



Entwicklung und Untersuchung von Kohlenstoffmonoxid-freisetzenden Materialien für medizinische Anwendungen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Silvio Sollazzo

aus Belvedere Marittimo

Köln, August 2015

Berichterstatter:

Prof. Dr. Annette M. Schmidt

Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz

Tag der mündlichen Prüfung:

02.11.2015

Für meine Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2011 bis August 2015 am Institut für physikalische Chemie der Universität zu Köln unter der wissenschaftlichen Anleitung von Frau Prof. Dr. Annette Schmidt angefertigt. Ich danke ihr herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das interessante und aktuelle Thema, stete Diskussionsbereitschaft, die mir immer wieder neue Anregungen gegeben hat, sowie für ihre Geduld und entgegengebrachtes Vertrauen während meiner Promotion.

Prof. Dr. Hans-Günter Schmalz danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und kontinuierliches Interesse an meiner Forschung sowie für viele intensive Gespräche, die mich stets begeistert haben und zum Weiterdenken angeregt haben, sowie nicht zuletzt für die Bereitschaft diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Mein Dank richtet sich auch an Prof. Dr. Benito Yard und seinem Team. Ohne seine experimentelle Unterstützung wäre dieser Arbeit ein bedeutender Teil der Ergebnisse entgangen.

Ein spezielles Dankeschön geht an die NMR Abteilung unter der Leitung von Herrn Dr. Nils Schlörer. Besonders erwähnt seien Frau Kathrin König und Frau Daniela Naumann, denen ich für die tatkräftige Unterstützung bei den analytischen Messungen danke.

Großer Dank gilt auch Frau Dipl. Chem. Svetlana Botov für die gute Zusammenarbeit und stetige Diskussionen der Ergebnisse, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich meinen Arbeitskollegen für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, viele Diskussionen und Gespräche sowie viele unvergessliche Momente danken. Insbesondere richtet sich mein Dank an Silke Quester, Marc Effertz, Johanna Nothacker, Nico Holbein und Eric Roeben für die unermüdlichen Korrekturen, moralische Unterstützung und stets konstruktive Kritik.

Auch bei meinen Praktikanten Fabian Hartl und Raphael Klein möchte ich mich bedanken. Unsere gemeinsame Arbeit im Labor sowie die zahlreichen Diskussionen haben bei der Entstehung dieser Arbeit konstruktiv geholfen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer an mich geglaubt hat

und ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

An meine Freundin Lidia Kibkalo möchte ich einen ganz besonderen Dank richten. Ihre Liebe gibt dieser Doktorarbeit eine Daseinsberechtigung.

Abstract

The incorporation of metal carbonyl complexes in biocompatible materials, such as cyclodextrins (CDs), copolymers and magnetite nanoparticles (MNPs), result in the possibility to create novel CO delivery systems. These increase the bioavailability of the active ingredient (CO) and simultaneously act as a transport system for it.

Three different CO-releasing systems, which are able to release CO by enzymatic triggering, are realized in this work. The enzymatically triggered CO-releasing molecules (ET-CORMs) are used as model drugs for the synthesis of these materials. The combination with different biocompatible materials allows the formation of CD/ET-CORM complexes, ET-CORM-bearing copolymers as well as ET-CORM-bearing MNPs.

Among the CDs only methylated CDs are found to be suitable hosts for the complexation of ET-CORMs. 1D and 2D NMR experiments are used to determine the stoichiometry, the stability constant, and the Gibbs free energy of the complexes. In addition, these investigations show that the CD/ET-CORM complexes, in contrast to ET-CORMs, are water soluble.

β -CD-functional copolymers are synthesized in order to serve as multifunctional hosts for β -CD-functional copolymer/ET-CORM complexes. Due to the synthetic route, developed in this study, a higher degree of functionalization of copolymers with the β -CD is obtained, as specified in the literature. However, the experiments of the complex formation show that the formation of complexes of ET-CORMs and β -CD-functional copolymer is not possible.

The ET-CORM-bearing copolymers are synthesized by controlled radical polymerization (ATRP) followed by copper catalyzed azido alkyne cycloaddition (CuAAC). The ET-CORM-bearing copolymers are mainly composed of oligo(ethylene glycol) methacrylate, as they are water soluble and biocompatible. Binding of the ET-CORMs to copolymers significantly increases the bioavailability.

MNPs are obtained by thermal decomposition of iron acetylacetonate in triethylene glycol. They are functionalized with an ET-CORM-bearing copolymer shell. So MNPs with an ET-CORM-bearing copolymer shell are produced. These form stable dispersions in water and exhibit superparamagnetic behavior.

The CO-release, of ET-CORM-bearing materials produced in this study, is quantified using headspace gas chromatography. Furthermore, bioassays show that the ET-CORM-bearing materials exhibit promising potential for medical application.

Kurzzusammenfassung

Die Einbindung von Metall-Carbonyl-Komplexen in biokompatible Materialien, wie Cyclodextrine (CDs), Copolymere und Magnetit-Nanopartikel (MNPs), ermöglicht die Bindung von CO-Freisetzungssystemen, die die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs erhöhen und gleichzeitig als Transportmittel dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird für drei unterschiedliche Kohlenstoffmonoxid-Freisetzungssysteme gezeigt, dass diese in der Lage sind, durch enzymatische Einwirkung Kohlenstoffmonoxid freizusetzen. Als Modellwirkstoff dienen dabei die enzymatisch induzierten CO-freisetzende Moleküle (ET-CORMs). In Kombination mit verschiedenen biokompatiblen Materialien werden CD/ET-CORM-Komplexe, ET-CORM-tragende Copolymere und ET-CORM-tragende MNPs synthetisiert und untersucht.

Unter den CDs haben sich nur methylierte CDs als geeignete Wirte für die Komplexierung der ET-CORMs erwiesen. 1D- und 2D-NMR-Experimente werden für die Ermittlung der Stöchiometrie, der Stabilitätskonstante und der freien Enthalpie der Komplexe herangezogen. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen, dass die CD/ET-CORM-Komplexe im Gegensatz zu ET-CORMs, wasserlöslich sind.

Darüber hinaus werden β -CD-funktionale Copolymere als multifunktionale Wirte für ET-CORM-Komplexe hergestellt. Durch den in dieser Arbeit entwickelten Syntheseweg wird ein höherer Grad an Funktionalisierung der Copolymere mit dem β -CD erreicht, als in der Literatur angegeben wird. Jedoch zeigen die Komplexierungsexperimente, dass die Bildung von Komplexen aus ET-CORMs und β -CD-funktionalen Copolymeren nicht möglich ist.

Die ET-CORM-tragenden Copolymere werden mittels kontrollierter radikalischer Polymerisation (ATRP) und anschließender kupferkatalysierter Azido-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) synthetisiert. Die ET-CORM-tragenden Copolymere bestehen hauptsächlich aus Oligo(ethylenglycol)methacrylate, da sie wasserlöslich und biokompatibel sind. Durch die Knüpfung der ET-CORMs an Copolymere kann die Wasserlöslichkeit der ET-CORMs erheblich gesteigert werden.

Durch die thermische Zersetzung von Eisenacetylacetonat in Triethylenglycol werden MNPs erhalten und anschließend mit einer ET-CORM-tragenden Copolymerhülle funktionalisiert. Dadurch werden MNPs hergestellt, die in der Copolymerhülle ET-CORMs tragen, stabile Dispersionen in Wasser bilden und ein superparamagnetisches Verhalten zeigen.

Die CO-Freisetzung, der in dieser Arbeit hergestellten ET-CORM-tragender Materialien, wird mithilfe der Headspace-Gaschromatographie quantifiziert. Des Weiteren zeigen die

durchgeführten Zelltests, dass die ET-CORM-tragenden Materialien Potential für medizinische Anwendungen besitzen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Einleitung.....	1
1.1. Biologische Bedeutung von Kohlenstoffmonoxid	1
1.2. Entwicklung von pharmazeutischen CORMs.....	3
1.2.1. Kohlenstoffmonoxid als Ligand in organometallischen Komplexen.....	4
1.2.2. Kohlenstoffmonoxid-freisetzende Materialien.....	8
1.3. Transport- und Freisetzungssysteme für Wirkstoffe	9
1.3.1. Polymere aus Oligo(ethylenglycol)methacrylaten	9
1.3.2. Cyclodextrine als Wirte für hydrophobe Wirkstoffe.....	12
1.3.3. Magnetit-Nanopartikel für die Wirkstoffpositionierung	16
2. Aufgabenstellung	19
3. Ergebnisse & Diskussion	20
3.1. Konzept.....	20
3.2. Herstellung und Charakterisierung von Cyclodextrin/ET-CORM-Komplexen	23
3.2.1. Komplexierungsexperimente	23
3.2.2. 2D-NMR-Untersuchungen	26
3.2.3. Stöchiometrie- und K_A -Bestimmung der RAMEB/ET-CORM-Komplexe.....	32
3.2.4. Zusammenfassung und Diskussion	37
3.3. Synthese und Charakterisierung von β -Cyclodextrin-funktionalen Copolymeren....	39
3.3.1. Synthese und Charakterisierung der Copolymere aus E_x und Propargylmethacrylat	40
3.3.2. Synthese und Charakterisierung der β -CD-funktionalen Copolymere.....	44
3.3.3. Komplexierung von ET-CORMs mit β -CD-funktionalen Copolymeren.....	48
3.3.4. Zusammenfassung und Diskussion	49

3.4.	Synthese und Charakterisierung von ET-CORM-tragenden Copolymeren	50
3.4.1.	Copolymerisation von CORM- <i>i</i> Ea und E _{4,5}	51
3.4.2.	Funktionalisierung von Copolymeren aus E _{4,5} und AzPMA mit dem CORM- <i>i</i> 5Ha	61
3.4.3.	Zusammenfassung und Diskussion	71
3.5.	Synthese von ET-CORM-tragenden Magnetit-Nanopartikeln	72
3.5.1.	Synthese von Fe ₃ O ₄ @CS	73
3.5.2.	Synthese von Magnetit-Nanopartikeln mit einer Copolymer-Hülle	73
3.5.3.	Eigenschaften und Charakterisierung der Magnetit-Nanopartikel	74
3.5.4.	Zusammenfassung und Diskussion	84
3.6.	Untersuchungen zur CO-Freisetzung und Biokompatibilität	85
3.6.1.	Quantifizierung der CO-Freisetzung mittels Headspace-GC	86
3.6.2.	Zelltests der ET-CORM-tragenden Materialien	88
3.6.3.	Zusammenfassung und Diskussion	92
4.	Zusammenfassung und Ausblick	94
5.	Experimenteller Teil	97
5.1.	Experimentelle Methoden	97
5.2.	Verwendete Chemikalien	99
5.3.	Synthesen	100
5.3.1.	Allgemeines	100
5.3.2.	Experimente zur Copolymerisation von E _{4,5} mit dem CORM- <i>i</i> Ea	100
5.3.3.	Synthese der Copolymere PE _x A _γ und PE _x Ma _γ und anschließende Funktionalisierung	102
5.3.4.	Herstellung der CD/ET-CORM-Komplexe	108
5.3.5.	Synthese der MNPs	108
5.3.6.	Zelltests	110
6.	Literatur	113

7. Anhang.....	124
Abbildungsverzeichnis	a
Verzeichnis der Schemata	e
Tabellenverzeichnis.....	f

Abkürzungsverzeichnis

A	3-Azidopropylmethacrylat
ADME	<i>Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion</i>
AG	Arbeitsgruppe
ANV	akutes Nierenversagen
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
Ar	Argon
ATR-IR	<i>Attenuated Total Reflection Infrarotspektroskopie</i>
ATRP	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>
A_x	Anteil an AzPMA im Polymer
AzPMA	3-Azidopropylmethacrylat
b	Belegungsdichte
Bpy	2,2'-Bipyridin
BriBBr	2-Bromisobutyrylbromid
$CDCl_3$	deutertes Chloroform
CGTase	Cyclodextrin-Glycosyltransferase
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COHb	Carboxyhämoglobin
CORMs	Carbon Monoxide-Releasing Molecules
CS	Zitronensäure
CuAAC	kupferkatalysierte Azido-Alkin-Cycloaddition
CuBr	Kupfer(I)-bromid
CuSO ₄	Kupfersulfat
D	Diffusionskoeffizient
d	Durchmesser

D ₂ O	deutertes Wasser
<i>d</i> ₆ -DMSO	deutertes Dimethylsulfoxid
<i>d</i> _h	mittlerer hydrodynamischer Durchmesser
DLS	dynamische Lichtstreuung
<i>d</i> _M	volumenmittlerer magnetischer Durchmesser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>d</i> _n	zahlmittlerer Durchmesser
DOSY	Diffusion-Ordered Spectroscopy
<i>d</i> _V	volumenmittlerer Durchmesser
E ₂	2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat
E ₃	2-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)ethylmethacrylat
E _{4,5}	2-Methoxyoligo(ethylenglycol)methacrylat
EA	Elementaranalyse
ET-CORMs	<i>Enzyme-Triggered Carbon Monoxide-Releasing Molecules</i>
E _x	Oligo(ethylenglycol)methacrylat (allgemein)
<i>f</i>	Funktionalisierungsdichte
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe(acac) ₃	Eisenacetylacetonat
GC	Gaschromatographie
<i>H</i>	Enthalpie
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
<i>I</i> _x	Integral eines ¹ H-NMR-Signals
<i>K</i>	Gleichgewichtskonstante

K_A	Stabilitätskonstante
k_{app}	scheinbare Geschwindigkeitskonstante
k_B	Boltzmann-Konstante
K_D	Dissoziationskonstante
k_{off}	Geschwindigkeitskonstante für die Disgregation eines Komplexes
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante zur Bildung eines Komplexes
KRP	Kontrollierten radikalischen Polymerisationstechniken
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Magnetisierung
m	magnetischer Moment der Partikel
Ma	Propargylmethacrylat
MCCs	Metall-Carbonyl-Komplexe
MeOH	Methanol
Ma(β -CD)	(3-(6-desoxy)- β -Cyclodextrin-3H-1,2,3-triazol-4-yl)-methylmethacrylat
M_n	zahlmittlere Molmasse
$M_{n,GPC}$	zahlmittlere Molmasse, bestimmt mit GPC
$M_{n,NMR}$	zahlmittlere Molmasse, bestimmt mit NMR
MNPs	Magnetit-Nanopartikel
MOFs	<i>Metal-Organic Frameworks</i>
M_s	Sättigungsmagnetisierung
M_{theo}	theoretische Molmasse
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M_w	massenmittlere Molmasse
m_x	Anzahl der Protonen einer bestimmten Komponente im Polymer
Mx	Methoxamin
NaAsCH	Natriumascorbat

NADP	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NMP	<i>Nitroxide Mediated Polymerization</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NPs	Nanopartikel
n_x	Polymerisationsgrad
HO	Hämoxygenase
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglycol
PE _{4,5} A _{χ}	Poly[methoxyoligo(ethylenglycol)methacrylat- <i>co</i> -azidopropargylmethacrylat]
PE _{4,5} A _{χ} (C)	Poly[2-methoxy(oligoethylenglycol)methacrylat- <i>co</i> -azidopropargylmethacrylat(CORM- <i>i</i> 5Ha)]
PE _{x} Ma _{χ}	Poly[oligo(ethylenglycol)methacrylat- <i>co</i> -propargylmethacrylat]
PE _{x} Ma _{χ} (β -CD)	Poly[oligo(ethylenglycol)methacrylat- <i>co</i> -propargylmethacrylat(β -cyclodextrin)]
PGF	<i>Pulsed Field Gradient</i>
PLE	<i>Pig Liver Esterase</i>
PMDETA	N,N,N',N',N''-Pentamethyl-diethylenetriamin
PTECs	<i>Renal Proximal Tubular Epithelial Cells</i>
R	Radius
RAFT	<i>Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer</i>
RAMEB	<i>Randomly Methylated β-Cyclodextrin</i>
R_h	Hydrodynamischer Radius

ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
r_p	Polymerisationsgeschwindigkeit
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
STABW	Standardabweichung
STE	<i>Stimulated Spin-Echo</i>
T	Temperatur
t	Zeit
<i>t</i> BBriB	<i>tert</i> -Butyl-2-bromisobutyrat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TNF α	Tumornekrosefaktor α
tpm	Tris(1-pyrazolyl)methan
U	Umsatz
U_{max}	maximaler Umsatz
U_{NMR}	Umsatz, bestimmt mit $^1\text{H-NMR}$
UV	ultraviolett
V	Volumen
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1
Vis	<i>Visible</i>
VSM	<i>Vibrating Sample Magnetometry</i>
w_{org}	organischer Gehalt
α	Verhältnis magnetischer Energie zu thermischer Energie
α -CD	α -Cyclodextrin
β -CD	β -Cyclodextrin
β -CD-N $_3$	Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -CD
γ -CD	γ -Cyclodextrin

δ	chemische Verschiebung
ΔG	Änderung der Gibbs-Energie
ΔG°	Änderung der Gibbs-Energie unter Standardbedingungen
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔH°	Änderung der Enthalpie unter Standardbedingungen
δ_{obs}	Beobachtete Änderung der chemischen Verschiebung
δR	Chemische Verschiebung vom Wirt
δRC	Chemische Verschiebung Protonen im Komplex
ΔS	Änderung der Entropie
ΔS°	Änderung der Entropie unter Standardbedingungen
Δ_{org}	organischer, thermisch zersetzbarer Massenanteil
$\Delta\delta$	Differenz der chemischen Verschiebung
$\Delta\delta_{max}$	Maximum der chemischen Verschiebung
η	Viskosität
μ_0	Permeabilität des Vakuums
μ_M	Massenanteil der Magnetit-Kerne
$\mu_{M,l}$	Massenanteil der Magnetit-Kerne in der Dispersion
$\mu_{M,s}$	Massenanteil der Magnetit-Kerne im Feststoff
χ_c	Kohlestoffgehalt
χ_{org}	Organischer Anteil
$\chi_{x,NMR}$	Anteil eines Monomers in der Polymerkette, bestimmt mit $^1\text{H-NMR}$
χ_{ini}	Anfangsuszeptibilität
$\chi_{x,theo}$	theoretischer Anteil eines Monomers x in der Polymerkette

1. Einleitung

Kohlenstoffmonoxid (CO), ähnlich wie Stickstoffmonoxid (NO), hat als potentieller Wirkstoff Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da es blutdrucksenkend, entzündungshemmend und zellschützend wirkt.^[1-4] Die Nutzung von CO als Wirkstoff wurde bereits an Menschen in klinischen Studien getestet.^[2,5] Präklinische Studien an Tiermodellen mit verschiedenen menschlichen Krankheiten, denen CO als Gas in niedriger Dosierung verabreicht wurde, haben eine positive Wirkung gezeigt.^[6] Die Verabreichung als Gas stellt für CO ein Hindernis dar, da es bereits in geringen Gaskonzentrationen eine toxische Wirkung zeigt. Daher müssen neue Wege gefunden werden, um diese toxischen Nebenwirkungen, wie z.B. die Bildung von Carboxyhämoglobin (COHb), zu vermeiden oder zu lindern und CO als Medikament nutzbar zu machen.^[7] CO-freisetzende Moleküle (*CO-Releasing Molecules* CORMS) ermöglichen eine sichere Behandlung, wenn die CO-Freisetzung *in vivo* erfolgt und zeitlich und räumlich kontrolliert werden kann. Die erste Generation von CORMs eignet sich jedoch noch nicht für eine Anwendung im menschlichen Körper, da diese CORMs toxisch und instabil sind.^[3,8] Daher ist es notwendig neue CORMs zu konzipieren und zu synthetisieren, welche eine Biokompatibilität zum Menschen aufweisen, sowie weiterhin CO in einer kontrollierbaren Art und Weise freisetzen können.

1.1. Biologische Bedeutung von Kohlenstoffmonoxid

CO ist ein farb- und geruchloses Gas. Es entsteht typischerweise bei der unvollständigen Oxidation von Kohlenstoffverbindungen. CO ist eine stabile, natürlich vorkommende Verbindung, in der Kohlenstoff in der seltenen Oxidationsstufe +2 vorliegt.^[9] In hoher Konzentration wirkt es für Menschen und Tiere giftig, da es an Hämoglobin ca. 200-mal stärker als Sauerstoff (O₂) bindet. Dadurch steht das resultierende Carboxyhämoglobin nicht mehr für den Transport von O₂ zur Verfügung. Erste Vergiftungssymptome treten in Form von Krämpfen auf, wenn 50% des Hämoglobins mit CO besetzt sind. Bei stärkeren Vergiftungen kann es zum Tod kommen. Eine weitere Ursache für die Toxizität von CO ist seine Distribution im Gewebe, wo es mit verschiedenen Biomolekülen interagiert.^[7] Die positive Wirkung des CO in geringer Dosis erweckt jedoch in wachsendem Maße das Interesse.

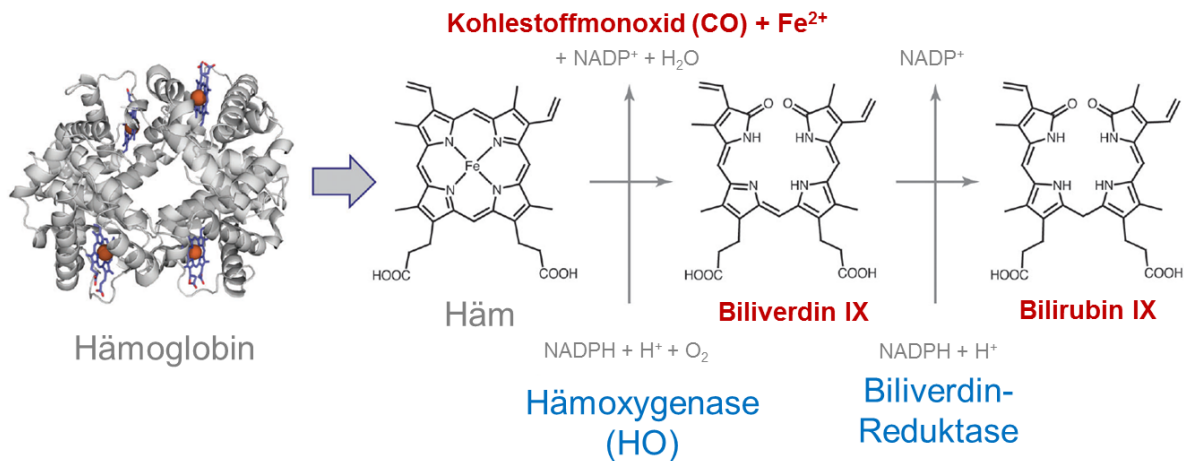


Abbildung 1.1. Häm Katabolismus. Häm (Fe^{2+} -Protoporphyrin IX) freigesetzt aus Hämoglobin (links), wird durch die Hämoxigenase zu CO, Fe^{2+} und Biliverdin IX zersetzt. Im Folgeschritt, der durch die Biliverdin-Reduktase katalysiert wird, entsteht Bilirubin IX. (In Anlehnung an Referenz).^[10]

Die hauptendogene Quelle von CO im Körper ist der Abbau des Häms. Die physiologische Degradation des Häms erfolgt auf einem strikt kontrollierten Weg. Das Enzym Hämoxigenase (HO) baut in Anwesenheit von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ und O_2 Porphyrin IX zu CO, Fe^{2+} und Biliverdin IX ab (Abbildung 1.1).^[11] Die Biliverdin-Reduktase katalysiert den nächsten Abbauschritt in Anwesenheit von NADPH und H^+ zu Bilirubin IX, das durch die Galle und den Urin ausgeschieden wird. Im menschlichen Körper werden auf diese Weise 16 $\mu\text{mol/h}$ CO produziert.^[12]

Allerdings ist die molekulare Wirkung des CO als begrenztes örtliches Ereignis zu betrachten, da der Wirkradius auf Grund seiner limitierten Bioverfügbarkeit und durch die Abhängigkeit seiner Produktion von der Hämoxigenase eingeschränkt ist. Im menschlichen Organismus gibt es zwei Isoformen dieses Enzyms. Die Expression von HO-1 wird durch die Anwesenheit des freien Häms induziert, dadurch wird das Häm abgebaut. Im Gegensatz dazu wird die HO-2 konstitutiv exprimiert. Da die Aktivität von HOs immer zur Klärung des Häms und zur Produktion von CO führt, ist in vielen Fällen nicht eindeutig klar, ob der Abbau des Häms, die Produktion von CO, oder beides zu den physiologischen relevanten Resultaten führen. Es wird angenommen, dass der Häm-Katabolismus und die endogene Produktion von CO ein breites physiologisches Funktionspektrum aufweist. Beispielsweise mindert die Induktion von HO-1 im Gehirn die Folgen einer eingeschränkten Durchblutung des Gehirns,^[5,13] und es wurde gezeigt, dass HO-2 neuroprotektiv während einer Gehirn-Hämorrhagie wirkt.

Das Interesse an CO als potentiellen therapeutischen Wirkstoff einzusetzen, beruht auf seiner Wirkung als Antihypertensivum und Antiinflammatorikum.^[1-4] Zum Beispiel mindert die Inhalation von CO-Gas unter kontrollierten Bedingungen die Symptome der pulmonalen Hypertonie.^[14] Höchstwahrscheinlich interagiert CO dabei mit Signalproteinen, wie die Guanylatcyclyase und den Kalium-Kanälen der glatten Muskulatur.^[15] Das Inhalieren von CO scheint lebenswichtige Organe wie Gehirn, Herz, Lunge und Leber während einer Ischämie und Hypoxie zu schützen,^[8,16,17] auch wenn die genauen molekularen Mechanismen derzeit noch unbekannt sind. Unter anderem führt die mit der postulierten heilsamen Rolle von CO zu einer hohen Expression der Hämoxigenase zu einer schnelleren Heilung von Patienten nach einem septischen Shock.^[18]

Die praktische Nutzung von CO-Gas ist auch durch die geringe Löslichkeit von CO in Wasser (ca. 1 mM) begrenzt, was die Verteilung von CO in Körperflüssigkeiten und Zielgewebe limitiert. Zusätzlich komplizieren potentielle Wechselwirkungen von CO mit verschiedenen Biomolekülen in einer physiologischen Umgebung, sowohl die gezielte Verabreichung von CO, als auch die genaue Untersuchung seiner physiologischen Funktionen.^[1] Daher wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, um CO gezielt zu verabreichen und gleichzeitig die Nebeneffekte zu minimieren. CORMs, die zu einem bestimmten Ziel im Körper gesteuert werden können und lokal begrenzt und in kontrollierter Dosis CO freisetzen können, werden daher für die Forschung und klinische Anwendungen gesucht.

1.2. Entwicklung von pharmazeutischen CORMs

Die Bereitstellung von pharmazeutischen CORMs, die CO in molekularer Konzentration kontrolliert freisetzen, ist eine Herausforderung für den synthetischen Chemiker. Als Modellverbindung für die Synthese von pharmazeutischen CORMs kann das Häm des Hämoglobins dienen. Strukturell betrachtet handelt es sich bei dem Häm um eine makrocyclische, organometallische Verbindung, welche einen natürlichen Träger für CO darstellt. Nur wenige organometallische Verbindungen werden als pharmazeutische Substanzen verwendet, da die Metalle mit Biomolekülen reagieren können und oftmals toxisch wirken.^[19] Daher wird nach alternativen Klassen von Verbindungen gesucht, die als CO-Träger dienen oder CO unter biologischen Bedingungen bilden können.

Neben organometallischen Verbindungen wurden weitere vier Klassen von Verbindungen identifiziert, die CO unter milden Bedingungen freisetzen können: α,α -Dialkylaldehyde,

Oxalate, Boroncarboxylate und Silacarboxylate. Die Freisetzungsrates von CO aus Oxalaten war zu langsam für den Einsatz dieser Moleküle als CORMs. Die vorläufigen Ergebnisse zur Freisetzung von CO aus Aldehyden haben deren Potential für den Einsatz als CORM bestätigt, jedoch ist ihre Freisetzungsrates noch langsam, und die Toxizität der Verbindungen ist problematisch für ihre Weiterentwicklung.^[20] Borocarboxylate sind bekannte CORMs und wurden bereits erfolgreich an verschiedenen Tiermodellen eingesetzt.^[21] Allerdings macht es ihre begrenzte synthetische Zugänglichkeit schwierig, Substanzen mit pharmazeutischen Charakteristiken herzustellen.^[22] Ähnlich zu den Borocarboxylaten wurden auch Silacarbonsäuren ($R_3SiCOOH$) als CORMs eingesetzt, jedoch wurde CO nur unter Pd-Katalyse in stöchiometrischen Mengen freigesetzt.^[23] Die hierzu benötigten hohen Temperaturen oder der notwendige Einsatz von Basen verhindern bisher ihren Einsatz in biologischen Systemen. Im Vergleich hierzu weisen einige organometallische Komplexe die passenden Eigenschaften für die CO-Freisetzung in biologischen Systemen auf.

1.2.1. Kohlenstoffmonoxid als Ligand in organometallischen Komplexen

Das CO-Molekül hat die Valenzelektronen auf eine σ - und zwei π -Bindungen verteilt und besitzt je ein freies Elektronenpaar an jedem Atom. Damit ist es isoelektronisch zu N_2 , allerdings weist CO ein Dipolmoment auf, wodurch es reaktiver ist als das nichtpolare N_2 . CO wird in Wasser nicht protoniert und ist schlecht löslich. Seine Reaktion mit NaOH unter Bildung von HCO_3Na benötigt harsche Bedingungen. Allerdings reagiert CO in wässriger Lösung mit $PdCl_2$ zu $Pd(0)$, CO_2 und HCl . Dies zeigt, dass CO durch die Koordination mit Metallen aktiviert werden kann. Unter Sauerstoffausschluss und unter geeigneten Reduktionsbedingungen, überwiegend in organischen Lösungsmitteln, reagiert CO mit vielen Metallen und bildet Carbonylkomplexe unter Ausbildung einer M-CO-Bindung,^[24] bevorzugt mit niedervalenten Metallen und schwachen Lewis-Säuren.

Die allgemeine Summenformel von Metall-Carbonyl-Komplexen (MCCs) ist $[M_m(CO)_xL_y]^{z\pm}[Q^{\pm}]_z$, wobei M das Übergangsmetall, L ein weiterer Ligand, z die Ladungszahl des Komplexes und Q das Gegenion ist. Des Weiteren sind m , x und y die Stöchiometrikoeffizienten, wobei m und $x \geq 1$ sein müssen. Da alle Parameter die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der MCCs beeinflussen, müssen sie bei der Entwicklung der CORMs berücksichtigt werden. Für eine pharmazeutische Anwendung sollten die Komplexe weiterhin in wässriger Lösung löslich und stabil sein und

eine hohe Lagerbarkeit aufweisen. Darüber hinaus sollen sie auch während der Zirkulation im Körper stabil bleiben, um das Zielgewebe noch aktiv zu erreichen. Per Definition muss ein MCC, das als CORM agiert, fähig sein *in vivo* CO freizusetzen. Als Startpunkt für die CORM-Entwicklung dient daher der Freisetzungsmechanismus. Die Chemie der MCCs ermöglicht per se unterschiedliche Mechanismen für die CO-Freisetzung.

Die photochemisch aktivierte Freisetzung von CO ist eine häufig beobachtete Reaktion von MCCs. Dabei ist die Wellenlänge des Lichtes, abhängig von der elektronischen Natur des MCCs. Solche Photo-CORMs könnten für dermale Krankheiten Anwendung finden, oder für die transdermale CO-Freisetzung in bestimmten Organen, Geweben oder Tumoren bei photodynamischen Therapien appliziert werden.^[25] Das lipophile und photoaktive Dimangandecacarbonyl ($\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$; CORM-1) war das erste Beispiel für ein bioaktives Photo-CORM (Abbildung 1.2).^[8] Die Behandlung mit CORM-1 gefolgt von der Bestrahlung mit kaltem Licht zeigte, dass es in Mäusen mit unterdrücktem HO-1 einem akuten Nierenversagen (ANV) vorbeugt.^[26] Des Weiteren stellt das wasserlösliche *cis*- $[\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S})_2]$ (CORM-S1) ein viel versprechendes Photo-CORM dar (Abbildung 1.2).^[27] Die Photoaktivierung von wasserlöslichem $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]^+$ (tpm = Tris(1-pyrazolyl)methan), das bereitwillig in menschlichen Darmkrebszellen der Zelllinie HT29 durch passive Diffusion akkumuliert wird, führt zum Tod dieser Tumorzellen. Allerdings leitet sich seine Toxizität vielmehr von freigesetzten, metallhaltigen Komplexfragmenten ab, die bei der CO-Freisetzung entstehen.^[25]

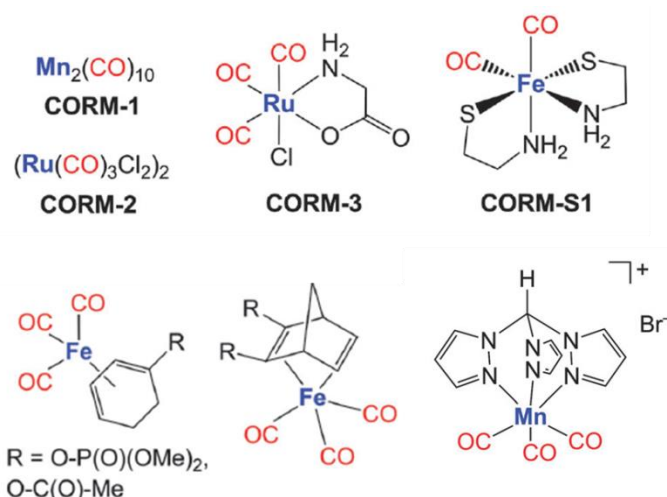


Abbildung 1.2. Auswahl an Metall-basierten CORMs (In Anlehnung an Referenz).^[11]

Eine lichtinduzierte CO-Freisetzung ist jedoch nicht für alle therapeutischen Anwendungen verwendbar, da es einen optischen Zugang benötigt. Daher werden auch andere Initiierungsmechanismen untersucht. Die CO-Freisetzung kann bei manchen Komplexen auch durch Substitution stattfinden. Dieser Mechanismus ist ein bimolekularer, zweistufiger Prozess. Im ersten Reaktionsschritt wird die eintretende Gruppe Y gebunden, im zweiten Schritt wird die austretende Gruppe X abgespalten.^[28] Als Beispiel für solche CORMs dienen das CORM-2 und das wasserlösliche CORM-3 (Abbildung 1.2). Ein weiterer Mechanismus für die CO-Freisetzung ist eine Änderung des pH-Wertes, die eine gewebespezifische Freisetzung möglich macht. Ein Beispiel ist das CORM $\text{Na}[\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{histidinato})]$, bei dem CO bei einem pH oberhalb 7.4 freigesetzt wird. Auf dieser Weise, könnte CO im Darm freigesetzt werden, nachdem das CORM den sauren Magen verlassen hat.^[29]

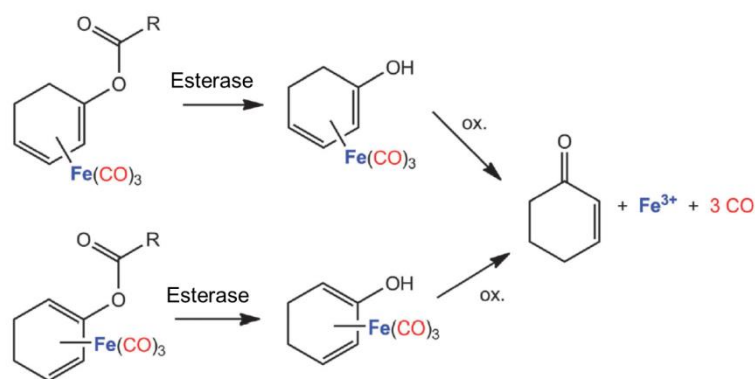


Abbildung 1.3. CO-Freisetzungsmechanismus aus ET-CORMs. (In Anlehnung an Referenz).^[11]

Der Zerfall von CORMs durch die Einwirkung von Enzymen oder Proteinen ist ebenfalls ein vielversprechender Weg, CO *in vivo* freizusetzen. Cyclohexadien-eisen-tricarbonyl-Komplexe stellen enzymgesteuerte, CO-freisetzende Moleküle (*enzyme triggered CO-releasing molecules*, ET-CORM) dar, wenn die Dien-Einheit an eine Acyloxy-Einheit gebunden ist.^[30,31] Diese Klasse von Substanzen wurde in den letzten Jahren intensiv in der Arbeitsgruppe von *H.-G. Schmalz* untersucht.^[32–34] Die CO-Freisetzung beginnt mit der Spaltung des Dienylesters durch eine Esterase. So wird durch die Keto-Enol-Tautomerie eine instabile Hydroxybutadien-Verbindung erhalten. Es folgt die Oxidation des $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Fragment und die schnelle Freisetzung von drei Äquivalenten CO (Abbildung 1.3).^[30] Die Zytotoxizität und die CO-Freisetzungsrates kann durch die Variation der Acyl-Gruppe variiert werden.^[35]

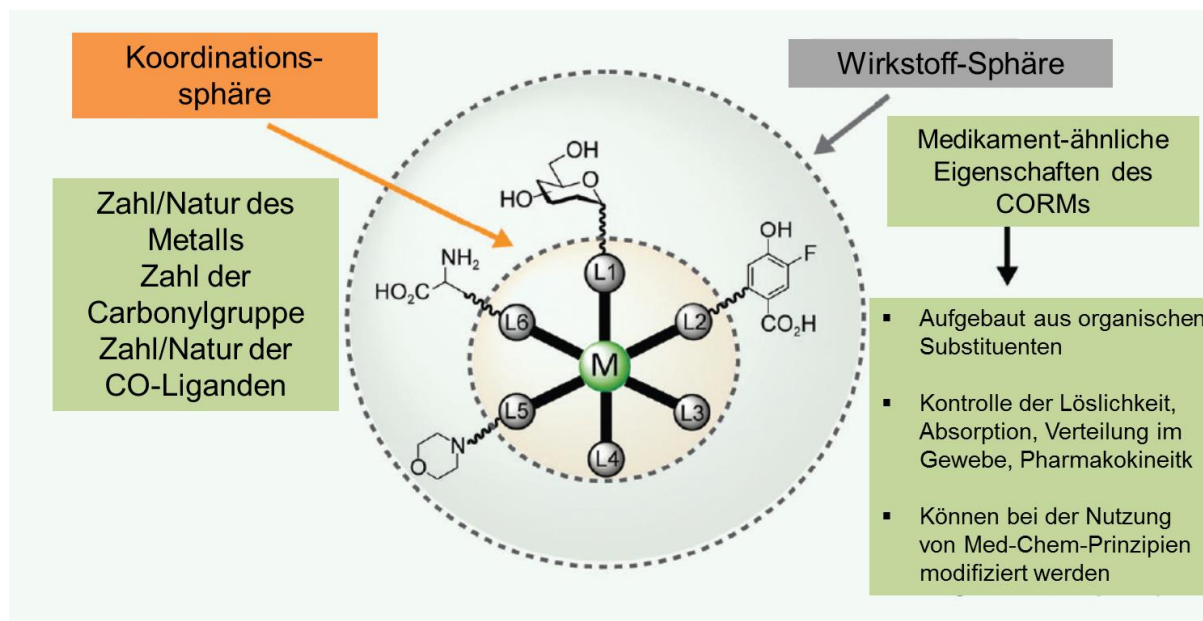


Abbildung 1.4. Konzeptionelles Modell für die Entwicklung von pharmazeutischen CORMs. (In Anlehnung an Referenz).^[20]

Die wissenschaftliche Abhandlung von *Romão et al.* stellt einen eleganten Entwurf für die zukünftige Entwicklung von CORMs dar.^[20] Das vorgeschlagene Modell präsentiert ein Instrument, um das Design der Carbonyl CORMs mit geeigneten pharmazeutischen Eigenschaften zu entwerfen. Als Beispiel dient eine oktaedrische Geometrie mit sechs Liganden, die das Metall umgeben (Abbildung 1.4). Mindestens ein CO-Ligand wird an das zentrale Metallatom koordiniert. Die thermodynamische und kinetische Stabilität des Komplexes wird von den Chelat-Liganden und den elektronischen Eigenschaften des zentralen Metallatoms beeinflusst. Alle Nebenliganden beeinflussen die Elektronendichte, das Oxidationsverhalten und die CO-Freisetzung aus dem Metallzentrum. Demzufolge beeinflusst die Koordinations-sphäre eines pharmazeutischen CORM auch die Beständigkeit gegenüber Plasmaproteinen und die Reaktionsfähigkeit bei einer spezifischen induzierten CO-Freisetzung. Die pharmazeutischen CORMs benötigen ein geeignetes pharmakologisches Profil,^[20] um ihre Eigenschaften zu entfalten. Die zelluläre Internalisierung und die pharmakologischen Absorptions, Distributions, Metabolismus-, und Exkretions- (ADME) Charakteristiken spielen dabei eine große Rolle. Die resultierende Medikamenten-Sphäre kann durch eine Modifizierung der koordinierenden Liganden an deren distalen Seiten erhalten werden (Abbildung 1.4). Des Weiteren determiniert der Nutzen als Pharmaka, welche weitere funktionelle Gruppe ein CORM besitzen sollen, um daraus ein Medikament herzustellen.^[36] Kohlenhydrate und Peptide können die Wasserlöslichkeit,^[37] die

Biokompatibilität und auch die Biodistribution in manchen Geweben verbessern.^[38-40] Morpholino-Gruppen können CORMs einen amphiphilen Charakter verleihen. Die Löslichkeit, die Membranpermeation und das pharmakokinetische Profil könnten durch Endgruppen, wie Amino- oder Carboxyl-Gruppen, kontrolliert werden. Außerdem können Farbstoffe helfen, den Metabolismus von CORMs *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.^[41]

1.2.2. Kohlenstoffmonoxid-freisetzende Materialien

Wie in Abschnitt 1.2.1 erläutert wurde, sind organometallische Komplexe eine vielversprechende Verbindungsklasse für pharmazeutische Anwendungen als CORM. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die systematische Applikation von wasserlöslichen CORMs zu einer Verteilung im gesamten Körper führt, die zu einer Schädigung des gesunden Gewebes führen kann. Die örtlich und zeitlich begrenzte CO-Freisetzung zu erreichen, bleibt daher eines der wichtigen Ziele.^[42] Des Weiteren werden bei der CO-Freisetzung auch die Co-Liganden freigesetzt, wodurch der Metabolismus der Zelle oder des Organismus ebenfalls beeinflusst werden kann. Um dies zu umgehen wurden unlösliche feste Speichermedien entwickelt, die nur das Gas freisetzen, und die anderen Fragmente festhalten. Diese Speichermedien sind makromolekulare oder Nano-Transporter.^[43]

Hubbell *et al.*^[38] haben CO-freisetzende Mizellen entwickelt, die die Diffusion der CORMs innerhalb des Gewebes reduzieren sollen. Diese Mizellen bestehen aus Blockcopolymeren, die drei Blöcke aufweisen: hydrophiles Poly(ethylenglykol), Poly(ornithinacrylamid), das den $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinat})]$ -Komplex (CORM-3) trägt, und hydrophobes Poly(*n*-butylacrylamid).^[44] Durch den Einbau in Mizellen wurde die lipopolysaccharid-induzierte Immunantwort der Monozyten im menschlichen Körper abgeschwächt. Außerdem konnte die Toxizität des $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinat})]$ -Komplexes erheblich reduziert werden^[38]

Ein vielversprechendes Konzept für die CO-Freisetzung *on demand* besteht in der Verwendung biokompatibler magnetischer Nanopartikel als Transportmittel für CORMs. In diesen Machbarkeits-Studien wurde gezeigt, dass die CO-Freisetzungsrates aus Maghemit@ $[\text{RuCl}(\text{CO})_3](\mu\text{-DOPA})$ -Nanopartikeln durch den Einsatz eines externen magnetischen Wechselfeldes verdoppelt werden konnte.^[45]

Poröse Koordinationspolymere, auch metallorganische Gerüste genannt (*metal-organic frameworks*, MOFs), besitzen eine sehr großen Innenoberfläche und weisen Porenkanäle mit unterschiedlichen Durchmessern auf.^[46,47] Wegen dieser strukturellen Eigenschaften sind

MOFs attraktive Materialien für die Speicherung von Gas-Molekülen, wie H₂, CH₄ und CO₂.^[48,49] Daher wurden vor kurzem MOFs auf Eisenbasis hergestellt, die in der Lage sind, CO zu speichern und freizusetzen.^[50] Die Materialien lassen sich schnell durch eine Mikrowellensynthese aus FeCl₃ und Terephthalsäure synthetisieren. Die CO-Beladung erfolgt durch Koordination des Gases an bestimmte Koordinationsstellen und wurde durch die Mößbauerspektroskopie bestätigt.^[50] Diese neuartigen Materialien zeigen eine gute Biokompatibilität und CO-Freisetzung durch Zersetzung des Materials unter physiologischen Bedingungen mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ zwischen 38 und 76 min.

1.3. Transport- und Freisetzungssysteme für Wirkstoffe

Bei der Synthese von Wirkstoff-freisetzenden Systemen müssen die Transportmittel, die Transportwege und die Zielorgane berücksichtigt werden, um die Effizienz von therapeutischen Substanzen für eine kontrollierte Freisetzung deutlich zu verbessern. Dies könnte eine bessere Bioverfügbarkeit, eine verbesserte therapeutische Bandbreite und eine bessere Verträglichkeit der Patienten einbeziehen. Ein kontrolliertes Wirkstofffreisetzungssystem ist definiert als ein System, das chemisch, physiochemisch oder mechanisch die Wirkstofffreisetzungsrates im Körper oder in das involvierte Gewebe reguliert.^[51]

1.3.1. Polymere aus Oligo(ethylenglycol)methacrylaten

Poly[oligo(ethylenglycol)methacrylat]e (PE_x) sind Polymere, die büstenförmige Strukturen aufweisen. Sie werden aus einem C-C-Rückgrat (oder Hauptkette) und aus Polyethylenglykol-Seitenketten gebildet (Abbildung 1.5). Daher sind sie heterogene Strukturen und bestehen zu 85 wt-% aus Polyethylenglycol (PEG). Somit sind sie in den meisten Fällen wasserlöslich und biokompatibel. Im Gegensatz zu PEG reagieren Polymeren PE_x auf bestimmte Stimuli. Zum Beispiel zeigen PE_x in Wasser oder in einem physiologischen Medium eine untere kritische Lösungstemperatur (*Lower Critical Solution Temperature*, LCST).^[52–56] In Bezug auf biomedizinische Anwendungen sollen PE_x einem hohen Grad an Biokompatibilität zeigen, da deren Hauptkomponente aus PEG-Segmenten bestehen, und PEG ungeladen, wasserlöslich, nicht toxisch und nicht immunologisch ist.

PEG ist von der FDA (*Food and Drug Administration*) anerkannt und ist in den letzten Jahren das meist genutzte Polymer in der Biotechnologie und der Medizin. Zum ersten Mal wurde PEG in der Medizin in den vierziger Jahren angewendet (nur wenige Jahre nach seiner Entdeckung und Beschreibung durch *Staudinger et al.*^[57]).^[58] Seitdem hat eine große Anzahl von wissenschaftlichen Publikationen die Wichtigkeit von PEG in den Biowissenschaften bestätigt. PEG wird üblicherweise über die anionische Polymerisation vom Epoxid synthetisiert. Dies ist ein empfindlicher Prozess, der nicht immer für moderne biotechnologische Anwendungen geeignet ist. Zum Beispiel ist beim karbanionischen Polymerisationsmechanismus die Abwesenheit von protischen und elektrophilen Verunreinigungen nötig. Außerdem kann PEG nicht direkt auf biologischen Substraten wachsen. Besondere Bindungsmethoden, genannt als PEGylierung, müssen angewendet werden, um PEG an biologischen Substraten zu binden.^[59] Diese Kopplungsprozesse sind meistens effizient, aber kostspielig und nur an Polymeren mit kleiner Molmasse anwendbar. In Gegensatz dazu scheint die Nutzung von PE_x eine attraktivere Alternative zur konventionellen PEGylierung zu sein.^[60] Tatsächlich können die Polymere bestehend aus E_x -Monomeren einfach vorbereitet und in einer wässrigen Lösung funktionalisiert werden.

Die anfängliche Motivation E_x für die Polymerisation zu benutzen, war das Entwickeln von neuen Polymer-Architekturen, wie Bürstenpolymere oder Netzwerke aus Polymeren.^[61,62] Polymere aus E_x können durch verschiedene Polymerisationsmechanismen, wie die anionische, kationische, ringöffnende und freie radikalische Polymerisation, synthetisiert werden.^[63–66] Ein weiterer wichtiger Vorteil von E_x ist die Möglichkeit, unter milden Reaktionsbedingungen hochmolekulare E_x -basierte Polymere zu synthetisieren. Die freie radikalische Polymerisation erlaubt die Herstellung von Polymeren mit einer großen Vielfalt an funktionellen Gruppen. Außerdem werden die kontrollierten radikalischen Polymerisationstechniken (KRP), wie die *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP), die *Nitroxide Mediated Polymerization* (NMP) und die *Reversible Addition-Fragmentation Transfer Polymerization* (RAFT) als bedeutende und verbreitete Methoden für das Entwerfen von Makromolekülen aus E_x angesehen.^[67–69]

Die ATRP wird im Labormaßstab meist in organischen Lösungsmitteln durchgeführt, um gut definierte Poly[oligo(ethylenglycol)methacrylat]e (PE_x) zu erhalten. Es wurde bereits gezeigt, dass entweder mit 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat (E_2) oder mit Oligo(ethylenglycol)methacrylat (E_x), das 8,5 Ethylenglycol-Einheiten ($E_{8,5}$, $M_n = 475 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) besitzt, die Polymerisation in EtOH schnell ist und zu gut definierten Polymeren

führt.^[52] Neben polaren Lösungsmitteln können auch apolare Lösungsmittel verwendet werden, um E_x zu polymerisieren.^[60,70] Zum Beispiel haben *Matyjaszewski et al.* gezeigt, dass die ATRP von E_x sehr gut in Toluol oder Anisol verläuft.^[71]

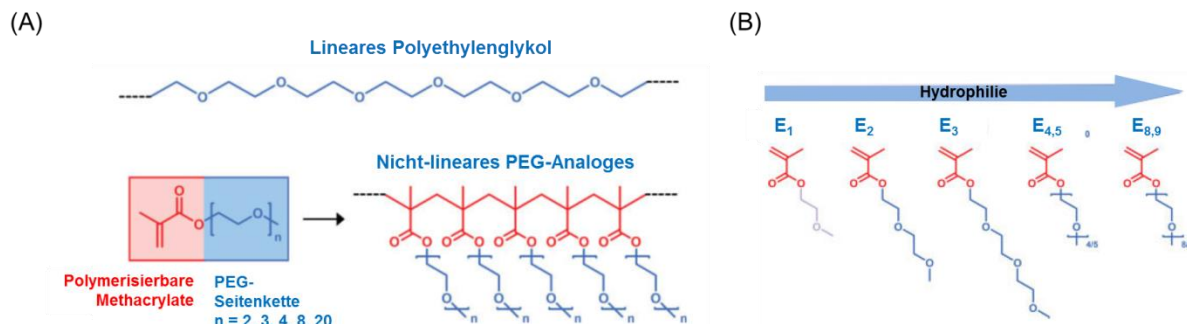


Abbildung 1.5. (A) Molekulare Struktur von PEG und von E_x . (B) Molekülstruktur von verschiedenen Oligo(ethylenglykol)methacrylaten. Hydrophobe und hydrophile Bereiche der Moleküle sind jeweils mit rot und blau gekennzeichnet. (In Anlehnung an Referenz).^[72]

Des Weiteren können PE_x , die mit der KRP vorbereitet wurden und die aktive Endgruppe besitzen, nach der Polymerisation modifiziert werden.^[73] Es wurde gezeigt, dass durch die ATRP synthetisierte PE_x nach der Funktionalisierung mit Natriumazid der Endgruppe effektiv durch kupferkatalysierte 1,3-dipolare Zyклоaddition zwischen einer Azido- und einer Alkin-Gruppe (*Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*, CuAAC) modifiziert werden können.^[74,75] Diese Art von Synthese ist bekannt als Click-Reaktion, da sie eine thermodynamisch begünstigte, modulierbare und hocheffiziente Reaktion ist. Daher ist die Click-Reaktion für makromolekulares Engineering eine sehr wichtige und aussichtsvolle Methode.^[64,75] In allen Fällen sind die Substitution- und Cycloaddition-Schritte nahezu quantitativ. Dies wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -, FTIR- und GPC-UV-Messungen nachgewiesen.^[64,75] Die chemoselektive CuAAC kann für die „Click“-Bindung von PE_x mit hochfunktionalisierten Biopolymeren wie Oligopeptiden oder CDs verwendet werden.^[75,76]

Die Biokompatibilität von nichtlinearen PE_x muss noch genauer untersucht werden. Bis jetzt zeigen alle *in vitro* durchgeführten Zellviabilitätstest eine exzellente Biokompatibilität. Zum Beispiel induziert $PE_{8,5}$ keinen Zelltod, auch wenn die Konzentration $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ übersteigt.^[72] Um ein solches Ergebnis zu erreichen, müssen die Polymere sorgfältig von allen Verunreinigungen getrennt werden, da manche Rückstände der Polymerisation hochtoxisch sein können. Dazu zählen Spuren des Kupfer-Katalysators. Lineares und nichtlineares PEG haben weitere Gemeinsamkeiten, beispielsweise zeigen modifizierte Oberflächen mit PE_x

bioabweisende Eigenschaften, ähnlich zu selbstassemblierten PEG-Monoschichten^[77]. Es wurde gezeigt, dass eine PE_x-basierte Beschichtung effektiv Proteinadsorption und Zelladhäsion verhindert.^[78,79] Diese interessanten Eigenschaften wurden für Bioanwendungen verwertet, wie der Mikrostrukturierung von Zellen und in der Fabrikation von blutverträglichen Materialien.^[80,81] Zusätzlich können PE_x-beschichtete Oberflächen nachträglich modifiziert werden. So können deren Eigenschaften zum Beispiel von bioabweisend zu bioadhärent umgeschaltet werden.^[79] Das bioabweisende Verhalten von PE_x kann auch also verwendet werden, um therapeutische Proteine und Wirkstofftransporter abzuschirmen.^[82,83] Gewiss hat die konventionelle PEGylierung seit vielen Jahren bewiesen, dass sie *in vivo* eine leistungsfähige Methode für die Stabilisierung und den Schutz von wirkstofffreisetzenden Systemen ist.^[84,85] Vergleichbar abschirmende Eigenschaften können auch mit der PE_x-Umhüllung erreicht werden. Werden beispielsweise Magnetit-Nanopartikel (MNPs) mit PE_{8,5} beschichtet, akkumulieren sie nicht wie die nichtbeschichteten MNPs durch die Phagozytose der Zellen in der Leber von Ratten.^[86] Außerdem zeigen die beschichteten MNPs *in vivo* eine hervorragenden Biokompatibilität und sind nicht letal für Ratten.^[87]

1.3.2. Cyclodextrine als Wirte für hydrophobe Wirkstoffe

Cyclodextrine (CDs) sind cyclische Oligosaccharide, die aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Anhydroglucopyranoseeinheiten bestehen. Sie wurden erstmals von *Villiers*^[88] im Jahr 1891 isoliert und 1903 von *Schardinger*^[89] als cyclische Oligosaccharide identifiziert. Es werden je nach Anzahl der Glucoseeinheiten verschiedene Cyclodextrine unterschieden. Verbreitet CDs sind α -CDs mit sechs Glucoseeinheiten, β -CDs mit sieben Glucoseeinheiten und die γ -CDs mit acht Glucoseeinheiten. Diese cyclischen Verbindungen haben die Form eines hohlen Kegelstumpfs.

