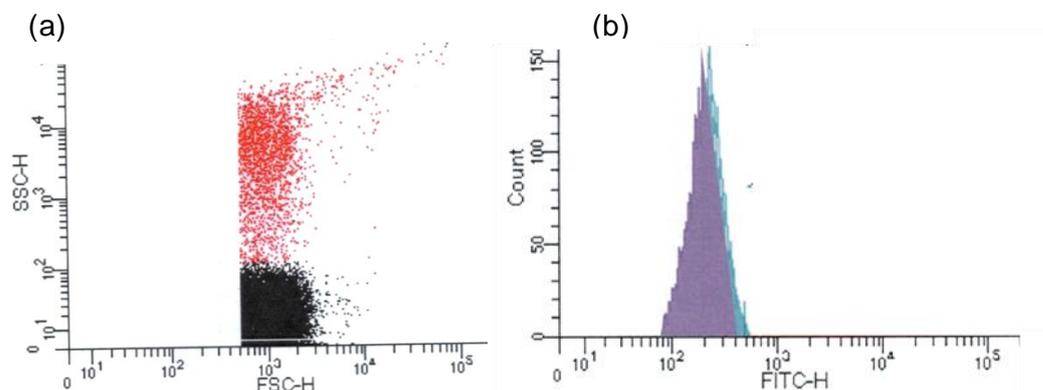
**Abb. 61:** Fluoreszenzintensität der Nanopartikel im Verlauf der Oberflächenmodifikation. Absorption: 395 nm, Emission 520 nm. **PP1:** Polyplex (PEI+DNA), **a:** mit CD-HS, **a':** mit unm. HS, **b** bzw. **b'** +Ad-Tf, **c** bzw. **c'** +AntiTf\*.

### 3.5.2 Durchflusszytometrische Analyse der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel

Die Durchflusszytometrie (auch FACS, engl. *fluorescence-activated cell sorting*) ist eine Technik, die dazu verwendet wird, physikalische und chemische Eigenschaften von einer Population von Zellen oder Partikeln zu bestimmen. Sie wird hauptsächlich zur Analyse von Zellen eingesetzt, welche einzeln einen Lichtstrahl passieren und je nach Größe, Form und Oberflächenstruktur der Zelle können Informationen über die Eigenschaften der Zelle erhalten werden.<sup>223</sup> Als Messgröße dient die Menge des gestreuten Lichts. Untersucht wird einerseits das Vorwärtsstreulicht (*FSC = Forward Scatter*), welches Rückschlüsse auf das Volumen der Zelle erlaubt, andererseits das Seitwärtsstreulicht (*SSC = Side Scatter*), welches von der Granularität und Struktur der Zelle abhängt.<sup>224</sup> Gleichzeitig mit dem gestreuten Licht können auch zuvor vorgenommene Fluoreszenzmarkierungen jeder einzelnen Zelle detektiert werden. Diese Möglichkeit macht die Methode attraktiv für die Analytik der fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln, da jeder Partikel einzeln auf seine Fluoreszenz untersucht wird und daraus Daten über die Gesamtheit der Partikel erhalten werden können. Die Durchflusszytometrie ist grundsätzlich eine Methode, die auch für (Nano-)Partikel verwendet werden kann, die Detektionsgrenze der Geräte liegt hierbei in der Regel bei einer Teilchengröße von 200-500 nm. Bei fluoreszierenden Partikeln ist die Empfindlichkeit deutlich höher. Auch extrazelluläre Vesikel (hauptsächlich 100–150 nm) wurden bereits durchflusszytometrisch gezählt und charakterisiert.<sup>225</sup> In wenigen Arbeiten wurde bisher die durchflusszytometrische Analyse von Nanopartikeln beschrieben.<sup>226</sup> Für zuverlässige Ergebnisse ist dabei die Konzentration der Nanopartikelsuspension ein wichtiger Faktor: bei einer zu geringen Konzentration ist die Abgrenzung der Partikel vom Hintergrund unmöglich, zu hohe Konzentration können dazu führen, dass sich mehrere Partikel gleichzeitig im Detektionsvolumen befinden und dadurch gleichzeitig vom Laser erfasst und dadurch als ein Partikel registriert werden (sogenannter Schwarmeffekt). Gleichermaßen beeinflusst die Flussrate die Ergebnisse: zu geringe Flussraten verhin-

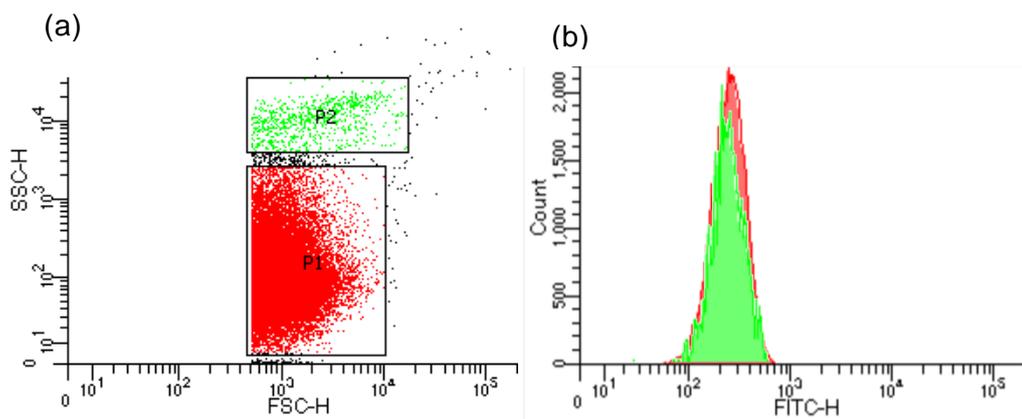
dern eine eindeutige Abgrenzung der Nanopartikel vom Hintergrund, zu hohe Flussraten führen wieder zum Schwarmeffekt im Detektionsvolumen. Das Auftreten des Schwarmeffekts äußert sich in Populationen (P) mit erhöhten SSC-Werten.<sup>226</sup>

Es wurden zunächst fluoreszierende Megamix-Plus SSC Beads zwischen 0.1 und 1  $\mu\text{M}$  analysiert, um eine Auftrennung des Geräts in diesem Bereich sicherzustellen (s. Anhang). Außerdem wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt, um die Partikelpopulationen vom Hintergrund abgrenzen zu können und die Hintergrundpopulation später ausblenden zu können. Vor der Analyse der fluoreszierenden Nanopartikel **PP1c** wurden ebenfalls die nicht fluoreszierenden Vorstufen **PP1** und **PP1a** analysiert. Es wurden hierzu Partikel mit einer DNA-Konzentration von 3.75  $\mu\text{g/mL}$  bei der langsamsten Flussrate (10-15  $\mu\text{L/min}$ ) analysiert. **PP1** und **PP1a** bilden jeweils eine Population, die sich deutlich vom Hintergrund abgrenzen lässt. Es waren keine Populationen bei erhöhtem SSC zu detektieren, der Schwarmeffekt kann daher ausgeschlossen werden. Die gewählte Konzentration in Kombination mit der niedrigen Flussrate wurde daher für diese und alle folgenden Messungen beibehalten. Für die Populationen von **PP1** und **PP1a** wurde ein sehr niedriges FITC-H (Fluoreszenz von Fluoresceinisothiocyanat) Signal beobachtet, d.h. die Nanopartikel zeigen praktisch keine Fluoreszenz (Abb. 62).



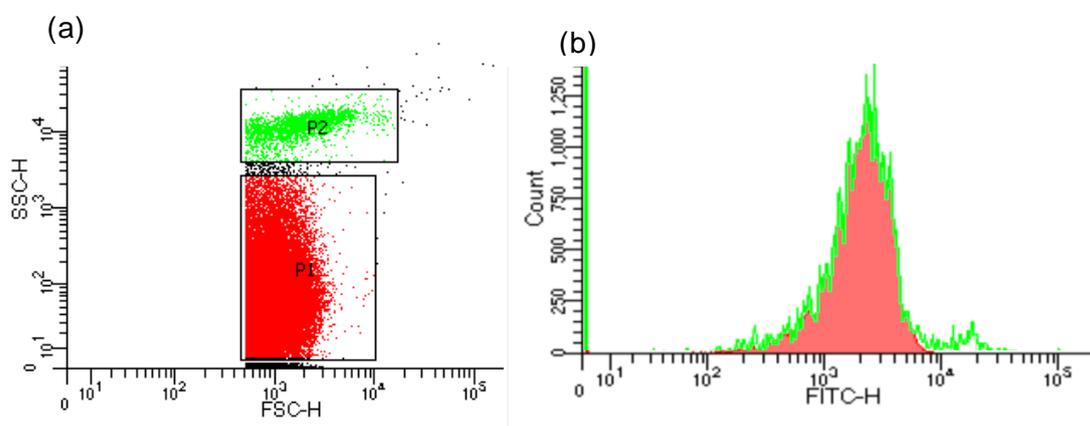
**Abb. 62:** (a) Cytogramm der Nanopartikel **PP1**, der Hintergrund ist schwarz eingefärbt; (b) Histogramm der Häufigkeitsverteilung der FITC-Intensität, blau: **PP1**, violett: **PP1a** (mit CD-HS).

Im Cytogramm SSC-H gegen FSC-H der Probe **PP1b** (mit Ad-Tf, Abb. 63) sind zwei Populationen zu beobachten: Eine größere Population P1 (98 % aller Events), sowie eine kleinere Population (2 %) bei höherem SSC-H. Das Auftreten des Schwarmeffektes ist unwahrscheinlich, da die Konzentration der Partikelsuspension **PP1c** identisch mit **PP1** und **PP1a** war. Bei der Analyse von Zellen wird bei einem erhöhten SSC-H auf eine höhere Granularität der Zellen rückgeschlossen, bedingt durch die stärkere Lichtbrechung. Übertragen auf Nanopartikel könnte die stärkere Lichtbrechung auf komplexere, möglicherweise diffusere Oberfläche der Nanopartikel hinweisen, sodass es sich bei Population P2 um Aggregate handeln könnte. Die Population P2 weist eine einheitlichere Oberflächenbeschaffenheit auf als P1 (schmalere SSC-H Verteilung) und erstreckt sich hin zu einem FSC-H von  $10^4$ . Die Partikel sind damit etwas größer als der Hauptteil der Population P1. Die durchschnittlichen FITC Intensitäten der beiden Populationen ist jeweils 241 und 270 für P1 und P2. Beide Intensitäten sind minimal, es handelt sich bei der detektierten Fluoreszenz um eine Autofluoreszenz der Partikel, wie sie auch im Platerader bei der Bestimmung der FITC-Intensität aufgetreten ist.



**Abb. 63:** (a) Cytogramm SSC-H gegen FSC-H der Probe PP1b. Es sind zwei Populationen zu beobachten: Eine größere Population P1 (98 % aller Events), sowie eine kleinere Population P2 (2 %) bei höherem SSC-H, vermutlich handelt es sich hierbei um Aggregate. (b) Histogramm der Häufigkeitsverteilung der FITC-H-Intensitäten.

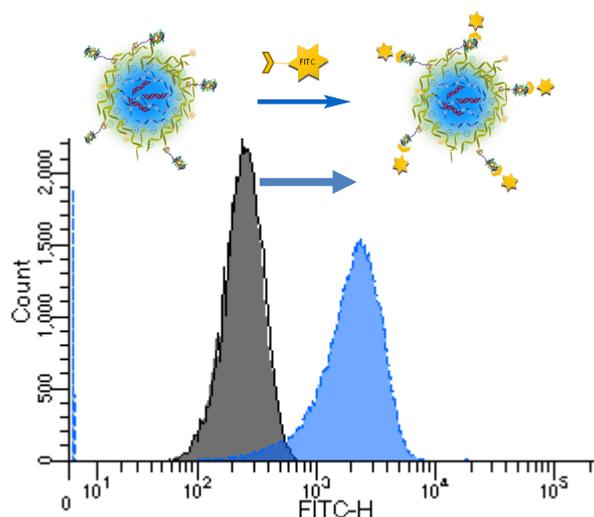
Das Cytogramm der Probe **PP1c** (Anti-Tf\*-markiert) sowie das zugehörige Histogramm der Häufigkeitsverteilung der FITC Intensitäten ist in Abb. 64 dargestellt. Es sind wieder zwei Populationen zu erkennen, einerseits die Hauptpopulation P1, sowie eine kleinere Population P2 der Aggregate. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Populationen sind 2100 und 4100 jeweils für P1 und P2, und sind damit um das 10 bzw. 20-fache höher als bei **PP1b**. Die doppelt so hohe Fluoreszenzintensität der Population P2 im Vergleich zur Population P1 unterstreicht die Annahme, dass es sich bei den Partikeln um Aggregate handelt. Durch die Aggregation mehrerer kleinerer Partikel entstehen etwas größere Partikel, an denen mehr AntiTf\* gebunden ist im Vergleich zu den Primärpartikeln.



**Abb. 64:** (a) Cytogramm SSC-H gegen FSC-H der fluoreszierenden Probe **PP1c**. Es sind wieder beide Populationen zu beobachten: Eine größere Population P1 (94 % aller Events), sowie eine kleinere Population P2 (2 %), bei der es sich vermutlich um Aggregate handelt. Das Histogramm (b) gibt die Intensitätsverteilung der Fluoreszenz an.

Durch Dialyse der Nanopartikel wurde zuvor freies AntiTf\* größtenteils abgetrennt, dennoch können sich einzelne freie AntiTf\* in der Nanopartikelsuspension befinden. Um sicherzustellen, dass es sich bei den detektierten fluoreszierenden Teilchen nicht um AntiTf\* handelt, wurde AntiTf\* selbst als Kontrolle ebenfalls analysiert (s. Anhang). Einzelne fluoreszierende Teilchen konnten detektiert werden, sie liegen von ihrer Größe her jedoch unter der Detektionsgrenze des FACS-Gerätes und im Bereich, der zuvor als Hin-

tergrund definiert wurde. Sie werden nicht im definierten Bereich der Populationen von P1 und P2 angezeigt. Demnach muss es sich bei den fluoreszierenden Partikeln in den Populationen P1 und P2 um oberflächenfunktionalisierte Nanopartikel handeln, an die AntiTf\* angebunden hat. Die nahezu unveränderte Lage und Form der Populationen P1 und P2 im Vergleich von Probe **PP1b** und **PP1c** bestätigen dies ebenfalls. Ein Vergleich der Histogramme über die Fluoreszenzintensitätsverteilung der Hauptpopulationen der Partikel **PP1b** und **PP1c** ist in Abb. 65 gezeigt.



**Abb. 65:** Vergleich FITC Intensität in grau: ungefärbte Probe (**PP1b**, größere Population P1) mit geringer Fluoreszenz, in blau: gefärbte Probe (**PP1c**) mit durchschnittlich 10-facher Fluoreszenzintensität.

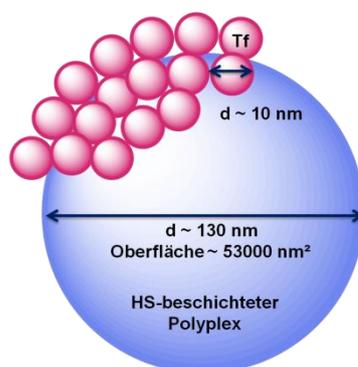
Durch die FACS Analyse der Nanopartikel konnten einerseits die Partikel **PP1**, **PP1a** und **PP1b** als nicht fluoreszierende, einzelne Partikel nachgewiesen werden. Es wurden für **PP1b** mit Ad-Tf zwei Populationen detektiert, eine Hauptpopulation der einzelnen Partikel, sowie eine kleine Population von Aggregaten. Nach Fluoreszenzmarkierung der Partikel wurde ein analoges Cytogramm der Partikel **PP1c** erhalten, wo erneut beide Populationen in gleicher Form und Intensität zu sehen waren, jedoch nun mit 10 bis 20-facher Fluoreszenzintensität im Vergleich zur vorherigen Autofluoreszenz der Partikel **PP1b**.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch schrittweise Herstellung Partikel mit definierten Schichten und funktionalisierten Oberflächen erhalten werden können. Die Umhüllung der PEI-Polyplexe mit anionischer HS resultierte in einem erhöhten hydrodynamischen Radius sowie in einer Verringerung des Zetapotentials. Das spezifische Anbinden von Ad-Tf an die CD der CD-HS wurde ebenfalls über DLS und Zetapotential, sowie spektroskopisch über Markierung des Ad-Tf mit fluoreszierendem AntiTf\* nachgewiesen.

Die FACS-Analyse gibt weiterhin Aufschluss über die Konzentration der Nanopartikel-suspension. Die Anzahl an Nanopartikeln pro mL Suspension ist interessant zur Berechnung der Anzahl an Nanopartikeln, die beim Transfektionsexperiment auf eine Zelle treffen. Dafür wurden die Partikel der Nanopartikelsuspension in der FACS Analyse über einen definierten Zeitraum (30 Sekunden) gezählt. Bei der langsamsten Flussrate (laut Hersteller 10 – 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) wurden durchschnittlich 32364 Events aufgenommen. Die Partikelkonzentration liegt damit zwischen 4315 und 6472 Partikeln pro  $\mu\text{L}$ , also um 5 Mio. Partikel/mL. Beim Transfektionsexperiment wurden je 10  $\mu\text{L}$  einer vergleichbaren Sus-

pension (also 50 000 Partikel) auf ein Well einer 96 Well Platte mit 20 000 Zellen gegeben, sodass im Durchschnitt 2.5 Partikel pro Zelle zugegeben werden.

Des Weiteren kann über die Partikelkonzentration und die Menge an eingesetztem Transferrin abgeschätzt werden, wie viele Transferrinmoleküle sich theoretisch auf der Oberfläche eines Nanopartikels befinden könnten. In 10  $\mu\text{L}$  einer Nanopartikelsuspension befinden sich 50 000 Partikel, und bei der Herstellung wurden 6  $\mu\text{g}$  Ad-Tf eingesetzt (entspricht  $7.5 \cdot 10^{-11}$  mol Ad-Tf), die sich nun auf die Anzahl der Partikel verteilen. Im Idealfall könnten sich theoretisch bis zu  $1.5 \cdot 10^{15}$  mol Tf auf der Oberfläche eines Partikels befinden, wobei die effektive Oberflächenbelegung vermutlich um ein Vielfaches geringer ist, da aufgrund des sterischen Anspruchs des Transferrins die Oberfläche des Partikels schnell vollständig belegt ist, und alle nicht-angebundenen Ad-Tf über Dialyse entfernt wurden. Die tatsächliche maximal mögliche Belegung der Partikeloberfläche durch Transferrin lässt sich jedoch recht einfach anhand geometrischer Überlegungen bestimmen (Abb. 66). In der Annahme, es handele sich bei einem HS-beschichteten Nanopartikel um eine ideale Kugel mit dem hydrodynamischen Durchmesser 130 nm ergibt sich eine Oberfläche von etwa 53 000  $\text{nm}^2$ . Ein Transferrinmolekül hat in etwa einen hydrodynamischen Durchmesser um 10 nm, in der Annahme, dass es sich hierbei ebenfalls um eine ideale Kugel handelt, belegt ein Tf etwa eine Fläche von 80  $\text{nm}^2$ . Demnach könnten etwa maximal 660 Tf-Moleküle an der Partikeloberfläche anbinden, bis diese vollständig belegt ist. Es handelt sich hierbei um eine stark vereinfachte Betrachtung, es ist zu beachten, dass sowohl die Polyplexe als auch Transferrin keine idealen Kugeln darstellen. Es wurde bereits gezeigt, dass die hydrodynamischen Durchmesser größer sind als die mittels TEM bestimmten Durchmesser. Andererseits haben gerade die mit HS beschichteten Nanopartikel eine recht diffuse Oberfläche, die deutlich größer sein kann als vermutet. Unberücksichtigt blieb bei dieser Betrachtung auch der TEG-Spacer, über den die Adamantangruppe an das Protein geknüpft ist und der einen größeren Abstand zwischen der Partikeloberfläche (Ad-CD-Komplex) und Transferrin bedingt.



**Abb. 66:** Geometrische Betrachtung zur Abschätzung der theoretisch maximal möglichen Belegung der Partikeloberfläche durch adamantyliertes Transferrin.

Eine weitere Information, die aus den durchflusszytometrischen Daten erhalten werden kann, ist der Gehalt an Plasmid pro Nanopartikel. In 400  $\mu\text{L}$  der Lösung waren insgesamt 1.5  $\mu\text{g}$  DNA enthalten, also 3.75  $\text{ng DNA}/\mu\text{L}$ , d.h. 20  $\text{ng}$  in allen 32364 Partikeln. In der Annahme, dass alle Partikel die gleiche Größe haben und die DNA exakt auf alle Partikel verteilt ist, befinden sich in jedem Nanopartikel durchschnittlich 620  $\text{pg DNA}$ . Mit einer Plasmidgröße von etwa 6  $\text{kbp}$  und einer durchschnittlichen Masse von 660  $\text{g/mol bp}$  befinden sich in jedem Partikel etwa 96 000 Plasmide.

In der Literatur finden sich nur begrenzt Informationen über den Nukleinsäuregehalt in Nanopartikeln.<sup>227</sup> In einem Ansatz von Ho *et al.*<sup>228</sup> wurde die DNA mit Quantum Dots gelabelt und die Chitosan-DNA-Nanopartikel via TEM Aufnahmen untersucht. Die Anzahl an QD pro Polyplex konnte anhand des Verhältnisses des Fluoreszenzsignals eines einzelnen Polyplexes zu einem einzelnen QD ermittelt werden, sowie durch Auszählen der QD in einer TEM-Aufnahme des Polyplexes. Es wurden etwa 30 Plasmide pro Partikel detektiert. Die Methode ist jedoch limitiert und eignet sich nur für Partikel mit geringer Anzahl an Plasmiden, da sonst die QDs überlagern und nicht mehr ausgezählt werden können.

Mittels einer weiteren Methode, der Nanoparticle Trafficking Analyse, wurde für PEI Nanopartikel ein DNA Gehalt von etwa 100 Plasmiden pro Nanopartikel (~ 100 nm) bestimmt. Zur Herstellung der Partikel wurde DNA in einer Konzentration von 60 µg/mL mit PEI (N/P 14) und 150 mM NaCl-Lösung verwendet. Die Gesamtmenge an DNA wurde durch die Anzahl der detektierten Partikel dividiert.<sup>227</sup>

In einem letzten Ansatz von Collins *et al.*<sup>229</sup> wurden Peptid-DNA-Komplexe in einer Flow Particle Image Analyse untersucht. Bei dieser Methode kann die Partikelgröße sowie die Anzahl der Partikel mikroskopisch bestimmt werden, sie ist allerdings nur geeignet für Partikel ab 1 µm Durchmesser. Für Partikel dieser Größe wurden etwa 70 000 Plasmide (6.0 kbp) pro Partikel bestimmt. Die Konzentration der DNA war dabei 10 µg/mL und die Partikel wurden in PBS hergestellt.<sup>229</sup> Diese Anzahl liegt in etwa in der Größenordnung, wie sie in dieser Arbeit via FACS-Analyse bestimmt wurde bei Verwendung von DNA in einer Konzentration von etwa 50 µg/mL in Wasser. Die Partikel von Collins *et al.*<sup>229</sup> sind zwar etwa 10 Mal größer, jedoch unter anderem auch aufgrund der hohen Ionenstärke des PBS (ca. 150 mM), was zu weniger dichten und damit größeren, diffuseren Partikeln führt. Die Ergebnisse stimmen dennoch gut überein, möglicherweise auch, da die Flow Particle Image Analyse der FACS Analyse recht ähnlich ist.

Viren, die etwa die gleiche Größe wie Nanopartikel haben, enthalten normalerweise eine bis zwei Kopien ihres Genoms, und erreichen damit maximale Transfektionseffizienzen. Synthetische Nanopartikel, die zwischen 30 und 100, je nach Partikel und Bestimmungsmethode bis zu 70 000 bzw. in diesem Fall knapp 100 000 Plasmide pro Partikel enthalten, sind entsprechend auch um das 100 bis 100 000-fache weniger effiziente Transfektionsvektoren als natürliche Viren.<sup>227</sup>

### 3.5.3 Gentransfektion mit targetfunktionalisierten Nanopartikeln

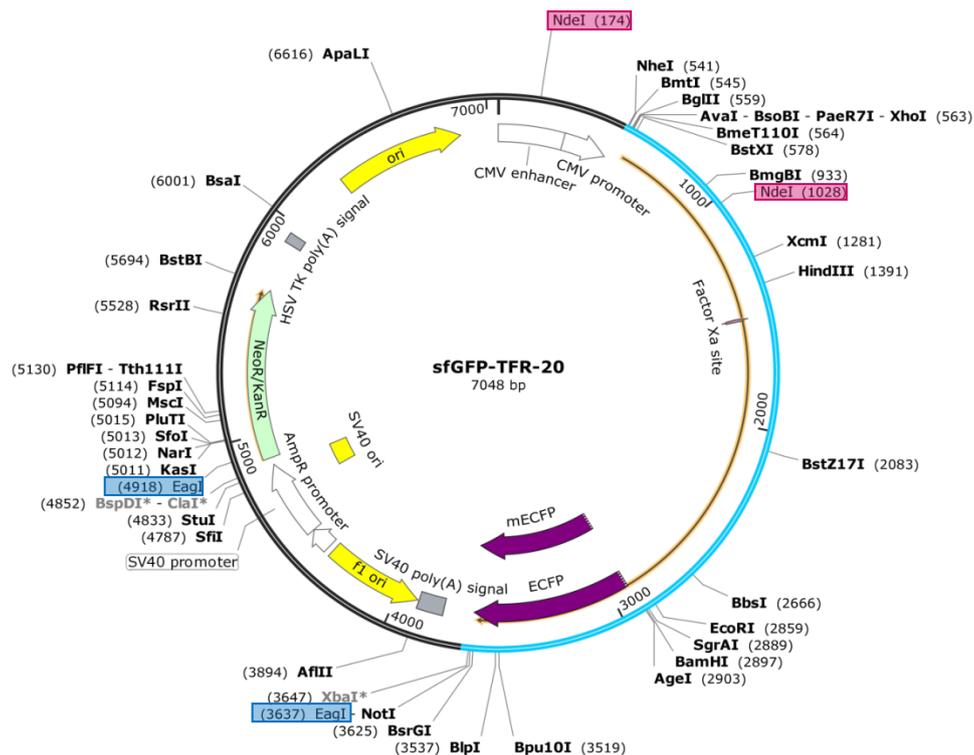
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Tf-markierten Nanopartikel über targetvermittelte Endocytose besser aufgenommen werden können, als die nicht modifizierten Nanopartikel. Alle Zelllinien exprimieren den Transferrinrezeptor 1 (TfR), so auch die HEK293T.<sup>230</sup> In vielen malignen Zelllinien, z.B. HDLM-2, HEL, T-47 D, BEWO oder auch CACO2, wird der TfR überexprimiert.<sup>231</sup>

Da der Vergleich der Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Zelllinien umstritten ist, sollen die Experimente zur Evaluierung der Transfektionseffizienz der targetfunktionalisierten Nanopartikel an HEK293T Zellen erfolgen. Auch wurden die ersten Transfektionsexperimente sowie die Toxizitätsbestimmungen bereits an dieser Zelllinie durchgeführt, sodass die optimalen Bedingungen für die Zelllinie bereits bekannt waren.

Es wurden zwei Ansätze verfolgt: Im ersten Experiment sollte der Transferrinrezeptor auf HEK293T Zellen überexprimiert werden. Auf diese Weise sollte die Transfektionseffizienz der gleichen funktionalisierten Nanopartikel an TfR überexprimierenden (TfR+++)  
HEK293T Zellen im Vergleich zu nicht modifizierten Zellen untersucht werden. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass speziell die Aufnahme der Nanopartikel untersucht werden kann.

In einem zweiten Experiment sollte ein kompetitiver Assay durchgeführt werden, wobei die von Natur aus vorhandenen Transferrinrezeptoren der HEK293T Zellen bei der Hälfte der Ansätze durch den Zusatz von freiem Transferrin abgesättigt werden sollen und somit die Aufnahme der Tf-modifizierten Nanopartikel verglichen werden kann mit freien und abgesättigten Transferrinrezeptoren.

Die Überexpression des TfR an HEK293T Zellen soll über eine Transfektion mit entsprechender pDNA (sfGFP-TFR-20) erfolgen. Dieses Plasmid codiert für die Überexpression des TfR, enthält jedoch auch ein Fusionsprotein (GFP), welches später als Kontrolle für den Erfolg der Expression des Plasmids in den Zellen dient. Bei Fusionsproteinen werden beide Gene zusammen nacheinander abgelesen. Dabei liegen idealerweise wie in diesem Fall die TfR+++-Gene *N*-terminal am 5'-Ende des Gens, und die Gene für GFP C-terminal am 3'-Ende. Durch diese Reihenfolge wird sichergestellt, dass beim Ablesen des Plasmids in 5'3'-Richtung zunächst der TfR+++-Teil und anschließend der GFP-Teil abgelesen wird. Wenn GFP exprimiert wird, wurde die gesamte Sequenz vorher ebenfalls sicher exprimiert. Der Transferrinrezeptor wäre anderenfalls nur über fluoreszenzmarkiertes Anti-TfR beispielsweise in einer FACS-Analyse nachzuweisen, was jedoch mit deutlich mehr Kosten und Aufwand verbunden wäre. Die Plasmidkarte des sfGFP-TFR-20 ist in Abb. 67 dargestellt.



**Abb. 67:** Plasmidkarte des sfGFP-TFR-20. In hellblau markiert ist der Teil des Inserts, der für TfR+++ und GFP codiert. Außerdem wurden die Schnittstellen von ausgewählten Restriktionsendonucleasen eingezeichnet.

Das Plasmid wurde als Bakterienstock erhalten. Es wurde zunächst in *E. coli* Bakterien vermehrt. Nach Isolation des Plasmids wurde die Konzentration und Reinheit über UV-Vis-Messung bestimmt. Zur Kontrolle der isolierten pDNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Da die genaue Größe von zirkulärer Plasmid-DNA nur ungefähr abgeschätzt werden kann, wurde außerdem eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Durch die Behandlung des Plasmids mit ausgewählten Restriktionsendonucleasen, welche definierte Abfolgen von Basen erkennen und schneiden das Plasmid an diesen Stellen. Dadurch entstehen Fragmente von charakteristischer Größe, die mittels Gelelektrophorese bestimmt werden können und anhand derer die Identität des Plasmids nachgewiesen werden kann. In diesem Fall wurden die Restriktionsenzyme Nde1 und Eag1 gewählt. Es wurde jeweils ein Verdau mit jeweils einem der Proteine einzeln durchgeführt, sowie ein simultaner Verdau mit beiden Enzymen, um die Identität des Plasmids zu beweisen.

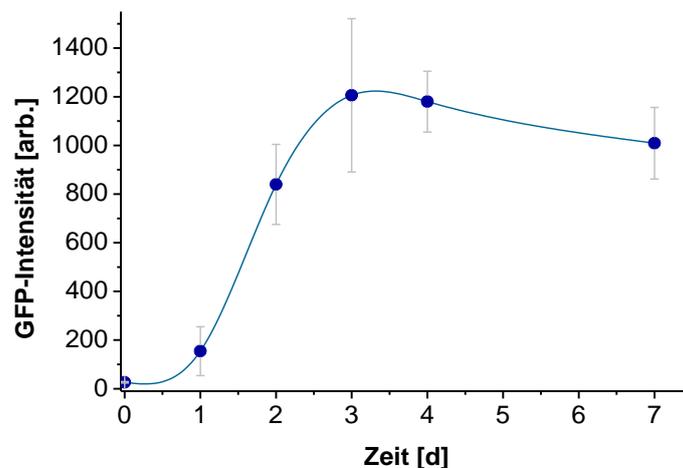
Im nächsten Schritt erfolgte nun die Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem isolierten Plasmid. Um möglichst maximale Transfektionseffizienzen zu erzielen wurde für diesen Transfektionsschritt auf das kommerzielle Transfektionsreagenz JetPrime zurückgegriffen. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben mit dem isolierten Plasmid transfiziert. Bei dieser Transfektion handelt es sich um eine transiente Transfektion, d.h. das Protein wird nicht dauerhaft exprimiert, sondern nur über einen kurzen Zeitraum (wenige Tage).<sup>232</sup>

Eine Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop ermöglicht bereits eine erste Kontrolle über den Erfolg der Transfektion. Während nach 8 h noch keine Fluoreszenz

sichtbar war, konnte nach 18 h ist jedoch eine deutliche Fluoreszenz der einzelnen Zellen beobachtet werden. Bei zehnfacher Vergrößerung war deutlich die fluoreszierende Zellmembran zu sehen.

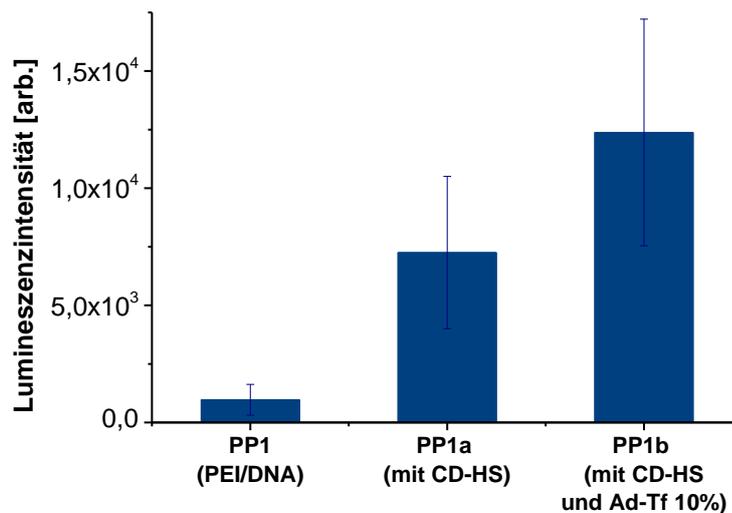
Um den Zeitraum zu bestimmen, über den das Protein TfR an der Zelloberfläche exprimiert wird, und damit das optimale Zeitfenster für die zweite Transfektion mit den Tf-modifizierten Nanopartikeln, wurde die Fluoreszenzintensität des Zelllysates von  $2 \cdot 10^4$  Zellen über 7 Tage bestimmt. Solange TfR auf der Oberfläche exprimiert werden, ist eine hohe Fluoreszenzintensität zu erwarten, wenn die Expression schwächer wird, nimmt auch das GFP Signal ab. Zur Lyse der Zellen wurde in diesem Fall Triton X-100 verwendet, ein nicht ionisches Detergenz, welches besonders mild ist und im Gegensatz zu ionischen Detergentien wie z.B. SDS Proteine nicht denaturiert.

Die GFP-Intensität des Zelllysates über 7 Tage ist in Abb. 68 dargestellt. Nach 24 h wird nur eine geringe Fluoreszenzintensität erreicht, die jedoch ansteigt, bis am 3. Tag nach der Transfektion ein Maximum in der GFP-Fluoreszenzintensität erreicht ist. Ab Tag 4 nimmt die Fluoreszenzintensität langsam wieder ab. Der optimale Zeitpunkt für das Transfektionsexperiment mit den Nanopartikeln ist daher drei Tage nach der ersten Transfektion. Die Transfektionseffizienz wurde abgeschätzt durch Auszählen der fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl in der Neubauer Zählkammer und beträgt etwa 70 % am 3. Tag nach Transfektion in einer 6 Well Platte nach Herstellerangaben.



**Abb. 68:** Fluoreszenzintensität des Zelllysates von  $2 \cdot 10^4$  Zellen, Anregungswellenlänge: 480 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm. Die GFP-Intensität ist proportional zur Anzahl an exprimierten TfR auf der Zelloberfläche.

Zwei Tage nach Transfektion der Zellen mit dem Plasmid sfGFP-TFR20 zur Überexpression des TfR wurden die Zellen bereits in 96 Wellplatten ausgesät und nochmal 24 h inkubiert, damit die Zellen zur zweiten Transfektion bereits regeneriert und angewachsen sind. Die Zellen wurden jeweils mit PEI-DNA-Nanopartikeln **PP1**, den Hyaluronsäure-modifizierten Nanopartikeln **PP1a**, sowie den Tf-modifizierten Nanopartikeln **PP1b** behandelt. Als pDNA wurde pGL4.32 DNA (Luciferase) verwendet. Das Auslesen des Assays erfolgte wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Das Ergebnis des Assays ist in Abb. 69 dargestellt.



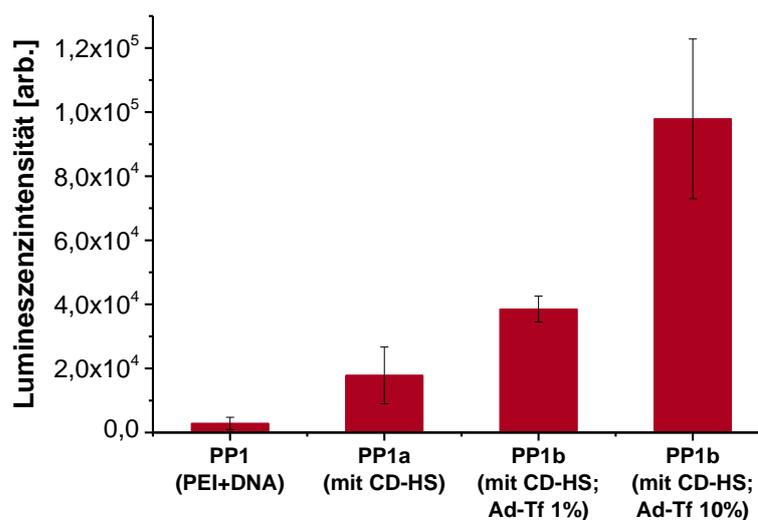
**Abb. 69:** Vergleich der Transfektionseffizienz der Polyplexe **PP1**, **PP1a** und **PP1b** an TfR+++ modifizierten HEK293T-Zellen.

Mit PEI-DNA Polyplexen **PP1** ist die geringste Transfektionseffizienz zu beobachten. Bereits durch Beschichtung der Nanopartikel mit Hyaluronsäure ist eine siebenfache Zunahme der Transfektionseffizienz zu beobachten. Anfänglich wäre bei den HS-beschichteten Partikeln eher mit einer Abnahme der Transfektionseffizienz zu rechnen gewesen, da durch den Ladungsumkehr der Partikeloberfläche von positiv für **PP1** zu negativ für **PP1a** die negativ geladenen Partikeln nicht mehr mit der ebenfalls anionischen Zellmembran interagieren sollten, und daher eine schlechtere Aufnahme der anionischen Partikel erwartet wurde. Die beobachtete Zunahme der Transfektionseffizienz könnte möglicherweise zurückzuführen sein auf die besonders zellschonenden und biokompatiblen Eigenschaften der Hyaluronsäure. Grundsätzlich sind die PEI-DNA Partikel **PP1** in der eingesetzten Konzentration nicht akut toxisch, dennoch kann PEI Zellstress induzieren, beispielsweise eine poröse Zellmembran hervorrufen. Dieser Zellstress tritt nicht auf, wenn die Partikel bereits mit Hyaluronsäure ummantelt sind, sodass die Zunahme der Lumineszenzintensität möglicherweise keine direkte Zunahme der Transfektionseffizienz darstellt, sondern eine erhöhte Zellaktivität. Dennoch beobachteten auch Ito *et al.*<sup>213</sup> eine verbesserte Transfektionseffizienz von anionischen, HS-beschichteten PEI-Polyplexen im Vergleich zu kationischen PEI-Polyplexen. Die sechsfach höhere Transfektionsrate wurde dabei auf die geringeren Wechselwirkungen mit biologischen Molekülen und der höheren Suspensionsstabilität der Partikel attribuiert. Ferner wurde beobachtet, dass HS an CD44 Rezeptoren binden kann, welche besonders auf Krebszelllinien stark exprimiert sind, und die Aufnahme HS-beschichteter Partikel daher in CD44-positiven Zellen verbessert sein kann. Diese Rezeptoren sind jedoch auf HEK293T Zellen quasi nicht vorhanden (5 TPM),<sup>233</sup> sodass dieser Effekt hier nicht auftritt.

Die Targetfunktionalisierung der Nanopartikel mit Transferrin (**PP1b**) resultiert in einer knappen Verdopplung der Lumineszenzintensität im Vergleich mit **PP1a**, wahrscheinlich aufgrund der besseren Internalisierung der **PP1b** Partikel über die rezeptorvermittelte Endocytose. Bei **PP1b** ist eine im Vergleich zu **PP1** 13-fach höhere Transfektionseffizienz zu beobachten.

Insgesamt war jedoch zu beobachten, dass die Transfektionseffizienz der **PP1**-Partikel an den modifizierten Zellen bereits deutlich schwächer war, als in nicht modifizierten Zellen. Es ist anzunehmen, dass die Zellen durch die vorangegangene Transfektion zur Expression des TfR bereits gestresst waren. Das erneute Aussähen der Zellen 2 Tage nach der ersten Transfektion und ein Tag vor der zweiten Transfektion bedeutete zusätzlichen Stress, sodass die Zellen offenbar noch nicht vollständig regeneriert waren und noch nicht für die nächste Transfektion bereit.

Aus diesem Grund wurde das Experiment an den nicht modifizierten HEK293T-Zellen wiederholt, die den TfR zwar nicht überexprimieren, ihn aber dennoch exprimieren (74.5 TPM).<sup>233</sup> Das Ergebnis des Transfektionsexperiments ist in Abb. 70 dargestellt. Generell sind unter gleichen Bedingungen zehnfach höhere Lumineszenzintensitäten zu beobachten. Auch hier ist bereits eine Vervielfachung der Transfektionseffizienz der HS-beschichteten Nanopartikel **PP1a** im Vergleich zu den nicht beschichteten Polyplexen **PP1** zu beobachten. (Durch einen zusätzlichen Titrationsversuch wurde gezeigt, dass die Transfektionseffizienz der **PP1a** Partikel zwischen 0 und 100% CD-HS linear ansteigt.) Die Transfektionseffizienz konnte durch Oberflächenfunktionalisierung mit 1% adamantyliertem Transferrin bezogen auf die Gesamtmol CD der CD-HS im Vergleich zu **PP1a** verdoppelt werden. Eine höhere Belegung der CD auf der Oberfläche des Partikels mit 10% Ad-Tf resultierte in einer Erhöhung der Transfektionseffizienz um das 34-fache im Vergleich zu den klassischen PEI-DNA-Polyplexen **PP1**.



**Abb. 70:** Vergleich der Transfektionseffizienz der Polyplexe **PP1**, **PP1a** und **PP1b** mit jeweils 1 und 10% adamantyliertem Transferrin an der Oberfläche bezogen auf die Gesamtmol CD der HS.

In der Literatur wurde für ähnliche Systeme ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Transfektionseffizienz beobachtet. Kircheis *et al.*, die PEI/DNA-Partikel beschrieben, wobei Transferrin kovalent an PEI angebunden wurde, fanden heraus, dass die Transfektionseffizienz durch Modifikation der Partikel mit Transferrin an K562-Zellen um das bis zu 100-fache gesteigert werden konnte (molares Verhältnis von Tf zu PEI war hierbei 8 zu 1).<sup>118</sup> Bei K562-Zellen handelt es sich jedoch um eine Leukämie-Zelllinie, bei der der TfR um das 3-4 fache stärker exprimiert wird (252 TPM) als bei HEK293T-Zellen.<sup>233</sup>

Davis *et al.* verwendeten zur Komplexierung der Nukleinsäuren ein CD-haltiges Polymer. Durch Bildung einer Einschlussverbindung von über einen PEG-Spacer adamanty-

liertem Transferrin mit den CD des Polymers wurde eine Oberflächenmodifikation erhalten. Durch die Modifikation der Partikel mit mit 0.05 % Transferrin im Bezug auf die Mol CD des Polymers wurde eine Vervierfachung der Transfektionseffizienz an K562-Zellen (Leukämie-Zelllinie) beobachtet.<sup>220</sup>

Die signifikante Erhöhung der Transfektionseffizienz wird auf die verbesserte Aufnahme der funktionalisierten Nanopartikel mittels transferrinrezeptor-vermittelter Endocytose attribuiert. Es ist daher zu erwarten, dass der Unterschied zwischen den PEI-DNA-Partikeln **PP1** sowie den Tf-modifizierten Partikeln **PP1b** noch stärker ausgeprägt ist, wenn der Versuch an Zellen durchgeführt würde, die den TfR überexprimieren.

#### 3.5.4 Kompetitive Bindungsstudie der Tf-modifizierten Nanopartikel

Nachdem gezeigt wurde, dass die Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel in einer Erhöhung der Transfektionseffizienz resultiert, sollte abschließend gezeigt werden, dass die erhöhte Transfektionseffizienz der Tf-funktionalisierten Nanopartikel durch verbesserte Aufnahme der Partikel mittels TfR-vermittelter Endocytose bedingt ist. Die eingesetzten Nanopartikel **PP1**, **PP1a** und **PP1b** (mit PEI) sowie **PP2**, **PP2a** und **PP2b** (mit Polyrotaxan) sind nicht identisch, sondern unterscheiden sich in ihrer Oberflächenbeschaffenheit, in ihrer Ladung und in ihrer Größe. Nebeneffekte wie die größere Biokompatibilität durch Transferrin an der Oberfläche könnten die Transfektionseffizienz insgesamt verbessern, und auch die Adsorption von Serumproteinen an Nanopartikel kann einen Einfluss auf den Transport und die Aufnahme haben.

