Synthese von Cyclodextrin-Polymeren zur Solubilisierung von Wirkstoffen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Diplom Chemikerin

Lisa Markenstein

Saarbrücken

2015

Tag des Kolloquiums:	17.07.2015
Dekan:	Prof. Dr. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Wenz
	Prof. Dr. M. Schneider
Vorsitz:	Prof. Dr. J. Jauch
Akad. Mitarbeiter:	Dr. B. Morgenstern

Die vorliegende Arbeit wurde in der der Zeit von Dezember 2011 bis März 2015 am Institut für Organische Makromolekulare Chemie an der Universität des Saarlandes unter Leitung von Prof. Dr. Gerhard Wenz angefertigt

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese von Cyclodextrin-Polymeren und der Solubilisierung lipophiler Wirkstoffe.

Im ersten Teil wurden native und methylierte Mono-Azid-Cyclodextrine (CD) über „Click"-Chemie an propargylierte Hydroxyethylstärke (HES) gekuppelt. Durch Einführen von Carboxylatgruppen an HES oder die Kupplung an Hyaluronsäure (HA) konnte das Auftauchen einer LCST vermieden werden. Zudem wurde gezeigt, dass die gekuppelten methylierten CDs eine signifikant geringere Zytotoxizität als die entsprechenden Monomere aufweisen.

Der zweite Teil behandelt die Amidkupplung nativer und methylierter Mono-Amino-CDs an HA und oxidierte HES mit CDMT als Kupplungsreagenz. Im dritten Teil wurden in einer zweistufigen Synthese methylierte CDs mit H-Phosphonat monofunktionalisiert und mit Pivaloylchlorid als Aktivierungsreagenz an Hydroxypropylcellulose gekuppelt.

Im letzten Teil wurde das Einschlussverhalten der synthetisierten CD-Derivate auf die lipophilen Wirkstoffe Sevofluran, Midazolam, Propofol, Hydrocortison, Estradiol, Testosteron und Ibuprofen mit Hilfe von ITC, der Methode der Löslichkeitsisothermen und der Headspace-Gaschromatographie untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen deutlich stärkeren Solubilisierungseffekt auf die Wirkstoffe als natives β-CD und seine kommerziellen Derivate.

Die vorgestellten, sehr gut wasserlöslichen CD-Polymere stellen deshalb vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer Darreichungsformen lipophiler Wirkstoffe dar.

Summary

This thesis discusses the synthesis of new cyclodextrin (CD) polymers and the complexation of hydrophobic drugs.

In the first part mono-azides of native and methylated CDs were conjugated to propargylated hydroxyethyl starch (HES) by “click”-chemistry. The appearing LCST phase separation could be avoided completely by the introduction of carboxylate groups or the use of hyaluronic acid (HA) as a polymer backbone. The conjugated methylated CDs exhibited significantly lower cytotoxicity than the corresponding monomeric CD derivatives.

The second part describes the conjugation of mono-amino functionalized CDs to HA and oxidized HES using CDMT as a coupling agent. For the resulting water soluble polymers no cytotoxic effect could be detected.

In the third part a two-step synthesis is presented in which CDs were functionalized by H-phosphonate and were conjugated to hydroxypropyl cellulose using pivaloylchloride as a condensing agent.

In the last part the inclusion behaviour of these CD-derivatives with the poorly soluble drugs sevoflurane, midazolam, propofol, hydrocortisone, estradiol, testosterone and ibuprofen were investigated using the phase solubility method, ITC and headspace gas chromatography. The studies demonstrated higher solubilizing abilities of the CD polymers in comparison to commercially available β-CD derivatives.

The CD polymers with both low toxicity and excellent binding potential are promising candidates for new dosage forms of hydrophobic active ingredients.

1 EINLEITUNG 1

1.1 Cyclodextrine 1
1.1.1 Struktur und Eigenschaften von Cyclodextrinen 2
1.1.2 Derivatisierung von Cyclodextrinen 4
1.1.3 Verwendung von Cyclodextrinen 6

1.2 Cyclodextrin-Polymere 8

1.3 Polysaccharide 12
1.3.1 Hydroxyethylstärke 12
1.3.2 Hyaluronsäure 14
1.3.3 Hydroxypropylcellulose 16

1.4 Wirt-Gast-Komplexe 17

1.5 Methoden zur Bestimmung der Komplexbindungskonstante 18
1.5.1 Löslichkeitsisotherme 18
1.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie 19
1.5.3 Headspace Gaschromatographie 20

1.6 Untersuchte Wirkstoffe 21
1.6.1 Anästhetika 21
1.6.2 Steroide 24
1.6.3 Ibuprofen 25

2 ZIELSETZUNG 26

3 ANKNÜPFUNG VON β-CD-DERIVATEN AN HYDROXYETHYLSTÄRKE ÜBER „CLICK“-CHEMIE 27

3.1 Unkatalysierte [1+3]-dipolare Cycloaddition (Huisgen-Reaktion) 27

3.2 Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (“Click”-Chemie) 28

3.3 Synthese der Cyclodextrin-Derivate 30

3.4 Modifizierung von Hydroxyethylstärke 37

3.5 Zytotoxische Untersuchungen 49

3.6 Zusammenfassung 52

4 ANKNÜPFUNG VON β-CD-DERIVATEN AN POLYSACCHARIDE ÜBER CDMT-KUPPLUNG 53

4.1 Amidkupplung mit CDMT 53

4.2 Synthese der Cyclodextrin-Derivate 55

4.3 CDMT-Kupplung der Cyclodextrin-Derivate an Hyaluronsäure 59

4.4 CDMT-Kupplung der Cyclodextrin-Derivate an Hydroxyethylstärke 63
4.5 Zytotoxische Untersuchungen 67
4.6 Zusammenfassung 68

5 SYNTHESE VON H-PHOSPHONAT MODIFIZIERTEN CYCLODEXTRINEN UND DIE KUPPLUNG AN HYDROXYPROPYLCELLULOSE 69

5.1 H-Phosphonate 69
5.2 Synthese der Cyclodextrin-Derivate 71
5.3 Kupplung der Cyclodextrin-Derivate mit Hydroxypropylcellulose.....78
5.4 Zusammenfassung 82

6 SOLUBILISIERUNG VON WIRKSTOFFEN 83

6.1 Einschluss von Sevofluran 83
6.2 Einschluss von Midazolam 87
6.3 Einschluss von Propofol 93
6.4 Einschluss von Steroid-Derivaten.....97
6.5 Einschluss von Ibuprofen..... 103
6.6 Zusammenfassung und Ausblick..... 105

7 ZUSAMMENFASSUNG 106

8 EXPERIMENTELLER TEIL 107

8.1 Materialien 107
8.2 Methoden und Geräte..... 107
8.3 Synthese von Polysaccharid-Cyclodextrin Derivaten über Click-Chemie 111
8.3.1 Synthese der Cyclodextrin-Bausteine..... 111
8.3.2 Modifizierung der Hydroxyethylstärke-Bausteine 116
8.3.3 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxyethylstärke-Konjugate über CuAAC 119
8.3.4 Synthese der Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Konjugate über CuAAC..... 123
8.4 Synthese von Polysaccharid-Cyclodextrin Derivaten über CDMT-Kupplung..... 125
8.4.1 Synthese der Cyclodextrin-Bausteine..... 125
8.4.2 Synthese der Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Konjugate 130
8.4.3 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxyethylstärke-Konjugate..... 134

8.5 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxypropylcellulose-Konjugate über H-Phosphonat-Chemie 136
8.5.1 Synthese der Cyclodextrin-Bausteine 136
8.5.2 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxypropylcellulose-Konjugate 139

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 142

10 LITERATURVERZEICHNIS 145

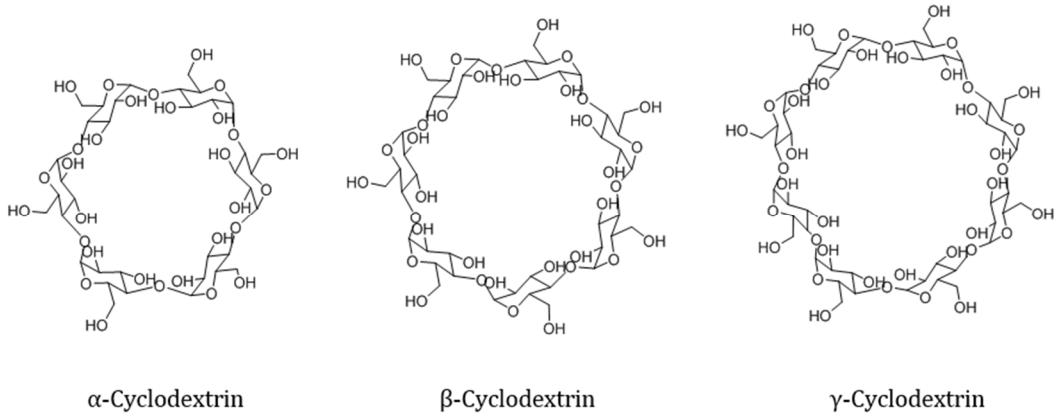
11 DANKSAGUNG 156

1 Einleitung

1.1 Cyclodextrine

Cyclodextrine (CD) sind die cyclischen Oligomere der Amylose, die aus α-1,4-Glucopyranoseeinheiten bestehen. Sie wurden 1891 von *Villiers*[1] entdeckt und 1903 von *Schardinger*[2] als cyclische Oligosaccharide charakterisiert. Seit 1948 wurden sie von *Freudenberg* und *Cramer*[3] systematisch untersucht und ihr Molekulargewicht bestimmt. Dabei entdeckten sie zudem deren Fähigkeit zur Ausbildung molekularer Einschlusskomplexe. Anfang der 1950er Jahr wurden die physikochemischen Eigenschaften der CDs sowie deren Fähigkeit, Wirkstoffe zu solubilisieren und stabilisieren, untersucht.[4]

Die wichtigsten Vertreter der Cyclodextrine sind das α-CD mit sechs, das β-CD mit sieben und das γ-CD mit acht Glucose-Molekülen (**Schema 1**).



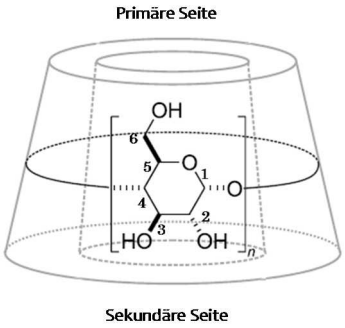
Schema 1: α-, β-, γ-Cyclodextrine

CDs mit weniger als sechs Glucose-Molekülen können aufgrund der sterischen Hinderung nicht gebildet werden. Höhere Homologe mit neun oder mehr Glucose-Bausteinen sind schwierig in der Aufreinigung. Cyclodextrine werden großtechnisch durch den enzymatischen Abbau von Stärke gewonnen, der durch die Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase), die in einigen Bakterienarten wie *Bacillus macerans* oder *alcaliphilic bacilli* vorkommt, katalysiert wird. Dieses Enzym schneidet Stücke aus der α-Helix der Amylose heraus, die sich durch Bildung einer 1,4-Verknüpfung von zwei Glucose-Molekülen zu einem ringförmigen Oligosaccharid zusammenfügen. Der enzymatische Abbau ist bezüglich der Ringgröße

nicht spezifisch, so dass durch Zugabe geeigneter Fällungsmittel, wie n-Octanol oder Toluol, die gewünschte Ringgröße in hoher Reinheit gewonnen werden muss.

1.1.1 Struktur und Eigenschaften von Cyclodextrinen

Cyclodextrine besitzen die Form eines hohlen Kegelstumpfes, der eine hydrophile Oberfläche und eine hydrophobe Kavität besitzt (**Schema 2**). Die primären Hydroxylgruppen an C-6 befinden sich an der oberen Seite des Kegels, die Sekundären bilden den unteren Teil aus. Durch die freie Rotation der primären OH-Gruppen ist die Kavität im oberen Teil etwas enger. Die sekundären Hydroxylgruppen an C-2 zeigen dabei in das Innere des Hohlraumes, die an C-3 nach außen. Da an der sekundären Seite doppelt so viele Hydroxylgruppen sitzen wie an der Primären, resultiert daraus ein starkes Dipolmoment entlang der C_n -Achse. Die Anordnung der H-3 und H-5-Atome, sowie die Stellung der glykosidischen Sauerstoffatome führen zur Ausbildung einer hydrophoben Kavität im Inneren des CDs.[5–7]



Schema 2: Schematischer Aufbau eines Cyclodextrin-Moleküls

Die Glucose-Moleküle liegen alle in der $^4C_1$ Sesselkonformation vor. Dadurch kann die Hydroxylgruppe an C-2 mit der Hydroxylgruppe an C-3 eines benachbarten Moleküls eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden, was zu einer Stabilisierung führt. Bei β-Cyclodextrinen bilden sich die Wasserstoffbrücken besonders gut aus, was sich auch in seiner im Vergleich zu α- und γ-Cyclodextrin schlechteren Wasserlöslichkeit widerspiegelt (**Tabelle 1**).

Von pharmazeutischem Interesse sind die Hydroxypropyl-Derivate von β- und γ-CD, das *randomly* methylierte β-CD (RAMEβCD), sowie das Natriumsalz des Sul-

fobutylether-β-CDs (SBEβCD). Die physikochemischen Eigenschaften dieser Derivate, wie die Wasserlöslichkeit und das Komplexiervermögen, sind nicht nur auf die Struktur des angefügten Substituenten, sondern auch auf die Anzahl sowie der Position am CD-Molekül zurückzuführen. Der molare Substitutionsgrad (MS) wird deshalb als die durchschnittliche Anzahl an Substituenten bezeichnet, die mit einer Glucose-Wiederholeinheit reagiert haben(**Tabelle 1**).[8,9]

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften von Cyclodextrinen und ausgewählten Derivaten

Cyclodextrin	**MW [Da]**	**MS**	**Löslichkeit in Wasser bei 25°C [g/L]**	**log$K_{o/w}$**
α-CD	973	-	145	-7.8
β-CD	1135	-	18.5	-10.7
HPβCD(CavasolW7 HP)	1400	0.65	>600	-8.5
SBEβCD(Captisol)	2163	0.9	>500	<-10
RAMEβCD(CavasolW7 M)	1312	1.8	>600	-2.4
γ-CD	1297	-	232	-12

CDs besitzen ein relativ günstiges toxikologisches Potential. Aufgrund ihrer Hydrophilie (log $K_{Octanol/Wasser}$ meist <-7), ihrer hohen molaren Masse (M_w 1000-2000 Da) und ihrer großen Anzahl an Wasserstoff-Donoren und -Akzeptoren, ist ihre orale Bioverfügbarkeit sehr gering, weshalb sie sich als Wirkstoff-Carrier eignen. Toxikologische Studien haben gezeigt, dass oral verabreichte CDs praktisch ungiftig sind. Dies ist auf die fehlende Absorption durch den Verdauungstrakt zurück zu führen.[9–11] Ausnahme stellen jedoch die methylierten Derivate dar. RAMEβCD ist lipophiler und besitzt weniger Wasserstoff-Donoren als die anderen CD-Derivate. Dadurch ist seine orale Bioverfügbarkeit höher.[8]

Die Verwendung von CDs für die parenterale Applikation ist begrenzter. Der hämolytische Effekt von CDs auf humane Erythrozyten in Kochsalzlösung nimmt in der Reihenfolge methylierter βCDs > βCD > HPβCD > αCD > γCD > HPγCD > SBEβCD ab. Es scheint ein Zusammenhang zwischen dem hämolytischen Effekt

und der Fähigkeit, Cholesterin aus den Membranen zu extrahieren, was eine Destabilisierung der Zellen zu Folge hat, zu bestehen.[8,10]

Die Verwendung von nativem β-CD ist zudem aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und der Nephrotoxizität[12,13] für die parenterale Anwendung nicht geeignet. In-Vivo Studien haben gezeigt, dass methylierte β-CDs und β-CD selbst nicht für eine parenterale Formulierung verwendet werden können. αCD, HPβCD, SBEβCD, γCD und HPγCD sind für diese Verabreichungsform sicher und werden deshalb auch in vermarkteten pharmazeutischen Produkten gefunden.[14]

1.1.2 Derivatisierung von Cyclodextrinen

Um die physikochemischen Eigenschaften der nativen CDs zu verbessern, können diese chemisch modifiziert werden. Diese Modifizierung erfolgt dabei durch Veretherung oder Substitution einer funktionellen Gruppe an den OH-Gruppen in 2-,3- und 6-Position der Glucose-Einheit. Es wurde gezeigt, dass schon durch Funktionalisierung einer einzigen Hydroxylgruppe, sogar bei Verwendung hydrophober Moleküle, die Wasserlöslichkeit der nativen CDs deutlich gesteigert werden kann. In den meisten Fällen erfolgt eine regioselektive Umsetzung der Hydroxylgruppen. Werden zum Beispiel alle primären Hydroxylgruppen mit einem hydrophoben Substituenten umgesetzt, so werden eine Vergrößerung der Kavität und damit meist auch ein verbessertes Bindungsvermögen gegenüber einem hydrophoben Gast erzielt. *G. Wenz* beschreibt 2012, dass vollständig methylierte Derivate, sowie Derivate, die nur auf der sekundären Seite Hydroxylgruppen tragen, niedrigere Bindungskonstanten liefern, als solche, die an 2-*O* und 6-*O*, bzw. nur auf der primären Seite methyliert sind. Grund hierfür ist, dass nur eine Methylierung auf der primären Seite zu der erwarteten Verbesserung des Bindungsvermögens des β-CDs aufgrund der bereits erwähnten Ausdehnung der Kavität führt. Die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen auf der sekundären Seite, die durch Funktionalisierung wegfallen würden, sind jedoch äußerst wichtig für das Erreichen eines hohen Bindungsvermögens. Im Falle der 2-*O*, 6-*O*-Dimethylierung halten sich die Effekte die Waage, gleiches gilt auch für das *randomly* methylierte β-CD, das in etwa dieselben Bindungskonstanten liefert wie Natives. [15]

Durch die Umsetzung der drei Hydroxylgruppen kann eine Vielzahl an unterschiedlichen Substitutionen durchgeführt werden, die sich sowohl quantitativ wie auch qualitativ voneinander unterscheiden. Es kann zum einen eine unterschiedliche Anzahl des selben Substituenten, zum anderen aber auch unterschiedliche Arten von Substituenten eingeführt werden. Im Falle von kommerziell erhältlichen CD-Derivaten, wie RAMEβ oder HPβCD, sind oft nur statistisch substituierte Derivate zu erhalten. Dabei wird die durchschnittlich substituierte Anzahl an Hydroxylgruppen angegeben. Eine selektive Modifizierung ist aufgrund der komplexen Chemie und der Vielzahl an Isomeren, die erhalten werden können, sehr schwierig, jedoch durch den Einsatz regioselektiver Reagenzien sowie geeigneter Reaktionsbedingungen möglich. Eine Substituion an C-6 ist beispielsweise sterisch am günstigsten, weshalb große Substituenten bevorzugt an der primären Seite angebracht werden können. Die OH-Gruppe an C-2 kann, mit einem pK_S-Wert von 12.2[16] am einfachsten deprotoniert oder mit elektrophilen Reagenzien umgesetzt werden.[17] Für eine Umsetzung der sehr unreaktiven Hydroxylgruppe an C-3 müssen zuerst die OH-Gruppen in 6- und 2-Postition geschützt werden.[18] Zur Herstellung gezielt mehrfach funktionalisierter Derivate wurden drei erfolgreiche Herangehensweisen beschrieben.[19] Zum Einen kann durch eine Überbrückung (Capping) eine Difunktionalisierung sowohl auf der primären als auch der sekundären Seite von β-CDs realisiert werden. Als Überbrückungsreagenz dient beispielsweise 1,3-bis[bis(4-tert-butylphenyl)chloromethyl]Benzol, das selektiv zwei benachbarte OH-Gruppen überbrückt. Durch Verwendung von zwei Äq. dieses Reagenzes wurden sogar in 50%iger Ausbeute tetrafunktionalisierte β-CDs erhalten.[20] Durch den Einsatz sterisch anspruchsvoller Reagenzien wie Trityl oder Triphenylphosphin ist es möglich, die primäre Seite von α-CDs direkt mehrfach zu modifizieren. Eine weitere Strategie zur Multifunktionalisierung baut auf der selektiven Entschüzung auf und ermöglicht es, polyheterofunktionelle CDs herzustellen. Dies wird durch die selektive Debenzylierung auf der primären Seite von α- und β-CDs mit Diisobutylaluminumhydrid (DIBAL-H) ermöglicht, wodurch die entstandene freie OH-Gruppe erneut funktionalisiert werden kann.[19]

Ein Beispiel für die hochselektive Funktionalisierung von CDs ist die von der Gruppe um *Sollogoub* im letzten Jahr erschienene Veröffentlichung. Dort wurde die Synthese eines mit sechs unterschiedlichen Substituenten funktionalisierten α-CDs beschrieben, was einer Selektivität von 1 aus 7826 möglichen Strukturen entspricht.[21]

1.1.3 Verwendung von Cyclodextrinen

Aufgrund ihres Komplexiervermögens, ihres niedrigen Preises und ihrer guten Verfügbarkeit finden CDs vor allem in der Lebensmittel-, Textil[22,23]- und Kosmetikbranche Anwendung. In der Lebensmittelindustrie dienen sie vor allem als Stabilisator für Aromastoffe sowie als Maskierer unliebsamer Gerüche oder von unerwünschtem Geschmack.[24,25] In der Kosmetikindustrie werden sie als Stabilisator für labile Verbindungen eingesetzt. Auch hier dienen sie dazu, ungewollte Gerüche zu maskieren, sowie die Wirkung des Produktes zu verlängern, als auch Irritationen zu vermindern.[26,27] In der Pharmazie[28–31] werden sie vor allem als Solubilisierer für lipophile Wirkstoffe verwendet, um deren Bioverfügbarkeit zu verbessern und gleichzeitig auftretende Nebenwirkungen im Körper zu vermindern. Zudem können sie beispielsweise Reizungen des Verdauungstraktes, die durch die Wirksubstanz hervorgerufen wurde, reduzieren, flüssige Wirkstoffe in kristalline oder amorphe Pulver umwandeln, sowie eine unerwünschte Interaktion des Wirkstoffes mit sich selbst oder mit Hilfsstoffen verhindern.[28,32,33]

1976 wurde das erste cyclodextrinhaltige, pharmazeutische Produkt unter dem Namen *Prostarmon E™* auf den japanischen Markt gebracht, das aus einem Komplex aus Prostaglandin E2 und β-CD besteht. Erst 12 Jahre später wurden in Italien Piroxicam/β-CD Tabletten unter dem Handelsnamen *Brexin* zugelassen, 1997 wurde in den USA schließlich die Vermarktung von Itraconazol/2-HPβ-CD genehmigt.[32] Mittlerweile sind weltweit um die 30 verschiedene CD-Wirkstoff-Komplexe auf dem Markt. (**Tabelle 2**)

Tabelle 2: Einige Beispiele für pharmazeutisch vermarktete CD-Produkte

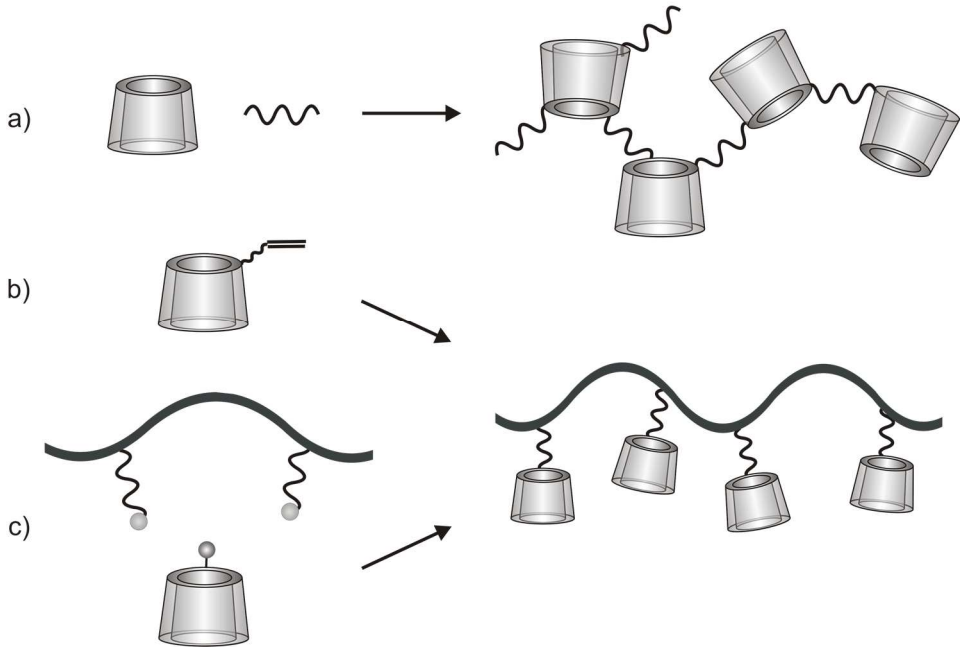
Wirkstoff	Handelsname	Art der Formulierung	Land
α-CD			
Alprostadil (PGE_1)	Prostavasin	I.V. Lösung	Japan
Cefotiam	Pansporin T	Tablette (oral)	Japan
β-CD			
Nicotin	Nicorette	Tablette	Schweden
Omeprazol	Omebeta	Tablette	Deutschland
Piroxicam	Brexin	Tablette, Suppositorium	Italien
Tiaprofensäure	Surgam	Tablette	Italien
2-Hydroxypropyl-β-CD			
Cisaprid	Propulsid	Suppositorium	Belgien
Itraconazol	Sporanox	Lösung (oral und I.V.)	Belgien, USA
Hydrocortison	Dexocort	Lösung	Island
Mitomycin	Mitozytrex	I.V. Lösung	Schweiz, USA
Rameβ-CD			
17 β -Estradiol	Aerodiol	Nasenspray	Frankreich
Chloramphenicol	Clorocil	Augentropfen	Portugal
Sulfobutylether β-CD			
Voriconazol	Vfend	I.V. Lösung	USA
2-Hydroxypropyl-γ-CD			
Diclofenac Natriumsalz	Voltaren	Augentropfen	Schweiz

Aktuelle Forschungsgebiete im Bereich der Cyclodextrine sind die Entwicklung zielgerichteter Abgabesysteme, bei der die Wirksubstanz nur am Zielort aktiv ist, sowie Formulierungen mit verzögerter Freisetzung, bei der der Wirkstoff über einen längeren Zeitraum in kontrollierter Menge abgegeben wird. Dazu zählen beispielsweise die Formulierung mittels Nanopartikeln[34,35], Liposomen[36–38],

biologisch abbaubaren Mikrosphären[39,40], Hydrogelen[41,42] sowie Konjugaten aus Wirkstoff und Polymeren.[43]

1.2 Cyclodextrin-Polymere

Unter Cyclodextrin-Polymeren sind die makromolekularen Derivate der Cyclodextrine zu verstehen. Dabei können die Cyclodextrine kovalent oder nichtkovalent an die Polymere angebunden werden. Ihre Fähigkeit, Wirt-Gast-Komplexe auszubilden, bleibt dabei überwiegend bestehen. Durch Anbindung an Polymere können die Cyclodextrine zum einen immobilisiert, zum anderen kann dadurch ihre Löslichkeit gezielt verändert werden. Cyclodextrin-Polymere besitzen aufgrund ihrer zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. DNA-Transfektion[44,45], Bildung von Nanopartikeln[46,47] sowie (Hydro-)Gelen[34,48–51] und Einsatz als Wirkstofftransporter[43,52] großes Interesse für die Biomedizin.

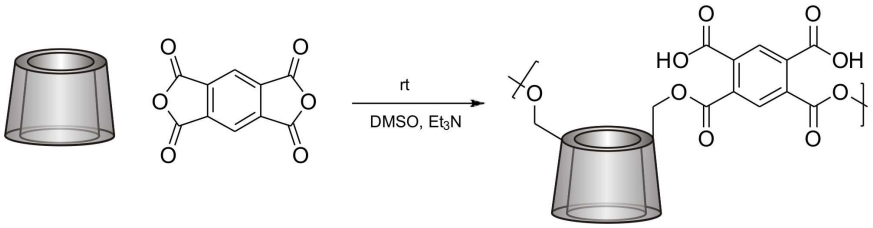


Schema 3: Schematische Darstellung von verzweigten und linearen CD-Polymeren:
a) durch Umsetzung mit bifunktionellen Verbindungen, b) durch Polymerisation von, mit Cyclodextrinen funktionalisierten, Acrylmonomeren, c) durch polymeranaloge Umsetzung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Darstellung von CD-Polymeren. Durch Umsetzung von CDs mit bifunktionellen Verbindungen können verzweigte Polymere hergestellt werden. Lineare Polymere hingegen können entweder durch Polymerisation entsprechend funktionalisierter CDs oder durch polymeranaloge Umsetzung erhalten werden (**Schema 3**).

Die einfachste Methode zur Darstellung vernetzter bzw. verzweigter CD-Polymere beruht auf der Verwendung von Epichlorhydrin (EPH) als Vernetzungsreagenz in alkalischem Medium.[53,54] Hochmolekulare vernetzte Polymere sind in Wasser jedoch unlöslich. Durch Anpassung der Reaktionsbedingungen war es aber möglich, wasserlösliche nieder- wie auch hochmolekulare (bis 20000 Da), mit Epichlorhydrin vernetzte CD-Polymere herzustellen. [53,55] Einige Studien stellten die Eignung dieser Systeme als Komplexierungsmittel für schlecht wasserlösliche Wirkstoffmoleküle dar.[56] *Mura et al* zeigten beispielsweise, dass sich durch Epichlorhydrin vernetzte CD-Gele die maximale Löslichkeit des NSAID (nonsteroidal antiinflammatory drug) Naproxen in Wasser um das 30-fache erhöht.[57] Es wird auch der Einschluss von niedermolekularen Wirkstoffen wie Hydrocortison, Cinnarizin und Furosemid durch solche Netzwerke beschrieben. [58] Ebenso wurden ionische, EPH-vernetzte CD-Polymere hergestellt, die eine geringere Toxizität, bessere Quelleigenschaften sowie einen verbesserten Einschluss von Gastmolekülen zeigten. *Li et al.* synthetisierten beispielsweise positive geladene Netzwerke, indem sie β-CD mit EPH in Anwesenheit von Cholin vernetzten. Auch wenn das Einschlussvermögen von Naproxen im Vergleich zu den neutral geladenen CD-Polymeren leicht verschlechtert war, zeigten diese gegenüber Erythrozyten eine geringere Toxizität. Dadurch sind sie für eine Anwendung als drug carrier besser geeignet.[59] *Fenyvesi et al.* beschrieben auch die Synthese von negativ geladenen Systemen, welche Carboxymethylgruppen enthalten. Diese finden Anwendung als Wirkstoff-freisetzendes Puder bei infizierten Wunden oder Verbrennungen, sowie als Kaugummi bei Halsschmerzen oder einer Infektion der Schleimhäute. [60] Neben EPH gibt es noch weitere Vernetzungsreagenzien wie Diglycidylether[61,62], Diisocyanate[63,64] und verschiedene Anhydride.[65,66] Pyromellitsäuredianhydrid stellt beispielsweise ein alternatives Vernetzungsreagenz dar. *Trotta* et al. zeigten die Synthese von sogenannten Nanosponges, die durch eine hohe Vernetzung von

Cyclodextrinen entstehen (**Schema 4**). Sie bilden sphärische Partikel mit einer porösen Oberfläche aus, welche durch Liganden weiter modifiziert werden kann. Sie können weiterhin mit lipo- und hydrophilen Molekülen Komplexe bilden, besitzen nur eine geringfügige Toxizität und sind somit als Nanocarrier für drug delivery Systeme geeignet.[67]



Schema 4: Vernetzung von CDs durch Pyromellitsäuredianhydrid[67]

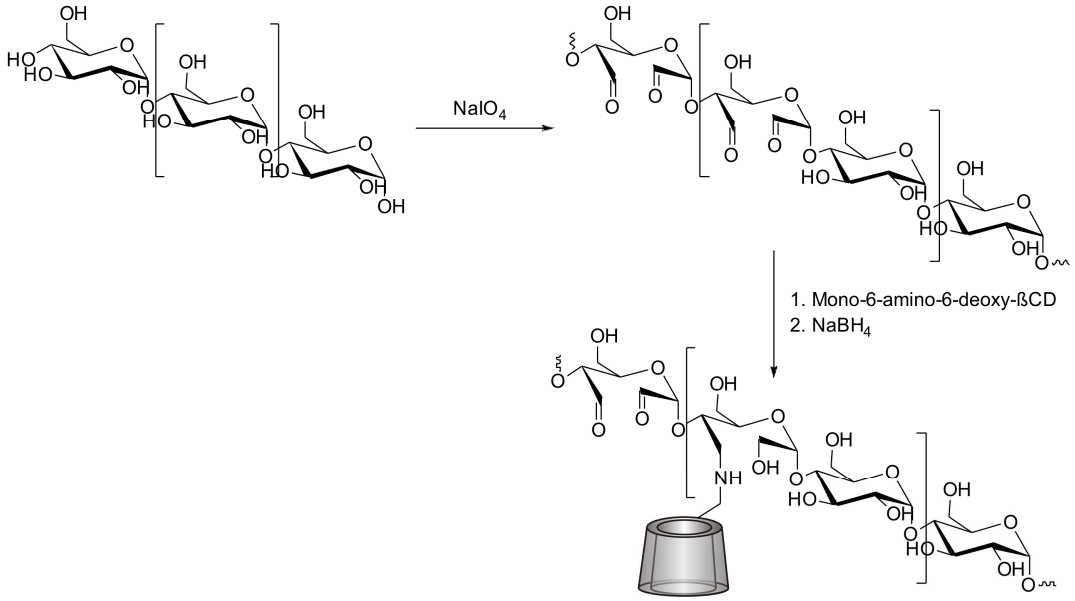
Die Herstellung linearer CD-Polymere kann zum einen durch Polymerisation monofunktioneller Cyclodextrin-Vinylderivate erfolgen[68], zum anderen durch polymeranaloge Umsetzung monofunktionalisierter Cyclodextrine mit linearen Polymeren (vgl. **Schema 3** b und c).[50]

1997 berichteten *Weickenmeier* und *Wenz* von Assoziationsverdickern, die durch Wirt-Gast-Komplexierung zwischen linearen β-Cyclodextrin-Polymeren als Wirt- und Polymeren mit hydrophoben Gast-Molekülen als Gastkomponente erzeugt wurden. Als Gast-Moleküle dienten dabei 4-tert-Butylanilid-Seitenkettenpolymere. Die Cyclodextrin-Polymere wurden durch polymeranaloge Umsetzung, ausgehend von Poly[(maleinsäureanhydrid)-alt-(isobuten)] (M_w = 60.000 g/mol) synthetisiert. Werden die beiden komplementären Polymere in wässriger Lösung miteinander vermischt, assoziieren sie zu einem Gel. Die Wechselwirkung von Wirt- und Gast-Polymer wird dabei von einem starken Anstieg der Viskosität begleitet.[50]

Durch die Verwendung von natürlichen und biologisch abbaubaren Polymeren zur Konjugation von CDs kann die Toxizität gering gehalten und eine Biokompatibilität gewährleistet werden. In den letzten Jahren wurden neue Cyclodextrin-Polymere auf Basis von Polysacchariden synthetisiert. Die kovalente Anknüpfung der Cyclodextrine an diese Polymer erfolgte meist durch reduktive Aminierung[69–72], durch Amidkupplung[73,74], nukleophile Substitution[47,75], sowie über „Click“

Chemie[76]. Die am häufigsten verwendeten Polysaccharide stellen Chitosan, Dextran und Alginat dar.

Ramirez et al. beschrieben die Funktionalisierung von Dextran, Mannan und Carboxymethylcellulose mit Periodat zum Aldehyd. Über reduktive Aminierung wurden in Anwesenheit von $NaBH_4$ Mono-6-amino-6-deoxy-β-CD Einheiten an die Polysaccharide fixiert (**Schema 5**).

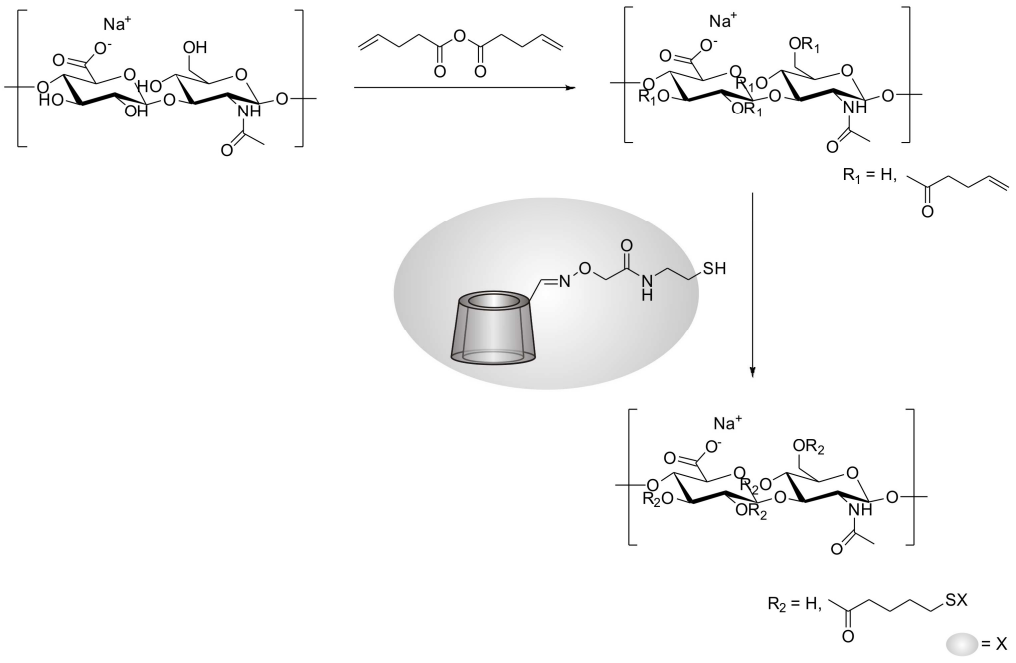


Schema 5: reduktive Aminierung von CD und verschiedenen Polysacchariden[69]

Diese Konjugate wurden als supramolekulare Carrier für Naproxen getestet, um dessen entzündungshemmenden Eigenschaften „in vivo“ zu verbessern. Im Falle von Dextran-CD konnte die Stabilitätskonstante im Vergleich zu nativem β-CD um 42% gesteigert und die Löslichkeit in Wasser verdoppelt werden.[69] *Gomez et al.* veröffentlichten 2006 die Synthese von β-CD-Alginat-Konjugaten. Dazu wurde Alginat mit Adipinsäuredihydrazid und CD mit einer Aldehydgruppe funktionalisiert und beide Bausteine über reduktive Aminierung verknüpft. Untersuchungen des Einschlussverhaltens von Adamantanacetat mittels ITC zeigten, dass die Polymere eine etwas geringe Bindungsaffinität aufzeigten als natives CD.[71]

Ein wasserlösliches CD-Chitosan Polymer stellten 2011 *Goni et al.* vor. Unter sauren Bedingungen (pH 4) reagiert Chitosan mit Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)]-β-CD zu den quaternisierten Konjugaten, aus denen durch ionische Gelierung Nanopartikel gewonnen werden können. Einschluss- und Freisetzungsstudien mit der Mo-

delverbindung Ketoprofen lassen darauf schließen, dass dieses Modell ein vielversprechendes Drug-Delivery System für schlecht wasserlösliche Wirkstoffe darstellt. Dabei erfolgte eine kontrollierte Freisetzung in Abhängigkeit des pH-Wertes.[47,77] *Auzély et al* beschrieben 2012 die Anknüpfung von thiolmodifizierten CDs mittels Thiol-En-Kupplung an Polysaccharide, die über die Hydroxylgruppen mit 4-Pentensäureanhydrid verestert wurden (**Schema 6**).



Schema 6: Radikalische Thiol-Addition von Cyclodextrin an Hyaluronsäure[78]

Die Umsetzung erfolgte rasch und in hohen Ausbeuten. Dabei fand nur ein geringer Abbau des Polymers statt. Da kein Metallkatalysator für diese Reaktion nötig ist, ist sie für biomedizinische Anwendungen geeignet.[78]

1.3 Polysaccharide

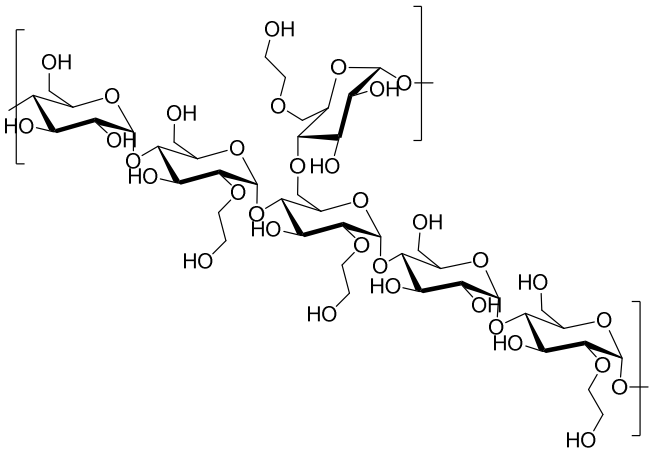
1.3.1 Hydroxyethylstärke

Bei Stärke handelt es sich um ein aus α-1,4 und α-1,6 verknüpften Glucoseeinheiten bestehendes Polysaccharid. Zur Herstellung der Hydroxyethylstärke (HES) werden als Ausgangsmaterial Wachsmaisstärken verwendet, die, wie das körpereigene Glykogen, aus hochverzweigtem Amylopektin bestehen. Die Stärkekörner

werden aufgebrochen und gespalten und anschließend mit Ethylenoxid in alkalischem Milieu zur HES umgesetzt. Die HES besitzt im Vergleich zur Stärke den Vorteil, dass sie eine ausreichende Wasserlöslichkeit in neutralem Milieu und bei Raumtemperatur besitzt. Zudem beeinflussen die eingeführten Hydroxyethylgruppen die Abbaubarkeit der Stärke. Unmodifizierte Stärke wird im Körper schnell durch α-Amylasen abgebaut. Im Fall der HES kann eine höhere Verweilzeit im Blut erreicht werden.[79]

Die Hydroxyethylstärke findet vor allem als kolloidales Volumenersatzmittel zum Ausgleich einer Hypovolämie Anwendung. Unter Volumenersatzmittel sind Flüssigkeiten zu verstehen, die bei Blutverlust statt konserviertem Vollblut Einsatz finden und sowohl Blutgefäße füllen wie auch den osmotischen Druck normalisieren. Ihr Vorteil gegenüber kristalloiden Infusionslösungen (z.Bsp. Ringer-Lactat, 0.9% NaCl) ist ihre effektivere Wiederherstellung des zirkulierenden Blutvolumens bei einer geringeren Akkumulation von interstitieller Flüssigkeit[80], sowie eine längere Verweildauer (3-6 Stunden statt ca. 30 min). Die kommerziell erhältlichen HES-Lösungen besitzen eine Konzentration von 3%, 6% und 10%.[81]

Da sich unterschiedliche Generationen der HES auf dem Markt befinden, sind für eine Beurteilung der pharmakologischen Wirkungen und Nebenwirkungen die Angaben von physikochemischen Kenngrößen notwendig. Die Charakterisierung der HES erfolgt durch Verwendung der Parameter wie das Massenmittel der molaren Masse (M_w), die molare Substitution (MS), den Substitutionsgrad “degree of substitution“ (DS) und das Verhältnis der partiellen Substitutionsgrade C_2/C_6. Diese Parameter ermöglichen es, gerade für die Anwendung der HES als Volumenersatzmittel, eine Aussage der verschiedenen Generationen über die Viskosität, den Volumeneffekt sowie die Eliminationsrate zu treffen. Der MS gibt an, wie viele Mol Hydroxyethylrest pro Mol Glucose durchschnittlich vorhanden sind. Der Substitutionsgrad kann aber auch durch den DS ausgedrückt werden. Dieser stellt das Molverhältnis von substituierten Glucosemolekülen zur Gesamtzahl in der HES vorkommenden Glucoseresten dar. Eine weitere wichtige Kenngröße, die einen Einfluss auf die Abbaubarkeit hat, ist das Verhältnis von C_2 zu C_6 Substitution. Nur die Einführung einer Hydroxyethylgruppe an C_2 führt durch sterische Abschirmung zu einer Beeinträchtigung der Hydrolyse durch Enzyme.[82,83]



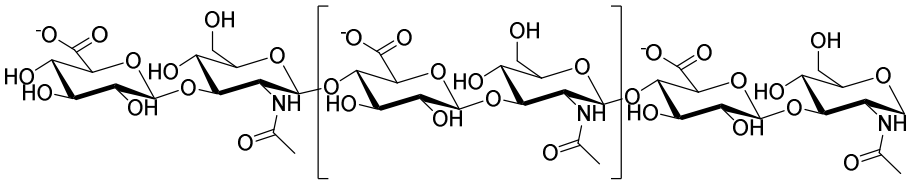
Schema 7: Strukturausschnitt der Hydroxyethylstärke

Die zurzeit auf dem Markt befindlichen HES-Präparate der sogenannten 3. Generation besitzen ein M_W von 130 kDa sowie einen molaren Substitutionsgrad von 0.4, was durch die Schreibweise 130/0.4 ausgedrückt wird. HES wird seit etwa 40 Jahren als Volumenersatzmittel verwendet. Die neueren Generationen der HES (70/0.5, 200/0.5, aber vor allem 130/0.4) zeichnen sich gegenüber der 1. Generation (450/0.7) durch geringere Nebenwirkungen wie Auswirkungen auf das Gerinnungssystem und eine bessere Steuerbarkeit aus.[84] Jedoch bestehen auch bei den neuen Generationen Nebenwirkungen. Bei wiederholter Gabe von höheren Dosen (>500 mL/Tag) einer HES-Lösung (200/0.5) trat bei einigen Patienten langanhaltender starker Juckreiz (Pruritus) auf der Haut auf. Die Ursache dafür scheint eine Akkumulation in der Haut zu sein.[85] Zudem wurden Nieren- und Leberschäden beschrieben.[86,87] Aufgrund dieser Nachteile sollen seit 2013 HES-haltige Infusionslösungen bei Patienten mit einer starken Sepsis, eingeschränkter Nierenfunktion sowie schweren Leberfunktions- und Gerinnungsstörungen in Europa nicht mehr verwendet werden.[88,89]

1.3.2 Hyaluronsäure

Bei Hyaluronsäure (HA) handelt es sich um ein lineares Polysaccharid, das zur Gruppe der Glykosaminoglykanen gehört. Sie besteht aus einer Wiederholeinheit aus D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin, die β-1,4 und β-1,3 miteinander verknüpft sind (**Schema 8**). Im Gegensatz zu den meisten anderen Glykosaminoglykanen besitzt sie aber keine Sulfatgruppe. Das Molekulargewicht dieses linea-

ren Polymers kann dabei eine Größenordnung von mehreren Millionen Dalton erreichen. Sie kommt natürlich in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten von allen Wirbeltieren vor. Dabei finden sich die höchsten Konzentrationen an HA im Bindegewebe, der extrazellulären Matrix (EZM), der Gelenkflüssigkeit, der Nabelschnur, dem Knorpelgewebe und dem Glaskörper. Darüber hinaus wird sie auch von einigen Bakterienarten synthetisiert. Erstmalig wurde sie 1934 aus dem Glaskörper des Rinderauges durch Karl Meyer und John Palmer isoliert.[90]



Schema 8: Strukturausschnitt der Hyaluronsäure

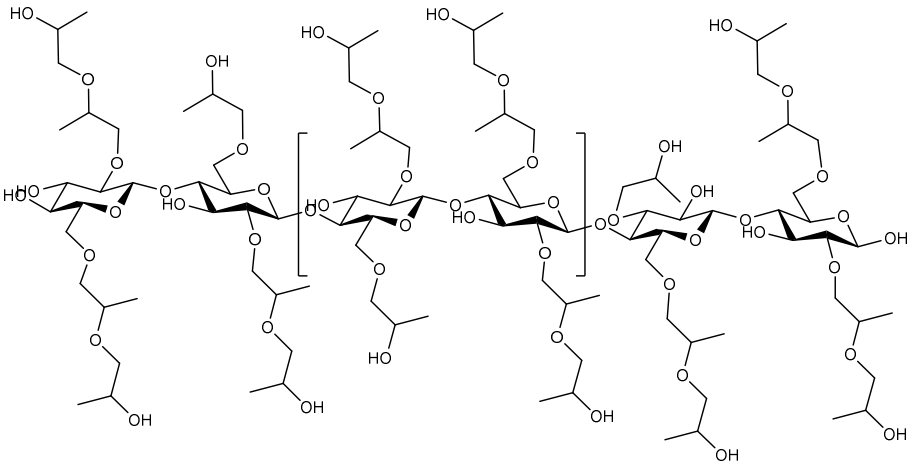
Die HA erfüllt zahlreiche biologische Funktionen. So ist sie beispielsweise ein stabilisierender Gerüstbaustein der EZM. Durch die Bindung an spezifische Proteine, die sich auf der Zelloberfläche der EZM befinden, unterstützt sie den Aufbau eines dreidimensionalen Netzwerkes zwischen Kollagenfasern und Zellen.[91] Früher wurde HA hauptsächlich aus Hahnenkämmen gewonnen, in manchen Fällen auch aus Rinder- und Fischaugen. Aus 1 kg Hahnenkämmen können etwa 3g HA gewonnen werden. Da das Geflügelprotein jedoch bei der Isolierung der HA nicht vollständig entfernt werden kann, kann es bei einer parenteralen Darreichung zu unerwünschten Reaktionen des Immunsystems kommen. Außerdem besteht bei Produkten tierischen Ursprungs generell das Risiko, dass Verunreinigungen durch Krankheitserreger, die sich auf den Menschen übertragen können, vorhanden sind. Seit den 1990er Jahren wird HA jedoch biotechnologisch auf Basis von bakterieller Fermentation hergestellt.[91,92] Die bakteriell hergestellte HA wird in mehreren Filtrationsschritten aufgereinigt und unter sterilen Bedingungen weiter verarbeitet.