Die Synthese der CDs erfolgt durch enzymatischen Abbau von Amylose. Enzyme wie Cyclodextrin-Glycosyltransferasen (CGTase), die aus Bakterien wie *Bacillus macerans* und *Klebsiella pneumonia* gewonnen werden,^[90,91] katalysieren die Reaktion. Durch die CGTase wird eine Windung der α -Helix der Amylose durch Spaltung der glycosidischen Bindung abgetrennt. Durch Bildung einer neuen 1,4-Verknüpfung von zwei Glucoseeinheiten bilden sich ringförmige Moleküle. Der Ringschluss erfolgt nicht selektiv, sondern führt zu einem Produktgemisch aus verschiedenen Ringgrößen. Um die verschiedenen CDs zu trennen, werden selektive Fällungsmittel angewendet.^[92]

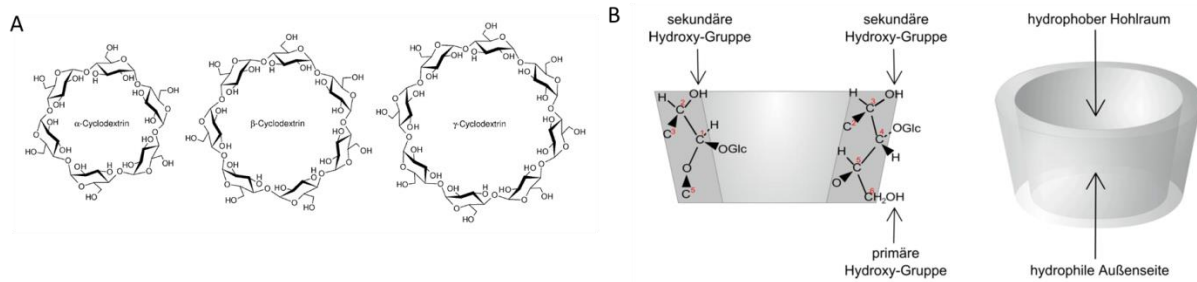


Abbildung 1.6. (A) Molekülstrukturen der CDs. (B) Schnitt durch ein CD-Molekül und die schematische Darstellung der dreidimensionalen Molekülstruktur (In Anlehnung an Referenz).^[93]

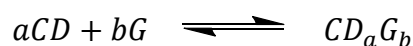
Abbildung 1.6 zeigt den schematischen Aufbau der CDs. Die Glucoseeinheiten liegen in der ⁴C₁-Sesselkonformation vor. α-, β- und γ-CD besitzen eine C_n-Symmetrie, wobei n für die Zahl der Glucoseeinheiten steht. Die primären Hydroxylgruppen sind an der engeren Seite des Kegelstumpfes zu finden, die sekundären Hydroxylgruppen an der breiteren Seite. Die Hydroxylgruppen an der C2-Position zeigen dabei ins Innere der Kavität, und die Hydroxylgruppen an der C3- und C6-Position befinden sich auf der Außenseite. Da sich auf der äußeren Seite doppelt so viele Hydroxylgruppen befinden wie auf der inneren Seite, kommt es zur Ausbildung eines Dipolmoments, das zwischen 10 D bis 15 D beträgt und parallel zur Drehachse liegt.^[94] Zwischen den Hydroxylgruppen auf der äußeren Seite der CDs bildet sich ein Band aus Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese können sich bei β-CD besonders gut ausbilden und sind der Grund für die vergleichbar schlechte Wasserlöslichkeit dieser Verbindung im Vergleich zu α- und γ-CD (Tabelle 1.1).^[95,96] Im Gegensatz zur hydrophilen äußeren Seite ist die Kavität hydrophob.^[97] Diese wird durch die H-Atome an den Positionen C-3 und C-5 sowie die Sauerstoffbrücken des Halbketal verursacht.

Tabelle 1.1. Eigenschaften der CDs.^[98]

Eigenschaften	α-CD	β-CD	γ-CD
Anzahl der Glucoseeinheiten	6	7	8
Molmasse (g/mol)	972	1135	1297
Wasserlöslichkeit bei 25 °C (% W/V)	14,5	1,85	23,2
Außendurchmesser (nm)	1,46	1,54	1,75
Innendurchmesser (nm)	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Hohe des Torus (nm)	0,79	0,79	0,79
Volumen der Kavität (nm ³)	0,174	0,262	0,427

Da die CDs eine hydrophobe Kavität und eine hydrophile Außenseite besitzen, können sie mit wasserunlöslichen hydrophoben Molekülen geeigneter Größe supramolekulare Einschlussverbindungen bilden. Wegen der hydrophilen Außenseite der CDs sind diese Wirt-Gast-Komplexe häufig wasserlöslich. Wasserunlösliche Substanzen können auf diese Weise in eine wässrige Phase überführt werden. Eine Komplexbildung findet statt, wenn das vorliegende System insgesamt eine negative Standardbildungsenthalpie zeigt. Die beiden wichtigsten Triebkräfte der Komplexierung sind dabei der hydrophobe Effekt und die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Wirt und dem Gast. Hydrophobe Moleküle bilden in wässriger Lösung Aggregate, die von einer Solvathülle umgeben werden. Die Wassermoleküle in der angrenzenden Solvathülle bevorzugen die hydrophilen intermolekularen Wechselwirkungen. Sie nehmen dabei einen Zustand höherer Ordnung als in freier Lösung ein und ihre translatorischen und rotatorischen Bewegungen werden eingeschränkt. Findet eine Komplexierung statt, werden die Wassermoleküle der Solvathülle in das freie Lösemittel abgegeben und das System erfährt einen Entropiegewinn. Neben dem hydrophoben Effekt, leisten die *Van-der-Waals*-Kräfte den größten Beitrag zur Komplexbildung. Je besser der Gast mit seinen Molekülabmaßen in die Kavität passt, desto höher ist der Energiegewinn und desto stabiler ist der Komplex.^[99,100]

Die Bildung von Wirt-Gast-Strukturen ist ein reversibler Prozess, der auf einem dynamischen Austausch der Komponenten basiert. So kann für jedes Wirt-Gast-System über das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 1.1) eine Gleichgewichtskonstante (K) bestimmt werden. Der Zusammenhang zwischen K und den thermodynamischen Zustandsgröße eines Systems, wie freie Standardenthalpie (ΔG°), Standardbildungsenthalpie (ΔH°) und Standardbildungsentropie (ΔS°) werden über die *Van't Hoff*- und die *Gibbs-Helmholtz*-Gleichung (Gleichung 1.2 Gleichung 1.3) beschrieben.



$$K = \frac{[CD_aG_b]}{[CD]^a[G]^b} \quad \text{Gleichung 1.1}$$

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad \text{Gleichung 1.3}$$

Zur Bestimmung von K können physikalische Eigenschaften von Wirt oder Gast herangezogen werden, die sich während der Komplexbildung ändern. Oft werden spektroskopische Methoden wie die Fluoreszenz-, UV/Vis- oder NMR-Spektroskopie verwendet.^[101] Typische Werte für K von Wirt-Gast-Komplexen mit β -CD in Wasser liegen zwischen 10 M^{-1} - 10^4 M^{-1} , vereinzelt treten auch Werte bis 10^5 M^{-1} auf.^[102]

Betrachtet man die biologischen Eigenschaften der CDs, so werden diese in niedriger Konzentration von Bakterienzellen nicht verstoffwechselt und haben nur geringe Toxizität gegenüber dem tierischen und menschlichen Organismus.^[103,104] Basierend auf diesen Eigenschaften und der guten Komplexbildungsfähigkeit haben sie bereits Anwendung in verschiedenen Produkten gefunden. In medizinischen Anwendungen und denen der Pharma- und Kosmetik-Industrie sind sie schon vielfach zu finden, z.B. um die Wasserlöslichkeit von Wirkstoffen und deren Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen zu erhöhen. Zudem erlauben sie eine kontrollierte Abgabe dieser Wirkstoffe.^[105–108]

Neben den bereits beschriebenen nativen CDs existiert eine Vielzahl von industriell hergestellten CD-Derivaten. Die Modifikationen dienen der Variation des Löslichkeitsprofils oder des Komplexbildungsverhaltens.^[109] Auf Grund der großen Anzahl der OH-Gruppen findet meist eine statistische Funktionalisierung der CDs statt. Durch die statistische Modifizierung der Hydroxylgruppen mittels Veretherung oder Acetylierung werden besser wasserlösliche CDs hergestellt. Von größter technischer Bedeutung ist das statistisch methylierte β -CD (RAMEB). Die Methylierung der Hydroxylgruppen verhindert die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den OH-Gruppen des CD, wodurch die Wasserlöslichkeit erhöht wird.

Die Synthese monofunktionaler CD-Derivate erfordert den Einsatz regioselektiver Reagenzien und eine optimale Reaktionsführung. Die einzelnen Hydroxylgruppen der Glucopyranoseeinheiten weisen unterschiedliche Reaktivitäten und pK_s Werte auf. So reagieren die primären, nach außen gerichteten OH-Gruppen bevorzugt mit sterisch anspruchsvollen Reagenzien, da sie am besten zugänglich sind. Die sekundäre OH-Gruppe am C2-Atom weist dagegen den höchsten pK_s-Wert von 12,2 auf, und kann unter Wasserausschluss selektiv deprotoniert und mit elektrophilen Reagenzien umgesetzt werden.^[110,111] Die Hydroxygruppe am C3-Atom ist so unreaktiv, dass sie nur durch Schutzgruppenchemie an C2-OH und C6-OH selektiv umgesetzt werden kann.^[112]

Die am besten untersuchten Reaktionen an CDs sind der elektrophile Angriff auf die Hydroxylgruppen und die nukleophile Spaltung einer C-O-Bindung durch die vorherige

Aktivierung mit einem elektronenziehenden Rest, wie z.B. einem Tosylat.^[113] β -CD wird bei der Reaktion in Natronlauge mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid bevorzugt an der primären Hydroxylgruppe substituiert, da der aromatische Ring des *p*-Toluolsulfonsäurechlorids mit dem β -CD-Molekül ein Komplex bildet. Die Komplexierung verhindert, dass sich weitere mögliche Reaktionspartner am β -CD-Molekül nähern. Ausgehend von diesem Tosyl- β -CD-Vorläufer werden zahlreiche weitere monofunktionalisierte β -CD-Derivate synthetisiert, darunter β -CD-Monomere, die polymerisationsfähige Funktionen tragen.^[114] Berücksichtigt man die Vielseitigkeit der CDs, liegt die Kombination von CDs mit biokompatiblen Polymeren nahe. Durch Verknüpfung der Eigenschaften beider Komponenten können bestehende Systeme weiterentwickelt und verbessert werden, um hochfunktionale Materialien herzustellen.

CD-Polymere können über zwei Strategien synthetisiert werden. Entweder über eine Homo- bzw. Copolymerisation von definierten monofunktionalisierten CD-Monomeren, oder über polymeranaloge Reaktionen, bei denen die CD-Moleküle nachträglich kovalent an das Polymer angeknüpft werden. Um CD-Polymere über eine klassische Polymerisation erhalten zu können, ist eine saubere Monofunktionalisierung der CDs unabdingbar. Ein weiteres β -CD-Derivat, das häufig verwendet wird und ebenfalls auf β -CD-Tosylat basiert, ist das Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -cyclodextrin (β -CD-N₃). Es kann in hohen Ausbeuten und in großer Reinheit isoliert und in einer hoch effizienten CuAAC mit Alkynyl-Komponenten umgesetzt werden.^[114]

1.3.3. Magnetit-Nanopartikel für die Wirkstoffpositionierung

Ein Bereich der Nanotechnologie, der in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen hat, ist die sogenannte Nanomedizin, in der nanotechnologische Produkte, wie z.B. Nanopartikel, für biologische und medizinische Anwendungen genutzt werden. In den medizinischen Anwendungen werden von vielen Experten zukunftsweisende und revolutionäre Fortschritte in Therapie und Diagnostik erwartet.^[115,116]

Die Eisenoxide Magnetit Fe₃O₄ und Maghemit γ -Fe₂O₃ sind die am häufigsten eingesetzten Materialien für die biomedizinische Anwendung von Nanopartikeln.^[117] Sie zeichnen sich durch hohe Bioverträglichkeit aus.^[118]

In der Literatur wird eine Vielzahl an Synthesewegen zu magnetischen Nanopartikeln aus Magnetit oder Maghemit beschrieben. Darunter befinden sich die thermische Zersetzung, die

Photothermal-Synthese, die Laserpyrolyse, elektrochemische Methoden, Polyol-Methoden, Sol-Gel-Reaktionen, Mizellare Synthesen, die biosynthetische Herstellung mittels Magnetosomen sowie das Mitfällungs-Verfahren.^[119–121] Im Folgenden wird das Verfahren der thermischen Zersetzung näher erläutert, da mit der Hilfe dieses Verfahrens einheitliche MNPs erhalten werden.

Durch die thermische Zersetzung ist in wässrigen Medien die Herstellung von qualitativ hochwertigen halbleitenden Nanokristallen und Oxiden möglich.^[122,123] Dementsprechend wurden verschiedene Verfahren für die Herstellung magnetischer Nanopartikel entwickelt. Das Prinzip der Methode ist die thermische Zersetzung von Vorläuferverbindungen, wie z.B. von Eisenpentacarbonyl ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) oder Eisenacetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), in Anwesenheit von (tensidischen) Stabilisatoren wie Fettsäuren, langkettigen Aminen oder Thiolen, in hochsiedenden Lösungsmitteln.^[124–126] Hierbei werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen das sogenannte „Hot-Injection“-Verfahren, bei dem der kalte Vorläufer schnell in die bereits heiße Lösung mit den Stabilisatoren injiziert wird. Durch diese Methode soll bei der Injektion in das heiße Medium ein spontaner und schneller Nukleierungsprozess erzeugt werden, dem eine homogene Wachstumsphase angeschlossen ist, sodass eine enge Größenverteilung erreicht wird.^[123] Zum anderen kann das Reaktionsgemisch mit allen beteiligten Reaktionspartnern langsam aufgeheizt werden. Hierbei bilden sich zunächst Keime, deren Konzentration mit steigender Temperatur immer größer wird. Bei niedriger Temperatur ist kein Wachstum zu beobachten, bis ab einer bestimmten Temperatur simultan ein homogener Wachstumsprozess zu Nanopartikeln mit einer engen Größenverteilung einsetzt.^[127]

Magnetische nanoskalige Partikel zeigen aufgrund ihrer geringen Größe zum Teil neue magnetische Eigenschaften, die für makroskopische Materialien nicht beobachtet werden.^[128]

Die magnetische Wechselwirkung zwischen den Nanopartikeln ist klein, da die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit dem Radius r über r^6 verknüpft sind.^[129] Für die Nanopartikelgetragene Wirkstoffpositionierung und die entsprechende Freisetzung spielen magnetische Partikel eine besondere Rolle, da die Positionierung und Beeinflussung der Nano-Objekte über magnetische Felder kontaktlos steuerbar sein soll.

Als magnetische Trägermaterialien können besonders polymerumhüllte Eisenoxid-Nanopartikel verwendet werden. Die Polymerhülle dient dabei nicht nur zur Stabilisierung gegen Agglomeration, sondern kann auch zur reversiblen Anbindung eines Wirkstoffes dienen.^[117] Die Voraussetzungen für effiziente Systeme liegen darin, dass während des

Transports möglichst kein Wirkstoff in die Umgebung freigesetzt wird, was idealerweise durch einen schnellen Transportprozess sowie starke Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Trägermaterial realisiert werden soll.^[121] Nach dem Erreichen des Zielortes soll hingegen eine möglichst effektive Freisetzung des Wirkstoffes erfolgen. Für eine solche Freisetzungsform können systembedingte Gegebenheiten, wie der pH-Wert-Unterschied zwischen Blut und dem Cytoplasma oder ein langsamer und kontinuierlicher (enzymatischer) Abbau der Polymer-Wirkstoff-Bindung, genutzt werden. Ein anderer, weiterführender Ansatz ist eine von außen schaltbare Freisetzung des Wirkstoffes. Dies ist für magnetische Systeme prinzipiell über das Anlegen hochfrequenter Wechselfelder und eine daraus resultierende intrinsische Erwärmung der Nanopartikel möglich, die die Spaltung einer thermolabilen Wirkstoffanbindung bewirken soll.^[130]

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in der *in vivo* Anwendung von MNPs gemacht werden. So konnten die effektive Positionierung und Freisetzung in einigen Tierversuchen gezeigt werden. Diese sind jedoch auf die Anwendung im menschlichen Körper nicht ohne weiteres zu übertragen, da die Dimensionen der magnetischen Felder bei kleinen Lebewesen wie Mäusen ausreichen, jedoch bei größerem Abstand im menschlichen Körper nicht genügen, um eine effektive Positionierung und Immobilisierung zu erreichen. Daher wird momentan versucht, die Verbesserung der magnetischen Felder bzw. der Verstärkung der Wechselwirkungen durch Implantierung makroskopischer magnetischer Körper wie Nadeln zu erreichen.^[117] Eine Verstärkung der magnetischen Wechselwirkungen ist durch eine Vergrößerung der Nanopartikel nur bedingt möglich, da diese an Limitationen durch das biologische System gebunden sind. Wenn diese Probleme behoben sind, werden sicherlich bald neue klinische Studien folgen, um in naher Zukunft die erste klinisch getestete Anwendung zu erreichen.

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Untersuchung von biokompatiblen Materialien, die zur Verpackung und zur kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen wie CO dienen können. Die Systeme sollen dabei aus unterschiedlichen Komponenten bestehen, die verschiedene Funktionen erfüllen. Als Modellwirkstoff dienen CO-freisetzende Moleküle, die unter Einfluss von Esterasen aktiviert werden (ET-CORMs). Sie werden für diese Arbeit von der Arbeitsgruppe (AG) *Prof. Dr. H.-G. Schmalz*, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

Eine Methode, die Wasserlöslichkeit, sowie die Bioverfügbarkeit der ET-CORMs zu erzielen, besteht in der möglichen Komplexierung durch Cyclodextrine. Anhand verschiedener Wirtsmoleküle soll diese Strategie geprüft werden. Darüber hinaus sollen die hergestellten Komplexe charakterisiert werden.

Als alternative Trägerkomponenten können biokompatible und wasserlösliche Polymere dienen, die eine bessere Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit gegenüber natürlichem Gewebe bewirken sollen. Dazu sollen verschiedene Strategien entwickelt und getestet werden. Der erfolgreiche Ansatz soll anschließend systematisch verfolgt werden.

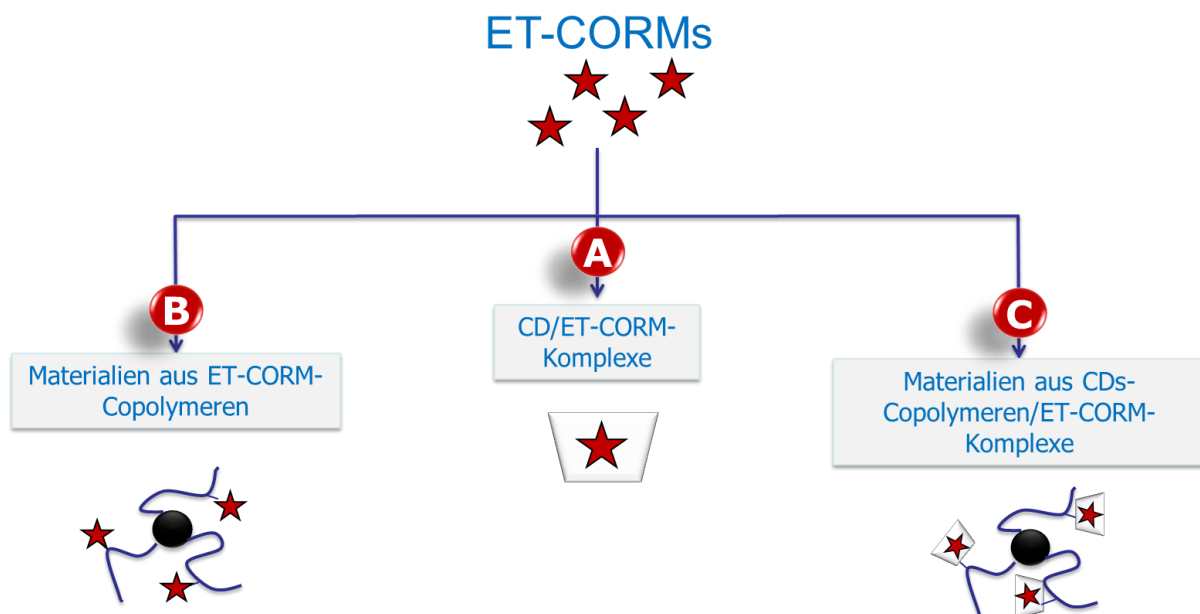
Die magnetische Nanopartikel stellen eine weitere Komponente in Trägersystemen dar. Dazu sollen Magnetit-Nanopartikel (MNPs) hergestellt werden, die eine Kern-Schale-Struktur aufweisen, wobei der Kern aus Magnetit und die Schale aus einer funktionellen hydrophilen Copolymerhülle bestehen soll.

Darüber hinaus sollen die in dieser Arbeit hergestellten ET-CORM-tragenden Materialien mit geeigneten analytischen Methoden untersucht werden, um Aussagen über ihre Zusammensetzung und ihr biomedizinisches Potential machen zu können.

3. Ergebnisse & Diskussion

3.1. Konzept

Die Entwicklung und Herstellung von biokompatiblen Materialien, die dazu konzipiert sind, CO zu transportieren und freizusetzen, ist das Ziel dieser Arbeit. Biokompatible Materialien, wie Makromoleküle und Nanopartikel (NPs) können als Träger, sowie als steuerbare Transportsysteme für Wirkstoffe dienen. Die CO-freisetzende Funktion wird von enzymatisch aktivierten CO-freisetzenden Molekülen (*Enzyme-Triggered Carbon Monoxide-Releasing Molecules*, ET-CORMs) erfüllt, die in Kombination mit den Makromolekülen und NPs transportfähige, Kohlenstoffmonoxid-freisetzende und bioverträgliche Systeme bilden (s. Schema 3.1). Die ET-CORMs werden von der AG Prof. Dr. H.-G. Schmalz aus der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt.



Schema 3.1. Modulares Konzept für die Herstellung von ET-CORM-Transportsystemen für biomedizinische Anwendungen.

Die Steigerung der Bioverfügbarkeit verschiedener ET-CORMs, die nicht an Copolymere kovalent gebunden werden können, wird durch die Komplexierung mit Cyclodextrinen gewährleistet.^[101] Hierbei werden geeignete Cyclodextrine für die ET-CORMs durch Komplexierungsexperimente ausgesucht (Schema 3.1, Syntheseroute A).

Die Herstellung der β -CD-funktionalen Copolymere erfolgt mittels ATRP.^[131,132] Als Comonomere werden Oligo(ethylenglycol)methacrylate E_x und Propargylmethacrylat (Ma) benutzt. Die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) erfolgt zwischen der Alkin-Gruppe der Propargyl-Einheit des Copolymers und der Azido-Gruppe des geeigneten Cyclodextrins (Schema 3.1, Syntheseroute B).^[74] Wie bei den einfachen Cyclodextrinen werden auch bei den Cyclodextrin-funktionalen Copolymeren Komplexierungsversuche mit den ET-CORMs durchgeführt.

Für die Realisierung eines magnetisch schaltbaren ET-CORM-Freisetzungssystem werden magnetische Nanopartikel (MNPs) mit einer Cyclodextrin-funktionalen Copolymer-Hülle hergestellt. Die auf diese Weise synthetisierten MNPs werden für die Komplexbildung zwischen der Cyclodextrin-Einheit des Copolymers und der ET-CORMs verwendet (Schema 3.1, Syntheseroute B).

Die Synthese der ET-CORM-tragenden Copolymere erfolgt ebenfalls mittels ATRP.^[131,132] Als Comonomere werden Oligo(ethylenglycol)methacrylate E_x und ET-CORM-Monomere verwendet. Alternativ kann die Copolymerisation von Oligo(ethylenglycol)methacrylat E_x mit 3-Azidopropylmethacrylat erfolgen. Die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen den Azido-Gruppen der 3-Azidopropylmethacrylat-Einheit im Copolymer und der Alkin-Gruppe eines geeigneten ET-CORMs führt zur Entstehung einer kovalenten Bindung (Schema 3.1, Syntheseroute C).^[74,133]

Die Herstellung von MNPs, die das Copolymer mit dem kovalent gebundenen ET-CORM tragen sollen, kann durch eine Vier-Schritt-Synthese erfolgen. MNPs werden durch die thermische Zersetzung von Eisenacetylacetonat in Triethylenglycol hergestellt.^[134] Die Funktionalisierung der MNPs mit einem ATRP-Starter ermöglicht eine oberflächeninitiierte Copolymerisation mit geeigneten acrylatbasierten Comonomeren. Dabei können grundsätzlich die bereits oben beschriebenen Wege beschritten werden (Schema 3.1, Syntheseroute C).^[135]

Die Charakterisierung der CD/ET-CORM-Komplexe sowie der Copolymere erfolgt mittels NMR-spektroskopischer Methoden. Darüber hinaus werden die funktionellen Gruppen der Copolymere mit Hilfe der *Attenuated Total Reflection* Infrarotspektroskopie (ATR-IR) detektiert. Für die Bestimmung der Molmasse der Copolymere dient die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC).

Die Untersuchung der Copolymerhülle der MNPs kann nicht mit Hilfe der Standard-Polymeranalytik erfolgen, da die Polymerketten sich an die Oberfläche der MNPs irreversibel

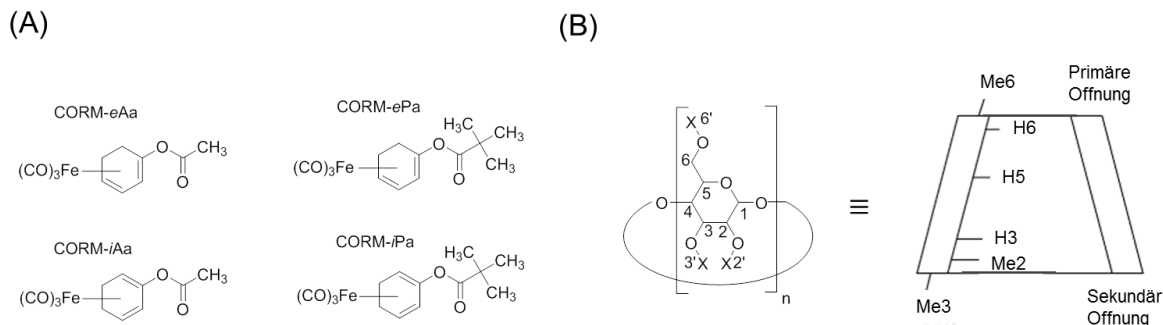
binden. Um die Zusammensetzung der MNPs charakterisieren zu können, wird mittels Elementaranalyse (EA) der organische Anteil der MNPs bestimmt. Zur Strukturaufklärung der Copolymer-Hülle kann die ATR-IR-Spektroskopie verwendet werden. Die Kerngröße der MNPs kann mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt werden. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ermöglicht die Aussage über den hydrodynamischen Durchmesser d_h der MNPs. Die magnetischen Eigenschaften der MNPs können mit Hilfe der *Vibrating Sample Magnetometry* (VSM) untersucht werden.

Anschließend werden für alle hergestellten biokompatiblen Materialien Zelltests durchgeführt, um eine Aussage über die mögliche Nutzung der Materialien als Pharmazeutika zu treffen. Die Zelltests werden von AG Prof. Dr. B. Yard an der V. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt.

3.2. Herstellung und Charakterisierung von Cyclodextrin/ET-CORM-Komplexen

Die schlechte Wasserlöslichkeit von ET-CORMs stellt ein Hindernis für die Entwicklung von biomedizinischen Applikationen und effizienteren Verabreichungsformen dar. Eine Möglichkeit die schlechte Wasserlöslichkeit zu verbessern, ist die Verwendung von Cyclodextrinen (CDs) als Wirt für die Komplexierung der ET-CORMs (Schema 3.2A und B).^[136,137] CDs sind zyklische Oligosaccharide,^[88,89] die bereits in der pharmazeutischen Chemie Anwendung finden (s. Abschnitt 1.3.2).^[105–108]

In Vorexperimenten wurden die Bildung und die Wasserlöslichkeit von Komplexen verschiedener ET-CORMs unter Verwendung von α -, β - und γ -CD, sowie methylierten β -CDs (DIMEB, TRIMEB und RAMEB) untersucht. Ausgewählte wässrige Mischungen der Verbindungen wurden anschließend mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und DOSY- und NOESY-Experimenten charakterisiert,^[100,101] um Informationen über die Stöchiometrie, Geometrie und Thermodynamik der Komplexierung zu erhalten. Basierend auf diesen Daten wurden Modelle der entsprechenden CD/ET-CORM-Komplexe vorgeschlagen.



Schema 3.2. (A) Chemische Struktur der komplexierten ET-CORMs mit CDs. (B) Allgemeine chemische Struktur der Cyclodextrine: α -CD ($n = 6$), β -CD ($n = 7$), γ -CD ($n = 8$). Bei DIMEB ($n = 7$) werden Hydroxylgruppen an der C2- und C6-Stellung mit Methoxy-Gruppen substituiert, während bei TRIMEB ($n = 7$) alle Hydroxylgruppen mit Methoxy-Gruppen substituiert werden. Bei RAMEB ($n = 7$) wird ein Teil der Hydroxylgruppen an der C2- und C6-Stellung mit Methoxy-Gruppen substituiert.

3.2.1. Komplexierungsexperimente

Vorexperimente mit ET-CORMs und CDs haben gezeigt, dass die Überführung der ET-CORMs in eine wässrige Phase nicht durch einfaches Mischen einer äquimolaren Menge an

CD und einem ET-CORM stattfindet. Am Beispiel des CORM-*e*Pa soll gezeigt werden, wie CD/ET-CORM-Komplexe hergestellt werden können. Das CORM-*e*Pa wurde hierfür in Wasser mit α -, β - oder γ -CDs gelöst. 50 mg der jeweiligen CDs wurden in Wasser mit einer äquimolaren Menge an CORM-*e*Pa gemischt. Das CORM-*e*Pa konnte dadurch nicht in die wässrige Phase überführt werden. Bei einem Überschuss an den CDs konnte das CORM-*e*Pa ebenfalls nicht in eine wässrige Phase überführt werden. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn das CORM-*e*Pa mit den methylierten CDs in Wasser vermischt wurde. Erst eine Ultraschallbad-Behandlung der wässrigen Mischung vom CORM-*e*Pa und den methylierten CDs resultierte in einer Überführung des CORM-*e*Pa in eine wässrige Phase. Im Falle des RAMEB/CORM-*e*Pa-Komplex war ein Überschuss an mindestens fünf RAMEB-Molekülen zu einem CORM-*e*Pa-Molekül notwendig, um eine klare wässrige Lösung dieser Mischung zu erhalten.

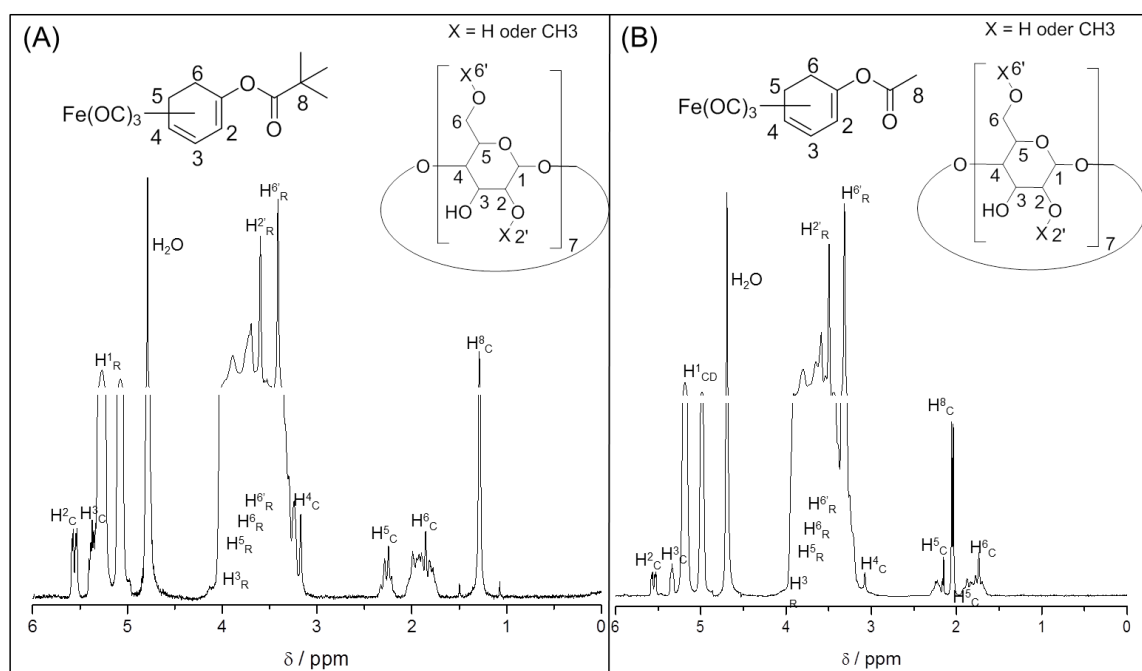


Abbildung 3.1. 600 MHz ^1H -NMR-Spektren der Wasserlösungen, (A) die 42,5 mM RAMEB und 7,5 mM CORM-*e*Pa und (B) 40,0 mM RAMEB und 10 mM CORM-*e*Aa enthalten. Aufnahme in D_2O bei 25 °C.

Um die Menge der ET-CORMs, die in eine wässrige Phase mit Hilfe der verschiedenen CDs überführt werden konnten, zu quantifizieren, wurden wässrige Mischungen in 1 ml D_2O aus ET-CORMs und CDs (Schema 3.2) mit unterschiedlicher Zusammensetzung und nach der oben genannten Methoden vorbereitet. Die Gesamtstoffmenge an ET-CORMs und CDs in der

Mischung wurde hierbei bei 50 μmol konstant gehalten. Die CD/ET-CORM-Mischungen wurden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht. Aus den ^1H -Signalen der freien CDs, der ET-CORMs und der Komplexe ist ersichtlich, dass das Komplextionsgleichgewicht zwischen Wirt und Gast eine schnellere Austauschrate verglichen zur NMR-Zeit-Skala aufweist.

Das molare Verhältnis der ET-CORMs $\chi_{C,NMR}$ wurde aus den ^1H -NMR-Spektren berechnet. Die ^1H -NMR-Spektren, Abbildung 3.1A und B, zeigen die ^1H -Signale der resultierenden RAMEB/ET-CORM-Komplexe in D_2O bei 25 $^\circ\text{C}$. Aus der Auftragung von $\chi_{C,NMR}$ gegen das theoretische molare Verhältnis der ET-CORMs $\chi_{C,theo}$ kann der benötigte Überschuss an CDs, um die ET-CORMs im Wasser zu lösen, entnommen werden (Abbildung 3.2). Dabei stellt $\chi_{C,theo}$ das molare Verhältnis des ET-CORM, das bei der experimentelle Vorbereitung der Proben festgelegt wurde, dar. Im Falle, dass die angesetzte Menge an ET-CORM sich komplett in die wässrige Phase überführen ließe, würde das molare Verhältnis von ET-CORMs und CDs aus den Spektren dem eingesetzten Verhältnisse entsprechen. Die errechneten Daten aus den ^1H -NMR-Spektren sollen somit bei der Auftragung von $\chi_{C,NMR}$ gegen $\chi_{C,theo}$ eine Gerade mit der Steigung eins ergeben. Aus der Auswertung der Daten ist ersichtlich, dass abhängig von den jeweiligen CDs und ET-CORMs nur ein Teil der angesetzten Menge an ET-CORMs sich in die wässrige Phase überführen lässt. Die wässrige Lösung ist somit mit ET-CORMs gesättigt.

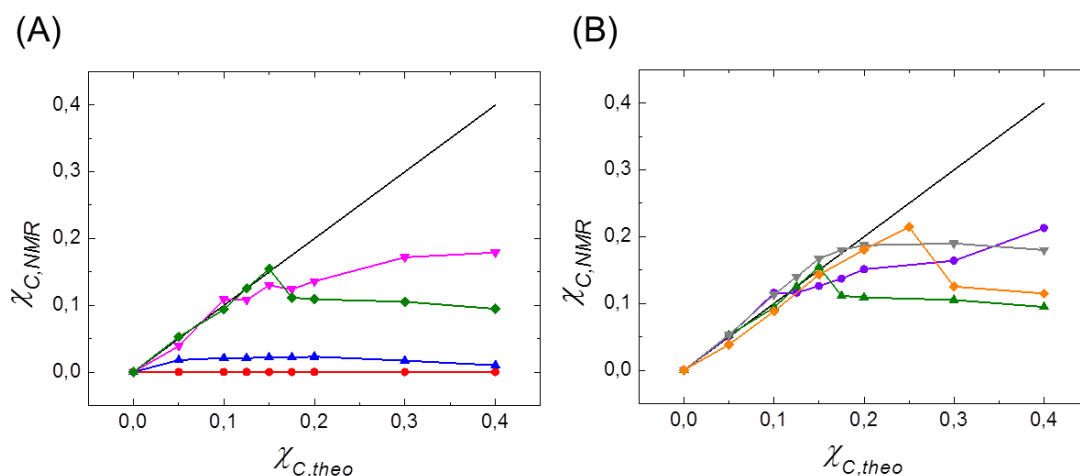


Abbildung 3.2. Auftragung des experimentellen molaren Anteils der ET-CORMs ($\chi_{C,NMR}$) gegen den theoretischen molaren Anteil ($\chi_{C,theo}$). $\chi_{C,NMR}$ wurde aus den Intensitäten der ^1H -NMR-Spektren der CD/ET-CORM-Mischungen erhalten (A) Daten von CORM-ePa mit β -CD und verschiedenen methylierten CDs. (B) Daten von verschiedenen ET-CORMs mit RAMEB. (schwarz) $\chi_{C,theo}$; (rot) β -CD/CORM-ePa; (blau) TRIMEB/CORM-ePa; (rosa) DIMEB/CORM-ePa; (grün) RAMEB/CORM-ePa; (violett) RAMEB/CORM-iPa; (grau) RAMEB/CORM-iAa; (orange) RAMEB/CORM-eAa.

In Abbildung 3.2A wird das molare Verhältnis des CORM-*ePa* mit vier unterschiedlichen CDs dargestellt. Die wässrigen Lösungen von α -, β - und γ -CD sind nicht in der Lage das CORM-*ePa* zu lösen. Es ist anzumerken, dass bei der Analyse der ^1H -NMR-Spektren der jeweiligen Wasserlösung von α - β - und γ -CDs und CORM-*ePa* keine ^1H -Signale des ET-CORM detektiert werden konnten. RAMEB stellt sich als das beste CD dar, um das CORM-*ePa* in die wässrige Phase zu überführen. Abbildung 3.2B zeigt die Auftragung von wässrigen Lösungen mit RAMEB, sowie vier unterschiedlichen ET-CORMs. Mischungen aus RAMEB/CORM-*iAa* und CORM-*eAa* zeigen eine höhere Wasserlöslichkeit als die RAMEB/CORM-*iPa*- und -*ePa*-Mischungen. Die Kurven der RAMEB/CORM-*ePa*- und CORM-*eAa*-Mischungen erreichen ihr Sättigung jeweils bei $\chi_{C,theo}$ von 0,15 und 0,20. Die Beobachtungen der wässrigen Lösungen zeigen, dass das CORM-*ePa* und die nativen CDs in Anwesenheit des ET-CORM ausfallen. Der Grund dafür könnte die starke Hydrophobizität des CORM-*ePa* und die geringe Wasserlöslichkeit von β -CD sein. Im Gegensatz besitzen α - und γ -CDs eine leichte höhere Wasserlöslichkeit als β -CD.^[138] Nichtsdestotrotz wurde bei diesen wässrigen Lösungen ein identisches Verhalten wie bei der β -CD/CORM-*ePa*-wässrigen Lösung beobachtet. Das CORM-*ePa* senkt bei der Komplexbildung mit den nativen CDs die Wasserlöslichkeit des Komplexes. Im Gegensatz zu den Komplexen aus nativen CDs sind RAMEB/CORM-*ePa*-Komplexe wasserlöslich.^[139] DIMEB unterstützt die Lösung des CORM-*ePa*, jedoch ist es teuer in der Anschaffung und folglich nicht für künftige biomedizinische Anwendungen relevant. Alle weiteren Komplexbildungsuntersuchungen wurden daher mit RAMEB durchgeführt.

3.2.2. 2D-NMR-Untersuchungen

Die Komplexe von RAMEB mit den ET-CORMs CORM-*ePa* und -*eA* weisen im Gegensatz zu deren jeweiligen Isomeren (CORM-*iPa* und -*iAa*) eine höhere Wasserlöslichkeit auf. Daher wurden sie für 2D-NMR-Untersuchungen verwendet.

Das ^1H -NMR-Spektrum von RAMEB weist ein breites ^1H -Signal zwischen 3,0-4,0 ppm auf (Abbildung 7.9). Daher ist es schwierig, die ^1H -Signale von RAMEB den einzelnen Protonen zuzuordnen, was eine detaillierte Analyse der NOESY-Experimente erschwert. Um die ^1H -Signale zu den jeweiligen RAMEB-Protonen zuzuordnen und die genaue chemische Verschiebung zu bestimmen, wurde ein NMR-Spektrum von RAMEB anhand des HMQC- (*Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) Verfahrens aufgenommen.^[100,140,141] Wie in

Abbildung 3.3 gezeigt wird, ist es mit dem HMQC-Verfahren möglich, die Zuordnung des breiten ^1H -Signals durch H,C-Korrelation ($^1J_{\text{CH}}$) zu verbessern. Aus der Untersuchung des ^1H -NMR-Spektrums wurde außerdem ermittelt (Abbildung 7.9), dass ein RAMEB-Molekül neun Methyl-Gruppen besitzt. Nur die OH-Gruppen an der C(2)- und C(6)- Position der jeweiligen Glucose-Einheiten sind methyliert.

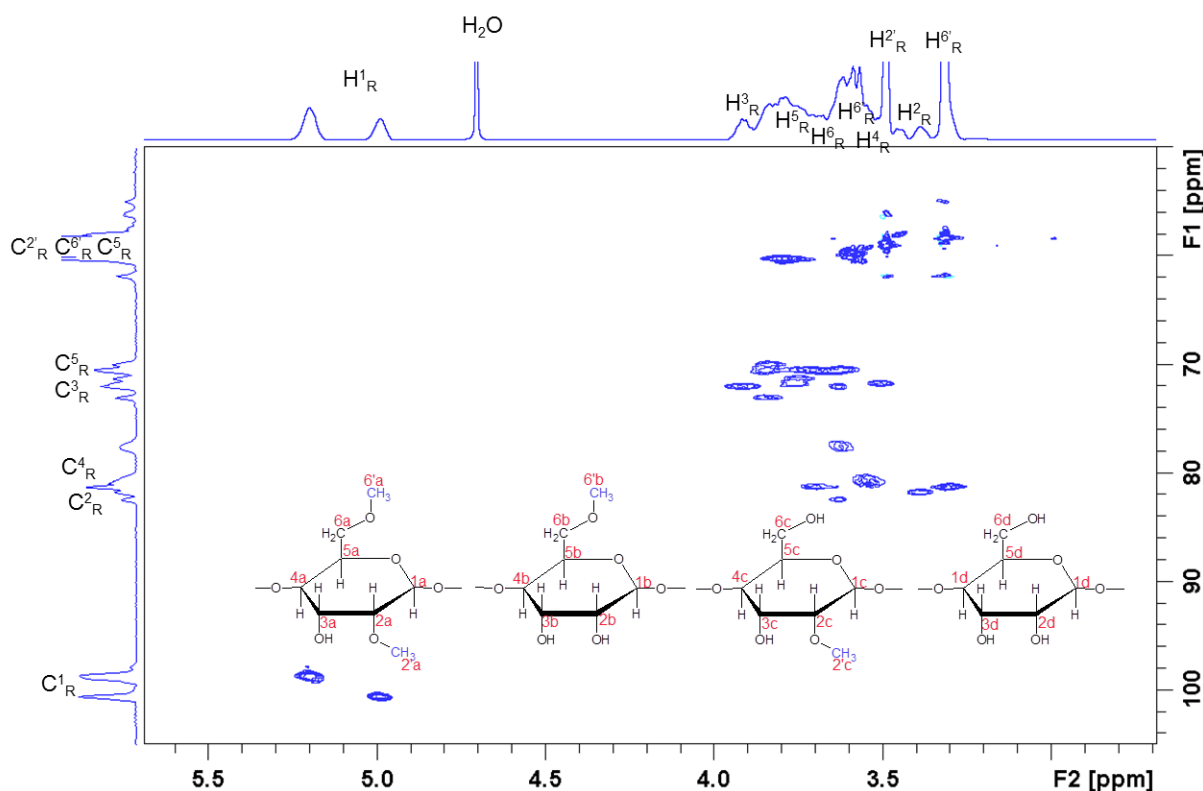


Abbildung 3.3. 600 MHz HMQC-NMR-Spektrum von RAMEB bei 25 °C in D_2O . Alle Möglichkeiten der Methylierung der OH-Gruppen an C2- und C6-Stellen werden in der Haworth-Projektion angegeben.

Das DOSY- (*Diffusion-Ordered Spectroscopy*) Verfahren erlaubt es, die translatorische Selbstdiffusion von Molekülen in der Lösung zu ermitteln. 2D-DOSY-NMR ist ein zweidimensionales NMR-Experiment: Eine Dimension stellt die konventionelle chemische Verschiebung und die andere die Diffusionskoeffizienten D der Moleküle, basierend auf den *Pulsed Field Gradient (PGF) Stimulated Spin-Echo (STE)* Experimenten, in der Lösung dar.^[142] NMR-Spektren von unterschiedlichen Komponenten der Lösung können somit in Abhängigkeit von ihren Diffusionskoeffizienten D aufgelöst werden. Abbildung 3.4A und B zeigen jeweils die 2D-DOSY der RAMEB/CORM-*ePa*- und -*eAa*-Komplexe (Tabelle 3.1).

Der hydrodynamische Radius R_h wurden mit Hilfe der *Stokes-Einstein*-Gleichung für freies und komplexgebundenes RAMEB berechnet (Gleichung 3.1).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

wobei T die absolute Temperatur ist, k_B die *Boltzmann*-Konstante und η die Viskosität des Lösungsmittels. Die berechneten hydrodynamischen Radien R_h für die RAMEB/CORM-*ePa*- und -*eAa*-Komplexe sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

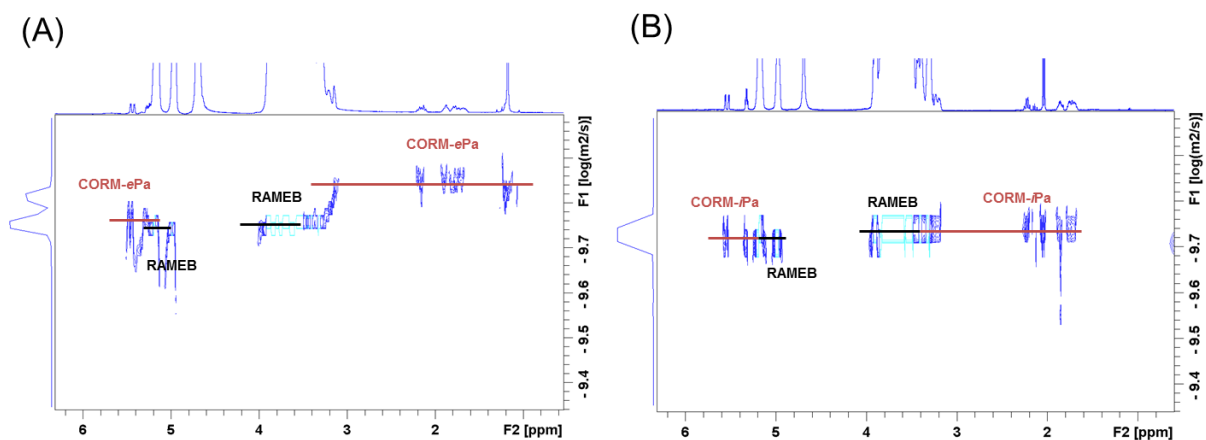


Abbildung 3.4. 500 MHz 2D-DOSY-Spektren der RAMEB/ET-CORM-Komplexe in D_2O bei 25 °C. Chemische Verschiebung in ppm auf der x-Achse und logarithmierte Diffusionskoeffizienten in m^2/s auf der y-Achse. (A) RAMEB/CORM-*ePa*- und (B) RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex.

Die Diffusionskoeffizienten D sollten für beide Moleküle (RAMEB und ET-CORM) gleich sein, wenn sie einen Komplex bilden. Das ist für den RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex der Fall, während sich für den RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex die Diffusionskoeffizienten D leicht voneinander unterscheiden (Tabelle 3.1). Dabei konnten die Diffusionskoeffizienten D der freien ET-CORMs nicht bestimmt werden, da die untersuchten ET-CORMs nicht in Wasser löslich sind. Die 2D-DOSY-Experimente zeigen einen höheren Diffusionskoeffizienten D für das freie RAMEB als für den RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex, während D des freien RAMEB dem des RAMEB/CORM-*eAa*-Komplexes gleicht. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass entweder für den RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex D abhängig von der Raumrichtung ist, oder die Wasserlöslichkeit des RAMEB im Komplex niedriger ist. R_h ist für das freie RAMEB niedriger als für das komplexierte RAMEB mit CORM-*ePa*. Dies deutet daraufhin, dass der RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex aus mehr als einem RAMEB-Molekül gebildet wurde,

während beim RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex das komplexierte RAMEB den gleichen hydrodynamischen Radius R_h wie das freie RAMEB besitzt. Dies bedeutet, dass der RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex ein 1:1 Komplex sein konnte.

Tabelle 3.1. Diffusionskoeffizient D und hydrodynamischer Radius R_h für die RAMEB/CORM-*ePa*- und RAMEB/CORM-*eAa*-Komplexe in D_2O bei 25 °C.

Substanz	$D / \text{m}^2\text{s}^{-1}$	R_h / nm	Substanz	$D / \text{m}^2\text{s}^{-1}$	R_h / nm
RAMEB _{frei}	$1,83 \cdot 10^{-10}$	1,34	RAMEB _{frei}	$1,83 \cdot 10^{-10}$	1,34
RAMEB _{Komplex}	$1,79 \cdot 10^{-10}$	1,37	RAMEB _{Komplex}	$1,83 \cdot 10^{-10}$	1,34
CORM- <i>ePa</i> _{frei}	0	-	CORM- <i>eAa</i> _{frei}	0	-
CORM- <i>ePa</i> _{Komplex}	$1,38 \cdot 10^{-10}$	1,78	CORM- <i>eAa</i> _{Komplex}	$1,83 \cdot 10^{-10}$	1,34

2D-NOESY- (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) und ROESY- (*Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*) Experimente wurden in der Forschung angewendet, um aus CD-Einschlussverbindungen detaillierte strukturelle Informationen über die Dynamik und die mittleren intermolekularen Abstände zwischen Protonen zu erfahren.^[143,144] NOESY- und ROESY-NMR-Techniken basieren auf dem Nuclear Overhauser Effekt (NOE), bei dem die räumlichen Interaktionen zwischen Protonen, falls deren intermolekulare Abstände kleiner als 0,4 nm sind, detektiert werden. Die Intensitäten der intermolekularen *Cross-Peaks* sind im Vergleich zu den typischen COSY-Signalen von geringer Intensität. Die Schlussfolgerung aus der Analyse der 2D-NOESY und ROESY sind meistens qualitativer Natur. Die erhaltenen Daten aus den NOESY- und ROESY-Experimenten sind sehr ähnlich.^[140] Bei unseren Untersuchungen wurden beide NMR-Techniken angewendet, um die Komplexe zu analysieren, da das RAMEB-Molekül eine Molmasse von 1310 g/mol besitzt. Bei der Analyse der 2D-NOESY- und ROESY-Experimente wurde festgestellt, dass beim 2D-NOESY-Experiment schärfere *Cross-Peaks* und weniger Artefakte vorhanden sind. Daher wurden in Abbildung 3.5 nur die 2D-NOESY-Spektren dargestellt und diskutiert.

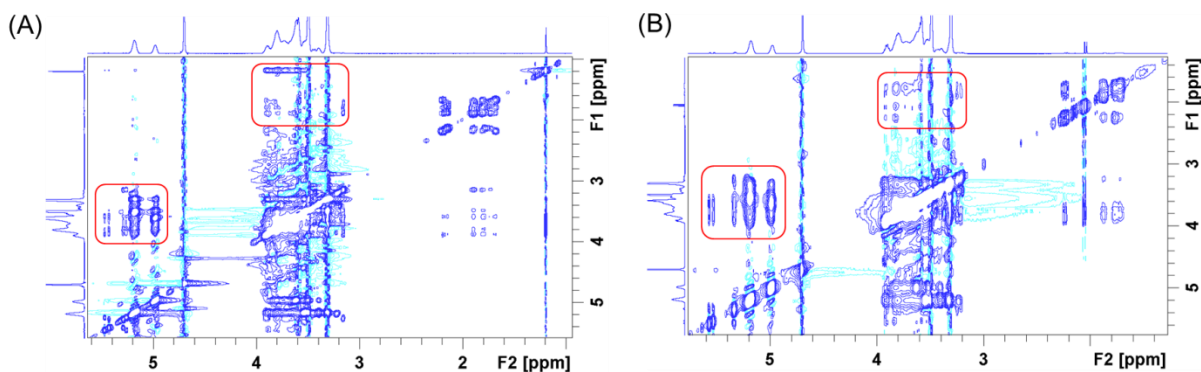


Abbildung 3.5. 600 MHz 2D-NOESY der RAMEB/ET-CORMs Formulierung in D_2O bei 25 °C bei einer Mischzeit von 0,3 s. (A) RAMEB/CORM-ePa- und (B) RAMEB/CORM-eAa-Komplex. Die roten Vierecke heben die Bereiche auf der linken Seite der Diagonale in den Spektren hervor, in denen NOE-Signale in den Spektren vorhanden sind.

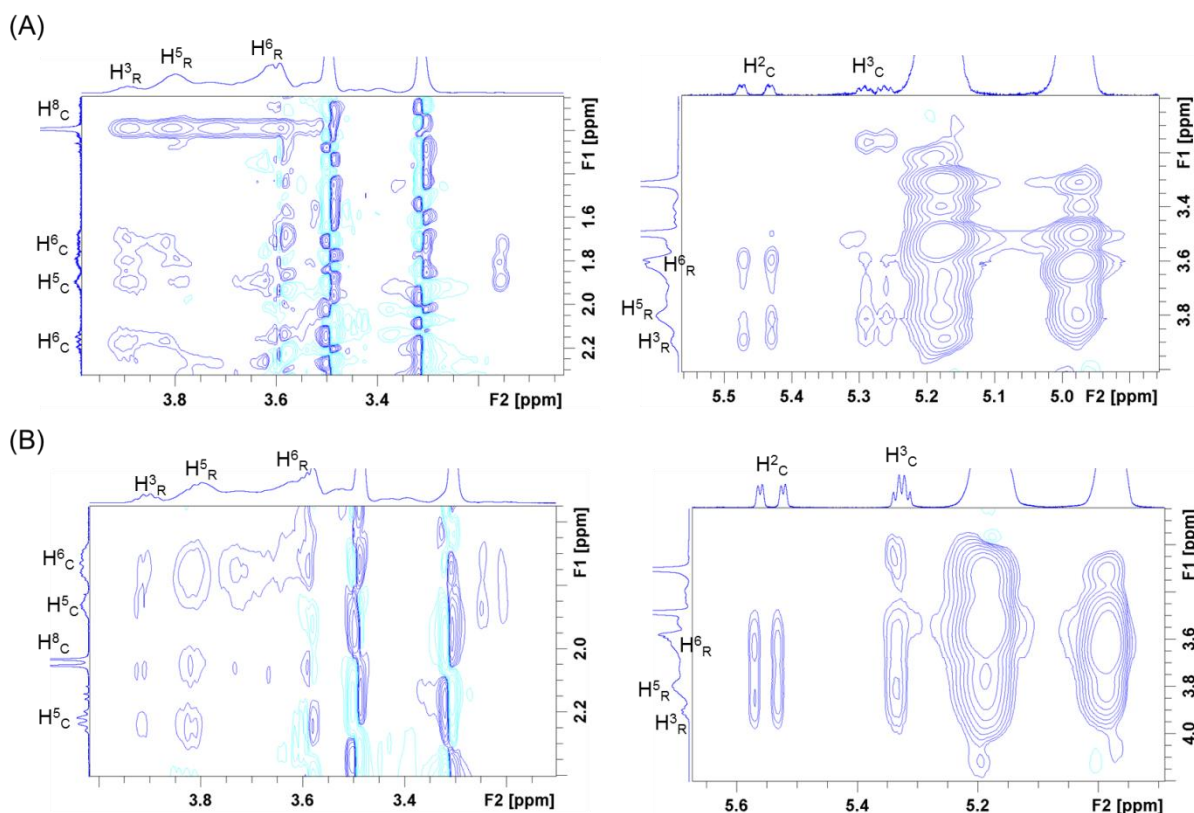


Abbildung 3.6. Vergrößerter Bereich der 600 MHz 2D-NOESY der RAMEB/ET-CORM-Komplexe zeigen intermolekulare Cross-Peaks der linken Seite der Diagonale. (A) RAMEB/CORM-ePa- und (B) RAMEB/CORM-eAa-Komplex.