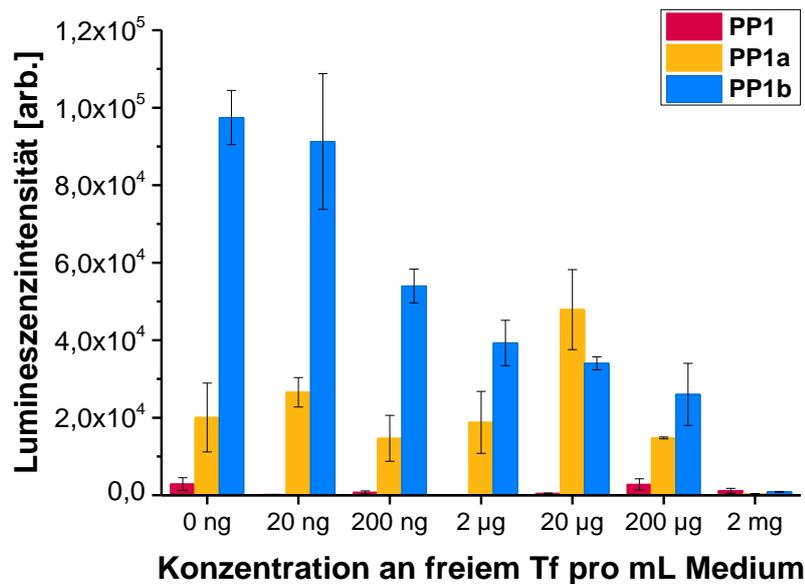
Um zu zeigen, dass die verbesserte Aufnahme der Tf-modifizierten Partikel hauptsächlich auf die verbesserte Aufnahme über den TfR zurückzuführen ist, wurde ein kompetitiver Bindungsassay in Anlehnung an Kircheis *et al.*<sup>118</sup> und Zhang *et al.*<sup>234</sup> durchgeführt. Hierbei soll untersucht werden, wie sich die Transfektionseffizienz der Tf-modifizierten Nanopartikel ändert, wenn die TfR durch freies (Holo)Transferrin abgesättigt werden. Als Kontrolle dienen die gleichen Zellen, die nicht mit freiem Transferrin behandelt wurden. Durch das Absättigen der TfR mit freiem Tf müsste die targetvermittelte Endocytose zur Aufnahme der Nanopartikel geschwächt sein, im Idealfall wäre die Transfektionseffizienz vergleichbar mit der der nicht modifizierten Nanopartikel. Dieses Experiment soll als Beweis dienen, dass die erhöhte Transfektionseffizienz auf der verbesserten Aufnahme der Nanopartikel mittels rezeptorvermittelter Endocytose basiert.

Kircheis *et al.*<sup>118</sup> und Zhang *et al.*<sup>234</sup> wählten jeweils eine Konzentration von 5 mg/mL Transferrin zur Blockierung der TfR. Um andere Effekte auszuschließen (z.B. Übersättigung der Zellen mit Transferrin bzw. Eisen) wurde in dieser Arbeit eine Titration durchgeführt, da hierbei besonders gut eine sukzessive Abnahme der Transfektionseffizienz bei Zunahme der Transferrinkonzentration im Medium, damit einer zunehmenden Absättigung der Transferrinrezeptoren auf der Zelloberfläche, beobachtet werden kann. Es wurde dabei ein logarithmischer Bereich gewählt von 20 ng bis 2 mg/mL Transferrin im Medium. Die Transferrinkonzentration im Zellkulturmedium wurde unmittelbar vor der Zugabe der Nanopartikel eingestellt. Das Ergebnis des Experiments ist in Abb. 71 dargestellt. Zu sehen ist einerseits bei der Kontrolle ohne zugesetztes Transferrin im Medium, dass sowohl durch die HS-Beschichtung, als auch durch die Tf-Modifikation einen signifikanter Anstieg der Transfektionseffizienz bewirkt. Die Transfektionseffizienz der PEI-DNA Partikel **PP1** ändert sich bei steigender Tf-Konzentration im Medium nicht. Andererseits ist zu beobachten, dass die Transfektionseffizienz zwar bei einer Konzentration von 20 ng/mL Tf im Medium noch nicht signifikant verringert ist, jedoch bei steigender Tf-Konzentration abnimmt, bis sie bei einer Konzentration von 2 mg/mL der Transfektionseffizienz der nicht-modifizierten Nanopartikel **PP1** entspricht. Die freien Tf-Moleküle konkurrieren mit

den an die Nanopartikel gebundenen Tf um freie Transferrinrezeptoren an der Zelloberfläche. Daher unterstützt die Abnahme der Transfektionseffizienz der Tf-modifizierten Partikel **PP1b** bei zunehmender Tf-Konzentration im Medium die Arbeitshypothese der transferrinrezeptorvermittelten Aufnahme der Tf-modifizierten Partikel. Das gleiche Ergebnis wurde von Kircheis *et al.*<sup>118</sup> und Zhang *et al.*<sup>234</sup> beobachtet im Vergleich Tf-modifizierter Partikel mit einer Tf-Konzentration von 0 und 5 mg/mL im Medium.

Im Volumen der Nanopartikelsuspension der Tf-modifizierten Partikel **PP1b**, welches in ein Well (finales Volumen: 100  $\mu$ L) zugegeben wurde, können sich theoretisch maximal 6  $\mu$ g Ad-Tf befinden. Da immer ein Gleichgewicht besteht zwischen CD-gebundenem Ad-Tf und freiem Tf ist davon auszugehen, dass der finale Gehalt an Ad-Tf auf den Partikeln nach der Dialyse deutlich geringer ist (abzüglich des Ad-Tf, welches nicht angebinden wurde und bei der Dialyse aus der Nanopartikelsuspension entfernt wurde). Zusätzlich können sich jedoch immer noch wenige freie Ad-Tf in Lösung befinden. Theoretisch wäre erst ein Einfluss des freien, dem Medium zugesetzten Transferrins ab etwa 6 – 60  $\mu$ g/mL erwartet gewesen, dem Konzentrationsbereich, in dem Ad-Tf im Zellmedium final vorliegen könnte. Es war jedoch festzustellen, dass die Aufnahme der Nanopartikel bereits ab einer Konzentration von 200 ng/mL zugesetztem Transferrin beeinträchtigt war, durch Konkurrenz des freien Tf mit Ad-Tf auf der Nanopartikeloberfläche um freie Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der um ein vielfaches kleinere hydrodynamische Durchmesser des freien Transferrins sein im Vergleich zum Nanopartikel sein, der dazu führt, dass Transferrin viel schneller diffundiert und daher bevorzugt an Tf-Rezeptoren anbindet. Weiterhin sind jeweils viele Ad-Tf an einen Nanopartikel gebunden, sodass die finale Konzentration an freien Transferrin-„Teilchen“ höher ist als die der Nanopartikel. Daher könnte das zugesetzte Transferrin bevorzugt an Tf-Rezeptoren anbinden und die Aufnahme der Tf-modifizierten Nanopartikel bereits bei niedrigen Konzentrationen behindern.

Interessant ebenfalls der Verlauf der Transfektionseffizienz der HS-beschichteten Nanopartikel **PP1a**. Während sich die Transfektionseffizienz bis zu 2  $\mu$ g/mL Tf im Medium etwa vergleichbar ist mit 0  $\mu$ g/mL Tf, ist bei einer Konzentration von 20 mg/mL ein leichter Anstieg zu beobachten. Bei 200  $\mu$ g/mL Tf ist die Transfektionseffizienz wieder geringer, bis sie bei 2 mg/mL wieder der der unmodifizierten Partikel entspricht. Eine mögliche Erklärung für den leichten Anstieg der Transfektionseffizienz könnte eine unspezifische Anlagerung des unmodifizierten Transferrins an den Nanopartikel sein. Bei niedrigen Transferrinkonzentrationen ist es noch unwahrscheinlich, dass Tf am Nanopartikel adsorbiert. Je höher die Tf-Konzentration im Medium jedoch wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass sich eine geringe Anzahl Tf-Moleküle an die HS-Oberfläche unspezifisch anlagern. Es wäre denkbar, dass auch Partikel, an denen Tf nicht über eine Adamantan-CD-Wechselwirkung gebunden ist, sondern lediglich adsorbiert ist, über den Transferrinrezeptor aufgenommen werden können und sich damit die Erhöhung der Transfektionseffizienz bei 20  $\mu$ g/mL Tf im Medium erklären lässt. Steigt die Tf-Konzentration weiter (200  $\mu$ g/mL bis 2 mg/mL) überwiegt möglicherweise wieder der kompetitive Effekt, d.h. die Transferrinrezeptoren sind soweit blockiert durch freies Tf, dass das Anbinden der Partikel mit adsorbiertem Tf an der Oberfläche verhindert wird.

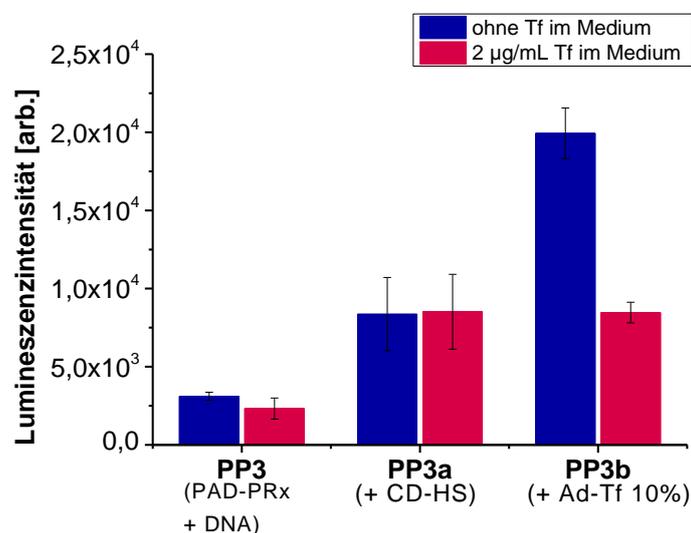


**Abb. 71:** Kompetitive Bindungsstudie der unmodifizierten, CD-HS-beschichteten und Tf-modifizierten Nanopartikel **PP1**, **PP1a** und **PP1b** mit 10% Ad-Tf. Aufgetragen ist die zur Transfektionseffizienz proportionale Lumineszenzintensität der Polyplexe **PP1**, **PP1a** und **PP1b** in Abhängigkeit der Holo-Transferrinkonzentration im Medium.

Bei einer hohen Belegung der Oberfläche durch Transferrin, bei der sich mehrere Transferrin-Moleküle in direkter Nachbarschaft auf dem Nanopartikel befinden, können mehrere Transferrin-Moleküle gleichzeitig Wechselwirkungen mit nahe gelegenen TfR eingehen. Multivalente Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren treten in der Natur häufig auf und führen zu einer besonders effektiven Regulation von Prozessen.<sup>235</sup> Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt auch bei Nanopartikeln auftreten kann, die mehrere Liganden an ihrer Oberfläche tragen, die mehrfache Wechselwirkungen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche eingehen können, wodurch die Internalisierung der Partikel nochmals erhöht werden konnte.<sup>236</sup> Dieses Phänomen könnte bei Kircheis *et al.*<sup>118</sup> aufgetreten sein, die mit 8 Äquivalent Transferrin im Vergleich zu PEI eine hohe Belegung des Transferrins vorweisen. Im Vergleich dazu wurde mit einer recht geringen Belegung durch Tf mit 0.05 % im Bezug auf die Mol CD nur eine Vervierfachung der Transfektionseffizienz erzielt,<sup>220</sup> sodass multivalente Wechselwirkungen zwischen Tf-modifiziertem Partikel und den TfR auf der Zelle unwahrscheinlich sind. Dadurch ließe sich die schwache Erhöhung der Transfektionseffizienz erklären.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Transfektionseffizienz durch Oberflächenfunktionalisierung mit Transferrin im Vergleich zu nicht-modifizierten Polykation-DNA Polyplexen um das 34-fache gesteigert werden konnte. Bei TfR-überexprimierenden malignen Zelllinien wäre in jedem Fall mit einer noch stärkeren Zunahme der Transfektionseffizienz mit Tf-funktionalisierten Nanopartikeln zu erwarten, einerseits durch die erhöhte Anzahl an verfügbaren Rezeptoren auf der Oberfläche, andererseits durch eine mögliche Vervielfachung der multivalenten Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor.

Abschließend wurde nach dem am Beispiel des PEI optimierten Systems nun die Polyamidin-Polyrotaxan Nanopartikel **PP3** im N/P Verhältnis 10 ebenfalls mit CD-HS sowie mit Ad-Tf beschichtet und die Transfektionseffizienz der Partikel im Luciferase-Assay verglichen. Das gleiche Experiment wurde auch nochmal mit einem Zusatz von 2 µg/mL Transferrin im Medium durchgeführt, um die Hemmung der Aufnahme der Tf-modifizierten Partikel bei Absättigung der TfR zu demonstrieren. Es wurde hierbei eine Konzentration von 2 µg/mL gewählt, da im Falle der PEI-Partikel **PP1b** eine deutliche Hemmung der Aufnahme der Partikel zu beobachten war, jedoch noch nicht eine vollständige Unterdrückung der Partikelaufnahme, wie sie bei 2 mg/mL Tf beobachtet werden konnte. Das Ergebnis des Experiments ist in Abb. 72 gezeigt. Zu beobachten ist hierbei erneut die Steigerung der Transfektionseffizienz bei Ummantelung der **PP3**-Partikel mit CD-HS (wieder 50 % im Bezug auf die kationischen Ladungen des Polyrotaxans) um das dreifache, sowie eine signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz der Tf-modifizierten Partikel **PP3b** um das 6-fache im Vergleich zu den nicht modifizierten Partikeln **PP3**. Gleichzeitig konnte auch in diesem Experiment gezeigt werden, dass die Tf-modifizierten Partikel **PP3b** schlechter internalisiert werden, wenn es eine Konkurrenz der freien Tf im Medium um die Transferrinrezeptoren gibt. Die Steigerung der Transfektionseffizienz bei Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel mit Ad-Tf ist bei den Polyrotaxan-Partikeln nicht so stark ausgefallen, wie sie bei PEI erwartet wurde. Möglicherweise könnte die Transfektionseffizienz der Polyrotaxan-Partikel noch gesteigert werden, indem der CD-HS Gehalt optimiert würde. Der pKs-Wert des PEI und der des Polyrotaxans sind nicht identisch, sodass sich bei gleichem pH-Wert minimale Unterschiede in der effektiven Ladung des Polykations ergeben. Da die Menge der zugesetzten CD-HS im Bezug auf die Ladungen des Polykations angegeben wird, könnte sich die optimale Menge der CD-HS von der der PEI-Partikel unterscheiden. Eine erneute Optimierung der Mengen an eingesetzter CD-HS sowie Ad-Tf könnte in einer Steigerung der Transfektionseffizienz der **PP3b** resultieren.



**Abb. 72:** Vergleich der Transfektionseffizienz der Polyamidin-Polyplexe (hergestellt aus PRx14) **PP3**, **PP3a** und **PP3b** mit 10% adamantyliertem Transferrin an der Oberfläche bezogen auf die Gesamtmol CD der HS, in blau ohne zugesetztes Transferrin, in rot mit 2 µg/mL freiem Transferrin im Medium.

### 3.6 Zusammenfassung & Ausblick

Nach Synthese kationischer CD-Derivate und kationischer Polymere (Ionen und Polyamidin) als Bausteine wurden Polyrotaxane über Selbstanordnung in wässriger Lösung hergestellt. Die Toxizität der Polyrotaxane wurde mittels MTT Assay bestimmt und liegt zwischen 10 und 50  $\mu\text{g/mL}$ , wobei die zytotoxischen Effekte auf das Polymerrückgrat zurückzuführen sind. Dennoch liegen die  $\text{LC}_{50}$ -Werte der Polyrotaxane mindestens 10-fach unterhalb der final eingesetzten Konzentration.

Die kationischen Polyrotaxane wurden verwendet, um anionische DNA zu komplexieren. Die DNA Komplexierung war dabei bei einem N/P-Verhältnis von 2 vollständig. Die erhaltenen Polyplexe waren etwa 120 nm groß und hatten eine positive Oberflächenladung, das Zetapotential lag zwischen 20 und 27 mV. Die hergestellten Nanopartikel zeigten in der final eingesetzten Konzentration keine toxischen Effekte.

In einem Luciferase- sowie einem GFP-Assay wurde die Transfektionseffizienz der Polyrotaxane im Vergleich mit dem kommerziell verfügbaren PEI verglichen. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Ladungsdichte und der Transfektionseffizienz festgestellt: die Transfektionseffizienz steigt, wenn die Ladungsdichte pro nm Polykation der Ladungsdichte der DNA entspricht. Folglich wurden die besten Ergebnisse für das Ionen-11 Polyrotaxan **PRx7** und die Polyamidin-Polyrotaxane **PRx14** und **PRx16** erreicht. Demnach könnte die Transfektionseffizienz zukünftig noch weiter gesteigert werden, in dem Polyrotaxane mit noch höherer Ladungsdichte hergestellt werden würde. Dies könnte einfach durch Erhöhung der Belegung an kationischem CD erreicht werden. Die Beschichtung der Polyplexe mit anionischer CD-modifizierter Hyaluronsäure resultierte in einer anionischen Oberfläche der Polyplexe (etwa -18 mV bei 50 % Ladungsabsättigung des Polykations) und einer Erhöhung der Transfektionseffizienz um das fünffache.

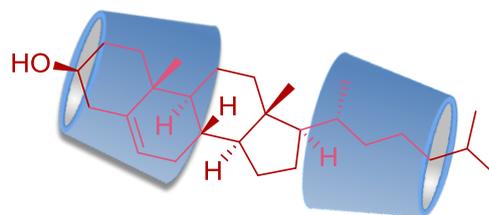
Schließlich wurden durch Bildung von Einschlussverbindungen zwischen adamantylierem Transferrin und der CD-modifizierten Hyaluronsäure oberflächenfunktionalisierte Nanopartikel erhalten. Das schrittweise Beschichten des Partikels konnte mittels DLS, Bestimmung des Zetapotentials, fluoreszenzspektrometrischer Methoden sowie durchfluscytometrischer Analyse der Nanopartikel bestätigt werden. Mit den Transferrin-modifizierten Polyplexen konnte an HEK293T Zellen eine Steigerung der Transfektionseffizienz um das 34-fache (PEI-Partikel) bzw. das sechsfache (Polyrotaxan-Partikel) beobachtet werden. In einem kompetitiven Bindungsassay wurde zudem bewiesen, dass die höhere Transfektionsrate auf die rezeptorvermittelte Aufnahme der Partikel zurückzuführen ist. Im Falle der oberflächenmodifizierten Polyrotaxan-Nanopartikel könnte die Transfektionseffizienz durch systematische Variation der Menge an Hyaluronsäure sowie des Ad-Tf-Gehalts auf der Partikeloberfläche weiter gesteigert werden. Grundsätzlich ist für alle Transferrin-modifizierten Partikel bei Zelllinien, die den Transferrinrezeptor überexprimieren, eine weitere Steigerung der Transfektionseffizienz durch rezeptorvermittelte Aufnahme der Partikel zu erwarten.

Das beschriebene System stellt ein Baukastensystem dar und ist ein Beispiel für funktionalisierte Partikel. Durch einfache Adamantylisierung beliebiger Targetmoleküle wie Antikörper, Zucker, Peptide wie RGDs können diese Liganden in Zukunft an die Oberfläche der Nanopartikel angebunden werden, sodass zellspezifisches Targeting der DNA-Polyplexe möglich ist.

## 4 Polyrotaxane zur Therapie der Niemann-Pick Krankheit

### 4.1 Einleitung

Cyclodextrine und ihre Derivate eignen sich auf Grund ihrer hydrophoben Kavität und ihrer hydrophilen Außenseite hervorragend als Solubilisierer für lipophile pharmazeutische Wirkstoffe. Eingeschlossen in CD wird ihre Bioverfügbarkeit verbessert und Bio-transformationsreaktionen sowie Nebenwirkungen im Körper werden verringert.<sup>237,238</sup> Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), ein besonders gut wasserlösliches Derivat, welches bereits kommerziell in mehreren Wirkstoffformulierungen eingesetzt wird, unter anderem für Itraconazol („Sporanox“)<sup>23</sup>, Hydrocortison („Dexocort“)<sup>239</sup>, und Indomethacin („Indocid“),<sup>240</sup> zeigt neben seiner Funktion als Wirkstoff-Solubilisierer jedoch auch selbst pharmakologische Aktivität: es konnte gezeigt werden, dass HP- $\beta$ -CD mit Cholesterol Komplexe mit einer 2:1 Stöchiometrie bildet.<sup>241,242</sup> Das CD-Derivat ist daher in der Lage, Cholesterol zu solubilisieren und zu transportieren, sowie ebenfalls durch Komplexierung von Cholesterol und anderen Lipiden die sogenannten Lipid Rafts in Zellen zu zerstören.<sup>243,244,172</sup> Der Komplex ist in Abb. 73 dargestellt.



**Abb. 73:** Schematische Darstellung der Einschlussverbindung des Cholesterols in HP- $\beta$ -CD mit 2:1 Stöchiometrie <sup>241,242</sup>.

Durch das Vermögen Cholesterol zu solubilisieren zeigt HP- $\beta$ -CD therapeutisches Potential in der Behandlung von lysosomalen metabolischen Speicherkrankheiten. HP- $\beta$ -CD wurde bereits eingehend hinsichtlich seines therapeutischen Potentials bei der Behandlung der lysosomalen Speicherkrankheit Niemann Pick Typ C (NPC) untersucht.<sup>245-247</sup> Bei dieser erblich bedingten Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 1:120000 lösen Mutationen der NPC1- (in ca. 95 % der Fälle) bzw. NPC2-Gene eine Dysfunktion der Transporter-Proteine aus, sodass Cholesterol und Sphingolipide nicht mehr aus den Lysosomen transportiert werden können und aggregieren. Die Ansammlung der Lipide in Form von mikrokristallinen Ablagerungen im Lysosom führt zu Zellschäden in Leber, Milz und Gehirn, und bewirkt beim Patienten unter anderem die progressive Neurodegeneration in der frühen Kindheit und den Tod im Jugendalter.<sup>248</sup>

Durch Gabe von HP- $\beta$ -CD wird das aggregierte Cholesterol solubilisiert und der Transport des Cholesterols in das Cytoplasma ermöglicht, wo es entweder aus der Zelle ausgeschieden oder in lösliche Cholesterylester umgesetzt werden kann. Auf diese Weise kann eine Normalisierung des Cholesterolspiegels in den späten endosomalen/lysosomalen Bereichen erreicht werden.<sup>249</sup>

In einer Studie von Lopez *et al.* wurde Versuchstieren jeweils viermal wöchentlich eine Dosis von 4000 mg/kg Körpergewicht HP- $\beta$ -CD als subkutane Injektion verabreicht. Nach 77 Tagen hatte sich der Gesamt-Leber-Cholesterol-Gehalt um 72% verringert.<sup>250</sup>

Aktuell wird HP- $\beta$ -CD als Wirkstoff in der Niemann-Pick Krankheit bereits in zwei klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit überprüft. Die klinische Studie der CTD Holdings,

Inc. (Alachua, Florida) mit dem Wirkstoff "Trappsol 1 Cyclo™" befindet sich in Phase I/II, eine weitere Studie der Vtesse Inc (Gaithersburg, Maryland mit dem Wirkstoff VTS-270 (Kleptose 1 HP- $\beta$ -CD der Firma Roquette Pharma (Frankreich)) befindet sich in Phase IIb/III. Mit beiden Präparaten konnte bereits die Lebensdauer von Patienten verlängert werden und die Menge unveresterten Cholesterols im zentralen Nervensystem und anderen Organen reduziert werden.<sup>251</sup>

Trotz dieser bereits erzielten therapeutischen Erfolge muss HP- $\beta$ -CD aufgrund der schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften (vor allem bedingt durch die schnelle renale Ausscheidung) sehr häufig verabreicht werden, was einerseits aufwändig ist, und außerdem eine nicht patientenfreundliche Behandlung darstellt. Abgesehen von den vielen, in zeitlich kurzen Abständen nötigen Injektionen gibt es jedoch auch weitere unerwünschte Nebenwirkungen beim Einsatz des freien HP- $\beta$ -CDs, einschließlich der akuten Toxizität bei diesen hohen Dosen sowie Lungenschädigungen.<sup>247,252,253</sup>

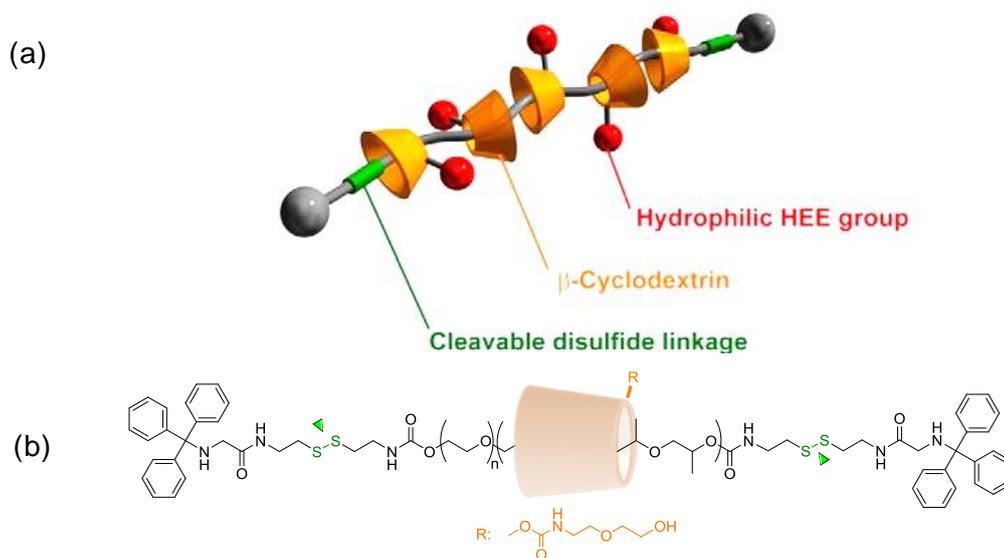
Die Nebeneffekte konnten bereits durch eine intrazisternale Verabreichung reduziert werden,<sup>254</sup> dennoch besteht immer noch das Risiko der Ototoxizität.<sup>249,254</sup> Daher gehen neue Forschungsansätze in Richtung der Suche geeigneter Carrier, mit denen HP- $\beta$ -CD verabreicht werden kann, sodass die Nebenwirkungen so weit wie möglich reduziert werden können.

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben sind Polyrotaxane attraktive Verbindungen als potentielle Carrier und geradezu prädestiniert für die kontrollierte Freisetzung von CD als API. Die Dissoziationsrate eines Polyrotaxans kann über die Art der gewählten Stoppergruppe an den Enden des Polyrotaxans bestimmt werden, wodurch ein beliebig langsames Abfädeln der Ringe gewährleistet werden kann.

Amphiphile Polymere eignen sich hervorragend zur Herstellung von CD-Polyrotaxanen, da die CDs in Wasser aufgrund hydrophober Wechselwirkungen spontan auf die hydrophoben Segmente des Polymers auffädeln, während die hydrophilen Bereiche die Wasserlöslichkeit der Polyrotaxane gewährleisten.<sup>18,27,29</sup> Wie eingangs erwähnt, wurden bisher wurden bereits neutrale und kationische Polymere wie PEG<sup>28</sup>, PPG<sup>34,35</sup>, Poly(oligomethylenimin)<sup>27</sup> und Derivate, aber auch Polyamide<sup>36</sup> und Polyester<sup>37</sup> mit CD komplexiert, um Polyrotaxane zu erhalten. Neutrale Polyrotaxane sind im Allgemeinen nur schlecht wasserlöslich und müssen daher weiter derivatisiert werden.<sup>18</sup>

Eine schnelle Reduzierung des Cholesterolgehalts in NPC1-Zellen<sup>255</sup> und des entsprechenden Mausmodells der Niemann-Pick Krankheit<sup>256</sup> wurde für HP- $\beta$ -CD (oder 2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl carbamat-modifiziertes  $\beta$ -CD) und PEG-PPG-PEG Blockpolymeren beschrieben.<sup>58,255–257</sup> Polyrotaxane mit HP- $\beta$ -CD haben gegenüber freiem HP- $\beta$ -CD den Vorteil, dass durch das verzögerte Abfädeln der CD-Ringe über einen längeren Zeitraum immer wieder CD im Lysosom frei wird, welches das abgelagerte Cholesterol solubilisieren kann. Es handelt sich dabei folglich um eine *slow release* Formulierung, wodurch die Häufigkeit der Injektionen des Wirkstoffs deutlich verringert werden könnte. Zur potentiellen Behandlung von NPC wurden mehrfach Polyrotaxane als HP- $\beta$ -CD Prodrug ausgehend von Blockcopolymeren aus Ethylenoxid und Propylenoxid (Pluronic) beschrieben.<sup>58,255,256</sup> Von Yui *et al.*<sup>258</sup> wurden zusätzlich spaltbare Disulfidbrücken in das Polymer eingebaut und anschließend HP- $\beta$ -CD und Hydroxyethoxyethyl- $\beta$ -CD (HEE- $\beta$ -CD) zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit aufgefädelt. In einer Variante dieses Systems wurden später säurelabile Stoppergruppen eingesetzt.<sup>257</sup> Auf diese Weise wurden zunächst bio-inerte Polyrotaxane erhalten. Das Prinzip des Systems von Yui *et al.* ist in Abb. 74 dargestellt. Da die Kavität des CD das Polymer einschließt, wird kein Cholesterol aus der Plasmamembran entzogen. Erst im Lysosom werden die Disulfidbrücken gespalten, das Polyrotaxan folglich

abgebaut und HP- $\beta$ -CD ortsspezifisch freigesetzt, wodurch das freie Cholesterol eingeschlossen werden kann.



**Abb. 74:** Schematische Darstellung des Pluronics-Polyrotaxans mit HP- $\beta$ -CD und HECD nach Yui *et al.*<sup>258</sup> Die sterisch anspruchsvollen Stoppergruppen sind über Disulfidbrücken an das Polyrotaxan angeknüpft. Bei enzymatischer Spaltung des Polyrotaxans werden die CD freigesetzt. (a) Reprinted with permission from Atsushi Tamura, and Nobuhiko Yui *J. Biol. Chem.* 2015; 290:9442-9454, Copyright 2015 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Die Gruppe von D. Thompson<sup>56-58</sup> arbeitet ebenfalls mit einem bereits in Kapitel 1 beschriebenen System mit einem Triblockcopolymer aus einem Polypropylen glycolblock, der von zwei Polyethylenglycolblöcken variabler Längen umgeben ist. Auf die Polymere wurden entweder nur HP- $\beta$ -CD, oder eine Mischung aus HP- $\beta$ -CD und 4-Sulfobutylether- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD) aufgefädelt und sterisch anspruchsvolle Endgruppen eingeführt, s. Abb. 9.

Obwohl das PEG-Rückgrat die Wasserlöslichkeit des Polyrotaxans gewährleistet, birgt die Verwendung von PEG-Polymeren in pharmazeutischen Anwendungen jedoch auch potentielle Risiken.<sup>259,260</sup> Unabhängig von der Darreichungsform können über spezifische und unspezifische Wechselwirkungen des PEGs mit dem Immunsystem Hypersensibilitätsreaktionen ausgelöst werden. Des Weiteren können bei PEG-basierten Carriersystemen unerwartete Änderungen in der Pharmakokinetik auftreten. So beeinflusst beispielsweise das *accelerated blood clearance* (ABC) Phänomen die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs. Problematisch ist außerdem, dass PEG nicht bioabbaubar ist.<sup>259</sup> Lediglich PEG-Oligomere können teilweise noch langsam von Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen sowie von Cytochrom P450 abgebaut werden. PEG bis zu einem MW von 20 kDa kann potentiell über den Urin ausgeschieden werden.<sup>260</sup> Es liegen jedoch keine systematischen Langzeitstudien vor, die zeigen ob PEG komplett ausgeschieden wird oder teilweise im Körper akkumuliert wird, oder welche Auswirkung die Akkumulation an den jeweiligen Stellen hat.<sup>259</sup> Es steht allerdings fest, dass PEG ab einem MW von etwa 40 – 60 kDa nicht mehr ausgeschieden werden kann und in der Leber angesammelt wird.<sup>260</sup>

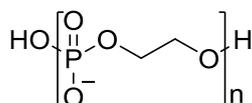
Im Gegensatz zu den PEG-basierten Polyrotaxanen sind kationische CD-Polyrotaxane zwar besser wasserlöslich, in der Regel jedoch auch deutlich toxischer als die neutralen Polyrotaxane.<sup>87,88,261</sup>

Diese Schwachpunkte der bisher etablierten CD-Polyrotaxane zur Therapie der NPC-Krankheit sollen mit einem anionischen Polyrotaxan verbessert werden. In dieser Arbeit wird die Synthese eines neuen, anionischen Polyrotaxans auf Polyalkylenphosphat-Basis beschrieben.

Phosphorsäurediester spielen bereits eine wichtige Rolle in der Zellphysiologie.<sup>262</sup> Sie sind ein essentieller Bestandteil des Phosphatdesoxyribose-Rückgrats der DNA bzw. RNA, treten jedoch auch im Rahmen posttranslationaler Proteinmodifikationen sowie in Phospholipiden auf.<sup>263</sup> Daher stellen Phosphorsäurediester eine ideale Grundlage für die Entwicklung biokompatibler und bioabbaubarer Polymere dar. Der erste Einsatz von Phosphorsäureestern für den Wirkstofftransport wurde von Leong *et al.* 1991 beschrieben. Er entwickelte lineare Polyphosphorsäureester, welche hydrolysierbar und enzymatisch abbaubar sind.<sup>264</sup> Polymere Phosphorsäurediester sind synthetische Analoga von Polynucleotiden, die über Nucleasen in nicht toxische Abbauprodukte gespalten werden können.<sup>262–265</sup> Phosphorsäurediester sind einfach zugänglich über die Oxidation von polymeren Phosphiten, welche wiederum üblicherweise über Umesterung von Diphenylphosphit mit  $\alpha,\omega$ -Dienen erhalten werden können.<sup>266</sup>

Polymere Phosphodiester wurden bereits als Prodrugs, Hydrogele und Wirkstoffcarrier eingesetzt.<sup>264,267,268</sup> Bogomilova *et al.* beschrieben beispielsweise 2013 den Einsatz von wasserlöslichen Polyphosphorsäureestern als Polymer Prodrug für die Chemotherapie.<sup>267</sup> Konkret wurde hierbei der niedermolekulare Antitumorwirkstoff Melphalanhydrochlorid an einen Polyphosphorsäureester mit PEG-Einheiten konjugiert. Dank der hochmolekularen Polymer-Prodrug konnte die unspezifische Verteilung des Wirkstoffs und damit die toxischen Nebenreaktionen verhindert werden. Ebenfalls konnte das schnelle Ausscheiden des Wirkstoffs aus dem Körper, welches das therapeutische Potential des Wirkstoffs verringert hätte, verlangsamt werden. Insgesamt wurde also durch die Konjugation mit dem Polyphosphorsäureester eine Prodrug mit vergleichbarer Toxizität, jedoch erhöhter therapeutischer Effizienz im Vergleich zum reinen Melphalan erhalten.<sup>267</sup>

Pseudopolyrotaxane auf Basis eines bioabbaubaren Polyphosphorsäureester-Ionomers wurden bereits von Tamura *et al.*<sup>269</sup> beschrieben (Abb. 75). Das Polyphosphorsäureester-Ionomer wurde hierbei über anionische Ringöffnungspolymerisation erhalten. Es konnten jedoch nur Einschlussverbindungen mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ -CD beobachtet werden, wobei die resultierenden Polyrotaxane in wässriger Lösung Niederschläge bildeten. Mit  $\beta$ -CD konnten keine Einschlussverbindungen erhalten werden.

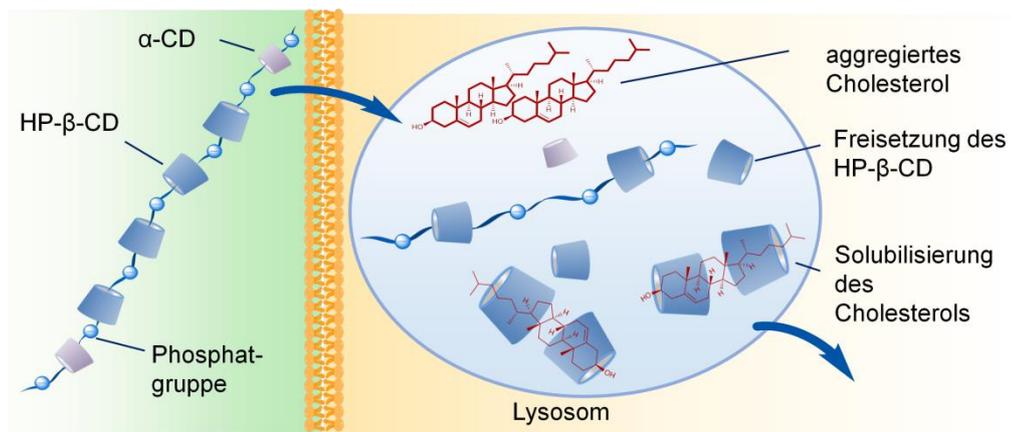


**Abb. 75:** Polyphosphat-Backbone von Tamura *et al.*<sup>269</sup>

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die homogene Herstellung eines wasserlöslichen Polyrotaxans aus HP- $\beta$ -CD und einem anionischen polymeren Phosphodiester beschrieben. Als Stoppergruppen wurde  $\alpha$ -CD verwendet. Das in dieser Arbeit beschriebene neue Polyalkylenphosphat ist aus hydrophoben Decamethyleneinheiten aufgebaut, die das Auf-fädeln von CD ermöglichen. Die Decyleneinheiten sind über anionische Phosphatgruppen verknüpft, die neben der Wasserlöslichkeit auch die Biokompatibilität gewährleisten. Gleichzeitig kann das Polymer an den Phosphatgruppen gespalten werden, sodass ein aufwändiger Einbau von zusätzlichen „Sollbruchstellen“ wie Disulfidbrücken entfällt. Somit ergibt sich aus den anionischen Polyalkylenphosphaten eine neue vielversprechende Gruppe an Polymeren zur Bildung von Polyrotaxanen.

Als Stoppergruppen für das Polyrotaxan fungieren  $\alpha$ -CD. Dies hat den Vorteil, dass auf die Einführung kovalenter Endgruppen am Polyrotaxan verzichtet werden kann. Nach Verabreichung des Polyrotaxans sollen zunächst die  $\alpha$ -CD vom Rückgrat abfädeln, und anschließend soll nach und nach HP- $\beta$ -CD freigesetzt und das aggregierte Cholesterol solubilisieren, was zu einer Normalisierung des Cholesterolspiegels in NPC-Zellen führen soll. Dies soll an NPC-Fibroblasten untersucht werden.

Durch diesen Ansatz soll einerseits die Menge des zu verabreichenden HP- $\beta$ -CD reduziert werden, da weniger HP- $\beta$ -CD von den Nieren direkt ausgeschieden wird, außerdem soll die verzögerte Freisetzung des HP- $\beta$ -CDs eine Verringerung der Verabreichungshäufigkeit erzielt werden. Das Prinzip des Poly(decamethylenphosphat)-Polyrotaxans als *slow release* Formulierung ist in Abb. 76 schematisch veranschaulicht.

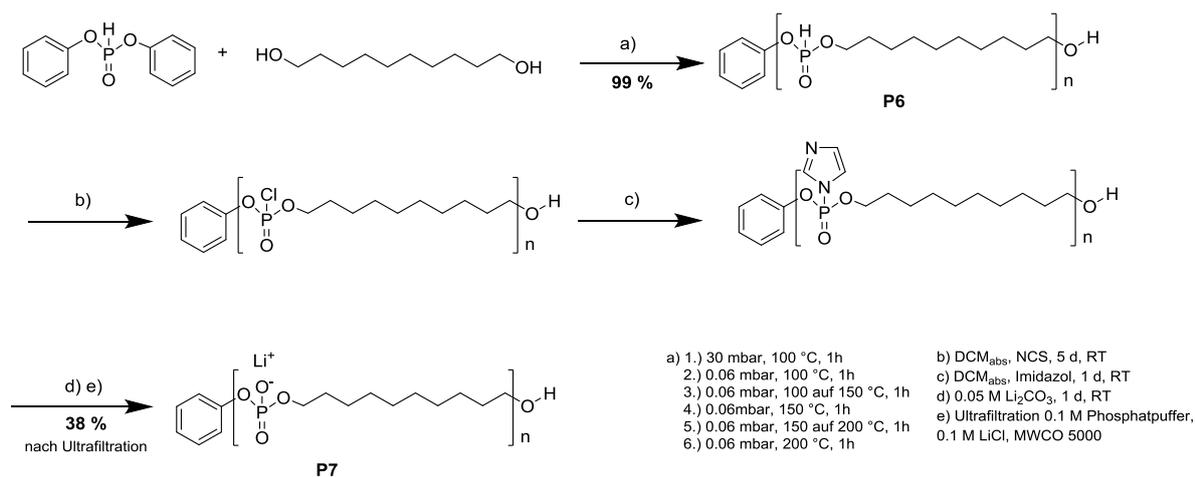


**Abb. 76:** Prinzip des HP- $\beta$ -CD Polyrotaxans als polymeres Prodrug für HP- $\beta$ -CD. Das Polyrotaxan wird über Endocytose in die Zelle aufgenommen. Nach Dissoziation der  $\alpha$ -CD-Stopper beginnt  $\beta$ -CD abzufädeln und die Konzentration an  $\beta$ -CD im Lysosom steigt und solubilisiert das aggregierte Cholesterol.

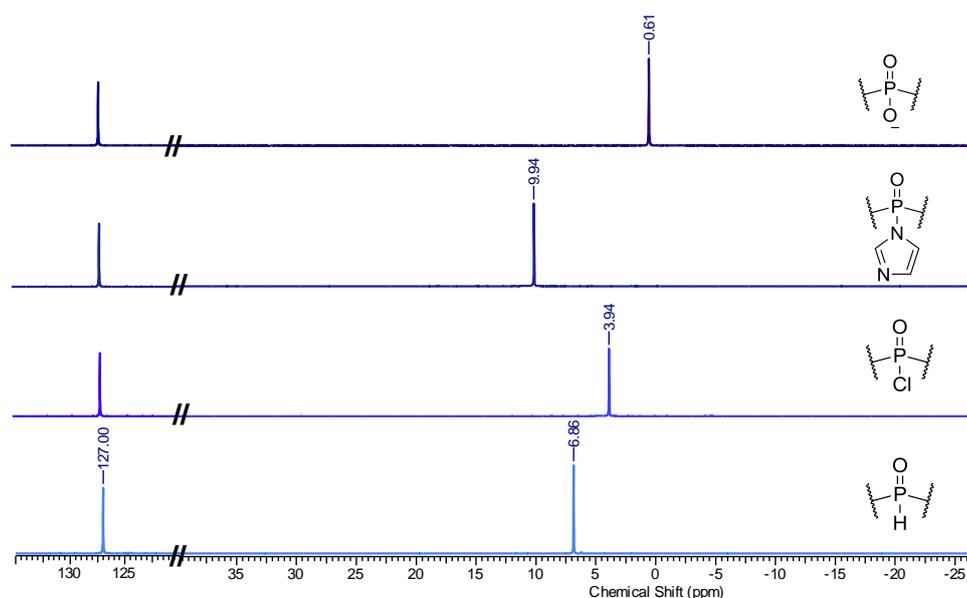
## 4.2 Synthese der Bausteine

Das Syntheschema des anionischen Gastpolymers Poly(decamethylenphosphat) **P7** ist in Schema 16 dargestellt. Die Polykondensationsreaktion von Diphenylphosphit und 1,10-Decandiol zu Polyalkylenphosphit **P6** erfolgte in Anlehnung einer Vorschrift von Penczek<sup>266</sup> und wurde in einer Kolonnenkopffapparat in im Vakuum (0.06 mbar) bei hohen Temperaturen in Substanz durchgeführt, um das bei der Reaktion entstehende Phenol abzudestillieren. Zur Erhöhung des Polymerisationsgrades wurde die Reaktionsdauer auf 6 h erhöht. Das Polymer wurde in quantitativer Ausbeute erhalten. Als nächstes wurde das Polyalkylenphosphit **P6** in einer dreistufigen polymeranalogen Umsetzung zu Polyalkylenphosphat oxidiert. Zunächst wurde Polyalkylenphosphit in Anlehnung an Huttunen<sup>270</sup> mit *N*-Chlorsuccinimid zu Poly(1,10-decamethylen-chlorophosphat) umgesetzt. Zur Aktivierung des Poly(1,10-decamethylen-chlorophosphat)s wurde die Reaktionsmischung unter Feuchtigkeitsausschluss mit Imidazol versetzt. Diese dreistufige Reaktion wurde gewählt, um die Bildung von Pyrophosphaten, welche bei der direkten einstufigen Oxidation mit wässriger Iodlösung gebildet werden können, zu vermeiden.<sup>271</sup>

Die Zwischenprodukte wurden hierbei nicht isoliert und aufgereinigt sondern direkt weiter umgesetzt. Die einzelnen Umsetzungen am Phosphoratom konnten via <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie verfolgt werden (Abb. 77).



