

**Synthese und Charakterisierung von
HPMA-stabilisierten Kolloiden sowie deren
Evaluierung *in vitro* und *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
“Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Annette Kelsch

geb. in Mannheim

Mainz, Januar 2015

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. [REDACTED] und Prof. [REDACTED] in der Zeit von Oktober 2011 bis Januar 2015 am Institut für Organische Chemie und am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz angefertigt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Doktorarbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 26.01.2015

Annette Kelsch

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2015

- *Für meine Familie* -

"Wege entstehen dadurch, dass man sie geht."

(Franz Kafka)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Der Wirkstoff und sein kolloidaler Träger	1
1.1.1	Polymerisation in Heterophase.....	2
1.1.2	Emulsionspolymerisation	2
1.1.3	Miniemulsionspolymerisation.....	4
1.1.4	Miniemulsions-Verdampfungsprozess.....	9
1.1.5	Grenzflächenaktive Verbindungen	11
1.2	Zugang zu wohldefinierten Polymeren	13
1.2.1	Freie radikalische Polymerisation	14
1.2.2	Kontrollierte radikalische Polymerisation	16
1.2.3	Chemische Ligation	22
1.3	Vom Reagenzglas über die Petrischale in den lebenden Organismus.	24
1.3.1	HPMA-basierte Trägersysteme.....	24
1.3.2	<i>In vitro</i> -Evaluierung.....	26
1.3.3	<i>In vivo</i> -Evaluierung	29
1.4	Messmethoden	38
1.4.1	Rasterelektronenmikroskopie	38
1.4.2	Dynamische Lichtstreuung	39
1.4.3	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	41
1.4.4	Konfokale Laserrastermikroskopie	42
1.4.5	Durchflusszytometrie	42
1.4.6	Positronen-Emissions-Tomographie.....	43
2	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG.....	47
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	49
3.1	Herstellung von kolloidalen Wirkstoff-Trägersystemen mittels Miniemulsionstechniken.....	50
3.1.1	Synthese von wohldefinierten HPMA-LMA-basierten Copolymeren als Tenside	51
3.1.2	Einsatz der polymeren Tenside in Miniemulsionsprozesse	67
3.1.3	Einsatz von bioabbaubaren Polypeptiden zur Darstellung von Kolloiden	76
3.2	<i>In vitro</i> Evaluierung von P(HPMA-<i>b</i>-LMA)-stabilisierten Kolloiden ...	79
3.3	<i>In vivo</i>-Evaluierung von P(HPMA-<i>b</i>-LMA)-stabilisierten Kolloiden	99

3.4	¹⁸F-markierte Folat-HPMA-Konjugate und deren Einfluss auf die Tumoranreicherung	113
3.5	Kupferfreie SPAAC an HPMA-Polymeren	125
4	ZUSAMMENFASSUNG	129
5	EXPERIMENTELLER TEIL	135
5.1	Verwendete Chemikalien	135
5.2	Mess- und Analysemethoden	138
5.2.1	Kernresonanz-Spektroskopie	138
5.2.2	FT-IR-Spektroskopie	138
5.2.3	UV/Vis-Spektroskopie	138
5.2.4	ESI-Massenspektroskopie	138
5.2.5	Gelpermeationschromatographie	139
5.2.6	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	139
5.2.7	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	139
5.2.8	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	139
5.2.9	<i>Ex vivo</i> Biodistribution	140
5.2.10	<i>In vivo</i> Kleintier-PET	140
5.2.11	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	141
5.2.12	Durchflusszytometrie	141
5.2.13	Toxizitätstest <i>via</i> MTS-Assay	141
5.3	Informationen zur verwendeten Zelllinie	142
5.4	Informationen zu verwendeten Tieren und Tumoren	142
5.5	Syntheseschritte zur Darstellung HPMA-basierter Polymere	143
5.5.1	Synthese des Kettentransferreagenz 4-Cyano-4-((thio-benzoyl)sulfanyl)-pentansäure (Säure-CTA)	143
5.5.2	Synthese des Monomers Pentafluorphenylmethacrylat	145
5.5.3	Synthese von Poly-(Pentafluorphenylmethacrylat) (P(PFPMA))	146
5.5.4	Synthese von PFPMA/LMA-basierten Block-Copolymeren	148
5.5.5	Synthese von PFPMA/LMA-basierten statistischen Copolymeren	150
5.5.6	Entfernung der Endgruppe der PFPMA-LMA-Copolymere mittels AIBN	151
5.5.7	Synthese von HPMA/LMA-basierten Copolymeren	152
5.5.8	Funktionalisierung HPMA/LMA-basierter Block-Copolymere	153
5.5.9	Synthese von Folat-HPMA-Konjugaten	155
5.5.10	Synthese von HPMA-Polymeren mit unterschiedlicher Anbindungschemie	160
5.6	Herstellung BODIPY-markierter Styrolsysteme	162
5.6.1	Synthese von BODIPY-Methacrylat	162
5.6.2	Synthese von BODIPY-markiertem Polystyrol	164