Im Körper liegt die HA als Natriumsalz vor. Sie besitzt somit eine negative Ladung an den COO^--Gruppen und ist dadurch sehr gut wasserlöslich. Unter physiologischen Bedingungen bindet sie über die Carboxylat-Gruppen sehr große Mengen an Wasser. So kann beispielsweise eine 2%ige HA-Lösung 98% Wasser unter Ausbil-

dung eines dickflüssigen Gels binden. Dieses Gel besitzt viskoelastische und pseudoplastische Eigenschaften.[91] Aufgrund ihrer Eigenschaft, als natürliches, schockabsorbierendes Schmiermittel zu fungieren, und ihrer Fähigkeit, große Mengen an Wasser zu binden, wird HA gerne in ophthalmischen Produkten verwendet.[93]

1.3.3 Hydroxypropylcellulose

Bei der Hydroxypropylcellulose (HPC) handelt es sich um einen Celluloseether, dessen Glucoseeinheiten β-(1,4)-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die HPC wird durch Umsetzung der reaktiven Hydroxylgruppen der Cellulose mit Propylenoxid gewonnen. Die dabei entstehende Hydroxypropylgruppe ist durch ihre OH-Gruppe in der Lage, eine Reaktion mit weiterem Propylenoxid einzugehen (**Schema 9).** Aufgrund der vielen hydrophilen und hydrophoben Gruppen besitzt die HPC eine lower critical solution temperature (LCST) von 45°C, ab der sie in Wasser unlöslich wird. Im Gegensatz zur unmodifizierten Cellulose ist die HPC aber unterhalb dieser Temperatur sehr gut in Wasser löslich.

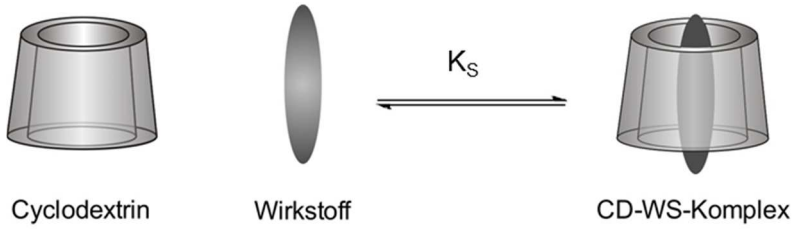


Schema 9: Strukturausschnitt der Hydroxypropylcellulose

HPC findet vor allem in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel und Emulgator unter der europäischen Zulassungsnummer E 463[94], als Augeninsert zur Behandlung trockener Augen[95–97] sowie als Tablettensprengmittel Verwendung.[98]

1.4 Wirt-Gast-Komplexe

Bei der Bildung von Einschlussverbindungen sind verschiedene Kräfte involviert, deren Beitrag sowohl von der Art des CDs als auch der Gastverbindung abhängig ist. Dabei spielen hydrophobe, Dipol-Dipol und elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken- und van-der-Waal-Bindungen sowie Dispersionskräfte eine große Rolle. Als Haupttriebkraft wird jedoch der Austausch der ungünstigen Wechselwirkungen (polar-apolar) sowohl zwischen inkludierten Wassermolekülen und der hydrophoben Kavität als auch zwischen den Wassermolekülen und einer hydrophoben Gastverbindung durch die weitaus günstigere Wechselwirkung (apolar-apolar) zwischen Kavität und Gast angesehen.[99] Dem durch die Komplexierung freigesetzten *„high energy water“* wird dabei der Hauptbeitrag zugeschrieben.[100]



Schema 10: Ausbildung eines Komplexes mit 1:1 Stöchiometrie

Die Einschlussverbindung steht in wässriger Lösung in einem dynamischen Gleichgewicht mit ihren Komponenten (Wirt: Cyclodextrin, Gast: Wirkstoff), und ist durch die Abwesenheit kovalenter Bindungen wie auch einer definierten Wirt:Gast Stöchiometrie charakterisiert (**Schema 10**). Die Bindungskonstante K_S gibt dabei die Stabilität des Komplexes an. Neben der Ausbildung eines Komplexes mit 1:1 Stöchiometrie, bei dem ein CD ein Gastmolekül einschließt, besteht auch die Möglichkeit der Ausbildung von 1:2 (der Gast wird von zwei CD-Molekülen eingeschlossen) und 2:1 Komplexen (dabei komplexiert ein CD zwei Gastmoleküle). Durch die Ausbildung dieses Komplexes können die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gastmoleküls verändert werden. So kann zum einen die Löslichkeit der eingeschlossenen Verbindung erhöht werden, zum anderen ist es möglich, leicht flüchtige Substanzen innerhalb des Komplexes zu fixieren. Auch

gegen Licht- oder UV-Strahlung empfindliche, sowie oxidations- oder hydrolyselabile Substanzen können durch Komplexierung in Cyclodextrine stabilisiert werden. Unerwünschte Duft- und Geschmacksstoffe können ebenso eingeschlossen und somit maskiert werden.[101–103] Nach der Verabreichung eines Wirkstoff-Cyclodextrin Komplexes dissoziiert dieser und der Wirkstoff wird in die relevanten Kompartimente im Körper frei gegeben. Dies geschieht zum einen durch einen Konzentrationsgradienten, sowie durch eine Verdrängung des Gastes durch andere Moleküle aus Gewebe und Serum, zum anderen aber auch durch die Bindung des Wirkstoffes an Zellmembranen.[104,105]

1.5 Methoden zur Bestimmung der Komplexbindungskonstante

Da sich die physikochemischen Eigenschaften der Gastverbindung bei einer Komplexierung verändern, eignet sich jede Methode, die diese Veränderung beobachten kann, zur Bestimmung der Bindungskonstante. Diese Veränderungen betreffen die Löslichkeit, die chemische Reaktivität, Veränderungen in der UV/VIS Absorption und der Fluoreszenz, Verschiebungen der Signale im NMR sowie Veränderung der pK_s-Werte. Da die Komplexierung auch einen Einfluss auf das den Komplex umgebende Medium hat, sind auch Methoden geeignet, die die Veränderung der physikochemischen Eigenschaften messen könne. Darunter fallen beispielsweise die Titrationskalorimetrie, Viskositäts- und Leitfähigkeitsmessungen sowie Gefrierpunktserniedrigung.[103][106] Im Folgenden seien die wichtigsten und in dieser Arbeit auch verwendeten Methoden dargestellt.

1.5.1 Löslichkeitsisotherme

Die am häufigsten verwendete Methode zur Untersuchung des Einschlussverhaltens von CDs ist die von Higuchi und Connors beschriebene Methode der Löslichkeitsisotherme.[107] Die dabei ermittelten Phasen-Löslichkeits-Diagramme können dabei in verschiedene Kategorien des Typs A und B eingeteilt werden (**Abb. 1**). Kurven nach dem A-Typus deuten auf die Bildung eines löslichen Einschlusskomplexes hin, während Kurven des Typs B auf einen Komplex mit einer geringen Löslichkeit schließen lassen. B_s-Typen sind charakteristisch für Komple-

xe mit einer begrenzten Löslichkeit, B_1- Kurven deuten auf unlösliche Komplexe hin. Der A-Typ lässt sich des Weiteren in A_L (linearer Zusammenhang der Wirkstofflöslichkeit in Abhängigkeit der CD-Konzentration), in A_P (positiv abweichende Isotherme) und A_N (negativ abweichende Isotherme) unterteilen.

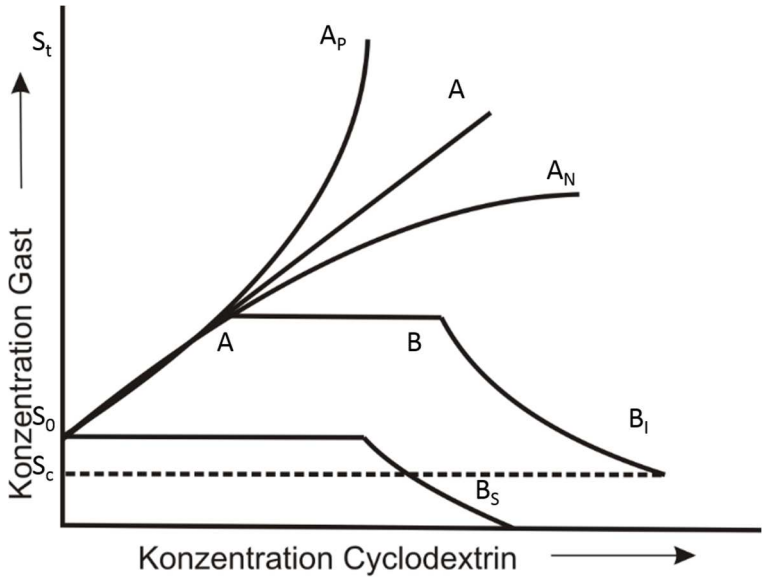


Abb. 1: Übersicht der Löslichkeitsisothermen

β-CD zeigt beispielsweise aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit B-Typ-Verhalten. Modifizierte CDs wie HPβCD und SBEβCD verlaufen gewöhnlich, durch die Bildung eines wasserlöslichen Komplexes, nach dem A-Typ. Im Falle eines 1:1-Komplexes kann, nach **Gleichung 1**, die Bindungskonstante K durch die Steigung der ermittelten Geraden erhalten werden:

$$K = \frac{Steigung}{S_0 \cdot (1 - Steigung)} \qquad (1)$$

S_0 stellt dabei die Grundlöslichkeit des zu komplexierenden Wirkstoffes bei gegeben Bedingungen dar.

1.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von K_S stellt die Mikrokalorimetrie dar. Diese Methode ist sehr empfindlich und präzise, besitzt aber den Nachteil,

dass sie nur für wasserlösliche Substanzen verwendet werden kann. Neben der Bestimmung der Stabilitätskonstante K_S können auch die thermodynamischen Zustandsgrößen (ΔG, ΔH und ΔS) ermittelt werden.

In Lösung steht der Wirt-Gast-Komplex (WG) im dynamischen Gleichgewicht mit seinen freien Komponenten (W,G). Dabei stellt K_S ein Maß für die Stabilität des Komplexes dar, und lässt sich über das Massenwirkungsgesetz berechnen:

$$W + G \rightleftharpoons \mathrm{WG} \quad (2)$$

$$K_S = \frac{[WG]}{[W][G]} \quad (3)$$

Für verdünnte Lösungen können die Aktivitätskoeffizienten des Wirtes [W], des Gastes [G] und des Komplexes [WG] näherungsweise gleich eins gesetzt und dadurch vernachlässigt werden. Aus K_S kann nun die Freie Standardbildungsenthalpie $\Delta G°_S$ für die Einschlussverbindung unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt werden, die sich wiederum aus der Standardbildungsenthalpie und Standardbildungsentropie zusammensetzt. [W], [G] und [WG] stehen für die Konzentrationen von freiem Wirt, freiem Gast und dem Komplex. Die Bestimmung von K_S beruht auf der Messung der freiwerdenden Wärme, die durch Titration der Wirtkomponente mit der Gastkomponente und der resultierenden Komplexbildung entsteht.

1.5.3 Headspace Gaschromatographie

Die Headspace Gaschromatographie stellt eine sehr sensitive Methode dar, um den Einschluss von flüchtigen Gastmolekülen in CDs bei sehr geringen Konzentrationen, in der die Gastverbindung in Wasser löslich ist, zu untersuchen. Dabei wird der Dampfdruck der Gastverbindung in Abhängigkeit von der CD-Wirt-Konzentration bestimmt, wie es *Armstrong*[108] und *Fourmentin* et al.[109,110] beschrieben. Der Dampfdruck des Gastmoleküls vermindert sich mit steigender CD-Konzentration, sodass die Abnahme des Dampfdruckes detektiert werden kann. Die Komplexbindungskonstante K kann aus dem Verhältnis A_0/A der Peakflächen

des Gastmoleküls ohne (A_0) und mit CD (A) beziehungsweise nach **Gleichung 4** und **5** bestimmt werden. k_H steht für die Henry-Konstante, die für jedes Gastmolekül ermittelt werden muss.

$$\frac{A}{A_0} = \frac{1}{1 + K^*[CD]_0} \qquad (4)$$

$$K = K^*(1+k_H) \qquad (5)$$

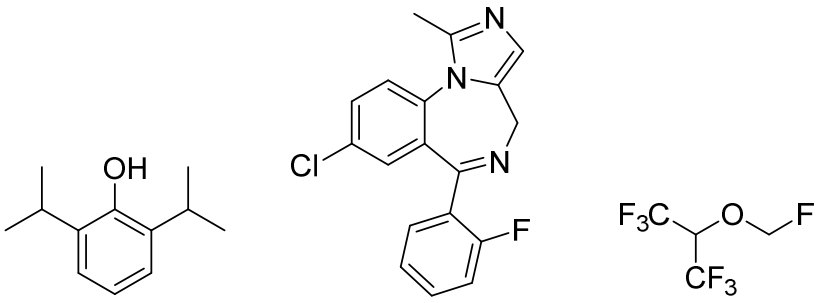
$$x = \frac{[CD \cdot G]}{[CD]_0} = \frac{K}{K + \frac{1}{[G]}} \qquad (6)$$

$$[G] = \frac{p}{RTk_H} \qquad (7)$$

1.6 Untersuchte Wirkstoffe

1.6.1 Anästhetika

In dieser Arbeit wurden drei nur sehr gering wasserlöslichen Anästhetika (Löslichkeiten in Tabelle 16 angegeben), Propofol, Midazolam und Sevofluran (**Schema 11**) ausgewählt und deren Einschluss in Cyclodextrinderivate untersucht.

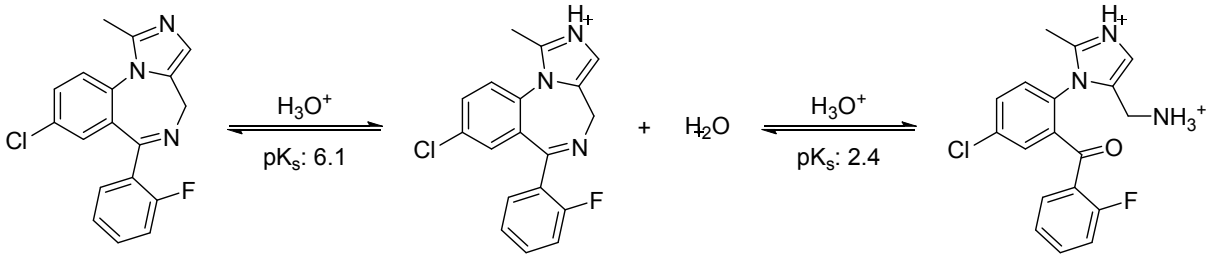


Schema 11: Darstellung der Anästhetika Propofol, Midazolam und Sevofluran

Bei **Sevofluran** handelt es sich um ein Inhalationsanästhetikum. Durch seine geringe Wasserlöslichkeit sowie seinen niedrigen Siedepunkt von 58.5°C kann es nur im gasförmigen Zustand verabreicht werden. Ein Einschluss in Cyclodextrine ist kaum beschrieben. In einer Patentanmeldung von 2011 wurde eine Einschlussverbindung von Sevofluran in α-CD dargestellt.[111] Bei der Herstellung fällt der Komplex als weißer Feststoff aus. Dieser kann für die orale Applikation Verwendung finden. Zudem ist es durch die Komplexierung möglich, eine genauere Verabreichung von Sevofluran durch Kenntnis der eingesetzten Konzentration zu erzielen.

Propofol wird bisher als intravenöses Anästhetikum aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit (0.12 g/L) in Form einer Fettemulsion (Öl-in-Wasser-Emulsion mit 10% Sojaöl) verabreicht, das vor allem zur Einleitung einer Narkose eingesetzt wird (Dosis: 1.5 – 2.5 mg Propofol/kg Körpergewicht). Als Vorteile gegenüber anderen Anästhetika werden ein angenehmes Einschlafen und Aufwachen, sowie nur geringe Übelkeit nach der Narkose beschrieben. Aufgrund seiner rasch einsetzenden Wirkung, der guten Sedierung sowie der guten Verträglichkeit wird es gerne, auch in der Pädiatrie, eingesetzt.[112–114] Die Nachteile dieser Emulsion sind zum einen die zum Teil schmerzhafte Applikation (Venenschmerz), zum anderen stellt die Emulsion eine gute Nährlösung für Keime dar.[115,116] Zudem ist die Verabreichung mit einer Erhöhung der Blutfettwerte verbunden.[117] Durch eine Komplexierung in Cyclodextrine könnten diese Nachteile behoben werden. *Loftsson* stellte den Einschluss von Propofol mit HPβCD (DS: 0.6) in Wasser vor. Die Komplexbildungskonstante K_S wurde zu 1600 M^{-1} bestimmt.[118] Es gibt zudem eine Patentanmeldung von 2012, die die pharmazeutische Formulierung eines Komplexes von HPβCD mit Propofolat beschreibt.[119]

Ein weiteres Anästhetikum stellt **Midazolam** dar, das zur Anxiolyse und Sedierung eingesetzt wird und zur Gruppe der Benzodiazepine gehört. Bei physiologischem pH ist Midazolam wasserunlöslich, bei pH-Werten unterhalb von 4 ist es aufgrund der Ringöffnung zu einem Benzophenonderivat und einer ionisierbaren primären Aminogruppe sehr gut in Wasser löslich. Bei pH-Werten >5 liegt Midazolam in der geschlossenen Ringform vor (**Schema 12**).[120]

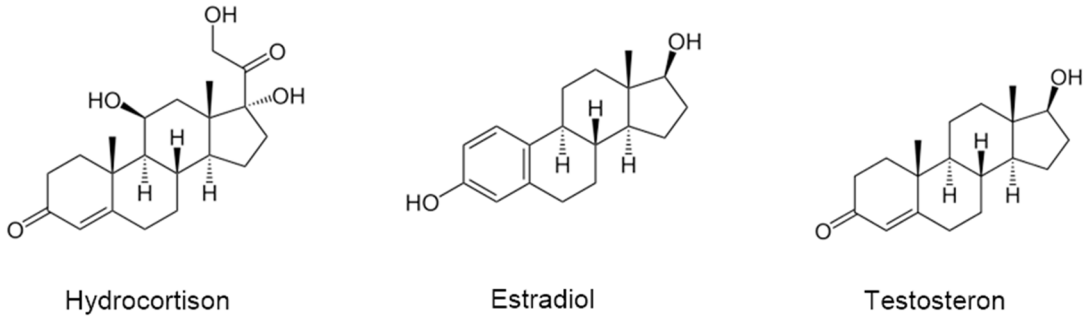


Schema 12: reversible Ringöffnung von Midazolam in wässriger Lösung

Aufgrund seiner kurzen pharmakokinetischen Halbwertszeit, seiner entspannenden Wirkung auf die Skelettmuskulatur und seiner amnetischen Eigenschaften wird es meistens als präoperatives Anästhetikum vor allem in der Pädiatrie verwendet.[121] Es wird oral (0.4mg/kg) oder sublingual (0.2mg/kg) appliziert und zeigt seine Wirkung nach etwa 30 Minuten (peroral). Dadurch ist sein Einsatz in dieser Darreichungsform jedoch für die Fast-Track- und Tageschirugie nicht geeignet.[122] Zudem wird die orale Verwendung durch seinen sehr bitteren Geschmack begrenzt. Durch den Einschluss in CDs soll einerseits seine Wasserlöslichkeit wie auch die Bioverfügbarkeit erhöht, andererseits der Eigengeschmack maskiert werden. In NMR-Studien wurde der 1:1 Komplex von Midazolam-Hydrochlorid und β-CD von *Ali* et al. vollständig charakterisiert. Dabei stellten sie fest, dass nur der fluor-substituierte Aromat als Gast agiert[123] *Loftsson* et al. zeigten 2001, dass in Anwesenheit von CDs die Löslichkeit von Midazolam gesteigert werden kann und stellten eine Formulierung für ein midazolamhaltiges Nasenspray (17mg/mL, pH: 4.3) mit 14% (w/v) SBEβCD vor.[124] Eine intranasale Verabreichung der sauren Midazolam-Lösung kann jedoch zu Irritationen führen. 2009 entwickelten *Marçon* et al. eine 0.2% (w/v) wässrige Midazolam-Lösung mit γ-CD und Citronensäure für die orale Applikation, die in einer Studie von Kindern besser als bisherige Formulierungen bezüglich des Geschmackes akzeptiert wurde.[125] 2013 wurde der Ersatz von γ-CD durch partiell methylierte CDs wie RAMEβCD beschrieben, durch deren Einsatz die Löslichkeit und Stabilität oraler Midazolam-Lösungen verbessert werden konnte.[126]

1.6.2 Steroide

Steroide zählen zu den Lipiden. Ihr charakteristisches Merkmal ist ein Ringsystem bestehend aus 3 Cyclohexanen und einem Cyclopentan, die miteinander annelliert sind. Durch unterschiedliche Funktionalisierung gibt es eine Vielzahl an Derivaten. In dieser Arbeit wurden drei sehr schwer wasserlösliche Steroidderivate, Hydrocortison, Estradiol und Testosteron (**Schema 13**), die deshalb nur eine geringe Bioverfügbarkeit aufweisen, ausgewählt, um den Einschluss durch die synthetisierten CD-Derivaten und CD-Polymere zu untersuchen (Löslichkeiten in Tabelle 16 angegeben).



Schema 13: Darstellung der Steroide Hydrocortison, Estradiol und Testosteron

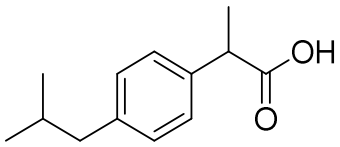
Hydrocortison ist ein natürliches Stresshormon der Nebennierenrinde. Es aktiviert katabole Stoffwechselvorgänge und kann dadurch dem Körper energiereiche Verbindungen wie Glucose zur Verfügung stellen. Zudem wirkt es an immunologischen Prozessen mit. Wegen seiner immunsupressiven Eigenschaften wird es in der Medizin häufig zur Hemmung von Entzündungsreaktionen im Körper eingesetzt. Schon mit β-CD bildet Hydrocortison stabile Komplexe aus ($K = 1*10^3\ M^{-1}$).[127]

Bei **Estradiol** handelt es sich um ein natürliches Sexualhormon der Frau und gehört zu der Gruppe der Östrogene. Es fördert Wachstum und Funktion der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale und ist zudem wichtig für den Knochenbau. In der Medizin wird es hauptsächlich in der Hormonersatztherapie eingesetzt. Unter dem Namen *Aerodiol* wurde es in einer Formulierung mit RAMEβ-CD in Form eines Nasensprays zur Linderung von Beschwerden in den Wechseljahren vermarktet.[28,33]

Testosteron ist ebenfalls ein Sexualhormon, das in beiden Geschlechtern in unterschiedlichen Konzentration vorkommt und stellt das wichtigste Androgen dar. Es wird im Hoden und der Nebennierenrinde gebildet und fördert die Spermienproduktion wie auch die Libido und aggressives Verhalten. In der Literatur wurden 1:1 Komplexe mit HPβ-CD ($K = 1.3*10^4\ M^{-1}$) beschrieben.[128]

1.6.3 Ibuprofen

Ibuprofen ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der nicht-steroidalen Entzündungshemmer und besitzt fiebersenkende, schmerzlindernde sowie entzündungshemmende Eigenschaften.

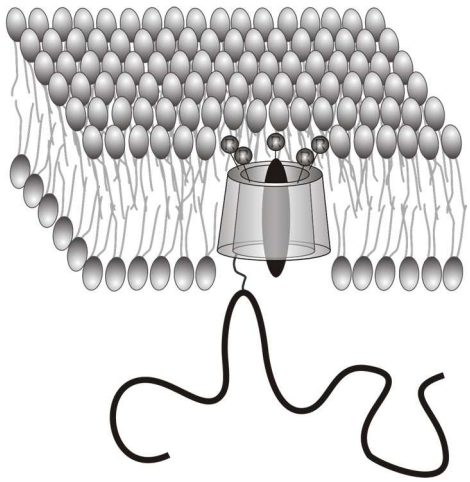


Schema 14: Darstellung von Ibuprofen

Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit (21mg/L)[129] wurden bereits Einschluss-Verbindungen mit β-CD und seinen Derivaten beschrieben.[130–132]

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von wasserlöslichen, definierten Cyclodextrin-Polymeren, die in der Lage sind, schwerlösliche Arzneimittel durch Wirt-Gast-Komplexierung einzuschließen und für medizinische Anwendungen leichter applizierbar zu machen. Dabei sollen regioselektiv modifizierte β-Cyclodextrinderivate, die sowohl hydrophiler wie auch amphiphiler Art sind, hergestellt werden. Die Verwendung von amphiphilen Derivaten soll durch Einlagerung dieser in biologische Membranen einen Wirkstofftransport durch die Membran hindurch erleichtern. Die Cyclodextrine sollen zudem kovalent an biokompatible und biologisch abbaubare Polysaccharide geknüpft werden, um eine unkontrollierte Aufnahme und Verteilung der Cyclodextrine im menschlichen Körper zu verhindern und die Toxizität der methylierten Derivaten gering zu halten. Dabei sollen verschiedene Kupplungstechniken wie Click-Chemie und Amidkupplung zum Einsatz kommen. So sollen beispielsweise erstmals definiert methylierte Cyclodextrinderivate an Polysaccharide geknüpft werden, um deren Toxizität deutlich zu verringern. Zudem soll das Einschlussvermögen dieser neuen Cyclodextrinpolymere mit ausgewählten Wirkstoffen wie Anästhetika oder Steroidderivaten mit physikalisch-chemischen Methoden untersucht und untereinander auf ihre Effektivität verglichen werden.

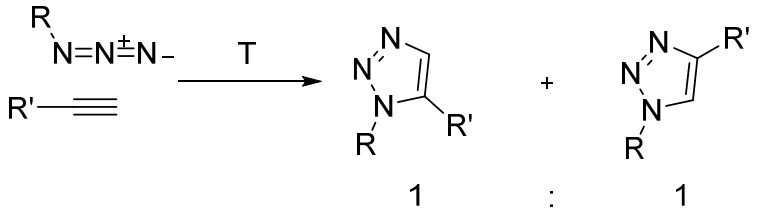


Schema 15: Schematische Darstellung des CD-Polymer-Wirkstoff-Komplexes bei Einlagerung in eine Membran

3 Anknüpfung von β-CD-Derivaten an Hydroxyethylstärke über „Click“-Chemie

3.1 Unkatalysierte [1+3]-dipolare Cycloaddition (Huisgen-Reaktion)

Bei der Huisgen-Cycloaddition handelt es sich um die Reaktion einer dipolarophilen Verbindung (meist substituierte Alkene oder Alkine) mit einer 1,3-dipolaren Verbindung (wie Azide, Nitriloxide oder Diazoalkane) unter Bildung eines 5-gliedrigen Heterocyclus. Dabei werden zwei π-Elektronen der dipolarophilen Verbindung und vier Elektronen der dipolaren Verbindungen gleichzeitig pericyclisch verschoben. Für eine erfolgreiche Reaktion müssen die beteiligten HOMOs und LUMOs des Dipolarophils und des Dipoles überlappen können. Dies wird beispielsweise durch elektronenziehende Gruppen an der dipolarophilen Verbindung begünstigt, wodurch das LUMO des Dipolarophils mit dem HOMO des 1,3-Dipols überlappen kann.[133]

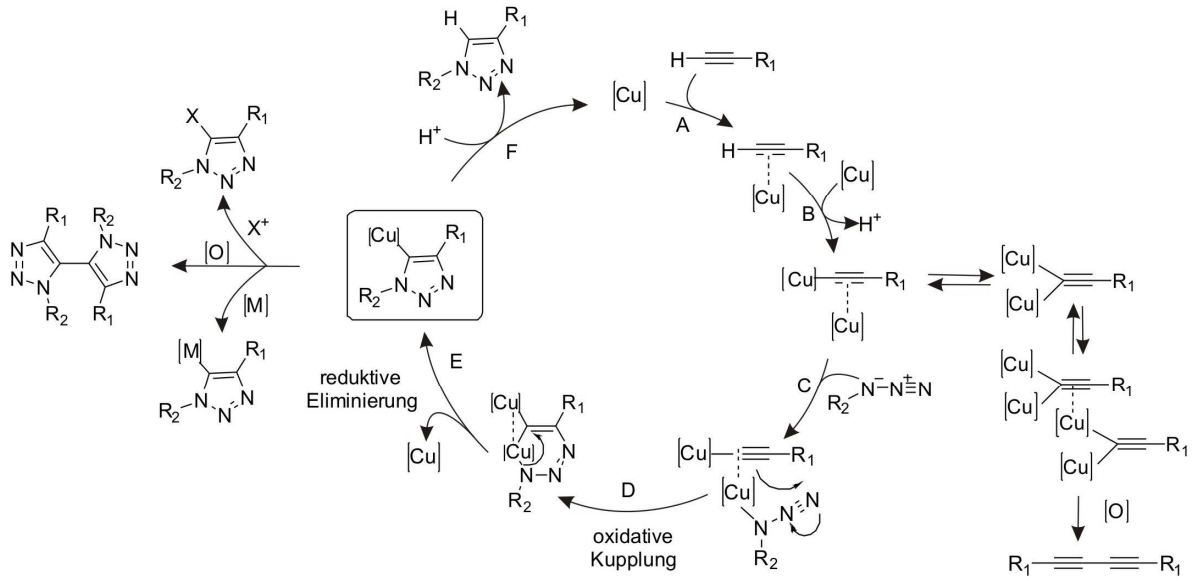


Schema 16: unkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition

Für die Bildung eines 1,2,3-Triazols aus einem Azid und einem Alkin über die 1,3-dipolare Cycloaddition sind erhöhte Temperaturen erforderlich. Zudem entsteht ein nahezu 1:1 Gemisch aus dem 1,4- und dem 1,5-Regioisomer. Die Reaktion kann jedoch auch über eine Kupfer(I)-Katalyse durchgeführt werden, in der regiospezifisch Azide und terminale Alkine ausschließlich zu einem 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol reagieren. Diese Reaktion verläuft jedoch nicht mehr konzertiert wie die klassische Cycloaddition sondern in mehreren Schritten.[134]

3.2 Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (“Click”-Chemie)

Das Konzept der “Click”- Chemie wurde 2001 von *Sharpless et al.* eingeführt.[135] Die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) ist eine häufig verwendete, zuverlässige und geradlinige Möglichkeit, um funktionalisierte Komponenten kovalent miteinander zu verknüpfen. In **Schema 17** ist der vermutete Mechanismus dargestellt, der sich auf rechnerische[136–138] und experimentelle[139–141] Ergebnisse stützt.



Schema 17: Postulierter Mechanismus der Click-Chemie[142]

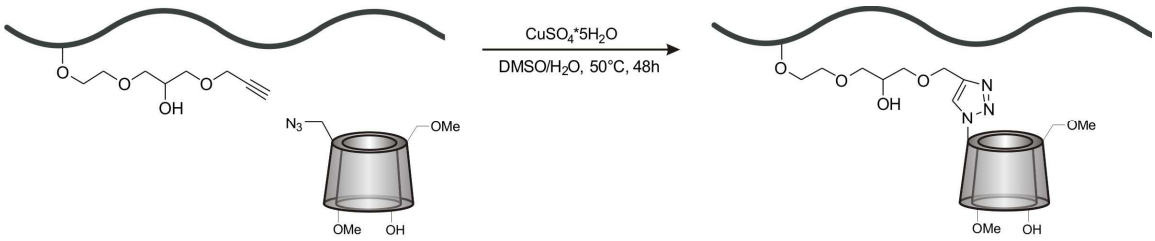
Im 1. Schritt (A) erfolgt eine π-Koordination der Cu(I)-Spezies an ein terminales Alkin, wodurch dessen CH-Bindung acider (der pK_S fällt von ~25 auf ~15) wird. In wässriger Lösung kann so im nächsten Schritt (B) ohne Zusatz einer Base H^+ gegen eine weitere Cu(I)-Spezies ausgetauscht werden. In Schritt C koordiniert die Azidkomponente an das π-koordinierte Cu(I)-Zentrum. Dabei ist es prinzipiell egal, ob der terminale oder der substituierte Stickstoff koordiniert, wobei der substituierte Stickstoff (π-Donor) die Elektronendichte am Kupfer erhöhen kann, was die anschließende oxidative Kupplung (D) erleichtert. Durch die präferierte Koordination des α-Kohlenstoff-Atoms des Acetylids an die π-koordinierte Cu(I)-

Spezies und dem daraus folgenden nukleophilen Angriff des β-Kohlenstoff an den elektrophilen, terminalen Stickstoff kann die 1,4-Regioselektivität erklärt werden. Als Folge dieses reaktionsbestimmenden Schrittes bildet sich ein sechsgliedriger Metallazyklus. Dabei ist bisher bzgl. des Oxidationszustandes der beiden Kupfer-Zentren noch unklar, ob Cu(III) gebildet wird, oder ob beide Kupfer-Zentren im Oxidationsschritt kooperieren. Schließlich bildet sich durch die bestehende Ringspannung sowie Cu(I) Abspaltung durch reduktive Eliminierung (E) der Cu(I) gebundene Triazolring, welcher in wässriger Lösung durch Protonierung (F) in das 1,2,3-Triazol umgewandelt wird. Das dabei freigesetzte Kupfer kann somit erneut einen weiteren Katalysezyklus eingehen.[136,140,142–144] *Finn et al*. führten zur weiteren Aufklärung des Mechanismus kinetische Untersuchungen durch und fanden dabei heraus, dass es sich bei einem Überschuss an Cu(I) um eine Reaktion 0. Ordnung bzgl. des Metalls handelt. Wird Cu(I) jedoch in katalytischen Mengen eingesetzt, verläuft die Reaktion bzgl. des Kupfers nach 2. Ordnung.[141]Eine mögliche Nebenreaktion der Click-Chemie stellt die Glaser-Kupplung dar. Dabei reagieren zwei terminale Alkine unter Kupfer(II)katalyse zu symmetrischen Diinen (**Schema 17,** rechte Reaktionsabfolge).[145] Um Nebenreaktionen wie die Glaser oder die verwandte Elington-Kupplung durch Zusammenlagerung der Alkin-Komponenten und anschließender Oxidation zu verhindern, muss Cu(I) beispielsweise durch Zusatz eines Reduktionsmittel wie Natriumascorbat stabilisiert werden. Dies verhindert zudem auch die Bildung von Bis-Triazolen (**Schema 17,** linke Reaktionsabfolge). Auch Cu(I)-stabilisierende Liganden (wie Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) sowie der Ausschluss von Sauerstoff während der Reaktion tragen zur Vermeidung dieser unerwünschten Reaktion bei.[142]

In den letzten Jahren wurden β-CD-Polymere[146,147] sowie Konjugate aus β-CDs[148,149] durch „Click"-Chemie hergestellt. *Nielsen* et al. berichteten 2010 von wasserlöslichem β-Cyclodextrin-Dextran-Polymeren, die über „Click-Chemie" erhalten wurden. Dafür wurden die Dextrane jeweils mit Glycidylpropargylether, mit Propargylcarbonylimidazol oder mit Hexynoylchlorid modifiziert. Über eine CuAAC wurden an die alkinmodifizierten Dextrane schließlich Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-Cyclodextrine angebracht. Die Polymere wurden mittels NMR-Spektroskopie und Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) charakterisiert und

die Komplexbindungskonstante mit 2-(1-Adamantyl)Ethyl-trimethyl-ammoniumbromid (AdaTMA) über isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt, die in etwa mit denen von nativem β-Cyclodextrin vergleichbar war. Es wurde gezeigt, dass die Zugänglichkeit der CD von der Spacerlänge zwischen Dextran und CD abhängig ist. So konnte die größte Zugänglichkeit im Falle von Glycidylpropargylether als Spacer, die geringste im Fall von Propargylcarbonylimidazol gemessen werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass mit Zunahme der Vernetzung die Fähigkeit, Substrate zu binden, abnimmt.[76]

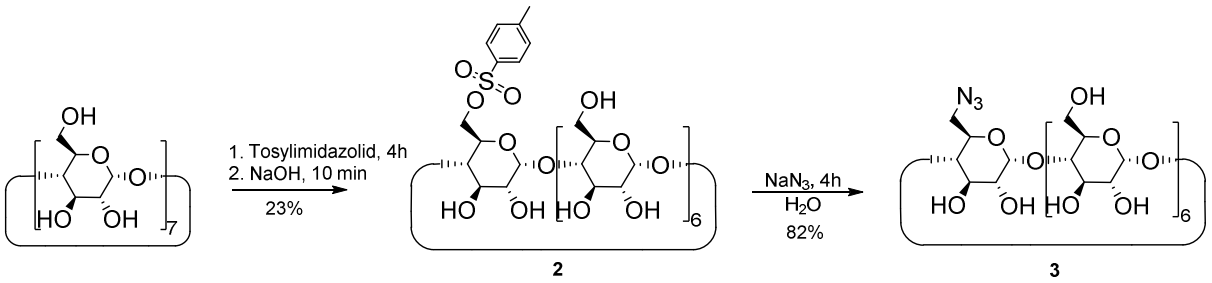
In diesem Teil der Arbeit soll das entsprechend methylierte Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-CD an propargylierte Hydroxyethylstärke (HES) gekuppelt, sowie dessen Komplexiervermögen mit den hydrophilen CD-Derivaten verglichen werden (**Schema 18**).



Schema 18: Synthese des HES-CD Konjugates über Click-Chemie

3.3 Synthese der Cyclodextrin-Derivate

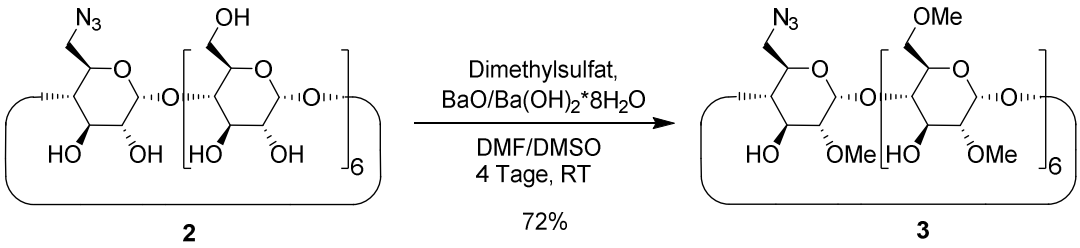
Ausgehend von nativem β-CD wurde über das Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)]-β-CD **1** das Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-CD **2** nach Literaturvorschrift mit einer Ausbeute von 82% (19% bezogen auf natives CD) synthetisiert (**Schema 19**).[150]



Schema 19: Synthese von Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-CD **2**

Um in Hinblick auf späteren Einschluss von Wirkstoffmolekülen bessere Komplexierungseigenschaften zu erzielen, sowie auch eine Wechselwirkung mit biologischen Membranen zu ermöglichen, wurde das monofunktionalisierte CD-Derivat zusätzlich noch methyliert. *Hoquelet* et al. beschrieben die Herstellung des methylierten Monoazid-CDs.[151] Jedoch wurde für die Methylierung Methyliodid verwendet, was bekanntlich zu einer zufälligen Methylierung führt und somit sehr unselektiv ist. Ziel dieser Arbeit war es, eine definierte Verbindung, die regioselektiv in den 2- und 6- Positionen eine Methylierung aufweist, herzustellen, da für diese im Allgemeinen die höchsten Komplexstabilitäten beschrieben sind.

Die regioselektive Methylierung wurde an die Vorschrift von *Szejtli* et al[152] angelehnt. Das Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-CD **2** wurde in einem DMF/DMSO-Gemisch und $BaO/Ba(OH)*8H_2O$ als Base durch vosichtige Zugabe von Dimethylsulfat umgesetzt (**Schema 20**).



Schema 20: Synthese von Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3**

Das ESI-MS-Spektrum von Verbindung **3** zeigt eine relativ enge Verteilung der Zahl der Methylgruppen, die zwischen 14 und 18 liegt (**Abb. 2**).

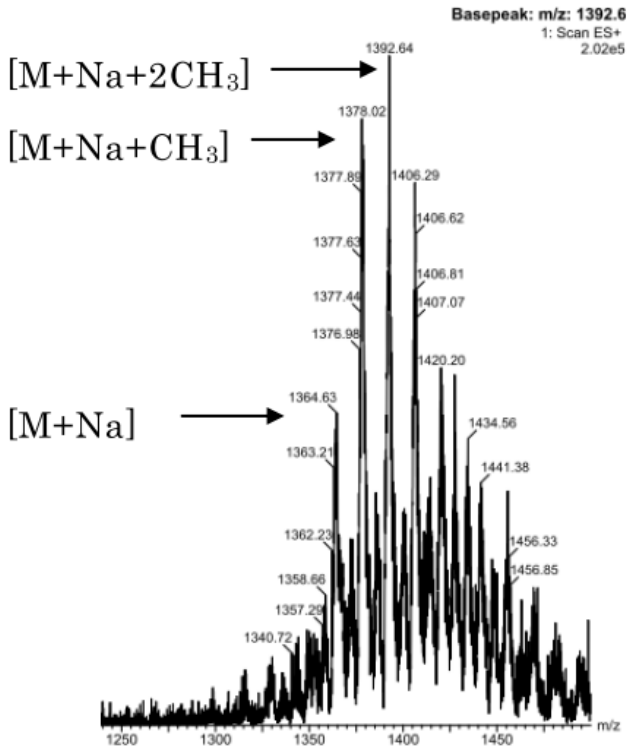


Abb. 2: ESI-Massenspektrum von Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3**

Der Molekülpeak bei m/z = 1364.6 für $[M+Na]^+$ zeigt das gewünschte Produkt. Eine zusätzliche CH_3-Gruppe ergibt eine Massendifferenz von 14.03 g/mol. Daher entspricht der intensivere Peak bei m/z = 1378.0 einer einfachen Übermethylierung und der intensivste Massenpeak bei 1392.64 entspricht einer doppelten Übermethylierung des CDs. Das gemittelte Molekulargewicht beträgt 1386.6 g/mol. Daraus lässt sich ein Substitutionsgrad von 2.2 ableiten.

Diese Werte können durch das ^{1}H-NMR-Spektrum (**Abb. 3**) bestätigt werden. Für eine genaue Zuordnung mussten jedoch HHCOSY und HSQC Aufnahmen durchgeführt werden. Über HHCOSY konnte festgestellt werden, dass es sich bei dem Multiplett bei 3.92ppm um H-3/3' handelt, da eine direkte Korrelation zu H-2/2' zu erkennen ist (**Abb. 4**).

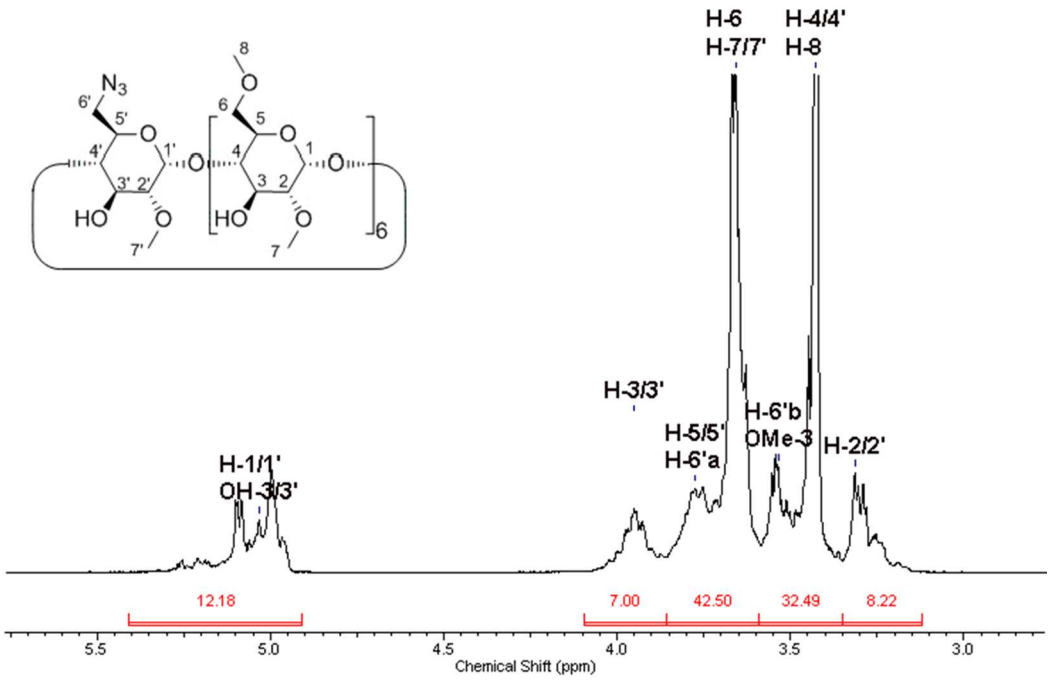


Abb. 3: ^{1}H-NMR (in $CDCl_3$) von Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3**

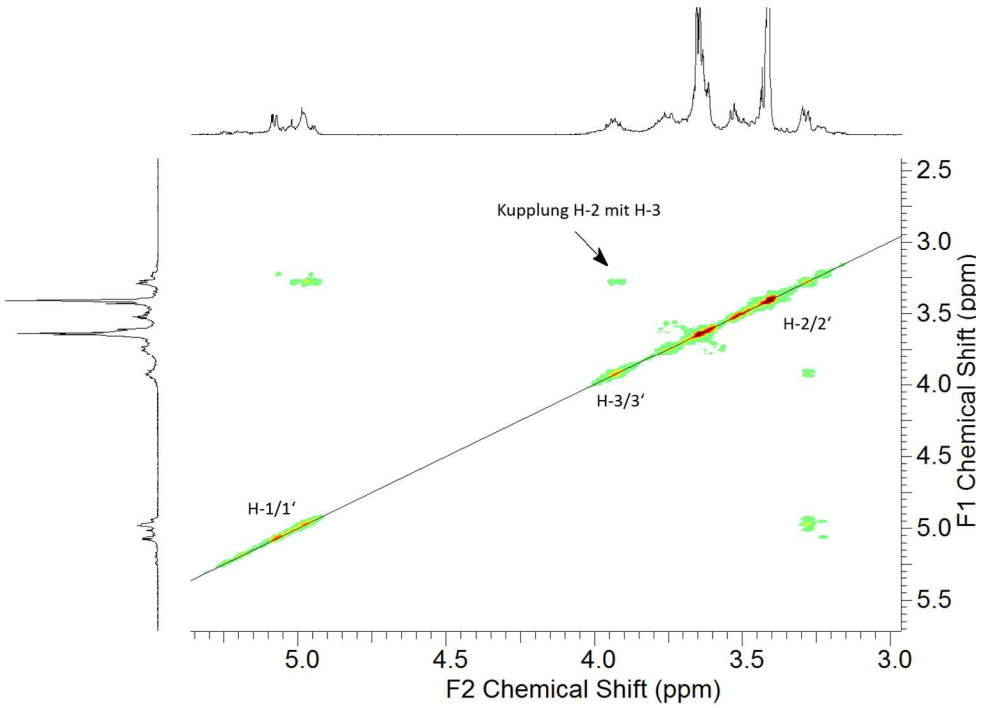


Abb. 4: HH-COSY (in $CDCl_3$) von Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3**

Diese Zuordnung stimmt auch mit den Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe *M.Okada* et al.[153] überein, welche Einschlusskomplexe mit methylierten CDs un-

tersucht hat. Die Zuordnung der Methylgruppen erfolgte analog zu den Ergebnissen von *B. Casu*.[154]

Die Bestimmung der chemischen Verschiebungen der C-Atome ergab, dass die Signale von C-3 und C-5 in umgekehrter Reihenfolge erscheinen als bei *J.Szejtli* et al.[152] zugeordnet wurden. Die Zuordnung der C-6 Atome erfolgte durch das HSQC, da auf ein ^{13}C-Signal zwei ^{1}H-Signale fallen. Durch die Intensitäten der Cross-Peaks konnte bestimmt werden, bei welchem Signal es sich um C-6‘ bzw. C-6 handelt (**Abb. 5**).

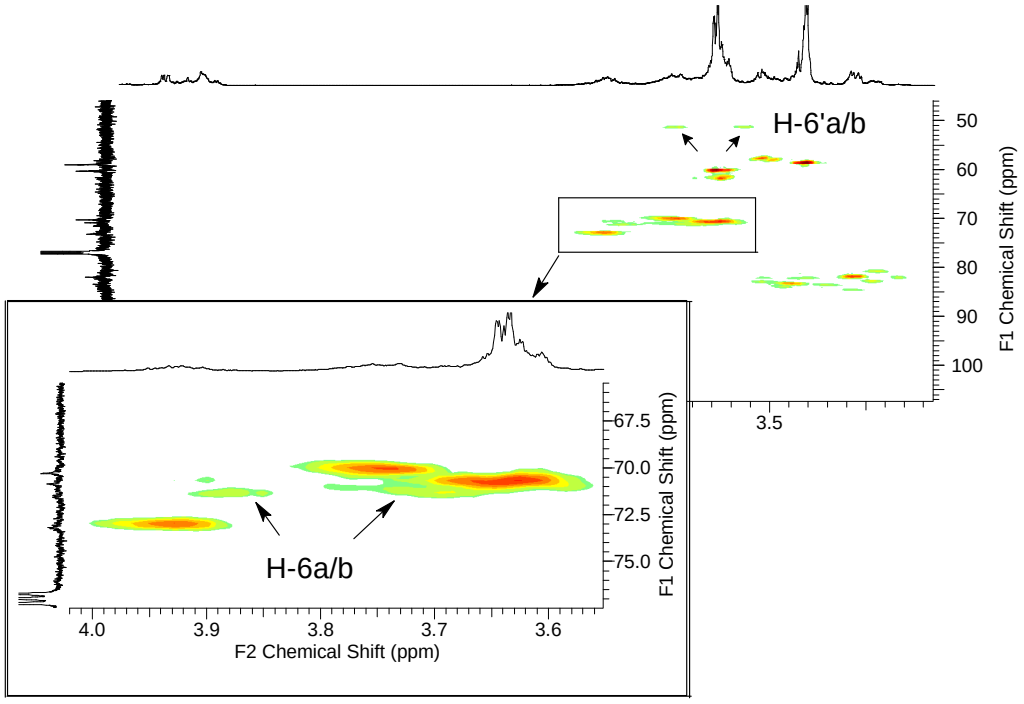


Abb. 5: HSQC (in $CDCl_3$) von Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3**

Nachdem das Intergral der H-3 Protonen auf 7 gesetzt wurde, ergibt eine Integration der Signale zwischen 4.8 und 5.4 ppm einen Wert von 12.18 Protonen. 7 dieser Protonen stammen vom anomeren H (H-1/1‘), sodass die restlichen Signale mit einer Integration von 5.18 den übrig gebliebenen OH-Gruppen in Position 3 zugeordnet werden können. Dies entspricht dem aus dem ESI-MS ermittelten Substitutionsgrad von 2.2. Zudem können die Signale bei 3.66 und 3.43 ppm den Methylgruppen in Position 2 und 6 zugeordnet werden. Ein Signal der Methylgruppen an OH-3 (bei ca. 3.5 ppm) ist hingegen kaum zu sehen.