**Schema 16:** Synthese des Gastpolymers Poly(decamethylenphosphat) **P7**.



**Abb. 77:**  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren des Poly(decamethylen)phosphits (P6), der Zwischenstufen Poly(decamethylen)chlorid und Poly(decamethylen)imidazol, sowie des Produktes Poly(decamethylen)phosphat (P7) in  $\text{CDCl}_3$ , Referenz Triphenylphosphit (127 ppm).

Anschließend wurde das Poly(1,10-decamethylen-imidazolylphosphat) im Basischen nach Pretula<sup>266</sup> hydrolysiert. Dazu wurde die Reaktionsmischung statt mit einer 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung mit einer 0.05 M  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ -Lösung ausgeschüttelt, um erstens die Hydrolyse der Estergruppen im stark basischen Milieu zu vermeiden, und zweitens durch das kleinere Li-Kation eine bessere Löslichkeit des Polymers zu erreichen. Die Gesamtausbeute an Poly(1,10-decamethylenphosphat) **P7** nach Ultrafiltration betrug **38 %**.

Da das Polymer über eine Membran mit MWCO 5 kDa ultrafiltriert wurde, sollten die Polymere eine theoretische Länge von  $\geq 21$  Wiederholeinheiten haben. Eine Endgruppenanalyse via NMR ergab eine durchschnittliche Kettenlänge von nur 8.3 Phosphateinheiten. Die Abweichung ist durch den erhöhten hydrodynamischen Radius des anionischen Polymers in wässriger Lösung bei der Ultrafiltration zu erklären, sodass die Moleküle größer erscheinen und somit auch kleinere Moleküle von der Membran zurückgehalten werden. Des Weiteren werden in der NMR-Spektroskopie alle Moleküle gemittelt betrachtet. Eine Gelpermeationschromatographie (GPC, s. Anhang, Kalibrierung mit Pullulan) ergab eine durchschnittliche  $M_w$  von 18 kDa (entspricht einer Kettenlänge von 76 Wiederholeinheiten)

Die Löslichkeit des Polymers **P7** in Wasser beträgt 110 mg/mL. In einem MTT-Assay wurde der  $\text{LC}_{50}$ -Wert des Polymers an HepG2-Zellen auf 900  $\mu\text{g/mL}$  bestimmt, womit es im Vergleich zu kationischen Polymeren eine deutlich geringere Toxizität zeigt<sup>89</sup> und damit potentiell sehr gut für den Wirkstofftransport geeignet ist.

### 4.3 Herstellung und Stabilität des Polyrotaxans

Der Einschluss des Poly(1,10-decamethylenphosphat)-Lithiumsalzes (**P7**) in  $\alpha$ -CD wurde bereits von N. Baudendistel *via*  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nachgewiesen (Abb. 78).<sup>272</sup> Dazu wurde eine Lösung von 1 Äquivalent  $\alpha$ -CD bezogen auf die Alkyleneinheiten des Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$  zur Lösung des Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$  gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde erwärmt und in regelmäßigen Abständen  $^1\text{H-NMR}$  Spektren aufgenommen. Der Einschluss des Polymers war relativ zur NMR-Skala langsam genug, um getrennte Signale der Protonen des freien Cyclodextrins bzw. des aufgefädelten Cyclodextrins zu beobachten: mit zunehmendem Einschluss des Polymers in das CD das Signal des anomeren Protons (H-1) des freien  $\alpha$ -CDs bei 5.035 ppm zugunsten des Signals des anomeren Protons (H-1) bei 5.060 ppm des aufgefädelten  $\alpha$ -CDs verringerte. Die neuen Signale bei 5.060 ppm sind charakteristisch für Einschlussverbindungen von  $\alpha$ -CD und wurden bereits bei entsprechenden Einschlussverbindungen mit anderen ionischen Polymeren beobachtet.<sup>134</sup> Anhand der beiden Signale bei 5.035 ppm und 5.060 ppm kann der Belegungsgrad  $y$  des Polymerrückgrats durch das Gastmolekül  $\alpha$ -CD bestimmt werden und gegen die Zeit aufgetragen werden (Abb. 79).

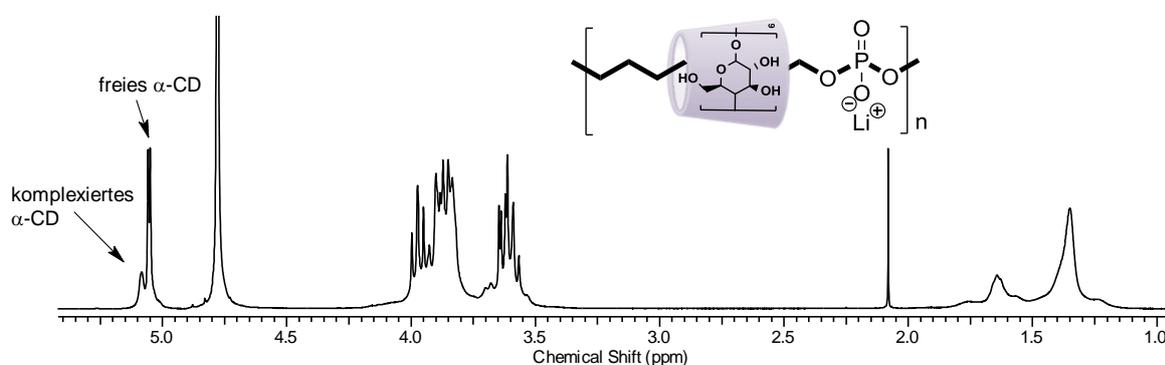


Abb. 78:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des  $\alpha$ -CD-Polyrotaxans in  $\text{D}_2\text{O}$ .

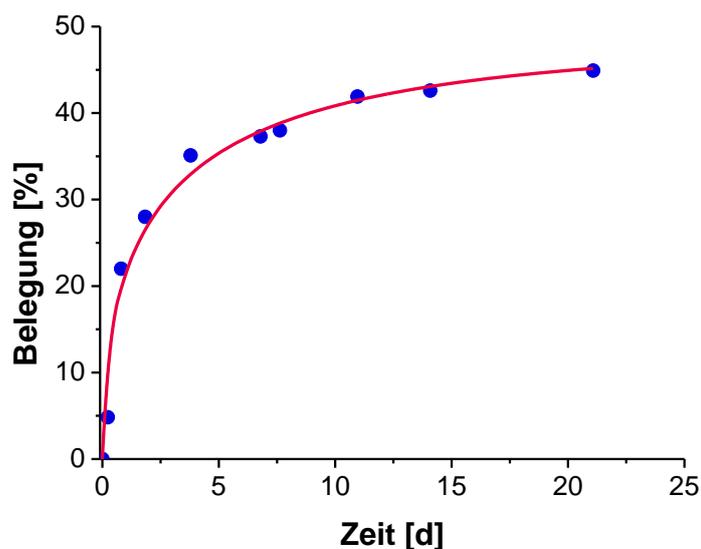
Der beobachtete, sehr langsame Einschluss wird auf die sterische Hinderung zwischen den sterisch anspruchsvollen solvatisierten Phosphatgruppen und dem rigiden  $\alpha$ -CD-Ring zurückgeführt.

Die Kinetik folgt einer gestreckten Exponentialfunktion (Gl. VI), die typisch für eine eindimensionale Diffusion ist.<sup>140,141</sup> Der Belegungsgrad  $y$  nähert sich einem Grenzwert von  $y_\infty = 48.5\%$  für eine unendliche Komplexierungszeit  $t$  und eine Zeitkonstante  $\tau$  von 2.9 d. Die Gleichgewichtskonstante  $K$  wurde ausgehend von  $y_\infty$  mit Hilfe von Gleichung VII berechnet, wobei  $[\text{CD}]_0$  die gesamte molare Konzentration des Cyclodextrins ist,  $x$  der molare Anteil der gesamten Konzentration an Gast-Wiederholungseinheiten in Bezug auf den Gast, und  $y$  der Belegungsgrad an CD, definiert als der molare Anteil des aufgefädelten CD in Bezug auf das gesamte CD.

Die bestimmte Gleichgewichtskonstante  $K = 200 \text{ M}^{-1}$  entspricht Konstanten, die für  $\alpha$ -CD mit anderen Gastpolymeren mit Decamethylen-Bindungsstellen bestimmt wurden.<sup>134</sup>

$$y = y_\infty \left(1 - e^{-\sqrt{t/\tau}}\right) \quad (\text{Gl. VI})$$

$$K = \frac{y_\infty}{[\text{CD}]_0(x - y_\infty)(1 - y_\infty)} \quad (\text{Gl. VII})$$



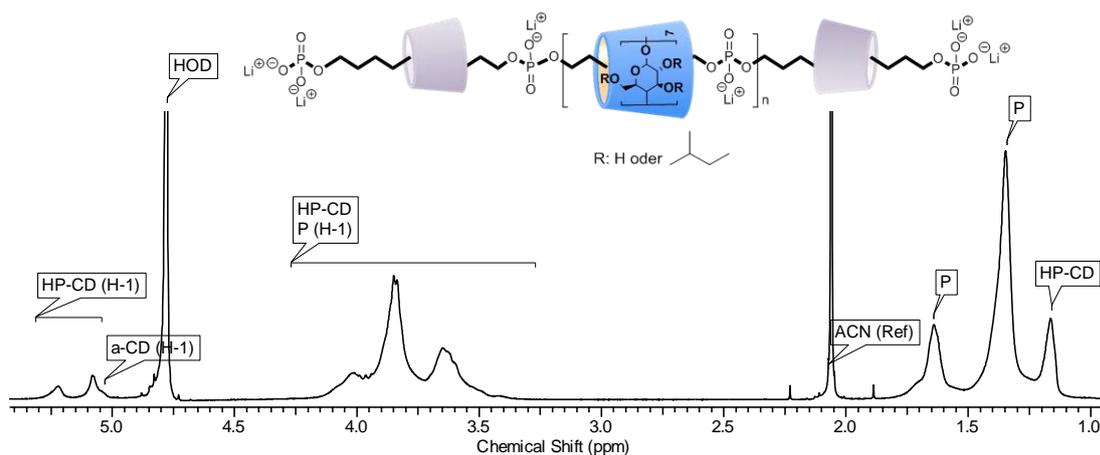
**Abb. 79:** Komplexierungskinetik von  $\alpha$ -CD mit dem Gastpolymer **P7** bei 60 °C. Die Daten wurden mit Gleichung VI gefittet, wobei  $y_{\infty} = 48.5 \%$  und  $\tau = 2.9$  d.

Obwohl die sterische Hinderung zwischen den großen Phosphatgruppen und der Kavität des  $\alpha$ -CDs eine sehr langsame Rotaxan-Bildung bewirkt, ist das resultierende Polyrotaxan dennoch kinetisch stabil und kann über Dialyse aufgereinigt werden. Im Gegensatz dazu bildet HP- $\beta$ -CD keine stabilen Einschlussverbindungen mit dem Polymer. Der Durchmesser der Kavität des  $\beta$ -CD (0.65 nm) ist im Vergleich zu  $\alpha$ -CD (0.44 nm) deutlich größer, sodass die sterische Hinderung der Phosphatgruppen vernachlässigbar wird.<sup>273</sup>

Trotzdem sind HP- $\beta$ -CD Polyrotaxane zugänglich, in dem  $\alpha$ -CD als supramolekulare Stoppergruppen auf den Kettenenden aufgefädelt werden. Die Herstellung des Polyrotaxans erfolgt somit durch schrittweises Auffädeln von größeren und kleineren Ringen, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde.<sup>89,130</sup>

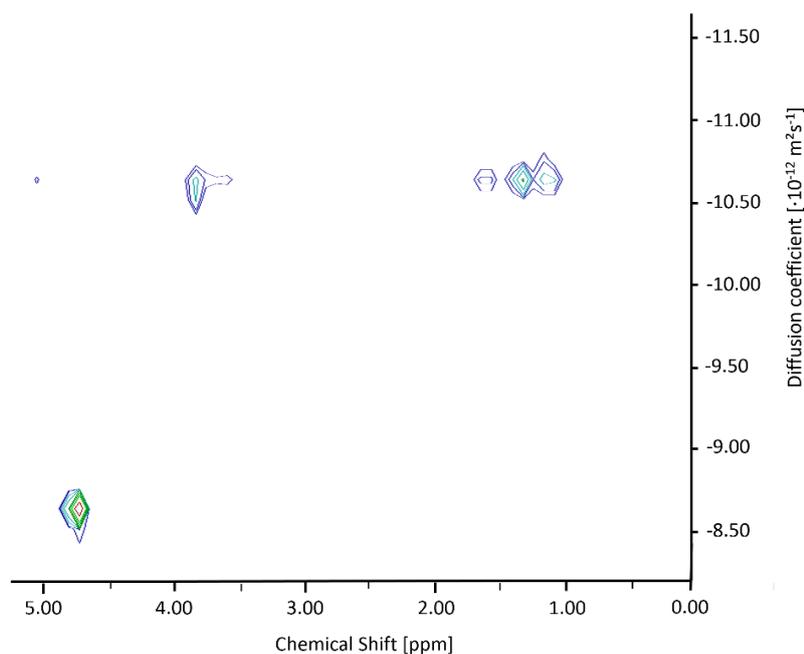
Konkret wurde das HP- $\beta$ -CD-Polyrotaxan durch Zugabe eines Überschusses (6 Äq.) an HP- $\beta$ -CD zur Lösung des Polyalkylphosphates **P7** hergestellt. Zunächst wurde über 5 ½ Stunden HP- $\beta$ -CD bei 40 °C aufgefädelt, anschließend wurde natives  $\alpha$ -CD zugegeben und 16 h bei 70 °C gerührt. Überschüssiges  $\alpha$ -CD und HP- $\beta$ -CD wurde anschließend über Ultrafiltration abgetrennt.

Die Löslichkeit des Polyrotaxans in Wasser ist 160 mg/mL. Die Belegung durch HP- $\beta$ -CD wurde via NMR auf 18 %, die Belegung durch  $\alpha$ -CD auf 3 % bestimmt, jeweils bezogen auf die Wiederholeinheiten des Polymers. Damit befinden sich ca. 14 HP- $\beta$ -CD auf jeder Polymerkette, abgestoppert sind sie durch ca. 2-3  $\alpha$ -CDs, die sich an den Enden der Ketten befinden. Der Gehalt an freiem HP- $\beta$ -CD wurde mittels ITC auf < 3 % bestimmt. Insgesamt ergibt sich für das Polyrotaxan **PRx18** ein Massengehalt an HP- $\beta$ -CD von 50 %. Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum des Polyrotaxans **PRx18** ist in Abb. 80 dargestellt.



**Abb. 80:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Polyrotaxans **PRx18** in  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz.

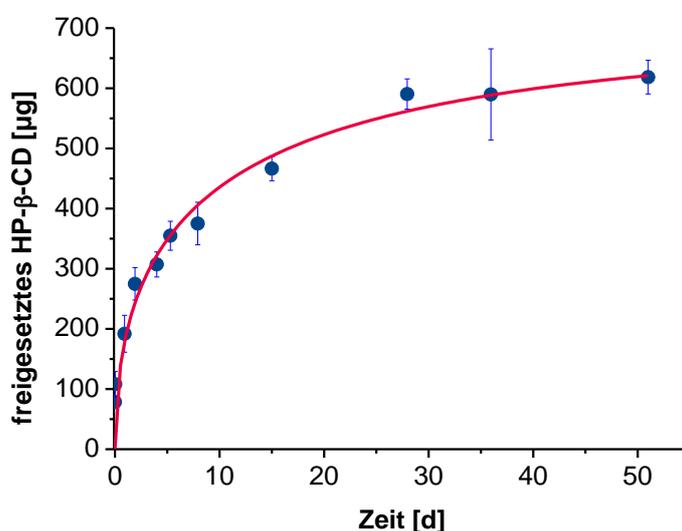
Die Polyrotaxanstruktur konnte mittels DOSY-NMR-Spektroskopie (Abb. 81) nachgewiesen werden. Alle Signale liegen auf einer Linie bei einem Diffusionskoeffizienten  $D = 1.55 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Es sind keine freien CD-Moleküle (bei größerem Diffusionskoeffizienten) zu erkennen.



**Abb. 81:** DOSY NMR Spektrum des Polyrotaxans **PRx18** in  $\text{D}_2\text{O}$ , das Signal bei 4.8 ppm stammt von  $\text{H}_2\text{O}$ .

Da das Polyrotaxan **PRx18** als *slow release* Formulierung für HP- $\beta$ -CD in wässriger Lösung vorbereitet wurde, wurde die Dissoziation in einem biologischen Puffer untersucht. Das Polyrotaxan wurde dafür bei  $37^\circ\text{C}$  in PBS inkubiert und es wurden über 50 Tage Proben entnommen. Anschließend wurde über einen Fluoreszenzassay mit Toluidinyl-naphtalin-2-sulfonat (TNS) die Konzentration an HP- $\beta$ -CD im Filtrat in Anlehnung an Kondo *et al.*<sup>132</sup> bestimmt. TNS weist in wässriger Lösung keine Fluoreszenz auf, kann jedoch in der hydrophoben Kavität des  $\beta$ -CD eingeschlossen werden und bildet hierbei

fluoreszierende 1:1 und 2:1 Komplexe.<sup>132,133</sup> Um Interferenzen des Polymers bzw. des Polyrotaxans mit TNS zu vermeiden, wurden die Proben ultrafiltriert, um die freien CD vom verbleibenden Polyrotaxan und Polymer abzutrennen.  $\alpha$ -CD bildet mit TNS keine fluoreszierenden Einschlussverbindungen und stört daher nicht. Über eine Kalibriergerade konnte der Gehalt an freiem HP- $\beta$ -CD im Filtrat bestimmt werden. Die  $\alpha$ -CD-Stoppergruppen fädeln zu Beginn schnell ab, sodass direkt ein kontinuierliches Abfädeln von HP- $\beta$ -CD beginnt. Nach 5 Tagen ist 25 % des HP- $\beta$ -CDs wieder vom Polyrotaxan abgefädelt. Danach verlangsamt sich die Abgabe des HP- $\beta$ -CDs. Nach 30 Tagen sind knapp 50 % aller aufgefädelten CDs wieder abgefädelt und es stellt sich ein Gleichgewicht ein (Abb. 82). In diesem *in vitro* Assay wurden die freien CD nicht abgetrennt, sondern sind in der Polyrotaxan-Lösung verblieben. Im Körper würden die abgefädelten CD das Cholesterin komplexieren und somit kontinuierlich aus dem Gleichgewicht entfernt werden. Auch wäre die Verdünnung größer, was das Gleichgewicht weiter auf die Seite des dissoziierten Polyrotaxans lenken würde. Es ist demnach davon auszugehen, dass das Abfädeln *in vivo* schneller und vollständig verlaufen würde.



**Abb. 82:** Freisetzung von HP- $\beta$ -CD von 2.59 mg Polyrotaxan **PRx18** gelöst in 1 mL PBS über 50 d bei 37 °C. Die Daten wurden mit Gl. VI gefittet, wobei  $y_{\infty} = 697 \mu\text{g}$  und  $\tau = 10.5 \text{ d}$ .

Für spätere Trafficking Studien des Polyrotaxans sollte ein weiteres, strukturell analoges Polyrotaxan hergestellt werden, welches fluoreszenzaktiv ist. Die Fluoreszenzmarkierung des Polymerrückgrats stellt eine Herausforderung dar. Generell ist eine Markierung nur an den Hydroxygruppen am Ende des Polymers möglich. Der hohe sterische Anspruch von gängigen Fluorophoren würde jedoch das Auffädeln von CDs behindern. Eine Möglichkeit wäre es das Fluorophor am Ende der Polymerketten einzubauen, was erstens schwierig wäre, da das Polyrotaxan in wässriger Lösung zu dissoziieren beginnt und bei Zugabe von signifikanten Mengen (über 10 %) an organischen Lösungsmitteln wie DMF oder DMSO sofort dissoziieren würde. Zweitens würde durch die Endgruppenmarkierung des Polyrotaxans auch das Abfädeln der CDs unterbunden werden, und das Polyrotaxan könnte nicht mehr seiner eigentlichen Funktion nachkommen. Daher wurde eine Fluoreszenzmarkierung durch Funktionalisierung der Polymerkette ausgeschlossen.

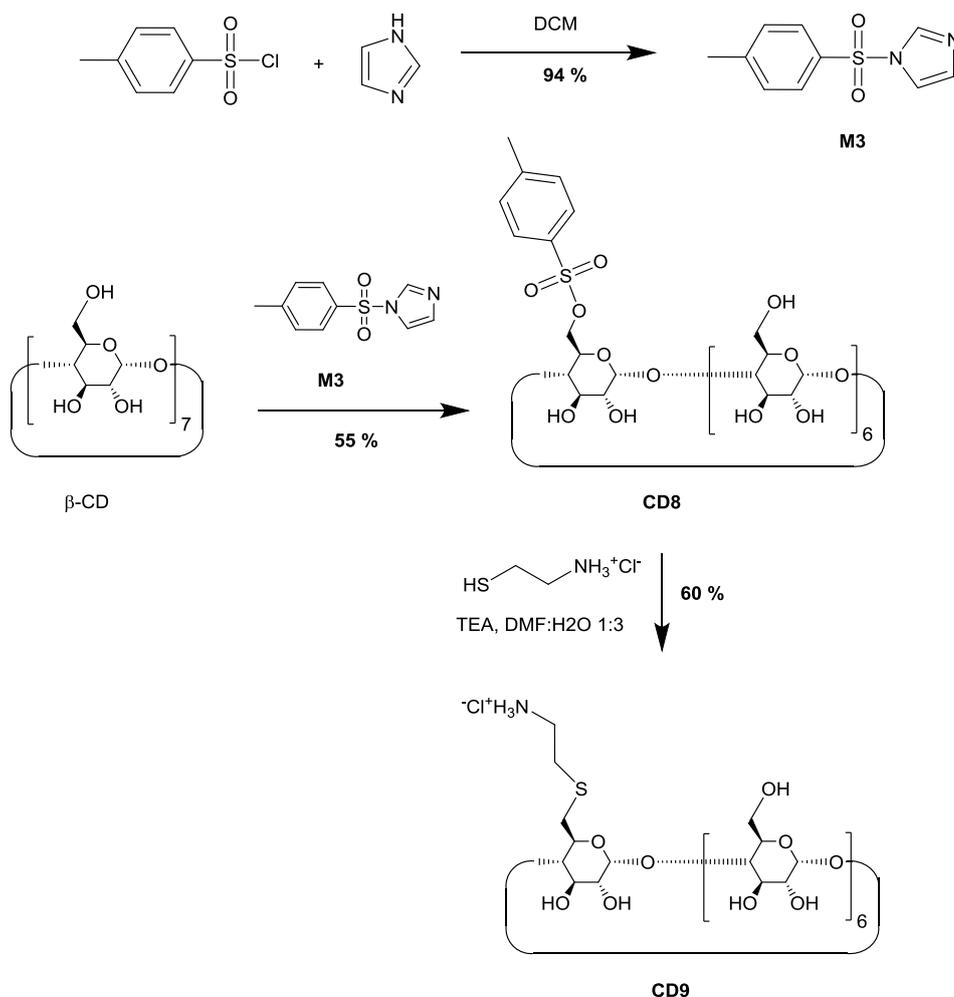
Deutlich einfacher und praktikabler gestaltet sich die Fluoreszenzmarkierung von Cyclodextrinen, die in kleiner Menge zu HP- $\beta$ -CD co-aufgefädelt werden können und somit ein fluoreszierendes Polyrotaxan bilden. Fluoreszenzmarkiertes HP- $\beta$ -CD ist zwar käuflich

erwerbbar, jedoch sehr teuer. Daher wurde ein eigenes fluoreszierendes  $\beta$ -CD-Derivat synthetisiert. Als Fluorophor wurde Fluorescein gewählt, ein Standardfluorophor, welches aufgrund seiner hohen Quantenausbeute unter anderem in der Fluoreszenzmikroskopie und bei durchflusscytometrischen Analysen Anwendung findet.<sup>274,275</sup> Das günstig erwerb- bare Fluoresceinisothiocyanat lässt sich einfach an Amine konjugieren.

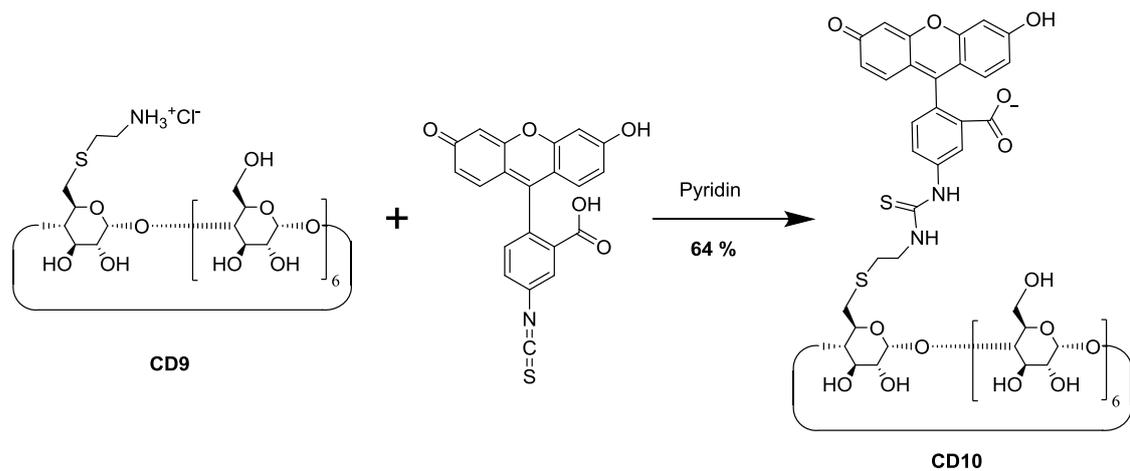
Die Synthese des CD-Derivates erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Kräuter *et al.*,<sup>52</sup> jedoch ausgehend vom Mono-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -CD (**CD9**), da gezeigt wurde, dass sich die Auffädeleigenschaften durch die zusätzliche Thioethergruppe die Auffädeleigenschaften verbessern.

Die Synthese des Mono-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -CD **CD9** erfolgte nach Steffen *et al.*,<sup>127</sup> wie in Schema 17 dargestellt. Zunächst wurde *p*-Toluolsulfonsäureimidazol **M3** hergestellt, welches im nächsten Schritt als gute Abgangsgruppe an natives  $\beta$ -CD geknüpft wurde. Im letzten Syntheseschritt wurde die Tosylgruppe durch Cysteaminyl-Hydrochlorid substituiert. Das erhaltene monosubstituierte Cyclo- dextrinderivat wurde über Ultrafiltration aufgereinigt.

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte anschließend durch Umsetzung der Aminofunktion mit Fluoresceinisothiocyanat nach Kräuter *et al.*<sup>52</sup> in Pyridin (Schema 18), das Derivat wurde ebenfalls über Ultrafiltration aufgereinigt.



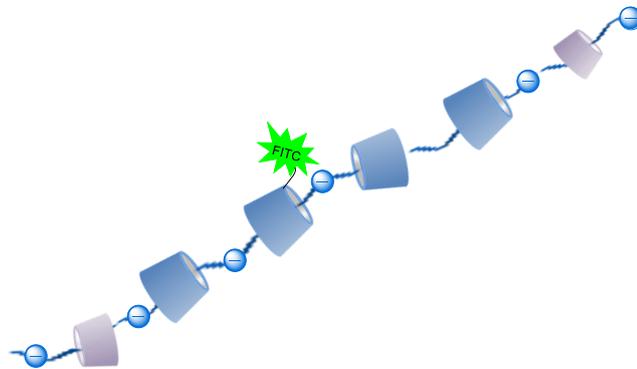
**Schema 17:** Synthese des Mono-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -CD **CD9** nach Steffen *et al.*<sup>127</sup>



**Schema 18:** Synthese des FITC-markierten CD-Derivats **CD10**.

Zur Herstellung des fluoreszenzmarkierten Polyrotaxans wurde zunächst FITC-**CD10** zur Lösung des Polymers gegeben, nach 2 h wurde HP- $\beta$ -CD zugegeben und schließlich  $\alpha$ -CD. Die Auffädzeiten und eingesetzten Konzentrationen an  $\beta$ -CD und  $\alpha$ -CD waren identisch zur Herstellung von Polyrotaxan **PRx18**. Durch das sequentielle Auffädeln sollten sich die FITC-CDs möglichst mittig auf der Kette befinden und damit erst zum Schluss abfädeln, sodass das Polyrotaxan möglichst lange fluoresziert.

Die Belegung durch HP- $\beta$ -CD wurde mittels NMR auf 21 % bestimmt, via Fluoreszenzmessung wurde die Belegung an FITC-CD auf 4 % bestimmt, was etwa 3 fluoreszierenden CDs pro Kette entspricht.



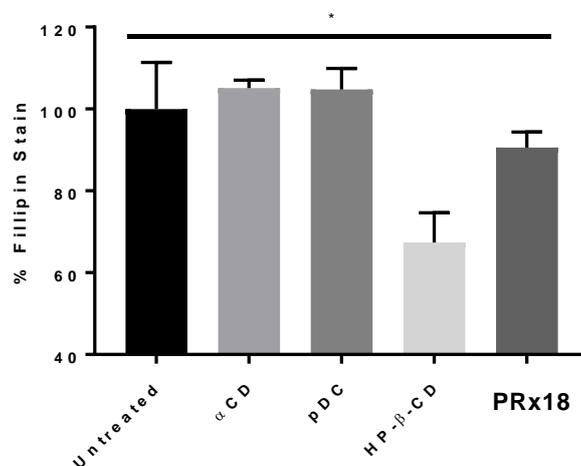
**Abb. 83:** Schematische Darstellung des FITC-markierten Polyrotaxans **PRx19**.

## 4.4 Evaluierung der biologischen Aktivität des HP- $\beta$ -CD-Polyrotaxans in NPC1-Zellen

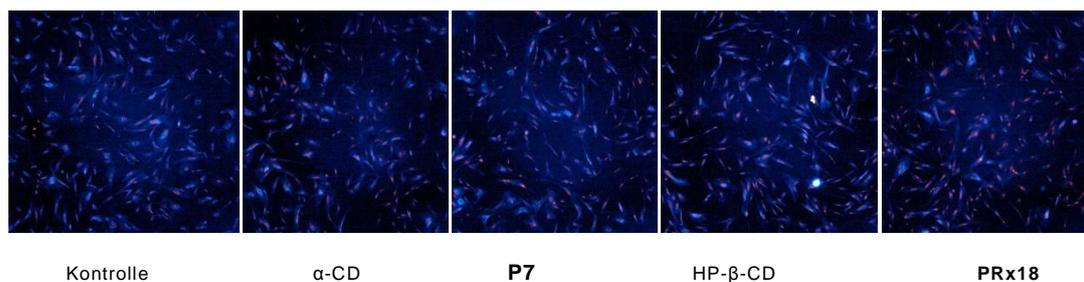
### 4.4.1 Evaluierung des therapeutischen Potentials

Das therapeutische Potential des Polyrotaxans **PRx18** wurde in primären NPC1 Fibroplasten untersucht. Die Experimente hierzu wurden von Shayak Samaddar und Prof. David Thompson an der Purdue University Lafayette (Indiana, USA) durchgeführt. Die NPC1 Zellen (1600 Zellen pro Well in 96 Well Platten) wurden über 24 h bei 37 °C mit Polyrotaxan **PRx18** inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, fixiert, mit Filipin angefärbt und der relative Anteil an Cholesterolaggregaten im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollzellen bestimmt. Die Filipin-Intensität korreliert dabei mit der relativen Cholesterol Akkumulation in den Zellen. Filipin ist eine Mischung aus Macroliden, die mit Cholesterol fluoereszierende Komplexe bilden, die auch klinisch zur Diagnose der Niemann-Pick-Krankheit eingesetzt wird.<sup>276</sup>

Bei einer Probe, die über 24 h mit einer einmaligen Dosis von **PRx18** behandelt wurde (finale Konzentration 1.825  $\mu$ M bezogen auf komplettes Polyrotaxan, 138  $\mu$ M bezogen auf die Wiederholeinheiten des Polyrotaxans, entspricht einer äquivalenten Konzentration von 25  $\mu$ M HP- $\beta$ -CD), konnte eine Reduktion der Filipin-Intensität von 10 % beobachtet werden. Als Kontrolle wurde freies  $\alpha$ -CD und Polymer **P7** untersucht, jeweils in den entsprechenden Mengen, die sich in den 1.825  $\mu$ M Polyrotaxan befinden. Für diese Substanzen wurde keine Verringerung der Filipin-Intensität beobachtet (Abb. 84 und Abb. 85). Dies entspricht den Erwartungen, da die Kavität des  $\alpha$ -CDs zu klein ist, um das Cholesterol einschließen zu können.<sup>277</sup>



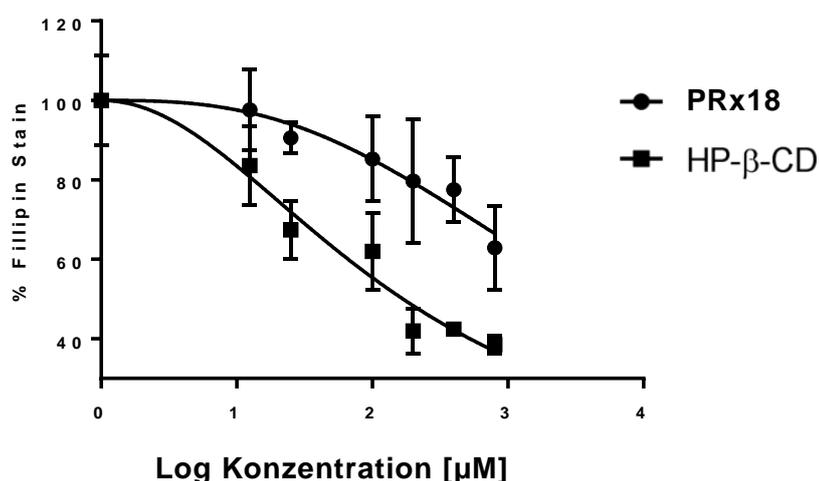
**Abb. 84:** Filipin-Färbung der primären Fibroplasten nach Behandlung mit  $\alpha$ -CD, Poly(decamethylenphosphat) **P7**, HP- $\beta$ -CD und Polyrotaxan **PRx18** über 24 h (jeweils in Konzentrationen, die einer HP- $\beta$ -CD-Konzentration von 25  $\mu$ M).



**Abb. 85:** Filipin-Färbung der primären Fibroblasten nach Behandlung mit  $\alpha$ -CD, Polymer **P7**, HP- $\beta$ -CD und Polyrotaxan **PRx18** über 24 h (jeweils in Konzentrationen, die einer HP- $\beta$ -CD-Konzentration von 25  $\mu$ M entsprechen). Die Zellkerne wurden mit NuclearRed angefärbt und die Zellen mit einem 5x Objektiv visualisiert.

Steigende Konzentrationen des Polyrotaxans reduzierten die Filipin-Intensität um 20 % bzw. 80 % für HP- $\beta$ -CD äquivalenten Dosen von 200  $\mu$ M und 800  $\mu$ M (1100  $\mu$ M und 4400  $\mu$ M bezogen auf PRx-Wiederholeinheiten), vgl. Abb. 86. Der beobachtete stärkere Effekt des freien HP- $\beta$ -CDs im Vergleich zu Polyrotaxan **PRx18** ist darauf zurückzuführen, dass das aufgefädelt HP- $\beta$ -CD nur langsam freigesetzt wird und daher nicht zu Beginn in der maximalen Konzentration vorliegt.

Insgesamt geht aus den erhaltenen Daten hervor, dass das Polyrotaxan **PRx18** nach Aufnahme in die Zellen beginnt zu dissoziieren und HP- $\beta$ -CD freigesetzt wird. Das in den Zellen aggregierte Cholesterin kann durch das freigesetzte HP- $\beta$ -CD solubilisiert und aus den Lysosomen transportiert werden, wie bereits für andere HP- $\beta$ -CD-Polyrotaxane von Collins *et al.*<sup>56</sup> beschrieben wurde. Auch wenn freies HP- $\beta$ -CD bei gleicher einmaliger Dosis im Vergleich zu Polyrotaxan **PRx18** eine stärkere Solubilisierung des Cholesterins ermöglicht, stellt das Polyrotaxan dennoch ein attraktives polymeres Prodrug dar. Einerseits zirkulieren die Polyrotaxane durch ihr hohes Molekulargewicht länger im Blut als freies HP- $\beta$ -CD, des Weiteren wird HP- $\beta$ -CD über einen langen Zeitraum in geringen Dosen abgegeben.



**Abb. 86:** Dosis-Wirkungs-Beziehung in NPC1 Zellen 24 h nach einmaliger Behandlung der Zellen mit Polyrotaxan **PRx18** und HP- $\beta$ -CD.

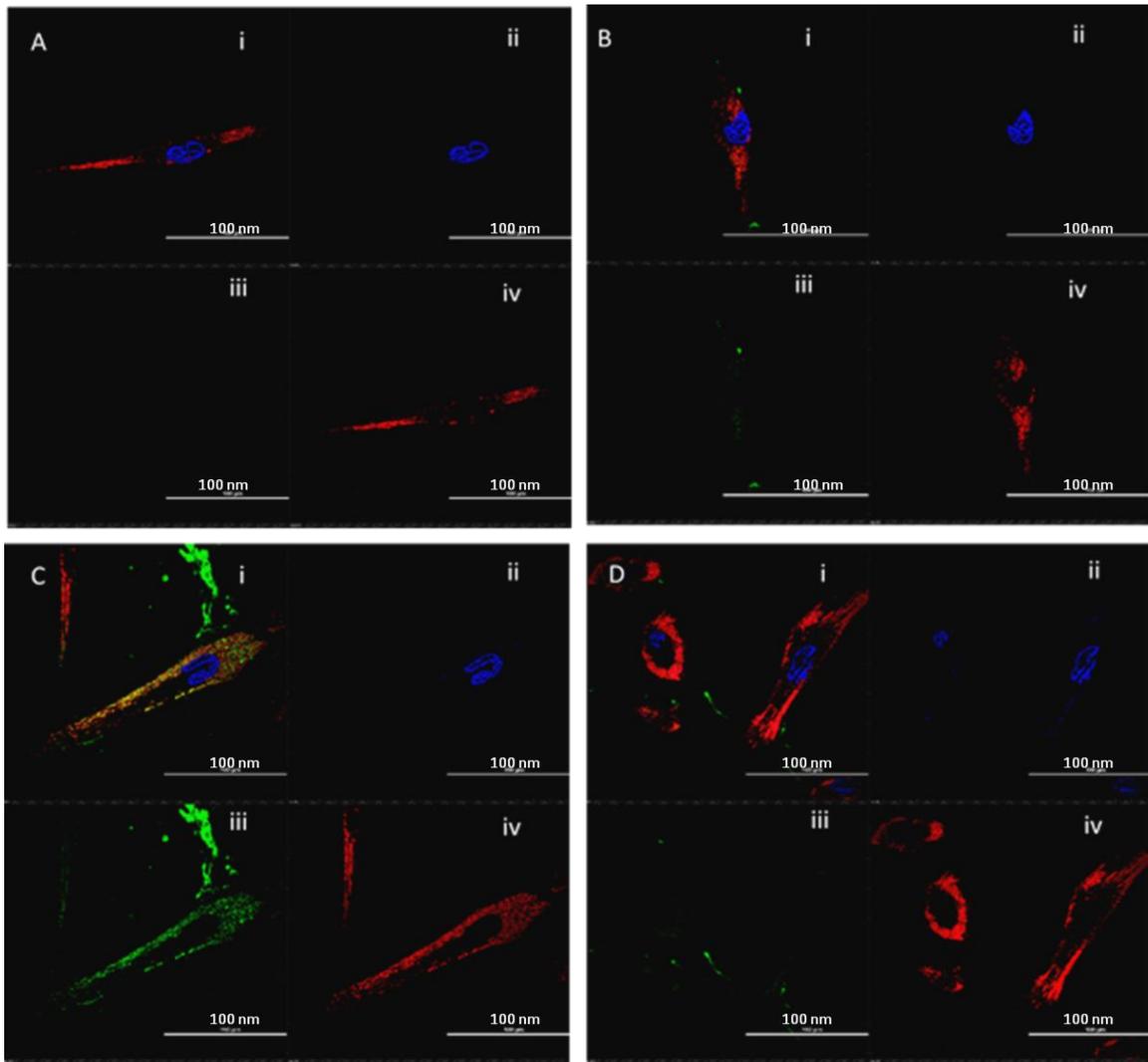
#### 4.4.2 Tracking-Studie zur Aufnahme des Polyrotaxans in NPC1 Zellen

Als weiteres Experiment wurde eine Tracking Studie durchgeführt, mit der veranschaulicht werden kann, wann das Polyrotaxan aufgenommen wird und wie lange es sich an welchem Ort in der Zelle aufhält. Die Zellen wurden hierzu wieder mit 25  $\mu$ M HP- $\beta$ -CD-Äquivalent des FITC-markierten Polyrotaxans **PRx19** behandelt. Es wurden nach 4 h und 24 h jeweils die Zellkerne sowie die Lysosome mit NuclearRed bzw. DAPI gefärbt. Ebenso wurden die Zellen nach 24 h Inkubationszeit gewaschen, um nicht aufgenommenes Polyrotaxan zu entfernen, und weitere 24 h später wurde ein zweites Bild aufgenommen. Die Aufnahmen sind in Abb. 87 dargestellt.

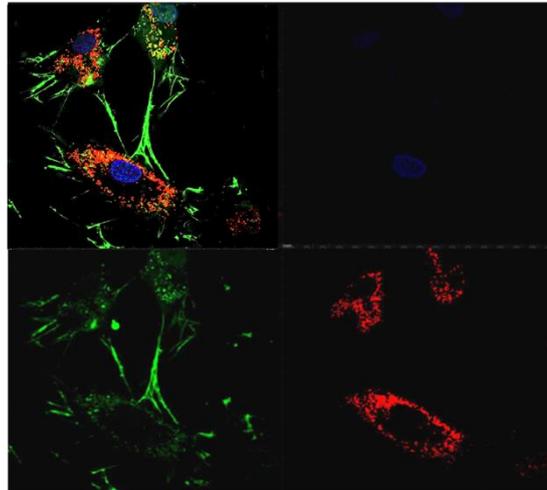
Nach 4 h beginnen die Zellen, das Polyrotaxan aufzunehmen, jedoch ist das Polyrotaxan lediglich in den nicht-aciden Vesikeln zu lokalisieren, also Bereichen, die nicht durch den LysoTracker angefärbt wurden, vermutlich Endosomen in einem früheren Reifegrad.<sup>278,279</sup>

Eine signifikante Aufnahme der Polyrotaxane ist nach 24 h zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Polyrotaxane in den aciden, späten endosomalen bzw. lysosomalen Bereichen (Abb. 87C). Weiterhin ist zu diesem Zeitpunkt eine starke Assoziation des Polyrotaxans mit der extrazellulären Matrix zu beobachten. Die PRx-Aggregate wurden nur in den dichten Zellbereichen beobachtet und nicht in dünn besiedelten Bereichen. Eine Adsorption des anionischen Polyrotaxans an der ebenfalls anionischen Glasoberfläche ist auszuschließen. Besonders gut ist das FITC-Signal in Abb. 88 zu sehen, in der für Fibronectin charakteristischen Struktur.

24 h nach Entfernen des nicht aufgenommenen Polyrotaxans wurden die Zellen erneut abgebildet, um den Verbleib der bereits internalisierten Polyrotaxane zu untersuchen. Die zu diesem Zeitpunkt aufgenommenen Bilder zeigen eine deutliche Verringerung des FITC-Signals. Es ist davon auszugehen, dass die Cyclodextrine aus den endosomalen/lysosomalen Bereichen der Zelle ausgetreten sind und dass das Fluorophor damit stark verdünnt wurde.



**Abb. 87:** NPC1-Zellen, behandelt mit 25  $\mu\text{M}$  HP- $\beta$ -CD-Äquivalenten des FITC-markierten Polyrotaxans **PRx19** in Opti-MEM Medium. (A) unbehandelte Zellen, (B) nach 4 h Behandlung mit **PRx19**, (C) 24 h nach Behandlung mit **PRx19** und (D) C+24 h nach Behandlung. (i) alle Fluoreszenzen, (ii): DAPI-Kanal, (iii) Fluorescein-Kanal, (iv) LysoTracker-Kanal). Die Lokalisierung des Polyrotaxans in den aciden Endosomen/Lysosomen (mit LysoTracker rot gefärbt) ist nach 24 h zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen gewaschen, um nicht aufgenommenes Polyrotaxans **PRx19** zu entfernen, und wurden weitere 24 h in Vollmedium (MEM) inkubiert. Auf den nach 24 h aufgenommenen Konfokalbildern ist eine deutliche Verringerung des FITC-Signals zu beobachten, vermutlich durch die starke Verdünnung der FITC-CD im Cytoplasma. Der Größenbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

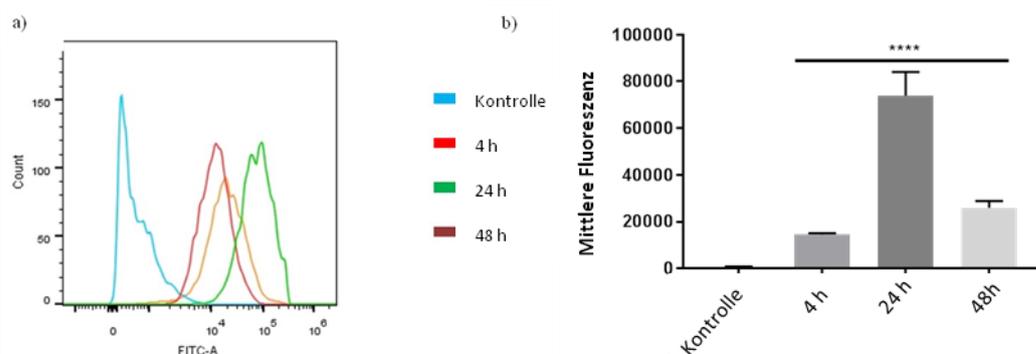


**Abb. 88:** NPC1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  HP- $\beta$ -CD Äquivalent **PRx19** in Opti-MEM Medium. Zu sehen ist das FITC-Signal in der charakteristischen Struktur von Fibronectin.