5.7 Herstellung polymerer Kolloide	165
5.7.1 Miniemulsionspolymerisation	165
5.7.2 Lösungsmittel-Verdampfungsprozess.....	166
5.8 ¹⁸F-Markierung der polymeren Kolloide	168
5.8.1 Synthese des ¹⁸ F-markierten Synthons 3-(2-(2-(2-[¹⁸ F]Fluor-ethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (¹⁸ F-OEG-Alkin).....	168
5.8.2 ¹⁸ F-Markierung mittels CuAAC	168
6 LITERATUR	169
VERÖFFENTLICHUNGEN	181
DANKSAGUNG.....	183
CURRICULUM VITAE.....	185

Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie	FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
ACC	engl. autocorrelation curve	[¹⁸ F]FETos	2-[¹⁸ F]Fluorethyl-1-tosylat
ACE	engl. angiotensin converting enzyme	Fr α	alpha-Folatrezeptor
ACVA	4,4'-Azobis(4-cyanvaleriansäure)	Fr β	beta-Folatrezeptor
AIBN	α,α' -Azoisobutyronitril	FR γ	gamma-Folatrezeptor
ATRP	engl. atom transfer radical polymerization	FS	Folsäure
β^+ , e^+	Positron	FSC	engl. forward scatter
Bl	Blase	g	Gramm
BODIPY	Bordipyromethen	Glu	Glutaminsäure
bzw.	beziehungsweise	GPC	Gelpermeationschromatographie
CDCl ₃	deutertes Chloroform	h	Stunde
CDR	CellMask™ Deep Red	HD	Hexadekan
CHCl ₃	Chloroform	He	Herz
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie	HPA	Hydroxypropylamin
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration	HPLC	engl. high pressure liquid chromatography
CRP	engl. controlled radical polymerization	HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
CT	Computertomographie	ID	injizierte Dosis
CTA	Kettentransferreagenz	IR	Infrarot
CTMA-Cl	Cetyltrimethylammoniumchlorid	i.v.	intravenös
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition	kDa	Kilodalton
CuSO ₄	Kupfer(II)-sulfat	L	Liter
D	Dispersität	λ_{ex}	Anregung
d	Dublett	LC	engl. liquid chromatography
DLS	Dynamische Lichtstreuung	Le	Leber
DMF	Dimethylformamid	LM	Lösungsmittel
DMSO	Dimethylsulfoxid	LMA	Laurylmethacrylat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LOR	engl. line of response, bzw. Koinzidenzlinie
engl.	englisch	Lys	Lysin
EPR	engl. enhanced permeability and retention	m	Multipllett
EtOH	Ethanol	M	Molar
eV	Elektronenvolt	MA	Methacrylat
evt.	eventuell	max.	Maximum
exp	Exponent	MBq	Megabequerel
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting	MeOH	Methanol
FBP	folatbindendes Protein	mg	Milligramm
FBS	fötales Kälberserum	MHz	Megahertz
		Mi	Milz

