

**Wirt-Gast-Komplexe zwischen Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Polymeren und adamantylierten Proteinen für den zielgerichteten Transport von Steroidwirkstoffen**

**Dissertation**

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

**vorgelegt von  
Dennis Hermann Schwarz, M.Sc.**

**Saarbrücken, 2018**

Tag des Kolloquiums: 30.04.2019

Dekan: Prof. G. Kickelbick

Berichterstatter: Prof. G. Wenz

Prof. C.-M. Lehr

Vorsitz: Prof. J. Jauch

Akad. Mitarbeiter: Dr. B. Morgenstern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2014 bis zum Dezember 2018 am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Wenz an der Universität des Saarlandes durchgeführt.



## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport von Steroidwirkstoffen mittels CD-Polymeren mit zellspezifischen Liganden über die Darmbarriere untersucht. Im ersten Teil der Arbeit konnte die Löslichkeit von Sexualhormonen und Glucocorticoiden durch Komplexierung mit  $\beta$ -CD-Derivaten erheblich gesteigert werden.

Um die Wasserlöslichkeit der  $\beta$ -CD-Derivate und deren Verweildauer im Organismus zu erhöhen, wurden die CD-Derivate an Hyaluronsäure als biokompatibles Polymer gebunden. Dies konnte nach Einführung einer Aminogruppe in einer Monosubstitution am  $\beta$ -CD-Derivat durchgeführt werden.

Über einen Triethylenglycol-Spacer konnte Adamantan an die Aminogruppen der Lysin-Seitenketten von humanem Transferrin und Lysozym als zellspezifische Liganden gebunden werden. Die adamantylierten Lysine konnten nach tryptischen Verdau mittels MALDI-Spektroskopie identifiziert werden. Anhand von computerchemischen Methoden konnte die räumliche Lage der Adamantangruppen an den Proteinoberflächen visualisiert werden.

Die Dissoziationskonstanten der adamantylierten Proteine mit  $\beta$ -CD-Monoschichten wurden durch SPR-Spektroskopie bestimmt. Die auf der CD-Schicht immobilisierten Proteine waren weiterhin für die Bindung zum entsprechenden Antikörper bzw. für die Komplexierung des CD-HA-Polymers zugänglich.

In einem *in-vitro* Assay wurde der Transport von zwei Steroidwirkstoffen über die Darmbarriere mithilfe des CD-HA-Polymers mit und ohne Targetligand verglichen.

## Abstract

The aim of this work was the synthesis of CD-polymers with cell-specific ligands for the intestinal delivery of steroidal drugs. First, the solubility of sexual hormones and glucocorticoids was enhanced after complexation with  $\beta$ -CD derivatives.

The  $\beta$ -CD derivatives were modified first with an amino group in a monosubstitution reaction to bind to hyaluronic acid. This can increase their water solubility and retention time in the human body.

Human transferrin and human lysozyme were used as cell-specific ligands in this drug delivery system. To bind the proteins on the CD-HA polymer via supramolecular interactions, the proteins were modified on their lysine side chains with adamantane groups over a hydrophilic triethylene glycol spacer. The modified lysine side chains were identified with MALDI spectroscopy and the adamantlylated proteins were visualized with molecular modeling methods.

The equilibrium dissociation constants of the modified proteins on  $\beta$ -CD monolayers were calculated with SPR spectroscopy. After immobilization of the proteins, they can also bind to their specific antibody. In addition, their free adamantane groups can also be complexed from CD-HA-Polymer.

The delivery of two steroidal drugs was analyzed in an *in-vitro* assay on an intestinal barrier of caco2 cells and goblet cells. For the drug delivery, we used a CD-HA polymer with and without a protein as target ligand.

# **Inhaltsverzeichnis**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme .....  | 1         |
| 1.2 Cyclodextrine als Wirkstofftransporter .....  | 5         |
| <b>2 ZIELSETZUNG .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3 SOLUBILISIERUNG VON STEROID-WIRKSTOFFEN MITTELS<br/>β-CD THIOETHER DERIVATEN .....</b>                                       | <b>10</b> |
| 3.1 Steroid-Wirkstoffe .....  | 10        |
| 3.2 Komplexe von β-CD-Derivaten mit Steroid-Wirkstoffen .....   | 12        |
| 3.3 Phasenlöslichkeitsisothermen von β-CD-Derivaten.....  | 14        |
| 3.4 Diskussion der Ergebnisse .....   | 16        |
| <b>4 SYNTHESE NEUER CYCLODEXTRIN-HYALURONSÄURE-<br/>POLYMEREN .....</b>   | <b>25</b> |
| 4.1 Cyclodextrin-Polymerne als Wirkstofftransporter .....   | 25        |
| 4.2 Hyaluronsäure in Wirkstofftransportsystemen.....  | 27        |
| 4.3 Diskussion der Ergebnisse .....   | 29        |
| <b>5 SYNTHESE VON ADAMANTAN-PROTEIN-KONJUGATEN.....</b>   | <b>36</b> |
| 5.1 Biokonjugation an Proteinen .....   | 36        |
| 5.2 Proteine als Target-Liganden .....  | 40        |
| 5.3 Diskussion der Ergebnisse .....   | 42        |
| 5.3.1 Synthese der Adamantan-Triethylenglycol-Bausteinen .....  | 42        |
| 5.3.2 Synthese von Adamantan-Protein-Konjugaten .....   | 49        |
| 5.3.3 Molecular Modelling der adamantyierten Proteine .....   | 55        |
| <b>6 IMMOBILISIERUNG DER ADAMANTYLIERTEN PROTEINE AUF<br/>GOLDOBERFLÄCHEN ÜBER MULTIPLE WIRT-GAST-<br/>WECHSELWIRKUNGEN .....</b> | <b>59</b> |
| 6.1 Molekulare Erkennung an Oberflächen.....  | 59        |
| 6.2 Diskussion der Ergebnisse .....   | 61        |
| 6.2.1 Immobilisierung eines CD-Liganden auf der Goldoberfläche .....  | 62        |
| 6.2.2 Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_D$ der<br>adamantyierten Proteine .....                             | 66        |

|   |            |
|---|------------|
| 6.2.3 Weitere Bindungsstudien auf den gebundenen adamantyierten Proteinen   | 72         |
| <b>7 TRANSPORT VON STEROIDALEN WIRKSTOFFEN DURCH DIE DARMBARRIERE .....</b> | <b>77</b>  |
| 7.1 Intestinaler Wirkstofftransport nach peroraler Applikation .....        | 77         |
| 7.2 β-CD-Derivate für den intestinalen Wirkstofftransport .....             | 78         |
| 7.3 Diskussion der Ergebnisse .....   | 80         |
| <b>8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>                                  | <b>91</b>  |
| <b>9 EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>   | <b>94</b>  |
| 9.1 Materialien .....   | 94         |
| 9.2 Methoden .....  | 95         |
| • NMR-Spektroskopie .....   | 95         |
| • Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie) .....                         | 95         |
| • Massenspektrometrie mittels Elektrospray-Ionisation (ESI-MS) .....        | 96         |
| • Dünnschichtchromatographie (DC) .....                                     | 96         |
| • Ultrafiltration .....   | 96         |
| • Lyophilisation .....  | 97         |
| • Löslichkeitsisothermen der Steroidwirkstoffe .....                        | 97         |
| • Löslichkeitsmessungen der Steroidwirkstoffe .....                         | 98         |
| • Amindetektion mittels Trinitrobenzylsulfonsäure (TNBSA) .....             | 99         |
| • Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie ..... | 99         |
| • Computerchemische Methoden .....  | 101        |
| • Isotherme Titrationskalorimetrie .....                                    | 102        |
| • Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie .....                           | 102        |
| • Zellbiologische Methoden .....  | 104        |
| 9.3 Präoperativer Teil .....  | 108        |
| <b>10 ANHANG .....</b>  | <b>141</b> |
| <b>11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                       | <b>156</b> |
| <b>12 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>  | <b>162</b> |
| <b>13 TABELLENVERZEICHNIS.....</b>  | <b>166</b> |
| <b>14 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>167</b> |
| <b>15 DANKSAGUNGEN .....</b>  | <b>182</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts stellten Polymere nicht mehr nur die Grundlage für Medizinprodukte wie Kontaktlinsen, Prothesen oder Zahnfüllungen dar, sondern erhielten auch im Bereich der Therapeutika eine immer größere Bedeutung in klinischen Studien. Der Begriff der polymeren Therapeutika wurde von *Duncan* 2003<sup>[1]</sup> erstmals für verschiedene Arten von nanoskaligen Polymeren (2-100 nm) verwendet, wie z.B. polymere Wirkstoffe<sup>[2]</sup>, Polymer-Protein-Konjugate<sup>[3]</sup>, Polymer-DNA-Komplexe<sup>[4]</sup>, Polymer-Wirkstoff-Konjugate<sup>[5]</sup> und polymere Mizellen mit kovalent gebundenen Wirkstoffen<sup>[6]</sup> (siehe Abbildung 1).

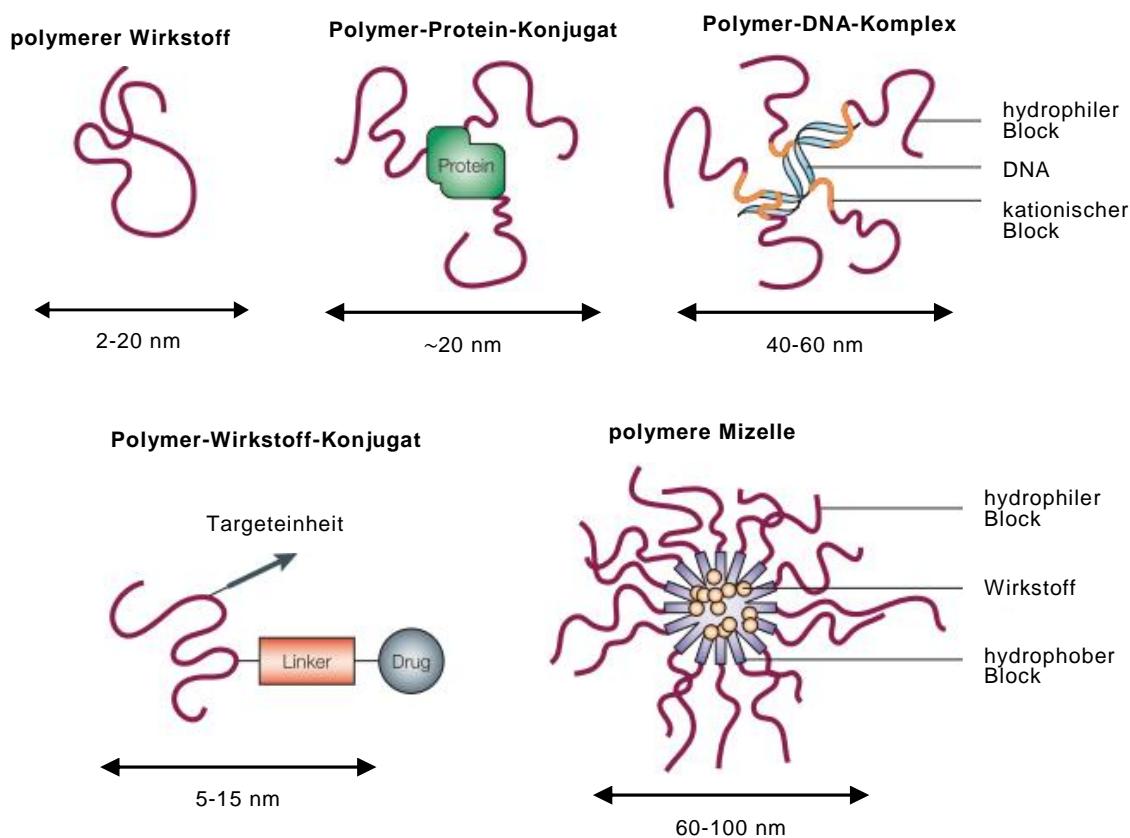


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von polymeren Therapeutika<sup>[1]</sup>.

Alle Untertypen bestehen dabei aus einem wasserlöslichen Polymer, um die Transport von hydrophoben Wirkstoffen, Proteinen oder DNA zu verbessern.

Die polymeren Hilfsstoffe dienen hierbei als Wirkstofftransportsystem. Sie sollen die Wasserlöslichkeit der meist niedermolekularen, lipophilen Wirkstoffe und somit auch deren Bioverfügbarkeit erhöhen. Durch Verwendung von Targetliganden am Wirkstofftransportsystem kann zudem ein zellspezifischer Transport ermöglicht werden. Dadurch kann die Wirkung schneller erfolgen und die Verweilzeit im Organismus erhöht werden. Ein weiterer Vorteil von Wirkstofftransportsystemen sind die kontinuierliche Freisetzung der Wirkstoffe, um somit einen gleichbleibenden Level der Wirkstoffkonzentration zu erzielen<sup>[7]</sup>. Unerwünscht auftretende Nebenwirkungen können vermieden werden, die durch die ziellose Verteilung der Wirkstoffe im Organismus auftreten können. Dadurch würden unspezifische Wechselwirkungen mit zahlreichen Rezeptoren an unterschiedlichen Zellen und Geweben resultieren<sup>[8]</sup>. Auch die Überwindung von biologischen Barrieren kann durch die Verwendung von Wirkstofftransportsystemen erzielt werden<sup>[9]</sup>.

Die Idee eines zielgerichteten Wirkstofftransportsystems beschrieb *Helmut Ringsdorf* erstmals bereits 1975, welches auf dem EPR-Effekt (engl. enhanced permeability and retention) beruht<sup>[5]</sup>. Das nach ihm benannte *Ringsdorf-Modell* ist in Abbildung 2 zu sehen.

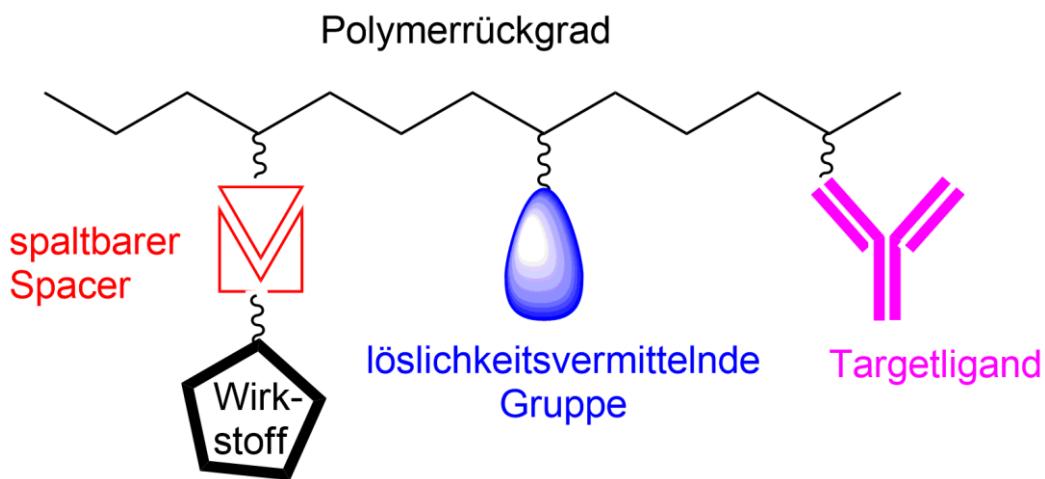


Abbildung 2: Ringsdorf Model eines zielgerichteten Wirkstofftransportsystems auf Polymerbasis<sup>[5,8]</sup>.

Der pharmazeutische Wirkstoff wird dabei über einen (enzymatisch) spaltbaren Spacer als Sollbruchstelle mit einem biostabilen und

bioabbaubaren Polymer verbunden. Des Weiteren sollte das Polymer keine Immunreaktion auslösen. Löslichkeitsvermittelnde Gruppen am Polymerrückgrad verbessern die Hydrophilie und somit auch die Bioverfügbarkeit des Wirkstofftransportsystems. Durch das Anbringen eines Targetliganden kann ein zielgerichteter Transport zu den gewünschten Zellen oder Geweben erreicht werden. Dabei stellen Antikörper, Kohlenhydrate oder Proteine geeignete Targetliganden dar, da diese durch die entsprechenden Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt werden können<sup>[7]</sup>. Nachteil von solchen Wirkstofftransportsystemen kann die bestehende Toxizität des Transportmoleküls oder dessen Abbauprodukte sein. Des Weiteren sollten die Kosten solcher Systeme nicht den therapeutischen Nutzen überschreiten. Die Freisetzung des Wirkstoffes kann entweder durch Diffusion aus dem Polymer oder durch chemischen oder enzymatischen Abbau des Systems erfolgen. Dies sollte bestenfalls erst an der gewünschten Targetzelle stattfinden<sup>[7]</sup>.

Duncan realisierte die Idee von Ringsdorf erstmals 1985, indem Sie ein Carriersystem für den hepatischen Transport von Doxorubicin, basierend auf einem N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) Copolymer, herstellte. Über ein Gly-Phe-Leu-Gly Tetrapeptid-Linker wurde Galaktosamin an das Polymerrückgrad gebunden. Aufgrund der spezifischen Bindung der Galaktose zum Asialoglycoprotein-Rezeptor konnte ein leberspezifischer Transport des Krebsmittels gewährleistet werden. Das System wurde bereits in Phase I/II Studien evaluiert<sup>[10,11]</sup>.

Da alle feuchten Epithelzellen im Körper von einer Mukusschicht bedeckt sind, welche aus Mucine, DNA, Proteine, Lipide, Zellabfällen und Wasser besteht, ist auch diese Schicht für den Wirkstofftransport über biologische Barrieren von besonderer Bedeutung. Diese Schleimhaut dient als Schutzschicht der Epithelzellen, aufgrund der netzartigen Struktur durch die intermolekularen quervernetzten Mucin-Moleküle<sup>[12]</sup>. Dadurch wird die Diffusion von NP durch die Mukusschicht erschwert. Auch die Diffusion von kleineren Molekülen wird durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen erniedrigt<sup>[13]</sup>. Für den Wirkstofftransport können nun mukoadhäsive Systeme verwendet werden, die die Verweildauer des Wirkstoffs in der Schleimhaut erhöhen. Ebenfalls

können mukopenetrierende Systeme eingesetzt werden, wenn keine Interaktionen mit der Mukusschicht gewünscht ist<sup>[14]</sup>. Beispiele für mukoadhesive Systeme sind z.B. die Polymere Chitosan<sup>[15]</sup> und Polycarbophil<sup>[16]</sup>. Suk et al. beschrieben erstmals die PEGylierung von Wirkstofftransportsystemen zur Verbesserung der mukopentrierenden Eigenschaften<sup>[17]</sup>. Der Transport von Wirkstoffen durch z.B. die intestinale Barriere kann über vier Mechanismen erfolgen: rezeptorvermittelt, carriervermittelt parazellulär oder transzellulär<sup>[18]</sup> (siehe Abbildung 3). Beim rezeptorvermittelten Transport werden die Wirkstoffe oder die Wirkstofftransportsysteme mit receptorspezifischen Liganden modifiziert, die von den entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt werden können. In der sogenannten rezeptorvermittelten Endozytose bindet der Ligand an den Rezeptor, gefolgt von einer Verclusterung der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Über Endosomen (niedrigerer pH-Wert) gelangt der Komplex in die Zelle. Über Exozytose wird der Komplex wieder an die Zelloberfläche befördert und unter physiologischen pH-Wert dissoziiert der Ligand vom Rezeptor ab<sup>[19]</sup>.

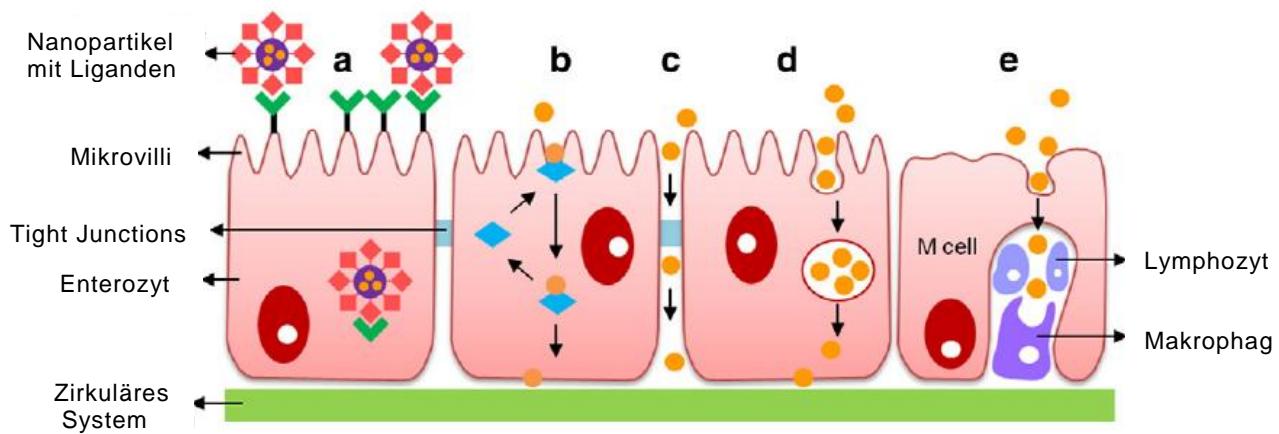


Abbildung 3: Schematische Darstellung der möglichen Transportmechanismen: a) rezeptorvermittelter Transport, b) carriervermittelter Transport, c) parazellulärer Transport, d) transzellulärer Transport und e) M Zellen-vermittelter Transport<sup>[18]</sup>.

Ein transzellulärer Transport kann auch carriervermittelt verlaufen (Abbildung 3b). Hierbei werden vor allem kleine Moleküle wie z.B. Aminosäuren oder Monosaccharide über Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt und anschließend von den Carrier-Molekülen innerhalb der Zelle transportiert<sup>[20]</sup>. Der parazelluläre Transport (Abbildung 3c) von Wirkstoffen erfolgt durch den

Zwischenraum der Zellen. Dieser passive Transport ist diffusionskontrolliert und wird von den Tight junctions beeinflusst, welche den Zwischenraum zusätzlich verengen. So ist dieser Transport nur für Moleküle mit einem Molekulargewicht <3500 Da möglich<sup>[21]</sup>. In Abbildung 3d ist der transzelluläre Transport dargestellt. Hierbei erfolgt die Endozytose ohne Anwesenheit eines Rezeptors auf der apikalen Seite der Zellmembran. Die Wirkstoffe werden danach auf der basolateralen Seite in das zirkuläre System wieder abgegeben, da diese Seite aufgrund des geringeren Protein-zu-Lipid-Verhältnisses dünner und permeabler als die apikale Seite ist. Der transzelluläre Transport ist von der Größe, der Lipophilie und der Ladung des Wirkstoffs abhängig<sup>[22,23]</sup>.

Ein weiteres Beispiel für den zielgerichteten Wirkstofftransport zur intestinalen Barriere bei einer chronisch entzündeten Darmschleimhaut ist das L-Lactid-co-Glycold Polymer. 2014 beschrieb *Ali et al*<sup>[24]</sup> dieses Polymer zum Transport des entzündungshemmenden Budesonid. Dabei wurde das synthetische Glucocorticoid im Nanopartikel (NP) durch eine Öl in Wasser Emulsionsverdampfungs-Technik verkapselt. Die NP (200 nm) wurden mit dem pH-sensitiven Methacrylat-Copolymer (Eudragit® S100) beschichtet. Der Wirkstoff wurde aus diesen 240 nm großen NP erst unter leicht basischen Bedingungen im Darm freigesetzt<sup>[24]</sup>.

## 1.2 Cyclodextrine als Wirkstofftransporter

Cyclodextrine (CDs) sind zyklische alpha-(1,4)-verknüpfte Oligomere der Glucose, welche durch enzymatischen Abbau von Maisstärke im industriellen Maßstab hergestellt werden können<sup>[25]</sup>. Industriell erhältlich sind die drei CD-Derivate mit 6, 7 oder 8 Glucoseeinheiten, genannt α-, β-, und γ-CD<sup>[26]</sup>. Die räumliche Darstellung der Cyclodextrine ist in Abbildung 4 visualisiert. α-CD und γ-CD sind nicht toxisch und als Lebensmittelzusatzstoff durch die europäische Kommission zugelassen<sup>[27–29]</sup>. β-CD ist hingegen in höheren Konzentrationen gesundheitsschädlich, da es Cholesterin aus der Zellmembran von Erythrozyten extrahieren kann<sup>[30]</sup>. Die Wasserlöslichkeit von β-CD (1.85Gew%) ist um einiges niedriger als von α-CD (14.5Gew%) bzw. γ-CD (23.2Gew%)<sup>[31]</sup>.

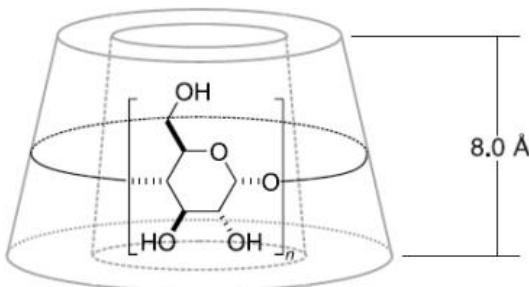


Abbildung 4: Räumliche Darstellung eines Cyclodextrin-Derivates<sup>[26]</sup>.

Cyclodextrine sind sowohl endolipophil als auch exohydrophil, da die Kavität durch die nach innen gerichteten Wasserstoffatome lipophil ist. Gleichzeitig zeigen die Hydroxylgruppen nach außen, was dieser Substanzklasse die gute Wasserlöslichkeit verleiht<sup>[26]</sup>. CDs werden aus diesem Grund als sogenannte Wirt-Moleküle bezeichnet, da sie in der Lage sind hydrophobe Gastmoleküle im wässrigen Medium im Innern ihrer Kavität zu komplexieren<sup>[26]</sup>. Hierbei stehen Wirt und Gast in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem gebildeten Komplex<sup>[32]</sup>. An dieser Art von Selbstorganisation sind vor allem der hydrophobe Effekt und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beteiligt<sup>[33,34]</sup>. In der Regel werden 1:1-Komplexe, seltener 1:2- oder 2:1-Komplexe (Wirt/Gast) gebildet. Die Gleichgewichtskonstanten  $K_S$ , sogenannte Bindungskonstanten, von 1:1 Komplexen können bis zu  $10^4 \text{ M}^{-1}$  erreichen<sup>[35,36]</sup>. Die Bindungsstärke ist hierbei abhängig von der räumlichen Passgenauigkeit und Hydrophobizität des Gastes in der Kavität des CD<sup>[37]</sup>. Komplexe mit Adamantan- und Ferrocenderivaten zeigen hier mitunter die stärksten Bindungskonstanten<sup>[38]</sup>. Um die Wasserlöslichkeit von  $\beta$ -CD zu erhöhen und gleichzeitig die Toxizität zu erniedrigen sind Derivatisierungen des nativen  $\beta$ -CD notwendig<sup>[30]</sup>. Die am meisten technisch produzierten  $\beta$ -CD-Derivate sind die statistisch substituierten Derivate Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD, *Wacker Chemie*, Deutschland) und Sulfobutylether- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD, *Ligand*, USA). Diese Derivate haben eine Wasserlöslichkeit > 50Gew% und sind weniger toxisch<sup>[39,40]</sup>.

Da die statistisch substituierten  $\beta$ -CD-Derivate eine Mischung aus verschiedenen Substitutionsgraden (engl. degree of substitution, d.s.)

aufweisen, ist die Reproduzierbarkeit und die Qualitätskontrolle erschwert. Eine Gruppe von einheitlich substituierten  $\beta$ -CD-Derivate sind die Thioether-modifizierten- $\beta$ -CD-Derivate. Hier wird ausgehend von per-6-Bromo-6-desoxy- $\beta$ -CD an der primären Seite des CD das Thiol eingeführt<sup>[41-43]</sup>. Die hydrophoben Thioether-Substituenten befinden sich hierbei über der hydrophoben Kavität der CD-Derivate. Aus diesem Grund erreichen  $\beta$ -CD-Derivate mit Thioether-Substituenten an den primären Hydroxylgruppen eine Bindungsstärke von  $K_S > 10^6 \text{ M}^{-1}$ <sup>[44,45]</sup>. Im Gegensatz dazu erniedrigen Substituenten an der sekundären Seite des CD die Bindungsstärke, da durch die Substituenten die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen gestört wird, welche für die rigide Kavität verantwortlich sind<sup>[46]</sup>. Hydrophile  $\gamma$ -CD Thioether Derivate zeigen besonders gute Affinitäten zu polyzyklischen Aromaten<sup>[47]</sup>, Fulleren C<sub>60</sub><sup>[48]</sup> oder Botulin<sup>[49]</sup>. Es gibt bereits einige Arzneimittelformulierungen auf dem Markt, welche CD-Derivate als Gastmoleküle verwenden, um die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes zu erhöhen. So wird zum Beispiel Nicotin als Komplex mit  $\beta$ -CD als sublinguale Tablette (*Nicorette, Pharmacia, Schweden*) vertrieben. Das Scherzmittel Diclofenac kann durch Komplexierung mit HP- $\gamma$ -CD als Augentropfen (*Voltaren, Novartis, Frankreich*) verabreicht werden<sup>[50]</sup>. Durch HP- $\beta$ -CD kann die Bioverfügbarkeit des Antimykotikums Itraconazol (*Sporanox, Janssen Pharmaceutica, USA*) durch Verabreichung als orale Lösung im Vergleich zu einer Kapsel um 30% gesteigert werden<sup>[51]</sup>. Voriconazole, ein weiteres Antimykotikum, wird nach Komplexierung mit SBE- $\beta$ -CD (*Vfend, Pfizer, Deutschland*) intravenös appliziert<sup>[52]</sup>. Das vollständig mit Ethylcarboxylatgruppen modifizierte Thioether- $\gamma$ -CD-Derivat *Sugammadex* (Grünenthal, Deutschland) wird zur Komplexierung des Muskelrelaxans Rocuronium eingesetzt. Nach einer Anästhesie kann durch die Gabe von Sugammadex die Wirkung des Rocuronium binnen weniger Minuten aufgehoben werden<sup>[53]</sup>. Probleme einer Arzneimittelformulierung über CD-Derivate sind zum Einen der auftretende cytotoxische Effekt der CDs, der ab einer gewissen CD-Konzentration auftritt<sup>[54]</sup>. Zum Anderen ist auch die Verweildauer der CD-Derivate im Organismus relativ gering, da diese recht schnell über die Niere eliminiert werden<sup>[55]</sup>.

## 2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese und Charakterisierung eines neuen Wirkstofftransportsystems, dessen Grundlage die supramolekularen Wechselwirkungen zwischen hydrophoben pharmazeutischen Wirkstoffen (Gast) und Cyclodextrinen (Wirt) sind. Hierfür sollen verschiedene  $\beta$ -CD-Derivate an ein wasserlösliches biokompatibles, bioabbaubares Polymer gebunden werden, um die Toxizität der CD-Derivate zu verringern und die Verweildauer im Organismus zu erhöhen. Eine schematische Darstellung des hergestellten Wirkstofftransportsystems ist in Abbildung 5 visualisiert.

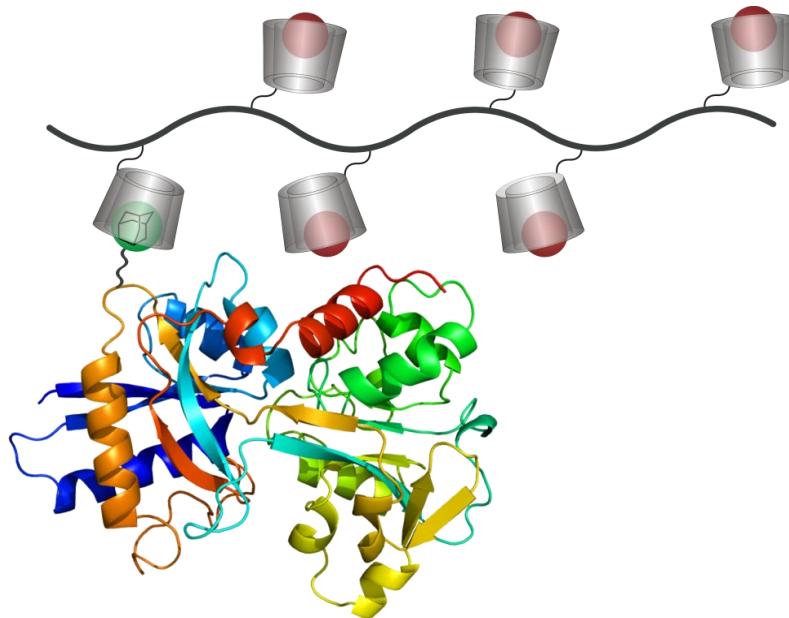


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Wirkstofftransporters, bestehend aus  $\beta$ -CD-Biopolymer-Konjugat und adamantyliertem Protein (Wirkstoff = rote Kugeln).

Das synthetisierte Wirkstofftransportsystem soll als supramolekulares, polymeres Prodrug-Konzept für Steroidhormone (rote Kugeln in Abbildung 5) verwendet werden, da diese Wirkstoffklasse optimal in die Kavität der CDs passt. Zudem sind steroidale Wirkstoffe sehr potent, wodurch nur eine geringe Menge des Wirtmoleküls benötigt wird.

Im Folgenden soll nun untersucht werden, inwiefern die Solubilisierung der steroidalen Wirkstoffe durch Thioether- $\beta$ -CD-Derivate und deren Polymere verbessert werden kann. Für einen zielgerichteten Transport sollen

targetspezifische Liganden mit guten Gastmolekülen für  $\beta$ -CDs modifiziert werden. Die supramolekularen Wechselwirkungen der modifizierten Liganden und den CD-Polymeren soll hierbei genauer analysiert werden. Aufgrund dieses supramolekularen Netzwerkes, können die einzelnen Bestandteile des Wirkstofftransportsystems separat hergestellt werden und nach Bedarf in einer Art Baukastensystem im wässrigen Milieu zusammengegeben werden. Im letzten Schritt soll die Löslichkeit und die Permeabilität der steroidalen Wirkstoffe mithilfe des Wirkstofftransportsystems über passende biologische Barrieren untersucht werden.

### 3 Solubilisierung von Steroid-Wirkstoffen mittels $\beta$ -CD Thioether Derivaten

#### 3.1 Steroid-Wirkstoffe

Steroide sind polyzyklische Isoprenoide, die aus drei Sechsringen (A, B und C-Ring) und einem Fünfring (D-Ring) aufgebaut sind. Die Biosynthese der natürlichen Steroidhormone erfolgt ausgehend von Cholesterin über enzymatische Umwandlungen. Steroide bilden eine sehr wichtige Substanzklasse, da viele Funktionen im Organismus hormonell gesteuert werden. Ein Überblick der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Steroid-Wirkstoffe gibt Abbildung 6.

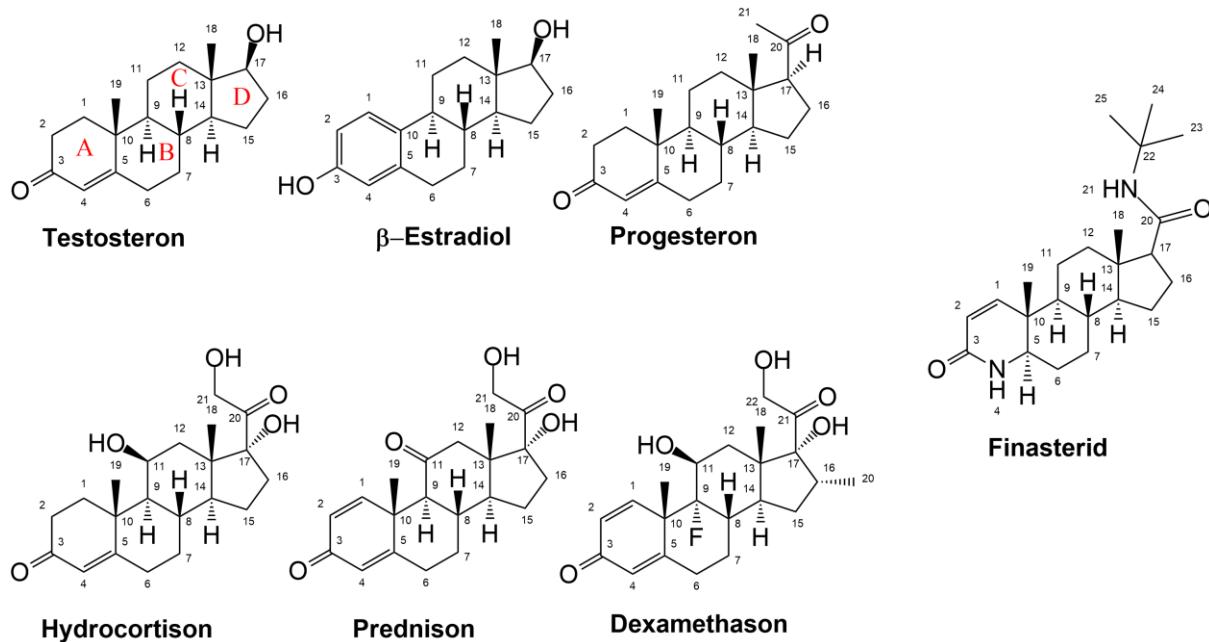


Abbildung 6: Strukturen einiger ausgewählter steroidaler Wirkstoffe.

Zu den Sexualhormonen gehören z.B.  $\beta$ -Estradiol, Progesteron und Testosteron welche für die Ausbildung der Geschlechtsmerkmale und die Steuerung der Sexualfunktionen zuständig sind<sup>[56,57]</sup>. Eine weitere Klasse von Steroidhormonen bilden die Glucocorticoide. Sie wirken entzündungshemmend und immunsuppressiv<sup>[58]</sup>. Mineralocorticoide wie z.B. Aldosteron beeinflussen den Wasser- und Mineralhaushalt im Organismus<sup>[59]</sup>. Durch die hohe Lipophilie der Steroidhormone sind diese in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu

passieren<sup>[60]</sup>. Für den Transport im Serum sind die Steroidhormone vor allem an spezifisch bindenden Globuline und am Serum Albumin gebunden<sup>[61–63]</sup>.

Aufgrund der starken Wirkung der Steroidhormone werden diese gerne auch als aktive pharmazeutische Wirkstoffe (engl. active pharmaceutical ingredients, APIs) eingesetzt. Das männliche Sexualhormon Testosteron wird in der sogenannten Testosteron-Ersatz-Therapie vor allem älteren Männern verabreicht, die mit Symptomen wie erektiler Dysfunktion, Verringerung an Muskelmasse und dem metabolischen Syndrom zu kämpfen haben<sup>[64,65]</sup>. Die weiblichen Sexualhormone β-Estradiol und Progesteron werden ebenfalls als Arzneistoffe für ältere Frauen während der hormonellen Umstellung in der Menopause verabreicht, um Beschwerden wie z.B. das Klimakterium zu lindern<sup>[66,67]</sup>. Aufgrund der Lipophilie der Sexualhormone wird die Kontrolle der verabreichten Dosis erschwert. Über den peroralen Weg müssen aufgrund der schlechten Absorptionsrate und des First-Pass-Effektes beispielsweise 17α-alkylierte Testosteronderivate mehrmals täglich in hochdosierten Mengen eingenommen werden. Dies kann schnell zu einer Überdosierung führen, was die Wahrscheinlichkeiten für Nebenwirkungen wie Prostata- oder Lebertumoren erhöht<sup>[68,69]</sup>. Begünstigt durch die gute Durchlässigkeit für Testosteron werden auch transdermale Gele und Pflaster, welche Ethanol als Lösungsvermittler beinhalten, auf die Haut appliziert. Über diesen transdermalen Weg können stabile hohe Testosteronkonzentrationen im Serum erzeugt werden<sup>[70]</sup>.

Die Glucocorticoide besitzen eine bessere Wasserlöslichkeit als die Sexualhormone, da sie mehr Hydroxylgruppen am Steroidgerüst besitzen. Auch diese Substanzklasse wird gerne als Arzneistoff eingesetzt. So wird Hydrocortison z.B. systemisch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Vermeidung einer Transplantationsabstoßung eingesetzt<sup>[58]</sup>.

Auch synthetische Steroidhormone, welche sich durch kleinere Modifikationen am Steroidgerüst von den natürlichen Steroidhormonen unterscheiden, werden als APIs verwendet. Prednison und Dexamethason sind synthetische Glucocorticoide, welche eine höhere Potenz im Gegensatz zu Hydrocortison zeigen, allerdings aber weniger gut wasserlöslich sind<sup>[71]</sup>. Finasterid ist ein synthetisches Steroid, welches als Inhibitor der 5α-Reduktase (Typ II/III) die Umwandlung von Testosteron in das potentere Dihydrotestosteron hemmt<sup>[72]</sup>.

Aus diesem Grund wird es für androgenabhängige Erkrankungen wie der benignen Prostatahyperplasie und der androgenen Alopezie eingesetzt<sup>[73,74]</sup>. Trotz der schlechten Wasserlöslichkeit von Finasterid wird es vor allem oral als auch transdermal verabreicht<sup>[75,76]</sup>. Hierbei kann es zu Nebenwirkungen wie erektiler Dysfunktion und Depressionen kommen<sup>[74]</sup>.

Wegen der Hydrophobizität der Steroid-Wirkstoffe werden diese momentan mehr über den transdermalen Weg in Form von Hydrogelen appliziert. Hierbei ist immer ein Co-Solvenz wie z.B. Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) notwendig. Eine tägliche Exposition von Ethanol auf der Haut führt allerdings zu Hautirritationen. Um die Nebenwirkungen über den transdermalen Weg zu reduzieren und eine höhere Bioverfügbarkeit über den peroralen Weg zu ermöglichen, können die steroidalen Wirkstoffe auch mittels β-CD-Derivaten im wässrigen System solubilisiert werden.

### **3.2 Komplexe von β-CD-Derivaten mit Steroid-Wirkstoffen**

β-CD-Derivate sind in der Lage neben Adamantan und Ferrocen auch Steroide zu komplexieren, da der innere Durchmesser der CDs zwischen 0.58 und 0.65 nm liegt<sup>[77]</sup>. Durch die Fähigkeit Cholesterin aus der Zellmembran zu komplexieren, resultiert der hämolytische Effekt von β-CD und dessen methylierten Derivaten<sup>[78]</sup>. Die Möglichkeit der Komplexierung von Cholesterin hat aber auch positive Effekte. So wird die Komplexierung von Cholesterin-Plaques durch methyliertes β-CD für den Einsatz in der Alzheimer-Therapie diskutiert<sup>[79]</sup>. Auch Hydroxypropyl-β-CD (HP-β-CD) kann Cholesterin maskieren, wodurch dieses Derivat gegen die Nieman-Pick-Krankheit eingesetzt werden kann<sup>[80]</sup>. Der Komplex von Testosteron mit HP-β-CD hat eine höhere Löslichkeit als der Komplex mit nativem β-CD und wird für eine sublinguale Applikation in den USA (*Andotest-SL*, Savient Pharmaceuticals, USA) vertrieben<sup>[81]</sup>. Die Aufnahme über die Mundschleimhaut hat den Vorteil, dass der Wirkstoff direkt in das zirkuläre System des Blutkreislaufes gebracht wird, wodurch der First-Pass-Effekt vermieden werden kann<sup>[82]</sup>. Die Solubilisierung von β-Estradiol mithilfe von Dimethyliertem β-CD (DIMEB) (Aerodiol, Servier, Frankreich) kann über die nasale Schleimhaut

aufgenommen werden<sup>[83]</sup>. Die Glucocorticoide können ebenfalls mittels  $\beta$ -CD-Derivaten solubilisiert werden. In klassischen Formulierungen werden Myristinsäureisopropylester und Isopropanol als Co-Solventen eingesetzt<sup>[84]</sup>. Über den transdermalen Weg zeigen Komplexe von Hydrocortison mit HP- $\beta$ -CD höhere Permeationsraten durch die Haut als mit der Verwendung eines Co-Solventen<sup>[85]</sup>. Der Komplex aus Hydrocortison und HP- $\beta$ -CD wird bereits als Arzneistoff eingesetzt (*Dexocort, Actavis, Island*). Dexamethason wird als Komplex mit  $\beta$ -CD (*Glymesason, Fujinaga, Japan*) und HP- $\beta$ -CD in Augentropfen gegen Bindegewebstzündungen verabreicht<sup>[86]</sup>. Die Kombination aus den Komplexen des Tetrapeptids Carfizomib und Dexamethason mit SBE- $\beta$ -CD wurde bereits in einer Phase III Studie gegen das multiple Myelom getestet. Hierbei wurde eine zweimal wöchentliche Dosis von  $27 \text{ mg/m}^2$  im Vergleich zu einer einmal wöchentlichen Dosis von  $70 \text{ mg/m}^2$  ebenfalls zugelassen<sup>[87]</sup>. Der transdermale Transport von Finasterid konnte bisher mithilfe von CD konjugierten Chitosan-Nanopartikeln realisiert werden<sup>[88]</sup>.

Die Bindungskonstanten  $K_s$  von Steroidhormonen mit  $\beta$ -CD-Derivaten sind bereits mehrfach publiziert worden<sup>[89–94]</sup>. Da die Löslichkeit und die Bindungskonstanten allerdings stark von der Ionenstärke des Lösungsmittels und vom Aussalz-Effekt abhängig sind<sup>[95]</sup>, sind die publizierten Werte untereinander schlecht vergleichbar. Auch die Wahl der Analysemethode beeinflusst die erzielten Bindungskonstanten<sup>[36]</sup>. Die bereits publizierten  $K_s$ -Werte liegen zwischen  $673 \text{ M}^{-1}$  (1:1 Komplex zwischen Finasterid und HP- $\beta$ -CD<sup>[90]</sup>) und  $32500 \text{ M}^{-1}$  (1:1 Komplex zwischen  $\beta$ -Estradiol und  $\beta$ -CD<sup>[96]</sup>). Der stabilste Komplex mit  $\beta$ -Estradiol ist auf die größere Hydrophobizität von  $\beta$ -Estradiol aufgrund des aromatischen A-Rings zurückzuführen. Generell werden bei hydrophileren Steroiden nur der A-Ring komplexiert, wohingegen bei hydrophoberen Steroiden das gesamte Molekül in der Kavität des CDs aufgenommen werden kann<sup>[97]</sup>. Weiterhin werden die Stabilitätskonstanten auch von den Seitenketten am D-Ring beeinflusst<sup>[98]</sup>. Aus diesem Grund bilden  $\beta$ -CD-Derivate mit Progesteron stabilere Komplexe als mit Testosteron.

### 3.3 Phasenlöslichkeitsisothermen von $\beta$ -CD-Derivaten

Zur Untersuchung der Einschlusssverbindungen von Gastmolekülen in der Kavität der CDs ist die Bestimmung der Stabilitätskonstante  $K_S$  bzw. der Dissoziationskonstante  $K_D$  mithilfe von Phasenlöslichkeitsisothermen eine gebräuchliche Methode. Auch die Stöchiometrie des Gleichgewichtes kann hierüber bestimmt werden. Diese Methode wurde erstmals 1965 von *Higuchi und Conners*<sup>[99]</sup> beschrieben. Experimentell wird ein Überschuss an schlecht löslichem Gastmolekül zu wässrigen Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines CD-Derivates zugegeben. Bei konstanter Temperatur wird bis zur Einstellung des Gleichgewichtes geschüttelt, der Überschuss an Gast abfiltriert und die gelöste Menge des Gastes mittels UV-Vis oder HPLC analysiert. Für die Löslichkeitsisothermen werden die gelösten Gastkonzentrationen gegen die Konzentrationen des eingesetzten CD-Derivates aufgetragen. Dabei lassen sich zwei Typen von Phasenlöslichkeitsdiagrammen feststellen<sup>[99]</sup> (siehe Abbildung 7).

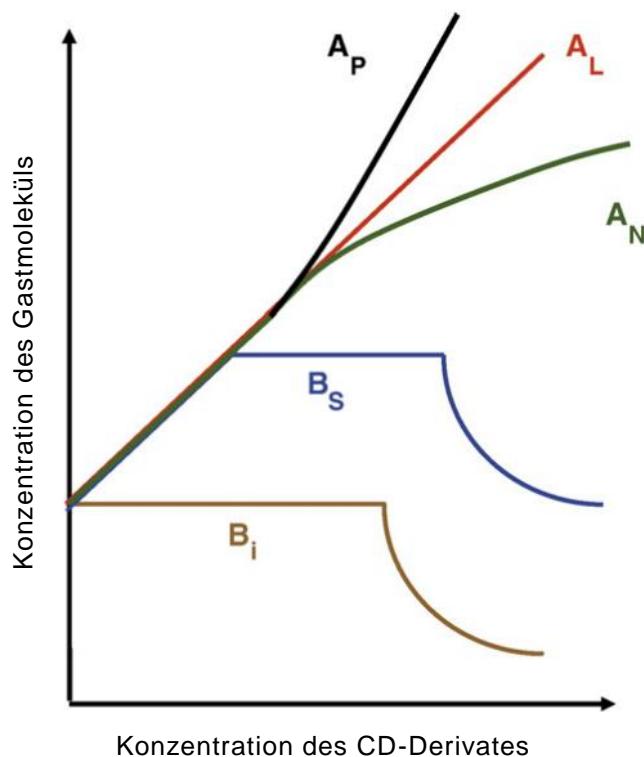


Abbildung 7: Arten der Phasenlöslichkeitsisothermen<sup>[32]</sup>.

A-Typ Profile zeigen einen Anstieg der Gastkonzentration mit steigender CD-Konzentration. Drei Untertypen sind bei den A-Typ Profilen zu erkennen. Während der  $A_L$ -Typ einen linearen Anstieg der Gastkonzentration aufzeigt, so weichen die  $A_P$  und  $A_N$ -Typen von der Linearität ab. Der  $A_P$ -Typ zeigt einen stärkeren Solubilisierungs-Effekt des CD-Derivates bei höheren Konzentrationen und der  $A_N$ -Typ einen schwächeren Solubilisierungs-Effekt. Alle A-Typ Profile weisen auf die Bildung eines gut wasserlöslichen Komplexes hin, dessen Löslichkeiten höher liegen als die des freien Gastes. Hat die Steigung der Isothermen einen Wert  $> 1$ , so können auch Komplexe höherer Ordnung (2:1, CD/Gast) gebildet werden. Bei einer Steigung mit einem Wert  $< 1$  liegen eher 1:1 Komplexe vor<sup>[100]</sup>. B-Typ Profile sind bei der Bildung von schlecht wasserlöslichen Komplexen zu erkennen. Im  $B_S$ -Untertyp bildet sich zunächst mit steigender CD-Konzentration ein wasserlöslicher Komplex aus, wodurch die Löslichkeit des Gastes zunimmt. Ab einer bestimmten CD-Konzentration wird eine maximale Gastkonzentration erreicht. Durch Zugabe höherer CD-Mengen werden die gebildeten Komplexe unlöslich und fallen aus, bis die Grundlöslichkeit des freien Gastes wieder erreicht wird. Im  $B_I$ -Untertyp sind die gebildeten Komplexe so unlöslich, dass sich auch bei geringen CD-Konzentrationen keine Erhöhung der Gastkonzentration einstellen kann<sup>[99]</sup>.

Wenn ein 1:1-Komplex zwischen CD-Derivat und Gastmolekül gebildet wird, so steigt die Löslichkeit des Steroids linear mit zunehmender CD-Konzentration an. Die Steigung der Löslichkeitsisothermen  $s$  spiegelt hierbei das molare Verhältnis von komplexiertem Gastmolekül pro Wirtmolekül wider. Die Bindungskonstante  $K_s$  kann aus der Steigung der Löslichkeitsisothermen  $s$  und der Eigenlöslichkeit  $[G]_0$  des Gastes ohne Anwesenheit eines Wirtmoleküls nach Connors et al. mithilfe von Formel (1) ermittelt werden<sup>[101,102]</sup>.

$$K_s = \frac{s}{(1 - s) \cdot [G]_0} \quad (1)$$

mit  $K_s$  = Bindungskonstante [ $M^{-1}$ ]

$s$  = Steigung der Löslichkeitsisothermen

$[G]_0$  = Eigenlöslichkeit des Gastmoleküls im Lösungsmittel [ $M$ ]

Die Bindungskonstante kann sowohl im linearen Bereich der Löslichkeitsisothermen aller A-Typ Profile als auch des B<sub>S</sub>-Typ Profils bestimmt werden.

Das molare Verhältnis zwischen Komplex zu freien Wirtmolekül wird Komplexierungseffizienz (engl. complexation efficiency, CE) genannt und wird nach *Loftsson et al.* aus der Steigung der Löslichkeitsisothermen mit Formel (2) berechnet<sup>[103]</sup>.

$$\text{CE} = \frac{s}{1-s} \quad (2)$$

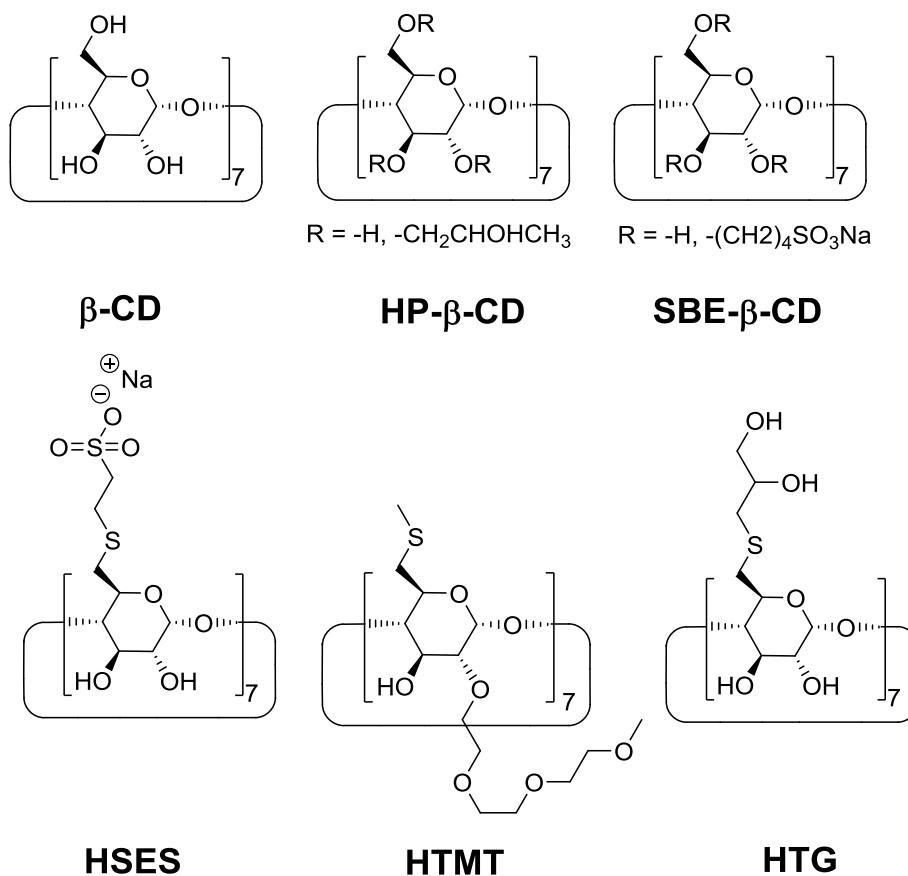
mit CE = Komplexierungseffizienz

s = Steigung der Löslichkeitsisothermen

Vorteil der CE-Werte im Vergleich zu den K<sub>S</sub>-Werten ist die geringere Empfindlichkeit der CE-Werte gegenüber Fehlern in der Bestimmung der intrinsischen Löslichkeit des Gastmoleküls. Im Folgenden werden nun die Bindungskonstanten und die Komplexierungseffizienzen der hergestellten Steroid- $\beta$ -CD-Komplexe untereinander diskutiert.

### 3.4 Diskussion der Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wurde die Solubilisierung der zuvor erwähnten sieben steroidalen Wirkstoffe mit drei kommerziell erhältlichen  $\beta$ -CD-Derivaten und drei im Arbeitskreis hergestellte Thioether- $\beta$ -CD-Derivate untersucht. Als kommerziell erhältliche  $\beta$ -CD-Derivate wurde das native  $\beta$ -CD und die zufällig modifizierten Derivate HP- $\beta$ -CD (d.s. = 6.3) und SBE- $\beta$ -CD (d.s. = 7.0) verwendet. Zum Vergleich wurden die Löslichkeiten mit den Thioether- $\beta$ -CD-Derivaten Heptakis-6-sulfoethylsulfanyl-6-deoxy- $\beta$ -CD<sup>[43]</sup> (**HSES**), Heptakis-6-methylsulfanyl-6-deoxy-[2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl]- $\beta$ -CD<sup>[41]</sup> (**HTMT**) und Heptakis-6-thioglycerin-6-deoxy- $\beta$ -CD<sup>[43]</sup> (**HTG**) evaluiert (siehe Abbildung 8). Die Ergebnisse wurden bereits im *International Journal of Pharmaceutics* veröffentlicht<sup>[104]</sup>.

Abbildung 8: Struktur der eingesetzten  $\beta$ -CD-Derivate.

Um physiologische Bedingungen zu simulieren, wurde die Solubilisierungen der Wirkstoffe in einem isotonischen HEPES-Puffer (pH 7.4) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Löslichkeit der Steroidwirkstoffe wurde in Anwesenheit von  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD und SBE- $\beta$ -CD mittels UV-Vis Spektroskopie bestimmt<sup>[100]</sup>. Da die UV-Absorptionen der Thioether-modifizierten CD-Derivate mit den UV-Absorptionen der Steroide bei 240 nm überlagern, wurde die Löslichkeit der Steroide hierbei mithilfe von Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) mit UV-Detektion analysiert. Zum Vergleich wurde auch die Löslichkeit mithilfe des natürlichen Carriers für Steroidhormone (humanes Serum Albumin, HSA) bestimmt. Da auch die UV-Absorption von HSA mit der der Steroide überlagert, wurde die in Lösung gebrachte Menge der Steroide mit n-Octanol aus der wässrigen Pufferphase extrahiert. Um die Konzentration an Steroid zu bestimmen, wurde die n-Octanol-Phase auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde für die Bestimmung der Löslichkeiten aller

Steroide jeweils die gleiche Menge an  $\beta$ -CD-Derivat bzw. HSA zugesetzt. Da bei einem gesunden Menschen die HSA-Konzentration im Serum 4 mg/100mL<sup>[105]</sup> beträgt, wurde eine einheitliche Konzentration der Additiven von 4Gew% in HEPES-Puffer gewählt. Ein Überblick der somit erzeugten Löslichkeiten der Steroide im wässrigen Puffersystem im Vergleich zur Eigenlöslichkeit  $[G]_0$  zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Löslichkeiten der steroidalen Wirkstoffe in isotonischem HEPES-Puffer (pH 7.4, 25°C) unter Verwendung verschiedener Carrier (Konzentration 4Gew%).

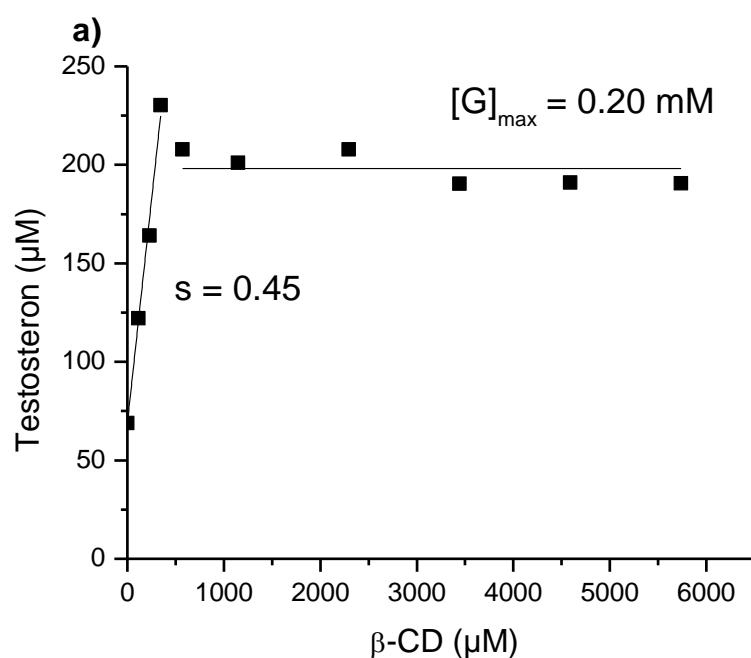
|                                     | Eigenlöslich-keit $[G]_0$<br>(mM) | HSA<br>(mM) | $\beta$ -CD**<br>(mM) | HP- $\beta$ -CD<br>(mM) | SBE- $\beta$ -CD<br>(mM) | HSES*<br>(mM) | HTMT*<br>(mM) | HTG*<br>(mM) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>Testosteron</b>                  | 0.069                             | 0.72        | 0.20                  | 13.54*                  | 11.20                    | 19.85         | 7.74          | 0.23         |
| <b><math>\beta</math>-Estradiol</b> | 0.0011                            | 0.58        | 0.56                  | 5.70                    | 6.41                     | 19.32         | 1.85          | 0.31         |
| <b>Progesteron</b>                  | 0.00089                           | 0.49        | 0.08                  | 8.91                    | 8.42                     | 17.49         | 6.34          | 2.51         |
| <b>Hydrocortison</b>                | 0.91                              | 1.15        | 5.65*                 | 13.27*                  | 10.02                    | 12.60         | 5.44          | 2.62         |
| <b>Prednison</b>                    | 0.32                              | 0.45        | 2.93                  | 11.77                   | 8.05                     | 10.07         | 2.74          | 1.05         |
| <b>Dexamethason</b>                 | 0.17                              | 0.35        | 4.91                  | 5.19                    | 5.25                     | 4.17          | 2.05          | 3.65         |
| <b>Finasterid</b>                   | 0.15                              | 0.88        | 0.37                  | 6.98                    | 6.95                     | 16.37         | 7.81          | 0.55         |

\*gemessen mit HPLC

\*\*Konzentration von  $\beta$ -CD: 1.5Gew%

Die Löslichkeiten der Steroide ohne Zusatz eines Wirkstofftransportsystems befinden sich zwischen 0.89  $\mu$ M für Progesteron und 0.91 mM für Hydrocortison. Somit verfügt dieses Glucocorticoid eine 1000-Fach höhere Löslichkeit im wässrigen Milieu als das Gelbkörperhormon. Generell ist zu beobachten, dass die Sexualhormone eine deutlich geringere Wasserlöslichkeit besitzen als die Glucocorticoide. Die Eigenlöslichkeit der Steroidhormone zeigt hierbei eine Abhängigkeit von der Anzahl an hydrophilen Hydroxylgruppen am Steroidgerüst. Progesteron besitzt keine Hydroxylgruppe, wohingegen Hydrocortison drei Hydroxylgruppen besitzt. Die großen Unterschiede in der Löslichkeit verschwinden nach Zugabe von 4Gew% des natürlichen Transporters HSA. Die Löslichkeit der Sexualhormone nach Zugabe von HSA liegt zwischen 0.49 mM (Progesteron) und 0.72 mM (Testosteron), die Löslichkeit der Glucocorticoide zwischen 0.35 mM (Dexamethason) und 1.15 mM (Hydrocortison). Die Steroidlöslichkeit durch Zugabe von nativem  $\beta$ -CD befindet sich auf dem Niveau, das nach der Zugabe von HSA erreicht wurde.