#### 4.4.3 FACS-Analyse zur Untersuchung der Aufnahme und Ausscheidung des Polyrotaxans in NPC1 Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit dem FITC-markierten Polyrotaxans **PRx19** behandelt und nach 4 h, 24 h sowie 24 h nach Waschen (entspricht  $t = 48$  h) durchflusszytometrisch analysiert. Diese Methode erlaubt es, das Fluoreszenzsignal von einzelnen Zellen zu analysieren und gibt damit an, in wie vielen Zellen zum Zeitpunkt der Analyse ein FITC-Signal zu detektieren war, d.h. in welche Zellen das Polyrotaxan aufgenommen wurde bzw. wieder abgebaut oder ausgeschieden wurde.

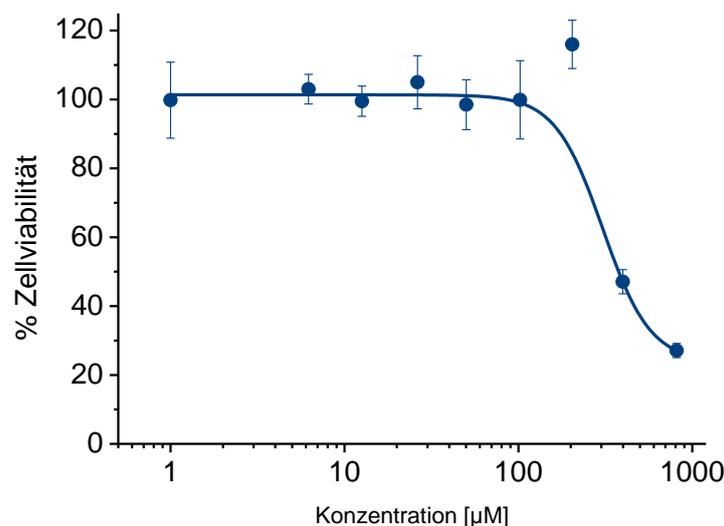
Die erhaltenen Daten sind in Abb. 89 dargestellt, sie stimmen mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen überein. Nach 4 h beginnen die Zellen, das Polyrotaxan zu internalisieren und zeigen eine leichte Fluoreszenz. Nach 24 h ist die FITC-Intensität in den Zellen deutlich angestiegen, wohingegen das Signal nach 48 h nur noch 30 % der ursprünglichen Intensität entspricht. Das bedeutet, dass die Cyclodextrine aus den lysosomalen/endosomalen Bereichen austreten und im Cytoplasma verdünnt werden.



**Abb. 89:** a) Histogramm Plot der FITC-Intensitätsverteilung der NPC1-Zellpopulation, b) Aufnahme und Ausscheidung bzw. Abbau des Polyrotaxans **PRx19** in NPC1-Zellen.

#### 4.4.4 Toxizität des Polyrotaxans im MTT-Assay und Evaluierung der Acetylcholinesterase-Hemmung des Polyrotaxans

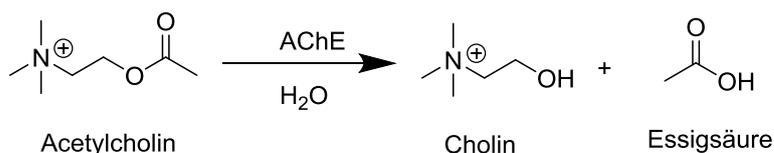
In einem MTS-Assay wurde außerdem die Cytotoxizität des Polyrotaxans **PRx18** untersucht (Abb. 90). Ein Einbruch der Zellviabilität ist ab 200  $\mu\text{M}$  HP- $\beta$ -CD Äquivalenten zu beobachten. Die akute Toxizität des Polyrotaxans könnte Tensid-Effekten des amphiphilen Polymers zuzuschreiben sein. Die Abbauprodukte des Polymers (Phosphorsäure und 1,10-Decandiol) sind jedoch mindertoxisch.



**Abb. 90:** Zellviabilität von NPC1 Zellen nach 24 h Exposition des Polyrotaxans **PRx18**, Konzentration aufgetragen in  $\mu\text{M}$  HP- $\beta$ -CD Äquivalenten.

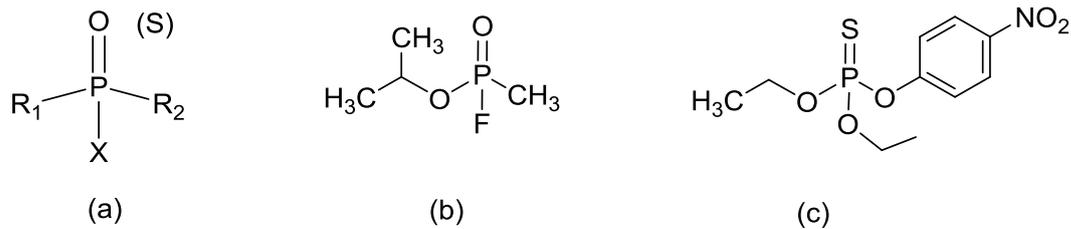
Die Phosphat Struktur des Polymers (und damit auch des Polyrotaxans) wurde aufgrund seiner potentiellen hohen Biokompatibilität gewählt, die mit struktureller Ähnlichkeit mit im Körper natürlich vorkommenden Phosphorsäureestern, beispielsweise Phospholipiden, begründet wurde. Dennoch gibt es organische Phosphorverbindungen, die bekannt dafür sind, die Acetylcholinesterase (AChE) zu hemmen, und damit hochtoxisch zu wirken. Da in der Therapie der Niemann-Pick Krankheit hohe Dosen an Wirkstoff verabreicht werden müssen, soll im Folgenden untersucht werden, ob das Phosphatpolymer die AChE hemmt.

Die Acetylcholinesterase ist ein hydrolytisches Enzym, welches in vielen Teilen des Körpers vorkommt, vor allem im Gehirn und in Nervenzellen, aber auch in Muskeln und in der Lunge.<sup>280</sup> Die AChE spielt eine essentielle Rolle bei der Transmission von Nervenimpulsen.<sup>281,282</sup> Konkret spaltet das Enzym in den Synapsen den kationischen Neurotransmitter Acetylcholin in Cholin und Acetat, wobei das Acetat sofort zur Essigsäure protoniert wird (Schema 19). Die AChE zählt zu den Enzymen mit der höchsten Umsatzgeschwindigkeit, für das physiologische Substrat Acetylcholin wurde  $k_E > 10^8 \text{ M}^{-1}$  bestimmt.<sup>283</sup>



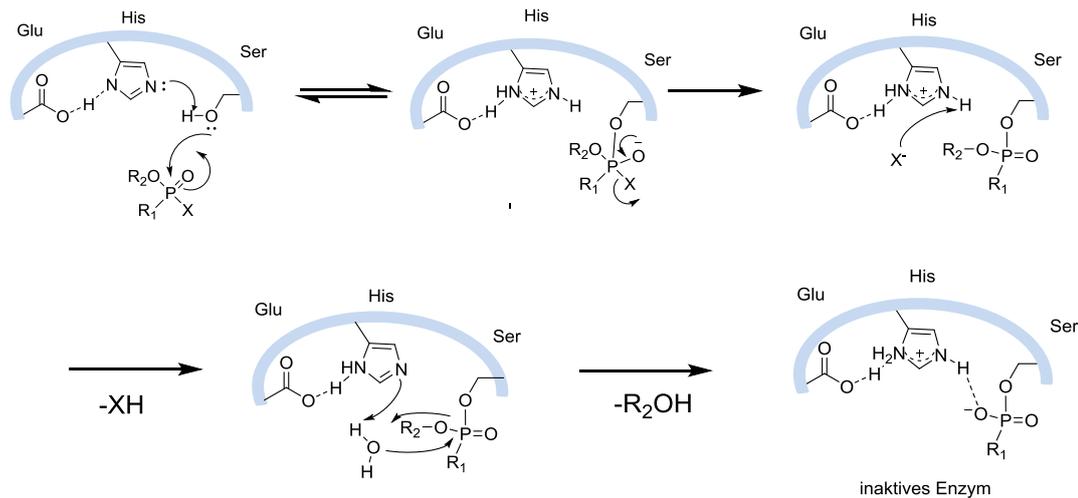
**Schema 19:** Enzymatische Hydrolyse des Acetylcholins.

Bei Hemmung des Enzyms kann Acetylcholin nicht mehr abgebaut werden und das Acetylcholin-Level im postsynaptischen Spalt steigt an. Dies führt Dauererregung der postsynaptischen Membran. Grundsätzlich werden zwei Arten von AChE-Hemmern unterschieden: reversible und irreversible Hemmer. Reversible Inhibitoren verfügen über Carbamat- oder quartäre und tertiäre Ammoniumgruppen. Sie finden gezielt Anwendung als Therapeutika bei diversen Krankheiten. Bekannte AChE-Inhibitoren, die in der Therapie der Alzheimer Krankheit eingesetzt werden, sind beispielsweise Donepezil, Galantamin und Rivastigmin.<sup>284,285</sup> Irreversible Hemmer der AChE sind Phosphorsäureester, deren allgemeine Struktur sowie zwei Beispiele in Abb. 91 dargestellt ist.



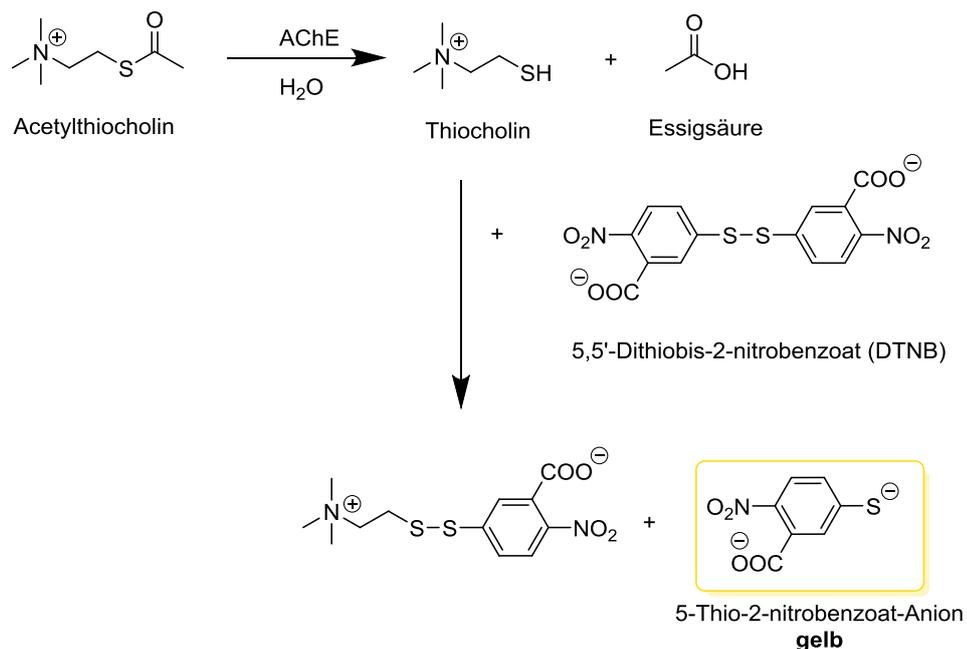
**Abb. 91:** (a) Allgemeine Struktur der AChE-hemmenden Phosphorsäureester, (b) Sarin (c) Parathion (E605).

$R_1$  und  $R_2$  sind Alkyl oder Arylgruppen, wobei die Reste auch über einen Sauerstoff oder Schwefel an das Phosphoratom gebunden sein können. Möglich sind auch substituierte oder unsubstituierte  $-NH_2$ -Reste. Die Gruppe X, die ebenfalls wieder über Sauerstoff oder Schwefel an das Phosphoratom gebunden ist, kann ein Halogen oder beliebiger aliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest sein. Diese Gruppe ist die Abgangsgruppe, die durch Proteine, z.B. Phosphotriesterasen abgespalten werden kann. Diese Phosphorsäureester sind Substratanaloga zum physiologischen Acetylcholin und passen daher ins katalytische Zentrum der AChE und binden kovalent an das Serin. Die Organophosphorverbindung wird nach dem klassischen Weg gespalten und das Enzym wird dabei phosphoryliert. Während die Acylgruppe schnell abgespalten wird und das freie Enzym wieder hergestellt wird, ist die Dephosphorylierung des Enzyms sehr langsam, sodass kein Acetylcholin mehr gespalten werden kann.<sup>286</sup> Der Mechanismus ist in Schema 20 dargestellt. Typische Symptome einer akuten Organophosphat-Vergiftung sind Schwindel, Sehstörungen, Krampfanfälle. Im schlimmsten Fall kann es zu Herzversagen kommen.<sup>284,287</sup>



**Schema 20:** Mechanismus der Hemmung des Enzyms durch Organophosphorverbindungen, nach Kwong *et al.*<sup>286</sup>

Jedoch hemmen nicht alle Phosphorverbindungen die Acetylcholinesterase. Einige kommen sogar natürlich im Körper vor (z.B. Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol). Zur Bestimmung der Aktivität der AChE wird ein spektroskopischer enzymatischer Assay durchgeführt nach Ellman *et al.*<sup>280</sup> Das Prinzip des Assays ist in Schema 21 dargestellt.



**Schema 21:** Prinzip des AChE-Aktivitätsassays nach Ellman *et al.*<sup>75</sup> nach <sup>83</sup>.

Die AChE wird zunächst mit dem potentiellen Hemmstoff inkubiert. Im nächsten Schritt wird 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) zugegeben und schließlich das Substrat (Acetylthiocholiniodid, AChI). Das durch enzymatische Spaltung des AChI entstandene Thiocholin reagiert mit DTNB, dabei wird das intensiv gelbe 5-Thio-2-nitrobenzoat-Anion freigesetzt. Die Farbintensität kann spektrometrisch bei 412 nm bestimmt werden und ist proportional zur Menge an ungesetztem Substrat und damit proportional zur Aktivität der AChE. Mit steigender Menge an Zellhomogenat (und damit auch an AChE) steigt die Ab-

sorption, die proportional zur Menge an umgesetztem Substrat und zur Aktivität der AChE ist.<sup>280,288</sup>

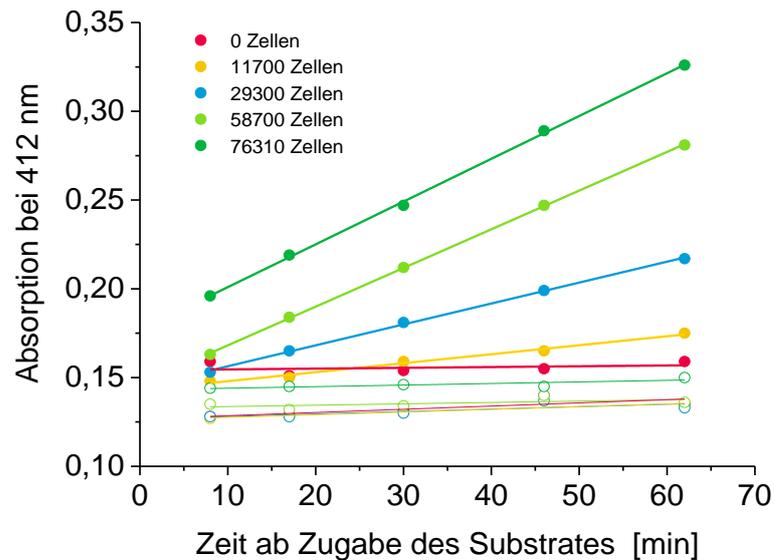
Dieser Assay ist ein schneller und empfindlicher Test, der bereits sehr geringe enzymatische Aktivitäten der AChE detektieren kann. Grundsätzlich können sowohl Blutproben, Plasma, Gewebe- und Zelllysate für den Test verwendet werden. Da die AChE ein membrangebundenes Protein ist,<sup>283</sup> kann der Aktivitätstest auch einfach mit einem Zellhomogenat durchgeführt werden.

Die Expression der AChE in den bereits verwendeten Zelllinien ist laut Protein Atlas sehr gering. Besser geeignet sind beispielsweise CACO-2, U2OS, MCF-7 oder SH-SY5Y, da diese Zelllinien eine starke Expression der AChE zeigen.<sup>280</sup> Da der Assay jedoch nicht zwischen von AChE und Butyrylcholinesterase (BChE) gespaltenem AChI unterscheidet, ist es vorteilhaft, neuronale Zellen zu verwenden, da diese im Gegensatz zu beispielsweise Leberzellen eine viel stärkere Expression der AChE im Vergleich zur BChE zeigen<sup>289</sup> und somit der Anteil des von BChE gespaltenem AChI vernachlässigt werden kann.

Für dieses Experiment wurden SH-SY5Y verwendet, eine humane neuronale Zelllinie, die aus dem Neuroblastom eines weiblichen vierjährigen Patienten aus dem Knochenmark entnommen und wurde erstmals 1973 beschrieben wurde.<sup>290,291</sup> SH-SY5Y Zellen werden seitdem gerne für Neurotransmitter-Studien verwendet<sup>292,293</sup>, beispielsweise als Zellmodell für die Parkinsonkrankheit.<sup>294</sup> Des Weiteren wurden diese Zellen bereits dazu verwendet, die Toxizität von Organophosphorverbindungen zu bestimmen.<sup>295</sup>

Im Folgenden wurde demnach das Homogenat von SH-SY5Y Zellen eingesetzt (erhalten von AK Prof. Dr. Uli Müller, Universität des Saarlandes), um die mögliche Hemmung der AChE durch das Polyphosphat zu untersuchen. In Vorversuchen wurde zunächst die optimale Menge an Zellhomogenat ermittelt, sowie die nötige Inkubationsdauer bis zum Auslesen des Assays. Es wurde hierzu über einen Zeitraum von einer Stunde in definierten regelmäßigen Abständen die Absorption von 5 Ansätzen mit 0 und ca. 11 700, 29 300, 58 700 und 76 310 homogenisierten Zellen bestimmt. Für den Testansatz ohne Zellhomogenat wurde stattdessen die entsprechende Menge an Phosphatpuffer (pH 8) eingesetzt. Thioester sind im Vergleich zu Oxyestern eher instabil und können daher spontan hydrolysieren. Dieser Ansatz diente dazu, den Anteil an spontan hydrolysiertem AChI im Vergleich zum enzymatisch gespaltenen AChI zu bestimmen, s. Abb. 92.

Weiterhin wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen lediglich das DTNB-Reagenz mit Zellhomogenat inkubiert wurde, da DTNB ebenfalls durch basische Hydrolyse zum gelben TNB<sup>2-</sup>-Ion reagieren kann.<sup>296</sup> Der Anteil an spontan hydrolysiertem DTNB-Reagenz wurde somit getrennt bestimmt und anschließend von der Gesamtabsorption abgezogen.



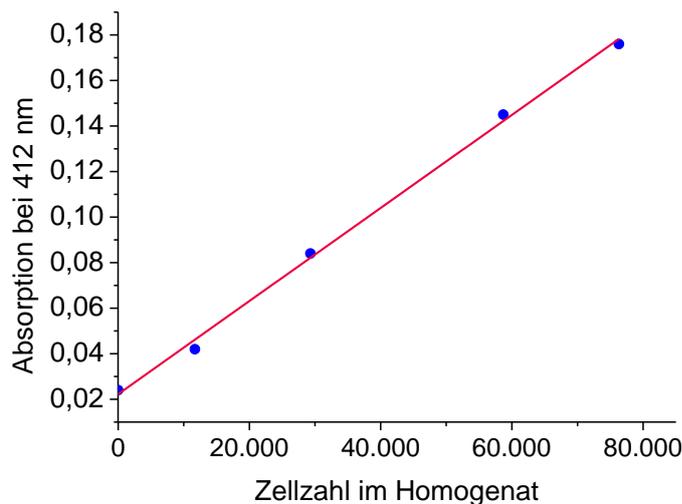
**Abb. 92:** Zunahme der Absorption mit steigender Reaktionsdauer zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit sowie der Evaluierung der spontanen Hydrolyse des DTNB (gestrichelte Linien).

Beim Testansatz ohne Zellhomogenat (rot), wobei nur die spontane Hydrolyse des AChI bestimmt wurde, ist innerhalb einer Stunde keine Änderung der Absorption zu beobachten. Außerdem ist die Konzentration an AChI (und auch DTNB) in jedem Ansatz des Experiments identisch. Daher wurde die spontane Hydrolyse des AChI im Folgenden vernachlässigt.

Bei den Testansätzen ohne AChI (gestrichelte Linien), bei denen die Hydrolyse des DTNBs untersucht wurde, zeigt sich eine leichte Erhöhung der Absorptionswerte im Verlauf der Zeit. Daher muss dieser Faktor im Folgenden berücksichtigt werden, sodass jeweils pro Ansatz der Anteil an spontan hydrolysiertem DTNB-Reagenz getrennt bestimmt wurde (identischer Ansatz ohne Substrat) und anschließend von der Gesamtaborption abgezogen wurde.

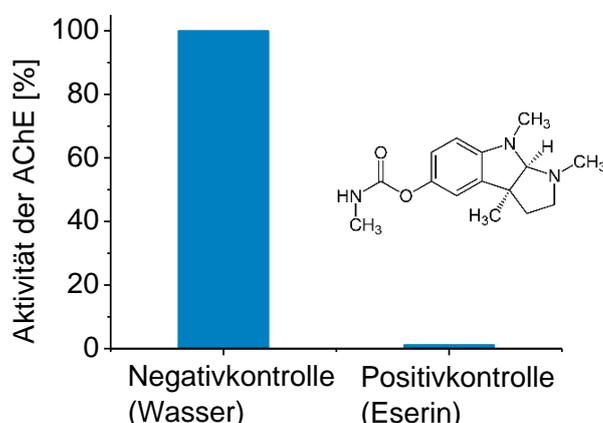
Die Ansätze mit Zellhomogenat, DTNB und Substrat steigt die Menge an umgesetztem Substrat wie zu erwarten mit der Reaktionsdauer linear an (Abb. 93). Als optimale Reaktionsdauer wurden 60 min festgelegt.

Wie zu erwarten steigt die Umsatzgeschwindigkeit mit der Anzahl der homogenisierten Zellen. (Vgl. Auftragung nach 60 min). Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0 bis 78 000 homogenisierten Zellen steigt die Absorption linear an. In diesem Bereich liegt folglich keine Sättigung des Enzyms durch das Substrat vor. Im Folgenden wurde jeweils mit 50 000 homogenisierten Zellen pro Ansatz gearbeitet.



**Abb. 93:** Lineare Abhängigkeit der Absorption von der Anzahl der Zellen im Homogenat.

Als nächstes wurde die Inhibition des Enzyms AChE mit einem Standardinhibitor der AChE untersucht. Hierzu wurde Eserin, auch als Physostigmin bezeichnet, verwendet. Eserin muss in Wasser gelöst werden und darf nicht in DMSO gelöst werden (wie teilweise in der Literatur beschrieben wurde<sup>297,298</sup>), da auch DMSO ein Inhibitor der AChE ist. Bereits 0.26 bis 4 vol% DMSO hemmen die Aktivität der AChE um 20 bzw. 80 %.<sup>299,300</sup> Die erfolgreiche Hemmung der AChE mit einer 10 mM Eserin-Lösung in Wasser im Vergleich zur Positivkontrolle (nur Wasser) ist in Abb. 94 dargestellt. Die finale Eserin-Konzentration im Testansatz war 1 mM.



**Abb. 94:** Positiv- und Negativkontrolle: Hemmung der AChE mit Eserin (finale Konzentration im Testansatz: 1 mM)

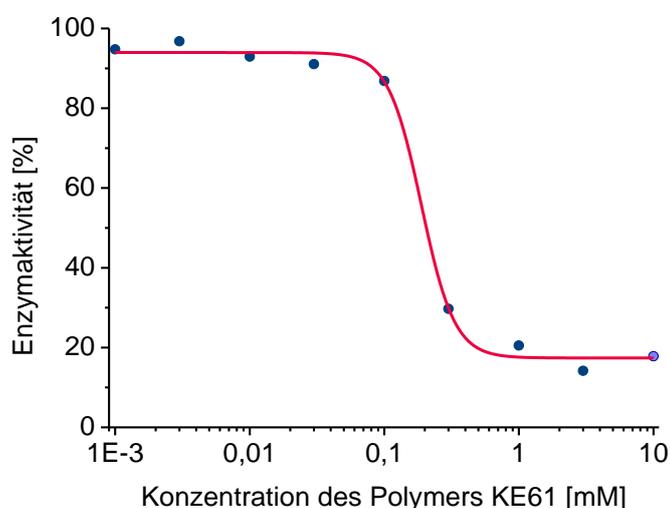
Die optimalen Bedingungen für den Assay sind demnach eine Zellzahl von 50 000 Zellen und eine Inkubationszeit von 60 min. Es wurde sichergestellt, dass in diesem Bereich keine Sättigung des Enzyms vorliegt, und eine Hemmung mit einem gängigen Hemmstoff funktionierte. Unter den optimalen Bedingungen wurde als nächstes die Aktivität der AChE in Anwesenheit des zu untersuchenden Polyalkylenphosphats **P7** untersucht werden.

Es wurden hierzu halblogarithmische Konzentrationen von **P7** und **PRx18** im finalen Konzentrationsbereich von 1  $\mu$ M bis 10 mM getestet. Das Ergebnis ist in Abb. 95 und

Abb. 96 dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch Plotten mit der Hill-Funktion (Gleichung VII). Sie beschreibt den Zusammenhang zwischen der Konzentration  $c$  des Inhibitors und dem zu beobachtenden Effekt  $E$  in einer nichtlinearen Regression. Dabei ist  $E_{max}$  definiert als der maximale Effekt, der durch den Inhibitor im gegebenen System erzielt werden kann,  $EC_{50}$  ist die Konzentration die den halben maximalen Effekt hervorruft (geometrisch: die halbe Höhe der Kurve) und  $H$  beschreibt den Hillkoeffizienten (geometrisch ein Faktor, der die Steigung der  $E/c$  Kurve am Mittelpunkt beschreibt).<sup>301,302</sup>

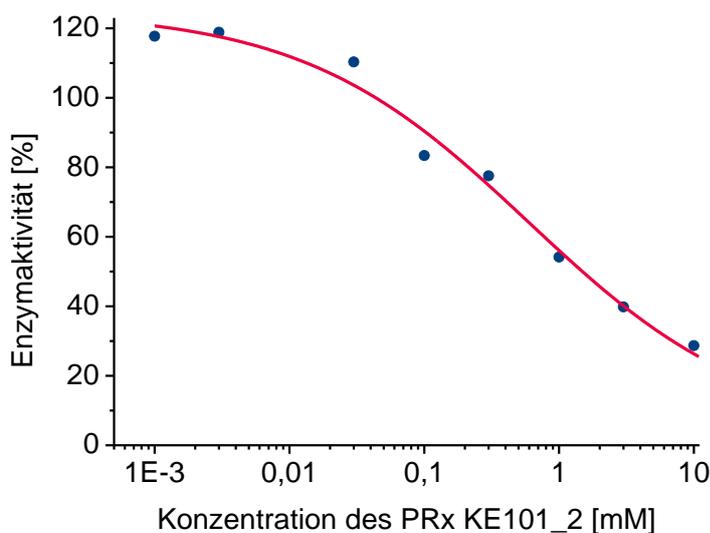
$$E = E_{max} \cdot \frac{c^H}{c^H + (EC_{50})^H} \quad \text{Gl.(VIII)}$$

In diesem Fall ist der beobachtete Effekt die Inhibition der AChE, damit wird  $EC_{50}$  als  $IC_{50}$  definiert. Die Hemmung der AChE ist ab  $IC_{50} = 0.190 (\pm 0.02)$  mM zu beobachten für **P7**, ab  $IC_{50} = 0.600 (\pm 0.2)$  mM für **PRx18**.



**Abb. 95:** Enzymaktivität der AChE in Anwesenheit des Polyalkylenphosphats **P7**, gefittet mit einer Hill Funktion. Dabei ist  $E_{min} = 94.0 \%$ ,  $E_{max} = 17.2 \%$ ,  $H = 3.51$  und  $IC_{50} = 0.189$  mM.

Der Messpunkt bei  $c = 10$  mM wurde maskiert, da hier die Löslichkeitsgrenze des Polyanions im Phosphatpuffer erreicht war (die Trübung des Ansatzes führte zu erhöhten Absorptionswerten).



**Abb. 96:** Enzymaktivität der AChE in Anwesenheit des Polyrotaxans **PRx18**, gefittet mit Gl. (VIII). Dabei ist  $E_{min} = 125 \%$ ,  $E_{max} = 3.4 \%$ ,  $H = 0.52$  und  $IC_{50} = 0.593 \text{ mM}$ .

Gängige Inhibitoren der AChE haben – je nach Testbedingungen und verwendeten Zellen bzw. Gewebe –  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich: Eserin beispielsweise zwischen 22 und 70 nM, Donepezil zwischen 14 und 23 nM.<sup>303,304</sup>

Ein Vergleich des bestimmten  $IC_{50}$  für das vorliegende Polymer mit andern phosphathaltigen Polymeren erweist sich als nicht einfach, da oftmals die genauen Testbedingungen nicht angegeben sind. Diese können einen erheblichen Einfluss auf den bestimmten  $IC_{50}$  Wert haben. Beim Vergleich mit strukturell ähnlichen Phosphonatpolymeren von Wurm *et al.*<sup>305</sup> (s. Abb. 97) wurden für beide Polymere bis zu den höchsten getesteten Konzentrationen von 3.5 mM (bezogen auf die Wiederholeinheiten des Polymers) keine Inhibition der AChE festgestellt.<sup>305</sup>



**Abb. 97:** Phosphonat-Polymere nach Wurm *et al.*<sup>305</sup>

Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht. Auch ist nicht angegeben, ob das isolierte Enzym verwendet wurde oder Zellen bzw. Zellhomogenat, und von welcher Zelllinie. Das Polyrotaxan **PRx18** hat einen etwa dreimal höheren  $IC_{50}$ -Wert als das Polymer **P7** selbst. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass das mit CD besetzte Polyrotaxan deutlich schlechter in die katalytische Kavität des Polymers passt, und deswegen eine geringere Hemmung des Enzyms bewirkt. Weiterhin verläuft die Hill-Funktion bei **PRx18** sehr flach, sodass der Fehler bei der Bestimmung des  $IC_{50}$ -wertes nicht unerheblich ist.

Es ist auch denkbar, dass die Hemmung der AChE durch das Polymer **P7** nicht durch irreversible Bindung der Phosphatgruppe im katalytischen Zentrum bedingt ist, sondern dass das Protein möglicherweise durch die tensidischen Effekte der C10-Alkylketten abgeschirmt ist, sodass AChE nicht mehr ins katalytische Zentrum gelangen kann.

Die Abschätzung der therapeutisch wirksamen Konzentration wurde anhand folgender Überlegungen durchgeführt:

Eine übliche Dosis HP- $\beta$ -CD entspricht beispielsweise 2.5 g/kg Körpergewicht<sup>250</sup>, das entspricht bei einem durchschnittlichen Niemann-Pick Patienten von 4 Jahren und einem Körpergewicht von 20 kg einer Dosis von 50 g und bei 60 kg einer Dosis von 150 g HP- $\beta$ -CD. Der Massengehalt an HP- $\beta$ -CD des PRx ist 50 %, d.h. eine entsprechende Dosis, um dieselbe Menge HP- $\beta$ -CD zu erreichen entspräche theoretisch 100 g PRx.

Nach dem Konzept des Polyrotaxans als makromolekulare Prodrug soll eine sehr viel geringere Dosis nötig sein, da der Verlust durch renale Ausscheidung des HP- $\beta$ -CDs durch das hohe Molekulargewicht des Polyrotaxans weitgehend ausgeschlossen werden kann. Daher würden vermutlich 1/100 bis 1/1000 der ursprünglichen Dosis ausreichen, um im Organismus dieselben Effekte zu erzielen. Das entspräche einer PRx-Dosis von 0.1 bis 1 g PRx, welches auf ein Blutvolumen von ca. 1.6 L verteilen würde.<sup>306</sup> Das Polyrotaxan würde folglich final idealerweise in einer Konzentration um 125  $\mu$ M vorliegen. Wie im MTS-Assay bestimmt läge diese Konzentration unterhalb des LC<sub>50</sub>-Wertes des Polyrotaxans (ca. 400  $\mu$ M), und auch gerade noch unterhalb des IC<sub>50</sub> des Polyrotaxans (Abb. 96). Mit dem Massengehalt von 50 % entspräche die berechnete nötige Wirkstoffkonzentration einer Polymerkonzentration von 50  $\mu$ M. Diese Konzentration liegt in einem Bereich, in dem keine inhibitorischen Effekte des Polymers festgestellt werden konnte (Abb. 95).

Gemäß diesen Ergebnissen wäre ein Einsatz des Polyrotaxans in der Therapie der Niemann-Pick-Krankheit aus toxikologischer Sicht grundsätzlich möglich. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass *in vitro* Assays nur begrenzte Informationen über die tatsächlichen toxikologischen Effekte in einem Organismus liefern und nur als erste Abschätzung der akuten Toxizität dienen. Offem bleibt ebenfalls die Frage, wie lange das Polyrotaxan im Organismus als solches vorliegt, und über welchen Zeitraum es in die ungiftigen Abbauprodukte hydrolysiert wird.

## 4.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die Synthese eines neuen HP- $\beta$ -CD-Polyrotaxans beschrieben und das Potential des Konstrukts zur Normalisierung des Cholesterolspiegels in NPC1-Zellen untersucht. Das Polymer wurde in einer Kondensationsreaktion durch anschließende polymeranaloge Oxidation erhalten. Der Polymerisationsgrad war 76. Durch sequentielles Auffädeln von HP- $\beta$ -CD und  $\alpha$ -CD als Stoppergruppen wurde ein Polyrotaxan mit einer Belegung von 18% HP- $\beta$ -CD und 3%  $\alpha$ -CD erhalten. Eine Konzentration von 0.3 g/L des Polyrotaxans über 24 h bewirkte eine Reduktion des Filipin-Signals um 20 %, was auf einen Abbau des aggregierten Cholesterols hinweist. Die Ergebnisse sind damit ähnlich zu den Ergebnissen von Mondjinou *et al.*<sup>57</sup> für gemischte HP- $\beta$ -CD:SBE- $\beta$ -CD Pluronic Polyrotaxane. Insgesamt ist das hergestellte Polyrotaxan damit ein geeignetes polymeres Prodrug für den Transport von HP- $\beta$ -CD in Niemann-Pick Typ C Zellen und eventuell später im Patienten.

Ein wesentlicher Vorteil des vorgestellten Polyrotaxans im Vergleich zu bereits existierenden Systemen ist das besonders einfache Abfädeln der HP- $\beta$ -CDs vom Polymer. Es sind keine enzymatischen Vorgänge nötig, um kovalente Stoppergruppen abzuspalten. Ferner wird vom Polyrotaxan aufgrund seiner hohen molekularen Masse von ca. 35 kDa eine außerordentlich lange Zirkulationszeit im Organismus erwartet.

Im nächsten Schritt wäre eine Erweiterung des Systems durch eine Targetfunktionalisierung denkbar. Diese könnte über kovalentes Anknüpfen eines zellspezifischen Targetmoleküls an CD erfolgen, die auf das Polymer coaufgefädelt werden könnten. Über targetvermittelte Endocytose könnten die Polyrotaxane dann spezifisch in die Zellen aufgenommen werden, bei denen eine Dysfunktion der NPC1 Proteine vorliegt. Die Nebenwirkungen von HP- $\beta$ -CD auf gesunde Zellen wären somit minimiert.

Langfristig wären Experimente am Tiermodell sehr aufschlussreich, da nur so realistische Ergebnisse für die Wirkung des Polyrotaxans in einem NPC-defizienten Organismus erhalten werden können. Zu untersuchen wären hierbei zunächst die Zirkulation des Polyrotaxans im Organismus und seine akute Toxizität. Eine weitere zentrale Frage wäre, ob und über welchen Zeitraum das Polymer abgebaut wird und über welchen Zeitraum HP- $\beta$ -CD im Organismus freigesetzt wird. Final wäre das entscheidende Experiment eine über mehrere Wochen angelegte Studie, bei der evaluiert wird, wie oft und in welchen Dosen das HP- $\beta$ -CD-Polyrotaxan gegeben werden muss, um die gewünschte Wirkung zu erzielen, und damit die Hypothese der *slow release* Formulierung zu bestätigen.

## 5 EXPERIMENTELLER TEIL

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Synthese der Bausteine und Herstellung der Nanopartikel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden über die Firmen Sigma-Aldrich, Acros Organics, TCI, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Carbolution und das ZBDS2 der Universität des Saarlandes bezogen. Dichlormethan (DCM) wurde vor Gebrauch über  $P_2O_5$  getrocknet und destilliert.  $\beta$ -CD, Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) mit einem d.s. = 0.9 pro Glucoseeinheit und  $\alpha$ -CD wurden von Wacker Chemie (München, Deutschland) erhalten und bei 70 °C für 18 h im Vakuum getrocknet. Fluorescein-isothiocyanat, Toluidinylnaphthalin-2-sulfonat, wurden bei Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) erworben. Lineares Polyethylenimin (25 kDa) wurde von Alfa Aesar erworben. *Calf thymus* DNA und Holotransferrin wurde von Sigma-Aldrich bezogen, SYBR Safe™ von Invitrogen Thermo Fisher. Der Transferrin Antikörper D-9 FITC wurde von Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA bezogen. Der Megamix-Plus SSC zur Kalibrierung des FACS-Geräts wurde von BioCytex (Marseille, Frankreich) erworben.

#### 5.1.2 Zellkultur

Das fötale Rinderserum (FCS), sowie das DMEM-Medium (high glucose, mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat) wurden von Gibco über Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Germany), RPMI-1640 Medium (mit L-Glutamin) und Penicillin/Streptomycin (x100) bei Sigma Aldrich (Weinheim, Germany) erworben. Das MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid)-Reagenz wurde bei Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany) erworben, Natriumlaurylsulfat (SDS) von Fluka (München, Germany) und HCl wurde über das ZChL der Universität des Saarland bezogen. Die verwendeten Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0.2 mit PES-Membran wurden bei Sarstedt (Nürnbrecht, Germany) gekauft. Trypsin-EDTA-Lösung (x1), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) wurden bei Sigma-Aldrich gekauft, PBS bei Thermo Fisher Scientific. Es wurden Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) von Greiner Bio-One, 6; 12 und 96-Wellplatten aus Polystyrol von Sarstedt, sowie weiße 96-well Polystyrolplatten (Nunc, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Bright-Glo™ Luciferase Assay Kit wurde von Promega bezogen. DNA Ladder und Loading Dye, Agarose, Kanamycin wurden von Sigma Aldrich bezogen. Die Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer (NEBuffer3.1, Nde1 und Eag1) wurden bei New England Bio-tech Inc. (Ipswich, USA) gekauft. Das MaxiPrep Plasmid Kit wurde von Qiagen erworben. Das Plasmid sfGFP-TFR-20 wurde von Michael Davidson (Addgene Plasmid # 56488) zur Verfügung gestellt. Das JetPrime Reagenz inklusive Puffer wurde von PolyplusTransfection (Strasbourg, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pGL4.3 wurde von AK Prof. Ducho zur Verfügung gestellt, das Plasmid pcDNA3-EGFP von der Firma PharmBioTech (Saarbrücken, Saarland). Die Zelllinie U937 wurde von AK Prof. Ducho erhalten, die Zelllinie HEK293T von AK Prof. Kierner (beide Universität des Saarlandes). Weitere benötigte Chemikalien für die Zellkultur (Ethanol, Isopropanol, DMSO, HCl, Triton X-100, EDTA, SDS, NaCl) wurden über das Zentrale Chemikalienlager der Universität des Saarlandes in höchster Reinheitsstufe von gängigen Herstellern bezogen. Verwendet wurde eine Universal Zentrifuge 32 R der Firma Hettich, sowie ein Mikrotiterplattenleser der Firma Tecan.

## 5.2 Methoden und Geräte

### 5.2.1 NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, H,H-COSY- und C,H-COSY-NMR Messungen wurden an einem Bruker AVANCE Ultrashield 400 (400.2 MHz) Gerät (Billerica, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die Verschiebungen werden in parts per million (ppm) bezogen auf Tetramethylsilan bzw. Acetonitril angegeben. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm ACD/NMR Processor Academic Edition 12.01 der Firma Advanced Chemistry Development Inc. Zur Bezeichnung der Signale wurden die Buchstaben s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplet) und br s (breites Signal) verwendet.

Die DOSY Messungen wurden am Bruker AVANCE 500, bei 296K ohne Spin gemessen. Das Pulsprogramm war ledbpgp2s. Die Auswertung der Spektren wurde zunächst über die Topspin3.2 Software durchgeführt, und anschließend über ILT (Inverse Laplace Transformation) die Diffusionsdimension generiert.

### 5.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Microplate Reader infinite® 200 der Firma Tecan durchgeführt. Steuerung des Systems erfolgte mit der Tecan i-Control Software Version 3.4.2.0. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm OriginPro 8.6G.

### 5.2.3 Dynamische Lichtstreuung

Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte am Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Das Gerät ist ausgestattet mit einem 4 mW He-Ne Laser und wird mit einer Wellenlänge von 633 nm und einem Rückstreuwinkel von  $173^\circ$  bei  $25^\circ\text{C}$  betrieben. Die Proben wurden als Triplikate in Einweg-Küvetten aus Polystyrol mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Zum Filtrieren von Polymerproben wurden Cellulosefilter (450 nm) eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des zugehörigen Programms Zetasizer der Firma Malvern Instruments.

### 5.2.4 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Cryo-Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen wurden von Marcus Koch am Leibniz Institut für Neue Materialien (INM Saarbrücken) durchgeführt. Für die Kryo-TEM-Probenpräparation wurde ein Kryoplunger CP3 der Firma Gatan (Pleasanton, Kalifornien, USA) verwendet. 3  $\mu\text{l}$  der Probenlösung wurden auf einen Kohlelochfilm vom Typ S147-4 (Plano, Wetzlar, Deutschland) pipettiert, für 2 s geblottet und bei  $T = -165^\circ\text{C}$  in flüssigem Ethan schockgefroren. Anschließend wurde die Probe unter flüssigem Stickstoff in einen Gatan Kryo-TEM-Probenhalter (Modell 914) transferiert und bei 200 kV Beschleunigungsspannung in einem JEOL (Akishima, Tokio, Japan) JEM-2100 LaB6 Transmissionselektronenmikroskop unter low-dose Bedingungen abgebildet. Für die Hellfeldabbildungen wurde eine Gatan Orius SC1000 CCD Kamera verwendet (Belichtungszeit 4 s).

### 5.2.5 Ultrafiltration

Die Aufreinigung der Cyclodextrinderivate und Polyrotaxane erfolgte in Ultrafiltrationszellen der Firma Millipore (200 bzw. 400 mL Inhalt) aus Polysulfon. Es wurden Membranen aus Regeneratcellulose der Firma Microdyn-NADIR mit einer Porengröße von 1, 5 bzw. 10 kDa verwendet.

Die Abtrennung von abgefädeltem CD von PRx erfolgte mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren des Typs Vivaspin 2 (Ausschlussgrenze 3 kDa; Polyethersulfon als Membran) der Sartorius Stedim Biotech GmbH und der Zentrifuge Rotina 35 der Firma Hettich Zentrifugen. Es wurde mit 5000 UpM zentrifugiert.

### 5.2.6 Lyophilisation

Zum Gefriertrocknen wurden die wässrigen Lösungen in einem Isopropanol-Trockeneis-Bad bzw. einem Flüssigstickstoff-Bad eingefroren und anschließend am Lyophilisator Alpha 1-4 der Firma Christ getrocknet.

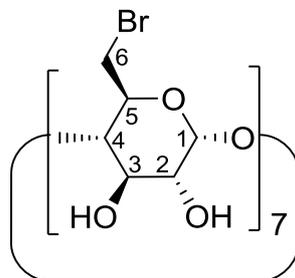
### 5.2.7 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die GPC Messungen wurden auf einer PSS Suprema Lux 30 Säule durchgeführt, ausgestattet mit einem RI Waters 2410 Detektor. Die Flussrate war 1mL/min und die Kalibrierung wurde mit Hilfe eines Pullulan Standards durchgeführt. Als Eluent kam Phosphatpuffer, pH 10 mit 5 % Acetonitril (ACN) zum Einsatz.