Die 2D-NOESY-Experimente der RAMEB/CORM-ePa- (Abbildung 3.5A) und RAMEB/CORM-eAa-Komplexe (Abbildung 3.5B) in D_2O illustrieren die intermolekularen *Cross-Peaks* zwischen den Protonen der *tert*-Butyl-Gruppe (Pivalat) und des Cyclohexadien-Rings vom CORM-ePa und die Protonen in der RAMEB-Kavitat. Das 2D-Spektrum des

RAMEB/CORM-*eAa*-Komplexes zeigt einerseits *Cross-Peaks* zwischen den Protonen der Methyl-Gruppe (Acetat) und des Cyclohexadien-Rings von CORM-*eAa* und den Protonen der RAMEB-Kavität andererseits. Abbildung 3.6 stellt den vergrößerten Bereich der linken Seite der 2D-NOESY aus Abbildung 3.5 dar. Folgende Wechselwirkungen wurden zwischen den Protonen des Wirts und Gastes des RAMEB/CORM-*ePa*-Komplexes detektiert (Abbildung 3.6A). H^2_C wechselwirkt mit H^3_R und $H^{6'}_R$, H^3_C wechselwirkt mit H^5_R und H^6_R und H^5_C wechselwirkt mit H^3_R und H^5_R . H^6_C wechselwirkt mit H^5_R und H^6_R . H^8_C wechselwirkt mit allen Protonen der RAMEB-Kavität. Die Wechselwirkungen von H^4_C mit den Protonen von RAMEB wurden aufgrund der Artefakte nicht detektiert. Es konnte bewiesen werden, dass fast alle Protonen des CORM-*ePa* mit den Protonen der RAMEB-Kavität wechselwirken. Im Einklang mit den erzielten Ergebnissen aus den 2D-DOSY-Experimenten wird angenommen, dass RAMEB und CORM-*ePa* einen 2:1 Komplex bilden können.

Für den RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex wurden ähnliche Wechselwirkungen zwischen den Protonen von CORM-*eAa* und den Protonen der RAMEB-Kavität gefunden, wie beim RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex, auch wenn die Wechselwirkungen von H^2_C und H^6_C stärkere Interaktionen mit H^5_R statt mit H^3_R zeigen (Abbildung 3.6B). Der größte Unterschied im 2D-NOESY des RAMEB/CORM-*ePa*-Komplexes ist, dass H^8_C des RAMEB/CORM-*eAa*-Komplexes keine Interaktionen mit allen Protonen der RAMEB-Kavität, sondern nur mit H^3_R zeigt. Im Einverständnis mit den erzielten Ergebnissen aus den 2D-DOSY-Experimenten wird angenommen, dass der RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex einen 1:1 Komplex bilden kann.

Abbildung 3.7A und B stellen die vorgeschlagenen Modelle aus den 2D-NOESY-Untersuchungen der RAMEB/ET-CORM-Komplexe dar. Der RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex wird aus zwei RAMEB-Molekülen gebildet. In diesem Modell liegt das RAMEB-Molekül mit der engeren Seite auf der breiteren Seite des anderen RAMEB-Moleküls. Jedoch können auch die beiden breiteren Seiten der RAMEB-Moleküle aufeinander liegen, da aus dem 2D-NOESY des RAMEB/CORM-*ePa*-Komplexes keine räumliche Zuordnung der einzelnen H-Atome der *tert*-Butyl-Gruppe in der Kavität getroffen werden kann. Beim RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex liegt der Cyclohexadien-Ring des CORM-*eAa* in der engeren Seite des RAMEB-Moleküls.

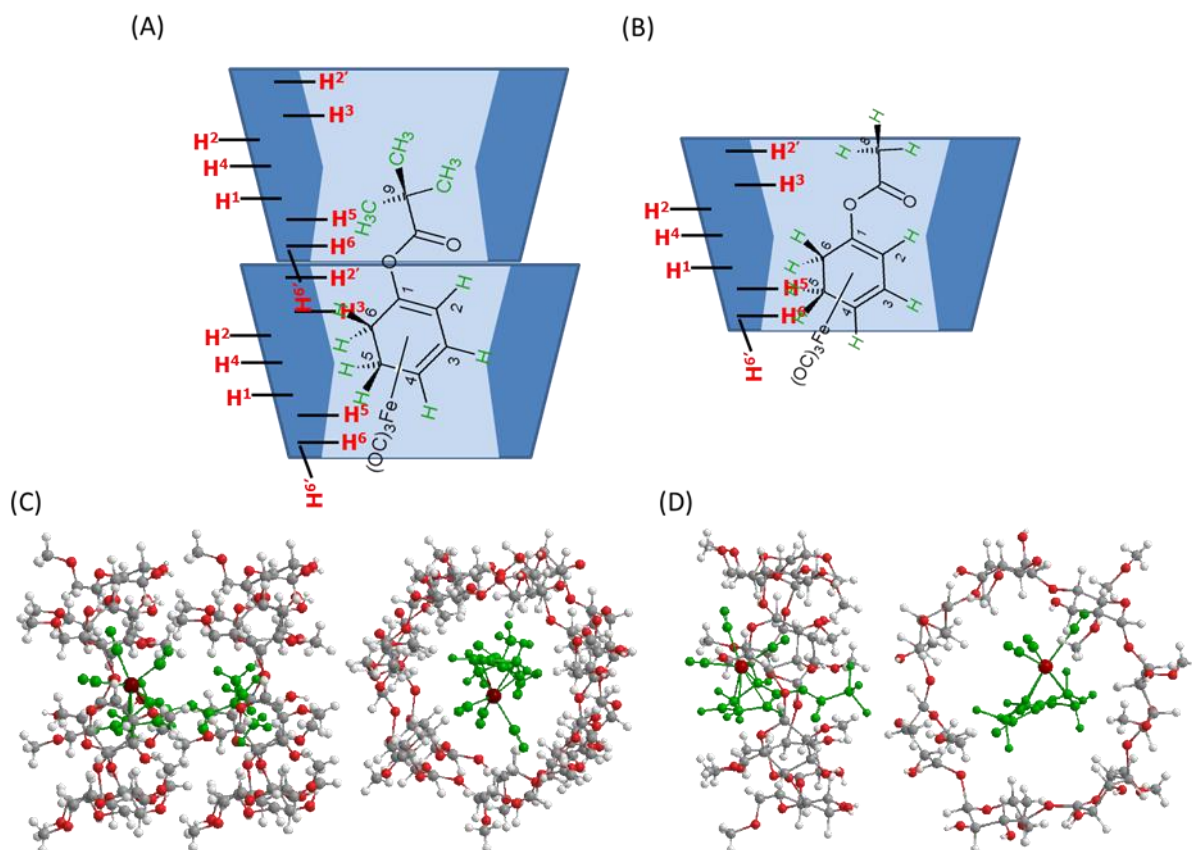
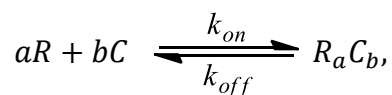


Abbildung 3.7. Vorgeslagene Strukturen der RAMEB/ET-CORM-Komplexe in D₂O. (A) Zwei Varianten der Komplexe von (A) RAMEB/CORM-ePa und (B) RAMEB/RAMEB/CORM-eAa.

3.2.3. Stöchiometrie- und K_A -Bestimmung der RAMEB/ET-CORM-Komplexe

Die wirkende Kraft zwischen Wirt- und Gast-Molekül bei der Bildung eines Komplexes ist ein wichtiger Parameter für die Beschreibung des Komplexes. Diese werden gewöhnlich in einer einzelnen Größe, die die Stabilität des Komplexes beschreibt, zusammengefasst. Dies ist die Stabilitätskonstante K_A . Die Stabilitätskonstante K_A kann als das Verhältnis der Bildungsgeschwindigkeit und Dissoziation des molekularen Komplexes beschrieben werden:



$$K_A = k_{on}/k_{off} \text{ und } K_D = k_{off}/k_{on},$$

Gleichung 3.2

wobei k_{on} und k_{off} jeweils die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion für die Bildung und Disaggregation des Komplexes sind.

Für die RAMEB/ET-CORMs-Komplexe gilt folgende Gleichung:

$$K_A = [R_a C_b] / [R]^a [C]^b \quad \text{Gleichung 3.3}$$

wobei $[R]^a$, $[C]^b$ und $[R_a C_b]$ jeweils die Konzentrationen von RAMEB, vom ET-CORMs und des Komplexes sind. a und b sind die Stöchiometriekoeffizienten der Reaktion.

Die Geschwindigkeit, bei welchem der Ligand an der Bindungsseite dockt, ist oft ein diffusionskontrollierter Vorgang. Die Dissoziationsrate wird primär von der Konzentration des gebundenen Gastes und der Kraft der Wechselwirkung während der Bindung determiniert. Die meiste Literatur, für die Ermittlung von K_A mittels NMR-Methoden, ist mit Systemen verknüpft, bei denen das Gast-Wirt-Gleichgewicht verglichen zu der NMR-Zeitskala eine sehr schnelle Austauschrate hat.^[100,145] Dies ist also auch der Fall für die RAMEB/ET-CORM-Komplexe.

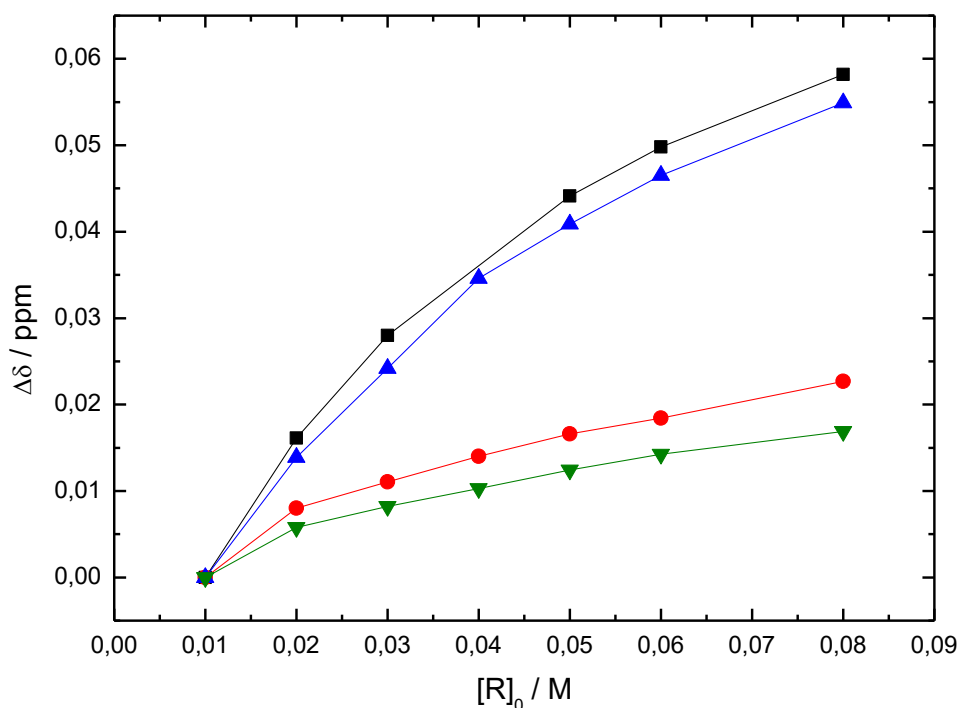


Abbildung 3.8. NMR-Bindungskurven der RAMEB/ET-CORM-Komplexe für eine wässrige Lösung aus 10 mM ET-CORMs (Gast) und RAMEB-Konzentrationen von 1 mM bis 80 mM bei 25 °C. Auftragung von $\Delta\delta$ gegen die Gesamtkonzentration von RAMEB $[R]_0$. $\Delta\delta$ wurde aus der Differenz der chemischen Verschiebung des Referenz- ^1H -Signals des freien RAMEB und der der chemischen Verschiebungen der ^1H -Signale bei der Komplexbildung errechnet. (schwarz) RAMEB/CORM-ePa; (rot) RAMEB/CORM-eAa; (blau) RAMEB/CORM-iPa; (grün) RAMEB/CORM-iAa.

Für die Bestimmung von K_A der RAMEB/ET-CORM-Komplexe wurden $^1\text{H-NMR}$ -Titrationsexperimente durchgeführt, wobei die Konzentration des Gastes (ET-CORM) in 1 ml D_2O konstant gehalten wurde und die des Wirtes nach jeder $^1\text{H-NMR}$ -Spektrumaufnahme gesteigert wurde. Abbildung 3.8 stellt die Bindungsisotherme für die Formation der RAMEB/ET-CORM-Komplexe dar. $[C]_0$ und $[R]_0$ sind jeweils die gesamte Konzentration des Wirtes und Gastes in der wässrigen Lösung. Die Verschiebung der ^1H -Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Wirt- und Gast-Mischung, die von der Gleichung 3.4 beschrieben wird, hängt von K_A und die Geschwindigkeit der Dissoziation ab. Bei einem schnelleren Austausch (wenn k_{off} größer ist als die chemische Verschiebungsdifferenz in der Frequenzeinheit) werden zeitgemittelte Spektren des Gastes oder Wirtes und des Komplexes beobachtet. Die Verschiebung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale sind dann die gewichteten Mittelwerte der Molenbrüche, die die freien und komplexierten Moleküle darstellen.^[145–147]

In Anlehnung an die Literatur können wir für die $^1\text{H-NMR}$ -Titration im Falle der RAMEB/ET-CORM-Komplexe folgende Abhängigkeit ableiten:^[146,147]

$$\Delta\delta = \delta_C - \delta_{\text{obs}} = ([R_a C_b]/[C]_0)(\delta_C - \delta_{RC}) = ([R_a C_b]/[C]_0)\Delta\delta_{\text{max}} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

wobei δ_C die chemische Verschiebung des ^1H -Signals der ET-CORM-Moleküle ist. δ_{obs} ist die beobachtete chemische Verschiebung des ^1H -Signals des ET-CORMs bei der Steigerung der RAMEB-Konzentration in der Lösung. δ_{RC} gibt die chemische Verschiebung des ^1H -Signals des RAMEB/ET-CORM-Komplexes an. Die graphischen Methoden zur Bestimmung der unbekannt Parameter K_A und δ_{RC} basieren auf der Annahme, dass entweder der Wirt oder der Gast in Überschuss in der Lösung vorhanden ist. Dadurch kann die Konzentration der freien Spezies mit ihrer Startkonzentration gleichgesetzt werden.^[146,147] Im vorliegenden Fall von RAMEB und der ET-CORMs gilt:

$$[R] = [R]_0 \text{ wenn } [R]_0 \gg [C]_0$$

Bei Arbeiten mit einem Überschuss an RAMEB kann eine Beziehung zwischen einer bekannten Menge (initiale Konzentration) und experimentellen Beobachtungen abgeleitet werden. Es ist anzumerken, dass bei der Auftragung $\chi_{C,NMR}$ gegen $\chi_{C,theo}$ in Abbildung 3.2 (Abschnitt 3.2.1) gezeigt wurde, dass ein Überschuss an RAMEB nötig ist, um die ET-CORMs vollständig in Wasser zu lösen. Auch bei der Vorbereitung der D_2O -Lösung für die NMR-Titrationsexperimente wurde beobachtet, dass ein Überschuss an RAMEB notwendig

ist, um eine klare Lösung zu erhalten. Daher können wir in diesem Fall die Gleichgewichtsreaktionsgleichung wie folgt beschreiben:



wobei a und b die Stöchiometrie-Koeffizienten der Reaktion sind. Daher gilt für die Stabilitätskonstante K_A Gleichung 3.5.

$$K_A = [R_aC_b]/[R]^a[C]^b \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Mit der Annahme, dass $b = 1$ ist, gilt

$$[C] = [C]_0 - [R_aC] \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Aus den Gleichungen 3.5 und 3.6 folgt

$$[R_aC]/[R]_0^a = -[R_aC]K_A + [C]_0K_A \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Aus den Gleichungen 3.4 und 3.7 wird Gleichung 3.8 abgeleitet. Die Vorgehensweise wird als *Scatchard*-Verfahren oder *x*-reziproke Auftragung bezeichnet.^[148]

$$\Delta\delta/[R]_0^a = -\Delta\delta \cdot K_A + \Delta\delta_{max} \cdot K_A \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Nach diesem Verfahren sollte eine Auftragung von $\Delta\delta/[R]_0^a$ gegen $\Delta\delta$ eine Gerade mit der Steigung $-K_A$ ergeben. Aus dem Schnittpunkt der y -Achse kann $\Delta\delta_{max}$ berechnet werden. Abbildung 3.9A und B stellen die *Scatchard*-Auftragungen der RAMEB/ET-CORM-Komplexe der dargestellten Daten aus Abbildung 3.8 dar. Es ist nur möglich gewesen, die erhaltenen Punkte aus den verschiedenen Messungen der Komplexe mit Gleichung 3.8 anzupassen, wenn angenommen wird, dass die RAMEB/CORM-*ePa*- und CORM-*iPa*-Komplexe 2:1 Komplexe bilden (d.h. $a = 2$ und $b = 1$), während die RAMEB/CORM-*eAa*- und CORM-*iAa*-Komplexe einen 1:1 Komplex bilden (d.h. $a = 1$ und $b = 1$). Das steht im Einklang mit den Ergebnissen aus den 2D-DOSY- und NOESY-Experimenten, in denen Hinweise dafür gefunden wurden, dass der RAMEB/CORM-*ePa*-Komplex größere molekulare Strukturen als der RAMEB/CORM-*eAa*-Komplex bildet.

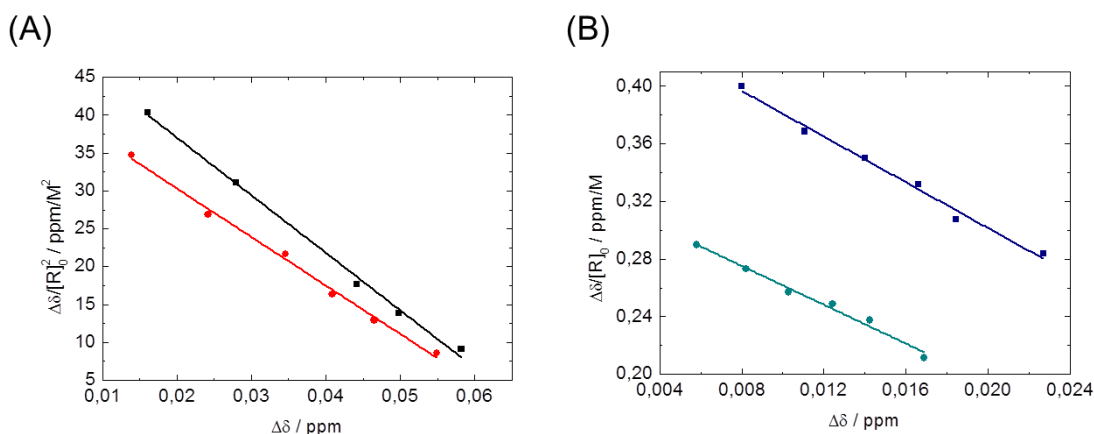


Abbildung 3.9. Scatchard-Auftragung der RAMEB/ET-CORM-Komplexe der dargestellten Daten aus Abbildung 3.8. (A) Auftragung von $\Delta\delta/[R]_0^2$ gegen $\Delta\delta$. (B) Auftragung von $\Delta\delta/[R]_0$ gegen $\Delta\delta$. (schwarz) RAMEB/CORM-ePa; (rot) RAMEB/CORM-iPa; (blau) RAMEB/CORM-eAa; (grün) RAMEB/CORM-iAa.

Nach Gleichung 3.8 wurde die Stabilitätskonstante K_A der Komplexe berechnet (Tabelle 3.2). Die freie Enthalpie ΔG° wurde aus der Gleichung 3.9 berechnet.

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln(K_A)$$

Gleichung 3.9

wobei R die Gaskonstante und T die Temperatur ist. Für die K_A -Werte der Komplexe gilt, je größer der Wert der Konstante ist, desto stabiler ist auch der Komplex. Das gilt natürlich nur, wenn die Konstanten überhaupt vergleichbar sind. Das ist dann gegeben, wenn es sich um die gleichen Liganden handelt oder wenn die Maßeinheiten gleich sind. Da die errechneten K_A -Werte für die RAMEB/CORM-eAa- und CORM-iAa-Komplexe die Maßeinheit von M^{-1} und die RAMEB/CORM-ePa- und CORM-CORM-iPa-Komplexe die Maßeinheit von M^{-2} besitzen, können mit Hilfe der K_A -Werten nur die RAMEB/CORM-ePa- und CORM-iPa-Komplexe oder die RAMEB/CORM-eAa- und CORM-iAa-Komplexe miteinander verglichen werden. Somit sind die RAMEB/CORM-ePa- und RAMEB/CORM-eAa-Komplexe stabiler als der Komplexe der jeweiligen Isomeren RAMEB/CORM-iPa- und RAMEB/CORM-iAa. Die ΔG° -Werte deuten darauf hin, dass die RAMEB/CORM-eAa- und CORM-iAa-Komplexe mit $-5,12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $-16,44 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ stabiler sind als die RAMEB/CORM-ePa- und RAMEB/CORM-iPa-Komplexe. Die negativen ΔG° -Werte deuten auf eine moderate bis hohe thermodynamische Stabilität hin.

Tabelle 3.2. Stabilitätskonstanten K_A , Maximum der chemischen Verschiebung $\Delta\delta_{max}$ und freie Enthalpie ΔG° der RAMEB/ET-CORMs-Komplexe bei 25 °C.

Komplex	$\Delta\delta_{max}$ / ppm	K_A	ΔG° / kJ·mol ⁻¹
RAMEB/CORM- <i>e</i> Aa	0,049 ±0,003	(7,9 ±0,4) M ⁻¹	-5,12 ±0,12
RAMEB/CORM- <i>i</i> Aa	0,058 ±0,003	(6,7 ±0,4) M ⁻¹	-4,71 ±0,15
RAMEB/CORM- <i>e</i> Pa	0,068 ±0,003	(759 ±28) M ⁻²	-16,44 ±0,09
RAMEB/CORM- <i>i</i> Pa	0,067 ±0,003	(640 ±21) M ⁻²	-16,02 ±0,08

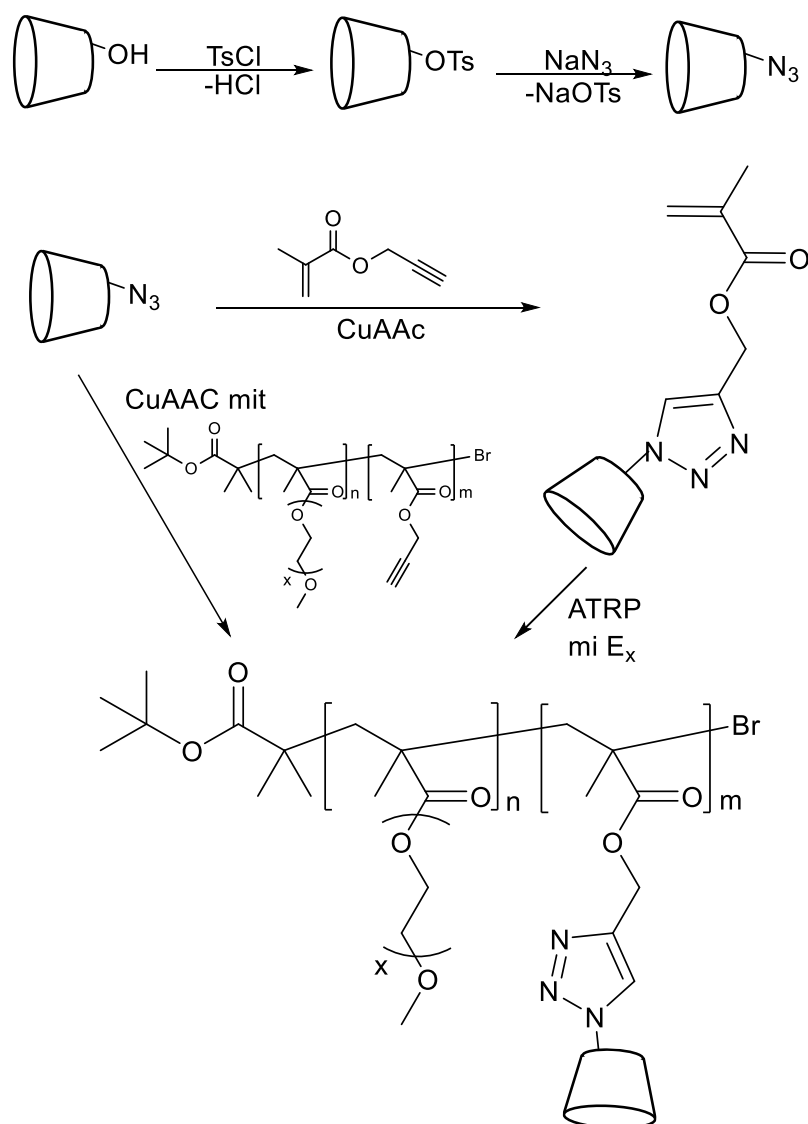
3.2.4. Zusammenfassung und Diskussion

In diesen Experimenten wurden verschiedene Cyclodextrine bezüglich ihrer Fähigkeit die ET-CORMs durch Komplexierung in die wässrige Phase zu überführen, untersucht. Nur die methylierten Cyclodextrine sind in der Lage die untersuchten ET-CORMs in die wässrige Phase zu überführen, was auf ihre hohe Wasserlöslichkeit zurückzuführen ist. Darüber hinaus haben die Komplexierungsexperimente gezeigt, dass ein Überschuss an methylierten Cyclodextrinen in der wässrigen Lösung notwendig ist, um die ET-CORMs zu lösen. Die Zuordnung der breiten und nicht aufgelösten ¹H-Signale des RAMEB im Bereich zwischen 4,0 und 3,3 ppm wurde mit dem HMQC-NMR-Spektrum aufgeklärt, was die genaue Zuordnung der Protonen zu ihrem jeweiligen C-Atome und Kopplungspartnern ermöglichte. Die 2D-DOSY- und NOESY-Experimente haben ergeben, dass der RAMEB/CORM-*e*Pa-Komplex größer ist als der RAMEB/CORM-*e*Aa-Komplex. Die 2D-NOESY-Experimente deuten auch darauf hin, dass der RAMEB/CORM-*e*Pa-Komplex einen 2:1 Komplex bildet, während RAMEB/CORM-*e*Aa-Komplex einen 1:1 Komplex bildet. Die ¹H-NMR-Titrationsexperimente haben die qualitativen Ergebnisse über die Stöchiometrie der Komplexe, die aus den 2D-DOSY- und 2D-NOESY-Experimenten erhalten wurden, bestätigt. Die RAMEB/CORM-*e*Aa- und CORM-*i*Aa-Komplexe sind stabiler als der RAMEB/CORM-*e*Pa- und RAMEB/CORM-*i*Pa-Komplexe. Somit wurde gezeigt, dass die Komplexbildung von schwer löslichen Gast-Molekülen in Wasser stattfindet, wenn die Löslichkeit groß und die Konzentration des Komplexbildners hoch ist. Im Falle der unlöslichen ET-CORMs könnten Komplexe gebildet werden, da RAMEB eine sehr hohe Wasserlöslichkeit aufweist. Darüber hinaus konnte durch den Überschuss an RAMEB das Gleichgewicht auf die rechte Seite der Reaktionsgleichung verschoben werden.

Zelltests der hergestellten RAMEB/ET-CORM-Komplexe wurden von der AG *Prof. Dr. B. Yard* an der V. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.6 dargestellt und diskutiert.

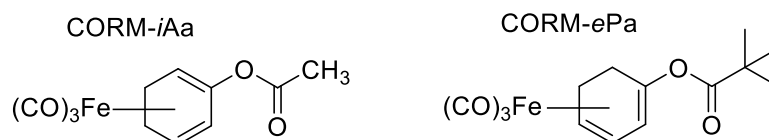
3.3. Synthese und Charakterisierung von β -Cyclodextrin-funktionalen Copolymeren

Das Ziel der Synthesen im folgenden Abschnitt ist es β -CD-funktionale Copolymere herzustellen. Dazu sind zwei Syntheserouten denkbar: Entweder wird ein β -CD-funktionales Monomer mittels Polymerisationsverfahren mit Oligo(ethylenglycol)methacrylat (E_x) copolymerisiert,^[149] oder nach der Copolymerisation von E_x mit Propargylmethacrylat (Ma) wird das Copolymer mittels CuAAC mit Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -CD (β -CD- N_3) modifiziert (Schema 3.3).



Schema 3.3. Mögliche Syntheserouten für die Herstellung von β -CD-funktionalen Biocopolymeren.

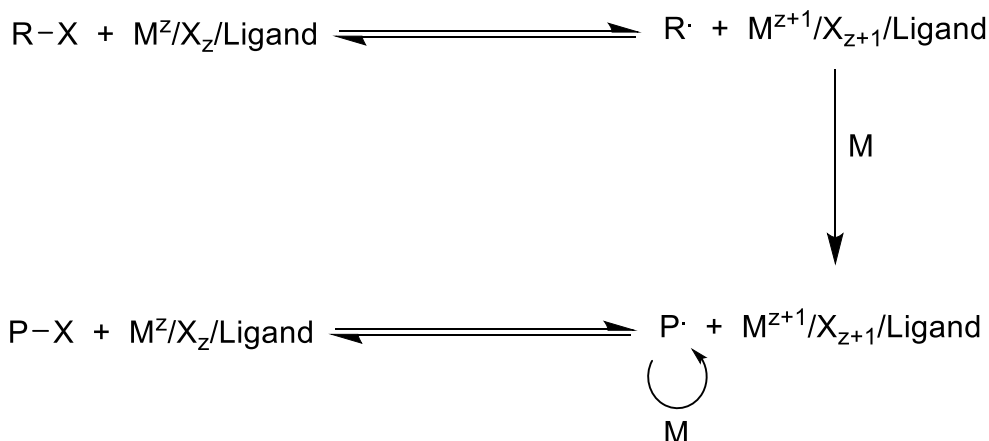
Als Startpunkt für die Synthese der β -CD-funktionalen Copolymere dient die Synthese von tosylierten β -CD.^[113] Dies kann mit Natriumazid (NaN_3) durch eine nukleophile Substitution zu (β -CD- N_3) umgewandelt werden. Mittels CuAAC kann nun β -CD- N_3 mit der Alkin-Gruppe von Propargylmethacrylat (Ma) zum Monomer (3-(6-desoxy)- β -Cyclodextrin-3H-1,2,3-triazol-4-yl)-methacrylat $\text{Ma}(\beta\text{-CD})$ umgesetzt werden. Das Monomer $\text{Ma}(\beta\text{-CD})$ kann anschließend mit den Monomeren E_x zu den gewünschten Copolymeren copolymerisiert werden.^[114] Alternativ ist es möglich, zuerst Ma mit E_x zu copolymerisieren und dann das vorläufige Copolymer $\text{PE}_x\text{Ma}_\chi$ über eine CuAAC mit β -CD- N_3 zu funktionalisieren. Da die direkte Copolymerisation von $\text{Ma}_\chi(\beta\text{-CD-}\text{N}_3)$ mit E_x schon hinreichend untersucht wurde,^[149] wird der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Möglichkeit der Postpolymerisationsmodifikation liegen. Das Ziel ist es, aus den hergestellten Copolymeren die $\text{PE}_x\text{Ma}_\chi(\beta\text{-CD/ET-CORM})$ -Komplexe zu bilden. Dafür wurden das CORM-*i*Aa und das CORM-*e*Pa ausgewählt (Schema 3.4).



Schema 3.4. Molekulare Struktur der ausgewählten ET-CORMs für die Komplexbildung mit dem Copolymer $\text{PE}_x\text{Ma}_\chi(\beta\text{-CD})$.

3.3.1. Synthese und Charakterisierung der Copolymere aus E_x und Propargylmethacrylat

Die Copolymere wurden mittels ATRP hergestellt (Schema 3.5). Als Katalysator wurde CuBr eingesetzt, das mit 2 Äquivalenten Bpy komplexiert wurde. Der benutzte Starter ist *tert*-Butyl-2-Bromisobutyrate und wird mit *t*BBriB abgekürzt. Als E_x -Monomere wurden entweder 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat (E_2), 2-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)-ethylmethacrylat (E_3) oder 2-Methoxyoligo(ethylenglycol)methacrylat ($\text{E}_{4,5}$) verwendet, die in verschiedenen Verhältnissen mit Ma copolymerisiert wurden. Die Copolymerisation wurde bei Raumtemperatur in DMSO durchgeführt. Die Copolymere wurden in Diethylether ausgefällt, ebenfalls mit Diethylether gewaschen und über eine Aluminiumoxidsäule vom Kupfer getrennt. Die Copolymere wurden mittels IR- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht.



Schema 3.5. Schematische Darstellung einer ATRP. R = organischer Rest, X = Halogen, M^z und M^{z+1} = Metall, M = Monomer, P = Polymer.

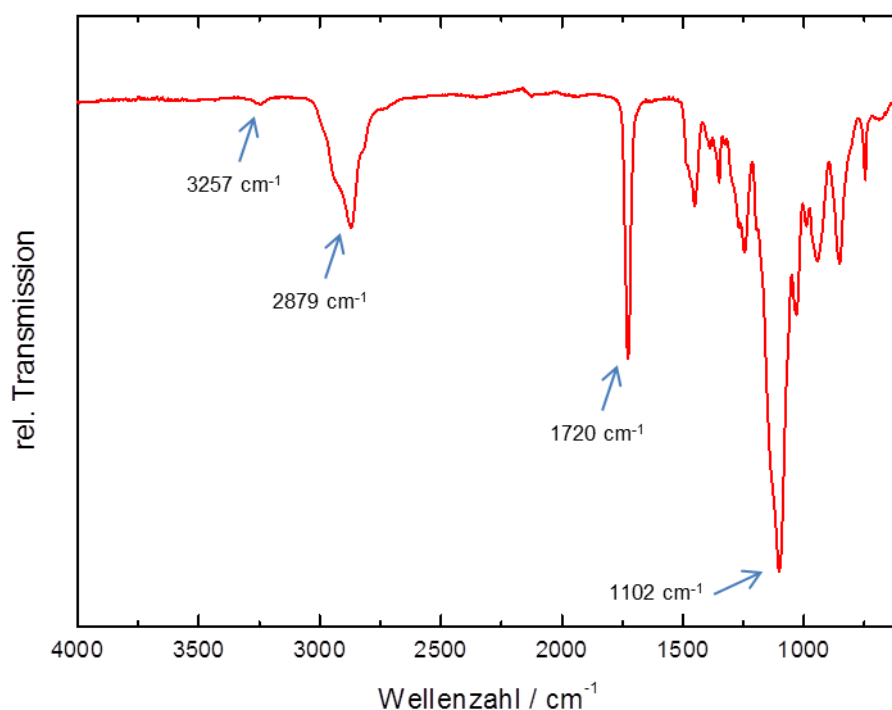


Abbildung 3.10. ATR-IR-Spektrum vom Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ mit 15 mol% Ma.

Abbildung 3.10 stellt das IR-Spektrum des Copolymers $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ mit 15 mol% Ma dar. Bei 3257 cm^{-1} ist die Bande der C-H-Valenzschwingung der Alkin-Gruppe zu erkennen. Die breite Bande bei 2879 cm^{-1} wird durch die C-H-Valenzschwingung der Methylen- und Methyl-Gruppen verursacht. Die intensive Bande bei 1720 cm^{-1} lässt sich der C=O-

Valenzschwingung der Ester-Gruppen zuordnen. Die intensivste Bande bei 1102 cm^{-1} wird durch die C-O-Valenzschwingung der Ether-Gruppen in den Seitenketten verursacht.

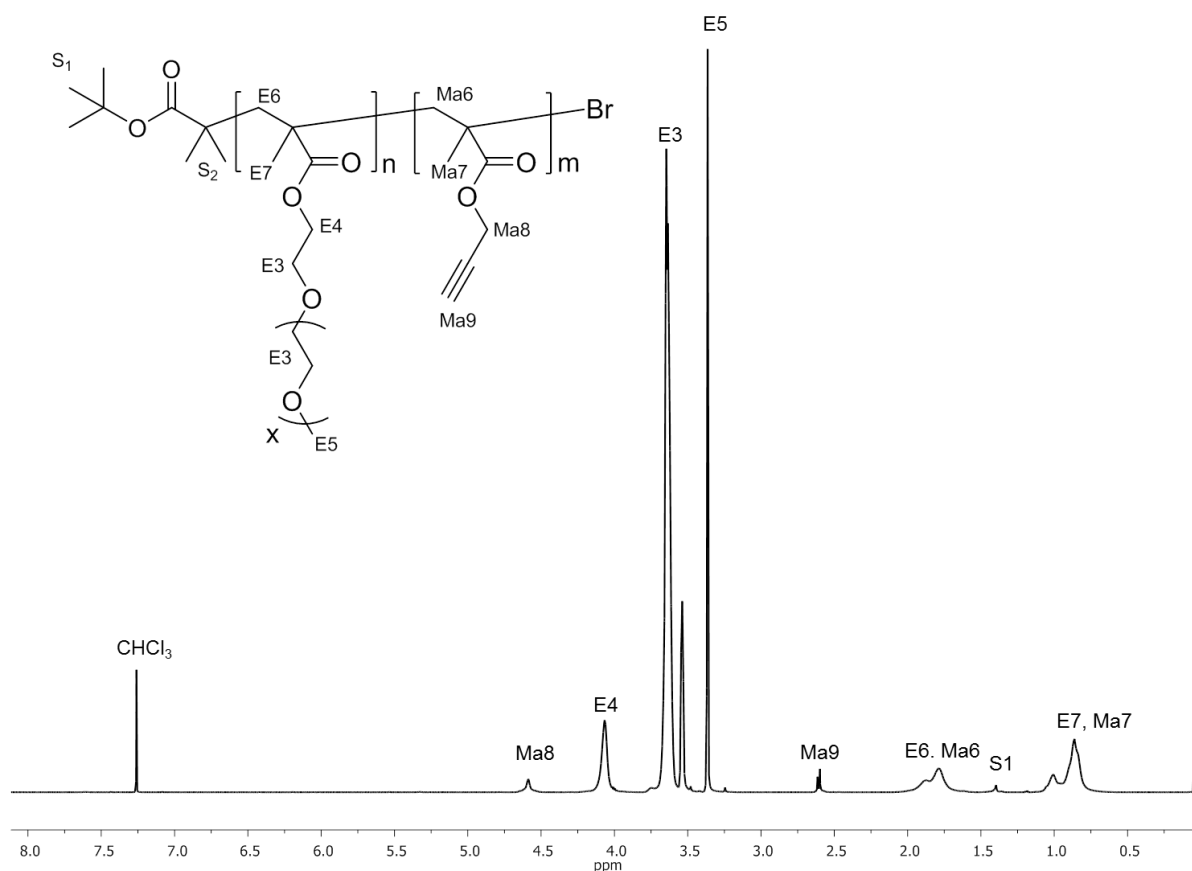


Abbildung 3.11. 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ mit 15 mol% Ma bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ in CDCl_3 .

Abbildung 3.11 zeigt ein beispielhaftes $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Copolymeren $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ mit 15 mol% Ma. Die ^1H -Signale sind den jeweiligen Protonen zugeordnet. Mit den Intensitäten der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Copolymeren PE_xMa_y kann des Weiteren der Stoffmengenanteil $\chi_{\text{Ma},\text{NMR}}$ an eingebauten Ma im Copolymer berechnet werden. Dazu wird das Integral des ^1H -Signals des Ma8-Protons bei 4,62 ppm ins Verhältnis zu dem Integral des ^1H -Signals der E4-Protonen bei 4,07 ppm gesetzt (Gleichung 3.10).

$$\chi_{\text{Ma},\text{NMR}} = \frac{\frac{I_{\text{Ma8}}}{m_{\text{Ma8}}}}{\frac{I_{\text{Ma8}}}{m_{\text{Ma8}}} + \frac{I_{\text{E4}}}{m_{\text{E4}}}} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

wobei I_{Ma8} und I_{E4} die Intensität und m_{Ma8} und m_{E4} die Anzahl der Protonen der Signale Ma8 und E4 sind. In der Tabelle 3.3 sind jeweils die theoretischen und experimentellen bestimmten Stoffmengenanteile ($\chi_{Ma,theo}$ und $\chi_{Ma,NMR}$) an Ma aufgeführt. Es lässt sich feststellen, dass die angestrebten $\chi_{Ma,theo}$ im Rahmen des Messfehlers erreicht wurden. Die Unterschiede der experimentell ermittelten Werte zu den theoretischen Werten können durch eine Ungenauigkeit bei der Auswertung der Spektren erklärt werden. Aus Gleichung 3.11 lassen sich die Umsätze des Einbaus des Monomers Ma in der Polymerkette U_{NMR} ermitteln.

$$U_{Ma,NMR} = \frac{\chi_{Ma,NMR}}{\chi_{Ma,theo}} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

Die Wiederholungseinheit $n_{Ex,Ma}$ der Comonomere E_x und Ma im Copolymer aus dem 1H -NMR-Spektrum werden mit folgender Gleichung berechnet:^[150]

$$n_{Ex,Ma} = \frac{I_{E7,Ma7} m_{S1} n_{S1}}{I_{S1} m_{E7,Ma7}} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

wobei m_{S1} die Anzahl der Protonen des Starters S1 (9-H,) und n_{S1} die Wiederholungseinheit des Starters im Polymer sind. Mit $n_{Ex,Ma}$ kann man nun die zahlenmittlere Molmasse $M_{n,NMR}$ der Copolymere berechnen (Gleichung 3.13).

$$M_{n,NMR} = n_{S1} M_{S1} + \chi_{Ex,NMR} n_{Ex,Ma} M_{Ex} + \chi_{Ma,NMR} n_{Ex,Ma} M_{Ma} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

wobei M_{S1} , M_{Ex} und M_{Ma} jeweils die Molmasse des Starters und die der Monomere sind.

Tabelle 3.3. Vergleich der Zusammensetzung und Molmasse der Copolymere mit unterschiedlichem Anteil χ_{Ma} an Ma. $U_{Ma,NMR}$: Umsatz an Ma bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $M_{n,theo}$: theoretische zahlenmittlere Molmasse; $M_{n,NMR}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $M_{n,GPC}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC; $M_{w,GPC}$: massenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC.

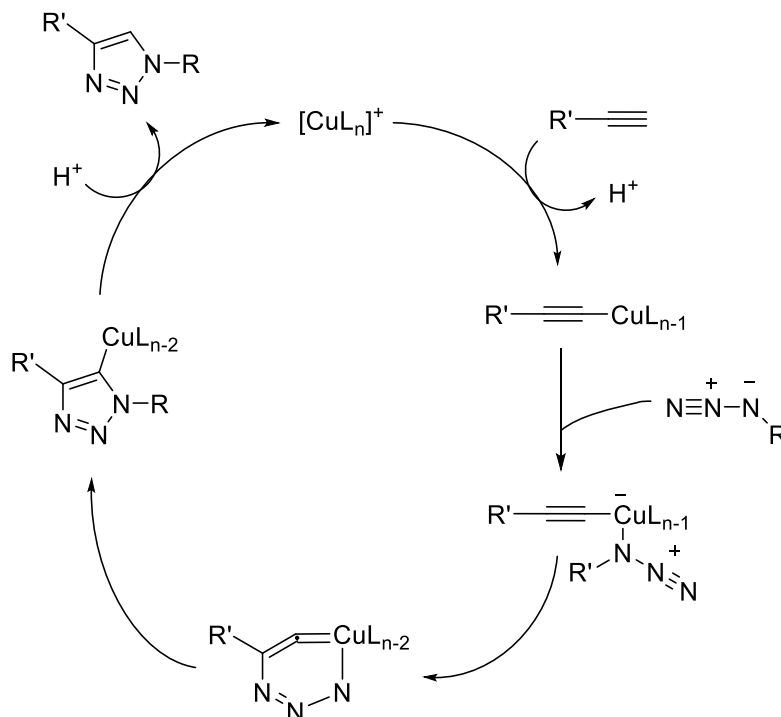
Copolymere	$\chi_{Ma,theo}$ %	$\chi_{Ma,NMR}$ %	$U_{Ma,NMR}$ %	$M_{n,theo}$ g/mol	$M_{n,NMR}$ g/mol	$M_{n,GPC}$ g/mol	$M_{w,GPC}$ g/mol	PDI
PE ₂ Ma _χ	20,0	18,4	92	7140	7853	25353	47512	1,87
	10,0	10,1	101	7495	7044	15200	25800	1,69
PE ₃ Ma _χ	15,0	12,8	85	11167	11345	21900	32100	1,47
	10,0	9,2	92	9081	10520	27700	49400	1,78
PE _{4,5} Ma _χ	10,0	8,4	84	11519	11211	22200	30500	1,37
	5,0	3,7	74	11871	13201	21500	28800	1,34

Um die Molmassenverteilung der Copolymere zu untersuchen und um zu überprüfen, ob es zu Quervernetzungen gekommen ist, wurden die Copolymere mittels GPC untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.3 dargestellt. PE₂Ma_{20%} mit 20 mol% Ma besitzt den höchsten Stoffmengenanteil an Ma und weist auch den höchsten PDI im Vergleich zu den anderen Copolymeren auf. Abweichend davon zeigt PE_{4,5}Ma_{10%} mit 10 mol% Ma eine etwas niedrigere Molmassenverteilung. Dies kann z.B. durch eine mögliche Quervernetzung der Polymere durch Beteiligung der Alkin-Gruppen an der Polymerisation erklärt werden. Bei kleinen $\chi_{Ma,theo}$ ist der Grad der Quervernetzung nicht hoch. Die breite Molmassenverteilung bei der Polymerisation von Ma mittels ATRP konnte von *K. Matyjaszewski et al.*^[74] bereits in früheren Untersuchungen beobachtet werden und wurde ebenfalls durch Quervernetzungen erklärt.

3.3.2. Synthese und Charakterisierung der β -CD-funktionalen Copolymere

Im ersten Teil dieses Abschnitts werden die Reaktionsbedingungen untersucht, mit denen die CuAAC optimal durchgeführt werden soll (Schema 3.6). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden dann die CD-funktionalisierten Copolymere hergestellt. Es wurden drei unterschiedliche Katalysatorsysteme zur Synthese verwendet: CuBr mit Bpy, CuI mit PMDTA und CuSO₄·5H₂O mit Natriumascorbat NaAscH. Bei dem CuSO₄·5H₂O/NaAscH-System wird Cu(I) *in situ* durch die Reduktion des Cu(II) durch NaAscH erzeugt. Dementsprechend wurde NaAscH äquivalent zum CuSO₄·5H₂O hinzugefügt. Die Versuche wurden mit dem Copolymer PE₂Ma_{20%} mit 20 mol% Ma durchgeführt. Alle Reaktionen fanden unter Sauerstoffausschluss bei 90 °C in DMSO statt. Die Copolymere wurden durch das Aussalzen aus wässriger Lösung mittels Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄ gereinigt. Die Produkte wurden mittels IR- und ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert. Mittels GPC konnten die Copolymere nicht untersucht werden, da die modifizierten Copolymere nicht mehr in THF löslich sind. Außerdem sind die β -CD-funktionalen Copolymere in DMSO schlecht löslich. Aus dem Reaktionsansatz mit CuBr/Bpy als Katalysator ließ sich kein Produkt isolieren. *K. Matyjaszewski et al.*^[151] konnten bereits zeigen, dass Bpy als Ligand der Kupfer(I)-ionen für die CuAAC eine geringe katalytische Aktivität besitzt. Mit anderen Cu(I)/Ligand-Systemen ließ sich das gewünschte funktionalisierte Copolymer darstellen, wobei mit CuI/PMDTA der höchste Umsatz erreicht wurde. Zudem hat PMDTA die Eigenschaft, Cu-Ionen in wässriger

Lösung stabil zu komplexieren, sodass beim Reinigen des Rohprodukts durch das mehrmalige Aussalzen aus wässriger Lösung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die durch Cu(II)-verursachte Färbung nahezu vollständig entfernt wurde.



Schema 3.6. Von Sharpless vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der CuAAC.^[152]

Abbildung 3.12 zeigt das IR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ dargestellt, welches zur qualitativen Untersuchung des Copolymers aufgenommen wurde. Bei 3242 cm^{-1} tritt beim $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ analog zu dem $\beta\text{-CD-N}_3$ eine sehr breite Bande auf,^[153] die durch die Valenzschwingung der Hydroxylgruppen des CDs verursacht wird. Es lässt sich zudem feststellen, dass beim $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ bei 2100 cm^{-1} keine Bande mehr vorhanden ist, während diese beim $\beta\text{-CD-N}_3$, verursacht durch die Valenzschwingung der Azido-Gruppe, vorhanden ist. Das lässt darauf schließen, dass das Produkt weitgehend von überschüssigen $\beta\text{-CD-N}_3$ befreit wurde. Bei 1724 cm^{-1} ist beim $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ die intensive C-O-Valenzschwingung der Ester-Gruppe vorhanden. Die Bande bei 1024 cm^{-1} ist der C-O-Valenzschwingung der Ether-Gruppen der Oligoethylenglycol-Seitenketten zuzuschreiben. Damit kann die erfolgreiche CuAAC von $\beta\text{-CD-N}_3$ an $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ qualitativ mit dem IR-Spektrum bestätigt werden.

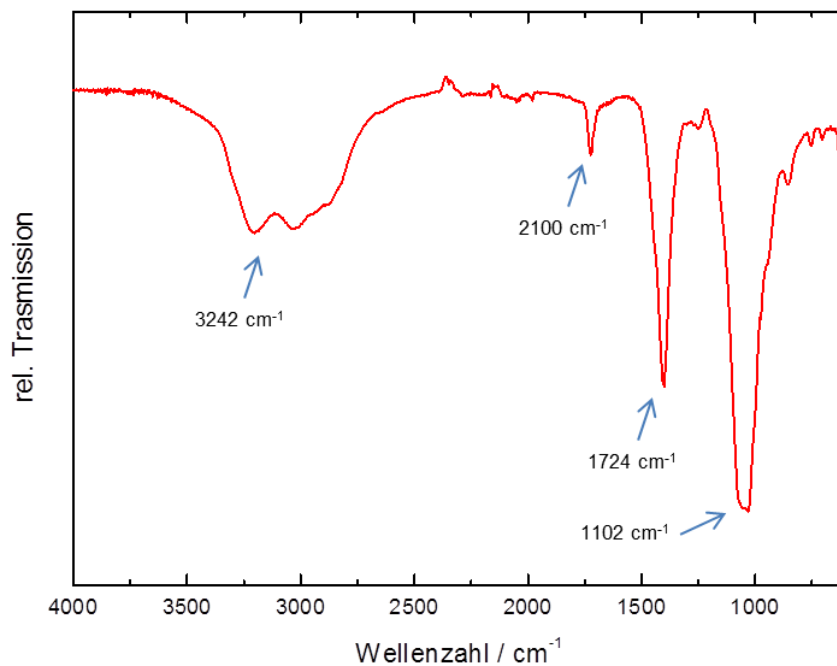


Abbildung 3.12. ART-IR-Spektrum von $\text{PE}_{4.5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ mit 15 mol% Ma.

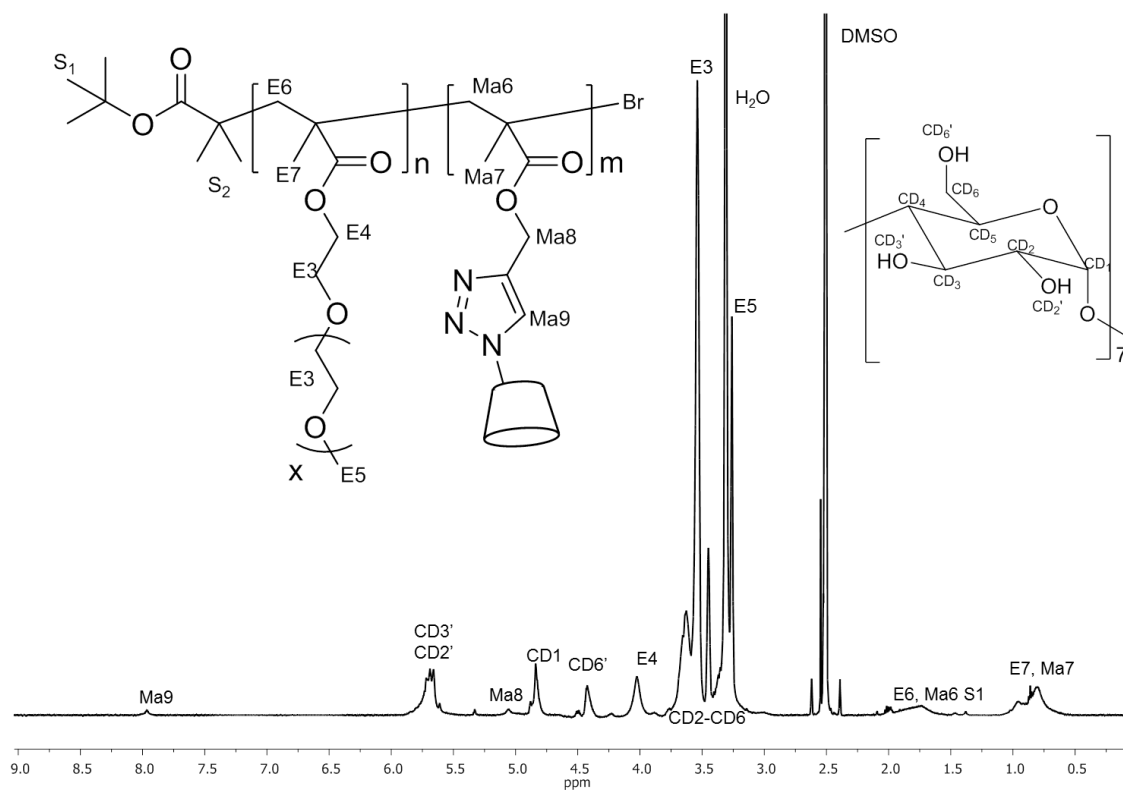


Abbildung 3.13. 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum vom Copolymer $\text{PE}_{4.5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ mit 15 mol% Ma bei 25 °C in d_6 -DMSO.

In Abbildung 3.13 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ mit 15 mol% Ma aufgeführt, welches mit dem Cu/PMDETA-System synthetisiert wurde. Neben den ^1H -Signalen vom modifizierten $\beta\text{-CD}$, sind bei 7,97 ppm und 5,06 ppm zwei weitere ^1H -Signale vorhanden, die den Rückschluss auf eine erfolgreiche Funktionalisierung mit $\beta\text{-CD-N}_3$ zulassen. Das ^1H -Signal Ma9 bei 7,97 ppm gehört zu dem im Zuge der CuAAC gebildeten Triazolring. Das ^1H -Signal Ma8 bei 5,06 ppm gehört zur Methylen-Gruppe, welche in α -Stellung zu dem Triazolring steht.

Um den Anteil von $\beta\text{-CD-N}_3$ $\chi_{\text{CD,NMR}}$ zu ermitteln, wurde das ^1H -Signal Ma9 des Triazolrings ins Verhältnis zu dem ^1H -Signal der Methylen-Gruppe E4 bei 4,01 ppm gesetzt (Gleichung 3.14).

$$\chi_{\text{CD,NMR}} = \frac{\frac{I_{\text{Ma9}}}{m_{\text{Ma9}}}}{\frac{I_{\text{Ma9}}}{m_{\text{Ma9}}} + \frac{I_{\text{E4}}}{m_{\text{E4}}}} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

wobei I_{E4} und I_{CDI} die Intensitäten und m_{E4} und m_{Ma9} die Anzahl der jeweiligen ^1H -Signale der Protonen Ma9 und E4 sind. Aus Gleichung 3.15 lassen sich die Umsätze des Einbaus von $\beta\text{-CD-N}_3$ in der Polymerkette $U_{\text{CD,NMR}}$ ermitteln.

$$U_{\text{CD,NMR}} = \frac{\chi_{\text{Ma,NMR}}}{\chi_{\text{Ma,theo}}} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

Tabelle 3.4. Übersicht über die CuAAC an den Copolymeren PE_xMa_y mit $\beta\text{-CD-N}_3$. $\chi_{\text{CD,theo}}$: theoretischer Stoffmengenanteil an CD im Copolymer; $\chi_{\text{CD,theo}}$: Stoffmengenanteil an CD im Copolymer bestimmt aus den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen; $U_{\text{CD,NMR}}$: Umsatz an CD bestimmt aus den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen.