min	Minute	PMI	(<i>N</i> -(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid)
MIP	engl. maximum intensity projection	PS	Polystyrol
mL	Milliliter	ppm	engl. parts per million
mm	Millimeter	q	Quartett
M_n	Zahlenmittel der Molmasse	RAFT	engl. reversible addition fragmentation chain transfer
MR	Magnetresonanz	RCA	radiochemische Ausbeute
MRT	Magnetresonanztomographie	REM	Rasterelektronenmikroskopie
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Salz	R_h	hydrodynamischer Radius
μ	Mikro	s	Singulett
μ_2	sekundärer Kumulant	Säure-CTA	4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)-pentansäure
M_w	Gewichtsmittel der Molmasse	Sar	Sarcosin
MWCO	Porengröße der Membran (engl.: molecular weight cut-off)	SDS	Natriumdodecylsulfat
n	Neutron	SEC	engl. size exclusion chromatography
NaCl	Natriumchlorid	sin	Sinus
NAD(P)H	Nicotinamidadeninucleotid(phosphat)	SPAAC	engl. strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
NCA	α - <i>N</i> -Carboxyanhydrid	SSC	engl. side scatter
Ni	Niere	SUV	engl. standardized uptake value
NK	Negativkontrolle	TAC	engl. time activity curve
nm	Nanometer	TEA	Triethylamin
nM	Nanomolar	TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
NMP	Nitroxid-vermittelte Polymerisation	THF	Tetrahydrofuran
NMR	engl. nuclear magnetic resonance	TR	Texas Red® Cadaverin
NO	Stickstoffmonoxid	u.a.	unter anderem
ν_e	Neutrino	usw.	und so weiter
OG	Oregon Green Cadaverin 488	V	Vene
OSEM	engl. ordered subset expectation maximization	V59	2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril)
p	Proton	vgl.	Vergleich
PBS	engl. phosphate buffered saline	VOI	engl. volume of interest
PDI	Polydispersitätsindex	W 256	Walker 256 Brustkrebskarzinom der Ratte
PDLLA	Poly- <i>D/L</i> -Lactid	μ PET	Kleintier-PET
PEG	Polyethylenglykol	z.B.	zum Beispiel
PET	Positronen-Emissions-Tomographie		
PFPMA	Pentafluorphenylmethacrylat		
p.i.	engl. post injection		
PLGA	Poly- <i>D/L</i> -lactid-co-glykolid		
PLLA	Poly- <i>L</i> -lactid		

Abstract

Nanodimensional drug carrier systems are of enormous interest in cancer therapy by improving bioavailability and the pharmacokinetic profile of (chemo-)therapeutics. The main reason is an increased plasma half-life as consequence of size-dependent decreased renal excretion as well as an increased accumulation in the tumor tissue due to passive targeting (EPR effect).

Colloids prepared in this work have a defined shape, consisting of a biocompatible/biodegradable polymer core stabilized by polymeric surfactants. This allows the encapsulation of hydrophobic drugs (e.g. fluorescent dyes as hydrophobic drug model) and the attachment of targeting vectors by using HPMA-based surfactants. Therefore, HPMA-based block and random copolymers with different sizes and hydrophobic segment ratios were synthesized *via* RAFT polymerization in combination with the activated ester approach. Subsequently, these copolymers were used as surfactants in miniemulsion processes and screened in respect to their stabilization efficacy. The copolymers with sizes of 10 kDa and a hydrophobic LMA-incorporation of around 10 mol% were most qualified for stabilizing polystyrene and poly-*D/L*-lactide colloids leading to sizes of around 100-300 nm in diameter. To investigate the biological applicability, toxicity assays (MTS assays) were conducted showing no cytotoxicity up to concentrations of 1.2 mg/mL. Furthermore, DLS experiments were carried out in human blood serum to investigate interactions with blood components showing no interactions. The colloids themselves have also been labeled with fluorescent dyes for cell uptake and release kinetics of the hydrophobic drug model. To visualize all colloid components independently, core and shell materials, as well as the hydrophobic drug model were fluorescent by attaching different dyes. It could be shown, that the drug model is taken up into the cells first, followed by a delayed uptake of the colloids. Such an initial burst release is e.g. suitable for delivery of nitroglycerin having no off-target effect and leading to vasodilatation of blood vessels followed by an enhancement of the EPR effect. Inside the cells a slow detachment of the stabilizing block copolymers has been observed

between 8 h to 24 h, which allows a controlled release of a second covalently bound drug. To investigate the pharmacokinetic profile of the colloids μ PET studies and *ex vivo* biodistributions have been performed showing a strong signal in kidneys and bladder, which was much more pronounced in the case of polystyrene compared to polylactide colloids. The detachment of the ^{18}F -labeled block copolymers as a consequence of aggregation with blood components is one possible explanation for the strong kidney and bladder signals. Besides, different accumulation patterns of both systems were observed showing a strong dependency on the core material. Polystyrene colloids predominantly accumulated in liver and spleen, whereas polylactide colloids showed high blood activity levels. These results indicate and underline that PDLLA-based colloids are promising candidates for long circulating drug delivery systems. To investigate the folate-targeting concept HPMA-based folate conjugates were synthesized and tested in tumor bearing rats. These studies showed an increased tumor uptake in the case of folate-targeted polymers compared to non-targeted polymers underlining the huge potential of the folate-targeting concept *in vivo* within short time frames and their potential also for colloidal systems.