Allerdings konnte aufgrund der schlechteren Wasserlöslichkeit von  $\beta$ -CD nur eine 1.5Gew%-Lösung von  $\beta$ -CD verwendet werden. Somit zeigt schon das native  $\beta$ -CD einen besseren Effekt im Vergleich zu HSA, um die Löslichkeit der Steroidhormone zu erhöhen. Im Gegensatz dazu zeigen alle hydrophilen  $\beta$ -CD-Derivate (HP- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD, **HSES** und **HTMT**) eine deutliche Erhöhung der Wasserlöslichkeiten der steroidalen Wirkstoffe. Durch Zugabe von 4Gew% des 7-fach negativ geladenen  $\beta$ -CD-Derivats **HSES** konnten die höchsten Steroidkonzentrationen im wässrigen Puffersystem mit einer Löslichkeit bis zu 19 mM erzielt werden. Durch Komplexierung von Progesteron mit **HSES** konnte die Löslichkeit um den Faktor 19000 erhöht werden. Die geringsten Effekte zeigten die Komplexierungen von Testosteron bzw. Finasterid mit nativem  $\beta$ -CD. Hier konnte nur eine Erhöhung der Löslichkeit um den Faktor 3 beobachtet werden. Komplexe mit **HTG** zeigen als einziges Thioether- $\beta$ -CD-Derivat nur eine schwache Erhöhung der Steroidlöslichkeit. Diese liegt nur auf dem Niveau der Komplexe mit nativem  $\beta$ -CD. Um die großen Unterschiede im Solubilisierungseffekt besser zu verstehen, wurden Phasenlöslichkeitsisothermen aller Steroid/ $\beta$ -CD-Komplexe vermessen. Beispielhaft sind die Löslichkeitsisothermen von Testosteron mit  $\beta$ -CD und mit **HSES** in Abbildung 9 gezeigt.



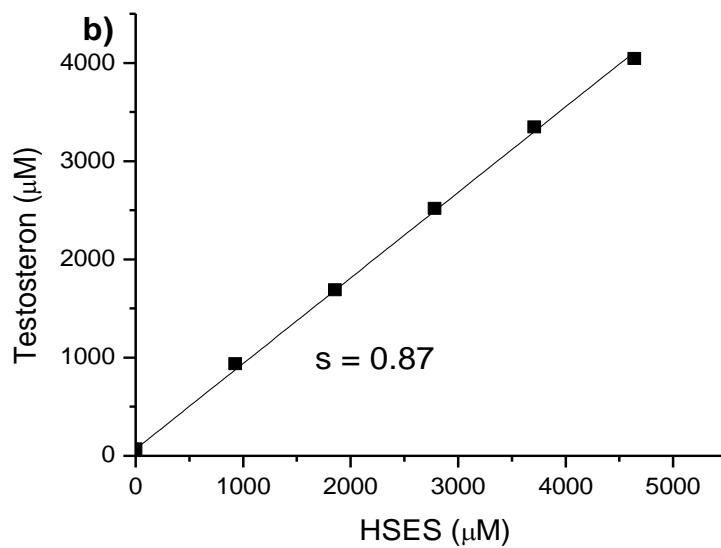


Abbildung 9: Phasenlöslichkeitsisotherme von Testosteron in isotonischem HEPES Puffer (10 mM, pH 7.4) mit a)  $\beta$ -CD und b) **HSES**

Die Löslichkeitsisotherme von Testosteron mit  $\beta$ -CD (Abbildung 9a) zeigt  $B_S$  Charakteristik. Die Löslichkeit von Testosteron steigt linear mit steigender  $\beta$ -CD-Konzentration bis zu 0.5 mM an. Der Sättigungseffekt, begründet durch die limitierende Löslichkeit des Testosteron/ $\beta$ -CD-Komplexes, führt zu einer maximalen Testosteron-Konzentration von  $[G]_{\max} = 0.2$  mM. In Abbildung 9b zeigt die Löslichkeitsisotherme von Testosteron mit **HSES** eine  $A_L$ -Charakteristik. Hier stellt sich kein Sättigungseffekt ein und es konnte eine Testosteron-Konzentration bis zu 4 mM erreicht werden. Anhand der Steigungen der beiden Isothermen ist ebenfalls zu erkennen, dass **HSES** in der Lage ist, doppelt so viel Testosteron zu komplexieren als  $\beta$ -CD. Dies liegt begründet in der vergrößerten Kavität des **HSES** durch die hydrophoben Thiolgruppen<sup>[44]</sup>.

Die molaren Komplexierungseffizienzen CE von allen Steroid/ $\beta$ -CD-Derivat-Komplexe sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Komplexierungseffizienz CE der  $\beta$ -CD-Derivate mit den Steroidwirkstoffen

|                                     | $\beta$ -CD | HP- $\beta$ -CD | SBE7- $\beta$ -CD | HSES*  | HTMT* | HTG*  |
|-------------------------------------|-------------|-----------------|-------------------|--------|-------|-------|
| <b>Testosteron</b>                  | 0.818       | 0.754*          | 1.174             | 15.667 | 2.571 | ---   |
| <b><math>\beta</math>-Estradiol</b> | 0.389       | 0.235           | 0.515             | 3.000  | 0.099 | 2.571 |
| <b>Progesteron</b>                  | 0.136       | 0.351           | 0.887             | 2.846  | 0.613 | ---   |
| <b>Hydrocortison</b>                | 1.632*      | 0.695*          | 0.695             | 3.348  | 0.754 | 0.351 |
| <b>Prednison</b>                    | 0.852       | 0.429           | 0.754             | 1.128  | 0.220 | 0.923 |
| <b>Dexamethason</b>                 | 0.266       | 0.190           | 0.370             | 0.299  | 0.136 | 0.754 |
| <b>Finasterid</b>                   | 0.563       | 0.299           | 0.538             | 2.030  | 0.250 | 1.632 |

\*gemessen mit HPLC

Unter den Steroid/ $\beta$ -CD-Derivat-Komplexen fällt auf, dass die CE-Werte der Steroid-Komplexe mit HP- $\beta$ -CD geringer sind, als mit nativem  $\beta$ -CD. Grund hierfür könnten die Hydroxypropyl-Substituenten sein, welche sich nicht nur auf der primären Seite des CD, sondern auch auf der sekundären Seite des CD befinden. Wie in Kapitel 1.2 bereits erwähnt, können Substituenten an der sekundären Seite des CD die Komplexbildungsfähigkeit verringern<sup>[46]</sup>. Die Komplexe mit dem SBE- $\beta$ -CD zeigen dagegen höhere CE-Werte als die Komplexe mit HP- $\beta$ -CD, da die hydrophoben Butylgruppen an der primären Seite des CD die Kavität vergrößern können<sup>[106]</sup>. Das anionische Thioether-Derivat **HSES** zeigt noch größere Komplexierungseffizienzen als das anionische SBE- $\beta$ -CD aufgrund der hydrophoben Schwefelgruppen<sup>[44]</sup>. Die Komplexe mit den beiden neutralen Thioether- $\beta$ -CD-Derivaten **HTMT** und **HTG** zeigen allerdings geringere CE-Werte, da die Wasserlöslichkeit der gebildeten Komplexe aufgrund von Aggregatbildung dieser Wirtmoleküle verringert ist. Die Komplexierungseffizienz des **HTG** ist dabei am geringsten. Des Weiteren ist eine spezifische Erkennung zwischen den beiden Sexualhormonen Testosteron und  $\beta$ -Estradiol unter den neutralen Thioether-Derivaten zu beobachten. **HTG** komplexiert nur das weibliche Hormon  $\beta$ -Estradiol und **HTMT** hat eine höhere Präferenz zum männlichen Hormon Testosteron. Diese Geschlechterspezifität lässt sich auf die zusätzliche Methylgruppe 19 am Kohlenstoffatom 10 des Testosterons zurückführen. Durch diese Methylgruppe wird eine Aufnahme in die Kavität des **HTG** verhindert. **HTMT** hingegen ist an allen O-2 Positionen substituiert, wodurch die sekundäre Seite dieses Wirtmoleküls weniger rigide ist und somit eine bessere Aufnahme des Testosterons in die Kavität

ermöglicht. Dexamethason zeigt durchweg eine eher mittelmäßige Komplexierungseffizienz, da durch die zusätzliche Fluoridgruppe am Kohlenstoffatom 9 eine sterische Hinderung bei der Aufnahme in die Kavität vorliegt.

Mit Ausnahme des Sättigungseffektes, bedingt durch die limitierte Wasserlöslichkeit des Komplexes, zeigen alle Löslichkeitsisothermen der gemessenen Steroide ein lineares Verhalten. Dies ist ein Indiz für die Ausbildung von 1:1-Komplexen (Wirt/Gast). Komplexe mit einer 2:1-Stöchiometrie wären aufgrund der Größe der Steroide auch möglich gewesen. Allerdings sind entsprechende parabolische Löslichkeitsisothermen nicht zu beobachten gewesen. Da die Komplexe eine 1:1-Stöchiometrie aufweisen, können die Bindungskonstanten  $K_s$  der Komplexe mithilfe von Formel (1) berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Bindungskonstanten  $K_s$  [ $M^{-1}$ ] der  $\beta$ -CD-Derivate mit den Steroidwirkstoffen

|                                     | $\beta$ -CD<br>( $M^{-1}$ ) | HP- $\beta$ -CD<br>( $M^{-1}$ ) | SBE7- $\beta$ -CD<br>( $M^{-1}$ ) | HSES*<br>( $M^{-1}$ ) | HTMT*<br>( $M^{-1}$ ) | HTG*<br>( $M^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Testosteron</b>                  | 11900                       | 10900*                          | 17000                             | 227400                | 37300                 | ---                  |
| <b><math>\beta</math>-Estradiol</b> | 353500                      | 213200                          | 468300                            | 2727300               | 89900                 | 2337700              |
| <b>Progesteron</b>                  | 151500                      | 390400                          | 985300                            | 3162400               | 681000                | ---                  |
| <b>Hydrocortison</b>                | 1800*                       | 760*                            | 760                               | 3700                  | 830                   | 390                  |
| <b>Prednison</b>                    | 2700                        | 1300                            | 2400                              | 3500                  | 690                   | 2900                 |
| <b>Dexamethason</b>                 | 1600                        | 1100                            | 2200                              | 1800                  | 800                   | 4500                 |
| <b>Finasterid</b>                   | 3900                        | 2000                            | 3700                              | 13900                 | 1700                  | 11200                |

\*gemessen mit HPLC

Die Bindungskonstanten der Glucocorticoide mit den untersuchten  $\beta$ -CD-Derivaten liegen alle im typischen Bereich von  $\beta$ -CD-Komplexen und liegen zwischen  $390\text{ M}^{-1}$  bis  $3700\text{ M}^{-1}$ . Die  $K_s$ -Werte der Sexualhormone sind dagegen um bis zu einem Faktor 1000 höher und erreichen Werte bis zu  $3.2 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$  für den Progesteron/**HSES**-Komplex. Dieser Wert ist einer der höchsten jemals gemessenen Werte für einen  $\beta$ -CD-Komplex. Diese sehr hohe Komplexstabilität ist auf die sehr geringe Hydrophilie des Progesterons zurückzuführen. Des Weiteren können die vorhandenen Ketogruppen Wasserstoffbrückenbindungen zu den OH-2-Gruppen in der Kavität ausbilden. Da durch die einheitliche Substitution und der hohen Löslichkeit des **HSES** eine

große Menge an Steroid durch die Komplexbildung solubilisiert wird, können gut aufgelöste 2D *rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy* (2D-ROESY)-NMR-Spektren aller **HSES**/Steroid-Komplexe aufgenommen werden. Dadurch kann die Lage der Steroide innerhalb der Kavität analysiert werden. Das 2D-ROESY-Spektrum des Progesteron/**HSES**-Komplexes ist in Abbildung 10 gezeigt. Die Protonen H-03 und H-05 des  $\beta$ -CD-Derivates ragen ins Innere der Kavität und zeigen Cross-Peaks mit den Protonen H-4, H-18, H-19 und H-21 des Progesterons. Diese sind über das gesamte Steroidgerüst verteilt und befinden sich an allen Ringen (A-D). Cross-Peaks mit den Protonen H-06 auf der primären Seite des **HSES** sind nicht zu finden. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Komplexe über die weitere sekundäre Seite des  $\beta$ -CD-Derivats gebildet werden. Ähnliche Ergebnisse konnten *Bednarek et al.* und *Forgo und Göndös* bereits mit Komplexen aus  $\beta$ -CD und Hydrocortison bzw. Ethinylestradiol beobachten<sup>[97,98]</sup>.

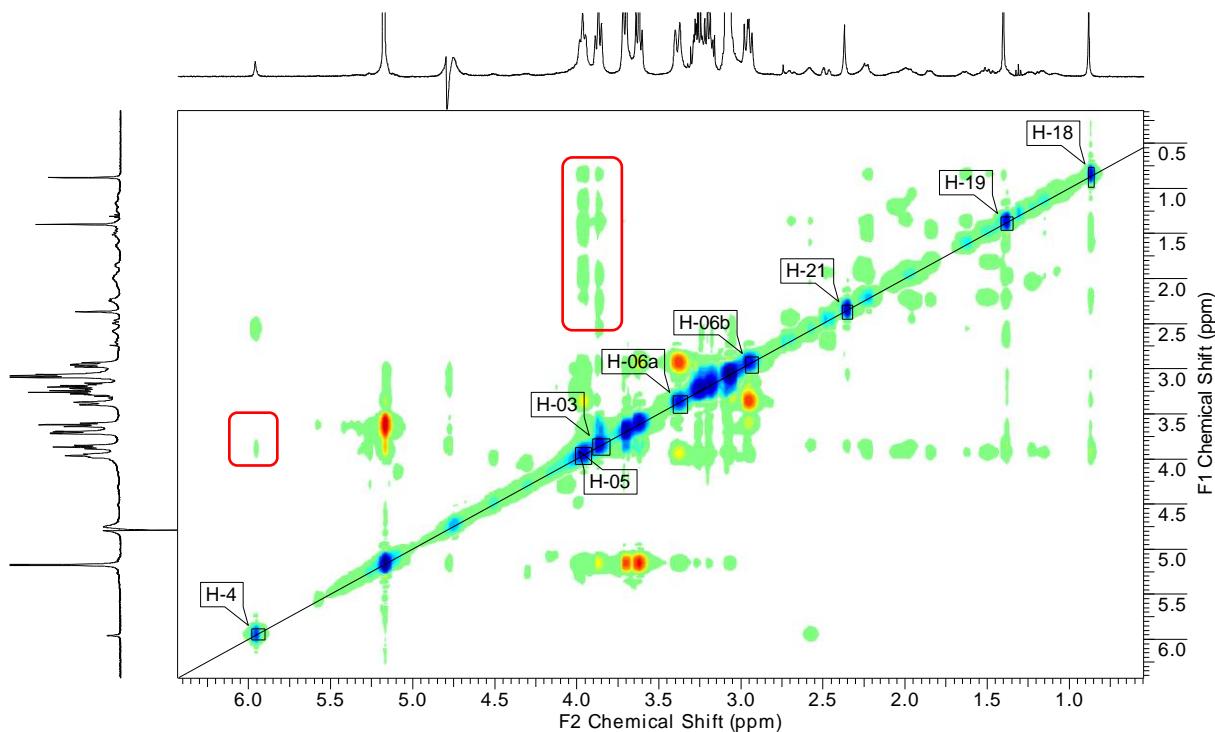


Abbildung 10: 2D-ROESY Spektrum des Progesteron/**HSES**-Komplexes.

Über das 2D-ROESY-Spektrum lässt sich somit schlussfolgern, dass Progesteron sowohl über den A- und B-Ring als auch über den C- und D-Ring des **HSES** komplexiert werden kann. Da allerdings durch die linearen

Löslichkeitsisothermen ein 1:1-Komplex als gesichert angesehen werden kann, können die zwei Komplexierungsmöglichkeiten nicht gleichzeitig am selben Steroid-Molekül erfolgen. Die 2D-ROESY-Spektren der anderen Steroid/**HSES**-Komplexe zeigen die gleichen Ergebnisse. Die Bildung eines 1:2-Komplexes zwischen Steroid und **HSES** kann somit ausgeschlossen werden. Im Folgenden Kapitel wird nun die Konjugation der Thioether- $\beta$ -CD-Derivate an die Hyaluronsäure beschrieben.

Da **HTG** im Gegensatz zu **HTMT** und **HSES** noch an der primären Seite modifiziert werden kann, sollte nun dieses CD-Derivat kovalent an Hyaluronsäure als hydrophiles Biopolymer gebunden werden. Dies soll die Wasserlöslichkeit der Komplexe verbessern. Zudem sollte nicht nur eine unkontrollierte Aufnahme der  $\beta$ -CD-Derivate im Organismus verhindert und somit die Toxizität erniedrigen werden sondern auch die Verweildauer im Organismus erhöht werden<sup>[107]</sup>. Die Ergebnisse der Konjugation des **HTG** an Hyaluronsäure sind im nachfolgenden Kapitel 4.3 gezeigt.

## 4 Synthese neuer Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Polymeren

### 4.1 Cyclodextrin-Polymeren als Wirkstofftransporter

Nicht nur CD-Monomere können im Bereich des Wirkstofftransports eingesetzt werden, sondern auch CD-Polymere sind hierfür sehr gut geeignet. Die Herstellung von CD-Polymeren kann durch vielerlei Möglichkeiten erzielt werden. Die CDs können sowohl kovalent als auch nichtkovalent an Polymere geknüpft werden. Die Polymerisation von funktionalisierten CD-Derivaten ist ebenfalls möglich. Eine Auswahl an supramolekularen CD-Polymer-Wirkstofftransportsystemen zeigt Abbildung 11.

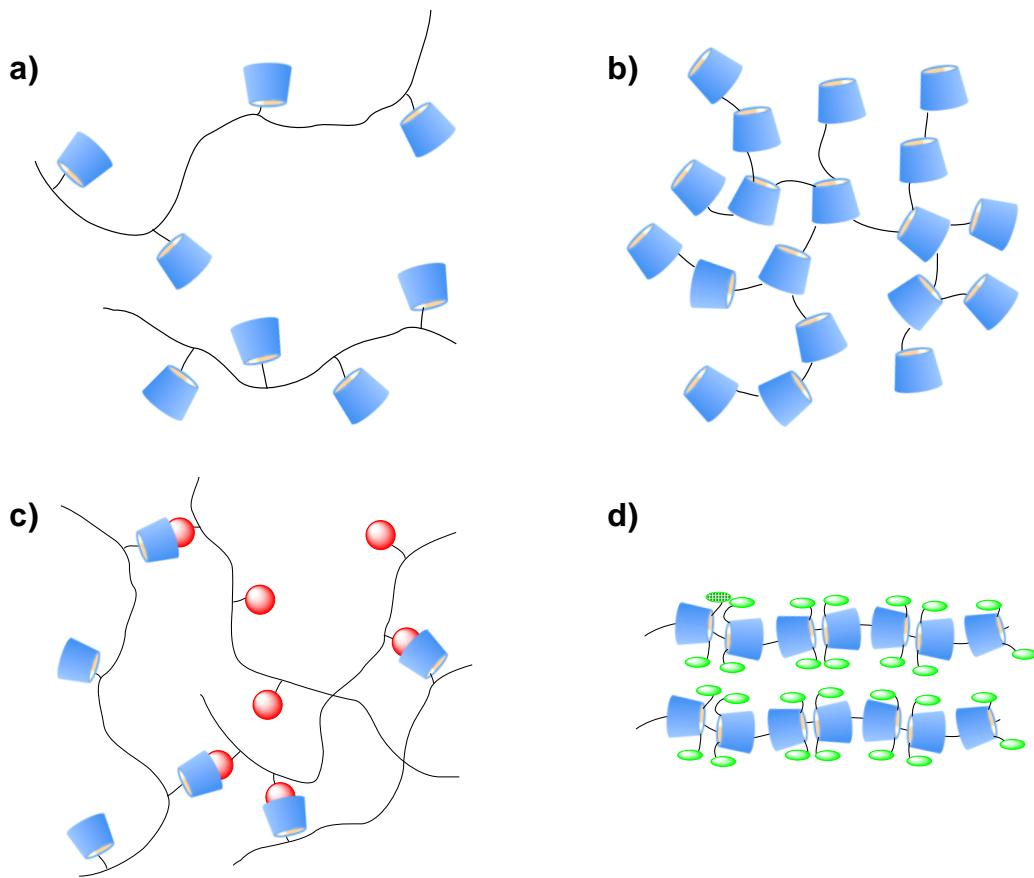


Abbildung 11: Schematische Darstellung von Cyclodextrin-Polymeren für den Wirkstofftransport; **a)** lineares CD-Polymer, **b)** kovalent verknüpftes Cyclodextrin-Polymer, **c)** supramolekulare Wirt-Gast-Netzwerke, **d)** Polypseudorotaxane mit Cyclodextrin-Wirkstoff-Konjugaten<sup>[108]</sup>.

Die kovalente Knüpfung von CDs über eine polymeranaloge Umsetzung kann auch an bioabbaubare Polymere erfolgen (Abbildung 11a)<sup>[109]</sup>. Der Einsatz von Biopolymeren, wie z.B. Alginat, Chitosan oder Hyaluronsäure hat den Vorteil, dass eine höhere Biokompatibilität und eine geringere Toxizität erzeugt werden kann<sup>[109]</sup>. Die polymeranaloge Umsetzung an diese Kohlenhydrate kann über reduktive Aminierung<sup>[110]</sup>, Amidknüpfung<sup>[111]</sup> oder über Click-Chemie<sup>[112]</sup> erfolgen.

Durch die Bildung von vernetzten CD-Polymeren (Abbildung 11b) können die Vorteile von Polymeren (hohes Molekulgewicht, unterschiedliche Architektur, Fähigkeit für einen zielgerichteten Transport über Liganden) mit denen der CDs (Einschluss von hydrophoben Wirkstoffen) kombiniert werden<sup>[113]</sup>. Lineare oder verzweigte CD-Polymeren können durch Kondensation an Bi- oder Multifunktionellen Cross-Linkern (z.B. Epichlorhydrin, Diisocyanate)<sup>[114,115]</sup> oder durch Polymerisation von Acryl/Vinyl-Derivaten von CDs mit anderen Monomeren erfolgen<sup>[116]</sup>. *Mura et al.* zeigten, dass CD-Gele aus vernetzten CD-Epichlorhydrin-Polymeren die Löslichkeit von Naproxen um das 30-Fache erhöhen konnte<sup>[117]</sup>. Eine Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit konnte mittels besagten Polymers auch an Glipizid<sup>[118]</sup>, Hyperacin<sup>[119]</sup> und Triclosan<sup>[120]</sup> festgestellt werden.

Die Ausbildung von Wirt-Gast-Netzwerken (Abbildung 11c), bestehend aus linearen CD-Polymeren und Polymeren mit hydrophoben Gastmolekülen, beschrieben *Wenz und Weickenmeier* erstmalig 1997. Als Gastmoleküle dienten hierbei Polymere mit 4-tert-Butylanilid-Seitenketten<sup>[121]</sup>. Durch Mischung der beiden Polymere kommt es zur Ausbildung von reißverschlussartigen Strukturen, welche als Hydrogele oder Nanocarriers verwendet werden können<sup>[122]</sup>. Ein Beispiel für einen solchen Nanocarrier, für den Einsatz in der Krebstherapie, ist ein Wirt-Gast-Netzwerk zwischen einem CD-Polymer mit einem Polymer-Paclitaxel-Konjugat. Durch die mehrfache Komplexierung der Paclitaxel-Einheiten durch die CD-Polymeren können sowohl die Stabilität als auch die Löslichkeit des Wirkstoffs im Vergleich zu einem monomeren CD-Paclitaxel-Komplexes erhöht werden<sup>[123,124]</sup>. Wirkstoffe wie z.B. Doxorubicin können allerdings nicht im Innern der Kavität der CDs komplexiert werden. Über die Verknüpfung des Wirkstoffes mit Adamantan kann eine

supramolekulare Bindung erzielt werden<sup>[125]</sup>. Für einen zielgerichteten Transport kann der benötigte Target-Ligand (z.B. RGD-Peptid) ebenfalls mit Adamantan modifiziert werden<sup>[126]</sup>.

Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von CD-Polymeren kann über das Auffädeln der CD-Ringe auf einer Polymerkette erfolgen. Dies wurde 1992 erstmals von *Wenz et al.* an Polyiminoooligomethylen als Polymer berichtet<sup>[127]</sup>. Unter dem so gebildeten Polyrotaxan werden Polymere bezeichnet die sperrige Stoppergruppen enthalten, wodurch die CDs nicht in der Lage sind sich frei entlang der Polymerkette zu bewegen. Fehlen solche sperrigen Gruppen, so sind die CDs frei beweglich. Diese Struktur wird Polypseudorotaxan genannt. Für den Einsatz als zielgerichtetes Wirkstofftransportsystem können die Polypseudorotaxane über die CD-Einheiten mit Target-Liganden modifiziert werden (Abbildung 11d)<sup>[125]</sup>. Ein supramolekulares Gel aus der Kombination aus  $\alpha$ -CD und Polycaprolacton-Polyethylenglycol-Polycaprolacton-Copolymer sorgt für eine nachhaltige Freisetzung von Vitamin B<sub>12</sub> über 20 Tage<sup>[128]</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde Hyaluronsäure als Biopolymer in einer polymeranalogen Umsetzung mit CD-Derivaten modifiziert. Aus diesem Grund wird der Einsatz von Hyaluronsäure in Wirkstofftransportsystemen im folgenden Kapitel diskutiert.

## 4.2 Hyaluronsäure in Wirkstofftransportsystemen

Hyaluronsäure (HA) gehört zu der Gruppe der Glucosaminoglycane und ist ein anionisches, biokompatibles Polymer, welches alternierend aus  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glykosidisch verknüpften D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin Einheiten besteht<sup>[129]</sup>. HA ist das einzige nicht-sulfatierte Glucosaminoglycan und liegt im Organismus vor allem in der Gelenkflüssigkeit, in der extrazellulären Matrix, in der Haut, in der Lunge oder im Darm vor<sup>[130]</sup>. Großtechnisch produziert wurde früher HA aus tierischem Gewebe, wie z.B. Hahnenkämmen<sup>[131]</sup>. Heutzutage wird HA vorzugsweise durch mikrobielle Fermentation gewonnen<sup>[132]</sup>. Hierbei werden HA-Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 1 kDa und 10000 kDa erzeugt. Während höher molekulare HA vor allem im Bindegewebe für den Wasserhaushalt in der

extrazellulären Matrix verantwortlich ist, so sind niedermolekulare HA-Moleküle für die Rezeptor-vermittelte intrazelluläre Signalwirkung zuständig<sup>[133]</sup>. Bisher konnten einige Hyaluronsäure-Rezeptoren für verschiedene biologische Funktionen identifiziert werden, darunter der HA-Rezeptor für Endozytose<sup>[134]</sup>, der Rezeptor für die HA-vermittelte Motilität<sup>[135]</sup> oder das Antigen CD44<sup>[136]</sup>.

Die biologische Halbwertszeit von injizierter HA im Plasma beträgt nur 2.5 bis 5.5 min<sup>[137]</sup>. Hierbei wird der größte Teil der HA über die Leber eliminiert<sup>[138]</sup>. Dies ist für den klinischen Einsatz problematisch. Um sowohl die biologische Halbwertszeit zu verlängern als auch das biologische Verhalten der HA im Körper zu verändern, kann HA an dessen Carboxylgruppe durch Veresterung<sup>[139]</sup> oder mittels Carbodiimid<sup>[140]</sup> modifiziert werden. Über die Carboxylgruppe der HA erfolgt die Erkennung der HA-Rezeptoren und der Hyaluronidase<sup>[141]</sup>, die für den Abbau der HA zuständig ist. Somit ist die Carboxylgruppe die Stelle der Wahl für die Modifizierung ihrer biologischen Eigenschaften.

HA und modifizierte HA-Derivate können in zahlreichen medizinischen Feldern Verwendung finden, wie z.B. bei der Gewebekonstruktion<sup>[142]</sup>, der Behandlung von Arthritis<sup>[143]</sup> oder im Bereich des Wirkstofftransports<sup>[144]</sup>. So konnte z.B. ein polymeres Prodrug aus Paclitaxel, das kovalent an modifizierte Hyaluronsäure gebunden ist, erfolgreich validiert werden. Der zellspezifische Transport zu den Krebszellen erfolgt hierbei über CD44-vermittelte Endozytose<sup>[145]</sup>.

Um HA über dessen Carboxylgruppe mit CD-Derivaten zu modifizieren, wurden bisher Mono-Amino-β-CD-Derivate bevorzugt über klassische Amidbindungs knüpfung mittels EDC/NHS im wässrigen Milieu eingesetzt<sup>[146]</sup>.

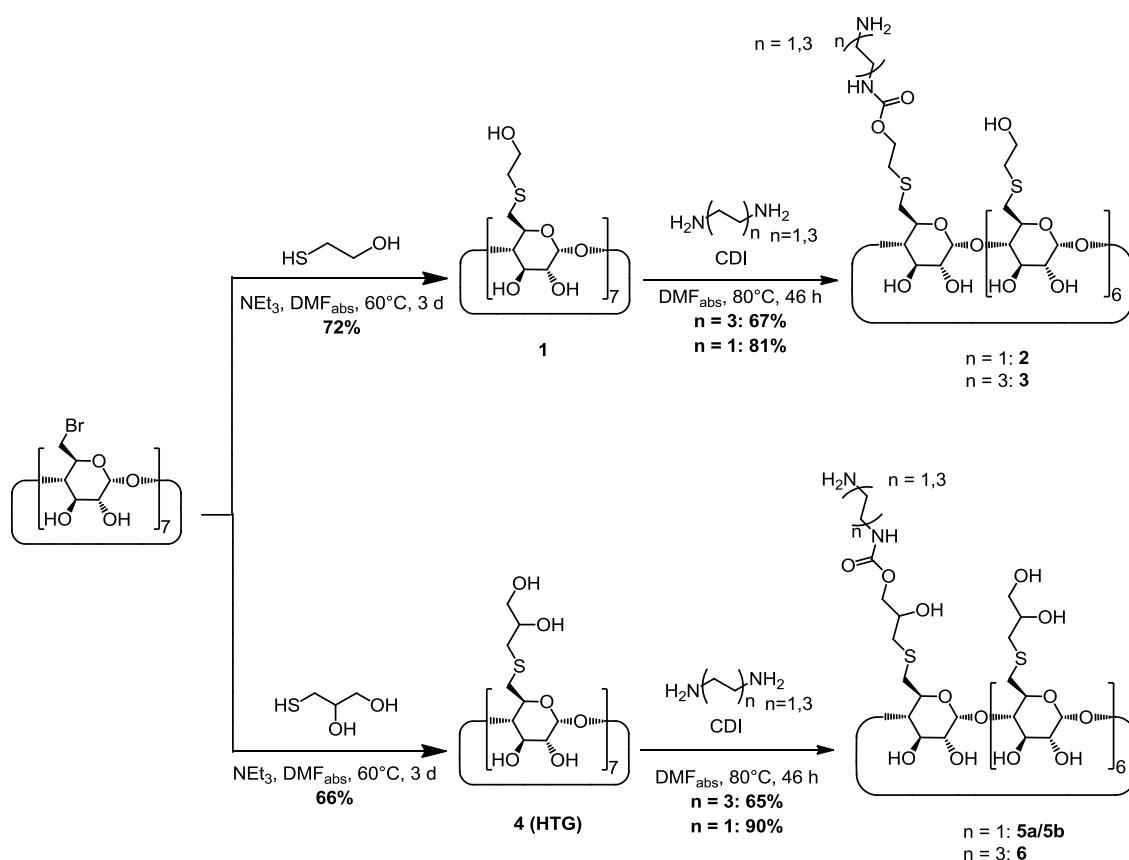
Die Bildung von Einschlusverbindungen zwischen einem β-CD-Hyaluronsäure-Polymer und Antitumor-Wirkstoffen wurde bereits von *Li et al.*<sup>[147]</sup> beschrieben. Durch die Anbindung des Wirkstofftransporters an adamantyierte Gold-Nanopartikel kann der Targeteffekt verbessert werden. Unter mild sauren pH-Bedingungen, wie sie in der Tumorzelle vorliegen, erfolgt die Freisetzung der Wirkstoffe aus den Kavitäten der β-CD-Moleküle an der Hyaluronsäure. Auch der Komplex aus Folat-modifizierten methylierten β-CD-Derivaten und adamantyierte Hyaluronsäure als Targetligand wurde bereits für den Einsatz

als Antitumor-Wirkstoff gegen Darmkrebs in einer *in-vivo* Studie untersucht. Hierbei liegt ein zweifaches Targeting-System, aufgrund der Folat-induzierten Endozytose und der CD44-vermittelten Endozytose, vor. Dies kann für eine verbesserte Aufnahme des Nanopartikels in die Tumorzellen sorgen<sup>[148]</sup>. Innerhalb der Tumorzellen erfolgt der Abbau der HA durch die Hyaluronidase<sup>[149]</sup>, wodurch die Nanopartikel zerfallen und der zytotoxische Effekt der methylierten  $\beta$ -CDs ausgelöst wird.

Im Folgenden wird nun die Synthese von Thioether- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure Polymeren beschrieben. Dabei werden die modifizierten CD-Derivate in einer Amidbildungsreaktion mittels 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (CDMT) an die HA geknüpft.

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

Aufgrund der besseren Komplexbildungskonstanten von Thioether-modifizierten  $\beta$ -CD-Derivaten im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen  $\beta$ -CD-Derivaten, sollte nun ein Konjugat aus Hepta-Thioglycol- $\beta$ -CD **1** bzw. Hepta-Thioglycerin- $\beta$ -CD (**HTG, 4**) und Hyaluronsäure hergestellt werden. Da die Komplexe des **HTG** mit den steroidalen Wirkstoffen aus Kapitel 3.4 aufgrund von Aggregatbildung schlechte Löslichkeiten im wässrigen Medium zeigten, soll durch die Anbindung dieser CD-Derivate an die HA deren Löslichkeit gesteigert werden. Um die beiden Thioether-modifizierten  $\beta$ -CD Derivate an HA kovalent binden zu können, muss zuerst eine Aminogruppe an die CD-Derivate eingeführt werden. Die Reaktionsroute zur Bildung der Monoamino-funktionalisierten Thioether- $\beta$ -CD-Derivate ist in Abbildung 12 gezeigt. Ausgehend von dem Hepta-Brom- $\beta$ -CD-Derivat wurden zunächst die Thioglycol bzw. die Thioglycerin-Einheiten in einer Hepta-Substitution in einer S<sub>N</sub>-Reaktion angebracht. Die Aufreinigung der Thioether- $\beta$ -CD-Derivate erfolgte hierbei durch Fällung in Aceton und anschließender Umkristallisation in Wasser/Aceton (5:2 für Thioglycol-Derivat **1** und 1:1 für Thioglycerin-Derivat **HTG (4)**).

Abbildung 12: Synthese von Mono-amino- $\beta$ -CD-Derivaten.

Im nächsten Schritt wurden in einer Mono-Funktionalisierung mittels CDI-Kupplung Ethylenediamin bzw. Hexamethylenediamin an die Thioether- $\beta$ -CD-Derivate in Anlehnung an Markenstein *et al.*<sup>[107]</sup> eingeführt. Hierfür wurde CDI in einem moderaten Überschuss von 1.1 bis 1.5 Äquivalente eingesetzt. Höhere Überschüsse von CDI >1.5 Äquivalente würde die Bildung von disubstituierten Derivaten begünstigen. Die Herstellung der Monoamino-funktionalisierten Thioether- $\beta$ -CD-Derivate unter Verwendung des Hexamethylenediamin-Spacers (**3/6**) zeigte sich hierbei als schwieriger umsetzbar, als unter Verwendung des Ethylenediamin-Spacers (**2/5**). Durch Fällung in kaltem Aceton bzw. Ethanol konnte das im Überschuss eingesetzte Ethylenediamin vollständig vom Produkt abgetrennt werden. Der im Überschuss eingesetzte Hexamethylenediamin-Spacer konnte nicht durch Fällung vom Produkt abgetrennt werden, da sowohl der Spacer als auch das Produkt gleiches Löslichkeitsverhalten zeigten. Aus diesem Grund wurden die Rohprodukte von **3** und **6** durch Ultrafiltration mittels 500 Da PES-Membran

aufgereinigt. Trotz der Ultrafiltration konnten in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **3** und **6** weiterhin Signale der ungebundenen Hexamethylendiamin-Spacers festgestellt werden. Dies verdeutlicht eine Komplexbildung der Hexamethylengruppen in der Kavität des CD-Derivates<sup>[150]</sup>, wodurch keine vollständige Abtrennung der ungebundenen Spacer erzielt werden konnte. Eine leichtere Aufreinigung ist somit bei der Synthese von **2** und **5** möglich, da hier auf eine Ultrafiltration verzichtet werden kann. Dadurch liegen die Ausbeuten der Produkte mit Ethylen-Spacer mit 81-90% höher als der Produkte mit Hexamethylen-Spacer mit 65-67%. In Abbildung 13 ist das Protonenspektrum von **5a** nach Reaktion mit 1.1 Äquivalenten CDI und 4.0 Äquivalenten Ethyldiamin gezeigt.

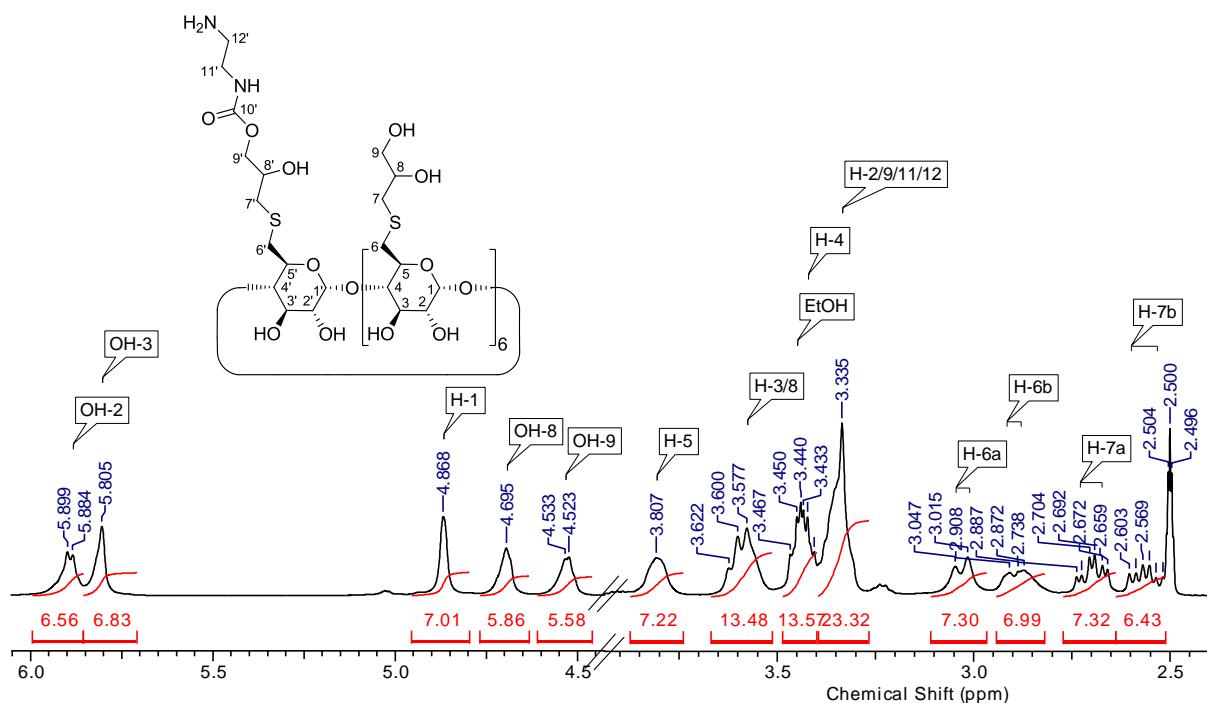


Abbildung 13:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **5a** ( $\text{DMSO-d}^6$ , 400 MHz).

Die Signale des neu eingeführten Ethylen-Spacers können im Protonenspektrum unter dem Multiplett der H-2 und H-9 Protonen des **HTG** bei 3.34 ppm identifiziert werden. Aufgrund der Ethylenbrücke ist die Integration des Multipletts um 3 Einheiten im Vergleich zum **HTG** erhöht. Dies würde für eine 75% Umsetzung zum Monoamino-**HTG**-Derivat sprechen. Um eine genauere Angabe zum Modifizierungsgrad machen zu können, wurde der Amingehalt des Produkts durch Zugabe von Trinitrobenzylsulfonsäure bestimmt<sup>[151,152]</sup>. Die

Absorption des dadurch gebildeten orangefarbenen Produkts wurde bei 335 nm gemessen. Mittels dieser Methode konnte eine 71% Umsetzung zum Monoamino-**HTG**-Derivat ermittelt werden. Dies entspricht den Ergebnissen aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **5a**. Um einen höheren Amingehalt zu erzeugen, wurde die Reaktion auch mit 1.5 Äquivalenten CDI durchgeführt. Dies führte zu einer 125% Umsetzung zum Monoamino-Derivat (**5b**).

Im letzten Schritt konnten die CD-Derivate über die neu eingeführte Aminogruppe an der Carbonsäure-Funktion der Hyaluronsäure über Amid-Kupplung mit CDMT kovalent geknüpft werden (siehe Abbildung 14).

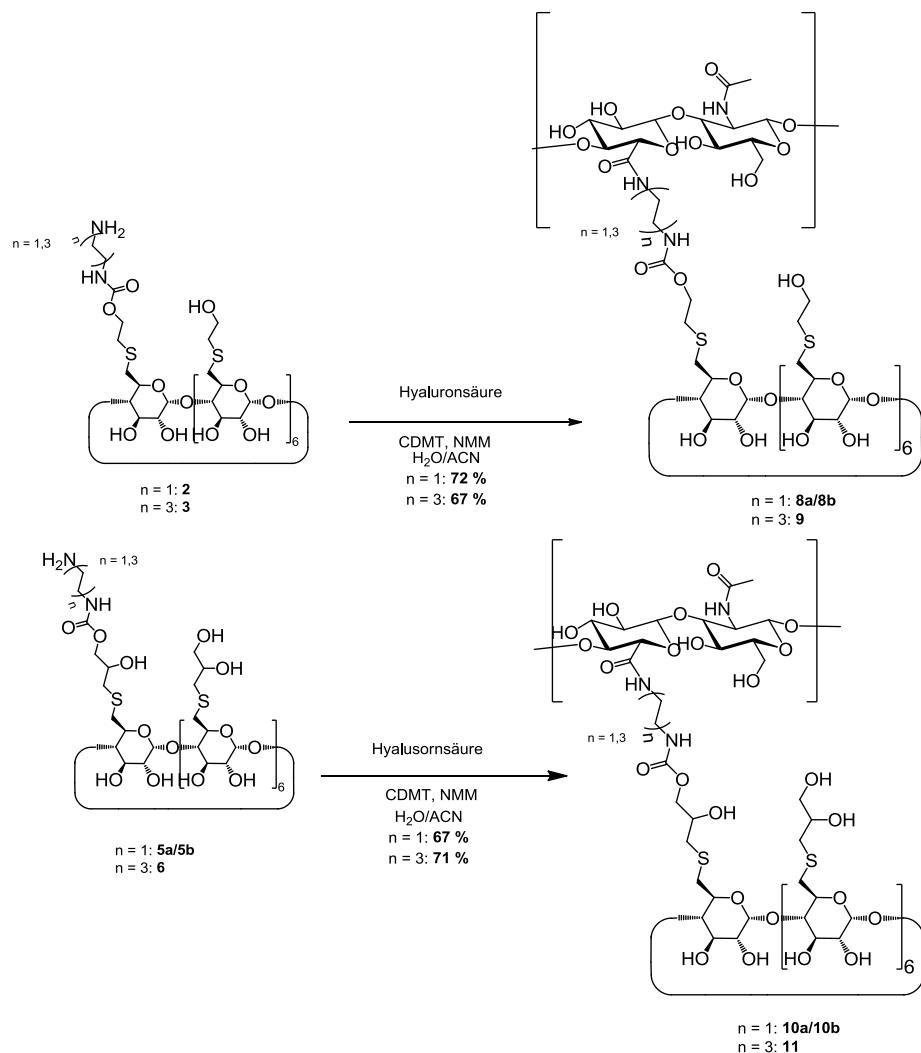


Abbildung 14: Bildung der  $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Polymeren.

Zuerst wurde die Carboxylgruppe der Hyaluronsäure mittels CDMT und N-Methylmorpholin innerhalb von 2-3 h in den Aktivester überführt.

Anschließend wurde das jeweilige Monoamino-CD-Derivat dazugegeben. Die Reaktion fand im wässrigen Milieu innerhalb von 48 h statt. Die Zugabe von Acetonitril war zum Lösen des CDMT notwendig. Zur Abtrennung von nicht gebundenem CD vom CD-Hyaluronsäure-Konjugat wurden die Rohprodukte in einer wässrigen Cross-Flow-Filtration mit einer 10 kDa PES-Membran aufgereinigt. Aufgrund des ionischen CD-Derivates wurde zuerst gegen 0.05 M NaCl und anschließend gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  filtriert. Um den Substitutionsgrad (d.s.) der CD-Hyaluronsäure-Polymere zu bestimmen, wurde auf die NMR-Spektroskopie zurückgegriffen. In Abbildung 15 ist das  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **10b** gezeigt.

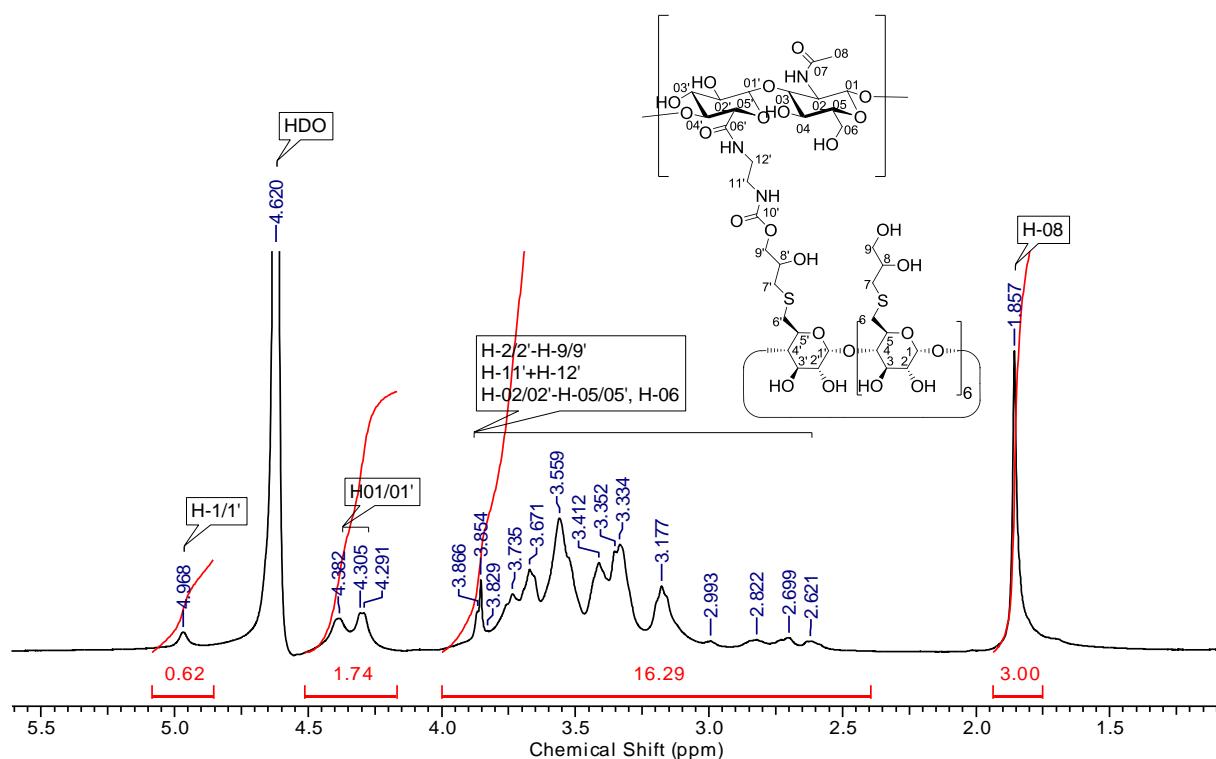


Abbildung 15:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des CD-Hyaluronsäure-Polymers **10b** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).

Die charakteristischen Signale sind zum einen die anomeren Protonen der Hyaluronsäure ( $\text{H}-01/01'$ ) bei 4.38-4.29 ppm sowie die Methylgruppe der Acetamidfunktion ( $\text{H}-08$ ) bei 1.86 ppm und zum anderen das anomere Proton des CD-Derivats ( $\text{H}-1/1'$ ) bei 4.97 ppm. Da pro Wiederholeinheit der Hyaluronsäure nur einmal die Methylgruppe  $\text{H}-08$  vorliegt, wurde die Integration der Methylgruppe auf drei normiert. Aus der daraus resultierenden

Integration des Signals des anomoren Protons des CD von 0.62 kann auf einen Substitutionsgrad vom 0.09 geschlossen werden. Aus den Signalen der Protonen des Hyaluronsäurerückgrads zwischen 3.87-2.62 ppm lässt sich ebenfalls der Substitutionsgrad bestimmen. Nach Normierung der Protonen der Methylgruppe der Hyaluronsäure auf 3.00 befinden sich im oben genannten Bereich zehn weitere Protonen (H-02/02'-H-05/05', H-06) des Hyaluronsäurerückgrads. Bei einer vollständigen Umsetzung aller Carboxylgruppen würden 81 Protonen des CD-Derivates im Bereich des Hyaluronsäure-Rückgrads hinzukommen. Da eine Erhöhung um 6.3 Protonen zu beobachten ist, ist hier von einem d.s. von 0.08 auszugehen. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der d.s. Wert-Bestimmung über das anomere Proton des CD-Derivats. Eine Übersicht der erzielten Substitutionsgrade der hergestellten CD-Hyaluronsäure-Polymere ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Substitutionsgrad der hergestellten CD-Hyaluronsäure-Polymere.

| Verbindung   | CD-Derivat | Ausbeute<br>(%) | d.s.<br>anomeres Proton | d.s.<br>Polymerrückgrad |
|--------------|------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>8a</b>    | <b>2</b>   | 20              | 0.41                    | 0.42                    |
| <b>8b*</b>   | <b>2</b>   | 72              | 0.06                    | 0.11                    |
| <b>9</b>     | <b>3</b>   | 96              | 0.12                    | 0.14                    |
| <b>10a</b>   | <b>5a</b>  | 67              | 0.20                    | 0.16                    |
| <b>10b**</b> | <b>5b</b>  | 46              | 0.09                    | 0.08                    |
| <b>11</b>    | <b>6</b>   | 71              | 0.02                    | 0.05                    |

\* 4-Facher Ansatz

\*\* 2-Facher Ansatz

Die Ergebnisse spiegeln wider, dass die Bestimmung der Substitutionsgrade sowohl über das anomere Proton des CD-Derivats als auch über die CD-Signale im Bereich des Polymerrückgrads erfolgen kann. Über beide Varianten lassen sich gleiche Ergebnisse erzielen. Durch Verwendung des Ethyleniamin-Spacers lassen sich höhere Substitutionsgrade einstellen als mit Verwendung des Hexamethylendiamin-Spacers. So liegt der d.s. des Thioglycol-Derivats **8a** mit 41-42% signifikant höher als der d.s. von **9** mit 12-14%. Auch beim Thioglycerin-Derivat ist mittels Ethyleniamin-Spacer (**10a**) der d.s. mit 16-20% höher als mittels Hexamethylendiamin-Spacer (**11**) mit einem d.s. von 2-5%. Die Polymer-Konjugationen mit den beiden Thioether-

Derivaten mit Ethyldiamin-Spacer wurden zusätzlich in einem größeren Maßstab synthetisiert. Hierbei war eine Verringerung des Substitutionsgrades in Abhängigkeit von der Erhöhung der Ansatzgröße zu beobachten. Durch einen 4-Fach höheren Ansatz des Thioglycol-Derivates **8b** konnte nur noch ein Viertel des ursprünglichen d.s.-Wertes mit 6-11% erreicht werden. Das Thioglycerin-Derivat **10b** wurde in einer doppelten Ansatzgröße synthetisiert, was in einem halb so großen d.s.-Wert von 8-9% mündete.

Die Herstellung der adamantyierten Targetliganden, die für den zielgerichteten Transport des CD-Hyaluronsäure-Polymers eingesetzt werden sollen, ist im nachfolgenden Kapitel 5.3 beschrieben.

## 5 Synthese von Adamantan-Protein-Konjugaten

### 5.1 Biokonjugation an Proteinen

Die Biokonjugation an Proteinen hat den Zweck, die Eigenschaften des Proteins mit denen des Labels zu ändern. Zum Beispiel können Fluoreszenzmarker an das Protein angebunden werden, um dieses besser detektieren zu können<sup>[153]</sup>. Auch Polymere wie zum Beispiel das Polyethylenglycol (PEG) werden gerne an Proteine in einer sogenannten PEGylierungs-Reaktion gebunden, um die Resistenz gegenüber Proteasen und Hitze zu erhöhen<sup>[154]</sup>. Wichtig hierbei ist, dass die Biokonjugationsreaktion keinen Einfluss auf die Konformation bzw. die katalytische Aktivität des Proteins aufweist<sup>[155,156]</sup>. Chemische Modifizierungen an Proteinen können dabei nach *Thordarson et al.* in drei Kategorien eingeteilt werden<sup>[157]</sup>: Zum einen gibt es die direkte, spezifische Funktionalisierung, die indirekte, spezifische Funktionalisierung und die Funktionalisierung über Cofaktoren/Liganden. Der Unterschied zwischen der direkten und der indirekten Modifizierung besteht darin, dass im ersten Fall das Polymer direkt an das Protein gebunden wird, während im letzteren Fall zuerst ein heterobifunktionaler Spacer an das Protein eingeführt wird. Das Polymer wird in einem zweiten Schritt über den Spacer mit dem Protein verbunden.

Eine beliebte Methode zur direkten Modifizierung von Proteinen ist die Verknüpfung über die Seitenketten geeigneter ionisierbarer Aminosäuren, wie zum Beispiel Cystein (Cys), Lysin (Lys), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp). Auch der  $\alpha$ -N-Terminus der Proteine ist leicht für chemische Reaktionen zugänglich<sup>[158]</sup>.

Die Thiolgruppe des Cysteins bildet ein gutes Nucleophil und kann aufgrund des selteneren Vorkommens von Cysteinen in Proteinen (1.7%)<sup>[159]</sup> recht selektiv in einer Biokonjugationsreaktion modifiziert werden (siehe Abbildung 16).

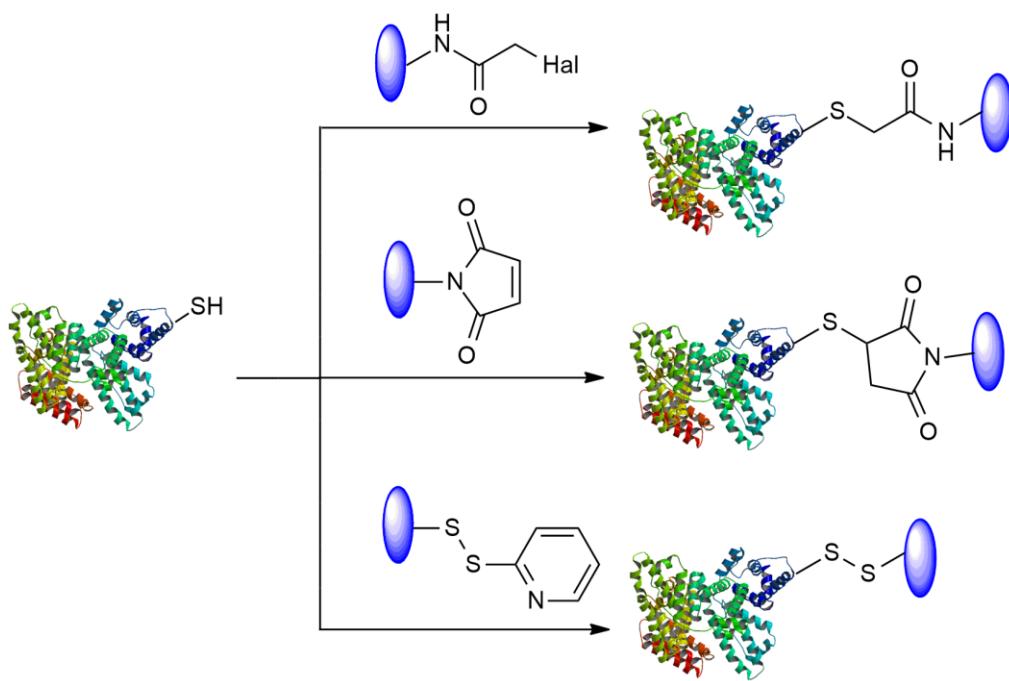


Abbildung 16: Biokonjugation über freie Thiolgruppe der Cysteine der Proteine.

Eine Umsetzung kann gut mittels Haloacetamiden in einer  $S_N2$ -Reaktion<sup>[160]</sup> oder mittels Maleimiden in einer Michael-Addition zur Bildung von Succinimidylthioethern erfolgen<sup>[161]</sup>. Auch Disulfide können spezifisch mit der Thiolgruppe des Cysteins reagieren. Da jedoch die Cysteinreste durch Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins für dessen Konformation und somit auch für dessen Funktion essentiell sind, ist eine Modifizierung der Cysteinreste nicht immer von Vorteil<sup>[162]</sup>.

Da die Lysinseitenketten häufig in Proteinen vorkommen (5.7%)<sup>[159]</sup> und aufgrund ihrer Hydrophilie sich eher an der Oberfläche des Proteins befinden, ist dessen Aminogruppe sehr leicht für eine mehrfache, unspezifische Modifizierung zugänglich<sup>[157]</sup>. Die endständige Aminogruppe ist ein gutes Nucleophil und kann mit aktivierten Säuren, Aldehyden und acylierenden Reagenzien reagieren. Die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins besitzt ein  $pK_s$ -Wert von 9.3. Somit liegt der optimale pH-Wert für Reaktionen an dieser Gruppe zwischen pH 8.5-9.5. Bei einem pH < 8 liegt die Aminogruppe protoniert vor, wodurch die Reaktivität eingeschränkt ist<sup>[157]</sup>. Eine Auswahl an direkten Biokonjugationsreaktionen an der  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenkette ist in Abbildung 17 dargestellt.

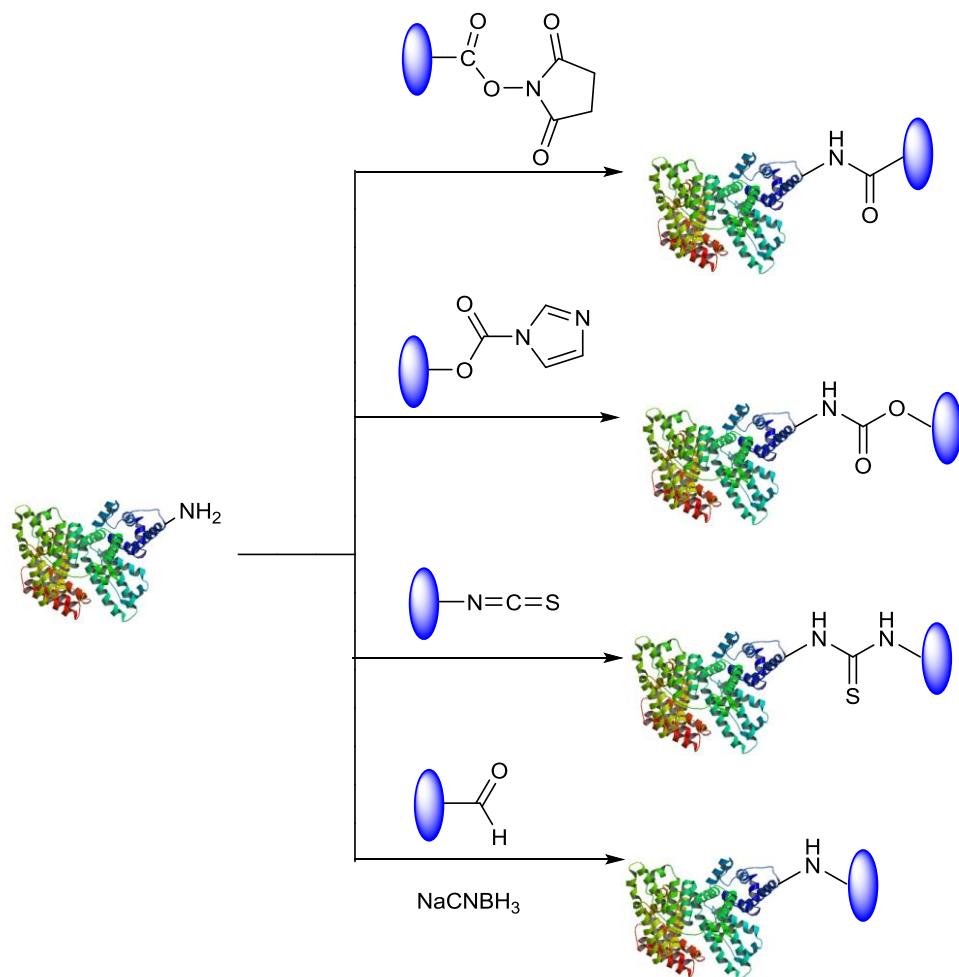


Abbildung 17: Direkte Biokonjugationsreaktionen an der Lysin-Seitenkette von Proteinen.

Die Reaktion mit Aktivestern kann einerseits nach der Aktivierung einer Carbonsäurefunktion durch ein Carbodiimid mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)<sup>[154]</sup> oder nach Aktivierung einer Hydroxylgruppe durch Carbonyldiimidazol (CDI) erfolgen<sup>[154,163]</sup>. Da die Succimidylgruppe aufgrund des stärkeren elektronenziehenden Effektes eine bessere Abgangsgruppe im Vergleich zu Imidazol darstellt, ist die Reaktivität des NHS-Aktivesters als höher einzustufen<sup>[154]</sup>. Ein Nachteil der Aktivester ist allerdings ihre Hydrolyseempfindlichkeit im wässrigen Medium<sup>[164]</sup>. Eine Alternative dazu stellt eine Umsetzung mit Isothiocyanaten dar, welche in einer nukleophilen Addition mit dem primären Amin unter Ausbildung einer hydrolysestabilen Thioharnstoffgruppe führt<sup>[165]</sup>. Eine sehr milde Methode unter pH neutralen Bedingungen stellt die reduktive Aminierung mit einem Aldehyd und

Natriumcyanoborhydrid ( $\text{NaCNBH}_3$ ) als Reduktionsmittel dar<sup>[166]</sup>. Nach Ausbildung einer SCHIFF'SCHEN BASE zwischen Aldehyd und Amin reduziert  $\text{NaCNBH}_3$  das vorhandene Imid zum sekundären Amin. Da dieses weiterhin protonierbar ist, verändert sich durch diese Methode die Gesamtladung des Proteins nicht.