Das während der Reaktion entstehende $BaSO_4$ fällt als sehr feiner Niederschlag aus, der schwer abzutrennen ist. Um dies zu umgehen und die Aufarbeitung zu erleichtern, sowie die Reaktionszeit von 4 Tagen zu verkürzen, wurde NaOH als stärkere Base gewählt. Die Reaktion verlief analog zur Patentvorschrift von *Szejtli*.[155] Leider kommt es bei der Reaktion zu einer starken Übermethylierung (4- bis 5-fach, ermittelt aus MS und ^{1}H-NMR), so dass im nächsten Versuch nur äquimolare Mengen an NaOH und Dimethylsulfat (13 Äq für 13 umzusetzende OH-Gruppen) dazugegeben wurden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass auch die zweite, weit unreaktivere Methylgruppe des DMS reagierte, so dass eine vollständige Methylierung des Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-CDs **2** erhalten wurde. Wurden jedoch nur 7 Äquivalente an Dimethylsulfat, bei gleichbleibender Menge an NaOH, verwendet, wurden auch nur im Schnitt 8 OH-Gruppen zum Methylether umgesetzt. Um also eine Übermethylierung durch die unreaktivere Methylgruppe des DMS zu verhindern, mussten sowohl die Mengen an Dimethylsulfat als auch an NaOH angepasst werden. Durch die Wahl von16.25 Äq DMS und 15.6 Äq konnte schließlich ein Produkt **3a** mit einem ähnlichen mittleren Substitutionsgrad (DS=2.3) wie Verbindung **3** hergestellt werden. Vergleicht man jedoch die ESI-MS und die NMR-Spektren (**Abb. 6**) mit **3** so fällt auf, dass **3a** eine viel größere Heterogenität aufweist. Dies deckt sich mit den Erfahrungen aus der Literatur. NaOH als Base ist weniger regioselektiv als Bariumhydroxid, wodurch auch die OH-Gruppe in Position 3 mit größerer Wahrscheinlichkeit mit methyliert wird.[156] Um ein definiertes Produkt zu erhalten, wurde deshalb für weitere Versuche wieder auf die Variante mit BaOH als Base zurückgegriffen und die Aufarbeitung hinsichtlich der Abtrennung des $BaSO_4$ optimiert. Nach Neutralisieren wurde das Lösemittel vollständig entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen und aufgekocht. Nach Abfiltrieren des Feststoffes und Abrotieren des Chloroforms kann Verbindung **3** in hohen Ausbeuten (70-90%) gewonnen werden.

In **Abb. 6** werden die ^{1}H-NMR-Spektren der methylierten Monoazid-CD-Derivaten mit gleichem DS an Methylgruppen verglichen. Es wird deutlich, dass das Spektrum von Verbindung **3** verglichen mit **3a**, viel besser aufgelöst und definierter ist, und einer Zuordnung der einzelnen Signale besser vorgenommen werden kann.

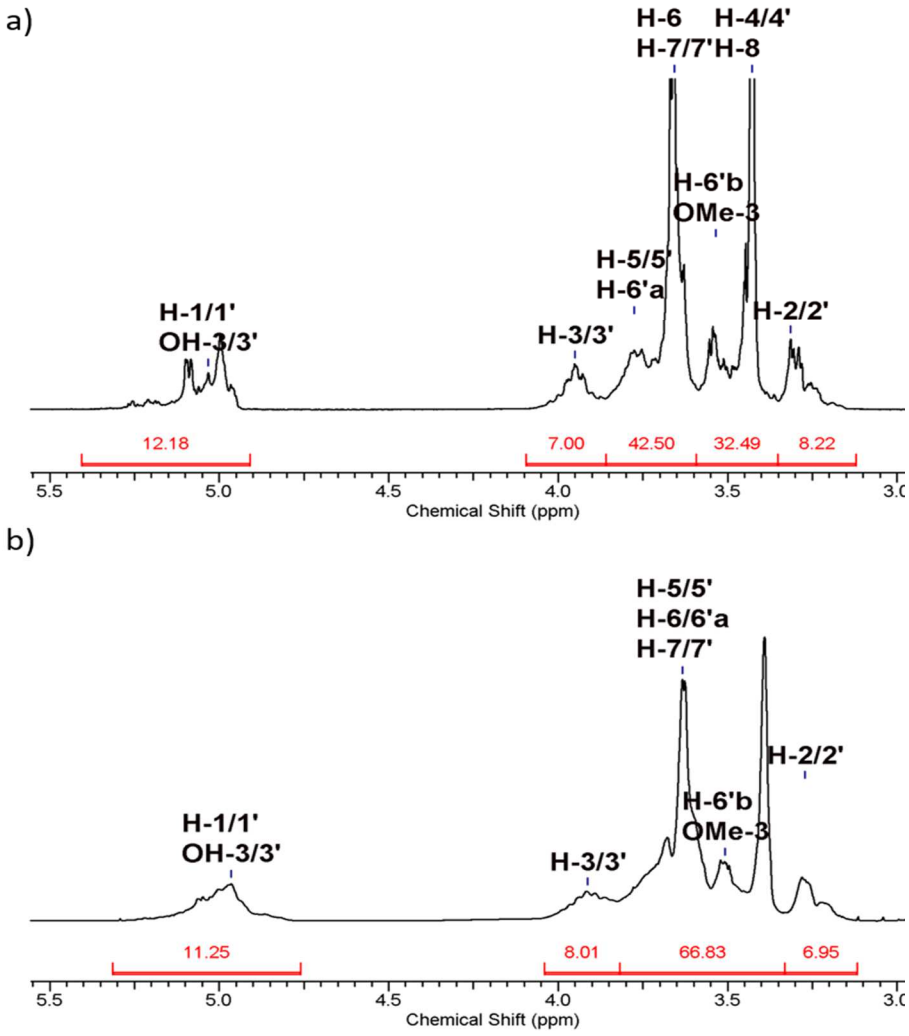


Abb. 6: NMR-Spektren von a) **3** und b) **3a**

Die Aufnahme von IR-Spektren der Verbindungen 3 und 3a zeigte, dass die Azidgruppe auch nach dem Methylierungsschritt erhalten bleibt. Zudem wird durch die Abnahme der OH-Schwingung im Vergleich zur CH-Schwingung die Methylierung deutlich. Eine quantitative Aussage aus den IR-Spektren über den Substitutionsgrad ist jedoch nur schlecht möglich.

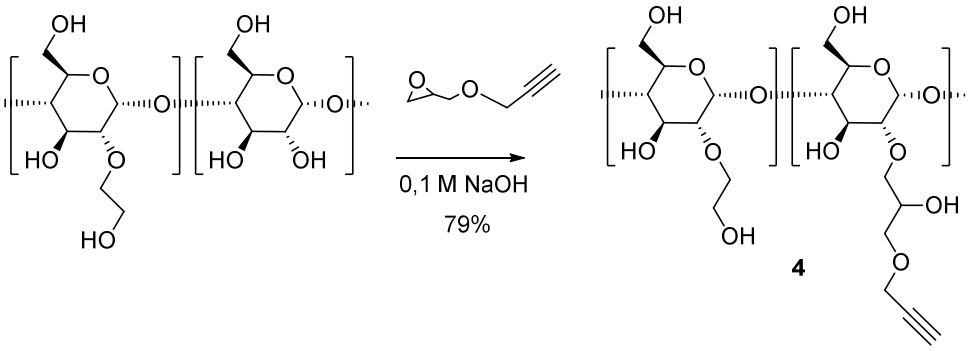
Da die synthetisierten Cyclodextrin-Derivate für einen medizinischen Einsatz gedacht sind, müssen sie, um einen unkontrollierten Durchtritt durch biologische Barrieremembranen zu verhindern, an wasserlösliche Polymere kovalent angeknüpft werden. Zudem wurde gezeigt, dass der Zusatz von hydrophilen Polymeren den Solubilisierungseffekt von Cyclodextrinen auf Wirkstoffe verbessert.[157] Als polymeres Backbone wurden deshalb die bereits medizinisch eingesetzte Hydro-

xyethylstärke (130/0.4) der 3. Generation, sowie die gut verträgliche Hyaluronsäure (M_W: 27.3 kDa) verwendet.

3.4 Modifizierung von Hydroxyethylstärke

Über die chemische Modifizierung von Hydroxyethylstärke wurde bisher nur wenig publiziert. *Besheer* et. al. modifizierten HES im Jahr 2007 mit Lauryl-, Palmin- und Stearinsäure mit DCC/DMAP und zeigten die Bildung von Mizellen und polymeren Vesikeln.[158] Im Jahr 2009 berichteten sie zudem über die Konjugation von Transglutaminase und konnten dadurch bioabbaubare Polymer-Wirkstoff- und Polymer-Protein-Konjugate synthetisieren. Dies stellt eine Alternative zur PEGylierung dar.[159] 2011 wurde HES mit Diethylentriaminpentaessigsäure gekuppelt und Gadolinium chelatisiert, wodurch ein makromolekulares Kontrastmittel erhalten werden konnte.[160] *Noga* et al. zeigten den Einsatz von HES zur Abschirmung sowie zur enzymatisch kontrollierten Entschirmung von DNA-Polyplexen.[161]

Die hier verwendete HES besaß eine molare Masse von 130 kDa und einen molaren Substitutionsgrad von 0.4. Das C_2/C_6 Verhältnis betrug 9:1, was bedeutet, dass Hydroxyethylgruppen 9-mal häufiger an C_2 als an C_6 substituiert wurden. Um die verwendete HES mit einen CD-Derivat über Click-Chemie zu konjugieren, musste zunächst noch eine Alkin-Gruppe eingeführt werden. In der Veröffentlichung von *Nielsen* et al [76] stellte sich heraus, dass die Funktionalisierung von Dextran mit Glycidylpropargylether (GPE) die besten Ergebnisse erzielte, da die gebildete Etherbrücke stabiler gegenüber Hydrolyse ist als die Esterverbindung. Aus diesem Grunde wurde zur Modifizierung der HES ebenfalls GPE gewählt. Ein weiterer Vorteil von der Verwendung von GPE ist der Erhalt der Menge an Hydroxylgruppen, da bei der Veretherung der HES-Hydroxylgruppe mit GPE eine neue entsteht. So kann die gute Wasserlöslichkeit von HES erhalten bleiben. Bei der Synthese handelt es sich um eine einfache Epoxidöffnung des GPE in 0.1 M NaOH (**Schem 21**).



Schema 21: Modifizierung von Hydroxyethylstärke mit Glycidylpropargylether

Tabelle 3: Zusammenfassung der durch Variation der Reaktionsbedingungen erhaltenen molaren Substitutionsgraden pro Glucose-Einheit

	MS (24 h)	**MS (72 h)**
0.1 M NaOH	0.5	0.6
0.75 M NaOH	0.4	0.4

Es stellte sich heraus, dass bei dieser Konzentration an NaOH höhere Substitutionsgrade erreicht werden können als bei einer höheren Konzentration von 0.75 M. Es wäre zu erwarten, dass in der 0.75 M NaOH mehr OH-Gruppen der HES deprotoniert vorliegen und daher die Nukleophilie erhöht wird, wodurch höhere Substitutionsgrade in kürzerer Zeit erreicht werden sollten. Aus **Tabelle 3** wird ersichtlich, dass dies für die durchgeführten Versuche nicht der Fall war. Die Reaktionen in 0.75 M NaOH führten unabhängig von der Reaktionsdauer zu einem Substitutionsgrad von 40%. Dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass GPE zum Teil hydrolysiert wurde. Dies würde auch erklären, warum eine verlängerte Reaktionsdauer in diesem Falle zu keiner Umsatzsteigerung führte. Da Polyglucane nur einen geringen pK_s-Wert von etwa 12 besitzen, findet eine Deprotonierung auch bei geringerer Basenkonzentration statt, so dass die 0.1 M NaOH dafür ausreichte. Durch Fällen des Reaktionsgemisches aus 2-Propanol kann schließlich ungebundener GPE entfernt werden. Um jedoch alle GPE- wie auch Lösemittelreste vollständig zu entfernen wurde zusätzlich ultrafiltriert. Die Produktanalyse erfolgte mittels ^{1}H-NMR (**Abb. 7**) und IR.

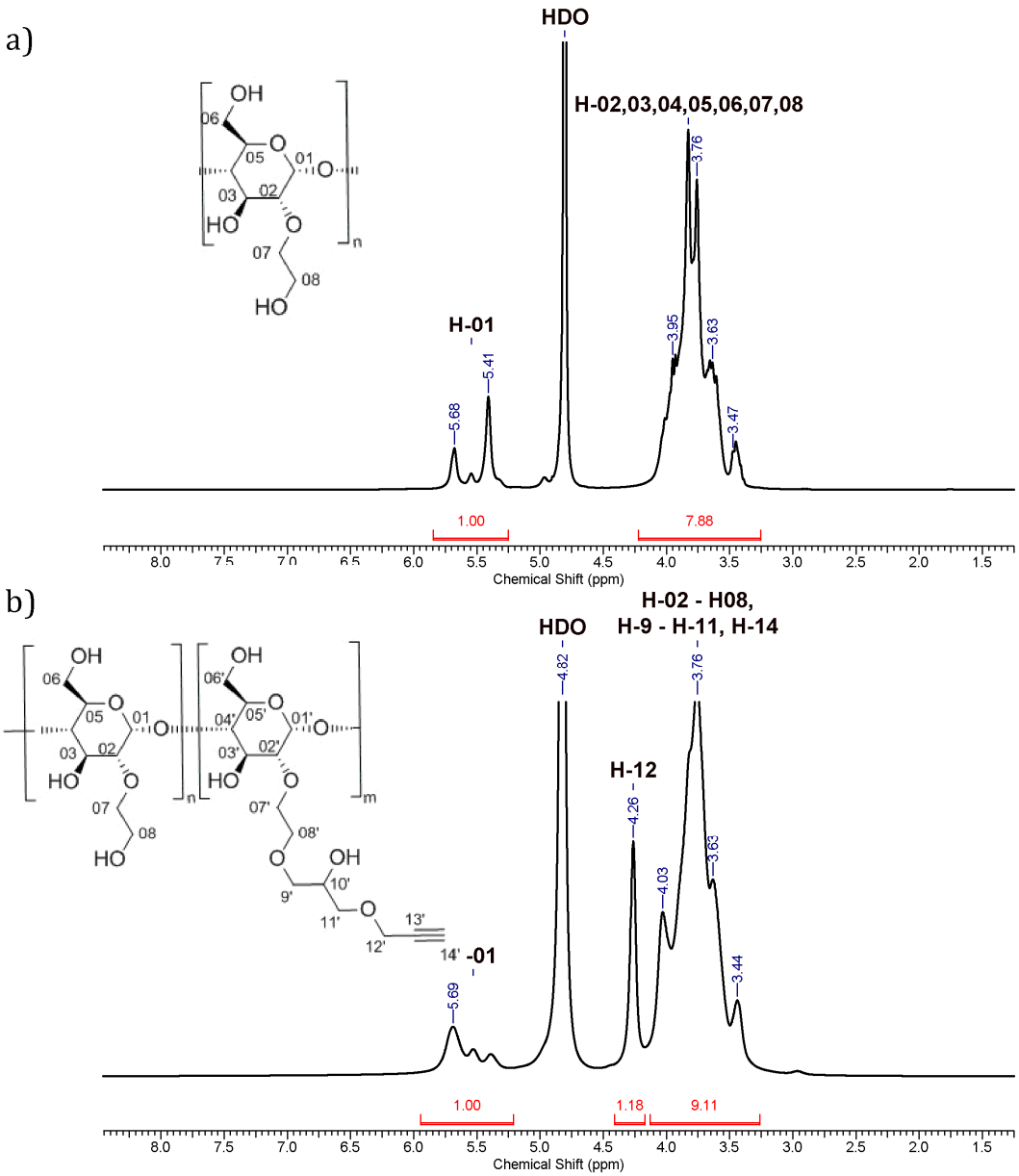


Abb. 7: ^{1}H-NMR-Vergleich von a) HES mit b) mod. HES **4**

Der Substitutionsgrad wurde durch Vergleich der Integrationen des anomeren Protons (5.73-5.41 ppm) der HES mit der CH_2-Gruppe vom Propargylrestes (H-12) des GPE (4.27 ppm) aus dem NMR-Spektrum ermittelt. Das anomere Proton der Stärke (5.69 ppm) wurde bei der Integration auf 1 gesetzt, sodass aus dem Integral des Signals der CH_2 – Gruppe des Linkers der Substitutionsgrad gemäß **Gleichung 8** berechnet werden kann.

$$DS = \frac{\frac{\int CH_2}{2}}{\int \text{anomeres H}} = \frac{\frac{1.18}{2}}{1} = 0.6 \qquad (8)$$

In **Tabelle 4** werden die DS-Werte, die durch Variation der Äq an GPE erzielt wurden, dargestellt. Durch die Zugabe von 2 Äq kann ein DS von fast 1 erreicht werden.

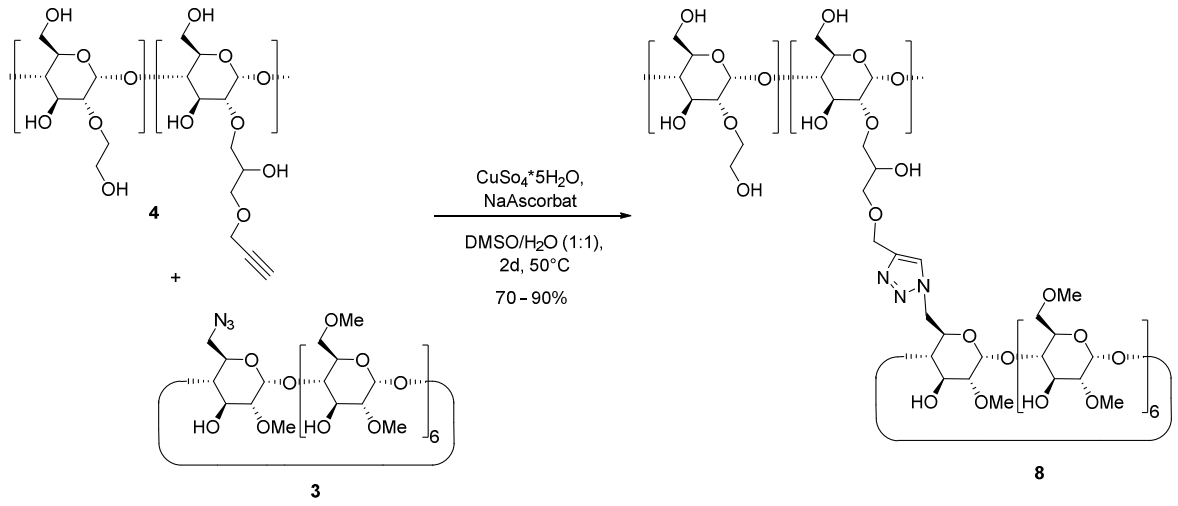
Tabelle 4: Übersicht der mit unterschiedlichem Substituionsgrad modifizierten HES

Derivat	Äq GPE	DS
4a	0.5	0.15
4b	0.85	0.3
4c	1	0.4
4d	2*0.5	0.53
4	2*0.85	0.6
4e	2*0.9	0.75
4f	2*1.0	0.9

Aus dem NMR-Spektrum (**Abb. 7**) wird zudem ersichtlich, dass die Modifizierung hauptsächlich an der unsubstituierten Glucoseeinheit an der Hydroxylgruppe in Position 2 stattfindet.[83] Dies wird durch das Verschwinden des Signals bei 5.4 ppm, das der unsubstituierten Wiederholeinheit zugeordnet werden kann, deutlich.

Auch im IR-Spektrum kann durch das Auftauchen der C≡C-Schwingung bei 2113 cm^{-1} das Produkt identifiziert werden (**Abb. 9**).

Aufgrund der guten Löslichkeit der propargylierten HES als auch die mit einer Monoazidgruppe funktionalisierten CDs in Wasser, wurde die CuAAC in einem DMSO/Wasser-Gemisch (1:1) durchgeführt (**Schema 22)**.



Schema 22: Synthese von HES-CD-Konjugat **8** aus 3 und **4** über „Click“-Chemie

NaAsc dient als Reduktionsmittel um Kupfer in der Oxidationsstufe I zu stabilisieren. Zudem wurde das Lösungsmittel vor Verwendung eine halbe Stunde mit Helium entgast, um gelösten Sauerstoff zu verdrängen. Die Stabilisierung des Kupfers ist sehr wichtig, um eine Kupplung der Alkin-Gruppen miteinander, beispielsweis durch Glaser-Kupplung, zu verhindern. Diese könnte nämlich zu einer Quervernetzung der Polymerketten führen, was eine Verschlechterung der Löslichkeit der Polymere zur Folge hätte. Zudem würde eine Ankupplung von CDs, sowie ein späterer Einschluss einer lipophilen Gastverbindung erschwert werden.

Auch hier erfolgte die Aufreinigung über Ultrafiltration. Durch die Durchführung von Dünnschichtchromatographie-Versuchen (DC) konnte sichergestellt werden, dass das Kupplungsprodukt frei von ungebundenem CD war. Es wurden sowohl das native Monoazid **2** als auch die methylierten Varianten **3** und **3a** an HES angekuppelt, im Folgenden wird aber nur das methylierte Kupplungsprodukt **8** (Kupplung von **3** und **4**) detaillierter vorgestellt. Die erfolgte Kupplung lässt sich im in ^{1}H-NMR Spektrum in D_2O durch Auftauchen des Triazol-H-Signals bei 8.06 ppm zeigen, hier im Vergleich mit den beiden Edukt-Spektren des methylierten Monoazids **3** und der modifizierten HES **4** (**Abb. 8**).

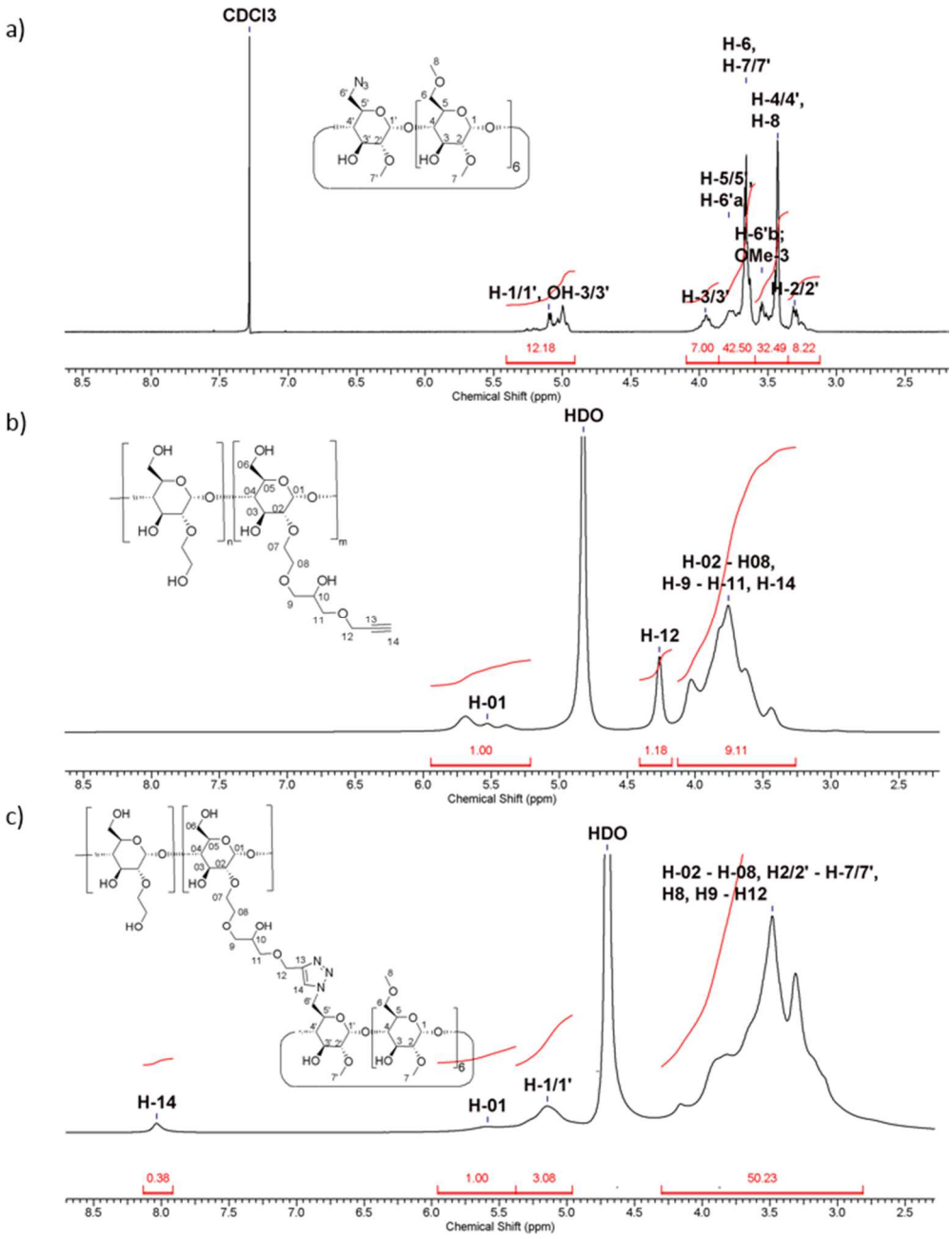


Abb. 8: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren von a) **3**, b) **4**, c) **8**

Das Integral des Signals des anomeren Protons der HES (H-01/01‘) bei 5.53 ppm wurde wie zuvor auf 1 gesetzt. Diesmal konnte der DS sowohl im Verhältnis zum anomeren Proton des CDs (1/1‘), als auch im Vergleich zum Triazol-H (H-14‘) des Linkers bestimmt werden. Das Triazol-Proton erfährt durch seine elektronenziehende Umgebung eine sehr hohe chemische Verschiebung, sodass es im NMR nicht mit anderen chemischen Verschiebungen der Wasserstoffatome des Moleküls überlappt. Deshalb kann die Integration des Triazol-Protons eindeutig bestimmt

werden. In dieser Reaktion wurde ein DS von knapp 0.4 erzielt. Die erfolgreiche Umsetzung wird auch im IR sichtbar (**Abb. 9**).

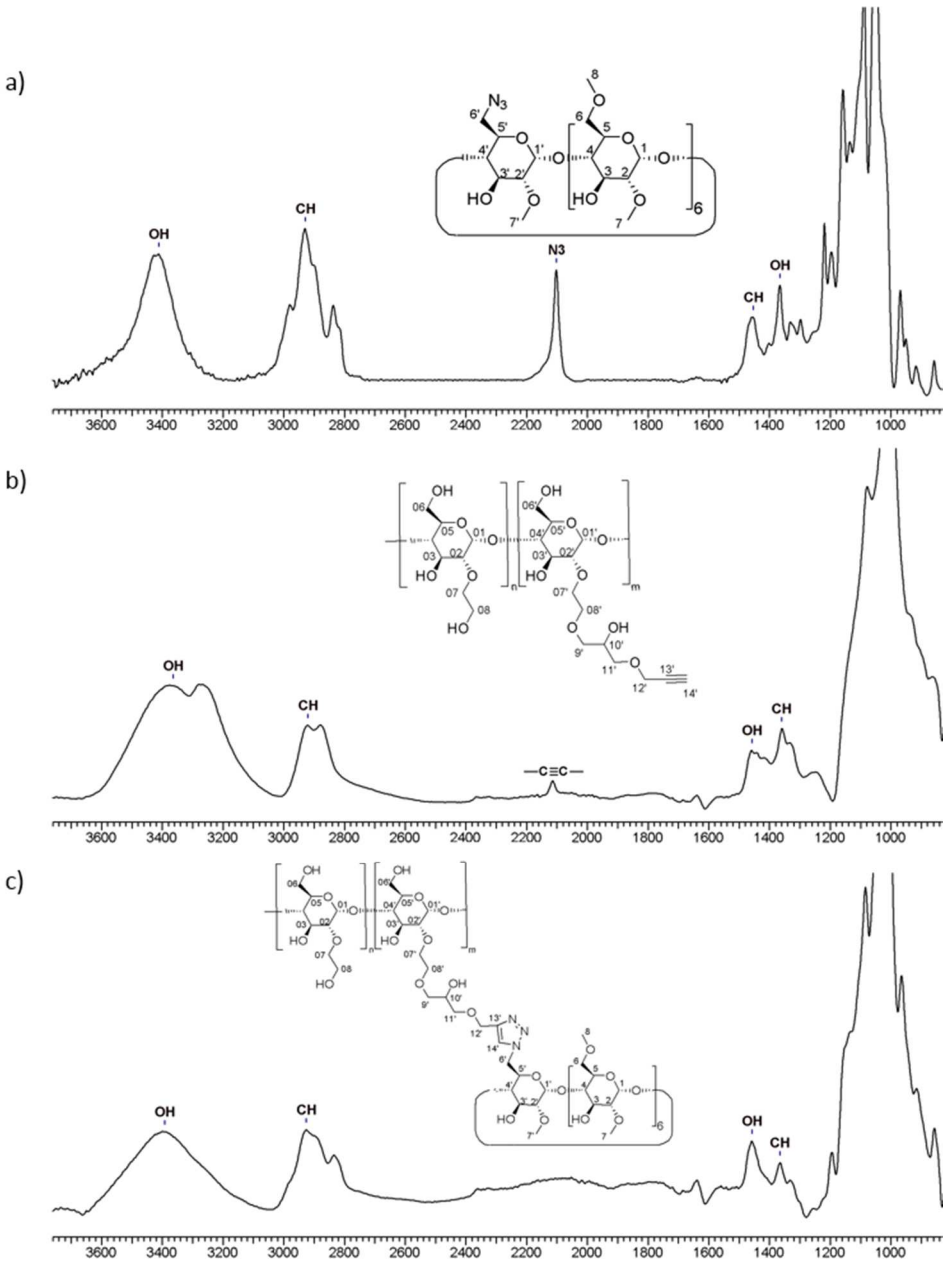


Abb. 9: IR-Spektren von a) **3**, b) **4**, c) **8**

Im Produktspektrum ist keine Azid-Schwingungsbande mehr zu beobachten. Dadurch kann bestätigt werden, dass das Produkt frei von ungebundenem CD ist. Das Konjugat **8** aus modifizierter HES **4** und methyliertem Monoazid **3** konnte somit vollständig charakterisiert werden. Die Umsetzung erfolgte mit einer Ausbeute von 90%.

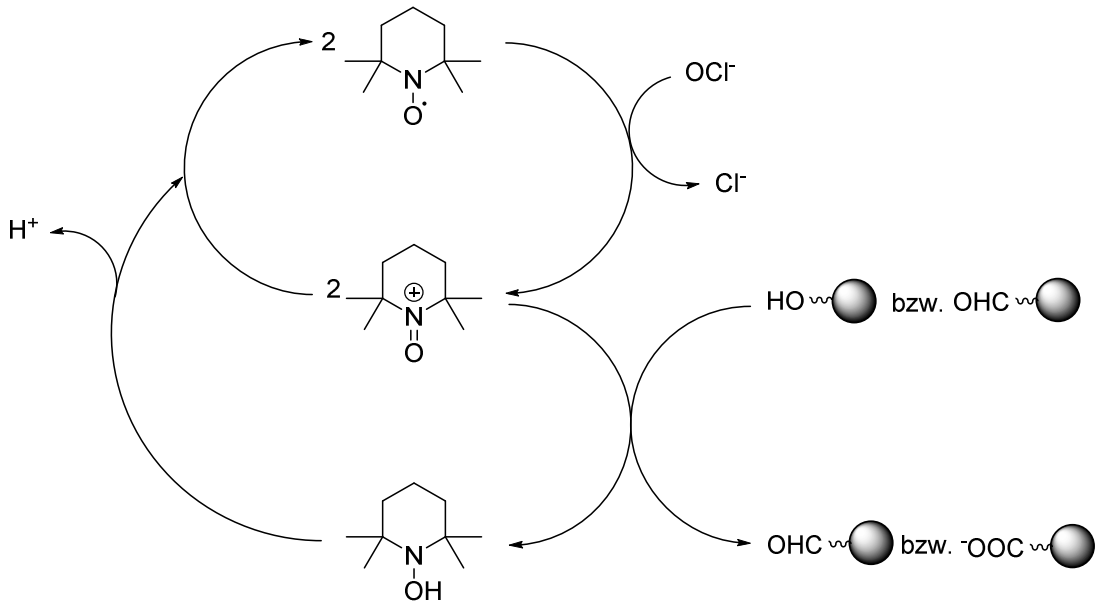
Bei Ankupplung des nativen Monoazids **2** an die modifizierte HES **4** konnte auch in mehreren Versuchen mit ähnlichen Äquivalenten wie zur Herstellung von Konjugat **8** lediglich ein DS-Wert von etwa 0.1 erzielt werden. Scheinbar spielt im Falle des hydrophilen Derivates die sterische Hinderung und die direkte Fixierung der Azid-Gruppe an der Glucose eine größere Rolle, als bei der methylierten Variante. Eigentlich ist davon auszugehen, dass die Methylgruppen in 6-Position die Kupplung stören würden. Ihre Anordnung hat jedoch keinen negativen Einfluss auf die Reaktion der Azid- mit der Alkingruppe. Im Gegenteil, die Ankupplung der methylierten Derivate führte durchweg zu einem höheren Kupplungsgrad als im Falle des nativen Derivates **2.** Die Ankupplung des heterogener methylierten Monoazids **3a** an die HES **4** zum Produkt **8a** erfolgte analog mit vergleichbarem Substitutionsgrad (0.35) und Ausbeute (96%).

Alle hergestellten Verbindungen sind sehr gut wasserlöslich. Es ist zwar möglich, durch Methylierung das Spektrum an Einschlussverbindungen zu erweitern, jedoch bringen amphiphile CD-Derivate, wie es die Methylierten darstellen, einen Nachteil mit sich. So besitzen amphiphile CDs eine **LCST** (lower critical solution temperatur). Oberhalb dieser Temperatur sind die Derivate nicht mehr in dem Lösungsmittel löslich und fallen aus. Dieses Verhalten ist typisch für alkylierte, neutrale Polysaccharide und ist auf eine erhöhte Wechselwirkung hydrophober Gruppen mit steigender Temperatur zurückzuführen.[162] Dies ist aber vor allem für medizinisch-pharmazeutische Anwendungen nicht wünschenswert. Liegt die LCST von ungebundenem DIMEβ noch über dem Siedepunkt von Wasser, so sinkt sie durch Ankupplung an die HES auf etwa 40°C ab. Dies kann durch die räumliche Nähe der nun am Polymer fixierten CDs erklärt werden, die nun leichter agglomerieren können und somit ausfallen.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden ionische Gruppen an der HES eingeführt, um eine Abstoßung der Ketten und CDs untereinander zu erzielen. Dazu musste eine Oxidation der nativen HES durchgeführt werden. Um Carbonyl- sowie Carboxylgruppen in Polysacchariden einzuführen, werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten beschrieben. Zur Modifikation stehen die Hydroxylgruppen an C2, C3 und C6 zur Verfügung. Die Oxidation der sekundären Hydroxylgruppen wird durch Oxidationsmittel wie Periodat oder Hypochlorit erreicht, was eine

Spaltung unter Entstehung von Diolen zur Folge hat. Um die primäre Hydroxylgruppe selektiv zu oxidieren, gibt es im Fall der Stärke die Möglichkeiten, dies unter Verwendung von Nitriersäure, Stickstoffdioxid oder Wasserstoffperoxid zu erzielen.[163]

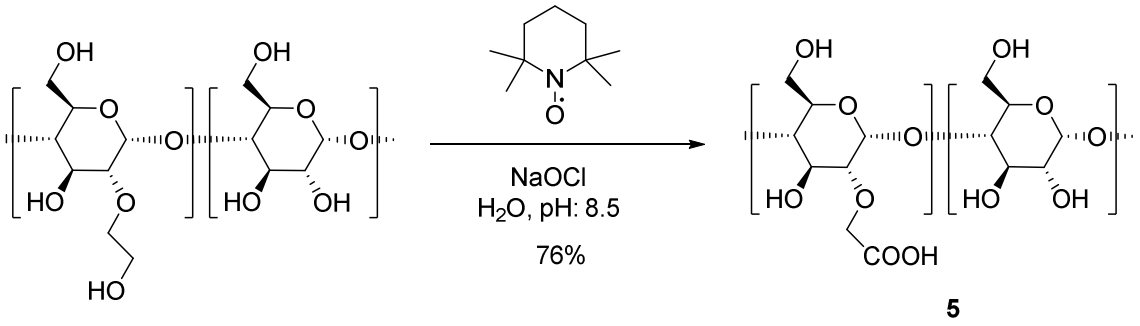
Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung katalytischer Mengen an TEMPO (2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl), ein stabilisiertes Nitroxylradikal, und Natriumhypochlorit, die die primäre Hydroxylgruppe der Glucoseeinheit zur entsprechenden Glucuronsäure oxidieren. Weitere Vorteile dieses Reagenzes sind die hohe Reaktionsrate, hohe Ausbeuten, sowie die hohe Selektivität. Zudem kommt es nur zu einem geringen Abbau des Polysaccharides während der Oxidation.[164]In dieser Arbeit wurde die Kombination von TEMPO und NaOCl zur Oxidation verwendet. In **Schema 23** ist der Mechanismus der Oxidation mit TEMPO und NaOCl als Cooxidans dargestellt.



Schema 23: Mechanismus der TEMPO-Oxidation

Mit Hilfe von Natriumhypochlorit wird der eigentliche Katalysator, nämlich das Nitrosylkation, gebildet, das zuerst den Alkohol zum Aldehyd und schließlich in einem weiteren Schritt zum Carboxylat oxidiert. Das Nitrosylkation wird dabei zum Hydroxylamin reduziert, welches mit einem weiteren Äquivalent Nitrosylkation zum TEMPO-Radikal wieder konproportioniert (**Schema 23**).[163,165]

Zur Reaktion wurde die HES in Wasser gelöst. Danach wurde TEMPO und über zwei Stunden verteilt Natriumhypochlorit zugegeben, während der pH auf 8.5 gehalten wurde (**Schema 24**). Da nicht alle Aldehydgruppen zur Carbonsäure oxidiert werden, wurde nach erfolgter Reaktion Natriumborhydrid zugegeben, um die vorhanden Aldehydgruppen zum Alkohol zu reduzieren.



Schema 24: TEMPO-Oxidation der HES

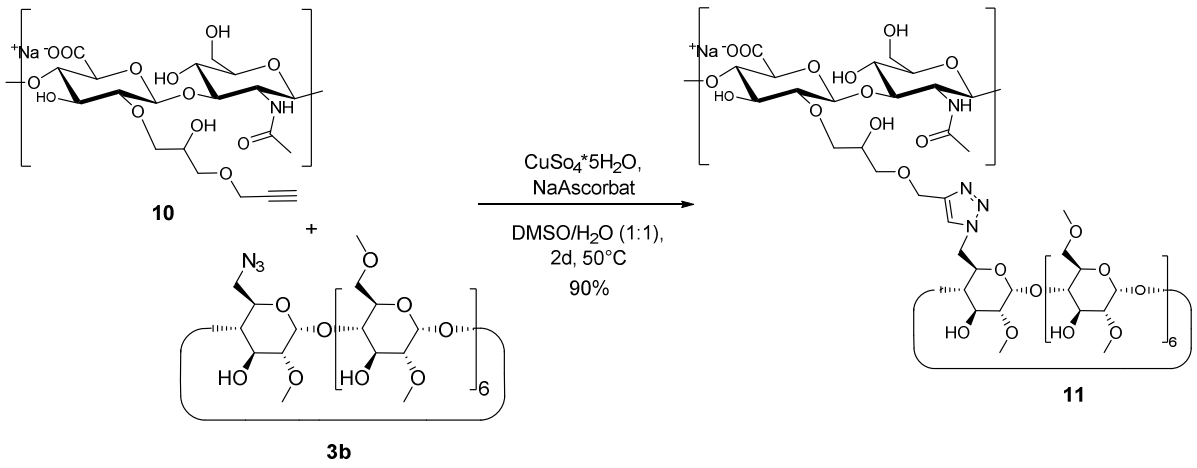
Erreicht man bei der TEMPO-Oxidation von reiner Stärke einen Substitutionsgrad von bis zu 70%[166] bei einer Zugabe von 4 Äq NaOCl, so erzielt man bei der Oxidation von HES lediglich einen DS-Wert von 30%, unabhängig davon, wie viel Äquivalente an NaOCl hinzugegeben werden (mind. 2). Auch eine Erhöhung der Menge an TEMPO führt zu keiner Erhöhung an Carboxylgruppen. Ein möglicher Grund für den geringen Substitutionsgrad stellen die primären Hydroxylgruppen des Hydroxyethylrests dar, die mit dem intermediär gebildeten Aldehyd ein Vollacetal ausbilden können. Dadurch ist der Aldehyd für einen weiteren Oxidationsschritt nicht mehr zugänglich.

Der Gehalt an Carboxylgruppen wurde photometrisch mit dem Blumenkrantz-Assay bestimmt.[167] Dabei werden Uronsäuren mit Hilfe von m-Hydroxybiphenyl-Lösung und Tetraborat-Lösung nachgewiesen. Die Uronsäuren bilden mit der m-Hydroxybiphenyl-Lösung pinkfarbene Komplexe aus. Durch die Bestimmung der Extinktion bei 523 nm kann der DS-Wert bestimmt werden. Der ermittelte Carboxylatgehalt in der oxidierten Stärke entspricht dem Substitutionsgrad und liegt bei dieser Reaktion bei 0.27.

Die weitere Modifizierung der oxidierten HES **5** und Ankupplung des methylierten CD-Derivates erfolgte analog über die Modifizierung mit Glycidylpropargylether

zu Verbindung **6** (DS=0.55). Auch diese Verbindung wurde mittels Click-Chemie mit dem methylierten Monoazid **3** zu dem Kupplungsprodukt **9** mit einer Ausbeute von 95% umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte auch hier wieder mittels Ultrafiltration, die Kontrolle der Reinheit über DC. In dieser Reaktion konnte ein Substitutionsgrad von 0.45 erzielt werden.

Zusätzlich wurde ein methyliertes Monoazid **3b** (DS: 2.7) auch an Hyaluronsäure (HA) über CuAAC gebunden. Da HA von Natur aus eine Carboxylfunktionalisierung besitzt, musste keine zusätzliche Oxidation durchgeführt werden, um die LCST Temperatur zu erhöhen oder vollständig aufzuheben. Dazu erfolgte ebenfalls eine Modifikation der Hydroxylgruppen der HA mit Glycidylpropargylether zu Verbindung **10** mit einem DS von 0.5 und einer Ausbeute von 80%. Die CuAAC wurde unter denselben Bedingungen wie bei den HES-CD-Konjugaten (Verbindungen **8**, **8a** und **9**) durchgeführt (**Schema 25**). Das Kupplungsprodukt **11** wurde mit einem DS von 0.45 und einer Ausbeute von 90% erhalten.

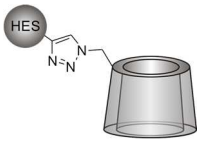
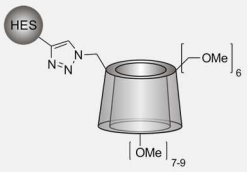
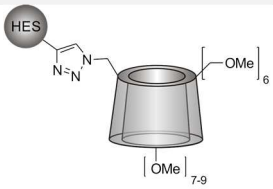
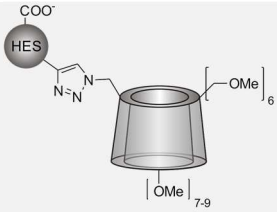
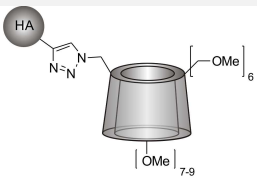


Schema 25: Synthese von HES-CD-Konjugat **11** aus **3b** und **10** über „Click"-Chemie

Die Umsetzung wurde auch hier wieder über ^{1}H-NMR und IR, sowie DC-Kontrolle bestätigt. Anzumerken ist, dass in dieser Reaktion ein methyliertes CD-Derivat mit einem DS von 2.7 verwendet wurde. Der höhere DS-Wert wirkt sich, wie später vorgestellt wird, auch auf die Komplexierung aus.

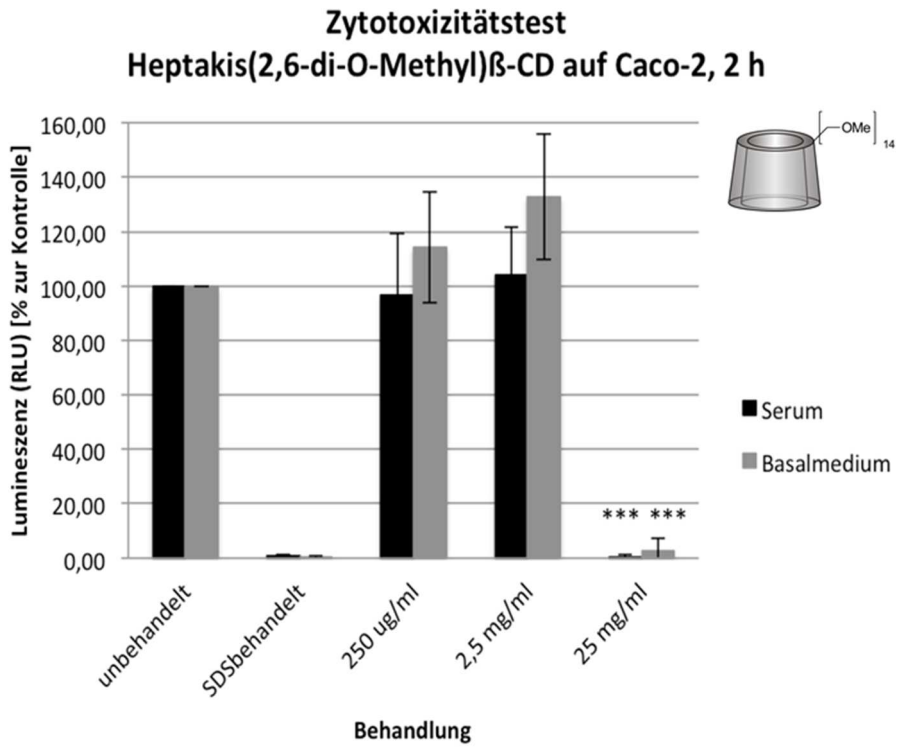
Wie aus der **Tabelle 5** ersichtlich ist, führt die Einführung von ionischen Gruppen zur Aufhebung der LCST und es kann kein Ausfallen unterhalb des Siedepunktes von Wasser beobachtet werden.