## 5.3 Präparativer Teil

### 5.3.1 Polyrotaxane zur Gentransfektion

#### Heptakis-[6-brom-6-deoxy]- $\beta$ -Cyclodextrin CD1

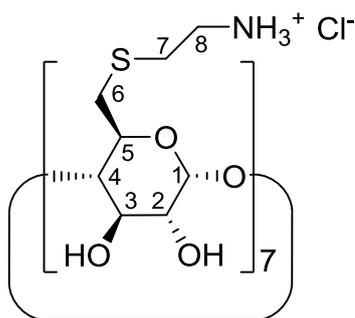


Unter Stickstoffatmosphäre wurden  $\beta$ -Cyclodextrin (45.4 g, 40.0 mmol, 1.0 Äq.) in 250 mL absolutem DMF gelöst. Im Folgenden wurden NBS (99.4 g, 558 mmol, 14 Äq.) und Triphenylphosphin (147 g, 560 mmol, 14 Äq.) zugegeben und mit 250 mL absolutem DMF nachgespült. Die Reaktionslösung erwärmte sich dabei auf 110°C und wurde mit einem Eisbad auf 80°C gekühlt. Danach wurden 2.5 Stunden bei 80°C gerührt und weiteres NBS (15.3 g, 86.0 mmol, 2.2 Äq.) sowie Triphenylphosphin (21.9 g, 83.5 mmol, 2.1 Äq.) zugegeben. Nach weiteren 2.5 Stunden Rühren bei 80°C wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und 300 mL Methanol zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel am Hochvakuum abdestilliert und der Rückstand in 400 mL Methanol aufgenommen. Anschließend wurde mit einigen Spatellöffeln Natriummethanolat auf pH 8 eingestellt und in 4.5 L Eiswasser gefällt. Der Feststoff wurde danach abgesaugt und in 500 mL Methanol aufgenommen. Nach 10 Minuten Rühren wurde der Feststoff erneut abgesaugt, der erhaltene Filterkuchen in 400 mL Ethanol aufgeschlemmt und 15 Minuten zum Sieden erhitzt. Die Suspension wurde heiß abgesaugt und in 120 mL Dimethylformamid gelöst. Darauf folgend wurde die Lösung in 1.2 L Ethanol getropft und der ausgefallene Feststoff heiß abgesaugt.

Nach zwei weiteren Auskochvorgängen mit Ethanol wurde der Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Es wurde ein hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 34.2 g (21.7 mmol) **54 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ /ppm (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) = 6.02 (d,  $^3J_{\text{OH},2/3}$  = 6.8 Hz, 1 H, O-H), 5.89 (d,  $^3J_{\text{OH},2/3}$  = 1.5 Hz, 1 H, O-H), 4.98 (d,  $^3J_{1,2}$  = 3.3 Hz, 1 H, H-1), 4.00 (d,  $^2J_{6a,6b}$  = 9.5 Hz, 1 H, H-6a), 3.82 (dd,  $^2J_{6b,6a}$  =  $^3J_{6b,5}$  = 9.5 Hz, 1 H, H-6b), 3.69 - 3.61 (m, 2 H, H-3/H-5), 3.34 - 3.41 (m, 2 H, H-2/H-4).

**Heptakis-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin CD2**

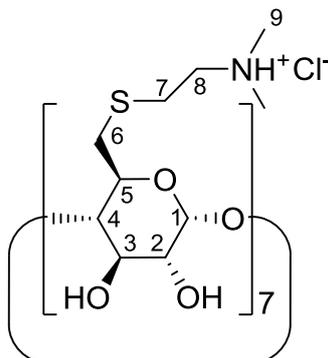
2-Aminoethanthiol-Hydrochlorid wurde zunächst über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Unter Stickstoffatmosphäre wurden 100 mL abs. DMF vorgelegt und abs. Triethylamin (25 mL, 18.3 g, 180 mmol, 28 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde 2-Aminoethanthiol-Hydrochlorid (10.2 g, 89.4 mmol, 14 Äq.) sowie Cyclodextrinderivat **CD1** (9.99 g, 6.34 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der ausgefallene Feststoff abgesaugt, in 15 mL Wasser aufgenommen und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4 angesäuert. Die erhaltene Lösung wurde über eine 1 kDa Regeneratcellulose-Membran gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5.09 g (2.82 mmol) **44 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 5.13 (d,  $^3J_{1,2} = 3.5$  Hz, 1 H, H-1). 4.05 (dd,  $^3J_{5,4} = ^3J_{5,6b} = 7.2$  Hz, 1 H, H-5), 3.92 (dd,  $^3J_{3,2} = ^3J_{3,4} = 9.4$  Hz, 1 H, H-3), 3.67 - 3.62 (m, 2 H, H-4/H-2), 3.26 (t,  $^3J_{8,7} = 6.8$  Hz, 2 H, H-8), 3.17 (d,  $^2J_{6a,6b} = 12.6$  Hz, 4 H, H-6a), 2.99 (t,  $^3J_{7,8} = 6.8$  Hz, 2 H, H-7), 3.02 - 2.95 (m, 1 H, H-6b).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz) = 101.6 (d, C-1), 83.6 (d, C-4), 72.7 (d, C-2), 72.0 (d, C-5), 71.5 (d, C-3), 38.6 (t, C-8), 32.7 (t, C-6), 29.9 (t, C-7).

### Heptakis-[6-deoxy-6-(2-(dimethylamino)ethylsulfanyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin-Hydrochlorid CD3

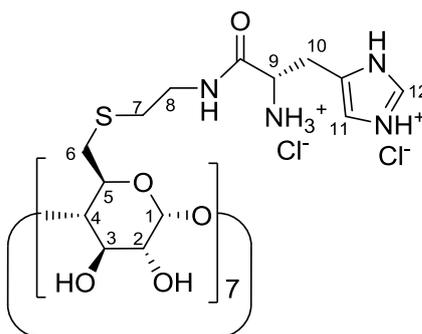


Unter Stickstoffatmosphäre wurde DMF<sub>abs</sub> (50 mL) vorgelegt und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (21 mL, 21.6 g, 142 mmol, 45 Äq.) zugegeben. Im Anschluss wurden 2-Dimethylaminoethanthiol-Hydrochlorid (MEDA) (6.29 g, 44.4 mmol, 14 Äq.) sowie Cyclodextrinderivat **CD1** (5.01 g, 3.18 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung in kaltem Diethylether gefällt und der Feststoff abgesaugt. Im Folgenden wurde der Filterkuchen in Wasser aufgenommen und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4 angesäuert. Die erhaltene Lösung wurde über eine 1 kDa Regeneratcellulose-Membran gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.80 g (9.86 mmol) **60 %**

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 5.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, 1 H, H-1), 4.04 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5,6b</sub> = 7.4 Hz, 1 H, H-5), 3.96 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 9.5 Hz, 1 H, H-3), 3.66 - 3.72 (m, 2 H, H-2/H-4), 3.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7.3 Hz, 2 H, H-8), 3.26 (d, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 14.4 Hz, 1 H, H-6a), 3.10 (t, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 7.3 Hz, 2 H, H-7), 3.04 (dd, <sup>2</sup>J<sub>6b,6a</sub> = 14.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b,5</sub> = 7.4 Hz, 1 H, H-6b), 2.93 (s, 6 H, H-9).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) = 101.9 (d, C-1), 83.9 (d, C-4), 72.7 (d, C-3), 72.1 (d, C-5), 72.0 (d, C-2), 56.7 (t, C-8), 42.9 (q, C-9), 32.6 (t, C-6), 27.0 (t, C-7).

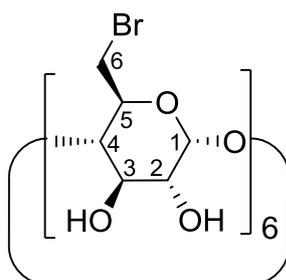
**Histidinyliertes CD-Derivat CD4**

**CD2** (501.7 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) wurde in  $\text{DMSO}_{\text{abs}}$  (9 mL) gelöst, dazu wurde Trifluoressigsäure (TFA) (300  $\mu\text{L}$ , 2.22 mmol, 1.2 Äq. pro Aminogruppe) gegeben und 90 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Boc-His(1-Boc)OSu (452.5 mg, 2.02 mmol, 1.05 Äq. pro Aminogruppe) in 1 mL  $\text{DMSO}_{\text{abs}}$  zugefügt. Die Mischung wurde 24 h bei RT gerührt, dann wurden 1.5 mL TFA zugegeben und 18 h gerührt. Die überschüssige TFA wurde am HV entfernt, das Rohprodukt aus eisgekühltem EE gefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert, abdekantiert und am HV getrocknet, bevor das Rohprodukt über Ultrafiltration (1 kDa-Membran, PES, NaCl-Lösung) gereinigt wurde. Nach Lyophilisation wurde das Rohprodukt 24 h bei RT in TFA gerührt und das TFA anschließend wieder im HV entfernt. Nach einem weiteren Ultrafiltrationsschritt wurde das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 683.7 mg (0.246 mmol) **91 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) = 8.28 (s, 1H, H-11 (His)), 7.28 (s, 1H, H-12 (His)), 5.22 (s, 1H, H-1), 4.23 (tr, 1H, H-9,  $^3J = 6.8$  Hz), 3.97-3.93 (m, 2H, H-3/5), 3.67-3.58 (m, 2H, H-2/4), 3.54-3.38 (m, 2H, H-8a/b), 3.33-3.16 (m, 3H, H-6b/10), 2.93-2.87 (m, 1H, H-6a), 2.77 (tr, 2H, H-7,  $^3J = 6.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 169.7 (C=O, Amid), 164.6 (C=O, TFA), 135.9 (C-12, arom. Imidazol), 130.2 (C quart. Imidazol), 119.6 (C-11, arom. Imidazol), 116.1 ( $\text{CF}_3$ , TFA), 99.4 (C-1), 73.3 (C-5, 72.1 (C-5), 71.4 (C-2/4), 53.4 (C-9), 38.1 (C-8), 32.3 (C-6), 31.6 (C-7), 28.4 (C-10).

**Hexakis-(6-brom-6-deoxy)- $\alpha$ -Cyclodextrin CD5**

$\alpha$ -Cyclodextrin (48.6 g, 50.0 mmol, 1 Äq.) wurden in DMF<sub>abs</sub> (250 mL) gelöst. Es wurden 106.8 g (600 mmol, 12 Äq.) NBS zugegeben und mit DMF<sub>abs</sub> (125 mL) nachgespült. Nachdem sich das Reagenz vollständig gelöst hatte, wurde Triphenylphosphin (157.4 g, 600 mmol, 12 Äq.) zugegeben und mit DMF<sub>abs</sub> (125 mL) nachgespült. Während der Zugabe färbte sich die Reaktionsmischung tiefrot und die Temperatur stieg auf 90 °C an. Nach 2.25 h Rühren bei 80 °C wurden weiteres NBS (16.0 g, 90 mmol, 1.8 Äq.) und Triphenylphosphin (23.6 g, 90 mmol, 1.8 Äq.) zugegeben und mit 30 ml DMF<sub>abs</sub>. nachgespült. Die Lösung wurde 2.5 h bei 80 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden 100 ml Methanol zugegeben und 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand in 400 ml Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von Natriummethanolat wurde der pH-Wert auf 7-8 eingestellt.

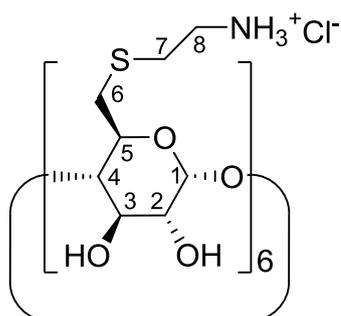
Anschließend wurde die Lösung unter Rühren zu 4 l Eiswasser gegossen. Der ausgefallene rote Feststoff wurde abgesaugt, in 500 ml Methanol suspendiert, 10 min gerührt und nochmals abgesaugt. Der erhaltene Feststoff wurde in 400 ml Ethanol aufgenommen, 15 min ausgekocht und heiß filtriert. Um Triphenylphosphin-Spuren zu entfernen, wurde der verbleibende Feststoff in 120 ml DMF gelöst und langsam zu 1.2 l siedendem Ethanol getropft. Der ausgefallene Feststoff wurde heiß filtriert und nochmals 15 min in 400 ml Ethanol ausgekocht. Beim Absaugen wurde ein Teil des Produkts als feinpulvriger, hellbrauner Feststoff erhalten; dieser wurde im Hochvakuum getrocknet.

Außerdem wurde eine zweite, intensiv rotbraun gefärbte Produktfraktion erhalten, die sich auch nach einem weiteren Auskochvorgang in 400 ml Ethanol nicht entfärbte. Aufgrund der starken Verunreinigungen wurde diese Fraktion verworfen.

Ausbeute: 13.71 g (10.2 mmol) **20 %** (1. Produktfraktion)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) = 5.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>OH,2</sub> = 6.8 Hz, 1 H, OH-2), 5.64 (bs, 1 H, OH-3), 4.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 3.0 Hz, 1 H, H-1), 3.94-3.86 (m, 2 H, H-5/6a), 3.80 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 9.3 Hz, 1 H, H-3), 3.76-3.72 (m, 1H, H-6b), 3.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 8.9 Hz, 1 H, H-4), 3.38-3.30 (m, 1 H, H-2).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 101.9 (C-1), 84.7 (C-4), 72.5 (C-3), 71.6 (C-2), 70.6 (C-5), 34.8 (C-6).

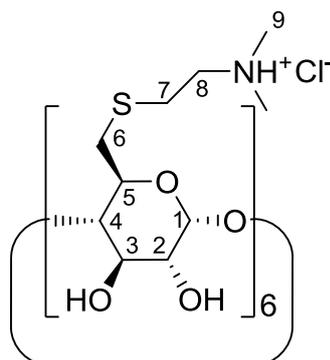
**Hexakis-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\alpha$ -Cyclodextrin-Hydrochlorid CD6**

2-Aminoethanthiol-Hydrochlorid wurde zunächst 18 h bei Raumtemperatur im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden zu einer Lösung von 2-Amino-ethanthiol-Hydrochlorid (3.02 g, 26.6 mmol, 12 Äq.) in DMF<sub>abs</sub> (30 ml) Triethylamin<sub>abs</sub> (9.89 g, 13.6 ml, 97.7 mmol, 44 Äq.) zugegeben. Nach Zugabe von Hexakis-(6-brom-6-deoxy)- $\alpha$ -Cyclodextrin **CD5** (3.00 g, 2.22 mmol, 1 Äq.) wurde die Mischung 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der ausgefallene Niederschlag abgesaugt, mit DMF gewaschen, in 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und durch Zugabe von 6 N HCl auf pH 3-4 angesäuert. Nach Ultrafiltration (1 kDa PES-Membran, H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.) und Lyophilisation wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.26 g (1.47 mmol) **66 %**

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) = 8.16 (bs, 2 H, NH), 5.80-5.45 (m, 2 H, OH-2/3), 4.89 (s, 1 H, H-1), 4.00-3.85 (m, 1 H, H-5), 3.76 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 8.7 Hz, 1 H, H-3), 3.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 8.8 Hz, 1 H, H-4), 3.42-3.30 (m, 2 H, H-2/8a), 3.11 (d, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 12.1 Hz, 1 H, H-6a), 3.04-2.97 (m, 1 H, H-8b), 2.95-2.80 (m, 3 H, H-6b/7).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) = 101.9 (C-1), 84.8 (C-4), 72.8 (C-3), 71.8 (C-2), 70.9 (C-5), 38.4 (C-8), 33.0 (C-6), 29.6 (C-7).

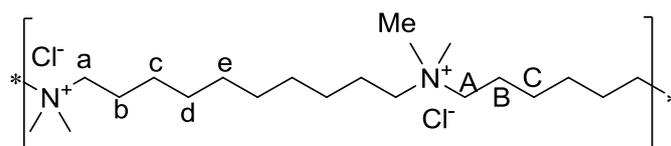
**Hexakis-[6-deoxy-6-(2-(dimethylamino)ethylsulfanyl)]- $\alpha$ -Cyclodextrin-Hydrochlorid CD7**


2-Dimethylaminoethanthiol-Hydrochlorid wurde zunächst 18 h bei Raumtemperatur im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden zu einer Lösung von DBU (14.9 mL, 15.2 g, 99.9 mmol, 45 Äq.) in DMF<sub>abs</sub> (30 ml) 2-Dimethylaminoethanthiol-Hydrochlorid (3.77 g, 26.6 mmol, 12 Äq.) sowie Hexakis-(6-brom-6-deoxy)- $\alpha$ -Cyclodextrin **CD5** (3.00 g, 2.22 mmol, 1 Äq.) gegeben und 5 d bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde weiteres 2-Dimethylaminoethanthiol-Hydrochlorid (377 mg, 2.66 mmol, 1.2 Äq.) sowie DBU (1.49 mL, 1.52 g, 9.99 mmol, 4.5 Äq.) zugegeben und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde langsam zu kaltem Diethylether gegossen und der ausgefallene Feststoff abgesaugt. Danach wurde der Filterkuchen in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen, durch Zugabe von 6 N HCl auf pH 3-4 angesäuert, ultrafiltriert (1 kDa PES-Membran, H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) und lyophilisiert. Das Produkt wurde als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.86 g (1.08 mmol), **49 %**

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 4.98 (m, 1 H, H-1), 3.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub>  $\approx$  <sup>3</sup>J<sub>5,6a</sub> = 8.0 Hz, 1 H, H-5), 3.77 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub>  $\approx$  <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 9.2 Hz, 1 H, H-3), 3.51-3.46 (m, 2 H, H-2/4), 3.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7.3 Hz, 2 H, H-8), 3.10 (d, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub> = 14.4 Hz, 1 H, H-6a), 2.97- 2.89 (m, 2 H, H-7), 2.84 (dd, <sup>2</sup>J<sub>6b,6a</sub> = 14.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b,5</sub> = 7.7 Hz, 1 H, H-6b), 2.75 (s, 6 H, H-9).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) = 101.8 (C-1), 84.7 (C-4), 73.5 (C-3), 73.1 (C-5), 72.2 (C-2), 57.2 (C-8), 43.4 (C-9), 33.2 (C-6), 27.6 (C-7).

**Ionen 6,10 P1**

Zu einer Lösung von 1,10-Dibromdecan (9.91 g, 33.0 mmol, 1 Äq.) in ACN/MeOH (1:1) (10 mL) wurde eine Lösung von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,6-diaminohexan (5.69 g, 33.0 mmol, 1 Äq.) in ACN/MeOH (1:1) (10 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf 40 °C erhitzt und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Nach 2 d wurden weitere 20 mL Lösungsmittelgemisch zugegeben und weitere 11 d gerührt. Das Rohprodukt wurde aus 100 mL kalten Diethylether gefällt und der Niederschlag 18 h am Hochvakuum (HV) getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 0.02 M NaCl-Lösung (200 mL) gelöst und über eine 10 kDa PES-Membran ultrafiltriert (5 L NaCl-Lösung, 1.5 L H<sub>2</sub>O). Es wurde ein farbloser, zäher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7.78 g (20.2 mmol) **62 %**

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.14-3.13 (m, 8H, a,A), 2.92 (s, 12H, Me), 1.65-1.64 (m, 8H, b,B), 1.30 (m, 4H, C), 1.23-1.19 (m, 12H, c,d,e).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 64.9 (A), 64.5 (a), 50.9 (Me), 29.0 (d), 26.1 (C), 25.8 (c), 22.5 (B), 22.4 (b).

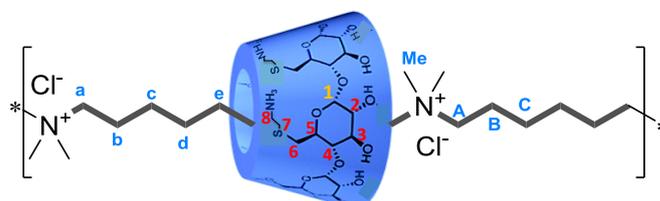
**Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Polyrotaxane aus Ionen und kationischen β-CD-Derivaten PRx1 - PRx8**

Das Polymer (0.134 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 0.1 M NaCl-Lösung (5.14 mL) gelöst. Nach Zugabe des kationischen CD-Derivates (0.268 mmol, 2 Äq.) wurde das Reaktionsgemisch im Heizblock für  $t_{\alpha}$  auf 40 °C erwärmt. Es wurden 5.14 mL einer 10 %-tigen  $\alpha$ -CD-Lösung zugegeben und die Mischung für  $t_{\beta}$  auf 70°C geheizt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in Eiswasser gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Die nicht aufgefädeltten  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD-Ringe wurden über Ultrafiltration (10 kDa Membran, Regeneratcellulose) entfernt. Nach Lyophilisation wurde ein weißer Feststoff als Produkt erhalten.

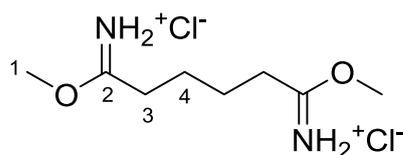
Die Auffädzeiten  $t_{\alpha}$  und  $t_{\beta}$  sowie die erhaltenen Belegungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Polyrotaxan-Synthese: Bedingungen und Belegungen für Ionen-Polyrotaxane PRx1 – PRx8.

PRx	Po-lymer	CD-Derivat	t <sub>β-CD</sub> bei 40°C [h]	Belegung β-CD [%]	t <sub>α-CD</sub> bei 70°C [h]	Belegung α-CD [%]
PRx1	P1	CD2	15	22	6	4
PRx2	P1	CD2	8	28	24	9
PRx3	P1	CD2	15	35	8	7
PRx4	P1	CD2	15	21	4	3
PRx5	P1	CD4	15	33	6	11
PRx6	P1	CD3	15	11	6	8
PRx7	Ionen 11	CD2	15	38	6	9
PRx8	N-Oxid 11	CD2	15	27	6	13

**NMR exemplarisch für PRx2:**

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 5.17 (H-1, β-CD), 5.10 (H-1, α-CD), 3.75 (H-A, Ionen), 3.54 (H-a, Ionen), 3.04 (H-Me, Ionen), 3.96 – 2.93 (H-2/3/4/5/6, α-CD und H-2/3/4/5/6/7/8, β-CD), 1.78 (H-b und H-B, Ionen), 1.43 (H-C, Ionen), 1.35 (H-c,d,e, Ionen).

**Dimethyladipimidat-Dihydrochlorid M1****Vorschrift 1:**

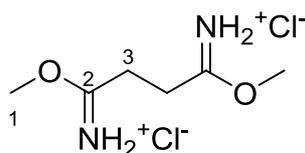
Unter Stickstoffatmosphäre wurden Adiponitril (0.50 mL, 485 mg, 4.48 mmol, 1.0 Äq.) und absolutiertes Methanol (0.72 mL, 569 mg, 17.8 mmol, 4.0 Äq.) vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0°C gekühlt und vorsichtig HCl in Dioxan (4 M) (11.1 mL, 44.4 mmol, 10 Äq.) zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und drei Tage gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden 5 mL Diethylether zugegeben und 15 Minuten gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Vorschrift 2:**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde absolutiertes Methanol (5.0 mL, 3.95 g, 123 mmol, 28 Äq.) vorgelegt und Acetylchlorid (6.3 mL, 6.93 g, 80.3 mmol, 18 Äq.) bei 0°C zuge tropft. Die Lösung wurde 20 Minuten bei 0°C gerührt und anschließend Adiponitril (0.50 mL, 485 mg, 4.48 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und drei Tage gerührt. Danach wurden 5 mL Diethylether zugegeben und 15 Minuten gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde der erhaltene weiße Feststoff am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.09 g (4.44 mmol, 99 %)

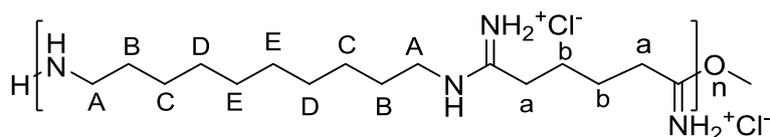
<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (MeOD-d<sub>4</sub>, 400 MHz) = 4.18 (s, 6H, H-1), 2.78 - 2.74 (m, 4H, H-3), 1.83 - 1.79 (m, 4H, H-4).

**Dimethylsuccinimidat-Dihydrochlorid M2**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden Succinodinitril (1.83 g, 22.8 mmol, 1.0 Äq.) vorgelegt und mit abs. MeOH (13 mL, 320 mmol, 14 Äq.) und 5 mL abs. Dioxan versetzt. Die Mischung wurde gerührt, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Das Gemisch wurde auf 0 °C gekühlt und innerhalb 1 h Acetylchlorid (16.5 mL, 210 mmol, 9 Äq.) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion über Nacht gerührt, 5 mL Diethylether zugegeben, der Niederschlag abgesaugt, mit kaltem Diethylether gewaschen und über eine Glasfritte abgesaugt. Der Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 4.02 g (18.5 mmol) **81 %**

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.71 (s, 6H, H-1), 2.65 (s, 4H, H-3).

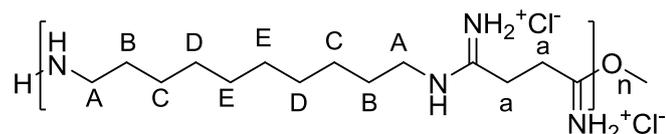
**Polyamidin 6,10 P2**

Dimethyladipimidat-Dihydrochlorid **M1** (999 mg, 4.08 mmol, 1.0 Äq.) und 1,10-Diaminodecan (704 mg, 4.08 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 5 mL 0.5 M wässriger Natriumcarbonat-Lösung gelöst und vier Tage unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert bis zur Lösung des Niederschlages und die erhaltene Lösung über eine 5 kDa Regeneratcellulose-Membran gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.05 g (2.97 mmol) **73 %**

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 3.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>A,B</sub> = 6.9 Hz, 4H, H-A), 2.53 (m, 4H, H-a), 1.74 (m, 4H, H-b), 1.65 (tt, <sup>3</sup>J<sub>B,C</sub> = <sup>3</sup>J<sub>B,A</sub> = 6.9 Hz, 4H, H-B), 1.41 – 1.25 (m, 12H, H-C,D,E).

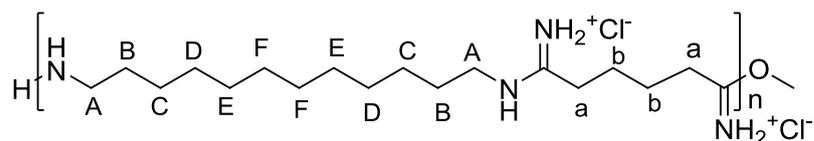
<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) = 167.7 (C=N), 42.8 (C-A), 32.8 (C-a), 29.2 (C-E), 28.9 (C-D), 27.3 (C-B), 26.6 (C-C), 26.3 (C-b).

**Polyamidin 10,4 P4**

Succinimidat-Dihydrochlorid **M2** (300 mg, 1.38 mmol, 1.0 Äq.) und 1,10-Diaminodecan (238 mg, 1.38 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 3 mL 0.5 M wässriger Natriumcarbonat-Lösung gelöst und drei Tage unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit 1 M Salzsäure auf pH 4 angesäuert und die erhaltene Lösung über eine 5 kDa Regeneratcellulose-Membran gegen 0.05 M NaCl und anschließend gegen destilliertes Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 94 mg (0.29 mmol) **21 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 3.49-3.28 (m, 2.9H, H-A), 3.14-3.11 (t,  $^3J_{A,B} = 6$  Hz, 0.5H, H-A neben C=O), 3.04 – 3.02 (m, 0.6H, H-A<sub>End</sub>), 2.88-2.84 (m, 3.3 H, H-a), 2.67-2.60 (m, 0.5H, H-a neben C=O), 2.54-2.38 (m, 4H, H-B), 1.29 – 1.05 (m, 12H, H-C,D,E).

**Polyamidin 6,12 P3**

Es wurde 1,12-Diaminododecan 163 mg (8.16 mmol, 1 Äq.) mit Dimethyladimpimidat-Dihydrochlorid (200 mg, 8.16 mmol, 1 Äq.) in 2 mL eines Lösungsmittelgemisches aus 1 mL THF mit 1 mL 0.5 M wässriger Natriumcarbonatlösung gelöst und die Mischung unter Stickstoff 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit wenigen Tropfen 1 M HCl angesäuert und über eine 5 kDa-Regeneratcellulose-Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Nach Lyophilisation wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 54.5 mg (0.14 mmol) **18 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 3.18 (t,  $^3J_{A,B} = 8$  Hz, 4H, H-A), 2.50-2.40 (m, 4H, H-a), 1.71-1.61 (m, 4H, H-b), 1.55 (tt,  $^3J_{B,A} = 8$  Hz, 4H, H-B), 1.35 – 1.15 (m, 16H, H-C,D,E,F).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) = 166.3 (C=N), 41.3 (C-A), 31.3 (C-a), 28.2 (C-E/F), 25.9 (C-D), 25.3 (C-BC), 24.8.6 (C-b/B).

### Polyamidin-basierte Polyrotaxane



#### Polyrotaxan PRx11

**P2** (20.0 mg, 56.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und natives  $\beta$ -CD (62.2 mg, 56.6  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) wurden in Wasser (3 mL) gelöst. Es wurde CB[6] (56.4 mg, 56.6  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) zugegeben und Natriumsulfat (20 mg, 141  $\mu\text{mol}$ , 2.5 Äq.), bis nur noch eine leichte Trübung zu erkennen war. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt, 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert, um nicht gelöstes CB[6] abzutrennen. Der Überstand wurde über eine 5 kDa Regeneratcellulose Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 20.0 mg

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 5.72 (d, 6.5H, CB), 5.50 (s, 6.5H, CB), 5.06 (s, 0.8H, CD), 4.25 (d, 6.5H, CB), 3.83-3.58 (m, CD), 3.22-2.80 (m, 4H, Polymer), 2.65-2.31 (m, 4H, Polymer), 2.03-0.31 (m, 20H, Polymer).

#### Polyrotaxan PRx12

**P2** (22.0 mg, 62.2  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) wurde in Wasser (3 mL) gelöst. Es wurde natives  $\beta$ -CD (353.3 mg, 311  $\mu\text{mol}$ , 5 Äq.) in Wasser (2 mL) zugegeben und die Mischung 30 min bei RT gerührt. Als nächstes wurde CB[6] (20.6 mg, 20.7  $\mu\text{mol}$ , 0.33 Äq.) zugegeben und Natriumsulfat, bis CB[6] vollständig gelöst war. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend über eine 5 kDa Regeneratcellulose Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11.1 mg

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 5.73 (d, 2.6H, CB), 5.48 (s, 2.6H, CB), 5.06 (s, 0.4H, CD), 4.24 (d, 2.6H, CB), 3.88-3.54 (m, CD), 3.42-2.84 (m, 4H, Polymer), 2.68-2.17 (m, 4H, Polymer), 1.96-0.75 (m, 20H, Polymer).

#### Polyrotaxan PRx13

**P2** (21.9 mg, 61.9  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) wurde in LiCl-Lösung (0.2 M, 3 mL) gelöst. **CD2** (216 mg, 120  $\mu\text{mol}$ , 2 Äq.) wurden zugegeben und 6 h bei RT gerührt. Dann wurde CB[6] (6.0 mg, 6.02  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Äq.) zugegeben, noch 1 h bei RT gerührt und anschließend über eine 5 kDa Regeneratcellulose-Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 22.5 mg

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 5.72 (d, 1.8H, CB), 5.48 (s, 1.8H, CB), 5.08 (s, 1.3H, CD), 4.15 (d, 1.8H, CB), 4.04-3.01 (m, CD), 3.01-2.63 (m, 4H, Polymer), 2.63-2.05 (m, 4H, Polymer), 1.95-0.42 (m, 20H, Polymer).

**Polyrotaxan PRx14** (analog für **PRx15**, **PRx16**, **PRx17**)

**P2** (21.3 mg, 60.3  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.) wurde in LiCl-Lösung (0.1 M, 5 mL) gelöst. **CD2** (217 mg, 121  $\mu\text{mol}$ , 2 Äq.) wurden zugegeben und 6 h bei RT gerührt. Dann wurde CB[6] (6.0 mg, 6.03  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Äq.) zugegeben, noch 1 h bei RT gerührt und anschließend über eine 5 kDa Regeneratcellulose-Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 21.7 mg

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 5.68 (d, 0.9H, CB), 5.43 (s, 0.9H, CB), 5.08 (s, 4H, CD H-1), 4.19 (d, 0.9H, CB), 4.06-3.76 (m, 8H, CD H-3/5), 3.76-3.46 (m, 8H, CD H2/4), 3.26-3.00 (m, 16H, CDH-6/8), 3.00-2.74 (m, 12H, CD H-7 + Polymer), 2.62-2.15 (m, 4H, Polymer), 1.77-0.74 (m, 20H, Polymer).

**Herstellung der Polyrotaxane PRx9 und PRx10 und Bestimmung der Auffädeldkinetik via NMR**

Es wurden jeweils 0.015 mmol (1 Äq.) Polyamidin und 14.8 mg (0.015 mmol, 1 Äq.) natives  $\alpha$ -CD in je 350  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Unmittelbar vor der ersten NMR-Messung wurde die  $\alpha$ -CD-Lösung zur Polymerlösung gegeben, mit der Eppendorf-Pipette gemischt und in ein NMR-Röhrchen gefüllt. Für die Kinetikmessung bei 12 °C wurden die beiden Lösungen so wie das NMR-Röhrchen 3 h auf 5 °C vorkonditioniert. Die Zeit zwischen dem Mischen der Lösungen bis zur 1. NMR-Messung wurde gestoppt und bei der Auswertung berücksichtigt. Ab dann wurden zu definierten Zeitpunkten jeweils ein  $^1\text{H}$ -Spektrum aufgenommen.

Die Auswertung dieser Spektren erfolgte mit BRUKER TOPSPIN 3.5PI6.

Bei der manuellen Erstellung der Kinetikkurve wurden die Spektren jeweils derart bearbeitet, dass der line broadening-Wert  $\text{LB} = 2$  gesetzt wurde. Anschließend wurde eine Deconvolution durchgeführt, wobei die Halbwertsbreite auf 15 eingestellt wurde und der Integral Scaling Factor auf 100. Nach Fit durch das Programm wurden anschließend die Flächenwerte der beiden theoretisch berechneten Fitkurven ausgegeben. Diese wurden jeweils in Bezug zueinander gesetzt und in ORIGIN gegen die Zeit aufgetragen.

Für die Auswertung mit Hilfe des Programms BRUKER DYNAMICS CENTER 2.4.8 wurden die Spektren zunächst jeweils in BRUKER TOPSPIN 3.5PI6 vorbereitet. Zur besseren Trennung der Peaks wurde der Line Broadening-Wert  $\text{LB} = -2$  gesetzt und der Gauß Broadening-Wert  $\text{GB} = 0.3$  eingestellt. Anschließend wurde eine Gauß Fourier Phase Correction durchgeführt. Nach manueller Phasenkorrektur der aller Spektren konnten diese in das Programm BRUKER DYNAMICS CENTER 2.4.8 eingeladen werden. Unter Angabe der Zeit zwischen Mischen und erster Messung sowie der Definition der beiden zu integrierenden Peaks wurde eine vollständige Kinetikkurve inklusive berechneter Gleichgewichtskonstanten ausgegeben.

**Hydrolyse des Polyamidins P2 zum Polyamid**

Es wurden je 15 mg des Polyamidins **P2** in 750  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und die Lösungen mit DCI und NaOD auf pD 3 und pD 10.5 eingestellt, die Mischungen bei RT gelagert und die Hydrolyse mittels  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie verfolgt.

**Wasserlöslichkeit des Polyamidins P2**

Es wurde eine gesättigte Lösung des Polyamidins **P2** in 1 mL milliQ-Wasser angesetzt und über Nacht geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 10 000 g wurden 500  $\mu\text{L}$  des

Überstandes entnommen, lyophilisiert und die Masse bestimmt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 2 wurde die Gesamtlöslichkeit des Polymers in 1 mL Wasser bestimmt.

### 5.3.2 TNS-Assay zur Bestimmung der Dissoziation des Polyrotaxans PRx14

**PRx14** (2.5 mg, 1.69  $\mu\text{mol}$ ) wurden in 2.5 mL PBS gelöst und bei 37 °C inkubiert. In definierten Abständen wurde die gesamte Probe in Vivaspin 2 ultrafiltriert und mit 5 mL PBS nachgespült. Der Rückstand wurde jeweils wieder mit PBS auf ein Volumen von 2.5 mL aufgefüllt und weiter inkubiert. Das Filtrat wurde lyophilisiert und in 200  $\mu\text{L}$  Wasser aufgenommen. 10  $\mu\text{L}$  der Probe wurde mit 70  $\mu\text{L}$  Wasser und 120  $\mu\text{L}$  einer 0.1 mM Toluidinylnaphtalin-2-sulfonat (TNS)-Lösung versetzt und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm bestimmt. Über eine Kalibriergerade von Lösungen von **CD2** mit demselben Salzgehalt und äquivalenten Mengen TNS konnte auf die Konzentration von **CD2** im Filtrat rückgeschlossen werden.

### 5.3.3 SYBRSafe™-Dye Displacement Assay

Es wurde eine SYBRSafe™ –Lösung in einer Verdünnung von 1:100 in Wasser hergestellt. Die Polyplexe wurden in den N/P Verhältnissen von 1-10 hergestellt. Dazu wurden Polyrotaxanlösungen der entsprechenden Konzentrationen (auf pH 7 eingestellt) mit einer definierten Menge *calf thymus* DNA gemischt, so dass in jedem Ansatz die gleiche finale Konzentration an DNA gegeben war (3.425  $\mu\text{g/mL}$ ), mit steigenden Konzentrationen der Polyrotaxane.

Bei einem Ansatz wurde nur DNA vorgelegt (N/P = 0, definiert als maximale Fluoreszenz), zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz der DNA. Alle Ansätze wurden auf ein Volumen von 300  $\mu\text{L}$  aufgefüllt, zur Partikelbildung 30 min bei RT inkubiert und anschließend jeweils mit 3  $\mu\text{L}$  der SYBRSafe™-Verdünnung versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Fluoreszenzintensität bei 531 nm bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm bestimmt. Eigenfluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes in Wasser sowie mit Polyrotaxan wurde ebenfalls bestimmt und gleich Null gesetzt.

### 5.3.4 Zellbiologische Experimente

#### 5.3.4.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

##### Zellen auftauen

Die im flüssigen Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  gelagerten Zellen wurden im  $37\text{ °C}$  Wasserbad schnell aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 10 mL vorgewärmtes Medium (je nach Zelllinie) überführt, geschüttelt und 5 min bei  $1650 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 mL frischem vorgewärmten Medium resuspendiert und in Zellkulturschalen (Suspensionszellen) oder Zellkulturflaschen (Adhäsionszellen) gegeben.

##### Zellen einfrieren

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mit Trypsin abgelöst und suspendiert. Je 1 mL der Zellsuspension (zwischen  $10^6$  und  $5 \times 10^6$  Zellen/mL) in Vollmedium wurden in ein Kryoröhrchen überführt und 100  $\mu\text{L}$  FCS zugefügt (um eine finale FCS-Konzentration von 20 % zu erhalten), sowie 100  $\mu\text{L}$  DMSO. Das Kryoröhrchen wurde mit einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Kühlungsrate von  $-1\text{ °C/Minute}$ ) auf  $-80\text{ °C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

##### Suspensionszellen

U937 Zellen wurden in RPMI Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in Zellkulturschalen (100 mm) bei  $37\text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde frisches Medium zugegeben bzw. gewechselt. Ab einer Zelldichte von ca.  $10^6$  Zellen/mL wurden die Zellen subkultiviert und maximal bis zur Passage #20 verwendet.

Zum Passagieren wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, die Zellsuspension 5 min bei  $1650 \times g$  zentrifugiert und das Zellpellet in 10 mL frischem Medium aufgenommen und auf 2-3 Zellkulturschalen mit frischem Medium verteilt bzw. der Rest verworfen.

##### Adhäsionszellen

Die HEK293T Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in  $75\text{ cm}^2$ -Zellkulturflaschen bei  $37\text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die HepG2 Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ebenfalls in  $75\text{ cm}^2$ -Zellkulturflaschen kultiviert. Bei beiden Zelllinien wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt, ab 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert und maximal bis zur Passage #20 verwendet.

Die abgelösten Zellen wurden im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt. Zum Passagieren wurden die Zellen trypsinisiert, abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt bzw. die Reste verworfen. (Split HEK293T 1:5 bis 1:10, HepG2 1:3 bis 1:8)

##### Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß mittels der Protease Trypsin

Trypsin bewirkt eine Lyse der Proteine an der Zelloberfläche, damit werden die Oberflächen-Zellwand-Wechselwirkungen gestört und die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Die Einwirkzeit des Trypsins wird so gering wie möglich gehalten, um eine Zellschädigung zu vermeiden.

Das Medium von den Zellkulturflaschen wurde mittels Absaugpumpe und Pasteurpipette abgesaugt. Zum Entfernen der restlichen im Medium enthaltenen Serumproteine wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dafür wurden vorsichtig 5 mL PBS zugege-

ben, die Flasche vorsichtig geschwenkt und PBS wieder abgesaugt. Dann wurden 2 mL einer vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben, vorsichtig geschwenkt und die Flaschen bei 37 °C für 2-3 Minuten inkubiert. Der Fortschritt der Ablösung der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop untersucht. Während HEK293T Zellen sehr leicht ablösbar sind, war die Inkubationszeit für die HepG2 Zellen deutlich länger (bis zu 5 min) und wurde durch vorsichtiges Klopfen der Flasche schließlich beschleunigt.

Zum Beenden der Reaktion wurden 5 mL Vollmedium (mit FCS) zugegeben und es wurden vorsichtig auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln und eine einheitliche Verteilung der Zellen zu gewährleisten.

#### **Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer**

Von der Zellsuspension (nach Trypsinieren, 5 mL Medium) wurden 50 µL entnommen und in 5 mL PBS gegeben (Verdünnung 1:100). Von dieser Verdünnung wurde in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde das Deckglas angehaucht und direkt auf die Zählkammer aufgelegt (Newton-Ringe erscheinen). Von der verdünnten Zellsuspension wurden nach Aufschütteln etwa 12 µL entnommen und unter das Deckglas gefüllt. Durch die Kapillarkräfte wird die Zellsuspension in die Kammer gesogen). Anschließend wird die Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet und die Zellen gezählt.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 9 Quadraten, welches jeweils ein Volumen von 0.1 µL fasst. Es wurden die Zellen in allen 9 Quadraten gezählt und ein Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation mit  $10^4$  wurde dann die Zellzahl pro mL in der PBS-Verdünnung erhalten, durch Multiplikation mit 100 wird die Zellzahl der ursprünglichen Zellsuspension erhalten. Insgesamt wurde der Mittelwert der gezählten Zellen pro Quadrat also mit  $10^6$  multipliziert, um direkt die Zellzahl der konzentrierten Zellsuspension zu bestimmen.

Die Zellsuspension wurde mit Medium beliebig verdünnt, um die gewünschte Anzahl an Zellen pro mL Medium zu erhalten (je nach Test zwischen  $10^6$  Zellen/mL bis zu  $2 \cdot 10^5$  Zellen/mL).

### 5.3.4.2 MTT Assay

#### Herstellen der benötigten Lösungen

**MTT-Lösung:** Es wurde eine Stammlösung von MTT (5 mg/mL) in PBS Puffer hergestellt. Die Lösung wurde über einen 0.2 µm Spritzenfilter sterilfiltriert und lichtgeschützt maximal 7 Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

**SDS-Lösung:** Es wurde eine 10 %ige Lösung von SDS in 0.01 M HCl hergestellt und über Nacht gerührt, bis alles SDS vollständig gelöst war. Die Lösung wurde über einen 0.2 µm Spritzenfilter sterilfiltriert und bis zu 30 Tage bei RT aufbewahrt (fällt im Kühlschrank aus).

**Substanzlösungen:** Von den zu testenden Substanzen wurden zunächst Stammlösungen in Wasser hergestellt (100 mg/mL für CD-Derivate, 10 mg/mL für Polymere und Polyrotaxane). Die Stammlösungen wurden filtriert und ausgehend von der Stammlösung eine halblogarithmische Verdünnungsreihe hergestellt. Dabei ist der Verdünnungsschritt (1:10) beim Auftragen der Lösungen auf die Zellen zu berücksichtigen.

#### Durchführung des MTT-Assays

Es wurden je 100 µL einer Zellsuspension (200 000 Zellen/mL) auf einer 96 well Platte (PS, durchsichtig, flacher Boden) ausgesät (entspricht einer Zelldichte von 20 000 Zellen pro well). Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen wurde die Zellsuspension stetig leicht geschüttelt und die Zellen mittels Multistep-Pipette auf die Platten aufgetragen. Die Zellen wurden für 24 bei 37 °C inkubiert, um am Plattenboden zu adhären, bevor die Testsubstanzen aufgetragen wurden. Auf einen Mediumswechsel nach der Inkubation wurde aufgrund zu hoher Zellverluste durch Ablösen der Zellen verzichtet. Nach 24 h wurde im Mikroskop kontrolliert, dass ein gleichmäßiger Zellrasen angewachsen war.

Es wurden jeweils 10 µL der Substanzlösung zu den bereits vorhandenen 100 µL Medium gegeben. (Aufgrund stetiger minimaler Verdunstung ist das Gesamtvolumen in den Wells nach 24 h nicht mehr 100 µL sondern geringer, es wurde davon ausgegangen dass durch Zugabe der 10 µL das Gesamtvolumen wieder etwa 100 µL sind. Da der Fehler in allen Wells ähnlich ist, wurde die minimale Volumenänderung vernachlässigt. Grundsätzlich wurden die Substanzlösungen (und Kontrollen) jeweils nur im Inneren der Platte aufgetragen. In die Randwells wurden keine Substanzlösungen aufgetragen, da hier die Verdunstungseffekte (Konzentrationsänderungen) zu hoch sind.