Neben diesen direkten Modifikationen können auch sogenannte bioorthogonale Reaktionen an Proteinen durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um selektive Reaktionen, die biochemische Prozesse im Organismus nicht beeinflussen können. Dies ist dadurch erklärbar, dass diese Reaktionen nur an jenen funktionellen Gruppen (z.B. Azid) ablaufen, die nicht in Zellen vorhanden sind. Um eine Azidgruppe in Proteine einzuführen, können die Aminogruppen der Lysin-Seitenketten mit Diazo-Transferreagenzien (z.B. Imidazol-1-sulfonylazid) in protischen Lösungsmitteln umgesetzt werden<sup>[167]</sup>. Im Gegensatz zu anderen Reaktionen, die in aprotischen Lösungsmitteln stattfinden müssen, kann hier eine Denaturierung der Proteine vermieden werden<sup>[168]</sup>. Eine Auswahl an bioorthogonalen Reaktionen ist in Abbildung 18 gezeigt.

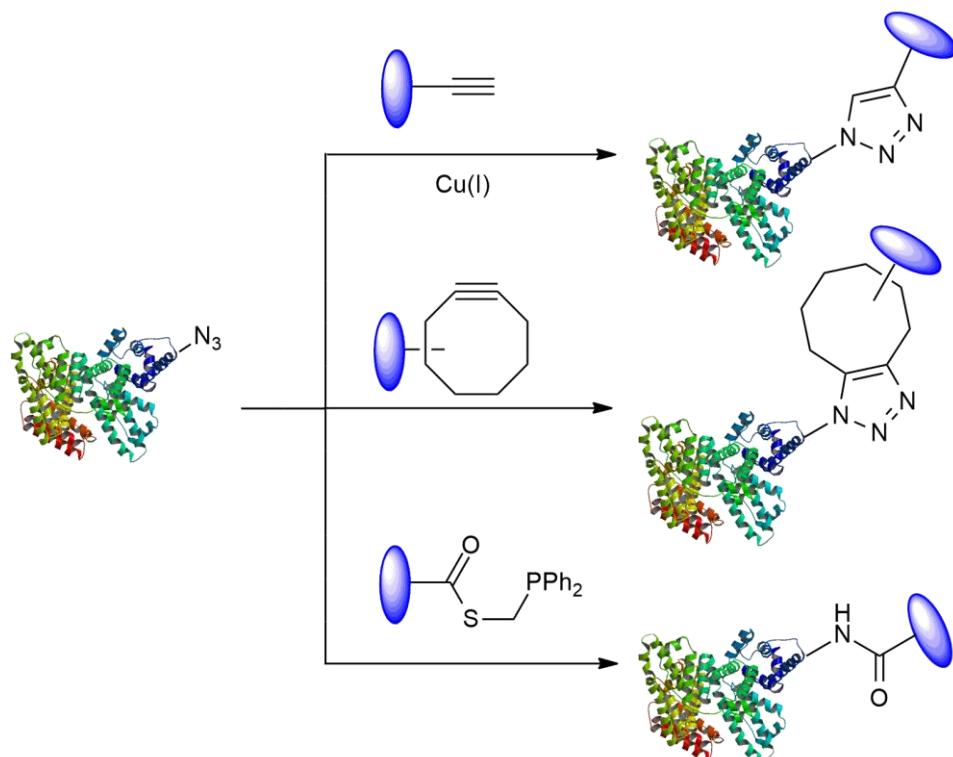


Abbildung 18: Bioorthogonale Reaktionen an Proteinen.

Ein Beispiel für eine solche bioorthogonale Reaktion wäre die HUISGEN 1,3-dipolare Cycloaddition. Hier können mithilfe von Substraten mit terminalen Alkinen 1,4-disubstituierte [1,2,3]-Triazole gebildet werden<sup>[169]</sup>. Da bei dieser Reaktion allerdings zytotoxische Cu(I)-Ionen in katalytischen Mengen benötigt werden, kann es zu einer Denaturierung des Proteins kommen<sup>[170]</sup>. Um die Verwendung von Cu(I)-Ionen zu umgehen, kann auf die spannungsinduzierte Alkin-Azid-Cycloaddition (engl. strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC) zurückgegriffen werden. Diese nutzt die Spannung eines ringförmigen Alkins als Triebkraft für die Bildung des Triazols aus<sup>[171]</sup>. Eine weitere bioorthogonale Reaktion ist die (traceless) STAUDINGER-Ligation, welche modifizierte Diphenylphosphine als Substrate benötigt<sup>[172]</sup>. Nach nukleophilem Angriff des Phosphors bildet sich unter Stickstoffabspaltung ein Aza-Ylid Intermediat. Der Stickstoff des Aza-Ylids bildet durch nukleophilen Angriff am Carbonyl-Kohlenstoffatom des spaltbaren Spacers ein Fünfring aus. Nach Hydrolyse des Fünfrings kann die gewünschte Amidbindung erhalten werden.

Eine direkte Modifizierung von Proteinen mit Adamantan wurde bereits von Arima *et al.*<sup>[173]</sup> beschrieben. Durch die Komplexierung der Adamantangruppen mit Polyethylenglycol (PEG) modifizierten  $\beta$ -CD-Derivate (PEG- $\beta$ -CD) konnte die sogenannte „self assembly PEGylation retaining activity“ Technologie etabliert werden. Aufgrund der PEGylierung zeigen die Proteine somit eine höhere Stabilität gegenüber Hitze und dem tryptischen Verdau. Da die PEG- $\beta$ -CDs aber auch wieder von den Adamantangruppen an den Proteinen dissoziieren können, kann eine Erniedrigung der Aktivität der Proteine vermieden werden.

## 5.2 Proteine als Target-Liganden

Das Hauptproblem der systemischen Gabe von Arzneistoffen ist die unspezifische Anreicherung in vielen Zellen und Geweben im Organismus. Da der Wirkstoff nicht spezifisch nur an der pathologischen Stelle im Körper wirken und somit dessen Toxizität auf nicht erwünschte Bereiche im Körper auftreten kann, kommt es häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen. Aus diesem Grund wird schon länger die Strategie des zielgerichteten Wirkstofftransports verfolgt.

Hierbei soll der Wirkstoff an zellspezifische Liganden wie Kohlenhydrate, Antikörper oder Proteine gebunden werden, um eine toxische Wirkung in gesunden Bereichen des Organismus zu verhindern<sup>[7]</sup>.

Ein Beispiel für einen solchen zellspezifischen Liganden stellt das Glycoprotein Transferrin (Tf) dar. Es ist vornehmlich für den Eisentransport zuständig<sup>[174]</sup> und wird bevorzugt für den zielgerichteten Transport zu Tumorzellen<sup>[175]</sup> oder durch die Blut-Hirn-Schranke<sup>[176]</sup> eingesetzt. Auch am apikalen Epithelium des Dickdarms sind Transferrin-Rezeptoren (TfR) zu finden<sup>[177]</sup>. Somit ist auch ein intestinaler Wirkstofftransport möglich. Die Eisenaufnahme an den benötigten Zellen erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose. Nach der Bindung des eisenhaltigen (holo)-Transferrins an die Transferrin-Rezeptoren an der Oberfläche der Endothelzellen erfolgt die Endozytose des Tf-TfR-Komplexes<sup>[178]</sup>. Im endosomalen Kompartiment der Zelle vermindert sich der pH-Wert auf 5.5, wodurch das Fe<sup>3+</sup> aus dem Tf freigesetzt wird<sup>[179]</sup>. Nach Reduktion zum Fe<sup>2+</sup> wird das Eisen aus dem Endosom ins Cytosol transportiert<sup>[180]</sup>, wo es als Cofaktor für Enzyme dient oder als Ferritin gespeichert wird. Der eisenfreie Tf-TfR-Komplex wird über Exozytose wieder an die Zelloberfläche befördert. Unter physiologischem pH-Wert dissoziert das eisenfreie (apo)-Tf vom Rezeptor wieder ab und wird in das Serum freigesetzt<sup>[181]</sup>.

Für den zielgerichteten Wirkstofftransport wurden bereits Krebswirkstoffe wie Doxorubicin kovalent über die Aminogruppen der Lysin-Seitenketten des Transferrins verknüpft. Die Bindung konnte sowohl direkt als auch über einen spaltbaren Spacer erfolgen. Dadurch konnte eine Erniedrigung der cytotoxischen Konzentration des Doxorubicins an den gewünschten Zellen um den Faktor 10-40 erwirkt werden<sup>[182,183]</sup>. Anabousi *et al.* beschrieb 2006 den zielgerichteten Transport von Doxorubicin durch die Verkapselung in Liposomen, welche über Spacergruppen mit Transferrin modifiziert wurden. Über Inhalation konnte somit der cytotoxische Effekt des gezielt an Lungentumorzellen gesteigert werden<sup>[184]</sup>. In einer neueren Studie konnte durch die Verwendung von Transferrin modifizierter Lipid-Nanopartikel ein gerichteter Transport von Paclitaxel zu Lungentumoren ermöglicht werden<sup>[185]</sup>.

Als weiteren zellspezifischen Liganden kann auch Lysozym eingesetzt werden. Lysozym gehört zur Gruppe der Glycosidasen und kommt in vielen biologischen Flüssigkeiten wie Speichel, Milch oder Hühnereiern vor<sup>[186,187]</sup>. Es besitzt antibakterielle Eigenschaften, indem es die Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure der Peptidoglycan-Komponenten in der Zellwänden von gramnegativen Bakterien spaltet<sup>[187]</sup>. Des Weiteren besitzt Lysozym auch antivirale, antitumorale und immunregulatorische Eigenschaften<sup>[188,189]</sup>. Für den endozytischen Rezeptor Megalin fungiert Lysozym als Ligand. Megalin ist vor allem in den Epithelzellen des proximalen Tubulussystems der Nieren überexprimiert<sup>[190]</sup>. Aber auch in den Epithelzellen der Darmwand ist Megalin zu finden<sup>[191]</sup>. Aus diesem Grund kann Lysozym für den renalen und intestinalen Wirkstofftransport eingesetzt werden<sup>[192]</sup>. Für den renalen Transport wurde ein Naproxen-Lysozym-Konjugat bereits erfolgreich getestet<sup>[193]</sup>. Im Folgenden wird nun Herstellung von Adamantan-Protein-Konjugaten der oben beschriebenen Proteine beschrieben.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse

### 5.3.1 Synthese der Adamantan-Triethylenglycol-Bausteinen

Um Proteine als Targetligand an das CD-Hyaluronsäure-Polymer supramolekular zu binden, wurden Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche eingeführt. Da Adamantan aufgrund seiner Hydrophobizität schlecht wasserlöslich ist, wurde Adamantan mit einem wasserlöslichen Spacer verknüpft, über den die Knüpfung an der Proteinoberfläche erfolgen sollte. Dafür wurde ein heterobifunktionaler Triethylenglycol-Spacer verwendet. Auf der einen Seite des Spacers sollte die Bindung an 1-Aminoadamantan bzw. 1-Aminomethyladamantan erfolgen. Auf der anderen Seite sollte die Modifizierung der Aminogruppen der Lysin-Seitenketten bzw. der N-Termini der Proteine stattfinden. Durch den Spacer ist somit auch eine nötige Distanz zur Proteinoberfläche gegeben, damit eine bessere Komplexbildungsfähigkeit zwischen Adamantan und Cyclodextrin vorliegt. Wie in Kapitel 5.1 gezeigt, sollten die Proteine mittels Aktivester, Aldehyden bzw. Isothiocyanaten modifiziert werden. In Abbildung 19 ist die Syntheseroute A

zur Bildung der lagerstabilen Vorstufe eines Adamantan-TEG-Derivates für die spätere Modifizierung mit einem Aktivester bzw. Aldehyd dargestellt.

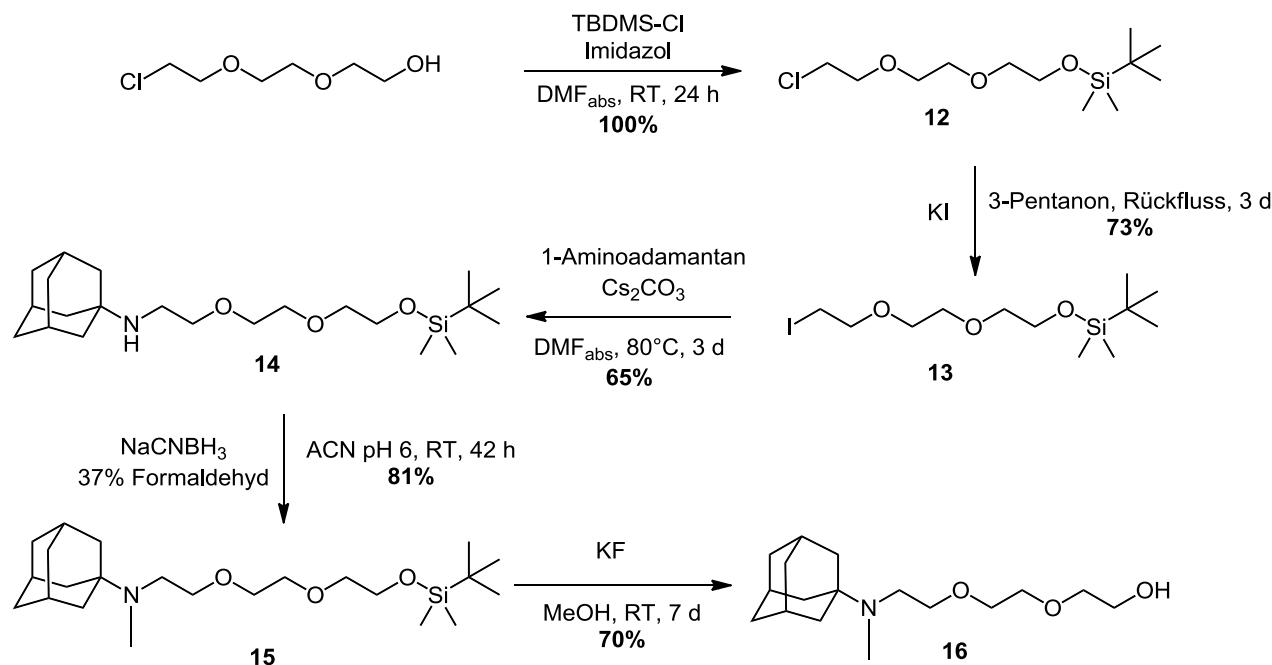
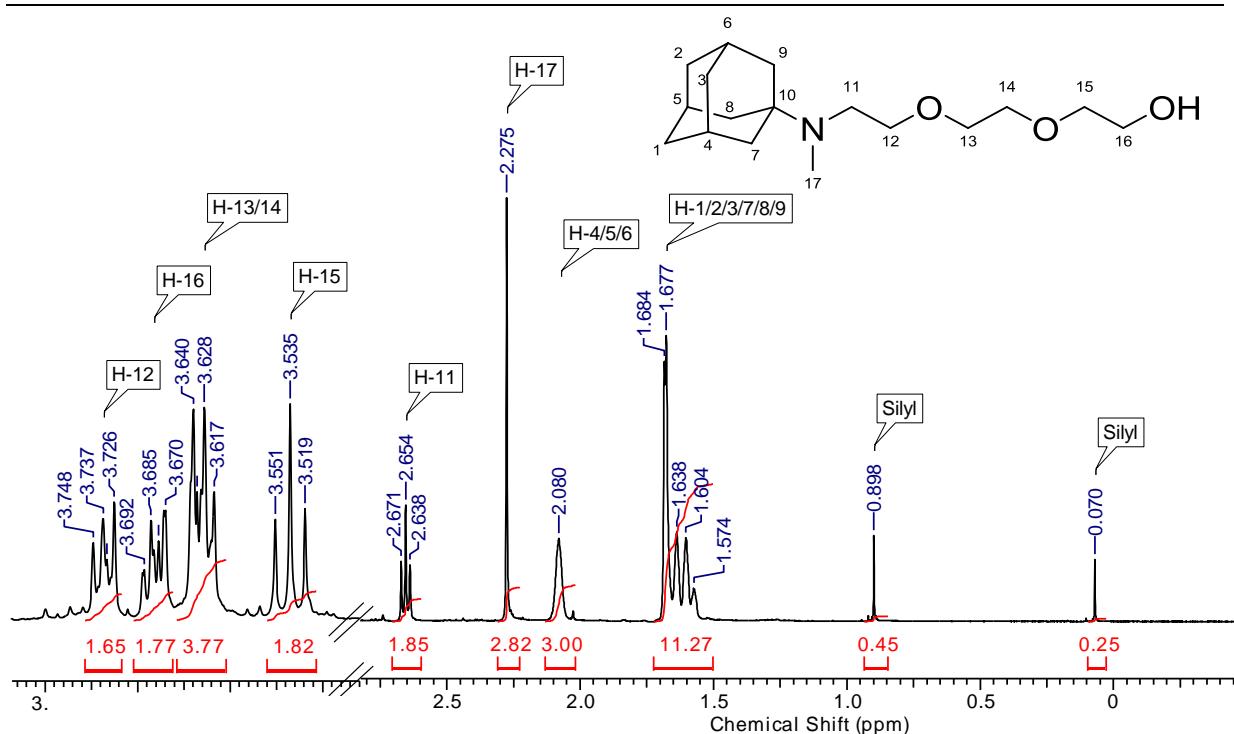


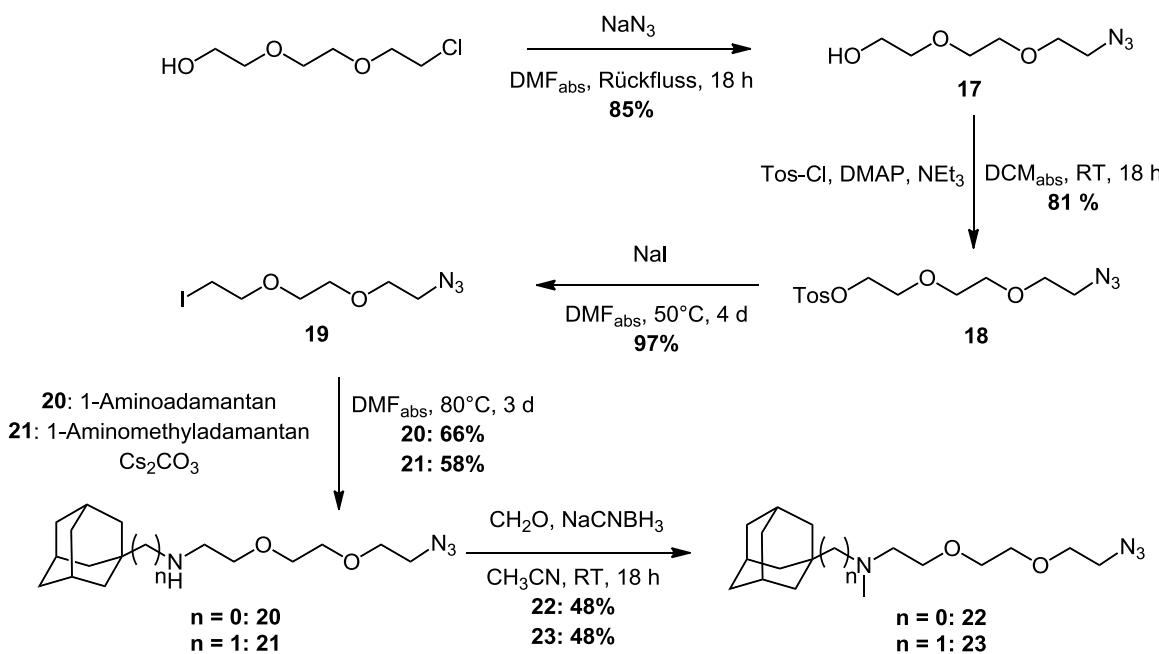
Abbildung 19: Syntheseroute A des Adamantan-TEG-Bausteins 16.

In der ersten Stufe von A wurde die freie Hydroxylgruppe des Cl-TEG-OH zum Silylether geschützt. Die Schützung der Hydroxylgruppe war nötig, um eine mehrfache Anlagerung von TEG-Gruppen untereinander zu verhindern. Im Upscaling konnte in diesem ersten Schritt eine quantitative Ausbeute erreicht werden und es wurden über 25 g von Zwischenprodukt **12** isoliert. Die FINKELSTEIN-Reaktion zum iodierten Produkt **13** wurde in 3-Pentanon anstatt klassisch in Aceton durchgeführt. Dadurch konnte eine höhere Reaktionstemperatur eingestellt werden, was die Reaktionszeit deutlich verkürzte. Die S<sub>N</sub>-Reaktion zwischen I-TEG-OTBDMS und 1-Aminoadamantan wurde analog zu *Simoni et al.*<sup>[194]</sup> mit Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> als Base in DMF<sub>abs</sub> bei 80°C durchgeführt. Bei dieser Reaktion war es nötig, 1-Aminoadamantan als besseres Nucleophil als 1-Hydroxyadamantan einzusetzen. Die Reaktion konnte auch nur mit dem iodierten TEG-Derivat **13** und nicht mit dem **12** durchgeführt werden. Die Methylierung des sekundären Amins zu Produkt **15** war notwendig, damit bei den Proteinreaktionen mittels reduktiver Aminierung als Nebenreaktion keine intermolekulare Reaktion mit dem sekundären Amin

eines weiteren Adamantan-TEG-Derivates erfolgt. Eine vollständige Methylierung zum quartären Amin wäre für die nachfolgende Aufreinigung mittels Säulenchromatographie hinderlich gewesen. Die kontrollierte Methylierung zum tertiären Amin lässt sich klassisch über ESCHWEILER-CLARKE-Methylierung realisieren. Da hier jedoch im stark sauren Milieu gearbeitet wurde, wäre die Silyl-Schutzgruppe nicht stabil gewesen. Aus diesem Grund wurde eine N-Methylierung mit Natriumcyanoborhydrid und Formaldehyd bei pH 6 nach *Gannett et al.*<sup>[195]</sup> verwendet. Aufgrund der Amphiphilie von **16** und den daraus resultierenden Problemen bei der Extraktion wurde eine optimierte Aufreinigungsmethode der Entschützungsreaktion durchgeführt, bei der auf einen Extraktionsvorgang verzichtet wurde. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen, wodurch noch vorhandenes Kaliumfluorid und das während der Reaktion gebildete <sup>1</sup>Butyldimethylsilylfluorid ausfallen und somit abgetrennt werden konnten. Um die Hydroxylgruppe im protonierten Zustand zu erhalten, wurde mit Essigsäure angesäuert. Da sich dadurch auch das Acetatsalz des protonierten Amins bildete, wurden mittels Anionenaustauscher die Acetationen wieder entfernt. Um das Ende der Reaktion feststellen zu können, wurde mittels NMR-Spektroskopie die Intensitätsverringerung der Schutzgruppensignale beobachtet. Am Ende der Reaktionszeit waren nur noch 4% der Hydroxylgruppen als Silylether geschützt (Singulets bei 0.90 ppm und 0.07 ppm). Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **16** ist in Abbildung 20 gezeigt. Die nun freie Hydroxylgruppe des Adamantan-TEG-Derivates **16** kann in einem letzten Schritt entweder in einen Aldehyd oxidiert oder in einen Aktivester umgewandelt werden.

Abbildung 20: Protonen-Spektrum von **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

In einer zweiten Syntheseroute **B** wurde die lagerstabile Vorstufe des Adamantan-TEG-Derivates für die spätere Proteinmodifizierung mit einem Isothiocyanat hergestellt (siehe Abbildung 21).

Abbildung 21: Syntheseroute **B** der Adamantan-TEG-Bausteine **22** und **23**.

Die ersten drei Stufen von Syntheseroute **B** sind bereits literaturbekannt und wurden bereits von *Song et al.*<sup>[196]</sup> und *Deng et al.*<sup>[197]</sup> beschrieben. In der ersten Stufe wurde das Chlorid des Cl-TEG-OH durch  $\text{NaN}_3$  in einer FINKELSTEIN ähnlichen Reaktion in ein Azid (**17**) überführt. Das Azid dient als lagerstabile Vorstufe des Isothiocyanats. Im nächsten Schritt wurde die Hydroxylgruppe in das reaktivere Tosylat umgesetzt, was eine gute Abgangsgruppe darstellt. Im dritten Schritt wurde wieder in einer FINKELSTEIN-Reaktion das Tosylat mit NaI in  $\text{DMF}_{\text{abs.}}$  in eine bessere Abgangsgruppe (Iodid) überführt. Bei der nachfolgenden  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion wurde sowohl 1-Aminoadamantan als auch 1-Aminomethyladamantan an den TEG-Spacer geknüpft. Das mit einer Methylgruppe längere Adamantanderivat weist eine bessere Bindungskonstante zu  $\beta$ -CD-Derivaten auf<sup>[198]</sup>. Im letzten Schritt wurde auch in dieser Syntheseroute das sekundäre Amin zu einem tertiären Amin einfach methyliert. Die Ausbeuten der Synthesen des heterobifunktionalen TEG-Spacers liegen mit 81-97% in einem sehr guten Bereich. Nach Einführung der Adamantangruppe am TEG-Spacer verringert sich die Ausbeute der einzelnen Schritte aufgrund der schlechteren Trennung über Säulenchromatographie. In Abbildung 22 ist das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **23** zu sehen

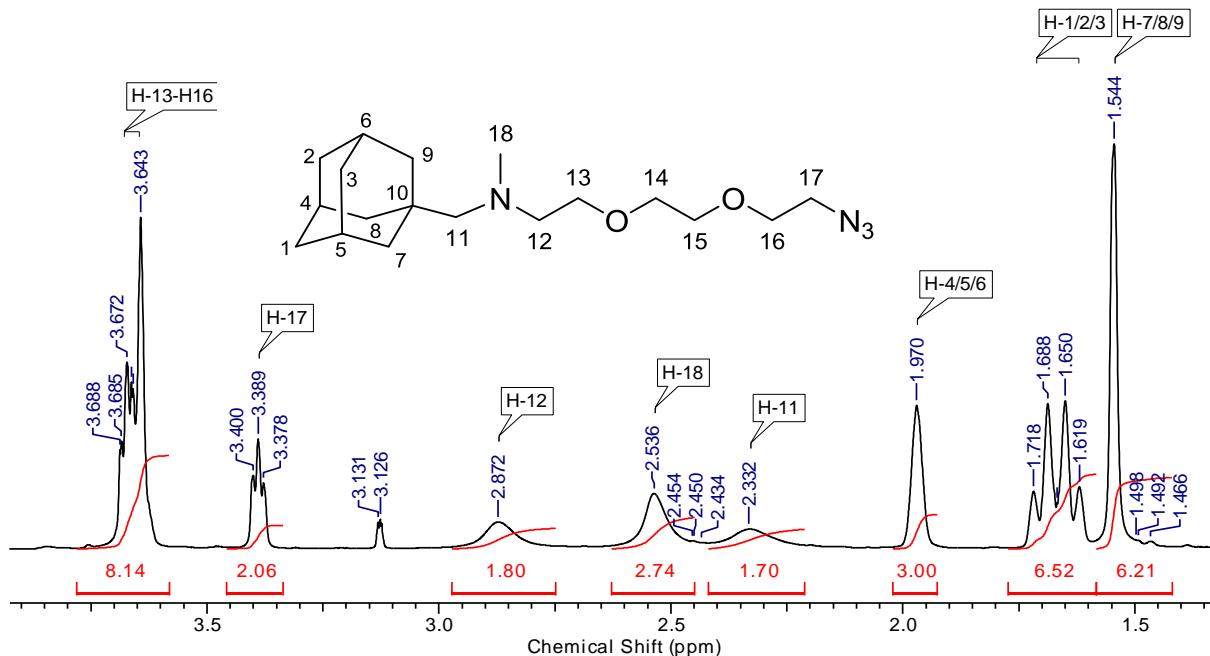


Abbildung 22: Protonenspektrum von **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

Das Signal des zusätzlichen Methyllinkers am Adamantan befindet sich bei einer chemischen Verschiebung von 2.33 ppm. Durch die reduktive N-Methylierung am sekundären Amin bleibt weiterhin die Azidfunktion stabil. Dies ist am Signal des H-17 bei 3.39 ppm zu erkennen, welches immer noch vorhanden ist.

Die lagerstabilen Zwischenprodukte **16**, **22** und **23** können nun in einem letzten Schritt immer frisch zu den reaktiven Derivaten für die Modifizierungsreaktionen an den Proteinen umgesetzt werden (siehe Abbildung 23).

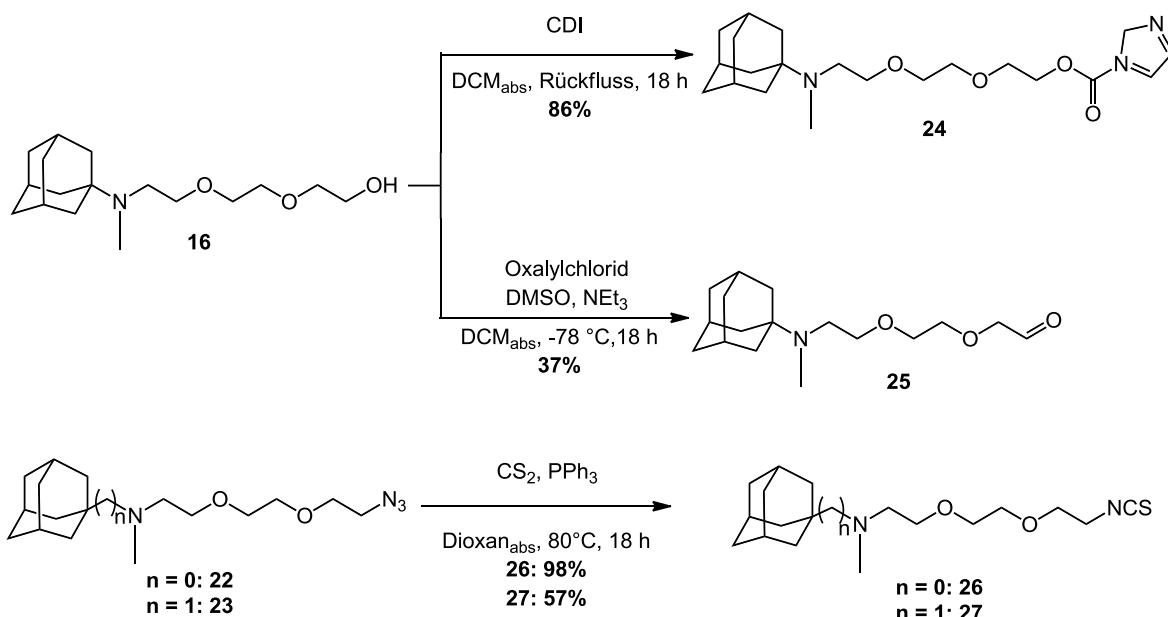


Abbildung 23: Syntheseschritt der Bildung der proteinreaktiven Endgruppen.

Ausgehend von **16** konnte nun sowohl mittels CDI ein Immidazolid-Aktivester (**24**) bzw. in einer SWERN-Oxidation ein Aldehyd (**25**) als reaktive Gruppe für die Proteinmodifizierungen hergestellt werden. Die Reaktion zum Aktivester ist der Reaktion zum Aldehyd zu bevorzugen, da hier zum einen höhere Ausbeuten und zum anderen reinere Produkte erzielt werden konnten. Die Gesamtausbeute der 6-stufigen Syntheseroute des **24** liegt mit 23% signifikant höher als die Gesamtausbeute zur Bildung des Aldehyds **25** (10%). Die Bildung

des Aktivesters **24** lässt sich am FT-IR-Spektrum nachweisen (siehe Abbildung 24).

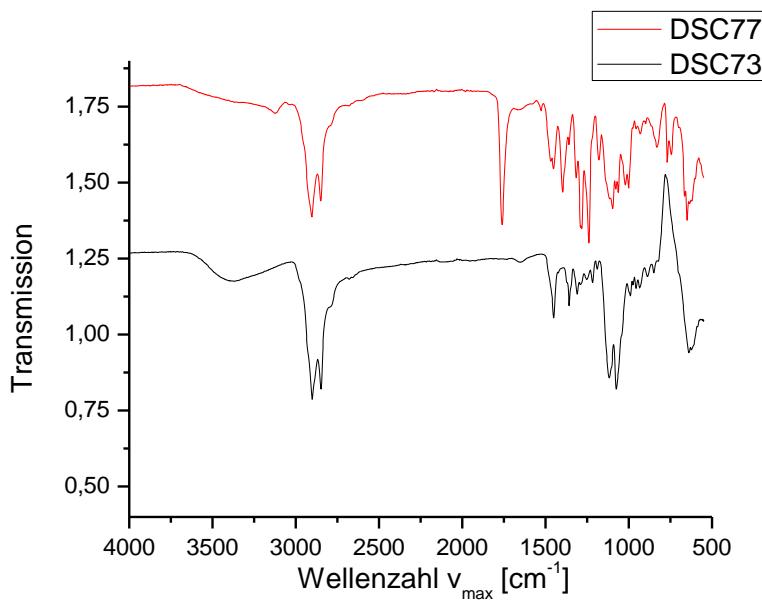


Abbildung 24: FT-IR-Spektrum von **16** und **24**.

Die OH-Streck-Schwingung der Hydroxylgruppe des **16** bei  $\nu_{\max} = 3345 \text{ cm}^{-1}$  ist nach der Reaktion zum Produkt **24** nicht mehr zu erkennen. Stattdessen ist nun die Bande der Carbonyl-Streckschwingung bei  $\nu_{\max} = 1749 \text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Dies spricht für eine Umsetzung der Hydroxylgruppe zum Immidazolid-Aktivester.

In Abbildung 23 ist ebenfalls die Umsetzung der lagerstabilen Azid-Vorstufen **22** und **23** zu den Isothiocyanaten **26** und **27** gezeigt. Die Reaktionen wurden nach *Garcia-Moreno et al.*<sup>[199]</sup> in wasserfreiem Dioxan durchgeführt. Dadurch konnte eine STAUDINGER Reaktion zum primären Amin verhindert werden. Nach Zugabe von Triphenylphosphin und Abspaltung von Stickstoff, reagiert die Iminophosphoran-Zwischenstufe mittels Schwefelkohlenstoff zum Isothiocyanat. Die Gesamtausbeute der 6-stufigen Reaktionenroute zur Bildung von **26** liegt mit 21% signifikant höher als die Gesamtausbeute zur Bildung des **27** mit 11%. Die Bildung der Isothiocyanatgruppe kann im FT-IR-Spektrum in Abbildung 25 bestätigt werden.

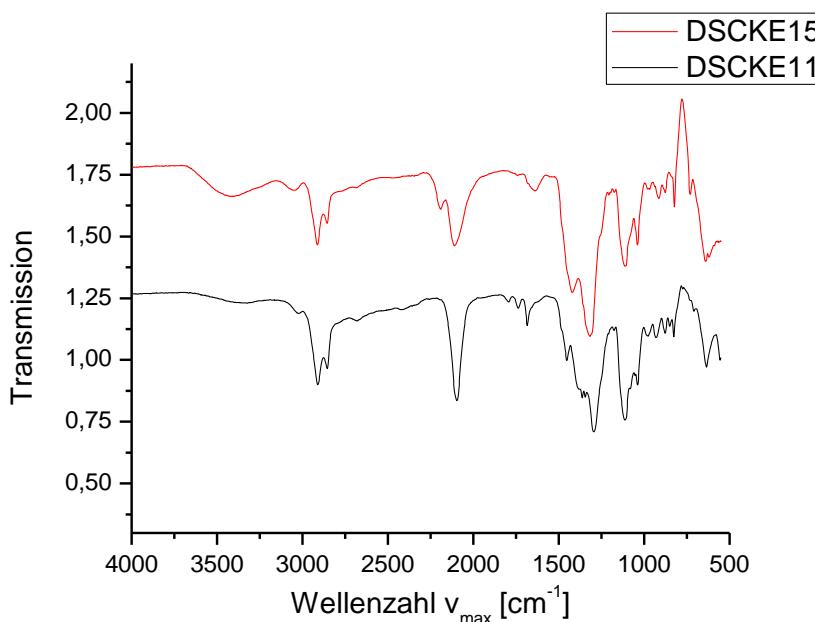


Abbildung 25: FT-IR-Spektrum von **22** und **26**.

Die Azidschwingung liegt beim **22**, wie auch schon bei den Edukten zuvor, bei  $\nu_{\max} = 2096 \text{ cm}^{-1}$ . Die Bande der Isothiocyanat-Schwingung liegt zwar auch in diesem Bereich, allerdings ist beim Produkt **26** nun eine viel breitere Bande bei  $\nu_{\max} = 2109 \text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Im Massenspektrum kann dieses Ergebnis ebenfalls bestätigt werden, da der Basispeak des Spektrums der Molekülpeak des Produktes darstellt ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 340.0 \text{ Da}$ ). Der Molekülpeak des Eduktes ist nicht mehr zu erkennen (siehe Spektrenanhang).

Über die beiden Syntheserouten **A** und **B** konnten somit zwei Adamantan-TEG-Derivate mit einer Isothiocyanatgruppe (**26**, **27**), ein Derivat mit einem Imidazolid-Aktivester (**24**) und ein Derivat mit einem Aldehyd (**25**) zur Proteinmodifizierung synthetisiert werden.

### 5.3.2 Synthese von Adamantan-Protein-Konjugaten

Als Target-Liganden wurden die humanen Proteine Lysozym und Transferrin für die Modifizierung mit den Adamantan-Derivaten ausgewählt. Bei der Proteinmodifizierung wurden mit dem Imidazolid-Aktivester **24** und der Isothiocyanat-Derivaten **26** und **27** die Aminogruppe der Lysin-Seitenketten auf der Proteinoberfläche bzw. auch die N-Termini adamantiliert. Eine Proteinmodifizierung mit dem Aldehyd-Derivat **25** konnte in einer reduktiven

Aminierung nach *Wirth et al.*<sup>[200]</sup> allerdings nicht realisiert werden. Nach einer zweistündigen Reaktionszeit konnte nur unmodifiziertes Protein isoliert werden.

Die statistische PEGylierung der peripheren Lysine von Lysozym (14.7 kDa) erfolgte bei *Higashi et al.* mit einem PEG-NHS-Aktivester in einem 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8.0)<sup>[201]</sup>. Ein DMF/H<sub>2</sub>O-Gemisch (3:2, pH 10.0) als Reaktionsmedium wurde für eine optimale Monofunktionalisierung des Insulins etabliert<sup>[202]</sup>. Die Umsetzung von PEG-Isothiocyanat-Derivaten realisierte *Meng et al.* in 10 mM Phosphatpuffer (pH 8.5)<sup>[165]</sup>.

Die Adamantylierung des Lysozyms konnte nun mit dem Imidazolid-Aktivester **24** und dem Isothiocyanat-Derivat **26** sowohl in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8.5) als auch in einem DMF/H<sub>2</sub>O-Gemisch (3:2, pH 8.5) durchgeführt werden (siehe Abbildung 26).

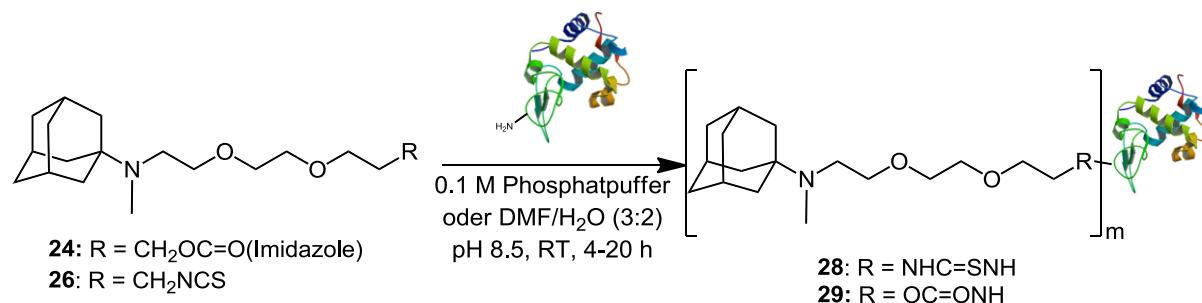


Abbildung 26: Modifizierung von humanem Lysozym.

Der pH-Wert wurde auf 8.5 eingestellt, damit die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysine ( $pK_s = 10.5$ ) in der deprotonierten Form vorliegt, wohingegen die  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus ( $pK_s < 7.0$ ) noch in der protonierten Form vorliegt<sup>[203,204]</sup>. Die Reaktionszeiten wurden zwischen 4 und 20 Stunden variiert. Es konnten sowohl Adamantan-Lysozym-Konjugate aus dem Imidazolid-Aktivester-Derivat **24** als auch aus dem Isothiocyanat **26** gebildet werden. Unverbrauchtes Adamantan-Derivat wurde im Zentrifugalkonzentrator (5 kDa-Membran) durch Ultrafiltration gegen Wasser abgetrennt. Der nach *Beauchamp et al.*<sup>[163]</sup> verwendete 10 mM Boratpuffer für die Proteinreaktion mit einem Imidazolid-Aktivester führte allerdings nicht zur Ausbildung eines adamantyierten Lysozym-Derivats. Um die Anzahl an Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche zu bestimmen, wurden MALDI-Spektren der

Lysozym-Konjugate aufgenommen. Dabei wurde die Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF) der freigesetzten Ionen verwendet. Über die Massendifferenz zwischen den modifizierten Proteinen mit deren nativen Proteinen lassen sich die Anzahl an eingeführten Adamantangruppen bestimmen. Mit der Modifizierung über den Immidazolid-Aktivester des Adamantan-TEG-Derivats **24** kann eine Massenerhöhung um 323.22 Da pro Adamantangruppe erzielt werden. Die Reaktion von peripheren Aminogruppen mit den adamantylierten Isothiocyanaten **26** und **27** erzeugten eine Massenerhöhung um 338.21 Da, bzw. 352.55 Da. Das MALDI-Spektrum der Lysozym Modifizierung nach einer vierstündigen Inkubation mit **24** ist Abbildung 27 in zu sehen.

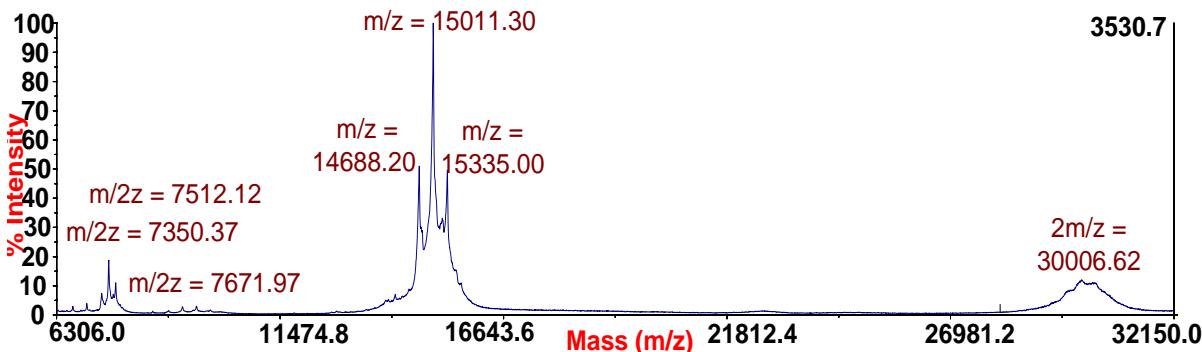


Abbildung 27: MALDI-Spektrum des modifizierten humanen Lysozyms **29**.

Aufgrund der geringen Molmasse von humanem Lysozym ( $M_w = 14688$  Da) kann jede Spezies der unterschiedlichen Modifizierungsgrade im MALDI-Spektrum charakterisiert werden. Es ist zu erkennen, dass der Molekülpeak das 1-Fach adamantylierte Lysozym darstellt ( $m/z = 15011$  Da). Zu ungefähr gleichen Anteilen liegt sowohl das zweifach adamantylierte Lysozym ( $m/z = 15335$  Da) als auch noch unmodifiziertes Lysozym vor. Des Weiteren sind auch doppelt geladene Proteinspezies ( $m/2z = 7512$  Da) und Protein-Dimere ( $2m/z = 30007$  Da) zu erkennen.

Die Adamantylierung des Transferrin (78.4 kDa) wurde im Gegensatz zu Lysozym nur in 0.1 M Phosphatpuffern (pH 8.5) durchgeführt<sup>[202]</sup> (siehe Abbildung 28).

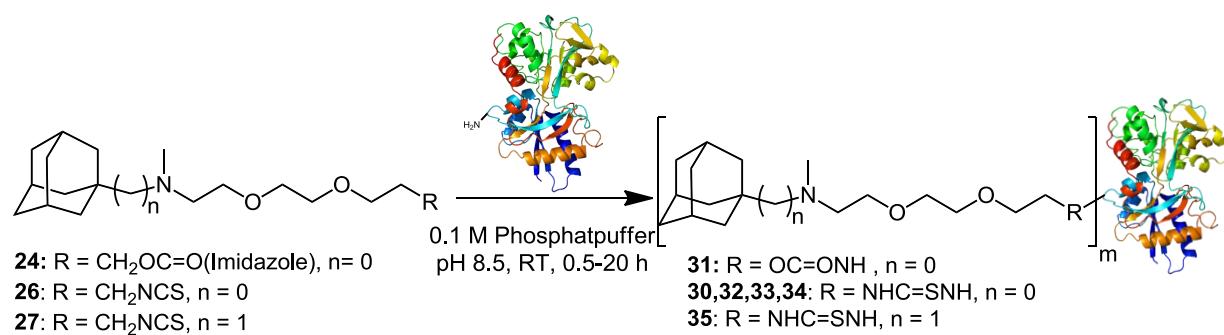
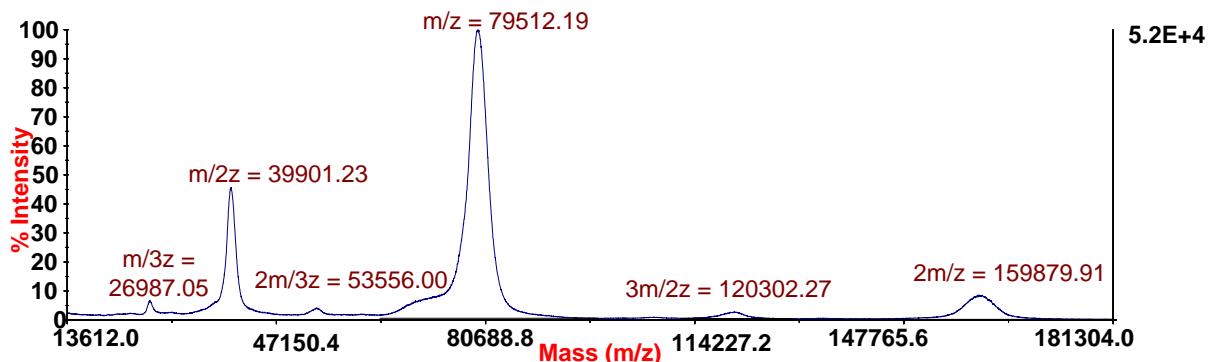


Abbildung 28: Modifizierung von humanem Transferrin.

Die Reaktionszeiten wurden zwischen 30 min und 20 h variiert um den Substitutionsgrad der Proteine einzustellen. Zur Abtrennung von nicht verbrauchtem Adamantan-Derivat wurden die Proteine nach der Reaktion im Zentrifugalkonzentrator (10 kDa-Membran) gegen Wasser ultrafiltriert. Um die Anzahl an eingeführten Adamantangruppen zu ermitteln, wurden ebenfalls MALDI-Spektren der Transferrin-Konjugate aufgenommen. Beispielhaft ist das MALDI-TOF-Spektrum von **34** in Abbildung 29 gezeigt.

Abbildung 29: MALDI-Spektrum des adamantylierten humanen Transferrins **34**.

Im Falle von humanem Transferrin ( $M_w = 78362$  Da, MALDI-Spektrum im Anhang) kommt es durch die hohe Molmasse zu einer Peakverbreiterung durch die hohe Isotopenzahl. Dadurch kann nur eine gemittelte Angabe zum Modifizierungsgrad gemacht werden. Die Molmasse des adamantylierten Transferrins **34** liegt nach einer dreistündigen Reaktion mit dem Isothiocyanat-Derivat **26** um 1150 Da höher als die Molmasse des nativen Transferrins. Somit kann von 3-4 Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche ausgegangen

werden. Im MALDI-Spektrum sind zusätzlich zum einfach geladenen Molekülsignal auch die Signale von mehrfach geladenen Transferrin-Spezies ( $m/z = 39901$  Da) oder von Protein-Dimeren ( $2m/z = 159880$  Da) zu erkennen. Auch über diese Signale lässt sich auf den gleichen Modifizierungsgrad schließen.

Ein Überblick über die Modifizierungsgrade der adamantylierten Proteine zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Adamantylierung der Proteine.

| Adamantan-Derivat | Protein     | Verbindung | Äquivalent Adamantan-Derivat | Anzahl der Lysine | Reaktionszeit (h) | Anzahl an Adamantan-gruppen m |
|-------------------|-------------|------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|
| <b>26</b>         | Lysozyme    | <b>28</b>  | 18                           | 5                 | 20                | 1-4                           |
| <b>24</b>         | Lysozyme    | <b>29</b>  | 18                           | 5                 | 4                 | 1-2                           |
| <b>26</b>         | Transferrin | <b>30</b>  | 250                          | 58                | 20                | 11-12                         |
| <b>24</b>         | Transferrin | <b>31</b>  | 250                          | 58                | 20                | 1-2                           |
| <b>26</b>         | Transferrin | <b>32</b>  | 38                           | 58                | 4                 | 2                             |
| <b>26</b>         | Transferrin | <b>33</b>  | 250                          | 58                | 4                 | 6                             |
| <b>26</b>         | Transferrin | <b>34</b>  | 250                          | 58                | 3                 | 3-4                           |
| <b>27</b>         | Transferrin | <b>35</b>  | 250                          | 58                | 20                | 8-9                           |

Sowohl an Lysozym als auch an Transferrin konnte durch **26** eine signifikant höhere Anzahl an Adamantangruppen eingeführt werden als durch **24**. Nach einer Reaktionszeit von 20 h konnte mit **26** am Transferrin eine 11-12-Fache Adamantylierung und mit **24** eine 1-2-Fache Adamantylierung festgestellt werden. Dies spricht für eine höhere Reaktivität des Isothiocyanats im Vergleich zum Immidazolid-Aktivester. Der Aktivester neigt zur Hydrolyse im wässrigen Medium, was zu Verringerung im Modifizierungsgrad führen kann<sup>[164]</sup>. Durch Variierung der Reaktionszeiten und der eingesetzten Äquivalenten an Adamantan-Derivat kann ebenfalls die Anzahl an Modifizierungen eingestellt werden. Bei einer Verringerung der Reaktionszeit mit dem Isothiocyanat **26** von 20 h (**30**) auf 4 h (**33**) und 3 h (**34**) konnte auch der Modifizierungsgrad von 11-12 (**30**) auf 6 (**33**) und 3-4 (**34**) erniedrigt werden. Die Reaktion des Transferrins mit dem um eine Methylgruppe längerem Adamantanderivat (**35**) erzeugte nach 20 h Reaktionszeit ebenfalls einen hohen Modifizierungsgrad (8-9 Adamantangruppen). Zur Lokalisierung der adamantylierten Lysine wurden die modifizierten Transferrine **33** und **34**

sowie das modifizierte Lysozym **29** tryptisch verdaut. Das MALDI-Spektrum des tryptisch verdauten Transferrin **33** ist in Abbildung 30 gezeigt.

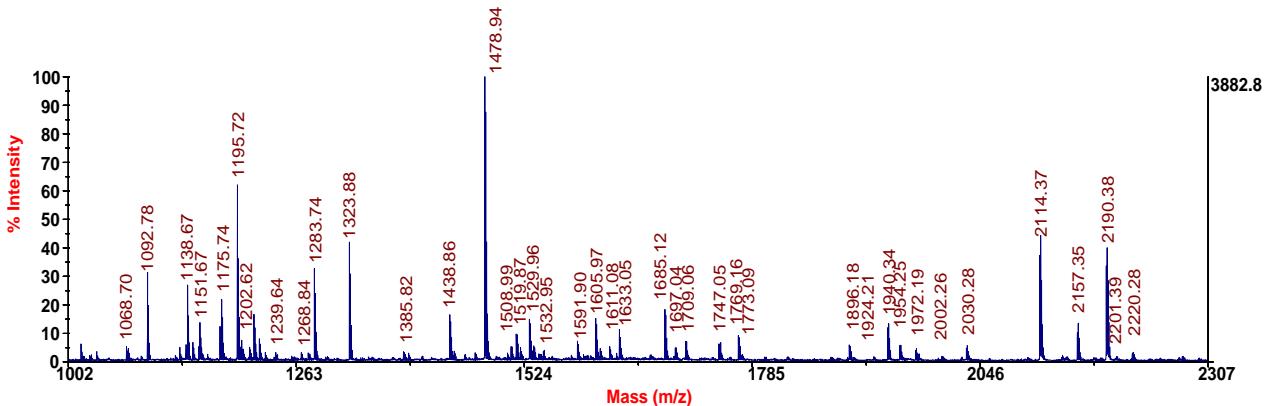


Abbildung 30: MALDI-Spektrum nach tryptischen Verdau von **33**.

Nach Abgleich der Peptidfragmenten im MALDI Spektrum mit denen in der MASCOT-Datenbank, konnten Peptidfragmente identifiziert werden, die nicht dem nativem Protein zuzuordnen sind. Durch den Vergleich der neuen Peptidfragmente mit denen eines simulierten tryptischen Verdaus in der Proteinprospector-Datenbank konnten die genauen Modifizierungspositionen im Protein bestimmt werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Modifiziertes Peptidfragment nach tryptischem Verdau.

| Protein                  | m/z modifiziert | Peptid-fragment | Aminosäuresequenz               | # Lysin |
|--------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|---------|
| <b>33</b><br>Transferrin | 1202.62         | 652-659         | (R)DDTVCLAK(L)                  | 659     |
|                          | 1268.84         | 611-618         | (K)DKEACVHK(I)                  | 612/618 |
|                          | 1605.97         | 611-618         | (K)DKEACVHK(I)                  | 612+618 |
|                          | 1697.07         | 47-60           | (K)SVIPSDGPSVACV <b>K</b> (K)   | 60      |
|                          | 1773.09         | 454-466         | (K)SASDLTWDNL <b>KGK</b> (K)    | 464/466 |
|                          | 1954.29         | 226-239         | (K)HSTIFENLANKADR(D)            | 236     |
|                          | 2220.28         | 27-42           | (R)WCAVSEHEAT <b>KCQSFR</b> (D) | 37      |
| <b>34</b><br>Transferrin | 1268.86         | 611-618         | (K)DKEACVHK(I)                  | 612/618 |
|                          | 1605.99         | 611-618         | (K)DKEACVHK(I)                  | 612+618 |
|                          | 1697.06         | 47-60           | (K)SVIPSDGPSVACV <b>K</b> (K)   | 60      |
|                          | 1773.10         | 454-466         | (K)SASDLTWDNL <b>KGK</b> (K)    | 464/466 |
|                          | 1954.29         | 226-239         | (K)HSTIFENLANKADR(D)            | 236     |
| <b>29</b><br>Lysozym     | 1207.74         | 81-87           | (R)YWCNDG <b>K</b> (T)          | 87      |
|                          | 1257.83         | 24-31           | (R)CELARTLK(R)                  | 31      |

Der Verdau von **33** zeigt hier sieben Peptidfragmente, welche nicht dem nativem Transferrin zugeordnet werden können und deren Massen genau um die eingeführte Adamantan-TEG-Einheit erhöht ist. Die modifizierten Peptidfragmente bei einem m/z von 1268.84 Da und 1605.97 Da stammen vom gleichen nativen Fragment (m/z = 929.45 Da). Dieses Fragment gehört zu den Aminosäuren #611-616, in dessen Sequenz sich zweimal ein Lysin befindet. Aus diesem Grund ist bei diesem Fragment eine zweifache Adamantylierung möglich. Im MALDI-Spektrum des verdauten **34** konnten fünf modifizierte Peptidfragmente bestimmt werden. Dabei fällt auf, dass am **34** die gleichen Lys-Seitenketten modifiziert wurden, wie beim **33**. Nur die schwer erreichbaren Lysine #659 und #37 wurden nicht adamantyliert. Das MALDI-Spektrum des verdauten **29** zeigt zwei modifizierte Fragmente. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der modifizierten unverdauten Proteine. Im Vergleich zu den gemittelten Modifizierungsgraden der unverdauten Proteine liegt bei den verdauten Proteinen die Anzahl an modifizierten Peptidfragmenten immer um eins höher. Dies deutet darauf hin, dass nicht immer alle gefundenen Peptidfragmenten gleichzeitig modifiziert vorliegen.

### 5.3.3 Molecular Modelling der adamantylierten Proteine

Um die genaue Position der Adamantaneinheiten auf der Proteinoberfläche zu ermitteln wurden mittels computerchemischer Methoden die Strukturen der modifizierten Proteine grafisch dargestellt. Die Proteinstrukturen des humanen Tf wurden basierend auf der Röntgenkristallstruktur von eisengebundenen Tf aus der Proteindatenbank (PDB Code: 3V83)<sup>[205]</sup> visualisiert. Anhand der Ergebnisse der MALDI-Analyse nach tryptischen Verdau der adamantylierten Transferrine **33** und **34** wurden die entsprechenden Lys-Seitenketten mit Adamantan-TEG-Gruppen dargestellt. Die Oberflächenstruktur des adamantylierten Transferrin **33** ist in Abbildung 31 zu sehen.

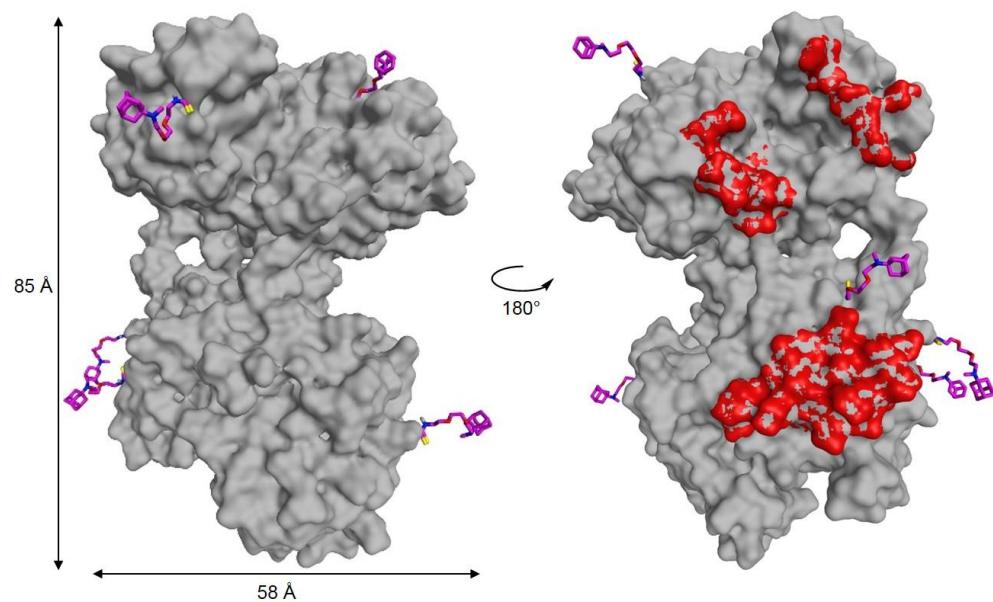


Abbildung 31: Oberflächendarstellung des adamantylierten Transferrin (**33**): Proteinoberfläche (grau), aktives Zentrum für Transferrin-Rezeptor (rot), eingeführte Adamantan-TEG-Gruppen (magenta), Vorderansicht (links), Rückansicht (rechts).

An der Visualisierung ist zu erkennen, dass die eingeführten Adamantangruppen sich gut verteilt an den Lysin-Seitenketten an der Proteinoberfläche befinden. Alle modifizierten Lysine befinden sich somit an gut zugänglichen Stellen des Proteins. Dies bestätigt somit auch die Richtigkeit der MALDI-Analysen nach dem tryptischen Verdau. Da sich die Adamantangruppen auf allen Seiten der Proteinoberfläche befinden, korrelieren diese Ergebnisse auch mit der Tatsache, dass das adamantyierte Tf **33** nach supramolekularer Bindung auf der CD-Monoschicht immer noch in der Lage ist, von den CDs des CD-HA-Polymers **10b** komplexiert zu werden (siehe Kapitel 6.2.3). Die Adamantan-TEG-Gruppen befinden sich in einem ausreichenden Abstand zu den aktiven Bereichen des Transferrins, welche für die Bindung zum TfR zuständig sind (rote Bereiche) (siehe Abbildung 31b)<sup>[206]</sup>. Aus diesem Grund sollte die Affinität des **33** zum TfR durch die eingeführten Adamantan-Gruppen nicht beeinträchtigt sein. Die Proteinstruktur des **34** zeigt die gleichen Ergebnisse. Auch hier sind, mit einer geringeren Anzahl an Adamantangruppen, nur die Lysin-Seitenketten modifiziert, die sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums befinden (siehe Anhang). Somit ist auch bei **34** die Affinität zum TfR nicht verringert.

Die Quartärstruktur des humanen Lysozyms wurde basierend auf der hochauflösenden Röntgenkristallstruktur von humanen Lysozym aus der Proteindatenbank (PDB Code: 2NWD)<sup>[207]</sup> visualisiert. Anhand der Ergebnisse der MALDI-Analyse nach tryptischen Verdau des adamantylierten Lysozums **29** wurden die entsprechenden Lysin-Seitenketten mit Adamantan-TEG-Gruppen grafisch dargestellt. Das Bändermodel des **29** inkl. der Kennzeichnung dessen aktiven Zentrums ist in Abbildung 32 gezeigt.