Tabelle 5: Übersicht der über „Click"-Chemie synthetisierten CD-Polymere und ihr LCST-Verhalten

Derivat	Struktur	DS_{CD}(Me)	DS_{Poly}(CD)	Ausbeute [%]	M_{CD} [Da]	LCST [°C]
7		0	0.1	70	3410	T>100°C
8		2.2	0.35	90	1985	52.5
8a		2.3	0.4	94	2054	84.5
9		2.3	0.45	95	1940	T>100°C
11		2.7	0.45	90	2523	T>100°C

3.5 Zytotoxische Untersuchungen

Um zu überprüfen, ob eine Anbindung der methylierten CDs an Polymere zu einer Verringerung des toxischen Potentials führt, wurde am Universitätsklinikum Würzburg ein auf ATP basierender CellTiter-Glo® Assay 51 an der humanen Darmkrebszelllinie Caco-2 sowohl mit kommerziell erwerblichem **DIMEβ-CD** von Sigma-Aldrich als auch dem synthetisierten Konjugat **8** aus methylierten Monoazid **3** und modifizierter HES **4** durchgeführt. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe (0.25 – 25 mg/mL) in Medium angesetzt und für 2 h bzw. 24 h inkubiert (**Abb. 10** und **Abb. 11**). Die getesteten Konzentrationen orientierten sich dabei an den experimentell ermittelten Füllgraden (w%) der beiden Anästhetika Sevofluran und Midazolam (beide <10 w%), sowie deren klinisch eingesetzten Plasmakonzentrationen. Die Testung erfolgte im relevanten Konzentrationsbereich, was bedeutet, das auch Konzentrationen, die 10x niedriger bzw. 10x höher als die klinisch relevante Konzentration sind, getestet wurden.[168]



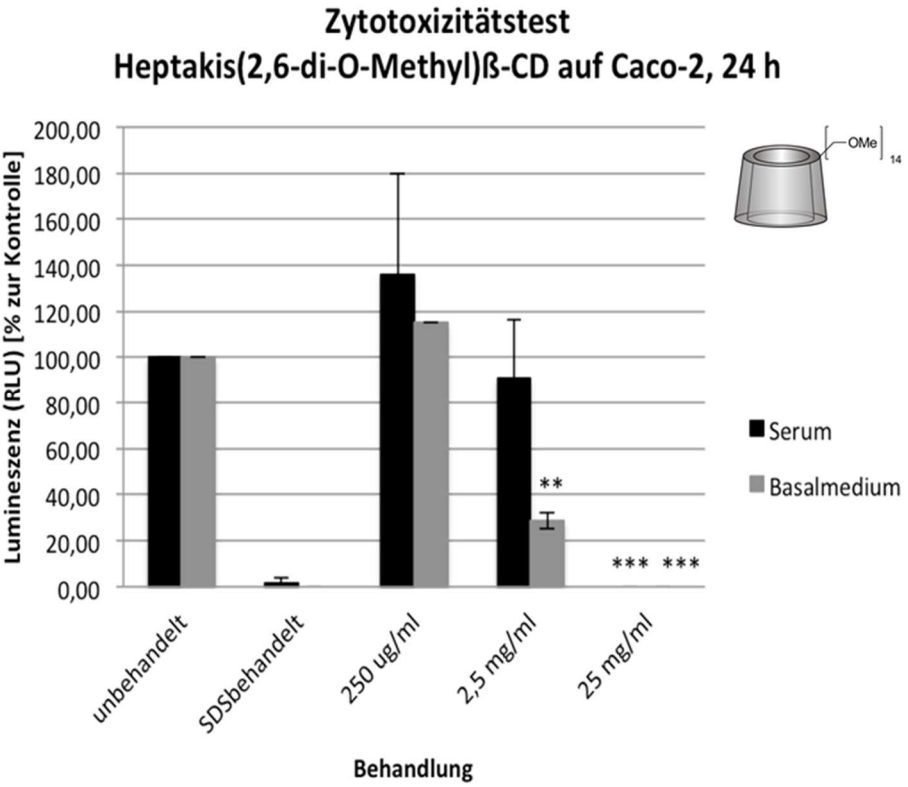


Abb. 10: Zytotoxizitätstest von DIMEβCD

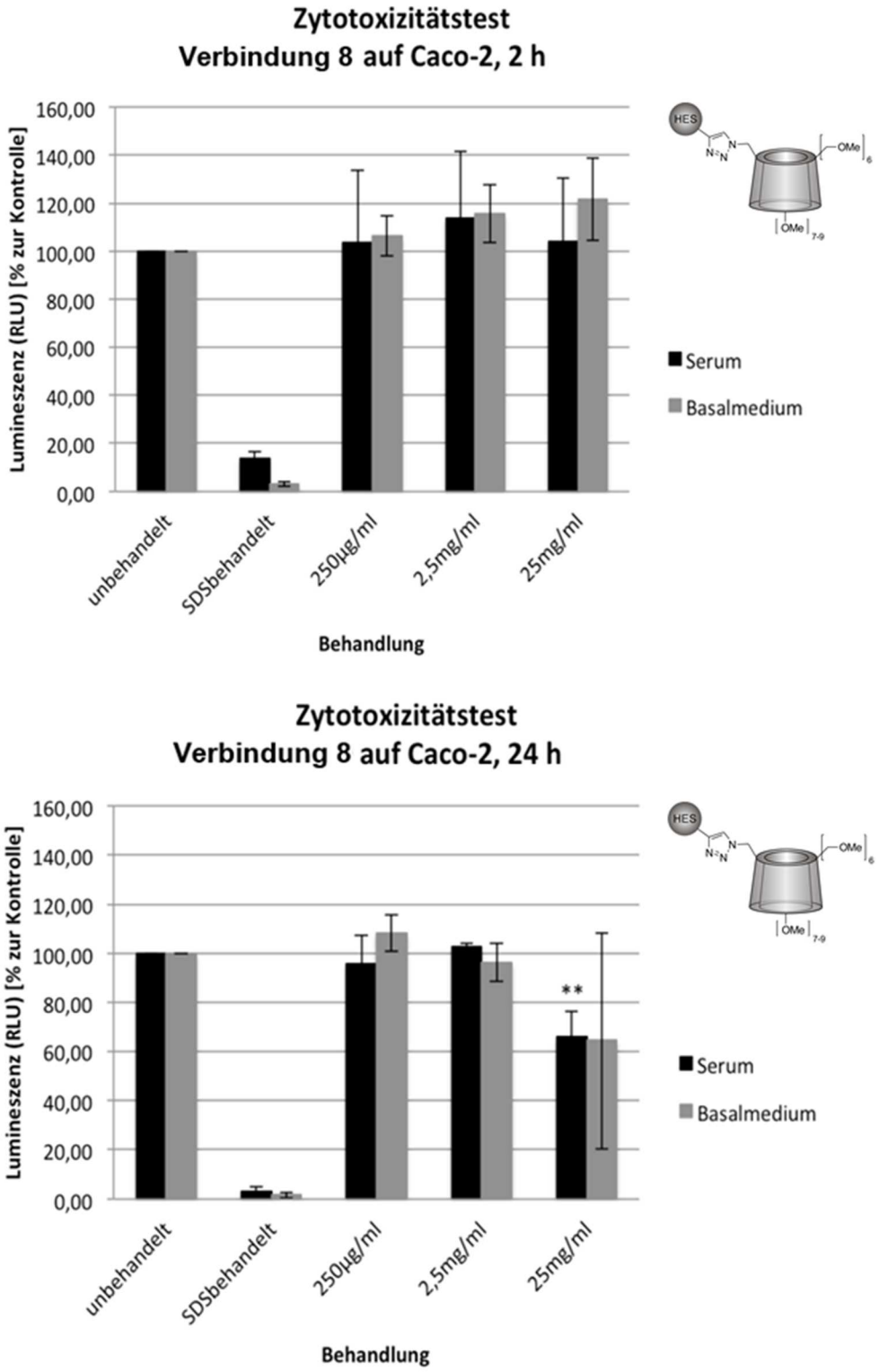


Abb. 11: Zytotoxizitätstest von HES-CD-Konjugat **8**

Nach Behandlung der Zellen konnte kein toxischer Effekt bei allen getesteten Konzentrationen im Falle des CD-Polymers **8** nach 2 h Inkubation beobachtet werden. Im Falle von **DIMEβ-CD** wurde bei einer Konzentration von 25 mg/mL

eine 10-fach erhöhte Toxizität festgestellt werden. Nach 24 h Inkubation zeigt auch das Polymer **3** ein leicht toxisches Potential, während **DIMEβ-CD** schon bei klinisch relevanten Konzentration hoch toxisch wirkt.

3.6 Zusammenfassung

Die Ankupplung von CD-Derivaten an die Hydroxyethylstärke über CuAAC stellt eine effiziente Methode dar, um polymere Wirtmoleküle für die Solubilisierung von Wirkstoffen herzustellen. In diesem Kapitel konnten hydrophile und methylierte CD-Derivate kovalent an Polysaccharide gebunden und mittels NMR, IR und MS charakterisiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Fixierung von methylierten CD-Derivaten an ein Polysaccharid deren toxisches Potential stark verringert. Durch Einführung von ionischen Gruppen oder durch Verwendung des Polyelektrolyten Hyaluronsäure kann eine LCST bei physiologisch relevanten Bedingungen verhindert werden. Dadurch können die polymeren Cyclodextrinverbindungen sowohl für die orale als auch die parenterale Applikation von Wirkstoffen Verwendung finden.

4 Anknüpfung von β-CD-Derivaten an Polysaccharide über CDMT-Kupplung

Die vorgestellte CuAAC als Konjugationsverfahren von Cyclodextrinen und Polymeren ist nur eine mögliche Kupplungsmethode. Die zur Vermeidung des LCST-Verhalten der methylierten CD-HES-Konjugate eingeführten ionischen Carboxylatgruppen eignen sich zusätzlich als funktionelle Gruppe, die mit modifizierten CD-Derivaten umgesetzt werden kann. Auch die bereits verwendete Hyaluronsäure muss für eine Konjugation nicht zusätzlich modifiziert werden. Als Kupplungspartner eignen sich beispielsweise aminofunktionalisierte CDs, wodurch bei einer Konjugation eine Amidbindung gebildet wird.

4.1 Amidkupplung mit CDMT

Die Konjugation von Carboxylgruppen und Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung erfolgt in zwei Schritten. Da die Reaktion der beiden funktionellen Gruppen nicht spontan bei Raumtemperatur verläuft, da dabei die notwendige Eliminierung von Wasser nicht stattfindet, sind hohe Temperaturen (>200°C) notwendig. Aus diesem Grunde wird die Carbonsäure durch Umwandlung der Hydroxylgruppe in eine gute Abgangsgruppe aktiviert, bevor sie mit dem Amin reagiert. Zur Aktivierung können Kupplungsreagenzien eingesetzt werden, die die Carbonsäure beispielsweise zu den entsprechenden Säurechloriden, (gemischten) Anhydriden oder Aktivestern umwandeln.[169] Die ersten Kupplungsreagenzien stellten Carbodiimide wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) dar, die seit 1955 verwendet werden und mit der Carbonsäure einen *O*-Acylharnstoff als Intermediat bilden.[170] Dieser reagiert mit dem Amin zum entsprechenden Amid unter Ausbildung des unlöslichen Dicyclohexylharnstoffs als Nebenprodukt. Um die Umlagerung des *O*-Acylharnstoffs zum inaktiven *N*-Acylharnstoff zu verhindern, werden meist Additive wie N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) verwendet.[171,172] Weitere häufig verwendete Carbodiimide sind Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC).[173,174] Einige Kupplungsreagenzien ba-

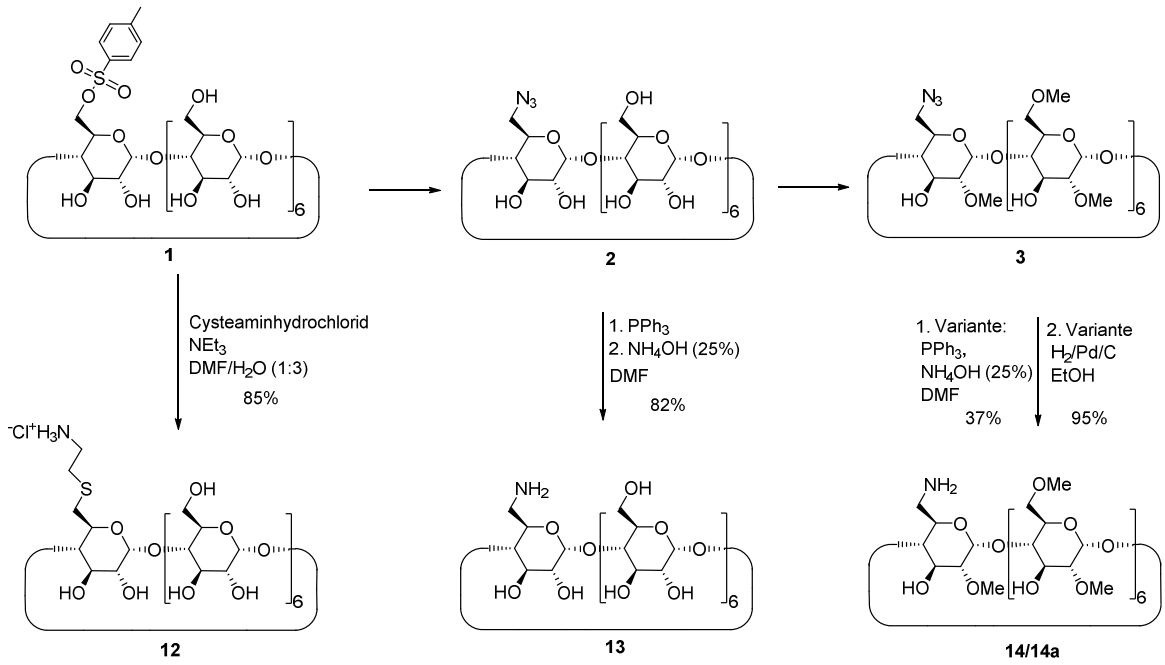
sieren auf HOBt/HOAt und Uronium/Iminiumsalzen wie *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU) oder *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU).[172,175] Diese Reagenzien reagieren mit der Carbonsäure zu OAt-/OBt-Aktivestern, die dann mit dem Amin weiter reagieren können. Als Nebenreaktion kann jedoch das Amin auch mit dem Kupplungsreagenz zu einem Guadinium reagieren. Werden stattdessen Phosphoniumsalze verwendet, entsteht dieses Nebenprodukt nicht. Das erste HOBt/HOAt Phosphoniumsalz stellte Benzotriazolyloxy-tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) dar.[176] Sein Einsatz als Kupplungsreagenz ist jedoch begrenzt, da während der Reaktion das Karzinogen Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) freigesetzt wird. Als Ersatz dient deshalb Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (ByBOP).[153,154]

Ein weiteres Kupplungsreagenz zur Herstellung von Estern oder Amiden stellt 2,2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) dar, das hinsichtlich Stabilität, milden Reaktionsbedingungen und dem Preis sehr interessant ist. Zudem finden keine Nebenreaktionen wie Acylwanderungen statt und es können hohe Substitutionsgrade erreicht werden. [179–181]

Zur Modifizierung der Hyaluronsäure wurde oft die Verwendung von EDC beschrieben, da die Reaktion in wässriger Lösung ablaufen kann.[182–184] Die Aktivierung der Carbonsäure erfolgte dabei bei einem pH von 4.75. Der nukleophile Angriff im zweiten Schritt durch das Amin ist jedoch effektiver bei einem basischeren pH, da dieses dann in deprotonierter Form vorliegt. Bei hohen pH-Werten hydrolysiert EDC jedoch schnell zu dem *N*-Acylharnstoff Nebenprodukt und ein Angriff des Amins kann nicht mehr erfolgen. So ist es schwer, ein pH-Optimum zu finden und eine Konjugation von Aminen mit einem hohen pK_S ist mit dieser Methode nur schwer möglich.[181] *Kuo* et al. beschrieben sogar, dass bei einem pH von 4.75 keine Bildung des Amids stattfindet, sondern nur der *N*-Acylharnstoff als Nebenprodukt erhalten wird.[185] 2007 beschrieb *Bergmann* die Modifizierung von HA mit CDMT als Aktivierungsreagenz unter neutralen Bedingungen in wässriger Lösung. Schon bei Verwendung eines halben Äquivalentes CDMT konnten sie Substitutionsgrade von bis zu 20% erreichen.[180]

4.2 Synthese der Cyclodextrin-Derivate

Um bei einer späteren Anknüpfung der CD-Derivate an die Polysaccharide eine inter- und intramolekulare Vernetzung zu vermeiden, ist es auch hier wichtig, monofunktionalisierte Amino-CD-Derivate herzustellen (Schema 26).



Schema 26: Synthese der monofunktionalisierten Amino-CD-Derivate **12**, **13** und **14/14a**

Ausgehend von Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)]-β-CD **1** wurde in einer S_N2 Reaktion mit Cysteaminhydrochlorid Mono-[6-deoxy-6-(2-amino-ethylsulfanyl)]-β-CD **12** mit einer Ausbeute von 85% hergestellt. Dazu wurde die Vorschrift von *Ekberg*[186] et al. verwendet, wobei anstatt Ammoniumhydrogencarbonat Triethylamin verwendet und die Reaktionsdauer von vier Stunden auf vier Tage für eine vollständige Umsetzung erhöht wurde. Da Hydrochloride bei pH 7 nicht stabil sind, wurde vor dem Fällen aus kaltem Aceton der pH auf 3 erniedrigt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Nanofiltration in Wasser gegen eine 500Da Cellulose-Membran. Zur Herstellung von Verbindung **13** wurde Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)]-β-CD **1** wie in Kapitel 3 beschrieben zum Mono-(6-deoxy-6-amino-)-β-CD **2** umgesetzt, welches schließlich in einer Staudinger Reaktion mit Triphenylphosphin zum Mono-(6-deoxy-6-amino-)-β-CD **13** in 82%iger Ausbeute reduziert wurde.[187] Die Reduktion des DIMEβ-Azids **3** zum methylierten Amin **14** wurde

mit zwei verschiedenen Methoden getestet. Die 1. Variante erfolgte wie beim nativen Derivat mit Hilfe der Staudinger Reaktion. Aufgrund der amphiphilen Natur des CDs ist ein Ausfällen aus Aceton oder einem anderen Fällungsmittel nicht möglich, so dass die Aufreinigung mittels Nanofiltration erfolgte. Die Aufreinigung mittels Nanofiltration gegen eine Cellulose-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 500Da führte jedoch zu einem hohen Produktverlust (Ausbeute: 37%). In einer 2. Variante wurde nach einer Vorschrift von *V.Pourcelle*[188] verfahren, wobei die Reduktion mithilfe einer katalytischen Hydrierung stattfindet. Der Vorteil der letzteren Variante ist die zügigere Aufreinigung, da der Katalysator einfach durch Abzentrifugieren abgetrennt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt werden kann. Zudem konnte bei dieser Variante eine deutlich höhere Ausbeute (95%) erzielt werden. Die vollständige Umsetzung des Azids zum Amin konnte durch IR- und MS-Messung nachgewiesen werden. Das IR zeigte ein Verschwinden der Azid-Bande bei 2102 cm^{-1} und das gleichzeitige Auftauchen der NH_2-Schwingungsbande bei 1653 cm^{-1}. Da es zu keiner Änderung der restlichen Schwingungsbanden kam, kann von einer vollständigen Umsetzung ausgegangen werden. In **Abb. 12** sind die Veränderungen der Banden in den IR-Spektren im Falle der methylierten Variante verdeutlicht.

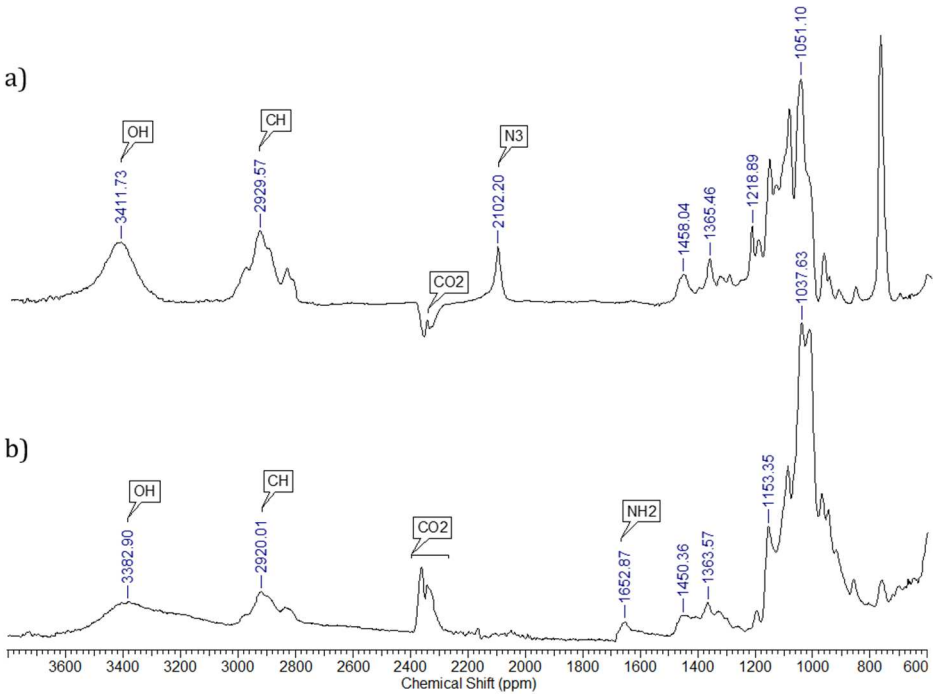
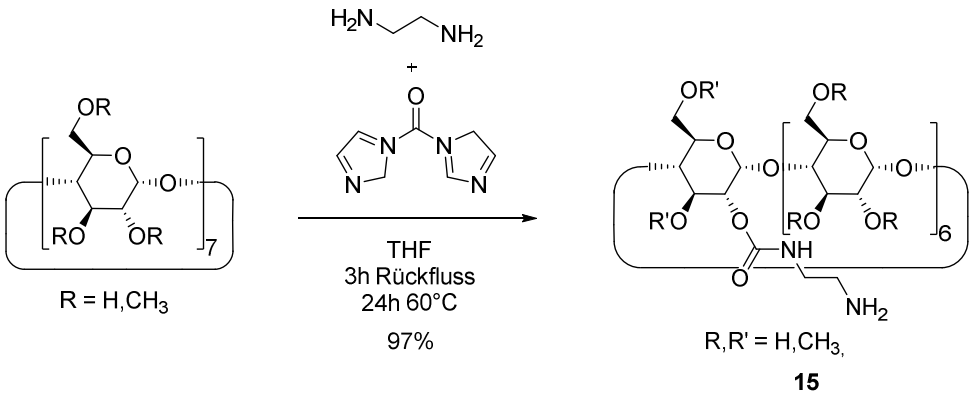


Abb. 12: Vergleich der IR-Spektren von a) methyliertem Monoazid **3** mit b) methyliertem Monoamin **14**

Auch die ESI-Massenspektren bestätigten die vollständige Umsetzung zu den aminofunktionalisierten Derivaten. Die m/z – Verhältnisse lagen bei dem nativen Monoamin **13** bei 1134.74 (mit H^+ als Gegenion) und bei dem methylierten Monoamin **14** zwischen 1338.74 – 1394.7 (mit Na^+ als Gegenion), was einer Anzahl an Methylgruppen zwischen 13 und 17 entspricht. Der intensivste Peak wurde bei dem methylierten Monoamin **14** mit insgesamt 14 Methylgruppen erhalten, sodass von einem mittleren DS von 2.1 ausgegangen wurde.

Da die Herstellung des amphiphilen Derivates doch sehr aufwändig ist und bezogen auf natives β-CD nur eine Gesamtausbeute von 12% erreicht werden konnte, wurde zusätzlich eine Aminofunktionalisierung an dem *randomly* methylierten β-CD durchgeführt. Dafür wurde Ethylendiamin mit CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol) an die freie Hydroxylgruppe des CDs gekuppelt (**Schema 27**). Da sich CDI in Wasser zersetzt, wurde die Reaktion in absolutiertem THF durchgeführt. Durch die amphiphile Natur des RAMEβCDs stellte THF als Lösungsmittel keine Probleme dar.



Schema 27: Synthese von (2-aminoethyl)-Carbamat-Methyl-β-CD **15**

Auch hier erfolgte die Produktkontrolle mit DC, NMR, IR und MS. Durch die statistische Methylierung fiel eine genaue Zuordnung mittels ^1H und ^{13}C-NMR jedoch sehr schwer. Da das anomere Proton schon zwei separierte Signale erzeugt, ist eine Zuordnung der übrigen Cyclodextrin Signale auch mit Hilfe von HHCOSY und HSQC nicht eindeutig möglich. Zudem überlappen die Signale der Methylgruppen die des CD-Backbones. Jedoch ist eine genaue Zuordnung der CH_2-Gruppen des Ethylendiamins möglich, die bei 3.26 und 2.77 ppm mit einer Integration zwischen 3.3 und 3.5 als breite Signale erscheinen. Die Verbreiterung ist ein Indiz für

die Ankupplung. Der DS kann aus dem NMR somit zu etwa 1.4 bestimmt werden, was einer leichten Übersubstitution entspricht.

Im ESI-MS (**Abb. 13**) wird sichtbar, dass neben der Monofunktionalisierung (m/z = 1390 $[M+H]^+$) auch eine Disubstitution (m/z = 1461 $[M+H]^+$) stattgefunden hat. Das Substitutionsmuster wird durch die unregelmäßige Methylierung vom **RAMEβCD** hervorgerufen.

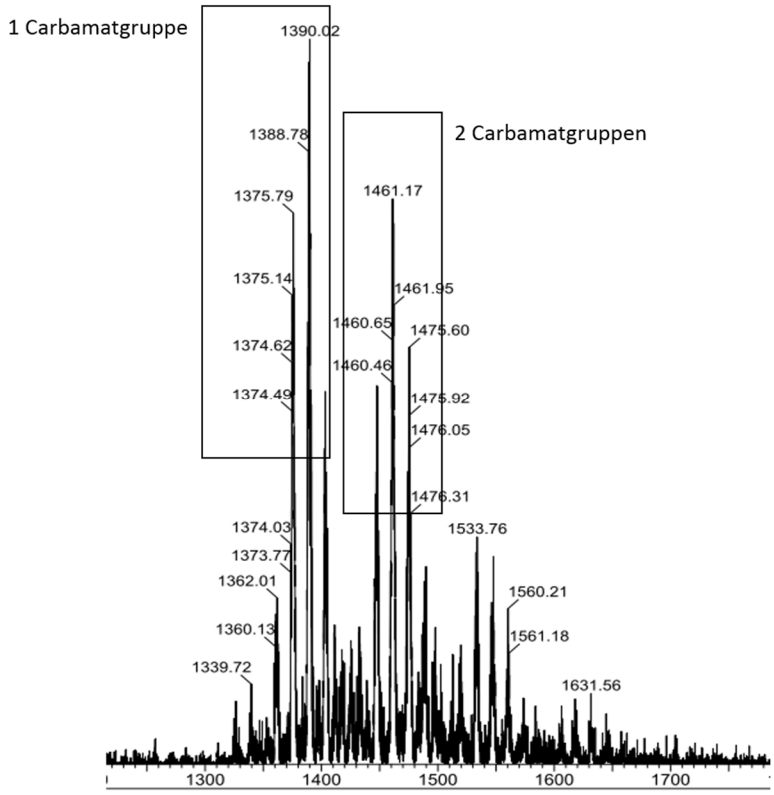
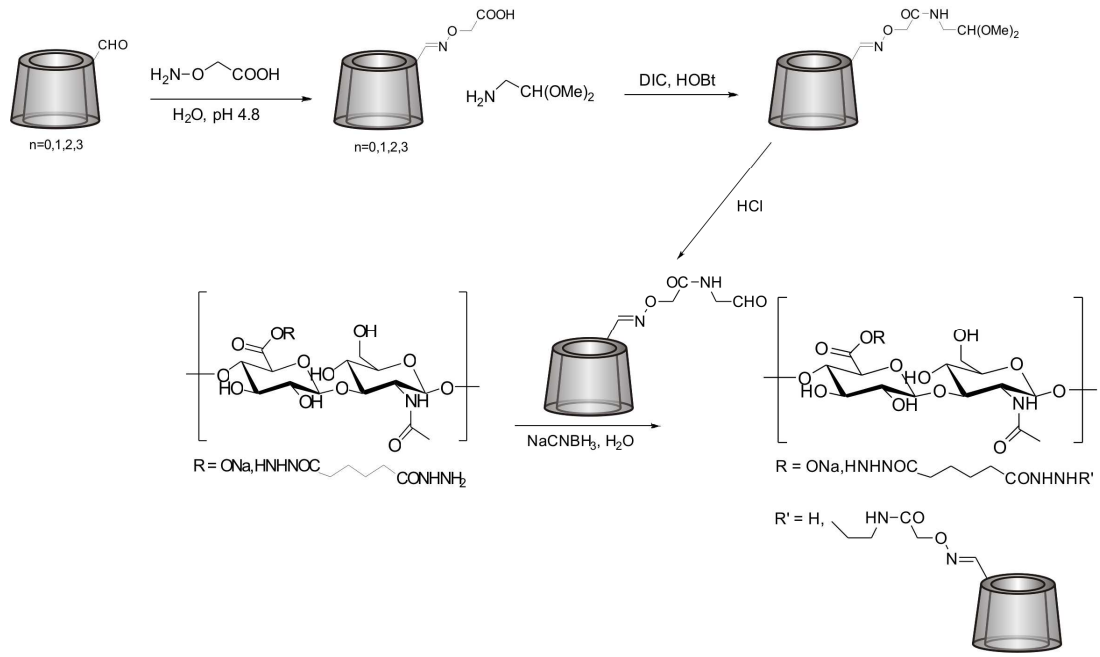


Abb. 13: ESI-MS von (2-aminoethyl)-Carbamat-Methyl-β-CD **15**

Es konnten somit vier aminofunktionalisierte hydrophile wie auch methylierte CD-Derivate synthetisiert werden, die über eine Amidbindung an die beiden Polysaccharide HA und HES angekuppelt werden können.

4.3 CDMT-Kupplung der Cyclodextrin-Derivate an Hyaluronsäure

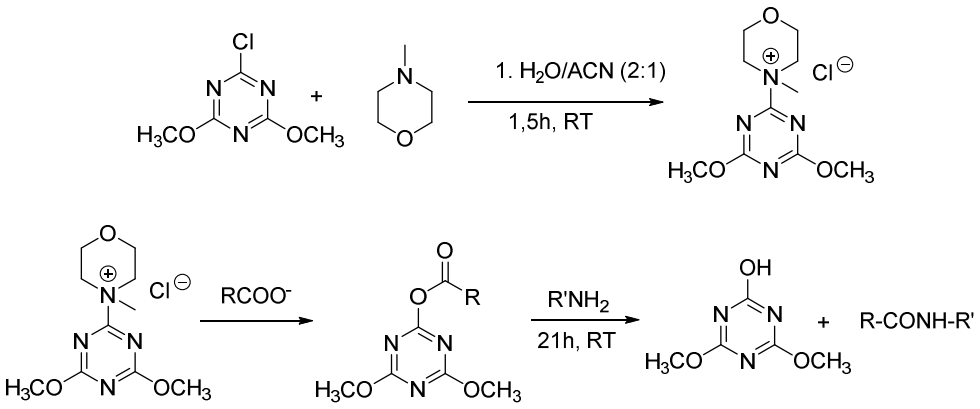
Charlot und *Auzely-Velty* beschrieben 2006 die Darstellung von Hyaluronsäure-Derivaten, die mit Cyclodextrinen modifiziert wurden (**Schema 28**). Dazu funktionalisierten sie die HA mit Adipinsäuredihydrazid, und oxidierten natives β-CD zunächst mit Hilfe des Dess-Martin-Reagenzes zum Aldehyd, wobei neben einer Monofunktionalität auch 2 oder sogar 3 Aldehydgruppen vorlagen. Der Aldehyd wurde in einem weiteren Schritt mit *O*-Carboxymethylhydroxylamin zur Carbonsäure und dann mit Aminoacetaldehyddimethylacetal zum entsprechenden Acetal umgesetzt. Dieses konnte nach Aktivierung mit Säure zum Aldehyd schließlich über reduktive Aminierung an die aminofunktionalisierte HA gekuppelt werden.[72]



Schema 28: Synthese von HA-CD-Konjugaten[71]

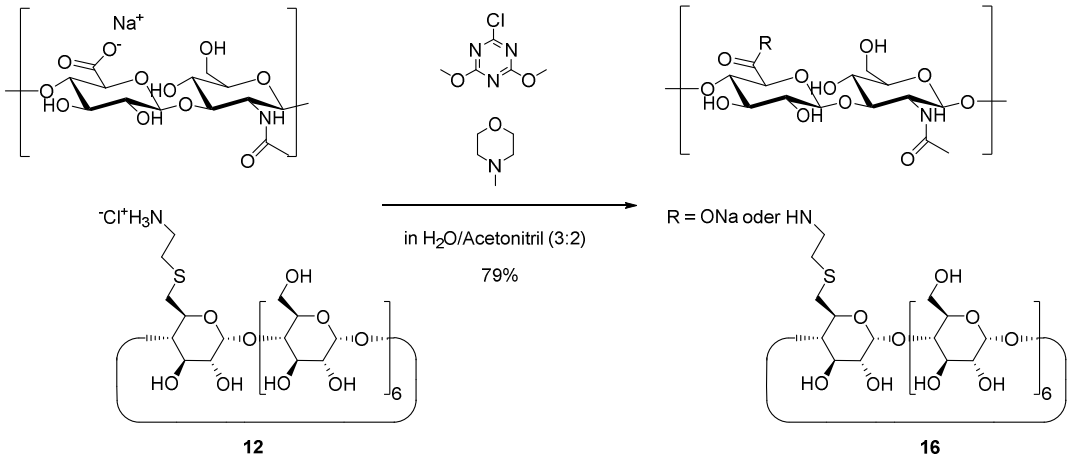
Der Nachteil liegt hier in der umständlichen Funktionalisierung und der Mehrfachsubstitution des CD-Derivates, was zu einem undefinierten Produkt führt. Zielgerichteter ist es daher, direkt über die Carboxylfunktionalität der HA zu gehen.

Eine erste Funktionalisierung der HA erfolgte mit Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-βCD **12**, da es einen Thioether als Spacer besitzt, der zum einen genügend Flexibilität für die Anknüpfung ermöglicht, zum anderen durch den eingeführten Schwefel einer Vergrößerung der CD-Kavität erreicht, was im Hinblick auf den Einschluss verschiedener Wirkstoffe eine Verbesserung bewirken soll. Als Kupplungsreagenz wurde, wie schon erwähnt, 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (CDMT) verwendet. Bei CDMT handelt es sich um eine kristalline Substanz, die bei Raumtemperatur stabil und in den meisten organischen Lösemitteln löslich ist. Um CDMT in ein reaktives Reagenz zu überführen, wird ein tertiäres Amin, beispielsweise N-Methylmorpholin (NMM), zugefügt. CDMT reagiert mit NMM zu 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinumchlorid (DMTMM), welches anschließend mit einer Carbonsäure den Aktivester bildet (**Schema 29**).



Schema 29: Mechanismus der CDMT-Kupplung[189]

In Anwesenheit eines Amins entsteht aus dem Ester 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-ol und das erwünschte Kupplungsprodukt. Als Lösungsmittel wurde ein Acetonitril/Wasser-Gemisch verwendet, da CDMT nicht wasserlöslich ist. Da für eine erfolgreiche Kupplung die Reaktion über den Aktivester laufen muss, stellte die Reihenfolge der Eduktzugabe eine wichtige Rolle dar. Deshalb wurde das Amin **12** (1 Äq.) erst 2 h nach der Aktivierung der Hyaluronsäure mit CDMT und NMM zum Reaktionsgemisch gegeben und für 12 h mit dem Aktivester reagieren gelassen (**Schema 30**).



Schema 30: CDMT-Kupplung von Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-βCD **12** an HA zu Konjugat **16**

Um ionische Wechselwirkungen zwischen ungebundenem Amino-CD und HA zu vermeiden, erfolgte vor der Aufreinigung mittels Ultrafiltration eine Protonierung mit einem starken H^+-Ionentauscher. Zuerst wurde mit 0.1M NaCl-Lösung und abschließend mit dest. Wasser filtriert. Um zu verifizieren, dass nach der Ultrafiltration das Produkt frei von ungebundenem CD war, wurde eine DC-Kontrolle durchgeführt. Als Laufmittel diente dabei ein Gemisch aus 2-Propanol und Ammoniumacetat im Verhältnis 2:1. Das Polymer zeigt keine Wechselwirkung mit der mobilen Phase und bleibt auf der Startlinie liegen, freies CD läuft hingegen mit einem R_f-Wert von 0.4 und kann durch Reaktion mit einem Gemisch aus Ethanol und H_2SO_4 (25:1) angefärbt werden. Da kein freies CD nachgewiesen werden konnte, konnte das Produkt charakterisiert und der Substitutionsgrad aus dem ^1H-Spektrum ermittelt werden (**Abb. 14**).

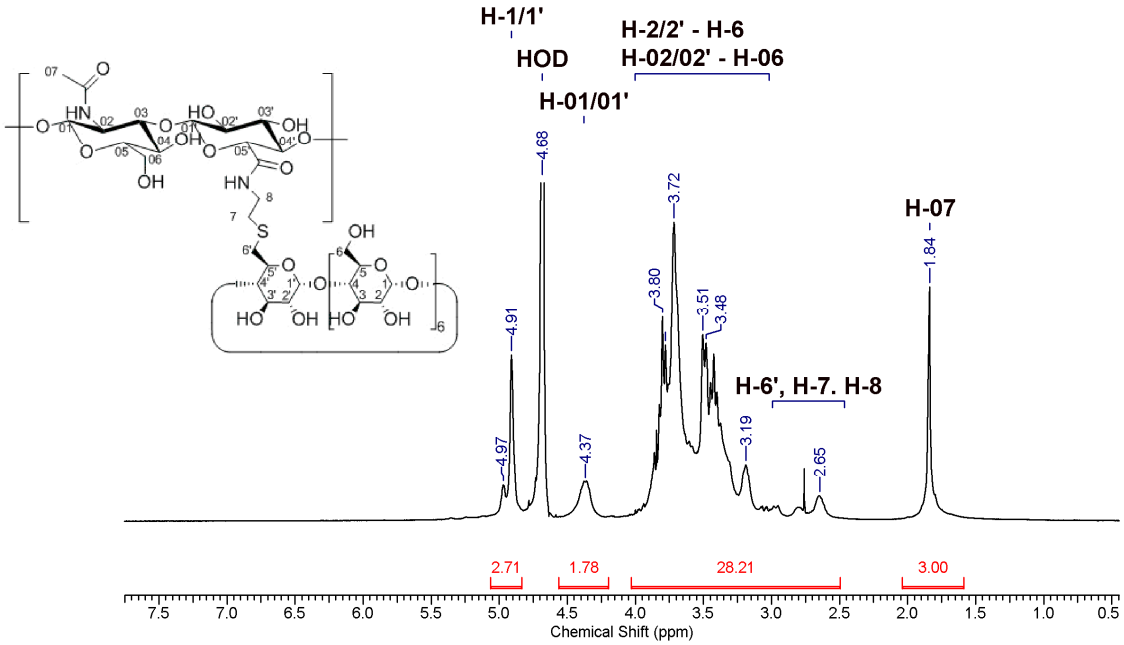


Abb. 14: ^{1}H-NMR-Spektrum (in D_2O) von Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-βCD-HA-Konjugat **16**

Die erfolgreiche Anbindung wurde durch das Auftauchen des CD-Signals der anomeren Protonen (H-1/1‘) bei 4.94 ppm ersichtlich. Der DS-Wert wurde durch Vergleich der Integrationen der CH_3-Gruppe der HA (H-07) und dem anomeren H des CDs (H-1/1‘) zu 0.4 ermittelt.

Eine Charakterisierung der Verbindung über IR ist auch möglich. Die C=O-Valenzschwingung bei 1410 cm^{-1} ist aber nicht charakteristisch für das gebildete Amid, da diese von der Carboxylatgruppe überlagert wird. Jedoch ist bei 1633 cm^{-1} die Schwingung der Amidgruppe zu sehen. Zudem taucht als Schulter die Deformationsschwingung der Aminogruppe bei 1550 cm^{-1} auf. Deren Valenzschwingung bei etwa 3.300 cm^{-1} wird jedoch von den OH-Gruppen überlagert.

Analog zu dem Konjugat **16** aus MonoCys **12** und HA wurden sowohl das native **13** als auch das methylierte Monoaminoderivat **14** mittels CDMT-Kupplung an HA angeknüpft. Die Produktkontrolle erfolgte hier ebenso mittels NMR und DC. Aus den ^{1}H-NMR-Spektren wurde der Substitutionsgrad im Falle von nativem Monoamin-HA-Konjugat **17** zu 0.5 und für das methylierte Monoamin-HA-Konjugat **18** zu 0.43 bestimmt. Bei der Ankupplung von (2-aminoethyl)-Carbamat-Methyl-βCD **15** an die HA konnte nur ein etwas geringerer DS von 0.23 erzielt werden (**Abb. 15**).

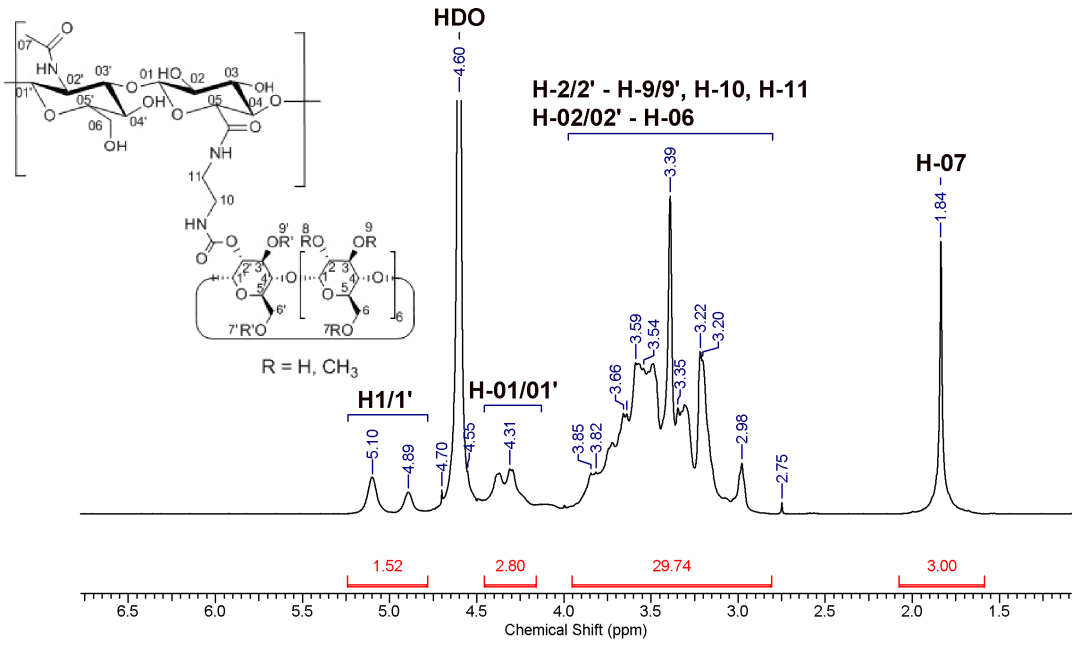
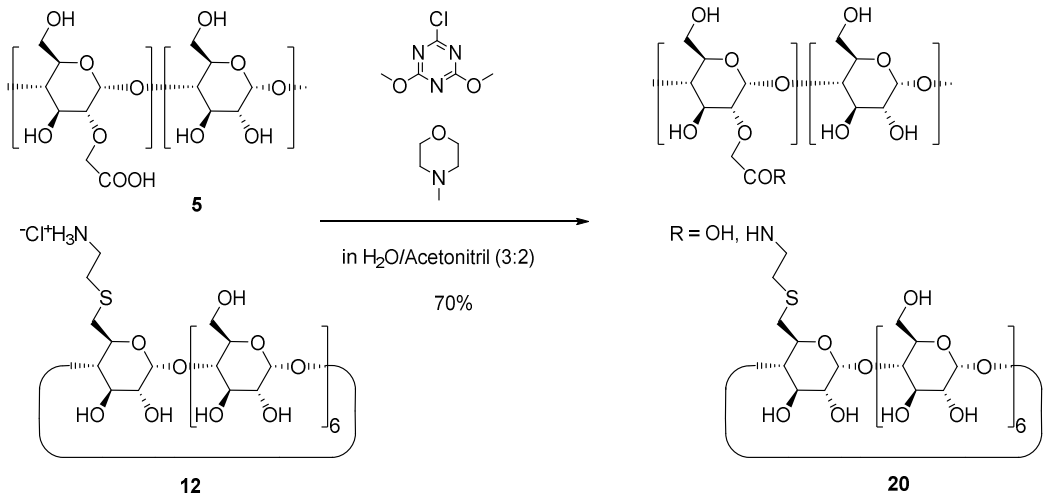


Abb. 15: ^{1}H-NMR-Spektrum (in D_2O) von Mono-(2-aminoethyl)-carbamat-methyl-βCD-HA-Konjugat **19**

Eine Vernetzung der HA durch die Disubstitution am Cyclodextrin konnte nicht festgestellt werden. Dies hätte sich durch eine Verschlechterung der Löslichkeit bemerkbar gemacht.

4.4 CDMT-Kupplung der Cyclodextrin-Derivate an Hydroxyethylstärke

Um auch die HES mit aminofunktionalisierten CDs umsetzen zu können, musste diese zuerst mittels TEMPO-Oxidation modifiziert werden. Dies erfolgte wie in **Kapitel 3.4** beschrieben. Die nun eingeführte Carboxylgruppe konnte im nächsten Schritt mit 0.4 Äq. Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-β-CD **12** gekuppelt werden. Dabei wurde analog zur Umsetzung der HA mit den CD-Derivaten (Verbindungen **16-19**) vorgegangen (**Schema 31**). Hier musste lediglich der Wasseranteil das Lösemittels auf 2:1 erhöht werden, da die HES bei einem Verhältnis 3:2 (H_2O:ACN) nicht mehr löslich ist und ausfällt.



Schema 31: CDMT-Kupplung der oxidierten HES **5** mit CD **12** zu Konjugat **20**

Nach erfolgter Aufreinigung mittels Ultrafiltration erfolgte auch hier mittels DC (EE/2-PropOH/NH_4OH/H_2O (7:7:5:2); tertBuOH/EtOH/H_2O (5:4:3)) die Kontrolle der Reinheit des CD-HES-Konjugates.

Um das Produkt zu charakterisieren, wurde ein ^{1}H-Spektrum (**Abb. 16**) aufgenommen und der Carboxylatgehalt durch das Blumenkrantz-Assay bestimmt. Die zum Amid umgesetzten Gruppen stehen dem Assay nicht mehr zur Verfügung, so dass durch Differenzbildung auf den Substitutionsgrad an CD geschlossen und mit dem aus dem ^{1}H-Spektrum ermittelten DS verglichen werden kann. Die Bestimmung des DS-Wertes gestaltete sich im Vergleich zu den HA-Konjugaten schwieriger, da nur die anomeren H-Atome der HES als isoliertes Signal erscheinen und als Referenz dienen können. Der Substitutionsgrad wurde somit durch Vergleich der Integrale der beiden anomeren Protonen von HES (5.55 ppm) und CD (5.10 ppm) zu 0.27 ermittelt.

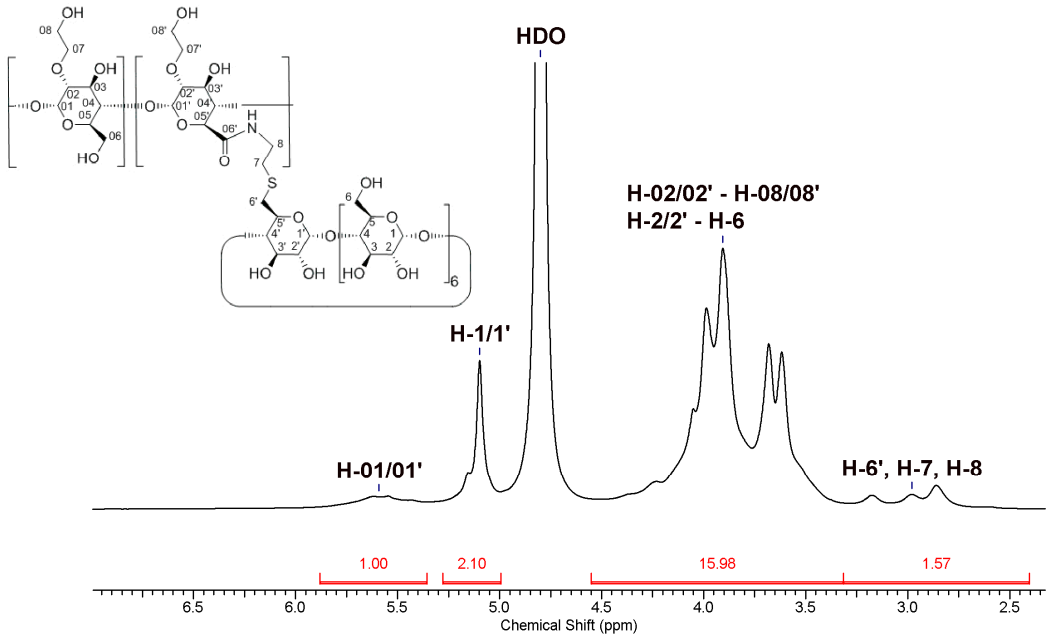
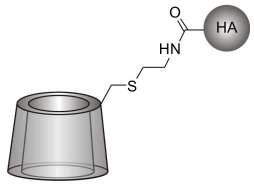
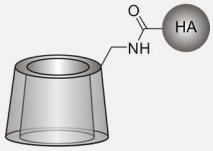
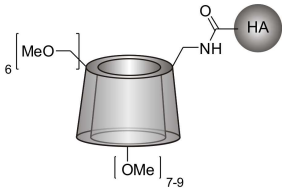
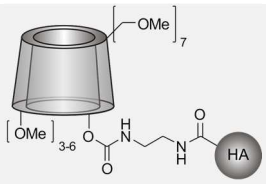
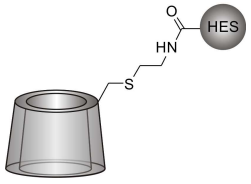
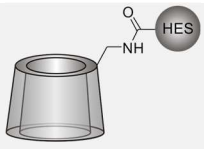


Abb. 16: ^{1}H-NMR-Spektrum (in D_2O) von CD-HA-Konjugat **20**

Auch das native Monoamin **13** wurde analog mittels CDMT-Kupplung an die HES angeknüpft. Der Substitutionsgrad lag durch Verwendung von nur 0.37 Äq jedoch unter 10%. Ein Grund für die schlechtere Anbindung könnte die sterische Hinderung des direkt am CD-Konus befestigten Amins sein, im Vergleich zu Verbindung **12**, die einen Thioether-Spacer besitzt. Eine Ankupplung des methylierten Monoamins **14** an die oxidierte HES wurde zwar durchgeführt, da es jedoch bei der Aufreinigung zu technischen Problemen kam, konnte nur eine geringe Menge an Produkt isoliert werden, die zu einer vollständigen Charakterisierung nicht ausreichten.

In **Tabelle 6** sind die synthetisierten HA-CD (**16-19**) sowie HES-CD-Derivate (**20** und **21**) vergleichend hinsichtlich Ausbeute, Substitutionsgrad (DS_{Poly}) und molare Masse des Konjugates pro CD-Einheit zusammengefasst.

Tabelle 6: Vergleich der mittels CDMT gekuppelten Polysaccharid-CD-Konjugate

Derivat	Struktur	Äq CD	$DS_{Poly}(CD)$	Ausbeute [%]	M_{CD} [Da]
16		1	0.4	79	2300
17		1	0.5	80	1990
18		0.75	0.43	70	2350
19		1	0.23	88	3280
20		0.4	0.27	69	1730
21		0.37	<0.1	77	3100

In Abhängigkeit der Äquivalente an CD und CDMT konnten Polysaccharid-CD-Konjugate mit unterschiedlichen Substitutionsgraden synthetisiert werden. Im Falle der HES war eine Ankupplung des nativen Monoamins **13** vergleichsweise schwieriger als bei Ankupplung an die HA (Konjugat **17**). Dort konnte bei Verwendung nur eines Äq. CDs bereits ein Substitutionsgrad von 50% erzielt werden. Bei der Anknüpfung des *randomly* methylierten Amins **15** an die HA konnte nur ein vergleichsweise geringer Substitutionsgrad erzielt werden. Dies ist auf die sterisch mehr gehinderte Position der Amino-Gruppe an der sekundären Seite des CD-Konus zurückzuführen.