Substanz	$\chi_{\text{CD,theo}} / \%$	$\chi_{\text{CD,NMR}} / \%$	$U_{\text{CD,NMR}} / \%$
$\text{PE}_2\text{Ma}_{20\%}(\beta\text{-CD})$	18,4	13,3	72
$\text{PE}_2\text{Ma}_{10\%}(\beta\text{-CD})$	10,1	9,2	91
$\text{PE}_3\text{Ma}_{10\%}(\beta\text{-CD})$	9,2	7,7	83
$\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$	12,8	11,5	90
$\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{10\%}(\beta\text{-CD})$	8,4	9	~100
$\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{5\%}(\beta\text{-CD})$	3,7	3,8	~100

In Tabelle 3.4 sind die Stoffmengenanteile des $\beta\text{-CD-N}_3$, sowie der daraus resultierende Umsatz aufgelistet. Der Umsatz bei Reaktionen mit geringerem Stoffmengenanteil an Ma

steigt. Das gleiche Verhalten wurde für ET-CORM-tragende Copolymere aus Abschnitt 3.4.2.4 beobachtet. Für β -CD-funktionale Copolymere kann dies dadurch erklärt werden, dass nach einer gewissen Menge an addiertem β -CD- N_3 die sterische Hinderung für die weitere Addition von β -CD- N_3 zu groß wird. Dagegen scheint die größere sterische Hemmung durch die längere Oligoethylenglycol-Seitenkette des $E_{4,5}$ gegenüber der des E_2 eine geringere Rolle zu spielen. So wurde für $PE_2Ma_{10\%}$ ein nur um 8% geringerer Umsatz als für $PE_3Ma_{10\%}$ gefunden. Des Weiteren lassen sich auf diese Weise auch die Copolymere $PE_{4,5}Ma_\chi$ mit einem höheren Stoffmengenanteil an modifizierten β -CD herstellen als durch die direkte Polymerisation von $E_{4,5}$ mit $Ma(\beta$ -CD).^[149] Das ist von Interesse, da bei steigender Kettenlänge der Oligoethylenglycol-Seitenkette die Wasserlöslichkeit zunimmt.^[54] Dies könnte somit eine wichtige Rolle bei der Komplexierung von $PE_xMa_\chi(\beta$ -CD) mit den stark hydrophoben ET-CORMs spielen.

3.3.3. Komplexierung von ET-CORMs mit β -CD-funktionalen Copolymeren

Vorherigen Untersuchungen mit dem $PE_3Ma_{10\%}(\beta$ -CD) und dem CORM-*ePa* haben gezeigt, dass die ausgewählten Materialien für die Komplexierungsversuche nicht geeignet sind. Das CORM-*ePa* liegt bei RT als Feststoff vor. Es schmilzt bei 56 °C, bei hohen Temperaturen fällt jedoch das β -CD-funktionale Polymer aufgrund der LCST, wie in der Literatur ausführlich beschrieben wird, aus.^[52–56] Daher liegt jeweils eine der beiden Substanzen, entweder Wirt oder Gast, in der wässrigen Lösung immer als unlöslicher Feststoff vor, was die notwendige Interaktion der beiden Moleküle miteinander für die Komplexbildung hindert.

Bei den nächsten Experimenten wurde das CORM-*iAa* statt dem CORM-*ePa* verwendet. Das CORM-*iAa* ist bei RT flüssig. Als β -CD-funktionales Copolymer wurde $PE_{4,5}Ma_{5\%}(\beta$ -CD) verwendet, da dieses β -CD-funktionale Copolymer eine höhere Wasserlöslichkeit als das β -CD-funktionale Copolymer $PE_3Ma_{10\%}(\beta$ -CD) aufweist.^[153] Die Komplexierungsversuche wurden bei unterschiedlichen Copolymer/CORM-*iAa*-Verhältnissen durchgeführt. 1 mg (3,6 μ mol) CORM-*iAa* wurde mit 1 ml D_2O versetzt und im Ultraschallbad bei RT dispergiert. Das Copolymer mit den gleichen Äquivalenten an modifiziertem β -CD oder mehr wurden hinzugefügt. Anschließend wurde der unlösliche Rückstand bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand IR- und 1H -NMR-spektroskopische untersucht. Die IR-Spektren wurden vorbereitet, indem eine kleine Menge der wässrigen Lösung auf die

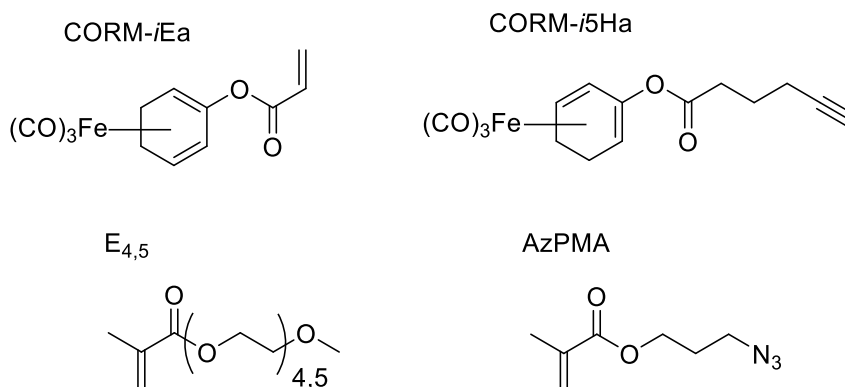
Probenaufnahme gegeben wurde. Nachdem die Probe hinreichend getrocknet war, wurde das Spektrum aufgenommen. Dabei ist zu beachten, dass bei dem ^1H -NMR-Spektrum die ^1H -Signale der ET-CORMs durch die breiten ^1H -Signale des Copolymers überlagert werden können. In den IR- und ^1H -NMR-Spektren der wässrigen Lösung ließ sich somit keine IR-Bande oder ^1H -Signale des ET-CORM nachweisen.

3.3.4. Zusammenfassung und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Copolymere mit β -CD- N_3 durch eine CuAAC als Postpolymerisationsmodifikation zu funktionalisieren. Durch die Copolymerisation von E_x und Ma wird ein Copolymer mit Alkin-Funktionalität erhalten. Bei der Untersuchung des Copolymerisationsverhaltens von E_x und Ma durch IR- und ^1H -NMR-Spektroskopie kann festgestellt werden, dass sich $\text{PE}_x\text{Ma}_\chi$ -Copolymere bilden und dass der Stoffmengenanteil von Ma $\chi_{\text{Ma},\text{NMR}}$ im Copolymer dem für die Reaktion eingesetzten Stoffmengenanteil von Ma $\chi_{\text{Ma},\text{theo}}$ im Rahmen des Messfehlers gleicht. Bei der Untersuchung der $\text{PE}_x\text{Ma}_\chi$ -Copolymere mittels GPC zeigt sich, dass sich der Polymerisationsgrad der Copolymere deutlich von dem eingestellten Polymerisationsgrad unterscheidet. Zudem zeigt sich, dass der PDI für die ATRP im Vergleich zu anderen Polymeren, die mittels ATRP polymerisiert wurden,^[154,155] relativ hoch ist. Der Vergleich der Copolymere untereinander zeigt, dass mit steigendem Stoffmengenanteil an Ma χ_{Ma} auch der PDI größer wird. Dies kann durch die Quervernetzung der Copolymere durch eine teilweise Beteiligung der Alkin-Gruppen an der Polymerisation erklärt werden. Durch eine CuAAC von β -CD- N_3 an diesem Copolymer wird das β -CD-funktionalisierte Copolymer erhalten. Bei der Variation des Katalysatorsystems für die CuAAC von β -CD- N_3 an dem $\text{PE}_2\text{Ma}_{20\%}$ -Copolymer wurde bewiesen, dass das Katalysatorsystem aus Cu/PMDDTA zu einem hohen Umsatz der Alkin-Gruppen führt, während sich bei dem Katalysatorsystem aus CuBr/Bpy kein Produkt isolieren lässt. Bei der Variation der Ausgangscopolymere für die CuAAC wurde nachgewiesen, dass bei $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{10\%}$ und $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{5\%}$ ein vollständiger Umsatz der Alkin-Gruppen stattfindet. Der Umsatz erhöht sich jedoch, je geringer der Stoffmengenanteil von Ma ist. Die Länge der Oligoethylenglycol-Seitenkette von E_x scheint dabei eine geringere Rolle zu spielen. Bei den Komplexierungsversuchen von $\text{PE}_3\text{Ma}_{10\%}$ (β -CD) mit dem CORM-*e*Pa und von $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{5\%}$ (β -CD) mit dem CORM-*i*Aa konnten in keinem Verhältnis wasserlösliche Komplexe hergestellt werden.

3.4. Synthese und Charakterisierung von ET-CORM-tragenden Copolymeren

ET-CORMs sind hydrophobe Moleküle, die CO durch die enzymatische Abspaltung der Ester-Bindung freisetzen.^[31] Für künftige biomedizinische Anwendungen soll die Biokompatibilität und Bioverfügbarkeit durch die Solubilisierung der ET-CORMs durch den Einbau in Copolymeren, die überwiegend aus E_{4,5} bestehen,^[72] gesteigert werden.



Schema 3.7. Verwendete Substanzen für die Synthese der biokompatiblen Copolymeren als ET-CORM-Träger.

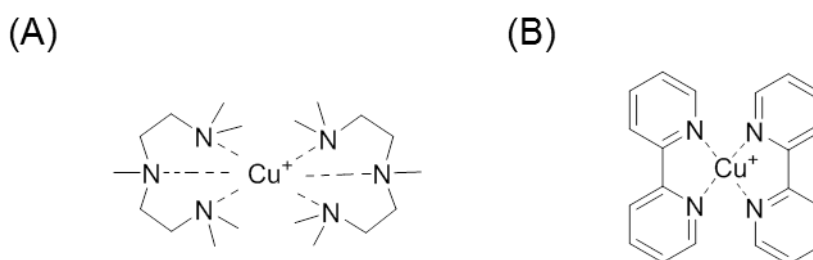
Die Copolymeren sollen mittels Cu-katalysierter *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP) hergestellt werden. Dabei stehen zwei alternative Wege zur Verfügung: Die erste Syntheseroute ist die Copolymerisation von 2-Methoxyoligo(ethylglycol)methacrylat (E_{4,5}) und CORM-iEa. Im zweiten Syntheseweg wird E_{4,5} mit dem 3-Azidopropylmethacrylat (AzPMA oder im Copolymer mit A abgekürzt) copolymerisiert (Schema 3.7).^[131] Das verwendete Monomer CORM-iEa entsteht aus der Veresterungsreaktion zwischen der Acrylsäure und dem Acycloxybutadien-Fe(CO)₃-Komplex. Das Monomer AzPMA kann nach der Polymerisation über die Azido-Gruppe wie folgt funktionalisiert werden: Das CORM-i5Ha wird in einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen einer Azido- und Alkin-Gruppe (CuAAC) an das Polymer kovalent gebunden.^[74,156] Durch beide Herstellungsrouten sollte es somit möglich sein, ET-CORM-tragende Copolymeren zu erhalten.

3.4.1. Copolymerisation von CORM-*i*Ea und E_{4,5}

Ziel des Versuches ist es, E_{4,5} und das CORM-*i*Ea mittels kupferkatalysierter ATRP zu copolymerisieren. Um die optimalen Polymerisationsbedingungen für die Copolymerisation der Monomere CORM-*i*Ea und E_{4,5} herauszufinden, wurden verschiedenen Experimente und Testreihen durchgeführt.

3.4.1.1. Lösungsmittel- & Farb-Tests

Die Polymerisation von Monomeren wie E_x erfolgte mittels ATRP in Anwesenheit von einem Katalysator/Ligand-Komplex (Schema 3.5).^[131] Die Reaktionslösung weist somit in Abhängigkeit des Lösungsmittels und der Art des verwendeten Katalysator/Ligand-Komplexes bestimmte Farben auf: Beispielsweise verleiht der Katalysator/Ligand-Komplex bestehend aus Cu(I)Br und 2,2'-Bipyridin einer DMSO-Lösung eine dunkelbraune Farbe. Wenn Cu(I) zu Cu(II) oxidiert wird, wird die DMSO-Lösung grün. Dies ermöglicht somit Rückschlüsse über die Oxidationsstufe des Metalls zu ziehen. Die Lösungsmittel- & Farb-Tests sollen somit helfen aufzuklären, welche Farbe die Lösungen in Abhängigkeit der Oxidationsstufe der Metalle Fe und Cu in Anwesenheit von bestimmten Liganden annehmen. Als Lösungsmittel wurden MeOH, THF, DMF oder DMSO verwendet, als Liganden wurden Bpy oder N,N,N',N',N''-pentamethyl-diethylenetriamin (PMDETA) verwendet (Schema 3.8).



Schema 3.8. (A) Cu(I)/PMDETA-Komplex. (B) Cu(I)/Bpy-Komplex.

In den Tabelle 3.5 und 3.6 werden die Farben von Lösungen der verschiedenen Komponenten (außer dem Starter), die für die ATRP notwendig sind, aufgelistet. Wie man aus ihnen entnehmen kann, hängt die Farbe der Lösung vom Lösungsmittel, vom Ligand und der Oxidationsstufe des Metalls ab. Die Kombination der Lösungsmittel mit Bpy als Ligand ergibt für Fe(II) eine blutrote Farbe, während für Fe(III) und Cu(I) orange bis dunkelbraune

Farben erhalten werden. Für Cu(II) treten blaue und grüne Farben auf. Die Anwesenheit des CORM-*iEa* beeinflusst ebenfalls die Farbe der Lösungen. Bei manchen Kombinationen bleibt jedoch die Farbe in Anwesenheit des CORM-*iEa* unverändert. Die Kombination der Lösungsmittel mit PMDETA als Ligand ergibt mit Fe(II) und Fe(III) gelbliche bis bräunlichen Lösungen, während mit Cu(I) und Cu(II) grünlich bis bläuliche Lösungen erhalten werden (Tabelle 3.6). Des Weiteren wird auch die Stabilität des ET-CORMs in diesen Lösungen untersucht. Das Verhältnis des ET-CORM zum CuBr wird erhöht, bis ein Niederschlag beobachtet oder ein Verhältnis von 1:1 erreicht wird. Die Bildung des Niederschlags wird als direkter Beweis für den Zerfall des Acycloxybutadien-Fe(CO)₃-Komplexes im ET-CORM angenommen. Nach dieser Beobachtung werden für die ATRP Versuchsbedingungen verwendet, bei denen kein Niederschlag beobachtet wurde. Insbesondere wurde für die weiteren Untersuchungen THF als Lösungsmittel ausgeschlossen.

Tabelle 3.5. Lösungsmitteltest und Farbtest mit dem Ligand 2,2'-Bipyridin (Bpy). NS: Niederschlag; Lsg.: Lösung. CuBr:CORM ist das molare Verhältnis zwischen CuBr und ET-CORM.

Lösungsmittel	Farbe von... komplexiert mit Bpy						CuBr:CORM Verhältnis
	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Cu ⁺	Cu ²⁺	Cu ⁺ + CORM- <i>iEa</i>	Cu ²⁺ + CORM- <i>iEa</i>	
MeOH	blutrote Lsg.	braune klare Lsg.	braune Lsg.	blaue Lsg.	dunkel braune Lsg.	dunkel braune Lsg.	1:1
THF	blutroter NS, rote Lsg.	orange Lsg.	braune Lsg.	grüne Lsg., brauner NS	hellgrüner NS, trübe	dunkelgrün, trübe	1:0,71
DMF	blutrote Lsg.	orange klare Lsg.	braune Lsg.	grüne Lsg.	dunkelbraune Lsg.	blutrote Lsg.	1:1
DMSO	blutrote Lsg.	orange klare Lsg.	dunkelbraune Lsg.	grüne Lsg.	dunkelbraune Lsg.	blutrote Lsg.	1:1

Tabelle 3.6. Lösungsmitteltest und Farbtest mit dem Ligand *N,N,N',N',N''*-pentamethyl-diethylenetriamin (PMDETA). NS: Niederschlag; Lsg.: Lösung. CuBr:CORM ist das molare Verhältnis zwischen CuBr und ET-CORM.

Lösungsmittel	Farbe von... komplexiert mit PMDETA						CuBr:CORM Verhältnis
	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Cu ⁺	Cu ²⁺	Cu ⁺ + CORM- <i>iEA</i>	Cu ²⁺ + CORM- <i>iEA</i>	
MeOH	braungelbe trübe Lsg.	orangeklare Lsg.	blaue Lsg.	blaue Lsg.	grüne trübe Lsg., NS	braune trübe Lsg.	1:0,38
THF	blutroter NS., hellgelbe Lsg.	Brauner NS., gelbbraune Lsg.	grüne Lsg.	Türkis, weißer NS	dunkelgrüne trübe Lsg., NS	dunkelgrüne trübe Lsg.	1:0,76
DMF	dunkelgelb trübe Lsg.	gelbbraune trübe Lsg.	hellgrüne Lsg.	blaue Lsg.	dunkelgrüne Lsg.	dunkelgrüne Lsg.	1:1
DMSO	gelbe Lsg.	brauntrübe Lsg.	hellgrüne Lsg.	blaue Lsg.	dunkelgrüne Lsg.	dunkelgrüne Lsg.	1:1

3.4.1.2. Homopolymerisationsversuche

Unter den aus den Farb- und Lösungsmitteltests ermittelten stabilen Bedingungen wurde zunächst eine Polymerisation von $E_{4,5}$ in den Lösungsmitteln d_6 -DMSO, d_7 -DMF und MeOH durchgeführt. Als Starter für die Reaktion dient *tert*-Butyl-2-bromisobutyrat (*t*BBrIB). Die Effizienz der ATRP wurde unter diesen Bedingungen zunächst für $E_{4,5}$ untersucht. Die Bedingungen mit den höchsten Umsätzen für die $E_{4,5}$ -Polymerisation sollten anschließend für eine Copolymerisation von $E_{4,5}$ mit dem CORM-*i*Ea verwendet werden.

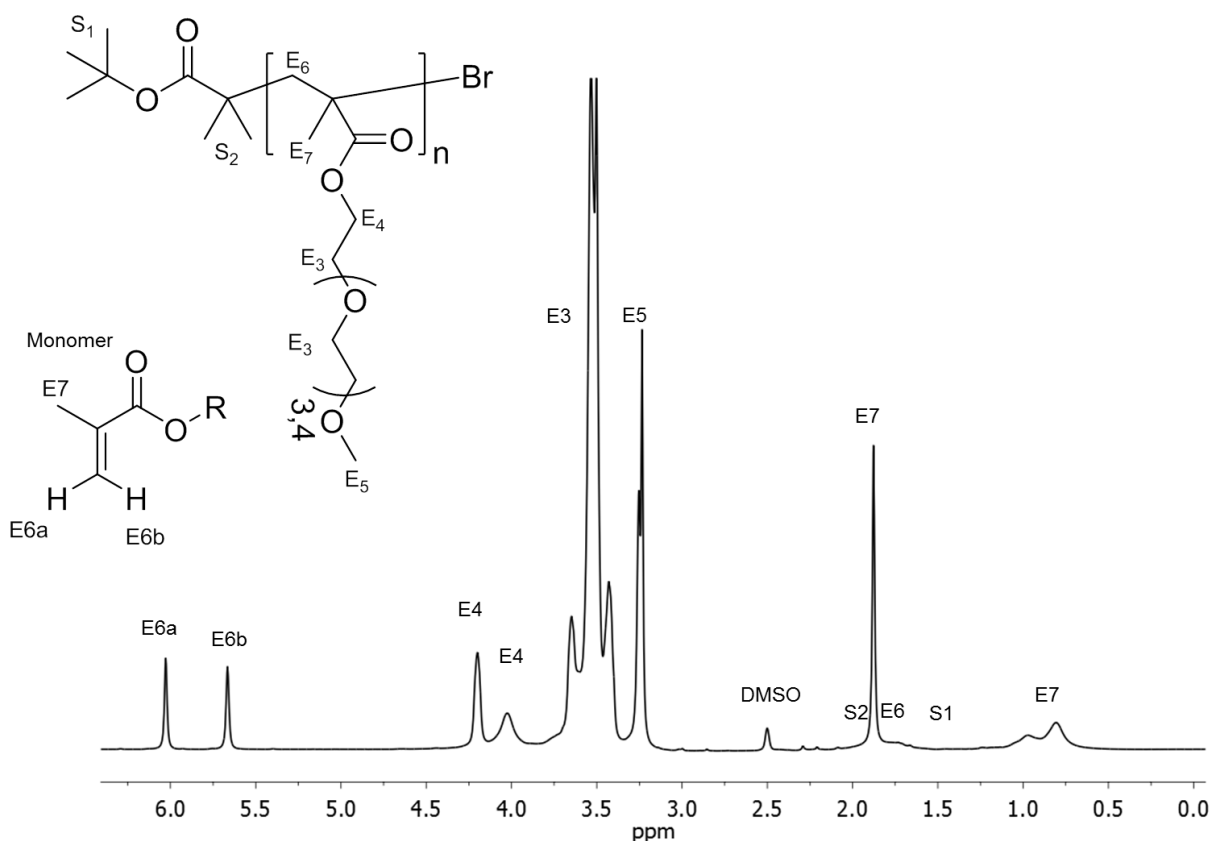


Abbildung 3.14. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts der Homopolymerisation von $E_{4,5}$ in d_6 -DMSO bei 25 °C nach 1 h.

In Abbildung 3.14 wird ein Beispiel eines ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes der durchgeführten ATRP in 1 ml d_6 -DMSO dargestellt. Die Zuordnung der ¹H-Signale zu den jeweiligen Protonen des Polymers erfolgte mit Hilfe der Literatur.^[157] Anhand der Protonen E7, E6, E5, E4, (0,89; 1,75; 3,23; 4,03 ppm) ist eindeutig zu erkennen, dass sich Polymerketten gebildet haben. Aus der Intensität von E7 bei 0,89 ppm und der Protonen des

Monomers E6a bzw. E6b bei 5,67 und 6,03 ppm kann der Umsatz U_{NMR} der Polymerisation aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum berechnet werden (Gleichung 3.16).

$$U_{NMR} = \frac{\frac{I_{E7}}{m_{E7}}}{\frac{I_{E6a}}{m_{E6a}} + \frac{I_{E7}}{m_{E7}}} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

wobei I_{E7} und I_{E6a} die Intensitäten und m_{E7} und m_{E6a} die Anzahl der Protonen der Signale O7 und E6a sind.

In Abbildung 3.15A wird U_{NMR} gegen die Zeit t aufgetragen, um Informationen zum zeitlichen Verlauf der ATRP zu erhalten. Um die Messpunkte anzupassen wird angenommen, dass für die Polymerisationsgeschwindigkeit r_p ein Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung gilt

$$r_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_{app}t \quad \text{Gleichung 3.17}$$

wobei k_{app} als die scheinbare Geschwindigkeitskonstante definiert wird. $[M]_0$ und $[M]_t$ sind jeweils die Monomer-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 und t .^[158] Die Integration liefert:

$$[M]_t = [M]_0 \exp(-k_{app}t) \quad \text{Gleichung 3.18}$$

mit

$$U = 1 - \frac{[M]_t}{[M]_0} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

wobei U der Umsatz ist. Durch Einsetzen von Gleichung 3.19 in Gleichung 3.18 erhält man

$$U = 1 - \exp(-k_{app}t) \quad \text{Gleichung 3.20}$$

Gleichung 3.20 passt die Werte gut an, wenn das Monomer vollständig umgesetzt wird (100% Umsatz), daher wird die Gleichung 3.20 mit der Konstante U_{max} multipliziert. Somit kann man nun auch die Messpunkte anpassen, die aus Experimenten stammen, in denen das Monomer nicht vollständig zum Polymer umgesetzt wird.

$$U = U_{max}(1 - \exp(-k_{app}t)) \quad \text{Gleichung 3.21}$$

U_{max} wird aus der Anpassung der Punkte im Diagramm von Abbildung 3.15 mit Hilfe der Gleichung 3.21 erhalten und stellt in diesen Experimenten den maximalen erreichten Umsatz nach langer Reaktionszeit ($t \rightarrow \infty$) dar.

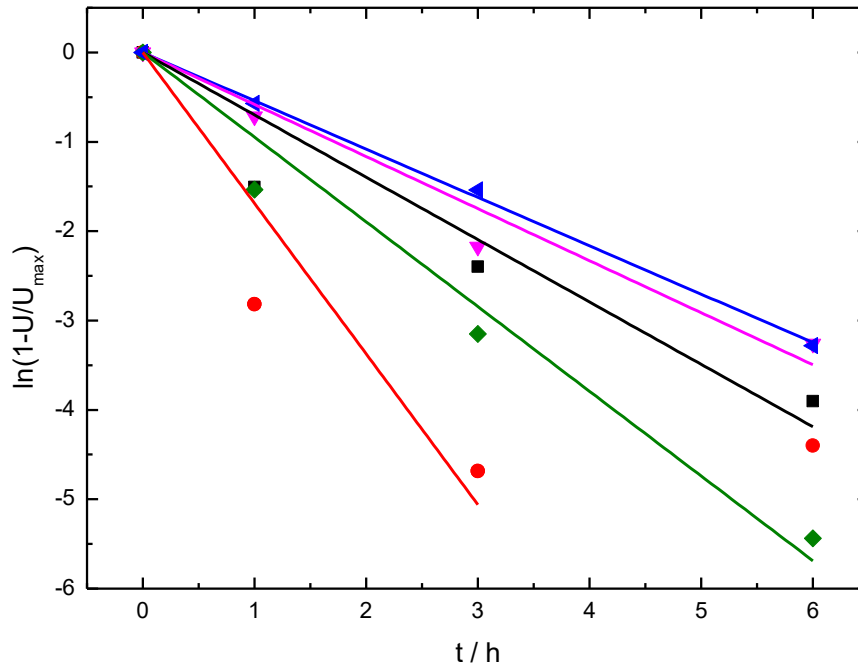


Abbildung 3.15. Auftragung von $\ln(1-U/U_{max})$ gegen die Zeit für die Homopolymerisation von $E_{4,5}$. (schwarz) DMSO/BPy; (rot) DMSO/PMDETA; (rosa) MeOH/Bpy; (grün) DMF/PMDETA; (blau) DMF/Bpy.

Um den Polymerisationsgrad des Polymers mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zu ermitteln, wurde die Endgruppenbestimmungsmethode verwendet.^[159] Anschließend werden die Integrale des Starters I_{S1} und des Signals E7 (I_{E7}) bestimmt. Die anderen Signale werden nicht in Betracht gezogen. Mit folgender Gleichung kann den Polymerisationsgrad $n_{E4,5}$ des Monomers $E_{4,5}$ im Polymer berechnet werden.^[159]

$$n_{E4,5} = \frac{I_{E7} m_{S1} n_{S1}}{I_{S1} m_{E7}} \quad \text{Gleichung 3.22}$$

wobei m_{S1} die Anzahl der Protonen des Starters S1 (9-H,) und n_{S1} die Wiederholungseinheit des Starters im Polymer sind. Mit $n_{E4,5}$ kann nun das Zahlenmittel der Molmasse $M_{n,NMR}$ des Polymers berechnet werden.

$$M_n = n_{S1}M_{S1} + n_{E4,5}M_{E4,5}$$

Gleichung 3.23

wobei M_{S1} und $M_{E4,5}$ jeweils die Molmasse des Starters bzw. des Monomers ist. Das Polymer sollte theoretisch aus 40 Wiederholungseinheiten bestehen, somit ergibt sich eine theoretische Molmasse M_{theo} des Polymers von $12200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabelle 3.7. Experimentelle und errechnete Umsätze U und mittlere Molmasse der Polymeren aus dem Rohrprodukt. $n_{E4,5}$: Polymerisationsgrad; $U_{max,NMR}$: maximaler Umsatz bestimmt aus den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen; M_n : zahlenmittlere Molmasse; M_n/M_{theo} : Verhältnis aus der zahlenmittleren Molmasse und theoretische Molmasse; k_{app} : scheinbare Geschwindigkeitskonstante.

	$U_{max,NMR}$ %	$n_{E4,5}$	M_n $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	M_n/M_{theo} %	k_{app} h^{-1}	k_{app}^* h^{-1}
DMSO, Cu(I)/Bpy	99	39	11900	97	$0,70 \pm 0,08$	0,89
DMSO, Cu(I)/PMDETA	76	27	8100	69	$1,7 \pm 0,3$	7,64
DMF, Cu(I)/Bpy	57	31	9700	79	$0,541 \pm 0,008$	0,250
DMF, Cu(I)/PMDETA	78	29	9100	74	$0,95 \pm 0,06$	1,75
MeOH, Cu(I)/Bpy	35	5	1800	15	$0,58 \pm 0,04$	0,21

*Literaturdaten.^[132]

Aus dem Verlauf der Kurven kann man entnehmen, dass nach ca. 6 h die ATRP in allen Ansätzen der maximale Umsatz erreicht ist. Die Werte des maximalen Umsatzes, die aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Rohprodukte der Polymerisation des Monomers $E_{4,5}$ mit Hilfe von Gleichung 3.16 ($U_{max,NMR}$) errechnet wurden und die aus der Anpassung der Datenpunkte aus dem Diagramm in der Abbildung 3.15 mit Hilfe der logarithmierten Gleichung 3.21 erhaltenen k_{app} -Werte werden in der Tabelle 3.7 aufgelistet. Die Polymerisation mit dem höchsten Umsatz wird in DMSO mit dem Katalysator/Ligand-Komplex Cu(I)/Bpy erzielt. Die k_{app} -Werte sind für die PMDETA-Systeme höher als für die Bpy-Systeme. Des Weiteren liegen die k_{app} -Werte in der gleichen Größenordnung wie die von *Bergenudd et al.*^[132] berichteten Werte und zeigen die gleiche Tendenz. Die Experimente haben somit gezeigt, dass bei der ATRP von $E_{4,5}$ in DMSO und Cu(I)/Bpy mit einem $U_{max,NMR}$ von 99% fast alle $E_{4,5}$ -Monomere in die Polymerkette eingebaut wurden.

3.4.1.3. Copolymerisationsversuche

Die in den Optimierungsexperimenten in den Abschnitten 3.4.1.1 und 3.4.1.2 ermittelten Polymerisationsbedingungen für die ATRP von E_{4,5} wurden im Folgenden auf Copolymerisationsexperimente mit 80 mol% E_{4,5} und 20 mol% CORM-*i*Ea angewandt. Dabei ist zunächst zu prüfen, ob sich das CORM-*i*Ea in die Polymerkette einbauen lässt. Die Copolymerisation wird unter drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt: In *d*₆-DMSO mit CuBr/Bpy, CuBr/PMDETA, und in DMF mit CuBr/PMDETA. Als Starter der Polymerisation dient *tert*-Butyl-2-bromisobutyrate. Nach ca. 24 h wurde die Reaktion durch Luftzufuhr beendet. Über die Zeit wurde der Polymerisationsansatz in *d*₆-DMSO mit Cu(I)/Bpy blutrot, während die anderen beiden Polymerisationsansätze grüngelb wurden. Über die Zeit ändert sich die Farbe von grüngelb zu grüngelbbraun. Es ist anzumerken, dass bei der Verwendung von PMDETA als Ligand die Farbänderungen schwierig zu verfolgen ist, da die grünlichen Farbtöne schwer zu unterscheiden sind.

Die Polymerisationsprodukte wurden mittels 300 MHz ¹H-NMR analysiert und daraus der Umsatz und die mittlere Molmasse der Polymere bestimmt. Am Beispiel des ¹H-NMR-Spektrums in Abbildung 3.16 sind die ¹H-Signale der Monomere und die des Polymeren PE_{4,5} zu erkennen, jedoch nicht die des polymerisierten ET-CORM (s. Anhang, Abbildung 7.1 für das ¹H-NMR-Spektrum von CORM-*i*Ea). Bei den Copolymerisationsversuchen bildet sich eindeutig PE_{4,5}. Wie aus zu entnehmen ist, sind die Umsätze und die Polymerisationsgrade der erhaltenen Copolymere niedrig. Anhand des ¹H-NMR-Spektrums in Abbildung 3.16 kann der Rückschluss gezogen werden, dass CORM-*i*Ea nicht in die Polymerkette eingebaut wird. In Abbildung 3.17 werden die Umsätze der Polymerisation und Copolymerisation als Block-Diagramm dargestellt, um zu verdeutlichen, wie stark der Umsatz an E_{4,5}-Monomer zum Polymer in Anwesenheit von CORM-*i*Ea sinkt (Gleichung 3.16). Der Umsatz der Polymerisation des CORM-*i*Ea kann nicht bestimmt werden, da im ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes keine ¹H-Signale zu beobachten sind, die für den Einbau des CORM-*i*Ea in der Polymerkette sprechen. Somit wurde das Polymer gereinigt und nochmals mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht.

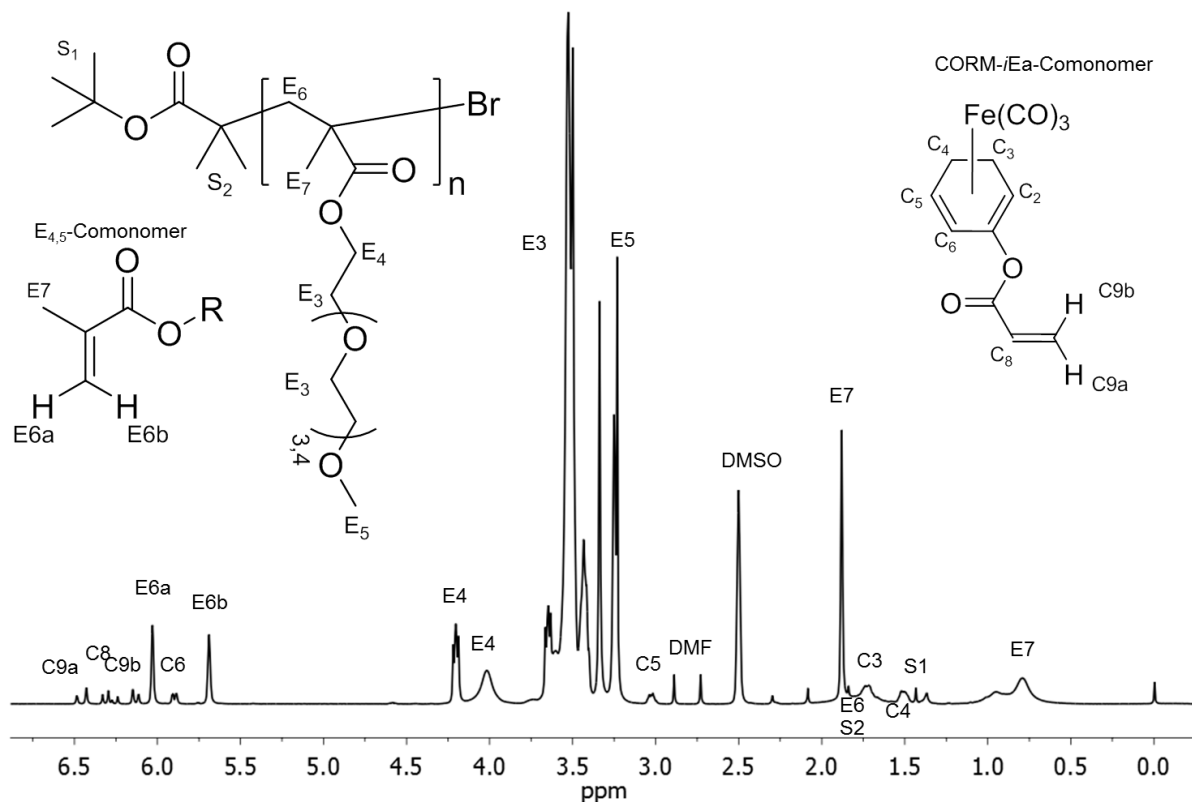


Abbildung 3.16. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes bei der Copolymerisation von 80 mol% E_{4,5} und 20 mol% CORM-iEa in DMF, Cu(I)/Bpy Mischung aufgenommen bei 25 °C in d₆-DMSO.

Tabelle 3.8. (A) Homopolymerisation von E_{4,5}. (B) Copolymerisation mit E_{4,5} und CORM-iEa. n_{E_{4,5}}: Polymerisationsgrad; U_{NMR}: Umsatz bestimmt aus den ¹H-NMR-Signalen; M_{n,NMR}: zahlenmittlere Molmasse bestimmt aus den ¹H-NMR-Signalen.

	U _{NMR} / %		n _{E_{4,5}}		M _{n,NMR} / gmol ⁻¹	
	A	B	A	B	A	B
DMSO, Cu(I)/Bpy	99	17	65	10	19663	3212
DMSO, Cu(I)/PMDETA	77	21	50	19	15223	5824
DMF, Cu(I)/Bpy	63	23	51	20	15457	6159

Die Rohprodukte wurden in Diethylether ausgefällt und gewaschen. Über eine Aluminiumoxidsäule werden sie von Kupfer getrennt. Falls das CORM-iEa in die PE_{4,5}-Polymerkette eingebaut wurde, sollte es nach der Isolierung des Polymers im ¹H-NMR-Spektrum sichtbar sein. Wie das ¹H-NMR-Spektrum in Abbildung 3.18 zeigt, sind keine ¹H-Signale des ET-CORM zu erkennen, sondern nur die des Polymers aus PE_{4,5}.

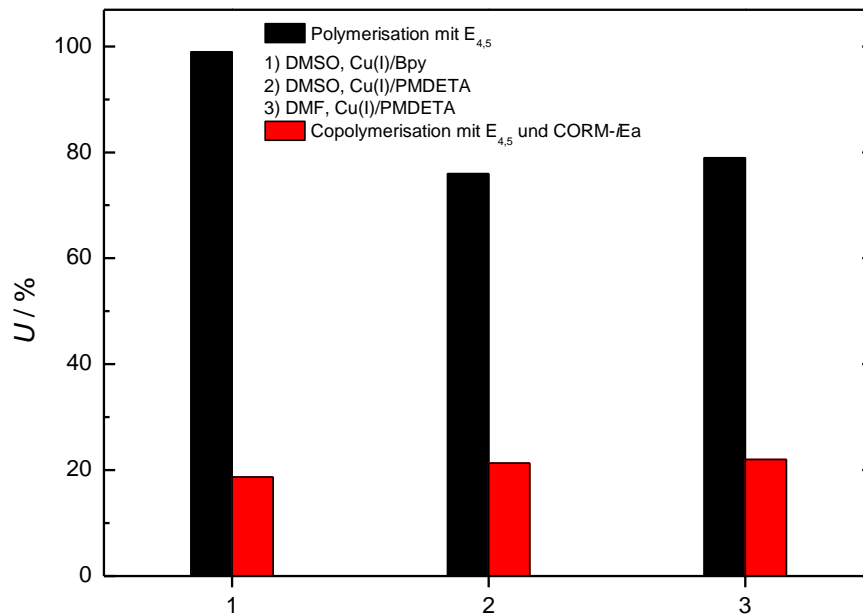


Abbildung 3.17. Vergleich der Umsätze U_{NMR} der ATRP mit $E_{4,5}$ und der Copolymerisation mit $E_{4,5}$ und CORM-iEa.

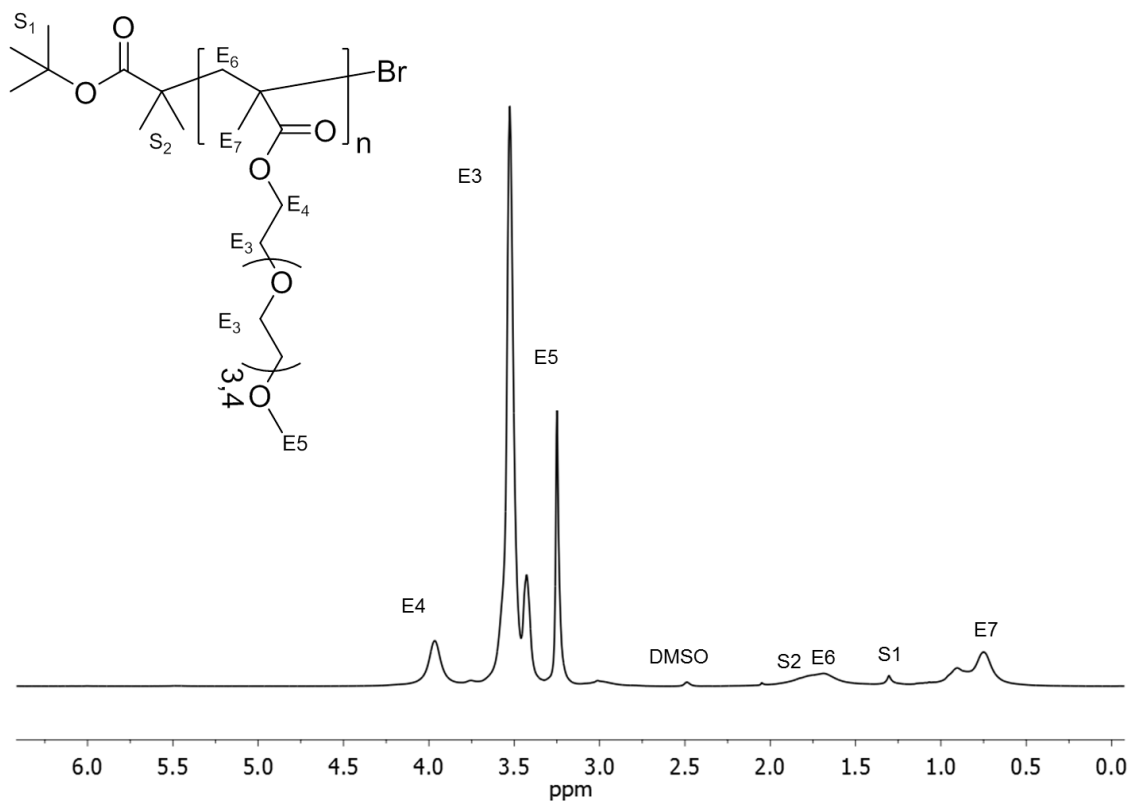
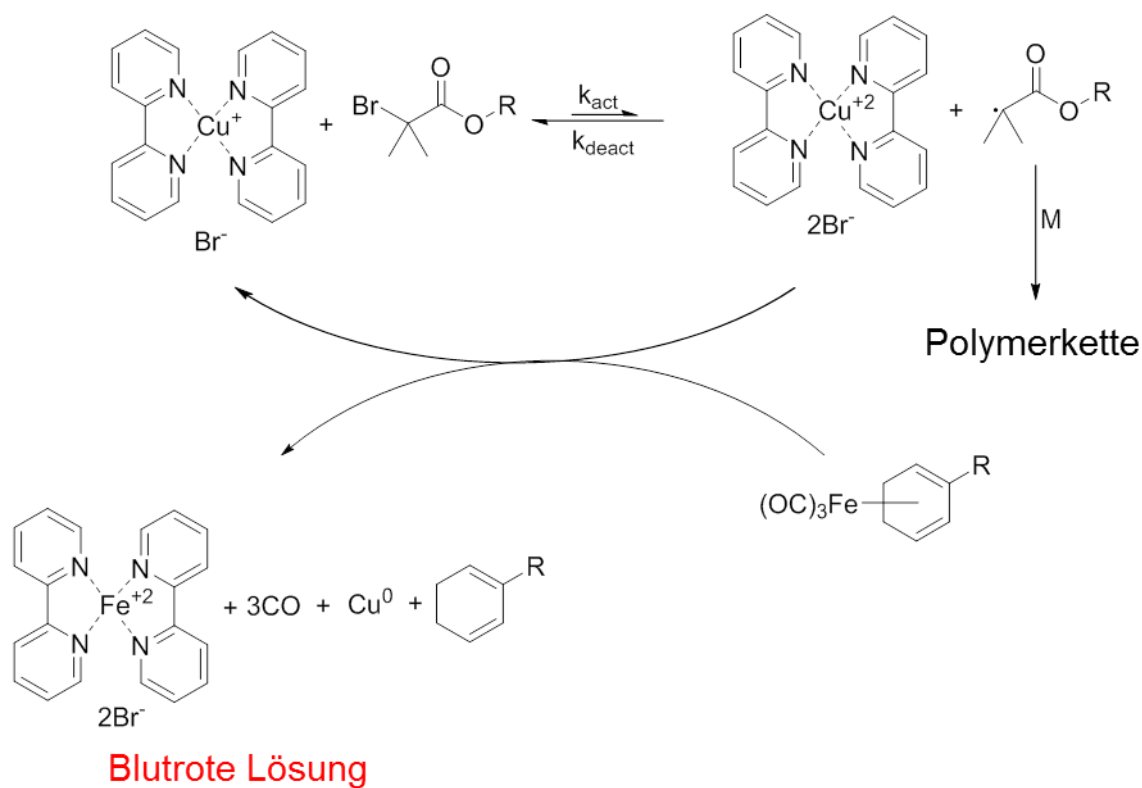


Abbildung 3.18. 300 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produktes der Copolymerisation von 80 mol% $E_{4,5}$ und 20 mol% CORM-iEa aufgenommen bei 25 °C in d_6 -DMSO.

3.4.1.4. Schlussfolgerung über die Beobachtungen und Untersuchungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stabilität des Fe-Komplexes im CORM-*iEa*-Molekül während der ATRP herabgesetzt wurde. Bei den Copolymerisationen von CORM-*iEa* und $E_{4,5}$ in DMSO mit Cu(I)/Bpy wurde die Lösung bei fortschreitender Polymerisation blutrot. Diese Farbe wurde auch im Farbttest beobachtet und deutet darauf hin, dass sich Fe^{2+} -Ionen bilden (Tabelle 3.5). Der niedrige Umsatz von $E_{4,5}$ zu $PE_{4,5}$ kann in den Copolymerisationsexperimenten auch auf eine erhöhte Bildung von Fe^{2+} -Ionen, wie in Schema 3.9 verdeutlicht wird, zurückgeführt werden. Die Freisetzung des Eisens interferiert im Gleichgewicht zwischen den Cu(I)- und Cu(II)-Spezies, indem Cu(II) das Fe(0) zu Fe(II) oxidiert und Cu(II) zu Cu(0) reduziert wird ($Cu/Cu^{2+} = +0,35$ V, $Cu^+/Cu^{2+} = +0,16$ V und $Fe/Fe^{2+} = -0,41$ V),^[9] somit wird schrittweise die Menge an Cu-Katalysator in der Lösung herabgesetzt. Die Anwesenheit von zwei Metallen stört das Gleichgewicht zwischen oxidierter und reduzierter Form des Katalysators, das für die ATRP wesentlich ist. Die Untersuchungen haben somit gezeigt, dass das CORM-*iEa* durch die ATRP nicht in eine Polymerkette eingebaut werden kann.

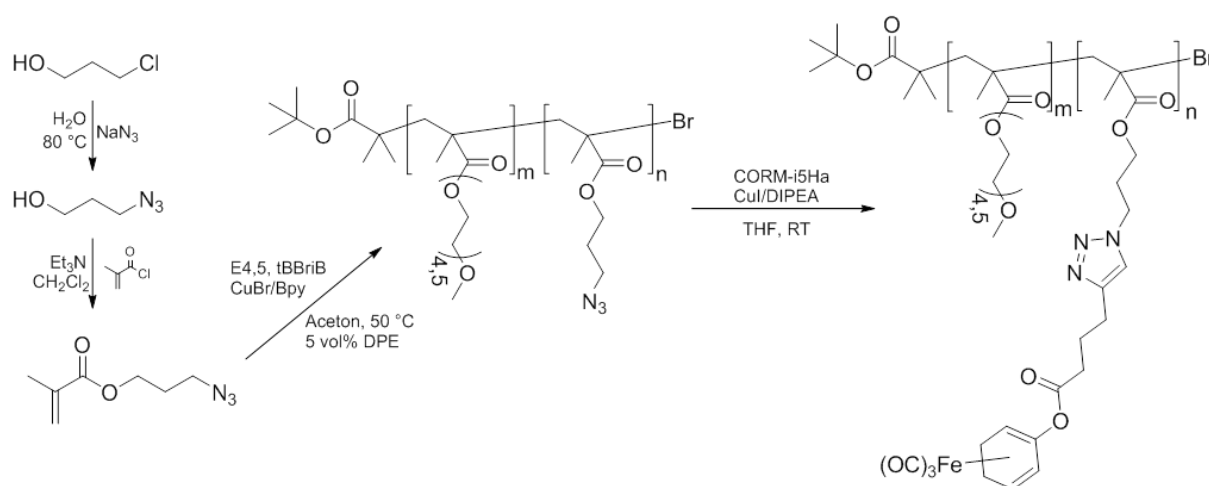


Schema 3.9. Möglicher Mechanismus der Oxidation des Fe-Atoms nach dem Zerfall des ET-CORM-Komplex und dessen erneuter Komplexierung mit Bpy in einer DMSO Lösung.

3.4.2. Funktionalisierung von Copolymeren aus $E_{4,5}$ und AzPMA mit dem CORM-*i*5Ha

Für die Synthese von Polymeren, die bei der CuAAC Verwendung finden, wurden, wie in der Literatur beschrieben wird,^[133] Monomere mit Acetylen- oder Azid-Gruppen via ATRP polymerisiert. Diese Syntheseroute kann eine Alternative zu der direkten Polymerisation des CORM-*i*Ea mittels ATRP darstellen.

Das Schema 3.10 zeigt die vierstufige Synthese des Copolymers $PE_{4,5}A_x(C)$ mit χ mol% an AzPMA (A).^[74] Zuerst wurde 3-Azidopropanol (AzPOH) aus 3-Chloropropanol und Natriumazid hergestellt. Durch die Veresterung der Alkohol-Gruppe mit Methacryloylchlorid wird das Monomer AzPMA erhalten.^[74] Anschließend findet mittels ATRP die Copolymerisation von AzPMA und $E_{4,5}$ in Aceton statt. Das Endprodukt wird durch Modifizierung des Copolymers durch CuAAC erhalten.



Schema 3.10. Synthese von AzPMA,^[74] dessen Copolymerisation mittels ATRP mit $E_{4,5}$ und Modifizierung des Copolymers $PE_{4,5}A_x$ zu $PE_{4,5}A_x(C)$ mittels CuAAC.

3.4.2.1. Synthese und Charakterisierung vom Monomer AzPMA

Die Substitution des Chlor-Atoms vom 3-Chloropropanol durch eine Azid-Gruppe wurde über eine Phasentransferkatalyse mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat durchgeführt. Die Reaktion von 3-Azidopropanol (AzPOH) mit 1,2 äquivalenten Methacryloylchlorid führt schließlich zur Bildung des Monomers 3-Azidopropylmethacrylat (AzPMA) (s. Abschnitt 5.3.3.1).

Das Produkt wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ - und IR-Spektroskopie untersucht. Das IR-Spektrum in Abbildung 3.19 stellt die Schwingungsbanden des synthetisierten Produktes dar. Die Bande bei 2100 cm^{-1} kann der ν_{N_3} -Bande zugeordnet werden, und weist auf die Bildung des gewünschten Monomers hin.

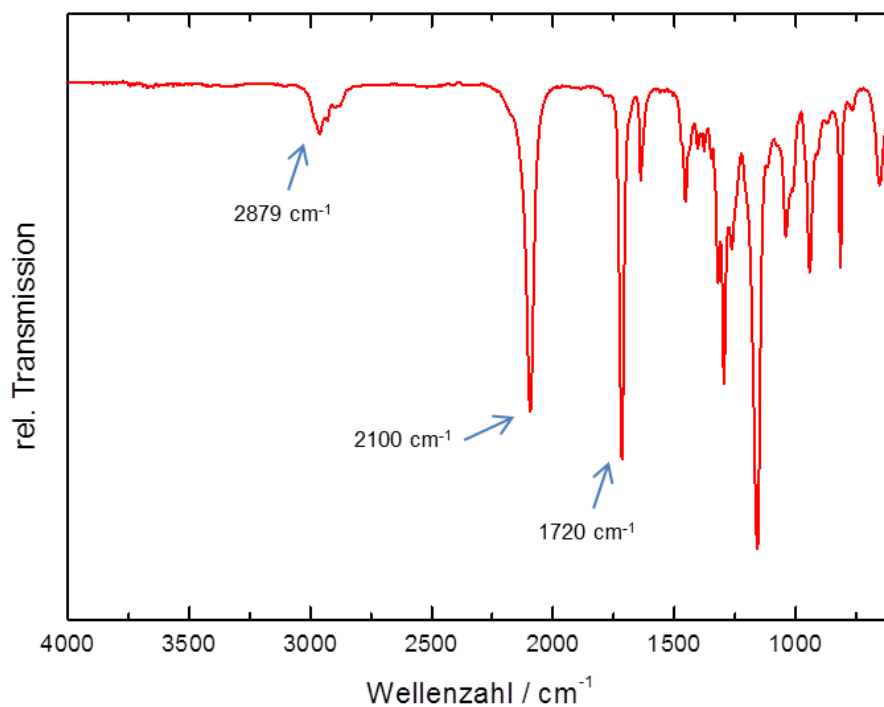


Abbildung 3.19. ATR-IR-Spektrum von 3-Azidopropylmethacrylat.

Ein weiterer Hinweis auf die Bildung des gewünschten Produktes stellt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in Abbildung 3.20 dar.^[74] Für ein Methacrylat ist die charakteristische Aufspaltung der ^1H -Signale bei 6,11 und 5,58 ppm zu erkennen. Darüber hinaus verschiebt sich das ^1H -Signal A3 (3,74 ppm) des Eduktes (3-Azidopropanol, s. Anhang Abbildung 7.3) mit 4,24 ppm bei der Bildung des Produktes im Tieffeldbereich, da die hohe Elektronegativität der Carbonsäure im 3-Azidopropylmethacrylat-Molekül die Entschirmung der Protonen des ^1H -Signals A3 verursacht. Die Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und die ν_{N_3} -Bande im IR-Spektrum bestätigen die Bildung des erwünschten Produktes.

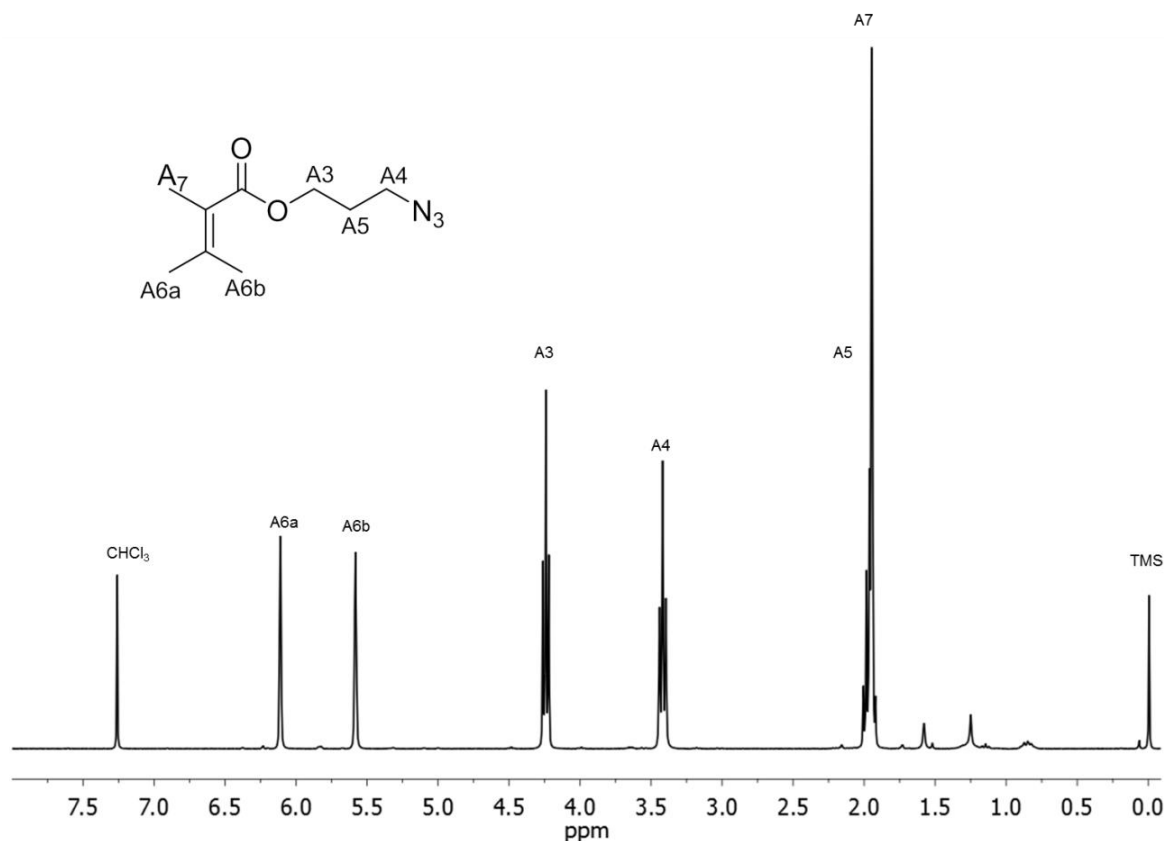


Abbildung 3.20. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 3-Azidopropanol bei 25 °C in CDCl_3 .