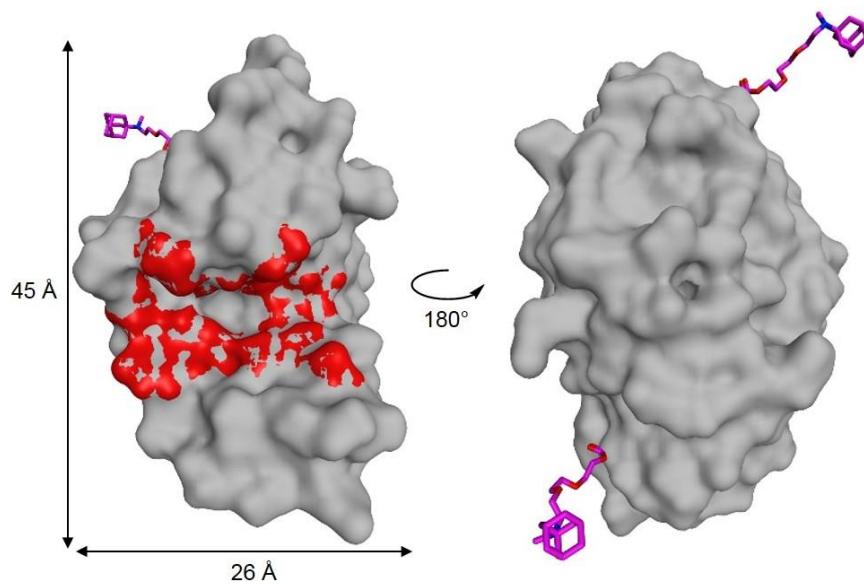


Abbildung 32: Oberflächendarstellung des adamantylierten Lysozym (**29**): Proteinoberfläche (grau), eingeführte Adamantan-TEG-Gruppen (magenta), aktives Zentrum des Lysozym (rot).

Interessanterweise befinden sich die Adamantan-TEG-Gruppen des **29** an #Lys31 und #Lys87, welche sich genau auf der entgegengesetzten Seite des aktiven Zentrums des Lysozyms befinden<sup>[208]</sup>. Das aktive Zentrum ist auch in dieser Abbildung rot markiert. Somit sollten die Adamantan-Gruppen auch die Hydrolyse-Aktivität des Lysozyms nicht beeinflussen. Da die beiden angeknüpften Adamantan-Gruppen sich auf derselben Seite des Proteins befinden, können durch die Flexibilität des TEG-Spacers die Adamantan-Gruppen mit den CD-Monoschichten auf der Goldoberfläche bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. Surface plasmon resonance spectroscopy, SPR-Spektroskopie) wechselwirken. Da keine

weiteren Adamantan-Gruppen vorhanden sind, ist eine weitere Komplexierung mit einem CD-Polymer auszuschließen (siehe Kapitel 6.2.3).

Um die Bindungsfähigkeit der Adamantangruppen auf den Proteinoberflächen mit dem  $\beta$ -CD-Derivat an der Hyaluronsäure aus Kapitel 4.3 zu analysieren, wurden die Dissoziationskonstanten  $K_D$  im nachfolgenden Kapitel 6.2 mittels SPR-Spektroskopie bestimmt.

## 6 Immobilisierung der adamantyierten Proteine auf Goldoberflächen über multiple Wirt-Gast-Wechselwirkungen

### 6.1 Molekulare Erkennung an Oberflächen

Unter der molekularen Erkennung ist eine starke, selektive Interaktion zwischen zwei Molekülen zu verstehen, die ohne kovalente Bindung zwischen den Molekülen ausgebildet wird<sup>[209,210]</sup>. In einem solchen supramolekularen System können molekulare Rezeptoren mit Bindungsstellen ein spezifisches Substrat mit einer bestimmten Geschwindigkeit komplexieren<sup>[210]</sup>. Ein biologisches Beispiel für eine solche hochaffine Interaktion ist die Bindung zwischen dem essentiellen Vitamin Biotin mit dem tetrameren Protein Streptavidin. Streptavidin ist in der Lage bis zu vier Biotin Moleküle mittels Protein-Ligand Wechselwirkung zu binden<sup>[211]</sup>. Über mehrfache Wasserstoffbrücken- und Van-der-Walls Wechselwirkungen können durch die Ausbildung von Polypetid-Loops an der Proteinoberfläche die Biotin-Moleküle innerhalb der Loops komplexiert werden. Dadurch entstehen strukturelle Veränderungen der Quartärstruktur des Strepavidin-Tetramers<sup>[212]</sup>. Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin galt lange Zeit als die stärkste, nicht-kovalente, biologische Wechselwirkung mit einer Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $10^{-14}$  M<sup>[213]</sup>. Die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung bildet somit eine nahezu irreversible supramolekulare Bindung aus. Dies wird sich vor allem in diagnostischen Assays zunutze gemacht, bei denen z.B. eine irreversible, spezifische Bindung zwischen zwei biologischen Makromolekülen notwendig ist<sup>[214]</sup>. Es können auch Biotin-funktionalisierte, selbstorganisierte Monoschichten auf einer Goldoberfläche realisiert werden, womit die spezifische Bindung zum Streptavidin analysiert wird<sup>[210]</sup>. Ist allerdings eine spezifische, reversible supramolekulare Wechselwirkung nötigt, so sind Wechselwirkungen mit einer größeren Dissoziationskonstante besser geeignet. Eine solche reversible supramolekulare Wirt-Gast-Wechselwirkung wird zwischen Cyclodextrinen und Adamantan-Derivaten ausgebildet.

---

Huskens et al.<sup>[215]</sup> beschrieb erstmals sogenannte MOLECULAR PRINTBOARDS, bei denen CDs als Wirtmoleküle an Goldoberflächen gebunden wurden. Multivalente Gastmoleküle (z.B. adamantyierte Polypropylenimin-Dendrimere) können hierbei hinsichtlich ihrer Adsorptions- und Desorptionsparameter untersucht werden, da die thermodynamischen und kinetischen Konstanten von der Anzahl an Bindungsstellen abhängig sind. Die supramolekularen Bindungen können hierbei mittels elektrochemischer Impedanz Spektroskopie oder SPR-Spektroskopie untersucht werden<sup>[216]</sup>.

Mittels SPR-Spektroskopie lassen sich kinetische und thermodynamische Analysen der Affinität von Analyt und Liganden durchführen. Sie ist eine optische Detektionsmethode, die ohne Verwendung eines Labels auskommt und in Echtzeit gemessen werden kann. Vor allem im biologischen Bereich können somit die Vorgänge wie z.B. Zelladhäsion oder virale Infektionen auf Basis von makromolekularen Wechselwirkungen untersucht werden<sup>[217]</sup>. Oberflächenplasmonenresonanz ist ein optisches Phänomen, welches durch Totalreflektion von monochromatischem, linear polarisiertem Licht an einer Metall-Flüssigkeit Phasengrenze entsteht. Ein Teil des einfallenden Lichtes dringt in das Medium mit geringerer Dichte (Puffer) ein und regt die Moleküle an der Phasengrenze Glas/Flüssigkeit an<sup>[218]</sup>. Befindet sich an der Phasengrenze ein dünner Metallfilm, so reagiert das einfallende Licht mit den Plasmonen an der Metalloberfläche. Dadurch verringert sich die Intensität des einfallenden Lichtes. Die Resonanz erfolgt nur bei einem definierten Winkel des einfallenden Lichtes, der vom Brechungsindex der Flüssigkeit auf der Metalloberfläche abhängig ist. Wechselwirkungen von Makromolekülen in der Pufferlösung ändern den Brechungsindex auf der Metalloberfläche und somit auch den Resonanzwinkel. Die Änderung des Resonanzwinkels wird anschließend detektiert und als Funktion nach der Zeit als Sensorgramm dargestellt. Das Resonanzsignal wird in Respons-Einheiten (engl. response units, RU) wiedergegeben<sup>[217,219]</sup>. 1000 RU entsprechen dabei einer Änderung des SPR-Winkels um 0.1°. Für Proteine ist dies zu einer Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm<sup>2</sup> äquivalent<sup>[220]</sup>. Die Messungen finden auf einem Sensorchip statt, der aus einem Glassubstrat besteht, auf dem eine

---

50 nm dünne Goldschicht aufgetragen wurde. Die Goldoberfläche wird mit einer Hydroxyalkylthiol-Monoschicht derivatisiert, damit Biomakromoleküle nicht mit der Metalloberfläche während den Messungen in Kontakt treten können. Eine weitere 100 nm dicke Schicht aus Carboxymethyldextran wird auf die vorherige Monoschicht gebunden, um eine hydrophile Oberfläche für die Immobilisierung von Biomakromolekülen zu erzeugen<sup>[217]</sup>.

Bei der Anbindung von Proteinen auf Oberflächen sind besonders die Proteinorientierung, die Adsorptionsstärke und Reversibilität der Bindung und eine weiterhin vorhandene biologische Aktivität der Proteine essentiell. Die multivalente Anbindung von Proteinen an  $\beta$ -CD-Monoschichten auf Goldoberflächen wurde bereits im Jahr 2007 von *Ludden et al.*<sup>[221]</sup> beschrieben. Hier wurde ein multivalenter, orthogonaler Linker (divalenter adamantyierte-Biotin-Linker) verwendet, welcher die Proteine mit der CD-Monoschicht miteinander verbindet. Durch den Linker kann eine unspezifische Bindung des Proteins auf der CD-Monoschicht verhindert werden<sup>[221]</sup>.

Im folgenden Kapitel 6.2 werden die Dissoziationskonstanten der adamantyierten Proteine zu CD-Monoschichten auf der Goldoberfläche über SPR-Spektroskopie ermittelt.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

Um die Bindungsfähigkeit der Adamantangruppen an der Proteinoberfläche mit CD-Derivaten zu untersuchen, wurde auf die SPR-Spektroskopie zurückgegriffen. Im Gegensatz zu klassischen Methoden wie der isothermen Titrationskalorimetrie (engl. isotherm titration calorimetry, ITC) liegt der Vorteil dieser Analysenmethode im sehr geringen Probenvolumen, welches zur Bestimmung benötigt wird. Als CD-Derivat sollte das Monoamino-HTG-Derivat **5b** auf der Goldoberfläche immobilisiert werden, um die Dissoziationskonstanten der adamantyierten Proteine mit dem CD-Derivat zu bestimmen, welches in Kapitel 4.3 an die Hyaluronsäure geknüpft wurde.

### 6.2.1 Immobilisierung eines CD-Liganden auf der Goldoberfläche

Für die Immobilisierung der CD-Derivate auf der Goldoberfläche wurde sich bei den Injektionszeiten und Flussgeschwindigkeiten an den Arbeiten von *Kobayashi et al.*<sup>[222]</sup> und *Singh et al.*<sup>[223]</sup> orientiert. Als Vergleich wurde sowohl das Monoamino- $\beta$ -CD-Derivat als auch das Mono-Cys- $\beta$ -CD **7** und das Mono-Amino-HTG **5b** mit einer Konzentration von 7 mM (25 mM bei Monoamino- $\beta$ -CD) auf der Goldoberfläche immobilisiert. Die nach der Immobilisierung erzeugten RU und die daraus resultierende Teilchendichte sowie der Raumbedarf pro Teilchen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Belegung und Teilchendichte der immobilisierten Liganden.

| Ligand                         | Molekulargewicht (g/mol) | Resonanz-einheit (RU) | Teilchendichte (1/nm <sup>2</sup> ) | Raumbedarf pro Teilchen (nm <sup>2</sup> ) |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--|
| Mono-Amino- $\beta$ -CD        | 1134.00                  | 1000                  | 0.531                               | 1.883                                      |
| Mono-Cys- $\beta$ -CD <b>7</b> | 1194.12                  | 400                   | 0.202                               | 4.957                                      |
| Mono-Amino-HTG <b>5b</b>       | 1850.77                  | 1900                  | 0.618                               | 1.618                                      |

Die Anzahl an Carboxylgruppen der Dextranmatrix auf dem Goldchip ist mit 3 nmol/cm<sup>2</sup> (18.06 COOH-Gruppen pro nm<sup>2</sup>) ausreichend, da der Raumbedarf von  $\beta$ -CD-Derivaten 1 nm<sup>2</sup> beträgt<sup>[224]</sup>. Zwischen den untersuchten CD-Derivaten zeigte sich ein erheblicher Unterschied im Immobilisierungslevel. Während Monoamino- $\beta$ -CD nur einen Immobilisierungslevel von 1000 RU erzeugte, konnte mit **5b** ein Level von 1900 RU erreicht werden. Mit **7** konnte nur ein Immobilisierungslevel von 400 RU gebildet werden. Die daraus resultierenden Teilchendichten liegen zwischen 0.2 Teilchen/nm<sup>2</sup> für **7** und 0.6 Teilchen/nm<sup>2</sup> für **5b**. Für die Ermittlung der Dissoziationskonstanten der modifizierten Proteine stellt das CD-Derivat **5b** das geeignetste Derivat dar, da es die größte Teilchendichte nach der Immobilisierung aufweist. **5b** ist auch das CD-Derivat welches an die Hyaluronsäure gebunden wurde, wodurch hiermit die Bindungseigenschaften der adamantyierten Proteine als Targetliganden mit dem CD-Hyaluronsäure-Derivat für den Wirkstofftransport ermittelt werden können. Die Immobilisierung von **5b** ist in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

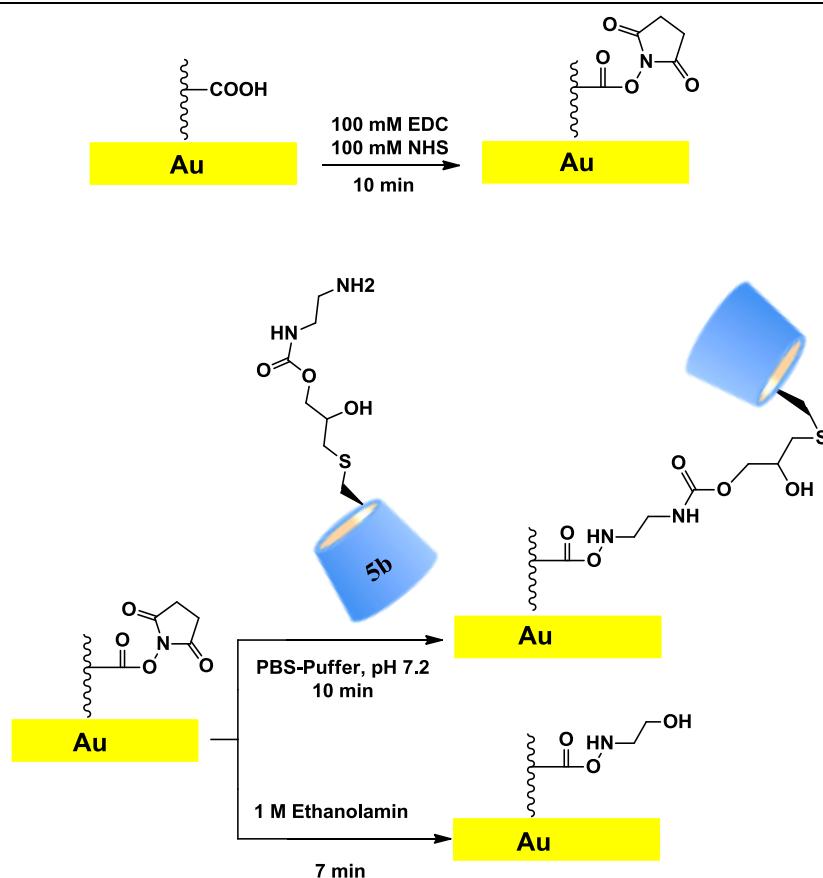


Abbildung 33: Immobilisierung des CD-Derivates **5b** auf der Goldoberfläche<sup>[222]</sup>.

In einem ersten Schritt wurde die Carboxylgruppe der Carboxymethyldextranmatrix auf der Goldoberfläche mit *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. In einer der beiden Messzellen des SPR-Geräts wurde dann eine Lösung von 7 mM **5b** in PBS-Puffer injiziert, um eine CD-Monoschicht auf der Goldoberfläche zu erzeugen. Alle nicht reagierten aktivierte Carbonsäuregruppen wurden in einem letzten Schritt mit 1 M Ethanolamin deaktiviert. Die Sensorgramme der CD-Immobilisierungen sind im Anhang zu finden. Da die Aminogruppe des CD-Derivates **5b** sich auf der primären Seite des CD befindet, ist die weitere sekundäre Seite des CD von der Goldoberfläche abgewandt und somit gut verfügbar für die Komplexierung mit Adamantan-Gruppen der Proteine. Die schematische Darstellung der immobilisierten CD-Monoschicht ist in Abbildung 34 gezeigt.

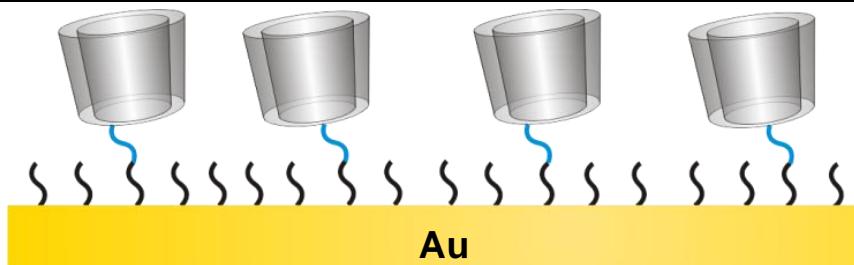


Abbildung 34: Schematische Darstellung der immobilisierten CD-Monoschicht.

Um die Bindungsfähigkeit der CD-Monoschicht zu analysieren, wurde in einem ersten Test 1-Aminoadamantan in aufsteigender Konzentration von 1.0-5.0 mM injiziert. Eine Überlagerung der so erhaltenen Sensorgramme zeigt Abbildung 35a.

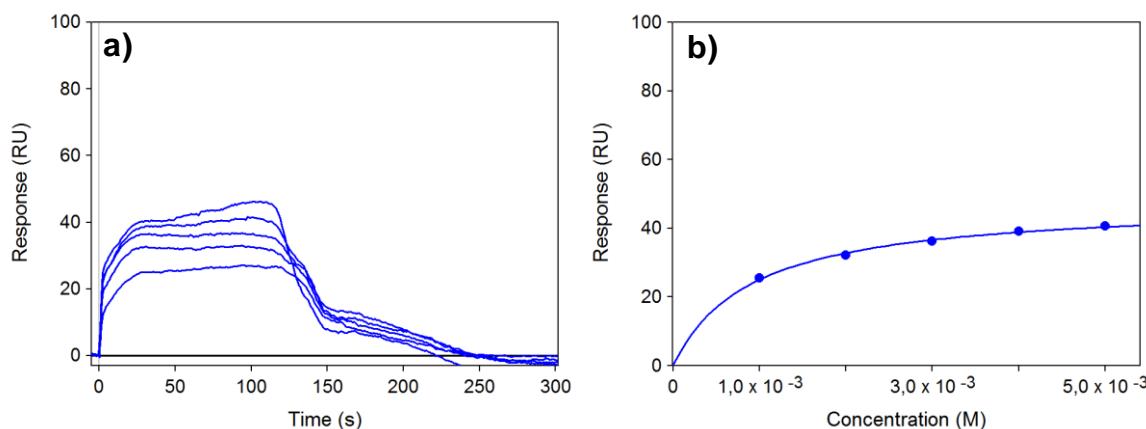
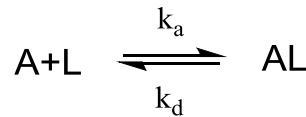


Abbildung 35: a) Sensorgrammüberlagerung und b) Langmuir-Isotherme von 1-Aminoadamantan bei den Konzentrationen 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 und 5.0 mM.

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit aufsteigender Konzentration des 1-Aminoadamantans auch das Resonanzsignal ansteigt. Ab Beginn der Dissoziationsphase (ab 120 s) sinkt die Resonanz auf den Nullwert ab. Dies verdeutlicht eine komplette Dissoziation des Adamantan-Derivats durch Spülung mit PBS-Puffer. Aus diesem Grund kann die  $K_D$ -Wert Bestimmung über sogenannte „single-cycle kinetics“ erfolgen. Hier werden die einzelnen Konzentrationen der Probe direkt hintereinander injiziert, ohne zwischendurch eine Regeneration der CD-Oberfläche durchzuführen.

Die Bildung einer 1:1-Interaktion zwischen Analyt (A) und Ligand (L) kann über die kinetische Konstante der Assoziation  $k_a$  und über die kinetische Konstante der Dissoziation  $k_d$  beschrieben werden.



mit  $k_a$  = kinetische Konstante der Assoziation [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]

$k_d$  = kinetische Konstante der Dissoziation [ $\text{s}^{-1}$ ]

Die Geschwindigkeitsgleichungen lassen sich wie folgt berechnen:

Assoziation  $\frac{d[\text{AL}]}{dt} = k_a \cdot [\text{A}] \cdot [\text{L}]$

Dissoziation  $\frac{-d[\text{AL}]}{dt} = k_d \cdot [\text{AL}]$

Die Netto-Geschwindigkeitsgleichung beträgt somit:

$$\frac{d[\text{AL}]}{dt} = k_a \cdot [\text{A}] \cdot [\text{L}] - k_d \cdot [\text{AL}]$$

Liegen Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht vor, so folgt:

$$k_a \cdot [\text{A}] \cdot [\text{L}] = k_d \cdot [\text{AL}]$$

Die Gleichgewichtskonstanten bilden sich somit aus:

Dissoziation  $K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[\text{A}] \cdot [\text{L}]}{[\text{AL}]}$  (3)

Assoziation  $K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[\text{AL}]}{[\text{A}] \cdot [\text{L}]}$  (4)

Folglich lässt sich aus dem Quotient der kinetischen Konstante der Dissoziation und der kinetischen Konstante der Assoziation über Formel (3) die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante bestimmen.

Im Falle des 1-Aminoadamantans konnte mittels SPR eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $640.0 \pm 20.0 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Dieser Wert liegt um einen Faktor 8 höher als der Wert, welcher über ITC gemessen wurde (siehe Anhang). Aufgrund der unterschiedlichen Messtechniken und der notwendigen zusätzlichen Aminogruppe des immobilisierten **HTG**-Derivates bei

der SPR, ist der etwas schlechter gebildete Komplex bei der SPR zu erklären<sup>[225]</sup>. Im Gegensatz dazu konnte nach der Immobilisierung des Monoamino- $\beta$ -CD-Derivates allerdings keine Dissoziationskonstante mit 1-Aminoadamantan bestimmt werden. Trotz aufsteigender Adamantan-Konzentration kam es zu keiner Steigerung im Resonanzsignal. Aus diesem Grund ist für die Analyse der  $K_D$ -Werte der adamantylierten Proteine das immobilisierte **5b** das CD-Derivat der Wahl.

### 6.2.2 Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_D$ der adamantylierten Proteine

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde von den adamantylierten Tf-Derivaten **33**, **34** und **35** und vom adamantylierten Lysozym-Derivat **29** bestimmt. Hier sollte durch die unterschiedliche Anzahl an Adamantangruppen an der Proteinoberfläche (**33**, **34**, **29**) bzw. durch die Modifizierung mit 1-Aminomethyladamantan (**35**) ein signifikanter Unterschied zu beobachten sein.

In einem ersten Versuch wurde zur Bestimmung des  $K_D$  des adamantylierten Tf **33** die Messung auch über „single-cycle kinetics“ durchgeführt. Das dazugehörige Sensorgramm ist in Abbildung 36 dargestellt.

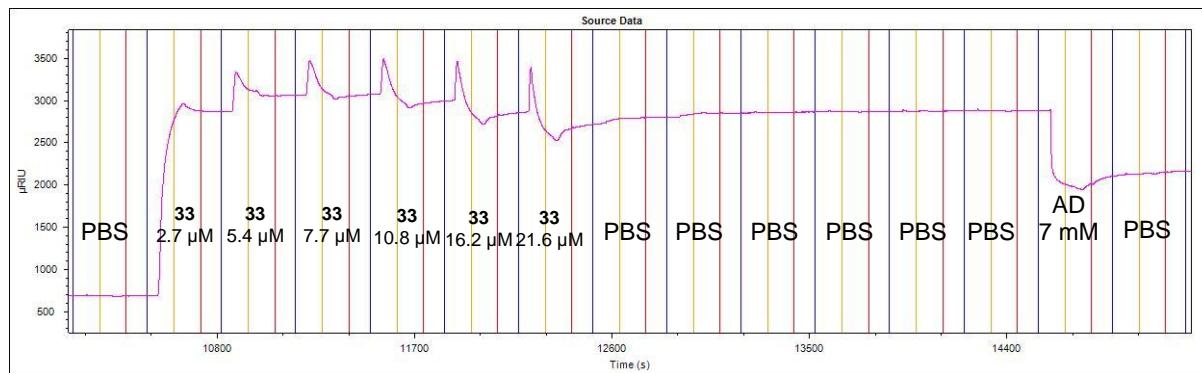


Abbildung 36: Sensorgramm von Tf **33** über „single-cycle kinetics“ bei Konzentrationen von 2.7, 5.4, 7.7, 10.8, 16.2 und 21.6 mM

In dieser ersten Analyse wurde das Mono-Cys- $\beta$ -CD-Derivat **7** als Monoschicht verwendet. Das Tf-Derivat **33** zeigt eine starke Affinität zum Cyclodextrin-Liganden, wodurch ein starker Anstieg im Resonanzsignal bereits nach der

ersten Injektion ( $2.7 \mu\text{M}$ ) zu erkennen war. Zwischen der ersten Injektion und den höheren Konzentrationen ist allerdings kein Anstieg des Resonanzsignals mehr zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die CD-Monoschicht schon unter einer Protein-Konzentration von  $2.7 \mu\text{M}$  gesättigt ist. Das hohe Resonanzsignal verringert sich nicht nach einer vierminütigen Dissoziationsphase. Selbst nach weiteren sechs Injektionen mit PBS-Puffer dissoziiert **33** nicht mehr aus der CD-Monoschicht heraus. Erst durch Injektion einer  $7.0 \text{ mM}$  Lösung von 1-Aminoadamantan in PBS-Puffer konnte ein Teil des komplexierten **33** aus der CD-Monoschicht dissoziieren. 1-Aminoadamantan verdrängt durch die höhere Konzentration das adamantyierte Protein aus der Kavität der CDs. In den nun folgenden Experimenten wurde zur Regeneration der CD-Monoschicht 1-Aminoadamantan dreimal mit einer Konzentration von  $25 \text{ mM}$  in PBS-Puffer injiziert. Anschließend wurde durch dreimalige Injektion von PBS-Puffer das Resonanz-Signal stabilisiert. Dabei wurde ausschließlich eine CD-Monoschicht aus **5b** verwendet (siehe Abbildung 37).

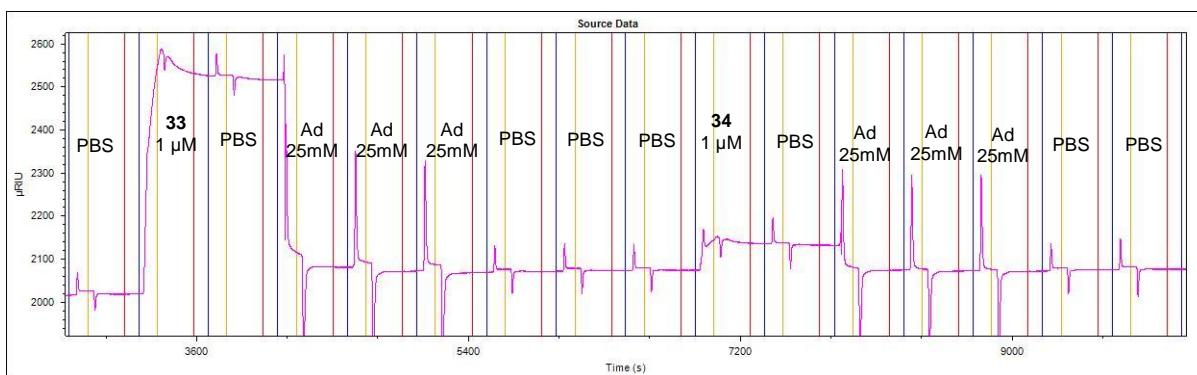


Abbildung 37: Sensorgramm der Regeneration der immobilisierten CD-Oberfläche mittels  $25 \text{ mM}$  1-Aminoadamantan.

Bereits nach einer Injektion mit  $25 \text{ mM}$  1-Aminoadamantan ist eine fast vollständige Regeneration der CD-Oberfläche zu erkennen. Um allerdings eine vollständige Regeneration zu gewährleisten wurde 1-Aminoadamantan 3-Mal injiziert.

Da die adamantyierten Proteine im Gegensatz zu freiem 1-Aminoadamantan nicht selbstständig aus der Kavität der CDs dissoziieren können, kann zur  $K_D$ -Wert Bestimmung der Proteine nicht auf „single-cycle kinetics“ zurückgegriffen werden. Wie oben beschrieben muss zwischen den einzelnen

Injektionen des adamantyierten Proteins in aufsteigender Konzentration eine vollständige Regenerierung der CD-Monoschicht erfolgen („multi-cycle kinetics“). Eine schematische Darstellung eines komplexierten Tf-Derivats auf der CD-Oberfläche ist in Abbildung 38 gezeigt.

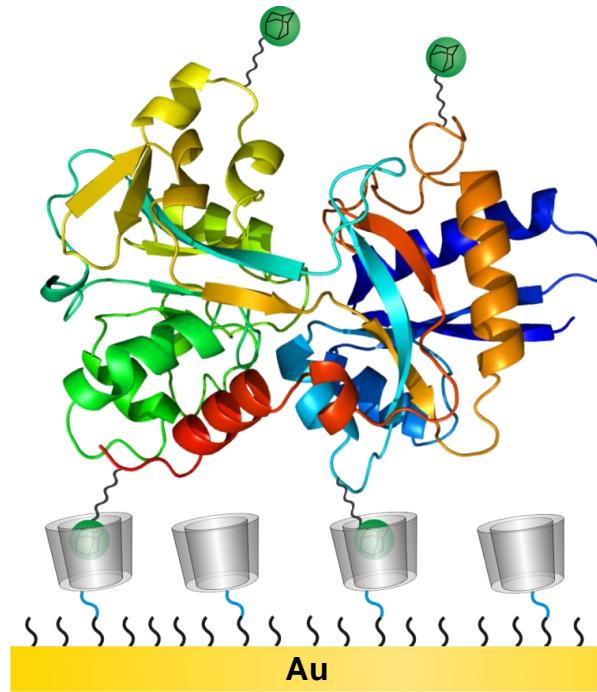


Abbildung 38: Schematische Darstellung eines komplexierten adamantyierten Tf-Derivats auf der CD-Monoschicht auf der Goldoberfläche.

Wie bereits in Kapitel 5.3.3 besprochen befinden sich die Adamantangruppen über die komplette Proteinoberfläche verteilt. Aus diesem Grund können nach Komplexierung von mehreren Adamantangruppen eines Proteins in der CD-Monoschicht, sich noch weitere freie Adamantangruppen auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins befinden.

Um die Abhängigkeit der Wechselwirkungen der eingeführten Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche zu der CD-Monoschicht zu zeigen, wurde zuerst ein Vergleich zu den unmodifizierten nativen Proteinen gezogen (siehe Anhang). Im Vergleich zu modifizierten Transferrin **33** und dem modifizierten Lysozym **29** zeige die nativen Proteine nahezu keine Bindung zur CD-Monoschicht, was sich im Resonanzsignal < 10 RU zeigt.

Die sehr schwachen Signale können hier nur durch die Komplexierung von Phenylgruppen der Phenylalanin-Seitenketten stammen<sup>[226]</sup>. Das signifikant

höhere Resonanzsignal der adamantyierten Proteine kann somit eindeutig auf die Bildung der Wirt-Gast-Komplexe zwischen CD-Monoschicht und den Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche zurückgeführt werden.

Mittels „multi-cycle kinetics“ konnten nun die Resonanzsignale der vier modifizierten Proteine, jeweils in aufsteigender Proteinkonzentration, gemessen werden. Die Überlagerung der Sensorgramme von **34** ist in Abbildung 39 zu sehen.

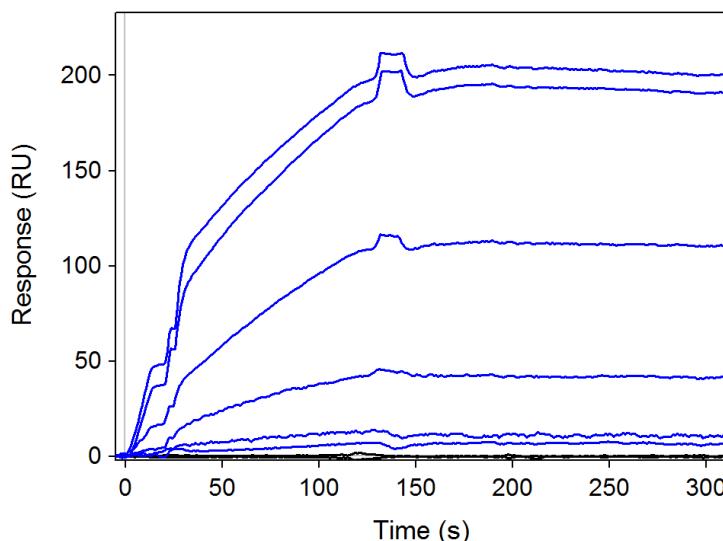


Abbildung 39: Sensorgrammüberlagerung von **34** bei den Konzentrationen 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 und 1.5  $\mu\text{M}$

Mit aufsteigender Proteinkonzentration ist ein Anstieg des Resonanzsignals bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen. Ab dieser Konzentration tritt ein Sättigungseffekt der CD-Monoschicht auf, wodurch es zu keiner weiteren Erhöhung der Resonanz kommt. Eine sehr große Assoziationsgeschwindigkeit ist hier vor allem bei den höheren Konzentrationen bemerkbar. Die Dissoziation verläuft hingegen bei allen Konzentrationen sehr langsam ab. Die Sensorgramme der anderen drei adamantyierten Proteine sind im Anhang zu finden.

Aus den kinetischen Konstanten ( $k_{\text{on}}, k_{\text{off}}$ ) der Sensorgramme der Proteine lässt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  aus Formel (3) ermitteln. Sowohl die kinetischen Konstanten als auch  $K_D$  der verwendeten

adamantyierten Proteine und von 1-Aminoadamantan sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Kinetische Konstanten ( $k_{on}, k_{off}$ ), die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  und die freie Energie  $\Delta G$  der Komplexe der adamantyierten Proteine / 1-Aminoadamantan mit dem CD-Liganden **5b**.

| Analyt                         | n   | $K_a$<br>(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $K_d$<br>(s <sup>-1</sup> )   | $K_D$<br>(μM)     | $\Delta G$<br>(kJ/mol) |
|--------------------------------|-----|---|-------------------------------|-------------------|------------------------|
| 1-Amino-adamantan<br><b>33</b> | 1   | $47.0 \pm 1.0$                              | $0.03 \pm 0.0003$             | $640.0 \pm 20.0$  | -17.9                  |
| Transferrin<br><b>34</b>       | 6   | $1.92 \pm 0.04 \times 10^4$                 | $1.38 \pm 0.7 \times 10^{-3}$ | $0.072 \pm 0.004$ | -39.9                  |
| Lysozym<br><b>29</b>           | 1-2 | $9.0 \pm 0.2 \times 10^3$                   | $6.8 \pm 0.4 \times 10^{-4}$  | $0.072 \pm 0.005$ | -39.9                  |

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von **33** ist ca. doppelt so groß als  $k_a$  von **34**. Dagegen ist die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von **34** nur doppelt so groß als  $k_d$  von **33**. Aus diesem Grund bilden sowohl **33** als auch **34** Komplexe mit einer identischen Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von  $K_D = 72$  nM aus. Dies verdeutlicht, dass die Komplexierung zur CD-Monoschicht von beiden Transferrin-Derivaten von der Proteinseite erfolgt, auf dem sich die gleiche Anzahl an Adamantangruppen befindet. Die zusätzlichen Adamantangruppen des **33** interagieren nicht mit der CD-Monoschicht und sind nach der Komplexierung noch frei zugänglich. Das adamantyierte Lysozym **29** zeigt eine geringere Assoziationsgeschwindigkeitskonstante und bildet somit weniger stabile Komplexe mit einem  $K_D = 2.90$  μM aus. Da **29** nur 1-2 Adamantangruppen enthält, kann nur eine schlechtere Komplexbildung zur CD-Schicht erfolgen. Dies entspricht auch der Tatsache, dass je mehr Adamantangruppen sich an der Proteinoberfläche befinden, desto stabilere Komplexe zur CD-Monoschicht werden gebildet.

Für das Tf-Derivat **35** konnte hingegen kein  $K_D$ -Wert bestimmt werden. **35** zeigte bei Konzentrationen bis 1.5 μM nur eine äußerst schwache Affinität (<10 RU) zur CD-Monoschicht. Da **35** im PBS-Puffer eine sehr schlechte Löslichkeit

zeigte, lag hier eine Denaturierung des Proteins nach der Modifizierung zugrunde. Folglich konnte keine Bindung der CD-Monoschicht ausgebildet werden. In nachfolgender Tabelle 9 sind nun die maximalen Resonanzsignale und die daraus resultierenden Teilchendichten der komplexierten Analyten gezeigt.

Tabelle 9: Belegung und Teilchendichte der adamantyierten Proteine auf **5b** Mono-Schicht.

| Analyt                  | Molekular-gewicht<br>(g/mol) | Protein-Oberfläche<br>(nm <sup>2</sup> ) | Resonanz-einheit<br>(RU) | Teilchendichte<br>(1/nm <sup>2</sup> ) | Raumbedarf<br>pro Teilchen<br>(nm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------|------------------------------|--|--------------------------|--|--|
| <b>1-Aminoadamantan</b> | 151.25                       | ---                                      | 54                       | 0.215                                  | 4.651  |
| <b>Transferrin 34</b>   | 79513                        | 49.30                                    | 200                      | 0.0015                                 | 660.4  |
| <b>Lysozym 29</b>       | 15011                        | 11.70                                    | 140                      | 0.0056                                 | 178.0  |

Das maximale Resonanzsignal von **34** steigt mit aufsteigender Konzentration bis zu einem Wert von 200 RU. Dies entspricht einem Raumbedarf von 660 nm<sup>2</sup> pro Protein. Die errechnete Oberfläche des simulierten **34** beträgt ca. 50 nm<sup>2</sup> (siehe Anhang). Somit ist nur eine teilweise Belegung der CD-Oberfläche zu beobachten. Für das adamantyierte Lysozym-Derivat **29** ist ebenfalls nur eine partielle Belegung zu erkennen.

In einem weiteren Vergleichsexperiment wurde natives Tf (1 µM) auch kovalent über dessen Lysin-Seitenketten an die Carboxymethyldextranmatrix des Sensorchips immobilisiert (Sensorgramm im Spektrenanhang). Dabei konnte ein Immobilisierungslevel des nativen Transferrins von 900 RU erzeugt werden, was äquivalent zu einem Raumbedarf von 145 nm<sup>2</sup> ist. Eine kovalente Immobilisierung des Transferrins erzeugt zwar eine dichtere Belegung auf dem Goldchip, allerdings können mit dieser Methode nicht mehrere Proteine auf einem Goldchip untersucht werden.

Aufgrund der stabilen Bindung der adamantyierten Proteine zum CD-Liganden wurden nun weitere Bindungsexperimente auf den bereits gebundenen Proteinen durchgeführt.

### 6.2.3 Weitere Bindungsstudien auf den gebundenen adamantylierten Proteinen

Um die Aktivität der adamantylierten Tf-Derivate **33** und **34** experimentell zu bestimmen, wurde der Tf D-9 Antikörper zu den adamantylierten Derivaten sowohl vor als auch nach der Inkubation auf die CD-Monoschicht gegeben. Eine schematische Darstellung der Antikörper-Transferrin-Bindung ist in Abbildung 40 zu sehen.

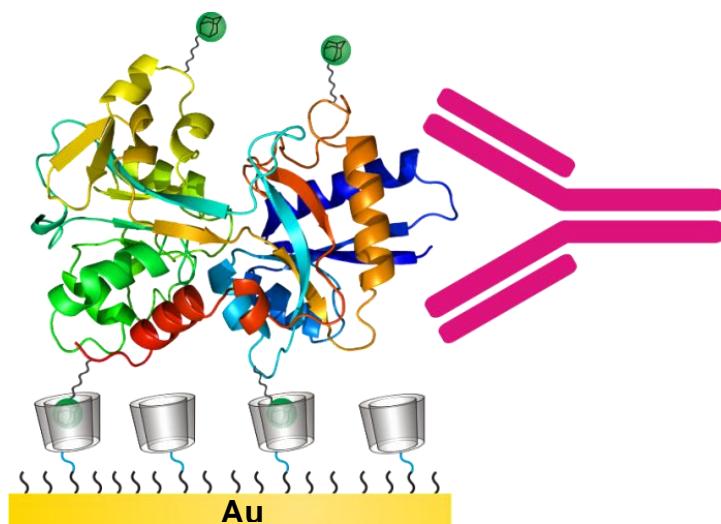


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Antikörper-Transferrin-Bindung auf der CD-Monoschicht.

In ersten Experimenten wurde der Tf D-9 Antikörper zu den Proteinen gegeben, nachdem diese bereits auf der CD-Monoschicht gebunden waren. Die dazugehörigen Sensorgramme sind im Spektrenanhang zu finden. Zum gebundenen **33** ( $1 \mu\text{M}$ ) zeigte der Tf D-9 Antikörper ab einer Konzentration von  $0.25 \mu\text{M}$  eine signifikante Affinität. Dies wurde durch den Anstieg des Resonanzsignals ab dieser Konzentration verdeutlicht. Zum immobilisierten **34** ( $1 \mu\text{M}$ ) ist nur eine moderate Affinität bis zu einer Konzentration von  $1.25 \mu\text{M}$  zu erkennen. Grund hierfür kann die geringere Anzahl an Adamantangruppen am **34** sein. Da die zusätzlichen Adamantangruppen des **33** sich auf der gegenüberliegenden Seite der Bindungsstelle des Transferrins befinden (siehe Kapitel 5.3.3), wird somit diese Seite für die Immobilisierung bevorzugt. Aufgrund des Fehlens dieser Adamantangruppen am **34**, kann die

Immobilisierung eher auch auf der Seite des aktiven Zentrums des Transferrins erfolgen. Dadurch wurde die Bindung zum Antikörper erschwert.

In einem zweiten Experiment wurde der Tf D-9 Antikörper ( $1.25 \mu\text{M}$ ) jeweils mit den beiden modifizierten Tf-Derivaten ( $1\mu\text{M}$ ) vorinkubiert, um anschließend den Komplex auf die CD-Monoschicht zu injizieren. Die dazugehörigen Sensorgramme sind in Abbildung 41 a) für den Komplex mit **33** und b) für den Komplex mit **34** zu finden.

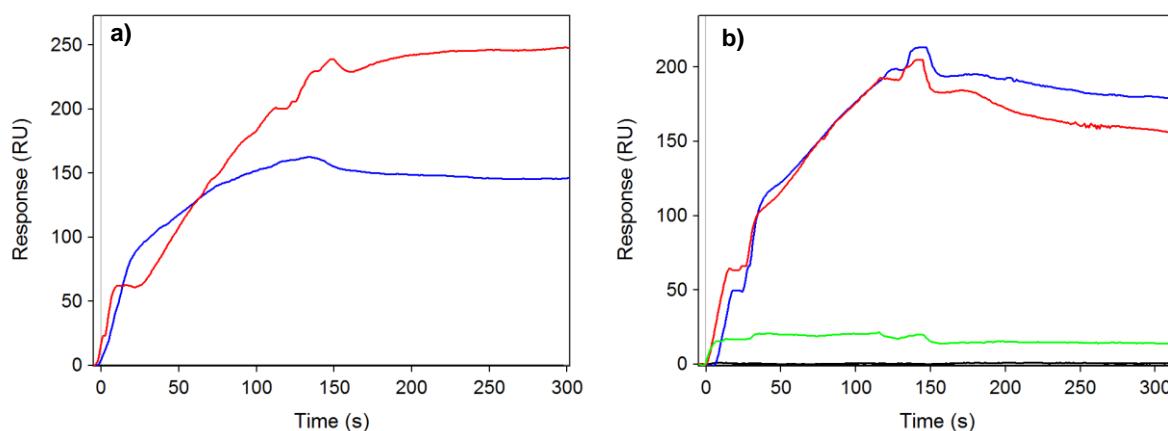


Abbildung 41: a) Sensorgramme von Tf **33** ( $1 \mu\text{M}$ , blau) und **33** vorinkubiert mit Tf D-9 Antikörper ( $1.25 \mu\text{M}$ , rot), b) Sensorgramme von Tf **34** ( $1 \mu\text{M}$ , blau) und **34** vorinkubiert mit Tf D-9 Antikörper ( $1.25 \mu\text{M}$ , rot) im Vergleich zum freien Tf D-9 Antikörper ( $1.25 \mu\text{M}$ , grün).

Der präinkubierte Komplex aus **33** und Tf D-9 Antikörper (rote Linie) erzeugte ein deutlich höheres Resonanzsignal als **33** alleine (blaue Linie). Dies verdeutlicht, dass auch nach der Komplexbildung mit dem Antikörper genügend Adamantangruppen für die Immobilisierung auf der CD-Oberfläche zur Verfügung stehen. Der Komplex zwischen **34** mit dem Tf D-9 Antikörper zeigt hingegen ein anderes Ergebnis. Hier ist eine leichte Erniedrigung des Resonanzsignals (rote Linie) im Vergleich zu **34** alleine (blaue Linie) zu erkennen. Des Weiteren ist bei der Injektion von Tf D-9 Antikörper ohne Zugabe von adamantyiertem Tf (grüne Linie) nur eine sehr schwache Affinität zur CD-Monoschicht (15 RU) erkennbar. Die Verringerung der Resonanz aus präinkubiertem **34** und dem Antikörper kann auf eine Affinität zwischen dem modifiziertem Transferrin und dem Antikörper hindeuten. Allerdings führt hier die Komplexierung zu einer Verschlechterung der Affinität des Proteins zur CD-

---

Monoschicht, im Gegensatz zum Komplex mit **33**. Aufgrund der geringeren Anzahl an Adamantangruppen am **34**, stehen nach der Bindung zum Antikörper weniger Adamantangruppen zur Bindung mit der CD-Oberfläche zur Verfügung.

In einem Vergleich wurde auch die Zugabe von 1 µM des Tf D-9 Antikörpers zum immobilisierten nativen Tf untersucht. Allerdings konnte keine Erhöhung des Resonanzsignals dabei festgestellt werden. Eine Bindung des Tf D-9 Antikörper zum kovalent gebundenen nativen Tf konnte somit ausgeschlossen werden. Aufgrund der chemischen Immobilisierung des nativen Tf könnte es zu einer Konformationsänderung gekommen sein. Des Weiteren könnte durch die kovalente Bindung über die Lysin-Seitenketten das aktive Zentrum des Transferrins nun schlechter für den Antikörper zu erreichen sein.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte nach Immobilisierung der adamantylierten Proteine, das Vorhandensein von weiterhin zugänglichen Adamantangruppen an den Proteinen untersucht werden. Dies wurde durch Zugabe des CD-HA-Polymers **10b** zu den gebundenen Proteinen realisiert. Eine schematische Darstellung einer weiteren Komplexbildung zwischen dem CD-HA-Polymer **10b** mit den auf der CD-Monoschicht immobilisierten adamantylierten Proteinen zeigt Abbildung 42.

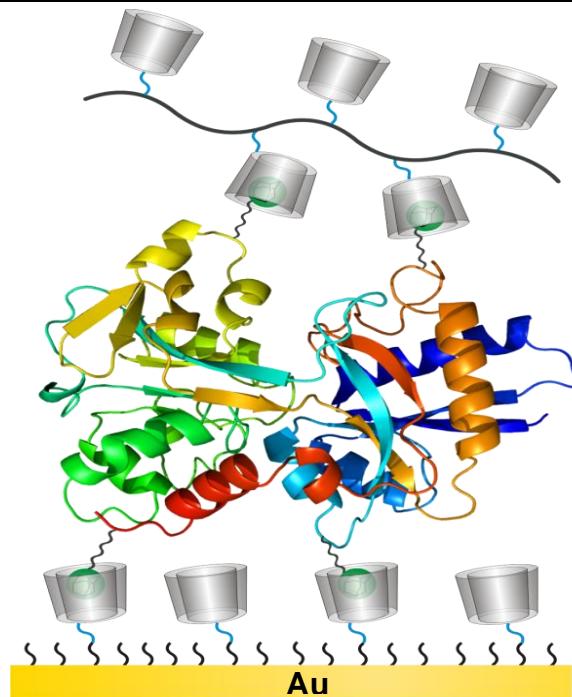


Abbildung 42: Schematische Darstellung einer weiteren Komplexierung der freien Adamantangruppen eines Transferrin-Derivates mittels CD-Hyaluronsäure-Polymer **10b**

In einem ersten Kontrollexperiment wurde das CD-HA-Polymer **10b** (6.2-25  $\mu\text{M}$ ) direkt auf die CD-Monoschicht injiziert, ohne vorher ein adamantyliertes Protein zu immobilisieren (Sensorgramm siehe Spektrenanhang). Nur eine sehr schwache Erhöhung des Resonanzsignals ist dabei zu beobachten. Die leichte Erhöhung ist auf andere nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen der CD-Monoschicht und dem CD-HA-Polymer wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen<sup>[227]</sup>. Ein deutlicher Anstieg des Resonanzsignals ist bei der Injektion des Polymers **10b** (1.5-100  $\mu\text{M}$ ) auf das immobilisierte Tf-Derivat **33** zu erkennen (siehe Abbildung 43). Durch die Immobilisierung des **33** ist bereits nach der ersten Injektion des CD-Polymers **10b** bei einer Konzentration von 1.5  $\mu\text{M}$  eine Erhöhung der Resonanz zu beobachten. Der Anstieg des Signals ist bis zu 100  $\mu\text{M}$  des CD-Polymers weiterhin zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass nach der Immobilisierung des **33** weiterhin erreichbare Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche verfügbar sind. Diese können durch das CD-Polymer komplexiert werden.

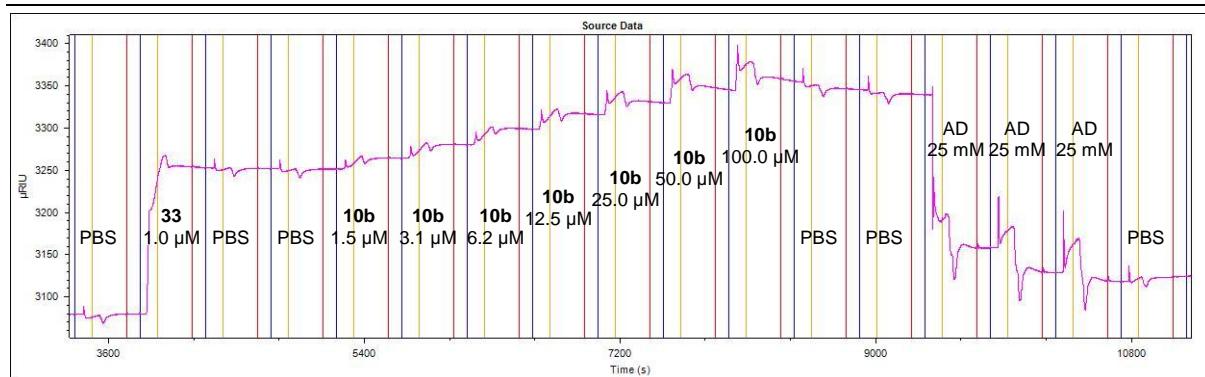


Abbildung 43: Sensorgram des CD-Hyaluronsäure Polymer **10b**, injiziert in Konzentrationen von 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25.0, 50.0 und 100.0  $\mu\text{M}$  über gebundenes Transferrin **33** immobilisiert auf CD-Liganden **5b**.

Somit konnten die Ergebnisse aus Kapitel 5.3.3 bestätigt werden, dass die Adamantangruppen sich über die gesamte Proteinoberfläche verteilt befinden. Zum Transferrin-Derivat **34** und dem Lysozym-Derivat **29** können allerdings, aufgrund der geringen Anzahl an Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche, keine weitere Bindung zum CD-HA-Polymer **10b** festgestellt werden (siehe Anhang).

Neben der Bestimmung der  $K_D$ -Werte der adamantyierten Proteine über die SPR-Spektroskopie konnte ebenfalls eine Methode zur Regeneration von Proteinliganden auf der mit Cyclodextrinen immobilisierten Goldoberfläche etabliert werden. Durch Zugabe von 25 mM 1-Aminoadamantan konnten die adamantyierten Proteine von der CD-Oberfläche wieder abgelöst werden. Da die Aktivität der Proteine durch die Adamantangruppen nicht beeinflusst wurde, können somit mehrere Proteinliganden mit einem Goldchip analysiert werden.

## 7 Transport von steroidalen Wirkstoffen durch die Darmbarriere

### 7.1 Intestinaler Wirkstofftransport nach peroraler Applikation

Die perorale Verabreichung von Medikamenten gehört zur häufigsten Applikationsform, da diese nicht-invasive Methode kostengünstig und vom Patienten selbst durchführbar ist. Aufgrund der Resorptionsfähigkeit des Gastrointestinaltrakts von Nährstoffen und Wasser aus der Nahrung, können auch peroral aufgenommene pharmazeutische Wirkstoffe über den Magen-Darm-Trakt in das zirkuläre System des Blutkreislaufs gelangen<sup>[228]</sup>. Die Innenseite des Dünndarms besteht aus Enterozyten (epithiale Muskelzellen) und schleimbildende Becherzellen. Dadurch kommt es zu einer Ausbildung einer Mukusschicht auf der gesamten Innenseite des Darms<sup>[229]</sup>. Biopolymere wie Chitosan und Hyaluronsäure besitzen mukoadhäsive Eigenschaften, wodurch sie in der Lage sind, an die negativ-geladene Darmschleimhaut zu binden<sup>[230,231]</sup>. Aus diesem Grund stellen diese Biopolymere geeignete Wirkstofftransporter für den intestinalen Transport dar.

Ein Nachteil der oralen Applikationsform ist allerdings, dass nach Resorption des Wirkstoffes durch die Darmwand, dieser noch die Leber passieren muss, um in den großen Blutkreislauf zu gelangen. Durch diesen hepatischen First-Pass-Effekt kann sich die orale Bioverfügbarkeit stark verringern<sup>[232]</sup>.

Wirkstoffmoleküle werden vom *Biopharmaceutical Classification System* (BCS) in vier Klassen unterteilt (siehe Tabelle 10)<sup>[233,234]</sup>:

Tabelle 10: Wirkstoffeinteilung nach dem Biopharmaceutical Classification System<sup>[235]</sup>.

| Parameter                            | Klasse I       | Klasse II   | Klasse III | Klasse IV                  |
|--------------------------------------|----------------|-------------|------------|----------------------------|
| Wasserlöslichkeit                    | hoch           | gering      | hoch       | gering                     |
| Permeation durch lipophile Barrieren | hoch           | hoch        | gering     | gering                     |
| <i>in-vitro/in-vivo</i> Korrelation  | gut            | gut         | schlecht   | schlecht                   |
| Kontrolle der Absorptionsrate        | Darmentleerung | Löslichkeit | Permeation | Löslichkeit<br>+Permeation |

Wirkstoffe der Klasse I sind gut wasserlöslich und haben eine gute Permeabilität durch den Gastrointestinaltrakt. Diese Wirkstoffe haben somit eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit. Wirkstoffe der Klasse II sind schlecht wasserlöslich, diffundieren aber noch gut durch die Darmbarriere. Klasse III Wirkstoffe sind zwar gut wasserlöslich, haben allerdings eine schlechte Permeationsrate durch die Darmbarriere. Deren orale Bioverfügbarkeit ist somit von den Eigenschaften der Barriere abhängig. Klasse IV Wirkstoffe sind dagegen sowohl wasserunlöslich als auch schlecht permeabel durch den Gastrointestinaltrakt<sup>[233,234]</sup>.

Um z.B. die Bioverfügbarkeit des Isoflavons Tectorigenin (Klasse IV Wirkstoff) zu erhöhen, kann ein Selbst-Microemulgierendes Wirkstofftransportsystem verwendet werden. Dieses Transportsystem besteht aus einem Öl, einem Emulgator und einem Co-Emulgator und verteilt sich sehr gut im Gastrointestinaltrakt<sup>[236]</sup>. Auch die Steroidhormone weisen eine niedrige Bioverfügbarkeit aufgrund ihrer Hydrophobizität auf. Des Weiteren unterliegen sie einem starken intestinalen und hepatischen First-Pass-Effekt. Um die Wasserlöslichkeit und die intestinale Aufnahme von z.B. Estradiol (Klasse II Wirkstoff) zu erhöhen, wurden Nanopartikel mit Poly(lactid-co-glycolid) gebildet. Dadurch konnten für 2-7 Tage konstante Estradiolspiegel im Blut nachgewiesen werden<sup>[237]</sup>.

## 7.2 β-CD-Derivate für den intestinalen Wirkstofftransport

Hydrophile β-CD-Derivate und deren Wirkstoffkomplexe können nach oraler Gabe so gut wie nicht vom Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden. Nur sehr geringe Mengen können die Darmschleimhaut durchdringen. Aus diesem Grund zeigen diese β-CD-Derivate keinerlei toxischen Effekte bei kleinen bis moderaten Dosen. Hydrophobe β-CD-Derivate, wie z.B. Methyl-β-CD können hingegen von der Darmwand aufgenommen werden und ins zirkuläre System übergehen. Dies führt zu einer toxischen Wirkung der hydrophoben β-CD-Derivate<sup>[238]</sup>. Réti-Nagy et al.<sup>[239]</sup> zeigten 2015 erstmals, dass sowohl fluoreszenzmarkiertes Methyl-β-CD als auch fluoreszenzmarkiertes Paclitaxel sich nach Endozytose im gleichen intrazellulären Vesikel befinden.

Bei den Komplexen mit hydrophilen CD-Derivaten ist es nur dem freien Wirkstoff möglich, der im dynamischen Gleichgewicht mit dem CD-Komplex steht, durch die lipophile biologische Membran zu diffundieren<sup>[240]</sup>. Sowohl die Zusammensetzung der Wirkstoffformulierung als auch die physikochemische und physiologische Zusammensetzung der biologischen Barriere entscheiden darüber, ob durch die Komplexierung mit CD-Derivaten der Wirkstofftransport gesteigert oder erniedrigt wird. CD-Wirkstoff-Komplexe erhöhen den Wirkstofftransport durch wässrige diffusionskontrollierte Barrieren. Bei lipophilen, membrankontrollierten Barrieren wird der Wirkstofftransport durch CD-Derivate allerdings erschwert. Bei der Permeation durch eine biologische Barriere stellt die Diffusion des Wirkstoffs durch die wässrige Schicht an der Membranoberfläche in den meisten Fällen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Aus diesem Grund kann durch die Solubilisierung des hydrophoben Wirkstoffs mittels der CD-Derivate eine Verbesserung des Wirkstofftransports über biologische Barrieren erreicht werden<sup>[235]</sup>.

Da CD-Derivate die Wasserlöslichkeit von hydrophoben Wirkstoffen verbessern und auch die Stabilität des Wirkstoffes erhöhen, lässt sich durch den Einsatz von CD-Derivaten die orale Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen der Klassen II und IV steigern<sup>[241]</sup>. So wurde 2015 von *Beig et al.*<sup>[242]</sup> die Änderung in der Solubilisierung und in der Permeabilität des Klasse IV Wirkstoffes Amiodaron durch die Komplexierung mit HP-β-CD bzw. SBE-β-CD beschrieben. Durch das anionische SBE-β-CD konnte im Vergleich zu HP-β-CD eine 10-Fach höhere Löslichkeit des Amiodaron erzeugt werden. Mit steigender CD-Konzentration zeigt die Löslichkeitsisotherme des Amiodaron einen linearen Verlauf (A-Typ). Mit steigender Löslichkeit des Wirkstoffs durch die steigende CD-Konzentration, sinkt allerdings die intestinale Permeabilität des Wirkstoffs<sup>[243]</sup>. Aus diesem Grund ist die Permeabilität mithilfe des SBE-β-CD 10-Fach niedriger als mittels HP-β-CD. Als optimale CD-Konzentration wurde in diesem System 5 mM SBE-β-CD gewählt, da hierbei eine 2000-Fache höhere Löslichkeit des Amiodaron erzeugt wurde, gleichzeitig die Permeabilität noch über  $1 \cdot 10^{-4}$  cm/s in einem guten Bereich liegt.

### 7.3 Diskussion der Ergebnisse

Der intestinale Transport von steroidalen Wirkstoffen wurde sowohl mit dem **HTG**-Monomer als auch mit dem **HTG**-Hyaluronsäure-Polymer **10b**, wahlweise mit oder ohne adamantyliertem Tf **33** als Targetliganden, durchgeführt. Die eingesetzten Wirkstofftransporter an der Zellbarriere sind in Abbildung 44 schematisch dargestellt.

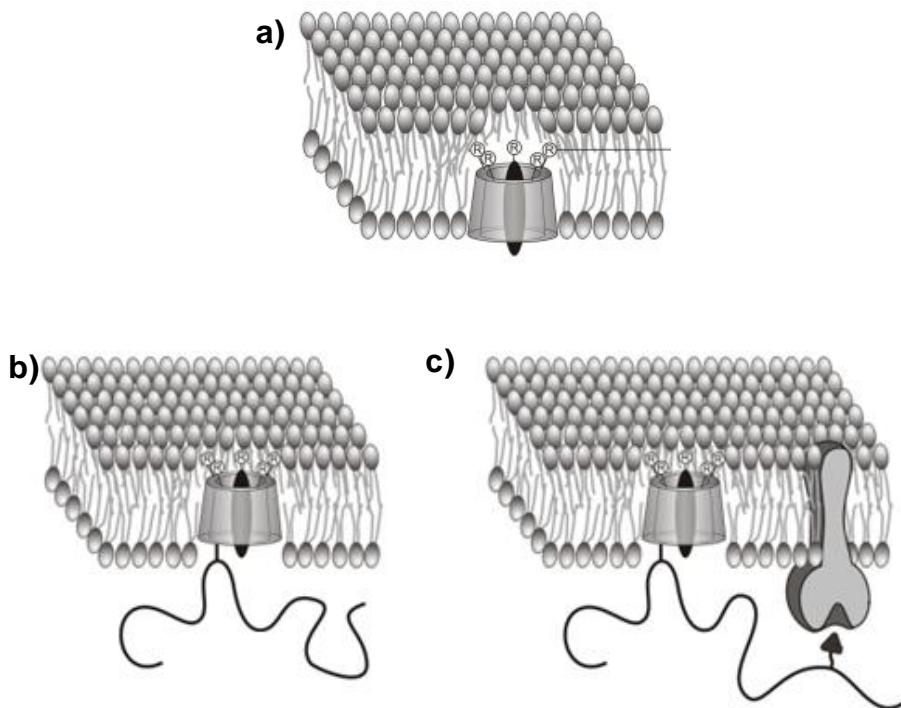


Abbildung 44: Schematische Darstellung des Wirkstofftransporters aus

- a) **HTG**-Monomer
- b) **HTG**-Hyaluronsäure-Polymer ohne zellspezifischen Ligand und
- c) **HTG**-HA-Polymer mit zellspezifischem Liganden an einer Zellbarriere

In Verbindung **10b** ist das Mono-Amino-**HTG** **5b** kovalent an der Hyaluronsäure als bioabbaubares Polymer gebunden. Dadurch soll eine bessere Wasserlöslichkeit des **HTG** ermöglicht werden. Zusätzlich wird eine längere Verweilzeit im Organismus begünstigt und es tritt keine unkontrollierte Anlagerung in den Zellen ein<sup>[107]</sup>. Durch das Anbringen von Targetliganden (Tf) an die CD-Polymere lässt sich durch spezifische Rezeptor-Ligand Wechselwirkung ein zellspezifischer Transport ermöglichen. Somit kann die zu verabreichte Dosis verringert werden<sup>[7]</sup>. Um geeignete Steroid-Derivate für den intestinalen Transport zu ermitteln, wurden die Stabilitätskonstanten der

steroidalen Wirkstoffe mit dem **HTG**-Derivat aus Kapitel 3.4 und die täglich benötigte Dosis der einzelnen Steroide betrachtet (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Stabilitätskonstanten mit HTG ( $M^{-1}$ ) und tägliche perorale Dosis (mg) der Steroid-Wirkstoffe.

| Steroidaler Wirkstoff | Stabilitätskonstanten mit HTG ( $M^{-1}$ ) | Tägliche perorale Dosis (mg) |
|-----------------------|--|------------------------------|
| Testosteron           | ---  | 40-160 [244]                 |
| $\beta$ -Estradiol    | 2337700                                    | 1-2 [245]                    |
| Progesteron           | ---  | 100 [245]                    |
| Hydrocortison         | 390  | 5-20 [245]                   |
| Prednison             | 2900                                       | 1-50 [245]                   |
| Dexamethason          | 4500                                       | 0.5-8 [245]                  |
| Finasterid            | 11200                                      | 1-5 [246]                    |

Die höchste Stabilitätskonstante und die geringste benötigte tägliche Dosis zeigt in der Gruppe der Sexualhormone  $\beta$ -Estradiol (E) und unter den Glucocorticoiden Dexamethason (D)<sup>[245]</sup>. Durch die Wahl dieser Wirkstoffe kann somit die benötigte Menge an CD-HA-Polymer minimiert werden.