Für die CD-Derivate wurden die finalen Konzentrationen von 10 mg/mL bis 1 µg/mL getestet, für Polymere und Polyrotaxane im Bereich von 1 mg/mL bis 100 ng/mL, jeweils als Duplikate

Als Negativkontrolle wurde statt 10 µL der Substanzlösungen 10 µL Wasser zugegeben, als Positivkontrolle diente Ethanol (finale Konzentration 20 %). Für Positiv- und Negativkontrollen wurden jeweils Triplikate durchgeführt.

Nachdem die Substanzlösungen aufgetragen wurden und die Platten zur besseren Durchmischung vorsichtig (!) leicht geschüttelt wurden, wurden die Zellen erneut für 24 h inkubiert. Nach 24 h wurden mit einer Multistep-Pipette vorsichtig je 20 µL der zuvor vorbereiteten MTT-Lösung zugegeben, ganz leicht geschüttelt (Gelbfärbung) und 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Mikroskop ist dabei die Bildung der dunkelblauen Formazan-Kristalle zu beobachten.

Anschließend wurden jeweils 80 µL der vorbereiteten SDS-Lösung mittels Multistep-Pipette zugegeben und die Platten dann bei RT inkubiert. Nach 1 h wurde die Absorption im Platerader bei 570 nm bestimmt, anschließend wurde die Platte in einem verschließ-

baren Plastikbeutel mit feuchtem Tuch (zum Erhalt der Feuchtigkeit und Verringern der Verdunstung) an einem dunklen Ort aufbewahrt. Am nächsten Tag (ca. 20 Stunden später) waren die Kristalle vollständig gelöst und die Zellsuspension homogen, und die Absorption bei 570 nm wurde erneut bestimmt (für die Auswertung relevante Messung).

Regelmäßige Kontrollen der Zellen im Mikroskop sind unbedingt wichtig, da hier Zellverluste (z.B. Ablösen von Zellen durch zu starkes Pipettieren) erkannt werden können, die die Ergebnisse erheblich beeinflussen, sowie um sicherzugehen, dass die Zellen in allen Wells gleichmäßig wachsen. Gibt bereits einen guten Aufschluss darüber, ob die Zellen noch leben oder bereits abgestorben sind.

Es empfiehlt sich, möglichst viele Schritte mit der Multistep-Pipette durchführen, um Schwankungen zu vermeiden, und alle Lösungen sehr vorsichtig an den Rand der Wells pipettieren, um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden.

### **Auswertung**

Die Absorptionswerte der Negativkontrollen (maximale Zellviabilität und Formazan-Bildung) wurden = 100 % Viabilität gesetzt, die Absorptionswerte der Positivkontrollen (minimale Zellviabilität und Formazanbildung) = 0 % Viabilität. Von allen weiteren Messwerten wurde zunächst der durchschnittliche Messwert der Positivkontrolle abgezogen und anschließend die prozentuale Viabilität der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet. Die Auswertung erfolgte mit OriginPro 8.5G durch Fitten mit einer Hill-Funktion.

### 5.3.4.3 Gentransfektion mit pDNA-Polyplexen aus Polyrotaxanen und PEI: finale Konditionen

#### Luciferase-Assay

Es wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen/Well in weißen 96 Wellplatten ausgesät und die Zellen 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung der Nanopartikel wurden pro Ansatz 200 ng Luciferase-DNA (pGL4.32) verwendet und Polyrotaxan im N/P-Verhältnis 2 und 10 eingesetzt. Die DNA-Lösung (100 µg/mL) wurde vorgelegt und mit entsprechendem Volumen der Polyrotaxanlösungen (je nach M/N-Verhältnis ca. 300 µg/mL) durch vorsichtiges Mischen gebildet. Das Volumen wurde mit milliQ-Wasser auf 10 µL/Ansatz aufgefüllt. Als Positivkontrolle diente PEI (N/P 10), als Negativkontrolle die reine DNA. Nach 30-minütiger Inkubation der Partikellösungen bei RT wurden die Lösungen vorsichtig auf die Zellen gegeben. Dabei wurden die Randwells aufgrund der hohen Verdunstungseffekte und damit einhergehender Aufkonzentrierung der Salze im Medium und der Änderung der Osmolarität, welche wiederum zu einer schwächeren Zellproliferation führt, ausgespart.

Die Partikel wurden durch vorsichtige kreisförmige Bewegungen auf den Zellen verteilt und für 20 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Induktion mit TNF $\alpha$ . Dazu wurde eine Verdünnung von TNF $\alpha$  von 2.5 ng/mL in Medium hergestellt und je 10 µL in jedes Well pipettiert (finale Konzentration im Well: 0.25 ng/mL). Die Zellen wurden für 5 h inkubiert. Anschließend wurde das Luciferasesubstrat zugegeben (100 µL/Well) und sofort die Lumineszenz im Platerader bestimmt. Alle Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt.

#### GFP-Assay

Es wurden  $1.5 \cdot 10^4$  Zellen/Well in durchsichtigen PS 96 Wellplatten ausgesät und die Zellen 24 h bei 37°C inkubiert. Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte analog, jedoch mit GFP-encodierender DNA (pcDNA3-EGFP). Nach Zugabe der Partikellösungen auf die Zellen wurden diese für 48 h inkubiert. Der Fortschritt der Expression des GFP konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Nach 48 h und einer deutlich sichtbaren Fluoreszenz der Zellen wurde das Medium abgesaugt und 30 min mit 100 µL einer TritonX-100 Lösung (50 mM TRIS\*HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA) behandelt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat gemischt und auf eine schwarze 96-Wellplatte überführt. Anschließend wurde im Platerader die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm bestimmt. Alle Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt.

### Amplifikation und Isolation der pDNA

Der erhaltene Bakterienstab wurde auf Agarplatten mit Kanamycin ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Es wurde eine Einzelkolonie abgestrichen und in 100 mL LB Medium (5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton und 5 g/L NaCl, mit NaOH auf pH 7 eingestellt) mit 50 µg/mL Kanamycin gegeben. Der Ansatz wurde 18 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 500 µL des Ansatzes mit 500 µL Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren (Glycerolstock). Der restliche Ansatz wurde 15 min bei 4°C bei 4700 g zentrifugiert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Qiagen MaxiPrep Plasmid Kit nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit wurde mit Nanodrop bestimmt. Es sind weder Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm), noch durch Zucker, Phenole und Salze (bei 230 nm) zu erkennen. Für die Probe wurde  $A_{260}/A_{230} = 2.37$  ( $\geq 2$ ), sowie  $A_{260}/A_{280} = 1.89$  (1.8 – 2.0) bestimmt.

#### Restriktion des Plasmids

Es wurde die isolierte pDNA (0.5 µg) mit 10x NEBuffer3.1 (2.5 µL) und den Restriktionsendonucleasen Nde1 (0.6 µL, 6 units) und/oder Eag1 (0.6 µL, 6 units) mit Wasser auf ein Volumen von 25 µL aufgefüllt. Es wurde gemischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 20 min bei 65 °C inkubiert, um die Restriktionsendonucleasen zu inaktivieren.

#### Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Vom nicht geschnittenen Plasmid sowie von den geschnittenen Plasmiden (nur Eag1, nur Nde1 und Eag1 und Nde1) Es wurden jeweils Ansätze à je 10 µL in Wasser vorbereitet, die 200 ng DNA enthalten. Dazu wurden je 2 µL des Loading Dyes (x6) gegeben.

#### Gelelektrophorese

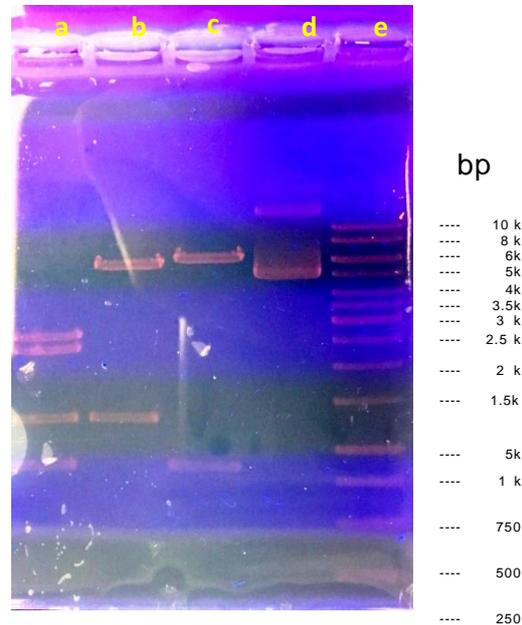
Es wurden 500 mg Agarose in 50 mL TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer gegeben und die Mischung vorsichtig aufgeköcht und gerührt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Mischung wurde auf 60 °C abgekühlt und in die vorbereitete Kammer mit Kamm gegossen (Höhe: ca. 0.6 cm). Das Gel wurde in die Kammer eingelegt, mit TAE-Puffer überschichtet und vorsichtig je 10 µL der vorbereiteten Proben in die Kammern eingefüllt (10 µL). Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 110 V für ca. 70 min. Zur Färbung der DNA wurde das Gel anschließend für 20 min in ein Ethidiumbromid-Bad eingelegt und unter UV-Licht (bei 354 nm) betrachtet. Nde1 erkennt und schneidet die Basenabfolge CA<sup>V</sup>TATG, Eag1 CG<sup>V</sup>GCCG. Die Schnittstellen der beiden Enzyme sind in Abb. 67 dargestellt. Die Größe der Fragmente nach Restriktionsverdau sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Theoretische Fragmente, die beim Restriktionsverdau des Plasmids sfGFP-TFR20 mit den Enzymen Nde1 und Eag1 erhalten werden.

Restriktionsenzym	Fragmente [bp]			
Nde1	854		6194	
Eag1		1281	5767	
Nde1 + Eag1	854	1281	2303	2610

Ein Bild des angefärbten Gels ist in Abb. 98 dargestellt. Für das nicht geschnittene Plasmid sind zwei Banden zu beobachten, jeweils für das zir-

kuläre Plasmid (> 10 000) und für das Plasmid in seiner supercoiled Form (5 000-6 000 bp). Bei der mit Nde1 und Eag1 jeweils einzeln verdauten Probe sind jeweils zwei Banden zu sehen, die den erwarteten Größen entsprechen. Beim letzten Ansatz mit beiden Enzymen sind ebenfalls die vier erwarteten Banden zu sehen. Damit ist die Identität des Plasmids bewiesen.



**Abb. 98:** Gelelektrophorese eines 1 %tigen Agarosegels in TAE-Puffer, angefärbt mit Ethidiumbromidlösung. Aufgetragen wurden a) das mit Eag1 und Nde1 verdaute Plasmid, b) das mit Eag1 verdaute Plasmid, c) das mit Nde1 verdaute Plasmid, d) das nicht verdaute Plasmid (Kontrolle) und e) der Standard zur Bestimmung der Größe der Basenpaare.

### Transfektion zur Überexpression des TFR

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von 100 000 c/Well in einer 6 Well Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Transfektion mit dem Plasmid sfGFP-TFR-20 mit dem Transfektionsreagenz JetPrime nach Herstellerangaben. Nach 2 d wurden die Zellen trypsiniert, und  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well in durchsichtige 96-Wellplatten ausgesät.

### Bestimmung des Zeitfensters der transienten Transfektion

HEK293T Zellen wurden in Vollmedium in einer 96 Wellplatte ausgesät ( $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well) und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit sfGFP-TFR-20 mit JetPrime nach Herstellerangaben transfiziert. In definierten Abständen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und Proben mit einer TritonX-100 Lösung (50 mM TRIS\*HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA) behandelt. Anschließend wurde im Platerreader die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm bestimmt.

#### 5.3.4.4 Herstellung der Core-Shell-Nanopartikel

Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt (final: 200 µg DNA/Well). Um identische Ausgangspartikel zu haben, wurde der 4-fache Ansatz der **PP1**-Partikel angesetzt und ausgehend davon **PP1a**, **PP1b** und **PP1c** angesetzt.

**PP1**: Zu 600 ng DNA (6 µL einer 100 µg/mL DNA-Lösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 7) wurde PEI im N/P-Verhältnis 10 gegeben (16 µL einer 100 µg/mL PEI-Lösung) und 30 min inkubiert.

**PP1a**: Zu einem Ansatz von **PP1** wurden nach 30 min Inkubation bei RT 6.3 µL einer CD-HS-Lösung (1 mg/mL) zugegeben, um 50 % der Ladungen des PEI auszugleichen. Die Partikel wurden 2 h bei RT inkubiert und anschließend über eine 100 kDa-Dialysekapsel gegen 10 mM Phosphatpuffer ultrafiltriert.

**PP1b**: Zu einem Ansatz von **PP1a** wurden 1.8 µL einer Ad-Tf-Lösung (1 mg/mL) und 18 µL 10 mM Phosphatpuffer (für 1 % Ad-Tf im Bezug auf die CD der CD-HS) bzw. 18 µL der Ad-Tf-Lösung (1 mg/mL) und 2 µL Phosphatpuffer gegeben, 2 h bei RT inkubiert und über Nacht in einer 100 kDa-Dialysekapsel gegen 10 mM Phosphatpuffer ultrafiltriert.

**PP1c** (nur für Analytik): Zu einem Ansatz von **PP1c** wurden für den 1% Ad-Tf-Partikel 2 µL, für 10 % Ad-Tf-Partikel 20 µL der Anti-Tf\*-Lösung (200 ng/mL) gegeben, 2 h inkubiert und anschließend über Nacht in einer 300 kDa-Dialysekapsel gegen 10 mM Phosphatpuffer dialysiert.

Alle Ansätze wurden mit 10 mM Phosphatpuffer auf ein Gesamtvolumen von 30 µL aufgefüllt und jeweils 10 µL in jedes Well pipettiert.

Für den Luciferase bzw. GFP-Assay wurden entsprechend pGL4.32 und pcDNA3-EGFP eingesetzt und verfahren wie oben beschrieben.

Für die FACS-Analyse wurde jeweils der 2.5-fache beschriebene Ansatz mit *calf thymus* DNA angesetzt und die Volumina auf 400 µL aufgefüllt.

#### Bestimmung der FITC-Intensität der Nanopartikel

Es wurde die Fluoreszenzintensität von 100 µL der Nanopartikelsuspensionen im Platerader bei einer Absorptionswellenlänge von 395 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm bestimmt.

#### Durchflusszytometrische Analyse der oberflächenfunktionalisierten Nanopartikel

BD FACS Canto II durchgeführt, das Gerät wurde über die BD FACSDiva™ Software Version 8.0.1 gesteuert. Da die Analyse von Nanopartikeln an der unteren Größenempfindlichkeitsgrenze liegen, wurde das Gerät zunächst mit fluoreszierenden Megamix-Plus SSC Beads (BioCytex, Marseille, Frankreich) definierter Größe zwischen 0.1 und 1 µm kalibriert. Die Analysendauer wurde auf 1 min gesetzt, die Flussrate „low“ (ca. 10-15 µL/min laut Hersteller), der SSC wurde auf 600 V gesetzt, FSC auf 800 V und FITC auf 580 V. Es wurde die logarithmische Skalierung gewählt. Es wurden jeweils Cytogramme mit FITC-H x SSC-H, sowie FSC-H x SSC-H erstellt, sowie ein Histogramm mit SSC-H x Zählrate. Für die Analyse der Nanopartikel wurden die zuvor angesetzten Nanopartikelsuspensionen auf eine DNA-Konzentration von 3.75 µg/mL verdünnt, sodass jeweils 400 µL mit je 1.5 µg DNA erhalten wurden.

### **Transfektion mit Core-Shell-Nanopartikeln**

Die Nanopartikel wurden wie oben beschrieben mit Luciferase und GFP-encodierender DNA angesetzt und jeweils PP1, PP1a und PP1b mit 1 % und 10 % Ad-Tf in Triplikaten auf die Zellen gegeben. Das Auslesen erfolgte bei Luc-DNA nach 25 h, bei GFP-DNA nach 48 h.

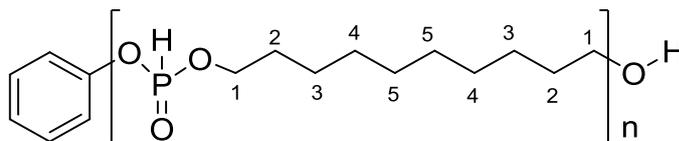
### **Kompetitiver Bindungsassay**

Es wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well in einer 96 Wellplatte ausgesät und 24 h inkubiert. Dann wurden in die Hälfte der Wells je 10  $\mu$ L einer Holotransferrin-Lösung in Medium zugesetzt, um finale Tf-Konzentrationen zwischen 20  $\mu$ g/mL und 2 mg/mL zu erreichen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 0  $\mu$ g/mL Tf.

Es wurden je Ansätze der Nanopartikel **PP1**, **PP1a** und **PP1b** (10% Ad-Tf) hergestellt und jede Partikellösung jeweils auf 3 Wells der unbehandelten Zellen und in 3 Wells der Zellen mit Transferrinzusatz gegeben. Das Auslesen der Assays erfolgte wie oben beschrieben. Für die Polyrotaxan-Partikel **PP3**, **PP3a** und **PP3b** wurde analog verfahren, jedoch nur mit 0  $\mu$ g/mL und 20  $\mu$ g/mL Tf im Zellmedium.

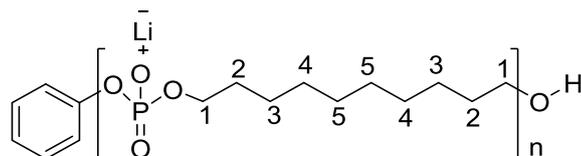
### 5.3.5 Polyrotaxane zur Therapie der Niemann-Pick Krankheit

#### Poly(decamethylenphosphit) P6



1,10-Decandiol (6.227 g, 26.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter  $N_2$  Atmosphäre zu Diphenylphosphit (4.619 g, 26.5 mmol, 1.0 Äq.) in einer Kolonnenkopf-Apparatur gegeben. Die Mischung wurde zunächst bei 30 mbar innerhalb 1 h auf  $100^\circ C$  erhitzt. Dann wurde die Reaktion innerhalb 1 h auf  $150^\circ C$  erhitzt, bevor der Druck auf 0.06 bar reduziert wurde und noch 1 h gerührt wurde. Anschließend wurde die Reaktion innerhalb einer 1 h auf  $200^\circ C$  erhitzt und noch 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann auf  $20^\circ C$  abgekühlt und es wurde ein weißer, wachsartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute:	5.77 g (26.2 mmol) <b>99 %</b>
$^1H$ -NMR:	$\delta/ppm$ ( $CDCl_3$ , 400 MHz) = 6.78 (d, 1H, P-H, $^1J_{H,P}$ = 346 Hz), 4.04 (sh, 4H, H-1), 1.70 – 1.54 (sh, 4H, H-2), 1.29 (sh, 12H, H-3/4/5).
$^{13}C$ -NMR	$\delta/ppm$ ( $CDCl_3$ , 100 MHz) = 65.8 (C-1), 30.4 (C-2), 29.4 (C-3), 29.1 (C-4), 25.5 (C-5).
$^{31}P$ -NMR	$\delta/ppm$ ( $CDCl_3$ , 100 MHz) = 6.86 ppm.

**Poly(decamethylenphosphat) P7**

Zu einer Lösung von Poly(decamethylenephosphit) **P6** (5.14 g, 23.4 mmol, 1.0 Äq.) in 200 mL DCM wurde *N*-Chlorsuccinimid (3.43 g, 25.7 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Die Mischung wurde 5 d bei 20 °C gerührt wodurch das polymere Phosphorylchlorid erhalten wurde. Anschließend wurde eine Lösung von Imidazol (3.18 g, 46.1 mmol, 2.0 Äq.) in 70 mL DCM über 2 h bei 20 °C zur Lösung des polymeren Phosphorylchlorids zugetropft und die Lösung über Nacht gerührt, um das polymere Phosphorylimidazol zu erhalten. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und 500 mL einer 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung wurden zugegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt. Die wässrige Phase wurde über Nacht gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wurde über eine 5 kDa Polyethersulfon-Membran zunächst gegen 2 L einer 0.1 M Phosphatpuffer mit 0.1 M LiCl und anschließend gegen 2 L H<sub>2</sub>O ultrafiltriert. Nach Lyophilisieren wurde ein weißer, watteartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute:	2.13 g (8.85 mmol) <b>38 %</b>
<sup>1</sup> H-NMR:	δ/ppm (D <sub>2</sub> O) = 3.82 (bs, 4H, H-1), 1.62 (bs, 4H, H-2), 1.32 (sh, 12H, H-3/4/5).
<sup>13</sup> C-NMR	δ/ppm (D <sub>2</sub> O) = 66.0 (C-1), 30.3 (C-2), 29.9 (C-3), 29.3 (C-4), 25.7 (C-5).
<sup>31</sup> P-NMR	δ/ppm (D <sub>2</sub> O) = 0.61 ppm.

**Einschluss von P7 in α-CD**

α-CD (11.6 mg, 16 mmol, 1.3 Äq.) und Poly(decamethylenphosphat) **P7** (4.1 mg, 12 mmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in 1 mL D<sub>2</sub>O gelöst. Es wurden jeweils 350 µL von beiden Lösungen gemischt und bei 60 °C über 22 d erhitzt.

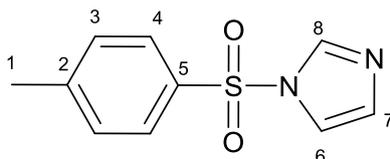
<sup>1</sup> H-NMR:	δ/ppm (D <sub>2</sub> O) = 5.06 (s, 0.25 H, aufgefädelt α-CD), 5.05 (d, 0.75 H, freies α-CD) 3.99 - 3.57 (m, 6 H, H-1 + α-CD), 1.81 - 1.23 (sh, 16H, H-3/4/5).
---------------------	--

**Poly(decamethylenphosphat)-Polyrotaxan PRx18**

2-HP-β-CD (d.s.: 0.9, durchschnittliches MW 1500 g/mol; 29.8 g, 198 mmol, 6.0 Äq.) und Poly(decamethylenphosphat) **P7** (802 mg, 3.30 mmol, 1.0 Äq.) wurden portionsweise in 100 mL einer 0.05 M NaCl Lösung gegeben. Die erhaltene klare Lösung wurde für 5.5 h auf 40 °C erhitzt. Dann wurde eine Lösung von α-CD (3.20 g, 3.30 mmol, 1.0 Äq.) in 30 mL H<sub>2</sub>O zugegeben und die Mischung wurde bei 70 °C für 16 h gerührt. Um die nicht aufgefädelten CDs vom Polyrotaxan abzutrennen, wurde die Lösung via Ultrafiltration aufgereinigt. Dazu wurde die Lösung gegen eine 5 kDa Polyethersulfon Membran gegen eine 0.05 M LiCl Lösung und anschließend gegen H<sub>2</sub>O ultrafiltriert, bevor das Wasser über Gefriertrocknung entfernt wurde. Es wurde ein weißer, watteartiger Feststoff erhalten.

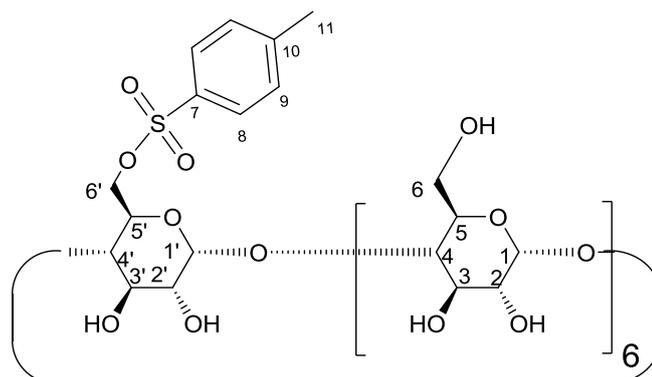
Ausbeute:	1.28 g
$^1\text{H-NMR}$ :	$\delta/\text{ppm}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ ) = 5.22 (s, 0.6 H, HP-CD), 5.08 (s, 0.7 H, HP-CD), 5.04 (s, 0.16 H, $\alpha$ -CD), 4.12 - 3.41 (m, 14.3 H, H-1 + $\alpha$ -CD + HP-CD), 1.64 (bs, 4H, H-2), 1.35 (sh, 12H, H-3/4/5), 1.16 (s, 2.8H, HP-CD).

### **p-Toluolsulfonsäureimidazol M3**



p-Toluolsulfonylchlorid (30.0 g, 158 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 150 mL  $\text{DCM}_{\text{abs}}$  gelöst. In einem zweiten Kolben wurde Imidazol (21.5 g, 315 mmol, 2.0 Äq.) in 150 mL  $\text{DCM}_{\text{abs}}$  gelöst. Unter Eiskühlung wurde die Imidazolösung über 2 h zur p-TosCl-Lösung getropft, auf 20 °C erwärmt und weitere 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, auf ca. 30 mL eingengt und aus 400 mL kaltem Hexan gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute:	33.0 g (148 mmol) <b>94 %</b>
$^1\text{H-NMR}$ :	$\delta/\text{ppm}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 8.38 (s, 1H, H-8), 7.99 (d, $^3J_{3,2} = 8$ Hz, 2H, H-4), 7.96 (s, 1H, H-6), 7.50 (d, $^3J_{2,3} = 8$ Hz, 2H, H-3), 7.13 (s, 1H, H-7), 2.40 (s, 3H, H-1).

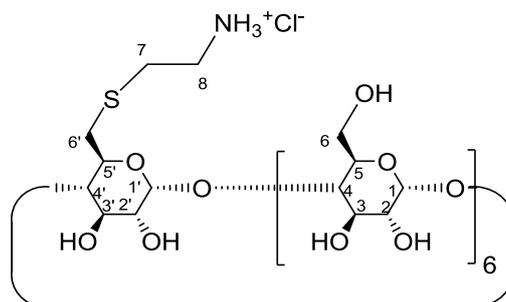
**Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin CD8**

$\beta$ -Cyclodextrin (70.0 g, 61.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Erlenmeyerkolben in 700 mL Wasser gelöst. Anschließend wurde *p*-Toluolsulfonsäureimidazol **M3** (17.8 g, 80.0 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben und die Mischung bei 20 °C für 4 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 20 g NaOH in 100 mL Wasser versetzt und 10 min gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat sofort mit 40 g Ammoniumchlorid und ca. 150 mL 6 M HCl auf pH 7 eingestellt. Dann wurde über eine Glasfilterfritte filtriert und drei Mal mit 100 mL Wasser und 100 mL Aceton gewaschen. Es wurde aus 100 mL eines Wasser-Methanol-Gemischs (1:1) umkristallisiert, heiß abgesaugt und der Feststoff am HV getrocknet. Aus dem Filtrat konnte noch eine weitere Produktfraktion erhalten werden. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 43.7 g (33.3 mmol) **54 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ /ppm (DMSO- $d_6$ ): 7.78 (d,  $^3J_{8,9} = 8$  Hz, 2H, H-8), 7.46 (d,  $^3J_{9,8} = 8$  Hz, 2H, H-9), 5.86-5.67 (m, 14H, OH-2/2', OH-3/3'), 4.86-4.75 (m, 7H, H-1/1'), 4.55-4.35 (m, 6H, OH-6), 4.34-4.30 (m, 1H, H-6'a), 4.21-4.19 (m, 1H, H-6'b), 3.66-3.43 (m, 26H, H-3/3', H-5/5', H-6a/b), 3.39-3.20 (m, 14H, H-2/2', H-4/4'), 2.44 (s, 3H, H-11).

### Mono-[6-deoxy-6-(aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin CD9

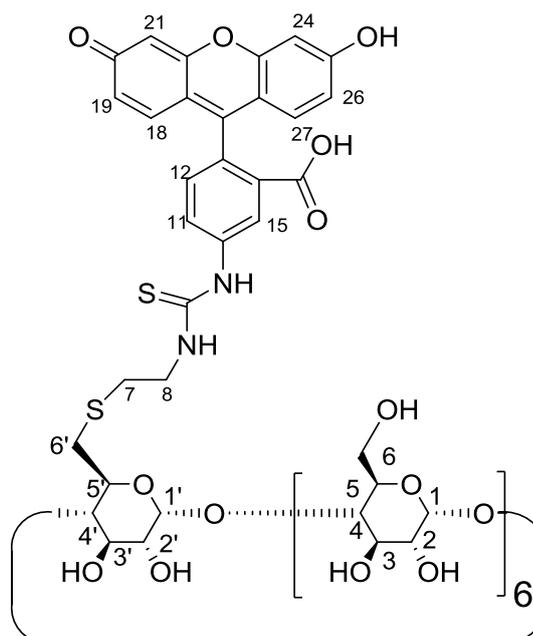


Mono-[6-(p-toluolsulfonyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin **CD8** (7.0 g, 5.43 mmol, 1.0 Äq.), Cysteaminyl-Hydrochlorid (5.55 g, 48.9 mmol, 9.0 Äq., zuvor am Hochvakuum getrocknet) und Triethylamin (35.2 mL, 178 mmol, 33.0 Äq.) wurden in 110 mL eines DMF/Wasser-Gemisches (1:3) gegeben und die Suspension 4 d bei 60 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf ca. 30 mL eingengt und mit 6 M HCl auf pH 3 eingestellt. Es wurde aus 500 mL kaltem Aceton gefällt und der Niederschlag abgesaugt. Der Filterkuchen wurde in Wasser (ca. 70 mL) und etwas DMSO (5 mL) gelöst und nochmal in EtOH gefällt. Der abgesaugte Niederschlag wurde über Nacht im Hochvakuum getrocknet, bevor das Rohprodukt gegen eine 0.05 M NaCl-Lösung über eine 500 Da Regeneratcellulose-Membran ultrafiltriert wurde und das Produkt anschließend lyophilisiert wurde. Es wurde ein watteartiger, weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.02 g (3.27 mmol) **60 %**

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ /ppm ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.13 (s, 1H, H-1'), 5.07 (s, 6H, H-1), 4.16-4.02 (m, 1H, H-5'), 3.98-3.80 (m, 25H, H-5/6/3/3'), 3.68-3.51 (3, 14H, H-2/2'/4/4'), 3.26-3.23 (m, 2H, H-8), 3.20-3.16 (m, 1H, H-6'a), 2.99-2.93 (m, 3H, H-6'b/7).

## FTIC-markiertes CD-Derivat CD10

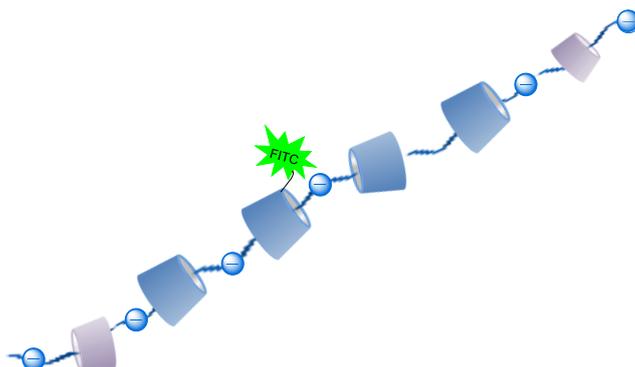


Mono-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -CD **CD8** (1.00 g, 0.81 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 18 mL wasserfreiem Pyridin gelöst. Eine Lösung von Fluorescein-5-isothiocyanat (Isomer I) (634 mg, 1.62 mmol, 2.0 Äq.) in 18 mL Pyridin wurde über 20 min unter  $N_2$  zuge tropft. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren auf 60 °C erhitzt. Nach 3 h wurde das Lösungsmittel destillativ bei 60 °C entfernt. Der Rückstand wurde in 15 mL *N,N*-Dimethylacetamid aufgenommen und aus 200 mL kaltem Aceton gefällt. Die Mischung wurde über Nacht gerührt, dann wurde der Niederschlag durch Zentrifugation gewonnen und erneut in 100 mL Wasser gelöst und über Nacht gerührt. Das Rohprodukt wurde über eine 500 Da Regeneratcellulose-Membran gegen eine 0.01 M wässrige Ammoniaklösung und anschließend gegen  $H_2O$  ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung wurde ein gelber, watteartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 816 mg ( $5.15 \cdot 10^{-4}$  mol) **64 %**

$^1H$ -NMR:  $\delta$ /ppm (DMSO- $d_6$ ): 9.24 (bs, 1H, COOH), 8.11 (bs, 1H, Ar-OH), 7.54-6.97 (m, 5H, H-11/12/15, NH), 6.83-6.46 (m, 6H, H-18/19/21/24/26/27), 6.36-5.25 (bs, 20 H, OH), 5.09-4.71 (m, 7H, H-1/1'), 4.10-3.45 (m, 26 H, H-3/3'/5/5'/6), 3.44-3.21 (m, 14H, H-2/2'/4/4'), 3.15-2.91 (m, 3H, H-6'a/H-8), 2.91-2.64 (m, 3H, H-6'b/H-7)

### FITC-markiertes Polyrotaxan PRx19



Poly(decamethylenphosphat) **P7** (27.0 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) und das fluoreszenzmarkierte CD-Derivat **CD10** (44.0 mg, 0.028 mmol, 0.25 Äq.) wurden in 2 mL einer 0.05 M LiCl Lösung auf 40 °C erhitzt. Nach 1 h wurde HP- $\beta$ -CD (500 mg, 0.33 mmol, 3.0 Äq.) zugegeben und die Lösung bei 40 °C gehalten. Nach 6 h wurde eine Lösung von  $\alpha$ -CD (150 mg, 0.15 mmol, 1.3 Äq. in 1 mL 0.05 M LiCl) zugegeben und die Mischung wurde für 16 h auf 70 °C erhitzt. Um die nicht aufgefädelten CDs vom Polyrotaxan abzutrennen, wurde die Reaktionsmischung über eine 5 kDa Polyethersulfon-Membran gegen eine 0.05 M LiCl Lösung und anschließend gegen H<sub>2</sub>O ultrafiltriert und gefriergetrocknet. Es wurde ein gelber, watteartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 62 mg

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$ /ppm (D<sub>2</sub>O) = 8.05-6.20 (bs, 0.67 H, Fluo-CD), 5.14 (s, 0.76 H, HP-CD), 5.08-4.97 (sh, 1.33 H, HP-CD + Fluo-CD), 4.96 (s, 0.26 H,  $\alpha$ -CD), 4.06 - 3.32 (m, 22 H, H-1 +  $\alpha$ -CD + HP-CD + Fluo-CD), 1.78-1.13 (sh, 12H, H-2/3/4/5), 1.09 (s, 4 H, HP-CD).

#### 5.3.6 Löslichkeitsbestimmungen von P7 und PRx18

Übersättigte Lösungen von **P7** bzw. Polyrotaxan **PRx18** in jeweils 1 mL milliQ Wasser wurden 18 h geschüttelt, und 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 500  $\mu$ L entnommen und lyophilisiert. Es wurde die Masse an erhaltenem Polymer bzw. Polyrotaxan bestimmt und durch Multiplikation mit dem Faktor 2 die Menge an Substanz bestimmt, die in 1 mL gelöst war.

### 5.3.7 TNS-Assay

Der Assay wurde in 50 mM PBS (8 g/L NaCl, pH 7.35) durchgeführt. Das Polyrotaxan **PRx18** (29.0 mg) wurde in 11.2 mL PBS gelöst und bei 37 °C inkubiert. Über eine Zeitspanne von 50 d wurden in definierten Abständen jeweils 1 mL der Lösung entnommen und eingefroren. Um die frei gewordenen CDs abzutrennen, wurden jeweils 500 µL der Proben in Vivaspin 2, MWCO 3000 (Sartorius, Göttingen) ultrafiltriert. Das freie HP-β-CD wurde im Filtrat erhalten. Die Filtrate wurden gefriergetrocknet und der Rückstand in 200 µL Wasser aufgenommen. Von diesen Lösungen wurden jeweils 10 µL entnommen und mit 15 µL Wasser verdünnt (um wieder eine Salzkonzentration von 50 mM zu erhalten), und mit 225 µL PBS und 50 µL einer 0.072 mM TNS-Lösung in PBS versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 20 °C wurden die Fluoreszenzintensitäten der Proben bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm und einer Detektionswellenlänge von 448 nm bei 27 °C bestimmt.

### 5.3.8 Filipin Färbung der NPC1 Zellen

NPC-1 Zellen (Coriell Institut) wurden in 96 Well Platten mit einer Dichte von 1600 Zellen/Well in Eagle's Minimum Essential Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät.

Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, bevor jeweils in Triplicaten Lösungen des Polyrotaxans **PRx18** bzw. freiem HP-β-CD zugegeben wurde. 100 µL einer Lösung, die 0.24 mg **PRx18** enthält und damit einer finalen HP-β-CD-Konzentration von 800 µM im Zellkulturmedium entspricht, wurde als höchste Konzentration eingesetzt. HP-β-CD-äquivalente Konzentrationen von 400, 200, 100, 25, 12.5 µM sowie unbehandelte Kontrollen wurden angesetzt, um die Dosis-Wirkbeziehung des **PRx18** an NPC-1 Zellen zu erforschen.

α-CD (0.4 µg) und 3.4 µg Poly(decamethylenphosphat) **P7** pro Well (der entsprechenden Menge des Polymers **P7**, die sich in der Menge von 25 µM HP-β-CD Äquivalenten des PRx **PRx18** befindet) dienten als zusätzliche Kontrollen. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Paraformaldehyd-Lösung (3.7 %) fixiert. Der Gesamtgehalt an nicht verestertem Cholesterin in den Zellen wurde bestimmt, indem die Zellen 1.5 h mit 50 µg/mL Filipin III in PBS behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Zellkerne mit einer Lösung von 16 µM Nuclear Red DCS1 (AAT Bioquest) in PBS gefärbt. Die Zellen wurden durch ein 5x Objektiv an einem Opera Phenix High-Content Imaging System (Perkin Elmer) betrachtet. Harmony Software (v4.1, Perkin Elmer) wurde verwendet, um die Daten auszuwerten, wobei die Randwells nicht berücksichtigt wurden.

Die Zellkerne wurden über den Cy5.5 Kanal identifiziert und der Gehalt an nicht verestertem Cholesterin wurde über die mittlere Filipin-Intensität über den DAPI-Kanal bestimmt. Die mittlere Filipin-Intensität in den behandelten Zellen wurde mit der der nicht behandelten Zellen verglichen und als % Filipin Färbung ± SEM angegeben. Eine One-way ANOVA Analyse wurde in GraphPad Prism (v7.03, GraphPad Software) durchgeführt.

### 5.3.9 Cellular Tracking der Polyrotaxane

NPC1 Zellen wurden mit dem FITC-markierten Polyrotaxan **PRx19** in Opti-MEM Medium behandelt, in einer Konzentration die 25 µM HP-β-CD entspricht. Die Zellen wurden jeweils 4 h bzw. 24 h bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurde die Polyrotaxanlösung entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht aufgenommenes Polyrotaxan zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen erneut 24 h

unter denselben Bedingungen inkubiert. Zur Bildgebung wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342, sowie die sauren endosomalen und lysosomalen Bereiche mit LysoTracker Red DND 99 angefärbt. An einem Nikon A1R Multiphoton Konfokalmikroskop mit einem 60X Objektiv, ausgestattet mit 405 nm, 488 nm und 561 nm Lasern (jeweils für Hoechst 33342, FITC und LysoTracker Red DND 99) wurden Konfokalbilder der Zellen aufgenommen.

### 5.3.10 FACS Analyse

NPC1 Zellen wurden mit dem FITC-markierten Polyrotaxan **PRx19** in Opti-MEM Medium behandelt, in einer Konzentration die 25  $\mu$ M HP- $\beta$ -CD entspricht. Die Zellen wurden jeweils 4 h bzw. 24 h bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht aufgenommenes Polyrotaxan zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen erneut 24 h unter denselben Bedingungen inkubiert. Es wurde eine FACS Analyse durchgeführt an einem BD LSR Fortessa flow Cytometer mit einem 488 nm Laser, um die mittlere Fluoreszenzintensität in 5000 NPC1 Zellen zu bestimmen (n=3, one-way ANOVA, \*\*\*\*p<0.0001).

### 5.3.11 MTS Assay

Die MTS Assays zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 5.3.12 Ellman Assay zur Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität

Für jedes Experiment wurden jeweils frische Stammlösungen von Acetylthiocholin und DTNB angesetzt. Die Stammlösung von Eserin in Wasser (10 mM, Ultraschallbad) wurde über 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.

AChI-Lösung: Es wurden 4.3 mg (26  $\mu$ mol) Acetylthiocholin in 1 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8.0) gelöst, um eine 26 mM Lösung zu erhalten.

DTNB-Reagenz: Es wurden 9.9 mg (25  $\mu$ mol) 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz) zusammen mit 3.75 mg (18  $\mu$ mol) Natriumhydrogencarbonat in 2.5 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) gelöst, um eine 25 mM Lösung von DTNB in 7mM NaHCO<sub>3</sub> in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) zu erhalten.

Es wurden zunächst Stammlösungen des Polyalkylenphosphats **P7** in Wasser angesetzt. Für die 0.1 M Stammlösung wurden 24.2 mg **P7** (100  $\mu$ mol bezogen auf die Wiederholeinheit des Polymers) in 1 mL dest. Wasser gelöst und über einen 0.2  $\mu$ m Spritzenfilter filtriert. Ausgehend davon wurden jeweils 1:10 und 3:10 Verdünnungen angesetzt, um eine halblogarithmische Konzentrationsreihe von 0.1 M bis 10  $\mu$ M zu erhalten.

Für die Testansätze wurden jeweils das Zellhomogenat von ca. 50 000 SH-SY5Y – Zellen in 67  $\mu$ L 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8.0) vorgelegt und jeweils 10  $\mu$ L der vorbereiteten Stammlösungen zugegeben und gemischt. Als Negativkontrolle (keine Inhibition) wurden 10  $\mu$ L Wasser anstelle der Stammlösung zugegeben, als Positivkontrolle (100 % Inhibition) 10  $\mu$ L einer 10 mM Eserin-Lösung in Wasser. Nach 20 min Inkubation bei 25 °C wurden jeweils 16.7  $\mu$ L des DTNB-Reagenzes zugegeben, gemischt und 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden je 6.7  $\mu$ L der AChI-Lösung zugegeben, gemischt und bei RT inkubiert. Es wurde pro Hemmstoffkonzentration jeweils noch ein Ansatz mitgeführt, bei dem nur der Hintergrund bestimmt wurde, d.h. es wurde kein Substrat (AChI) zugegeben (stattdessen das entsprechende Volumen an Wasser). Nach 60 min wurde die optische Dichte der Testansätze in einer farblosen 96 well Platte (flat bottom, Greiner) im Tecan Platerereader bei 412 nm bestimmt.