Kurzdarstellung

Nanodimensionale Wirkstoff-Trägersysteme sind in der Lage, sowohl die Bioverfügbarkeit als auch das pharmakokinetische Profil von Wirkstoffen drastisch zu verbessern. Hauptgründe dafür sind eine erhöhte Plasma-Halbwertszeit durch die größenbedingte verminderte renale Ausscheidung und eine gesteigerte Anreicherung im Tumorgewebe durch den EPR-Effekt. Diese Arbeit beschreibt die Synthese und Entwicklung neuer kolloidaler Wirkstoff-Trägersysteme, welche biokompatibel, teilweise bioabbaubar und funktionalisierbar sind. Ein Fluoreszenzfarbstoff wurde als hydrophobes Wirkstoffmodell eingekapselt. Wohldefinierte, eng verteilte und funktionalisierbare HPMA-basierte Block- und statistische Copolymere unterschiedlicher Molekulargewichte (10-25 kDa) und hydrophiler/hydrophober Zusammensetzung (10-50 mol%) wurden mittels RAFT-Polymerisation in Kombination mit dem Reaktivesteransatz hergestellt und in Miniemulsionsprozesse eingesetzt, um ihre Stabilisierungseffizienz zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die kleineren Copolymere (10 kDa) mit einem Einbau von 10 mol% LMA, sowohl im Modellsystem Polystyrol, als auch im bioabbaubaren PDLLA-System, besonders geeignet sind und ergaben monodisperse Kolloide im Größenbereich von 100 bis 300 nm. Die kolloidalen Systeme zeigten keine Wirkung auf die Zellviabilität. In Folge dessen wurde das Aggregationsverhalten in humanem Blutserum mittels DLS untersucht, wobei keine Interaktion mit Blutbestandteilen festgestellt werden konnte. Zellaufnahmestudien wurden an HeLa-Zellen durchgeführt, um das Schicksal der Kolloide *in vitro* zu untersuchen. Dabei wurden Kernmaterial, Hülle und das hydrophobe Wirkstoffmodell durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung getrennt betrachtet. Das hydrophobe Wirkstoffmodell wurde allein durch Interaktion der Kolloide mit den Zellen übertragen, was für eine diffusionsbedingte, initiale, aber unspezifische Freisetzung spricht. Eine solche Freisetzungskinetik kann durch Verwendung von Nitroglycerin, als vasodilatierender Wirkstoff mit geringer unspezifischer Wirkung, ausgenutzt werden, um den EPR-Effekt zu unterstützen. Die Aufnahme des Partikels hingegen geschieht zeitverzögert. Das Schicksal der Kolloide (sowohl des Kern- und des

Hüllmaterials) wurde durch doppelte Fluoreszenzmarkierung untersucht. Dabei kam es zu einer intrazellulären Ablösung der stabilisierenden Block-Copolymere zwischen 8 und 24 h. Nach Aufklärung der Aufnahme- und Freisetzungskinetiken wurde nun die Körperverteilung der PS- und PDLLA-Kolloide nach ^{18}F -Markierung mittels PET und *ex vivo*-Biodistributionsstudien untersucht. Dabei hatte das Kernmaterial einen Einfluss auf die Körperverteilung. PET-Studien in Mäusen zeigten, dass die stabilisierenden Block-Copolymere beider Kolloide ein starkes Signal in der Niere geben, wobei das der PS-Kolloide weiter ausgeprägt war. Darüber hinaus war eine Anreicherung dieser in Lunge, Leber und Milz festzustellen. Die Verdrängung der stabilisierenden Polymere durch die Interaktion mit Blutbestandteilen erklärt dabei das erhöhte Nieren- und Blasensignal der PS-Kolloide. Das Anreicherungsmuster der PDLLA-Kolloide hingegen zeigte neben der Nierenakkumulation eine erhöhte Blutaktivität und somit die gewünschten langzirkulierenden Eigenschaften. Diese Ergebnisse konnten auch mittels *ex vivo*-Biodistributionsstudien bestätigt werden. Um die Tumoranreicherung weiter zu verbessern wurde die Verwendung von Folat als Erkennungsstruktur am einfachen HPMA-Polymer untersucht. Die Konjugate zeigten eine erhöhte Anreicherung im Vergleich zu den Polymeren ohne Erkennungsstrukturen. Blockadestudien bestätigten die Selektivität der Anreicherung. Diese Daten zeigen das Potential der Folat-Erkennungsstruktur *in vivo* innerhalb kurzer Zeitfenster, welche nun auf kolloidale Systeme übertragen werden kann.