Um die Komplexbildungsfähigkeit des **10b** während der Transportstudien zu validieren, wurden Löslichkeitsisothermen von  $\beta$ -Estradiol und Dexamethason in DMEM-Zellmedium ohne fetales Kälberserum (FKS) sowohl mit dem **HTG**-Monomer als auch mit dem HTG-HA-Polymer **10b** aufgenommen. Die Löslichkeitsisothermen der beiden Steroid-Wirkstoffe mit dem Polymer **10b** sind in Abbildung 45 zu sehen (Löslichkeitsisothermen mit dem **HTG**-Monomer befinden sich im Anhang). Durch Bindung des **HTG** an die Hyaluronsäure (**10b**) konnte der molekulare Füllgrad von Estradiol von 61mol% auf 71mol% gesteigert werden. Dies spricht für eine bessere Komplexierung aufgrund der Anbindung an das wasserlösliche Polymer. Dieses positive Ergebnis konnte bei der Komplexbildung mit Dexamethason nicht wiederholt werden. Die Löslichkeitsisotherme von Dexamethason mit **10b** zeigt nur einen molekularen Füllgrad von 26mol% im Gegensatz zu 41mol% bei der Komplexierung mit **HTG**-Monomer. **10b** sollte also besser für den Transport von Estradiol geeignet sein als für den Transport von Dexamethason.

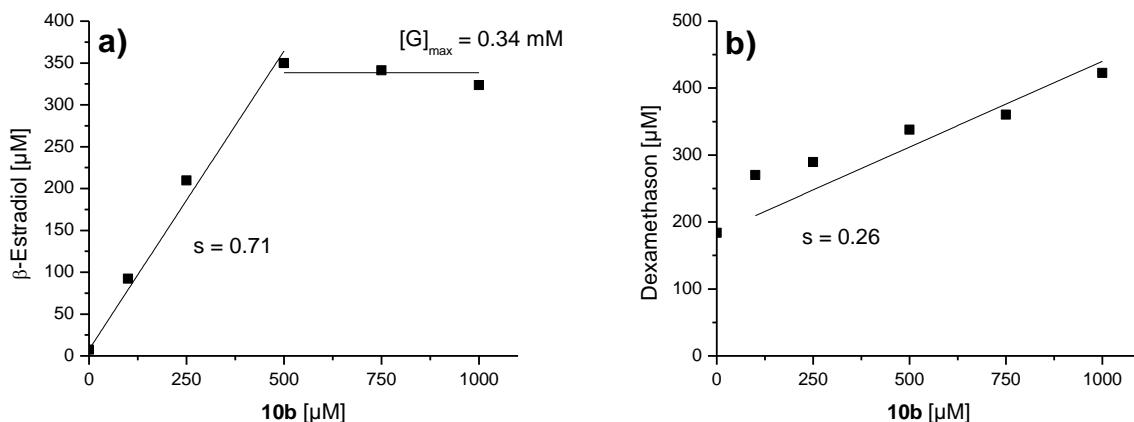


Abbildung 45: Löslichkeitsisothermen von **a)**  $\beta$ -Estradiol und **b)** Dexamethason mit **10b** in DMEM Zellkulturmedium (ohne FKS).

Ausgehend von den Ergebnissen der Löslichkeitsisothermen der Steroidwirkstoffe mit **HTG** und **10b** in serumsfreiem DMEM Zellkulturmedium, wurden die Wirkstoffkomplexe mit einem entsprechenden molekularen Überschuss an Wirtmolekülen gebildet. Für die Untersuchung des Einflusses des adamantyierten Transferrins, wurde für den Polymer-Wirkstoffkomplex mit Targetliganden 0.02 Äquivalente **33** zugesetzt.

Die Transportstudien wurden an einer Co-Kultur aus der Dickdarmtumorzelllinie Caco-2 (Enterozyten) und HT29-MTX-E12 Becherzellen (9:1) durchgeführt. Die Co-Kultur wurde zunächst 21 Tage auf einer Polycarbonat-Membran differenzieren lassen. In dieser Zeit bilden die Enterozyten apikale Mikrovilli und Tight-Junctions als Zeichen einer dichten Barriere aus. Die Sezernierung von Mukus ist von den Becherzellen ebenfalls nach dieser Zeit vollständig abgelaufen (siehe Abbildung 46).

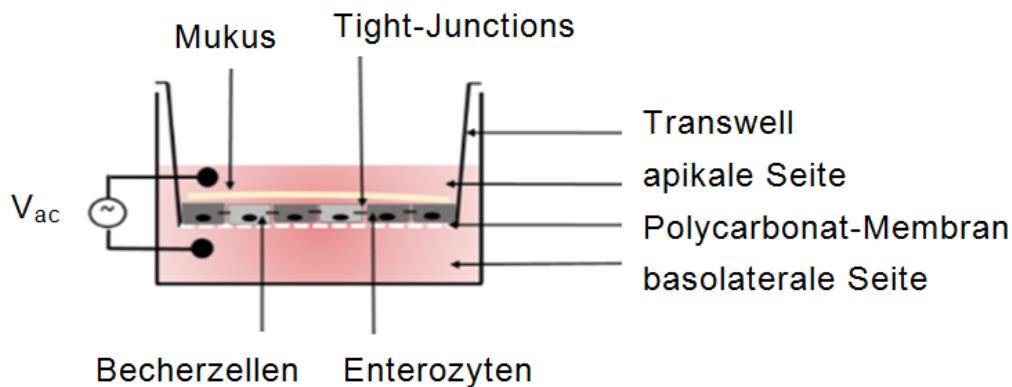


Abbildung 46: Aufbau der Transportstudien.

Auf der apikalen Seite (Darminnenseite) der Zellbarriere wurden die Wirkstofftransporter in DMEM-Medium zugesetzt. Auf der basolateralen Seite (Darmaußenseite) wurde Hepta-Thiosulfonat- $\beta$ -CD (**HSES**) dem Medium zugesetzt, um  $\beta$ -Estradiol bzw. Dexamethason in Lösung zu bringen. Da Wirkstoffe ca. 3 h benötigen um den Gastrointestinaltrakt zu passieren, wurde eine Inkubationszeit von 3 h gewählt. Anschließend wurde sowohl auf der apikalen Seite, als auch auf der basolateralen Seite das Medium entnommen und nach Extraktion mit  $^1\text{Butyl-methylether}$  die Steroidkonzentrationen mittels HPLC analysiert (siehe Abbildung 47).

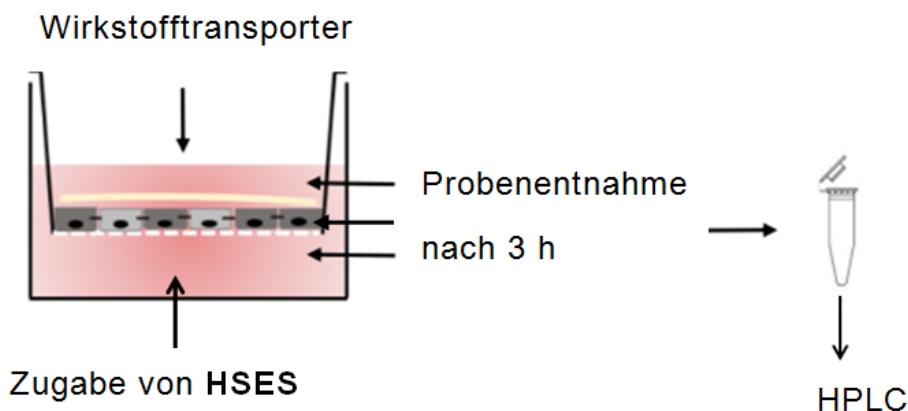


Abbildung 47: Probenzugabe und Probenentnahme bei den Transportstudien.

Durch die Extraktion können die Steroid-Wirkstoffe aus dem Zellkulturmedium und somit auch von den CD-Derivaten abgetrennt werden. Dies erleichtert die darauffolgende Detektion der Steroide über HPLC-Messungen.

In einem ersten Schritt wurde ein Wst1-Assay durchgeführt, um die Zellviabilität der Co-Kultur aus Caco-2-Zellen und HT29-Becherzellen nach Zugabe der Wirkstofftransporter mit  $\beta$ -Estradiol zu bestimmen. Zum einen wurde die Toxizität von  $\beta$ -Estradiol allein und komplexiert in **HTG**, dem **HTG-Polymer 10b** und dem **10b/33**-Komplex untersucht. Zum anderen wurde auch die Toxizität des **HSES** bestimmt, welches auf der basolateralen Seite der Zellbarriere zugesetzt wurde. Die Ergebnisse des Wst1-Assays sind in Abbildung 48 zu sehen.

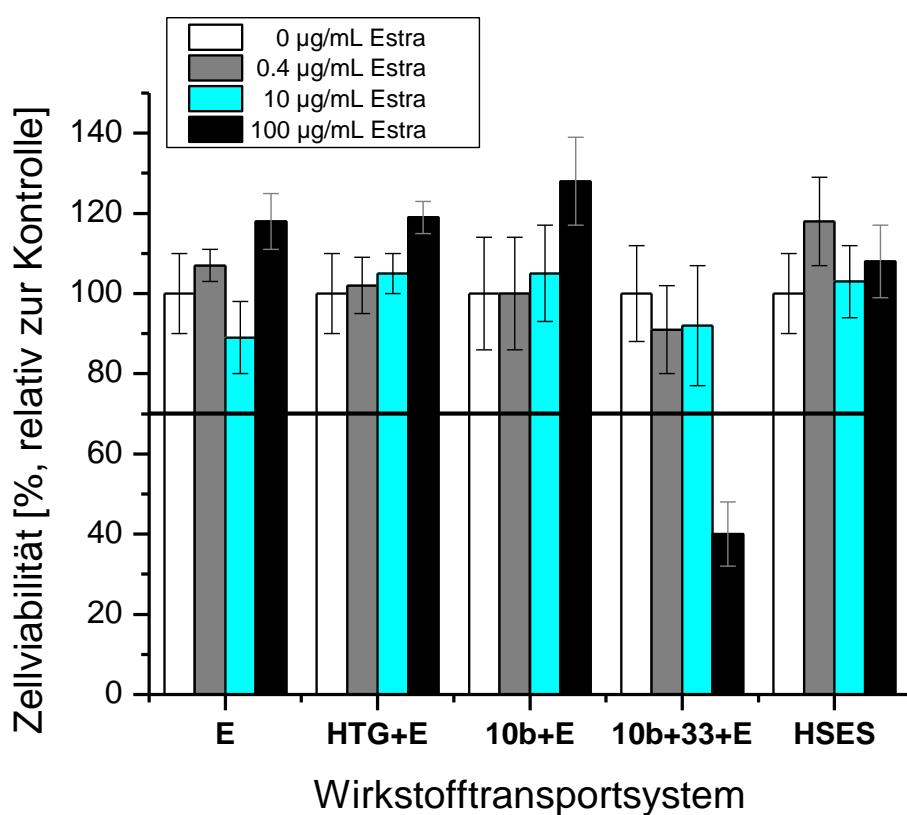


Abbildung 48: relative Zellviabilität der Co-Kultur nach 3 h Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen und **HSES** bei einer Estradiolkonzentration von 0.4, 10 und 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (unbehandelte Zellen werden auf 100% Viabilität gesetzt).

Die Zellviabilität wurde nach einer 3 stündigen Inkubation der Wirkstofftransporter, die 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -Estradiol enthalten, gemessen. Eine  $\beta$ -Estradiol-Konzentration von 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  liegt dann im Blut vor, wenn eine tägliche Dosis von 2 mg  $\beta$ -Estradiol appliziert wird. Bei dieser Konzentration zeigt kein Carrier eine toxische Wirkung, basierend auf der metabolischen Aktivität der Zellen. Mit Ausnahme des  $\beta$ -Estradiol-CD-HA-

Polymer-Tf Komplexes **10b/33** zeigte kein Wirkstofftransporter bis zu einer  $\beta$ -Estradiolkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eine signifikante Verringerung der Zellviabilität. Die toxische Wirkung des Komplexes mit **10b/33** ist allerdings erst ab einer Konzentration festzustellen, die 250-Fach über der applizierenden Konzentration liegt. Aus diesem Grund wurden die Transportstudien bei einer  $\beta$ -Estradiolkonzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durchgeführt, da bei dieser Konzentration noch kein toxischer Effekt zu erkennen ist. Des Weiteren konnte somit auch noch über der Detektionsgrenze der HPLC Anlage gearbeitet werden. Für diese Steroidkonzentration wurde mit einer Carrier-Konzentration von 111  $\mu\text{g}/\text{mL}$  **HTG** bzw. 658  $\mu\text{g}/\text{mL}$  **10b** gearbeitet.

Die Barrierefintegrität wurde während der dreistündigen Inkubation mittels einem cellZscope®-Gerät aufgezeichnet. Die dadurch aufgezeichneten TEER-Werte zeigten bei den Komplexen mit  $\beta$ -Estradiol keinerlei barriereschädigende Wirkung der Wirkstofftransporter (siehe Anhang). Somit kann sichergestellt werden, dass die Steroidmengen auf der basolateralen Seite ausschließlich durch den Wirkstofftransport und nicht aufgrund der Durchlässigkeit der Zellbarriere zustande kommen. Die Ergebnisse der TEER-Messungen bestätigen ebenfalls die Daten der Zellviabilität des Wst1-Assays.

Bei den Transportstudien von  $\beta$ -Estradiol wurde zudem auch der Einfluss von fetalem Kälberserum (FKS) im DMEM-Medium auf den Transport untersucht. In Abbildung 49 sind die absoluten  $\beta$ -Estradiolmengen mittels **HTG**, **10b** und **10b/33**-Komplex im Vergleich zur Gabe von  $\beta$ -Estradiol ohne Transporter gezeigt. Die weißen Balken stellen die  $\beta$ -Estradiolmengen mit Zugabe von FKS und die grauen Balken die  $\beta$ -Estradiolmengen ohne Zugabe von FKS dar. Die gestreiften Balken visualisieren die Estradiolmengen auf der basolateralen Seite der Zellbarriere.

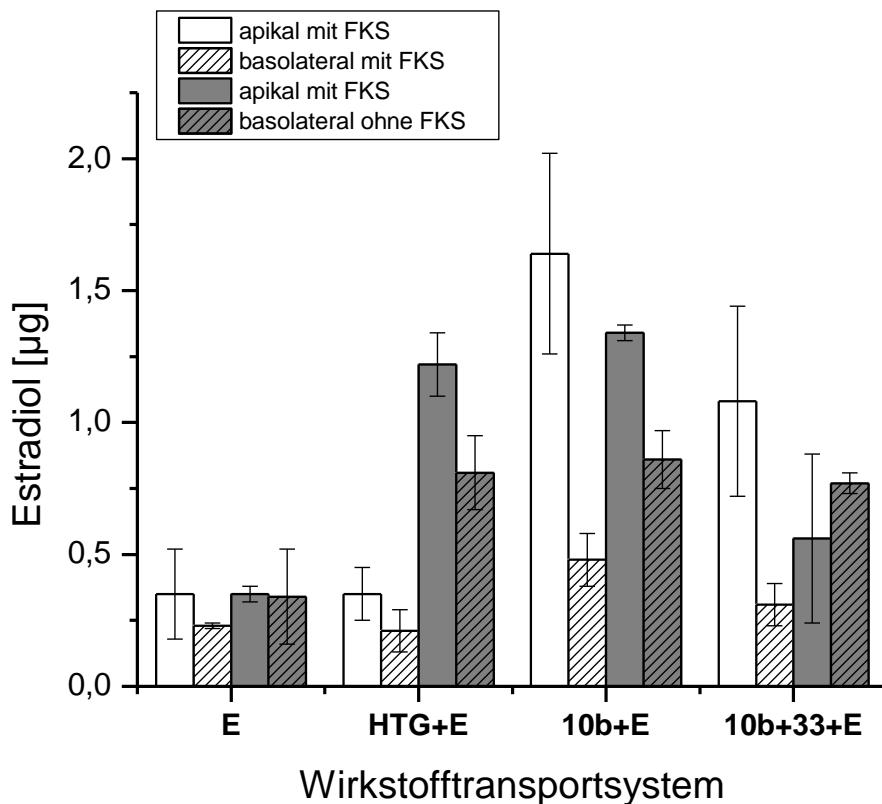


Abbildung 49: Absolutmengen an Estradiol auf apikaler und basolateraler Seite der Co-Kultur nach einer dreistündigen Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen in Abhängigkeit von FKS im Zellmedium.

Bei allen drei Systemen konnte ein gesteigerter Transport von Estradiol im Vergleich zur Inkubation von Estradiol ohne Transportsystem gezeigt werden. Des Weiteren ist eine höhere Transporteffizienz von Estradiol in serumsfreiem Zellmedium im Vergleich zu serumshaltigem Medium zu beobachten. Zwischen den eingesetzten Wirkstofftransportern ist allerdings kein signifikanter Unterschied in der Estradiolkonzentration auf der basolateralen Seite zu erkennen. Der Wirkstofftransporter mit Targetligand **10b/33** zeigt die gleichen Effekte wie das CD-HA-Polymer ohne Ligand. Allerdings ist keine Steigerung des Transports durch das Vorhandensein von Tf zu erkennen. Aufgrund der mehrfachen Modifizierung des Transferrins **33** können in Lösung mehrere CD-Hyaluronsäure-Polymer-Komplexe mit den Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche bilden. Somit kann das aktive Zentrum des Transferrins nicht mehr vom Tf-Rezeptor erkannt werden. Dies ist ein signifikanter Unterschied zum Ergebnis aus der SPR-Spektroskopie, in der das auf einer Transferrin-

Derivat nur auf einer Seite mit der CD-Monoschicht Komplexe bildete und somit das aktive Zentrum noch frei verfügbar war.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Estradiol-Komplexe konnte trotz Verwendung der Wirkstofftransporter nicht die gewünschte Estradiolkonzentration von 10 µg/mL auf der apikalen Seite vor Beginn der Inkubation eingestellt werden. Nach Filtration von unlösbarer Bestandteilen wurde der Transport somit mit einer niedrigeren Konzentration gestartet. Die Estradiollöslichkeiten vor Beginn der Inkubation, sowie die Wiederfindungsraten nach der dreistündigen Inkubation sind in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Estradiollöslichkeiten in % (bezogen auf 10 µg/mL) vor der Inkubation und die Wiederfindungsrate (%) nach der dreistündigen Inkubation .

|                   | Löslichkeit bei 0 h<br>(%) | Wiederfindungsrate nach 3 h<br>(%) |
|-------------------|----------------------------|------------------------------------|
| E mit FKS         | 12.2                       | 48                                 |
| E ohne FKS        | 8.7                        | 109                                |
| HTG+E mit FKS     | 7.7                        | 72                                 |
| HTG+E ohne FKS    | 22.5                       | 102                                |
| 10b+E mit FKS     | 41.3                       | 51                                 |
| 10b+E ohne FKS    | 17.6                       | 143                                |
| 10b+33+E mit FKS  | 38.7                       | 36                                 |
| 10b+33+E ohne FKS | 23.0                       | 77                                 |

Sowohl bei freiem Estradiol als auch bei der Verwendung der polymeren Transporter **10b** und **10b/33** konnte eine höhere Estradiollöslichkeit in Zellmedium mit FKS festgestellt werden. Nur durch den Einsatz des **HTG**/Estradiol-Komplexes zeigt sich eine höhere Estradiollöslichkeit ohne Vorhandensein von FKS im Medium. Serum Proteine wie das bovine Serumalbumin (BSA) konkurrieren mit dem Estradiol um die freie Kavität der CDs<sup>[247]</sup>. Da im Falle des **HTG**/E-Komplexes eine geringere Anzahl freier CD-Moleküle im Vergleich zum **10b**/E bzw. **10b/33**/E-Komplex vorliegen, verringert BSA hier die Solubilisierungseffizienz des HTG besonders. Daraus folgt, dass die polymeren Transporter einen besseren Solubilisierungseffekt bei Vorhandensein von FKS aufweisen, **HTG** hingegen ohne FKS im Zellmedium.

In einer weiteren Messserie wurde der intestinale Estradioltransport nur in serumsfreien Zellmedium durchgeführt. Diesmal wurden zusätzlich auch Proben innerhalb der Zellschicht auf Vorhandensein von Estradiol analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 grafisch dargestellt.

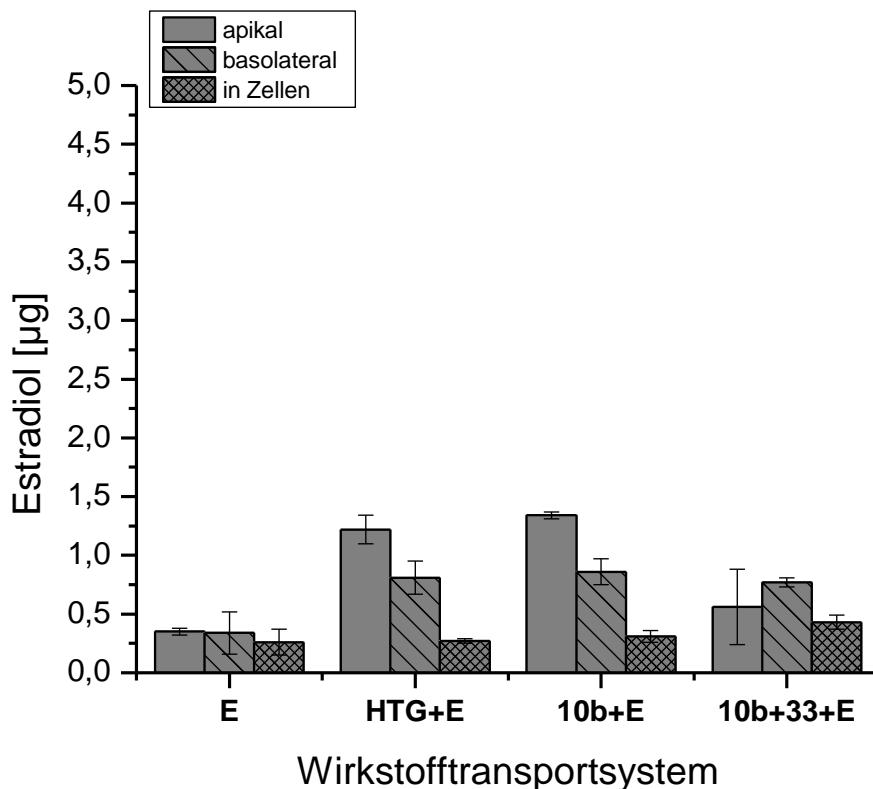


Abbildung 50: Absolutmengen an Estradiol auf apikaler und basolateraler Seite sowie in den Zellen der Co-Kultur nach einer dreistündigen Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen.

Nach der dreistündigen Inkubation liegt bei Verwendung von freiem Estradiol sowohl auf apikaler Seite, auf basolateraler Seite als auch in den Zellen ungefähr die gleiche Menge an Steroid vor. Mithilfe der Wirkstofftransporter konnten höhere Estradiolmengen in Lösung gebracht werden und auch eine höhere Transporteffizienz ist zu verzeichnen. Mittels HTG konnte nach der Inkubation in allen drei Kompartimenten zusammen eine Estradiolmenge von 2.30 µg festgestellt werden. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 102% (siehe Tabelle 12). Als Wiederfindungsrate wird die Addition der Steroidmengen auf apikaler und basolateraler Seite sowie innerhalb der Zellschicht nach der dreistündigen Inkubation im Verhältnis zu den

Steroidmengen gesetzt, die vor Beginn der Inkubation auf der apikalen Seite bestimmt wurden. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass durch die Wirkstofftransporter eine 2.2- bis 2.5-Fach höhere Transporteffizienz im Vergleich zu freiem Estradiol erzielt werden konnte. Die Steroidmengen innerhalb der Zellbarriere sind allerdings durch die CD-Transporter nicht gestiegen. Dies zeigt, dass die Transporter nur für den Transport über die Zellbarriere geeignet sind und nicht für den Transport des Wirkstoffes in die Zellbarriere.

Aufgrund der guten Ergebnisse beim Transport von Estradiol über die Darmbarriere, wurde der Transport von Dexamethason mit dem gleichen Prinzip untersucht. Um eine Dexamethasonkonzentration von 10 µg/mL zu erreichen, wurden Carrierkonzentration von 148 µg/mL **HTG** bzw. 457 µg/mL **10b** eingesetzt. Ähnlich zu den TEER-Messungen der Estradiol-Komplexe, beeinflussen die Dexamethason-Komplexe nicht die Integrität der intestinalen Zellbarriere (siehe Anhang). Der intestinale Transport von Dexamethason wurde ebenfalls in serumsfreiem Zellmedium durchgeführt. Nach einer dreistündigen Inkubation wurde die Dexamethasonkonzentration auf apikaler Seite und auf basolateraler Seite sowie in den Zellen bestimmt (siehe Abbildung 51). Auch hier konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit der Dexamethason-Komplexe trotz Verwendung der Wirkstofftransporter nicht die gewünschte Dexamethasonkonzentration von 10 µg/mL auf der apikalen Seite vor Beginn der Inkubation eingestellt werden. Nach Filtration von unlösbareren Bestandteilen wurde der Transport somit mit einer niedrigeren Konzentration (15.3% bei **10b/D** bis 36.9% bei **HTG/D**) gestartet. Deutlich ist zu erkennen, dass die Löslichkeit von Dexamethason nicht in dem Maße durch die Wirkstofftransporter gesteigert werden konnte als die Löslichkeit des β-Estradiols. Nur durch das **HTG**-Monomer konnte eine bessere Löslichkeit des Dexamethasons auf der apikalen Seite beobachtet werden. Zudem liegt der Transport von Dexamethason über die Darmbarriere durch HTG um das 1.5-Fache höher, während der Transport mit **10b** um das 2.1-Fache geringer ausfällt. Die Dexamethasonmengen auf der basolateralen Seite durch Verwendung von **10b/33** sind auf dem Niveau von der Applikation von Dexamethason ohne Carriersystem.

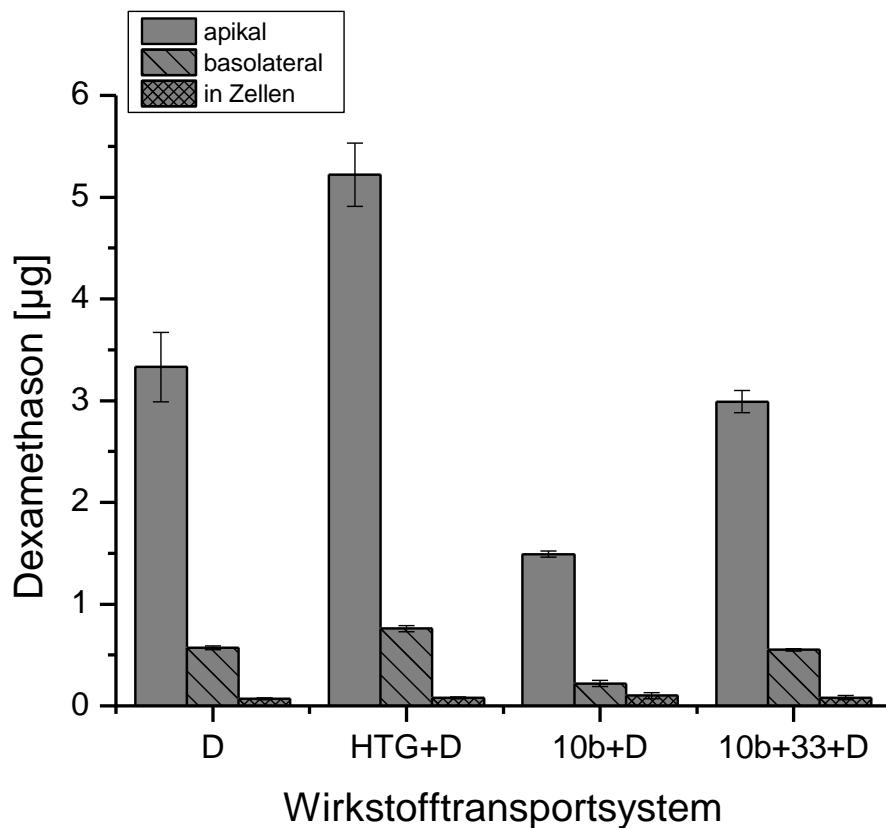


Abbildung 51: Absolutmengen an Dexamethason auf apikaler und basolateraler Seite sowie in den Zellen der Co-Kultur nach einer dreistündigen Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen.

Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkstofftransporter nur selektiv für die Wirkstoffe mit sehr guten Füllgraden zu empfehlen sind. Da Dexamethason nur einen Füllgrad von 26mol% mit **10b** aufweist (vgl. Füllgrad des  $\beta$ -Estradiol von 71mol%), sind die CD-Derivate nicht in der Lage, eine Verbesserung des Transports von Dexamethason über die Darmbarriere zu erzielen.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einsatz von Thioether- $\beta$ -CD-HA-Polymeren für den Wirkstofftransport durch den Gastrointestinaltrakt validiert werden. Durch Komplexierung von diversen Sexualhormonen und Glucocorticoiden mit Thioether- $\beta$ -CD-Derivaten, lässt sich deren Wasserlöslichkeit erheblich steigern. Die stabilsten Komplexe konnte hierbei das 7-Fach negativ geladene **HSES** mit den Sexualhormonen Progesteron ( $K_s = 3.16 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) und  $\beta$ -Estradiol ( $K_s = 2.73 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Unter den Glucocorticoiden wurde Dexamethason am stärksten von **HTG** ( $K_s = 4.50 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) komplexiert. Um die Verweildauer der Thioether- $\beta$ -CD-Derivate im Organismus zu erhöhen, wurden  $\beta$ -CD-Polymeren aus **HTG** bzw. **1** und Hyaluronsäure gebildet. Um die CD-Derivate an HA zu binden, musste eine Aminogruppe in einer Monofunktionalisierung eingeführt werden. Hierbei stellte sich die Verwendung eines Ethylendiamin-Spacer als beste Wahl heraus, da 2-4-Fach höhere Ausbeuten erzielt wurden. Für den zielgerichteten Wirkstofftransport wurden die humanen Proteine Lysozym und Transferrin mit Adamantangruppen über einen TEG-Spacer modifiziert. Dadurch konnten die Proteine über Wirt-Gast-Wechselwirkungen an das CD-HA-Polymer geknüpft werden. Die Adamantylierung erfolgte über die Aminogruppen der Lysin-Seitenketten und konnte mithilfe von drei synthetisierten Adamantan-TEG-Derivaten (**26**, **24** und **27**) realisiert werden. Die Anzahl an Adamantangruppen war von der verwendeten reaktiven Gruppe am TEG-Spacer und der Reaktionszeit abhängig. Das Isothiocyanat-Derivat **26** ermöglichte hierbei höhere Adamantylierungsraten als das Immidazolid-Derivat **24**. Zur Identifizierung der modifizierten Lysingruppen wurden die Proteine trypisch verdaut, mittels MALDI-Spektroskopie analysiert und die räumliche Struktur mittels computerchemischen Methoden visualisiert. Die eingeführten Adamantangruppen waren dabei nicht in der Nähe der aktiven Zentren der Proteine lokalisiert. Die Dissoziationskonstanten der adamantylierten Transferrine **33** und **34** und des adamantylierten Lysozyms **29** an der Thioether- $\beta$ -CD-Monomenschicht wurden über SPR-Spektroskopie bestimmt. Die Dissoziationskonstanten waren dabei abhängig von der Anzahl der

Adamantangruppen auf der Proteinoberfläche. Die adamantylierten Transferrine konnten nach Immobilisierung auf der CD-Oberfläche immer noch von dessen Antikörper erkannt werden. Des Weiteren waren für die Immobilisierung nicht benötigte Adamantangruppen weiterhin für die Komplexierung mit dem CD-HA-Polymer **10b** zugänglich. Der intestinale Wirkstofftransport wurde mit  $\beta$ -Estradiol und Dexamethason als Modelverbindungen in einem *in-vitro*-Assay an einer Co-Kultur untersucht. Als Wirkstofftransporter wurden das **HTG**-Monomer und das **HTG**-HA-Polymer **10b** mit und ohne Zusatz von **33** als targetspezifischen Liganden verwendet. Der intestinale Transport von  $\beta$ -Estradiol konnte durch die Verwendung des polymeren Wirkstofftransporters **10b** um das 2.5-Fache gesteigert werden. Die in dieser Arbeit hergestellten Wirkstofftransporter basieren auf einer Art Baukastensystem, in dem jede einzelne Komponente separat hergestellt werden kann. Für das gewünschte System werden die Komponenten im wässrigen Puffersystem zueinander gegeben. Hierbei werden keine toxischen Kopplungschemikalien benötigt und es sind eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten gegeben. Alle Bestandteile sind biologisch abbaubar und die Molmasse der supramolekularen Systeme liegt über 30000 Da, wodurch eine langsame Ausscheidung durch die Niere gewährleistet ist<sup>[248]</sup>.

Trotz der Erfolge des Wirkstofftransports mithilfe der hergestellten CD-HA-Polymer bedarf es weiterhin an Optimierung. So können in Zukunft noch andere Thioether- $\beta$ -CD-Derivate an die Hyaluronsäure gebunden werden, um eine noch bessere Bindungsfähigkeit zu entsprechenden Wirkstoffen zu erzielen. Des Weiteren kann der Transport anderer hydrophober steroidaler Wirkstoffe nach peroraler Applikation über den Gastrointestinaltrakt analysiert werden. So wird z.B. das synthetische Glucocorticoid Budesonid für die örtliche Behandlung von Darmerkrankungen eingesetzt<sup>[249]</sup>.

In weiteren Experimenten können die Thioether- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Polymer auch für den Wirkstofftransport über andere biologische Barrieren getestet werden. So sollte durch den überexprimierten Transferrin-Rezeptor an den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke der Transport von hydrophoben Wirkstoffen zum Gehirn verbessert werden<sup>[250]</sup>.

Um einen zielgerichteten Transport zu gewährleisten können neben Proteinen auch andere zellspezifische Liganden mit Adamantangruppen modifiziert werden. Hierfür bieten sich z.B. Antikörper, RGD-Peptide oder Zuckerderivate an<sup>[7,251,252]</sup>.

Im Bereich des Nukleotid-Transports können CD-HA-Polymere mit adamantyierten Proteinen als targetspezifischen Liganden ebenfalls eingesetzt werden. Nach Bildung von kationischen DNA-Polyrotaxan-Nanopartikeln können die anionischen CD-HA-Polymere elektrostatisch auf der Oberfläche der Nanopartikel gebunden werden. Im zweiten Schritt kann durch Zugabe von adamantyierten Proteinen die Oberfläche des Nanopartikels targetspezifisch modifiziert werden. Gleichzeitig ändert sich durch die Zugabe der anionischen HA die Oberflächenladung des Nanopartikels. Die negative Oberflächenladung verhindert die unspezifische Aufnahme der Nanopartikel in Zellen<sup>[253]</sup>. Somit werden die Nanopartikel hauptsächlich von den Zellen aufgenommen, die über die speziellen Targetfunktionen an der Oberfläche der Zellmembran verfügen<sup>[254]</sup>.

## 9 Experimenteller Teil

### 9.1 Materialien

Zur Absolutierung der Lösemittel wurde DCM über Phosphorpentoxid und Triethylamin über Calciumhydrid getrocknet. DMF, DMSO und Dioxan wurden über einem Molekularsieb gelagert. Alle Reaktionen mit Verwendung von absolutem Lösemittel wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Zur Synthese wurden Chemikalien der Firmen *Sigma-Aldrich* (St. Louis, USA), *Thermo Fisher Scientific* (New Jersey, USA), *TCI* (Zwijndrecht, Belgien), *Alfa Aesar* (Landau, Deutschland), *Carbolution* (Saarbrücken, Deutschland) und des Chemikalienlagers der Universität des Saarlandes verwendet.

Die Steroidwirkstoffe wurden von *TCI*, *Sigma Aldrich* und *Carbosynth* (Compton, UK), die kommerziell erhältlichen  $\beta$ -CD-Derivate von *Wacker Chemie* (München, Deutschland) und *Ligand Pharmaceuticals* (San Diego, USA) bezogen. Die humanen Proteine wurden von *Sigma Aldrich* (St. Louis, USA) und *AppliChem* (Darmstadt, Deutschland) erworben. Der Transferrin D-9 Antikörper wurde von *Santa Cruz Biotechnology* (Dallas, USA) und die Hyaluronsäure von *Dagmar Köhler* (Sonsbeck, Deutschland) verwendet. Trypsin von der Bauchspeicheldrüse des Schweins, welches eine Aktivität von 1645 U/mg misst, wurde von *Fluka* (Deisenhofen, Deutschland) und das 4700 Proteomics Analyser mass standard kit wurde von *Applied Biosystems* (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Alle für die Zellkultur verwendeten Gebrauchsmaterialien waren vom Hersteller steril verpackt oder wurden vor Ingebrauchnahme autoklaviert. Um Kontaminationen durch Mikroorganismen zu vermeiden, sind sämtliche zellbiologische Methoden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt worden.

Die verwendete Dickdarmtumorzelllinie Caco-2 wurde von der *Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zelllinie HT29-MTX-E12 stammte von *Sigma-Aldrich*. Das Zellkulturmedium (DMEM, mit hohem Glucosegehalt, 4.5 g/L), die Antibiotika und alle Puffer und Lösungen für die zellbiologischen

Untersuchungen wurden bei *ThermoFisher Scientific* (Darmstadt, Deutschland) erworben. Die Transwell inserts mit einem Porendurchmesser von 3.0 µm und einem Wachstumsbereich von 1.12 cm<sup>2</sup> wurden von *Corning* (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Der Wst-1 Zellproliferationsreagent Assay stammte von *Roche* (Mannheim, Deutschland)

## 9.2 Methoden

- **NMR-Spektroskopie**

Die <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, H,H-COSY- und C,H-COSY- NMR-Spektren der synthetisierten Verbindungen wurden mit dem *Magnet System 400 MHz Ultra shield plus* Kernresonanzspektrometer der Firma *Bruker BioSpin* (Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) bezogen auf Tetramethylsilan angegeben. Zur Auswertung wurde das Programm *ACD/NMR Processor Academic Edition 12.01* der Firma *Advanced Chemistry Development Inc* (Toronto, Kanada) genutzt. Folgende Bezeichnungen der Signale wurden gewählt: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), m (Multiplett) und br s (breites Signal).

Die 2D-ROESY-NMR-Spektren der Steroid-**HSES**-Komplexe wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer der Firma *Bruker* aufgenommen. Dabei wurde die Standardroutine „roesyphpr“ gewählt. Die Daten bestanden aus NS = 8 Scans, welche über 2048 Komplexpunkte mit einer Spektralweite von 5200 Hz zusammengelegt wurden. Die Mischzeit (P15) betrug 300 ms, die Wiederholverzögerung (P1) 2s und die Aufnahmezeit 0.2 s. Die 90° Pulsweite (P1) umfasste 11.5 µs bei einer Leistungsdämpfung von PL1W = 33.44 W. Die Komplexe sind mit einer Wirt-Konzentration von 4Gew% gebildet worden.

- **Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie)**

Zur Aufnahme der IR-Spektren wurde auf das FT-IR-Spektrometer *Tensor 27* der Firma *Bruker Optics GmbH* (Ettlingen, Deutschland) zurückgegriffen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mithilfe der dazugehörigen Software *OPUS*.

- **Massenspektrometrie mittels Elektrospray-Ionisation (ESI-MS)**

Zur Charakterisierung der niedermolekularen Bausteine wurde zum einen das LC/MS-Gerät *Micromass ZQ-4000* der Firma *Waters GmbH* (Eschborn, Deutschland) im Arbeitskreis von Prof. Wenz und zum anderen das *API 2000 Triple Quad* der Firma *ABSciex* (Ontario, Kanada) aus dem Arbeitskreis von Prof. Volmer verwendet.

- **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Zur Bestimmung des Reaktionsverlaufs wurden für die Dünnschichtchromatographie (DC) Fertigfolien (*Silica on TLC Alu foils*) der Firma *Sigma-Aldrich* verwendet. Die Detektion der niedermolekularen Produkte erfolgte durch Eintauchen der DC-Platten in eine basische Kaliumpermanganatlösung.

Die Detektion der Cyclodextrin-Derivate erfolgte durch Eintauchen in eine schwefelsaure Ethanol-Lösung und anschließender Erwärmung, die Aldehydbestimmung durch eine schwefelsaure 2-Aminobiphenyl-Lösung. Hierzu wurden 100 mg 2-Aminobiphenyl in 10 mL Ethanol gelöst und mit gleichen Teilen 20%iger Schwefelsäure gemischt. Nach Eintauchen in die Lösung wurden die DC-Platten kurz auf 100°C erhitzt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei 365 nm.

- **Ultrafiltration**

*Ultrafiltration der Proteine*

Zur Aufreinigung der Proteine wurden die Zentrifugalkonzentratoren des Typs *Vivaspin 2* (PES-Membran, Ausschlussgrenze 3 kDa) und des Typs *Vivaspin 4* (PES-Membran, Ausschlussgrenzen 5 kDa und 10 kDa) der Firma *Sartorius Stedim Lab Ltd* (Stonehouse, UK) genutzt. Zudem wurde die Zentrifuge *Rotina 35* der Firma *Hettich Zentrifugen* (Tuttlingen, Deutschland) eingesetzt. Dabei wurde mit 5000 UpM zentrifugiert.

### *Ultrafiltration der Cyclodextrin-Derivate*

Die Aufreinigung der Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Polymeren wurde mittels kontinuierlicher Cross-Flow-Ultrafiltration zuerst gegen 0.05 M NaCl und dann gegen entionisiertes Wasser durchgeführt. Hierfür wurden Zellen des Typs *Vivaflow 200* (Hydrosat, Ausschlussgrenze 10 kDa) der Firma *Sartorius* (Göttingen, Deutschland) verwendet.

- **Lyophilisation**

Beim Gefriertrocknen wurden die wässrigen Lösungen im Isopropanol-Trockeneis-Bad eingefroren und am Lyophilisator *Alpha 1-4* der Firma *Christ* (Osterode am Harz, Deutschland) getrocknet.

- **Löslichkeitsisothermen der Steroidwirkstoffe**

Zur Aufstellung von Phasenlöslichkeitsisothermen wurden Lösungen der  $\beta$ -CD-Derivate (0-6 mM, 1mL) in isotonischem HEPES-Puffer (10mM, 0.154 M NaCl, pH 7.4) mit einem Überschuss an Steroidwirkstoff für 18 h bei 25°C gerührt. Die Suspension wurde mit einem Spritzenfilter (*Kinesis Group*, Mixed Cellulose-Membran, 0.45 µm) filtriert. Die Löslichkeit der Steroide aus den Komplexen mit den  $\beta$ -CD-Derivaten natives  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD und SBE- $\beta$ -CD wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der eingesetzten  $\beta$ -CD-Derivate sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13:Extinktionskoeffizienten der  $\beta$ -CD-Derivate in HEPES-Puffer bei 240 nm.

| CD-derivatives    | $\epsilon$ in HEPES<br>( $\frac{L}{mol \cdot cm}$ ) |
|-------------------|---|
| $\beta$ -CD       | 4   |
| HP- $\beta$ -CD   | 2   |
| SBE7- $\beta$ -CD | 10  |
| HSES              | 260   |
| HTMT              | 583   |
| HTG               | 256   |

Die UV-Vis Spektren der steroidalen Wirkstoffe wurden mit dem Spektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Model Evolution 220) (Massachusetts,

USA) in einer Glasküvette in HEPES-Puffer aufgenommen. Im Scanmodus wurden die Spektren im Bereich von 200-600 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min und einer Bandbreite von 1 nm gemessen. Die Steroid-Konzentration wurde aus der UV-Absorption der Lösung, welche mit der UV-Absorption des Wirtmoleküls subtrahiert wurde, bei der gleichen Wellenlänge bestimmt. Die graphische Darstellung der Löslichkeitsisothermen erfolgte mit dem Programm *OriginPro 8G*.

Die Löslichkeit der Steroide aus den Komplexen mit den  $\beta$ -CD-Derivaten **HSES**, **HTMT** und **HTG** wurde mittels HPLC bestimmt. Die Steroidkonzentration wurde mit einer LiChrospher 100 RP-18 5  $\mu\text{m}$  125x4 mm Säule und einem Spectraflow 501 UV-Detektor (Eluent: MeOH/Phosphatpuffer 60/40 oder 70/30 (0.5%  $\text{NEt}_3$ , pH 6.38)<sup>[255]</sup>, Flussgeschwindigkeit: 1mL/min, Injektionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ ) bestimmt. Die HPLC-Daten der untersuchten Steroide sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: HPLC-Daten der untersuchten Steroidwirkstoffe

| Steroidwirkstoff   | Retentionszeit<br>(min) | Eluent<br>(MeOH/Phosphat Puffer) | Absorptionswellenlänge<br>(nm) |
|--------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Testosteron        | 3.31                    | 70/30                            | 240                            |
| $\beta$ -Estradiol | 2.98                    | 70/30                            | 280                            |
| Progesteron        | 5.65                    | 70/30                            | 240                            |
| Hydrocortison      | 2.76                    | 60/40                            | 240                            |
| Prednison          | 2.25                    | 60/40                            | 240                            |
| Dexamethason       | 3.63                    | 60/40                            | 240                            |
| Finasterid         | 3.08                    | 70/30                            | 240                            |

#### • Löslichkeitsmessungen der Steroidwirkstoffe

Für die Bestimmung der Löslichkeit der Steroide wurden Lösungen der  $\beta$ -CD-Derivate und von HSA (4Gew%, 1 mL) im isotonischen HEPES Puffer mit einem Überschuss an Steroidwirkstoff für 18 h bei 25°C gerührt. Die Konzentrationen der Steroide wurden wie oben beschrieben mittels UV-Vis und HPLC analysiert. Mit Verwendung von HSA als Carrier wurden die Steroide aus der wässrigen Phase dreimal mit n-Octanol extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden die vereinigten organischen Phasen zentrifugiert. Die organische Phase wurde auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und die Konzentration des Steroids mittels UV-Vis-Spektroskopie sowie dem

entsprechenden Extinktionskoeffizienten in n-Octanol ermittelt. Die Extinktionskoeffizienten der Steroide in Ethanol und n-Octanol sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Extinktionskoeffizienten der Steroidwirkstoffe in Ethanol und n-Octanol.

| Steroidwirkstoff   | Absorptionswellenlänge<br>(nm) | $\varepsilon$ in Ethanol<br>$(\frac{L}{mol \cdot cm})$ | $\varepsilon$ in n-Octanol<br>$(\frac{L}{mol \cdot cm})$ |
|--------------------|--------------------------------|--|--|
| Testosteron        | 240                            | 15100  | 16300  |
| $\beta$ -Estradiol | 282                            | 2318   | 2059   |
| Progesteron        | 240                            | 16500  | 15600  |
| Hydrocortison      | 241                            | 15800  | 15500  |
| Prednison          | 238                            | 14700  | 15400  |
| Dexamethason       | 239                            | 15500  | 15700  |
| Finasterid         | 240                            | 1588   | 1566   |

- **Amindetektion mittels Trinitrobenzylsulfonsäure (TNBSA)**

Zur Bestimmung des Amingehalts der modifizierten CD-Derivate wurde eine verdünnte Trinitrobenzylsulfonsäure (TNBSA)-Lösung aus 10  $\mu$ L einer 5%igen TNBSA Lösung in Methanol und 4990  $\mu$ L eines 0.1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffers (pH 8.5) frisch hergestellt. 250  $\mu$ L der verdünnten TNBSA-Lösung wurden mit 500  $\mu$ L der Analyt-Lösung gut gemischt und für 2h bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 125  $\mu$ L einer 1 M HCl dazugegeben. Die Absorption der Lösung wurde anschließend mit dem UV-Vis-Spektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Model Evolution 220) bei 335 nm gemessen. Zur Kalibrierung wurden definierte Konzentrationen einer Mono-Cystaminyll- $\beta$ -CD-Lösung (10-100 nM) verwendet. Die Kalibierkurve wurde mit dem Programm *OriginPro 8G* erstellt. Diese ist im Anhang zu finden.

- **Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie**

#### *Probenvorbereitung für tryptischen Verdau*

Zur Bestimmung der genauen Modifizierungsposition im Protein wurden je eine 10  $\mu$ M Proteinlösung in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer hergestellt. Zu 20  $\mu$ L dieser Proteinlösung wurden 5  $\mu$ L 2-Mercaptoethanol dazugegeben und für 30 min auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (RT)

wurde 1 µL einer Trypsinlösung (1mg/mL in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer) hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung für 3 h bei 37°C inkubiert. 5 µL der tryptisch verdauten Proteinlösungen wurden mit 5 µL einer gesättigten α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure-Lösung (HCCA-Lösung) in 70% ACN und 1% TFA gemischt. Von jeder Probe wurden 5 Spots auf eine polierte MALDI-Target-Platte aufgetragen und getrocknet.

#### *Probenvorbereitung zur Bestimmung der Gesamtmasse*

Um die Gesamtmasse der Proteine zu bestimmen, wurden je eine 10 µM Proteinlösung in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer hergestellt. 5 µL der Proteinlösung wurden mit 5 µL einer gesättigten Matrix-Lösung (in 70% ACN, 1% TFA) gemischt. Als Matrix wurde für Lysozym HCCA und für Transferrin Sinapinsäure verwendet. Von jeder Probe wurden 5 Spots auf eine polierte MALDI-Target-Platte aufgetragen und getrocknet.

#### *Aufnahme der MALDI-Spektren*

Die MALDI-Spektren wurden an einem *4800 TOF/TOF Analytator* Massenspektrometer (*Applied Biosystems*, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Dabei wurde im positiven Reflektormodus mit einem gepulsten 200 Hz Festphasen Nd:YAG Laser (Wellenlänge 355 nm, Laserenergie 2700-3200 Units) gemessen.

Die Spannung an Ausgang 1 wurde auf 20 kV gesetzt und mit einer Netzspannung von 16 kV versorgt. Die Spannung des Spiegel-Detektors lag bei 2.19 kV. Die Spektren der Standard-Peptide für die Kalibrierung wurden mit einer Verzögerungszeit von 600 ns gemessen und lagen zwischen 0.8 und 4 kDa (des-arg1-bradykinin, angiotensin I, glu1-fi brinopeptide B, ACTH 1-17 clip, ACTH 18-39 clip und ACTH 7-38 clip). Ein Massenspektrum wurde aus 20 Sub-Spektren pro Spot gebildet. Jedes Sub-Spektrum wurde aus 25 Laserimpulsen gebildet. Nur die Monoisotopischen Ionen der Standard-Peptide mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von 20 und einer Auflösung > 10000 wurden verwendet. Die Massentoleranz wurde auf 0.3 Da mit einem minimalen Abweichung von 5 ppm gesetzt. Die Kalibrierungseinstellungen wurden zum Messen der Realproben der Proteine im Bereich 1-3.5 kDa mit

einem minimalen S/N von 10 und einer Auflösung von >8000 verwendet. Ein interner Algorithmus definierte die Fläche der Isotopencluster (nachfolgend Intensität genannt), basierend auf dem Molekulargewicht der Peptide und ihrer elementaren Zusammensetzung.

Zur Auswertung der Spektren wurde die *Data Explorer®* Software der Firma *Applied Biosystems* (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

### *Datenbankvergleich*

Durch Vergleich der erhaltenen Signale in den Massenspektren mit der *Mascot*-Datenbank (*Matrix Science Inc*, Boston, USA) konnten die nativen Proteine bestimmt werden. Ebenfalls konnten der Datenbank nicht bekannte Signale ausgemacht werden, welche nicht zu den nativen Proteinen zugehörig sind. Der simulierte tryptische Verdau von Lysozym und Transferrin wurde mit der *Proteinprospector-Datenbank v 5.20.0 (UCSF Mass Spectrometry Facility*, San Francisco, USA) durchgeführt.

### • Computerchemische Methoden

Die Visualisierung der Quartärstruktur der adamantyierten Transferrine und Lysozym wurde mithilfe der *Molecular Operating Environment (MOE)* Software (Version 2018.01, *Chemical Computing Group Inc.*, Quebec, Kanada) realisiert. Um die Struktur der adamantyierten Proteine darzustellen, wurden die Röntgenkristallstrukturen von humanem Holo-Transferrin (PDB Code 3V83)<sup>[205]</sup> und humanem Lysozym (PDB Code 2NWD)<sup>[207]</sup> aus der Proteindatenbank von *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* verwendet. Das Potential wurde auf Amber10:EHT als Kraftfeld und für die Solvatisierung auf R-Feld gesetzt.

Protonierung und Entfernung von Wassermolekülen wurde mittels QuickPrep Modul durchgeführt. Die Modifizierung der Lysin-Seitenketten wurde mit der Zeichen-Funktion visualisiert. Die neuen adamantyierten Lysin-Reste wurden mit einem Gradienten von 0.1 kcal/mol energetisch minimiert, die Proteinoberflächen mittels „Surfaces and maps panel“ bestimmt.

- Isotherme Titrationskalorimetrie

Für die ITC-Messungen wurde das Gerät ITC<sup>2G</sup> der Firma *TA Instruments* (New Castle, USA) verwendet. Hierfür wurde eine Goldzelle (0.983 mL) als Probenzelle und Referenzzelle benutzt. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Die Referenzzelle wurde mit destilliertem Wasser gefüllt. Für die Maßlösung wurde 1-Aminoadamantan (8 mM) in PBS-Puffer gelöst. Der pH-Wert der Maßlösung wurde auf 7.2 eingestellt. Als Probelösung wurden wässrige Lösungen von β-CD und **HTG** (1 mM) in PBS-Puffer angesetzt und der pH-Wert ebenfalls auf 7.2 eingestellt. Die CD-Lösung wurde in die Probezelle gefüllt und die Titration der Maßlösung erfolgte in 25 Schritten zu je 10 µL.

Um Verdünnungseffekte zu berücksichtigen wurde die Verdünnungswärme des 1-Aminoadamantans gemessen, um diese von den Messwerten der Titration zu subtrahieren. Zur Bestimmung der Verdünnungswärme wurde 1-Aminoadamantan unter Messbedingungen zum PBS-Puffer ohne CD titriert.

Die Auswertung der Titrationskurven erfolgte mit der Software *NanoAnalyze* der Firma *TA Instruments*.

- Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die SPR Experimente sind am Reichert SR7500DC Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer (*Reichert Technologies*, Depew, NY, USA) mit einem CMD500I Sensor-Chip mit geringer Dichte an Carboxymethyldextranmatrix (*XanTec Bioanalytics*, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt worden. Alle Puffer wurden vor dem Gebrauch gefiltert und entgast.

#### *Immobilisierung der Cyclodextine auf dem Gold-Chip*

Das Mono-amino-β-CD-Derivat **5b** wurde in einer der beiden Messzellen auf dem Gold-Chip nach standardisierter Amin-Kupplungs-Technik immobilisiert. Die zweite Messzelle erfüllte die Funktion als Referenzzelle. Für die Immobilisierung wurde als Laufmittel doppelt destilliertes Wasser verwendet. Zuerst wurde das System mit 0.1 M Natriumboratpuffer (pH 9.0, 1 M NaCl)

viermal gereinigt, um anschließend die Carboxymethyldextran-Matrix mit 50 µL einer wässrigen 1:1-Mischung aus 100 mM *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid (EDC) und 100 mM *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zu aktivieren. Die Aktivierung erfolgte für 10 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µL/min. 50µL von **5b** (7 mM) in PBS-Puffer (pH 7.2) wurde in einer der beiden Messzellen für 10 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µL/min injiziert. Die aktivierte Oberfläche, die keine Reaktion mit dem CD-Derivat zeigte, wurde mit 1 mM Ethanolamin hydrochlorid für 7 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µL/min gequencht. Nach mehrmaligen PBS-Injektion und Spülen mit 25 mM 1-aminoadamantan konnte ein Immobilisierungslevel von circa 2000 *micro refractive index unit* (µRIU) erzielt werden.

Zum Vergleich wurde auch Monoamino-β-CD (7mM, 25 mM) mit der gleichen Methode immobilisiert. Durch Verwendung dieses CD-Derivates konnte ein Immobilisierungslevel von ca. 1000 µRIU eingestellt werden.

Für einen weiteren Vergleich wurde natives Tf ebenfalls auf einem CMD500I-Chip über Amin-Kupplungs Technik immobilisiert<sup>[256]</sup>. Nach Aktivierung des Chips wurde eine 1 µM Lösung des nativen Transferrins in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) für 7 min mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 µL/min injiziert. Nicht reagierte Oberfläche wurde mit 1 M Ethanolaminhydrochlorid-Lösung (pH 8.5) mit einer Flussgeschwindigkeit von 25 µL/min für 3 min gequencht. Nach Äquilibrierung mit 10 Pufferinjektionen konnte ein Immobilisierungslevel von 900 µRIU erzielt werden.

### *Bindungsexperimente*

Die Bindungsexperimente wurden bei 20°C in einem PBS-Puffer (pH 7.2) und einer Flussgeschwindigkeit von 10 µL/min durchgeführt. Um das System zu äquilibrieren, floss zunächst eine Serie von Puffer-Injektionen sowohl durch die Referenzzelle als auch durch die Messzelle. Die Analyten (1-aminoadamantan, vier adamantyierte Proteine **33**, **34**, **MHaw18** und **29**, deren nativen Proteine humanes Tf und humanes Lysozyme, der Tf D-9-Antikörper und das CD-HA-Polymer **10b**) wurden in den Messkonzentrationen in PBS-Puffer gelöst. Zur

Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  von 1-Aminoadamantan wurden die Analyt-Proben in aufsteigender Konzentration unmittelbar nacheinander injiziert, ohne zwischendurch die CD-Oberfläche zu regenerieren (single-cycle kinetics). Um  $K_D$ -Werte der adamantyierten Proteine zu ermitteln, wurde die CD-Oberfläche nach jeder Injektion einer Analyt-Konzentration regeneriert (multi-cycle kinetics). Die Assoziationszeit ist auf 120 s und die Dissoziationszeit auf 240 s festgesetzt worden. Zur Regeneration der CD-Oberfläche wurde Acetonitril (50%) oder 1-Aminoadamantan (25 mM) dem PBS-Puffer zugesetzt. Die Regeneration des immobilisierten nativen Transferrins erfolgte durch Injektion von 10 mM Glycinhydrochlorid (pH 2.0) für 30 s bei einer Flussgeschwindigkeit von 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Die Datenaufbereitung wurde mithilfe der *Scrubber Software* (Version 2.0c, 2008, BioLogi Software) vorgenommen. Die Sensorgramme wurden durch Subtraktion der Signale der Referenzzelle von den Signalen der Messzelle erhalten. Ebenfalls wurden die Signale des PBS-Puffers als Blank gesetzt. Die Resonanz-Signale wurden in  $\mu\text{RIU}$  oder in *resonance unit* (RU) wiedergegeben.

- **Zellbiologische Methoden**

#### *Kultivierung der Zellen*

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte im Standardkulturmedium DMEM, supplementiert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FKS), 100 Units/mL Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin, wahlweise in einer T75 oder T175 Zellkulturflasche. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

#### *Passagieren von Zellen*

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von etwa 90% mithilfe von Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels automatischem Zellzählsystem CASY TT (*Omni Life Science*, Bremen, Deutschland).

### Zellaussaat

Die Caco-2 und HT29-MTX-E12-Zellen wurden als Co-Kultur im Verhältnis 9:1 (Caco-2:HT29-MTX-E12) ausgesät. Die Zellen wurden für den Toxizitätstest für 24 h in einer 96-Loch-Platte ( $0.1 \times 10^5$  Zellen/Well) und für die Transportstudie für 21 Tage auf Transwell®-Inserts ( $1.0 \times 10^5$  Zellen/Insert) kultiviert. Dabei erfolgte an jedem zweiten Tag ein Wechsel des Mediums.

### Vorbereitung der Testsubstanzen

Die Löslichkeitsisothermen zwischen Estradiol bzw. Dexamethason mit **10b** wurden wie oben beschrieben hier in DMEM Medium bestimmt. Zur Herstellung der Komplexe für die Transportstudie wurde ein Überschuss an CD-Derivat **10b** in 10 mM HEPES Puffer (0.154 M NaCl, pH 7.4) gelöst und 0.30 Äquivalente an Steroid und gegebenenfalls 0.02 Äquivalente adamantyliertes Tf **33** hinzugegeben. Die Komplexe wurden für 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend gefriergetrocknet. Die Lyophilisate der Wirkstoffkomplexe mit **10b** bzw. **10b/33** wurden für eine Ausgangskonzentration von 1 mg/ml an Wirkstoff (Estradiol oder Dexamethason) in entsprechendem Volumen an Zellkulturmedium aufgenommen. Zur Komplexbildung erfolgte eine einstündige Inkubation unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Nach Filtration durch einen 0.2 µm PES Filter wurde die benötigte Menge der Stocklösung in Zellkulturmedium pipettiert, um eine Wirkstoffkonzentration von 0.4, 10 oder 100 µg/ml einzustellen.