4.5 Zytotoxische Untersuchungen

Für Verbindung **20** wurden ebenfalls zytotoxische Untersuchungen durchgeführt (**Abb. 17**). Wie in **Kapitel 3.5** beschrieben wurde hier unter denselben Bedingungen der Einfluss des CD-Polymers auf die Zellviabilität der Dickdarmtumorzelllinie Caco-2 mit Hilfe des *CellTiter-Glo*® Assays in Würzburg getestet. Die ermittelten Konzentrationsbereiche orientierten sich dabei an den experimentell bestimmten Füllgraden (w%) für das Anästhetikum Propofol.

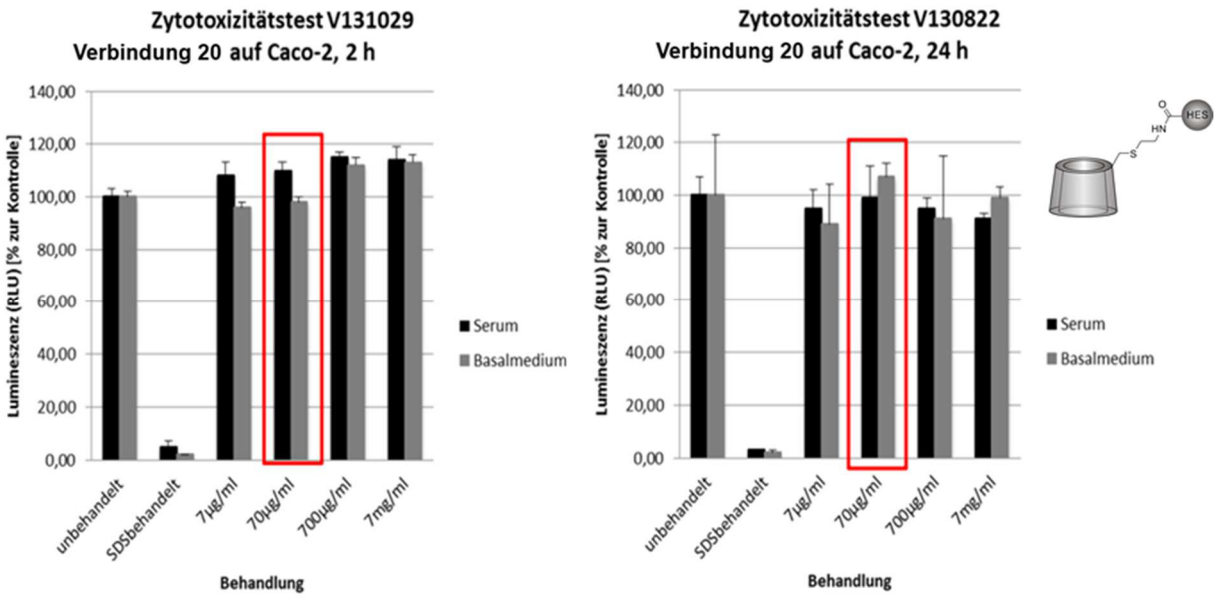


Abb. 17: Ergebnisse der zytotoxischen Untersuchungen von CD-HES-Konjugat **20**

In allen getesteten Konzentrationen konnte für **Verbindung 20** kein toxisches Potential für die getestete Zelllinie beobachtet werden.

4.6 Zusammenfassung

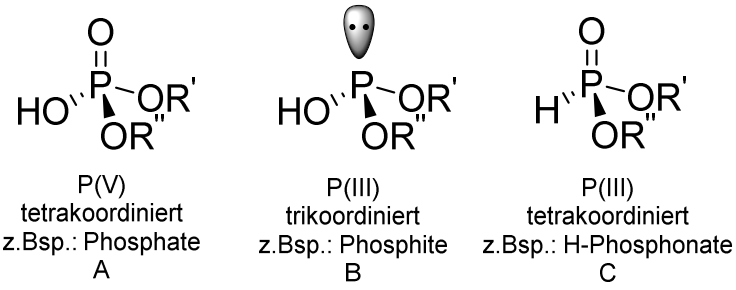
In diesem Kapitel wurde eine weitere Technik vorgestellt, die es ermöglicht, modifizierte CD-Derivate kovalent an Polysaccharide anzuknüpfen. Auch hier konnten native und methylierte CD-Derivate synthetisiert werden. Durch die Anbindung an Hyaluronsäure oder an oxidierte Hydroxyethylstärke konnte ein LCST Verhalten in wässriger Lösung nicht beobachtet werden. Zytotoxische Untersuchungen bestätigten auch hier die gute Verträglichkeit der HES-Konjugate, wodurch auch diese Polymere als Solubilisierer im medizinischen Bereich Verwendung finden können.

5 Synthese von H-Phosphonat modifizierten Cyclodextrinen und die Kupplung an Hydroxypropylcellulose

Die Synthesen der CD-Polysaccharid-Konjugate durch die beiden vorgestellten Kupplungstechniken sind zwar effektiv, in der Herstellung allerding sehr zeitaufwändig und im Hinblick auf den Einsatz als Wirkstofftransporter für kommerzielle Zwecke zu kostenintensiv. In diesem Teil soll deshalb eine weitere Technik vorgestellt werden, die es in wenigen Schritten ermöglicht, CDs an Polysaccharide kovalent anzubinden. Als funktionelle Gruppe wird dazu eine H-Phosphonat-Einheit an den CD-Bausteinen angebracht.

5.1 H-Phosphonate

Es gibt drei Arten von Phosphorverbindungen, die zur Synthese von wichtigen biologischen Systemen genutzt werden. Dies sind tetrakoordinierter Phosphor(V) mit einen Oxidationszustand von +5, trikoordinierter Phosphor(III) im Oxidationszustand +3 und tetrakoordinierter Phosphor(III) mit einem Oxidationszustand von +3 (**Schema 32**).

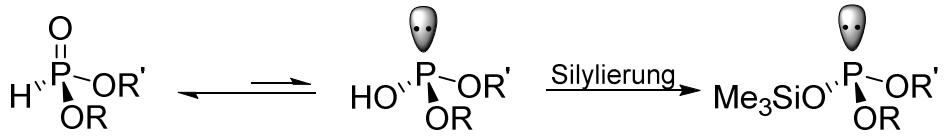


Schema 32: verschiedene Arten von Phosphorverbindungen: Phosphate, Phosphite und H-Phosphonate

Phosphorverbindungen des Typs A besitzen eine stabile P=O Bindung, der Phosphor besitzt eine tetrahedrale Geometrie und stellt ein hartes elektrophiles Zentrum dar, das gut mit harten Nukleophilen reagieren kann. Verbindungen des Typs B dagegen besitzen eine trigonal-pyramidale Geometrie mit einem freien Elektronenpaar, weshalb der Phosphor basisch ist und ein weiches Nukleophil darstellt,

das mit vielen, bevorzugt weichen Elektrophilen regiert. Solche P(III) Verbindungen können aber auch mit Nukleophilen reagieren, wenn sie selbst protoniert vorliegen oder elektronenziehende Substituenten besitzen. Da die Reaktionen sowohl mit Elektrophilen als auch mit Nukleophilen sehr schnell verlaufen, sind sie sehr interessant als Startreagenzien, auch wenn sie durch diese Eigenschaft schwerer zu handhaben sind. Eine dritte Verbindungsklasse stellen Verbindungen des Typs C dar. Aufgrund ihrer Phosphorylgruppe und ihrer tetrahedralen Struktur sind sie den Verbindungen des Typs A sehr ähnlich, aber durch ihre Oxidationsstufe von +3 werden sie den Typ B Verbindungen zugeordnet. Der Phosphor ist elektrophil und ist trotz seines Oxidationszustandes von +3 aufgrund seines fehlenden Elektronenpaares weniger anfällig für die spontane Oxidation als Verbindungen des Typs B. Diese Eigenschaft macht sie einzigartig. Aufgrund ihrer P-H Bindung werden diese Verbindungen als H-Phosphonate bezeichnet. Sie finden vor allem in der Nukleotidsynthese ihre Anwendung.[190]

Phosphor(III)-Verbindungen sind sehr reaktiv, können aber auch schnell ungewollt oxidiert werden. Zudem sind sie sehr hydrolyseempfindlich. Phosphor(V)-Verbindungen dagegen sind lagerstabil und leicht zu handhaben. Sie reagieren aber sehr langsam, auch wenn Aktivierungsreagenzien zugesetzt werden. H-Phosphonate vereinen die Vorteile dieser beiden Komponenten. Sie können leicht durch Oxidationsmittel wie Iod/Wasser oder elementaren Schwefel in die Phosphor(V)-Komponente konvertiert werden, sind zugleich aber resistenter gegenüber spontaner Oxidation durch Luftsauerstoff sowie stabil unter sauren Bedingungen. In Lösung stehen die H-Phosphonate im Gleichgewicht mit der Phosphor(III)-Komponente. Das Gleichgewicht liegt jedoch stark auf der linken Seite, weshalb der Phosphor als elektrophiles Zentrum fungiert. Wird das Gleichgewicht aber auf die rechte Seite verschoben, z. Bsp. durch Zugabe von Silylierungsreagenzien, wird der nukleophile Charakter der Phosphor(III)-Verbindung dominanter (**Schema 33**). Aus diesem Grund können H-Phosphonate sowohl mit weichen nukleophilen (Phosphit) als auch mit harten Nukleophilen (H-Phosphonat) reagieren.[191]

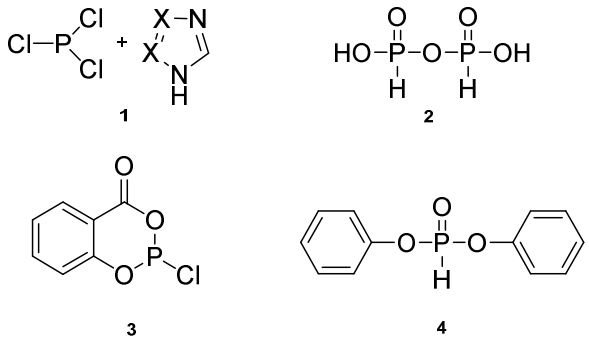


Schema 33: Gleichgewicht zwischen H-Phosphonat und Phosphit

Ein weiterer Vorteil bei Verwendung von H-Phosphonaten in der Nukleotidsynthese ist, dass keine Schutzgruppen benötigt werden. Der an den Phosphor gebundene Wasserstoff fungiert selbst als kleinste mögliche Schutzgruppe. Zudem geht der Wasserstoff bei Oxidation verloren, so dass Phosphodiester direkt aus H-Phosphonaten hergestellt werden können.

5.2 Synthese der Cyclodextrin-Derivate

Zur Einführung einer H-Phosphonat-Gruppe gibt es verschiedene, kommerziell erhältliche Reagenzien, die eine unterschiedliche Reaktivität aufweisen (**Schema 34**). Diese erlauben eine Umsetzung der Hydroxylgruppe von Nukleosiden unter milden Reaktionsbedingungen und in hohen Ausbeuten (80-95%).

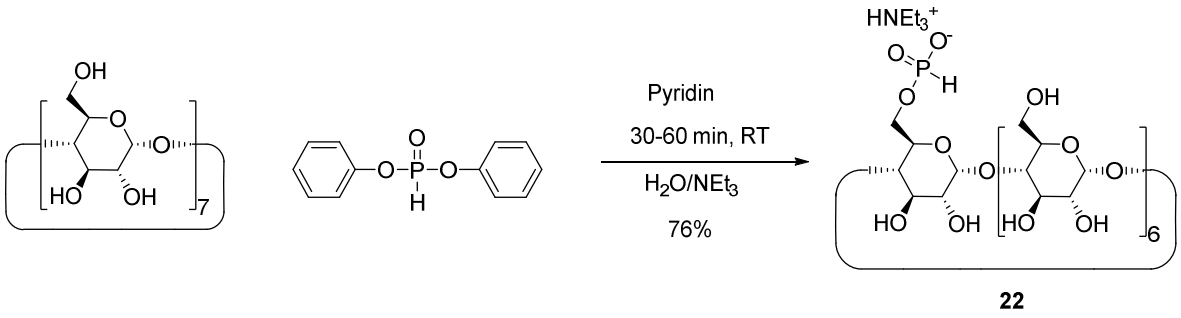


Schema 34: kommerziell erhältliche Phosphonylierungsreagenzien

Dabei ist die Wahl des Phosphonylierungsreagenzes von der Struktur des umzusetzenden Moleküls abhängig. So tolerieren Verbindungen 1 und 3 beispielsweise keine Aminogruppen im Nukleosid, so dass die Einführung einer Schutzgruppe notwendig wird.[190] Verbindung 2 hingegen ist im Fall sterisch gehinderter Hydroxylgruppen praktisch unreaktiv.

Zur Herstellung des H-Phosphonat Monoesters wurde in dieser Arbeit Diphenyl-H-Phosphonat 4 als Phosphonylierungsreagenz verwendet, da es billig ist, hohe Ausbeuten liefert und die Synthese unter milden Reaktionsbedingungen verläuft. Zudem müssen enthaltene Aminogruppen nicht zusätzlich geschützt werden.[190]Diphenyl-H-Phosphonat wird auch zur Herstellung von chiralen α- und β-Amino-Phosphonsäuren, die aufgrund ihrer biologischen Aktivität interessant sind, verwendet.[192,193]

Als Ausgangssubstanzen wurden sowohl natives β-CD, das eine Analyse der umgesetzten Substanz erleichtert, sowie RAMEβCD, das vergleichsweise bessere Bindungseigenschaften aufweist, jedoch durch seine statistische Substitution schwieriger zu analysieren ist, verwendet. In **Schema 35** ist die Synthese des nativen Mono-[6-(H-Phosphonat)]-βCDs **22** dargestellt.



Schema 35: Synthese von Mono-[6-(H-Phosphonat)]-βCD **22**

Das Cyclodextrin wurde in Pyridin gelöst, dann Diphenylphosphit zur Lösung hinzugegeben und bei RT gerührt. Mittels DC ($CHCl_3$/MeOH 8:2) wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Nach einer Stunde war keine Veränderung mehr zu beobachten. Durch Zugabe einer Mischung aus Triethylamin und Wasser wurde die Reaktion schließlich beendet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gegen eine 1000 Da PES-Membran mit Wasser nanofiltriert. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 76% im Falle des nativen Derivates **22** und mit 71% im Falle des methylierten CDs **23** erhalten werden.

Die erfolgreiche Umsetzung zeigte sich im NMR, im IR und in der Masse. So tauchten im ^{1}H-NMR bei 4ppm die Protonen-Signale der H-Phosphonat-Gruppe auf (H-7

in **Abb. 18** und H-10 in **Abb. 19**). Eine Verschiebung der Signale des CD-Backbones ist nicht zu beobachten.

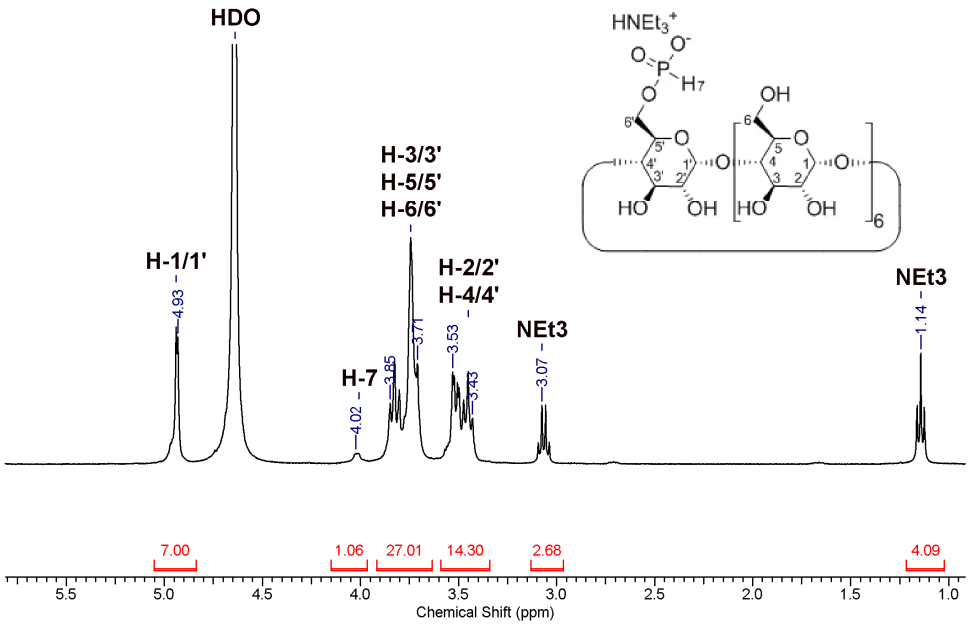


Abb. 18: ^{1}H-NMR-Spektrum (in D_2O) von Mono-[6-(H-Phosphonat)]-β-CD **22**

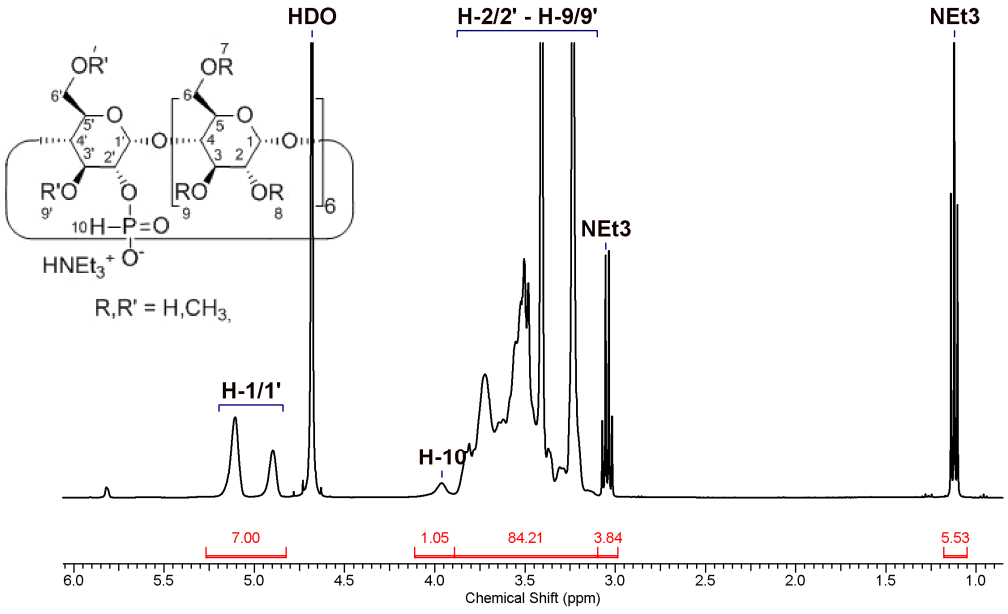


Abb. 19: ^{1}H-NMR-Spektrum (in D_2O) von Mono-[2-(H-Phosphonat)]-*random*-Methyl-β-CD **23**

Der Substitutionsgrad wurde aus dem Verhältnis der Integrale der H-Phosphonat Gruppe und der anomeren Protonen (4.93ppm bei Verbindung **22** und 5.11-

4.90ppm bei Verbindung **23**) ermittelt. Im Falle der nativen Verbindung **22** konnte ein Substitutionsgrad von 1.06 und für das methylierte Derivat **23** von 1.05 erhalten werden. Da im aromatischen Bereich in beiden Fällen keine Signale auftauchten, war sichergestellt, dass das Signal bei 4ppm nicht vom Edukt Diphenylphosphit stammte.

Auch im ^{31}P-NMR (**Abb. 20**) sind im entkoppelten Spektrum a) Signale bei 6.6 ppm, bei den Spektren mit Kopplung b) Signale bei etwa 8 und 5 ppm ($^{1}J_{PH}$: 504 Hz) zu finden, die dem H-Phosphonat zugeordnet werden können.

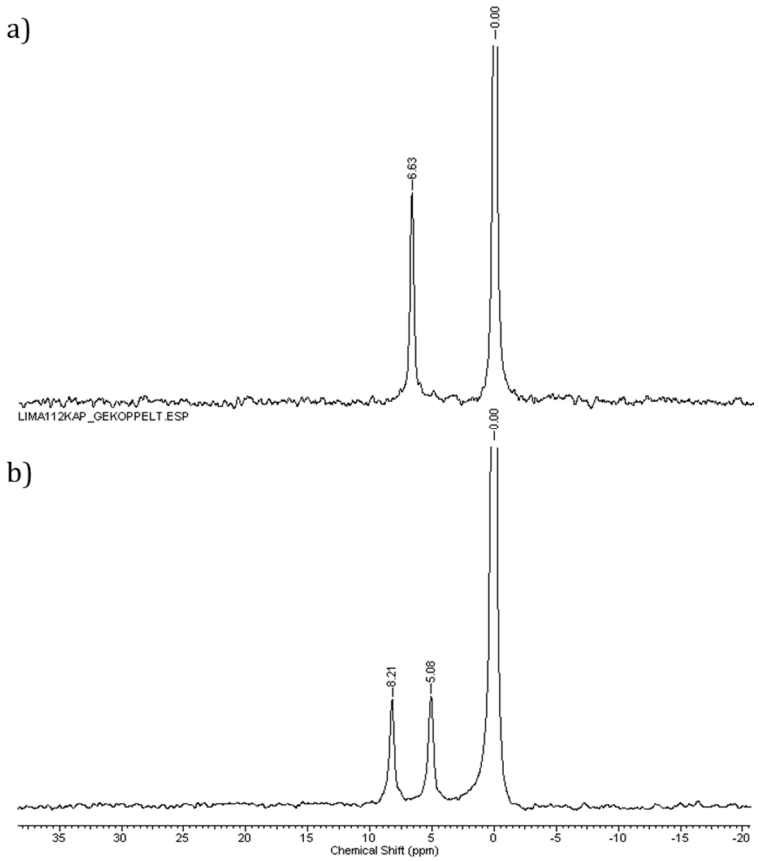


Abb. 20: ^{31}P-NMR-Spektrum von Mono-[2-(H-Phosphonat)]-*random*-Methyl-β-CD **23** a) ohne und b) mit Kopplung

Das Auftauchen eines Doubletts bestätigt das Vorhandensein einer P-H-Bindung. Die Kopplungskonstante stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Werte für Triethylammonium H-Phosphonate überein.[194] Die P-H Schwingung konnte auch im IR-Spektrum bei 2357 cm^{-1} beobachtet werden (**Abb. 21)** Im Vergleich zum Edukt RAMEβ ist die Modifizierung deutlich zu erkennen. Die Streckschwingungen

der P=O (1260-1310cm^{-1}) und P-O-C-Gruppen (1030-1090cm^{-1}) fallen in den Fingerprint-Bereich und konnten deshalb nicht genau zugeordnet werden.

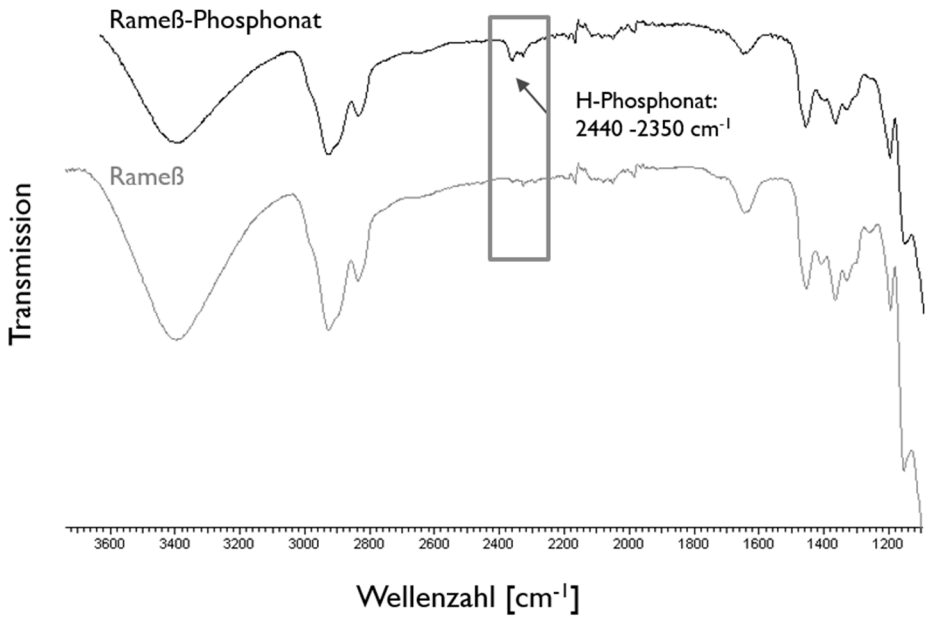


Abb. 21: IR-Spektrum von Mono-[2-(H-Phosphonat)]-*random*-Methyl-β-CD **23**

Das Massenspektrum von Mono-[6-(H-Phosphonat)]-βCD **22** zeigt neben dem unmodifiziertem β-CD ([M+Na]$^+$:1157.84) nur ein Molekülpeak bei m/z von 1221.14 ([M+Na]$^+$). Im Massenspektrum von Mono-[2-(H-Phosphonat)]-*random*-Methyl-β-CD **23** ist ebenfalls nur eine einfache Substitution an H-Phosphonat mit einem m/z von 1403.56 [M+Na]$^+$ zu erkennen (**Abb. 22**). Das Substitutionsmuster wird durch die statistische Methylierung des Edukts (RAMEβCD) hervorgerufen. Durchschnittlich enthält das Molekül 11-17 Methylgruppen.

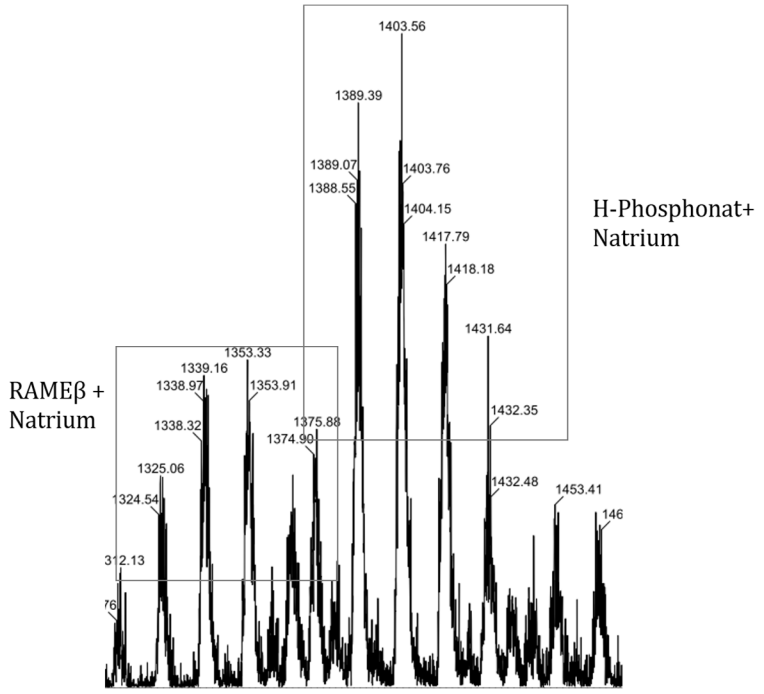
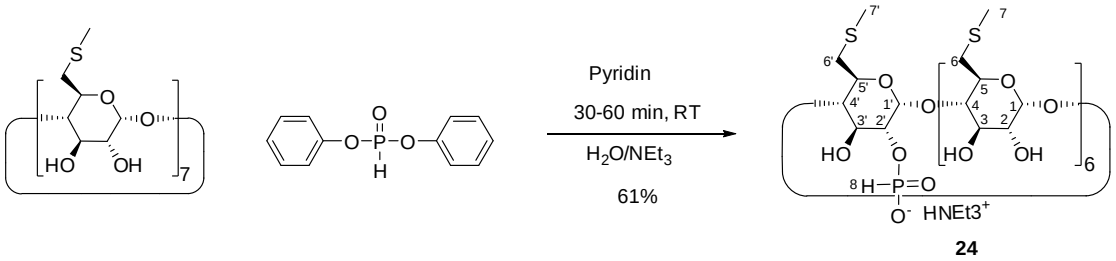


Abb. 22: ESI-MS-Spektrum von Mono-[2-(H-Phosphonat)]-*random*-Methyl-β-CD **23**

Die Funktionalisierung von nativem β-CD und RAMEβCD mit einer H-Phosphonat-Gruppe konnte somit bestätigt werden. Da methylierte Derivate eine vergleichbar beseres Bindungsvermögen gegenüber lipophilen Substanzen aufweisen als die nativen, wurde ein weiteres, amphiphiles CD-Derivate synthetisiert, das eine Analyse aufgrund einer einheitlichen Substitution erleichtern soll. Dazu wurde **Heptakis-(6-deoxy-6-methylthio)-β-CD,** das durch Substitution von **Heptakis-(6-deoxy-6-bromo)-β-CD** mit Methanthiolat erhalten wurde[195], unter denselben Bedingungen mit Diphenylphosphit zu Mono-[2-(H-phosphonat)]-Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-βCD **24** umgesetzt und über Nanofiltration aufgereinigt (

Schema 36).



Schema 36: Synthese von Mono-[2-(H-phosphonat)]-Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-βCD **24**

Da das eingesetzte CD-Derivat selbst nicht wasserlöslich ist, ist eine Löslichkeit in Wasser nach erfolgter Umsetzung ein erstes Indiz für eine Anbindung der ionischen H-Phosphonatgruppe. ^{1}H-, ^{31}P-NMR, MS und IR Spektren bestätigen die erfolgte Umsetzung.

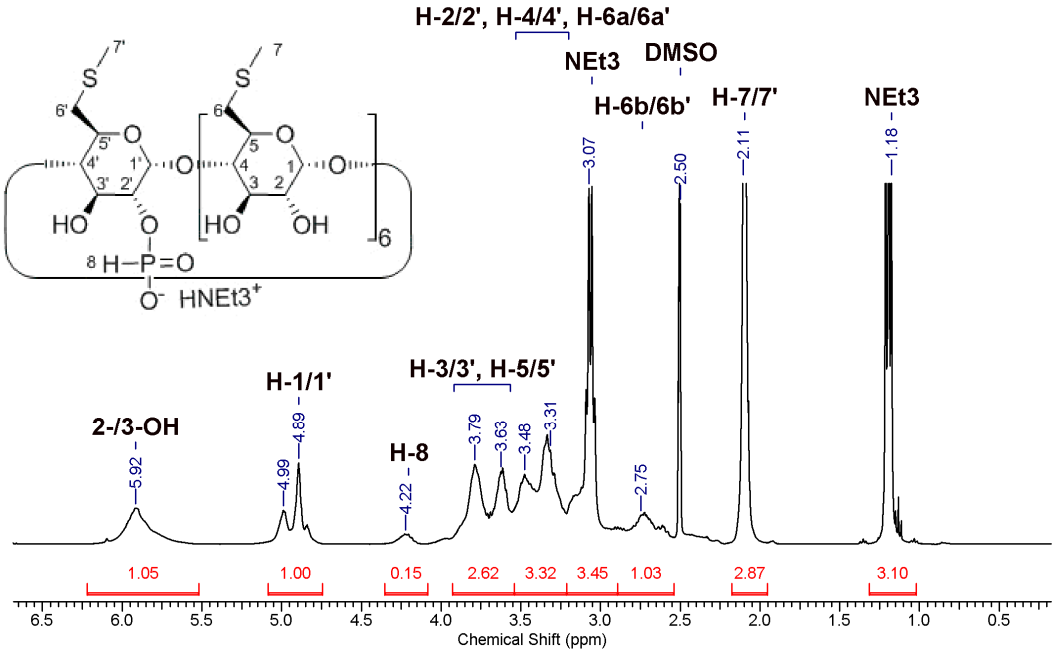


Abb. 23: ^{1}H-NMR (in DMSO) von Mono-[2-(H-Phosphonat)]-Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-βCD **24**

Die Umsetzung lässt sich auch hier im ^{1}H-NMR durch Auftauchen des Protonen-Signals der H-Phosphonatgruppe (H-8) bei 4.23 ppm zeigen (**Abb. 23**).

Bei dieser Reaktion kam es zu einer leichten Übersubstitution (DS=1.16), was sich auch im Massenspektrum beobachten lässt (**Abb. 24**). Dort tauchen zwei Peaks auf, wobei der mit m/z von 1407.1 der Einfachsubstitution, der mit m/z von 1471.1 $[M+H]^{+}$ der Zweifachsubstitution in Form eines Phosphodiesters zugeordnet werden kann. Zusätzlich ist auch ein Peak bei einem m/z von 734.8 zu beobachten. Dieser ist auch auf eine Anbindung von zwei H-Phosphonat-Gruppen zurück zu führen, jedoch in Form eines Monoesters an zwei verschiedenen Hydroxylgruppen. Dadurch enthält das Molekül zwei negative Ladungen, weshalb nur die Hälfte der Masse beobachtet werden kann.

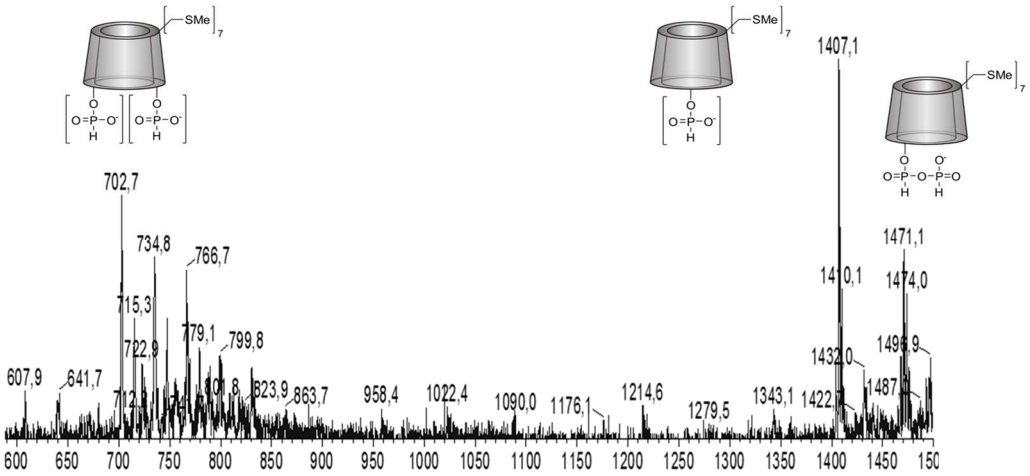


Abb. 24: ESI-MS-Spektrum von Mono-[2-(H-phosphonat)]-Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-βCD **24**

Auch im ^{31}P-NMR macht sich die Ausbildung eines Phosphodiesters bemerkbar. So erscheint nicht mehr ein klares Signal bei etwa 6 ppm. Es tauchen zudem noch zwei kleinere und breitere Signale bei 7.1 und 8.4 auf.

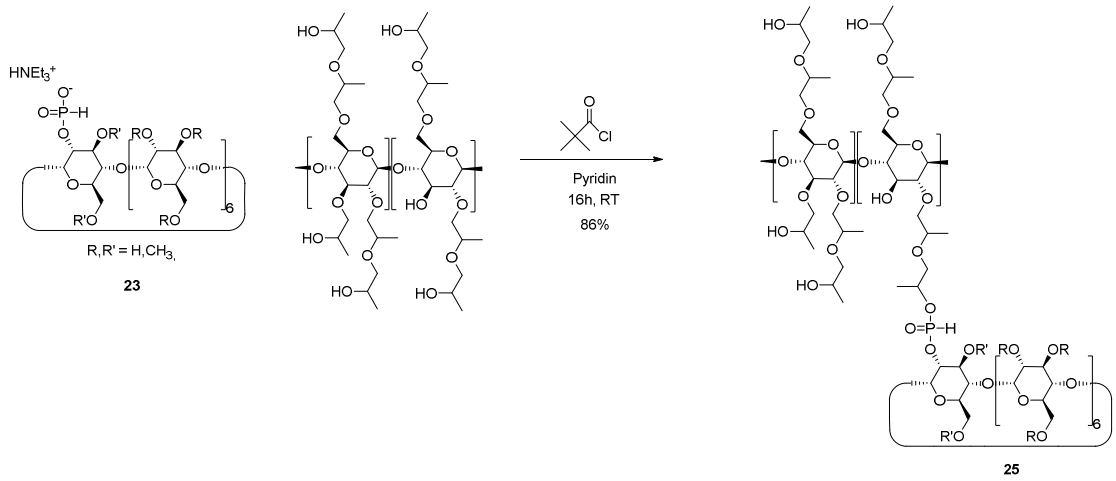
Die vorgestellten, amphiphilen CD-Derivate **23** und **24** sollen nun an Polysaccharide gekuppelt werden.

5.3 Kupplung der Cyclodextrin-Derivate mit Hydroxypropylcellulose

Um nun mit Nukleophilen oder Elektrophilen reagieren zu können, müssen die hergestellten H-Phosphonat Monoester zuerst in ein reaktives Derivat umgewandelt werden. Dies wird durch den Einsatz von Aktivierungsreagenzien erzielt. Dabei handelt es sich meistens um Carbonsäurehalogenide. Das am häufigsten verwendete Aktivierungsreagenz stellt Pivaloylchlorid dar. Es aktiviert den Monoester zum entsprechend gemischten Anhydrid, ist aber unreaktiv gegenüber Dialkylphosphiten. 1987 zeigten *Garegg* und *Stawinski,* dass bei diesem Kupplungsschritt die zeitliche Zugabe von Aktivierungsreagenz und Nukleophil eine große Bedeutung hat. So bildeten sich die H-Phosphonatdiester schnell und in hohen Ausbeuten, wenn das Nukleosid 3'-H-Phosphonat in Anwesenheit des Nukleosid mit einer 5'-OH-Gruppe aktiviert wird. Die Ausbeute nahm jedoch drastisch ab,

wenn das Aktivierungsreagenz vor Zugabe der 5'-Hydroxylkomponente mit dem Nukleosid 3'-H-Phosphonat gemischt wurde.[196]

Da eine Kupplung an Hydroxyethylstärke wegen mangelnder Auswahl an Lösungsmittel (H_2O, DMSO, DMF, DMAc) nicht möglich war, wurde als zweite Hydroxylkomponente Hydroxypropylcellulose (HPC) verwendet.



Schema 37: Synthese des HPC-CD-Konjugates **25**

Diese zeigt sowohl in wässriger Lösung als auch in Pyridin eine gute Löslichkeit. Die Umsetzung erfolgte in absolutiertem Pyridin und bei RT für 18h unter Wasserausschluss, um eine Hydrolyse des Aktivierungsreagenzes Pivaloylchlorid zu verhindern. Nach Abdestillieren des Lösemittels wurde das Reaktionsgemisch ultrafiltriert und abschließend lyophilisiert. Mittels DC konnte bestätigt werden, dass das Produkt frei von ungebundenem CD war. Das Produkt konnte mit 86% Ausbeute erhalten werden.

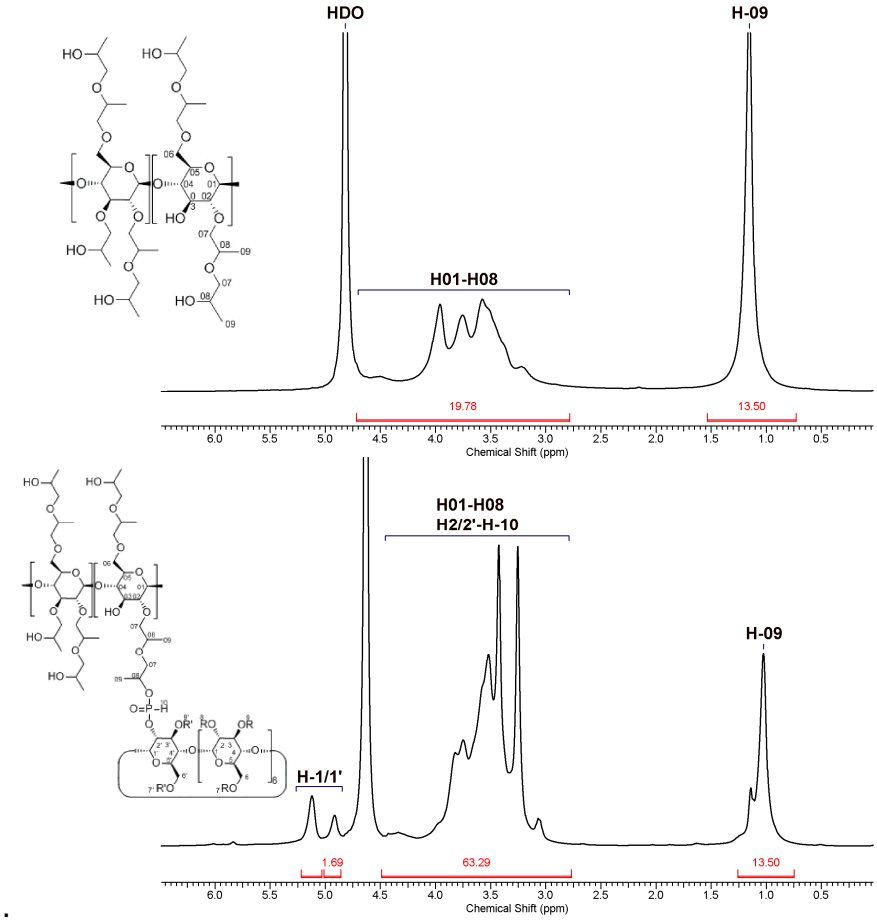
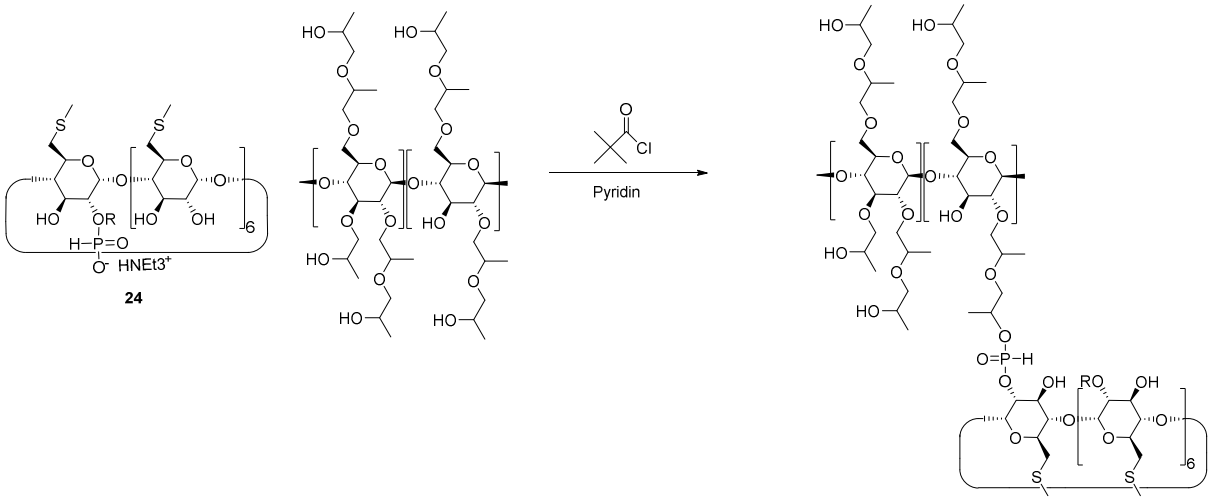


Abb. 25: ^{1}H-NMR-Spektren (in D_2O) von HPC und dem HPC-CD-Konjugat **25**

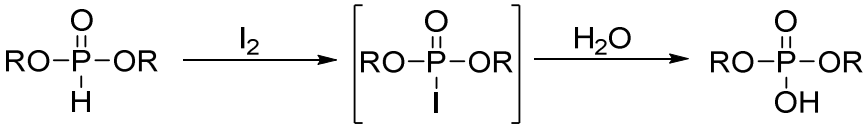
Aus dem ^{1}H-NMR-Spektren wurde der DS-Wert zu 0.3 ermittelt (**Abb. 25**). Als Referenz wurde das Signal der Methylgruppen (H-09) bei 1.06 ppm der HPC genommen, das ein Integral von 13.5 H-Atomen (bei einem MS von 4.5) besitzt. Auch Verbindung **24** wurde unter denselben Bedingungen versucht, an die HPC zu kuppeln (**Schema 38**).



Schema 38: Synthese des HPC-CD-Konjugates **26**

Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt in Wasser suspendiert und ultrafiltriert, um ungebundenes CD zu entfernen. Nach Lyophilisation konnte das Konjugat jedoch nicht mehr in Lösung gebracht werden (versuchte Lösungsmittel: H_2O, D_2O, DMSO, Pyridin, MeOH, EtOH, $CDCl_3$). NMR-Versuche zeigten lediglich Spuren des verwendeten Edukt-CDs **24**. Da durch die Bildung des Phosphodiesters die negative Ladung am Sauersoff verloren geht, kann die Unlöslichkeit in Wasser, die durch das CD hervorgerufen wird, erklärt werden.

Deshalb wurde versucht, die H-Phosphonatgruppe in situ zum Phosphat zu oxidieren, um eine negative Ladung in das Molekül einführen zu können. Das Standardoxidationsmittel in der Oligonukleotidsynthese stellt Iod/Pyridin/H_2O dar, da es sehr effizient ist und unter milden Bedingungen abläuft.[197] Iod dient hierbei als Oxidationsmittel und bildet mit dem H-Phosphonat eine Iod-Phosphor-Zwischenstufe, die in Anwesenheit von Wasser zum gewünschten Phosphat hydrolysiert wird.



Schema 39: Oxidation von H-Phosphonat zu Phosphat

Das oxidierte Kupplungsprodukt löste sich nach Entfernen des Lösemittels (Pyridin) wiederum in keinem Lösungsmittel, das für Ultrafiltration wie auch NMR-

Aufnahmen geeignet ist. Somit war es nicht möglich, eine Charakterisierung dieses Kupplungsproduktes vorzunehmen.

5.4 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurde eine neue Kupplungstechnik im Bereich der Cyclodextrine vorgestellt. Durch die Anbindung einer H-Phosphonatgruppe ist eine einfache Funktionalisierung der OH-Gruppen des CDs möglich. Zudem kann eine Anknüpfung der CDs an eine zweite OH-Gruppe des Kupplungspartners unter Ausbildung eines H-Phosphonatdiesters ohne weitere Modifizierung durchgeführt werden. So ist es möglich, in einer zweistufigen Synthese ein CD-Polysaccharid-Konjugat zu erhalten. Das hier vorgestellte Konjugat aus Hydroxypropylcellulose und *randomly* methyliertem H-Phosphonat besitzt wie die kommerziell erwerblichen **HPβCD** und **SBEβCD** den Nachteil der statistischen Substitution. Dadurch ist eine Reproduzierbarkeit erschwert. Zudem können sich durch Veränderung des Substitutionsmusters die Eigenschaften des CDs verändern. Für pharmazeutische Verwendung sind jedoch definierte Derivate mit einem einheitlichen Substitutionsmuster interessanter. Da diese Technik jedoch auf alle CDs mit einer reaktiven Hydroxylgruppe angewendet werden kann, besitzt sie ein großes Potential für die Synthese günstiger Transportsysteme auf CD-Basis, die für pharmazeutisch interessante Wirkstoffe Verwendung finden können.

6 Solubilisierung von Wirkstoffen

6.1 Einschluss von Sevofluran

Die Komplexierung von Sevofluran durch die synthetisierten CD-Derivate wurde aufgrund seines hohen Dampfdrucks mit Hilfe der Headspace Gaschromatographie untersucht.

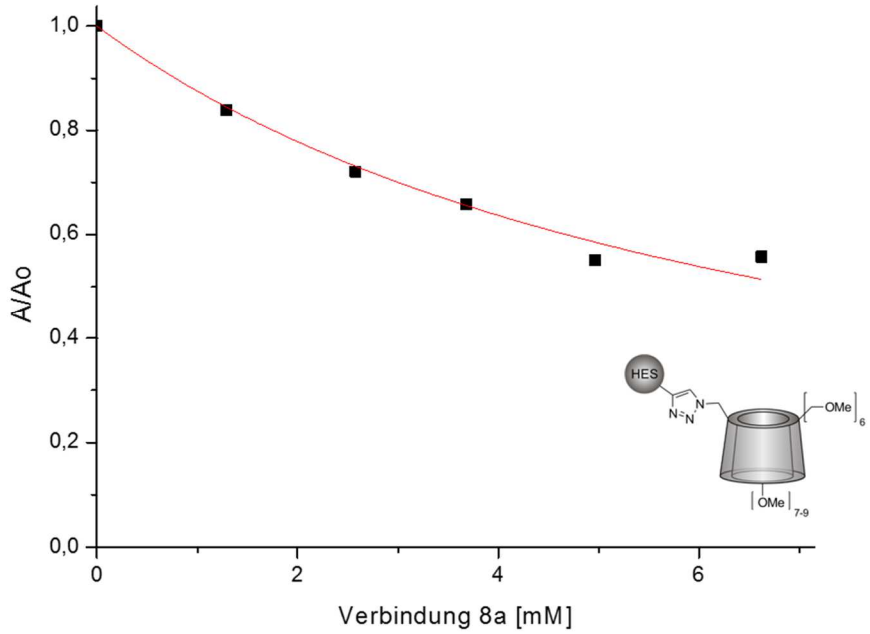


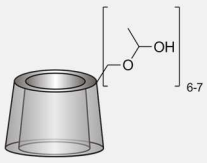
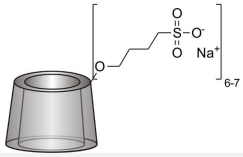
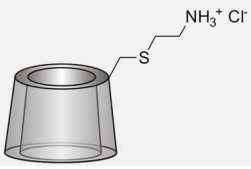
Abb. 26: Abnahme des Dampfdruckes A/A_0 als Funktion der Wirtkonzentration für Derivat **8a**

In **Abb. 26** ist zu erkennen, dass der Dampfdruck von Sevofluran deutlich mit steigender CD-Konzentration und der damit verbundenen Komplexierung abnimmt. Die Bindungskonstanten und Belegungsgrade für die kommerziell erhältlichen und die synthetisierten nativen und methylierten CD-Derivate wurden nach Gleichung 5 und 6 berechnet sind in **Tabelle 7** und **8** zusammengefasst.