## 6 Anhang

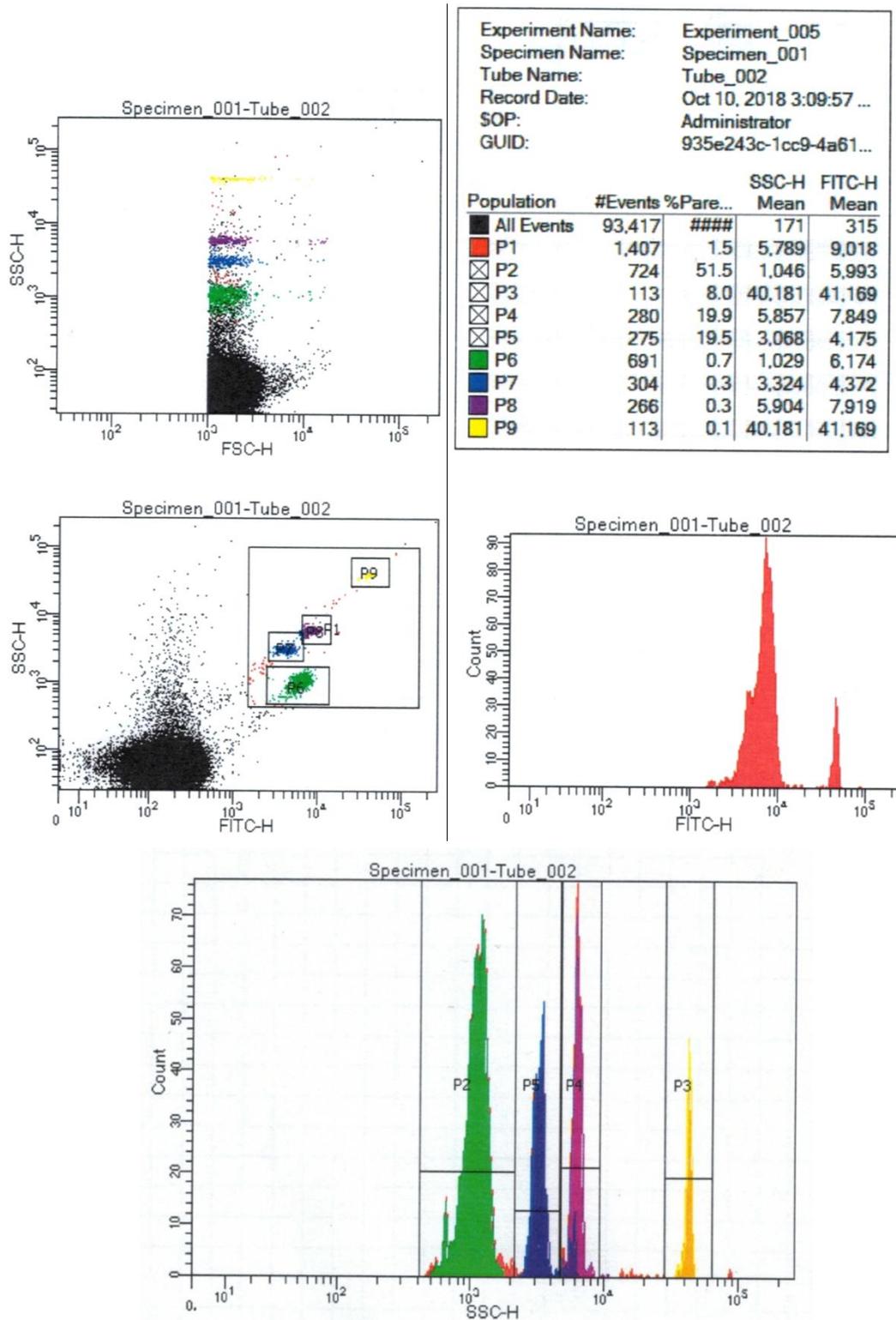
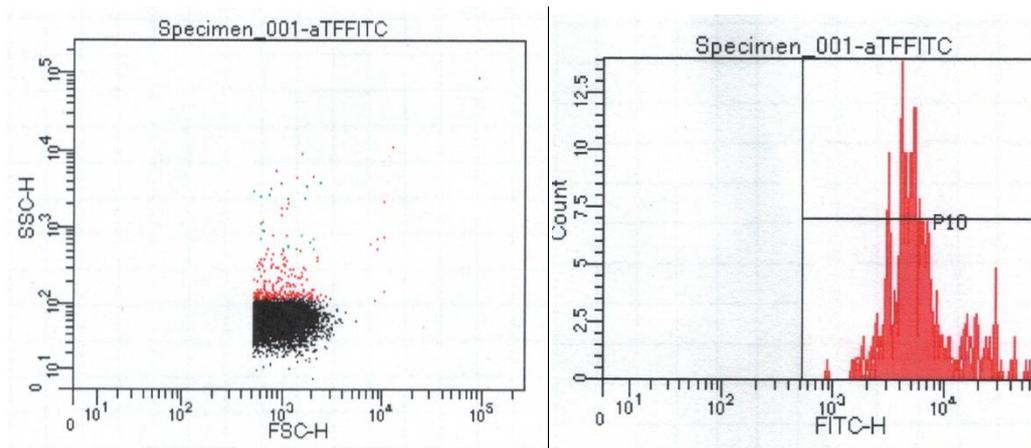
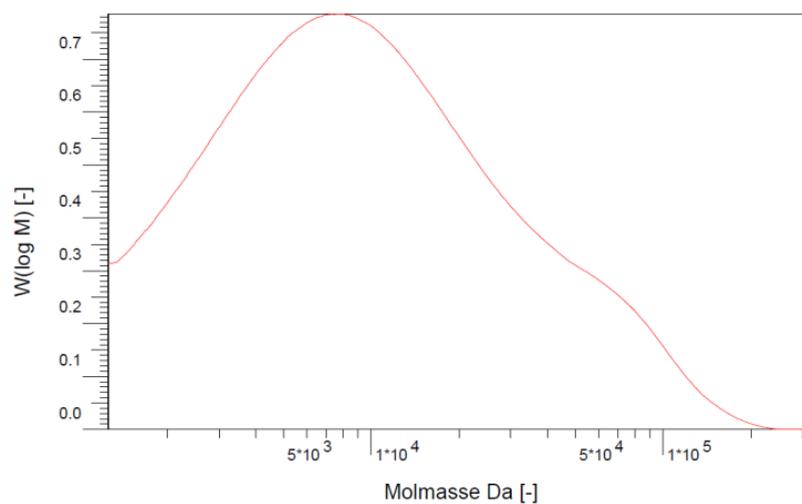


Abb. S1: Kalibrierung mit Megamix-SSC Beads zur FACS-Analyse der Nanopartikel.



**Abb. S2:** (a) Cytogramm SSC-H gegen FSC-H des fluoreszenzmarkierten Antitransferrins. In schwarz markiert ist der zuvor definierte Hintergrund. Analysiert wurde die gleiche Konzentration Anti-Tf\*, welche zur Partikelherstellung verwendet wurde. Nur sehr wenige Anti-Tf\* Moleküle konnten detektiert werden, aufgrund der geringen Größe der Moleküle, die unter der Detektionsgrenze des Geräts lagen. Das Histogramm (b) gibt die Intensitätsverteilung der Fluoreszenz an, zu sehen ist hierbei eine hohe Fluoreszenz, woraus sich schließen lässt, dass es sich bei den detektierten Teilchen um FITC-markiertes Anti-Tf\* handelt.



**Abb. S3:** Verteilung der molaren Masse des Poly(decamethylenphosphats) **P7** in 66 mM Phosphatpuffer, pH 10 mit 5 % ACN, Kalibrierung erfolgte mit Pullulan.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 R. Haag and F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 1198–1215.
- 2 I. Bala and S. Haribaran, *Evolution (N. Y.)*, 2004, **22**, 387–422.
- 3 G. S. El-Feky, M. El-Rafie, M. El-Sheikh, M. E. El-Naggar and A. Hebeish, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 2015, **06**, 1–8.
- 4 H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.*, 1975, **51**, 135–153.
- 5 R. Langer, *Science*, 1990, **249**, 1527–1534.
- 6 L. Markenstein, A. Appelt-Menzel, M. Metzger and G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 3087–3096.
- 7 L. Purdie, C. Alexander, S. G. Spain and J. P. Magnusson, *Bioconjug. Chem.*, 2016, **27**, 1244–1252.
- 8 H. Bader, H. Ringsdorf and B. Schmidt, *Die Angew. Makromol. Chemie*, 1984, **123**, 457–485.
- 9 R. Langer, *Nature*, 1998, **392**, 5–10.
- 10 R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**, 347–60.
- 11 T. M. Allen and P. R. Cullis, *Science*, 2004, **303**, 1818–1822.
- 12 G. Wenz, B.-H. Han and A. Müller, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 782–817.
- 13 J. J. Li, F. Zhao and J. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **90**, 427–43.
- 14 H. W. Gibson, M. C. Bheda and P. T. Engen, *Prog. Polym. Sci.*, 1994, **19**, 843–945.
- 15 R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, S. L. Langford, S. Menzer, L. Prodi, J. F. Stoddart, M. Venturi and D. J. Williams, *Angew. Chemie*, 1996, **108**, 1056–1059.
- 16 K. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, 2002, **31**, 96–107.
- 17 F. Huang and H. W. Gibson, *Prog. Polym. Sci.*, 2005, **30**, 982–1018.
- 18 G. Wenz, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1994, **33**, 803–822.
- 19 N. Qiu, X. Li and J. Liu, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2017, **89**, 229–246.
- 20 B. Wang, E. Zaborova, S. Guieu, M. Petrillo, M. Guitet, Y. Blériot, M. Ménand, Y. Zhang and M. Sollogoub, *Nat Commun.*
- 21 G. Wenz and M. Weickenmeier, *Macromol. Rapid Commun.*, 1996, **17**, 731–736.
- 22 W. C. Cromwell, K. Bystrom and M. R. Eftink, *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 326–332.
- 23 T. Loftsson and D. Duchene, *Int. J. Pharm.*, 2007, **329**, 1–11.
- 24 G. Tiwari, R. Tiwari and A. Rai, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 2010, **2**, 72.
- 25 R. V Pinjari, K. A. Joshi and S. P. Gejji, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 13073–13080.
- 26 L. Liu, K.-S. Song, X.-S. Li and Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2001, **40**, 35–39.
- 27 G. Wenz and B. Keller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1992, **31**, 197–199.
- 28 A. Harada, J. Li and M. Kamachi, *Nature*, 1992, **356**, 325–327.
- 29 G. Wenz and B. Keller, *Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.*, 1993, **34**, 62–64.
- 30 A. Harada, J. Li and M. Kamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 3192–3196.
- 31 A. Harada, Y. Takashima and M. Nakahata, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2128–2140.
- 32 P. Lo Nostro, J. R. Lopes and C. Cardelli, *Langmuir*, 2001, **17**, 4610–4615.
- 33 I. Kräuter, W. Herrmann and G. Wenz, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 1996, **25**, 93–96.
- 34 M. Okada, Y. Kawaguchi, H. Okumura, M. Kamachi and A. Harada, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2000, **38**, 4839–4849.
- 35 Y. Liu, Y. W. Yang, Y. Chen and H. X. Zou, *Macromolecules*, 2005, **38**, 5838–5840.
- 36 C. Meschke, H. J. Buschmann and E. Schollmeyer, *Polymer (Guildf.)*, 1999, **40**, 945–949.
- 37 H. Iguchi, S. Uchida, Y. Koyama and T. Takata, *ACS Macro Lett.*, 2013, **2**, 527–530.
- 38 G. Kali, H. Eisenbarth and G. Wenz, *Macromol. Rapid Commun.*, 2016, **37**, 67–72.
- 39 A. Harada, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 456–464.
- 40 S. A. Nepogodiev and J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **98**, 1959–1976.
- 41 H. Fujita, T. Ooya, M. Kurisawa, H. Mori, M. Terano and N. Yui, *Macromol. Rapid.*

- Commun.*, 1996, **17**, 509–515.
- 42 N. Yui, R. Katoono and A. Yamashita, in *Inclusion Polymers*, 2009, pp. 55–77.
- 43 P. Dandekar, R. Jain, M. Keil, B. Loretz, L. Muijs, M. Schneider, D. Auerbach, G. Jung, C.-M. C.-M. Lehr and G. Wenz, *J. Control. Release*, 2012, **164**, 387–393.
- 44 K. Kunath, *J. Control. Release*, 2003, **89**, 113–125.
- 45 X. T. Shuai, T. Merdan, F. Unger and T. Kissel, *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**, 322–329.
- 46 S. Loethen, J.-M. Kim and D. H. Thompson, *Polym. Rev.*, 2007, **47**, 383–418.
- 47 J. Li, C. Yang, H. Li, X. Wang, S. H. Goh, J. L. Ding, D. Y. Wang and K. W. Leong, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 2969–2974.
- 48 A. Harada, M. Okada, J. Li and M. Kamachi, *Macromolecules*, 1995, **28**, 8406–8411.
- 49 S. J. Hwang, N. C. Bellocq and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, 2001, **12**, 280–290.
- 50 J. Li, A. Harada and M. Kamachi, *Polym. J.*, 1994, **26**, 1019–1026.
- 51 J. Li and X. J. Loh, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 1000–1017.
- 52 I. Krauter, W. Herrmann and G. Wenz, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 1996, **25**, 93–96.
- 53 T. Ooya, H. Mori, M. Terano and N. Yui, *Macromol. Rapid Commun.*, 1995, **16**, 259–263.
- 54 H. Fujita, T. Ooya and N. Yui, *Macromol. Chem. Phys.*, 1999, **200**, 706–713.
- 55 T. Ooya and N. Yui, *J. Control. Release*, 1999, **58**, 251–269.
- 56 C. J. Collins, L. A. McCauliff, S.-H. Hyun, Z. Zhang, L. N. Paul, A. Kulkarni, K. Zick, M. Wirth, J. Storch and D. H. Thompson, *Biochemistry*, 2013, **52**, 3242–53.
- 57 Y. A. Mondjinou, S.-H. H. Hyun, M. Xiong, C. J. Collins, P. L. Thong and D. H. Thompson, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 23831–23836.
- 58 C. J. Collins, B. P. Loren, M. S. Alam, Y. Mondjinou, J. L. Skulsky, C. R. Chaplain, K. Haldar and D. H. Thompson, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 46737.
- 59 M. A. Mintzer and E. E. Simanek, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 259–302.
- 60 I. D. Young, *Medical Genetics*, Oxford University Press, 2010.
- 61 I. M. Verma and N. Somia, *Nature*, 1997, **389**, 239–242.
- 62 S. Rosenberg, P. Aebersold and Cornetta K; et al., *N. Engl. J. Med.*, 1999, **323**, 570–578.
- 63 D. B. Kohn, *Pediatr. Res.*, 2000, **48**, 578.
- 64 R. Mulligan, *Science*, 1993, **260**, 926–932.
- 65 S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont and J. C. Fernandes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **57**, 1–8.
- 66 G. F. Walker and E. Wagner, *Cancer Gene Ther.*, 2005, 367–378.
- 67 F. L. Graham and A. J. van der Eb, *Virology*, 1973, **52**, 456–467.
- 68 M. Jordan, A. Schallhorn and F. M. Wurm, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 596–601.
- 69 P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, **84**, 7413–7417.
- 70 C. Tros de Ilarduya, Y. Sun and N. Düzgüneş, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, **40**, 159–170.
- 71 H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui and J. Yan, *J. Control. Release*, 2006, **114**, 100–109.
- 72 J. W. Wiseman, C. A. Goddard, D. McLelland and W. H. Colledge, *Gene Ther.*, 2003, **10**, 1654–1662.
- 73 S. Agarwal, Y. Zhang, S. Maji and A. Greiner, *Mater. Today*, 2012, **15**, 388–393.
- 74 O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 7297–7301.
- 75 K. Utsuno and H. Uludağ, *Biophys. J.*, 2010, **99**, 201–207.
- 76 D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun and P. S. Stayton, *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**, 581–593.
- 77 J. Behr, *Chim. Int. J. Chem.*, 1997, **51**, 34–36.
- 78 Q.-Q. Zhao, J.-L. Chen, T.-F. Lv, C.-X. He, G.-P. Tang, W.-Q. Liang, Y. Tabata and J.-Q. Gao, *Biol. Pharm. Bull.*, 2009, **32**, 706–710.
- 79 M. D. Buschmann, M. Thibault, S. Nimesh, M. Lavertu and M. D. Buschmann, *Mol. Ther.*, 2010, **18**, 1787–1795.
- 80 W. Zauner, M. Ogris and E. Wagner, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **30**, 97–113.
- 81 H. Yamada, B. Loretz and C. Lehr, *Biomacromolecules*, 2014, 1753–1761.

- 82 A. A. Eltoukhy, D. J. Siegwart, C. A. Alabi, J. S. Rajan, R. Langer and D. G. Anderson, *Biomaterials*, 2012, **33**, 3594–3603.
- 83 H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin and D. G. Anderson, *Nat. Rev. Genet.*, 2014, **15**, 541–555.
- 84 C. C. Lee, J. A. Mackay, J. M. J. Fréchet and F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 1517–1526.
- 85 B. Helms and E. W. Meijer, *Science (80-. )*, 2006, **313**, 929–930.
- 86 A. Kulkarni, K. Defrees, R. A. Schuldt, S. Hyun, K. J. Wright, K. Charu, R. Verheul and D. H. Thompson, *Mol. Pharm.*, 2014, **10**, 1299–1305.
- 87 T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, R. Ito, K. Kogure and H. Harashima, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3852–3853.
- 88 T. Albuzat, M. Keil, J. Ellis, C. Alexander and G. Wenz, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 8558–8565.
- 89 P. Dandekar, R. Jain, M. Keil, B. Loretz, M. Koch, G. Wenz and C.-M. Lehr, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 2590–2598.
- 90 H. Gonzalez, S. J. Hwang and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, 1999, **10**, 1068–1074.
- 91 C. Mülhardt, *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*, Springer Spektrum, 7. Auflage., 1999.
- 92 A. Carbone, F. M. Fioretti, L. Fucci, J. Ausió and M. Piscopo, *Acta Biochim. Pol.*, 2012, **59**, 275–278.
- 93 K. N. Bakeev, V. A. Izumrudov, S. I. Kuchanov, A. B. Zezin and V. A. Kabanov, *Macromolecules*, 1992, **25**, 4249–4254.
- 94 D. Pezzoli, E. Giupponi, D. Mantovani and G. Candiani, *Nat. Publ. Gr.*, 2017, **7**, 1–11.
- 95 M. M. Mady, W. A. Mohammed, N. M. El-guendy and A. A. Elsayed, *Rom. J. Biophys*, 2011, **21**, 151–165.
- 96 J. Kloeckner, E. Wagner and M. Ogris, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, **29**, 414–425.
- 97 P. Erbacher, T. Bettinger, P. Belguise-Valladier, S. Zou, J. L. Coll, J. P. Behr and J. S. Remy, *J. Gene Med.*, 1999, **1**, 210–22.
- 98 K. Taira, K. Kataoka and T. Niidome, *Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery*, Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2006.
- 99 M. Möhwald, S. R. Pinnapireddy, B. Wollenberg, M. Pourasghar, M. Jurisic, A. Jung, C. Fink-straube, T. Tschernig, U. Bakowsky and M. Schneider, *Adv. Healthc. Mater*, 2017, 1700478.
- 100 A. Verma and F. Stellacci, *Small*, 2010, **6**, 12–21.
- 101 J. Chen, J. A. Hessler, K. Putschakayala, B. K. Panama, D. P. Khan, S. Hong, D. G. Mullen, S. C. DiMaggio, A. Som, G. N. Tew, A. N. Lopatin and J. R. Baker, *J Phys Chem*, 2009, **113**, 11179–11185.
- 102 V. Mailander and K. Landfester, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 2379–2400.
- 103 E. Fröhlich, *Int. J. Nanomedicine*, 2012, **7**, 5577–5591.
- 104 J. Wang, J. D. Bryne, M. Napier and J. DeSimone, *Small J.*, 2011, **7**, 1919–1931.
- 105 H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori, *J. Control. Release*, 2000, **65**, 271–284.
- 106 V. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, **63**, 131–135.
- 107 O. M. Merkel, D. Librizzi, A. Pfestroff, T. Schurrat, K. Buyens, N. N. Sanders, S. C. De Smedt, M. Béhé and T. Kissel, *J. Control. Release*, 2009, **138**, 148–159.
- 108 T. Ito, C. Yoshihara, K. Hamada and Y. Koyama, *Biomaterials*, 2010, **31**, 2912–2918.
- 109 K. Strebhardt and A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer*, 2008, **8**, 473–80.
- 110 M. Harata, Y. Soda, K. Tani, J. Ooi, T. Takizawa, M. Chen, Y. Bai, K. Izawa, S. Kobayashi, A. Tomonari, F. Nagamura, S. Takahashi, K. Uchimaruru, T. Iseki and T. Tsuji, *Blood*, 2004, **104**, 1442–1449.
- 111 A. N. Lukyanov, T. A. Elbayoumi, A. R. Chakilam and V. P. Torchilin, *J. Control. Release*, 2004, **100**, 135–144.
- 112 S. Tortorella and T. C. Karagiannis, *J. Membr. Biol.*, 2014, **247**, 291–307.
- 113 T. R. Daniels, E. Bernabeu, J. A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera and M. L. Penichet, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2012, **1820**, 291–317.
- 114 S. Xiao, C. Tong, X. Liu, D. Yu, Q. Liu, C. Xue, D. Tang and L. Zhao, *Chinese Sci. Bull.*, 2006, **51**, 1693–1697.

- 115 D. Arosio, L. Manzoni, E. M. V. Araldi and C. Scolastico, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 664–672.
- 116 F. Wang, Y. Li, Y. Shen, A. Wang, S. Wang and T. Xie, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 13447–13462.
- 117 A. C. Roche, I. Fajac, S. Grosse, N. Frison, C. Rondanino, R. Mayer and M. Monsigny, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003, **60**, 288–297.
- 118 R. Kircheis, A. Kichler, G. Wallner, M. Kursa, M. Ogris, T. Felzmann, M. Buchberger and E. Wagner, *Gene Ther.*, 1997, **4**, 409–418.
- 119 C.-Y. Quan, J.-X. Chen, H.-Y. Wang, C. Li, C. Chang, X.-Z. Zhang and R.-X. Zhuo, *ACS Nano*, 2010, **4**, 4211–9.
- 120 S. K. Kim, K. M. Park, K. Singha, J. Kim, Y. Ahn, K. Kim and W. J. Kim, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 692–694.
- 121 X. Sun, P. Ma, X. Cao, L. Ning, Y. Tian and C. Ren, *Drug Deliv.*, 2009, **16**, 357–362.
- 122 S. H. Pun and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, 2002, **13**, 630–639.
- 123 D. Harries, D. C. Rau and V. A. Parsegian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2184–2190.
- 124 M. E. Davis, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 659–668.
- 125 M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel and A. Ribas, *Nature*, 2010, **464**, 1067–1070.
- 126 L. Markenstein, *Synthese von Cyclodextrin-Polymeren zur Solubilisierung von Wirkstoffen*, Saarland University, 2015.
- 127 A. Steffen, C. Thiele, S. Tietze, C. Strassnig, A. Kämper, T. Lengauer, G. Wenz, J. Apostolakis, A. Kamper, T. Lengauer, G. Wenz and J. Apostolakis, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 6801–6809.
- 128 P. Midoux, C. Pichon, J. Yaouanc and P. Jaffrès, *Br. J. Pharmacol.*, 2009, **157**, 166–178.
- 129 K. Chmurski and J. Defaye, *Supramol. Chem.*, 2000, **12**, 221–224.
- 130 G. Wenz, I. Kräuter and E. Sackmann, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2009, **47**, 6223–6230.
- 131 K. Egele, *Masterarbeit: Stabilität von Plasmid-DNA-Polyplexen*, 2016.
- 132 H. Kondo, H. Nakatani and K. Hiromi, *J. Biochem.*, 1976, **79**, 393–405.
- 133 D. J. Jobe, R. E. Verrall, R. Palepu and V. Reinsborough, *J. Phys. Chem.*, 1988, **92**, 3582–3586.
- 134 W. Herrmann, B. Keller and G. Wenz, *Macromolecules*, 1997, **30**, 4966–4972.
- 135 G. Wenz, C. Gruber, B. Keller, C. Schilli, T. Albuzat and A. Mueller, *Macromolecules*, 2006, **39**, 8021–8026.
- 136 T. Albuzat, *Dissertation: Synthese und Anwendungen funktionalisierter Polyrotaxane in biologischen Systemen*, 2013.
- 137 A. Nudelman, Y. Bechor, E. Falb, B. Fischer, B. a. Wexler and A. Nudelman, *Synth. Commun.*, 1998, **28**, 471–474.
- 138 M. Noè, A. Perosa and M. Selva, *Green Chem.*, 2013, **15**, 2252.
- 139 M. B. M. B. Steinbrunn and G. Wenz, *Angew. Chemie, Int. Ed. English*, 1996, **35**, 2139–2141.
- 140 G. Wenz, *Adv. Polym. Sci.*, 2009, **222**, 1–54.
- 141 G. Wenz, C. Gruber, B. Keller, C. Schilli, T. Albuzat and A. Müller, *Macromolecules*, 2006, **39**, 8021–8026.
- 142 J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti and L. Isaacs, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2005, **44**, 4844–4870.
- 143 H.-J. Buschmann, K. Jansen, C. Meschke and E. Schollmeyer<sup>2</sup>, *J. Solution Chem.*, 1998, **27**, 135–140.
- 144 H. J. Buschmann, A. Wego, A. Zielesny and E. Schollmeyer, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2006, **54**, 241–246.
- 145 D. Whang and K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **1**, 451–452.
- 146 C. Meschke, *Dissertation: Mono-, Oligo- und Polyrotaxane mit Cucurbituril und gemischte Polyrotaxane mit Cucurbituril und  $\alpha$ -Cyclodextrin mittels Selbstorganisation*, 1998.
- 147 G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs and V. Briken, *PLoS One*, 2010, **5**, e10514.
- 148 V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau and A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2037–2042.

- 149 R. L. Sidman, I. L. Miale and N. Feder, *Exp. Neurol.*, 1959, **1**, 322–333.
- 150 T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55–63.
- 151 T. F. Slater, B. Sawyer and U. Sträuli, *BBA - Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **77**, 383–393.
- 152 M. V. Berridge, P. M. Herst and A. S. Tan, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2005, **11**, 127–152.
- 153 C. J. Goodwin, S. J. Holt, S. Downes and N. J. Marshall, *J. Immunol. Methods*, 1995, **179**, 95–103.
- 154 M. G. Stevens and S. C. Olsen, *J. Immunol. Methods*, 1993, **157**, 225–231.
- 155 M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, **19**, 1518–1520.
- 156 H. M. Shein and J. F. Enders, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1962, **48**, 1164–1172.
- 157 H. Zur Hausen, *J. Virol.*, 1967, **1**, 1174–85.
- 158 B. Knowles and D. Aden, *U.S. Patent 4393133*, 1983, 2–6.
- 159 C. Urani, M. Doldi, S. Crippa and M. Camatini, *Chemosphere*, 1998, **37**, 2785–2795.
- 160 S. Knasmüller, V. Mersch-Sundermann, S. Kevekordes, F. Darroudi, W. W. Huber, C. Hoelzl, J. Bichler and B. J. Majer, *Toxicology*, 2004, **198**, 315–328.
- 161 J. E. van Montfoort, B. Hagenbuch, G. M. Groothuis, H. Koepsell, P. J. Meier and D. K. Meijer, *Curr Drug Metab*, 2003, **4**, 185–211.
- 162 P. R. Twentyman and M. Luscombe, *Br. J. Cancer*, 1987, **56**, 279–285.
- 163 H. Tada, O. Shiho, K. ichi Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto, *J. Immunol. Methods*, 1986, **93**, 157–165.
- 164 J. B. Sprague, *Water Res.*, 1969, **3**, 793–821.
- 165 S. A. L. M. Kooijman, *Water Res.*, 1987, **21**, 269–276.
- 166 M. Zhang, D. Aguilera, C. Das, H. Vasquez, P. Zage, V. Gopalakrishnan and J. Wolff, *Anticancer Res.*, 2007, **27**, 35–38.
- 167 J. Weyermann, D. Lochmann and A. Zimmer, *Int. J. Pharm.*, 2005, **288**, 369–376.
- 168 T. Kiss, F. Fenyvesi, I. Bácskay, J. Váradi, É. Fenyvesi, R. Iványi, L. Szente, Á. Tósaki and M. Vecsernyés, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, **40**, 376–380.
- 169 Y. Ohtani, I. Tetsumi, K. Uekama, K. Fukunaga and J. Pitha, *Eur. J. Biochem.*, 1989, **186**, 17–22.
- 170 H.-J. Schneider, F. Hackett, V. Ruediger and H. Ikeda, *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)*, 1998, **98**, 1755–1785.
- 171 M. P. Beseničar, A. Bavdek, A. Kladnik, P. Maček and G. Anderluh, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 2008, **1778**, 175–184.
- 172 R. Zidovetzki and I. Levitan, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 2007, **1768**, 1311–1324.
- 173 M. L. Forrest, N. Gabrielson and D. W. Pack, *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, **89**, 416–423.
- 174 I. H. Uzun, A. Tatar, A. Hacimuftuoglu, F. Saruhan and F. Bayindir, *Acta Odontol. Scand.*, 2013, **71**, 1267–1272.
- 175 S. Choksakulnimitr, S. Masuda, H. Tokuda, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Control. Release*, 1995, **34**, 233–241.
- 176 H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui and J. Yan, *J. Control. Release*, 2006, **114**, 100–109.
- 177 L. Parhamifar, A. K. Larsen, A. C. Hunter, T. L. Andresen and S. M. Moghimi, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4001–4009.
- 178 B. D. Monnery, M. Wright, R. Cavill, R. Hoogenboom, S. Shaunak, J. H. G. Steinke and M. Thanou, *Int. J. Pharm.*, 2017, **521**, 249–258.
- 179 Y. Zhou, H. Wang, C. Wang, Y. Li, W. Lu, S. Chen, J. Luo, Y. Jiang and J. Chen, *Mol. Pharm.*, 2012, 1067–1076.
- 180 H. Hufnagel, P. Hakim, A. Lima and F. Hollfelder, *Mol. Ther.*, 2009, **17**, 1411–1417.
- 181 X. Gao and L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, **179**, 280–285.
- 182 J. Y. Cherng, P. Van De Wetering, H. Talsma, D. J. a Crommelin and W. E. Hennink, *Pharm. Res.*, 1996, **13**, 1038–1042.
- 183 A. V. Kabanov, C. Enzymology, V. L. M. State and V. Gory, *Bioconjug. Chem.*, 1995, 7–20.
- 184 A. M. Haines, S. S. Tobe, H. J. Kobus and A. Linacre, *Electropho*, 2015, 941–944.
- 185 G. Navarro, R. R. Sawant, S. Essex, C. T. de ILarduya and V. P. Torchilin, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2011, **1**, 25–33.
- 186 S. K. Brar and M. Verma, *Trends Anal. Chem.*, , DOI:10.1016/j.trac.2010.08.008.
- 187 R. Kazemi, M. Dabbaghi, L. Gholami and S. Taheri-bojd, *Life Sci.*, 2018, **197**, 101–108.

- 188 A. Kulkarni, W. Deng, S.-H. Hyun and D. H. Thompson, *Bioconjug. Chem.*, 2012, **23**, 933–940.
- 189 N. Hoshyar, H. Han, S. Grey and G. Bao, *Nanomedicine*, 2016, **11**, 673–692.
- 190 J. W. Meisel and G. W. Gokel, *Nat. Publ. Gr. Sci. Reports*, 2016, 27662.
- 191 J. P. Gomez, L. Billiet, J. Gomez, M. Berchel, P. Jaffrès and T. Le, *Biomaterials*, 2012, **33**, 2980–2990.
- 192 D. Y. Kwoh, C. C. Coffin, C. P. Lollo, J. Jovenal, M. G. Banaszczyk, P. Mullen, A. Phillips, A. Amini, J. Fabrycki, R. M. Bartholomew, S. W. Brostoff and D. J. Carlo, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, 1999, **1444**, 171–190.
- 193 R. J. Lee and L. Huang, *Biochem*, 1996, **271**, 8481–8487.
- 194 A. Kulkarni, K. Defrees, R. A. Schuldt, S. Hyun, K. J. Wright, C. K. Yerneni, R. Verheul and D. H. Thompson, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 1299–1305.
- 195 A. Tamura and N. Yui, *Biomaterials*, 2013, **34**, 2480–2491.
- 196 C. Kasper, D. Schaffert, M. Ogris, E. Wagner and W. Friess, *J. Control. Release*, 2011, **151**, 246–255.
- 197 W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse and H. Fessi, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1688–1713.
- 198 S. McLenachan, J. P. Sarsero and P. A. Ioannou, *Genomics*, 2007, **89**, 708–720.
- 199 A. Von Groll, Y. Levin, M. C. Barbosa and A. P. Ravazzolo, *Biotechnol. Prog.*, 2006, **22**, 1220–1224.
- 200 J. De Wet, K. V Wood, M. Deluca and D. R. Helinski, *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7**, 725–737.
- 201 D. W. Ow, K. V Wood, M. Deluca, J. R. D. E. Wet, D. R. Helinski and S. H. Howellt, *Science*, 1986, **234**, 856–860.
- 202 F. Jacob and J. Monod, *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 318–356.
- 203 A. K. Campbell and P. J. Herring, *Mar. Biol.*, 1990, **104**, 219–225.
- 204 C. Sundström and K. Nilsson, *Int. J. Cancer*, 1976, **17**, 565–577.
- 205 D. Luo and W. M. Saltzman, *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**, 33–37.
- 206 Y. Kong, X. Zhang, Y. Zhao, Y. Xue and Y. Zhang, *Biol. Res.*, 2017, **50**, 2.
- 207 H. Arima, K. Motoyama and T. Higashi, *Pharmaceutics*, 2012, **4**, 130–148.
- 208 H. Salman, D. Zbaida, Y. Rabin, D. Chatenay and M. Elbaum, *PNAS*, 2001, **98**, 7247–7252.
- 209 J. F. Thompson, L. S. Hayes and D. B. Lloyd, *Gene*, 1991, **103**, 171–177.
- 210 C. Zhang, F. G. Wu, P. Hu and Z. Chen, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 12195–12205.
- 211 A. K. Larsen, D. Malinska, I. Koszela-Piotrowska, L. Parhamifar, A. C. Hunter and S. M. Moghimi, *Mitochondrion*, 2012, **12**, 162–168.
- 212 C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang and C. Yin, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3657–3666.
- 213 T. Ito, N. Iida-Tanaka, T. Niidome, T. Kawano and K. Kubo, *J. Control. Release*, 2006, **112**, 382–388.
- 214 F. Kratz, U. Bexer, T. Roth, N. Tarasoca, P. Collery, F. Lechenault, A. Cazabat, P. Schumacher, C. Unger and U. Falken, *J. Pharm. Sci.*, 1998, **87**, 338–346.
- 215 P. H. Yang, X. Sun, J. F. Chiu, H. Sun and Q. Y. He, *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**, 494–496.
- 216 S. H. Pun, F. Tack, N. C. Bellocq, J. J. Cheng, B. H. Grubbs, G. S. Jensen, M. E. Davis, M. Brewster, M. Janicot, B. Janssens, W. Floren and A. Bakker, *Cancer Biol. Ther.*, 2004, **3**, 641–650.
- 217 C. E. Schante, G. Zuber, C. Herlin and T. F. Vandamme, *Carbohydr. Polym.*, 2011, **85**, 469–489.
- 218 G. Kogan, L. Soltes, R. Stern and P. Gemeiner, *Biotech. Lett.*, 2006, 2–14.
- 219 J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner and J. Kolar, *Vet. Med. (Praha)*, 2008, **53**, 397–411.
- 220 N. C. Bellocq, S. H. Pun, G. S. Jensen and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, 2003, **14**, 1122–1132.
- 221 D. W. Bartlett and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, 2007, **18**, 456–468.
- 222 D. H. Schwarz, *Dissertation: Wirt-Gast-Komplexe zwischen Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Polymeren und adamantylierten Proteinen für den zielgerichteten Transport von Steroidwirkstoffen*, 2018.
- 223 J. A. Steinkamp, *Rev. Sci. Instrum.*, 1984, **55**, 1375–1400.
- 224 A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant, Y. Baran and A. Nalbant, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2017, **37**, 163–176.

- 225 J. A. Welsh, J. A. Holloway, J. S. Wilkinson and N. A. Englyst, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2017, **5**, 1–7.
- 226 M. C. LoGuidice, L. M. Herda, E. Polo and K. A. Dawson, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 1–10.
- 227 N. S. Bhise, R. B. Shmueli, J. Gonzalez and J. J. Green, *Small NIH*, , DOI:10.1002/smll.201101718.A.
- 228 Y. P. Ho, H. H. Chen, K. W. Leong and T. H. Wang, *J. Control. Release*, 2006, **116**, 83–89.
- 229 L. Collins, M. Kaszuba and J. W. Fabre, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2004, **1672**, 12–20.
- 230 J. Wang, S. Tian, R. Petros, M. Napier and J. DeSimone, *J Am Chem Soc*, 2010, **132**, 11306–11313.
- 231 The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000072274-TFRC/cell#human>, (accessed 6 February 2019).
- 232 T. K. Kim and J. H. Eberwine, *Anal Bioanal Chem*, 2010, **397**, 3173–3178.
- 233 The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000026508-CD44/cell>, (accessed 10 May 2019).
- 234 W. Zhang, W. Rödl, D. He, M. Döblinger, U. Lächelt and E. Wagner, *J. Gene Med.*, 2015, **17**, 161–172.
- 235 M. Csizmar, J. R. Petersburg, T. J. Perry, L. Rozumalski, B. J. Hackel and C. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 251–261.
- 236 J. Majoros, B. G. Orr, J. R. Baker, S. Hong, P. R. Leroueil and M. M. B. Holl, *Chem. Biol.*, 2007, 107–115.
- 237 M. E. Brewster and T. Loftsson, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, **59**, 645–666.
- 238 K. Cal and K. Centkowska, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, **68**, 467–478.
- 239 N. M. Davies, G. Wang and I. G. Tucker, *Int. J. Pharm.*, 1997, **156**, 201–209.
- 240 S. Jambhekar, R. Casella and T. Maher, *Int. J. Pharm.*, 2004, **270**, 149–166.
- 241 R. O. Williams, V. Mahaguna and M. Sriwongjanya, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998, **46**, 355–360.
- 242 J. Nishijo, S. Moriyama and S. Shiota, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2003, **51**, 1253–1257.
- 243 E. P. C. Kilsdonk, P. G. Yancey, G. W. Stoudt, F. W. Bangerter, W. J. Johnson, M. C. Phillips and G. H. Rothblat, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 17250–17256.
- 244 P. Claudy, J. M. Létoffé, P. Germain, J. P. Bastide, A. Bayol, S. Blasquez, R. C. Rao and B. Gonzalez, *J. Therm. Anal.*, 1991, **37**, 2497–2506.
- 245 E. Ottinger, M. Kao, N. Carrillo-Carrasco, N. Yanjanin, R. Shankar, M. Janssen, M. Brewster, I. Scott, X. Xu, J. Cradock, P. Terse, S. Dehdashti, J. Marugan, W. Zheng, L. Portilla, A. Hubbs, W. Pavan, J. Heiss, C. H. Vite, S. Walkley, D. Ory, S. Silber, F. Porter, C. Austin and J. McKew, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, **14**, 330–339.
- 246 A. L. Yergey, P. S. Blank, S. M. Cologna, P. S. Backlund, D. Porter and A. J. Darling, *PLoS One*, 2017, **12**, e0175478.
- 247 T. J. Maarup, A. H. Chen, F. D. Porter, N. Y. Farhat, D. S. Ory, R. Sidhu, X. Jiang and P. I. Dickson, *Mol. Genet. Metab.*, 2015, **116**, 75–79.
- 248 M. T. Vanier, *Orphanet J. Rare Dis.*, 2010, **5**, 16.
- 249 C. D. Davidson, N. F. Ali, M. C. Micsenyi, G. Stephney, S. Renault, K. Dobrenis, D. S. Ory, M. T. Vanier and S. U. Walkley, *PLoS One*, 2009, **4**, e6951.
- 250 A. M. Lopez, S. J. Terpack, K. S. Posey, B. Liu, C. M. Ramirez and S. D. Turley, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2014, **41**, 780–787.
- 251 ClinicalTrials.gov, U.S. National Library of Medicine, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02534844>, (accessed 14 December 2018).
- 252 S. Gould and R. C. Scott, *Food Chem. Toxicol.*, 2005, **43**, 1451–1459.
- 253 A. Muralidhar, I. A. Borbon, D. M. Esharif, W. Ke, R. Manacheril, M. Daines and R. P. Erickson, *Mol. Genet. Metab.*, 2011, **103**, 142–147.
- 254 C. H. Vite, J. H. Bagel, G. P. Swain, M. Prociuk, T. U. Sikora, V. M. Stein, P. O'Donnell, T. Ruane, S. Ward, A. Crooks, S. Li, E. Mauldin, S. Stellar, M. De Meulder, M. L. Kao, D. S. Ory, C. Davidson, M. T. Vanier and S. U. Walkley, *Mol. Genet. Metab.*, 2015, **7**, 122.
- 255 Y. A. Mondjinou, L. A. McCauliff, A. Kulkarni, L. Paul, S.-H. Hyun, Z. Zhang, Z. Wu, M. Wirth, J. Storch and D. H. Thompson, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 4189–97.
- 256 A. Tamura and N. Yui, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 4356.
- 257 A. Tamura and N. Yui, *J. Control. Release*, 2018, **269**, 148–158.

- 258 A. Tamura and N. Yui, *J. Biological Chem.*, 2015, **290**, 9442–9454.
- 259 K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer and U. S. Schubert, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2010, **49**, 6288–6308.
- 260 G. Pasut and F. M. Veronese, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 933–961.
- 261 C. O. Mellet, J. M. G. Fernández and J. M. Benito, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1586–1608.
- 262 F. H. Westheimer, *Science*, 1987, **235**, 1173–1178.
- 263 C. Schultz, *Bioorganic Med. Chem.*, 2003, **11**, 885–898.
- 264 M. Richards, B. I. Dahiyat, D. M. Arm, P. R. Brown and K. W. Leong, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991, **25**, 1151–1167.
- 265 J. Baran and S. Penczek, *Macromolecules*, 1995, **28**, 5167–5176.
- 266 J. Pretula, K. Kaluzynski, R. Szymanski and S. Penczek, *Macromolecules*, 1997, **30**, 8172–8176.
- 267 A. Bogomilova, M. Höhn, M. Günther, A. Herrmann, K. Troev, E. Wagner and L. Schreiner, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, **50**, 410–419.
- 268 Z. Liu, L. Wang, C. Bao, X. Li, L. Cao, K. Dai and L. Zhu, *Biomacr*, 2011, **12**, 2389–2395.
- 269 A. Tamura, M. Tokunaga, Y. Iwasaki and N. Yui, *Macromol. Chem. Phys.*, 2014, **215**, 648–653.
- 270 K. M. Huttunen, H. Kumpulainen, J. Leppänen, J. Rautio, T. Järvinen and J. Vepsäläinen, *Synlett*, 2006, 701–704.
- 271 S. M. Gryaznov and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5876–5877.
- 272 N. Baudendistel, *Diplomarbeit: Synthesis of Polyphosphates and Inclusion in Cyclodextrins*, 2001.
- 273 A. Müller and G. Wenz, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 2218–2223.
- 274 I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger, *J. Immunol. Methods*, 1995, **184**, 39–51.
- 275 T. H. The and T. E. W. Feltkamp, *Immunology*, 1970, **18**, 865–873.
- 276 M. T. Vanier, P. Gissen, P. Bauer, M. J. Coll, A. Burlina, C. J. Hendriksz, P. Latour, C. Goizet, R. W. D. Welford, T. Marquardt and S. A. Kolb, *Mol. Genet. Metab.*, 2016, **118**, 244–254.
- 277 C. D. Davidson, Y. I. Fishman, I. Puskás, J. Szemán, T. Sohajda, L. A. Mccauliff, J. Sikora, J. Storch, M. T. Vanier, L. Szente, S. U. Walkley and K. Dobrenis, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, 2016, **3**, 366–380.
- 278 B. R. Liu, S. Y. Lo, C. C. Liu, C. L. Chyan, Y. W. Huang, R. S. Aronstam and H. J. Lee, *PLoS One*, 2013, **8**, e67100.
- 279 N. B. Yapici, Y. Bi, P. Li, X. Chen, X. Yan, S. R. Mandalapu, M. Faucett, S. Jockusch, J. Ju, K. M. Gibson, W. J. Pavan and L. Bi, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 1–8.
- 280 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres and R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 1961, **7**, 88–95.
- 281 T. L. Rosenberry, K. Brew, R. L. Hill, W. P. Jencks, A. Meister, I. A. Rose, P. A. Serre, P. van der Werf and F. G. Yount, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, ed. Alton Meister, Wiley & Sons, 1975, vol. 43.
- 282 H. Soreq, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001, **2**, 294–302.
- 283 D. M. Quinn, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 955–979.
- 284 M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic and V. M. Vasic, *Curr. Neuropharmacol.*, 2013, **11**, 315–335.
- 285 R. J. Polinsky, *Clin. Ther.*, 1998, **20**, 634–647.
- 286 T. C. Kwong, *Ther. Drug Monit.*, 2002, **24**, 144–149.
- 287 L. G. Costa, *Clin. Chim. Acta*, 2006, **366**, 1–13.
- 288 F. Worek, P. Eyer and H. Thiermann, *Drug Test. Anal.*, 2012, **4**, 282–291.
- 289 J. A. Edwards and S. Brimijoin, *J. Neurochem.*, 1982, **38**, 1393–1403.
- 290 J. L. Biedler, L. Helson and B. a Spengler, *Cancer Res.*, 1973, **33**, 2643–2652.
- 291 J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman, *Cancer Res.*, 1978, **38**, 3751–3757.
- 292 J. Kovalevich and D. Langford, *Methods Mol. Biol.*, 2013, **1078**, 9–21.
- 293 A. Adem, M. E. Mattsson, A. Nordberg and S. Pählman, *Brain Res.*, 1987, **430**, 235–242.
- 294 H. Xicoy, B. Wieringa and G. J. M. Martens, *Mol. Neurodegener.*, 2017, **12**, 1–11.