### Toxizitätsassay in 96-Loch-Platten

Nach einer 24-stündigen Adhäsionsphase wurden die Zellen in den 96-Loch-Platten für 3 Stunden bei 37°C mit den Testsubstanzen (0.4-100 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurde frisches Zellkulturmedium ohne Wirkstofftransportsystem verwendet. Am Ende der dreistündigen Expositionsdauer wurde das zytotoxische Potenzial mittels Wst-1 Assay (Roche, Germany) gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) bestimmt. Dabei

wurde das Zellkulturmedium inkl. Wst1-Reagenz als Hintergrund gemessen. Die Viabilität nach Zugabe der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

#### *Transportstudie der Testsubstanzen auf Transwell®-Inserts*

Nach einer 21-tägigen Wachstums- und Differenzierungsphase auf Transwell®-Inserts wurden die Testsubstanzen in einer Wirkstoffkonzentration von 10 µg/ml in serumhaltigen oder serumfreien Zellkulturmedium auf apikaler Zellseite zugegeben. Auf basolateraler Zellseite wurden 8.6 mg/mL **HSES** dem Zellkulturmedium zugesetzt, um eine ausreichende Löslichkeit zur Detektion auf der basolateralen Zellseite zu gewährleisten. Nach drei Stunden wurden Proben auf apikaler sowie basolateraler Seite für die weitere Analyse entnommen. Die Zellbarriere wurde mit PBS gewaschen und für 30 min mit 0.05% Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im RIPA Puffer (Zelllysepuffer, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Tergitol), 0.5% Natriumdeoxycholat, 0.1% Natriumdodecylsulfat und 50 mM TRIS) während einer Ultraschallbehandlung (10 s) lysiert. Proben der lysierten Zellen wurden ebenfalls zur Bestimmung der Steroidkonzentrationen genommen.

#### *Probenaufarbeitung*

Die Steroidkonzentrationen auf apikaler und basolateraler Zellseite sowie in den lysierten Zellen wurden durch HPLC Messungen bestimmt. Zuerst wurde das Zellmedium der Proben jeweils dreimal mit tert-Butylmethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mittels SpeedVac (*Thermo Electron Corporation*, 35°C, 0.1 bar, 30 min) eingedampft und der Rückstand im Eluent (MeOH/Phosphatpuffer 70/30 (0.5% NEt<sub>3</sub>, pH 6.38) aufgenommen. Die Steroidkonzentration wurde mit einer LiChrospher 100 RP-18 5 µm 125x4 mm Säule und einem Spectraflow 501 UV-Detektor (Eluent: MeOH/Phosphatpuffer 70/30 (0.5% NEt<sub>3</sub>, pH 6.38)<sup>[255]</sup>, Flussgeschwindigkeit: 1mL/min, Injektionsvolumen 20 µL) bestimmt.

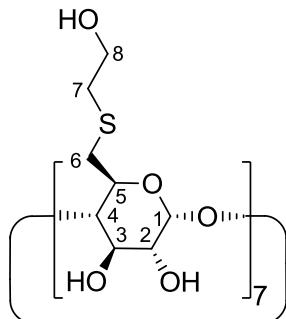
*Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)*

Die auf Transwell®-Inserts gewachsene Zellbarrieren wurden jeden Tag der 21-Tägigungen Wachstumsphase in das Zellmodul des automatischen Messsystems cellZscope® (*Nano Analytics GmbH*, Münster, Deutschland) überführt, um den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER-Wert) und damit die Dichte der Zellbarriere zu bestimmen. Während der dreistündigen Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der TEER-Wert alle 60 min aufgenommen um eine eventuell auftretende barrièreschädigende Wirkung der Testsubstanzen zu bestimmen.

### 9.3 Präoperativer Teil

- Synthese der Thioether- $\beta$ -CD-Derivate

#### Heptakis-(6-deoxy-6-thioglycol)- $\beta$ -CD **1**



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 14.40 g (9.16 mmol, 1 Äq.) Heptakis (6-desoxy-6-bromo)- $\beta$ -CD in DMF<sub>abs.</sub> (100 mL) vorgelegt und 11.3 mL (161 mmol, 2.5 Äq./Glucose) 2-Mercaptoethanol und 22.3 mL (161 mmol, 2.5 Äq./Glucose) destilliertes Triethylamin dazugegeben. Die Lösung wurde für 3 d bei 60°C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde das Reaktionsgemisch auf die Hälfte eingeengt und das Rohprodukt aus 500 mL kaltem Aceton gefällt. Der erhaltene Feststoff wurde abgesaugt und aus Wasser/Aceton (5:2) umkristallisiert. Das Produkt wurde am Hochvakuum (HV) getrocknet.

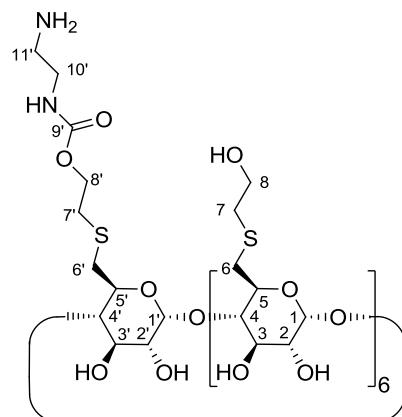
Ausbeute: 10.195 g (6.553 mmol), **72%**

DC:  $R_f = 0.64$  (Isopropanol/NH<sub>4</sub>Ac 2:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.93 (d, 7H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, OH-2), 5.83 (d, 7H, <sup>3</sup>J = 1.6 Hz, OH-3), 4.88 (d, 7H, <sup>3</sup>J = 3.2 Hz, H-1), 4.72 (t, 7H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, OH-8), 3.79-3.76 (m, 7H, H-5), 3.60 (t, 7H, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, H-3), 3.52 (q, 14H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, H-8), 3.40 (t, 7H, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, H-4), 3.36-3.31 (m, 7H, H-2), 3.07-3.04 (m, 7H, H-6a), 2.87-2.82 (m, 7H, H-6b), 2.65 (t, 14H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, H-7).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 102.1 (C-1), 84.5 (C-4), 72.6 (C-3), 72.3 (C-2), 71.4 (C-5), 60.8 (C-8), 35.2 (C-7), 33.3 (C-6).

Mono-6-deoxy-6-thioglycol-aminoethylcarbamat-hexa-6-deoxy-6-thioglycol- $\beta$ -CD 2



1.00 g (0.64 mmol, 1 Äq.) **1** wurden in 15 mL DMF<sub>abs.</sub> gelöst und 125 mg (0.77 mmol, 1,2 Äq.) CDI dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h bei 60°C gerührt und dann 0.2 mL (3.00 mmol, 4.7 Äq.) Ethylen diamin dazugegeben und für weitere 40 h bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung auf die Hälfte eingeengt und das Produkt aus 250 mL kaltem Aceton gefällt. Der erhaltene Feststoff wurde abgesaugt, gemörsert und am HV getrocknet.

Ausbeute: 850 mg (0.52 mmol), **81%**

DC: R<sub>f</sub> = 0.77 (Isopropanol/NH<sub>4</sub>Ac 2:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.86 (br s, 14H, OH-2/3), 4.88 (br s, 7H, H-1/1'), 4.72 (br s, 5H, OH-8), 4.06 (br s, 2H, NH), 3.79-3.76 (m, 7H, H-5/5'), 3.60 (t, 7H, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, H-3/3'), 3.52 (t, 14H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-8/8'), 3.42-3.33 (m, 18H, H-2/2'/4/4'/10'/11'), 3.07-3.04 (m, 7H, H-6a/6a'), 2.87-2.82 (m, 7H, H-6b/6b'), 2.65 (t, 14H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-7/7').

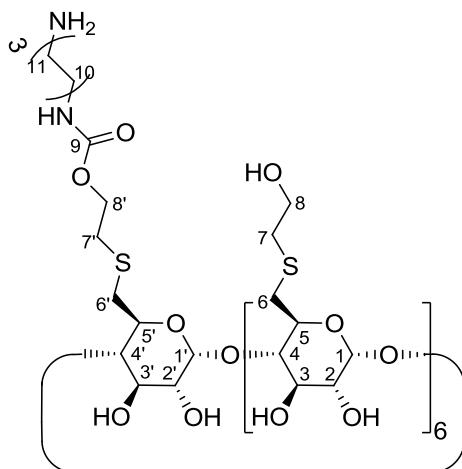
<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 162.3 (C-9'), 102.0 (C-1/1'), 84.5 (C-4/4'), 74.0 (C-10'), 73.6 (C-11'), 72.5 (C-3/3'), 72.2 (C-2/2'), 71.3 (C-5/5'), 60.7 (C-8/8'), 35.2 (C-7/7'), 33.2 (C-6/6').

MALDI-TOF-MS: m/z<sub>exp</sub> = 1663.94 [M+Na<sup>+</sup>] (1 fach modifiziert)

m/z<sub>theo</sub> = 1664.45 [M+Na<sup>+</sup>] (1 fach modifiziert)

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3288 (OH-Streck), 2915 (CH-Streck), 1662 (C=O-Streck), 1408 (CH-Deformation), 1150 (CN-Deformation), 1035 (COC-Streck), 749 (SC-Streck).

Mono-6-deoxy-6-thioglycol-aminohexylcarbamat-hexa-6-deoxy-6-thioglycol- $\beta$ -CD **3**



2.00 g (1.29 mmol, 1 Äq.) **1** wurden in 30 mL DMF<sub>abs.</sub> gelöst und 271 mg (1.67 mmol, 1.3 Äq.) CDI dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei 80°C gerührt. Danach wurden 0.9 mL (6.43 mmol, 5 Äq.) 1,6-Diaminohexan dazugegeben und für weitere 48 h bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung auf die Hälfte eingeengt und das Rohprodukt zweimal aus 250 mL kaltem Aceton gefällt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ultrafiltration (500 Da PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl-Lösung und dann gegen entionisiertes Wasser. Der Rückstand wurde lyophilisiert und es konnte ein weißer Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 1.47 g (0.87 mmol), 67%

DC:  $R_f = 0,77$  (Isopropanol/NH<sub>4</sub>Ac 2:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.88 (br s, 14H, OH-2/3), 4.87 (s, 7H, H-1), 4.79 (br s, 5H, OH-8), 3.77 (br s, 7H, H-5), 3.60 (t, 7H, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, H-3), 3.50 (br s, 14H, H-8), 3.39 (br s, 7H, H-4), 3.34 (br s, 7H, H-2), 3.05-3.02 (m, 7H, H-6a), 2.95-2.94 (m, 2 H, H-10), 2.86-2.81 (m, 7H, H-6b), 2.73 (t, 2H,

$^3J = 7.4$  Hz H-15), 2.64 (t, 14H,  $^3J = 6.8$  Hz, H-7), 1.56-1.55 (m, 2H, H-14), 1.37-1.36 (m, 2H, H-11), 1.31 (br s, 2 H, H-13), 1.26-1.23 (m, 2H, H-12).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 161.0 (C-9), 102.0 (C-1), 84.4 (C-4), 72.6 (C-3), 72.3 (C-2), 71.4 (C-5), 60.8 (C-8), 40.4 (C-10), 38.5 (C-15), 35.2 (C-7), 33.3 (C-6), 28.9 (C-11), 26.7 (C-14), 25.8 (C-12), 25.4 (C-13).

MALDI-TOF-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 1720.00$  [M+Na<sup>+</sup>] (1-fach modifiziert)

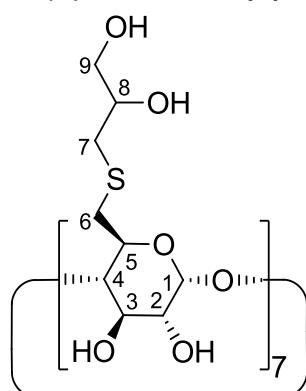
$m/z_{\text{theo}} = 1719.49$  [M+Na<sup>+</sup>] (1-fach modifiziert)

$m/z_{\text{exp}} = 1862.14$  [M+Na<sup>+</sup>] (2-fach modifiziert)

$m/z_{\text{theo}} = 1861.60$  [M+Na<sup>+</sup>] (2-fach modifiziert)

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3262$  (OH-Streck), 2921 (CH-Streck), 1659 (C=O-Streck), 1406 (CH-Deformation), 1150 (CN-Deformation), 1035 (COC-Streck), 750 (SC-Streck).

#### Heptakis-(6-deoxy-6-thioglycerin)- $\beta$ -CD HTG (4)



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 10.00 g (6.35 mmol, 1 Äq.) Heptakis (6-desoxy-6-bromo)- $\beta$ -CD in DMF<sub>abs.</sub> (80 mL) vorgelegt und 9.6 mL (111 mmol, 2.5 Äq./Glucose) 1-Mercaptoglycerin und 15.4 mL (111 mmol, 2,5 Äq./Glucose) destilliertes Triethylamin dazugegeben. Die Lösung wurde für 3 d bei 60°C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde das Reaktionsgemisch auf die Hälfte eingeengt und das Rohprodukt aus 600 mL kaltem Aceton gefällt. Der erhaltene Feststoff wurde abgesaugt und aus Wasser/Aceton (1:1) umkristallisiert. Die anschließende Trocknung fand am HV statt.

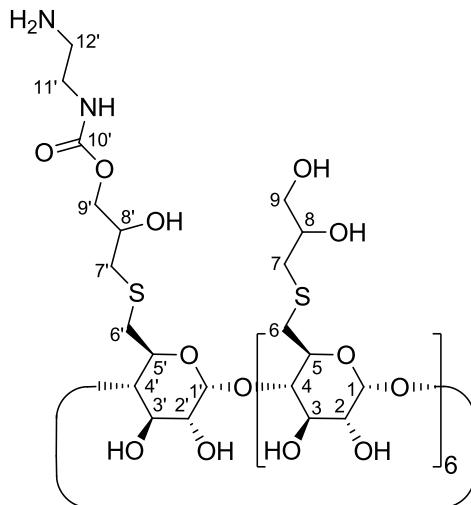
Ausbeute: 7.37 g (4.18 mmol), 66%

DC:  $R_f = 0,72$  (Isopropanol/NH<sub>4</sub>Ac 2:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.89 (d, 7H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, OH-2), 5.80 (s, 7H, OH-3), 4.87 (br s, 7H, H-1), 4.68 (d, 7H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, OH-8), 4.51 (t, 7H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, OH-9), 3.80 (br s, 7H, H-5), 3.62-3.57 (m, 14H, H-3/8), 3.46-3.40 (m, 7H, H-4), 3.38-3.30 (m, 21H, H-2/9), 3.04-3.01 (m, 7H, H-6a), 2.91-2.89 (m, 7H, H-6b), 2.73-2.66 (m, 7H, H-7a), 2.60-2.53 (m, 7H, H-7b).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 102.1 (C-1), 84.2 (C-4), 72.6 (C-3), 72.3 (C-2), 71.4 (C-5), 71.3 (C-8), 64.6 (C-9), 36.7 (C-7), 34.0 (C-6).

Mono-6-deoxy-6-thioglycerin-aminoethylcarbamoylhexa-6-deoxy-6-thioglycerin-  
 $\beta$ -CD **5**



7.50 g (4.25 mmol, 1 Äq.) **HTG (4)** wurde in 50 mL DMF<sub>abs</sub> gelöst und 1,03 g (6.38 mmol, 1.5 Äq.) CDI wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde für 90 min bei 60°C gerührt. Nach Zugabe von 1.02 g (17.00 mmol, 4 Äq.) Ethylendiamin wurde die Reaktion für weitere 68 h bei 60°C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde die Lösung auf die Hälfte eingeengt und der Rückstand aus 500 mL kaltem Ethanol gefällt. Der so gewonnene weiße Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 7,11 g (3.84 mmol, **90%**)

DC:  $R_f = 0,49$  (Isopropanol/NH<sub>4</sub>Ac 2:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.90 (br s, 7 H, OH-2), 5.81 (br s, 7 H, OH-3), 4.87 (s, 7H, H-1), 4.70 (br s, 6 H, OH-8), 4.53 (br s, 6 H, OH-9), 3.81 (br s, 7H, H-5), 3.62-3.58 (m, 14H, H-3/8), 3.47-3.43 (m, 7H, H-4), 3.34 (br s, 23 H, H-2/9/11/12), 3.05-3.02 (m, 7H, H-6a), 2.91-2.87 (m, 7H, H-6b), 2.73-2.66 (m, 7H, H-7a), 2.60-2.54 (m, 7H, H-7b).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 145.0 (C-10), 102.1 (C-1), 84.2 (C-4), 72.6 (C-9), 72.3 (C-8), 71.4 (C-5), 71.3 (C-3), 64.7 (C-2), 64.6 (C-11/12), 36.8 (C-7), 33.9 (C-6).

MALDI-TOF-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 1873.77$  [M+Na<sup>+</sup>] (1-fach modifiziert)

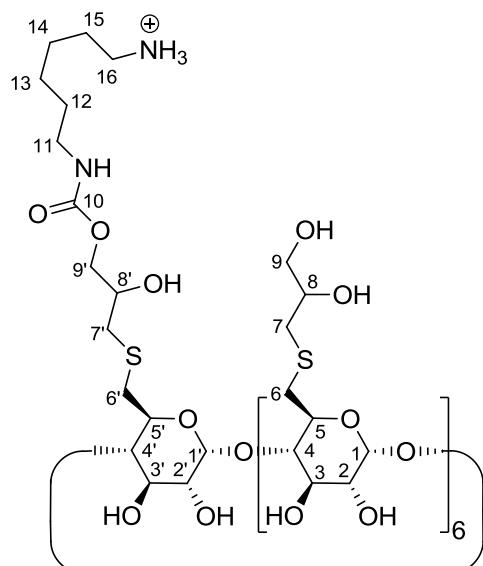
$m/z_{\text{theo}} = 1873.52$  [M+Na<sup>+</sup>] (1-fach modifiziert)

$m/z_{\text{exp}} = 1959.82$  [M+Na<sup>+</sup>] (2-fach modifiziert)

$m/z_{\text{theo}} = 1959.56$  [M+Na<sup>+</sup>] (2-fach modifiziert)

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3420$  (OH-Streck), 2907 (CH-Streck), 1696 (C=O-Streck), 1399 (CH-Deformation), 1142 (CN-Deformation), 1012 (COC-Streck), 750 (SC-Streck).

Mono-6-deoxy-6-thioglycol-aminohexylcarbamat-hexa-6-deoxy-6-thioglycerin-β-CD **6**



1.00 g (0.61 mmol, 1 Äq.) **HTG (4)** wurden in 15 mL DMF<sub>abs.</sub> gelöst und 108 mg (0.67 mmol, 1.1 Äq.) CDI dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei 70°C gerührt und dann 0.3 mL (1.82 mmol, 3 Äq.) 1,6-Diaminohexan dazugegeben und für weitere 46 h bei 70°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung auf die Hälfte eingeengt und das Rohprodukt aus 250 mL kaltem Aceton gefällt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ultrafiltration (500 Da PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl-Lösung und dann gegen entionisiertes Wasser. Der Rückstand wurde lyophilisiert und es konnte ein weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 746 mg (0.39 mmol), **65%**

DC:  $R_f = 0.63$  (Isopropanol/NH<sub>4</sub>Ac 2:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.88 (br s, 14H, OH-2/3), 4.86 (s, 7H, H-1), 4.68 (br s, 6H, OH-8/9), 3.80 (br s, 7H, H-5), 3.60-3.58 (m, 14H, H-3/8), 3.44-3.34 (m, 28H, H-2/4/9), 3.04-2.90 (m, 16H, H-6a/6b/11), 2.73-2.65 (m, 9H, H-7a/16), 2.60-2.53 (m, 7H, H-7b), 1.55 (br s, 2H, H-15), 1.38 (br s, 2H, H-12), 1.31 (br s, 2 H, H-14), 1.24 (br s, 2H, H-13).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 102.1 (C-1), 84.3 (C-2), 72.6 (C-3), 72.5 (C-8), 72.4 (C-4), 71.4 (C-5), 64.6 (C-9), 40.5 (C-11), 36.8 (C-16), 36.7 (C-7), 34.0 (C-6), 29.2 (C-12), 26.9 (C-15), 25.6 (C-14), 25.4 (C-13).

MALDI-TOF-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 1929.74$  [M+Na<sup>+</sup>] (1-fach modifiziert)

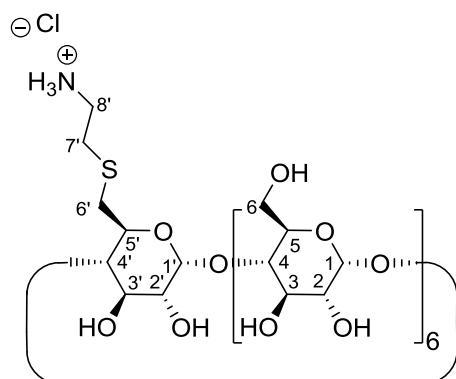
$m/z_{\text{theo}} = 1929.58$  [M+Na<sup>+</sup>] (1-fach modifiziert)

$m/z_{\text{exp}} = 2071.86$  [M+Na<sup>+</sup>] (2-fach modifiziert)

$m/z_{\text{theo}} = 2071.69$  [M+Na<sup>+</sup>] (2-fach modifiziert)

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3299$  (OH-Streck), 2916 (CH-Streck), 1655 (C=O-Streck), 1366 (CH-Deformation), 1149 (CN-Deformation), 1035 (COC-Streck), 750 (SC-Streck).

### Mono-[6-deoxy-6-(amino-ethylsulfanyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin 7



Zu einer Suspension aus 8.50 g (6.59 mmol, 1 Äq.) Mono-[6-(*p*-Toluolsulfonyl)]- $\beta$ -Cyclodextrin in 130 mL DMF/H<sub>2</sub>O-Gemisch (1:3) wurden 6.67 g (59.06 mmol, 9 Äq.) Cysteamin-Hydrochlorid und 42.6 mL Triethylamin dazugegeben. Die resultierende Lösung wurde für 4 d auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlung auf RT wurde die Lösung auf die Hälfte eingeengt und mit 6 M HCl auf einen pH von 3 angesäuert. Das Rohprodukt wurde zweimal aus 500 mL kaltem Ethanol gefällt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ultrafiltration (500 Da PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl-Lösung und dann gegen entionisiertes Wasser. Zur Entfernung von Cu-Ionen wurde das Retentat mit Kationentauscher Ambersep GT74 geschüttelt. Nach Filtration wurde der Rückstand lyophilisiert und es konnte ein weißer Feststoff als Produkt gewonnen werden.

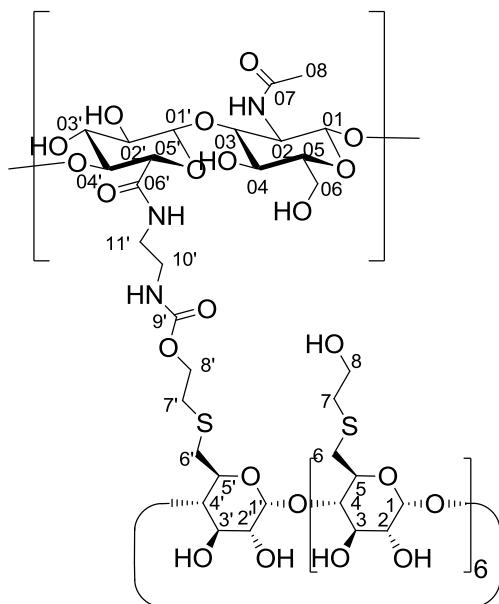
Ausbeute: 4.29 g (3.59 mmol), **54%**

DC:  $R_f = 0,10$  (tButanol/EtOH/H<sub>2</sub>O 5:4:3)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 400 MHz) = 5.72 (br s, 14H, OH-2/2'/3/3'), 4.88 (br s, 1H, H-1'), 4.83 (br s, 6H, H-1), 3.79-3.75 (m, 1H, H-5'), 3.63-3.58 (m, 25 H, H-3/3'/5/6a/6b), 3.40-3.29 (m, 14H, H-2/2'/4/4'). 3.06 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 12.4 Hz H-6a'), 2.94 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-8'), 2.83-2.75 (m, 3H, H-6b'/7').

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (DMSO-d<sup>6</sup>, 100 MHz) = 102.2 (C-1'), 101.9 (C-1), 84.3 (C-4'), 81.5 (C-4), 73.0 (C-3/3'), 72.4 (C-2/2'), 72.3 (C-5), 72.0 (C-5'), 59.9 (C-6), 38.6 (C-8'), 32.9 (C-6'), 29.7 (C-7').

- Synthese von Thioether- $\beta$ -Cyclodextrin-Hyaluronsäure-Konjugaten  
Monoaminoethylcarbamat-hepta-thioglycol- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Konjugat **8**



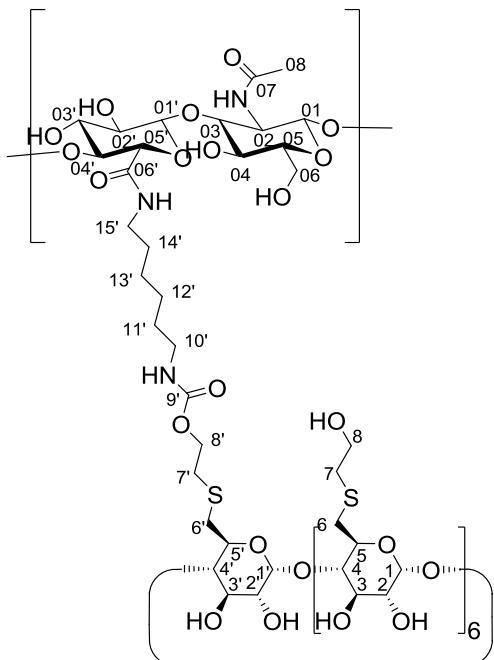
400 mg (1.06 mmol, 1 Äq.) Hyaluronsäure (27 kDa) wurden in 35 mL  $H_2O_{dest}$  gelöst und 464 mg (2.64 mmol 2.5 Äq.) CDMT sowie 0.6 mL (4.24 mmol, 4 Äq.) NMM in 7 mL ACN und 120  $\mu$ L  $H_2O_{dest}$  gelöst und zur Reaktionsmischung dazugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurden 1.73 g (1.06 mmol, 1.0 Äq.) **2** dazugegeben. Die Suspension wurde ebenfalls bei RT weitere 68 h gerührt. Danach wurden 50 mL  $H_2O_{dest}$  und Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) hinzugegeben und 60 min geschüttelt. Die trübe Lösung wurde vorfiltriert und mit einer Cross-Flow Membran (10 kDa, PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl und dann gegen  $H_2O_{dest}$  ultrafiltriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und es konnte als Endprodukt ein weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 363 mg (0.74 mmol, **72%**)

$^1H$ -NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $D_2O$ , 400 MHz) = 5.13 (br s, 0.46 H, H-1/1'), 4.51-4.42 (m, 2H, H-01/01'), 3.98-2.69 (m, 16.9 H, H-2/2' - H-8/8', H-10'/11', H-02/02' – H-05/05', H-06), 1.99 (s, 3H, H-08).

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3269 (OH-Streck), 2885 (CH-Streck), 1604 (C=O-Streck), 1372 (CH-Deformation), 1149 (CN-Deformation), 1012 (COC-Streck), 660 (SC-Streck).

### Monoaminohexylcarbamat-hepta-thioglycol- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Konjugat **9**



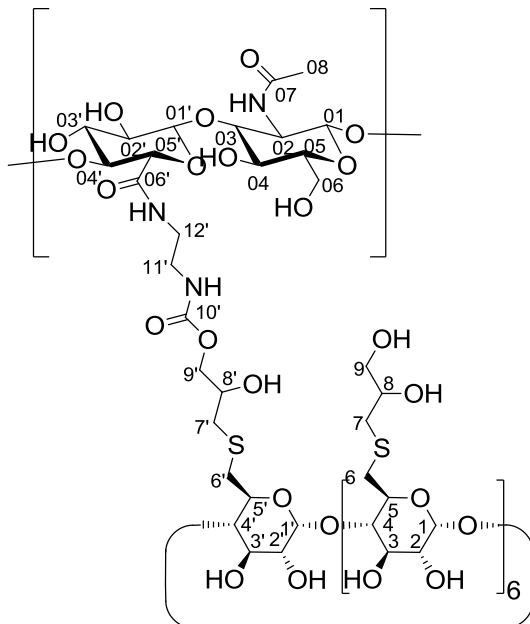
100 mg (0.26 mmol, 1 Äq.) Hyaluronsäure (27 kDa) wurden in 16 mL einer Mischung aus ACN/H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (2:3) gelöst. 115 mg (0.66 mmol, 2.5 Äq.) CDMT und 110 µL (1.05 mmol, 4 Äq.) NMM wurden in 1 mL ACN und 40 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und zur Reaktionsmischung dazugegeben. Nach 2.5 h Rühren bei RT wurden 892 mg (0.53 mmol, 2 Äq.) **3** dazugegeben und die Suspension wurde weitere 20 h bei RT gerührt. Dann wurden 50 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) hinzugegeben und 60 min geschüttelt. Die trübe Lösung wurde vorfiltriert und mit einer Cross-Flow Membran (10 kDa, PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl und dann gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ultrafiltriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und als Endprodukt konnte ein weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 157 mg (0.25 mmol, **96%**)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) = 5.02 (br s, 1.07 H, H-1/1'), 4.44-4.37 (m, 2H, H-01/01'), 3.92-2.76 (m, 19.2 H, H-2/2' -

H-8/8', H-10'/15', H-02/02' – H-05/05', H-06), 1.92 (s, 3H, H-08), 1.54-1.17 (m, 2.8 H, H-11-H-14).

### Monoaminoethylcarbamat-hepta-thioglycerin- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Konjugat **10**



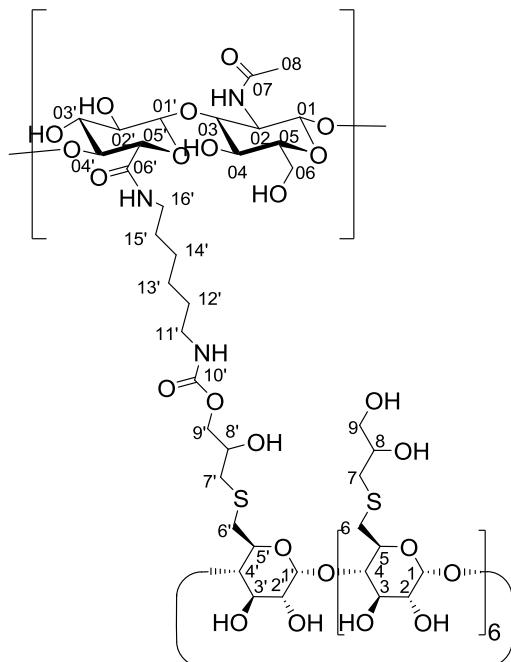
600 mg (1.58 mmol, 1 Äq.) Hyaluronsäure (27 kDa) wurden in 25 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöst und 696 mg (3.96 mmol 2.5 Äq.) CDMT sowie 1.2 mL (6.34 mmol, 4 Äq.) NMM in 3 mL ACN und 120  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöst und zur Reaktionsmischung dazugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurden 5.54 g (2.38 mmol, 1.5 Äq.) **5b** dazugegeben. Die Suspension wurde weitere 42 h bei RT gerührt. Danach wurden weitere 50 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  und Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) hinzugegeben und 30 min geschüttelt. Die trübe Lösung wurde vorfiltriert und mit einer Cross-Flow Membran (10 kDa, PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl und dann gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  ultrafiltriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und als Endprodukt konnte ein weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 415 mg (0.74 mmol, **46%**)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 4.97 (br s, 0.72H, H-1/1'), 4.38-4.29 (m, 2H, H-01/01'), 3.87-2.62 (m, 18.9H, H-2/2' - H-9/9', H-11'/12', H-02/02' – H-06), 1.86 (s, 3H, H-08).

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3267 (OH-Streck), 2902 (CH-Streck), 1603 (C=O-Streck), 1370 (CH-Deformation), 1148 (CN-Deformation), 1022 (COC-Streck), 660 (SC-Streck).

### Monoaminohexylcarbamat-hepta-thioglycerin- $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Konjugat **11**



200 mg (0.53 mmol, 1 Äq.) Hyaluronsäure (27 kDa) wurden in 13 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöst. 232 mg (1.32 mmol 2.5 Äq.) CDMT und 240  $\mu\text{L}$  (2.11 mmol, 4 Äq.) NMM wurden in 2 mL Acetonitril und 80  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöst und zur Reaktionsmischung dazugegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wurden 1.01 g (0.53 mmol, 1 Äq.) **6** dazugegeben und die Suspension wurde weitere 70 h bei RT gerührt. Dann wurden 50 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  und Kationentauscher (Amberlyst 15 hydrogen form) hinzugegeben und 30 min geschüttelt. Die trübe Lösung wurde vorfiltriert und mit einer Cross-Flow Membran (10 kDa, PES-Membran) zuerst gegen 0.05 M NaCl und dann gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  ultrafiltriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und als Endprodukt konnte ein weißer Feststoff gewonnen werden.

Ausbeute: 178 mg (0.38 mmol, **71%**)

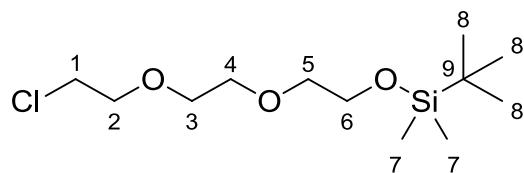
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) = 5.01 (br s, 0.18H, H-1/1'), 4.44-4.34 (m, 2H, H-01/01'), 3.90-2.7 (m, 13.8H, H-2/2' - H-

9/9', H-11'/16',H-02/02' - H-05/05',H-06), 1.91 (s, 3H, H-08),  
1.55-1.05 (m, 0.5H, H-12-H-15).

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3269 (OH-Streck), 2919 (CH-Streck), 1601  
(C=O-Streck), 1373 (CH-Deformation), 1148  
(CN-Deformation), 1026 (COC-Streck), 662 (SC-Streck).

- Synthese der Adamantan-Triethylenglykol-Derivate

<sup>t</sup>Butyldimethyl(2-(2-chlorethoxy)ethoxy)ethoxy silan **12** (CAS: 145133-88-6)



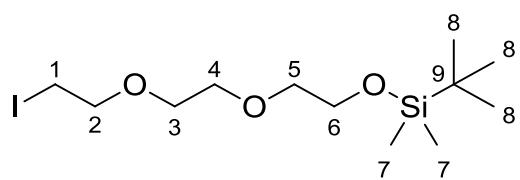
18.17 g (266.88 mmol, 3 Äq.) Imidazol und 17.43 g (115.65, 1.2 Äq.) <sup>t</sup>Butyldimethylsilylchlorid wurden zu einer Lösung von 15.0 g (59.30 mmol, 1 Äq.) 2-(2-Chlorethoxy)ethanol in 50 mL DMF<sub>abs</sub> gegeben und die Reaktionsmischung 20 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderter Druck entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen und einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Als Produkt konnte ein gelbliches Öl gewonnen werden.

Ausbeute: 25.27 g (89.34 mmol), **100%**

DC:  $R_f$  = 0.71 in Hexan / EE (7:3)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.76 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-6,),  
3.75 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-2,), 3.66 (s, 4H, H-3/4), 3.62 (t,  
2H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, H-1,), 3.56 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-5), 0.88 (s,  
9H, H-8), 0.06 (s, 6H, H-7).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 72.7 (C-2), 71.3 (C-3), 70.7  
(C-4/5), 62.7 (C-6), 42.6 (C-1), 25.9 (C-8), 18.3 (C-9), -5.3  
(C-7).

**<sup>t</sup>Butyldimethyl(2-(2-(2-iodethoxy)ethoxy)ethoxy)silan **13**** (CAS:127895-65-2)

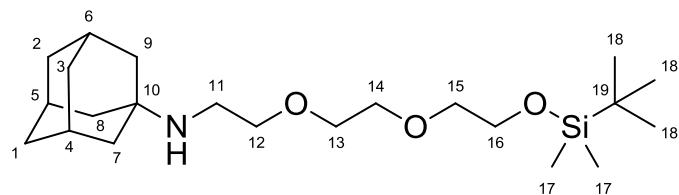
Zu einer Lösung von 25.0 g (89.31 mmol, 1 Äq.) **12** in 100 mL 3-Pentanon wurden 44.48 g (267.93 mmol, 3 Äq.) Kaliumiodid gegeben und die Suspension unter Rückfluss für 3 d gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösemittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und zweimal mit gesättigter Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Lösung sowie einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels unter verminderter Druck wurde ein gelbliches Öl gewonnen.

Ausbeute: 24.54 g (65.56 mmol), **73%**

DC: R<sub>f</sub> = 0.71 in Hexan / EE (7:3)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.77 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-6,), 3.76 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-2,), 3.67-3.64 (m, 4H, H-3/4), 3.56 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, H-5,), 3.25 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-1,), 0.89 (s, 9H, H-8), 0.06 (s, 6H, H-7).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 72.7 (C-2), 71.9 (C-3), 70.7 (C-4), 70.2 (C-5), 62.7 (C-6), 25.9 (C-8), 18.3 (C-9), 2.8 (C-1), -5.3 (C-7).

<sup>t</sup>Butyldimethyl(2-(2-(1-adamantylamino)ethoxy)ethoxyethoxy)silan **14**

Zu einer Lösung von 12.61 g (83.35 mmol, 1.3 Äq.) 1-Aminoadamantan in 150 mL DMF<sub>abs</sub> wurden 41.78 g (128.23 mmol, 2 Äq.) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 24.0 g (64.12 mmol, 1 Äq.) **13** gegeben und für 3 d bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde der Feststoff abfiltriert und DMF unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM / MeOH 9:1) gereinigt und das Produkt als gelbliches Öl isoliert.

Ausbeute: 17.79 g (44.73 mmol), **65%**

DC: R<sub>f</sub> = 0.35 in DCM / MeOH (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.82 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-12,), 3.75 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-16,), 3.65 (br s, 4H, H-13/14), 3.56 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-15,), 3.18 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-11,), 2.19 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.96-1.95 (m, 6H, H-7/8/9), 1.73-1.64 (m, 6H, H-1/2/3), 0.88 (s, 9H, H-18), 0.05 (s, 6H, H-17).

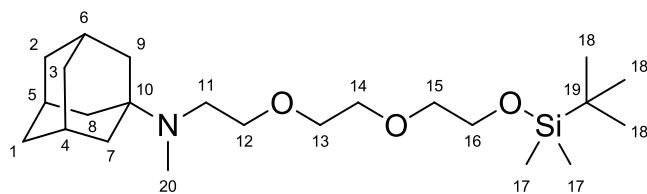
<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 72.5 (C-15), 70.4 (C-14), 70.2 (C-13), 65.8 (C-12), 62.6 (C-16), 57.5 (C-10), 40.1 (C-11), 38.5 (C-7/8/9), 35.5 (C-1/2/3), 28.9 (C-4/5/6), 25.9 (C-18), 18.3 (C-19), -5.3 (C-17).

ESI-MS: m/z<sub>exp</sub> = 398.49 [M+H]<sup>+</sup>

m/z<sub>theo</sub> = 398.31 [M+H]<sup>+</sup>

IR: ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> = 3420 (NH-Streck), 2852 (CH-Streck), 1655 (NH-Deformation), 1460 (CH-Deformation), 1361 (CN-Streck), 1097 (COC-Streck).

<sup>t</sup>Butyldimethyl(2-(2-(2-(N-methyl-N-1-adamantylamino)ethoxy)ethoxy)silan **15**



11.0 g (27.66 mmol, 1 Äq.) **14** wurden in 140 mL Acetonitril gelöst und 2.61 g (41.49 mmol, 1.5 Äq.) Natriumcyanoborhydrid sowie 27.4 mL (276.61 mmol, 10 Äq.) Formaldehyd (37%) dazugegeben. Der pH-Wert wurde mittels kalter Essigsäure auf 6 festgesetzt und die Lösung bei RT für 42 h gerührt. Nach Zugabe von 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wurde mittels 10%iger NaOH-Lösung der pH-Wert auf 12 erhöht und anschließend die Lösung dreimal mit DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderterem Druck entfernt. Als Produkt entstand ein klares, gelbliches Öl.

Ausbeute: 9.20 g (22.35 mmol), **81%**

DC: R<sub>f</sub> = 0.51 in DCM / MeOH (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.77 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, H-16,), 3.66-3.59 (m, 4H, H-13/14), 3.56 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, H-15,), 3.52 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-12,), 2.66 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-11,), 2.28 (s, 3H, H-20), 2.08 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.68-1.57 (m, 12H, H-1/2/3/7/8/9), 0.89 (s, 9H, H-18), 0.06 (s, 6H, H-17).

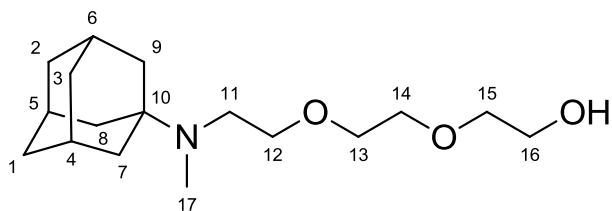
<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 72.6 (C-15), 71.1 (C-12), 70.6 (C-13), 70.5 (C-14), 62.7 (C-16), 54.6 (C-10), 48.8 (C-11), 38.3 (C-7/8/9), 36.7 (C-1/2/3), 34.7 (C-20), 29.5 (C-4/5/6), 25.9 (C-18), 18.3 (C-19), -5.3 (C-17).

ESI-MS: m/z<sub>exp</sub> = 412.45 [M+H]<sup>+</sup>

m/z<sub>theo</sub> = 412.33 [M+H]<sup>+</sup>

IR: ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> = 2903 (CH-Streck), 1462 (CH-Deformation), 1359 (CN-Streck), 1105 (COC-Streck).

**2-(2-(2-(*N*-Methyl-*N*-1-adamantylamino)ethoxy)ethoxy)ethanol **16****



9.00 g (21.86 mmol, 1 Äq.) **15** wurden in 300 mL Methanol gelöst und 6.35 g (109.31 mmol, 5 Äq.) Kaliumfluorid hinzugegeben. Die Lösung wurde 7 d bei RT gerührt und anschließend wurde das Lösemittel unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und der sich bildende Niederschlag abfiltriert. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 6 eingestellt und das Lösemittel unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zu einem Anionenaustauscher (Amberlite-IRA 402) in 100 mL H<sub>2</sub>O gegeben und es wurde 18 h geschüttelt. Nach Abtrennen des Anionenaustauschers wurde das Wasser an der Lyophile entfernt.

Ausbeute: 4.55 (15.30 mmol), **70%**

DC:  $R_f = 0.31$  in DCM / MeOH (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) = 3.75-3.73 (m, 2H, H-12,), 3.69-3.67(m, 2H, H-16,), 3.64-3.62 (m, 4H, H-13/14), 3.54 (t, 2H,  $^3J = 6.4$  Hz, H-15,), 2.65 (t, 2H,  $^3J = 6.8$  Hz, H-11,), 2.28 (s, 3H, H-17), 2.08 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.68-1.57 (m, 12H, H-1/2/3/7/8/9).

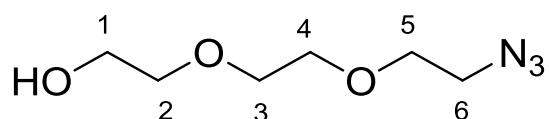
<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 72.7 (C-15), 70.2 (C-12), 70.2 (C-13), 67.3 (C-14), 61.5 (C-16), 48.8 (C-11), 43.8 (C-10), 36.6 (C-7/8/9), 35.8 (C-1/2/3), 34.0 (C-17), 29.3 (C-4/5/6).

ESI-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 298.19$  [M+H]<sup>+</sup>

$m/z_{\text{theo}} = 298.24$  [M+H]<sup>+</sup>

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3345$  (OH-Streck), 2907 (CH-Streck), 1450 (CH-Deformation), 1364 (CN-Streck), 1105 (COC-Streck).

**2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **17** (CAS 86520-52-7)**



Zu einer Lösung von 10.01 g (59.30 mmol, 1 Äq.) 2-(2-Chloroethoxy)ethanol in 80 mL DMF<sub>abs</sub> wurden 7.80 g (119.90 mmol, 2 Äq.) Natriumazid zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde unter Rückfluss 20 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (EE) aufgenommen und zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereint und dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter verminderter Druck wurde das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 8.79 g (50.17 mmol), **85%**

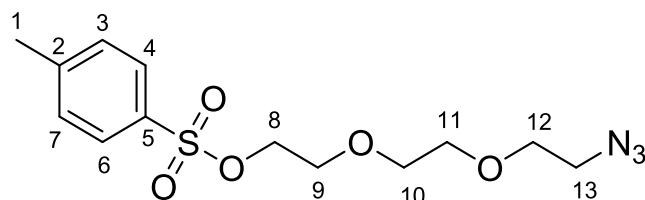
DC: R<sub>f</sub> = 0.65 in DCM / MeOH (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.74 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, H-1,), 3.70-3.67 (m, 6H, H-3/4/5), 3.62 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, H-2,), 3.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-6,), 2.32 (br s, 1H, OH).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 72.4 (C-2), 70.5 (C-3), 70.3 (C-4), 69.9 (C-5), 61.6 (C-1), 50.5 (C-6).

**2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat **18****

(CAS 178685-33-1)



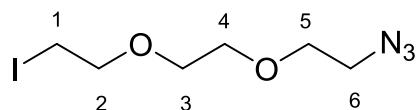
Es wurden 7.96 g (45.46 mmol, 1 Äq.) **17** in 240 mL DCM<sub>abs</sub> gelöst. Zur gerührten Lösung wurden 32 mL (230.85 mmol, 5 Äq.) destilliertes NEt<sub>3</sub> sowie 568 mg (4.65 mmol, 0.1 Äq.) DMAP zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und langsam eine Lösung von 22.01 g (115.45 mmol, 2.5 Äq.) Tosylchlorid in 130 mL DCM<sub>abs</sub> zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und 18 h gerührt. Die besagte Mischung wurde einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> sowie einmal mit 0.1 M HCl gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden dreimal mit DCM extrahiert, vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Hexan/EE 2:1) gereinigt und das Produkt als gelbliches Öl isoliert.

Ausbeute: 12.15 g (36.89 mmol), **81%**DC: R<sub>f</sub> = 0.31 in Hexan/EE (2:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 7.79 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 12.0 Hz, H-4/6,), 7.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, H-3/7,), 4.16 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, H-8,), 3.70 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, H-9,), 3.64 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-12,), 3.60 (s, 4H, H-10/11), 3.36 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-13,), 2.44 (s, 3H, H-1).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 144.8 (C-5), 132.9 (C-2), 129.8 (C-3/7), 127.9 (C-4/6), 70.7 (C-10), 70.5 (C-11), 70.0 (C-12), 69.2 (C-9), 68.7 (C-8), 50.6 (C-13), 21.6 (C-1).

**1-Azido-2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethan **19** (CAS 1309457-01-9)**



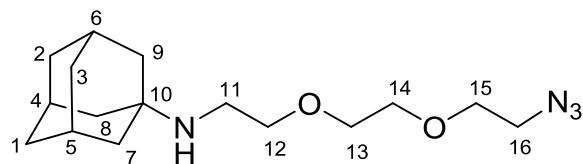
11.59 g (35.18 mmol, 1 Äq.) **18** wurden in 100 mL DMF<sub>abs</sub> gelöst und 15.71 g (104.81 mmol, 3 Äq.) Natriumiodid unter Rühren zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 50°C erhitzt und 4 d gerührt. Unter verminderter Druck wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen und einmal mit gesättigter Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung sowie einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Als Produkt konnte ein gelbliches Öl gewonnen werden.

Ausbeute: 9.71 g (34.05 mmol), **97%**

DC:  $R_f = 0.85$  in DCM/MeOH (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.77 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-2), 3.71-3.68 (m, 6H, H-3/4/5), 3.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-6), 3.27 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-1).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 71.9 (C-2), 70.6 (C-5), 70.2 (C-4), 70.1 (C-3), 50.6 (C-6), 2.8 (C-1).

**N-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)adamantan-1-amin **20****

Zu einer Lösung von 6.55 g (43.30 mmol, 1.3 Äq.) 1-Aminoadamantan in 80 mL DMF<sub>abs</sub> wurden 23.55 g (72.28 mmol, 2 Äq.) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Dann wurden 9.49 g (33.29 mmol, 1 Äq.) **19** beigefügt und die Reaktionsmischung 48 h bei 80°C gerührt. Nach Filtrieren der Reaktionsmischung wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und nochmals filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, DCM/MeOH 95:5) gereinigt. Das Produkt wurde als ein gelbliches Öl isoliert.

Ausbeute: 6.80 g (22.06 mmol), **66%**

DC: R<sub>f</sub> = 0.35 in DCM/MeOH (9:1)

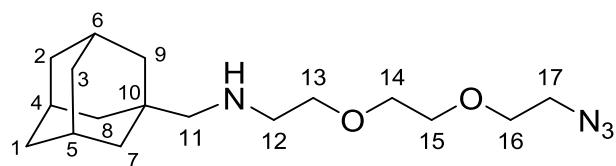
<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.72-3.64 (m, 8H, H-12/13/14/15), 3.39 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-16), 2.99 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-11), 2.12 (br s, 3 H, H-4/5/6), 1.81-1,80 (m, 6 H, H-7/8/9), 1,70-1,61 (m, 6H, H-1/2/3).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 72.4 (C-15), 70.6 (C-12), 70.2 (C-14), 69.9 (C-13), 50.6 (C-10), 50.5 (C-16), 40.4 (C-7/8/9), 39.9 (C-11), 36.0 (C-1/2/3), 29.2 (C-4/5/6).

ESI-MS: m/z<sub>exp</sub>= 309.7 [M+H]<sup>+</sup>

m/z<sub>theo</sub>= 309.2 [M+H]<sup>+</sup>

IR: ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> = 2904 (CH-Streck), 2095 (N<sub>3</sub>-Streck), 1452 (CH-Deformation), 1295 (CNC-Streck), 1115 (COC-Streck).

**N-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxyethyl)-N-adamantan-1-methylamin 21**

3.90 g (11.97 mmol, 2 Äq.) Caesiumcarbonat wurde in 30 mL DMF<sub>abs.</sub> gegeben und mit 925 mg (5.60 mmol; 1 Äq.) 1-Adamantyl-methylamin versetzt. Nach 10 min wurden 2.05 g (7.19 mmol; 1,2 Äq.) **19** hinzugefügt. Die Suspension wurde bei 50°C für 24 h gerührt. Caesiumcarbonat wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen und dreimal mit je 20 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (Gradient; DCM/MeOH, 95:5 zu 9:1). Als Produkt konnte ein gelb-rötliches Öl isoliert werden.

Ausbeute: 1,05 g (3,3 mmol), **58%**

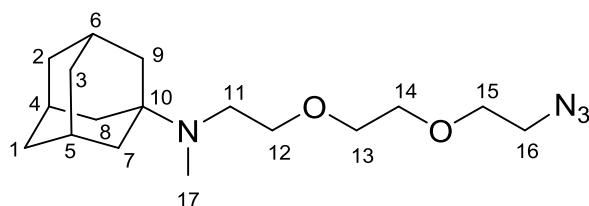
DC: R<sub>f</sub> = 0,29 in DCM/Methanol (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.76 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-13), 3.70-3.67 (m, 7H, H-14/15/16,NH), 3.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz H-17), 3.15 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, H-12), 2.64 (s, 2H, H-11), 1.99 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.73-1.60 (m, 12H, H-1/2/3/7/8/9).

<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 70.6 (C-16), 70.3 (C-15), 70.0 (C-14), 61.7 (C-10), 60.9 (C-11), 50.6 (C-17), 49.1 (C-12), 39.8 (C-7/8/9), 36.6 (C-1/2/3), 28.0 (C-4/5/6).

ESI-MS: m/z<sub>exp</sub> = 323,4 [M+H]<sup>+</sup>

m/z<sub>theo</sub> = 322,2 [M+H]<sup>+</sup>

**N-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-N-methyladamantan-1-amin 22**

6.51 g (22.13 mmol, 1 Äq.) **20** wurden in 90 mL Acetonitril vorgelegt. Zur gerührten Lösung wurden zunächst 9.0 mL einer 37%-igen Formalinlösung (110.89 mmol, 5 Äq.), danach 2.09 g (33.26 mmol, 1.5 Äq.) Natriumcyanoborhydrid beigefügt. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf 6 eingestellt. Innerhalb einer Stunde wurde der pH-Wert mit wenigen Tropfen Essigsäure auf 6 gehalten. Die Mischung wurde 18 h bei RT gerührt und dann durch Zugabe von 35 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und einigen Tropfen 50%-iger NaOH-Lösung auf pH 12 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 150 mL DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Gradient DCM bis DSC/10% MeOH) gereinigt. Als Produkt konnte ein bräunliches Öl entnommen werden.

Ausbeute: 3.44 g (10.68 mmol), **48%**

DC: R<sub>f</sub> = 0.42 in DCM/MeOH (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 3.87 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, H-12,), 3.68-3.65 (m, 6H, H-13/14/15), 3.38 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, H-16,), 3.14 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, H-11,), 2.78 (s, 3H, H-17), 2.23 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.94 (s, 6H, H-7/8/9), 1.68 (q, 6H, <sup>3</sup>J = 13.6 Hz, H-1/2/3,).

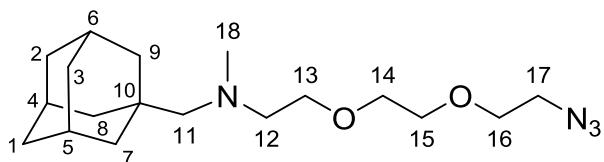
<sup>13</sup>C-NMR: δ/ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 70.3 (C-12), 70.2 (C-15), 69.3 (C-13/14), 66.7 (C-11), 50.5 (C-16), 49.3 (C-10), 36.4 (C-7/8/9), 35.5 (C-1/2/3), 34.5 (C-17), 29.3 (C-4/5/6).

ESI-MS: m/z<sub>exp</sub> = 324.1 [M+H]<sup>+</sup>

m/z<sub>theo</sub> = 323.24 [M+H]<sup>+</sup>

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 2910 (CH-Streck), 2096 ( $\text{N}_3$ -Streck), 1295 (CN-Streck), 1313 (COC-Streck).

**N-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-N-methyladamantan-1-methylamin 23**



Zu einer Lösung von 799 mg **21** (2,5 mmol; 1 Äq.) in 9 mL Acetonitril wurde unter Stickstoff-Atmosphäre 1 mL Formalin-Lösung (37%ig; 15 mmol; 6 Äq.) gegeben und anschließend unter Röhren mit 235 mg  $\text{NaCNBH}_3$  (3.75 mmol; 1,5 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde innerhalb von 30 min mit konzentrierter Essigsäure auf pH 6 eingestellt, bis der pH-Wert konstant blieb. Nach 48 h Stunden wurden der Reaktionslösung 6 mL Wasser hinzugefügt und der pH mit 50%iger NaOH-Lösung auf pH 12 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung dreimal mit je 20 mL DCM extrahiert und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Einengen der organischen Phase wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Gradient; DCM/MeOH 98:2 zu 9:1) und das Produkt als leicht gelbliches Öl isoliert.

Ausbeute: 403 mg (1,2 mmol), **48%**

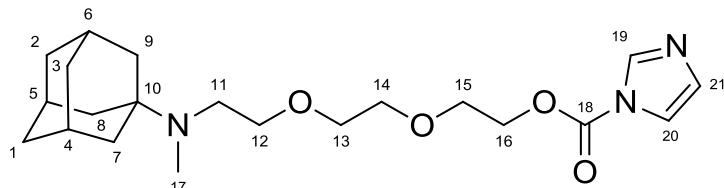
DC:  $R_f = 0,37$  in DCM/Methanol (9:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) = 3.69-3.64 (m, 8H, H-13/14/15/16), 3.39 (t, 2H,  $^3J = 4.4$  Hz, H-17), 2.87 (br s, 2H, H-12), 2.54 (br s, 3H, H-18), 2.33 (br s, 2H, H-11), 1.97 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.72-1.62 (m, 6H, H-1/2/3), 1.54 (br s, 6H, H-7/8/9).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 71.2 (C-11), 70.5 (C-16), 70.4 (C-15), 70.0 (C-14), 68.9 (C-13), 59.6 (C-12), 50.6 (C-17), 49.1 (C-10), 46.6 (C-18), 40.6 (C-7/8/9), 36.8 (C-1/2/3), 28.2 (C-4/5/6).

ESI-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 337.2 [\text{M}+\text{H}]^+$   
 $m/z_{\text{theo}} = 336.3 [\text{M}+\text{H}]^+$

2-(2-(2-(*N*-Methyl-*N*-1-adamantylamino)ethoxy)ethoxy)ethyl-1*H*-imidazol-1-carboxylat **24**



In 10 mL DMF<sub>abs</sub> wurden 200 mg (0,67 mmol, 1 Äq.) **16** gelöst und 240 mg (1,48 mmol, 2,2 Äq.) CDI dazugegeben. Die Lösung wurde für 18 h unter Rückfluss gerührt und anschließend auf RT abgekühlt. Danach wurde die Lösung zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und anschließend die Wasserphase zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindernden Druck entfernt und ein hellbraunes Öl als Produkt entnommen.

Ausbeute: 225 mg (0,57 mmol), **86%**

DC:  $R_f = 0.48$  in DCM / Methanol (9:1)

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 8.15 (s, 1H, H-arom), 7.44 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 1.2, H-arom), 7.06-7.05 (m, 1H, H-arom), 4.56-4.54 (m, 2H, H-16), 3.84-3.82 (m, 2H, H-15), 3.68-3.60 (m, 4H, H-13/14), 3.50 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-12), 2.63 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-11), 2.26 (s, 3H, H-17), 2.06 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.66-1.55 (m, 12H, H-1/2/3/7/8/9).

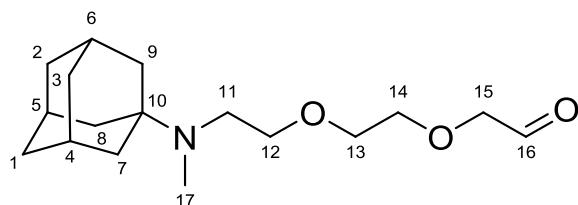
<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 148,7 (C-18), 137,2 (C-arom), 130,6 (C-arom), 117,2 (C-arom), 71,2 (C-12), 70,7 (C-13), 70,3 (C-14), 68,6 (C-15), 67,1 (C-16), 54,5 (C-10), 48,7 (C-11), 38,4 (C-7/8/9), 36,7 (C-1/2/3), 34,7 (C-17), 29,5 (C-4/5/6).

ESI-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 392,48 [\text{M}+\text{H}]^+$

$m/z_{\text{theo}} = 392,26 [\text{M}+\text{H}]^+$

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 2902$  (CH-Streck), 1749 (C=O-Streck), 1450 (CH-Deformation), 1357 (CN-Streck), 1262 (CO-Streck), 1118 (COC-Streck).

### 2-(2-(2-(*N*-Methyl-*N*-1-adamantylamino)ethoxy)ethoxy)acetaldehyd **25**



0,34 mL (3,02 mmol, 1,5 Äq.) Oxalylchlorid wurde in 2mL DCM<sub>abs.</sub> gelöst und auf -78°C gekühlt. Langsam wurden 0,43 mL (6,03 mmol, 3 Äq.) DMSO<sub>abs.</sub> in 0,5 mL DCM<sub>abs.</sub> hinzugegeben. Nach einem 45 minütigem Rührvorgang wurde 600 mg (2,01 mmol, 1 Äq.) **16** in 1,7 mL DCM<sub>abs.</sub> hinzugegeben. Erneut wurde ein Rührvorgang von diesmal 60 min vorgenommen. Danach wurden 1,24 mL (12,1 mmol, 6 Äq.) destilliertes Triethylamin langsam dazu getropft. Die Lösung wurde 16 h auf RT erwärmt. Durch Zugabe von 10 mL NaHCO<sub>3ges.</sub> konnte die Reaktion gestoppt werden. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde zweimal mit NaCl<sub>ges.</sub> gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen konnten über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet werden. Unter verminderter Druck wurde das Lösungsmittel entfernt, sodass als Produkt ein braunes Öl isoliert werden konnte.

Ausbeute: 222 mg (0,75 mmol), **37%**

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta/\text{ppm}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 9.74 (s, 0.46H, H-16), 4.16 (s, 1.0H, H-15), 3.74-3.58 (m, 6H, H-12/13/14), 2.71 (br s, 2H, H-11), 2.33 (br s, 3H, H-17), 2.09 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.71-1.58 (m, 12H, H-1/2/3/7/8/9).

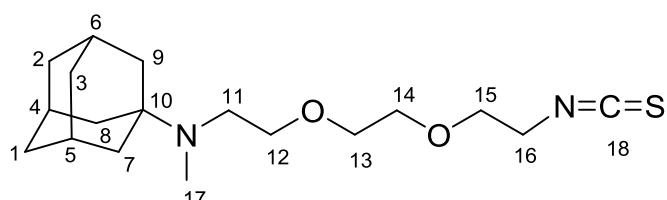
$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 200.9 (C-16), 76.8 (C-15), 71.2 (C-12), 70.5 (C-13), 48.8 (C-11), 41.0 (C-10), 38.2 (C-7/8/9), 36.6 (C-1/2/3), 34.7 (C-17), 29.5 (C-4/5/6).

ESI-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 296,22 [\text{M}+\text{H}]^+$

$m/z_{\text{theo}} = 296,22 [\text{M}+\text{H}]^+$

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 2901$  (CH-Streck), 1738 (C=O-Streck), 1450 (CH-Deformation), 1358 (CN-Streck), 1102 (COC-Streck).

### *N*-(2-(2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethoxy)ethyl)-*N*-methyladamantan-1-amin **26**



Zu einer gerührten Lösung von 601.18 mg (1.68 mmol, 1 Äq.) **22** in 60 mL Dioxan<sub>abs</sub> wurden 1.44 g (18.91 mmol, 10 Äq.)  $\text{CS}_2$  und 536.62 mg (2.04 mmol, 1.1 Äq.) Triphenylphosphin hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h auf 80°C erhitzt. Unter verminderter Druck wurden  $\text{CS}_2$  und Dioxan entfernt, der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Gradient DCM, bis 100% MeOH) und als Produkt wurde ein bräunliches Öl gewonnen.

Ausbeute: 619 mg (1.83 mmol), **98%**

DC:  $R_f = 0.35$  in DCM/MeOH (9:1)

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) = 4.04-3.61 (m, 12H, H-11/12/13/14/15/16), 2.90 (s, 3H, H-17), 2.27 (br s, 3H, H-4/5/6), 2.02 (s, 6H, H-7/8/9), 1.70 (q, 6H, H-1/2/3,  $^3J = 12.0$  Hz).

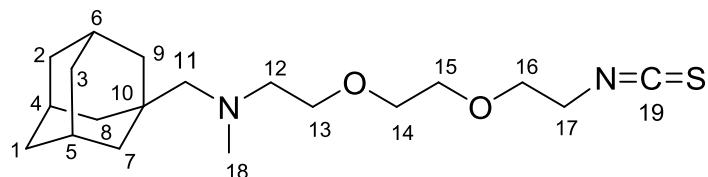
$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 148.5 (C-18), 70.3 (C-12/15), 68.9 (C-13/14), 66.1 (C-11), 49.6 (C-10/16), 36.2 (C-7/8/9), 35.4 (C-1/2/3), 34.7 (C-17), 29.3 (C-4/5/6).