3.4.2.2. Synthese und Charakterisierung des Homopolymers aus AzPMA

Um die Protonen der AzPMA-Einheit im Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{A}_\chi$ im ^1H -NMR-Spektrum zu zuordnen (s. Abschnitt 3.4.2.3), wurden Homopolymere aus AzPMA mittels Cu-katalysierter ATRP in Aceton mit zwei Äquivalenten Bpy bei 50 °C synthetisiert. Als Starter diente *t*BBriB. Die Homopolymere wurden in Diethylether ausgefällt, ebenfalls mit Diethylether gewaschen, über eine Aluminiumoxidsäule vom Kupfer getrennt und durch 1D- und 2D-NMR-Spektren untersucht. Mit Hilfe des ^{13}C -NMR-Spektrums (Abbildung 3.21A) wurden die Kohlenstoff-Atome beginnend mit dem C_q -Kohlenstoff bei 170,8 ppm im Polymer mit A1 bis A7 nummeriert. Alle ^{13}C -Signale konnten zugeordnet werden. Des Weiteren wurden mit Hilfe des HMQC-Spektrums in Abbildung 3.21B die ^{13}C -Atome zu den jeweiligen ^1H -Signalen zugeordnet. Das A7 ^{13}C -Signal konnte nur zu dem ^1H -Signal bei 1,5 ppm zugeordnet werden, jedoch nicht zum ^1H -Signal bei 0,9 ppm. Bei den HMQC-Spektren können die Signalintensitäten stark von der ^1H -Off-Resonance-Entkopplung und von den Unterschieden der Kopplungskonstanten beeinflusst werden.^[160] Besondere Pulsverfahren stehen zur

Verfügung, um die Intensitäten der Signale zu steigern.^[150,161] Da bei der Messung des HMQC-Spektrums das Routineverfahren verwendet wurde, zeigen alle breiten ^1H -Signale vom Polymer PA im 2D-Spektrum eine geringe Intensität.

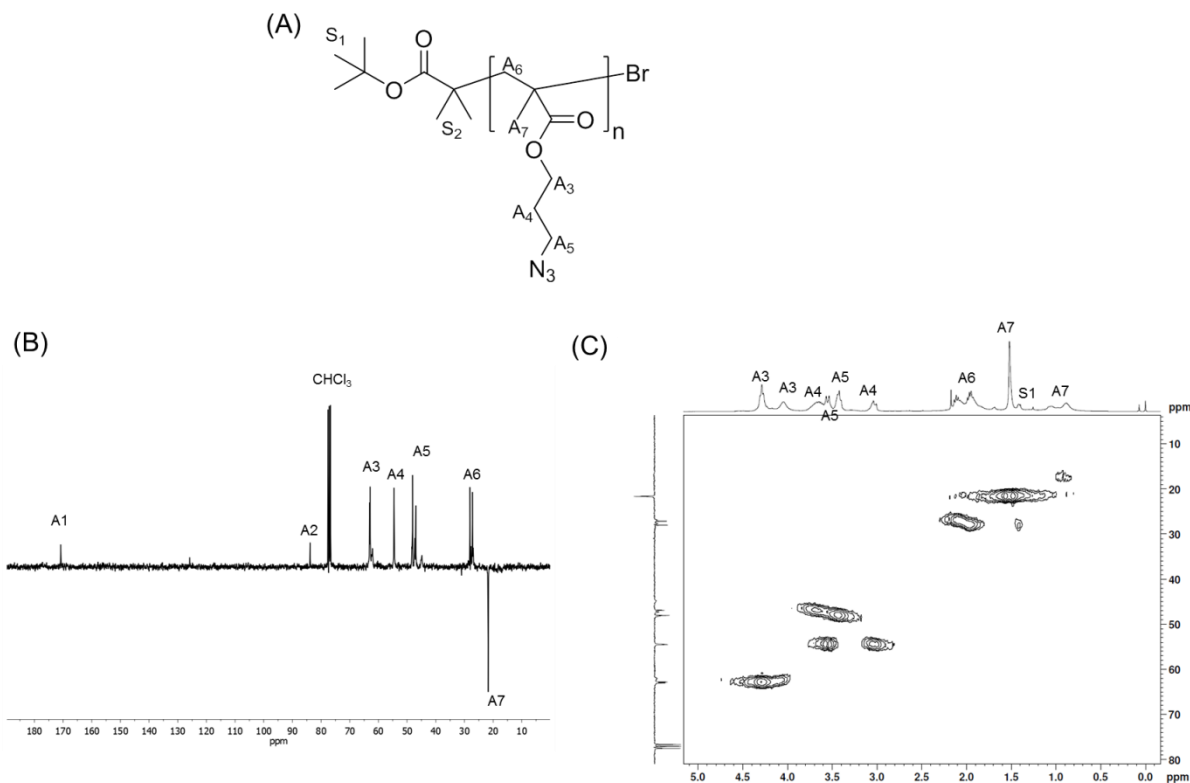


Abbildung 3.21. (A) Molekülstruktur des Polymers PA. (B) 300 MHz ^{13}C -NMR-Spektrum und (C) 300MHz H,C-korreliertes Spektrum von PA mit dem HMQC-Verfahren bei 25 °C in CDCl_3 aufgenommen.

3.4.2.3. Synthese und Charakterisierung der Copolymere aus $\text{E}_{4,5}$ und AzPMA

Die Copolymere $\text{PE}_{4,5}\text{A}_\chi$ wurden mittels ATRP hergestellt. Der molare Anteil (χ mol%) von AzPMA zu $\text{E}_{4,5}$ im Copolymer wurde jeweils auf 20 mol%, 10 mol% und 5 mol% eingestellt. Als Katalysator wurde CuBr, das mit zwei Äquivalenten Bpy komplexiert wurde, verwendet. Als Starter diente *t*BBriB. Die Polymerisation wurde bei 50 °C in Aceton durchgeführt.^[74] Die Polymere wurden in Diethylether ausgefällt und gewaschen sowie über eine Aluminiumoxidsäule vom Kupfer getrennt.

Struktur und Zusammensetzung der Polymere wurden mittels IR- und ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht. Das IR-Spektrum in Abbildung 3.22 zeigt eine Bande bei 2100 cm^{-1} , die der Azido-Gruppe zugeordnet werden kann. Dies deutet auf eine erfolgreiche

Copolymerisation hin. Die IR-Spektren der anderen Copolymere sind mit dem gezeigten Spektrum qualitativ identisch.

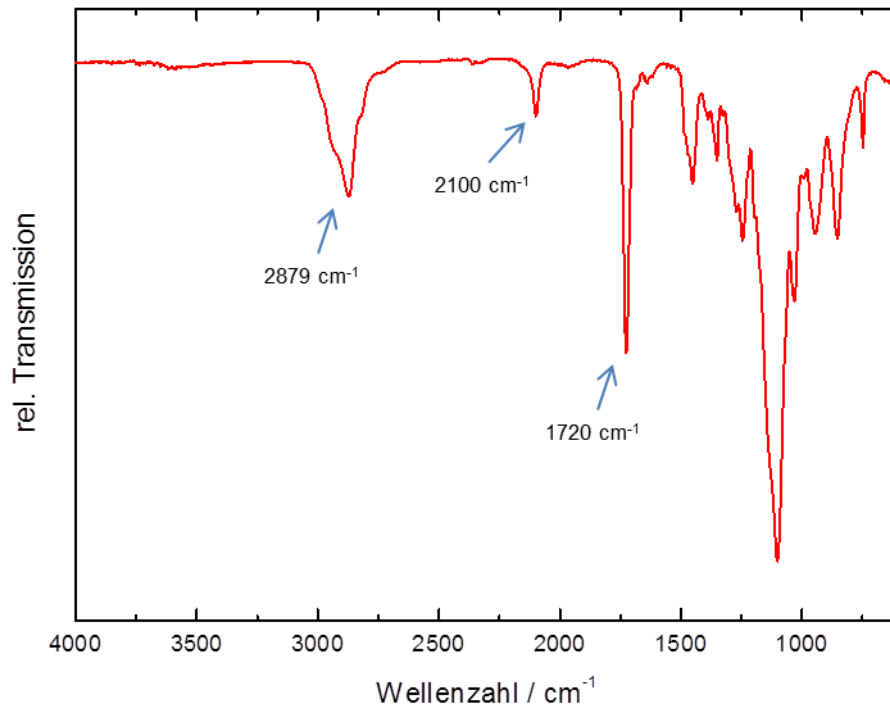


Abbildung 3.22. ATR-IR-Spektrum von $PE_{4,5}A_{20\%}$ mit 20 mol% AzPMA.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind eindeutig die ^1H -Signale von $E_{4,5}$ zu sehen (Abbildung 3.23). Anhand der Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums vom Homopolymer PA können die ^1H -Signale von AzPMA identifiziert werden (s. Abschnitt 3.4.2.2).

Aus der Analyse der Rohprodukte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie der drei hergestellten Copolymere wurde der Umsatz ermittelt, der über 99% liegt (Gleichung 3.24).

$$U_{\text{NMR}} = \frac{\frac{I_{E7,A7}}{m_{E7,A7}}}{\frac{I_{E6a,A6a}}{m_{E6a,A6a}} + \frac{I_{E7,A7}}{m_{E7,A7}}} \quad \text{Gleichung 3.24}$$

wobei $I_{E7,A7}$ und $I_{E6a,A6a}$ die Intensitäten der ^1H -Signale und $m_{E7,A7}$ und $m_{E6a,A6a}$ die Anzahl der Protonen der Signale E7, A7, E6a und A6a sind.

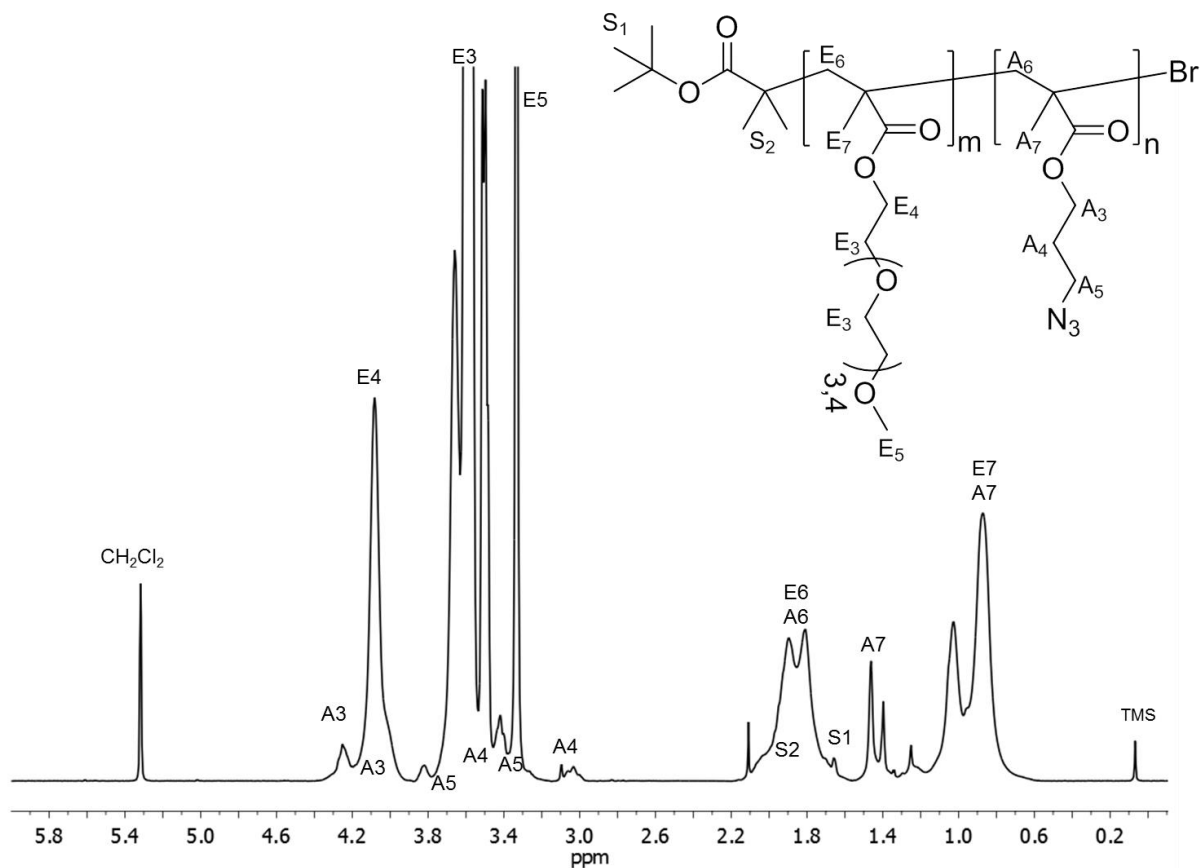


Abbildung 3.23. 600 MHz ¹H-NMR-Spektrum von PE_{4,5}A_{20%} bei 25 °C in CD₂Cl₂.

Der Anteil an eingebauten AzPMA wurde mit Hilfe des ¹H-NMR-Spektrums des jeweiligen Copolymers experimentell bestimmt. Da die ¹H-Signale der beiden Comonomere nicht voneinander getrennt aufgelöst werden können, wurden bestimmte ¹H-Signale der Copolymere in vordefinierte Bereiche unterteilt und deren Integrale bestimmt. Die Intensität I_1 ist die der ¹H-Signale der AzPMA- und E_{4,5}-Einheiten zwischen ca. 4,5 und 3,5 ppm. Die Intensitäten der ¹H-Signale sind daher proportional zum Anteil von AzPMA und E_{4,5} in der Copolymerkette (Gleichung 3.25 und Gleichung 3.26).

$$I_1 = 2n_{E_{4,5}} + 2n_A \quad \text{Gleichung 3.25}$$

$$I_2 = 19n_{E_{4,5}} + 4n_A \quad \text{Gleichung 3.26}$$

wobei $n_{E_{4,5}}$ und n_A die jeweiligen Stoffmengen der beiden Comonomere sind. Der Anteil an AzPMA im Copolymer kann mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\chi_{A,NMR} = \frac{n_A}{n_A + n_{E4,5}} \quad \text{Gleichung 3.27}$$

In der Tabelle 3.9 sind die theoretischen und experimentellen Werte von χ_A aufgelistet. Die Werte zeigen eine gute Übereinstimmung. Auch der hohe Umsatz bestätigt den nahezu vollständigen Einbau der beiden Comonomere in die Copolymere. Des Weiteren wurden die mittleren Molmassen $M_{n,GPC}$ und $M_{w,GPC}$ der Copolymere mittels GPC bestimmt. Durch die Analyse der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren kann die Molmasse $M_{n,NMR}$ des Copolymers nicht bestimmt werden, da die ^1H -Signale des Starters von anderen ^1H -Signalen überlagert werden. $M_{n,theo}$ und $M_{n,GPC}$ weisen Differenzen auf.

Tabelle 3.9. Zusammensetzung und Molmassen der Copolymere mit unterschiedlichem Anteil an AzPMA. $\chi_{A,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer; $\chi_{A,NMR}$: Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer bestimmt aus den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen; U_{NMR} : Umsatz bestimmt aus den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen; $M_{n,theo}$: theoretische zahlenmittlere Molmasse; $M_{n,GPC}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC; $M_{w,GPC}$: massenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC; PDI: Polydispersitätsindex.

Substanz	$\chi_{A,theo}$ %	$\chi_{A,NMR}$ %	U_{NMR} %	$M_{n,theo}$ g/mol	$M_{n,GPC}$ g/mol	$M_{w,GPC}$ g/mol	PDI
PE _{4,5} A _x	20	20,5	98,1	10952	14200	23700	1,6
	10	10,3	99,6	11699	13200	17200	1,3
	5	5,5	99,7	11961	22000	29700	1,4

3.4.2.4. Synthese und Charakterisierung der ET-CORM-tragenden Copolymere

Die erhaltenen Azid-funktionalen Copolymere können anschließend mit Hilfe der CuAAC weiter funktionalisiert werden (Schema 3.6).^[75,133,156] An diese Copolymere soll das CORM-*i*5Ha, das eine Propargyl-Gruppe trägt, mittels CuAAC angeknüpft werden (Schema 3.7). Die Durchführung der Reaktion erfolgte in THF unter Argon-Atmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur. Als Katalysator/Ligand-Komplex wurde CuI/DIPEA in einem Verhältnis von 1:68 verwendet. Das Rohprodukt wurde mit Diethylether ausgefällt, mehrmals gewaschen und über eine Aluminiumoxidsäule vom Kupfer getrennt.

Die Bildung des Produkts wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ und IR-Spektroskopie überprüft. Abbildung 3.24 zeigt das IR-Spektrum des modifizierten Copolymers mit 20 mol% AzPMA. Die Azid-Bande bei 2100 cm^{-1} ist nicht mehr vorhanden, was auf eine erfolgreiche Modifizierung weist.

Zudem sind bei 2044 und 1952 cm^{-1} die Schwingungsbanden des $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexes zu sehen. Die IR-Spektren der anderen Copolymere stimmen mit dem gezeigten Spektrum qualitativ überein.

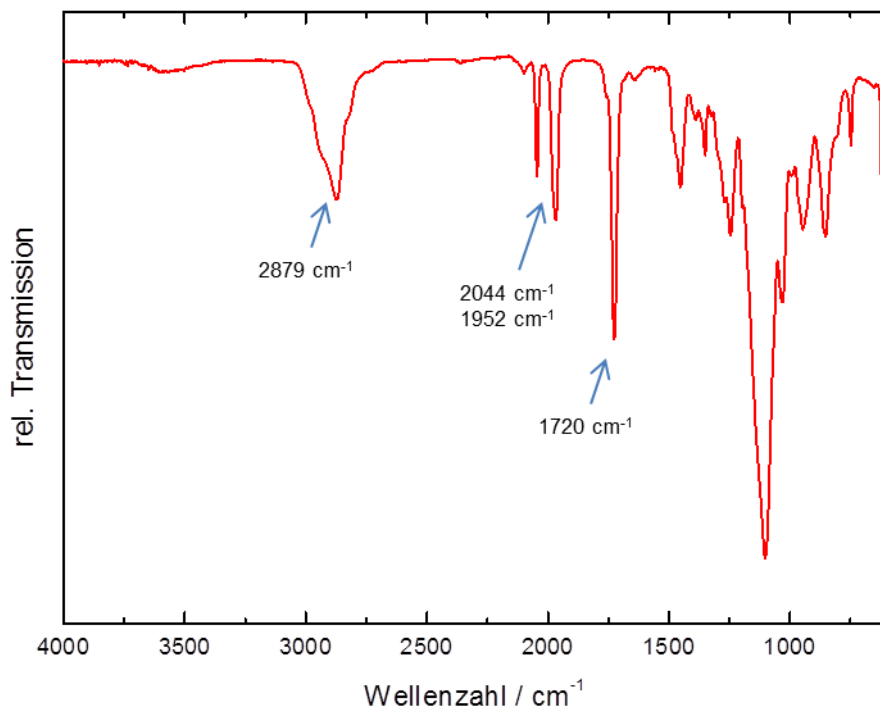


Abbildung 3.24. ATR-IR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}(\text{C})$ mit 20 mol% AzPMA.

Bei der Bildung des Triazol-Rings verschiebt sich das C12 ^1H -Signal bei 1,98 ppm im ^1H -NMR-Spektrum vom CORM-*i*5Ha in den Tieffeldbereich (s. Anhang für das ^1H -NMR-Spektrum vom CORM-*i*5Ha). Das ^1H -NMR-Spektrum von Abbildung 3.25 zeigt das modifizierte Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}(\text{C})$ mit 20 mol% AzPMA. Das C2-Signal bei 5,53 ppm gehört zu dem Cyclohexadien-Ring des CORM-*i*5Ha. Außerdem sind weitere ^1H -Signale des CORM-*i*5Ha im ^1H -NMR-Spektrum zu erkennen: Bei 2,82 ppm und 2,53 ppm sind die C3 und C8 ^1H -Signale zu sehen. Das ^1H -Signal von C12, das zum Proton des Triazol-Rings gehört, ist bei 7,48 ppm zu finden. Dieses ^1H -Signal weist eine niedrige Intensität auf, jedoch kann es im ^1H -NMR-Spektrum, das in D_2O aufgenommen wurde, eindeutig zugeordnet werden (s. Anhang Abbildung 7.4).

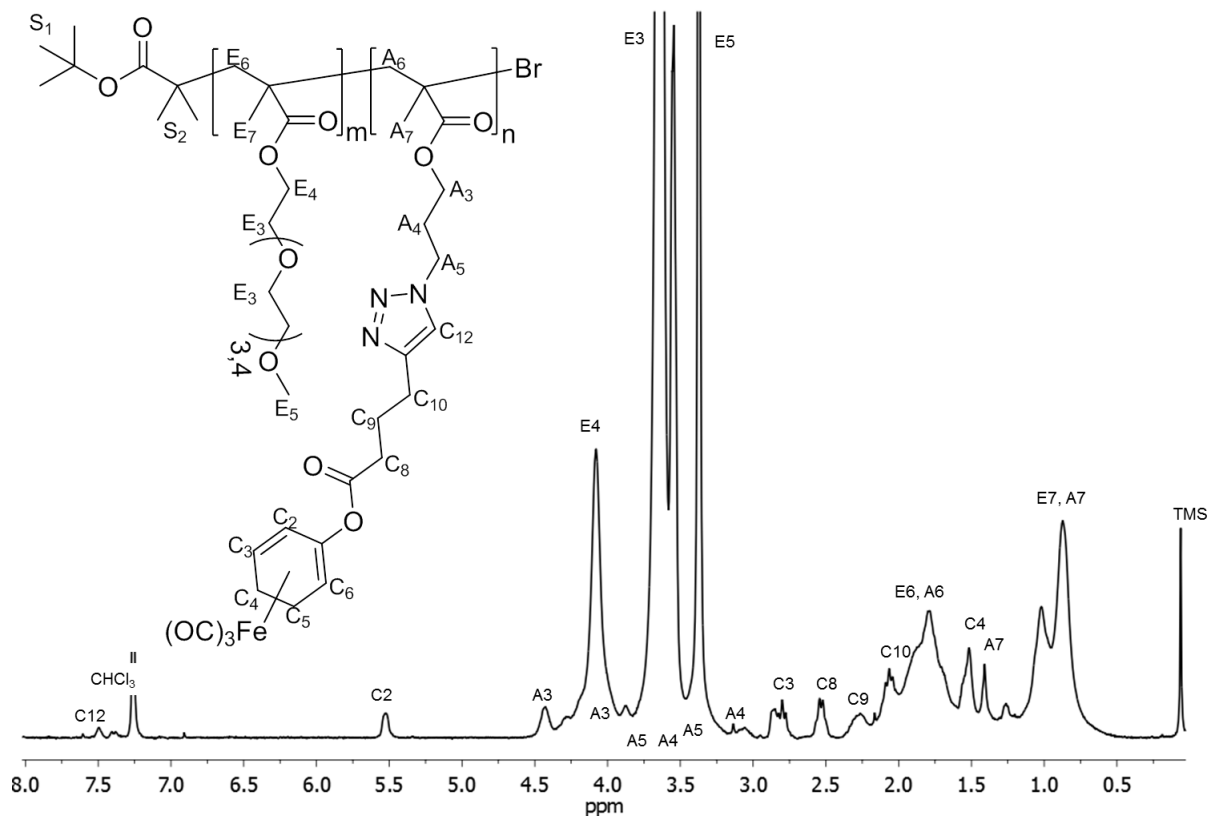


Abbildung 3.25. 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}(\text{C})$ mit 20 mol% AzPMA in CDCl_3 . Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist vergrößert, um die ^1H -Signale von AzPMA und CORM-*i*5Ha im Copolymer besser sichtbar zu machen.

Der Anteil an eingebauten CORM-*i*5Ha $\chi_{C,NMR}$ wurde mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der jeweiligen Copolymere experimentell bestimmt. Da die ^1H -Signale der beiden eingebauten Monomere nicht voneinander getrennt aufgelöst werden können, wird in einem zum Vorgehen in Abschnitt 3.4.2.3 analogen Verfahren bestimmt.

$$I_1 = 2n_{E4,5} + 2n_A \equiv n_{E4,5,A} \quad \text{Gleichung 3.28}$$

$$I_3 = 1H_C n_C \quad \text{Gleichung 3.29}$$

Der Anteil an ET-CORM $\chi_{C,NMR}$ im Copolymer ergibt sich somit zu:

$$\chi_{C,NMR} = \frac{2I_3}{I_1} \quad \text{Gleichung 3.30}$$

In der Tabelle 3.10 sind die theoretischen und experimentellen Werte von χ_C aufgelistet. Es gibt Differenzen zwischen den theoretischen und experimentellen Werten. Der Umsatz $U_{C,NMR}$

der CuAAC wurde aus dem Verhältnis von $\chi_{C,NMR}$ und $\chi_{C,theo}$ bestimmt. Die Reaktion war umso effektiver, je kleiner der Anteil von χ_A war.

Tabelle 3.10. Vergleich der Zusammensetzung der Copolymere mit unterschiedlichem Anteil an AzPMA. $\chi_{A,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer; $\chi_{A,NMR}$: Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $\chi_{C,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an CORM-i5Ha im Copolymer; $\chi_{C,NMR}$: Stoffmengenanteil an CORM-i5Ha im Copolymer bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $U_{C,NMR}$: Umsatz an CORM-i5Ha bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen.

Substanz	$\chi_{A,theo}$ %	$\chi_{A,NMR}$ %	$\chi_{C,theo}$ %	$\chi_{C,NMR}$ %	$U_{C,NMR}$ %
PE _{4,5} A _{χ} (C)	20	20,5	20	7.2	35,0
	10	10,3	10	6,5	63,5
	5	5,5	5	4,7	85,0

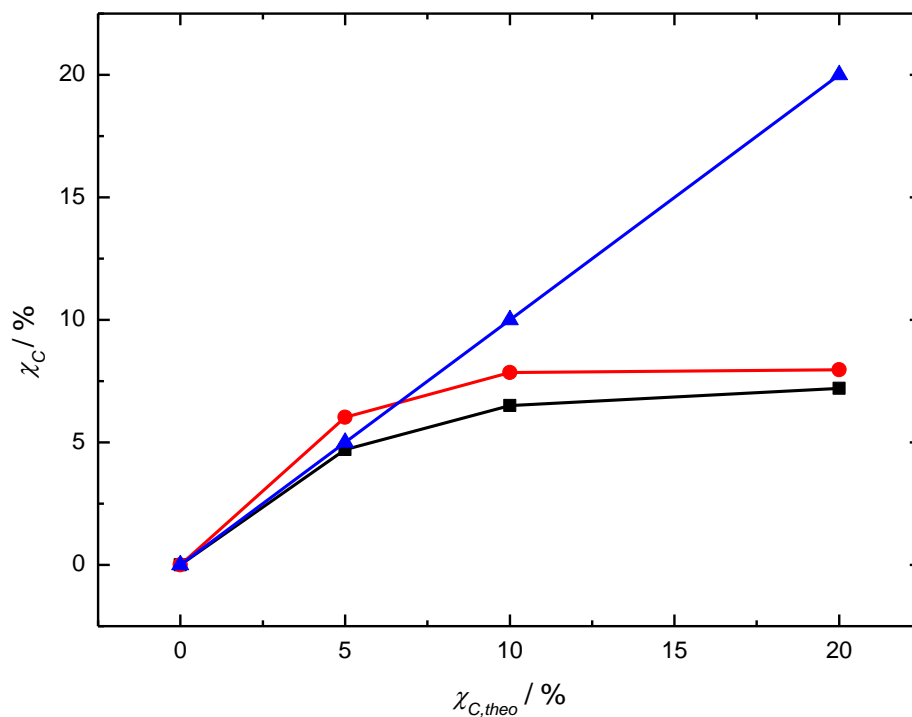


Abbildung 3.26. Auftragung von $\chi_{C,theo}$ gegen die bestimmten experimentellen Anteile $\chi_{C,exp}$ an gebundenen CORM-i5Ha in den Copolymeren PE_{4,5}A _{χ} (C). (blau) $\chi_{C,theo}$; (rot) $\chi_{C,ICP-OES}$; (schwarz) $\chi_{C,NMR}$.

Der Anteil an gebundenen ET-CORM $\chi_{C,ICP-OES}$ im Polymer wurde außerdem durch die Bestimmung des Fe-Gehalts mittels Induktivplasma-gekoppelter Optische Emissionsspektrometrie (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-

OES) ermittelt. In Abbildung 3.26 ist der theoretische Anteil an gebundenem ET-CORM in den Copolymeren gegen die experimentell bestimmten Daten aufgetragen. Das Diagramm zeigt, dass die Daten aus beiden Kurven die gleiche Tendenz aufweisen und annähernd gleich sind. Der maximale CORM-*i*5Ha-Anteil liegt bei ca. 7,5%. Bei den Copolymeren mit 10 mol% und 20 mol% Anteil an AzPMA sind theoretisch 2,5% und 12,5% der Bindungsstellen für den CORM-*i*5Ha frei. Die Analysen bestätigen auch, dass beim Copolymer mit 5 mol% AzPMA alle Bindungsstellen mit ET-CORM besetzt sind. Das Copolymer PE_{4,5}A_{20%}(C) mit 20 mol % AzPMA ist in Wasser nicht löslich. Im Gegensatz dazu lassen sich die anderen beiden Copolymeren mit 5 mol% und 10 mol% AzPMA in Wasser gut lösen. Auch wenn der Anteil an gebundenem ET-CORM bei den Copolymeren ähnlich ist, spielt für die Löslichkeit des Copolymeren in Wasser offenbar auch die Menge an AzPMA eine Rolle, d.h. ein steigender Gehalt an AzPMA im Copolymer erniedrigt dessen Wasserlöslichkeit.

3.4.3. Zusammenfassung und Diskussion

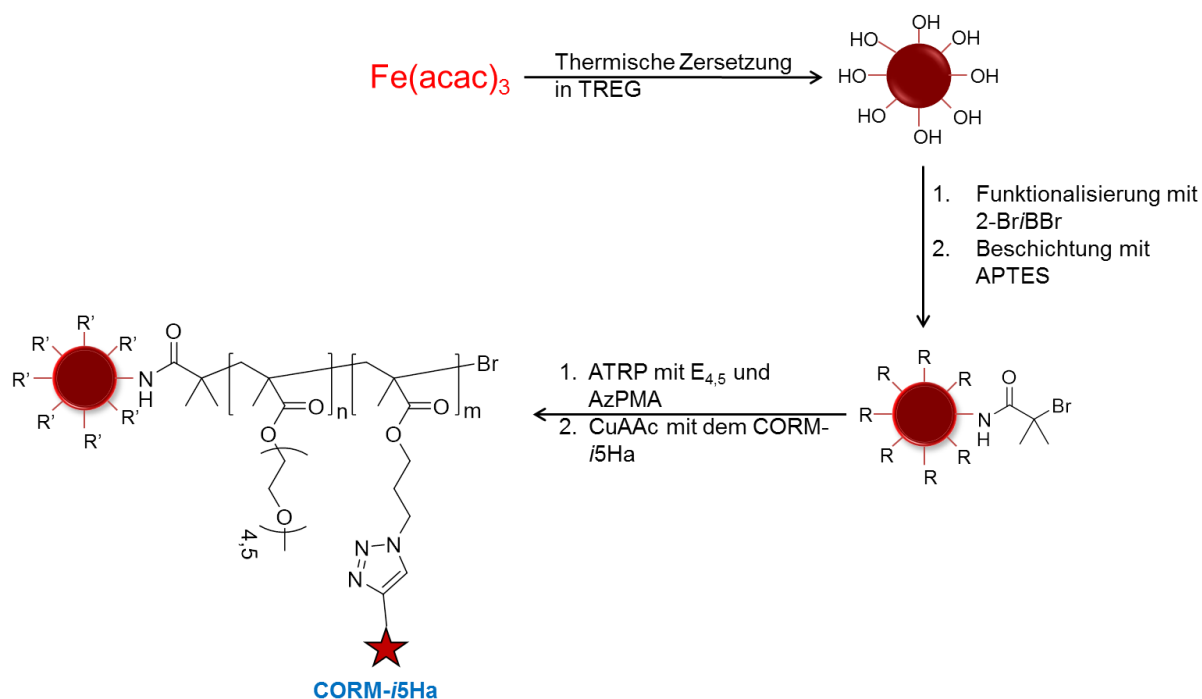
Bei der Herstellung von ET-CORM-tragenden Copolymeren konnte gezeigt werden, dass der Einbau des CORM-*i*Ea-Monomers mittels ATRP aufgrund der Redoxreaktion zwischen dem Cu-Katalysator und dem Eisen im ET-CORM nicht erfolgte. Es findet unter einer Reihe von Reaktionsbedingungen die Oxidation von Fe(0) zu Fe(II) statt. Die homolytische Spaltung des ATRP-Starters zwischen dem Kohlenstoff und dem Brom erfolgte nicht, somit wurde die kontrollierte radikalische Polymerisation nicht gestartet. Aufgrund dessen wurde eine alternative Syntheseroute gesucht, um ET-CORMs an Polymere zu binden. Das gewünschte ET-CORM-funktionalisierte Copolymer konnte mittels CuAAC hergestellt werden.

Nach diesem Syntheseweg ist es möglich gewesen, Copolymeren zu synthetisieren, die mit ET-CORM CORM-*i*5Ha funktionalisiert sind. Wenn der Anteil an AzPMA im Copolymer bei 20 mol% liegt, sind die ET-CORM-tragenden Polymere jedoch nicht wasserlöslich und die Ausbeute der CuAAC ist mit 35% sehr niedrig. Erst bei einem AzPMA-Anteil von 5 mol% im Copolymer wurde die Ausbeute der CuAAC mit 85% signifikant gesteigert. Darüber hinaus sind die ET-CORM-tragenden Copolymeren mit 5 mol% und 10 mol% an AzPMA wasserlöslich, was die Bioverfügbarkeit des Polymers erhöht.

Zelltests der hergestellten Copolymeren PE_{4,5}A_{5%} und PE_{4,5}A_{5%}(C) wurden von der AG Prof. Dr. B. Yard an der V. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.6 dargestellt und diskutiert.

3.5. Synthese von ET-CORM-tragenden Magnetit-Nanopartikeln

Ziel dieser Arbeit ist es, biokompatible MNPs zu synthetisieren, die als biomedizinische Transport-Systeme für ET-CORMs dienen sollen. Für die Synthese der ET-CORM-tragenden MNPs kommt die in Schema 3.11 dargestellte Syntheseroute in Betracht. Als Ausgangsmaterial für die Synthese von MNPs dient Eisenacetylacetonat $\text{Fe}(\text{acac})_3$.



Schema 3.11. Gewählte Syntheseroute für die ET-CORM-tragende MNPs.

Die hergestellten MNPs werden mit dem Starter für die ATRP durch zwei Syntheseschritte funktionalisiert. Dadurch können Polymere oder Copolymere, die funktionelle Gruppen für Postpolymerisationsreaktionen tragen, mittels oberflächeninitiiert Polymerisation synthetisiert werden. In dieser Arbeit sollen MNPs mit einer Copolymer-Hülle beschichtet werden. Die Copolymer-Hülle soll Azid-Gruppen tragen und mittels CuAAC modifiziert werden. Das CORM-i5Ha, das eine Alkin-Gruppe besitzt, soll an der Copolymer-Hülle der MNPs kovalent gebunden werden.

3.5.1. Synthese von Fe₃O₄@CS

Die Fe₃O₄@CS-NPs wurden in TREG durch thermische Zersetzung von Fe(acac)₃ synthetisiert und mit Zitronensäure in Wasser stabilisiert.^[134,162] Die Aufgabe der Zitronensäure besteht darin eine negative Aufladung auf der Partikel-Oberfläche zu erzeugen und die Partikel durch elektrostatische Abstoßung gegenüber Agglomeration und Sedimentation zu stabilisieren. Die erhaltene wässrige Dispersion kann als Basis für weitere Synthesen dienen und ist über Monate in einer Argon-Atmosphäre gegenüber Oxidation und Agglomeration stabil. Nach dieser Vorgehensweise wurde eine magnetische Flüssigkeit erhalten, bei der die magnetischen Kerne der MNPs einen durchschnittlichen magnetischen Durchmesser d_M von 7,9 nm, der aus der Magnetisierungsmessung (VSM) ermittelt wurde, aufweisen. Außerdem beträgt der zahlenmittlere hydrodynamischen Durchmesser d_n (DLS) der MNPs in Wasser 11,3 nm. Daher kann angenommen werden, dass die MNPs in der Dispersion fein verteilt sind und nicht als Agglomerate vorliegen. Für eine nähere Betrachtung der Untersuchungsergebnisse wird auf Abschnitt 3.5.3 verwiesen. Die Magnetit-Nanopartikel konnten somit über die Methode der thermischen Zersetzung erfolgreich synthetisiert und anschließend mit Zitronensäure elektrostatisch stabilisiert werden.^[121,162,163]

3.5.2. Synthese von Magnetit-Nanopartikeln mit einer Copolymer-Hülle

Ausgehend von den Fe₃O₄@CS-NPs (s. Abschnitt 3.5.1), wurden die mit Copolymeren umhüllten MNPs über die Beschichtung mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES), dessen Funktionalisierung mit 2-Bromisobutyrylbromid (2-Br*i*BBr) und anschließender oberflächeninitiiertes ATRP hergestellt.^[163,164,165]

3.5.2.1. Oberflächenfunktionalisierung der MNPs mit dem ATRP-Initiator

Zur Oberflächenfunktionalisierung der MNPs mit dem ATRP-Initiator wurden mit Zitronensäure stabilisierte Fe₃O₄-NPs mit APTES in EtOH beschichtet. Über Polykondensation, d.h. unter Abspaltung von Alkoholen und Wasser, sind Trimethoxysilane in der Lage zu polymerisieren und bilden unter geeigneten Bedingungen eine Monolage auf der Oberfläche von MNPs.^[166] Dies dient auch zur Immobilisierung von Initiator-Gruppen, wie 2-Br*i*BBr, auf der Partikeloberfläche für die im folgenden Abschnitt beschriebene ATRP. Die behandelten MNPs tragen auf der Oberfläche der Hülle Amino-Gruppen, die mit dem

ATRP-Initiator-Molekül 2-Br \bar{i} BBr zur Reaktion gebracht wurden. Nach der Funktionalisierung lassen sich die hergestellten MNPs (Fe₃O₄@Br) in DMSO dispergieren. Sie besitzen in der DMSO-Dispersion einen zahlenmittlere hydrodynamischen Durchmesser d_n von 18,2 nm (DLS), während der magnetische volumenmittlere Durchmesser d_M mit 7,9 nm (VSM) unverändert bleibt. Für die MNPs (Fe₃O₄@APTES) wurden nicht alle Analysen durchgeführt, da sie sofort weiter für die nächste Reaktion verwendet wurden. Mittels ICP-OES-Analyse wurde bei den MNPs Fe₃O₄@Br der Anteil an Silizium und Brom bestimmt. Bei 5,55 Gew.% an Brom und 2,19 Gew.% an Silizium auf der MNPs-Oberfläche wurde errechnet, dass 88,6% der Amino-Gruppen mit dem Molekül 2-Br \bar{i} BBr reagiert haben. Die anderen durchgeführten Analysen werden in Abschnitt 3.5.3 dargestellt.

3.5.2.2. Oberflächeninitiierte Polymerisation und Modifizierung der Copolymere mittels CuAAC

Für die Bildung der Polymerhülle wurden die Comonomere E_{4,5} und AzPMA verwendet. Der Anteil an E_{4,5} in der Copolymerkette diente auch zur Stabilisierung der MNPs in Wasser. Die Polymerisation wurde in DMSO durchgeführt. Als Katalysator wurde CuBr verwendet, das mit Bpy komplexiert wurde, um seine Löslichkeit und Reaktivität zu steigern. Als Produkt der Synthese wurden Copolymer-umhüllte MNPs erhalten, die biokompatibel sind und durch sterische Stabilisierung in wässriger, sowie in DMSO-Dispersion gegen Agglomeration stabil sind.

Die CuAAC der MNPs (Fe₃O₄@PE_{4,5}A₅%) mit dem CORM-*i*5Ha wurde in THF bei RT mittels CuI/DIPEA-Katalyse durchgeführt. Nach der Polymerisation und Modifizierung der Copolymere mittels CuAAC wurden die hergestellten MNPs mit verschiedenen Methoden untersucht, um die Präsenz der Polymerhülle zu bestätigen und die Zusammensetzung zu quantifizieren (s. Abschnitt 3.5.3). Für die durchgeführten Analysen wird auf Abschnitt 3.5.3 verwiesen.

3.5.3. Eigenschaften und Charakterisierung der Magnetit-Nanopartikel

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Analyse-Ergebnisse der MNPs illustriert und miteinander verglichen.

3.5.3.1. Charakterisierung der Oberflächen der MNPs

ATR-IR-Spektroskopie

ATR-Infrarotspektroskopie ist ein Messverfahren der Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) für die Untersuchung von undurchsichtigen Stoffen. Eine kleine Probenmenge der ausgefällten und getrockneten Nanopartikel wird auf einen Diamant-Messkopf aufgetragen und anschließend vermessen. Somit kann die Anwesenheit der unterschiedlichen Hüllen qualitativ durch ATR-IR-Spektroskopie bestätigt werden.

Im Folgenden werden die ATR-IR-Spektren (Abbildung 3.27) der MNPs, deren Herstellung in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurde, im Bereich von 600 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} dargestellt. Aus der Literatur ist bekannt,^[162] dass die Zitronensäure auf der Oberfläche der Magnetit-Partikel sich über die IR-Spektroskopie nicht nur durch die Bande bei 1700 cm^{-1} der C=O symmetrischen Streckschwingung der drei COOH-Gruppen kennzeichnet, die sich bei der Komplexbildung mit den Magnetit-Partikeln auf ca. 1600 cm^{-1} verschiebt, sondern auch über die breite Bande der OH-Gruppen bei ca. 3400 cm^{-1} . Das dargestellte ATR-IR-Spektrum in Abbildung 3.27 zeigt aber keine eindeutigen Banden, die der Zitronensäure zugeordnet werden könnten. Dies kann an der geringen Menge an Zitronensäure in der Probe liegen.

Die $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ -NPs wurden zuerst mit APTES beschichtet und dann mit 2-Bromisobutyrylbromid funktionalisiert. Aus dem ATR-IR-Spektrum der $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Br}$ -NPs kann kein Rückschluss auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der MNPs gezogen werden, da die Bande der Si-O Streckschwingung bei 1118 cm^{-1} und die Banden der Si-C Deformationsschwingung bei 1014 cm^{-1} der Siloxan-Hülle und die Deformationsschwingungsbande des Amids bei 950 cm^{-1} nicht eindeutig identifiziert werden können.^[167] Dies kann an der geringen Menge der funktionellen Gruppen in der Probe liegen.

Bei den MNPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$) ist die Azid-Bande bei 2080 cm^{-1} zu sehen, da im Copolymer 5 mol% AzPMA eingebaut sind. Nach der CuAAC wurden $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$ -NPs erhalten. Im IR-Spektrum ist daher die Azid-Bande bei 2080 cm^{-1} nicht mehr vorhanden, da bei der Knüpfung des CORM-*i5*Ha an das Copolymer sich ein Triazol-Ring bildet. Stattdessen sind $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Banden des CORM-*i5*Ha bei 2040 cm^{-1} und 1970 cm^{-1} zu sehen. Im „Fingerprint“-Bereich zwischen 1100 cm^{-1} bis 1446 cm^{-1} sind Banden vorhanden, die auch beim ATR-IR-Spektrum des freien Polymers zu sehen sind.^[168] Abgesehen von den $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ - und $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Br}$ -NPs konnte mittels ATR-IR-Spektroskopie qualitativ gezeigt werden, dass die hergestellten MNPs die gewünschte Hülle auf der Partikeloberfläche tragen.

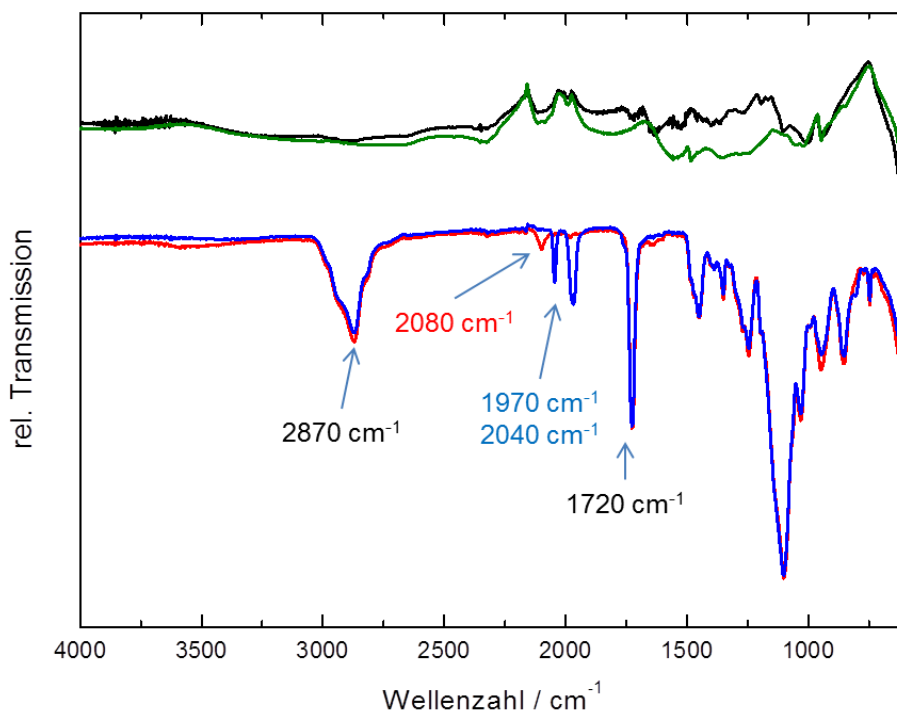


Abbildung 3.27. ATR-IR-Spektren der MNPs. (grün) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$; (schwarz) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Br}$; (blau) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$; (rot) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$.

Elementar- und thermogravimetrische Analyse

Eine Quantifizierung des organischen, thermisch zersetzbaren Anteils Δ_{org} der Magnetit-Nanopartikel wird mittels thermogravimetrischer Analyse (TGA) bestimmt. Dabei wird der Verlust der organischen Masse, der aus den getrockneten MNPs durch Erwärmung des Pulvers unter Schutzgas auf 800 °C erfolgt, in Massen-Prozent angegeben. Es wird der Massenanteil berücksichtigt, der ab ca. 120 °C bis 800 °C zersetzt wird (Abbildung 3.28). Zur Bestimmung des gesamte organischen und Kohlenstoff-Gehalts χ_{org} und χ_C der Pulverprobe wird die Elementaranalyse herangezogen (Tabelle 3.11). Aus der EA wurde nicht nur der χ_C der umhüllten MNPs in Massen-Prozent, sondern die genaue Menge an Kohlestoff, Stickstoff und Wasserstoff in mg erhalten. Daraus wurde der gesamte organische Anteil χ_{org} , die Funktionalisierungsdichte f und die Belegungsdichte b bestimmt. Am Beispiel von den $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ -NPs wird gezeigt, wie χ_{org} , f und b ermittelt wurden. Für die EA wurden 7,52 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ -NPs eingesetzt. Aus der Analyse ergab sich, dass die gesamte Menge an

Kohlestoff, Stickstoff und Wasserstoff 0,68 mg beträgt. Jedoch besteht der organische Gehalt w_{org} $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ -NPs nicht nur aus Kohlestoff-, Stickstoff- und Wasserstoff-Atomen, sondern auch aus Sauerstoff-Atomen. Folglich enthält die Beschichtung der $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ -NPs 54,8% an Kohlestoff, Stickstoff und Wasserstoff und die restlichen 45,2% sind Sauerstoff-Atome. Über den Dreisatz konnte auf die gesamte Menge von 1,24 mg an organischem Gehalt w_{org} geschlossen werden. Somit beträgt der gesamte organische Anteil χ_{org} 16,50% (Tabelle 3.11). Die Funktionalisierungsdichte f gibt die Stoffmenge der organischen Moleküle pro Gramm Partikel an. Die Stoffmenge Zitronensäure und Tetramethylammoniumhydroxid wurde aus der gesamten Menge des organischen Gehalts w_{org} (1,24 mg) durch das Molekulargewicht der Moleküle, die die organische Schichte der $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ -NPs bilden, bestimmt. Die Belegungsdichte b , die in Stoffmenge pro Quadratmeter der Partikeloberfläche angegeben wird, wird für die MNPs aus der gesamten Oberfläche der MNPs einer definierten Menge an MNPs errechnet. Es wird angenommen, dass die einzelnen MNPs eine sphärische Form aufweisen. Die Oberfläche der einzelnen MNPs wird aus dem mittleren magnetischen Durchmesser d_M (s. Tabelle 3.13) ermittelt.

Die Daten der thermogravimetrischen Analyse der MNPs bestätigen die Daten die aus der EA erhalten wurden. Somit sind Δ_{org} und χ_{org} annähernd gleich. Wie zu erwarten war, ist auch bei der TGA Δ_{org} größer bei den MNPs die eine Polymerhülle tragen als bei den $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ -NPs. Des Weiteren kann man beobachten, dass die Werte sowohl für Δ_{org} und χ_{org} bei jedem Funktionalisierungsschritt steigen, da die Moleküle, die die Hülle der MNPs bilden eine immer höhere Molmasse besitzen. Die Funktionalisierungsdichte f und die Belegungsdichte b der $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$ - und $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ -NPs konnte nicht ermittelt werden, da die Mollmassen der Copolymere unbekannt sind. Nichtsdestotrotz kann aus der TGA und EA nach der Funktionalisierung der $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$ -NPs mit dem CORM-*i*5Ha ein Zuwachs von ca. 4 wt-% sowohl an Δ_{org} als auch an χ_{org} festgestellt werden. Wenn davon ausgehen wird, dass jede Copolymer-Kette aus 40 Wiederholungseinheiten besteht und eine Copolymer-Kette zwei Azido-Gruppen besitzt, dann würde ein Zuwachs an Δ_{org} und χ_{org} von ca. 5 wt-% erwartet werden.

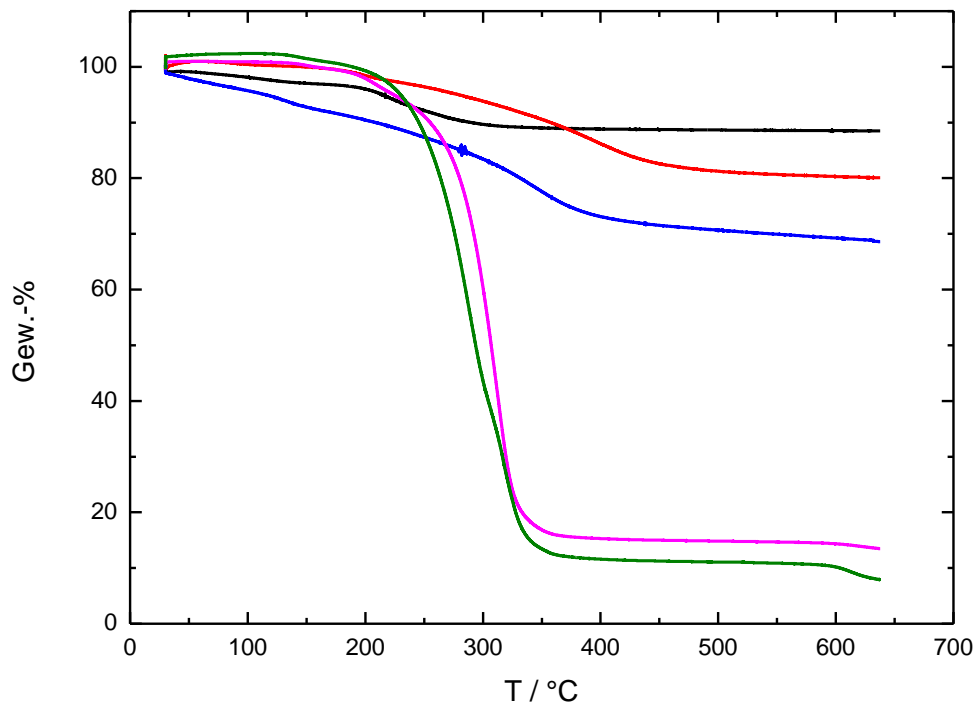


Abbildung 3.28. Thermogramm der unterschiedlichen Magnetit-Nanopartikel-Spezies. (schwarz) $Fe_3O_4@CS$; (rot) $Fe_3O_4@APTES$; (blau) $Fe_3O_4@Br$; (rosa) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}$; (grün) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$.

Tabelle 3.11. Zusammensetzung der verschiedenen MNPs. Δ_{org} : organischer, thermisch zersetzbarer Anteil. χ_{org} : gesamter organischer Anteil. χ_C : Kohlenstoff-Gehalt. f : Funktionalisierungsdichte. b : Belegungsdichte.

Probe	Δ_{org} wt-%	χ_C wt-%	f mmol/g	b mmol/m ²	χ_{org} wt-%
$Fe_3O_4@CS$	11,78	6,73	0,70	$4,39 \cdot 10^{-3}$	16,50
$Fe_3O_4@APTES$	21,13	6,02	2,16	$14,43 \cdot 10^{-3}$	22,50
$Fe_3O_4@Br$	32,52	7,58	1,22	$8,11 \cdot 10^{-3}$	25,66
$Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}$	85,53	47,85	-	-	85,44
$Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$	89,51	49,65	-	-	88,66

3.5.3.2. Hydrodynamische Eigenschaften der MNPs

Die hydrodynamischen Eigenschaften der Magnetit-Nanopartikel werden mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Bei der DLS wird die durch thermische Diffusion verursachte Bewegung der Partikel gemessen. Aus dem Diffusionskoeffizienten D ,

der aus der Autokorrelationsfunktion zugänglich ist, kann mit Hilfe der *Stokes-Einstein*-Gleichung (Gleichung 3.31) der hydrodynamische Durchmesser d_h bestimmt werden.

$$d_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{Gleichung 3.31}$$

wobei η die dynamische Viskosität, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur ist. Da immer eine Partikelgrößenverteilung vorliegt, wird der Durchmesser als Mittelwert angegeben. Außerdem wird auch der Polydispersitäts-Index (PDI) der Magnetit-Nanopartikel gezeigt, der Informationen über die Homogenität der Partikel gibt.

In Abbildung 3.29 werden die Verteilung des hydrodynamischen Durchmessers d_n der MNPs, die in H₂O eine stabile Dispersion bilden, gezeigt. Das Ziel war, MNPs mit Copolymeren zu umhüllen, die in Wasser dispergierbar sind. Mittels DLS konnte gezeigt werden, dass die mit den Copolymeren umhüllten MNPs stabile Dispersionen in Wasser bilden. Der zahlgemittelte hydrodynamische Durchmesser d_n der Fe₃O₄@CS-NPs in einer wässrigen Dispersion beträgt 11,3 nm. Die Fe₃O₄@Br-NPs mit d_n 15,8 nm zeigen in der DMSO-Dispersion gegenüber den Fe₃O₄@CS-NPs in DMSO mit d_n 13,6 nm eine geringfügige Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers. Der Zuwachs der hydrodynamischen Hülle ist durch geringe Aggregationseffekte zu erklären.

Tabelle 3.12. Hydrodynamischer Durchmesser der MNPs. d_n : zahlenmittlerer Durchmesser; d_v : volumenmittlerer Durchmesser; PDI: Polydispersitätsindex.

MNPs	Dispersion	d_n / nm	d_v / nm	PDI
Fe ₃ O ₄ @CS	H ₂ O	11,3	13,6	0,232
	DMSO	11,2	13,2	0,264
Fe ₃ O ₄ @Br	DMSO	15,7	20,8	0,338
Fe ₃ O ₄ @PE _{4,5} A ₅ %	H ₂ O	40,3	59,3	0,598
	DMSO	75,3	77,5	0,216
Fe ₃ O ₄ @PE _{4,5} A ₅ %(C)	H ₂ O	43,9	69,3	0,207

Die mit Copolymer umhüllten MNPs besitzen einen zahlenmittleren hydrodynamischen Durchmesser d_n von 40 nm. Die deutliche Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers ist durch die Ausbildung der Polymerhülle zu erklären. Des Weiteren besitzen die untersuchten MNPs in Wasser einen Polydispersitäts-Index (PDI) zwischen 0,2 und 0,5 (der PDI wurde ermittelt aus der Autokorrelationsfunktion während der DLS-Messung). Alle diese Werte

deuten auf eine breite Verteilung der MNPs hin. In der Tabelle 3.12 werden die Zahlen und volumengemittelten hydrodynamischen Durchmesser d_n und d_v der MNPs aufgelistet.