- 
- 295 K. Carlson, B. S. Jortner and M. Ehrich, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000, **168**, 102–113.
- 296 P. W. Riddles, R. L. Blakeley and B. Zerner, *Anal. Biochem.*, 1979, **94**, 75–81.
- 297 R. A. Mans, B. A. Warmus, C. C. Smith and L. L. McMahon, *J. Neurophysiol.*, 2014, **112**, 2388–2397.
- 298 M. Fadaeinasab, A. H. A. Hadi, Y. Kia, A. Basiri and V. Murugaiyah, *Molecules*, 2013, **18**, 3779–3788.
- 299 A. Kumar and T. Darreh-Shori, *ACS Chem. Neurosci.*, 2017, **8**, 2618–2625.
- 300 J. A. Watts and R. P. Hoogmoed, *Biochem. Pharmacol.*, 1984, **33**, 365–369.
- 301 H. Motulsky and A. Christopoulos, 2004, 352.
- 302 R. Gesztelyi, J. Zsuga, A. Kemeny-Beke, B. Varga, B. Juhasz and A. Tosaki, *Arch. Hist. Exact Sci.*, 2012, **66**, 427–438.
- 303 R. Jackisch, S. Förster, M. Kammerer, A. K. Rothmaier, A. Ehret, J. Zentner and T. J. Feuerstein, *J. Alzheimer's Dis.*, 2009, **16**, 635–647.
- 304 D. J. Triggle, J. M. Mitchell and R. Filler, *CNS Drug Rev.*, 1998, **4**, 87–136.
- 305 T. Wolf, T. Steinbach and F. R. Wurm, *Macromolecules*, 2015, **48**, 3853–3863.
- 306 S. R. C. Howie, *Bull. World Health Organ.*, 2011, **89**, 46–53.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung eines Polyrotaxans. ....	9
<b>Abb. 2:</b> Energiediagramm für ein Rotaxan und seine Bestandteile. E = Endgruppe. Reprinted with permission from G. Wenz, B.-H. Han and A. Müller, <i>Chem. Rev.</i> , 2006, <b>106</b> , 782–817. Copyright 2006, American Chemical Society. ....	9
<b>Abb. 3:</b> Allgemeiner Aufbau eines Cyclodextrins. ....	10
<b>Abb. 4:</b> Polyrotaxan nach Wenz <i>et al.</i> <sup>29</sup> Mit $x = 0.025$ und $y = 0.10$ ist an 2.5 % der Polymereinheiten eine Nicotinoylgruppe eingeführt und 10 % aller Polymereinheiten sind durch ein $\alpha$ -CD besetzt. ....	11
<b>Abb. 5:</b> Polyrotaxan nach Harada <i>et al.</i> <sup>30</sup> ....	11
<b>Abb. 6:</b> Erstes kationisches Polyrotaxan zur Gentransfektion von Li <i>et al.</i> <sup>13,47</sup> ....	13
<b>Abb. 7:</b> Erstes bioabbaubares Polyrotaxan nach Ooya <i>et al.</i> <sup>53</sup> ....	14
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung eines Wirkstoff-Polyrotaxan-Konjugats und langsame Freisetzung des CD-Wirkstoff-Konjugats nach enzymatischer Spaltung der Stoppergruppen, in Anlehnung an <sup>13</sup> . ....	15
<b>Abb. 9:</b> Polyrotaxan auf Pluronic-Basis von Thompson <i>et al.</i> <sup>56</sup> ....	16
<b>Abb. 10:</b> Schematische Darstellung der biochemischen Gentransfektion. <sup>73</sup> ....	19
<b>Abb. 11:</b> Ionene als Polymerbasis für Polyrotaxane. ....	21
<b>Abb. 12:</b> Schematische Darstellung des verwendeten Polyrotaxans aus Ionen-6,10, kationischen $\beta$ -CD-Derivaten sowie nativem $\alpha$ -CD als Stoppergruppen an den Enden. <sup>4321</sup>	
<b>Abb. 13:</b> Schematische Darstellung der Nanopartikel nach Davis <i>et al.</i> <sup>125</sup> Reprinted with permission from M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel and A. Ribas, <i>Nature</i> , 2010, <b>464</b> , 1067–1070, Copyright 2010 Nature. ....	25
<b>Abb. 14:</b> Schematische Darstellung des oberflächenfunktionalisierten Polyplexes. ....	25
<b>Abb. 15:</b> Protonenspektrum des Polyrotaxans <b>PRx1</b> in D <sub>2</sub> O, 400 MHz. <sup>131</sup> ....	29
<b>Abb. 16:</b> Schematische Darstellung des 2:1-Einschlusskomplexes von $\beta$ -CD und TNS. <sup>30</sup>	
<b>Abb. 17:</b> Abfädeln des kationischen $\beta$ -CD-Derivates <b>CD2</b> von den Polyrotaxanen <b>PRx2</b> , <b>PRx3</b> und <b>PRx4</b> im Vergleich. Gezeigt ist die Zunahme der Konzentration an freiem $\beta$ -CD im Filtrat über einen Zeitraum von 50 Tagen bei 37 °C. Puffersystem: PBS (50 mM, 9 g/L NaCl). <sup>131</sup> ....	31
<b>Abb. 18:</b> Strukturen der Polymere Ionen 11 und Ionen- <i>N</i> -Oxid 11 nach Albuat <i>et al.</i> <sup>88,135</sup> ....	31
<b>Abb. 19:</b> <sup>1</sup> H-Protonenspektrum des Polyamidins 6,10 ( <b>P2</b> ) in D <sub>2</sub> O, 400 MHz. ....	35
<b>Abb. 20:</b> Umsetzung des Polyamidins <b>P2</b> zum Polyamid im Basischen ( <sup>1</sup> H Protonenspektrum in D <sub>2</sub> O mit NaOD auf pD 10.5 eingestellt, 400 MHz). ....	37
<b>Abb. 21:</b> Umsetzung des Polyamidins <b>P2</b> zum Polyamid bei pD 10.5. ....	37
<b>Abb. 22:</b> (a) <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum der 1:1-Mischung von $\alpha$ -CD und Polyamidin <b>P2</b> in D <sub>2</sub> O (Polyrotaxan <b>PRx9</b> ) nach 15 min, 400 MHz. Zu sehen ist einerseits eine	

Signalverbreiterung bei den Signalen der aliphatischen Kohlenstoffkette des Polymers sowie neue Signale des CDs im Bereich 3.8 – 3.4 ppm. (b) Ausschnitt aus dem Protonenspektrum der 1:1-Mischung von $\alpha$ -CD und Polyamidin <b>P2</b> (Polyrotaxan <b>PRx9</b> ) in D <sub>2</sub> O über 24 h. Gezeigt ist der Bereich von 5.01 - 4.90 ppm. In diesem Bereich sind die beiden Signale des freien $\alpha$ -CDs (4.955 – 4.930 ppm) und des aufgefädelten $\alpha$ -CDs (tieffeldverschoben, 4.985 – 4.955). Nach 0.25 h ist das Signal des aufgefädelten $\alpha$ -CD bereits intensiver als das des freien CD. ....	39
<b>Abb. 23:</b> Kinetik des Auffädels von $\alpha$ -CD auf Polyamidin 6,10 ( <b>P2</b> ) bei 27 °C über Gaußen der Spektren und anschließender Auswertung mit Bruker Dynamics. Die Daten wurden gefittet mit Gleichung II, wobei $y_{\infty} = 59.3\%$ , $\tau = 0.043$ . ....	41
<b>Abb. 24:</b> Überlagerung der gegaußten NMR-Spektren des Einschlusses von Polyamidin 6,12 in $\alpha$ -CD über 20 h bei 12 °C. Gezeigt ist der Ausschnitt von 4.9 bis 5.1 ppm, zu sehen sind das Signal des freien CDs (um 4.94 ppm) zu Beginn der Messung in dunkelblau, welches sich im Laufe des fortschreitenden Einschlusses zugunsten des Signals des komplexierenden $\alpha$ -CDs (tieffeldverschoben, um 4.98 ppm) verschiebt. Nach 20 h liegt nur noch ein kleiner Anteil des CDs frei vor und der größte Teil des CDs hat das Polymer umschlossen (grün). ....	42
<b>Abb. 25:</b> Kinetik des Auffädels von $\alpha$ -CD auf PAD 6,12 ( <b>P3</b> ) bei 12 °C über Gaußen der Spektren und anschließender Auswertung mit Bruker Dynamics. Die Daten wurden gefittet mit Gleichung II, wobei $y_{\infty} = 72.9\%$ , $\tau = 0.33$ . ....	42
<b>Abb. 26:</b> Vergleich von $\alpha$ -Cyclodextrin mit CB[6]. <sup>141,142</sup> .....	44
<b>Abb. 27:</b> Überlagerung der Protonenspektren des Polyamidins <b>P2</b> (a), des kationischen CD-Derivates <b>CD2</b> (b), des Cucubiturils CB[6] (c) und des Polyrotaxans <b>PRx14</b> (d). ....	46
<b>Abb. 28:</b> <sup>1</sup> H-Protonenspektrum des Polyrotaxans <b>PRx14</b> (D <sub>2</sub> O, 400 MHz). ....	47
<b>Abb. 29:</b> Dissoziation des Polyrotaxans <b>PRx14</b> mit CB als Stoppergruppe. Gezeigt ist die Abnahme der Belegung des Polymers durch <b>CD2</b> bei semikontinuierlicher Dialyse über 65 Tage. ....	48
<b>Abb. 30:</b> Prinzip des MTT-Assays: Reduktion des gelben MTT zum violetten Formazan. <sup>150</sup> .....	49
<b>Abb. 31:</b> Metabolische Aktivität der HEK293T-Zellen nach 24 h Inkubation mit Hexakis-Cysteaminyl- $\alpha$ -CD <b>CD6</b> . ....	51
<b>Abb. 32:</b> Hill-Plot nach Gleichung IV zur Bestimmung des LC <sub>50</sub> -Wertes von Hexa-Cystaminyl- $\alpha$ -CD ( <b>CD6</b> ) an HepG2 Zellen über 24 h. $y_{100} = 98.1\%$ , $y_0 = 5.6\%$ mit $H = 6.3$ , und LC <sub>50</sub> = 1471 ( $\mu\text{g/mL}$ ). ....	52
<b>Abb. 33:</b> Bestimmung des optimalen N/P Verhältnisses für PEI und die Polyrotaxane <b>PRx1</b> , <b>PRx5</b> und <b>PRx14</b> im Verdrängungsassay mit SYBRsafe™. ....	57
<b>Abb. 34:</b> Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser des CD-Derivates <b>CD2</b> (1.5 nm) des Ionen 6,10 <b>P1</b> (6.0 nm), des Polyrotaxans <b>PRx1</b> (15.0 nm) sowie des Polyplexes <b>PP2</b> (120 nm), N/P = 2. ....	58

<b>Abb. 35:</b> Cryo-Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme von Polyrotaxan-Polyplexen <b>PP2</b> aus pDNA und <b>PRx1</b> . .....	61
<b>Abb. 36:</b> Hydrodynamischer Radius der Polyplexe bei Gefriertrocknung von der Polyplexe <b>PP2</b> . Nach Bildung der Polyplexe und 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz gedrittelt, eine Probe blieb unbehandelt (dunkelblau), die zweite Probe wurde einem Einfrier- und Auftau-Zyklus unterzogen (hellblau) und die dritte Probe wurde gefriergetrocknet und resuspendiert (gelb). .....	61
<b>Abb. 37:</b> Größe der Polyplexe <b>PP2</b> bei Zugabe des Cryoprotectants Trehalose (100 w% im Bezug auf die Masse an Polyplexen) nach Bildung der Polyplexe und 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz gedrittelt, eine Probe blieb unbehandelt (dunkelblau), die zweite Probe wurde einem Einfrier- und Auftau-Zyklus unterzogen (hellblau) und die dritte Probe wurde gefriergetrocknet und resuspendiert (gelb). .....	62
<b>Abb. 38:</b> Stabilität der Nanopartikelsuspension <b>PP2</b> über eine Woche bei Lagerung bei 4 °C.....	62
<b>Abb. 39:</b> Plasmidkarte des zur Gentransfektion verwendeten Plasmids pGL4.32 [luc2p/NF-kB-RE/Hygro] mit 6049 bp. ....	64
<b>Abb. 40:</b> Prinzip der Reporterexpression. Nach erfolgreicher Transfektion und der Expression des Reportergens kann die Reporterenzymaktivität durch Zugabe eines Substrats bestimmt werden, welches in ein lumineszierendes Produkt umgesetzt wird.	64
<b>Abb. 41:</b> Plasmidkarte des zur Gentransfektion verwendeten Plasmids pcDNA3-EGFP mit 6159 bp. ....	65
<b>Abb. 42:</b> Bestimmung der Zellvermehrung über 5 Tage. Ausgesät wurden an Tag 0 $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in serumhaltigem Medium auf einer 12-Well Platte, täglich wurde die Zellzahl in 4 Wells bestimmt. ....	67
<b>Abb. 43:</b> Vergleich der Lumineszenzintensität (proportional zur Transfektionseffizienz) nach 24 und 48 h Behandlung mit Nanopartikeln aus pDNA und <b>PRx1</b> ( $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in serumhaltigem Medium auf einer 12-Wellplatte, $1 \mu\text{g DNA/Well}$ , N/P = 2). .....	68
<b>Abb. 45:</b> Abnahme der Lumineszenzintensität als Funktion der Inkubationsdauer (a) mit PEI-Polyplexen ( <b>PP1</b> ), (b) mit Polyrotaxan-Polyplexen ( <b>PP2</b> ).....	68
<b>Abb. 46:</b> Transfektionseffizienz in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses und der Menge an eingesetzter DNA pro well (96 Wellplatte, $100 \mu\text{L Medium}$ , $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Well über 24 h) mit <b>PP2</b> (Polyrotaxan <b>PRx1</b> ) an HEK293T-Zellen (rot) und HepG2-Zellen (blau). ....	69
<b>Abb. 47:</b> Einfluss der Inkubationszeit mit $\text{TNF}\alpha$ auf die Lumineszenzintensität. Transfektion mit <b>PP2</b> , $200 \text{ ng DNA/well}$ über 20 h, $50 \text{ ng/mL TNF}\alpha$ .....	70
<b>Abb. 48:</b> Einfluss der $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration auf die Lumineszenzintensität bei der Transfektion mit einem Ionen-Polyrotaxan <b>PRx5</b> und PEI ( $200 \text{ ng DNA/well}$ , N/P = 2 für <b>PRx5</b> und N/P = 10 für PEI) nach 5 h. ....	70

<b>Abb. 49:</b> Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyplexe aus den hergestellten Polyrotaxane in den N/P-Verhältnissen 2 und 10, durchgeführt über 24 h an HEK293T-Zellen ( $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well) in Triplikaten im Luciferase-Assay mit 200 ng DNA/Well. ....	72
<b>Abb. 50:</b> Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyplexe aus den hergestellten Polyrotaxane in den N/P-Verhältnissen 2 und 10, durchgeführt über 48 h an HEK293T-Zellen ( $1.5 \cdot 10^4$ Zellen/Well) in Triplikaten im GFP-Assay. ....	73
<b>Abb. 51:</b> Bestimmung der Ladungsdichte (Ladung pro nm Polymer) für (a) DNA in Helixform, (b) PEI und (c) exemplarisch für ein Ionen-Polyrotaxan).....	74
<b>Abb. 52:</b> Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Ladungsdichte ist für ausgewählte Polyrotaxane, (a) für N/P 2, (b) für N/P 10 und (c) im jeweils optimalen N/P-Verhältnis.	76
<b>Abb. 53:</b> Schrittweise Herstellung der oberflächenfunktionalisierten Nanopartikel. ....	78
<b>Abb. 54:</b> Monoaminoethylcarbamit-hepta-thioglycerin- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Konjugat (CD-HS) von D. Schwarz. ....	78
<b>Abb. 55:</b> Zetapotential und hydrodynamischer Durchmesser der Nanopartikel in Abhängigkeit der zugegebenen Menge CD-HS in % bezogen auf die kationischen Ladungen des PEI. ....	80
<b>Abb. 56:</b> Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers der Nanopartikel in Funktion der zugegebenen Menge an CD-HS in % bezogen auf die kationischen Ladungen des PEIs, bestimmt über DLS. ....	81
<b>Abb. 57:</b> Dye Displacement Assay mit SYBRSafe™ zur Bestimmung der potentiellen Freisetzung von DNA bei Zugabe der Hyaluronsäure. Die Polyplexe wurden jeweils im vorher bestimmten optimalen N/P-Verhältnis angesetzt, für das Polyrotaxan <b>PRx1</b> war N/P = 2, für die PEI-Polyplexe war N/P = 10. Als Negativkontrolle wurde dieselbe Menge der in den Polyplexen enthaltenen DNA mit SYBRSafe™ angefärbt, als Positivkontrolle wurden jeweils nur PEI bzw. <b>PRx1</b> mit SYBRSafe™ gemischt und ausgeschlossen, dass hierbei fluoreszierende Komplexe entstehen. ....	82
<b>Abb. 58:</b> Adamantyliertes Transferrin (Ad-Tf) von D. Schwarz. Pro Transferrin sind etwa sechs Adamantangruppen angeknüpft. ....	83
<b>Abb. 59:</b> Fluoreszenzmarkierung des Tf-funktionalisierten Nanopartikels <b>PP1b</b> mit AntiTf*. ....	84
<b>Abb. 60:</b> Größenverteilung der PEI-Polyplexe im Verlauf der Oberflächenfunktionalisierung bei Verwendung von CD-modifizierter HS. ....	85
<b>Abb. 61:</b> Größenverteilung der PEI-Polyplexe im Verlauf der Oberflächenfunktionalisierung bei Verwendung von nicht modifizierter HS. ....	85
<b>Abb. 62:</b> Fluoreszenzintensität der Nanopartikel im Verlauf der Oberflächenmodifikation. Absorption: 395 nm, Emission 520 nm. <b>PP1:</b> Polyplex (PEI+DNA), <b>a:</b> mit CD-HS, <b>a':</b> mit unm. HS, <b>b</b> bzw. <b>b'</b> +Ad-Tf, <b>c</b> bzw. <b>c'</b> +AntiTf*. ....	87
<b>Abb. 63:</b> (a) Cytogramm der Nanopartikel <b>PP1</b> , der Hintergrund ist schwarz eingefärbt; (b) Histogramm der Häufigkeitsverteilung der FITC-Intensität, blau: <b>PP1</b> , violett: <b>PP1a</b> (mit CD-HS). ....	88

<b>Abb. 64:</b> (a) Cytogramm SSC-H gegen FSC-H der Probe PP1b. Es sind zwei Populationen zu beobachten: Eine größere Population P1 (98 % aller Events), sowie eine kleinere Population P2 (2 %) bei höherem SSC-H, vermutlich handelt es sich hierbei um Aggregate. (b) Histogramm der Häufigkeitsverteilung der FITC-H-Intensitäten. ....	89
<b>Abb. 65:</b> (a) Cytogramm SSC-H gegen FSC-H der fluoreszierenden Probe <b>PP1c</b> . Es sind wieder beide Populationen zu beobachten: Eine größere Population P1 (94 % aller Events), sowie eine kleinere Population P2 (2 %), bei der es sich vermutlich um Aggregate handelt. Das Histogramm (b) gibt die Intensitätsverteilung der Fluoreszenz an.....	89
<b>Abb. 66:</b> Vergleich FITC Intensität in grau: ungefärbte Probe ( <b>PP1b</b> , größere Population P1) mit geringer Fluoreszenz, in blau: gefärbte Probe ( <b>PP1c</b> ) mit durchschnittlich 10-facher Fluoreszenzintensität.....	90
<b>Abb. 67:</b> Geometrische Betrachtung zur Abschätzung der theoretisch maximal möglichen Belegung der Partikeloberfläche durch adamantyliertes Transferrin. ....	91
<b>Abb. 68:</b> Plasmidkarte des sfGFP-TfR-20. In hellblau markiert ist der Teil des Inserts, der für TfR+++ und GFP codiert. Außerdem wurden die Schnittstellen von ausgewählten Restriktionsendonucleasen eingezeichnet. ....	94
<b>Abb. 69:</b> Fluoreszenzintensität des Zelllysates von $2 \cdot 10^4$ Zellen, Anregungswellenlänge: 480 nm, Emissionswellenlänge: 525 nm. Die GFP-Intensität ist proportional zur Anzahl an exprimierten TfR auf der Zelloberfläche. ....	95
<b>Abb. 70:</b> Vergleich der Transfektionseffizienz der Polyplexe <b>PP1</b> , <b>PP1a</b> und <b>PP1b</b> an TfR+++ modifizierten HEK293T-Zellen.....	96
<b>Abb. 71:</b> Vergleich der Transfektionseffizienz der Polyplexe <b>PP1</b> , <b>PP1a</b> und <b>PP1b</b> mit jeweils 1 und 10% adamantyliertem Transferrin an der Oberfläche bezogen auf die Gesamtmol CD der HS. ....	97
<b>Abb. 72:</b> Kompetitive Bindungsstudie der unmodifizierten, CD-HS-beschichteten und Tf-modifizierten Nanopartikel <b>PP1</b> , <b>PP1a</b> und <b>PP1b</b> mit 10% Ad-Tf. Aufgetragen ist die zur Transfektionseffizienz proportionale Lumineszenzintensität der Polyplexe <b>PP1</b> , <b>PP1a</b> und <b>PP1b</b> in Abhängigkeit der Holo-Transferrinkonzentration im Medium. ....	100
<b>Abb. 73:</b> Vergleich der Transfektionseffizienz der Polyamidin-Polyplexe (hergestellt aus <b>PRx14</b> ) <b>PP3</b> , <b>PP3a</b> und <b>PP3b</b> mit 10% adamantyliertem Transferrin an der Oberfläche bezogen auf die Gesamtmol CD der HS, in blau ohne zugesetztes Transferrin, in rot mit 2 µg/mL freiem Transferrin im Medium. ....	101
<b>Abb. 74:</b> Schematische Darstellung der Einschlussverbindung des Cholesterols in HP-β-CD mit 2:1 Stöchiometrie <sup>241,242</sup> . ....	103
<b>Abb. 75:</b> Schematische Darstellung des Pluronic-Polyrotaxans mit HP-β-CD und HEE-CD nach Yui <i>et al.</i> <sup>258</sup> Die sterisch anspruchsvollen Stoppergruppen sind über Disulfidbrücken an das Polyrotaxan angeknüpft. Bei enzymatischer Spaltung des Polyrotaxans werden die CD freigesetzt. (a) Reprinted with permission from Atsushi	

Tamura, and Nobuhiko Yui J. Biol. Chem. 2015; 290:9442-9454, Copyright 2015 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. ....	105
<b>Abb. 76:</b> Polyphosphat-Backbone von Tamura et al. <sup>269</sup> .....	106
<b>Abb. 77:</b> Prinzip des HP- $\beta$ -CD Polyrotaxans als polymeres Prodrug für HP- $\beta$ -CD. Das Polyrotaxan wird über Endocytose in die Zelle aufgenommen. Nach Dissoziation der $\alpha$ -CD-Stopper beginnt $\beta$ -CD abzufädeln und die Konzentration an $\beta$ -CD im Lysosom steigt und solubilisiert das aggregierte Cholesterol. ....	107
<b>Abb. 78:</b> <sup>31</sup> P-NMR Spektren des Poly(decamethylen)phosphits (P6), der Zwischenstufen Poly(decamethylen)chlorid und Poly(decamethylen)imidazol, sowie des Produktes Poly(decamethylen)phosphat (P7) in CDCl <sub>3</sub> , Referenz Triphenylphosphit (127 ppm). ....	109
<b>Abb. 79:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum des $\alpha$ -CD-Polyrotaxans in D <sub>2</sub> O.....	110
<b>Abb. 80:</b> Komplexierungskinetik von $\alpha$ -CD mit dem Gastpolymer <b>P7</b> bei 60 °C. Die Daten wurden mit Gleichung VI gefittet, wobei $y_{\infty} = 48.5 \%$ und $\tau = 2.9$ d. ....	111
<b>Abb. 81:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum des Polyrotaxans <b>PRx18</b> in D <sub>2</sub> O, 400 MHz.....	112
<b>Abb. 82:</b> DOSY NMR Spektrum des Polyrotaxans <b>PRx18</b> in D <sub>2</sub> O, das Signal bei 4.8 ppm stammt von H <sub>2</sub> O.....	112
<b>Abb. 83:</b> Freisetzung von HP- $\beta$ -CD von 2.59 mg Polyrotaxan <b>PRx18</b> gelöst in 1 mL PBS über 50 d bei 37 °C. Die Daten wurden mit Gl. VI gefittet, wobei $y_{\infty} = 697 \mu\text{g}$ und $\tau = 10.5$ d. ....	113
<b>Abb. 84:</b> Schematische Darstellung des FITC-markierten Polyrotaxans <b>PRx19</b> . ....	115
<b>Abb. 85:</b> Filipin-Färbung der primären Fibroblasten nach Behandlung mit $\alpha$ -CD, Poly(decamethylenphosphat) <b>P7</b> , HP- $\beta$ -CD und Polyrotaxan <b>PRx18</b> über 24 h (jeweils in Konzentrationen, die einer HP- $\beta$ -CD-Konzentration von 25 $\mu\text{M}$ . ....	116
<b>Abb. 86:</b> Filipin-Färbung der primären Fibroblasten nach Behandlung mit $\alpha$ -CD, Polymer <b>P7</b> , HP- $\beta$ -CD und Polyrotaxan <b>PRx18</b> über 24 h (jeweils in Konzentrationen, die einer HP- $\beta$ -CD-Konzentration von 25 $\mu\text{M}$ entsprechen). Die Zellkerne wurden mit NuclearRed angefärbt und die Zellen mit einem 5x Objektiv visualisiert. ....	117
<b>Abb. 87:</b> Dosis-Wirkungs-Beziehung in NPC1 Zellen 24 h nach einmaliger Behandlung der Zellen mit Polyrotaxan <b>PRx18</b> und HP- $\beta$ -CD. ....	117
<b>Abb. 88:</b> NPC1-Zellen, behandelt mit 25 $\mu\text{M}$ HP- $\beta$ -CD-Äquivalenten des FITC-markierten Polyrotaxans <b>PRx19</b> in Opti-MEM Medium. (A) unbehandelte Zellen, (B) nach 4 h Behandlung mit <b>PRx19</b> , (C) 24 h nach Behandlung mit <b>PRx19</b> und (D) C+24 h nach Behandlung. (i) alle Fluoreszenzen, (ii): DAPI-Kanal, (iii) Fluorescein-Kanal, (iv) LysoTracker-Kanal). Die Lokalisierung des Polyrotaxans in den aciden Endosomen/Lysosomen (mit LysoTracker rot gefärbt) ist nach 24 h zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen gewaschen, um nicht aufgenommenes Polyrotaxans <b>PRx19</b> zu entfernen, und wurden weitere 24 h in Vollmedium (MEM) inkubiert. Auf den nach 24 h aufgenommenen Konfokalbildern ist eine deutliche	

Verringerung des FITC-Signals zu beobachten, vermutlich durch die starke Verdünnung der FITC-CD im Cytoplasma. Der Größenbalken entspricht 100 $\mu\text{m}$ .....	119
<b>Abb. 89:</b> NPC1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 25 $\mu\text{M}$ HP- $\beta$ -CD Äquivalent <b>PRx19</b> in Opti-MEM Medium. Zu sehen ist das FITC-Signal in der charakteristischen Struktur von.....	120
<b>Abb. 90:</b> a) Histogramm Plot der FITC-Intensitätsverteilung der NPC1-Zellpopulation, b) Aufnahme und Ausscheidung bzw. Abbau des Polyrotaxans <b>PRx19</b> in NPC1-Zellen.	120
<b>Abb. 91:</b> Zellviabilität von NPC1 Zellen nach 24 h Exposition des Polyrotaxans <b>PRx18</b> , Konzentration aufgetragen in $\mu\text{M}$ HP- $\beta$ -CD Äquivalenten.....	121
<b>Abb. 92:</b> (a) Allgemeine Struktur der AChE-hemmenden Phosphorsäureester, (b) Sarin (c) Parathion (E605). .....	122
<b>Abb. 93:</b> Zunahme der Absorption mit steigender Reaktionsdauer zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit sowie der Evaluierung der spontanen Hydrolyse des DTNB (gestrichelte Linien). .....	125
<b>Abb. 94:</b> Lineare Abhängigkeit der Absorption von der Anzahl der Zellen im Homogenat.....	126
<b>Abb. 95:</b> Positiv- und Negativkontrolle: Hemmung der AChE mit Eserin (finale Konzentration im Testansatz: 1 mM).....	126
<b>Abb. 96:</b> Enzymaktivität der AChE in Anwesenheit des Polyalkylenphosphats <b>P7</b> , gefittet mit einer Hill Funktion. Dabei ist $E_{min} = 94.0 \%$ , $E_{max} = 17.2 \%$ , $H = 3.51$ und $IC_{50} = 0.189 \text{ mM}$ . Der Messpunkt bei $c = 10 \text{ mM}$ wurde maskiert, da hier die Löslichkeitsgrenze des Polyanions im Phosphatpuffer erreicht war (die Trübung des Ansatzes führte zu erhöhten Absorptionswerten). .....	127
<b>Abb. 97:</b> Enzymaktivität der AChE in Anwesenheit des Polyrotaxans <b>PRx18</b> , gefittet mit Gl. (VIII). Dabei ist $E_{min} = 125 \%$ , $E_{max} = 3.4 \%$ , $H = 0.52$ und $IC_{50} = 0.593 \text{ mM}$ . ....	128
<b>Abb. 98:</b> Phosphonat-Polymere nach Wurm <i>et al.</i> <sup>305</sup> .....	128
<b>Abb. 99:</b> Gelelektrophorese eines 1 %tigen Agarosegels in TAE-Puffer, angefärbt mit Ethidiumbromidlösung. Aufgetragen wurden a) das mit Eag1 und Nde1 verdaute Plasmid, b) das mit Eag1 verdaute Plasmid, c) das mit Nde1 verdaute Plasmid, d) das nicht verdaute Plasmid (Kontrolle) und e) der Standard zur Bestimmung der Größe der Basenpaare.....	155

## Schemaverzeichnis

<b>Schema 1:</b> Synthese der Polyamide 6,6 und 9,6 nach Davis <i>et al.</i> <sup>90</sup> .....	21
<b>Schema 2:</b> CD-Polyamidin-Copolymer nach Davis <i>et al.</i> <sup>49</sup> .....	21
<b>Schema 3:</b> Synthese des Heptakis-(6-deoxy-6-cysteaminyl)- $\beta$ -Cyclodextrins <b>CD2</b> aus nativem $\beta$ -Cyclodextrin. ....	26
<b>Schema 4:</b> Synthese des Heptakis-(6-deoxy-6-dimethylcysteaminyl)- $\beta$ -Cyclodextrins <b>CD3</b> aus <b>CD1</b> .....	26
<b>Schema 5:</b> Synthese des histidinylierten CD-Derivates <b>CD4</b> .....	27
<b>Schema 6:</b> Synthese der kationischen $\alpha$ -CD-Derivate <b>CD6</b> und <b>CD7</b> . ....	28
<b>Schema 7:</b> Polykondensation zur Herstellung des Ionens 6,10 ( <b>P1</b> ). ....	28
<b>Schema 8:</b> Allgemeine Herstellung der Ionen-Polyrotaxane. Für Polyrotaxan <b>PRx1</b> war $t_{\beta} = 8$ h und $t_{\alpha} = 16$ h. ....	29
<b>Schema 9:</b> Synthese des Monomers Dimethyladipimidat-Dihydrochlorid <b>M1</b> .....	33
<b>Schema 10:</b> Hydrolyse von Imidatsalzen zu Estern und thermische Zersetzung von zu Amiden und Alkylhalogeniden. <sup>138</sup> .....	33
<b>Schema 11:</b> Synthese des Succinimidat-Dihydrochlorids mit einer Kettenlänge von vier Kohlenstoffatomen ( <b>M2</b> ). ....	34
<b>Schema 12:</b> Synthese der Polyamide <b>P2</b> , <b>P3</b> , <b>P4</b> und <b>P5</b> .....	34
<b>Schema 13:</b> Bildung des Polyrotaxans <b>PRx9</b> (aus Polyamidin <b>P2</b> ) und <b>PRx10</b> (aus Polyamidin <b>P3</b> ) mit nativem $\alpha$ -CD. ....	38
<b>Schema 14:</b> Polyrotaxane aus Polyamidin <b>P2</b> mit Hepta-Cys- $\beta$ -CD <b>CD2</b> und CB-Stoppergruppen ( <b>PRx11</b> – <b>PRx14</b> , wobei für <b>PRx11</b> und <b>PRx12</b> natives $\beta$ -CD eingesetzt wurde). ....	45
<b>Schema 15:</b> Luciferase-Reaktion: Die Umsetzung des Luciferins zum Oxyluciferin wird katalysiert durch die Luciferase in Anwesenheit von $Mg^{2+}$ , ATP und Sauerstoff. ...	65
<b>Schema 16:</b> Synthese des Gastpolymers Poly(decamethylenphosphat) <b>P7</b> . ....	108
<b>Schema 17:</b> Synthese des Mono-[6-deoxy-6-(2-aminoethylsulfanyl)]- $\beta$ -CD <b>CD9</b> nach Steffen <i>et al.</i> <sup>127</sup> .....	114
<b>Schema 18:</b> Synthese des FITC-markierten CD-Derivats <b>CD10</b> .....	115
<b>Schema 19:</b> Enzymatische Hydrolyse des Acetylcholins. ....	121
<b>Schema 20:</b> Mechanismus der Hemmung des Enzyms durch Organophosphoverbindungen, nach Kwong <i>et al.</i> <sup>286</sup> .....	123
<b>Schema 21:</b> Prinzip des AChE-Aktivitätsassays nach Ellman <i>et al.</i> <sup>75</sup> nach <sup>83</sup> . ....	123

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die hergestellten Ionen-Polyrotaxane. Angegeben ist jeweils die Belegung durch $\alpha$ - und $\beta$ -CD, die Masse pro Wiederholeinheit sowie das M/N-Verhältnis.....	32
<b>Tabelle 2:</b> Ausbeuten und Polymerisationsgrade der hergestellten Polyamidine analog Schema 12. ....	35
<b>Tabelle 3:</b> Polyamidin-basierte Polyrotaxane mit CB als Stoppergruppe, hergestellt nach <b>Schema 14</b> . Die angegebenen Äquivalente sind jeweils bezogen auf die Wiederholeinheiten des Polyamidins. Die Belegung durch $\beta$ -CD und CB[6] ist ebenfalls auf die Wiederholeinheiten des Polyamidins bezogen und wurde nach Ultrafiltration über eine 5 kDa Membran via NMR bestimmt.....	46
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht über die hergestellten Polyamidin-Polyrotaxane. Angegeben ist jeweils die Belegung durch $\alpha$ - bzw. $\beta$ -CD und CB[6], die Masse pro Wiederholeinheit sowie das M/N-Verhältnis. ....	48
<b>Tabelle 5:</b> LC <sub>50</sub> -Werte aller synthetisierten CD-Derivate im Vergleich zu nativen CD und CB[6], getestet an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) sowie an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) über 24 h. Die Werte sind angegeben in mg/mL mit $\pm$ Standardabweichung mit 3 Proben (n=3). ....	53
<b>Tabelle 6:</b> LC <sub>50</sub> -Werte aller Polymere im Vergleich zu PEI, getestet an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) sowie an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) über 24 h. Die Werte sind angegeben in $\mu$ g/mL, mit $\pm$ Standardabweichung mit 3 Proben (n=3) pro Experiment. ....	54
<b>Tabelle 7:</b> LC <sub>50</sub> -Werte ausgewählter Polyrotaxane, getestet an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) sowie an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) über 24 h. Die Werte sind angegeben in $\mu$ g/mL mit $\pm$ Standardabweichung mit 3 Proben (n=3) pro Experiment. ....	55
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht über die hydrodynamischen Durchmesser von Polyplexen aus DNA und PEI (N/P 2 und 10), eines Ionen-Polyrotaxans ( <b>PRx1</b> ) sowie eines Polyamidin-Polyrotaxans ( <b>PRx14</b> ) (jeweils N/P 2). ....	60
<b>Tabelle 9:</b> Übersicht über die Ladungsdichte der Polykationen bezogen auf die Masse sowie auf die Länge des Polymers.....	74
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht über die Größenverteilungen, Polydispersitätsindices und Zetapotential der modifizierten PEI-Nanopartikel. ....	86
<b>Tabelle 11:</b> Polyrotaxan-Synthese: Bedingungen und Belegungen für Ionen-Polyrotaxane <b>PRx1 – PRx8</b> . ....	142
<b>Tabelle 12:</b> Theoretische Fragmente, die beim Restriktionsverdau des Plasmids sfGFP-TFR20 mit den Enzymen Nde1 und Eag1 erhalten werden. ....	154

## Substanzverzeichnis

Nummer	Nummer im Laborjournal	Substanzbezeichnung
<b>Cyclodextrinderivate</b>		
CD1	KEMK3	Hepta-Brom- $\beta$ -CD
CD2	KE01	Hepta-Cys- $\beta$ -CD
CD3	KEMK10	Hepta-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\beta$ -CD
CD4	KE06	Hepta-His- $\beta$ -CD
CD5	KEOA10	Hexa-Brom- $\alpha$ -CD
CD6	KEOA12	Hexa-Cys- $\alpha$ -CD
CD7	KEOA14	Hexa-Cys(Me) <sub>2</sub> - $\alpha$ -CD
CD8	KE170, KE155	Mono-Tos- $\beta$ -CD
CD9	KE157, KE172	Mono-Cys- $\beta$ -CD
CD10	KE171	FITC- $\beta$ -CD
<b>Polymere</b>		
P1	KE02	Ionen 6,10
P2	KEMK5	Polyamidin 6,10
P3	KE112	Polyamidin 6,12
P4	KE92	Polyamidin 4,10
P5	KE116	Polyamidin 4,12
P6	KE30	Poly(decamethylenphosphit)
P7	KE61	Poly(decamethylenphosphat)
<b>Monomere und kleine Moleküle</b>		
M1	KEMK1	Dimethyladipimidat hydrochlorid
M2	KE88	Dimethylsuccinimidat-Dihydrochlorid
M3	KE153, KE169	<i>p</i> -Toluolsulfonsäureimidazol
<b>Polyrotaxane</b>		
PRx1	KE140	<b>P1 + CD2</b>
PRx2	KEMA6	<b>P1 + CD2</b>
PRx3	KEMA8	<b>P1 + CD2</b>
PRx4	KEMA9	<b>P1 + CD2</b>
PRx5	KE156	<b>P1 + CD4</b>
PRx6	KE143b	<b>P1 + CD3</b>
PRx7	KE202	Ionen 11 + <b>CD2</b>
PRx8	KE203	Ionen <i>N</i> -Oxid 11 + <b>CD2</b>
PRx9	DR1	<b>P2 + <math>\alpha</math>-CD</b>
PRx10	DR2	<b>P3 + <math>\alpha</math>-CD</b>
PRx11	KE70	<b>P2 + <math>\beta</math>-CD</b>
PRx12	KE71	<b>P2 + <math>\beta</math>-CD</b>
PRx13	KE77	<b>P2 + CD2</b>
PRx14	KE90	<b>P2 + CD2</b>
PRx15	KE144	<b>P2 + CD3</b>
PRx16	KE150	<b>P3 + CD6</b>
PRx17	KE162	<b>P2 + CD7</b>
PRx18	KE101_2	<b>P7 + HP-<math>\beta</math>-CD</b>
PRx19	KE176	FITC-markiertes PRx aus <b>P7 + HP-<math>\beta</math>-CD + CD10</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Microliter
µm	Micrometer
Abb.	Abbildung
ABC	<i>accelerated blood clearance</i>
abs	absolut
AcCl	Acetylchlorid
AChE	Acetylcholinesterase
AChI	Acetylthiocholiniodid
Ad	Adamantan
Ad-Tf	adamantyliertes Transferrin
AntiTf*	FITC-markiertes Anti-Transferrin
Äq.	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
BChE	Butyrylcholinesterase
bp	Basenpaare
c	Konzentration
c	Konzentration
CB	Cucurbituril
CD	Cyclodextrin
CD-HS	cyclodextrinmodifizierte Hyaluronsäure
COSY	zweidimensionale kernmagnetische Resonanzspektroskopie
ct	<i>calf thymus</i>
d	Tag
d	Durchmesser
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
dest	destilliert
DIMEB	Dimethyl-β-Cyclodextrin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOSY-NMR	<i>Diffusion ordered spectroscopy</i>
DTNB	5, 5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat
E	Effekt
EC <sub>50</sub>	Konzentration des halben maximalen Effekts
E <sub>max</sub>	Maximaler Effekt
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm

Gal	Galactose
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gl.	Gleichung
Glc	Glucose
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
<i>H</i>	Hill-Koeffizient
HEE- $\beta$ -CD	Hydroxyethoxyethyl- $\beta$ -CD
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
Hep	<i>hepatocellular</i>
HP- $\beta$ -CD	Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
HS	Hyaluronsäure
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
$K_A$	Komplexbildungskonstante
kDa	Kilodalton
L	Liter
LC <sub>50</sub>	halbe letale Konzentration
Luc	Luciferase
M	molar
M	molare Masse
M/N	Masse pro Ladungsverhältnis
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Mililiter
$M_N$	Zahlenmittel der Molmasse
mol	Mol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mV	Millivolt
$M_w$	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
N/P	Verhältnis kationischer zu anionischer Ladungen
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPC	Niemann Pick Typ C
NPC1	Niemann Pick Protein C1
NPC2	Niemann Pick Protein C2
P	Population
PAD	Polyamidin
PBS	saliner Phosphatpuffer
PD	Polymerisationsgrad
PDI	Polydispersitätsindex
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pKs	Säurekonstante
PP	Polyplex
PPG	Polypropylenoxid

---

PRx	Polyrotaxan
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SBE- $\beta$ -CD	Sulfobutylether- $\beta$ -CD
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
THF	Tetrahydrofuran
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNS	Toluidinylnaphtalin-2-sulfonat
TPM	<i>Transcripts per million</i> , d.h.für 1 000 000 RNA Moleküle der RNA-sequenz Probe kamen x von diesem Gen/Transkript.
vol%	Volumenprozent
WST	<i>water soluble</i> Tetrazolium
XXT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid)
$y_{\infty}$	maximale Belegung
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\tau$	Zeitkonstante

## Danksagungen

In erster Linie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die Möglichkeit, meine Dissertation zu meinem Wunschthema in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Ebenso bedanken möchte ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, besonders auch für die Gelegenheiten, neue Wege gehen zu dürfen und benachbarte Themengebiete erkunden zu dürfen. Auch bedanke ich mich für die Korrektur dieses Manuskripts.

Prof. Dr. Marc Schneider danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie für die Erlaubnis zur Mitbenutzung des Zetasizers und des Platereaders in den vergangenen Jahren.

Prof. Dr. Christian Ducho danke ich in seiner Funktion als wissenschaftlicher Begleiter. Bei Dr. Matthias Engel (AK Prof. Dr. Christian Ducho) bedanke ich mich sehr für die Einführung in die Zellkultur, und für die Mitbenutzung des Zelllabors. Weiterhin bedanke ich mich für die wertvollen Anregungen, ohne die meine Arbeit nicht zu dem geworden wäre, was sie heute ist. Ebenso geht mein Dank an Reem Fathallah, sowie an Jannine Ludwig und Martina Jankowski für die Tipps und Hilfe im Zelllaboralltag.

Dr. Stefan Lohse (AG für Virologie, Prof. Dr. Sigrun Smola, Uniklinik Homburg) danke ich für das Interesse an der Idee, Nanopartikel mittels FACS zu analysieren. Für die Nachmittage in Homburg zur gemeinsamen Erarbeitung der Methode und die interessanten Diskussionen währenddessen bedanke ich mich noch einmal herzlich!

Dr. Marcus Koch (Leibniz Institut für Neue Materialien) gilt mein Dank für die Durchführung der Cryo-TEM-Aufnahmen und Dr. Josef Zapp (AK Prof. Alexandra Kiemer) für die Aufnahme der DOSY-NMR-Spektren. Beim AK Prof. Dr. Uli Müller bedanke ich mich für die Bereitstellung des SH-SY5Y-Zelllysats und die Tipps zur Durchführung des AChE-Assays.

Danke an Shayak Samaddar sowie Prof. Dr. David Thompson (Purdue University, Lafayette, USA) für die erfolgreiche Kooperation im Niemann-Pick-Projekt.

Bei der Elisabeth und Prof. Dr. Horst-Dietrich Hardt-Stiftung sowie der Graduiertenschule der NT-Fakultät bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Konferenzreisen. An dieser Stelle geht mein Dank erneut an Prof. Wenz, der mir die Teilnahme an diesen Konferenzen erst ermöglicht hat.

Danke an Dr. Jan Gorges für die sorgfältige Durchsicht dieses Manuskripts, und an Dr. Karin Kiefer (INM) für ihre spontane und sehr hilfreiche Beratung bei biologischen Fragestellungen in der letzten Phase der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Vertiefungsstudenten Michael Kohr, Thorsten Kinsinger und Oliver Andler bedanken, die einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Angestellten des Arbeitskreises möchte ich ebenfalls danken: Petra Thinner, Thomas Scherer, Joachim Kriesamer, Anne Engelke und Blandine Boßmann. Bei David

Hero bedanke ich mich besonders für die unzähligen Tipps und praktische Unterstützung im Laboralltag.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus dem AK Wenz für die einmalige Arbeitsatmosphäre und freundschaftliche Zusammenarbeit aussprechen: meinen Laborkollegen Andreas Kapf und Manuel Hawner aus Labor 2.08, David Hafner, Dr. Dennis Schwarz, Jessica Brunke, Dr. Jessica Hilschmann, Dr. Marcel Albrecht, Dr. Gergely Kali, Harley Eisenbarth, Devid Hero und Blandine Boßmann. Danke für eure Hilfsbereitschaft und Diskussionen im Laboralltag, für unsere gemeinsame Frühstücksrunde, bei der oft kreative Ideen entstanden sind, sowie auch für unsere AK-Ausflüge und Skiurlaube. Ich werde mich immer gerne an die schöne Zeit erinnern.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Dennis Schwarz und Jessica Brunke für eure Freundschaft bedanken, die unvergesslichen Momente auf den gemeinsamen Konferenzreisen nach Lissabon, Tokyo und Berlin sowie für schöne Erinnerungen an unsere Reise nach Athen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Kommilitonen Cynthia Prudel, Christina Schneider, Dr. Julius Hornung und Philipp Rebmann für unsere Lernrunden und die gemeinsame Zeit während des Studiums bedanken.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben, sowie auch bei meinen Schwestern und meinem Freund für die moralische Unterstützung.

*Danke*