ESI-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 340.0 [\text{M}+\text{H}]^+$

$m/z_{\text{theo}} = 339.20 [\text{M}+\text{H}]^+$

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 2913$  (CH-Streck), 2109 (NCS-Streck), 1415 (CH-Deformation), 1317 (COC-Streck).

*N*-(2-(2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethoxy)ethyl)-*N*-methyladamantan-1-methylamin **27**



Zu einer rührenden Lösung von 907 mg **23** (2,7 mmol; 1 Äq.) in 5 mL absolutem Dioxan wurden 779 mg Triphenylphosphin (2,97 mmol; 1,1 Äq.) und 1,63 mL Schwefelkohlenstoff (27 mmol; 10 Äq.) gegeben und für 18 h bei 80°C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Das Lösemittel wurde abgedampft und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH, 95:5). Das Produkt wurde als gelb-orangene Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute: 538 mg (1,53 mmol), **57%**

DC:  $R_f = 0,31$  in DCM / MeOH (9:1)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) = 3.69-3.58 (m, 10 H, H-13-H-17), 2.98 (br s, 2H, H-12), 2.63 (br s, 3 H, H-18), 2.48 (br s, 2H, H-11), 1.94 (br s, 3H, H-4/5/6), 1.68-1.58 (m, 6H, H-1/2/3), 1.53 (br s, 6H, H-7/8/9).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta/\text{ppm}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 162.7 (C-19), 71.0 (C-11), 70.5 (C-16), 70.3 (C-15), 70.2 (C-13), 70.1 (C-14), 69.1 (C-12), 59.5 (C-17), 49.0 (C-10), 36.5 (C-7/8/9), 34.2 (C-18), 31.4 (C-1/2/3), 28.1 (C-4/5/6).

ESI-MS:  $m/z_{\text{exp}} = 353,9 [\text{M}+\text{H}]^+$

$m/z_{\text{theo}} = 352,2 [\text{M}+\text{H}]^+$

IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 2901$  (CH-Streck), 2050 (NCS-Streck), 1438 (CH-Deformation), 1100 (COC-Streck)

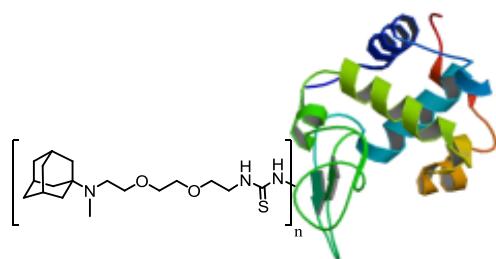
- Synthese der adamantylierten Proteine

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift AA1

44.8  $\mu\text{mol}$  (3.6 Äq./Lysin) **24/26** wurden in 1 mL DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ -Gemisch (3:2) gelöst. Dem hinzugegeben wurden 0.83  $\mu\text{mol}$ , (1.0 Äq.) humanes Lysozym. Die Reaktionslösung wurde bei RT für eine Dauer nach Tabelle 5 gerührt wurde. Nach Zugabe von 3,6 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  wurde der pH-Wert mittels 1 M Salzsäure auf 2 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde in einen Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 2, 5 kDa PES-Membran, 5000 U/min, 10min) gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  5-Mal ultrafiltriert. Der Rückstand wurde gefriergetrocknet und es konnte ein weißer Feststoff gewonnen werden.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift AA2

96,25  $\mu\text{mol}$  (4.3 Äq./Lysin) **24/26/27** wurden in 1 mL 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,5) gelöst. 0,39  $\mu\text{M}$  humanes Tf (1 Äq.) wurden in 1 mL 0,1 M Phosphatpuffer gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Die Mischung wurde bei RT für eine Dauer nach Tabelle 5 gehört. Dann wurden 2 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  hinzugefügt und die Lösung im Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 4, 10 kDa PES-Membran, 5000 U/min, 10min) gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  zehnmal ultrafiltriert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und es konnte ein rötlicher Feststoff gewonnen werden.

**Adamantan-Lysozym-Konjugat 28****Synthese nach AA1**

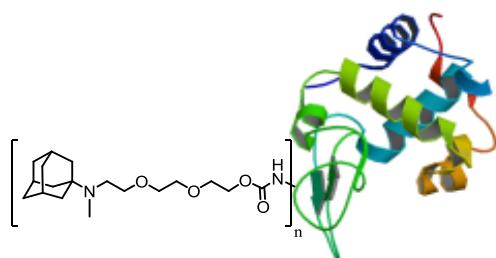
Ausbeute: 6.6 mg (0.43 µmol, **63%**)

MALDI-TOF-MS: m/z = 15053 (1-Fach modifiziert)

m/z = 15381 (2-Fach modifiziert)

m/z = 15718 (3-Fach modifiziert)

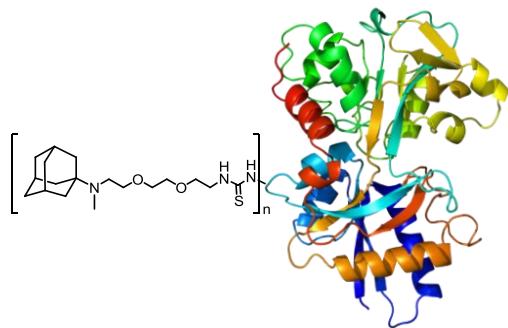
m/z = 16049 (4-Fach modifiziert)

**Adamantan-Lysozym-Konjugat 29****Synthese nach AA1**

Ausbeute: 11.2 mg (0.75 µmol, **89%**)

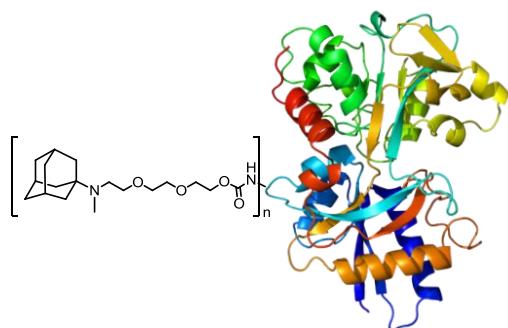
MALDI-TOF-MS: m/z = 15011 (1-Fach modifiziert)

m/z = 15335 (2-Fach modifiziert)

**Adamantan-Transferrin-Konjugat 30****Synthese nach AA2**

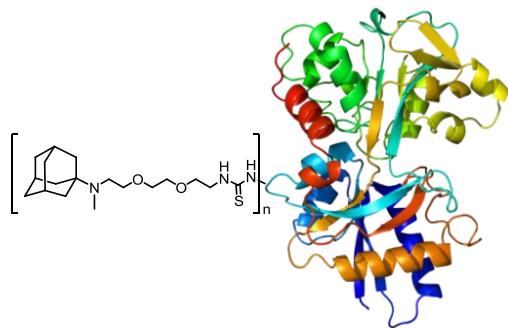
Ausbeute: 11 mg (0.13 µmol, **54%**)

MALDI-TOF-MS: m/z = 82217 (11-12-Fach modifiziert).

**Adamantan-Transferrin-Konjugat 31****Synthese nach AA2**

Ausbeute: 32 mg (0.41 µmol, **81%**)

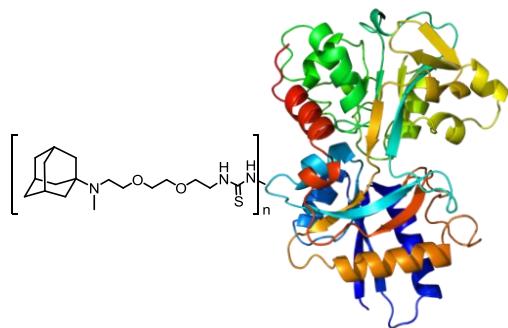
MALDI-TOF-MS: m/z = 78968 (1-2-Fach modifiziert).

**Adamantan-Transferrin-Konjugat 32**

Synthese nach AA2

Ausbeute: 22 mg (0.28 µmol, **72%**)

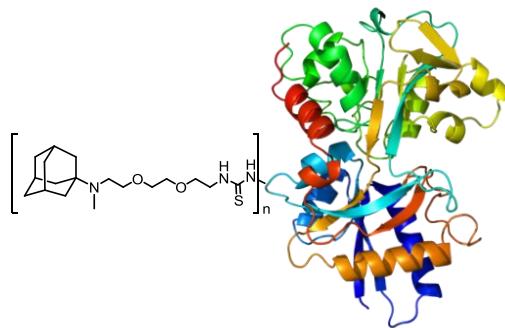
MALDI-TOF-MS: m/z = 79206 (2-Fach modifiziert).

**Adamantan-Transferrin-Konjugat 33**

Synthese nach AA2

Ausbeute: 23 mg (0,29 µmol, **73%**)

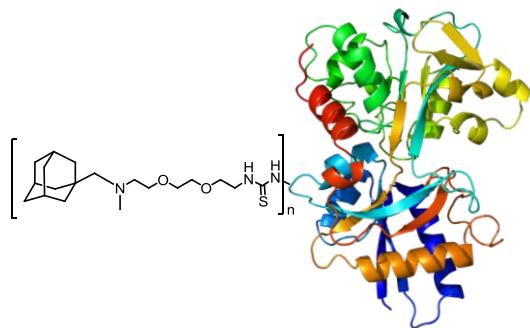
MALDI-TOF-MS: m/z = 80396 (6-Fach modifiziert).

**Adamantan-Transferrin-Konjugat 34**

Synthese nach AA2

Ausbeute: 24 mg (0,30  $\mu\text{mol}$ , **77%**)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 79513$  (3-4-Fach modifiziert).

**Adamantan-Transferrin-Konjugat 35**

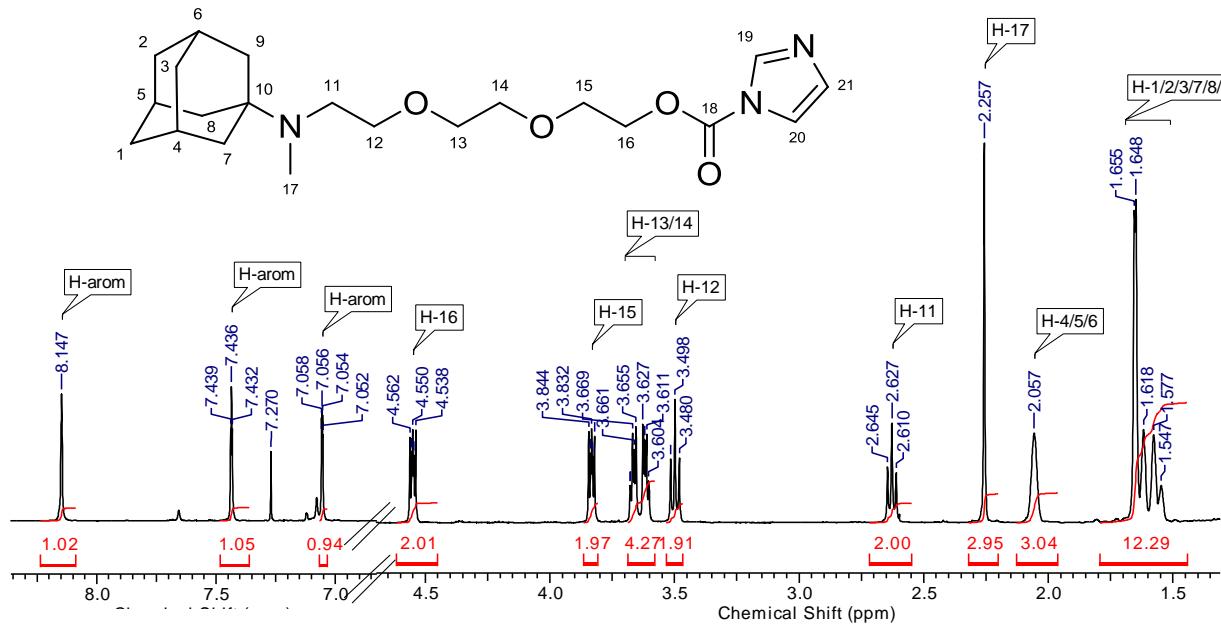
Synthese nach AA2

Ausbeute: 15 mg (0,18  $\mu\text{-mol}$ , **100%**)

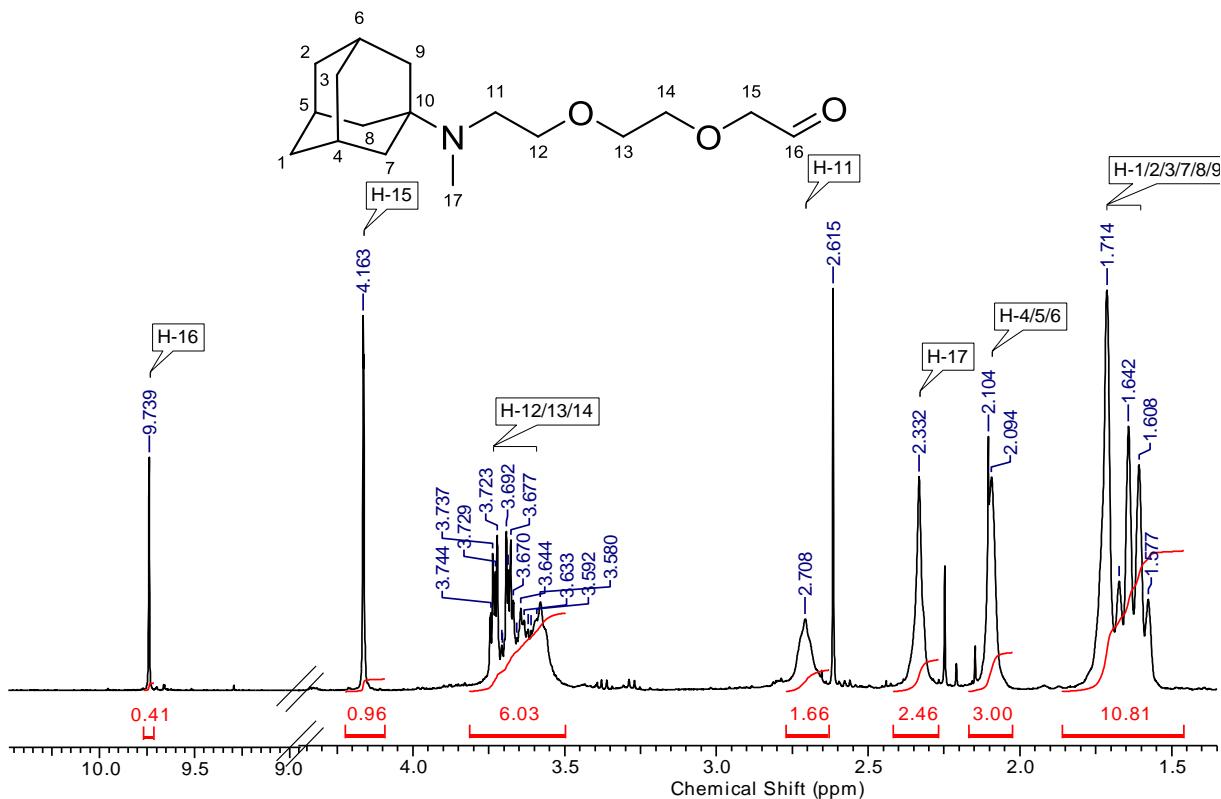
MALDI-TOF-MS:  $m/z = 81261$  (8-9-Fach modifiziert).

## 10 Anhang

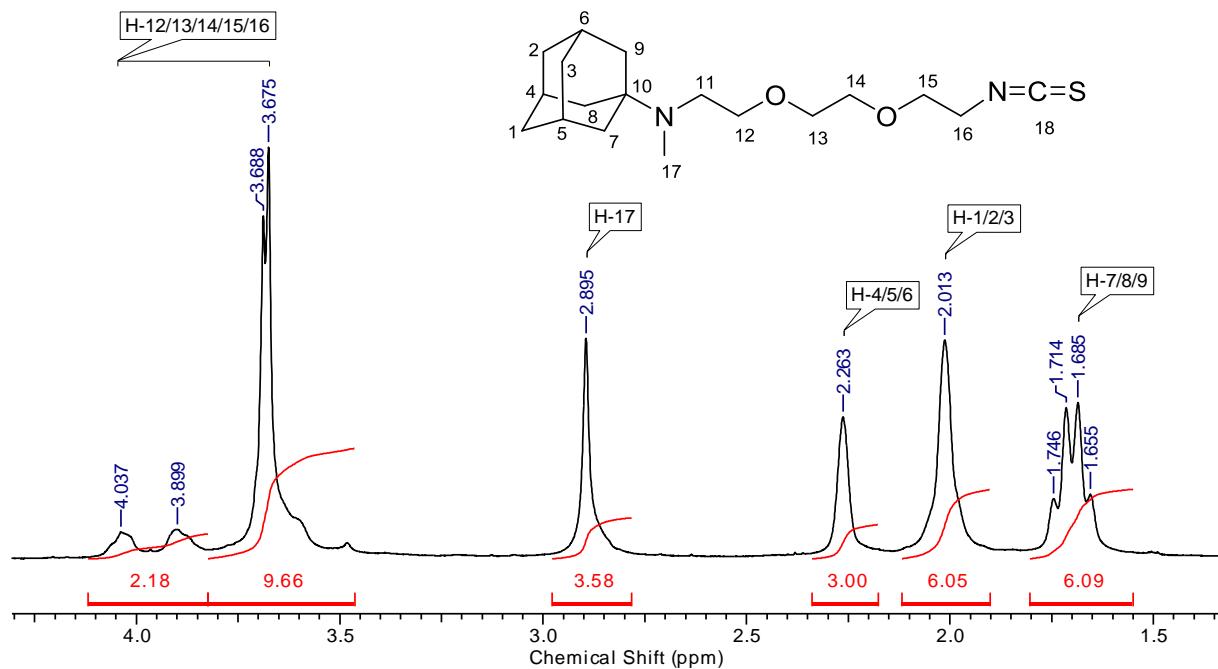
- NMR-Spektren



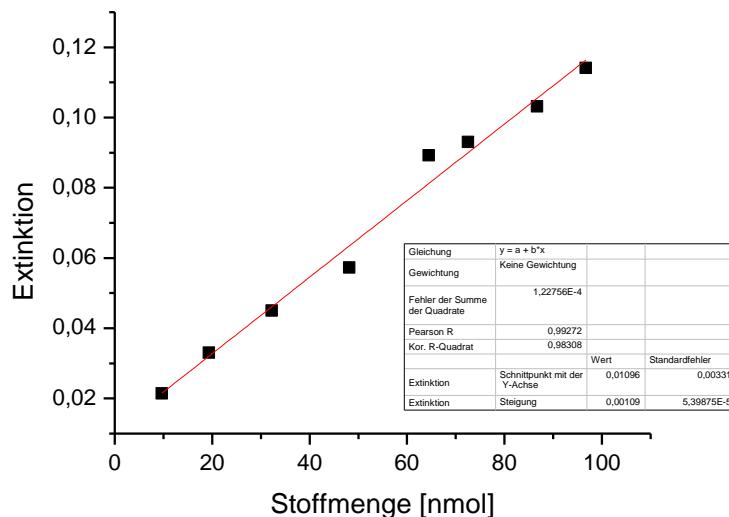
Protonenspektrum von **24** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



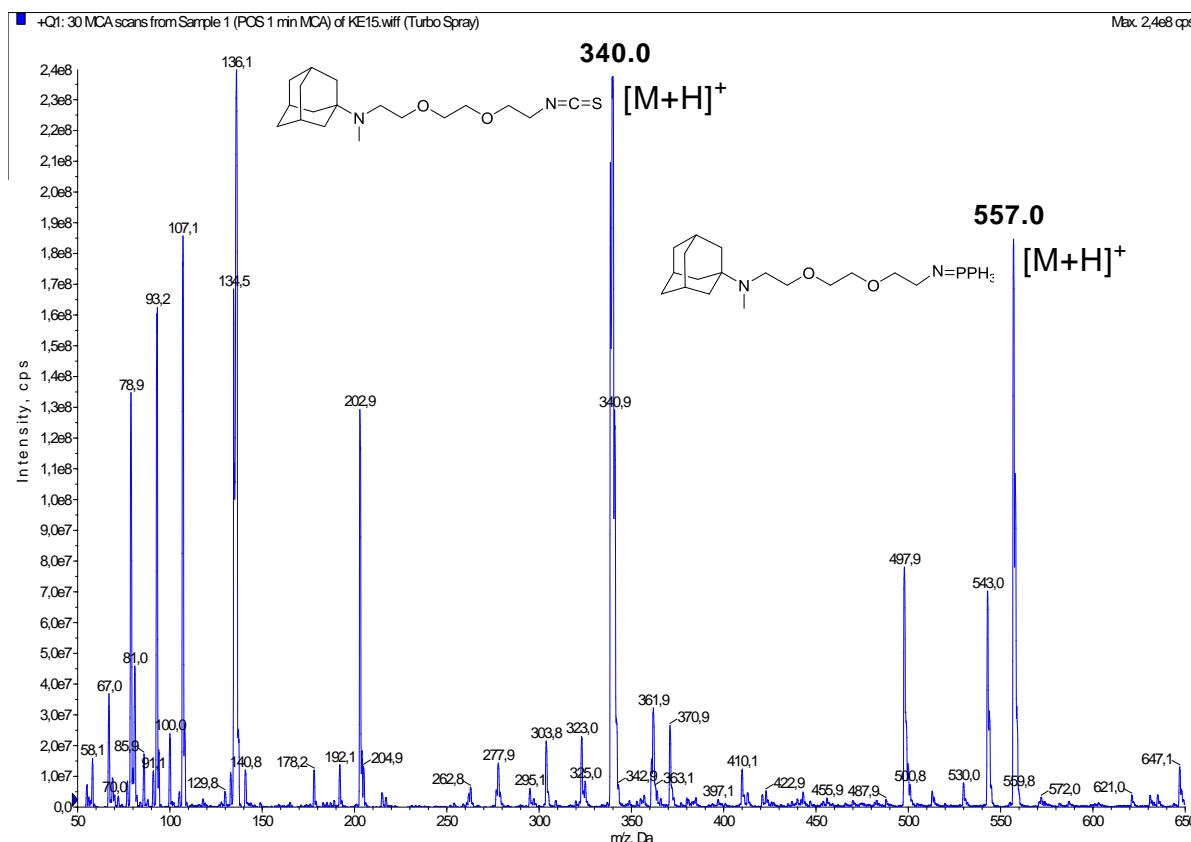
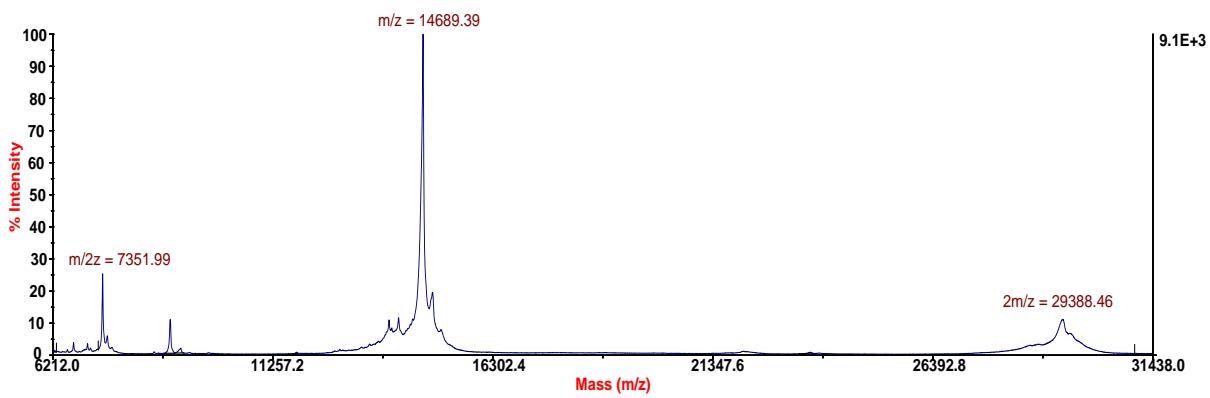
Protonenspektrum von **25** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Protonenspektrum des **26** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

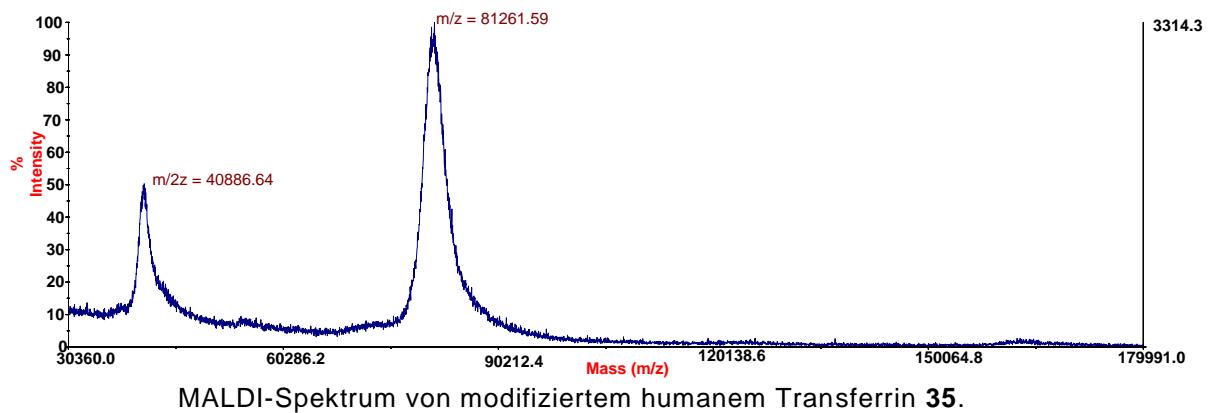
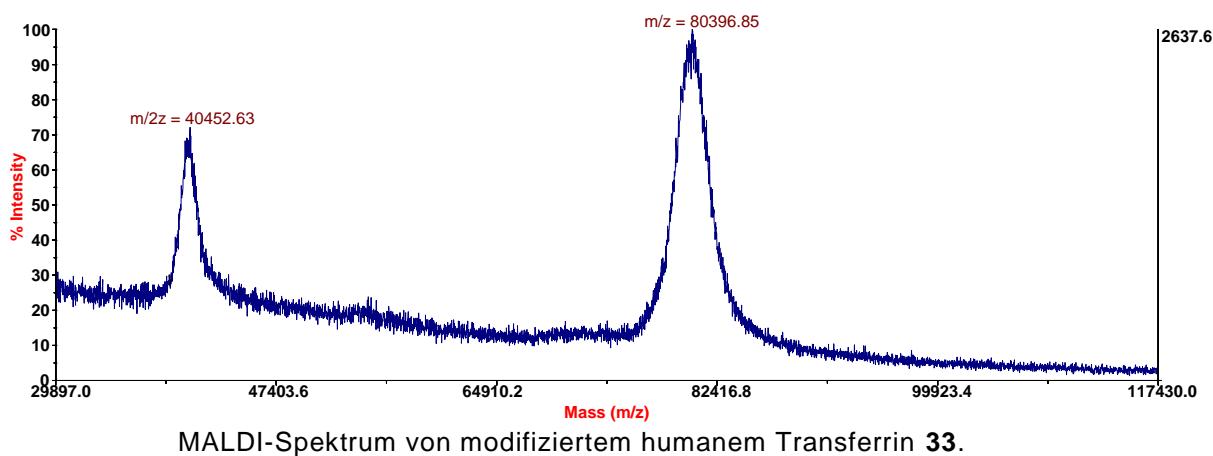
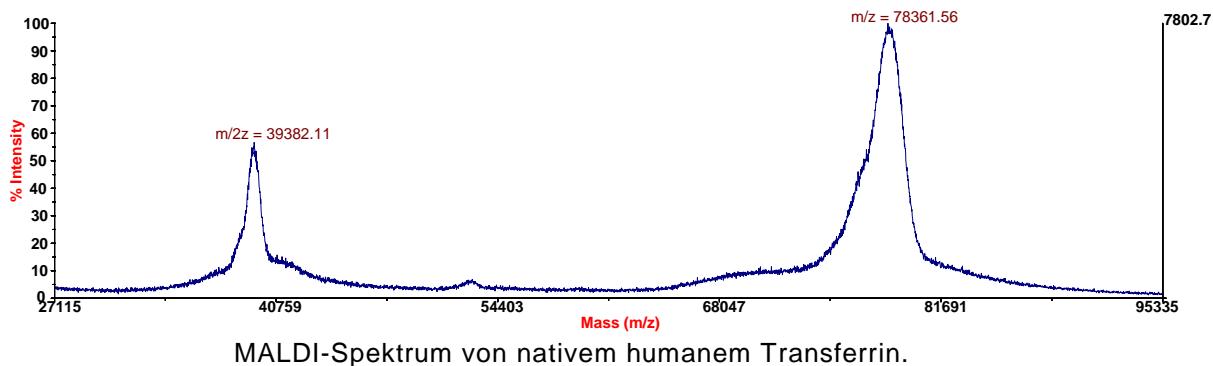
- Amindetektion mit TNBSA

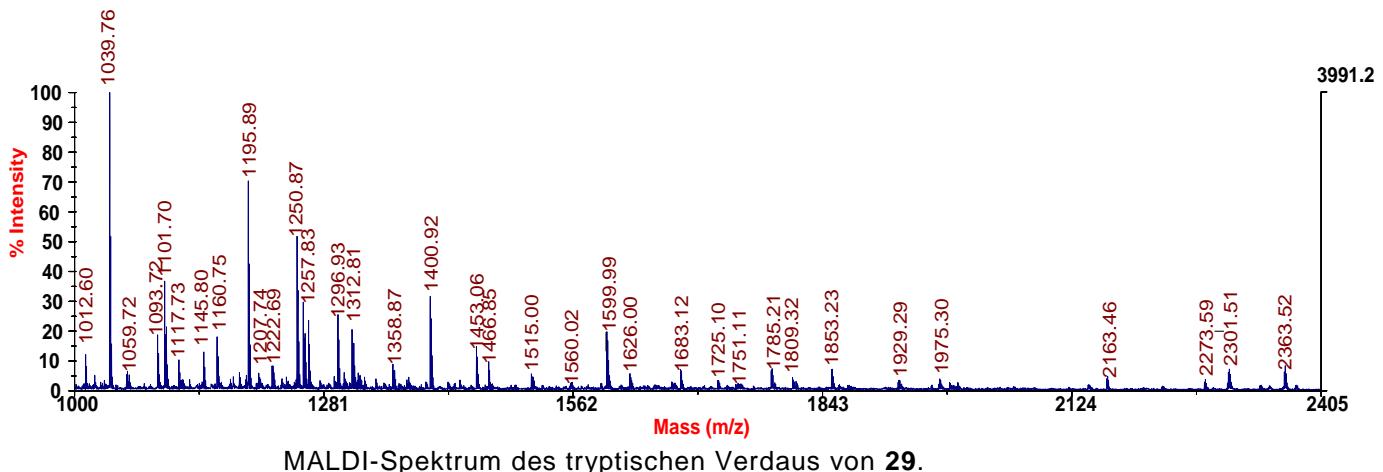
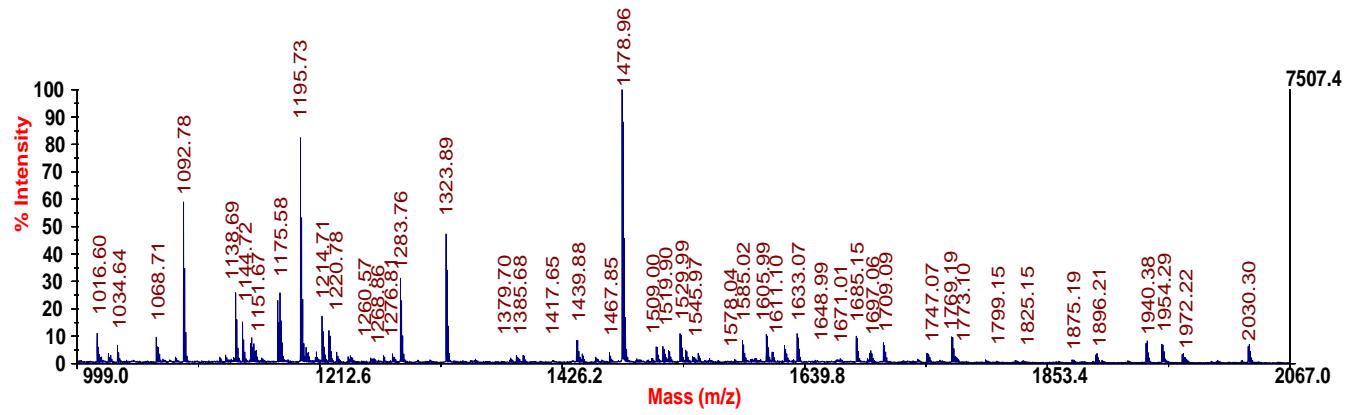
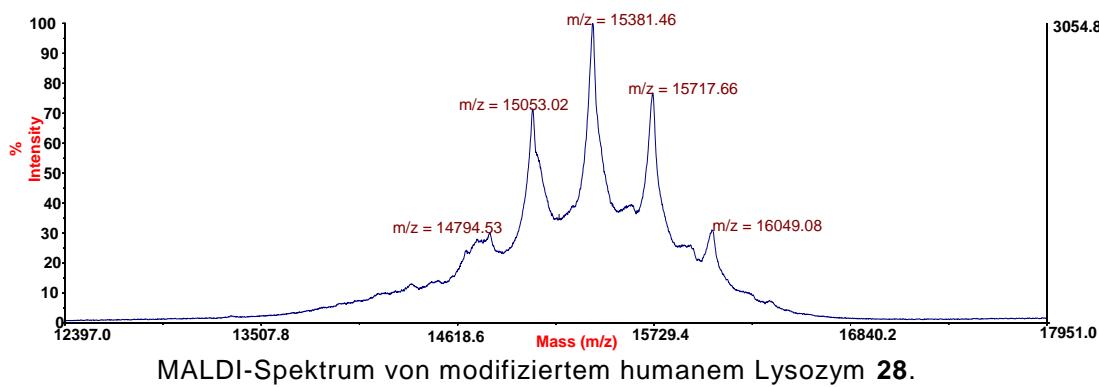
Kalibrierung der Amindetektion mittels Mono-Cys- $\beta$ -CD

- Massenspektren

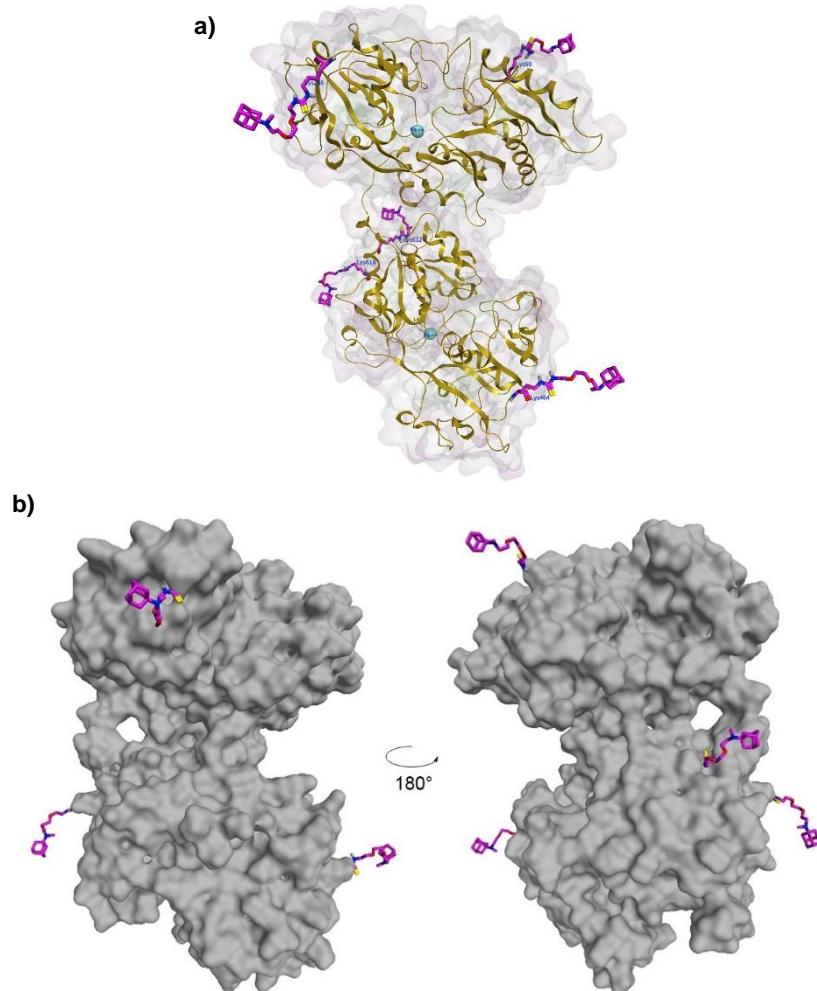
ESI-Massenspektrum von **26**.

MALDI-Spektrum von nativem humanem Lysozym.





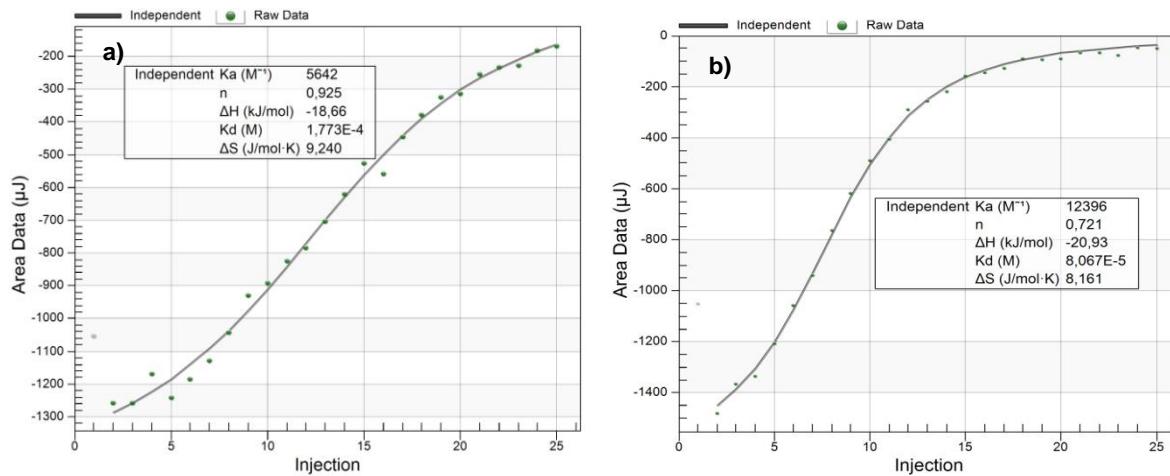
- Molecular Modelling



**a)** Bändermodell von adamantyiertem Transferrin **34**: Proteinrückgrad (Gold), eingeführte Adamantan-TEG-Gruppen (magenta)

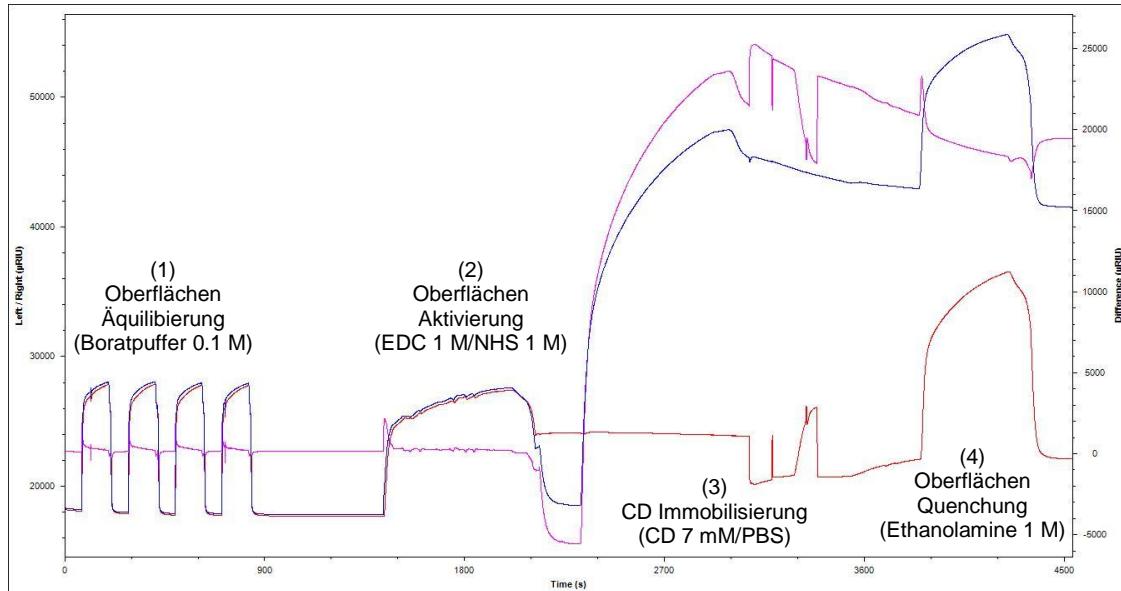
**b)** Oberflächendarstellung von adamantyiertem Transferrin **34**: Proteinoberfläche (grau), Adamantan-TEG-Gruppen (magenta), Vorderansicht (links), Rückansicht (rechts).

- Isotherme-Titrations-Kalorimetrie

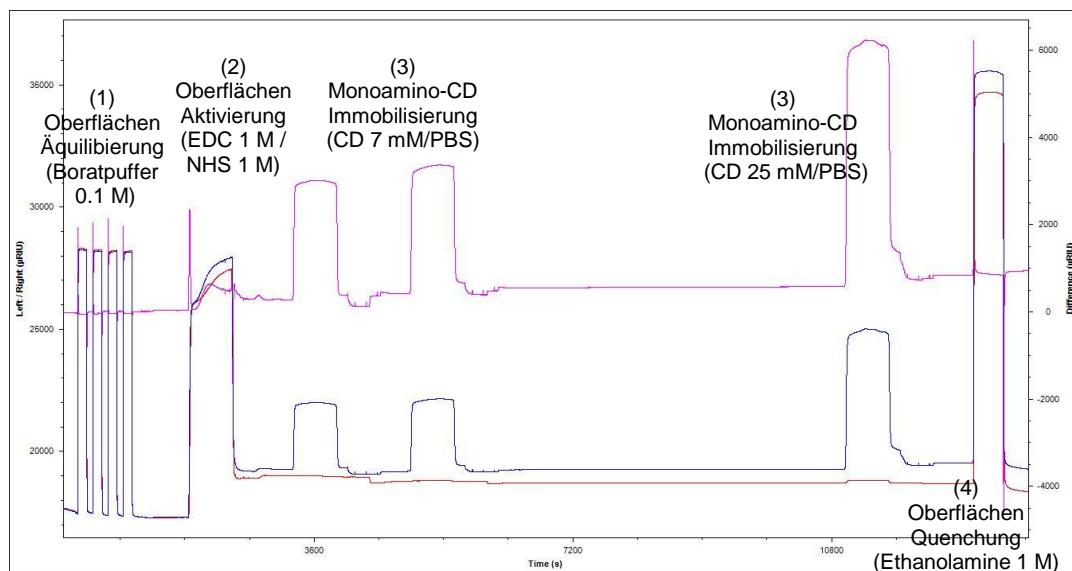


Bestimmung der thermodynamischen Größen und der Dissoziationskonstanten von Aminoadamantan mit a) nativem  $\beta$ -CD und mit b) **HTG** mittels isothermer Titrationskalorimetrie (pH 7.2).

- SPR-Sensorgramme

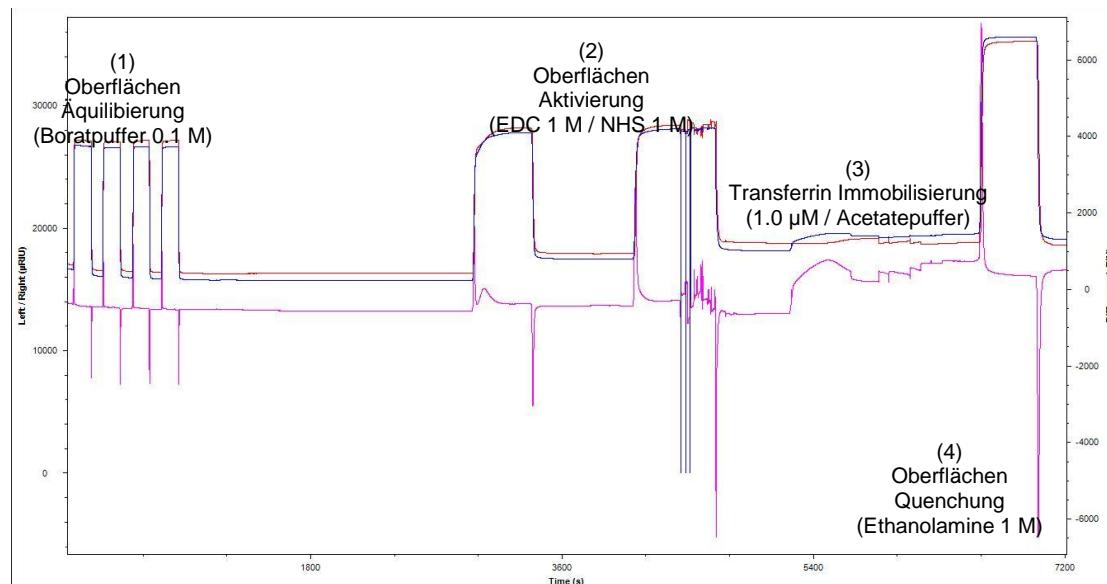


Sensorgram der Immobilisierungsmethode des **5b** auf dem CMD5001 Sensorchip: (1) vier Injektionen der Reinigungslösung, (2) Aktivierung der Carboxymethylextranmatrix (3) Injektion der **5b**-Lösung (7 mM) in PBS und (4) Quenchung der nicht reagierten Matrix. Die Kurven stellen den aktiven Kanal (blau), den Referenzkanal (rot) und deren Differenz (magenta) dar.



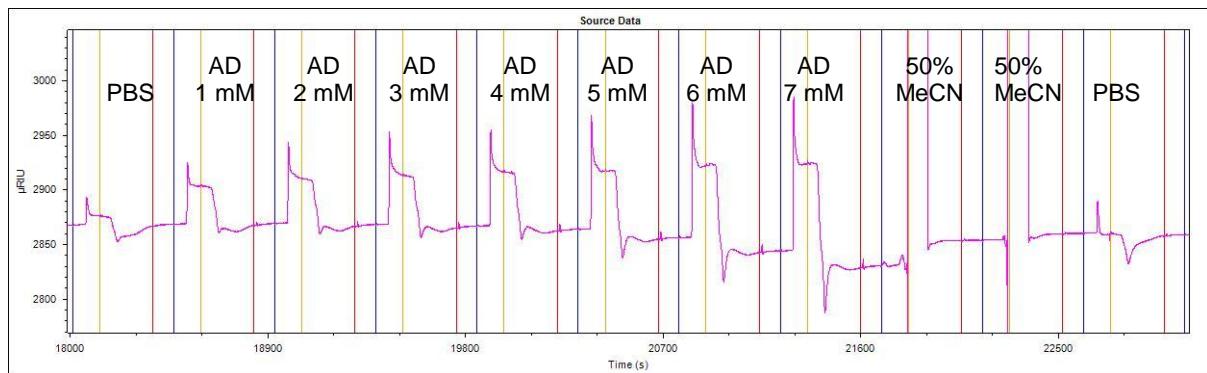
Sensorgram der Immobilisierungsmethode des Monoamino- $\beta$ -CD auf dem CMD5001

Sensorchip: (1) vier Injektionen der Reinigungslösung, (2) Aktivierung der Carboxymethyldextransmatrix (3) Injektion der Monoamino- $\beta$ -CD-Lösung (7 mM / 25 mM) in PBS und (4) Quenchung der nicht reagierten Matrix. Die Kurven stellen den aktiven Kanal (blau), den Referenzkanal (rot) und deren Differenz (magenta) dar.

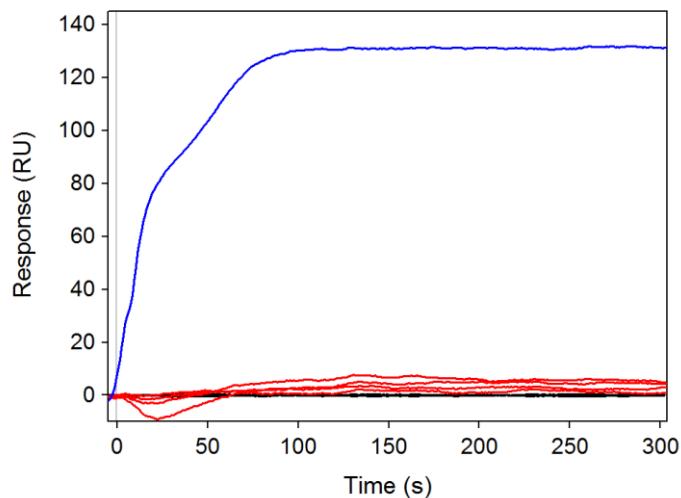


Sensorgram der Immobilisierungsmethode des nativen Transferrins auf dem CMD5001

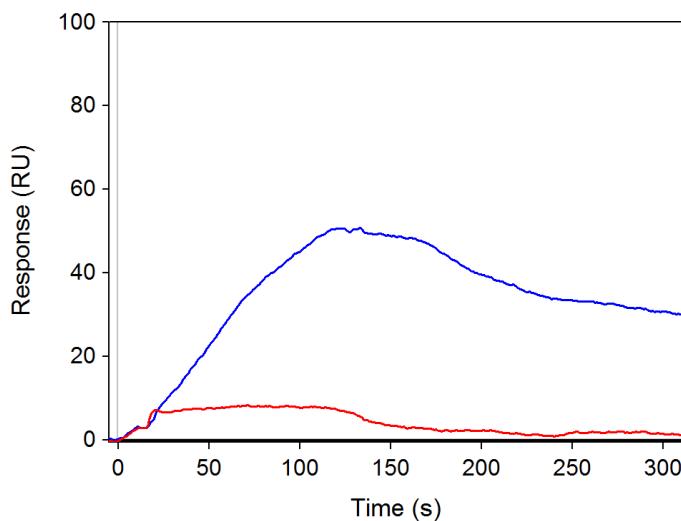
Sensorchip: (1) vier Injektionen der Reinigungslösung, (2) Aktivierung der Carboxymethyldextransmatrix (3) Injektion der nativen Transferrin-Lösung (1  $\mu$ M) in Acetatpuffer und (4) Quenchung der nicht reagierten Matrix. Die Kurven stellen den aktiven Kanal (blau), den Referenzkanal (rot) und deren Differenz (magenta) dar.



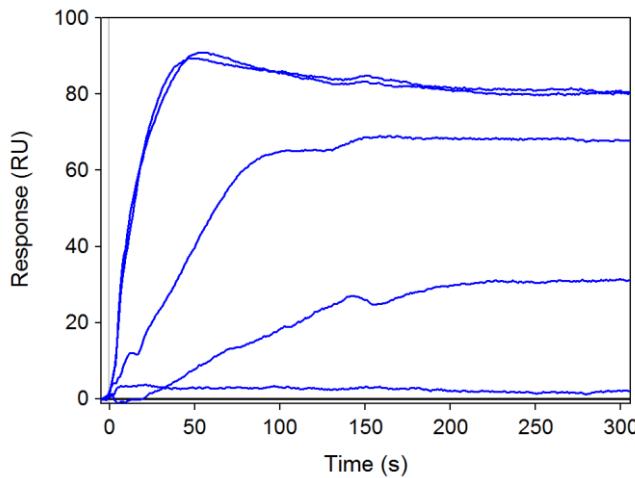
Sensorgramm von 1-Aminoadamantan über „single-cycle kinetics“ bei Konzentrationen von 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, und 7.0 mM.



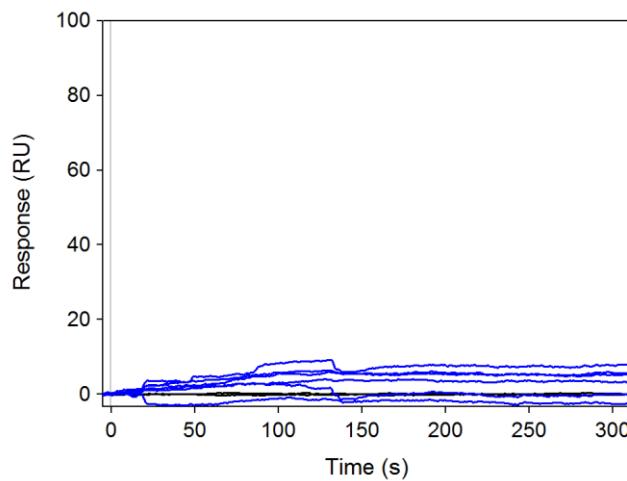
Sensorgramme von Transferrin **33** bei 1 µM (blau) im Vergleich zu native Transferrin bei 1.25, 2.5, 5.0 und 10.0 µM (rot)



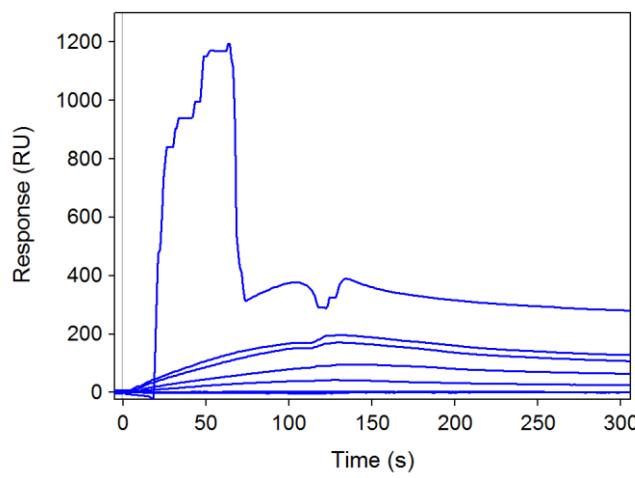
Sensorgramme von Lysozym **29** bei 1 µM (blau) im Vergleich zu nativem Lysozym bei 1 µM (rot).



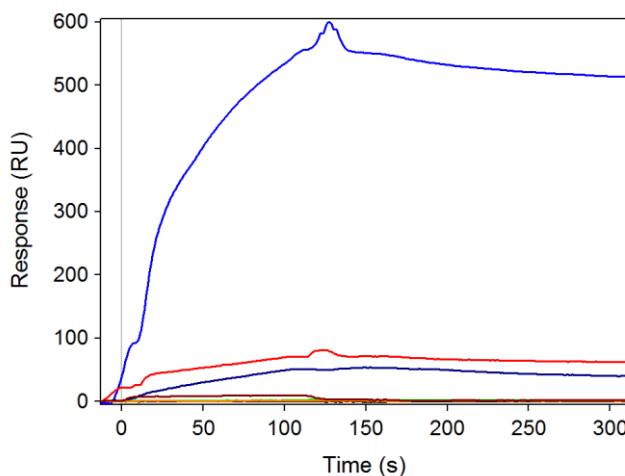
Sensorgrammüberlagerung von **33** bei den Konzentrationen 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 und 1.5  $\mu\text{M}$



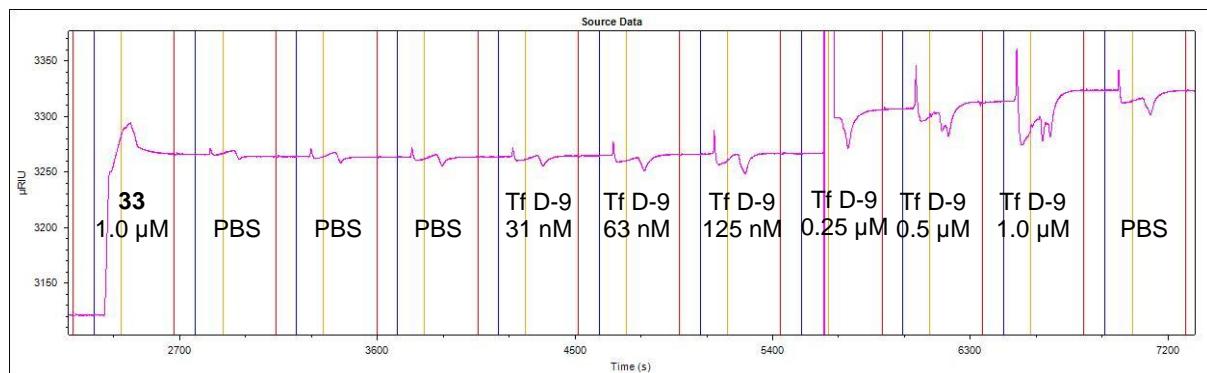
Sensorgrammüberlagerung von injiziertem **35** bei den Konzentrationen 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 1.5  $\mu\text{M}$  über den **5b** Liganden.



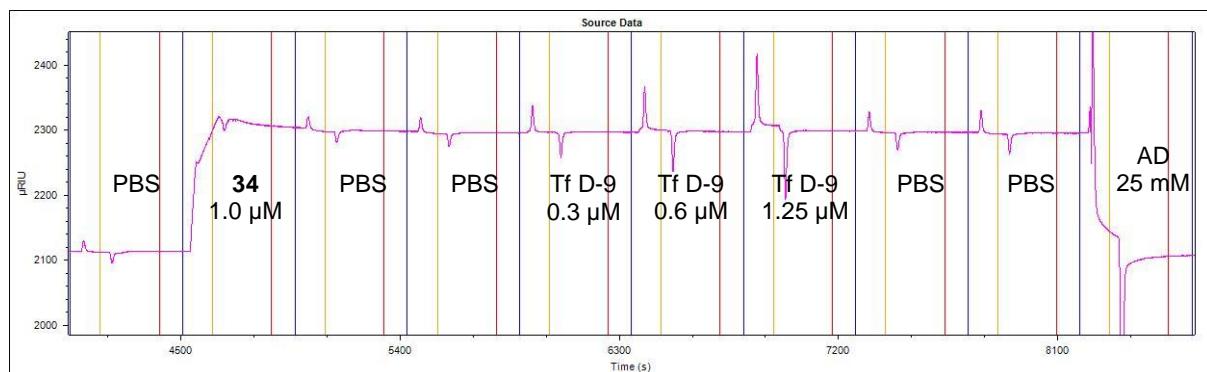
Sensorgrammüberlagerung von injiziertem **29** bei den Konzentrationen 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 und 10.0  $\mu\text{M}$  über den **5b** Liganden.



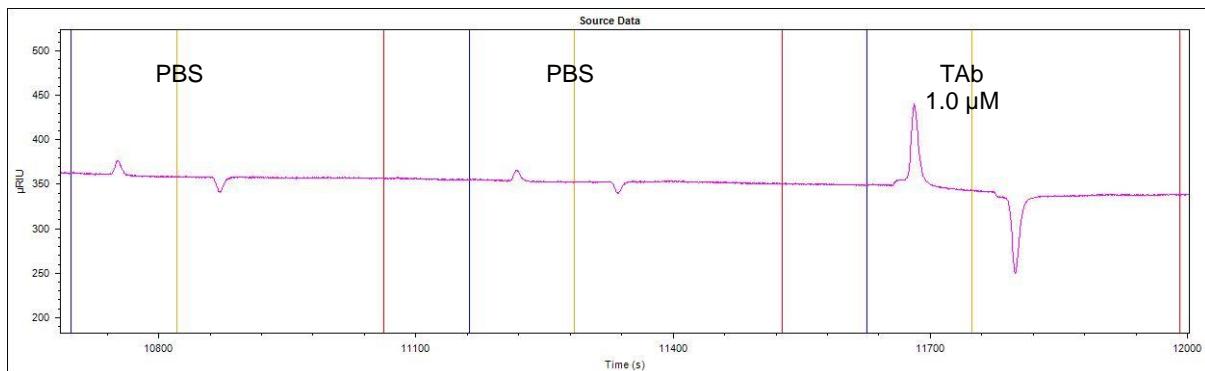
Sensorgrammüberlagerung von **33** (blau), **34** (rot), **29** (violett), **35** (grün), nativem Tf (orange) und nativem Lysozym (braun), injiziert mit einer jeweiligen Konzentration von 1.0  $\mu\text{M}$ .



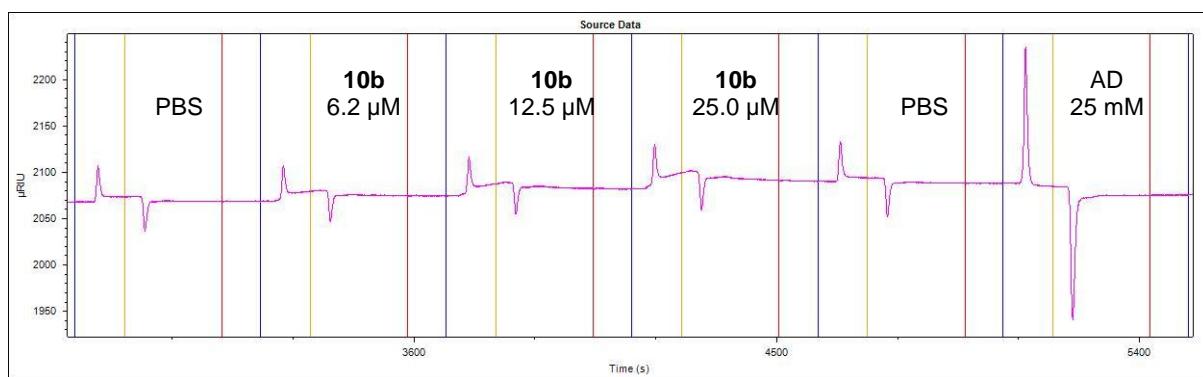
Sensorgramm des Transferrin D-9 Antikörpers, injiziert mit den Konzentrationen von 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5 und 1.0  $\mu\text{M}$  über Transferrin **33**, gebunden am CD-Liganden **5b**.



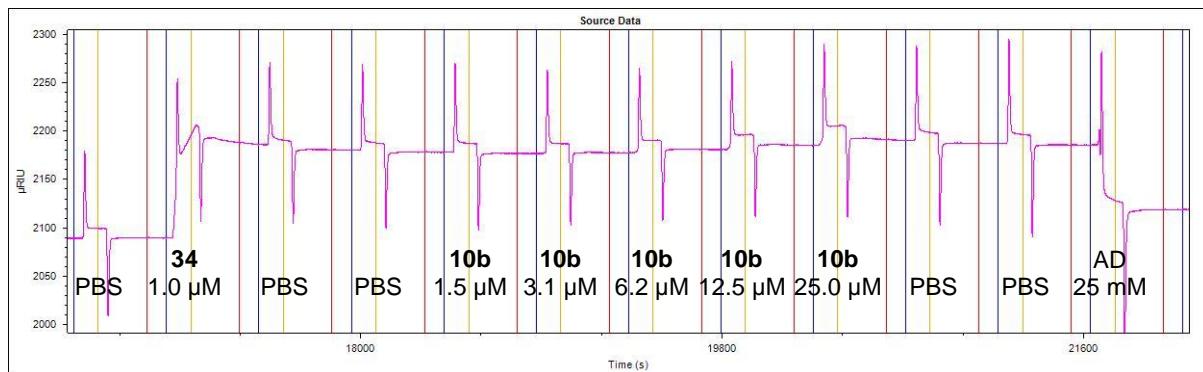
Sensorgramm von Transferrin D-9 Antikörpers, injiziert mit den Konzentrationen von 0.3, 0.6 und 1.25  $\mu\text{M}$  über Transferrin **34**, gebunden am CD-Ligand **5b**.