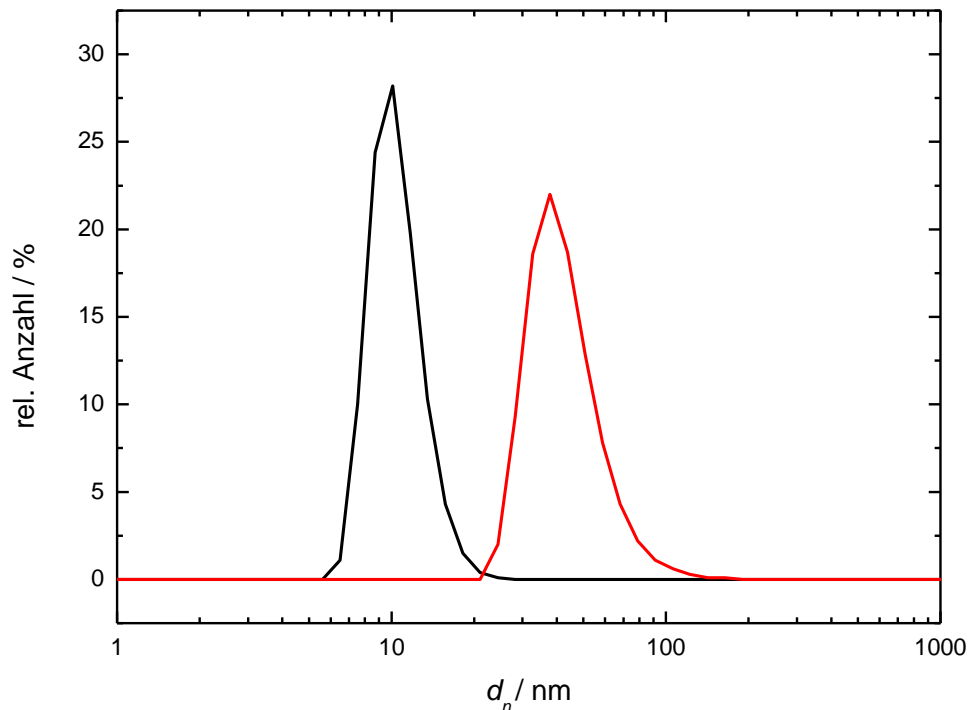


Abbildung 3.29. Verteilung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers d_n der MNPs in H_2O . (schwarz) $Fe_3O_4@CS$, (rot) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$.

3.5.3.3. Magnetischen Eigenschaften und Durchmesser der MNPs

Im Folgenden werden die magnetischen Eigenschaften der MNPs dargestellt. Bei der *Vibrating Sample Magnetometrie* (VSM) wird die Magnetisierung M der Probe in Abhängigkeit der angelegten Feldstärke H gemessen. Die Abhängigkeit von M der Partikeldispersion mit H kann durch die von *Langevin* 1905 aufgestellte Funktion (Gleichung 3.32) für Systeme von nicht miteinander interagierenden Partikeln verwendet werden.^[169]

$$M = M_s \left[\coth(\alpha) - \frac{1}{\alpha} \right] \quad \text{Gleichung 3.32}$$

mit

$$\alpha = \frac{\mu_0 m H}{k_B T} \quad \text{Gleichung 3.33}$$

als Verhältnis zwischen magnetischer und thermischer Energie. μ_0 ist die Permeabilität des Vakuums, m das magnetische Moment der Partikel, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Für kleine Feldstärken wird das Verhältnis zwischen magnetischer und thermischer Energie α klein und Gleichung 3.32 vereinfacht sich zu.^[169]

$$M \approx \frac{M_s \mu_0 m H}{3 k_B T} = \chi_{ini} H \quad \text{Gleichung 3.34}$$

Aus der Anfangssteigung der Kurve lässt sich die Anfangssuszeptibilität χ_{ini} bestimmen. Durch Umstellung der Gleichung 3.34 kann m berechnet werden, wenn die Sättigungsmagnetisierung M_s bekannt ist (Gleichung 3.35).

$$m = \frac{3 k_B T \chi_{ini}}{M_s \mu_0} \quad \text{Gleichung 3.35}$$

Aus m und der spontanen Magnetisierung M_0 , die durch das Material der suspendierten Partikeln ermittelt wird und für Magnetit $4,5 \cdot 10^5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$ beträgt, kann der magnetisch volumenmittlere Durchmesser d_M der MNPs berechnet werden (Gleichung 3.36).^[169]

$$d_M = \sqrt[3]{\frac{6m}{M_0 \pi}} \quad \text{Gleichung 3.36}$$

Abbildung 3.30 zeigt die normierten Magnetisierungskurven der $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ -, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Br$ -NPs, und der mit den Copolymeren umhüllten MNPs. Die Kurven besitzen einen sigmoidalen Verlauf ohne erkennbare Hysterese. Bei kleiner Feldstärke steigt die Magnetisierung steil an und erreicht bei hohen Feldstärken einen Sättigungswert. In diesem Bereich lässt sich die Sättigungsmagnetisierung M_s bestimmen, womit der Volumenanteil v_M in Prozent der Magnetit-Kerne berechnet werden kann (Gleichung 3.37).

$$v_M = \frac{M_{s,VSM}}{M_{s,Fe3O4}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 3.37}$$

wobei $M_{s,VSM}$ der experimentellen Sättigungsmagnetisierung (Tabelle 3.13) und $M_{s,Fe3O4}$ der Sättigungsmagnetisierung von reinem Magnetit ($4,5 \cdot 10^5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$) entspricht.^[170] Aus v_M

(Gleichung 3.37) kann der Massenanteil μ_M in Prozent der Magnetit-Kerne berechnet werden (Gleichung 3.38).

$$\mu_M = \left(1 + \frac{\sigma_{Matrix}}{\sigma_{Fe_3O_4}} \cdot \frac{100}{v_M + 100} \right)^{-1} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 3.38}$$

wobei σ_{Matrix} die Dichte des Trägermediums und $\sigma_{Fe_3O_4}$ die Dichte von Magnetit ist. Aus Abbildung 3.30 und aus der normierten Anfangssuszeptibilität $\chi_{ini}/M_{s,VSM}$ (Tabelle 3.13) ist zu entnehmen, dass bei der Herstellung der $Fe_3O_4@APTES$ -, $Fe_3O_4@Br$ -NPs und der mit Copolymeren umhüllten MNPs, aus den Vorläufer-MNPs ($Fe_3O_4@CS$), die Magnetisierungseigenschaften annähernd gleich geblieben sind. Die Form der NPs hat sich ebenfalls nicht allzu sehr ändert, da d_M für alle Proben ca. 8 nm beträgt.

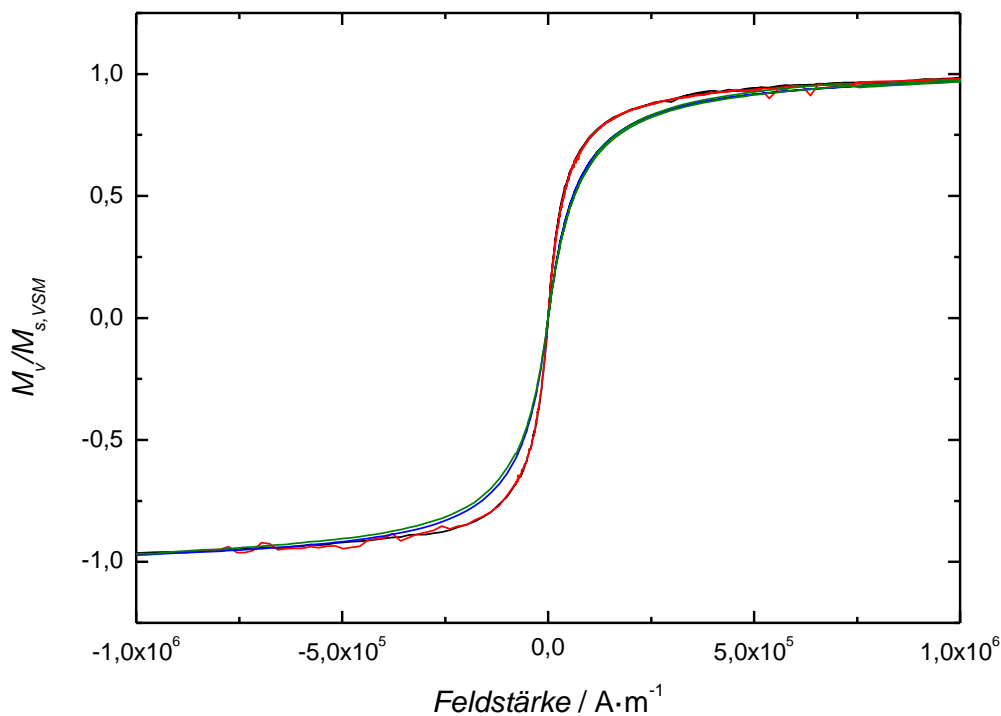


Abbildung 3.30. Normierte Magnetisierungskurven der MNPs. (schwarz) $Fe_3O_4@CS$; (rot) $Fe_3O_4@Br$; (blau) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}$; (grün) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$.

Im Folgenden werden TEM-Aufnahmen der $Fe_3O_4@CS$ -NPs, gezeigt (Abbildung 3.31). Die TEM-Bilder zeigen monodisperse MNPs. Dank geeigneter Computerprogramme (OriginPro 8.5G) ist es möglich den Durchmesser der MNPs zu bestimmen. Aus der Vermessung der

Durchmesser werden Histogramme hergestellt, die die Partikelgrößenverteilung darstellen. Bei der Auswertung der Histogramme werden der mittlere Durchmesser d_c und die Standardabweichung (STABW) angegeben. Die Auswertung der TEM-Bilder mittels Histogramme ergibt, dass die untersuchten MNPs einen mittleren Durchmesser d von ca. 8 nm mit der STABW von 1,8 besitzen.

Tabelle 3.13. Magnetische Eigenschaften der verschiedenen Partikelspezies nach VSM. $M_{s,VSM}$: Sättigungsmagnetisierung mit dem VSM bestimmt; χ_{ini} : Anfangssuszeptibilität; $\chi_{ini}/M_{s,VSM}$: Verhältnis aus Anfangssuszeptibilität und Sättigungsmagnetisierung. $\mu_{M,l}$: Massenanteil der Magnetit-Kerne in der Dispersion; $\mu_{M,s}$: Massenanteil der Magnetit-Kerne als Feststoff.

Probe	$M_{s,VSM} / \text{kA} \cdot \text{m}^{-1}$	χ_{ini}	$\chi_{ini}/M_{s,VSM} / \text{m} \cdot \text{kA}^{-1}$	d_M / nm	$\mu_{M,l} / \%$	$\mu_{M,s} / \%$
$\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$	5,720	0,072	$12,59 \cdot 10^{-3}$	7,9	6,82	53,08
$\text{Fe}_3\text{O}_4@Br$	2,580	0,032	$12,40 \cdot 10^{-3}$	7,9	3,22	31,34
$\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$	1,140	0,014	$12,28 \cdot 10^{-3}$	7,8	1,46	5,54
$\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$	0,405	0,005	$12,35 \cdot 10^{-3}$	7,9	0,52	5,14

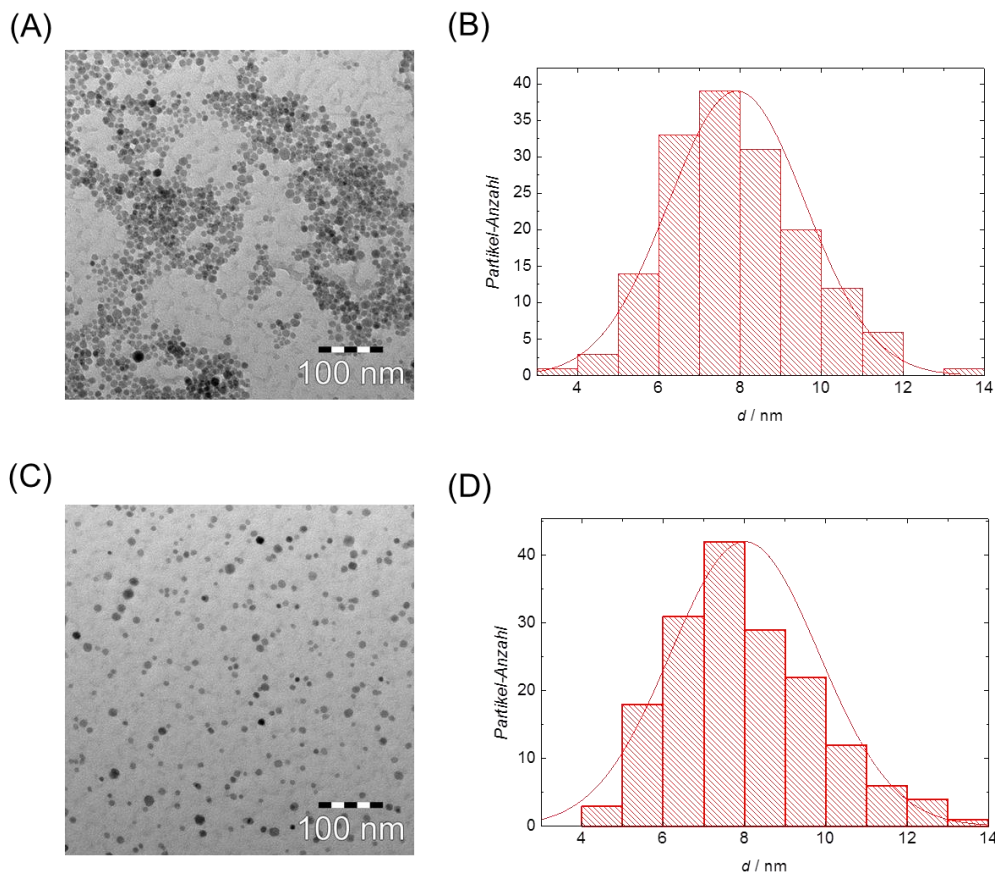


Abbildung 3.31. TEM-Aufnahmen der MNPs und Verteilung der Durchmesser. A) & B) TEM-Aufnahme der $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ -NPs und deren Histogramm. C) & D) TEM-Aufnahme der $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ -NPs und deren Histogramm.

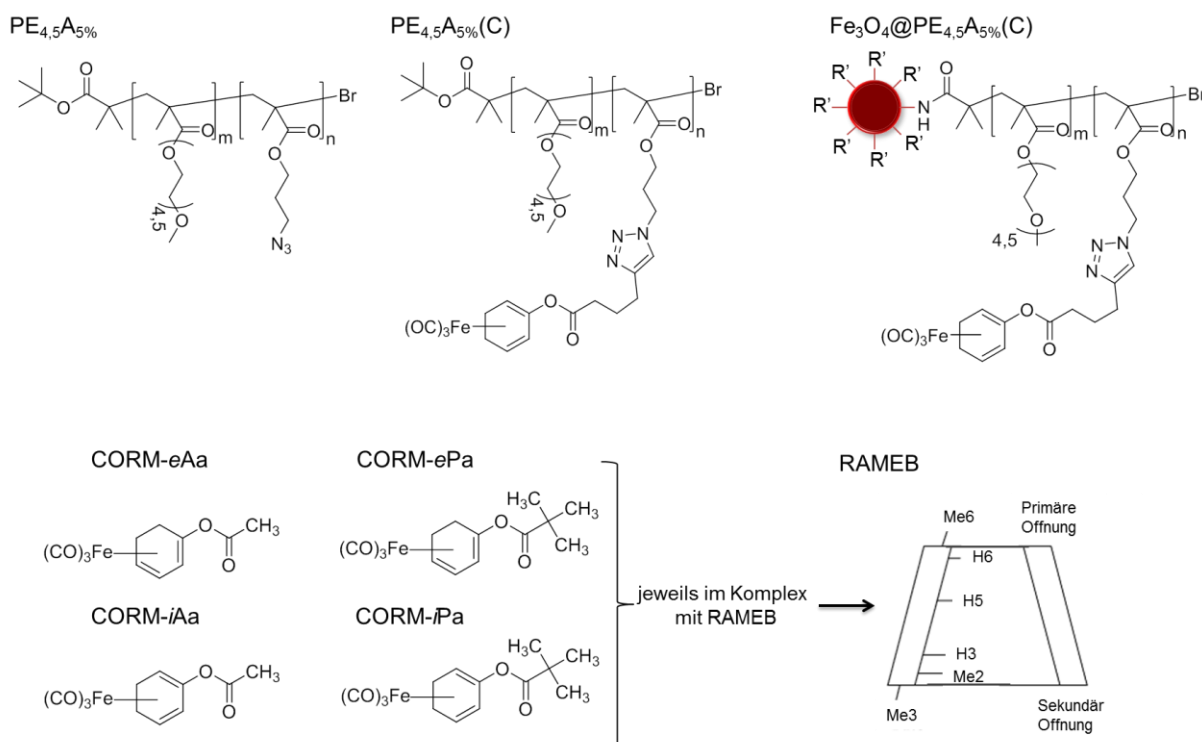
3.5.4. Zusammenfassung und Diskussion

In Abschnitt 3.4.2 konnte gezeigt werden, dass es möglich ist ET-CORM-tragende Polymere herzustellen. Nach der Synthese der MNPs und Funktionalisierung derer Oberfläche mit dem ATRP-Starter, wurden polymerbürstenförmige MNPs erhalten. Dank der Azid-Gruppen in der Copolymerhülle ist es mittels CuAAC möglich gewesen, das ET-CORM CORM-*i*5Ha an die Copolymer-Ketten zu binden. Die qualitative Analyse mittels ATR-IR-Spektroskopie hat gezeigt, dass der Eisencarbonyl-Komplex nach der Anbindung des CORM-*i*5Ha stabil bleibt und nicht zu Eisen und Kohlenstoffmonoxid zerfällt. Die TGA und EA haben gezeigt, dass bei der Funktionalisierung der Fe₃O₄@PE_{4,5}A₅%NPs mit dem CORM-*i*5Ha ein Zuwachs von ca. 4% an Δ_{org} und χ_{org} stattfindet. Die magnetischen Eigenschaften der MNP-Dispersion wurden mittels VSM vermessen. Die MNPs weisen superparamagnetische Eigenschaften auf und besitzen ein zahlenmittleren magnetischen Durchmesser von ca. 8 nm, der gut mit dem erhaltenen Durchmesser aus der TEM-Aufnahmen überstimmt.

Zelltests der hergestellten MNPs Fe₃O₄@PE_{4,5}A₅% und Fe₃O₄@PE_{4,5}A₅%(C) wurden von der AG Prof. Dr. B. Yard an der V. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin, Mannheim durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.6 dargestellt und diskutiert.

3.6. Untersuchungen zur CO-Freisetzung und Biokompatibilität

Die biologische Aktivität der ET-CORMs hängt stark von ihrer Struktur ab. Die ET-CORMs wurden in dieser Arbeit an biokompatible Materialien gekoppelt, um deren Bioverfügbarkeit zu erhöhen. In Schema 3.12 sind die Substanzen und Materialien aufgelistet, die für die Experimente, die in diesem Kapitel erläutert werden, dargestellt.



Schema 3.12. Verwendete ET-CORM-tragende Materialien für die biologischen Testreihenuntersuchungen.

Die folgenden Experimente mit Zellkulturen und Geweben zeigen, wie die Eigenschaften der ET-CORMs durch die Kombination mit biokompatiblen Materialien beeinflusst werden. Es war das Ziel, die Bioverfügbarkeit der ET-CORMs zu erhöhen, ohne deren Wirkung zu beeinträchtigen.

Die CO-Freisetzung der ET-CORM-tragenden Materialien wurde *in vitro* in Anwesenheit und Abwesenheit von dem Enzym *Pig Liver Esterase* (PLE) mittels Headspace-GC detektiert und quantifiziert. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Dr. H.-G. Schmalz durchgeführt. Darüber hinaus wurden die ET-CORM-tragenden Materialien in Zelltests in der AG Prof. Dr. B. Yard aus der V. Medizinischen Klinik in Mannheim untersucht. Die Toxizität der ET-CORM-tragenden Materialien wurde an *Human Umbilical*

Vein Endothelial Cells (HUVEC) überprüft.^[171] Die Zelltests sollen klären, ob die ET-CORM-tragenden Materialien in der Lage sind, den TNF- α vermittelten Entzündungen entgegenwirken zu können.^[30,172] Des Weiteren wurden menschlichen Nierenzellen (*Renal Proximal Tubular Epithelial Cells*) PTEC für Kälteschocktests eingesetzt. Die Freisetzung von CO soll sie vor Kälteschäden schützen. Außerdem wurden die Vasodilatationseigenschaften von ET-CORM-tragenden Materialien mit Hilfe von Mesenterialarterien aus Ratten untersucht.

3.6.1. Quantifizierung der CO-Freisetzung mittels Headspace-GC

Bei der Headspace-Gaschromatographie werden leichtflüchtige Substanzen, die aus Flüssigkeiten oder Feststoffen in die Gasphase des Probenfläschchens diffundieren, detektiert. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde aus dem Gasraum die Menge des freigesetzten CO aus den ET-CORM-tragenden Materialien untersucht. Ziel der Experimente ist zu zeigen, ob durch das Enzym PLE die CO-Freisetzung induziert und sie darüber hinaus beschleunigt werden kann. Die ET-CORM-tragenden Materialien wurden in Phosphatpuffer pH 7,2 aufgelöst und bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration bezüglich der ET-CORMs beträgt entweder 26 μM für $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$ und $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$ oder für die RAMEB/ET-CORM-Komplexe 36 μM . Für die $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$ -NPs wurde angenommen, dass die Polymerhülle die gleiche Menge an ET-CORM besitzt wie das Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$ aus Abschnitt 3.4.2. Das Volumen V an detektiertem CO konnte mit Hilfe einer Kalibrierungskurve aus der Fläche des CO-Signals im Chromatogramm geschlossen werden. Die Stoffmenge an CO wurde aus dem detektierten Volumen an CO im Chromatogramm durch das molare Volumen V_m von CO ($V_m = 25,44 \text{ l/mol}$) ermittelt. Die CO-Äquivalente wurden aus dem Quotient der Stoffmenge an CO durch die Stoffmenge an ET-CORM errechnet.

In Abbildung 3.32 wurde das freigesetzte detektierte CO aus den ET-CORM-tragenden Materialien quantifiziert und die freigesetzten CO-Äquivalente gegen die Zeit t aufgetragen. Nach der enzymatisch katalysierten Reaktion der Hydrolyse der Ester-Bindung findet eine Umlagerung der Doppelbindungen am Cyclohexadien-Ring statt, bevor der Acycloxybutadien- $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplex in seinen einzelnen Komponenten zerfällt.^[30] Die ermittelten Daten über CO-Äquivalente wurden mit der Anpassungsfunktion ExpDec2 (s. Gleichung 3.39) aus dem Programm *OriginPro 8.5G* angepasst.

$$y = a \cdot \exp(-x/b) + c \cdot \exp(-x/d) + e$$

Gleichung 3.39

wobei a, b, c, d und e Funktionsparameter sind.

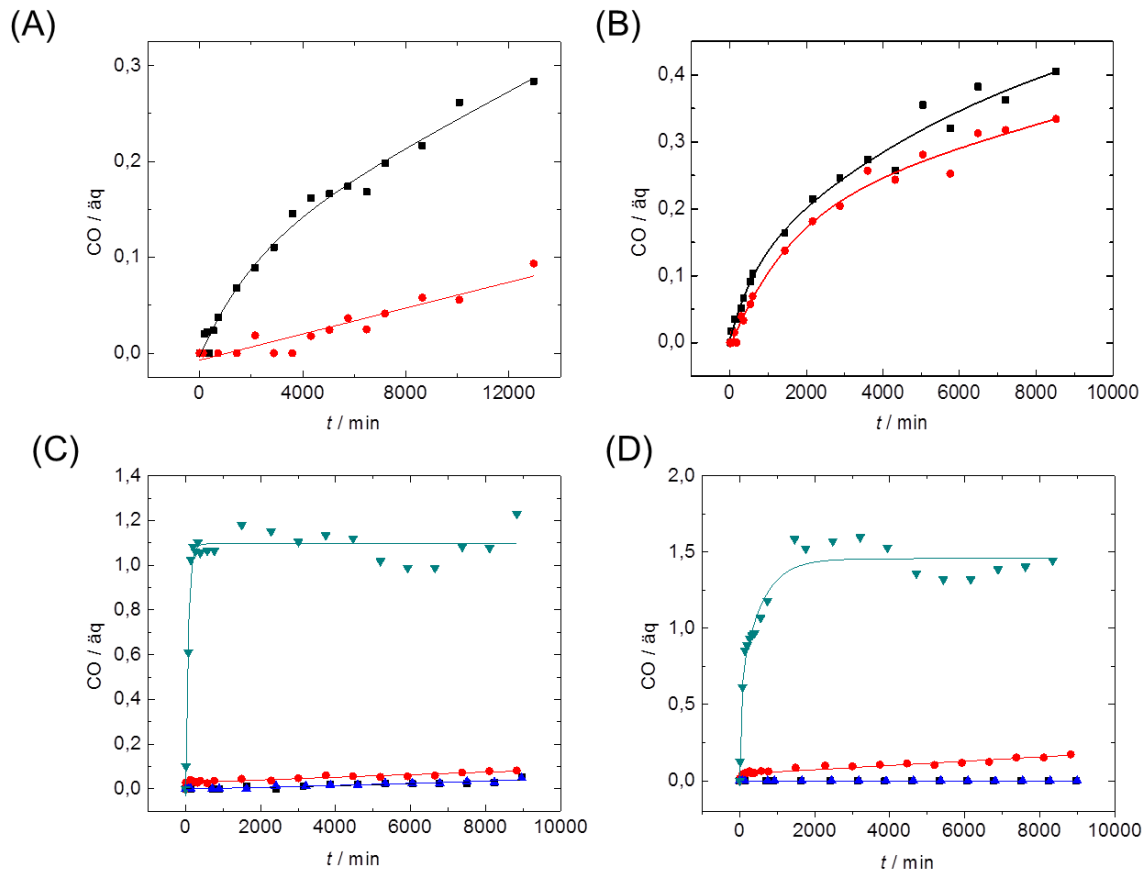


Abbildung 3.32. Auftragung der freigesetzten CO-Äquivalente aus den ET-CORM-tragenden Materialien. PLE: Pig Liver Esterase. (A) $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$: (schwarz) mit PLE; (rot) ohne PLE. (B) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$: (schwarz) mit PLE; (rot) ohne PLE. (C) RAMEB/ET-CORM-Komplexe: (grün) RAMEB/CORM-eAa mit PLE; (blau) RAMEB/CORM-eAa ohne PLE; (rot) RAMEB/CORM-iAa mit PLE; (schwarz) RAMEB/CORM-iAa ohne PLE. (D) RAMEB/ET-CORM-Komplexe: (grün) RAMEB/CORM-ePa mit PLE; (blau) RAMEB/CORM-ePa ohne PLE; (rot) RAMEB/CORM-iPa mit PLE; (schwarz) RAMEB/CORM-iPa ohne PLE.

Die Quantifizierung der CO-Freisetzung des Polymers $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ zeigt, dass die CO-Freisetzung durch das Enzym PLE beschleunigt. Nach 9 d wurden ca. 0,3 CO-Äquivalente freigesetzt (Abbildung 3.32A). Wohingegen ohne Enzym bei Hintergrundhydrolyse des Acycloxydien- $Fe(CO)_3$ -Komplexes nach 9 d nur ca. 0,09 CO-Äquivalente freigesetzt wurden. Bei den $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ -NPs war die CO-Freisetzung in Anwesenheit und Abwesenheit des Enzyms PLE annähernd gleich (Abbildung 3.32B). In Anwesenheit des Enzyms wurden ca. 0,4 CO-Äquivalenten freigesetzt, während ohne Enzym ca. 0,3 CO-Äquivalente nach ca. 6

d freigesetzt wurden. Bei den $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ -NPs wurden, sowohl mit als auch ohne das Enzym PLE, annähernd die gleichen CO-Äquivalente detektiert. Hier könnte die erhöhte Konzentration an Fe-Ionen in den Proben eine Rolle spielen. Diese können die Stabilität des Acycloxydien- $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexes schwächen und die CO-Freisetzungsraten auch ohne PLE erhöhen.

In Abbildung 3.32C und D wurde die CO-Freisetzung der RAMEB/ET-CORM-Komplexe analysiert und Quantifiziert. Die ET-CORMs, die die Ester-Bindung zwischen den beiden Doppelbindungen des Cyclohexadien-Ringes tragen (Innenposition), ist die CO-Freisetzung sehr niedrig und annähernd gleich, wie in Abwesenheit des Enzyms PLE. Bei den ET-CORMs, die die Ester-Bindung nicht zwischen den beiden Doppelbindungen des Cyclohexadien-Ring tragen (Außenposition), werden ca. 1,1 bis 1,5 CO-Äquivalenten freigesetzt.

In allen Experimenten dieser Arbeit, die sich mit der Quantifizierung der CO-Freisetzung befassen, konnten mittels Headspace-GC nicht alle 3 CO-Äquivalente, die ein ET-CORM abgeben kann, detektiert werden. Dafür sind verschiedene Faktoren verantwortlich. Im Fall des an das Copolymer gekoppelten ET-CORM ist es für das Enzym PLE nicht möglich, ein Makromolekül mit einer Molmasse von ca. 12 kDa schnell und effektiv zu hydrolysieren. Das ändert sich, wenn sich das Polymer in einer zellulären Umgebung befindet. Zellen besitzen Verdauungsorganellen, die große Moleküle in einzelne Bausteine zerlegen können. Wie in Abschnitt 3.6.2 zu sehen ist, beginnt das ET-CORM-tragende Copolymer bereits nach ca. 15 min, auf Grund der enzymatischen CO-Freisetzung zu wirken. Wie die Analysen in Abbildung 3.32C und D sowie in bisherigen Arbeiten gezeigt wurde,^[28,171,172] verläuft die CO-Freisetzung bei den ET-CORMs, die die Ester-Bindung zwischen den beiden Doppelbindungen des Cyclohexadien-Ringes tragen (Innenposition), sehr langsam. Dieses Verhalten zeigen auch die RAMEB-Komplexe mit den ET-CORM CORM-*i*Aa und CORM-*i*Pa. Weitere Gründe für die Detektion von weniger als 3-Äquivalenten sind, dass ein Teil von CO in der flüssigen Phase der Probe verbleibt.

3.6.2. Zelltests der ET-CORM-tragenden Materialien

In den folgenden Studien wurden Polymere und MNPs mit und ohne CORM-*i*5Ha untersucht (s. Schema 3.1). Die RAMEB/ET-CORM-Komplexe wurden auf deren Toxizität und deren Einfluss auf Entzündung bereits untersucht.^[173] Die Toxizität der ET-CORM-tragenden

Materialien wurde in HUVEC-Zellen in einem Bereich von 0 bis 300 μM bezüglich der CORM-*i*5Ha-Konzentration getestet. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test getestet. Dieser Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan.^[174] Die Reduktion von MTT hängt hauptsächlich von der Anwesenheit von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) in den Zellen. Somit entspricht die Menge des umgesetzten und gemessenen Farbstoffs der Glykolyserate der lebendigen Zellen.^[175]

Wie Abbildung 3.33A zeigt, wirkt sich das Polymer PE_{4,5}A_{5%}(C) in dem getesteten Konzentrationsbereich nicht toxisch auf die HUVEC-Zellen aus, während die MNPs ab einer Konzentration von 18,5 μM an CORM-*i*5Ha toxisch wirken. Anzumerken ist, dass bei dem Copolymer PE_{4,5}A_{5%}(C) der Cu-Katalysator über eine Aluminiumoxid-Säule entfernt wurde. Mittels ICP-OES-Analyse wurden Cu-Reste von 0,06 wt-% im Copolymer nachgewiesen. Die MNPs Fe₃O₄@PE_{4,5}A_{5%}(C) wurden nicht mit einer Aluminiumoxid-Säule behandelt. Es gab die Vermutung, dass die MNPs auf der Säule hätten hängen bleiben können, daher hat man sich gegen die Nutzung der Aluminiumoxid-Säule entschieden. Die ICP-OES-Analyse hat ergeben, dass 1,04 wt-% Cu in der Probe vorhanden sind. Dies entspricht etwa der Menge an Katalysator, die für die Synthese der MNPs verwendet wurde. Die Anwesenheit von Cu in der Probe konnte der Grund der Toxizität der MNPs sein.

Die Toleranz der Hypothermie-induzierten Zellschädigung wurde durch die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) im Nährmedium der PTEC-Zellen gemessen. Die Freisetzung von LDH im Nährmedium ist ein Marker für die Auflösung, und somit für den Tod, der Zellen. Zu den Zellkulturen wurden jeweils die Polymeren PE_{4,5}A_{5%} oder PE_{4,5}A_{5%}(C) hinzugefügt. Als Kontrollen dienen die Zellkulturen mit dem Polymer PE_{4,5}A_{5%} oder ohne Zusatz im Nährmedium (Abbildung 3.33C und D). Die Zellen wurden für 24 h bei 4 °C inkubiert. Der freigesetzte LDH-Anteil wurde bei der Oxidation von NADH photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmt.^[176] Hypothermie-induzierte Zellschädigungstests haben gezeigt, dass das Polymer PE_{4,5}A_{5%}(C) ab einer Konzentration von 75 μM bezüglich des CORM-*i*5Ha durch die enzymatisch induzierte CO-Freisetzung die Nierenzelle vor Kälteschäden effektiv schützen kann, während das Vorläuferpolymer PE_{4,5}A_{5%}, das noch kein ET-CORM trägt, dies nicht kann. Somit kann die Wirkung auf die Anwesenheit von CO im zellulären System zurückgeführt werden.

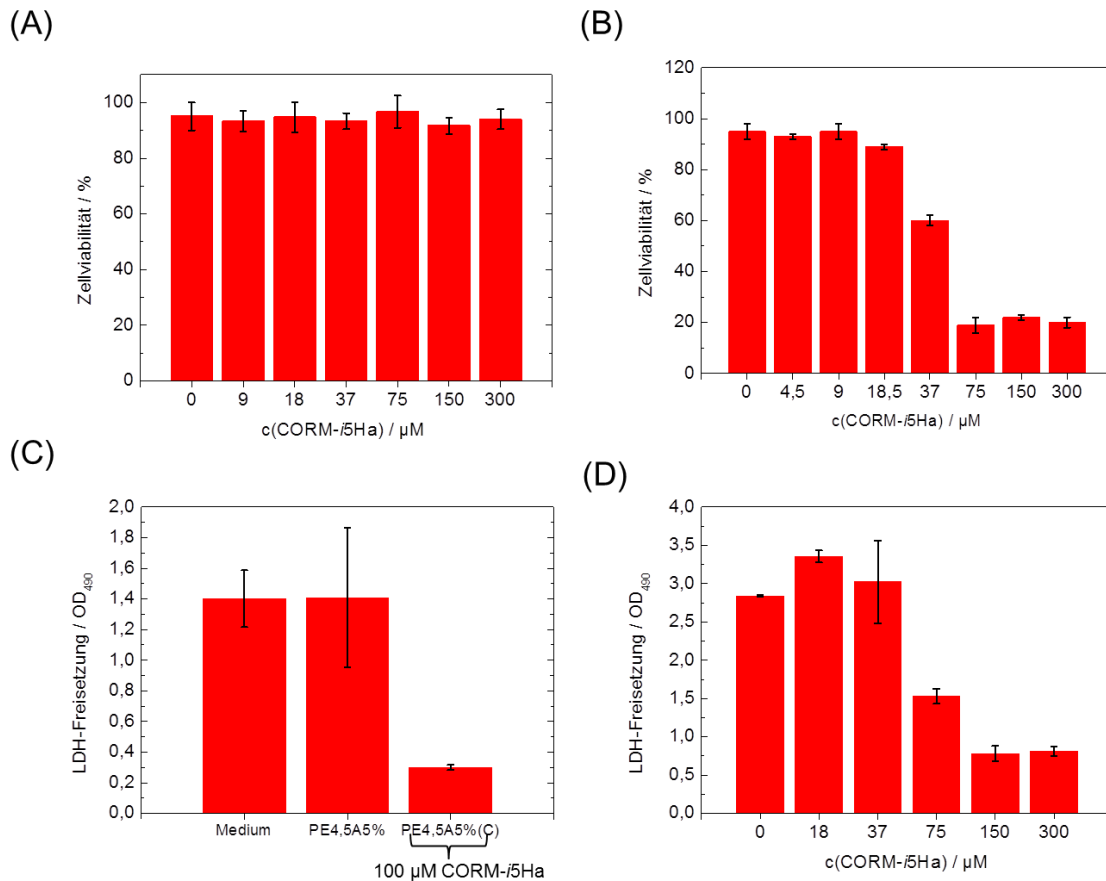


Abbildung 3.33. MTT-Tests in HUVEC-Zellen mit steigender Konzentration an CORM-i5Ha mit dem (A) Polymer PE_{4,5}A_{5%}(C) und mit dem (B) MNPs Fe₃O₄@PE_{4,5}A_{5%}. Hypothermie-induzierten Zellschädigungstests von PTEC-Zellen mit dem (C & D) Polymeren PE_{4,5}A_{5%} und PE_{4,5}A_{5%}(C) abgeschätzt durch die Freisetzung von LDH.

Der Nachweis der Inhibition und Induktion von bestimmten Markerproteinen, die in der Physiologie von CO eine Rolle spielen, wurden mittels Western Blot durchgeführt. Nach der Behandlung der HUVEC-Zellen mit dem Polymeren PE_{4,5}A_{5%} und PE_{4,5}A_{5%}(C) wurden sie aufgelöst und die Proteine im Zelllysat mittels SDS-PAGE-Elektrophorese getrennt. Mit Polyclonalantikörpern wurde die Proteine *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) und Hämoxigenase 1 (HO1) detektiert. Als Kontrolle dienen die Zellkulturen die mit dem Polymer PE_{4,5}A_{5%} behandelt wurden, sowie unbehandelte Zellen (Abbildung 3.34A & B). Die Rolle des Proteins HO1 in der menschlichen Physiologie und für zukünftige CO-Therapien spielt,^[4] wurde bereits in der Einleitung im Abschnitt 0erläutert. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Expression vom VCAM-1 die Arteriosklerose und die Rheumatoide Arthritis fördert.^[177]

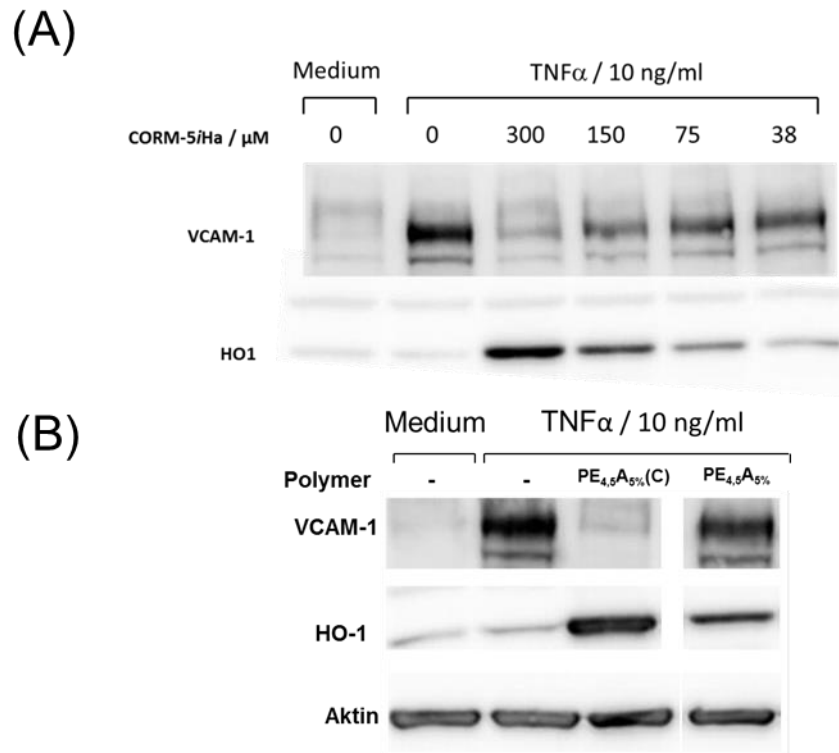


Abbildung 3.34. Die Hemmung und die Induktion der Proteine VCAM-1 und HO1 in HUVEC-Zellen in An- und Abwesenheit der ET-CORM-tragenden Polymere wurden mit dem Western Blot bewiesen. (A) Polymer PE_{4,5}A_{5%}(C) wurde bei steigender Konzentration auf dessen Fähigkeit getestet, VCMA-1 oder HO1 jeweils zu hemmen oder zu induzieren. Die angesetzte Konzentration bezüglich des CORM-i5Ha im Polymer wurde in μM angegeben. (B) In diesen Experimenten wurden die Fähigkeiten der Polymere PE_{4,5}A_{5%} und PE_{4,5}A_{5%}(C) nachgewiesen, die Expression von VCM-1 oder von HO1 jeweils zu hemmen oder zu induzieren. Die Konzentration bezüglich des CORM-i5Ha beträgt 300 μM .

In der Regel inhibieren ET-CORMs die Expression von VCAM-1 und induzieren die Expression von HO1.^[172,173] In Abbildung 3.34A und B werden die entsprechenden Western Blots dargestellt. Dazu wurde Aktin gefärbt, um zu zeigen, dass die gleiche Menge an Proteinen auf dem Gel aufgetragen wurden. Aus den Western Blots kann man entnehmen, dass das Copolymer PE_{4,5}A_{5%}(C), wie die niedermolekularen ET-CORMs, die Expression von VACM-1 inhibiert und die Expression von HO1 induziert. Somit kann angenommen werden, dass die Kombination von ET-CORMs mit dem biokompatiblen Polymer PE_{4,5}A_{5%} nicht deren Wirkung beeinträchtigt, und wie man aus der Kontrolle mit PE_{4,5}A_{5%} erkennen kann, ist der Effekt auf die Expression der Proteine nur auf die Präsenz des CORM-i5Ha im Polymer zurückzuführen.

Die Ergebnisse der Experimente, die in Abbildung 3.35A und B dargestellt sind, zeigt die induzierte Vasodilatation der Muskelzellen in Mesenterialarterien aus Ratten mittels ET-

CORM-tragenden Materialien. Die Kraft der Muskelkontraktion der Mesenterialarterien wird gegen die Zeit aufgetragen. Weiterhin wurden Kontrollen zur Überprüfung der Funktion der Arterien durchgeführt. Die Vasokonstriktion wurden mit Methoxamin (Mx) induziert. Methoxamin wirkt hierbei als α_1 -Adrenozeptor-Agonist.^[178] Abbildung 3.35A zeigt die Effekte der Polymere PE_{4,5}A_{5%} und PE_{4,5}A_{5%}(C). Nur das Polymer PE_{4,5}A_{5%}(C), in welchem das CORM-*i5*Ha eingebaut wurde, kann die Muskulatur der Arterien dilatieren. Das gleiche Ergebnis erhält man aus der Analyse des Diagramms in Abbildung 3.35B. In diesen Experimenten wurden die RAMEB/ET-CORM-Komplexe verwendet. Die RAMEB/CORM-*e*Aa-Komplexe zeigen einen größeren Effekt als die RAMEB/CORM-*i*Aa-Komplexe und setzen unter enzymatischer Einwirkung CO in schnellerem Maße frei.

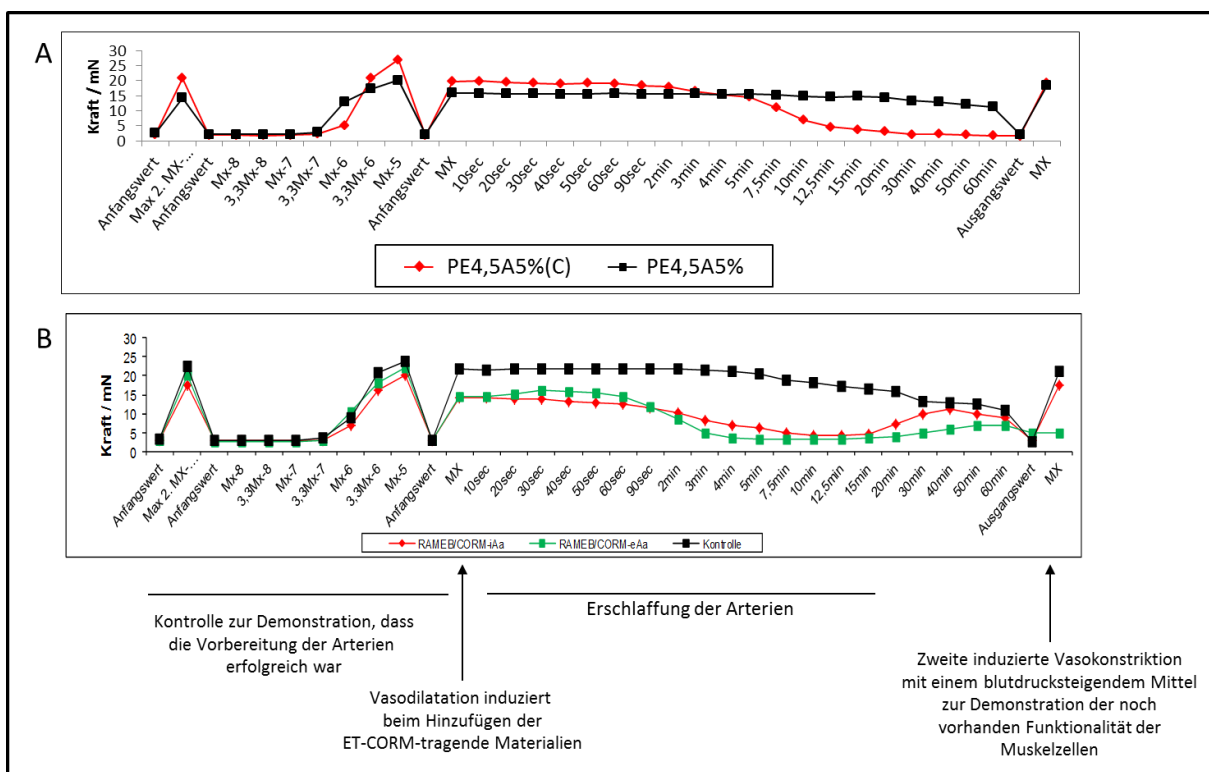


Abbildung 3.35. ET-CORM-tragende Materialien induzierte Antwort der Muskelzellen in Mesenterialarterien aus Ratten A) mit Polymeren mit und ohne CORM-*i5*Ha und (B) RAMEB/ET-CORM-Komplexe. Die angesetzte Konzentration der ET-CORMs beträgt 200 μ M.

3.6.3. Zusammenfassung und Diskussion

Die Zelltests der ET-CORM-tragenden Materialien haben gezeigt, dass sie CO-freisetzen können. Durch die GC-Analytik konnte bewiesen werden, dass durch das Enzym PLE die

CO-Freisetzungsrates gesteigert werden konnte. Des Weiteren hängt die CO-Freisetzungsrates von der Art der ET-CORMs im Zusammenspiel mit den verwendeten Materialien ab. Durch Zelltests konnten die gestellten Anforderungen an die ET-CORM-tragenden Materialien bezüglich Biokompatibilität und Bioverfügbarkeit überprüft werden. ET-CORM-tragende Copolymere sind bis zur gemessenen Konzentration an CORM-*i5Ha* von 300 μM nicht toxisch. Die Copolymere, die nicht mit dem CORM-*i5Ha* funktionalisiert sind und als Kontrolle in den Zelltests benutzt wurden, haben untermauert, dass die untersuchten Effekte auf den Katabolismus der Zellen auf die CO-Freisetzung aus den ET-CORM-tragenden Copolymeren zurückzuführen ist. Die ET-CORM-tragenden MNPs wirken oberhalb einer Konzentration von 35 μM an CORM-*i5Ha* toxisch. Der Grund kann an Kupfer-Rückständen aus der Synthese des Polymer-Teils- der MNPs mittels ATRP in der Probe liegen. *Stamellou et al.*^[173] haben gezeigt, dass die mit RAMEB komplexierten ET-CORMs in Zelltests die gleichen Wirkungen wie die nicht komplexierten ET-CORMs gezeigt haben. Dies deutet darauf hin, dass RAMEB, als Wirt für ET-CORMs, nicht deren molekulare Eigenschaften beeinflusst. Darüber hinaus wurden Vasodilatationseffekte in Muskelzellen von Mesenterialarterien von Ratten gemessen.^[15] Das ET-CORM-tragende Copolymer wirkt nicht toxisch auf die Muskelzellen in hohen Konzentrationen, während die RAMEB/CORM-*eAa*-Komplexe in hoher Konzentration die Muskelaktivität der Mesenterialarterien hemmen. Der Grund liegt in der hohen CO-Freisetzungsrates, die RAMEB/CORM-*eAa*-Komplexe besitzen. Durch Zelltests wurde somit nachgewiesen, dass die in dieser Arbeit synthetisierten ET-CORM-tragenden Materialien ein sehr hohes Potential aufweisen, als pharmazeutischen CORMs Anwendung zu finden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich Kohlenstoffmonoxid-freisetzende Materialien für medizinische Anwendungen entwickelt, hergestellt und charakterisiert. Die synthetisierten Materialien genügen den angeforderten Parametern als zukünftige Pharmaka bezüglich ihrer Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität in biologischen Systemen.

Im Fokus steht hierbei die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von häufig nur schlecht wasserlöslichen ET-CORMs bei gleichzeitiger Beibehaltung der selektiven Freisetzung unter enzymatischem Einfluss. Zu diesem Zweck wurden einerseits CD/ET-CORM-Komplexe hergestellt, andererseits wurden ET-CORM-tragende Copolymere und Magnetit-Nanopartikel synthetisiert.

Die Herstellung der Wirt-Gast-Komplexe aus Cyclodextrinen und ET-CORMs konnte erfolgreich gezeigt werden. Um solche Komplexe zu erhalten, müssen CDs verwendet werden, die als Wirt selbst eine sehr hohe Wasserlöslichkeit aufweisen, wie z.B. methylierte CDs.^[93] Bei der Herstellung der Komplexe ist diese Eigenschaft von großer Bedeutung, da die Komplexierung der CDs mit den ET-CORMs die Wasserlöslichkeit des Komplexes herabsetzt. Die erhaltenen Einschlussverbindungen aus CDs und ET-CORMs wurden mittels 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie untersucht und charakterisiert. Die Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zwischen dem Wirt (CDs) und dem Gast (ET-CORMs) konnten durch die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten und der Identifizierung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Protonen des Wirtes und Gastes im 2D-NOE-Spektrum nachgewiesen werden. Die physikalischen Eigenschaften der Komplexe, wie die Stabilitätskonstante (K_a) und die Änderung der Gibbs-Energie (ΔG°), konnten aus $^1\text{H-NMR}$ -Titrationsexperimenten hergeleitet werden. Aus diesen Daten wurden Strukturen der Komplexe entworfen, die in Einklang mit den erhaltenen Daten aus den 2D-NMR-Untersuchungen stehen. Die Analysen haben ergeben, dass die RAMEB/CORM-*eAa*- und RAMEB/CORM-*iAa*-Komplexe 1:1 Komplexe bilden, während die RAMEB/CORM-*ePa*- und RAMEB/CORM-*iPa*-Komplexe 2:1 Komplexe bilden. Darüber hinaus zeigen die ΔG° -Werte, dass die ET-CORMs, welche die Ester-Bindung an der Außenseite der beiden Doppelbindungen des Cyclohexadien-Ringes tragen, stabile Komplexe hervorbringen.

In Anlehnung an die Komplexe aus methylierten CDs und ET-CORMs sollten Komplexe aus β -CD-funktionalen Copolymeren und ET-CORMs hergestellt werden. Mit Hilfe der ATRP von E_x und Ma und anschließender CuAAC mit $\beta\text{-CD-N}_3$ konnten β -CD-funktionale

Copolymere hergestellt werden. Sowohl die erfolgreiche Copolymerisation als auch die kovalente Bindung zwischen Copolymer und β -CD-N₃ wurden mittels ¹H-NMR- und IR-Spektroskopie nachgewiesen. Die Komplexierungsexperimente zeigten, dass die ET-CORMs nicht in die Kavität der β -CD-funktionalen Copolymere eingefügt werden konnten. Dennoch konnten durch die in dieser Arbeit entworfenen Synthesemethoden β -CD-funktionale Copolymere mit einem höheren Anteil an β -CD im Copolymer erhalten werden als bei der Herstellung der β -CD-funktionalen Copolymere durch die Copolymerisation von E_x-Monomeren und des β -CD-Monomers.^[179] Im Falle der Copolymerisation von E_{4,5} mit dem β -CD-Monomer wurde ein β -CD-Molekül pro zwei Polymerketten eingebaut.^[179]

In weiteren Arbeiten sollen die β -CD-funktionalen Copolymere als potentielle Kandidaten für die Komplexierung mit geeigneten hydrophoben Wirkstoffen überprüft werden.^[143]

Vorversuche zur Copolymerisation des Acrylat-funktionalen CORM-*iEa* mit 2-Methoxyoligo(ethylenglycol)methacrylat (E_{4,5}) zeigten, dass es aufgrund der Redoxempfindlichkeit nicht möglich ist, ET-CORM-Monomere mittels ATRP zu polymerisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Einwirkung des ATRP-Katalysators zum Zerfall des Acycloxybutadien-Fe(CO)₃-Komplexes führt. Daher wurden alternative Polymerisationsmethoden entwickelt. Mit Hilfe der ATRP von E_{4,5} und AzPMA und anschließender CuAAC mit CORM-*i5Ha* konnten ET-CORM-tragende Copolymere hergestellt werden.^[74,180] Sowohl die erfolgreiche Copolymerisation als auch die kovalente Bindung zwischen Copolymer und CORM-*i5Ha* wurden mittels ¹H-NMR- und IR-Spektroskopie nachgewiesen. Die Anwesenheit der Eisencarbonyl-Banden bei 2044 cm⁻¹ und 1952 cm⁻¹ im IR-Spektrum des ET-CORM-tragenden Copolymers weist auf die Integrität des Acycloxybutadien-Fe(CO)₃-Komplexes hin. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu einem Gehalt an 5 mol% von AzPMA und CORM-*i5Ha* das Copolymer eine gute Wasserlöslichkeit aufweist. Darüber hinaus konnte die Effizienzsteuerung der CuACC erreicht werden, wobei die Menge an AzPMA variiert wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei Copolymeren mit einem niedrigen Anteil an AzPMA die CuACC effizienter erfolgt als bei Copolymeren mit einem höheren Anteil an AzPMA.

Die Herstellung von magnetisch steuerbaren ET-CORM-tragenden Materialien wurde durch die kovalente Anbindung von ET-CORM-tragenden Copolymeren an Magnetit-Nanopartikeln erzielt. Durch die thermische Zersetzung von Eisenacetylacetonat (Fe(acac)₃) in TREG wurden MNPs erhalten,^[163] die mit einer Zitronensäureschicht stabilisiert wurden. Die Fe₃O₄@CS-NPs wurden mit 2-Bromisobutyrylbromid, das als Starter für die ATRP dient,

funktionalisiert. Mittels oberflächeninitiiert Polymerisation konnten polymerumhüllte MNPs synthetisiert werden. Die hergestellten $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$ -NPs wurden mit dem CORM-*i*5Ha funktionalisiert. Somit wurden MNPs hergestellt, die eine ET-CORM-tragende Polymerhülle besitzen und stabile Dispersionen in Wasser bilden. Die VSM-Untersuchungen der MNPs zeigten, dass der mittlere Durchmesser der superparamagnetischen Kerne ca. 8 nm beträgt. Die Funktionalisierung der MNPs mit dem CORM-*i*5Ha wurde durch die Anwesenheit der Eisencarbonyl-Bande bei 2100 cm^{-1} mittels ATR-IR-Spektroskopie qualitativ nachgewiesen. Durch EA und TGA wurde der organische Anteil der MNPs quantifiziert. Des Weiteren zeigen die TEM-Aufnahmen monodisperse MNPs mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 8 nm.

Für zukünftige Arbeiten wäre es sinnvoll, die Materialien der Kerne sowie der Hülle der Nanopartikel für die medizinische Anwendung zu variieren. Darüber hinaus soll eine Methode zur vollständigen Beseitigung des Katalysators der Azido-Alkin-Cycloaddition entwickelt werden.