1 Einleitung

Das Hauptproblem in der Krebstherapie liegt darin, Wirkstoffe, welche hoch toxisch sind, zielgerichtet in erkranktes Gewebe, Zellen und intrazelluläre Kompartimente zu bringen. Somit besteht die größte Herausforderung darin, ein effizientes Wirkstoff-Transportsystem zu entwickeln, das im Zielgewebe eine gewünschte Dosis des Wirkstoffes freisetzt und eine reduzierte unspezifische Wirkung zeigt.

Dazu eignen sich nanopartikuläre Systeme, zu denen beispielsweise Mizellen, Liposomen und polymere Kolloide zählen. Allen Systemen gemeinsam ist eine reduzierte renale Ausscheidung aufgrund ihrer Größe und somit eine verlängerte Zirkulationszeit verbunden mit einer verbesserten Pharmakokinetik. Des Weiteren wird dadurch eine erhöhte Löslichkeit des Wirkstoffes gewährleistet und eine Tumorspezifität kann durch aktive (Erkennungsstrukturen) oder passive Anreicherungseffekte (EPR-Effekt) erhöht werden. Der EPR-Effekt basiert dabei auf einer erhöhten Permeabilität des Tumorgewebes für Nanometer große Objekte im Vergleich zu gesundem Gewebe verbunden mit einer mangelnden Lympfdrainage. Somit können sich kolloidale Systeme im Tumorgewebe anreichern wohingegen in gesundem Gewebe weitestgehend keine erhöhte Anreicherung zu finden ist. Unter Ausnutzung dessen sind wesentlich niedrigere Verabreichungskonzentrationen im Vergleich zum freien Wirkstoff nötig sodass starke systemische Nebenwirkungen vermindert werden können. Einige kolloidale Systeme haben bereits klinische Phasen erreicht^{1,2}, dennoch besteht trotz erster vielversprechender Ergebnisse die Notwendigkeit, diese zu optimieren. Ein Problem ihrer routinemäßigen Verwendung stellt beispielsweise die relativ geringe Ladungskapazität, Interaktionen mit Blutkomponenten sowie eine kurze Haltbarkeit dar.

1.1 Der Wirkstoff und sein kolloidaler Träger

Kolloide sind heterogene Systeme und ihre Herstellung kann durch unterschiedliche Techniken bewerkstelligt werden, wobei sich die

Heterophasenpolymerisation etabliert hat. Darunter fallen sowohl die Emulsions- und Miniemulsionspolymerisation, aber auch die Suspensionspolymerisation.

1.1.1 Polymerisation in Heterophase

Emulsionen bestehen aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten. Dabei ist die disperse Phase in der kontinuierlichen Phase in Form von Tröpfchen verteilt. Man unterscheidet zwischen der "direkten" Öl-in-Wasser-Emulsion und der "inversen" Wasser-in-Öl-Emulsion, wobei die Ausbildung der Tröpfchen unter anderem von den Eigenschaften der verwendeten Tenside, den Mengenverhältnissen Wasser zu Öl und der Temperatur abhängt. Direkte Emulsionen finden eine hohe Bandbreite an Anwendungen, da Wasser, als am häufigsten verwendetes Lösungsmittel, die polare Phase darstellt.³ Die Differenzierung zwischen den Emulsionen untereinander kann durch die Größe der dispergierten Tröpfchen, ihre thermodynamische Stabilität und die jeweilige Präparationsmethode gemacht werden. Somit kann in Makroemulsion (oder auch nur Emulsion genannt), Mikroemulsion und Miniemulsion unterschieden werden.^{4,5} Im Folgenden werden die Prozesse der direkten Emulsions- und Miniemulsionspolymerisation im Einzelnen näher erläutert.