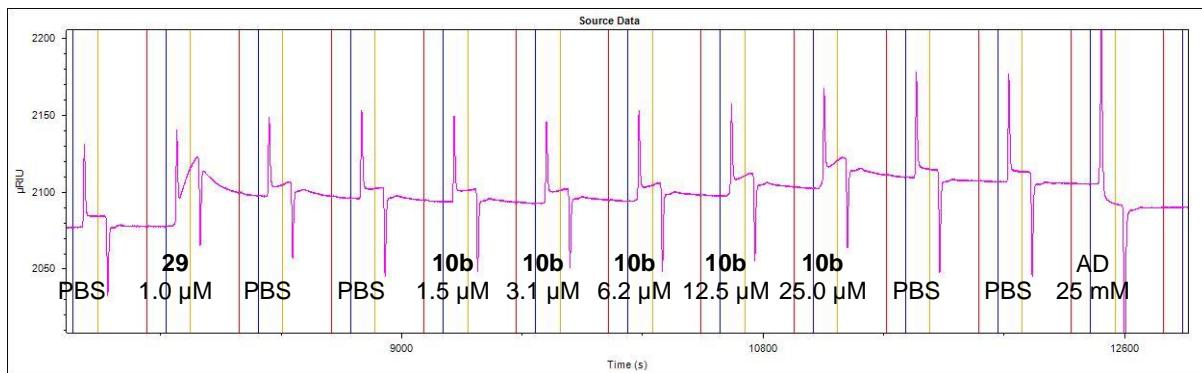
Sensorgramm von Transferrin D-9 Antikörper (1  $\mu$ M), injiziert auf immobilisiertem nativem Transferrin.



Sensorgramm des CD-Hyaluronsäure Polymer **10b**, injiziert mit den Konzentrationen 6.2, 12.5 und 25.0  $\mu$ M über den CD-Liganden **5b** (Kontrollexperiment).

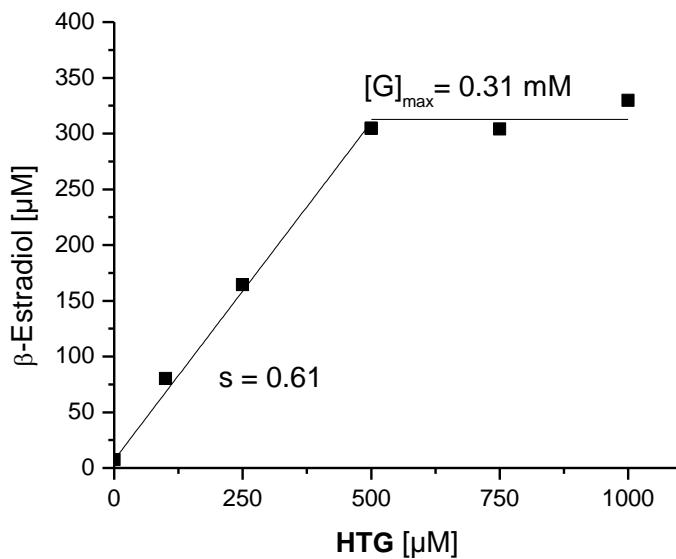


Sensorgramm des CD-Hyaluronsäure-Polymer **10b**, injiziert mit den Konzentrationen 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, und 25.0  $\mu$ M über das gebundene Transferrin **34**.

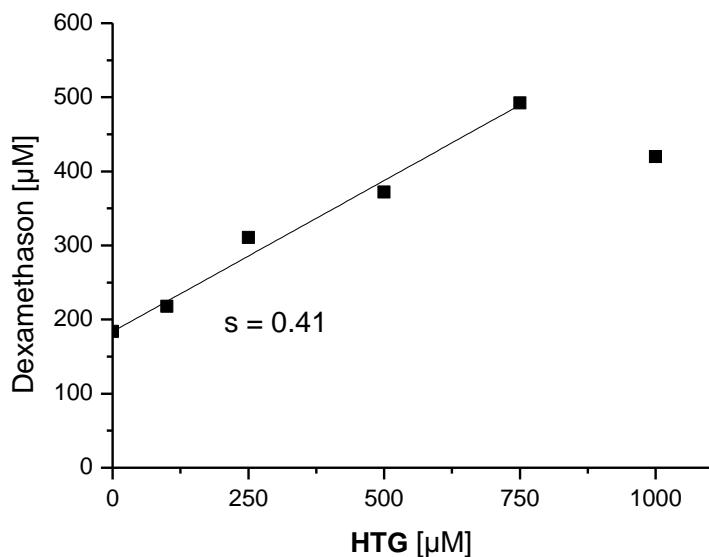


Sensorgramm des CD-Hyaluronsäure-Polymer **10b**, injiziert mit den Konzentrationen 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, und 25.0  $\mu\text{M}$  über das gebundene Lysozym **29**.

- Löslichkeitsisothermen in DMEM-Zellmedium

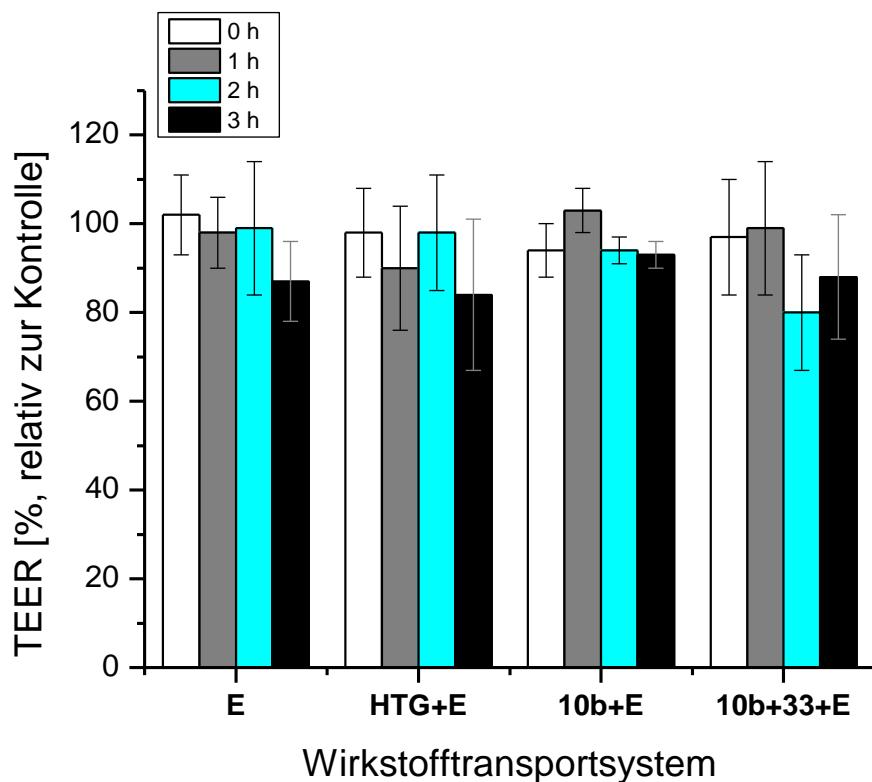


Löslichkeitsisotherme von  $\beta$ -Estradiol in DMEM-Zellmedium (ohne FKS) mit **HTG**.

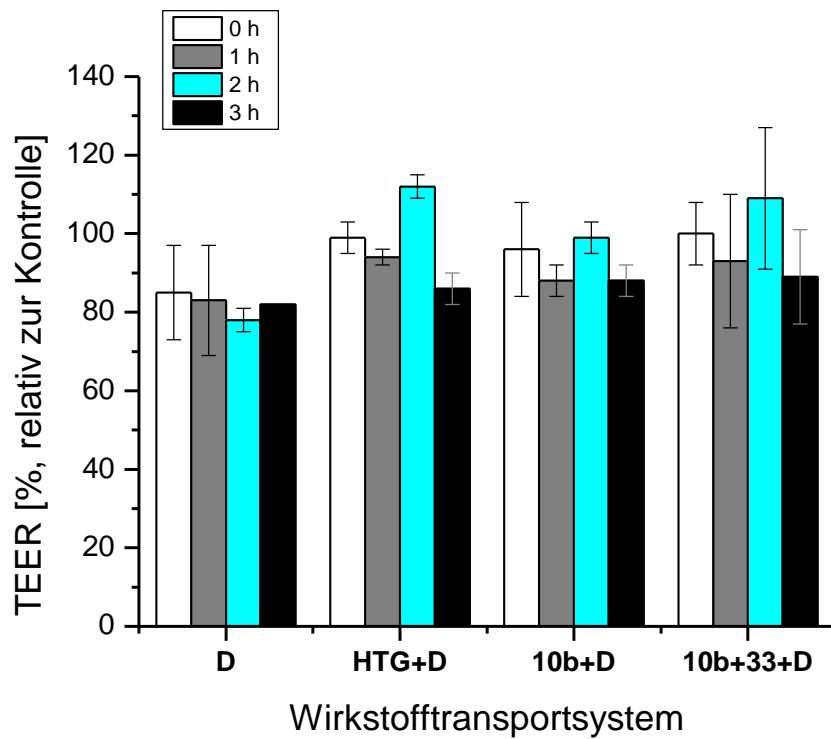


Löslichkeitsisotherme von Dexamethason in DMEM-Zellmedium (ohne FKS) mit **HTG**.

- Transepitheliale elektrische Resistenz



relative transepitheliale elektrische Resistenz (TEER) der Zellbarriere nach Zugabe der Wirkstofftransportsysteme mit einem Gehalt von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -Estradiol (unbehandelte Zellen werden auf 100% Viabilität gesetzt).



relative transepitheliale elektrische Resistenz (TEER) der Zellbarriere nach Zugabe  
der Wirkstofftransportsysteme mit einem Gehalt 10 µg/mL Dexamethason  
(unbehandelte Zellen werden auf 100% Viabilität gesetzt)..

## 11 Abkürzungsverzeichnis

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| α                               | alpha                                      |
| A                               | Analyt                                     |
| Å                               | Angström                                   |
| Abs.                            | absolut                                    |
| ACN                             | Acetonitril                                |
| API                             | aktive pharmazeutische Wirkstoffe          |
| Äq                              | Äquivalent                                 |
| Au                              | Gold                                       |
| BCS                             | Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem |
| β                               | beta                                       |
| bzw.                            | beziehungsweise                            |
| γ                               | gamma                                      |
| C                               | Kohlenstoff                                |
| CD                              | Cyclodextrin                               |
| CDCl <sub>3</sub>               | deuteriertes Chloroform                    |
| CDI                             | Carbonyldiimidazol                         |
| CDMT                            | 2-chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin        |
| CE                              | Komplexierungseffizienz                    |
| °C                              | Grad Celsius                               |
| CH <sub>2</sub> O               | Formaldehyd                                |
| CI-TEG-OH                       | 2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethanol        |
| cm                              | Zentimeter                                 |
| CO <sub>2</sub>                 | Kohlenstoffdioxid                          |
| COSY                            | correlation spectroscopy                   |
| CS <sub>2</sub>                 | Schwefelkohlenstoff                        |
| Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Caesiumcarbonat                            |
| Cu                              | Kupfer                                     |
| Cys                             | Cystein                                    |
| δ                               | Delta                                      |
| d                               | Tage                                       |
| D                               | Dexamethason                               |

|                     |  |
|---------------------|--|
| 2D                  | zweidimensional  |
| d.s.                | Substitutionsgrad  |
| D <sub>2</sub> O    | deuteriertes Wasser  |
| Da                  | Dalton   |
| DC                  | Dünnschichtchromatographie                                 |
| DCM                 | Dichlormethan  |
| dest.               | destilliert  |
| DIMEB               | Dimethyliertes beta-Cyclodextrin                           |
| DMAP                | 4-(Dimethylamino)-pyridin                                  |
| DMEM                | Dulbecco's Modified Eagle Medium                           |
| DMF                 | Dimethylformamid   |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid   |
| DMSO-d <sup>6</sup> | deuteriertes Dimethylsulfoxid                              |
| DNA                 | Desoxyribonukleinsäure                                     |
| DSMZ                | deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen     |
| dt                  | Änderung nach der Zeit                                     |
| ε                   | Epsilon  |
| E                   | Estradiol  |
| EDC                 | N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid |
| EDTA                | Ethyldiamintetraacetat                                     |
| EE                  | Essigsäureethylester                                       |
| EPR                 | erhöhte Permeabilität und Retention                        |
| ESI                 | Elektrosprayionisation                                     |
| EtOH                | Ethanol  |
| exp                 | experimentell  |
| Fe                  | Eisen  |
| FKS                 | fetales Kälberserum  |
| FT-IR-Spektroskopie | Furier-Transform-Infrarotspektroskopie                     |
| g                   | Gramm  |
| ges.                | gesättigt  |
| [G] <sub>0</sub>    | Eigenlöslichkeit des Gastmoleküls                          |
| H                   | Wasserstoff  |
| h                   | Stunden  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| H <sub>2</sub> O  | Wasser  |
| HA                | Hyaluronsäure   |
| HCCA              | $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure  |
| HCl               | Salzsäure   |
| HEPES             | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                                   |
| HP                | Hydroxypropyl   |
| HPLC              | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie  |
| HSA               | humanes Serum Albumin   |
| HSES              | Heptakis-6-sulfoethylsulfanyl-6-deoxy- $\beta$ -CD                                      |
| HTG               | Heptakis-6-thioglycerin-6-deoxy- $\beta$ -CD  |
| HTMT              | Heptakis-6-methylsulfanyl-6-deoxy-[2-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)]- $\beta$ -CD |
| HV                | Hochvakuum  |
| Hz                | Hertz   |
| ITC               | Isotherme Titrationskalorimetrie  |
| I-TEG-OTBDMS      | tButyldimethyl(2-(2-(2-iodethoxy)ethoxy(ethoxy)silan                                    |
| J                 | Joule   |
| k                 | kilo  |
| k <sub>a</sub>    | kinetische Konstante der Assoziation  |
| kcal              | Kilokalorie   |
| K <sub>D</sub>    | Gleichgewichts-Dissoziationskonstante   |
| k <sub>d</sub>    | kinetische Konstante der Dissoziation   |
| K <sub>s</sub>    | Gleichgewichts-Bindungskonstante  |
| kV                | Kilovolt  |
| L                 | Liter   |
| L                 | Ligand  |
| LC/MS             | Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie   |
| Lys               | Lysin   |
| M                 | Molar   |
| m/z               | Masse zu Ladung Verhältnis  |
| MALDI             | Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation   |
| MeOH              | Methanol  |
| MgSO <sub>4</sub> | Magnesiumsulfat   |

|                                   |                               |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| MHz                               | Megahertz                     |
| $\mu\text{M}$                     | Mikromolar                    |
| $\mu\text{s}$                     | Mikrosekunden                 |
| $\mu\text{RIU}$                   | mikro Brechungsindexeinheiten |
| min                               | Minuten                       |
| mL                                | Milliliter                    |
| mM                                | Millimolar                    |
| mm                                | Millimeter                    |
| mmol                              | Millimol                      |
| ms                                | Millisekunden                 |
| MS                                | Massenspektrometrie           |
| Mw                                | Molekulargewicht              |
| n                                 | Anzahl der Wiederholeinheiten |
| Na                                | Natrium                       |
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | Natriumthiosulfat             |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4$          | Natriumsulfat                 |
| NaCl                              | Natriumchlorid                |
| $\text{NaCNBH}_3$                 | Natriumcyanoborhydrid         |
| $\text{NaHCO}_3$                  | Natriumhydrogencarbonat       |
| Nal                               | Natriumiodid                  |
| NaN3                              | Natriumazid                   |
| NaOH                              | Natriumhydroxid               |
| #                                 | Nummer                        |
| NCS                               | Isothiocyanat                 |
| $\text{NEt}_3$                    | Triethylamin                  |
| ng                                | Nanogramm                     |
| NH4Ac                             | Ammoniumacetat                |
| NHS                               | N-Hydroxysuccinimid           |
| nm                                | nanometer                     |
| NMM                               | N-Methylmorpholin             |
| NMR-Spektroskopie                 | Kernspinresonanzspektroskopie |
| br s                              | Breites Signal                |
| d                                 | Duplett                       |

|                  |   |
|------------------|---|
| m                | Multiplett  |
| s                | Singulett   |
| t                | Triplet   |
| NP               | Nanopartikel  |
| ns               | Nanosekunden  |
| O                | Sauerstoff  |
| PBS              | Phosphatgepufferte Salzlösung                                     |
| PDB              | Proteindatenbank  |
| PEG              | Polyethylenglycol   |
| PES              | Polyethersulfon   |
| %                | Prozent   |
| pH               | negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| pK <sub>s</sub>  | negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante                |
| PPh <sub>3</sub> | Triphenylphosphin   |
| ppm              | parts per million   |
| R <sub>f</sub>   | Retentionsfaktor  |
| RGD-Peptid       | Arginin,Glycin,Asparaginsäure-Peptid                              |
| RIPA             | Radioimmunoprecipitation Assay Puffer                             |
| ROESY            | <i>rotating frame nuclear overhauser effect</i>                   |
| RT               | Raumtemperatur  |
| RU               | Resonanzsignale   |
| s                | Steigung  |
| s                | Sekunden  |
| S/N              | Signal zu Rauschen Verhältnis                                     |
| SBE              | Sulfobutylether   |
| SN               | nukleophile Substitution  |
| SPAAC            | spannungs induzierte Alkin-Azid Cycloaddition                     |
| SPR              | Oberflächenplasmonenresonanz                                      |
| TBDMS-Cl         | Tertbutyldimethylsilylchlorid                                     |
| TEER             | transepitheliale elektrische Resistenz                            |
| TEG              | Triethylenglykol  |
| Tf               | Transferrin   |
| TFA              | Trifluoressigsäure  |

|            |                                   |
|------------|-----------------------------------|
| TfR        | Transferrin-Rezeptor              |
| theo.      | theoretisch                       |
| TNBSA      | Trinitrobenzylsulfonsäure         |
| TOF        | Flugzeitanalyse                   |
| Tos-Cl     | Tosylchlorid                      |
| Trp        | Tryptophan                        |
| Tyr        | Tyrosin                           |
| U/mg       | Einheiten pro Milligramm          |
| UpM        | Umdrehungen pro Minute            |
| UV         | Ultraviolett                      |
| v/v        | Volumenprozent                    |
| $V_{ac}$   | Spannung                          |
| $V_{max}$  | Wellenzahl                        |
| W          | Watt                              |
| Wst1-Assay | Water soluble tetrazolium-1 Assay |
| Gew%       | Gewichtsprozent                   |
| z.B.       | zum Beispiel                      |

## 12 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematischer Aufbau von polymeren Therapeutika <sup>[1]</sup> .....   | 1  |
| Abbildung 2: Ringsdorf Model eines zielgerichteten Wirkstofftransportsystems auf Polymerbasis <sup>[5,8]</sup> .....  | 2  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der möglichen Transportmechanismen:<br>a) rezeptorvermittelter Transport, b) carriervermittelter Transport, c)<br>parazellulärer Transport, d) transzellulärer Transport und e) M Zellen-<br>vermittelter Transport <sup>[18]</sup> .....   | 4  |
| Abbildung 4: Räumliche Darstellung eines Cyclodextrin-Derivates <sup>[26]</sup> .....   | 6  |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des Wirkstofftransporters, bestehend<br>aus $\beta$ -CD-Biopolymer-Konjugat und adamantyliertem Protein (Wirkstoff = rote<br>Kugeln).....   | 8  |
| Abbildung 6: Strukturen einiger ausgewählter steroidaler Wirkstoffe.....  | 10 |
| Abbildung 7: Arten der Phasenlöslichkeitsisothermen <sup>[32]</sup> .....   | 14 |
| Abbildung 8: Struktur der eingesetzten $\beta$ -CD-Derivate. ....   | 17 |
| Abbildung 9: Phasenlöslichkeitsisotherme von Testosteron in isotonischem<br>HEPES Puffer (10 mM, pH 7.4) mit a) $\beta$ -CD und b) <b>HSES</b> .....  | 20 |
| Abbildung 10: 2D-ROESY Spektrum des Progesteron/ <b>HSES</b> -Komplexes.....  | 23 |
| Abbildung 11: Schematische Darstellung von Cyclodextrin-Polymeren für den<br>Wirkstofftransport; <b>a)</b> lineares CD-Polymer, <b>b)</b> kovalent verknüpftes<br>Cyclodextrin-Polymer, <b>c)</b> supramolekulare Wirt-Gast-Netzwerke, <b>d)</b><br>Polypseudorotaxane mit Cyclodextrin-Wirkstoff-Konjugaten <sup>[108]</sup> ..... | 25 |
| Abbildung 12: Synthese von Mono-amino- $\beta$ -CD-Derivaten. ....  | 30 |
| Abbildung 13: $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von <b>5a</b> (DMSO-d <sup>6</sup> , 400 MHz). ....  | 31 |
| Abbildung 14: Bildung der $\beta$ -CD-Hyaluronsäure-Polymere.....   | 32 |
| Abbildung 15: $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des CD-Hyaluronsäure-Polymers <b>10b</b> (D <sub>2</sub> O,<br>400 MHz).....   | 33 |
| Abbildung 16: Biokonjugation über freie Thiolgruppe der Cysteine der Proteine.<br>.....   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 17: Direkte Biokonjugationsreaktionen an der Lysin-Seitenkette von Proteinen.....  | 38 |
| Abbildung 18: Bioorthogonale Reaktionen an Proteinen. ....   | 39 |
| Abbildung 19: Syntheseroute <b>A</b> des Adamantan-TEG-Bausteins <b>16</b> . ....  | 43 |
| Abbildung 20: Protonen-Spektrum von <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).....   | 45 |
| Abbildung 21: Syntheseroute <b>B</b> der Adamantan-TEG-Baustein <b>22</b> und <b>23</b> .....45  |    |
| Abbildung 22: Protonenspektrum von <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).....  | 46 |
| Abbildung 23: Syntheseschritt der Bildung der proteinreaktiven Endgruppen. .47   |    |
| Abbildung 24: FT-IR-Spektrum von <b>16</b> und <b>24</b> .....   | 48 |
| Abbildung 25: FT-IR-Spektrum von <b>22</b> und <b>26</b> .....   | 49 |
| Abbildung 26: Modifizierung von humanem Lysozym.....   | 50 |
| Abbildung 27: MALDI-Spektrum des modifizierten humanen Lysozums <b>29</b> .....51  |    |
| Abbildung 28: Modifizierung von humanem Transferrin. ....  | 52 |
| Abbildung 29: MALDI-Spektrum des adamantylierten humanen Transferrins <b>34</b> . .....  | 52 |
| .....  |    |
| Abbildung 30: MALDI-Spektrum nach tryptischen Verdau von <b>33</b> . ....54  |    |
| Abbildung 31: Oberflächendarstellung des adamantylierten Transferrin ( <b>33</b> ): Proteinoberfläche (grau), aktives Zentrum für Transferrin- Rezeptor (rot), eingeführte Adamantan-TEG-Gruppen (magenta), Vorderansicht (links), Rückansicht (rechts). ..... | 56 |
| Abbildung 32: Oberflächendarstellung des adamantylierten Lysozym ( <b>29</b> ): Proteinoberfläche (grau), eingeführte Adamantan-TEG-Gruppen (magenta), aktives Zentrum des Lysozym (rot). .....  | 57 |
| Abbildung 33: Immobilisierung des CD-Derivates <b>5b</b> auf der Goldoberfläche <sup>[222]</sup> .....   | 63 |
| Abbildung 34: Schematische Darstellung der immobilisierten CD-Monoschicht. .....   | 64 |
| Abbildung 35: a) Sensorgrammüberlagerung und b) Langmuir-Isotherme von 1-Aminoadamantan bei den Konzentrationen 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 und 5.0 mM. ....64  |    |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 36: Sensorgramm von Tf <b>33</b> über „single-cycle kinetics“ bei Konzentrationen von 2.7, 5.4, 7.7, 10.8, 16.2 und 21.6 mM .....  | 66 |
| Abbildung 37: Sensorgramm der Regeneration der immobilisierten CD-Oberfläche mittels 25 mM 1-Aminoadamantan .....  | 67 |
| Abbildung 38: Schematische Darstellung eines komplexierten adamantylierten Tf-Derivat auf der CD-Monoschicht auf der Goldoberfläche.....   | 68 |
| Abbildung 39: Sensorgrammüberlagerung von <b>34</b> bei den Konzentrationen 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 und 1.5 $\mu$ M.....  | 69 |
| Abbildung 40: Schematische Darstellung der Antikörper-Transferrin-Bindung auf der CD-Monoschicht .....   | 72 |
| Abbildung 41: <b>a)</b> Sensorgramme von Tf <b>33</b> (1 $\mu$ M, blau) und <b>33</b> vorinkubiert mit Tf D-9 Antikörper (1.25 $\mu$ M, rot), <b>b)</b> Sensorgramme von Tf <b>34</b> (1 $\mu$ M, blau) und <b>34</b> vorinkubiert mit Tf D-9 Antikörper (1.25 $\mu$ M, rot) im Vergleich zum freien Tf D-9 Antikörper (1.25 $\mu$ M, grün). ..... | 73 |
| Abbildung 42: Schematische Darstellung einer weiteren Komplexierung der freien Adamantangruppen eines Transferrin-Derivates mittels CD-Hyaluronsäure-Polymer <b>10b</b> .....  | 75 |
| Abbildung 43: Sensorgram des CD-Hyaluronsäure Polymer <b>10b</b> , injiziert in Konzentrationen von 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25.0, 50.0 und 100.0 $\mu$ M über gebundenes Transferrin <b>33</b> immobilisiert auf CD-Liganden <b>5b</b> .....  | 76 |
| Abbildung 44: Schematische Darstellung des Wirkstofftransporters aus a) <b>HTG</b> -Monomer b) HTG-Hyaluronsäure-Polymer ohne zellspezifischen Ligand und c) <b>HTG</b> -HA-Polymer mit zellspezifischem Liganden an einer Zellbarriere .....  | 80 |
| Abbildung 45: Löslichkeitsisothermen von <b>a)</b> $\beta$ -Estradiol und <b>b)</b> Dexamethason mit <b>10b</b> in DMEM Zellkulturmedium (ohne FKS). .....   | 82 |
| Abbildung 46: Aufbau der Transportstudien.....   | 83 |
| Abbildung 47: Probenzugabe und Probenentnahme bei den Transportstudien.....  | 83 |

|  |
|--|
| Abbildung 48: relative Zellviabilität der Co-Kultur nach 3 h Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen und <b>HSES</b> bei einer Estradiolkonzentration von 0.4, 10 und 100 µg/mL (unbehandelte Zellen werden auf 100% Viabilität gesetzt). 84 |
| Abbildung 49: Absolutmengen an Estradiol auf apikaler und basolateraler Seite der Co-Kultur nach einer dreistündigen Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen in Abhängigkeit von FKS im Zellmedium. ....86                                   |
| Abbildung 50: Absolutmengen an Estradiol auf apikaler und basolateraler Seite sowie in den Zellen der Co-Kultur nach einer dreistündigen Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen.....88  |
| Abbildung 51: Absolutmengen an Dexamethason auf apikaler und basolateraler Seite sowie in den Zellen der Co-Kultur nach einer dreistündigen Inkubation mit den Wirkstofftransportsystemen. ....90  |

## 13 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Löslichkeiten der steroidalen Wirkstoffe in isotonischem HEPES-Puffer (pH 7.4, 25°C) unter Verwendung verschiedener Carrier (Konzentration 4Gew%). .....  | 18 |
| Tabelle 2: Komplexierungseffizienz CE der $\beta$ -CD-Derivate mit den Steroidwirkstoffen .....  | 21 |
| Tabelle 3: Bindungskonstanten $K_s$ [ $M^{-1}$ ] der $\beta$ -CD-Derivate mit den Steroidwirkstoffen .....   | 22 |
| Tabelle 4: Substitutionsgrad der hergestellten CD-Hyaluronsäure-Polymeren. .   | 34 |
| Tabelle 5: Adamantylierung der Proteine.....   | 53 |
| Tabelle 6: Modifiziertes Peptidfragment nach tryptischem Verdau. ....  | 54 |
| Tabelle 7: Belegung und Teilchendichte der immobilisierten Liganden. ....  | 62 |
| Tabelle 8: Kinetische Konstanten ( $k_{on}, k_{off}$ ), die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_D$ und die freie Energie $\Delta G$ der Komplexe der adamantyierte Proteine / 1-Aminoadamantan mit dem CD-Liganden <b>5b</b> . .... | 70 |
| Tabelle 9: Belegung und Teilchendichte der adamantyierte Proteine auf <b>5b</b> Mono-Schicht. ....   | 71 |
| Tabelle 10: Wirkstoffeinteilung nach dem Biopharmaceutical Classification System <sup>[235]</sup> .....  | 77 |
| Tabelle 11: Stabilitätskonstanten mit HTG ( $M^{-1}$ ) und tägliche perorale Dosis (mg) der Steroid-Wirkstoffe.....  | 81 |
| Tabelle 12: Estradiollöslichkeiten in % (bezogen auf 10 $\mu$ g/mL) vor der Inkubation und die Wiederfindungsrate (%) nach der dreistündigen Inkubation . ....   | 87 |
| Tabelle 13:Extinktionskoeffizienten der $\beta$ -CD-Derivate in HEPES-Puffer bei 240 nm.....   | 97 |
| Tabelle 14: HPLC-Daten der untersuchten Steroidwirkstoffe .....  | 98 |
| Tabelle 15: Extinktionskoeffizienten der Steroidwirkstoffe in Ethanol und n-Octanol.....   | 99 |

## 14 Literaturverzeichnis

- [1] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347–60.
- [2] L. G. Donaruma, *Prog. Polym. Sci.* **1975**, *4*, 1–25.
- [3] F. F. Davis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 457–458.
- [4] A. Kabanov, P. L. Felgner, L. W. Seymour, *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery - From Laboratory to Clinical Trials*, **1998**.
- [5] H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51*, 135–153.
- [6] M. Yokoyama, M. Miyauchi, N. Yamada, T. Okano, Y. Sakurai, *J. Control. Release* **1990**, *11*, 269–278.
- [7] R. Langer, *Nature* **1998**, *392*, 5–10.
- [8] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chemie* **2006**, *118*, 1218–1237.
- [9] P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan, D. D. Allen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 1–13.
- [10] R. Duncan, L. W. Seymour, L. Scarlett, J. B. Lloyd, P. Rejmanova, J. Kopecek, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *62*–71.
- [11] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P. J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, D. J. Kerr, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1668–1676.
- [12] M. E. V. Johansson, H. Sjövall, G. C. Hansson, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 352–361.
- [13] P. G. Bhat, D. R. Flanagan, M. D. Donovan, *Int. J. Pharm.* **1996**, *134*, 15–25.
- [14] X. Murgia, B. Loretz, O. Hartwig, M. Hittinger, C. M. Lehr, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *124*, 82–97.
- [15] C. M. Lehr, J. A. Bouwstra, E. H. Schacht, H. E. Junginger, *Int. J. Pharm.* **1992**, *78*, 43–48.
- [16] C. - M Lehr, J. A. Bouwstra, W. Kok, A. G. De Boer, J. J. Tukker, J. C. Verhoef, D. D. Breimer, H. E. Junginger, *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, *44*, 402–407.
- [17] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign, *Adv. Drug Deliv. Rev.*

- 2016**, 99, 28–51.
- [18] Y. Yun, Y. W. Cho, K. Park, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 822–832.
- [19] P. W. Swaan, *Pharm. Res.* **1998**, 15, 826–834.
- [20] J. P. F. Bai, G. L. Amidon, *Pharm. Res.* **1992**, 9, 969–978.
- [21] M. Tomita, M. Hayashi, T. Horie, T. Ishizawa, S. Awazu, *Pharm. Res.* **1988**, 5, 786–789.
- [22] P. S. Burton, R. A. Conradi, H. A. R., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1991**, 7, 339–364.
- [23] M. Shakweh, G. Ponchel, E. Fattal, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2004**, 1, 141–163.
- [24] H. Ali, B. Weigmann, M. F. Neurath, E. M. Collnot, M. Windbergs, C. M. Lehr, *J. Control. Release* **2014**, 183, 167–177.
- [25] T. Wimmer, in *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**.
- [26] G. Wenz, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1994**, 33, 803–822.
- [27] J. Dalli, *2012/288/EU: Commission Implementing Decision of 1 June 2012 Authorising the Placing on the Market of Gamma-Cyclodextrin as a Novel Food Ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (Notified under Document C(2012), Official Journal Of The European Union*, **2012**.
- [28] I. C. Munro, P. M. Newberne, V. R. Young, A. Bär, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2004**, 39, Supple, 3–13.
- [29] A. Vassliou, *2008/413/EC: Commission Decision of 26 May 2008 Authorising the Placing on the Market of Alpha-Cyclodextrin as a Novel Food Ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (Notified under Document Number C(2008) 19, Official Journal Of The European Union*, **2008**.
- [30] T. Kiss, F. Fenyvesi, I. Bácskay, J. Váradi, E. Fenyvesi, R. Iványi, L. Szente, A. Tósaki, M. Vecsernyés, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, 40, 376–80.
- [31] J. Szejtli, *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **1998**, 98, 1743–1753.

- [32] T. Loftsson, M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017–1025.
- [33] F. Biedermann, W. M. Nau, H.-J. Schneider, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158–11171.
- [34] H. J. Schneider, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2146–2151.
- [35] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Y. Zhang, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872–4897.
- [36] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- [37] S. Fourmentin, A. Ciobanu, D. Landy, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1185–1191.
- [38] M. Weickenmeier, G. Wenz, *Macromol. Rapid Commun.* **1996**, *17*, DOI 10.1002/marc.1996.030171008.
- [39] R. A. Rajewski, G. Traiger, J. Bresnahan, P. Jaberaboansar, V. J. Stella, D. O. Thompson, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 927–932.
- [40] L. Szente, J. Szejtli, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 17–28.
- [41] L. F. Becker, D. H. Schwarz, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2920–7.
- [42] A. Mazzaglia, R. Donohue, B. Ravoo, R. Darcy, *European J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 1715–1721.
- [43] A. Steffen, C. Thiele, S. Tietze, C. Strassnig, A. Kämper, T. Lengauer, G. Wenz, J. Apostolakis, A. Kamper, T. Lengauer, et al., *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6801–6809.
- [44] G. Wenz, C. Strassnig, C. Thiele, A. Engelke, B. Morgenstern, K. Hegetschweiler, *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14*, 7202–7211.
- [45] C. Thiele, D. Auerbach, G. Jung, G. Wenz, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *69*, DOI 10.1007/s10847-010-9741-4.
- [46] G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1890–1895.
- [47] H. M. H. M. Wang, G. Wenz, *Chem. – An Asian J.* **2011**, *6*, 2390–2399.
- [48] H. M. Wang, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, DOI 10.3762/bjoc.8.188.
- [49] H. M. H. M. Wang, C. M. Soica, G. Wenz, C. M. Soica, G. Wenz, *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 289–291.

- [50] T. Loftsson, D. Duchene, *Int. J. Pharm.* **2007**, 329, 1–11.
- [51] J. A. Barone, B. L. Moskovitz, J. Guarnieri, A. E. Hassell, J. L. Colaizzi, R. H. Bierman, L. Jessen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 1862–1865.
- [52] D. R. Luke, K. Tomaszewski, B. Damle, H. T. Schlamm, *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 3291–3301.
- [53] H. D. de Boer, J. van Egmond, F. van de Pol, A. Bom, L. Booij, *Br. J. Anaesth.* **2006**, 96, 473–479.
- [54] J. P. Puisieux, F., Wouessidjewe, D., Andreux, F. Leroy-Lechat, D. Wouessidjewe, J.-P. Andreux, D. Duchene, F. Puisieux, *Int. J. Pharm.* **1994**, 101, 97–103.
- [55] S. Gould, R. C. Scott, *Food Chem. Toxicol.* **2005**, 43, 1451–1459.
- [56] B. Ettinger, A. Pressman, P. Sklarin, D. C. Bauer, J. A. Cauley, S. R. Cummings, K. Permanente, M. Care, **2016**, 83, 2239–2243.
- [57] L. Katznelson, J. S. Finkelstein, D. A. Schoenfeld, D. I. Rosenthal, E. J. Anderson, A. Klibanski, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, 81, 4358–4365.
- [58] D. Steinhilber, *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, 34, 276–281.
- [59] G. W. G. Sharp, A. Leaf, *Am. Physiol. Soc.* **1966**, 46, 593–633.
- [60] W. M. Pardridge, L. J. Mietus, *J. Clin. Invest.* **1979**, 64, 145–154.
- [61] D. C. Anderson, *Clin. Endocrinol. Metab.* **1974**, 3, 69–96.
- [62] W. H. Daughaday, *J. Clin. Invest.* **1957**, 37, 511–518.
- [63] B. W. R. O. Y. Slaunwhite, A. A. Sandberg, *J. Clin. Invest.* **1958**, 38, 384–391.
- [64] B. Salehian, C. Wang, G. Alexander, T. Davidson, V. McDonald, N. Berman, R. E. Dudley, F. Ziel, R. S. Swerdloff, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, 80, 3567–3575.
- [65] M. Zitzmann, S. Faber, E. Nieschlag, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, 91, 4335–4343.
- [66] J. A. Cauley, D. G. Seeley, K. E. Ensrud, B. Ettinger, D. Black, S. R. Cummings, *Ann Intern Med* **1995**, 122, 9–16.
- [67] L. S. Cohen, C. N. Soares, J. R. Poitras, J. Prouty, A. B. Alexander, J. L.

- Shifren, *Am. J. Psychiatry* **2003**, *160*, 1519–1522.
- [68] S. R. Ahmed, A. E. Boucher, A. Manni, R. J. Santen, M. Bartholomew, L. M. Demers, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1988**, *66*, 546–51.
- [69] F. S. Vom Saal, B. G. Timms, M. M. Montano, P. Palanza, K. a Thayer, S. C. Nagel, M. D. Dhar, V. K. Ganjam, S. Parmigiani, W. V Welshons, et al., *Physiology* **1997**, *94*, 2056–2061.
- [70] N.-M. An, D.-D. Kim, Y.-H. Shin, C.-H. Lee, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*, 99–105.
- [71] A. W. Meikle, F. H. Tyler, *Am. J. Med.* **1977**, *63*, 200–207.
- [72] K. Yamana, F. Labrie, V. Luu-The, *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2010**, *2*, 293–9.
- [73] D. R.G., S. S.M.J.M., S. P.C., D. B. a., B. J.L.H.R., H. a.W., *Cancer Causes Control* **2014**, *25*, 1577–1582.
- [74] M. S. Irwig, S. Kolukula, *J. Sex. Med.* **2011**, *8*, 1747–1753.
- [75] G. J. Gormley, *Biomed. Pharmacother.* **1995**, *49*, 319–324.
- [76] M. Tabbakhian, N. Tavakoli, M. R. Jaafari, S. Daneshamouz, *Int. J. Pharm.* **2006**, *323*, 1–10.
- [77] A. Müller, G. Wenz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2218–2223.
- [78] T. Kiss, F. Fenyvesi, I. Bácskay, J. Váradi, É. Fenyvesi, R. Iványi, L. Szente, Á. Tósaki, M. Vecsernyés, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 376–380.
- [79] M. Simons, P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C. G. Dotti, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6460–6464.
- [80] F. Camargo, R. P. Erickson, W. S. Garver, G. S. Hossain, P. N. Carbone, R. A. Heidenreich, J. Blanchard, *Life Sci.* **2001**, *70*, 131–142.
- [81] C. Wang, D. R. Eyre, R. Clark, D. Kleinberg, C. Newman, A. Iranmanesh, J. Veldhuis, R. E. Dudley, N. Berman, T. Davidson, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81*, 3654–3662.
- [82] M. E. Brewster, K. S. Estes, T. Loftsson, R. Perchalski, H. Derendorf, G. Mullersman, N. Bodor, *Am. Pharm. Assoc.* **1988**, *77*, 981–985.
- [83] N. G. M. Schipper, W. a J. J. Hermens, S. G. Romeyn, J. Verhoef, F. W.

- H. M. Merkus, *Int. J. Pharm.* **1990**, *64*, 61–66.
- [84] I. Brinkmann, C. C. Müller-Goymann, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2003**, *16*, 393–404.
- [85] S. L. Chang, A. K. Banga, *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 635–40.
- [86] T. Loftsson, E. Stefánsson, *Acta Ophthalmol. Scand.* **2002**, *80*, 144–50.
- [87] P. Moreau, M. V. Mateos, J. R. Berenson, K. Weisel, A. Lazzaro, K. Song, M. A. Dimopoulos, M. Huang, A. Zahlten-Kumeli, A. K. Stewart, *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 953–964.
- [88] S. K. H. Khalil, G. S. El-Feky, S. T. El-Banna, W. a. Khalil, *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1244–1253.
- [89] E. Albers, B. W. Müller, *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 756–761.
- [90] A. C. C. Asbahr, L. Franco, A. Barison, C. W. P. Silva, H. G. Ferraz, L. N. C. Rodrigues, *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17*, 2718–2723.
- [91] M. Frasconi, F. Mazzei, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 285502.
- [92] M. Lahiani-Skiba, C. C. Barbot, F. F. Bounoure, S. Joudieh, M. Skiba, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 1043–58.
- [93] F. Y. Liu, D. O. Kildsig, A. K. Mitra, *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 869–873.
- [94] A. Usayapant, A. H. Karara, M. M. Narurkar, *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 1495–1499.
- [95] T. Loftsson, D. Hreinsdottir, M. Masson, *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, 18–28.
- [96] C. Rodriguez-Tenreiro, C. Alvarez-Lorenzo, a. Rodriguez-Perez, a. Concheiro, J. J. Torres-Labandeira, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 55–62.
- [97] P. Forgo, G. Göndös, *Monatshefte fuer Chemie* **2002**, *133*, 101–106.
- [98] E. Bednarek, W. Bocian, J. Poznanski, J. Sitkowski, N. Sadlej-Sosnowska, L. Kozerski, *J. Chem. Soc.* **2002**, *2*, 999–1004.
- [99] T. Higuchi, K. A. Connors, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 117–212.
- [100] M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 645–666.
- [101] K. A. Connors, *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **1997**, *97*, 1325–1357.

- [102] K. A. Connors, D. A. Pendergast, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7607–7614.
- [103] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, in *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, Kluwer Academic Publishers, **2007**, pp. 545–552.
- [104] D. H. Schwarz, A. Engelke, G. Wenz, *Int. J. Pharm.* **2017**, *531*, 559–567.
- [105] D. J. GREENBLATT, *J. Am. Geriatr. Soc.* **1979**, *27*, 20–22.
- [106] V. Zia, R. A. Rajewski, V. J. Stella, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 667–673.
- [107] L. Markenstein, A. Appelt-Menzel, M. Metzger, G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 3087–3096.
- [108] S. M. N. Simões, A. Rey-Rico, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6275–6289.
- [109] R. Auzély-Velty, *Comptes Rendus Chim.* **2011**, *14*, 167–177.
- [110] H. L. Ramírez, A. Valdivia, R. Cao, J. J. Torres-Labandeira, A. Fragoso, R. Villalonga, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1499–501.
- [111] N. Aoki, M. Nishikawa, K. Hattori, *Carbohydr. Polym.* **2003**, *52*, 219–223.
- [112] T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, K. L. Larsen, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, DOI :10.1021/bm9013233.
- [113] B. Gidwani, A. Vyas, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *114*, 130–137.
- [114] E. Renard, a. Deratani, G. Volet, B. Sébille, B. Sebille, *Eur. Polym. J.* **1997**, *33*, 49–57.
- [115] N. Morin-Crini, G. Crini, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 344–368.
- [116] H. Yamaguchi, R. Kobayashi, Y. Takashima, A. Hashidzume, A. Harada, *Macromolecules* **2011**, *44*, 2395–2399.
- [117] P. Mura, M. T. Faucci, F. Maestrelli, S. Furlanetto, S. Pinzauti, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 1015–1024.
- [118] S. Nie, S. Zhang, W. Pan, Y. Liu, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2011**, *37*, 606–612.
- [119] W. Zhang, X. Gong, Y. Cai, C. Zhang, X. Yu, J. Fan, G. Diao, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 366–370.

- [120] M. Jug, I. Kosalec, F. Maestrelli, P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 1030–1039.
- [121] M. Weickenmeier, G. Wenz, J. Huff, *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, DOI 10.1002/marc.1997.030181216.
- [122] R. Gref, C. Amiel, K. Molinard, S. Daoud-Mahammed, B. Sebille, B. Gillet, J.-C. Beloeil, C. Ringard, V. Rosilio, J. Poupaert, et al., *J. Control. Release* **2006**, *111*, 316–324.
- [123] H. Hamada, K. Ishihara, N. Masuoka, K. Mikuni, N. Nakajima, *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *102*, 369–371.
- [124] R. Namgung, Y. Mi Lee, J. Kim, Y. Jang, B. H. Lee, I. S. Kim, P. Sokkar, Y. M. Rhee, A. S. Hoffman, W. J. Kim, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–12.
- [125] Q. Da Hu, H. Fan, Y. Ping, W. Q. Liang, G. P. Tang, J. Li, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5572–5574.
- [126] C. Y. Quan, J. X. Chen, H. Y. Wang, C. Li, C. Chang, X. Z. Zhang, R. X. Zhuo, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4211–4219.
- [127] G. Wenz, B. Keller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 197–199.
- [128] S. A. S. Tabassi, F. S. M. Tekie, F. Hadizadeh, R. Rashid, E. Khodaverdi, S. A. Mohajeri, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2014**, *69*, 166–171.
- [129] K. Meyer, J. W. Palmer, *J. Biol. Chem.* **1934**, *107*, 629–634.
- [130] G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, P. Gemeiner, *Biotech. Lett.* **2006**, *2*–14.
- [131] N. F. Boas, *J. Biol. Chem.* **1949**, *181*, 573–575.
- [132] H. Akasaka, H. Komasaki, T. Arai, *Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid*, **1989**.
- [133] R. Stern, A. A. Asari, K. N. Sugahara, *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 699–715.
- [134] Y. Takei, A. Maruyama, A. Ferdous, Y. Nishimura, S. Kawano, K. Ikejima, S. Okumura, S. Asayama, M. Nogawa, M. Hashimoto, et al., *Faseb J.* **2004**, *18*, 699–722.
- [135] J. Entwistle, C. L. Hall, E. A. Turley, *J. Cell. Biochem.* **1996**, *61*, 569–577.
- [136] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, B. Seed, *Cell* **1990**, *61*, 1303–1313.

- [137] J. R. Fraser, T. C. Laurent, A. Engstrom-Laurent, U. G. Laurent, *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1984**, *11*, 17–25.
- [138] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, *Vet. Med. (Praha)* **2008**, *53*, 397–411.
- [139] D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, D. F. Williams, *Biomaterials* **1998**, *19*, 2101–2127.
- [140] J. W. Kuo, D. A. Swann, G. D. Prestwich, *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 232–241.
- [141] S. Banerji, A. J. Wright, M. Noble, D. J. Mahoney, I. D. Campbell, A. J. Day, D. G. Jackson, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 234–239.
- [142] J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer, A. Naumann, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 172–181.
- [143] B. Y. M. E. Adams, M. H. Atkinson, A. J. Lussier, J. A. N. I. Schulz, K. A. Siminovitch, J. P. Wade, M. Zummer, *Osteoarthr. Cartil.* **1995**, *3*, 213–225.
- [144] S. K. Hahn, S. J. Kim, M. J. Kim, D. H. Kim, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1374–1381.
- [145] Y. Luo, M. R. Ziebell, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 208–218.
- [146] L. Y. Yang Y, Zhang Y-M, Chen Y, Chen J-T, *J. Med. Chem.* **2013**, *12*.
- [147] N. Li, Y. Chen, Y. M. Zhang, Y. Yang, Y. Su, J. T. Chen, Y. Liu, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–7.
- [148] K. M. Elamin, K. Motoyama, T. Higashi, Y. Yamashita, A. Tokuda, H. Arima, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 386–394.
- [149] M. Zhang, C. Xu, L. Wen, M. K. Han, B. Xiao, J. Zhou, Y. Zhang, Z. Zhang, E. Viennois, D. Merlin, *Cancer Res.* **2016**, *76*, 7208–7218.
- [150] N. Ogata, K. Sanui, J. Wada, *J. Polym. Sci. , Polym. Lett. Ed.* **1976**, *14*, 459–462.
- [151] S. L. Snyder, P. Z. Sobocinski, *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 284–288.
- [152] N. R. Drozdovskaya, I. A. Kozlov, Y. M. Milgrom, I. S. Tsybovski, *FEBS Lett.* **1982**, *150*, 385–389.

- [153] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* (80- ). **2006**, *312*, 217–225.
- [154] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 459–476.
- [155] O. Schiavon, P. Caliceti, P. Ferruti, F. M. Veronese, *Farm.* **2000**, *55*, 264–269.
- [156] Y. Lu, S. E. Harding, A. Turner, B. Smith, D. S. Athwal, J. G. Grossmann, K. G. Davis, A. J. Rowe, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *97*, 2062–2079.
- [157] P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73*, 243–254.
- [158] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 4088–106.
- [159] P. McCaldon, P. Argos, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1988**, *4*, 99–122.
- [160] F. R. N. Gurd, *Enzym. struct. Part B* **1972**, 424–438.
- [161] L. D. Lavis, T.-Y. Chao, R. T. Raines, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *1*, 252–260.
- [162] N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876–884.
- [163] C. O. Beauchamp, S. L. Gonias, D. P. Menapace, S. V. Pizzo, *Anal. Biochem.* **1983**, *131*, 25–33.
- [164] M. Brinkley, *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 2–13.
- [165] F. Meng, B. N. Manjula, P. K. Smith, S. A. Acharya, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1352–1360.
- [166] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897–2904.
- [167] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797–3800.
- [168] H. S. G. Beckmann, V. Wittmann, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1–4.
- [169] C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.
- [170] L. M. Gaetke, C. K. Chow, *Toxicology* **2003**, *189*, 147–163.
- [171] N. E. Mbua, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet, G. J. Boons, *ChemBioChem*

- 2011, 12, 1912–1921.
- [172] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141–2143.
- [173] T. Hirotsu, T. Higashi, I. I. A. Hashim, S. Misumi, K. Wada, K. Motoyama, H. Arima, *Mol. Pharm.* **2017**, 14, 368–376.
- [174] E. H. Morgan, *Br. J. Haematol.* **1964**, 10, 442–452.
- [175] F. Kratz, U. Beyer, *Drug Deliv.* **1998**, 5, 281–299.
- [176] W. M. Pardridge, *Mol. Interv.* **2003**, 3, 90–105.
- [177] D. Banerjee, P. R. Flanagan, J. Cluett, L. S. Valberg, *Gastroenterology* **1986**, 91, 861–869.
- [178] Z. M. Qian, P. L. Tang, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1269, 205–214.
- [179] A. Dautry-Varsat, A. Ciechanover, H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, 80, 2258–2262.
- [180] M. D. Fleming, M. A. Romano, M. A. Su, L. M. Garrick, M. D. Garrick, N. C. Andrews, *Genetics* **1998**, 95, 1148–1153.
- [181] E. H. Morgan, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1996**, 11, 1027–1030.
- [182] F. Kratz, U. Beyer, P. Schumacher, M. Krüger, H. Zahn, T. Roth, H. Fiebig, C. Unger, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 7, 617–622.
- [183] F. Kratz, U. Beyer, T. Roth, N. Tarasova, P. Collery, F. Lechenault, A. Cazabat, P. Schumacher, C. Unger, U. Falken, *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 338–346.
- [184] S. Anabousi, U. Bakowsky, M. Schneider, H. Huwer, C. M. Lehr, C. Ehrhardt, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 29, 367–374.
- [185] Z. Shao, J. Shao, B. Tan, S. Guan, Z. Liu, Z. Zhao, F. He, J. Zhao, *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 10, 1223–1233.
- [186] J. Jollès, E. M. Prager, E. S. Alnemri, P. Jollès, I. M. Ibrahim, A. C. Wilson, *J. Mol. Evol.* **1990**, 30, 370–382.
- [187] P. Jollès, J. Jollès, *Mol. Cell. Biochem.* **1984**, 63, 165–189.
- [188] G. Sava, A. Benetti, V. Ceschia, S. Pacor, *Anticancer Res.* **1989**, 9, 583–592.
- [189] S. Lee-Huang, P. L. Huang, Y. Sun, H. F. Kung, D. L. Blithe, H. C. Chen,

- Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 2678–2681.
- [190] G. Zheng, D. R. Bachinsky, I. Stamenkovic, D. K. Strickland, D. Brown, G. Andres, R. T. McCluskey, *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, *42*, 531–542.
- [191] R. R. Yammani, S. Seetharam, B. Seetharam, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2001**, *281*, E900–E907.
- [192] M. Takano, Y. Koyama, H. Nishikawa, T. Murakami, R. Yumoto, *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *502*, 149–155.
- [193] M. Haas, A. C. A. Kluppel, E. S. Wartna, F. Moolenaar, D. K. F. Meijer, P. E. De Jong, D. De Zeeuw, *Kidney Int.* **1997**, *52*, 1693–1699.
- [194] E. Simoni, S. Daniele, G. Bottegoni, D. Pizzirani, M. L. Trincavelli, L. Goldoni, G. Tarozzo, A. Reggiani, C. Martini, D. Piomelli, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9708–9721.
- [195] P. M. Gannett, S. Hailu, J. Daft, D. James, B. Rybeck, T. S. Tracy, *J. Anal. Toxicol.* **2001**, *25*, 88–92.
- [196] H. O. Song, B. Lee, R. P. Bhusal, B. Park, K. Yu, C. K. Chong, P. Y. Cho, S. Y. Kim, H. S. Kim, H. Park, *PLoS One* **2012**, *7*, DOI 10.1371/journal.pone.0048459.
- [197] L. Deng, O. Norberg, S. Uppalapati, M. Yan, O. Ramström, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3188.
- [198] S. N. Yashkin, A. V. Bazilin, E. A. Yashkina, *Prot. Met. Phys. Chem. Surfaces* **2016**, *52*, 986–995.
- [199] M. I. Garcia-Moreno, P. Diaz-Perez, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. Garcia Fernandez, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2329–2334.
- [200] P. Wirth, J. Souuppe, D. Tritsch, J. F. Biellmann, *Bioorg. Chem.* **1991**, *19*, 133–142.
- [201] T. Higashi, F. Hirayama, S. Yamashita, S. Misumi, H. Arima, K. Uekama, *Int. J. Pharm.* **2009**, *374*, 26–32.
- [202] T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, H. Arima, K. Uekama, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3866–3871.
- [203] Y. Nodake, N. Yamasaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 767–774.

- [204] T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, K. Motoyama, H. Arima, K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2009**, *57*, 541–544.
- [205] N. Noinaj, N. C. Easley, M. Oke, N. Mizuno, J. Gumbart, E. Boura, A. N. Steere, O. Zak, P. Aisen, E. Tajkhorshid, et al., *Nature* **2012**, *483*, 53–61.
- [206] B. E. Eckenroth, A. N. Steere, N. D. Chasteen, S. J. Everse, A. B. Mason, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 13089–13094.
- [207] T. Durek, V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 4846–4851.
- [208] A. C. Pushkaran, N. Nataraj, N. Nair, F. Götz, R. Biswas, C. G. Mohan, *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 760–770.
- [209] J.-M. Lehn, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1988**, *27*, 89–112.
- [210] L. Häussling, H. Ringsdorf, *Langmuir* **1991**, *7*, 1837–1840.
- [211] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1–5.
- [212] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science (80-.)* **1989**, *243*, 85–88.
- [213] N. M. Green, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51–67.
- [214] P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 6633–6637.
- [215] J. Huskens, M. A. Deij, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41*, 4467–4471.
- [216] M. R. De Jong, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Chem. - A Eur. J.* **2001**, *7*, 4164–4170.
- [217] D. J. O'Shannessy, M. Brighan-Burke, K. K. Soneson, P. Hensley, I. Brooks, *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 457–468.
- [218] M. N. Kronick, W. A. Little, *J. Immunol. Methods* **1975**, *8*, 235–240.
- [219] H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, **1988**.
- [220] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513–526.
- [221] M. J. W. Ludden, A. Mulder, R. Tampe, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2007**, *46*, 4104–4107.

- [222] H. Kobayashi, T. Endo, N. Ogawa, H. Nagase, M. Iwata, H. Ueda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 258–263.
- [223] V. Singh, Y. He, C. Wang, J. Xu, X. Xu, H. Li, P. Singh, P. York, L. Sun, J. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *134*, 252–258.
- [224] W. Saenger, *Angew. Chemie-International Ed. English* **1980**, *19*, 344–362.
- [225] S. J. Katner, W. E. Johnson, E. J. Peterson, P. Page, N. P. Farrell, *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 3116–3125.
- [226] J. Horský, J. Pitha, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *18*, 291–300.
- [227] K. K. Chacko, W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1708–1715.
- [228] J. Hirtz, R. Malmaison, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1985**, *19*, 77S–83S.
- [229] R. D. Specian, M. G. Oliver, *Am. J. Physiol. Physiol.* **1991**, *260*, C183–C193.
- [230] V. Grabovac, D. Guggi, A. Bernkop-Schnürch, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1713–1723.
- [231] S. T. Lim, G. P. Martin, D. J. Berry, M. B. Brown, *J Control Release* **2000**, *66*, 281–292.
- [232] M. Gibaldi, R. N. Boyes, S. Feldman, *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 1338–1340.
- [233] L. X. Yu, G. L. Amidon, J. E. Polli, H. Zhao, M. U. Mehta, D. P. Conner, V. P. Shah, L. J. Lesko, M. L. Chen, V. H. L. Lee, et al., *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 921–925.
- [234] J. B. Dressman, G. L. Amidon, C. Reppas, V. P. Shah, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 11–22.
- [235] T. Loftsson, M. E. Brewster, M. Masson, *Am J Drug Deliv* **2004**, *2*, 261–275.
- [236] Y. Zhang, L. He, S. Yue, Q. Huang, Y. Zhang, J. Yang, *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 632–640.
- [237] S. Hariharan, V. Bhardwaj, I. Bala, J. Sitterberg, U. Bakowsky, M. N. V. Ravi Kumar, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 184–195.

- [238] T. Irie, K. Uekama, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147–162.
- [239] K. Réti-nagy, M. Malanga, É. Fenyvesi, L. Szente, G. Vámosi, *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 509–517.
- [240] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **1998**, *98*, 2045–2076.
- [241] T. Loftsson, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 63–67.
- [242] A. Beig, R. Agbaria, A. Dahan, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 73–78.
- [243] J. M. Miller, A. Dahan, *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 388–391.
- [244] G. a Wittert, I. M. Chapman, M. T. Haren, S. Mackintosh, P. Coates, J. E. Morley, *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2003**, *58*, M618-25.
- [245] F. A. Leidenberger, M. J. Stowitzki, O. Ortmann, *Klinische Endokrinologie Für Frauenärzte*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2014**.
- [246] A. S. Abdelhameed, A. M. Alanazi, A. a. Kadi, *Anal. Methods* **2015**, *7*, 5096–5102.
- [247] E. E. Sideris, M. A. Koupparis, P. E. Macheras, *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 90–95.
- [248] G. Arturson, G. Wallenius, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1964**, *16*, 81–86.
- [249] G. Greenberg, B. Feagan, F. Martin, L. Sutherland, A. Thomson, N. Williams, L.-G. Nilsson, T. Persson, *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 836–841.
- [250] R. Gabathuler, *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 48–57.
- [251] Y. Takakura, M. Hashida, *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 820–831.
- [252] Z. Zhen, W. Tang, H. Chen, X. Lin, T. Todd, G. Wang, T. Cowger, X. Chen, J. Xie, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4830–4837.
- [253] A. Verma, F. Stellacci, *Small* **2010**, *6*, 12–21.
- [254] R. Kircheis, A. Kichler, G. Waller, M. Kursa, M. Orgis, T. Feltzmann, M. Buchberger, E. Wagner, *Gene Ther* **1997**, *4*, 409–419.
- [255] N. Patel, D. Meshram, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *6*, 4882–4885.
- [256] E. K. Schneider, J. X. Huang, V. Carbone, M. Han, Y. Zhu, S. Nang, K. K. Khoo, J. Mak, M. A. Cooper, J. Li, et al., *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 249–258.

## 15 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich nun ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben und somit auch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die interessante Themenstellung, seiner ständigen Diskussionsbereitschaft, seiner kritischen Durchsicht meines Manuskripts sowie seiner wissenschaftlichen Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr bedanke ich mich bei seiner Funktion als mein wissenschaftlicher Begleiter und zweiten Gutachter und dem damit verbundenes Interesse an meinem Thema.

Desweiteren danke ich Dr. Josef Zapp für die Aufnahme der 2D-ROESY-Spektren meiner Cyclodextrin-Steroid-Komplexe.

Mein Dank geht auch an Dr. Klaus Hollemeyer für die Einarbeitung in die MALDI-Spektroskopie und die Aufnahme der MALDI-Spektren.

Bei Dr. Walid Elgaher (Helmholtz-Institut für pharmazeutische Forschung Saarland) bedanke ich mich für die intensive Betreuung bei der Aufnahme der SPR-Spektren und für die graphische Visualisierung meiner Protein-Konjugate.

An das Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik geht mein Dank besonders an Michelle Hesler für die zellbiologischen Untersuchungen meiner Wirkstofftransporter sowie an Dr. Yvonne Koch für die Hilfe bei der Diskussion der biologischen Ergebnisse und der hervorragenden Kooperation bei unserer gemeinsamen Publikation.

Einen herzlichen Dank geht auch an meine Vertiefungspraktikanten, besonders an Manuel Hawner und Kerstin Egele, die einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben und die auch Mitglied des Arbeitskreises wurden.

Annegret Engelke, Blandine Bossmann und Devid Hero danke ich besonders für die praktische Unterstützung im Laboralltag, insbesondere für die zahlreichen HPLC und ITC Messungen.

Bei Jessica Hilschmann und Jessica Brunke möchte ich mich ganz besonders für eure tiefe Freundschaft bedanken. Ihr habt mich vom ersten Semester an

bis zum Ende der Promotion begleitet. Ohne euch wäre die Zeit nur halb so schön gewesen.

Ich danke auch Kerstin Egele und Jessica Brunke für die gemeinsamen Momente auf den Konferenzen und den lustigen Erlebnissen in Lissabon, Tokyo und Athen.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für den besonderen Zusammenhalt in der Gruppe und für die Ausflüge in Freizeitparks, die Skifreizeit oder den Traktortouren.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen langjährigen Freunden bedanken, die mir immer zur Seite standen.