Die CO-Freisetzungsexperimente mit den in dieser Arbeit synthetisierten ET-CORM-tragenden Materialien wurden in der AG *Prof. Dr. H.-G. Schmalz* durchgeführt. Die Detektion sowie die Quantifizierung des freigesetzten CO erfolgten mit Hilfe der Headspace-GC. Dabei wurde die CO-Freisetzungsrates unter dem Einfluss des Enzyms *Pig Liver Esterase* untersucht. Die Experimente zeigten eine klare Tendenz: bei den RAMEB/ET-CORMs-Komplexen, welche die Ester-Bindung zwischen den beiden Doppelbindungen des Cyclohexadien-Ringes tragen (Innenposition), wird CO langsamer freigesetzt. Darüber hinaus veränderte die Komplexierung mit RAMEB die chemischen Eigenschaften der ET-CORMs nicht. Es wurde auch keine Hintergrundhydrolyse, wie bei den ET-CORM-tragenden Copolymeren und den ET-CORM-tragenden MNPs, beobachtet.

Des Weiteren zeigen Zelltests, die von AG *Prof. Dr. B. Yard* in der V. Medizinischen Klinik in Mannheim durchgeführt wurden, dass die ET-CORM-tragenden Materialien biokompatibel sind und die CO-Freisetzung ihre Wirkung sowohl in Zellkulturen als auch in Geweben entfaltet. Die vielversprechenden Ergebnisse der Zelltests zeigten bereits, dass die ET-CORM-tragenden Materialien für zukünftige medizinische Anwendungen geeignet sind. Weitere biomedizinische Untersuchungen dieser Materialien sollen folgen, um deren Anwendbarkeit als Pharmazeutikum zu untermauern.

5. Experimenteller Teil

5.1. Experimentelle Methoden

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Der hydrodynamische Durchmesser der Eisenoxid-Partikel werden mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung im Back Scattering Modus an einem HPPS Particle Sizer der Firma Malvern Instrument mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm in einem Winkel von 173° gemessen. Die DLS-Messungen werden in einer Quartz-Glasküvette der Schichtdicke 1 cm durchgeführt. Die gemessenen Dispersionen enthalten ca. 5·10⁻⁴ wt-% Eisenoxid in Wasser oder DMSO. Die Messergebnisse werden mit Hilfe eines Non-Negative Least- Squares (NNLS) Algorithmus ausgewertet. Zur Charakterisierung der Eisenoxid-Partikel werden die zahlgemittelten Durchmesser d_n betrachtet.

ATR-Infrarotspektroskopie (ATR-IR)

Die Messung der Infrarotspektren erfolgt am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln und wird mit einem ATR-Spektrometer der Firma Shimadzu Typ IR Affinity-1 mit Diamantausstattung aufgenommen. Die Messungen der getrockneten Proben werden ohne weitere Modifikationen durchgeführt.

Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wird am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln durchgeführt. Die Elementaranalyse gibt Aufschluss über den Gehalt der chemischen Elemente C, H und N. Das Analysegerät ist ein Elementar Vario EL mit einer Messgenauigkeit von ±0,3 %. Für jede Probe wurde nur eine Messung durchgeführt.

Magnetisierungsmessungen

Die Messung der Magnetisierung der Partikeldispersion erfolgt an einem *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM) EV7 System der Firma ADE Magnetics. Hierbei wird ein Elektromagnet 3472-70 der Firma GMW Magnet System mit einer maximalen Feldstärke von 2,8·10⁸ A·m⁻¹ und einem Vibrator mit einer Frequenz von 75 Hz genutzt. Bei jeder Messung werden Hystereseschleifen von -1,59·10⁸ A·m⁻¹ bis +1,59·10⁸ A·m⁻¹ aufgenommen.

Thermogravimetrische Analyse

Für die thermogravimetrischen Messungen wird ein Gäret der Firma Perkin Elmer Typ STA 6000 benutzt. Dabei wird die Gewichtsabnahme fester Proben mit steigender Temperatur untersucht. Die Analysen werden mit ca. 10 mg Proben durchgeführt und von 30 °C auf 800 °C mit 10 °C/min erhitzt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Probe für die Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) werden vorbereitet, indem sie auf einer *carbon-coated copper grind* zutropft. Als TEM wird einen LEO 912 Omega, Oberkochen, Deutschland verwendet.

Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die ¹H-NMR-Spektren wurden bei unterschiedlichen Resonanzfrequenzen aufgenommen. Die 300 MHz ¹H-NMR-Spektren wurden an einem FT-NMR-Spektrometer vom Typ Avance II 300 der Fa. Bruker bei Raumtemperatur aufgenommen. Die 600 MHz ¹H-NMR-Spektren wurden an einem FT-NMR-Spektrometer vom Typ Avance II+ 600 der Fa. Bruker bei Raumtemperatur aufgenommen. Alle Geräte waren mit invers detektierenden Probenköpfen mit z-Gradient ausgestattet. Als Lösungsmittel kamen CDCl₃, d₆-DMSO und D₂O zum Einsatz. Das verwendete Lösungsmittel wird bei den Spektren angegeben. Zweidimensionale NOESY-(*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*-)Experimente wurden mit einer Mischzeit von 300 ms aufgenommen. Es wurden 2k Datenpunkte mit jeweils 16 Scans in der direkten Frequenzdimension (t₂) aufgenommen, für die indirekte Dimension (t₁) 256 Inkremente. Zweidimensionale ROESY-(*Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*-)Experimente wurden mit einem Spinlock von 200 oder 300 ms aufgenommen. Es wurden 2k Datenpunkte mit jeweils 72 Scans in der direkten Frequenzdimension (t₂) aufgenommen, für die indirekte Dimension (t₁) 480 Inkremente. ¹H-detektierte Pseudo-2D-DOSY-(*Diffusion Ordered Spectroscopy*-)Experimente wurden mit einer "stimulated echo"-Pulssequenz unter Verwendung von dipolaren Feldgradienten aufgenommen. Für jede gewählte Gradientenstärke wurden 16 Scans aufgenommen, die Gradientenstärke wurde von 1 G/cm bis 47 G/cm in Form einer linearen Gradientenrampe mit 64 Inkrementen variiert. Die Gradienten wurden 2 ms geschaltet, es wurden pro FID 8 k komplexer Datenpunkte aufgenommen. Der Relaxationsdelay betrug 2 s, der Diffusionsdelay 300 ms

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Chromatogramme wurden von Frau Patricia Bach im Institut für Physikalische Chemie der Universität zu Köln aufgenommen. Bei der Anlage handelt es sich um ein Produkt der Fa. hs GmbH. Die Proben wurden in THF gelöst. Das Säulensystem besteht aus einer Vorsäule und drei weiteren Säulen der Fa. MZ-Analysentechnik, die in Reihe geschaltet sind. Die stationäre Phase ist das MZ-Gel SD plus. Die Vorsäule besitzt eine Porengröße von 100 Å. Die drei Säulen besitzen eine Porengröße von jeweils 100 Å, 1000 Å und 10.000 Å. Das Eluat wurde mit einem UV/Vis-Detektor vom Typ S3245 der Fa. Sykam und einem RI-Detektor vom Typ RI2012 der Fa. Schambeck analysiert.

Headspace-Gaschromatographie

Für die Headspace-Gaschromatographie zur Detektion von CO-Gas wurde ein Thermo Scientific Trace 1300 Gaschromatographen mit Helium als Trägergas und einer Shin Carbon ST 1.0 mm x 2 m mikrogepackte Säule verwendet. Die Gase wurden mit einem Thermo Scientific Wärmeleitfähigkeitsdetektor bei 70 °C detektiert. Alle Reaktionen wurden in 10 ml Headspace Glasfläschchen (Vials) (Cat. No. 200410-FF; ND20) gasdicht verschlossen mit einem Aluminiumdeckel (aluminum crimp cap) mit Silikone/PTFE Septum (Cat. No. 20030500; ND20) der Firma BGB Analytik durchgeführt.

5.2. Verwendete Chemikalien

p-Toluolsulfonsäurechlorid (99+%), Natriumazid (99%, *Extrapure*), Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat (99+%, krist.), Aceton (99,8% *Extra Dry*) und Dichlormethan (99,8% *Extra Dry*) wurde von Acros Organics bezogen. Dimethylsulfoxid (99,7+%, *Absolut*) wurde ebenfalls von AcrosOrganics bezogen und wurde über Molsieb gelagert. Eisenacetylacetonat (99%) wurde bei ABCR GmbH & Co KG erworben, während APTES (99%) bei Sigma Aldrich bezogen wurde. Propargylmethacrylat (98%) und 2-Bromisobutyrylbromid wurde von der Fa. Alfa Aesar bezogen und ist mit 1000 ppm 4-Methoxyphenol stabilisiert. Das N,N,N',N',N''-Pentamethyldiethylenetriamin (98%), L-(+)-Natriumascorbat (98+%), Kupfer(I)-bromid (98%), Kupfer(I)-iodid (98%), 2,2'-Bipyridin (99+%), 2-Brom-2-methylpropionsäure-tert-butylester (98,0+%), 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat (E₂) (95%), 2-(2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy)ethylmethacrylat (E₃) (95%) und 2-Methoxyoligo(ethylenglycol)methacrylat (E_{4,5}) (95%) wurde von der Fa. Sigma Aldrich

bezogen, wobei E₂ und E₃ mit jeweils 250 ppm 4-Methoxyphenol stabilisiert sind. β-Cyclodextrin (95+%) wurde von der Fa. Tokyo Chemical Industrie bezogen, während α-CD und γ-CD von AppliChem bezogen wurden. RAMEB wurde bei Sigma Aldrich erworben. DIMEB und TRIMEB wurden von CycloLab TDL. Bezogen. d₆-DMSO (0,03% TMS, H₂O<0,02%) mit einem Deuterierungsgrad von 99,80%, CDCl₃ (0,03% TMS, H₂O<0,02%) mit einem Deuterierungsgrad von 99,80% und Deuteriumoxid mit einem Deuterierungsgrad von 99,90% wurden von der Fa. Eurioso-Top bezogen. Natriumhydroxid und die konzentrierte Salzsäure wurden von der Fa. VWR. Diethylether und Aceton wurden in technischer Qualität bezogen. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

5.3. Synthesen

5.3.1. Allgemeines

Alle Synthesen wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter Argonatmosphäre und in ausgeheizten Apparaturen bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu wurden die Apparaturen, dreimal unter Vakuum ausgeheizt und dreimal mit Argon gespült. Die eingesetzten Spritzen wurden ebenfalls dreimal mit Argon gespült.

5.3.2. Experimente zur Copolymerisation von E_{4,5} mit dem CORM-*i*Ea

Um die idealen Bedingungen für die Copolymerisation von E_{4,5} mit dem CORM-*i*Ea mittels ATRP herauszufinden, wurde zunächst getestet inwieweit sowohl das CORM-*i*Ea als auch der jeweilige Kupferkomplex in den jeweiligen Lösungsmitteln stabil sind. Anschließend wurden die Homopolymerisationen von E_{4,5} und die Copolymerisationen von E_{4,5} mit dem CORM-*i*Ea durchgeführt.

5.3.2.1. Lösungsmittel- und Farb-Tests

Es wurden 2 mg (6,9 mmol) CORM-*i*Ea in 100 µl Lösungsmittel vorgelegt. In einem anderen Kolben wurden 5 mg (34,9 mmol) CuBr und 10,9 mg (69,8 mmol) 2,2'-Bipyridin bzw. 7,47 µl (34,9 mmol) PMDETA in 1000 µl Lösungsmittel gelöst. Die Zugabe des Komplexes zum

CORM-*iEa* erfolgte in 10 μl Schritten bis 100 μl und anschließend in 20 μl Schritten, bis bei 200 μl dieselbe molare Menge erreicht war. Im Anschluss wurden die Farben der möglichen Komplexe von Eisen mit 2,2'-Bipyridin bzw. PMDETA ermittelt. Hierzu wurden 8 mg (0,042 mmol) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bzw. 11 mg (0,042 mmol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 600 μl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst und anschließend 9,1 μl (0,042 mmol) PMDETA bzw. 13 mg (0,084 mmol) 2,2'-Bipyridin zugegeben.

5.3.2.2. ATRP von $\text{E}_{4,5}$

Die sich aus dem Stabilitätstest ergebenden Bedingungen, in denen sowohl der Kupferkomplex als auch das CORM-*iEa* stabil waren, wurden für die Polymerisation von $\text{E}_{4,5}$ verwendet. Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes wurden jeweils nach 1, 3, 6 und 21 Stunden Proben genommen und mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie vermessen.

Für die Polymerisation wurden 500 μl (1,67 mmol, 40 eq) E_x in einen Schlenkkolben gegeben und mit 7,8 μl (0,042 mmol, 1 eq) des Starters *t*BBriB versetzt. In einem anderen Schlenkkolben wurden 6 mg (0,042 mmol, 1 eq) CuBr und 13 mg (0,084 mmol, 2 eq) 2,2'-Bipyridin bzw. 9,1 μl (0,042 mmol, 1 eq) PMDETA hinzugefügt. Nach Zugabe von 1000 μl des jeweiligen Lösungsmittels wurde das E_x /Starter-Gemisch hinzugefügt, um die Polymerisation zu starten.

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, CDCl_3) = 0,98 (d, 3H, CH_3), 1,82 (d, 2H, CH_2), 3,41 (s, 3H, O- CH_3), 3,64 (m $\text{E}_{4,5}$: 16H, O- CH_2), 4,10 (s, 2H, COOCH_2) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 2879 (CH), 1725 (C-O), 1457 (CH), 1107 (C-O) cm^{-1} .

5.3.2.3. Copolymerisation von $\text{E}_{4,5}$ und CORM-*iEa*

Die drei Bedingungen, welche bei der Polymerisation von E_x die höchsten Umsätze ergaben, wurden für die Copolymerisation mit dem CORM-*iEa* verwendet. Wie bei der Polymerisation von E_x wurden auch hier zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs jeweils nach 1, 3, 6 und 21 Stunden Proben genommen und mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie vermessen.

Es wurden 6 mg (0,042 mmol, 1 eq) CuBr und 13 mg (0,084 mmol, 2 eq) Bpy bzw. 9,1 μl (0,042 mmol, 1 eq) PMDETA in einen Schlenkkolben eingewogen und in 1000 μl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst. In einem weiteren Schlenkkolben wurden 96 mg (0,33 mmol, 10 eq) vom CORM-*iEa* sowie 379 mg (1,26 mmol, 30 eq) E_x mit 7,8 μl

(0,042 mmol, 1 eq) des Starters versetzt und anschließend zum Cu(I)-Komplex hinzugegeben, um die Reaktion zu starten.

5.3.3. Synthese der Copolymere PE_xA_χ und PE_xMa_χ und anschließende Funktionalisierung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden Copolymere mit unterschiedlichen Seitenkettenlängen des E_x -Monomers und Zusammensetzung an Comonomeren mittels ATRP hergestellt. Außer E_x wurden als Comonomere AzPMA (A) und Propargylmethacrylat (Ma) verwendet. Das Comonomer A wurde aus 3-Chloro-1-propanol synthetisiert. Die Funktionalisierung der Copolymere erfolgte mittels CuAAC. Um die Copolymere PE_xMa_χ mit β -CD- N_3 zu funktionalisieren, wurde β -CD- N_3 aus β -CD hergestellt.

5.3.3.1. Synthese des Monomers AzPMA

Das benötigte Monomer AzPMA (A) wurde in einer zweistufigen Reaktion synthetisiert.

- Synthese von 3-Azidopropanol (AzPOH)

20 ml (22,62 g, 239,26 mmol) 3-Chloro-1-propanol, 31,11 g (478,52 mmol; 2 äq) Natriumazid und 0,658 g (1,9 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat wurden in 26,7 ml Wasser aufgelöst. Die Mischung wurde bei 80 °C 24 h lang gerührt. Anschließend wurde die Mischung bei RT weitere 13-14 h gerührt. Das Produkt wurde mit Ether (3 x 53,3 ml) extrahiert und die resultierende Lösung mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der Vakuumdestillation wurde das Produkt 3-Azidopropanol erhalten.

Die Ausbeute betrug 15,86 g; 72,92%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): 3,76 (t, 2H, CH_2O), 3,45 (t, 2H, CH_2N_3) 1,83 (tt, 2H, CCH_2C) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 3321 (breit O-H) und 2100 (N_3) cm^{-1} .

- Synthese von 3-Azidopropyl-methacrylat (AzPMA)

Eine Lösung aus 2 ml (2,18 g, 21,6 mmol) 3-Azidopropanol, 3,846 ml (2,79 g, 27,6 mmol, getrocknet über Natriumsulfat) Triethylamin, 8,5 mg (0,08 mmol) Hydroquinon und 8,5 ml

Dichlormethan (getrocknet über Natriumsulfat) wurde in einem Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 2,48 ml (25,5 mmol, 2,68 g) Methacryloylchlorid tropfenweise über 20 min zur obigen Mischung hinzugegeben. Die Lösung wurde noch 1 h im Eisbad gekühlt, bei RT weitere 14 h gerührt und daraufhin mit 8,5 ml Dichlormethan versetzt. Anschließend wurde die Mischung mit einer HCl-Lösung (1/10, v/v, 2 x 8,5 ml), Wasser (2 x 8,5 ml), 10 Massen%-ige NaOH-Lösung (2 x 8,5 ml) und wieder mit Wasser (2 x 8,5 ml) gewaschen. Die Dichlormethan-Lösung wurde mit 8,5 mg Hydroquinon versetzt und über Natriumsulfat getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das reine Produkt wurde über Vakuumdestillation erhalten.

Die Ausbeute betrug 13,77 g, 50,4 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz CDCl_3): 6,11 (s, 1H, =CH), 5,58 (s, 1H, =CH), 4,24 (t, 2H, CH_2O), 3,42 (t, 2H CH_2N_3) und 1,95-2,01 (m, 5H, überlappt $\text{CH}_3\text{C=}$ und CCH_2C) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 2100 (N_3) und 1721 (C=O) cm^{-1} .

5.3.3.2. Synthese von $\beta\text{-CD-N}_3$

Das für die CuAAC verwendete Mono-(6-azido-6-desoxy)- $\beta\text{-CD}$ ($\beta\text{-CD-N}_3$) wurde in einer zweistufigen Synthese hergestellt.

- Synthese von Mono-(6-O-(*p*-tolylsulfonyl))- $\beta\text{-CD}$ ($\beta\text{-CD-N}_3$)

50 g (44 mmol) $\beta\text{-CD}$ wurden in 500 ml 0,4 N NaOH-Lösung gelöst und im Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurden 35 g (184 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid portionsweise hinzugegeben und weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde der Ansatz abfiltriert und das Filtrat mit konz. Salzsäure neutralisiert. Danach wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert und dreimal mit Wasser gewaschen. Der Filtrückstand wurde über Nacht im Trockenschrank vorgetrocknet und im Anschluss im Feinvakuum über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet.

Die Ausbeute betrug 17,2 g, 30%.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, $d_6\text{-DMSO}$) = 2,43 (s, 3H, Ar-CH), 3,16-3,78 (m, 42H, H-2,3,4,5,6) 4,77 (s, 1H, H-1), 4,86 (s, 6H, H-1), 5,72 (m, 14H, OH-2,3) 7,33 (d, 2H, Ar-H(meta)), 7,75 (d, 2H, Ar-H(ortho)) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 3316 (OH), 2924 (CH), 2160 (CH), 2030, 1358 (S=O), 1152 (S-O), 1077 cm^{-1} (OH), 1023 (CH), 945, 841, 756 (OH), 684 (CH) cm^{-1} .

- Synthese von Mono-(6-azido-6-desoxy)- β -CD (β -CD-N₃)

10 g (7,76 mmol) des zuvor dargestellten Mono-(6-O-(*p*-tolylsulfonyl))- β -CD wurden in 100 ml Wasser suspendiert und auf 80 °C erhitzt. Danach erfolgte die Zugabe von 2,52 g (38,8 mmol) Natriumazid. Nach 6 h Rühren bei 80 °C wurde die nun klare Lösung in 600 ml Aceton eingetragen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Feinvakuum über Phosphorpentoxid in einem Exsikkator getrocknet.

Die Ausbeute betrug 8,5 g, 96%.

¹H-NMR: (300 MHz, *d*₆-DMSO) = 3,31 (m, 14H, H-2,4) 3,63 (m, 28H, H-3,5,6),

4,44 (m, 6H, OH-1), 4,82 (s, 6H, H-1) 4,87 (s, 1H, H-1), 5,71 (m, 14H, OH-2,3) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 3316 (OH), 2924 (CH), 2160 (C-C), 2102 (N=N), 2033, 1644 (C=C), 1364 (OH), 1152 (C-N), 1077 (OH), 1025 (CH), 945, 853, 756 (NH), 704 cm⁻¹ (CH) cm⁻¹.

5.3.3.3. Copolymere aus E_{4,5} und A

Die Comonomere wurden in den in Tabelle 5.1 angegebenen Mengen eingesetzt. Die molaren Verhältnisse zwischen Initiator, Katalysatorsystem und der Gesamtstoffmenge der eingesetzten Comonomere waren bei allen Ansätzen gleich gewählt. Für die Synthese aller Copolymere wurde ein molares Verhältnis von 2,5% zu 100% AzPMA (A) eingesetzt.

Tabelle 5.1. Syntheseparameter für die Copolymere PA und PE_{4,5}A_x. Stoffmenge und Volumina der eingesetzten Comonomere.

Polymere	E _{4,5}		A	
	n / mmol	m / ml	n / mmol	m / ml
PA	0	0	5,92	1000
PE _{4,5} A _{20%}	8,50	3200	2,70	450
PE _{4,5} A _{10%}	12,00	3600	1,33	226
PE _{4,5} A _{5%}	12,67	3800	0,67	113
PE _{4,5} A _{2,5%}	13,00	3900	0,33	56

Die molaren Verhältnisse zwischen Initiator, Katalysatorsystem und der Gesamtstoffmenge der eingesetzten Comonomere waren bei allen Ansätzen gleich gewählt. Für die Synthese von PA wurden 1000 μ l Aceton und 75 μ l Diphenylether als Lösungsmittel verwendet. Des

Weiteren wurden 24,7 mg (0,15 mmol, 27,6 μ l, 1 eq) *t*BBriB, 21,2 mg (0,15 mmol, 1 eq) CuBr und 46,4 mg (0,30 mmol, 1 eq) Bpy verwendet. Die gleiche Versuchsdurchführung galt für alle in diesem Abschnitt synthetisierten Polymere. Die Comonomere wurden in 4000 μ l Aceton und 300 μ l Diphenylether in einem 25 ml Schlenkkolben aufgelöst. Bei einem fünfmaligen Frieren-Pumpen-Auftauen-Zyklus wurde das Gemisch entgast. Danach wurden 47,8 mg (0,33 mmol, 1 äq) CuBr und 104,1 mg (0,66 mmol, 2 äq) Bpy zu der gefrorenen Mischung gegeben. Es wurde dreimal sekuriert und die Reaktionsmischung auf 50 °C erhitzt. Nachdem der Katalysator aufgelöst war, wurde die Reaktion mit 62,2 μ l (0,33 mmol, 1 äq) *t*BBriB gestartet. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Copolymer mit Diethylether ausgefällt und der Katalysator wurde mit einer neutralen Aluminiumoxid-Säule entfernt.

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃) = 0,98 (d, 3H, CH₃), 1,48 (d, 3H, CH₃), 1,82 (t, 2H, CH₂), 3,10 (m, 2H, CH₂), 3,41 (s, 3H, O-CH₃), 3,64 (m, 16H, O-CH₂), 4,10, 4,25 (s, 2H, COOCH₂) ppm.
FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 2879 (CH), 2100 (N₃), 725 (C-O), 1457 (CH), 1107 (C-O) cm⁻¹.

5.3.3.4. Copolymere aus E_x und Ma

Die eingesetzten Mengen der Comonomere sind in der Tabelle 5.2 und in der Tabelle 5.3 angegeben. Die molaren Verhältnisse zwischen Initiator, Katalysatorsystem und der Gesamtstoffmenge der eingesetzten Comonomere ändern sich in jedem Ansatz. Für die Synthese aller Copolymere wurde ein molares Verhältnis von 5% C zu 20% Propargylmethacrylat (Ma) eingesetzt.

Es wurden zwei 50 ml Schlenkkolben vorbereitet. In den ersten Kolben wurden CuBr und Bpy eingefüllt. In den zweiten Kolben wurden 4 ml DMSO, E_x, Ma und *t*BBriB eingefüllt. Nachdem die Kolben sekuriert und mit einem Septum verschlossen wurden, wurde der Inhalt des zweiten Kolbens in den ersten Kolben mit einer Spritze überführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Polymer mit Diethylether ausgefällt und der Katalysator mit einer neutralen Aluminiumoxid-Säule entfernt.

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃) = 0,98 (d, 3H, CH₃) 1,82 (t, 2H, CH₂), 2,55 (s, 1H, CCH), 3,41 (s, 3H, O-CH₃) 3,64 (m, E₂: 6H, E₃: 10H, E_{4,5}: 16H O-CH₂), 4,10 (s, 2H, COOCH₂) 4,62 (s, 2H, CH₂-C) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 3258 (CCH), 2879 (CH), 2162 (N₃), 1725 (C-O), 1457 (CH), 1107 (C-O) cm⁻¹.

Tabelle 5.2. Syntheseparameter für die Copolymere PE_xMa_x . Massen und Volumina der eingesetzten Chemikalien.

Copolymere	V(E_x) / ml	V(Ma) / μ l	V(t BBriB) / ml	m(CuBr) / mg	m(Bpy) / mg
PE ₂ Ma _{20%}	3,18	524	82,3	76,0	164,8
PE ₂ Ma _{10%}	3,56	267	82,3	76,0	164,8
PE ₃ Ma _{10%}	3,88	217	80,4	61,8	134,6
PE _{4,5} Ma _{15%}	3,40	253	62,2	47,3	103,0
PE _{4,5} Ma _{10%}	3,60	168	62,2	47,3	103,0
PE _{4,5} Ma _{5%}	3,80	84	62,2	47,3	103,0

Tabelle 5.3. Syntheseparameter für die Copolymere PE_xMa_x . Übersicht über die Stoffmengen der eingesetzten Chemikalien.

Copolymere	n(E_x) / mmol	n(Ma) / mmol	n(t BBriB) / mmol	n(CuBr) / mmol	n(Bpy) / mmol
PE ₂ Ma _{20%}	17,08	4,18	0,53	0,53	1,06
PE ₂ Ma _{10%}	19,13	2,13	0,53	0,53	1,06
PE ₃ Ma _{10%}	15,50	1,72	0,43	0,43	0,86
PE _{4,5} Ma _{15%}	11,30	2,00	0,33	0,33	0,66
PE _{4,5} Ma _{10%}	12,00	1,33	0,33	0,33	0,66
PE _{4,5} Ma _{5%}	12,70	0,67	0,33	0,33	0,66

5.3.3.5. CuAAC der Copolymere PE_{4,5}A_x

Allgemein wurde die CuAAC unter Argon-Atmosphäre in THF durchgeführt. Als Katalysator/Ligand-Komplex wurden CuI und DIPEA in einem Verhältnis von 1 zu 68 eingesetzt. Die Reaktion dauert ca. 18 Stunden. Die eingesetzten Stoffmengen der verwendeten Chemikalien für die CuAAC sind in der Tabelle 5.4 aufgelistet.

In einem 25 ml Schlenkkolben wurden 50 mg (1 äq A) des jeweiligen Copolymers mit 1,1 äq CORM-*i*5Ha und 12,9 äq DIPEA in 2,5 ml THF aufgelöst. Durch ein Einfrieren- und Auftau-Zyklus wurde die Reaktionslösung entgast. 0,19 äq CuI wurden zu der gefrorenen Lösung hinzugegeben und sekuriert. Beim Auftauen der Reaktionslösung wurde die Reaktion gestartet.

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃) = 0,98 (d, 3H, CH₃), 1,48 (d, 3H, CH₃), 1,82 (t, 2H, CH₂), 2,28 (sm, 2H, CH₂), 2,57 (st, 2H, CH₂), 2,80 (sm, 1H, CH), 3,10 (m, 2H, CH₂), 3,41 (s, 3H, O-CH₃), 3,64 (m, 16H, O-CH₂), 4,10, 4,25 (s, 2H, COOCH₂) 5,50 (sd, 1H, CH), 7,50 (s, 1H, CH) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 2879 (CH), 2100 (N₃), 725 (C-O), 1457 (CH), 1107 (C-O) cm⁻¹.

Tabelle 5.4. Syntheseparameter für die CuAAC der Copolymere $PE_{4,5}A_{\chi}$. Übersicht über die Stoffmengen der eingesetzten Chemikalien.

Copolymere	n(A) / mmol	n(CORM- <i>i</i> 5Ha) / mmol	n(CuI) / mmol	n(DIPEA) / μ mol
$PE_{4,5}A_{10\%}$	29,6	32,6	5,6	381,8
$PE_{4,5}Ma_{5\%}$	14,8	16,3	2,8	190,9

5.3.3.6. CuAAC der Copolymere PE_xMa_{χ} mit β -CD- N_3

Die Durchführung der CuAAC lief immer unter den gleichen Bedingungen ab. Es änderte sich nur die Sorte des verwendeten Copolymers PE_xMa_{χ} .

Es wurden zwei 50 ml Schlenkkolben vorbereitet. In den ersten Kolben wurde der Katalysator/Ligand-Komplex, bestehend aus 57,1 mg (0,3 mmol, 0,5 äq) CuI und 125,3 μ l (0,6 mmol, 1 äq) PMDTA, eingewogen. Der zweite Kolben wurde unter Rühren mit 20 ml DMSO, 1,39 g (1,2 mmol, 2 äq) β -CD- N_3 und 500 mg (0,6 mmol Ma) einer Sorte der Copolymere PE_xMa_{χ} befüllt. Nachdem die Kolben sekuriert und mit einem Septum verschlossen wurden, wurde der Inhalt des zweiten Kolbens in den ersten Kolben mit einer Spritze überführt. Der Ansatz wurde anschließend über Nacht bei 90 °C gerührt.

Zur Aufreinigung wurde der Reaktionsansatz in Diethylether ausgefällt und mit Diethylether gewaschen. Danach wurde das Rohprodukt in 60 ml Wasser gelöst und auf zwei Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt. Durch die Zugabe von je 10 g Ammoniumsulfat in jedes Zentrifugationsröhrchen wurde das Produkt ausgefällt und bei 6000 rpm abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abdekantiert worden war, wurde das Produkt erneut in Wasser gelöst. Der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das β -CD-funktionale Copolymer wurde an der Vakuumpumpe getrocknet und trocken aufbewahrt.

1 H-NMR: (600 MHz, d_6 -DMSO) = 0,80 (d (br), 3H, CH₃), 1,74 (s (br), 2H, CH₂), 3,30 (d, 3H, O-CH₃ überlagert mit 14H, H-2,4), 3,41-3,79 (m, E₂ : 6H, E₃ : 10H, E_{4,5}: 16H, O-CH₂ überlagert mit 28H, H-3,5,6), 4,01 (s, 2H, COOCH₂), 4,44 (s, 14H, OH-1), 4,64 (s, 2H, CH₂-C), 4,85 (s, 6H, H-1), 5,04 (s, 2H, O-CH₂ (Triazolring)), 5,71 (s, 14H, OH-2.3), 7,97 (s, 1H, CH (Triazolring)) ppm.

FT-IR (Diamant): $\tilde{\nu}$ = 3247 (OH), 2910 (CH), 2162 (N₃), 1725 (C-O), 1457 (CH), 1081 (C-O), 1024 (C-O) cm⁻¹.

5.3.4. Herstellung der CD/ET-CORM-Komplexe

Für die Komplexierungs- und Löslichkeits-Experimente wurden neun unterschiedliche Lösungen aus CDs und ET-CORMs mit einem Molenbruch an ET-CORM von 0,0 bis 0,4 vorbereitet, indem die beiden Komponenten, CDs und ET-CORMs zu 1 ml D₂O hinzugefügt wurden. Die Lösungen wurden dann im Ultraschallbad bei 70 °C 20 min behandelt (25 kHz, 50% Intensität). Die Proben für die 2D-NMR-Experimente wurden, wie oben beschrieben, vorbereitet. Jedoch betrug bei der RAMEB/CORM-*ePa*-Mischung das Verhältnis zwischen RAMEB und ET-CORM 5:1, während bei der RAMEB/CORM-*eAa*-Mischung ein Verhältnis von 3:1 vorlag. Für die ¹H-NMR-Titrationsexperimente wurden vier Proben mit je 10 mM ET-CORMs und 1 ml D₂O vorbereitet. Die RAMEB-Konzentration wurde von 10 mM zu 80 mM nach jeder ¹H-NMR-Messung gesteigert. Bevor die Proben mittels ¹H-NMR analysiert wurden, wurden sie nach jedem Schritt im Ultraschallbad bei 70 °C ca. 1 min behandelt (25 kHz, 50% Intensität).

5.3.5. Synthese der MNPs

5.3.5.1. Synthese von Fe₃O₄@CS

7,12 g (20 mmol) Fe(acac)₃ wurden in 200 ml TREG in einem 500 ml Dreihalskolben mit Rührfisch und Rückflusskühler gelöst. Bei geöffnetem Dreihalskolben wurde die Lösung bei 120 °C für 1 h dehydriert. Unter Argonatmosphäre wurde die Lösung bei 280 °C für 2 h erhitzt. Die Fe₃O₄-Nanopartikel wurden durch die Zugabe von 200 ml Ethylacetat ausgefällt und dann mittels Zentrifugation (6000 rpm, 10 min) isoliert. Die Fe₃O₄-Nanopartikel wurden dann in EtOH resuspendiert, wieder mit Ethylacetat ausgefällt und via Zentrifugation isoliert. Dieser Waschvorgang wurde 3-mal wiederholt. Die MNPs wurden zweimal mit H₂O gewaschen, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Anschließend wurden 5 ml H₂O hinzugegeben und die MNP-Wasser-Mischung mit einer 0,1 M Zitronensäurelösung versetzt (pH 3). Daraufhin wurde 25%-ige Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung (TMAH) schrittweise hinzugefügt bis die Dispersion einen pH-Wert von 7 erreichte. Die MNPs wurden mit Aceton ausgefällt, gewaschen und schließlich in H₂O dispergiert. Nach der Synthese und Dispersion der MNPs in Wasser wurde ein Dispersionsvolumen von 15,22 ml (15,58 g; 1,02 g·cm⁻³) erhalten. Insgesamt waren in der Dispersion 1,35 g Fe₃O₄@CS-Partikel enthalten, was einem Massenanteil von 8,66% an Fe₃O₄@CS-Partikel entspricht.

5.3.5.2. Synthese von $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$ und Funktionalisierung der Copolymer-Hülle mit CORM-*i*5Ha

Die Herstellung der MNPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$ erfolgte in drei Syntheseschritten. Die $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$ wurden zuerst mit APTES beschichtet. Anschließend wurden die Amino-Gruppen von an den MNP-Oberflächen kondensiertem APTES mit 2-Bromisobutyrylbromid (BriBBr) zur Reaktion gebracht. Auf diese Weise funktionalisierte MNPs ermöglichen deren Einsatz als Initiator für die ATRP. Im letzten Syntheseschritt wurde eine Oberflächen-initiierte Copolymerisation mit den Comonomeren $E_{4,5}$ und A durchgeführt. Die Funktionalisierung der Copolymer-Hülle mit dem CORM-*i*5Ha erfolgte in THF mittels CuAAC.

- Synthese von $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$

In einem 1 l Rundkolben wurden 1 l absolutes EtOH vorgelegt. Anschließend wurden 3,1 ml (1 mg) MNPs hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für ca. 30 min ins Ultraschallbad gestellt (25 kHz, 100%). Nach der Zugabe von 3,1 ml (2,93 g; 13,25 mmol) APTES wurde die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Nach der Reaktion wurde das Reaktionsvolumen am Rotationsverdampfer auf ein Hundertstel reduziert. Nach der magnetischen Trennung wurden aminofunktionalisierte MNPs mit einer Siliziumoxid-Schicht erhalten, die sofort für die nächste Reaktion weiterverwendet wurden.

- Synthese von $\text{Fe}_3\text{O}_4@Br$

Die $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$ -Partikel wurden in einen 100 ml Dreihalskoben, in dem 50 ml trockenes Dichlormethan und 1,5 ml (10,8 mmol) Triethylamin vorgelegt wurden, gegeben und in ein Eisbad gestellt. Die Reaktionsmischung wurde mit einem KPG-Rührer gerührt und über einen Tropftrichter tropfenweise 1,2 ml (9,7 mmol) BriBBr hinzugegeben. Die Reaktion lief über Nacht unter Schutzgas. Die MNPs wurden magnetisch abgetrennt, mit einer 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ -Mischung bei pH 4,0 (eingestellt mit 100%iger Essigsäure) gewaschen und dann mit einer 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ -Mischung gewaschen. Schließlich wurden sie mit Diethylether gewaschen und in DMSO dispergiert. Nach der Synthese und Dispersion der MNPs in DMSO wurde ein Dispersionsvolumen von 13,91 ml (15,75 g; $1,13 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) erhalten. Insgesamt sind in der Dispersion 0,74 g $\text{Fe}_3\text{O}_4@Br$ -Partikel vorhanden, was einem Massenanteil von 4,70% entspricht.

- Synthese von $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$

In einem 25 ml Schlenkkolben wurden 24,4 mg (1 äq, 0,17 mmol) CuBr und 53,1 mg (2 äq, 0,34 mmol) Bpy eingewogen und sekuriert. In einem anderen 25 ml Schlenkkolben wurden 8 ml DMSO vorgelegt und dann 1,94 ml (95 mol%, 6,5 mmol) $\text{E}_{4,5}$, 57,5 μl (5 mol%, 0,34 mmol) AzPMA und 200 mg (0,170 mmol Starter) $\text{F}_3\text{O}_4@\text{Br}$ -Partikel hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde sekuriert und mit einer mit Schutzgas gespülten Spritze in den Schlenkkolben, der den Katalysator enthält, gegeben. Die Reaktion lief über Nacht. Die mit Polymer-umhüllten MNPs wurden mit Diethylether gereinigt und in DMSO dispergiert. Nach der Synthese und Dispersion der Polymer-umhüllten MNPs in DMSO wurde ein Dispersionsvolumen von 6,2 ml (6,91 g; $1,12 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) erhalten. Insgesamt sind in der Dispersion 1,39 g Polymer-umhüllte MNPs enthalten, was einem Massenanteil von 20,12% an $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$ -Partikeln in der Dispersion entspricht.

- Funktionalisierung der Copolymer-Hülle der $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$ -Partikel mit dem CORM-*i5Ha*

50 mg (5 mol%, 12,6 μmol , 1 äq AzPMA) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}$ -Partikel wurden in 2,5 ml THF in einem 25 ml Schlenkkolben redispergiert. Danach wurden 4,6 mg (13,8 μmol) CORM-*i5Ha* und 27,7 μl (162 μmol , 12,9 äq) DIPEA zu der Reaktionslösung hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde durch fünf Frieren-Pumpen-Auftauen-Zyklen entgast. Schließlich wurde auf die gefrorene Lösung 0,5 mg (2,7 μmol , 0,19 äq) CuI gegeben, dreimal sekuriert und die Reaktion über Nacht laufen gelassen, Nach dem Ausfällen der MNPs aus der Lösung, wurde $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PE}_{4,5}\text{A}_{5\%}(\text{C})$ als Produkt erhalten und trocken aufbewahrt.

5.3.6. Zelltests

Zelltests mit den hergestellten ET-CORM-tragenden Materialien wurden von der AG Prof. Dr. B. Yard an der V. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt.

5.3.6.1. Zellkulturen

HUVEC-Zellen wurden aus frischen Nabelschnüren, wie in der Literatur beschrieben^[181], isoliert. Die Zellen wurden in einem basalen Endothelial-Medium, das 10% FBS (*fetal bovine serum*) und die essentiellen Wachstumsfaktoren enthielt, bis zur Konfluenz kultiviert.

Menschliche PTEC-Zellen wurden chirurgisch aus Nephrektomie-Proben nach *Detrisac et al.*^[182] erhalten, kultiviert und subkultiviert.

5.3.6.2. Zelltoxizität

HUVEC- und PTEC-Zellen wurden in 24- oder 96-Wellplatten bis zur Konfluenz gezüchtet und in der Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an ET- CORMs für 24 h kultiviert. Die Zelltoxizität wurde mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), gemäß den Anweisungen des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), bestimmt. Die Zellviabilität wurde als Prozentsatz lebensfähiger Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ausgedrückt. Die Zellexperimente wurden drei Mal unter oben beschriebenen Versuchsbedingungen durchgeführt.

5.3.6.3. Hypothermie-induzierte Zellschädigungstests

Die Toleranz der Zellen gegenüber Hypothermie wurde mittels Lactatdehydrogenase-Freisetzung ermittelt. Zu diesem Zweck wurden HUVEC- und PTEC-Zellen in Platten mit 24 Vertiefungen geimpft und bis zur Konfluenz gezüchtet. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von ET-CORMs im Konservierungsmedium ohne vorherige Vorbehandlung zugegeben. Die Platten wurden auf Eis bei 4 °C für 24 h gebracht. In Kontrollexperimenten waren die ET-CORMs im Medium nicht vorhanden. Zellschäden wurden durch die LDH-Freisetzung im Überstand, nach den Anweisungen des Herstellers (Roche Diagnostics) bestimmt. Alle experimentellen Bedingungen wurden dreifach getestet.

5.3.6.4. Western Blot

HUVEC-Zelllysate wurden durch Lyse in Lysepuffer (10 mM Tris, 2% SDS, 0,5% β -Mercaptoethanol) (alle von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) erhalten. Die Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung von Coomassie-Reagenz (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Proben aus 20 mg Protein-Extrakt wurden auf 95 °C für 5 min erhitzt und auf 10% SDS-polyacrylamidgels aufgetragen und getrennt. Es erfolgte ein Semidry Blot auf PVDF-Membranen (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Membranen wurden mit Blockierungspuffer (5% w/v fettfreier, trockener Milch in TBS/Tween 0,5%) blockiert und über Nacht bei 4 °C mit polyklonalen anti-VCAM-1 (R & D Systems,

Wiesbaden, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen gründlich mit TBS-Tween gewaschen und mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Jackson Immuno Research, Baltimore, MD) inkubiert. Proteine wurden unter Verwendung verbesserter Chemolumineszenz Technik, entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Pierce, Rockford, IL) visualisiert. Um die gleiche Proteinbeladung zu bestätigen, wurden Membranen gestrippt und erneut mit monoklonalen Anti-GAPDH-Antikörpern (Abcam, Cambridge, UK) sondiert.

6. Literatur

- [1] R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 728–743.
- [2] R. Foresti, M. G. Bani-Hani, R. Motterlini, *Intensive Care Med.* **2008**, *34*, 649–658.
- [3] R. Motterlini, B. Haas, R. Foresti, *Med. Gas Res.* **2012**, *2*, 1–28.
- [4] S. W. Ryter, A. M. K. Choi, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *41*, 251–260.
- [5] E. Zeynalov, Z. A. Shah, R.-C. Li, S. Doré, *Neurobiol. Dis.* **2009**, *35*, 264–269.
- [6] H. P. Kim, S. W. Ryter, A. M. K. Choi, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 411–449.
- [7] L. R. Goldbaum, R. G. Ramirez, K. B. Absalon, *Aviat Sp. Env. Med.* **1975**, *46*, 1289–1291.
- [8] R. Motterlini, J. E. Clark, F. Roberta, P. Sarathchandra, B. E. Mann, C. J. Green, *Circ. Res.* **2002**, *90*, e17–e24.
- [9] Ulrich Müller, Charles E. Mortimer, *Chemie: Das Basiswissen Der Chemie*, Thieme, **2010**.
- [10] S. H. Heinemann, T. Hoshi, M. Westerhausen, A. Schiller, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3644–3660.
- [11] M. D. Maines, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **1988**, *2*, 2557–2568.
- [12] R. D. Coburn, *Ann. New York Acad. Sci.* **1970**, *174*, 11–22.
- [13] E. Aztatzi-Santillan, F. Eduardo Nares-Lopez, B. Marquez-Valadez, P. Aguilera, M. Elena Chanez-Cardenas, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 310–316.
- [14] B. S. Zuckerbraun, B. Y. Chin, B. Wegiel, T. R. Billiar, E. Czimadia, J. Rao, L. Shimoda, E. Ifedigbo, S. Kanno, L. E. Otterbein, *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2109–2119.
- [15] H. Lin, J. J. McGrath, *Drug Chem. Toxicol.* **1988**, *11*, 371–385.
- [16] J. Kohmoto, A. Nakao, D. B. Stolz, T. Kaizu, A. Tsung, A. Ikeda, H. Shimizu, T. Takahashi, K. Tomiyama, R. Sugimoto, *Am. J. Transplant.* **2007**, *7*, 2279–2290.
- [17] A. Nakao, D. J. Kaczorowski, Y. Wang, J. S. Cardinal, B. M. Buchholz, R. Sugimoto, K. Tobita, S. Lee, Y. Toyoda, T. R. Billiar, *J. Hear. Lung Transplant.* **2010**, *29*, 544–

- 553.
- [18] S. Takaki, N. Takeyama, Y. Kajita, T. Yabuki, H. Noguchi, Y. Miki, Y. Inoue, T. Nakagawa, H. Noguchi, *Intensive Care Med.* **2010**, *36*, 42–48.
- [19] C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391–401.
- [20] C. C. Romão, W. A. Blättler, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3571–3583.
- [21] R. Motterlini, P. Sawle, J. Hammad, S. Bains, R. Alberto, R. Foresti, C. J. Green, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **2005**, *19*, 284–286.
- [22] T. S. Pitchumony, B. Spingler, R. Motterlini, R. Alberto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4849–4854.
- [23] S. D. Friis, R. H. Taaning, A. T. Lindhardt, T. Skrydstrup, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *113*, 18114–18117.
- [24] M. Bochmann, *Organometallics: Complexes with Transition Metal-Carbon [sigma]-Bonds*, Oxford University Press Inc, New York, **1994**.
- [25] U. Schatzschneider, *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *374*, 19–23.
- [26] B. Arregui, B. López, M. García Salom, F. Valero, C. Navarro, F. J. Fenoy, *Kidney Int.* **2004**, *65*, 564–574.
- [27] R. Kretschmer, G. Gessner, H. Görls, S. H. Heinemann, M. Westerhausen, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 6–9.
- [28] J. A. S. Howell, P. M. Burkinshaw, *Chem. Rev.* **1983**, *83*, 557–599.
- [29] D. J. Darensbourg, J. D. Draper, D. L. Larkins, B. J. Frost, J. H. Reibenspies, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2538–2546.
- [30] S. Romanski, B. Kraus, M. Guttentag, W. Schlundt, H. Rücker, A. Adler, J.-M. Neudörfl, R. Alberto, S. Amslinger, H.-G. Schmalz, *R. Soc. Chem.* **2012**, *41*, 13862–13875.
- [31] S. Romanski, B. Kraus, U. Schatzschneider, J.-M. Neudörfl, S. Amslinger, H.-G. Schmalz, *Angew. Chemie* **2011**, *123*, 2440–2444.
- [32] A. Bohac, M. Lettrichova, P. Hrnčiar, M. Hutta, *J. Organomet. Chemistry* **1996**, *507*,

- 23–29.
- [33] V. Reboul, C. Guillou, C. Thai, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8355–8358.
- [34] J. A. S. Howell, A. G. Bell, P. J. O’Leary, *Organometallics* **1996**, *15*, 4247–4257.
- [35] S. Botov, E. Stamellou, M. Guttentag, R. Alberto, J. Neudo, B. Yard, H. Schmalz, *Organometallics* **2013**, *32*, 3587–3594.
- [36] G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2013**.
- [37] T. Desmet, W. Soetaert, P. Bojarová, V. Křen, L. Dijkhuizen, V. Eastwick-Field, A. Schiller, *Chemistry* **2012**, *18*, 10786–10801.
- [38] U. Hasegawa, A. J. van der Vlies, E. Simeoni, C. Wandrey, J. A. Hubbell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18273–18280.
- [39] I. Neundorff, J. Hoyer, K. Splith, R. Rennert, H. W. Peindy N’dongo, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2008**, *43*, 5604–5606.
- [40] S. E. McGlynn, D. W. Mulder, E. M. Shepard, J. B. Broderick, J. W. Peters, *Dalton Trans.* **2009**, *22*, 4274–4285.
- [41] A. E. Pierri, A. Pallaoro, G. Wu, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18197–18200.
- [42] A. R. Marques, L. Kromer, D. J. Gallo, N. Penacho, S. S. Rodrigues, D. Seixas, A. M. L. Gonc, M. N. De Matos, I. Bento, L. E. Otterbein, *Organometallics* **2012**.
- [43] L. Y. T. Chou, K. Ming, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 233–245.
- [44] F. H. Schacher, P. A. Rugar, I. Manners, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 7898–78921.
- [45] P. C. Kunz, H. Meyer, J. Barthel, S. Sollazzo, A. M. Schmidt, C. Janiak, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4896–4898.
- [46] M. Eddaoudi, D. B. Moler, H. Li, B. Chen, T. M. Reineke, M. O’Keeffe, O. M. Yaghi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 319–330.
- [47] T. R. Cook, Y.-R. Zheng, P. J. Stang, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 734–777.

-
- [48] C. Janiak, J. K. Vieth, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2366–2388.
- [49] S. K. Henninger, F. Jeremias, H. Kummer, C. Janiak, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 2625–2634.
- [50] M. Ma, H. Noei, B. Mienert, J. Niesel, E. Bill, M. Muhler, R. A. Fischer, Y. Wang, U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6785–6790.
- [51] A. C. Lauer, M. L. Lieb, C. Ramachandran, G. L. Flynn, N. D. Weiner, *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 179–186.
- [52] J.-F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules* **2006**, *39*, 893–896.
- [53] S. Han, M. Hagiwara, T. Ishizone, *Macromolecules* **2003**, *36*, 8312–8319.
- [54] J.-F. Lutz, O. Akdemir, A. Hoth, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13046–13047.
- [55] H. Kitano, T. Hirabayashi, M. Gemmei-Ide, M. Kyogoku, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 1651–1659.
- [56] B. Zhao, D. Li, F. Hua, D. R. Green, *Macromolecules* **2005**, *38*, 9509–9517.
- [57] H. Staudinger, O. Schweitzer, *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 2395–2405.
- [58] E. Schütz, *Arzneim. Forsch.* **1953**, *3*, 451–456.
- [59] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1–39.
- [60] G. Mantovani, F. Lecolley, L. Tao, D. M. Haddleton, J. Clerx, J. J. L. M. Cornelissen, K. Velonia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2966–2973.
- [61] P. Masson, G. Beinert, E. Franta, P. Rempp, *Polym. Bull.* **1982**, *7*, 17–22.
- [62] K. Ito, H. Tsuchida, A. Hayashi, T. Kitano, E. Yamada, T. Matsumoto, *Polym. J.* **1985**, *17*, 827–839.
- [63] X. Jiang, E. B. Vogel, M. R. Smith, G. L. Baker, *J. Polym. Sci.* **2007**, *45*, 5227–5236.
- [64] X. Jiang, E. B. Vogel, M. R. Smith, G. L. Baker, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1937–1944.
- [65] S. C. G. Biagini, A. L. Parry, *J. Polym. Sci.* **2007**, *45*, 3178–3190.
- [66] D. Neugebauer, *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1469–1498.
-

-
- [67] P. Lacroix-Desmazes, F. Chauvin, R. Severac, B. Boutevin, *Macromolecules* **2001**, *34*, 8866–8871.
- [68] C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3661–3688.
- [69] J. Chiefari, Y. K. B. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, P. T. L. Tam, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [70] D. Neugebauer, Y. Zhang, T. Pakula, S. S. Sheiko, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2003**, *36*, 6746–6755.
- [71] S. Yamamoto, J. Pietrasik, K. Matyjaszewski, *J. Polym. Sci.* **2007**, *46*, 194–202.
- [72] J.-F. Lutz, *J. Polym. Sci.* **2008**, *46*, 3459–3470.
- [73] V. Coessens, T. Pintauer, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 337–377.
- [74] B. S. Sumerlin, N. V. Tsarevsky, G. Louche, R. Y. Lee, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 7540–7545.
- [75] J.-F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 514–518.
- [76] M. Munteanu, S. Choi, H. Ritter, *Macromolecules* **2008**, *41*, 9619–9623.
- [77] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714–10721.
- [78] H. W. Ma, J. H. Hyun, P. Stiller, A. Chilkoti, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 338–341.
- [79] P. Banerjee, D. J. Irvine, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 331–339.
- [80] D. C. Popescu, R. Lems, N. A. A. Rossi, C.-T. Yeoh, J. Loos, S. J. Holder, C. V. C. Bouten, N. A. J. M. Sommerdijk, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2324–2329.
- [81] J. Hyun, H. Ma, Z. Zhang, T. P. Beebe, A. Chilkoti, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 576–579.
- [82] J. Nicolas, G. Mantovani, D. M. Haddleton, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1083–1111.
- [83] B. S. Lele, H. Murata, K. Matyjaszewski, A. J. Russell, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3380–3387.
- [84] R. B. Greenwald, *J. Control. Release* **2001**, *74*, 159–171.
-

-
- [85] G. Pasut, F. M. Veronese, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *192*, 95–134.
- [86] J.-F. Lutz, S. Stiller, A. Hoth, L. Kaufner, U. Pison, R. Cartier, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3132–3138.
- [87] E. D. Pressly, R. Rossin, A. Hagooley, K. Fukukawa, B. W. Messmore, M. J. Welch, K. L. Wooley, M. S. Lamm, R. A. Hule, D. J. Pochan, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3126–3134.
- [88] A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1891**, *112*, 536–538.
- [89] F. Schardinger, *Zeitschrift für Leb. und Forsch.* **1903**, *19*, 865–880.
- [90] J. A. DePinto, L. L. Campell, *Biochemistry* **1968**, *7*, 121–125.
- [91] H. Bender, *Arch. Microbiol.* **1977**, *111*, 271–282.
- [92] F. Cramer, F.-M. Henglein, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 308–310.
- [93] S. Krees, Wirt-Gast-Komplexe Mit Cyclodextrinen Strukturelle Merkmale Und Didaktisches Potenzial, Bergischen Universität Wuppertal, **2009**.
- [94] M. Sakurai, K. Masaki, H. Hajime, I. Yoshio, R. Riichiro, *Carbohydr. Res.* **1990**, *198*, 181–191.
- [95] D. French, M. L. Levine, J. H. Pazur, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *1*, 1–3.
- [96] B. W. Saenger, C. Betzel, G. M. Brown, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 883–884.
- [97] K. Lindner, W. Saenger, *Angew. Chem.* **1978**, *147*, 738–740.
- [98] E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046.
- [99] L. Liu, Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *42*, 1–14.
- [100] F. Hacket, V. Ru, H. Ikeda, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755–1785.
- [101] R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S. N. Hiremath, *J. Pharm. Sci. Technol.* **2010**, *2*, 171–183.
- [102] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- [103] M. H. Stenzel, F. Yhaya, A. M. Gregory, *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 195–210.
-

-
- [104] F. van de Manakker, T. Vermonden, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3157–3175.
- [105] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045–207.
- [106] T. Loftsson, M. S. Duan, N. Zhao, I. B. Ossurardottir, T. Thorsteinsson, *Int. J. Pharm.* **2005**, *297*, 213–222.
- [107] T. Loftsson, I. B. Ossurardottir, T. Thorsteinsson, M. Duan, M. Masson, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *52*, 109–117.
- [108] S. Klein, F. M. Wempe, T. Zoeller, N. L. Buchanan, J. L. Lambert, M. G. Ramsey, K. J. Edgar, C. M. Buchanan, *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *61*, 23–30.
- [109] G. Wenz, *Angew. Chemie-International Ed. English* **1994**, *33*, 803–822.
- [110] D. Rong, V. T. Dsouza, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4275–4278.
- [111] R. I. Gelb, L. M. Schwartz, J. J. Bradshaw, D. A. Laufer, *Bioorg. Chem.* **1980**, *9*, 299–304.
- [112] J. Canceill, J. Ludovic, L. Liliane, J.-M. Lehn, *Chim. Acta* **1992**, *75*, 791–812.
- [113] L. D. Melton, K. N. Slessor, **1971**, *18*, 29–37.
- [114] J. Zhou, H. Ritter, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1552–1559.
- [115] J. L. Arias, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 1589–608.
- [116] A. Grobe, C. Schneider, M. Rekić, V. Schetula, *Nanomedizin - Chancen Und Risiken, Gutachten Im Auftrag Der Friedrich-Ebert-Stiftung*, **2008**.
- [117] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2003**, *167*, R167–R181.
- [118] V. Holzapfel, M. Lorenz, C. K. Weiss, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, S2581–S2594.
- [119] S. Behrens, *Nanoscale* **2011**, *3*, 877–892.
- [120] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- [121] A.-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 1222–1244.
-

-
- [122] X. Peng, J. Wickham, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 7863, 5343–5344.
- [123] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8706–8715.
- [124] C. B. Murray, C. R. Kagan, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, 30, 545–610.
- [125] N. R. Jana, Y. Chen, X. Peng, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 3931–3935.
- [126] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12798–12801.
- [127] V. F. Puentes, M. K. Kannan, A. P. Alivisatos, *Science* **2001**, 291, 2115–2117.
- [128] Y.-W. Jun, J.-W. Seo, J. Cheon, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 179–189.
- [129] M. Safarikova, K. Nymburska, Z. Blazek, I. Safarik, *Biotechnol. Tech.* **1996**, 10, 391–394.
- [130] A. M. Derfus, G. von Maltzahn, T. J. Harris, T. Duza, K. S. Vecchio, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, *Adv. Mater.* **2007**, 3932–3936.
- [131] K. Matyjaszewski, *Macromolecular* **2012**, 45, 4015–4039.
- [132] H. Bergenudd, G. Coullerez, M. Jonsson, E. Malmstro, *Macromolecules* **2009**, 42, 3302–3308.
- [133] P. L. Golas, K. Matyjaszewski, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 1116–1134.
- [134] D. Maity, S. N. Kale, R. Kaul-ghanekar, J. Xue, J. Ding, *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, 321, 3093–3098.
- [135] S. Saha, M. L. Bruening, G. L. Baker, *Macromolecules* **2012**, 45, 9063–9069.
- [136] T. Loftsson, D. Duchene, *Int. J. Pharm.* **2007**, 329, 1–11.
- [137] J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic, Lodon, **2010**.
- [138] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, 97, 1743–1753.
- [139] L. Szente, J. Szejtli, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36, 17–28.
- [140] H. Friebolin, *Ein- Und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, WILEY-VCH, Heildeberg, **2006**.
- [141] D. Castagne, G. Dive, B. Evrard, M. Frédérick, G. Piel, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2010**,
-

- 13, 362–377.
- [142] Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 520–554.
- [143] J. R. Cruz, B. a Becker, K. F. Morris, C. K. Larive, *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 838–845.
- [144] A. Hazekamp, R. Verpoorte, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 340–347.
- [145] K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193–209.
- [146] L. Fielding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 219–242.
- [147] L. Fielding, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 39–53.
- [148] C. A. Foster, R.; Fyfe, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1969**, *4*, 1–89.
- [149] G. U. Marten, T. Gelbrich, H. Ritter, A. M. Schmidt, *IEEE Trans. Magn.* **2013**, *49*, 364–372.
- [150] D. M. Lemaster, G. Hernandez, *Macromolecules* **2000**, *33*, 3569–3576.
- [151] P. L. Golas, N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6451–6457.
- [152] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.
- [153] G. U. Marten, Maßgeschneiderte Multifunktionale Hybrid-Nanopartikel Für Biomedizinische Anwendungen, Universität zu Köln, **2011**.
- [154] J. Xia, S. G. Gaynor, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5958–5959.
- [155] K. L. Beers, S. G. Gaynor, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, M. Mo, *Macromolecules* **1998**, *31*, 9413–9415.
- [156] W. H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15–54.
- [157] J. Kurjata, J. Chojnowski, C. Yeoh, N. A. A. Rossi, S. J. Holder, *Polymer* **2004**, *45*, 6111–6121.
- [158] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7901–7910.
- [159] J. U. Izunobi, C. L. Higginbotham, *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 1098–1104.