Während natives β-CD wie auch seine hydrophilen funktionalisierten Derivate nur eine geringe Affinität zu Sevofluran aufweisen, zeigen die methylierten CDs, RAMEβ und vor allem DIMEβ eine zufriedenstellende Komplexierung. Die Methylierung erhöht die Hydrophobizität der Kavität und verbessert dadurch die Kompatibilität mit dem hydrophoben Wirkstoffmolekül. Dabei wird deutlich, dass der Substitutionsgrad an Methylgruppen einen entscheidenden Einfluss auf die Kom-

plexierung hat. Für dimethylierte CDs konnten die höchsten Werte gemessen werde. Eine leichte Übersubstitution in Position 3 wie bei Verbindung **8-9** macht sich kaum bemerkbar. Werden jedoch mehrere Hydroxylgruppen in 3-Position umgesetzt, sinken die Werte sehr stark ab (Verbindung **11**). TRIMEβCD weist deshalb auch keine nennenswerte Affinität für Sevofluran auf. Dieser Effekt ist auch mit anderen Gastmolekülen wie t-Butylbenzoat oder Adamantan-1-carboxylat beschrieben. Der Grund hierfür ist wie das schon beschriebene Fehlen intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen, die das CD-Gerüst stabilisieren.[15] Auch Derivate **24** mit seinen sieben Thiomethylgruppen zeigt eine hervorragende Komplexierung. Die hydrophobe Kavität wird durch die Thiomethylgruppen verlängert, so dass mit Sevofluran ein stabiler Komplex entsteht. Aus Tabelle 8 wird deutlich, dass eine Polymerfixierung keinen negativen Einfluss auf die Komplexierung ausübt. Bei Verwendung von Hyaluronsäure und oxidierter HES wurden jedoch etwas geringere Bindungskonstanten und Belegungsgrade bestimmt als für die neutralen HES-Derivate. Dies könnte auf einen kooperativen Effekt der amphiphilen CDs an dem neutralen Polysaccharid zurückzuführen sein, durch den der Wirkstoff zusätzlich zur Komplexierung in der CD-Kavität eingeschlossen wurde.

Tabelle 7: Belegungsgrad x und Bindungskonstante K monomerer CD-Derivate für Sevofluran

Derivat	Struktur	$DS_{CD}(CH_3)$	x [mol%]	K [M^{-1}]
β-CD		0	32	87
HPβCD		0	36	108
SBEβCD		0	25	63
12		0	36	108

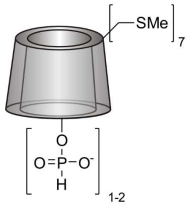
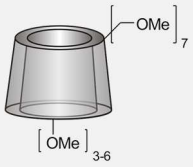
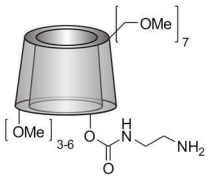
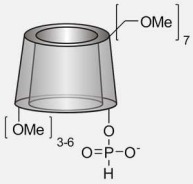
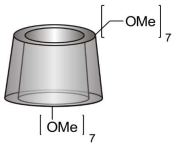
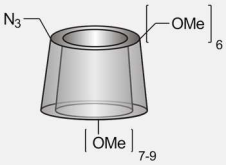
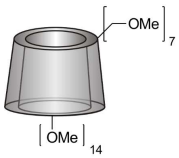
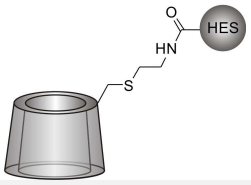
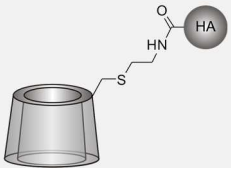
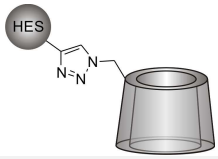
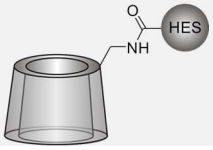
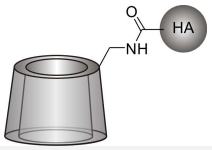
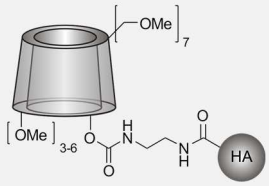
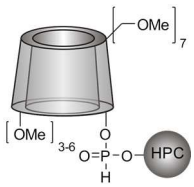
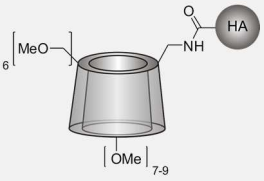
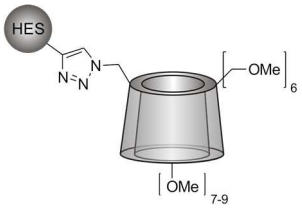
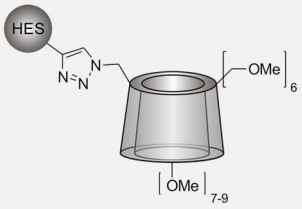
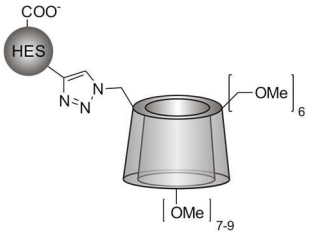
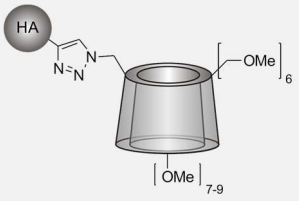
24		1	75	561
RAMEβ		1.8	50	186
15		1.8	41	129
23		1.8	38	114
DIMEβ		2.0	71	471
3		2.2	72	489
TRIMEβ		3.0	9	18

Tabelle 8: Belegungsgrad x und Bindungskonstante K polymerer CD-Derivate für Sevofluran

Derivat	Struktur	$DS_{CD}(CH_3)$	x [mol%]	K [M^{-1}]
20		0	39	120
16		0	30	81
7		0	36	108
21		0	25	63
17		0	36	105
19		1.8	29	78
25		1.8	44	147
18		2.1	47	165

8		2.1	69	423
8a		2.3	70	429
9		2.3	50	186
11		2.7	32	90

6.2 Einschluss von Midazolam

Das Einschlussverhalten von Midazolam in die CD-Derivate und –Polymere wurde mit der Methode der Löslichkeitsisothermen untersucht. In **Abb. 27** ist beispielhaft die Löslichkeitsisotherme von Derivat **8a** mit Midazolam dargestellt. Alle ermittelten Kurven der Derivate mit Midazolam wurden mit einer Geradengleichung angepasst, um die Steigung zu erhalten. Die Steigung entspricht dem Belegungs- bzw. Füllgrad, also wieviel mol% des CDs oder CD-Polymers mit einem Gastmolekül eine Einschlussverbindung eingegangen sind. Daraus konnte mit Hilfe von **Gleichung 1** die Komplexbindungskontante K_S bestimmt werden. Die gemessenen Isothermen zeigten für alle Wirte ein A-Typ-Verhalten, außer für TRIMEβCD, für das kein Einschluss von Midazolam beobachtet werden konnte.

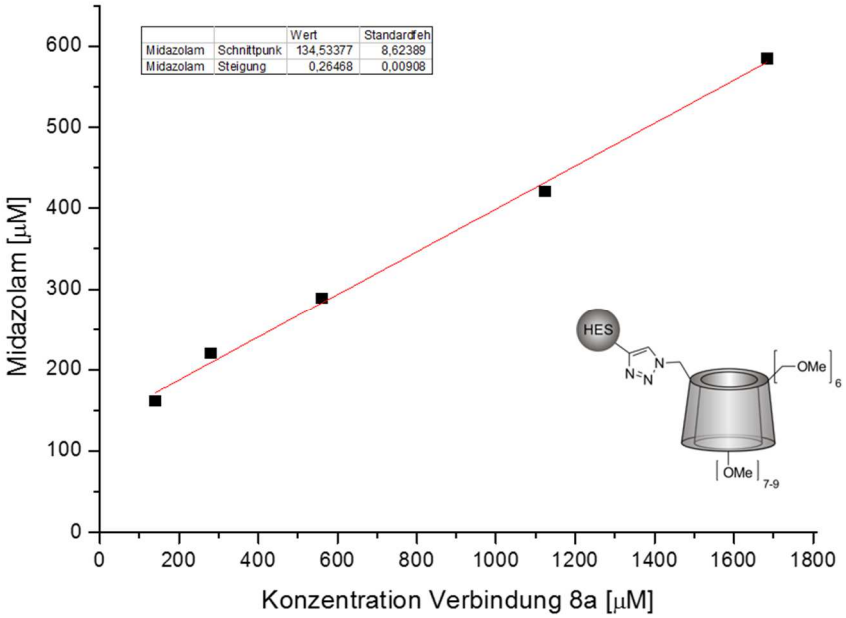


Abb. 27: Löslichkeitsisotherme von Derivat **8a** und Midazolam in isoton. HEPES-Puffer

Um den Einfluss der Substituenten am CD-Grundgerüst auf den Einschluss der Gastkomponente zu bewerten, muss beachtet werden, welche funktionellen Gruppen der Gastkomponente von welcher Seite der CD-Kavität aus eingeschlossen werden. In den spektroskopischen Untersuchungen (^{1}H-NMR) von *Ali* et al. zeigte sich, dass Midazolam über den fluorsubstituierten Aromaten durch die weitere, sekundäre Seite des CDs eingeschlossen wird. Dadurch spielen vor allem die Wechselwirkungen zwischen H-5 des CDS mit dem fluorsubstitiuierten Ring sowie H-3 mit Teilen des chlorsubstituierten Ringes eine große Rolle (Abb. 28).[123]

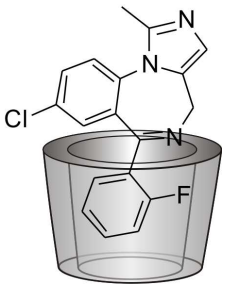


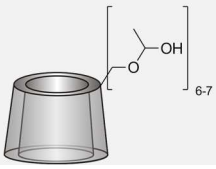
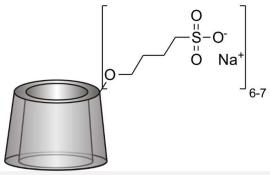
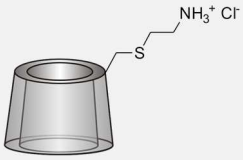
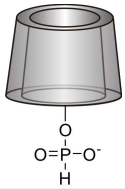
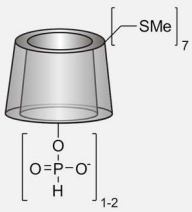
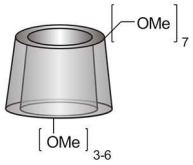
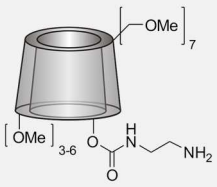
Abb. 28: schematische Darstellung des Einschlusses von Midazolam in β-CD

Aus **Tabelle 9** wird ersichtlich, dass die unmethylierten Derivate nur eine geringe Affinität zur Ausbildung eines Komplexes aufweisen. Eine Modifizierung mit hyd-

rophilen Gruppen sowie die Anbindung an die Polysaccharide führten in diesem Fall zu keiner verbesserten Solubilisierung verglichen mit nativem β-CD und den kommerziell Erhältlichen. Für die methylierten Derivate konnte ein gegenteiliges Verhalten beobachtet werden. Wie *Mathiron* et al. durch T-ROESY Experimente zeigen konnten, führen die, wenn auch nur schwachen Wechselwirkungen der Methoxygruppen in 2- und in 6-Position mit dem fluorsubstituierten Aromaten und dem Imidazolring zu einer deutlichen Verbesserung der Bindungskonstante.[126] Zudem wird die hydrophobe Kavität vergrößert, so dass das große Molekül besser in die Kavität passt. Je besser die Kavität ausgefüllt wird, desto stabiler ist der gebildete Komplex. Eine Ausnahme stellt jedoch **RAMEβCD** dar, für das vergleichbare Werte wie **HPβCD** und **SBEβCD** gemessen werden konnten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die primäre Seite nicht voll substituiert wurde und sich deshalb mehr Methylgruppen auf der sekundären Seite befinden, was die Komplexierung, vor allem durch Substitution der 3-OH-Gruppe, verschlechtert. Eine Funktionalisierung von **RAMEβCD** mit hydrophilen Substituenten (Verbindung **15** und **23**) führte zu einer besseren Komplexbildung, die durch Stabilisierung zusätzlicher Wasserstoffbrücken mit dem Gastmolekül erklärt werden kann wird.

Auch für die polymeren Verbindungen (**Tabelle 10**) konnten vergleichbar gute Werte erhalten werden. Die höchsten Werte wurden für die beiden Polymere **8** und **8a** bestimmt. Die HES übt auch hier wieder einen solubilisierenden Effekt auf das Gastmolekül aus. Interessanterweise konnte diese Beobachtung nur in Anwesenheit von CDs festgellt werden. Die HES alleine führte zu keiner verbesserten Löslichkeit von Midazolam. Für die ionischen CD-Polymere **9** und **11** wurden etwas geringere Werte, die der monomeren Verbindung entsprechen, gefunden. Bei Verbindung **19** konnte kein zusätzlich solubilisierender Effekt durch HA beobachtet werden, was wiederum durch das ionische Backbone erklärt werden kann. Die Anknüpfung an die HPC führt bei Verbindung **25** zu einer Verschlechterung. Dies kann durch eine sterische Hinderung durch die Hydroxypropylgruppen der HPC begründet werden, die den Einschluss des sterisch anspruchsvollen Midazolams erschweren.

Tabelle 9: Belegungsgrad x und Bindungskonstante K monomerer CD-Derivate für Midazolam

Derivat	Struktur	$DS_{CD}(CH_3)$	x [mol%]	K [M^{-1}]
β-CD		0	2	311
HPβCD		0	2	528
SBEβCD		0	4	648
12		0	n.b.	n.b.
22		0	6	946
24		1	17	2826
RAMEβ		1.8	6	1158
15		1.8	16	2826

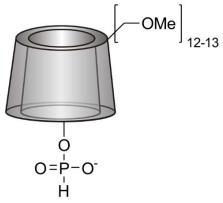
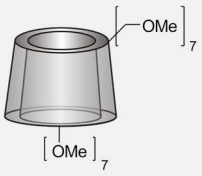
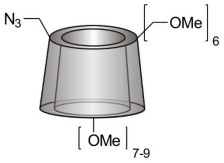
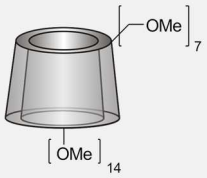
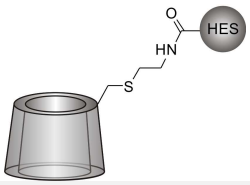
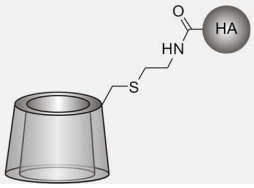
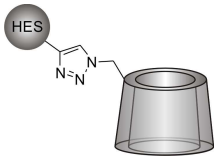
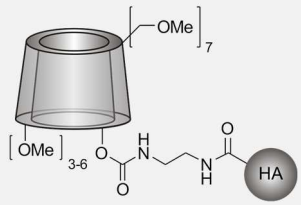
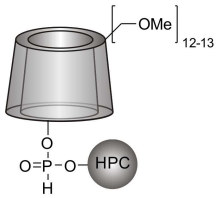
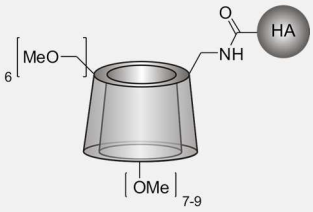
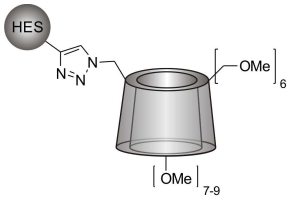
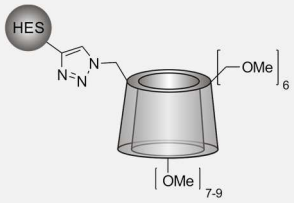
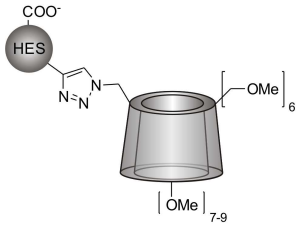
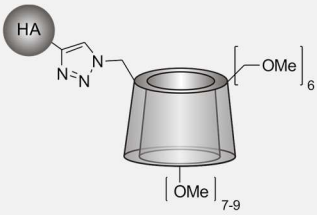
23		1.8	15	2681
DIMEβ		2.0	21	3816
3		2.2	19	3427
TRIMEβ		3.0	Kein Einschluss	Kein Einschluss

Tabelle 10: Belegungsgrad x und Bindungskonstante K polymerer CD-Derivate für Midazolam

Derivat	Struktur	$DS_{CD}(CH_3)$	x [mol%]	K [M^{-1}]
20		0	7	1124
16		0	3	814
7		0	4	615

19		1.8	15	3272
25		1.8	8	2846
18		2.1	16	4826
8		2.1	24	4635
8a		2.3	26	5918
9		2.3	19	3522
11		2.7	19	4418

6.3 Einschluss von Propofol

Auch der Einschluss von Propofol wurde mit Hilfe der Löslichkeitsisothermen untersucht (**Abb. 29**). Hier konnten sowohl für natives β-CD, TRIMEβCD als auch für DIMEβCD Isothermen nach dem B-Typ beobachtet werden. Die gebildeten Komplexe fallen schon bei sehr geringer Konzentration aus, so dass keine verbesserte Löslichkeit erzielt werden kann. Diese Derivate sind mit * in **Tabelle 11** markiert und die Grenzlöslichkeiten der Komplexe jeweils angegeben. Diese liegen zwischen 0.7 und 1.2mM, die Grundlöslichkeit von Propofol in HEPES-Puffer liegt bei etwa 0.7mM.

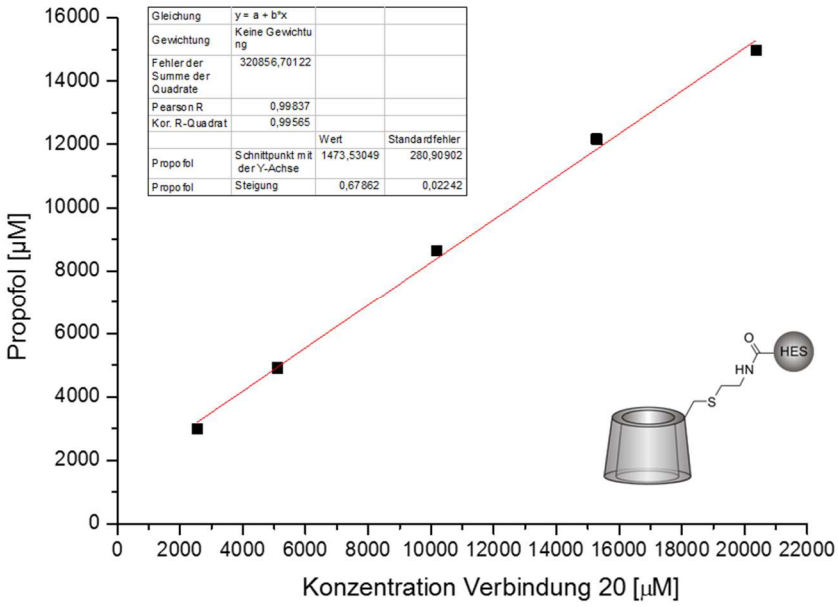


Abb. 29: Löslichkeitsisotherme von Derivat **20** und Propofol in isoton. HEPES-Puffer

Anders als bei Midazolam führt die Modifizierung einer einzigen OH-Gruppe schon zu einer deutlichen Verbesserung des Einschlussverhaltens der CD-Derivate mit Propofol (vgl. **MonoCys**). So zeigten auch die an der primären Seite mehrfach funktionalisierten Derivate **HPβCD** und **SBEβCD** eine Verbesserung der Löslichkeit. ^{1}H-NMR-Studien von HPβCD mit Propofol zeigten, dass der aromatische Ring und Teile der Isopropylgruppe in der Kavität lokalisiert sind, während sich die Hydroxylgruppe am Rand der weiteren, sekundären Seite befindet.[198]

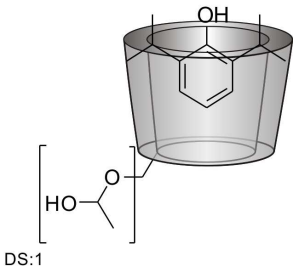
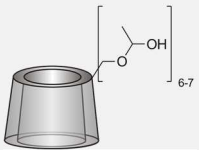
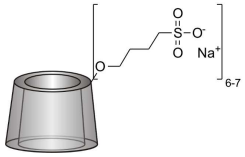


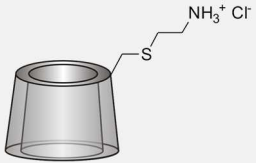
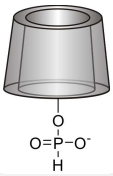
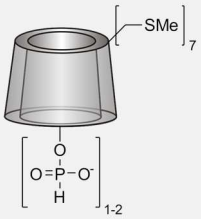
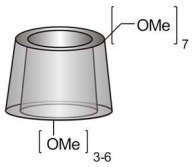
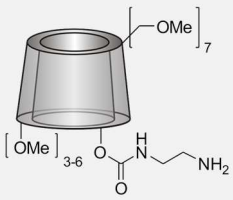
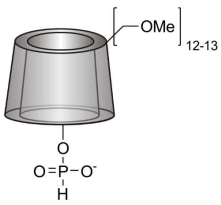
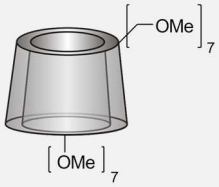
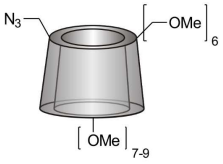
Abb. 30: schematische Darstellung des Einschlusses von Propofol in HPβCD

Auch **RAMEβCD** zeigt vergleichbare Werte, die dimethylierten Derivate zeigten allerdings nur eine geringe Affinität bzw. sind die gebildeten Komplexe unlöslich. Zur Ausbildung eines wasserlöslichen Komplexes ist scheinbar eine gewisse Anzahl an hydrophilen Gruppen notwendig, die beim **RAMEβCD** noch vorhanden ist, beim **DIMEβCD** jedoch nicht mehr ausreicht, um den Komplex in Lösung zu halten. Bemerkenswert ist die Solubilisierung von Propofol mit Verbindung **24**. Der ermittelte Belegungsgrad von 138 mol% deutet darauf hin, dass neben der Komplexierung in der Kavität eine zusätzliche Solubilisierung durch Aggregation der Thiomethylgruppen und dem damit verbundenen Einschluss auftritt.

Aus Tabelle 12 wird ersichtlich, dass eine Fixierung der CDs an HES und HA einen positiven Einfluss auf die Solubilisierung ausübt. So konnten für die Polymere **17** und **20** wesentlich bessere Werte als bei der monomeren Verbindung **12** gemessen werden.

Tabelle 11: Belegungsgrad x und Bindungskonstante K monomerer CD-Derivate für Propofol

Derivat	**Struktur**	**$DS_{CD}(CH_3)$**	**x [mol%]**	**K [M^{-1}]**
β-CD		0	2* (1.2mM)	16*
HPβCD		0	62	1497
SBEβCD		0	65	1764

12		0	43	1092
22		0	n.b.	n.b.
24		1	138	n.b.
RAMEβ		1.8	67	1148
15		1.8	45	767
23		1.8	39	598
DIMEβ		2.0	0* (0.7mM)	0*
3		2.2	10	103

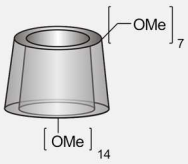
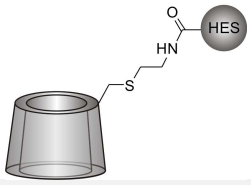
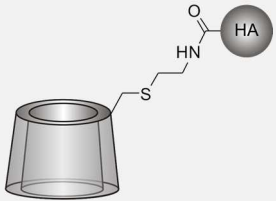
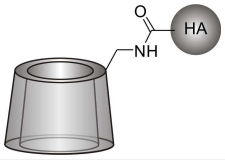
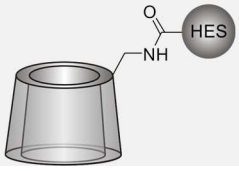
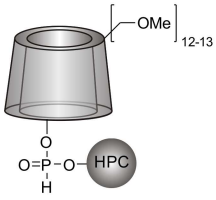
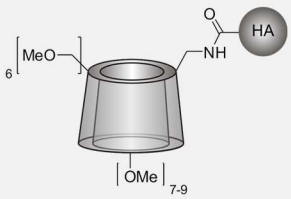
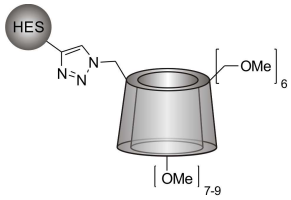
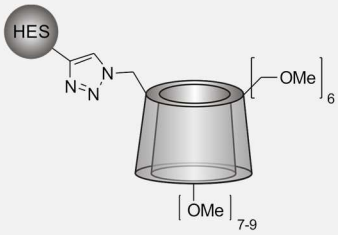
TRIMEβ		3.0	0* (1.2mM)	0*

Tabelle 12: Belegungsgrad x und Bindungskonstante K polymerer CD-Derivate für Propofol

Derivat	**Struktur**	**$DS_{CD}(CH_3)$**	**x [mol%]**	**K [M^{-1}]**
20		0	68	2046
16		0	45	1039
17		0	78	4298
21		0	67	1981
25		1.8	34	744
18		2.1	50	1275

8		2.1	3	32
8a		2.3	n.b.	n.b.

6.4 Einschluss von Steroid-Derivaten

In den folgenden Tabellen 13 und 14 sind die funktionalisierten CD-Derivate und deren relevanten Polymere sowie die kommerziell erhältlichen CD-Derivate im Hinblick auf den Einschluss der Steroid-Derivate Estradiol, Testosteron und Hydrocortison dargestellt. Im Allgemeinen konnten für Testosteron und Hydrocortison höhere Werte für die Solubilisierung bestimmt werden als für Estradiol. Da CDs bevorzugt den A/B-Ring von Steroiden einschließen[199,200], kann diese Beobachtung auf den phenolischen Ring des Estradiols zurückgeführt werden. In den folgenden Abbildungen (**31-33**) sind die Löslichkeitsisothermen der Steroide jeweils mit β-CD und Verbindung **12** dargestellt. Auch hier wurde das B-Typ-Verhalten von nativem β-CD deutlich. Im Falle von Hydrocortison übt β-CD bis zu einer Konzentration von 8mM einen solubilisierenden Effekt auf das Gastmolekül aus, im Falle von Estradiol und vor allem Testosteron findet nur eine geringe Verbesserung der Löslichkeit der Gäste statt und die auch nur bei geringen CD-Konzentrationen. Es wird schnell ein Plateau erreicht, ab dessen Konzentration eine Erhöhung der CD-Konzentration keinen Einfluss mehr auf die Löslichkeit der Gastkomponente zeigte.

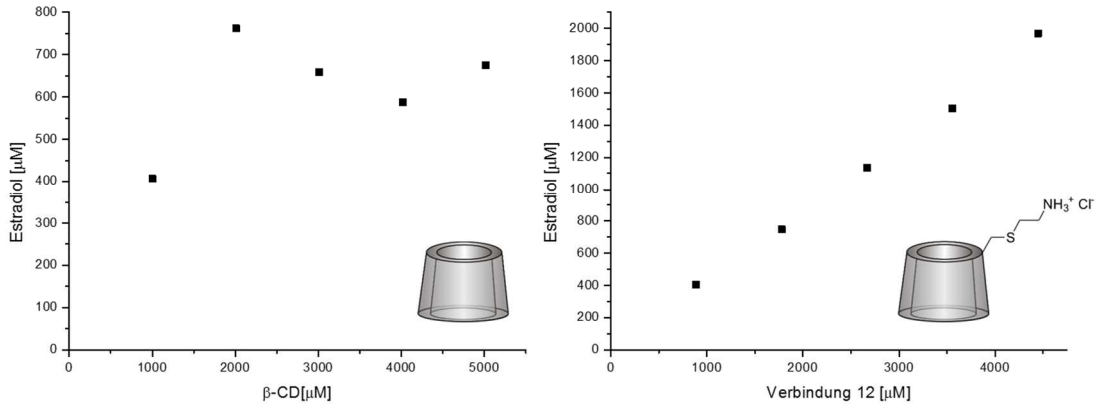


Abb. 31: Löslichkeitsisothermen für Estradiol mit β-CD und Verbindung 12

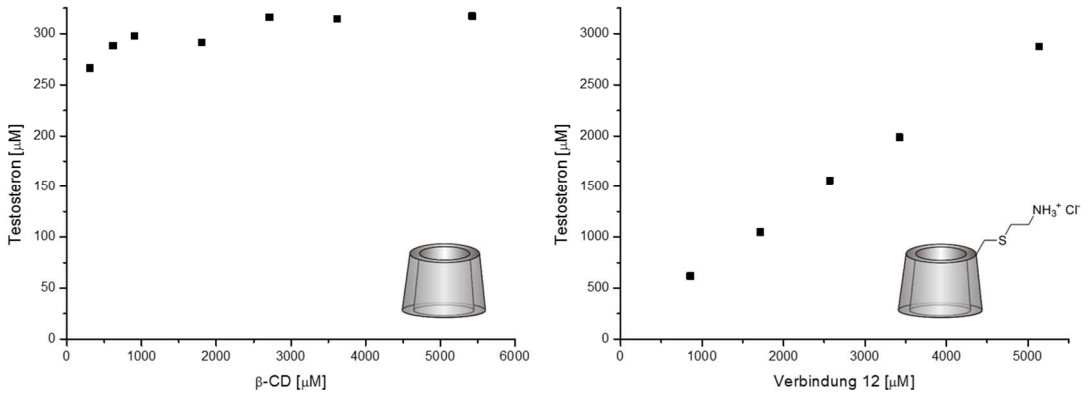


Abb. 32: Löslichkeitsisothermen für Testosteron mit β-CD und Verbindung 12

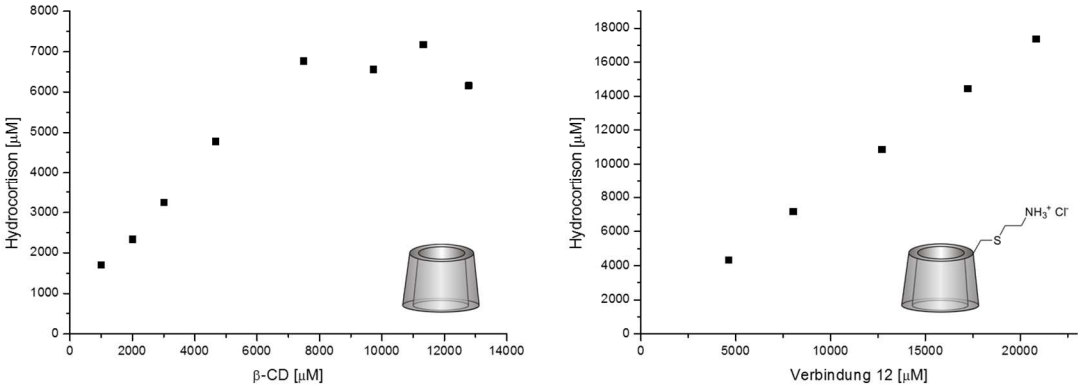
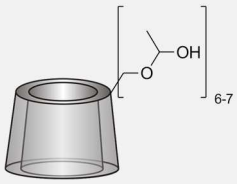
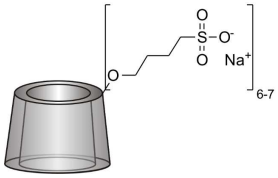
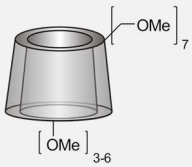
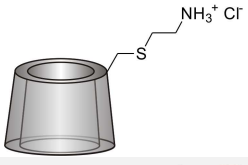
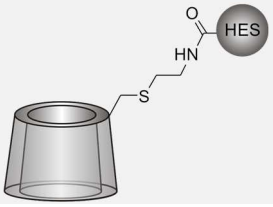


Abb. 33: Löslichkeitsisothermen für Hydrocortison mit β-CD und Verbindung 12

Für Verbindung 12 sowie die übrig vorgestellten Derivate konnten Kurven nach dem A-Typ gemessen werden. Die Art der Substituenten am CD scheint bei den Steroid-Derivaten eine geringere Rolle zu spielen als bei den vorgestellten Anästhetika, wobei die hydrophilen Derivate tendenzielle bessere Bindungskonstanten lieferten als die Methylierten. Der bei den Anästhetika beschriebene positive Einfluss des Polymerbackbones kann hier nicht beobachtet werden; der Solubilisierungseffekt der CD-Polymere ist etwas geringer als der des Monomeren.

Tabelle 13: Belegungsgrade x [mol%] für Estradiol, Testosteron und Hydrocortison

Derivat	Struktur	Estradiol [mol%]	Testosteron [mol%]	Hydrocortison [mol%]
βCD		17* (0.8mM)	6* (0.3mM)	55* (7mM)
HPβCD		29	52	51
SBEβCD		33	53	28
RAMEβCD		32	56	41
12		43	55	78
20		33	38	56

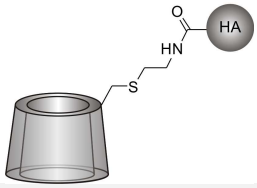
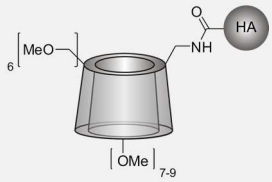
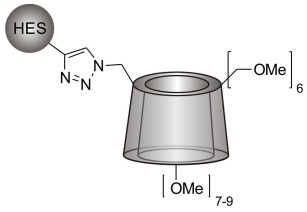
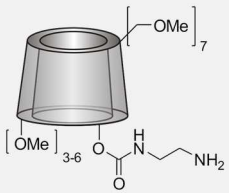
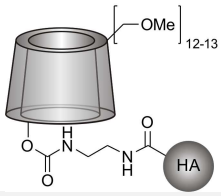
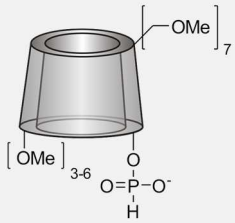
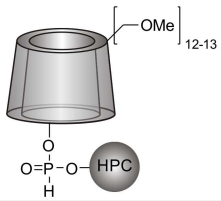
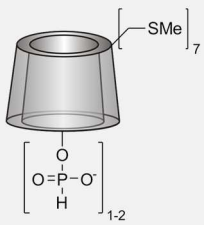
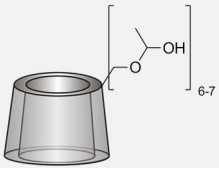
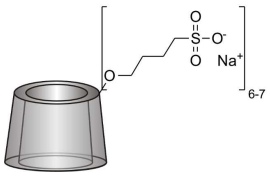
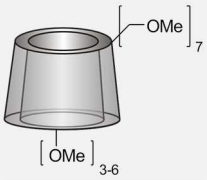
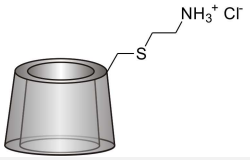
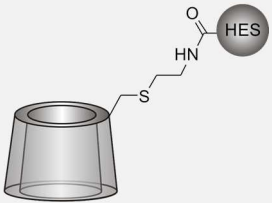
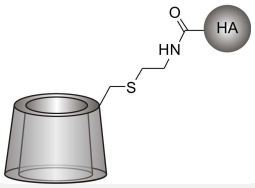
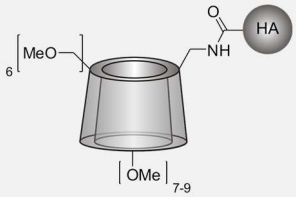
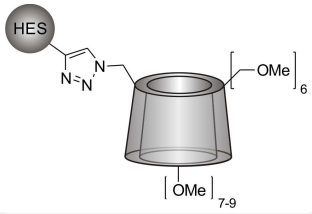
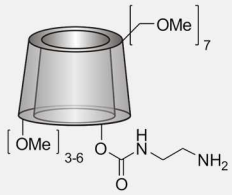
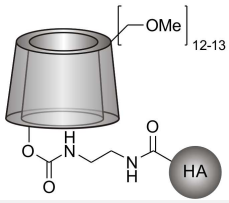
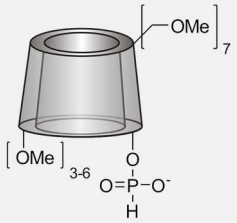
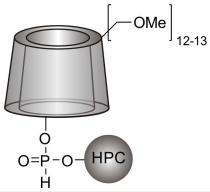
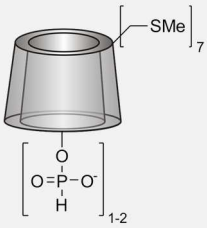
16		34	43	66
18		28	14	39
8a		31	0* (83mM)	22
15		23	53	26
19		24	46	53
23		30	53	69
25		28	41	51
24		5	13	6

Tabelle 14: Bindungskonstanten K [M^{-1}] für Estradiol, Testosteron und Hydrocortison

Derivat	Struktur	Estradiol [M^{-1}]	Testosteron [M^{-1}]	Hydrocortison [M^{-1}]
βCD		20952	846	1198
HPβCD		40614	13032	1034
SBEβCD		50263	13283	352
RAMEβCD		48358	14990	783
12		76077	15210	3519
20		50433	6655	1281
16		52643	9147	1941
18		32502	1520	913

8a		45062	0*	282
15		30934	12255	365
19		35333	11592	1135
23		43335	20831	2216
25		38588	8323	1105
24		14543	1154	6

6.5 Einschluss von Ibuprofen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Titration der Cyclodextrin-Hyaluronsäure Polymere mit dem Gast Ibuprofen (als Natriumsalz) durchgeführt. Dazu wurde neben den polymeren Verbindungen auch das Komplexiervermögen von Monocys-CD**12** untersucht, um eine vergleichbare Aussage darüber treffen zu können, welchen Einfluss das Polymer auf die Ausbildung des Komplexes besitzt.

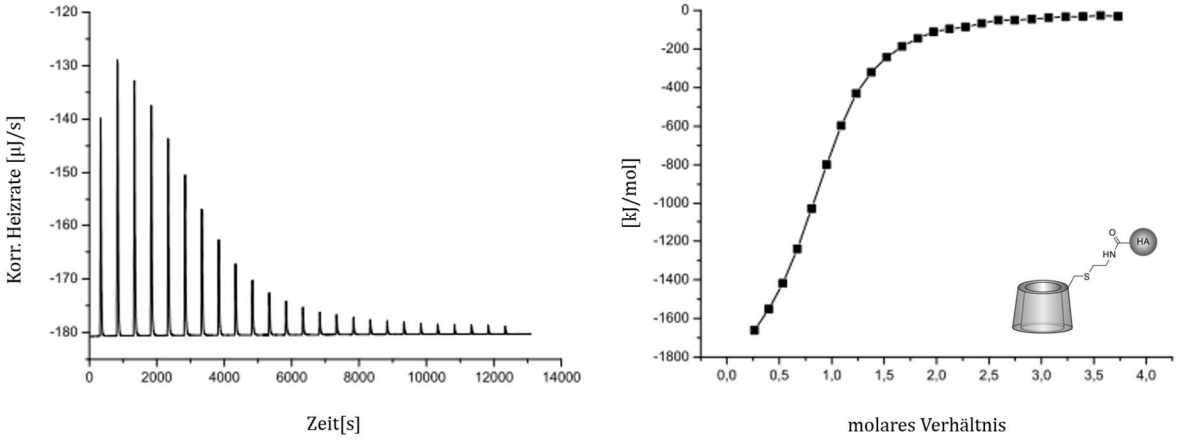
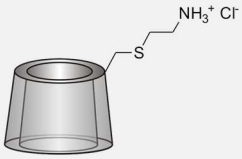
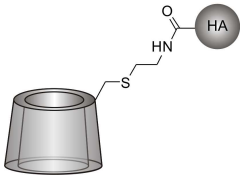
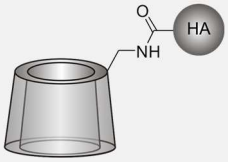


Abb. 34: kalorimetrische Titration für Ibuprofen mit HA-CD-Konjugat **16**

Abb. 34 zeigt beispielhaft die ermittelten Wärmeflüsse während der Titration gegen die Zeit, wobei jedes Signal dabei einer Injektion entspricht, sowie die Reaktionswärme, die durch Integration der um die Verdünnungswärme korrigierten Wärmeflüsse ermittelt wird, gegen das molare Verhältnis (Gast:Wirt). Die Aufnahme der Verdünnungswärme ist notwendig, um Vorgänge, die eine Wärmetönung verursachen, aber nicht zur Komplexierung beitragen, heraus zu filtern. Es wurde eine typische S-förmige Titrationskurve erhalten. Liegt der Wendepunkt der Kurve bei einem Verhältnis von 1.0, liegt ein 1:1 Komplex vor.

In **Tabelle 14** sind die thermodynamischen Daten der Einschlussverbindungen mit Ibuprofen aufgelistet. Bei allen Komplexierungen handelte es sich um exotherme Reaktionen.

Tabelle 15: Thermodynamische Daten der Einschlussverbindungen von β-CD und den HA-CD-Derivaten 15, 16 und 17 mit Ibuprofen in 0.1 M Phosphatpuffer bei pH = 7.2 und 25°C.

Derivat	Struktur	K_S [M^{-1}]	ΔH [kJ/mol]	TΔS [kJ/mol]	N (Gast:Wirt)
βCD		7910	-15.79	6.48	1.04
15		8789	-16.69	5.84	1.28
16		12872	-15.82	7.63	0.70
17		5200	-14.96	6.06	0.72

Die Funktionalisierung des nativen βCDs führte zu einer leichten Verbesserung des Einschlusses von Ibuprofen. Durch die Einführung des hydrophoben Schwefels kann die Kavität vergrößert und eine Komplexierung begünstigt werden. Auch hier wird durch die Anbindung an Hyaluronsäure der Komplex stabilisiert. Die niedrigeren Werte für Enthalpie und Entropie sowie die geringere Bindungskonstante von Konjugat **17** könnten auf eine sterischen Hinderung der direkt an der Kavität angebundenen HA zurückzuführen sein, wodurch der Einschluss des Isobutyl-Benzyl-Gruppe in der Kavität erschwert wird. Während das Verhältnis von Gast:Wirt im Falle des ungebundenen CDs bei etwa 1.1 liegt, wird bei den Polymeren ein Verhältnis von etwa 0.7 beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Polymere durch die räumliche Nähe der CDs zueinander dazu neigen, 1:2 Komplexe mit dem Wirkstoff auszubilden.

Insgesamt konnte durch die Untersuchung mittels Mikrokalorimetrie nachgewiesen werden, dass die Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Polymere zur Ausbildung stabiler Komplexe mit Ibuprofen fähig sind.

6.6 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die funktionalisierten CDs und CD-Polymere dazu in der Lage sind, die vorgestellten Wirkstoffe einzuschließen, um somit eine deutliche Steigerung der Löslichkeit in wässrigem Medium zu erzielen. Dabei wurde deutlich, dass die neuen CD-Derivate hinsichtlich ihrer Solubilisierung mit den kommerziellen, statistischen Derivaten durchaus konkurrieren können und teilweise deutlich bessere Bindungskonstanten liefern. Es hat sich zudem gezeigt, dass die Auswahl und vor allem die Anzahl der Substituenten am CD einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen CD und Wirkstoff und die Stabilität des Komplexes hat. So sind die teil-methylierten CD-Derivate mit einem MS von 2.0 – 2.4 vorwiegend für den Einschluss von Sevofluran und Midazolam geeignet, während RAMEβCD und die unsubstituierten CDs stabilere Komplexe mit Propofol und den Steroid-Derivaten ausbilden. Das vollständig methylierte TRIMEβCD schließt hingegen keinen der vorgestellten Wirkstoffe ein. Des Weiteren fiel auf, dass sich die kovalente Anknüpfung der CD-Derivate an die neutrale HES positiv auf die Solubilisierung der Anästhetika ausübt, was durch den Einschluss der Gastkomponente außerhalb der CD-Kavität in der Polymermatrix erklärt werden kann. Insgesamt konnten für die CD-Polymere aber vergleichbare Werte wie für die monomeren Verbindungen bestimmt werden. Um einen detaillierten Einblick in den Einschluss der einzelnen Wirkstoffe in den Kavitäten zu gewinnen und genaue Erkenntnisse über den Einfluss der verschiedenen Substituenten auf die Wechselwirkungen des CDs mit den Gastmolekülen zu erhalten müssten ROESY-Experimente durchgeführt werden.

7 Zusammenfassung

Die kovalente Anbindung von Cyclodextrinen an Polymere ist ein interessantes und vielfältiges Feld in der Entwicklung von Transportsystemen im Bereich Drug Delivery. Aufgrund des exzellenten Komplexiervermögens der CDs, stellen solche Systeme ideale Wirte für schlecht lösliche Wirkstoffe dar. In dieser Arbeit konnten hydrophile und methylierte Cyclodextrine über verschiedene Kupplungstechniken kovalent an Hydroxyethylstärke, Hyaluronsäure und Hydroxypropylcellulose gebunden und charakterisiert werden. Als Kupplungsmethoden dienten dabei die „Click"-Chemie, die Amidkupplung mithilfe von CDMT sowie die Anbindung über einen H-Phosphonatester. Zytotoxische Untersuchungen zeigten, dass durch die Fixierung methylierter CDs an Hydroxyethylstärke deren toxischer Effekt deutlich reduziert werden konnte. Dadurch ist es möglich, einen Durchtritt methylierter CD-Derivate durch biologisch wichtige Membranen und den damit verbundenen negativen Auswirkungen zu verhindern, aber einen gezielten Transport von hydrophoben Wirkstoffen durch die Membran zu gewährleisten. Es wurde außerdem das Einschlussverhalten dieser CD-Derivate gegenüber ausgewählten Anästhetika und Steroiden sowie Ibuprofen mit Hilfe der Methode der Löslichkeitsisothermen, der Head-Space Gaschromatographie und der isothermen Titrationskalorimetrie untersucht und die Stabilität der Komplexe bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die polymeren Cyclodextrin-Verbindungen ähnlich gute Bindungseigenschaften und Solubilisierungseffekte wie ihre monomeren Derivate, jedoch deutlich bessere Werte als natives β-CD aufweisen. Zudem wurde gezeigt, dass die synthetisierten Derivate ein vergleichbar gutes oder sogar verbessertes Einschlussverhalten wie die statistisch substituierten und kommerziell erhältlichen CDs gegenüber den untersuchten Gastmolekülen besitzen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Cyclodextrin-Polysaccharid-Konjugate stellen somit aufgrund ihrer guten Komplexierungseigenschaften sowie ihrem sehr geringen zytotoxischem Potential ideale Kandidaten für die Solubilisierung und den Transport schlecht wasserlöslicher Wirkstoffe dar.

8 Experimenteller Teil

8.1 Materialien

Die verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Merck* und *Acros Organics* erhalten und ohne weiteren Reinigungsschritte verwendet.

Die verwendete Hydroxyethylstärke (batch Nr: 17120211) mit einer mittleren molaren Masse von 130 kDa und einem Substitutionsgrad von 0.4 wurde von *Fresenius Kabi*, Friedberg, zur Verfügung gestellt. β-CD wurde von der Firma *Wacker Chemie GmbH*, München, erhalten. Die HES wie auch das β-CD wurden vor Verwendung über Nacht im HV bei 60°C getrocknet. Die benutzte Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 27 kDa wurde von der Firma *BaccaraRose* bezogen. Die in dieser Arbeit verwendete Hydroxypropylcellulose mit einer durchschnittlichen molaren Masse von 100.000 g/mol und einen MS-Wert von 4.5 wurden von Sigma Aldrich erhalten.

Absolutierte Lösemittel wurden gemäß der Standardverfahren getrocknet und entweder direkt eingesetzt oder über Molsieb aufbewahrt.
Alle übrigen Chemikalien wurden vom Zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes bezogen und in gelieferter Qualität genutzt.

8.2 Methoden und Geräte

Die **Löslichkeitsisothermen** in dieser Arbeit wurden mit Midazolam, Propofol, Estradiol, Hydrocortison und Testosteron gemessen. Alle Wirkstoffe besitzen eine sehr schlechte Löslichkeit in Wasser, was bei einer medizinischen Verwendung entweder die Applikation erschwert oder Nebenwirkungen mit sich bringt.

Zur Messung der Löslichkeitsisothermen wurde von jedem CD-Derivat eine Konzentrationsreihe (2 - 20 mM) in HEPES-Puffer (pH: 7.4) angesetzt. Die Lösungen wurden mit der jeweiligen Gastkomponente gesättigt und über Nacht bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gerührt, um eine Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Mit Hilfe eines Cellulose-Spritzenfilters wurde die Lösung von unlöslichen Resten getrennt und der Gehalt des Gastes mittels UV/VIS-Spektroskopie bei der entsprechenden Wellenlänge bestimmt. Um den Gehalt an Wirkstoff zu bestimmen, musste von jedem Gast zuerst der Extinktionskoeffizient in Ethanol,

sowie die Grundlöslichkeit in HEPES-Puffer bestimmt werden. Beide Werte sind für den jeweiligen Gast in **Tabelle 16** angegeben und stimmen mit der Literatur überein.[118,201–203] Zudem wurde die Absorption der Wirtverbindungen bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen und von der Absorption des Komplexes abgezogen.

Tabelle 16: Extinktionskoeffizient ε und Grundlöslichkeit S_0 in HEPES-Puffer der ausgewählten Wirkstoffe

Wirkstoff	Extinktionskoeffizient ε [M^{-1} cm^{-1}]	UV_{Max} [nm]	Grundlöslichkeit S_0 [µM]
Midazolam	23500	240	40
Propofol	1812	272	791
Estradiol	2090	281	10
Testosteron	15890	237	82
Hydrocortison	15860	241	1022

UV-Spektren wurden mit einem UV/VIS-Spektrometer Lambda 2 von *Perkin Elmer* bzw. dem Spektrometer Evolution 220 der Firma *Thermo* aufgenommen.

NMR-Spektren wurden mit einem Spektrometer des Typs Magnet Spin 400 MHz Ultra shield plus der Firma *Burker Biospin* bei Raumtemperatur aufgenommen. Zur Auswertung wurden ^{1}H-, ^{13}C-, ^{31}P, sowie HH-COSY- und HSQC-Spektren aufgenommen. Die Spektren wurden anschließend mit der Software ACDLabs 10.0 der Firma *Advanced Chemistry Development Inc.* ausgewertet.

^{1}H-NMR-Spektren wurden mit einer Messfrequenz von 400 MHz und 64Pulsen aufgenommen. Dazu wurden ca. 20 mg der Substanz eingewogen und in 550 µl deuteriertem Lösemittel (D_2O, DMSO-d_6 oder $CDCl_3$) gelöst. Die Referenzen der nicht vollständig deuterierten Lösemittel zählen als interner Standard (δ(DMSO-d_6)=2.50 ppm, δ($CDCl_3$)=7.25 ppm) bzw. 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS, δ(DSS)=0.00 ppm) bei D_2O. Verwendete Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett von Dublett, m = Multiplett.

^{13}C-NMR-Spektren wurden mit einer Messfrequenz von 100 MHz und 1000 Puls aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm (parts per million) angegeben.

^{31}P-NMR-Spektren wurden mit einer Messfrequenz von 160 MHz aufgenommen. Als interner Standard wurde H_3PO_4 in D_2O ($\delta(H_3PO_4)$=0.00 ppm) verwendet.

Die **IR-Spektren** wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Tesor 27 der Firma *Bruker Optik GmbH* mit der GoldenGate-Micro-ATR-Technik aufgenommen und mittels der Software OPUS der gleichnamigen Firma ausgewertet. Die Wellenzahlen charakteristischer Banden sind als ν(Gruppe) in cm^{-1} angegeben.

Die **Massenspektren** wurden mit dem Micromass ZQ-4000 der Firma *Waters GmbH* aufgenommen.

Für die **Dünnschichtchromatographie** wurden Fertigfolien der Firma *Machery-Nagel & Co* verwendet. Die Verbindungen wurden durch Eintauchen in eine ethanolische Schwefelsäure-Lösung und anschließender Erwärmung mit einem Heißluftfön sichtbar gemacht.

Zur Reinigung der Produkte wurde eine kontinuierliche **Nanofiltration** gegen bidestilliertes Wasser in einer Stahlzelle der Firma *Berghof* mit 200 mL Inhalt und einer HPLC-Pumpe der Firma Besta HD2-200 durchgeführt. Dafür wurde eine Polyethersulfon- sowie eine Cellulose-Membran der Firma *Microdyn-Nadir GmbH* mit einer Ausschlussgrenze von 500 Da verwendet. Die Nanofiltration über eine 1000 Da Polyethersulfon-Membran der Firma *Microdyn-Nadir GmbH* erfolgte unter Stickstoffzufuhr (4 Bar) in einer 400 mL-Zelle der Firma Millipore.

Die Ultrafiltration gegen bidestilliertes Wasser erfolgte, in Abhängigkeit der Produktmenge, in einer Zelle der Firma Millipore mit 100 bzw. 400 mL Inhalt und unter Stickstoffzufuhr (4 Bar). Dafür wurde eine Membran der Firma *Microdyn-Nadir GmbH* (Regeneratcellulose, cut-off: 5 bzw. 10 kDa) verwendet. Zudem wurde mit eine Cross-Flow-Membran der Firma *Satorius* (Vivaflow 200, Polyethersulfon und Hydrosart) mit einer Schlauchpumpe der Firma *Cole Parmer* (Masterflex L/S) gearbeitet.

Zur **Gefriertrocknung** wurde die Lyophille Alpha der Firma *Christ* verwendet.

Die **Elementaranalysen** wurden an der Servicestelle Analytik an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

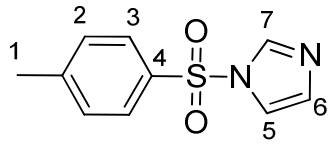
Die **ITC Messungen** wurden mit der Nano ITC 2G der Firma *TA Instruments* durchgeführt. Die Auswertung der Titrationskurven erfolgte mit der Software NanoAnalyze der gleichnamigen Firma.

Die **GC-Messungen** wurden mit dem GC Shimadzu 17A mit Autosampler AOC17 durchgeführt. Um die Abnahme des Dampfdrucks zu bestimmen wurden in 5 mL GC-Vials verschiedene Konzentrationen der Wirtkomponente (0 – 8 mM) in isotonischem HEPES-Puffer (pH: 7.4) gelöst. Die Gläser wurden anschließend mit einem Silikon-Septum mit Aluminiumkappe verschlossen. Danach erfolgte die Zugabe von 3 µL Sevofluran Stammlösung (1%ige Lsg. in Ethanol). Das Verhältnis der Volumina von flüssiger Phase (V = 1.8 mL) und Gasphase (V = 3.2 mL) betrug dabei f = 1.77. Nach Gleichgewichtseinstellung zwischen flüssiger und Gasphase (ca. 15 Minuten) wurde jede Probe einzeln in den GC injiziert und analysiert. Die Henry Konstante wurde zu k_H=2.0 bei 25°C nach bekannter GC-Methode ermittelt[109] und stimmt mit der Literatur überein.[204] Aus dem Massenwirkungsgesetz konnte schließlich der Belegungsgrad x (mol%) nach Gleichung 4 berechnet werden. Die Löslichkeit des ungebundenen Wirkstoffes Sevofluran beträgt bei 25 °C in Wasser [G] = 5.3 mM. Dieser Wert wurde aus dem idealen Gasgesetz, seinem Dampfdruck (p = 263 mbar) und der ermittelten Henry-Konstante nach Gleichung 5 berechnet. R steht für die Gaskonstante (R = 8.314$\frac{J}{mol*K}$) und T für die Temperatur in Kelvin.

8.3 Synthese von Polysaccharid-Cyclodextrin Derivaten über Click-Chemie

8.3.1 Synthese der Cyclodextrin-Bausteine

1a *p*-Toluolsulfonsäureimidazol



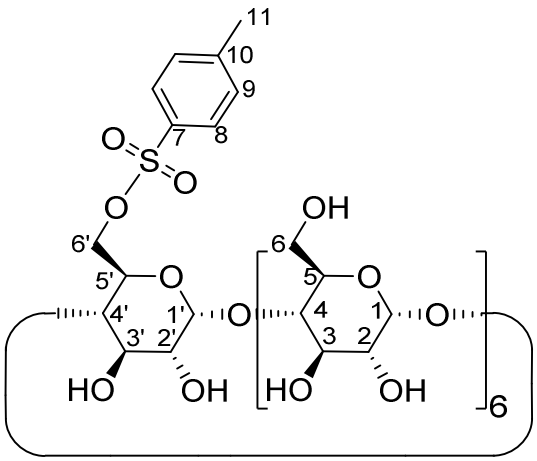
30 g (157.5 mmol) p-Toluolsulfonylchlorid werden in 150 mL Dichlormethan gelöst und im Eisbad gekühlt (Lösung A). In einem weiteren Kolben werden 24 g (354 mmol) Imidazol in 150 mL Dichlormethan gelöst und über einen Tropftrichter über 1.5 h unter Stickstoffatmosphäre in Lösung A überführt. Es wird auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 h gerührt. Anschließend wird filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Dann wird das Produkt aus 170 mL Hexan gefällt und der Niederschlag abgesaugt. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 32.59 g (146.43 mmol, 93%)

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d6)

δ = 8.37 (s, 1H, H-7), 7.97 (d,$^3J_{3,2}$ = 8 Hz, 2H, H-3), 7.96 (s, 1H, H-5), 7.49 (d, $^3J_{2,3}$ = 8 Hz, 2H, H-2), 7.12 (s, 1H, H-6), 2.39 (s, 3H, H-1).

1 Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)]-β-Cyclodextrin



70 g (61.68 mmol) β-Cyclodextrin und 17.8 g (80 mmol) ***p*-Tolouolsulfonsäureimidazol** werden in 700 mL Wasser in einem 1 L Erlenmeyerkolben für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 20 g NaOH in 100 mL Wasser versetzt und für weitere 10 min gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat mit 40 g Ammoniumchlorid und 100 mL 1 M HCl auf pH 7 gebracht. Danach wird über eine Glasfilterfritte filtriert und drei Mal mit je 100 mL kaltem Wasser und 100 mL Aceton gewaschen. Es wird aus 25 mL heißem Wasser umkristallisiert und über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 18.18 g (14.10 mmol, 23 %)

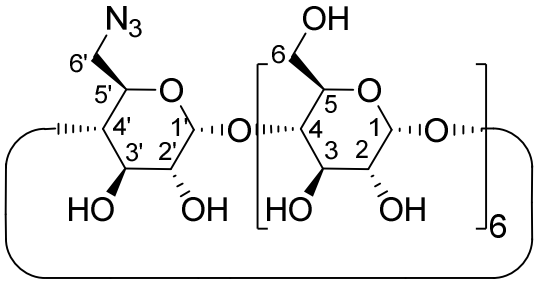
^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d6)

δ = 7.76 (d, $^{3}J_{8,9}$ = 8 Hz, 2H, H-8), 7.44 (d, $^{3}J_{9,8}$ = 8 Hz, 2H, H-9), 5.64 – 5.85 (m, 14H, OH-2/2', OH-3/3'), 4.77 - 4.84 (m, 7H, H-1/1'), 4.37 – 4.53 (m, 6H, OH-6), 4.31 – 4.34 (m, 1H, H-6'a), 4.19 (m,1H, H-6'b), 3.43 – 3.65 (m, 26H, H-3/3', H-5/5', H-6a/b), 3.22 – 3.38 (m, 14H, H-2/2', H-4/4'), 2.43 (s, 3H, H-11).

^{13}C-NMR: (100 MHz, $CDCl_3$)

δ = 144.87 (C-7), 132.70 (C-10), 129.94 (C-9), 127.63 (C-8), 102.27 (C-1'), 101.97 (C-1), 81.57 (C-4'), 81.19 (C-4), 73.11 (C-5), 72.09 (C-2/2'), 71.91 (C-3/3'), 69.76 (C-6'), 68.95 (C-5'), 59.93 (C-6), 21.26 (C-11).

2 Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-Cyclodextrin



8.5 g (6.59 mmol) Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)-β-Cyclodextrin **1** und 7.44 g (114.47 mmol) Natriumazid werden in 130 mL Wasser gegeben und für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wird das Reaktionsprodukt auf Raumtemperatur abgekühlt, 130 mL Aceton hinzugegeben und bei 4°C auskristallisiert. Es wird abgesaugt, mit Aceton gewaschen und über Nacht im HV getrocknet.

Ausbeute: 6.24 g (5.38 mmol, 82%)

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO)

δ = 5.58 – 5.86 (m, 14 H, 2/2'-OH, 3/3'-OH), 4.87 (s, 1H, H-1'), 4.82 (s, 1H, H-1), 4.44 – 4.55 (m, 6H, 6-OH), 3.42 – 3.83 (m, 28 H, H-3/3', H5/5', H-6a/6'a, H-6b/6'b), 3.21 – 3.46 (m, 14H, H-2/2', H-4/4').

^{13}C-NMR: (100 MHz, DMSO)

δ = 102.53 (C-1'), 102.18 (C-1), 83.23 (C-4'), 81.80 (C-4), 73.37 (C-3/3'), 72.64 (C-2/2'), 72.43 (C-5), 72.23 (C-5'), 60.18 (C-6), 30.93 (C-6').

MS (ESI): m/z 1160.00 ($[M+H]^+$ $[C_{42}H_{69}N_3O_{34}]$)

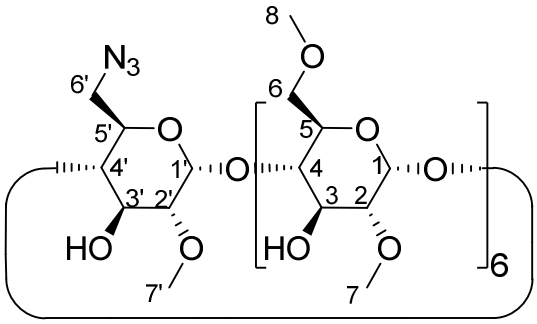
IR: $\tilde{\nu}$[cm^{-1}] = 3283 (OH), 2922 (CH), 2106 (N_3), 1335 (OH), 1152 (CO).

CHN – Analyse: $C_{42}H_{69}N_3O_{34}$ (M = 1160.00 g/mol):

Theorie: C= 43.19%; H= 6.00%; N= 3.62%

Gefunden: C= 43.19%; H= 6.25%; N= 3.35%

3 Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-Cyclodextrin



3.0 g (2.59 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-Cyclodextrin **2** werden in 150 mL DMF:DMSO (1:1) vorgelegt. Unter Stickstoffatmosphäre wird ein Gemisch aus 26 g (168 mmol) BaO und 26 g $Ba(OH)_2$ (153 mmol) portionsweise innerhalb von 40 min zugegeben. Die Suspension wird im Eisbad auf 0°C gekühlt. Die Zugabe von 30 mL (0.32 mol, ρ = 1.33 g/mL) Dimethylsulfat erfolgt innerhalb von 1h unter Konstanthaltung der Temperatur unter 5°C. Nach Rühren bei RT für 4 Tage wird das Gemisch für 30 min auf 85°C erhitzt, anschließend auf RT abgekühlt, 100 mL 12%ige NH_4OH zugegeben und im Wasserbad über Nacht gerührt. Nach Neutralisieren mit HCl wird das Lösemittel vollständig am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand je zwei Mal mit 400 ml Chloroform für 20 Minuten refluxiert. Der Feststoff wird abfiltriert und die Chloroformphase bis zur Trockne einrotiert. Das Produkt wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.5 g (1.86 mmol, 72%)

DS 2.2

^{1}H-NMR: (400 MHz, $CDCl_3$)

δ = 5.25 – 4.94 (m, 12H, H-1/1‘, OH-3/3‘), 3.94 – 3.92 (m, 7H, H-3/3‘), 3.75 – 3.40 (m, 74H, H-4/4‘, H-5/5‘, H-6/6’a/6’b, H-7/7‘, H-8, OMe-3), 3.29 – 3.21 (m, 7H, H-2/2‘).

^{13}C-NMR: (100 MHz, $CDCl_3$)

δ = 101.3 (C-1), 83.5 (C-4), 82.0 (C-2), 73.2 (C-3), 70.8 (C-6a/b), 70.3 (C-5), 61.7 - 58.2 (C-7, C-8, OMe-3), 51.8 (C-6’a/b).

MS (ESI) m/z 1364.63 ($[M+Na]^+$ $[C_{55}H_{95}N_3O_{34}]$),

m/z 1378.02 ($[M+Na]^+ +CH_3$ $[C_{56}H_{97}N_3O_{34}]$),

m/z 1392.64 ($[M+Na]^+ +2CH_3$ $[C_{57}H_{99}N_3O_{34}]$ intensivster Peak)

m/z 1406.29 ($[M+Na]^+ +3CH_3$ $[C_{58}H_{101}N_3O_{34}]$),

m/z 1420.20 ($[M+Na]^+ +4CH_3$ $[C_{59}H_{103}N_3O_{34}]$).

IR $\tilde{\nu}$[cm^{-1}] = 3412 (OH), 2930 (CH), 2102 (N_3), 1453 (CH), 1361 (OH).

3a Alternative mit NaOH

5.80 g (5 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-cyclodextrin **2** werden unter N_2 in 100 mL absolutem DMF gelöst. Dann werden 3.12 g (78 mmol) NaOH über 10 Minuten in kleinen Portionen hinzugegeben. Die Lösung wird auf -10 °C gekühlt. 10.25 g (81.25 mmol) Dimethylsulfat werden tropfenweise hinzugegeben und für weitere 4 Stunden bei -10 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung auf 85 °C für 30 Minuten erwärmt. Nach Abkühlen auf RT wird überschüssiges DMS durch Zugabe von 20 mL 25 wt. % wässriger Ammoniak Lösung zerstört und für weitere 16 h gerührt. Das Lösemittel wird entfernt, das Rohprodukt in 100 mL Wasser gelöst und 3 Mal mit je 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird anschließend einmal mit Brine gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösemittels wird das Produkt im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 6.64 g (4.78 mmol, 96%)

DS: 2.3

^{1}H-NMR: (400MHz, $CDCl_3$)

δ = 5.26 – 4.95 (m, 11H, H-1/1‘, OH-3/3‘), 3.94 – 3.92 (m, 7H, H-3/3‘), 3.76 – 3.40 (m, 76H, H-4/4‘, H-5/5‘, H-6/6’a/6’b, H-7/7‘, H-8, OMe-3), 3.28 – 3.19 (m, 7H, H-2/2‘).

^{13}C-NMR: (100 MHz, $CDCl_3$)

δ = 101.3 (C-1), 83.6 (C-4), 81.6 (C-2), 73.2 (C-3), 70.9 (C-6a/b), 70.3 (C-5), 60.4 - 59.1 (C-7, C-8, OMe-3), 51.3 (C-6’a/b).

MS (ESI) m/z 1364.63 ($[M+Na]^+$ $[C_{55}H_{95}N_3O_{34}]$),

m/z 1378.79 ($[M+Na]^+$ $+CH_3[C_{56}H_{97}N_3O_{34}]$),

m/z 1391.83 ($[M+Na]^+$ $+2CH_3[C_{57}H_{99}N_3O_{34}]$),

m/z 1406.51 ($[M+Na]^+$ $+3CH_3[C_{58}H_{101}N_3O_{34}]$ intensivster Peak)

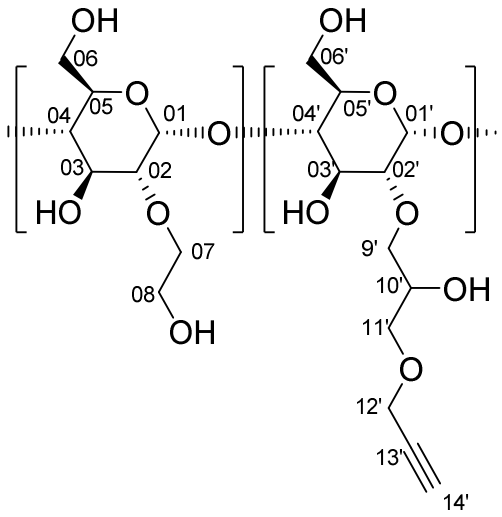
m/z 1420.43 ($[M+Na]^+$ $+4CH_3[C_{59}H_{103}N_3O_{34}]$),

m/z 1435.04 ($[M+Na]^+$ $+4CH_3[C_{60}H_{105}N_3O_{34}]$).

IR $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2926 (CH), 2102 (N_3), 1456 (CH), 1365 (OH).

8.3.2 Modifizierung der Hydroxyethylstärke-Bausteine

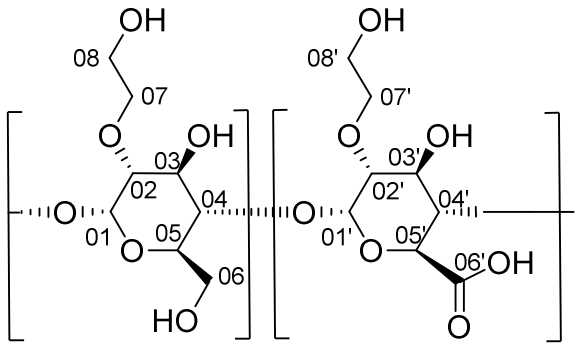
4 (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hydroxyethylstärke



Unter Sticktoffatmosphäre werden 3.41 g (18.98 mmol) HES in 40 mL 0.1M NaOH gelöst, 1.8 mL (16.70 mmol, ρ = 1,05 g/mL) Glycidylpropargylether zugetropft. Die Temperatur wird auf 35°C erhöht und die Lösung für 24 h gerührt. Anschließend werden weitere 1.8 mL (16.70 mmol) Glycidylpropargylether hinzugegeben und nochmals für 16 h gerührt. Dann wird aus ca. 500 mL Isopropanol gefällt, über eine Glasfilterfritte abgesaugt und mit Isopropanol gewaschen. Nach Lösen in Wasser und neutralisieren mit 0.1M HCl, wird mit Wasser gegen eine 5kDa Cellulose-Membran ultrafiltriert und abschließend lyophilisiert.

Ausbeute:	3.61 g (14.97 mmol, 79%)
DS:	0.65
^{1}H-NMR:	(400 MHz, DMSO-d_6/D_2O)
	δ = 5.68 – 5.38 (m, 1H, H-01/01‘), 4.27 (s, 1.30H, H-12‘), 4.03 – 3.45 (m, 10H, H-02/02‘, H-03/03‘, H-04/04‘, H-05/05‘, H-06/06‘, H-07, H-08, H-9‘, H-10‘, H-11‘, H-14‘).
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2925 (CH), 2113 (-C≡C), 1456 (CH), 1365 (OH).

5 oxidierte Hydroxyethylstärke

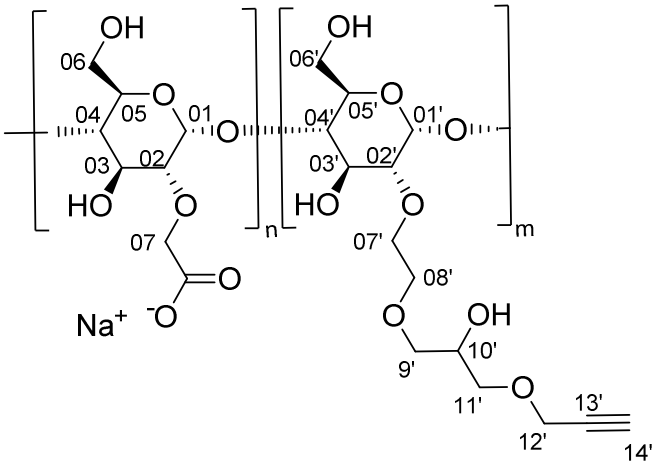


10.00 g (55.62 mmol) HES werden in 200 mL dest. Wasser gelöst und mit 1M NaOH auf pH = 8.5 gebracht. Nach Zugabe von 40 mg TEMPO (4mg/g Stärke) werden 124.33 mL (241 mmol, ρ = 1,206 g/mL) NaOCl (12%ig) gleichmäßig über ei-

nen Zeitraum von 2 h zugegeben und 30 min nachgerührt. Der pH wird während dieser Zeit ständig mit 1M NaOH auf etwa 8.5 – 9 eingestellt. Anschließend wird das Gemisch mit 4.21 g (11.24 mmol) $NaBH_4$ versetzt und über Nacht gerührt. Danach wird mit einer einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) mit Wasser ultrafiltriert. Abschließend wird das Produkt lyophilisiert. Der Substitutionsgrad (DS) wird über das Blumenkrantz-Essay bestimmt.

Ausbeute:	8.79g (42,50 mmol, 76 %)
DS:	0.27
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 5.68 - 5.60 (m, 1H, H-01/01‘), 4.27 – 3.36 (m, 7H, H-02/02‘, H-03/03‘, H-04/04‘, H-05/05‘, H-06, H-07/07‘, H-08/08‘).
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3210 (OH), 1591 (C=O), 1411 (C=O), 1322 (OH).

6 Oxidierte (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hydroxyethylstärke



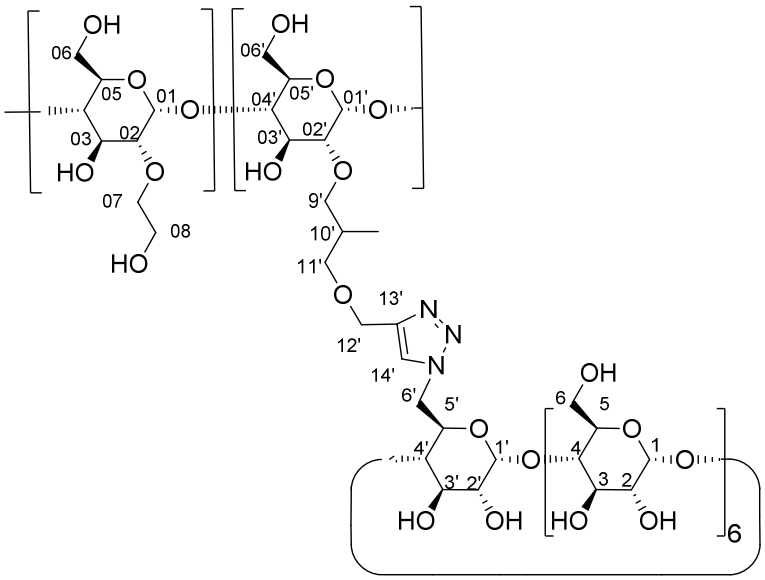
3.4 g (16.44 mmol) oxidierte HES **5** (DS 0.27) werden in 40 mL 0.1M NaOH gelöst und 1.8 mL (16.70 mmol) Glycidylpropargylether hinzugegeben. Die Temperatur wird auf 35°C erhöht und die Lösung für 24 h gerührt. Anschließend werden weitere 1.8 mL (16.70 mmol) Glycidylpropargylether hinzugegeben und nochmals für 16 h gerührt. Das Produkt wird aus 500 mL 2-Propanol gefällt, fil-

triert und mit 200 mL 2-Propanol gewaschen. Das Produkt wird durch Ultrafiltration mit Wasser und einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) aufgereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute:	4.02 g (14.97 mmol, 91%)
DS:	0.55
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 5.58 – 5.42 (m, 1H, H-01/01‘), 4.19 (s, 1.10H, H-12‘), 3.99 – 3.42 (m, 10H, H-02/02‘, H-03/03‘, H-04/04‘, H-05/05‘, H-06/06‘, H-07/07‘, H-08/08, H-9‘, H-10‘, H-11‘), 2.85 (bs, H-14‘).
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2926 (CH), 2114 (-C≡C), 1456 (CH), 1366 (OH).

8.3.3 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxyethylstärke-Konjugate über CuAAC

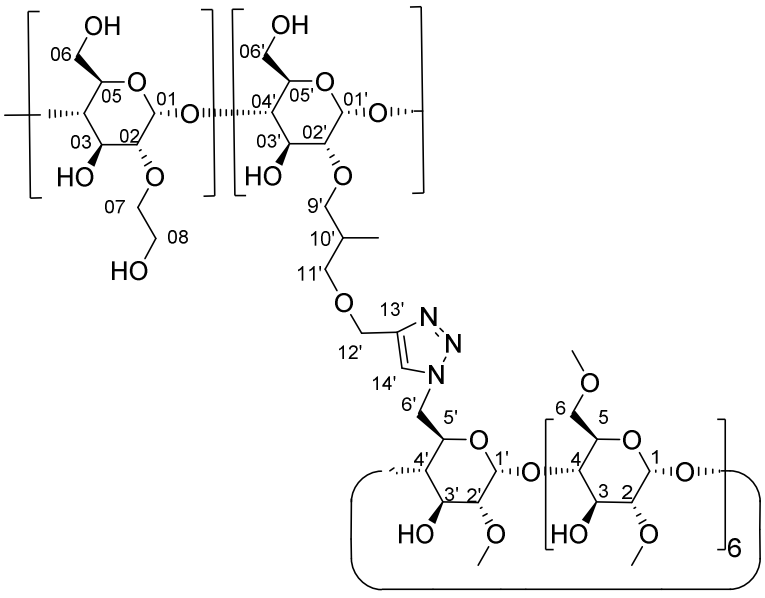
7 CD-HES-Konjugat aus 2 und 4



Unter Stickstoffatmosphäre werden 510 mg (0.4 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-β-CD **2** in 40 mL entgastem DMSO:H_2O (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 250 mg (1 mmol) (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hydroxyethylstärke **4** und 500 µL (50 µmol) einer wässrigen NaAsc-Lösung (20 mg/mL) wird das Gemisch auf 50°C erhitzt und anschließend 5 µL (1.4 µmol) einer wässrigen $CuSO_4*5H_2O$ - Lösung (70 mg/mL) zugegeben. Nach Rühren für 48 h bei 50°C wird das Produkt über Ultrafiltration mit einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) mit Wasser aufgereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute:	260 mg (0.07 mmol, 70%)
DS:	0.1
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 7.97 (s, 0.14H, H-14‘), 5.56 – 5.27 (m, 1H, H-01/01‘), 4.94 – 4.88 (m, 1H, H-1/1‘), 3.86 – 3.07 (m, 14H, H-02/02‘ – H-08/08‘, H2/2‘ – H-7/7‘, H8, H9‘ – H12‘).
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2926 (CH), 1456 (CH), 1365 (OH).

8 CD-HES-Konjugat aus 3 und 4



Unter Stickstoffatmosphäre werden 1.6 g (1.19 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3** in 40mL entgastem DMSO:H_2O (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 600 mg (2.4 mmol) (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hydroxyethylstärke **4** und 334 µL (119 µmol) einer wässrigen NaAsc-Lösung (70 mg/mL) wird das Gemisch auf 50°C erhitzt und anschließend 211 µL (59 µmol) einer wässrigen $CuSO_4$*$5H_2O$ -Lösung (70 mg/mL) zugegeben. Nach Rühren für 48h bei 50°C wird das Produkt über Ultrafiltration mit einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) aufgereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute:	1.67 g (2.15 mmol, 90%)
DS:	0.4
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 8.03 (s, 0.4H, H-14‘), 5.58 (m, 1H, H-01/01‘), 5.14 (m, 2.8H, H-1/1‘), 3.86 – 3.07 (m, 45H, H-02/02‘ – H-08/08‘, H2/2‘ – H-7/7‘, H8, H9‘ – H12‘).
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2925 (CH), 1456 (CH), 1365 (OH).

8b CD-HES-Konjugat aus 3a und 4

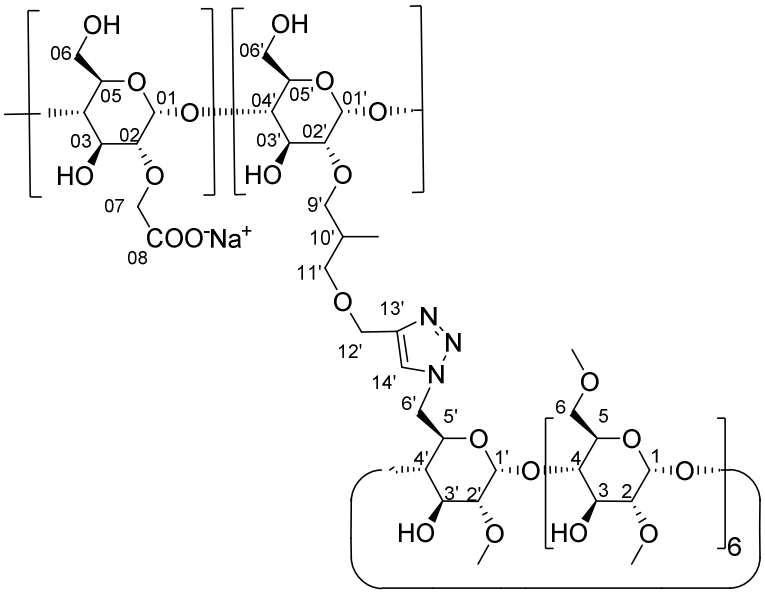
Unter Stickstoffatmosphäre werden 2.8 g (2.02 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3a** in 40 mL entgastem DMSO:H_2O (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 800 mg (3.4 mmol) (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hydroxyethylstärke **4** und 198 mg (500 µmol) NaAsc wird das Gemisch auf 50°C erhitzt und anschließend 250 mg (100 µmol) $CuSO_4$*$5H_2O$ -Lösung zugegeben. Nach Rühren für 48h bei 50°C wird das Produkt über Ultrafiltration mit einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) aufgereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute:	2.83 g (3.28 mmol, 96%)
DS:	0.35
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)

δ = 8.03 (s, 0.4H, H-14‘), 5.58 (m, 1H, H-01/01‘), 5.14 (m, 2.8H, H-1/1‘), 3.86 – 3.07 (m, 45H, H-02/02‘ – H-08/08‘, H2/2‘ – H-7/7‘, H8, H9‘ – H12‘).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2924 (CH), 1458 (CH), 1365 (OH).

9 CD-HES-Konjugat aus 3 und 6



Unter Stickstoffatmosphäre werden 1.0 g (0.72 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3** in 15 mL entgastem DMSO:H_2O (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 250 mg (1.02 mmol) oxidierter (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hydroxyethylstärke **6** und 138 µL (70 µmol) einer wässrigen NaAsc-Lösung (70 mg/mL) wird das Gemisch auf 50°C erhitzt und anschließend 100 µL (40 µmol) einer wässrigen $CuSO_4$*$5H_2O$-Lösung (70 mg/mL) zugegeben. Nach Rühren für 48h bei 50°C wird das Produkt über Ultrafiltration 5kDa Cross Flow Membran (PES) und Wasser aufgereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 850 mg (0.97 mmol, 95%)

DS: 0.45

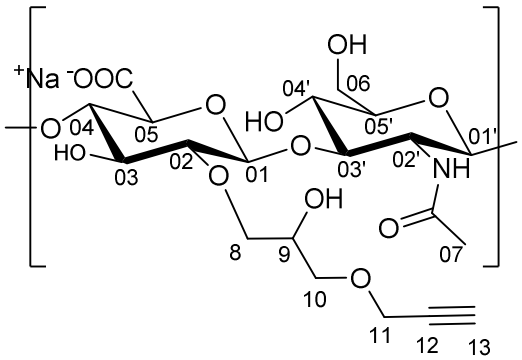
^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 8.04 (s, 0.45H, H-14‘), 5.52 (m, 1H, H-01/01‘), 5.14 (m, 2.98H, H-1/1‘), 3.86 – 3.07 (m, 60.78H, H-02/02‘ – H-08/08‘, H2/2‘ – H-7/7‘, H8, H9‘ – H12‘).

IR $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3381 (OH), 2926 (CH), 1609 (COO^-), 1454 (CH), 1364 (OH).

8.3.4 Synthese der Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Konjugate über CuAAC

10 (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-Hyaluronsäure



2 g (5.47 mmol) Hyaluronsäure werden unter Stickstoff in 40 mL 0.1 M NaOH gelöst und anschließend 1.8 mL (16.69 mmol) Glycidylpropargylether zugetropft. Nach vier Stunden werden weitere 1.8 mL (16.69 mmol) Glycidylpropargylether zugetropft und über Nacht gerührt. Anschließend wird aus 500 mL 2-Propanol gefällt und der erhaltene Feststoff mit 2-Propanol nachgewaschen. Der Feststoff wird in Wasser gelöst und mit 1M HCl auf pH 7 eingestellt. Danach wird mit Wasser und einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) ultrafiltriert und abschließend lyophilisiert.

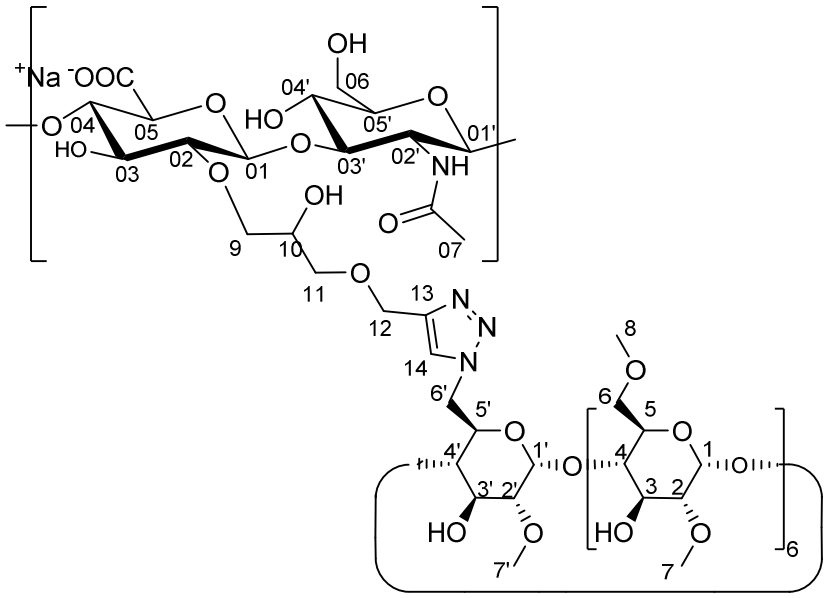
Ausbeute: 1.82 g (4.36 mmol, 80%)

DS: 0.5

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 4.67 - 4.34 (m, 2H, H-01/01‘), 4.24 (s, 0.99H, H-11), 4.04 – 3.31 (m, 13H, H-02/02‘ - H-06/06‘, H-8, H-9, H-10, H-13), 2.01 (s, 3H, H-7).

11 CD-HA-Konjugat aus 3 und 10



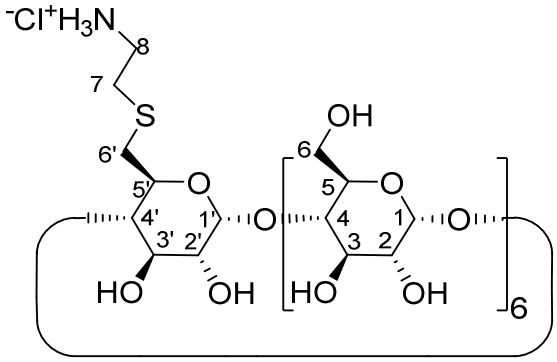
Unter Stickstoffatmosphäre werden 0.81 g (0.56 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3b** (DS = 2.7) in 30mL entgastem DMSO:H_2O (1:1) gelöst. Nach Zugabe von 500 mg (1.01 mmol) (3-Propargyloxy-2-Hydroxypropyl)-HA **10** und 171 µL (171 µmol) einer wässrigen NaAsc-Lösung (70 mg/mL) wird das Gemisch auf 50°C erhitzt und anschließend 108 µL (59 µmol) einer wässrigen $CuSO_4$*$5H_2O$ -Lösung (70 mg/mL) zugegeben. Nach Rühren für 24h bei 50°C wird das Produkt über Ultrafiltration mit Wasser und einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) aufgereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute:	1.04 g (0.91 mmol, 90%)
DS:	0.45
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 8.19 (s, 0.45H, H-14‘), 5.43 – 5.1 (m, 3.1H, H-1/1‘), 5.14 (m, 2.1H, H-01/01‘), 3.86 – 3.07 (m, 55H, H-02/02‘ – H-06, H2/2‘ – H-7/7‘, H8, H9 – H12), 2.06 (s, 3H, H-07).
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (OH), 2926 (CH), 2100 (C≡C), 1610 (COO^-), 1448 (C=O), 1371 (OH).

8.4 Synthese von Polysaccharid-Cyclodextrin Derivaten über CDMT-K□ppl□ng

8.4.1 Synthese der Cyclodextrin-Ba□steine

12 Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethyls□lfanyl)]-β-Cyclodextrin



8.5 g (6.59 mmol) Mono-[6-(*p*-toluolsulfonyl)-β-Cyclodextrin **2**, 6.67 g (59,06 mmol) Cysteamin Hydrochlorid und 42.58 mL (215.70 mmol) Triethylamin werden in 130 mL einer DMF/Wasser-Mischung (1:3) suspendiert und für vier Tage auf 60°C erwärmt. Die Lösung wird anschließend auf ¼ eingeengt und mit verdünnter Salzsäure (1M) angesäuert (pH ~ 3). Es wird aus kaltem Aceton gefällt und der Niederschlag abgesaugt. Der Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt, um noch enthaltenes DMF zu entfernen. Anschließend wird mit Wasser gegen eine 500 Da Cellulose-Membran nanofiltriert und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 6.87 g (5.58 mmol, 85 %)

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d6)

δ = 5.77 (bs, 14H, OH-2/2', OH-3/3'), 4.89 (d, $^3J_{1',2'}$ = 4 Hz, 1H, H-1'), 4.83 (bs, 6H, H-1), 3.75 – 3.81 (m, 1H, H-5'), 3.57 – 3.72 (m, 25H, H-5, H-6a/6b, H-3/3'), 3.20 – 3.41 (m, 14H, H-4/4', H-2/2'), 3.06 (d, $^3J_{6a',6b'}$ = 8Hz, 1H, H-6a'), 2.93 – 2.97 (m, 2H, H.8), 2.76 – 2.83 (m, 3H, H-6b', H-7).

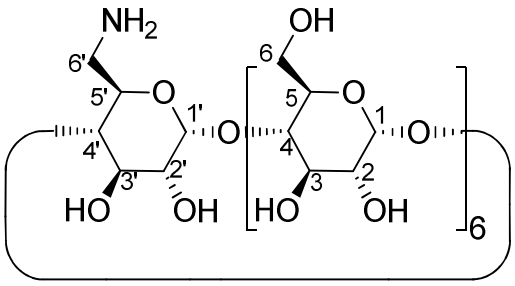
^{13}C-NMR: (100 MHz, DMSO)

δ = 102.21 (C-1'), 101.88 (C-1), 84.62 (C-4'), 81.56 (C-4), 73.04 (C-3/3'), 72.38 (C-2/2'), 72.03 (C-5), 70.57 (C-5'), 59.96 (C-6), 38.58 (C-8), 32.78 (C-6'), 29.58 (C-7).

MS (ESI): m/z 1194.14 ([M+H]$^+$ [$C_{44}H_{76}NO_{34}S$])

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3280 (OH), 2923 (CH), 1637 (NH_2), 1338 (OH), 1145 (CO).

13 Mono-(6-deoxy-6-amino-)-β-Cyclodextrin



2.09 g (1.72 mmol) Mono-(6-azido-6-deoxy)-β-Cyclodextrin **3** und 1.82 g (6.92 mmol) Triphenylphosphin werden in 100 mL trockenem DMF gelöst und bei Raumtemperatur 1 h gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr zu erkennen ist. Dann werden 16 mL 25%ige Ammoniumhydroxid-Lösung hinzu gegeben und für 18 h gerührt. Anschließend wird bis zur Trockne eingeengt, 9 mL 25%ige Ammoniumhydroxid-Lösung dazu gegeben und 30 min gerührt. Es wird abgesaugt und das Filtrat aus 500 mL kaltem Aceton gefällt. Das Gemisch wird noch für eine Stunde gerührt, der Niederschlag abgesaugt und in Wasser aufgenommen. Anschließend wird lyophilisiert.

Ausbeute: 1.60 g (1.41 mmol) farbloser Feststoff (82%)

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 5.06 (m, 7H, H-1/1'), 3.91 – 3.98 (m, 7H, H-3/3'), 3.84 – 3.91 (m, 19H, H-5/5', H-6a/b), 3.63 – 3.66 (m, 7H, H-2/2'),

3.55 – 3.60 (m, 6H, H-4), 3.45 – 3.49 (m, 1H, H-4'), 3.15 (d, 1H, H-6a'), 2.91 (m, 1H, H-6b').

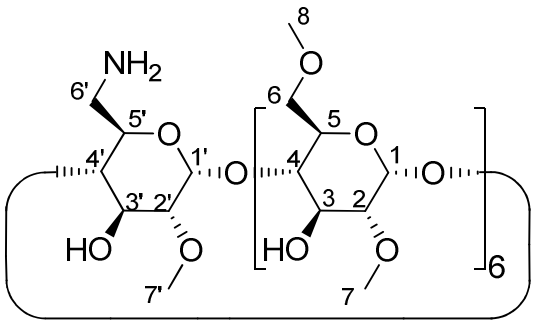
^{13}C-NMR: (100 MHz, D_2O)

δ = 101.84 (C-1'), 101.57 (C-1), 81.11 (C-4'), 80.87 (C-4), 73.06 (C-3/3'), 72.06 (C-2/2'), 71.79 (C-5/5'), 60.26 (C-6), 41.09 (C-6').

MS (ESI): m/z 1134.74 ([M+H]$^+$ [$C_{42}H_{71}NO_{34}$])

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3283 (OH), 2922 (CH), 1651 (NH_2), 1335 (OH), 1152 (CO).

14 Mono-(6-deoxy-6-amino)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-cyclodextrin



Unter Stickstoffatmosphäre werden 3 g (2.24 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3** in 100 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 2.36 g (9 mmol) Triphenylphosphin wird bei RT 1h gerührt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Anschließend werden 20 mL 25%ige NH_4OH zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Nach Einengen im Vakuum werden 5 mL NH_4OH zugegeben. Der entstandene Feststoff wird über eine Glasfilterfritte abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgt durch Nanofiltration mit Wasser gegen eine 500 Da Cellulose-Membran und anschließender Lyophilisation.

Ausbeute: 1.1 g (0.83 mmol, 37%)

DS: 2.1

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 5.17 – 5.12 (m, 7H, H-1/1‘) 3.84 – 3.40 (m, 56H, H-3/3’ - H-7/7‘), 3.31 – 3.18 (m, 24H, H-2/2‘, H-8).

^{13}C-NMR: (125 MHz, $CDCl_3$)

δ = 101.23 (C-1), 83.50 (C-4), 82.01 (C-2), 73.14 (C-3), 70.80 (C-6a/b), 70.25 (C-5), 62.12 - 57.92 (C-7, C-8, C-9).

MS (MALDI-TOF): m/z 1338.7 ($[M+Na]^+$ $[C_{55}H_{97}NO_{34}]$),

m/z 1352.8 ($[M+Na]^+$ $+CH_3$ $[C_{56}H_{99}NO_{34}]$ intensivster Peak),

m/z 1366.7 ($[M+Na]^+$ $+2CH_3$ $[C_{57}H_{101}NO_{34}]$),

m/z 1380.7 ($[M+Na]^+$ $+3CH_3$ $[C_{58}H_{103}NO_{34}]$),

m/z 1394.7 ($[M+Na]^+$ $+4CH_3$ $[C_{59}H_{105}NO_{34}]$)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3382 (OH), 2919 (CH), 1653 (NH_2), 1364 (OH).

14a Alternative mit Pd/C

700 mg (0.51 mmol) Mono-(6-deoxy-6-azido)-heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD **3** werden in 50 mL Ethanol gelöst. Nach Fluten mit Argon werden 27 mg (0.25 mmol) 10% Pd/C-Katalysator und Wasserstoff über einen Ballon unter Rühren zugegeben. Der Katalysator wird anschließend abzentrifugiert (2 mal 5 min mit je 5000 Umdrehungen). Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt über Nacht im HV getrocknet.

Ausbeute: 0.65 g (0.48 mmol, 95%)

^{1}H-NMR: (500 MHz, $CDCl_3$)

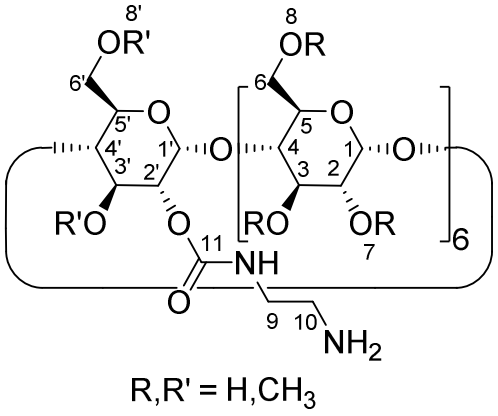
δ = 5.27 – 4.93 (m, 13H, H-1/1‘, OH-3/3‘), 3.96 – 3.82 (m, 7H, H-3/3‘),3.72 – 3.26 (m, 78H, H-4/4‘, H-5/5‘, H-6/6’a/6’b, H-7/7‘, H-8, OMe-3), 3.24 – 3.12 (m, 7H, H-2/2‘).

^{13}C-NMR: (125 MHz, $CDCl_3$)

δ = 101.23 (C-1), 83.50 (C-4), 82.01 (C-2), 73.14 (C-3), 70.80 (C-6a/b), 70.25 (C-5), 62.12 - 57.92 (C-7, C-8, OMe-3).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3382 (OH), 2919 (CH), 1653 (NH_2), 1364 (OH).

15 (2-aminoethyl)-carbamat-Methyl-β-Cyclodextrin



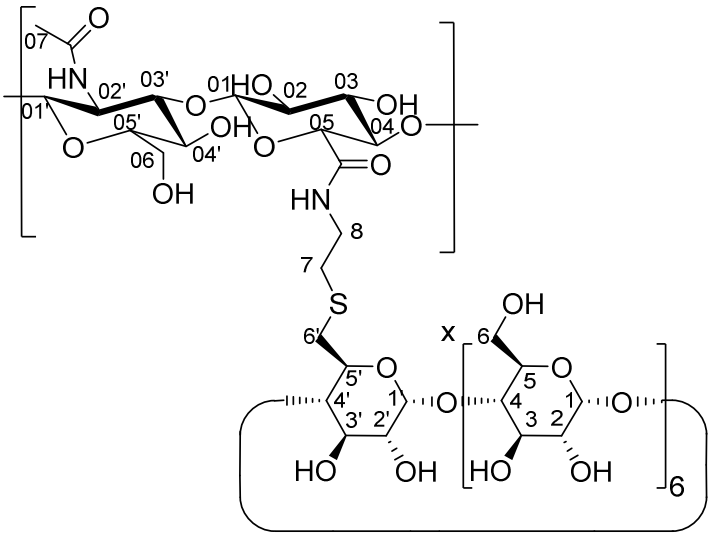
Unter Sticktoffatmosphäre werden 13.12 g (10 mmol) RAMEβCD (Cavasol W7) in abs. THF gelöst. 3.24 g (20 mmol) Carbonyldiimidazol werden zugegeben und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Danach werden 3 g (50 mmol) Ethylendiamin zugegeben und 24 h bei 60°C gerührt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Aceton aufgenommen und nichtlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Die Aceton-Phase wird in Dieethylether getropft, aus der das Produkt als weißer, fluffiger Feststoff ausfällt. Das Produkt wird schließlich abgesaugt und über Nacht im HV getrocknet.