-
- [160] L. Zhang, G. Gellerstedt, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 37–45.
- [161] S. Heikkinen, M. M. Toikka, P. T. Karhunen, I. A. Kilpela, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4362–4367.
- [162] M. Răcuciu, D. E. Creangă, A. Airinei, *Eur. Phys. J. E. Soft Matter* **2006**, *21*, 117–121.
- [163] J. Wan, W. Cai, E. Liu, **2007**, *4*, 5004–5006.
- [164] N. Frickel, R. Messing, T. Gelbrich, A. M. Schmidt, *Langmuir* **2010**, *26*, 2839–2846.
- [165] T. Gelbrich, M. Feyen, A. M. Schmidt, *Macromolecules* **2006**, *39*, 3469–3472.
- [166] W. Stöber, A. Fink, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- [167] J. Liu, W. He, L. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu, L. Yuan, H. Chen, Z. Cheng, X. Zhu, *Langmuir* **2011**, *27*, 12684–12692.
- [168] T. Gelbrich, G. U. Marten, A. M. Schmidt, *Polymer* **2010**, *51*, 2818–2824.
- [169] S. Odenbach, *Int. J. Mod. Phys.* **2000**, *16*, 1615–1631.
- [170] S. Thurm, S. Odenbach, *Phys. Fluids* **2003**, *15*, 1658–1664.
- [171] B. S. Zuckerbraun, B. Y. Chin, M. Bilban, J. D. C. D’Avila, J. Rao, T. R. Billiar, L. E. Otterbein, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **2007**, *21*, 1099–1106.
- [172] S. Romanski, E. Stamellou, J. T. Jaraba, D. Storz, B. K. Krämer, M. Hafner, S. Amslinger, H. G. Schmalz, B. A. Yard, *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 78–88.
- [173] E. Stamellou, D. Storz, S. Botov, E. Ntasis, J. Wedel, S. Sollazzo, B. K. Krämer, W. van Son, M. Seelen, H. G. Schmalz, *Redox Biol.* **2014**, *2*, 739–748.
- [174] T. Mosmann, *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, **1983**.
- [175] M. Berridge, A. Tan, K. McCoy, R. Wang, *Biochemica* **1996**, *4*, 4–9.
- [176] T. Decker, M. L. Lohmann-Matthes, *J. Immunol. Methods* **1988**, *115*, 61–69.
- [177] O. Barreiro, M. Yáñez-Mó, J. M. Serrador, M. C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr, F. Sánchez-Madrid, *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 1233–1245.
- [178] T. L. Pazdernik, L. Kerecsen, *Pharmacology*, **2010**.
-

- [179] G. U. Marten, Funktionalisierung Magnetischer Hybridpartikel Für Biomedizinische Anwendungen, Universität Düsseldorf, **2008**.
- [180] S. Zhai, J. Shang, D. Yang, S. Wang, J. Hu, G. Lu, *J. Polym. Sci.* **2012**, *50*, 811–820.
- [181] B. Yard, G. Beck, P. Schnuelle, C. Braun, M. Schaub, M. Bechtler, U. Göttmann, Y. Xiao, A. Breedijk, S. Wandschneider, *Am. J. Transplant.* **2004**, *4*, 22–30.
- [182] C. J. Detrisac, M. A. Sens, A. J. Garvin, S. S. Spicer, D. A. Sens, *Kidney Int.* **1984**, *25*, 383–390.

7. Anhang

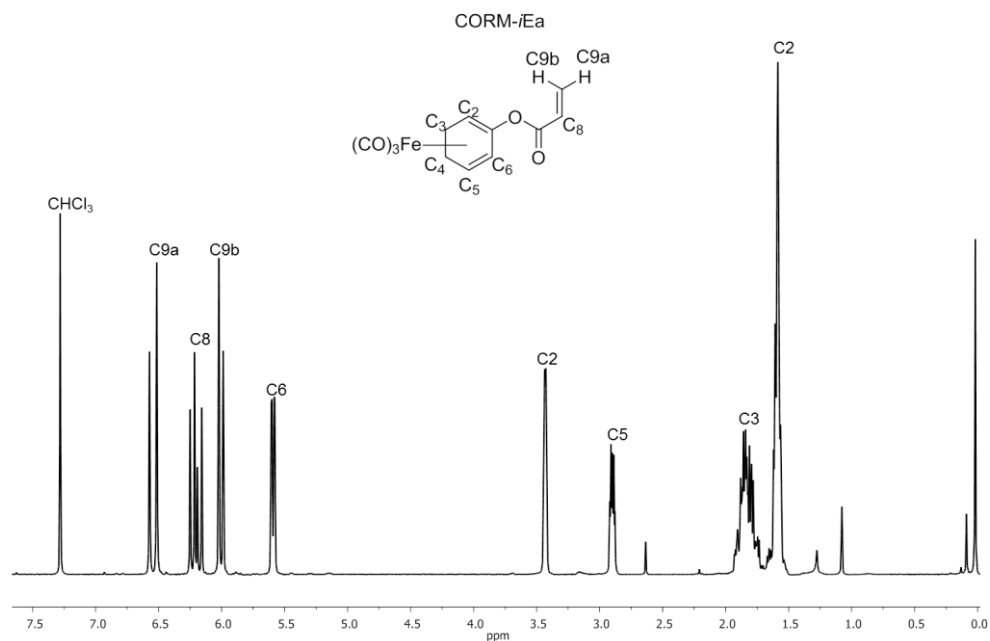


Abbildung 7.1. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des CORM-*i*Ea bei 25 °C in CDCl₃. 1,65 (m, 2H, CH₂), 1,77 (m, 2H, CH₂), 2,80 (m, 1H, CH), 3,41 (dd, 1H CH), 5,58 (dd, 1H, CH), 6,00 (d, 1H, CH), 6,15 (dd, 1H, CH), 6,55 (d, 1H, CH) ppm.

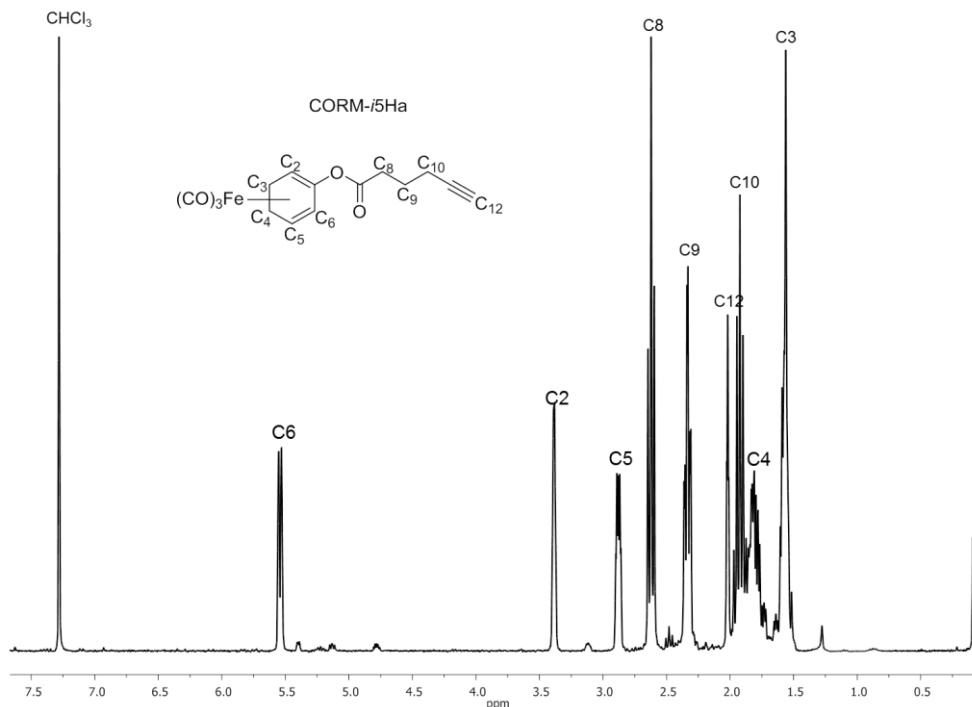


Abbildung 7.2. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des CORM-*i*5Ha bei 25 °C in CDCl₃. 1,52 (m, 2H, CH₂), 1,75 (m, 2H, CH₂), 1,80 (m, 2H, CH₂), 1,98 (st, 1H, CH), 2,28 (sm, 2H, CH₂), 2,57 (st, 2H, CH₂), 2,80 (sm, 1H, CH), 3,30 (s, 1H, CH), 5,50 (sd, 1H, CH) ppm.

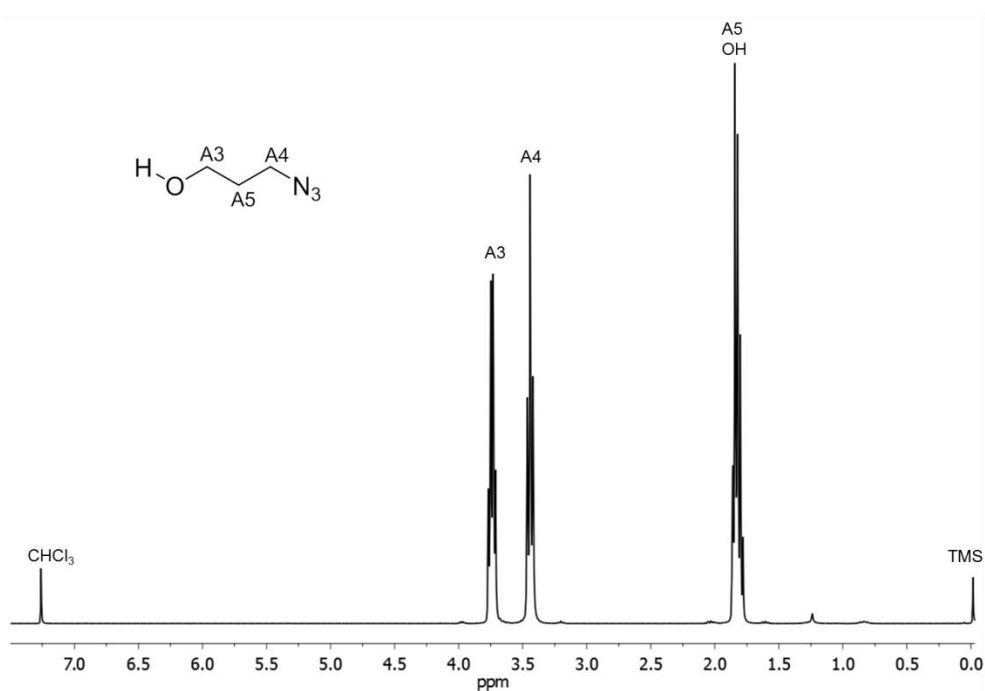


Abbildung 7.3. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum von 3-Azidopropanol bei 25 °C in CDCl₃. 1,83 (m, 23H, CH₂ & OH), 3,44 (t, 2H, CH₂-N₃), 3,74 (q, 2H, CH₂-O) ppm.

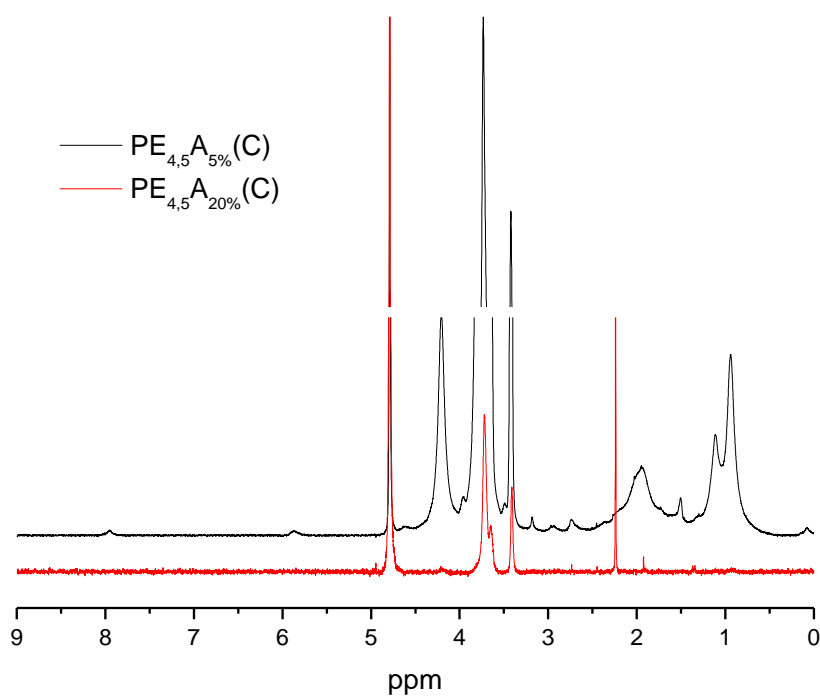


Abbildung 7.4. 300 MHz ¹H-NMR-Spektren der Polymere PE_{4,5}A_{5%} und PE_{4,5}A_{5%}(C) wurden bei 25 °C in D₂O.

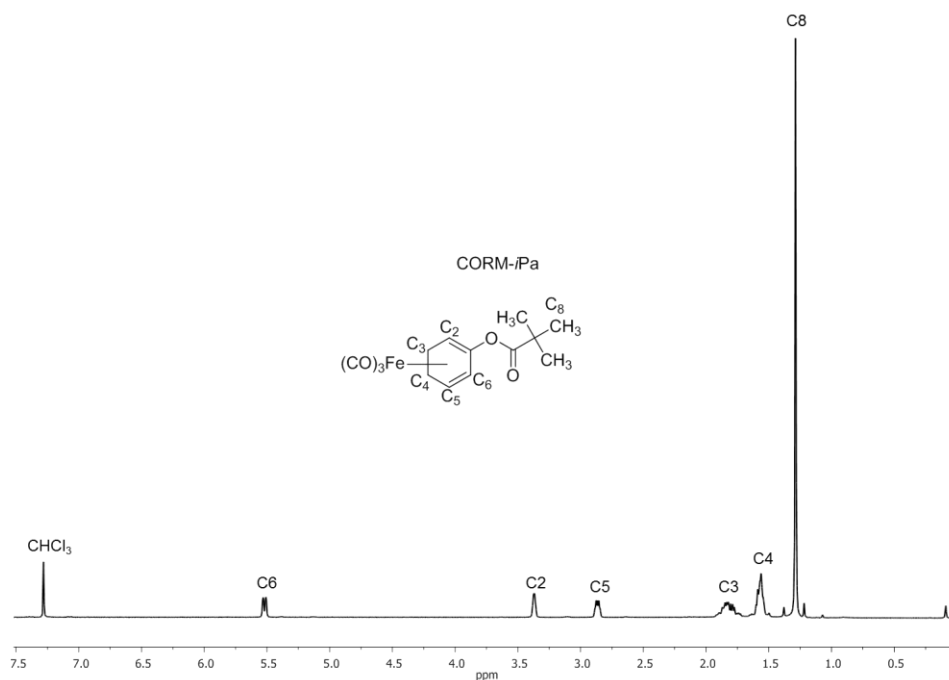


Abbildung 7.5. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des CORM-iPa bei 25 °C in CDCl₃. 1,26 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,55 (m, 2H, CH₂), 1,80 (m, 2H, CH₂), 2,80 (m, 1H, CH), 3,45 (s, 1H, CH), 5,50 (sd, 1H, CH) ppm.

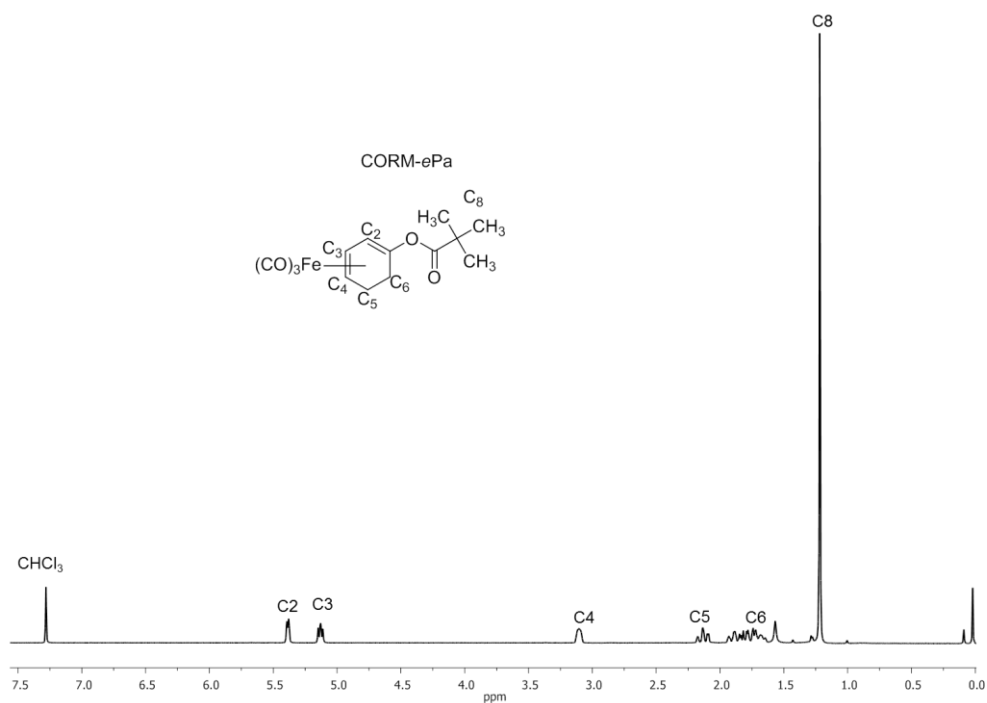


Abbildung 7.6. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des CORM-ePa bei 25 °C in CDCl₃. 1,23 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,75 (m, 2H, CH₂), 2,20 (m, 2H, CH₂), 3,08 (m, 1H, CH), 5,15 (st, 1H, CH), 5,45 (sd, 1H, CH) ppm.

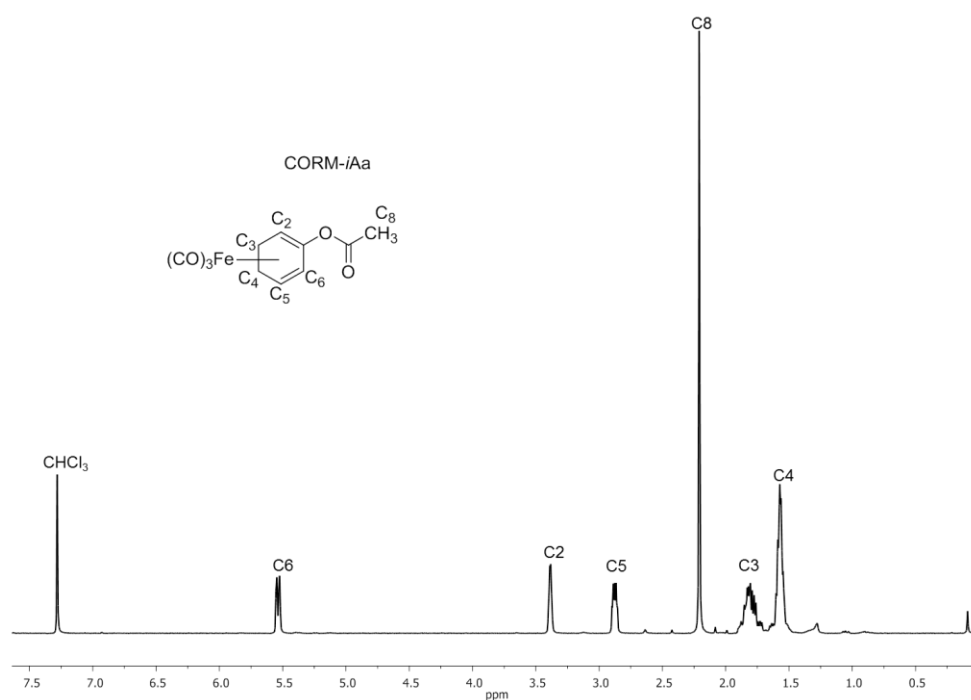


Abbildung 7.7. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des CORM-iAa bei 25 °C in CDCl₃. 1,52 (m, 2H, CH₂), 1,82 (m, 2H, CH₂), 2,23 (s, 3H, CH₃), 2,90 (sd, 1H, CH), 3,45 (s, 1H, CH), 5,5 (sd, 1H, CH) ppm.

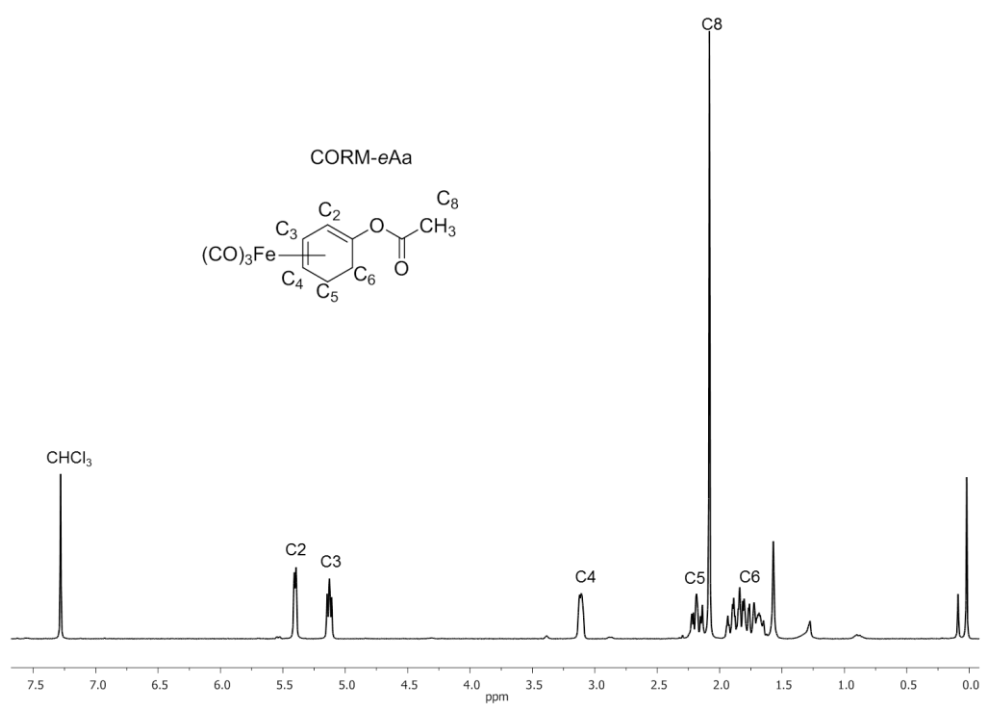


Abbildung 7.8. 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum des CORM-eAa bei 25 °C in CDCl₃. 1,75 (m, 2H, CH₂), 1,80, 2,10 (m, 2H, CH₂), 2,02 (s, 3H, CH₃), 3,08 (s, 1H, CH), 5,10 (st, 1H, CH), 5,40 (sd, 1H, CH) ppm.

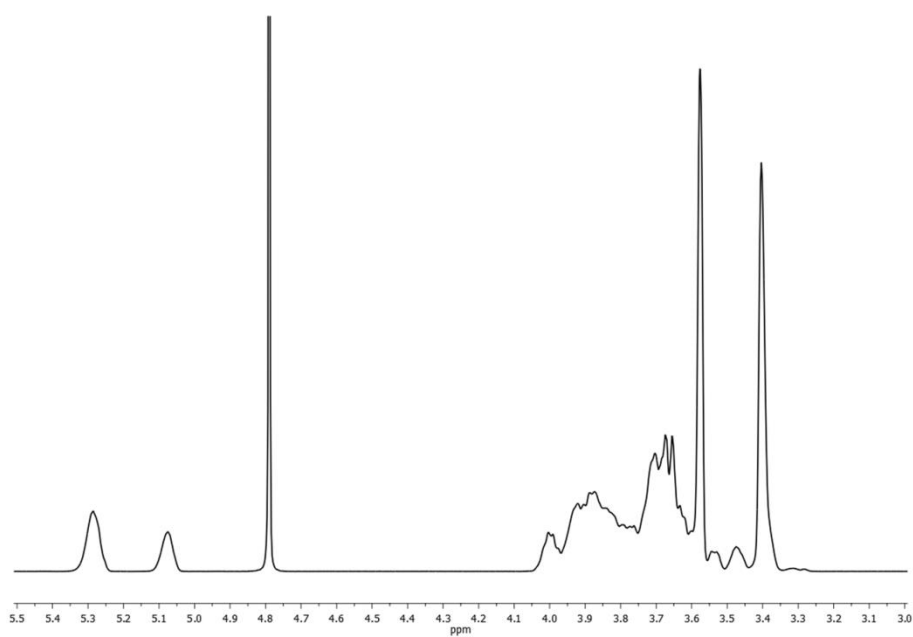


Abbildung 7.9: 600 MHz ¹H-NMR-Spektrum von RAMEB bei 25 °C in D₂O. 3,40 (s, H6'_R, CH₃), 3,50 (d, 1H_R, CH), 3,58 (s, H2'_R, CH₃), 3,66 bis 4,01 (m, breit, 3H_R, 5H_R und 6H_R, CH, CH und CH₂), 5,08 und 5,29 (s, 1H_R, CH) ppm.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Häm Katabolismus. Häm (Fe^{2+} -Protoporphyrin IX) freigesetzt aus Hämoglobin (links), wird durch die Hämoxxygenase zu CO, Fe^{2+} und Biliverdin IX zersetzt. Im Folgeschritt, der durch die Biliverdin-Reduktase katalysiert wird, entsteht Bilirubin IX. (In Anlehnung an Referenz). ^[10]	2
Abbildung 1.2. Auswahl an Metall-basierten CORMs (In Anlehnung an Referenz). ^[11]	5
Abbildung 1.3. CO-Freisetzungsmechanismus aus ET-CORMs. (In Anlehnung an Referenz). ^[11]	6
Abbildung 1.4. Konzeptionelles Modell für die Entwicklung von pharmazeutischen CORMs. (In Anlehnung an Referenz). ^[20]	7
Abbildung 1.5. (A) Molekulare Struktur von PEG und von E_x . (B) Molekülstruktur von verschiedenen Oligo(ethylenglykol)methacrylaten. Hydrophobe und hydrophile Bereiche der Moleküle sind jeweils mit rot und blau gekennzeichnet. (In Anlehnung an Referenz). ^[72]	11
Abbildung 1.6. (A) Molekülstrukturen der CDs. (B) Schnitt durch ein CD-Molekül und die schematische Darstellung der dreidimensionalen Molekülstruktur (In Anlehnung an Referenz). ^[93]	13
Abbildung 3.1. 600 MHz 1H -NMR-Spektren der Wasserlösungen, (A) die 42,5 mM RAMEB und 7,5 mM CORM-ePa und (B) 40,0 mM RAMEB und 10 mM CORM-eAa enthalten. Aufnahme in D_2O bei 25 °C.	24
Abbildung 3.2. Auftragung des experimentellen molaren Anteils der ET-CORMs ($\chi_{C,NMR}$) gegen den theoretischen molaren Anteil ($\chi_{C,theo}$). $\chi_{C,NMR}$ wurde aus den Intensitäten der 1H -NMR-Spektren der CD/ET-CORM-Mischungen erhalten (A) Daten von CORM-ePa mit β -CD und verschiedenen methylierten CDs. (B) Daten von verschiedenen ET-CORMs mit RAMEB. (schwarz) $\chi_{C,theo}$; (rot) β -CD/CORM-ePa; (blau) TRIMEB/CORM-ePa; (rosa) DIMEB/CORM-ePa; (grün) RAMEB/CORM-ePa; (violett) RAMEB/CORM-iPa; (grau) RAMEB/CORM-iAa; (orange) RAMEB/CORM-eAa.	25
Abbildung 3.3. 600 MHz HMQC-NMR-Spektrum von RAMEB bei 25 °C in D_2O . Alle Möglichkeiten der Methylierung der OH-Gruppen an C2- und C6-Stellen werden in der Haworth-Projektion angegeben.	27
Abbildung 3.4. 500 MHz 2D-DOSY-Spektren der RAMEB/ET-CORM-Komplexe in D_2O bei 25 °C. Chemische Verschiebung in ppm auf der x-Achse und logarithmierte Diffusionskoeffizienten in m^2/s auf der y-Achse. (A) RAMEB/CORM-ePa- und (B) RAMEB/CORM-eAa-Komplex.	28
Abbildung 3.5. 600 MHz 2D-NOESY der RAMEB/ET-CORMs Formulierung in D_2O bei 25 °C bei einer Mischzeit von 0,3 s. (A) RAMEB/CORM-ePa- und (B) RAMEB/CORM-eAa-Komplex. Die roten Vierecke heben die Bereiche auf der linken Seite der Diagonale in den Spektren hervor, in denen NOE-Signale in den Spektren vorhanden sind.	30
Abbildung 3.6. Vergrößerter Bereich der 600 MHz 2D-NOESY der RAMEB/ET-CORM-Komplexe zeigen intermolekulare Cross-Peaks der linken Seite der Diagonale. (A) RAMEB/CORM-ePa- und (B) RAMEB/CORM-eAa-Komplex.	30
Abbildung 3.7. Vorgeschlagene Strukturen der RAMEB/ET-CORM-Komplexe in D_2O . (A) Zwei Varianten der Komplexe von (A) RAMEB/CORM-ePa und (B) RAMEB/RAMEB/CORM-eAa.	32
Abbildung 3.8. NMR-Bindungskurven der RAMEB/ET-CORM-Komplexe für eine wässrige Lösung aus 10 mM ET-CORMs (Gast) und RAMEB-Konzentrationen von 1 mM bis 80 mM bei 25 °C. Auftragung von $\Delta\delta$ gegen die Gesamtkonzentration von RAMEB $[R]_0$. $\Delta\delta$ wurde aus der Differenz der chemischen Verschiebung des Referenz-	

^1H -Signale des freien RAMEB und der chemischen Verschiebungen der ^1H -Signale bei der Komplexbildung errechnet. (schwarz) RAMEB/CORM-ePa; (rot) RAMEB/CORM-eAa; (blau) RAMEB/CORM-iPa; (grün) RAMEB/CORM-iAa.	33
Abbildung 3.9. Scatchard-Auftragung der RAMEB/ET-CORM-Komplexe der dargestellten Daten aus Abbildung 3.8. (A) Auftragung von $\Delta\delta/[R]_0^2$ gegen $\Delta\delta$. (B) Auftragung von $\Delta\delta/[R]_0$ gegen $\Delta\delta$. (schwarz) RAMEB/CORM-ePa; (rot) RAMEB/CORM-iPa; (blau) RAMEB/CORM-eAa; (grün) RAMEB/CORM-iAa.	36
Abbildung 3.10. ATR-IR-Spektrum vom Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ mit 15 mol% Ma.	41
Abbildung 3.11. 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum vom Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}$ mit 15 mol% Ma bei 25 °C in CDCl_3	42
Abbildung 3.12. ART-IR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ mit 15 mol% Ma.	46
Abbildung 3.13. 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum vom Copolymer $\text{PE}_{4,5}\text{Ma}_{15\%}(\beta\text{-CD})$ mit 15 mol% Ma bei 25 °C in $d_6\text{-DMSO}$	46
Abbildung 3.14. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum des Rohprodukts der Homopolymerisation von $\text{E}_{4,5}$ in $d_6\text{-DMSO}$ bei 25 °C nach 1 h.	53
Abbildung 3.15. Auftragung von $\ln(1-U/U_{\max})$ gegen die Zeit für die Homopolymerisation von $\text{E}_{4,5}$. (schwarz) DMSO/Bpy ; (rot) DMSO/PMDETA ; (rosa) MeOH/Bpy ; (grün) DMF/PMDETA ; (blau) DMF/Bpy	55
Abbildung 3.16. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum des Rohproduktes bei der Copolymerisation von 80 mol% $\text{E}_{4,5}$ und 20 mol% CORM-iEa in DMF, Cu(I)/Bpy Mischung aufgenommen bei 25 °C in $d_6\text{-DMSO}$	58
Abbildung 3.17. Vergleich der Umsätze U_{NMR} der ATRP mit $\text{E}_{4,5}$ und der Copolymerisation mit $\text{E}_{4,5}$ und CORM-iEa.	59
Abbildung 3.18. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum des Produktes der Copolymerisation von 80 mol% $\text{E}_{4,5}$ und 20 mol% CORM-iEa aufgenommen bei 25 °C in $d_6\text{-DMSO}$	59
Abbildung 3.19. ATR-IR-Spektrum von 3-Azidopropylmethacrylat.	62
Abbildung 3.20. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 3-Azidopropanol bei 25 °C in CDCl_3	63
Abbildung 3.21. (A) Molekülstruktur des Polymers PA. (B) 300 MHz ^{13}C -NMR-Spektrum und (C) 300MHz ^1H , ^{13}C -korreliertes Spektrum von PA mit dem HMQC-Verfahren bei 25 °C in CDCl_3 aufgenommen.	64
Abbildung 3.22. ATR-IR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}$ mit 20 mol% AzPMA.	65
Abbildung 3.23. 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}$ bei 25 °C in CD_2Cl_2	66
Abbildung 3.24. ATR-IR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}(\text{C})$ mit 20 mol% AzPMA.	68
Abbildung 3.25. 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum von $\text{PE}_{4,5}\text{A}_{20\%}(\text{C})$ mit 20 mol% AzPMA in CDCl_3 . Das ^1H -NMR-Spektrum ist vergrößert, um die ^1H -Signale von AzPMA und CORM-i5Ha im Copolymer besser sichtbar zu machen.	69
Abbildung 3.26. Auftragung von $\chi_{\text{C,theo}}$ gegen die bestimmten experimentellen Anteile $\chi_{\text{C,exp}}$ an gebundenen CORM-i5Ha in den Copolymeren $\text{PE}_{4,5}\text{A}_\chi(\text{C})$. (blau) $\chi_{\text{C,theo}}$; (rot) $\chi_{\text{C,ICP-OES}}$; (schwarz) $\chi_{\text{C,NMR}}$	70
Abbildung 3.27. ATR-IR-Spektren der MNPs. (grün) $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$; (schwarz) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Br$; (blau) $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$; (rot) $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}(\text{C})$	76
Abbildung 3.28. Thermogramm der unterschiedlichen Magnetit-Nanopartikel-Spezies. (schwarz) $\text{Fe}_3\text{O}_4@CS$; (rot) $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$; (blau) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Br$; (rosa) $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}$; (grün) $\text{Fe}_3\text{O}_4@PE_{4,5}A_{5\%}(\text{C})$	78

Abbildung 3.29. Verteilung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers d_n der MNPs in H_2O . (schwarz) $Fe_3O_4@CS$, (rot) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$	80
Abbildung 3.30. Normierte Magnetisierungskurven der MNPs. (schwarz) $Fe_3O_4@CS$; (rot) $Fe_3O_4@Br$; (blau) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}$; (grün) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$	82
Abbildung 3.31. TEM-Aufnahmen der MNPs und Verteilung der Durchmesser. A) & B) TEM-Aufnahme der $Fe_3O_4@CS$ -NPs und deren Histogramm. C) & D) TEM-Aufnahme der $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ -NPs und deren Histogramm.....	83
Abbildung 3.32. Auftragung der freigesetzten CO-Äquivalente aus den ET-CORM-tragenden Materialien. PLE: Pig Liver Esterase. (A) $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$: (schwarz) mit PLE; (rot) ohne PLE. (B) $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}(C)$: (schwarz) mit PLE; (rot) ohne PLE. (C) RAMEB/ET-CORM-Komplexe: (grün) RAMEB/CORM-eAa mit PLE; (blau) RAMEB/CORM-eAa ohne PLE; (rot) RAMEB/CORM-iAa mit PLE; (schwarz) RAMEB/CORM-iAa ohne PLE. (D) RAMEB/ET-CORM-Komplexe: (grün) RAMEB/CORM-ePa mit PLE; (blau) RAMEB/CORM-ePa ohne PLE; (rot) RAMEB/CORM-iPa mit PLE; (schwarz) RAMEB/CORM-iPa ohne PLE.	87
Abbildung 3.33. MTT-Tests in HUVEC-Zellen mit steigender Konzentration an CORM-i5Ha mit dem (A) Polymer $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ und mit dem (B) MNPs $Fe_3O_4@PE_{4,5}A_{5\%}$. Hypothermie-induzierten Zellschädigungstests von PTEC-Zellen mit dem (C & D) Polymeren $PE_{4,5}A_{5\%}$ und $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ abgeschätzt durch die Freisetzung von LDH.	90
Abbildung 3.34. Die Hemmung und die Induktion der Proteine VCAM-1 und HO1 in HUVEC-Zellen in An- und Abwesenheit der ET-CORM-tragenden Polymere wurden mit dem Western Blot bewiesen. (A) Polymer $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ wurde bei steigender Konzentration auf dessen Fähigkeit getestet, VCMA-1 oder HO1 jeweils zu hemmen oder zu induzieren. Die angesetzte Konzentration bezüglich des CORM-i5Ha im Polymer wurde in μM angeben. (B) In diesen Experimenten wurden die Fähigkeiten der Polymere $PE_{4,5}A_{5\%}$ und $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ nachgewiesen, die Expression von VCM-1 oder von HO1 jeweils zu hemmen oder zu induzieren. Die Konzentration bezüglich des CORM-i5Ha beträgt 300 μM	91
Abbildung 3.35. ET-CORM-tragende Materialien induzierte Antwort der Muskelzellen in Mesenterialarterien aus Ratten A) mit Polymeren mit und ohne CORM-i5Ha und(B) RAMEB/ET-CORM-Komplexe. Die angesetzte Konzentration der ET-CORMs beträgt 200 μM	92
Abbildung 7.1. 300 MHz 1H -NMR-Spektrum des CORM-iEa bei 25 °C in $CDCl_3$. 1,65 (m, 2H, CH_2), 1,77 (m, 2H, CH_2), 2,80 (m, 1H, CH), 3,41 (dd, 1H CH), 5,58 (dd, 1H, CH), 6,00 (d, 1H, CH), 6,15 (dd, 1H, CH), 6,55 (d, 1H, CH) ppm.	124
Abbildung 7.2. 300 MHz 1H -NMR-Spektrum des CORM-i5Ha bei 25 °C in $CDCl_3$. 1,52 (m, 2H, CH_2), 1,75 (m, 2H, CH_2), 1,80 (m, 2H, CH_2), 1,98 (st, 1H, CH), 2,28 (sm, 2H, CH_2), 2,57 (st, 2H, CH_2), 2,80 (sm, 1H, CH), 3,30 (s, 1H, CH), 5,50 (sd, 1H, CH) ppm.....	124
Abbildung 7.3. 300 MHz 1H -NMR-Spektrum von 3-Azidopropanol bei 25 °C in $CDCl_3$. 1,83 (m, 23H, CH_2 & OH), 3,44 (t, 2H, CH_2-N_3), 3,74 (q, 2H, CH_2-O) ppm.....	125
Abbildung 7.4. 300 MHz 1H -NMR-Spektren der Polymere $PE_{4,5}A_{5\%}$ und $PE_{4,5}A_{5\%}(C)$ wurden bei 25 °C in D_2O	125
Abbildung 7.5. 300 MHz 1H -NMR-Spektrum des CORM-iPa bei 25 °C in $CDCl_3$. 1,26 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,55 (m, 2H, CH_2), 1,80 (m, 2H, CH_2), 2,80 (m, 1H, CH), 3,45 (s, 1H, CH), 5,50 (sd, 1H, CH) ppm.	126

-
- Abbildung 7.6. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum des CORM-ePa bei 25 °C in CDCl_3 . 1,23 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,75 (m, 2H, CH_2), 2,20 (m, 2H, CH_2), 3,08 (m, 1H, CH), 5,15 (st, 1H, CH), 5,45 (sd, 1H, CH) ppm. 126
- Abbildung 7.7. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum des CORM-iAa bei 25 °C in CDCl_3 . 1,52 (m, 2H, CH_2), 1,82 (m, 2H, CH_2), 2,23 (s, 3H, CH_3), 2,90 (sd, 1H, CH), 3,45 (s, 1H, CH), 5,5 (sd, 1H, CH) ppm. 127
- Abbildung 7.8. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum des CORM-eAa bei 25 °C in CDCl_3 . 1,75 (m, 2H, CH_2), 1,80, 2,10 (m, 2H, CH_2), 2,02 (s, 3H, CH_3), 3,08 (s, 1H, CH), 5,10 (st, 1H, CH), 5,40 (sd, 1H, CH) ppm. 127
- Abbildung 7.9: 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum von RAMEB bei 25 °C in D_2O . 3,40 (s, $\text{H6}'_{\text{R}}$, CH_3), 3,50 (d, 1H_{R} , CH), 3,58 (s, $\text{H2}'_{\text{R}}$, CH_3), 3,66 bis 4,01 (m, breit, 3H_{R} , 5H_{R} und 6H_{R} , CH, CH und CH_2), 5,08 und 5,29 (s, 1H_{R} , CH) ppm. 128
-

Verzeichnis der Schemata

<i>Schema 3.1. Modulares Konzept für die Herstellung von ET-CORM-Transportsystemen für biomedizinische Anwendungen.</i>	20
<i>Schema 3.2. (A) Chemische Struktur der komplexierten ET-CORMs mit CDs. (B) Allgemeine chemische Struktur der Cyclodextrine: α-CD ($n = 6$), β-CD ($n = 7$), γ-CD ($n = 8$). Bei DIMEB ($n = 7$) werden Hydroxylgruppen an der C2- und C6-Stellung mit Methoxy-Gruppen substituiert, während bei TRIMEB ($n = 7$) alle Hydroxylgruppen mit Methoxy-Gruppen substituiert werden. Bei RAMEB ($n = 7$) wird ein Teil der Hydroxylgruppen an der C2- und C6-Stellung mit Methoxy-Gruppen substituiert.</i>	23
<i>Schema 3.3. Mögliche Syntheserouten für die Herstellung von β-CD-funktionalen Biocopolymeren.</i>	39
<i>Schema 3.4. Molekulare Struktur der ausgewählten ET-CORMs für die Komplexbildung mit dem Copolymer $PE_xMa_x(\beta\text{-CD})$.</i>	40
<i>Schema 3.5. Schematische Darstellung einer ATRP. R = organischer Rest, X = Halogen, M^z und M^{z+1} = Metall, M = Monomer, P = Polymer.</i>	41
<i>Schema 3.6. Von Sharpless vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der CuAAC.^[152]</i>	45
<i>Schema 3.7. Verwendete Substanzen für die Synthese der biokompatiblen Copolymere als ET-CORM-Träger.</i> ..	50
<i>Schema 3.8. (A) Cu(I)/PMDETA-Komplex. (B) Cu(I)/Bpy-Komplex.</i>	51
<i>Schema 3.9. Möglicher Mechanismus der Oxidation des Fe-Atoms nach dem Zerfall des ET-CORM-Komplex und dessen erneuter Komplexbildung mit Bpy in einer DMSO Lösung.</i>	60
<i>Schema 3.10. Synthese von AzPMA,^[74] dessen Copolymerisation mittels ATRP mit $E_{4,5}$ und Modifizierung des Copolymers $PE_{4,5}A_x$ zu $PE_{4,5}A_x(C)$ mittels CuAAC.</i>	61
<i>Schema 3.11. Gewählte Syntheseroute für die ET-CORM-tragende MNPs.</i>	72
<i>Schema 3.12. Verwendete ET-CORM-tragende Materialien für die biologischen Testreihenuntersuchungen.</i> ...	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. Eigenschaften der CDs. ^[98]	13
Tabelle 3.1. Diffusionskoeffizient D und hydrodynamischer Radius R_h für die RAMEB/CORM-ePa- und RAMEB/CORM-eAa-Komplexe in D_2O bei 25 °C.	29
Tabelle 3.2. Stabilitätskonstanten K_A , Maximum der chemischen Verschiebung $\Delta\delta_{max}$ und freie Enthalpie ΔG° der RAMEB/ET-CORMs-Komplexe bei 25 °C.	37
Tabelle 3.3. Vergleich der Zusammensetzung und Molmasse der Copolymere mit unterschiedlichem Anteil χ_{Ma} an Ma. $U_{Ma,NMR}$: Umsatz an Ma bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $M_{n,theo}$: theoretische zahlenmittlere Molmasse; $M_{n,NMR}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $M_{n,GPC}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC; $M_{w,GPC}$: massenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC.....	43
Tabelle 3.4. Übersicht über die CuAAC an den Copolymeren PE_xMa_χ mit β -CD- N_3 . $\chi_{CD,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an CD im Copolymer; $\chi_{CD,NMR}$: Stoffmengenanteil an CD im Copolymer bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $U_{CD,NMR}$: Umsatz an CD bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen.....	47
Tabelle 3.5. Lösungsmitteltest und Farbttest mit dem Ligand 2,2'-Bipyridin (Bpy). NS: Niederschlag; Lsg.: Lösung. CuBr:CORM ist das molare Verhältnis zwischen CuBr und ET-CORM.....	52
Tabelle 3.6. Lösungsmitteltest und Farbttest mit dem Ligand N,N,N',N',N'' -pentamethyl-diethylenetriamin (PMDETA). NS: Niederschlag; Lsg.: Lösung. CuBr:CORM ist das molare Verhältnis zwischen CuBr und ET-CORM.	52
Tabelle 3.7. Experimentelle und errechnete Umsätze U und mittlere Molmasse der Polymeren aus dem Rohrprodukt. $n_{E_{4,5}}$: Polymerisationsgrad; $U_{max,NMR}$: maximaler Umsatz bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; M_n : zahlenmittlere Molmasse; M_n/M_{theo} : Verhältnis aus der zahlenmittleren Molmasse und theoretische Molmasse; k_{app} : scheinbare Geschwindigkeitskonstante.	56
Tabelle 3.8. (A) Homopolymerisation von $E_{4,5}$. (B) Copolymerisation mit $E_{4,5}$ und CORM-iEa. $n_{E_{4,5}}$: Polymerisationsgrad; U_{NMR} : Umsatz bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $M_{n,NMR}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen.....	58
Tabelle 3.9. Zusammensetzung und Molmassen der Copolymere mit unterschiedlichem Anteil an AzPMA. $\chi_{A,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer; $\chi_{A,NMR}$: Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; U_{NMR} : Umsatz bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $M_{n,theo}$: theoretische zahlenmittlere Molmasse; $M_{n,GPC}$: zahlenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC; $M_{w,GPC}$: massenmittlere Molmasse bestimmt mit der GPC; PDI: Polydispersitätsindex.	67
Tabelle 3.10. Vergleich der Zusammensetzung der Copolymere mit unterschiedlichem Anteil an AzPMA. $\chi_{A,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer; $\chi_{A,NMR}$: Stoffmengenanteil an AzPMA im Copolymer bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $\chi_{C,theo}$: theoretischer Stoffmengenanteil an CORM-i5Ha im Copolymer; $\chi_{C,NMR}$: Stoffmengenanteil an CORM-i5Ha im Copolymer bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen; $U_{C,NMR}$: Umsatz an CORM-i5Ha bestimmt aus den 1H -NMR-Signalen.	70
Tabelle 3.11. Zusammensetzung der verschiedenen MNPs. Δ_{org} : organischer, thermisch zersetzbarer Anteil. χ_{org} : gesamter organischer Anteil. χ_C : Kohlenstoff-Gehalt. f : Funktionalisierungsdichte. b : Belegungsdichte.....	78

Tabelle 3.12. Hydrodynamischer Durchmesser der MNPs. d_n : zahlenmittlerer Durchmesser; d_V : volumenmittlerer Durchmesser; PDI: Polydispersitätsindex..... 79

Tabelle 3.13. Magnetische Eigenschaften der verschiedenen Partikelspezies nach VSM. $M_{s,VSM}$: Sättigungsmagnetisierung mit dem VSM bestimmt; χ_{ini} : Anfangsuszeptibilität; $\chi_{ini}/M_{s,VSM}$: Verhältnis aus Anfangsuszeptibilität und Sättigungsmagnetisierung. $\mu_{M,I}$: Massenanteil der Magnetit-Kerne in der Dispersion; $\mu_{M,S}$: Massenanteil der Magnetit-Kerne als Feststoff. 83

Tabelle 5.1. Syntheseparameter für die Copolymere PA und PE_{4,5}A_γ. Stoffmenge und Volumina der eingesetzten Comonomere. 104

Tabelle 5.2. Syntheseparameter für die Copolymere PE_xMa_γ. Massen und Volumina der eingesetzten Chemikalien. 106

Tabelle 5.3. Syntheseparameter für die Copolymere PE_xMa_γ. Übersicht über die Stoffmengen der eingesetzten Chemikalien. 106

Tabelle 5.4. Syntheseparameter für die CuAAC der Copolymere PE_{4,5}A_γ. Übersicht über die Stoffmengen der eingesetzten Chemikalien. 107

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Annette M. Schmidt betreut worden.

Teilpublikationen liegen vor

- 06.2014 E. Stamellou, D. Storz, S. Botov, E. Ntasis, J. Wedel, S. Sollazzo, B. K. Kramer, W. van Son, M. Seelen, H.-G. Schmalz, A. Schmidt, M. Hafner, *Redox Biol.*, 2014, 2, 739-748
- 04.2013 P. Kunz, H. Meyer, J. Barthel, S. Sollazzo, A. M. Schmidt, C. Janiak, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 4896-4898

Köln, den 27.04.2015



Silvio Sollazzo

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Geburtsdatum und -ort 20. August 1981 in Belvedere Marittimo
Nationalität Italienisch
Familienstand Ledig

Berufliche Erfahrungen

- 01.2012 - 07.2015 **Institut für Physikalische Chemie, Universität zu Köln**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
- Synthese und Charakterisierung von biokompatiblen magnetischen Nanomaterialien
 - Betreuung von Studenten
- 06.2011 - 08.2011 **Institut für Physikalische Chemie, Universität zu Köln**
Wissenschaftliche Hilfskraft
- Synthese und Charakterisierung von biokompatiblen magnetischen Nanomaterialien
- 07.2010 - 09.2010 **Qiagen GmbH**
Studentische Aushilfe
- Herstellung von magnetischen Nanopartikeln
 - Prozessvisualisierung mit Excel
- 02.2010 - 04.2010 **B. Braun Avitum AG**
Praktikant
- Klinische Studien
 - UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen der Proben
- 01.2009 - 08.2009 **Institut für Biochemie, Universität zu Köln**
und
11.2007 - 07.2008 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
- Untersuchung der Fermentationsbedingungen für die Produktion eines biopharmazeutischen Produktes (cPMP) zur Behandlung eines MoCD-Patienten
 - Betreuung von Studenten

- 08.2008 - 12.2008 **Institut für Biochemie, Universität zu Köln**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
- Untersuchung der Fermentationsbedingungen für die Produktion eines biopharmazeutischen Produktes (cPMP) zur Behandlung eines MoCD-Patienten
 - Betreuung von Studenten
- 03.2007 - 08.2007 **Institut für Biochemie, Universität zu Köln**
Studentische Aushilfe
- Untersuchung der Fermentationsbedingungen für die Produktion eines biopharmazeutischen Produktes (cPMP) zur Behandlung eines MoCD-Patienten
 - Betreuung von Studenten

Studium

- Seit 01.2012 **Promotionsstudium am Institut für Physikalische Chemie der Universität zu Köln**
- Thema der Dissertation: „Entwicklung und Synthese von Kohlenstoffmonoxid-freisetzenden Materialien für medizinische Anwendungen“
- 10.2008 - 10.2011 **Bachelor of Science in Chemie (Note 1,7) Universität zu Köln**
- Thema der Bachelorarbeit: „Synthese und Charakterisierung biokompatibler Kern-Schale-Strukturen mit systematischer Variation“
- 10.2002 - 08.2007 **Diplom in Biologie (Note 1,7) Universität zu Köln**
- Thema der Diplomarbeit: „Spectroscopic and Biochemical Studies on the Molybdenum Cofactor Intermediates cyclic Pyranopterin Monophosphate, Molybdopterin and adenylated-Molybdopterin“

Schule

- 09.1996 - 05.2002 **Abitur (Note 2,1)**
Papst Johannes XXIII-Schule, Stommeln

Zusatzqualifikationen

- Sprachen
- Italienisch - Muttersprache
 - Deutsch - Verhandlungssicher in Wort und Schrift
 - Englisch - Verhandlungssicher in Wort und Schrift

Publikationen

- **E. Stamellou, D. Storz, S. Botov, E. Ntasis, J. Wedel, S. Sollazzo, B. K. Kramer, W. van Son, M. Seelen, H.-G. Schmalz, A. Schmidt, M. Hafner**
Different design of enzyme-triggered CO-releasing molecules (ET-CORMs) reveals quantitative differences in biological activities in terms of toxicity and inflammation
Redox Biol., 2014, 2, 739-748
- **P. Kunz, H. Meyer, J. Barthel, S. Sollazzo, A. M. Schmidt, C. Janiak**
Metal carbonyls supported on iron oxide nanoparticles to trigger the CO-gasotransmitter release by magnetic heating
Chem. Commun., 2013, 49, 4896-4898
- **Veldman, J. A. Santamaria-Araujo, S. Sollazzo, J. Pitt, R. Gianello, J. Yaplito-Lee, F. Wong, C. A. Ramsden, J. Reiss, I. Cook, J. Fairweather, G. Schwarz**
Successful treatment of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP
Pediatrics. 2010, 125, 1249-54