Ausbeute:	13.51 g (9.66 mmol, 97%)
DS:	1.7
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 5.29 – 5.07 (dd, 7H, H-1/1‘), 4.01 – 3.25 (m, 84H, H-2/2‘ – H-8/8‘), 3.26 (m, 3.4H, H-9), 2.77 (m, 3.4H, H-10).
^{13}C-NMR:	(125 MHz, D_2O)
	158.03 (C-11), 100.82 – 98.85 (m, C-1/1‘), 81.34 – 59.50 (C-2/2‘ – C-8/8‘), 42.67 (C-9), 40.30 (C-10).
MS (ESI):	m/z 1375.79 ($M+H^+$ [$C_{56}H_{98}N_2O_{36}$])
	m/z 1390.02 ($M+H^+$ [$C_{57}H_{100}N_2O_{36}$])
	m/z 1461.17 ($M+H^+$ [$C_{59}H_{104}N_4O_{37}$])
	m/z 1475.60 ($M+H^+$ [$C_{60}H_{106}N_4O_{37}$])

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3382 (OH), 2928 (CH), 175 (C=O), 1530 (N-H), 1363 (OH).

8.4.2 Synthese der Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Konjugate

16 CD-HA-Konjugat aus 12 und nativer HA



1.77 g (4.06 mmol) HA werden in 200 mL Wasser und 130 mL ACN gelöst. Anschließend werden 1.76 g (10 mmol) CDMT und 1.8 mL (16.7 mmol, ρ = 0,93g/mL) NNM in 10 mL ACN und einem Tropfen Wasser gelöst und zur Reaktionsmischung zugegeben. Es wird bei RT für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 5 g (4.06 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-β-Cyclodextrin **12** wird bei RT für 20 h gerührt. Danach wird Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) zugegeben und für 1 h geschüttelt. Zur Aufreinigung wird mit einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) zuerst mit 0.05M NaCl und anschließend mit Wasser ultrafiltriert und das Produkt über Lyophilisation getrocknet.

Ausbeute: 2.93 g (3.2 mmol, 79 %)

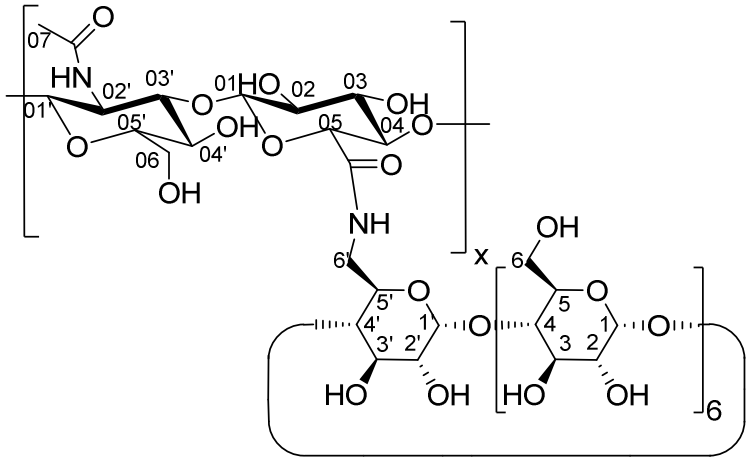
DS: 0.4

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 4.97 – 4.91 (m, 2.75H, H1/1''), 4.39 (d, 2H, H-01/01'), 3.93 – 3.21 (m, 28H, H-02/02', H-03/03', H-04/04', H-05/05', H-06', H2/2', H-3/3', H-4/4', H-5/5', H-6/6', H-7, H.8), 1.84 (s, 3H, H-07').

IR $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3205 (OH), 2921 (CH), 1721 (RC=O), 1633 (CONR), 1557 (COO^-), 1410 (C=O), 1370 (OH).

17 CD-HA-Konjugat aus 13 und nativer HA



0.5 g (1.14 mmol) HA werden in 75 mL Wasser und 45 mL ACN gelöst. Anschließend werden 0.528 g (3 mmol) CDMT und 545 µl (5 mmol, ρ = 0,93g/mL) NNM in 5 mL ACN und einem Tropfen Wasser gelöst und zur Reaktionsmischung zugegeben. Es wird bei RT für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 1.298 g (1.14 mmol) Mono-(6-deoxy-6-amino-)-β-cyclodextrin **13** wird bei RT für 20 h gerührt. Danach wird Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) zugegeben und für 1 h geschüttelt. Zur Aufreinigung wird mit Wasser und einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) ultrafiltriert und das Produkt über Lyophilisation getrocknet.

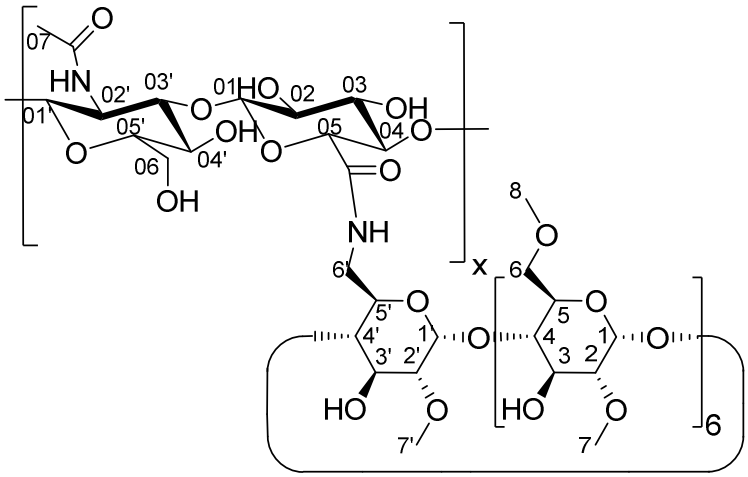
Ausbeute: 907 mg (0.91 mmol, 80%)

DS: 0.55

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 4.93 (dd, 3.85H, H1/1''), 4.39 (d, 2H, H-01/01'), 3.93 – 3.21 (m, 33H, H-02/02', H-03/03', H-04/04', H-05/05', H-06', H2/2', H-3/3', H-4/4', H-5/5', H-6/6'), 1.87 (s, 3H, H-07').

18 CD-HA-Konjugat aus 14 und nativer HA



0.437 g (1 mmol) HA werden in 20 mL Wasser gelöst. Anschließend werden 0.351 g (2 mmol) CDMT und 233 µl (3 mmol, ρ = 0,93g/mL) NNM in 13 mL ACN gelöst, zur Reaktionslösung zugegeben und bei RT für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 1.0 g (0.75 mmol) Mono-(6-deoxy-6-amino)-heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-CD **14** wird bei RT für 20 h gerührt. Danach wird Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) zugegeben und für 1 h geschüttelt. Zur Aufreinigung wird mit Wasser und einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) ultrafiltriert und das Produkt über Lyophilisation getrocknet.

Ausbeute: 709 mg (0.70 mmol, 70%)

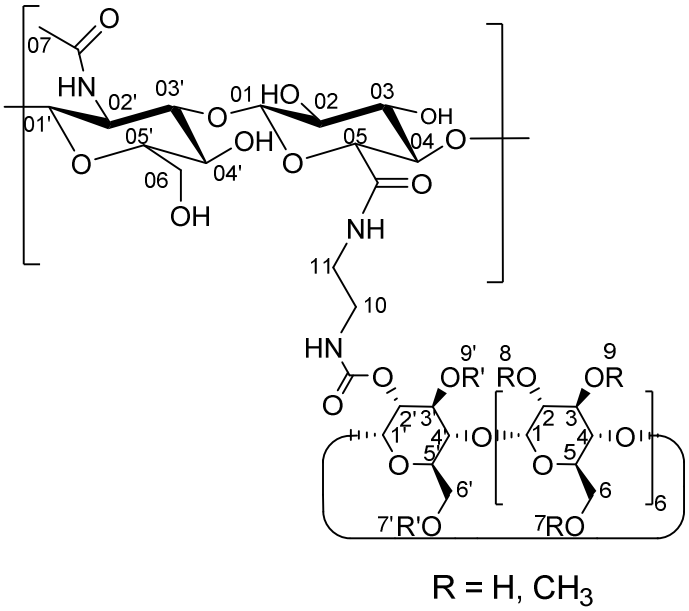
DS: 0.43

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 5.19 (m, 3H, H1/1''), 4.50 (d, 2H, H-01/01'), 4.07 – 3.10 (m, 46H, H-02/02' – H-06', H-2/2 – H-8), 1.95 (s, 3H, H-07')

IR $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3203 (OH), 2895 (CH), 1721 (RC=O), 1612 (CONR), 1552 (COO^-), 1453 (C=O), 1369 (OH).

19 CD-HA-Konjugat aus 15 und nativer HA



1 g (2.29 mmol) HA werden in 120 mL Wasser und 75 mL ACN gelöst. Anschließend werden 0.878 g (5 mmol) CDMT und 1.07 mL (10 mmol, ρ = 0,93g/mL) NNM in 5 mL ACN und einem Tropfen Wasser gelöst und zur Reaktionsmischung zugegeben. Es wird bei RT für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 3.2 g (2.29 mmol) (2-aminoethyl)-carbamat-Methyl-β-CD **15** wird bei RT für 20 h gerührt. Danach wird Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) zugegeben und für 1 h geschüttelt. Zur Aufreinigung wird mit einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) ultrafiltriert und das Produkt über Lyophilisation getrocknet.

Ausbeute: 1.5 g (2.01 mmol, 88%)

DS: 0.23

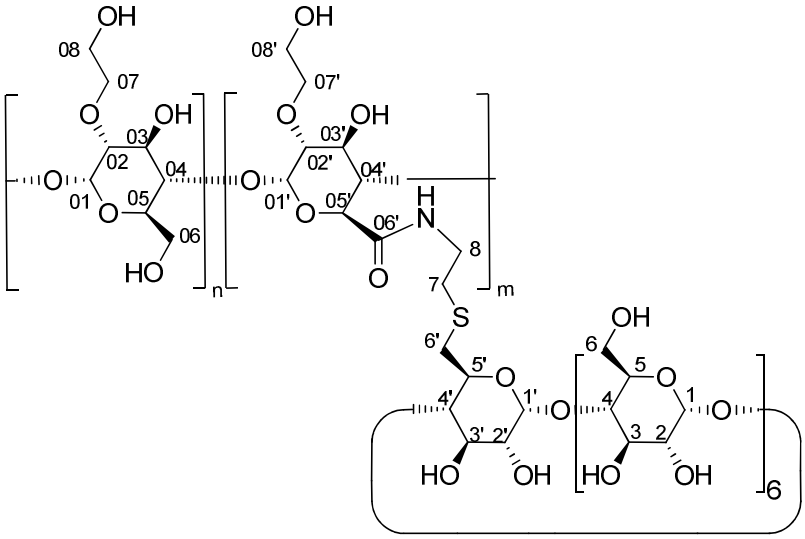
^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 5.10 – 4.89 (m, 1.61H, H1/1'), 4.39 – 4.31 (d, 2H, H-01/01'), 4.85 – 2.98 (m, 29.5 H, H-02/02' - H-06, H2/2 - H-9/9', H-10, H-11), 1.84 (s, 3H, H-07).

IR $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3203 (OH), 2902 (CH), 1721 (RC=O), 1604 (CONR), 1548 (COO^-), 1457 (C=O), 1372 (OH).

8.4.3 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxyethylstärke-Konjugate

20 CD-HES-Konjugat aus 15 und 5



3 g (15.78 mmol) oxidierte Hydroxyethylstärke **5** werden in 110 mL Wasser gelöst. Anschließend werden 5.27 g (30 mmol) CDMT in 60 mL ACN und 10 mL Wasser gelöst, und 4.78 mL (40 mmol, ρ = 0,93g/mL) NNM zur Reaktionsmischung zugegeben und bei RT für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 7.94 g (6.45 mmol) Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-β-Cyclodextrin **12** wird bei RT über Nacht gerührt. Danach wird Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) zugegeben und für 1 h geschüttelt. Zur Aufreinigung wird mit 5kDa Cross Flow Membran (PES) und Wasser ultrafiltriert und das Produkt über Lyophilisation getrocknet.

Ausbeute: 5.22 g (10 mmol, 69%)

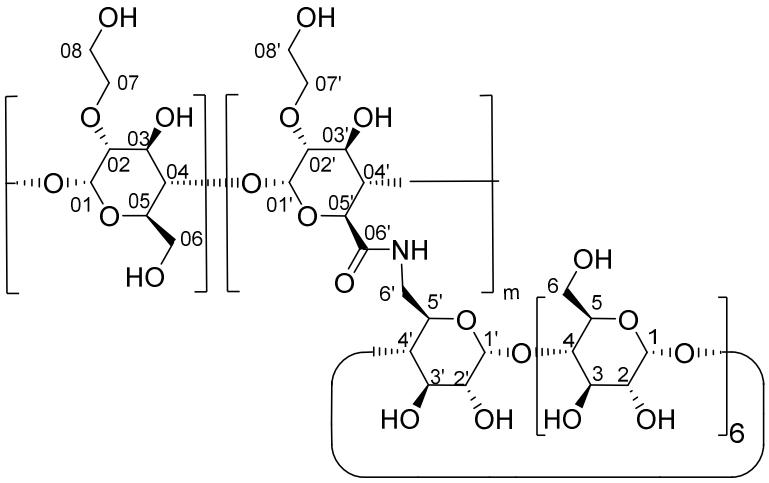
DS: 0.27

^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 5.62 – 5.52 (m, 1H, H-01/01‘), 5.10 (s, 2,1H, H-1), 4.40 – 3.21 (m, 18H, H-02/02‘, H-03/03‘, H-04/04‘, H-05/05‘, H-06, H.2/2‘, H-3/3‘, H-4/4‘, H-5/5‘, H-6/6‘), 3.21 - 2.45 (m, 1.8H, H-06’, H-7/7‘, H-8/8‘).

IR $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3263 (OH), 2924 (CH), 1543 (C=O), 1596 (CONHR), 1410 (C=O), 1363 (OH).

21 CD-HES-Konjugat aus 13 und oxidierter HES



1 g (5.41 mmol) oxidierte Hydroxyethylstärke (DS= 0.16) werden in 40 mL Wasser und 15 mL ACN gelöst. Anschließend werden 526 mg (3 mmol) CDMT in 5 mL ACN und 0.428 mL (4 mmol, ρ = 0,93g/mL) NNM zugegeben und bei RT für 1 h gerührt. Nach Zugabe von 2.69 g (2 mmol) Mono-(6-deoxy-6-amino-)-β-cyclodextrin **13** wird bei RT für 24 h gerührt. Danach wird Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) zugegeben und für 1 h geschüttelt. Zur Aufreinigung wird das Produkt über Ultrafiltration mit einer 5kDa Cross Flow Membran (PES) aufgereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 0.87 g (4.14 mmol, 77%)

DS: 0.1

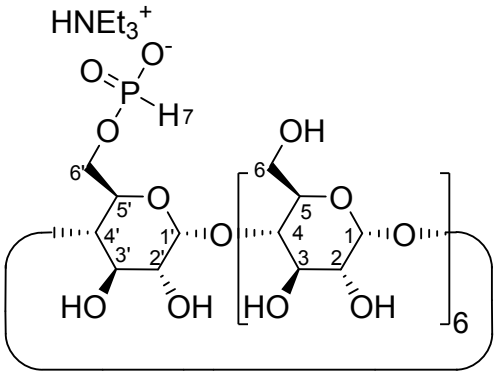
^{1}H-NMR: (400 MHz, D_2O)

δ = 5.56 – 5.31 (m, 1H, H-01/01‘), 4.96 (s, 0.64H, H-1/1‘), 4.26 – 3.25 (m, 10.3H, H-02/02‘ – H-08/08’, H-2/2’ - H-6/6’).

8.5 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxypropylcellulose-Konjugate über H-Phosphonat-Chemie

8.5.1 Synthese der Cyclodextrin-Bausteine

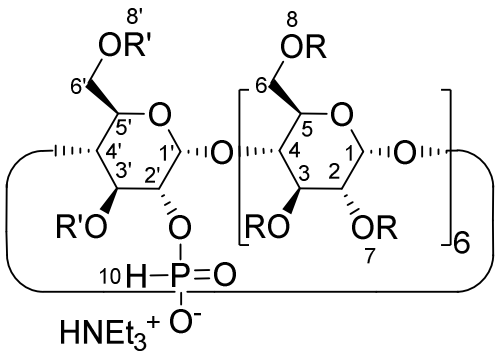
22 Mono-[6-(H-phosphonat)]-β-Cyclodextrin



In einem ausgeheizten Kolben werden 1.13g (1 mmol) β-CD in 10 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend werden 230 µL (1.2 mmol) Diphenylphosphit zur Lösung hinzugegeben und für 1 Stunde bei RT gerührt. Danach wird mit einer Mischung aus je 2 mL Triethylamin und Wasser gequencht. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gegen eine 1000 Da PES-Membran mit Wasser nanofiltriert. Abschließend wird lyophilisiert.

Ausbeute:	1.01g (0.76 mmol, 76 %)
DS:	1.1
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 4.93 (d, 7H, H-1/1‘), 4.02 (bs, 1.1H, H-7), 3.85 – 3.71 (m, 27H, H-3/3’, H-5/5‘, H-6/6’), 3.53 – 3.43 (m, 14H, H-2/2‘, H-4/4‘),3.07 -3.03 (q, 2.7H, CH_2-Net_3), 1.14 (tr, 4.1H, CH3-Net3).
^{31}P-NMR:	(160 MHz, D_2O)
	δ = 6.64.
MS (ESI):	m/z 1221.14 ([M+Na]$^+$ [$C_{42}H_{70}O_{37}P$])
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3382 (OH), 2919 (CH), 2357 (P-H), 1364 (OH).

23 Mono-[2-(H-phosphonat)]-Methyl-β-Cyclodextrin

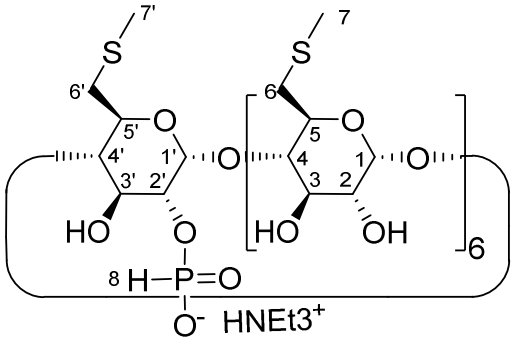


R,R' = H,CH_3,

In einem ausgeheizten Kolben werden 6.77 g (5.16 mmol) RAMEβCD (Cavasol W7) in 20 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend werden 1.15 mL (6 mmol) Diphenylphosphit zur Lösung hinzugegeben und für 1 Stunde bei RT gerührt. Danach wird mit einer Mischung aus je 3 mL Triethylamin und Wasser gequencht. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Wasser gegen eine 1000 Da PES-Membran nanofiltriert. Abschließend wird lyophilisiert.

Ausbeute:	5.41 g (3.65 mmol, 71%)
DS:	1.05
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 5.11 – 4.90 (m, 7H, H-1/1‘), 3.96 (bs, 1.1H, H-10), 3.83 – 3.23 (m, 80H, 2/2‘,H-3/3’, H-4/4‘, H-5/5‘, H-6/6’, H-7/7‘,H-8/8‘, OMe-3), 3.07 -3.02 (q, 3.8H, CH_2-Net_3), 1.12 (tr, 5.5, CH3-Net3).
^{31}P-NMR:	(160 MHz, D_2O)
	δ = 6.73
MS (ESI):	m/z 1389.39([M+Na]$^+$ [$C_{54}H_{94}O_{37}P$])
	m/z 1403.56 ([M+Na]$^+$[$C_{55}H_{96}O_{37}P$])
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3384 (OH), 2926 (CH), 2357 (P-H), 1364 (OH).

24 Mono-[2-(H-phosphonat)]-Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-β-Cyclodextrin



In einem ausgeheizten Kolben werden unter N_2 4.04 g (3 mmol) Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-β-CD in 40 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend werden 2.58 g (11 mmol) Diphenylphosphit zur Lösung hinzugegeben und für 1 Stunde bei RT gerührt. Danach wird mit einer Mischung aus je 6 mL Triethylamin und Wasser gequencht und 10 min gerührt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und der unlösliche Rückstand über eine 0.45 µm Membran (BiodyneA, *Pall*) abfiltriert. Die Reaktionslösung wird gegen eine 1000 Da PES-Membran mit Wasser nanofiltriert und abschließend lyophilisiert.

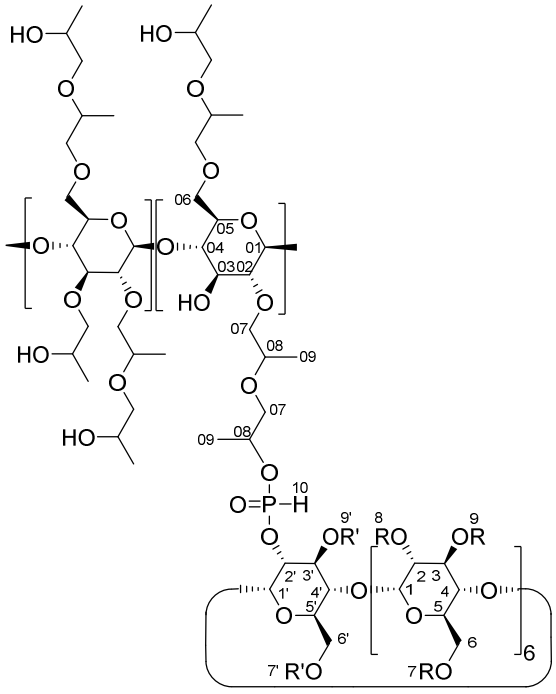
Ausbeute:	2.75 g (1.82 mmol, 61%)
DS:	1.13
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 5.05 – 4.90 (m, 7H, H-1/1‘), 4.20 (bs, 1.13H, H-8), 3.91 – 3.72 (m, 14H, H-3/3’, H-5/5‘), 3.56 – 3.34 (m, 14H, H-2/2‘,H-4/4‘), 3.21 – 2.64 (m, 7H, H-6/6’), 3.07 -3.02 (q, 3.8H, CH_2-NEt_3), 2.08 (s, 21H, H-7/7‘), 1.12 (tr, 5.5, CH_3-NEt_3).
^{13}C-NMR:	(125 MHz, $CDCl_3$)
	δ = 101.2 (C-1/1‘), 82.4 (C-2/2‘), 71.8 (C-3/3‘,4/4‘,5/5‘), 46.6 (CH_2-NEt_3), 35.4 (C-6/6‘), 16.1 (C-7/7‘), 8.2 (CH_3-NEt_3).
^{31}P-NMR:	(160 MHz, D_2O)
	δ = 8.48, 6.12, 3.55.

MS (ESI): m/z 734.8 ([M+H⁺] [$C_{49}H_{84}O_{32}P_2S_7$]),
m/z 1407.1 ([M+H⁺] [$C_{49}H_{84}O_{30}PS_7$]),
m/z 1471.1 ([M+H⁺] [$C_{49}H_{85}O_{32}P_2S_7$]).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3304 (OH), 2915 (CH), 2361 (P-H), 1361 (OH, P-O-Alkyl), 1198 (P=O).

8.5.2 Synthese der Cyclodextrin-Hydroxypropylcellulose-Konjugate

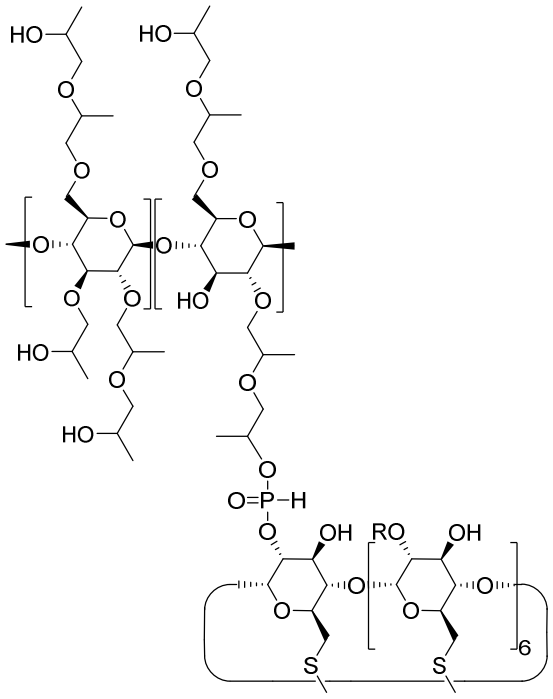
25 CD-HPC-Konjugat aus 23 und nativer HPC



In einem ausgeheizten Kolben werden 700 mg (1.66 mmol) Hydroxypropylcellulose und 3 g (2.07 mmol) Mono-[2-(H-Phosphonat)]-Methyl-β-Cyclodextrin **23** in 30 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend werden unter Kühlung 492 µL (4 mmol) Pivaloylchlorid zur Lösung hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit einer 10 kDa Cellulose-Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Abschließend wird lyophilisiert.

Ausbeute:	1.4 g (1.42 mmol, 86%)
DS:	0.3
^{1}H-NMR:	(400 MHz, D_2O)
	δ = 5.12 – 4.92 (bs, 2.1H, H-1/1'), 4.40 3.05 (m, 43.5H, H-01 – H-08, H-2/2' – H-10), 1.14 -1.03 (s, 13.5H, H-09).
^{31}P-NMR:	(160 MHz, D_2O)
	δ = 6.72, 3.64
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3401 (OH), 2894 (CH), 1453 (CH_3, CH_2), 1370 (OH, P-O-Alkyl), 1195 (P=O).

26 CD-HPC-Konjugat aus 24 und nativer HPC



In einem ausgeheizten Kolben werden 480 mg (1.14 mmol) Hydroxypropylcellulose und 1.7 g (1.18 mmol) Mono-[2-(H-phosphonat)]-Heptakis-[6-deoxy-6-thiomethyl]-β-cyclodextrin **24** in 20 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend werden unter Kühlung 369 µL (3 mmol) Pivaloylchlorid zur Lösung hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt,

der Rückstand in Wasser suspendier und mit einer 10 kDa Cellulose-Membran gegen Wasser ultrafiltriert. Abschließend wird lyophilisiert.

Aufgrund der Unlöslichkeit des Produktes konnte keine Charakterisierung erfolgen.

9 Abkürzungsverzeichnis

α-CD	alpha-Cyclodextrin
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AGU	Anhydroglucoseeinheit
Äq.	Aquivalente
β-CD	β-Cyclodextrin
CDI	Carbonyldiimidazol
CDMT	2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin
COSY	Korrelationsspektroskopie
$CuSO_4$	Kupfersulfat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIMEβ-CD	Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-Cyclodextrin
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Substitutionsgrad
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
EE	Ethylacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gramm
G	Gast-Molekül

ΔG_0	Änderung der freien Energie
GC	Gaschromatographie
γ-CD	gamma-Cyclodextrin
GPE	Glycidylpropargylether
h	Stunden
ΔH	Enthalpie
HA	Hyaluronsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPβCD	Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPC	Hydroxypropylcellulose
HSQC	Korrelationsspektroskopie
HV	Hochvakuum
IR	Infrarotspektroskopie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K_S	Komplexbindungskonstante [l/mol]
λ	Wellenlänge
L	Liter
LM	Lösemittel
M^{-1}	Molar
Me	Methyl
min	Minuten
mL	Milliliter
MonoCys	Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]-β-CD
MonoTos	Mono-[6-(p-toluolsulfonyl)]-β-Cyclodextrin
MS	Massenspektrometrie

MWG	Massenwirkungsgesetz
NaAsc	Natriumascorbat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NEt_3	Triethylamin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PES	Polyethersulfon
pK_S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
ppm	parts per million
R	allgemeine Gaskonstante
RAMEβCD	Statistisch methyliertes beta-Cyclodextrin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBEβCD	Sulfobutylether-beta-Cyclodextrin
TEMPO	2,2,6,6,-Tetremethylpiperidinyloxyl
THF	Tetrahydrofuran
T-ROESY	Transverse-Rotating frame Overhauser Effect Spectroskopie
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
W	Wirt-Molekül
z.Bsp.	zum Beispiel

10 Literaturverzeichnis

[1] A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1891**, *112*, 536–538.

[2] F. Schardinger, *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* **1903**, *6*, 865–880.

[3] K. Freudenberg, F. Cramer, *Z. Naturforsch.* **1948**, *3b*, 464.

[4] F. Cramer, *Einschlussverbindungen*, Springer-Verlag, Berlin, **1954**.

[5] S. V Kurkov, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 167–80.

[6] E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046.

[7] G. Wenz, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1994**, *33*, 803–822.

[8] T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 1607–21.

[9] T. Loftsson, M. E. Brewster, **2012**, *101*, 10–12.

[10] T. Irie, K. Uekama, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147–62.

[11] T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *63*, 1119–35.

[12] D. W. Frank, J. E. Gray, R. N. Weaver, *Am. J. Pathol.* **1976**, *83*, 367–82.

[13] H. W. Frijlink, A. C. Eissens, N. R. Hefting, K. Poelstra, C. F. Lerk, D. K. F. Meijer, *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 9–16.

[14] R. Rajewski, V. Stella, *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1142–1169.

[15] G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1890–5.

[16] D. A. Gelb, R. I., Schwartz, L. M., Bradshaw, J. J. & Laufer, *Bioorg. Chem.* **1980**, *304*, 299–304.

[17] D. Rong, V. D'Souza, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2–5.

[18] J. Canceill, L. Jullien, L. Lacombe, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 791–812.

[19] S. Guieu, M. Sollogoub, in *Mod. Synth. Methods Carbohydr. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2013**, pp. 241–283.

[20] R. Gramage-Doria, D. Rodriguez-Lucena, D. Armspach, C. Egloff, M. Jouffroy, D. Matt, L. Toupet, *Chemistry* **2011**, *17*, 3911–21.

[21] B. Wang, E. Zaborova, S. Guieu, M. Petrillo, M. Guitet, Y. Blériot, M. Ménand, Y. Zhang, M. Sollogoub, *Nat Commun* **2014**, *5*.

[22] J. Szejtli, *Starch Stärke* **2003**, *55*, 191–196.

[23] H.-J. Buschmann, U. Denter, D. Knittel, E. Schollmeyer, *J. Text. Inst.* **1998**, *89*, 554–561.

[24] L. Szente, J. Szejtli, *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137–142.

[25] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J. C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara, *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1631–1640.

[26] E. Schollmeyer, *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *191*, 185–191.

[27] H. M. C. Marques, *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 313–326.

[28] M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 645–66.

[29] T. Loftsson, T. Järvinen, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 59–79.

[30] K. Cal, K. Centkowska, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 467–78.

[31] K. Uekama, **2003**, 3–7.

[32] K.-H. Frömming, J. Szejtli, in *Top. Incl. Sci.*, **1994**, pp. 19–32.

[33] T. Loftsson, D. Duchêne, *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1–11.

[34] J. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1215–33.

[35] M. E. Davis, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 659–668.

[36] B. McCormack, G. Gregoriadis, *J. Drug Target.* **1994**, *2*, 449–454.

[37] R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R. K. Khar, *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, 329–357.

[38] L. Boulmedarat, *Int. J. Pharm.* **2003**, *254*, 59–64.

[39] Y. Meissner, A. L. F. Lamprecht, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2878–2891.

[40] D. C. Bibby, N. M. Davies, I. G. Tucker, *Int. J. Pharm.* **2000**, *197*, 1–11.

[41] D. Kanjickal, S. Lopina, M. M. Evancho-Chapman, S. Schmidt, D. Donovan, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *74*, 454–60.

[42] Y.-Y. Liu, X.-D. Fan, T. Kang, L. Sun, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1912–1916.

[43] J. Li, X. J. Loh, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1000–17.

[44] Y. Nie, Z. Zhang, L. Li, K. Luo, H. Ding, Z. Gu, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20*, 1849–57.

[45] F. Van De Manakker, T. Vermonden, C. F. Van Nostrum, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3157–75.

[46] R. W. Lakkakula, J. R. & Maçedo Krause, *Nanomedicine (Lond).* **2014**, *9*, 877–94.

[47] Z. Yuan, Y. Ye, F. Gao, H. Yuan, M. Lan, K. Lou, W. Wang, *Int. J. Pharm.* **2013**, *446*, 191–8.

[48] N. Lin, A. Dufresne, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 871–80.

[49] M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 152–63.

[50] M. Weickenmeier, G. Wenz, J. Huff, **1997**, *1123*, 1117–1123.

[51] A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1188–203.

[52] J. Zhou, H. Ritter, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1552.

[53] E. Renard, a. Deratani, G. Volet, B. Sebille, *Eur. Polym. J.* **1997**, *33*, 49–57.

[54] B. Gidwani, A. Vyas, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2014**, *114*, 130–7.

[55] B. A. Ingelse, F. M. Everaerts, S. Fanali, P. O. Box, M. Scalo, *J. High Resol. Chromatogr.* **1995**, *18*, 348–352.

[56] É. Fenyvesi, *ournal Incl. Phenom.* **1988**, *6*.

[57] P. Mura, M. T. Faucci, F. Maestrelli, S. Furlanetto, S. Pinzauti, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 1015–24.

[58] J. et al Szeman, *J. Incl. Phenom.* **1987**, *5*, 427–431.

[59] J. Li, H. Xiao, J. Li, Y. Zhong, *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 329–42.

[60] F. E. . A. U. J. Szejtli, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *25*, 185–189.

[61] C. Rodriguez-Tenreiro, C. Alvarez-Lorenzo, a Rodriguez-Perez, a Concheiro, J. J. Torres-Labandeira, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 55–62.

[62] C. Rodriguez-Tenreiro, C. Alvarez-Lorenzo, A. Rodriguez-Perez, A. Concheiro, J. J. Torres-Labandeira, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 121–30.

[63] A. Binello, B. Robaldo, A. Barge, R. Cavalli, G. Cravotto, V. Giuria, D. Scienza, T. Farmaco, *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *107*, 10.1002/app.

[64] S. Tang, L. Kong, J. Ou, Y. Liu, X. Li, H. Zou, *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 39–48.

[65] T. Girek, C. Kozlowski, J. Koziol, W. Walkowiak, I. Korus, *Carbohydr. Polym.* **2005**, *59*, 211–215.

[66] T. Girek, D. Shin, S. Lim, *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 59–63.

[67] F. Trotta, M. Zanetti, R. Cavalli, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2091–9.

[68] A. Harada, M. Furue, S. Nozakura, *Macromolecules* **1976**, *9*, 701–704.

[69] H. L. Ramírez, A. Valdivia, R. Cao, J. J. Torres-Labandeira, A. Fragoso, R. Villalonga, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1499–501.

[70] H. L. Ramirez, A. Valdivia, R. Cao, A. Fragoso, J. J. Torres Labandeira, M. Baños, R. Villalonga, *Polym. Bull.* **2007**, *59*, 597–605.

[71] C. G. Gomez, G. Chambat, A. Heyraud, M. Villar, R. Auzély-Velty, *Polymer (Guildf).* **2006**, *47*, 8509–8516.

[72] A. Charlot, A. Heyraud, P. Guenot, M. Rinaudo, R. Auzély-Velty, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 907–13.

[73] N. Aoki, M. Nishikawa, K. Hattori, **2003**, *52*, 219–223.

[74] M. Prabaharan, J. F. Mano, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 965–73.

[75] S. Chen, Y. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 2414–2421.

[76] T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, K. L. Larsen, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1710–5.

[77] P. Gonil, W. Sajomsang, U. R. Ruktanonchai, N. Pimpha, I. Sramala, O. Nuchuchua, S. Saesoo, S. Chaleawlert-umpon, S. Puttipipatkhachorn, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 905–913.

[78] J. Mergy, A. Fournier, E. Hachet, R. Auzély-Velty, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2012**, *50*, 4019–4028.

[79] A. Lesch, Hydroxyethylstärke (HES) Im Urin Nach Mehrfachinfusion von HES, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, **2003**.

[80] D. Toyoda, S. Shinoda, Y. Kotake, *J Intensive Care* **2014**, *2*, 1–8.

[81] T. Simon, G. Marx, in *Die Intensivmed.* (Eds.: H. Burchardi, R. Larsen, G. Marx, E. Muhl, J. Schölmerich), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**, pp. 287–292.

[82] I. von Roten, C. Madjdpour, P. Frascarolo, M. Burmeister, a Fisch, S. Schramm, T. Bombeli, D. R. Spahn, *Br. J. Anaesth.* **2006**, *96*, 455–63.

[83] C. Augsten, Asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung in Verbindung Mit Mehrwinkellichtstreudetektion – Eine Neue Bedeutende Methode Der Pharmazeutischen Analytik Zur Charakterisierung von Makromolekülen Und Nanopartikeln Dissertation, **2008**.

[84] J. Boldt, *Wien. Klin. Wochenschr.* **2004**, *116*, 159–169.

[85] P. Kimme, B. Jannsen, T. Ledin, A. Gupta, *Acta Anaesthesiol Scand* **2001**, 686–689.

[86] J. a Myburgh, S. Finfer, R. Bellomo, L. Billot, A. Cass, D. Gattas, P. Glass, J. Lipman, B. Liu, C. McArthur, et al., *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1901–11.

[87] A. Perner, N. Haase, A. B. Guttormsen, J. Tenhunen, G. Klemenzson, A. Åneman, K. R. Madsen, M. H. Møller, J. M. Elkjær, L. M. Poulsen, et al., *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 124–34.

[88] F. M. Brunkhorst, *Notfall + Rettungsmedizin* **2014**, *17*, 21–24.

[89] C. S. Hartog, T. Welte, P. Schlattmann, K. Reinhart, *Dtsch. Arztebl. Int.* **2013**, *110*, 443–50.

[90] J. W. . Palmer, K. Meyer, *J. Biol. Chem.* **1934**, 629–634.

[91] W. Wohlrab, J. Wohlrab, *Hyaluronsäure Und Haut*, Trends Clin Exp Dermatol, Aachen, Shaker, **2004**.

[92] F. Kendall, M. Heidelberger, M. Dawson, *J. Biol. Chem* **1973**, *118*, 61–69.

[93] M. J. Rah, *Optometry* **2011**, *82*, 38–43.

[94] D. Coffey, D. Bell, A. Henderson, in *Food Polysaccharides Their Appl.*, **2006**, p. 163.

[95] T. Nguyen, R. Latkany, *Clin. Ophthalmol.* **2011**, *5*, 587–91.

[96] A. H. Wander, *Eye Contact Lens* **2011**, *37*, 39–44.

[97] J. I. Luchs, D. S. Nelinson, J. I. Macy, *Cornea* **2010**, *29*, 1417–1427.

[98] H. Zerbe, F. Al-Khalil, *High Speed Disintegration; Mixture of Hydroxypropyl Cellulose and Starch*, **2006**.

[99] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1754.

[100] F. Biedermann, V. D. Uzunova, O. A. Scherman, W. M. Nau, A. De Simone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318–15323.

[101] M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023–35.

[102] G. Wenz, B.-H. Han, A. Müller, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782–817.

[103] T. Loftsson, M. Másson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1091–9.

[104] V. Stella, V. Rao, E. Zannou, V. Zia, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 3–16.

[105] F. Hirayama, K. Uekama, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 125–141.

[106] R. Chadha, N. Kashid, A. Saini, *J. Sci. Ind. Res.* **2004**, *63*, 211–229.

[107] T. Higuchi, K. Connors, *Adva Anal Chem Instr* **1965**, *4*, 212–217.

[108] A. W. Lantz, S. M. Wetterer, D. W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 160–6.

[109] S. Fourmentin, A. Ciobanu, D. Landy, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1185–91.

[110] D. Landy, S. Fourmentin, M. Salome, G. Surpateanu, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2000**, *38*, 187–198.

[111] J. Roewer, N & Broscheit, *Halogenated Ether Complex*, **2011**.

[112] M. V. E. I. J. Kanto, *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1989**, *33*.

[113] J. T. M Valtonen, E Iisalo, J Kanto, *Anaesthesia* **1988**, *43*, 696–699.

[114] A. Juluri, S. Narasimha Murthy, *J. Control. Release* **2014**, *189*, 11–8.

[115] L. Jalota, V. Kalira, E. George, Y. Shi, C. Hornuss, O. Radke, N. L. Pace, C. C. Apfel, *BMJ* **2011**, 1–18.

[116] M. Sosis, B. Braverman, *Anesth. Analg.* **1993**, *77*, 766–768.

[117] T. D. Egan, S. E. Kern, K. B. Johnson, N. L. Pace, *Anesth. Analg.* **2003**, *97*, 72–79.

[118] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, 18–28.

[119] J. Broscheit, N. Roewer, *Pharmazeutische Zubereitung*, **2012**.

[120] R. Andersin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, *9*, 451–455.

[121] B. Krauss, S. M. Green, *Lancet* **2006**, *367*, 766–80.

[122] N. Roewer, J. Broscheit, *Pharmaceutical Preparation Comprising Permethylated Cyclodextrin*, **2011**.

[123] S. M. Ali, S. K. Upadhyay, *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 676–9.

[124] T. et al. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **2001**, *212*, 29–40.

[125] F. Marçon, D. Mathiron, S. Pilard, A.-S. Lemaire-Hurtel, J.-M. Dubaele, F. Djedaini-Pilard, *Int. J. Pharm.* **2009**, *379*, 244–50.

[126] D. Mathiron, F. Marcon, J.-M. M. Dubaele, D. Cailleu, S. Pilard, F. Djedaïni-Pilard, *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 2102–2111.

[127] S. a Zawko, Q. Truong, C. E. Schmidt, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *87*, 1044–52.

[128] J. Pitha, T. Hoshino, *Int. J. Pharm.* **1992**, *80*, 243–251.

[129] A. Paschke, J. Brümmer, G. Schüürmann, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1417–21.

[130] J. A. N. Pawlaczyk, B. Szafran, T. H. N, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2000**, *62*, 1–8.

[131] G. R. Brown, M. Caira, L. R. Nassimbeni, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *26*, 281–294.

[132] I. Oh, I, Lee, MY, Lee, YB, Shin, SC & Park, *Int. J. Pharm.* **1998**, *175*, 215–223.

[133] R. Huisgen, *Angew. Chemie* **1963**, 604–637.

[134] V. V Rostovtsev, L. G. Green, V. V Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie* **2002**, *114*, 2708–2711.

[135] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

[136] V. V Fokin, *Organometallics* **2007**, *26*, 4389–4391.

[137] 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.

[138] B. F. Straub, *Chem. Commun.* **2007**, 3868.

[139] C. Nolte, P. Mayer, B. F. Straub, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2101–3.

[140] B. T. Worrell, J. a Malik, V. V Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–60.

[141] V. O. Rodionov, V. V Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2210–5.

[142] B. Schulze, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2522–71.

[143] J. E. Hein, J. C. Tripp, L. B. Krasnova, K. B. Sharpless, V. V Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 8018–21.

[144] J. E. Hein, V. V Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302–15.

[145] C. J. Duxbury, D. Cummins, A. Heise, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3795–3802.

[146] S. Srinivasachari, T. M. Reineke, *Biomaterials* **2009**, *30*, 928–38.

[147] M. Munteanu, S. Choi, H. Ritter, *Macromolecules* **2008**, *41*, 9619–9623.

[148] P.-A. Faugeras, B. Boëns, P.-H. Elchinger, F. Brouillette, D. Montplaisir, R. Zerrouki, R. Lucas, *European J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 4087–4105.

[149] M. Mourer, F. Hapiot, E. Monflier, S. Menuel, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7159–7163.

[150] L. Markenstein, *Diplomarbeit: Synthese von Wasserlöslichen Cyclodextrin-Polymeren*, **2011**.

[151] C. Hocquelet, C. K. Jankowski, A. L. Pelletier, J.-C. Tabet, C. Lamouroux, P. Berthault, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *69*, 75–84.

[152] B. J. Szejtli, A. Liptak, I. Jodal, P. Fugedi, P. Nanasi, A. Neszmelyi, **1980**, 165–169.

[153] M. Okada, M. Kamachi, A. Harada, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2607–2613.

[154] B Casu; M Reggiani; GG Gallo; A, *Tetrahedron* **1967**, *24*.

[155] G. P. Szejtli, J.D., et al., Verfahren zur Herstellung von Heptakis-(2.6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin. 1984, *Patent DIMEß.pdf*, **n.d.**

[156] T. Wimmer, *Preparation of Alkylated Cyclodextrin Derivatives, Methylated Cyclodextrin Derivatives and Their Use*, **1994**.

[157] T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **1994**, *110*, 169–177.

[158] A. Besheer, G. Hause, J. Kressler, K. Mäder, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 359–67.

[159] R. G. Kressler, K. Ma, A. Besheer, T. C. Hertel, **2009**, *98*, 4420–4428.

[160] A. Besheer, H. Caysa, H. Metz, T. Mueller, J. Kressler, K. Mäder, *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 196–203.

[161] M. Noga, D. Edinger, W. Rödl, E. Wagner, G. Winter, A. Besheer, *J. Control. Release* **2012**, *159*, 92–103.

[162] H. Kern, S. Choi, G. Wenz, J. Heinrich, L. Ehrhardt, P. Mischnick, P. Garidel, a Blume, *Carbohydr. Res.* **2000**, *326*, 67–79.

[163] P. L. Bragd, H. Van Bekkum, A. C. Besemer, **2004**, *27*.

[164] Y. Kato, R. Matsuo, a Isogai, *Carbohydr. Polym.* **2003**, *51*, 69–75.

[165] P. L. Bragd, a C. Besemer, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 355–63.

[166] C. Thiele, Synthese von Cyclodextrin- Und Stärkederivaten Zum Verbesserten Wirkstofftransport, **2010**.

[167] G. Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 484–489.

[168] L. Markenstein, A. Appelt-Menzel, M. Metzger, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 3087–3096.

[169] M. M. Joullié, K. M. Lassen, *Arkivoc* **2010**, 189–250.

[170] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.

[171] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.

[172] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–31.

[173] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 589–636.

[174] C. a. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.

[175] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-faham, S. A. Kates, *J . Org. Chem* **1998**, *63*, 9678–9683.

[176] B. Castro, J. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron* **1975**, *14*, 1219–1222.

[177] T. I. Al-Warhi, H. M. a. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97–116.

[178] J. Coste, D. Lenguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.

[179] Z. Kamiński, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 2901–2904.

[180] K. Bergman, C. Elvingson, T. Bowden, J. Hilborn, G. Svensk, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2190–2195.

[181] C. E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T. F. Vandamme, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85*, 469–489.

[182] P. Bulpitt, D. Aeschlimann, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47*, 152–69.

[183] I. Danishefsky, E. Siskovic, *Carbohydr. Res.* **1971**, *16*, 199–205.

[184] G. D. Prestwich, D. M. Marecak, J. F. Marecek, K. P. Vercruysse, M. R. Ziebell, *J. Control. Release* **1998**, *53*, 93–103.

[185] J. Kuo, S. Brook, M. Products, W. C. Park, R. February, *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 232–241.

[186] B. Ekberg, L. I. Andersson, K. Mosbach, *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, 111–117.

[187] W. Tang, S.-C. Ng, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 691–7.

[188] V. Pourcelle, H. Freichels, F. Stoffelbach, R. Auzély-Velty, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 966–74.

[189] Z. Kaminski, P. Paneth, J. Rudzinski, *J . Org. Chem* **1998**, *3263*, 4248–4255.

[190] J. Stawinski, A. Kraszewski, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 952–960.

[191] A. Kraszewski, J. Stawinski, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2217–2227.

[192] J. George, B. Sridhar, B. V. S. Reddy, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1595–602.

[193] Y. Zhu, J. P. Malerich, V. H. Rawal, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 153–6.

[194] V. Ozola, C. B. Reese, Q. Song, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8621–8624.

[195] L. F. Becker, D. H. Schwarz, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2920–7.

[196] J. Stawinski, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**, 7–12.

[197] P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strомberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1269.

[198] M. F. G Trapani, A Latrofa, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 514–518.

[199] E. Albers, B. Müller, *J. Pharm. Sci.* **1991**, *81*, 756–761.

[200] W. Cai, T. Sun, P. Liu, C. Chipot, X. Shao, H. Poincare, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7836–7843.

[201] K. Y. Chan, B. M. Gavaghan, A. W. Stoeckel, K. Irizarry, P. M. Hare, *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 295–303.

[202] F. Bischoff, R. D. Stauffer, *Contrib. FRON Chem. Lab. SAYTA Barbar. Cottag. Hosp. Res. INSTITU* **1953**, *263*, 1962–1965.

[203] O. Friaa, V. Chaleix, M. Lecouvey, D. Brault, *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1011–8.

[204] J. H. N. Soares, R. J. Brosnan, F. B. Fukushima, J. Hodges, H. Liu, *Anesthesiology* **2012**, *117*, 48–55.

11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen herzlich bedanken, die mich während der Promotion mit Rat und Tat unterstützt und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die Stellung des Dissertationsthemas, die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bei allen aufkommenden Fragen sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Marc Schneider danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und dem damit verbundenen Interesse.

Den Mitgliedern des BMBF-Projektes „Lipo Trans“ danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Vielen Dank an Annegret Engelke und Blandine Boßmann für die vielen Messungen. Joachim Kriesamer und Thomas Scherer danke ich für die Reparaturen und technische Beratung, Gerti Radünz und Petra Thinnes für alle Verwaltungsangelegenheiten. Dr. Joseph Zapp danke ich für die Aufnahme der ^{31}P-NMR Spektren.

Danke an meine Vertiefungsstudenten, vor allem an Jessica Hilschmann und Daniel Fernschild, für die tolle Zusammenarbeit und ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

Meinem Laborkollegen Devid Hero danke ich nicht nur für die Aufnahme der MS-Spektren und Unterstützung bei den Synthesen, sondern vor allem für die fachlichen und privaten Diskussionen und die vielen lustigen und schönen Momente im Labor.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die einmalige Arbeitsatmosphäre, die tolle Zusammenarbeit, die unvergesslichen Ausflüge, die vielen Lacher und die entstandenen Freundschaften. Ich werde mich immer gerne an diese Zeit erinnern!

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die mir während der gesamten Zeit finanziell sowie mit viel Verständnis und Geduld zur Seite standen.

Und ich danke Christian, für seine Liebe, seine Motivation und seinen Rückhalt, auch in stressigen Zeiten.

Danke!