1.1.2 Emulsionspolymerisation

Die klassische Emulsionspolymerisation besteht aus einem diffusionsgesteuerten Prozess, da das Monomer durch Zugabe von Tensid in der wässrigen Phase kinetisch stabilisiert wird. Die sich bildenden Monomertröpfchen haben eine Größe von ca. 1 μm .⁴ Häufig verwendete Konzentrationen an Tensid, welche weit oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration liegen, führen zur Ausbildung von Kugelmizellen, in deren lipophiles Inneres Monomer eindiffundieren kann und solubilisiert wird. Die Größenordnung von leeren Mizellen liegt bei etwa 3,5-5 nm und kann im gequollenen Zustand um etwa 1 nm anwachsen.⁴ In Abbildung 1 ist der Verlauf einer Emulsionspolymerisation schematisch dargestellt.

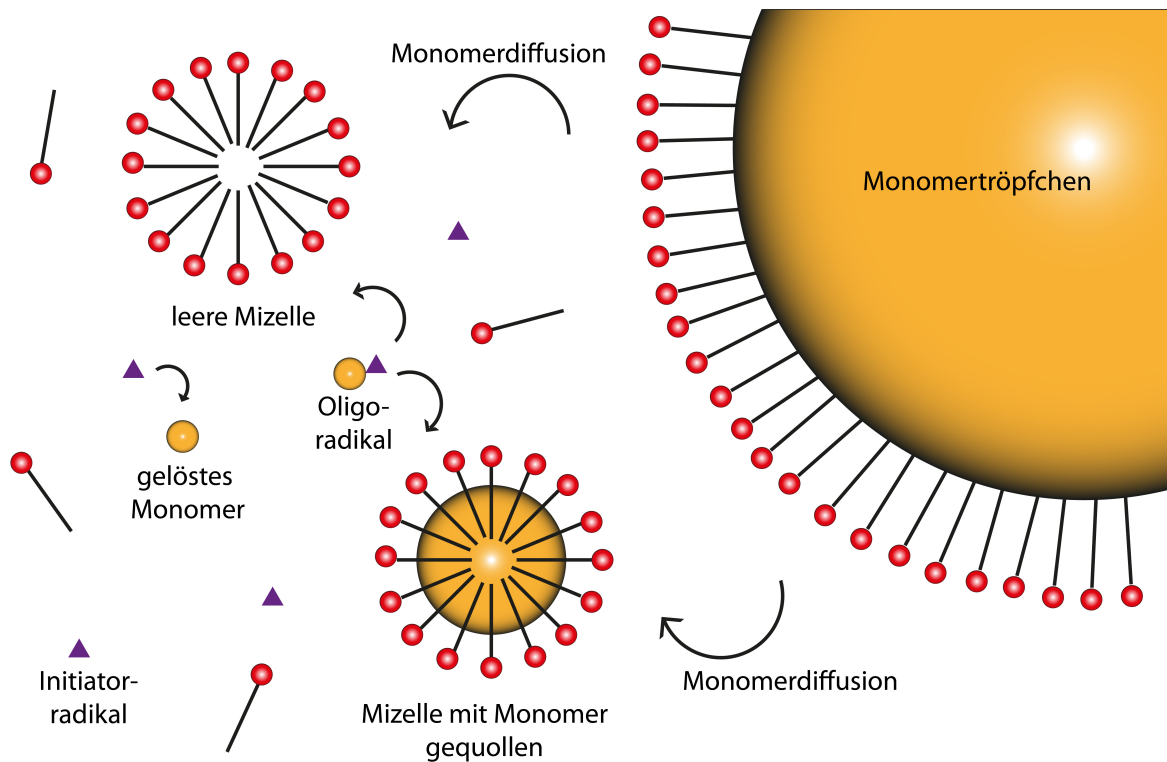


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Emulsionspolymerisation, modifiziert nach⁴.

Die Reaktionsmischung der klassischen Emulsionspolymerisation besteht somit aus einem Monomer, das im Dispersionsmedium kaum löslich ist, und einem im Dispersionsmedium löslichen Initiator und Tensid. Häufig wird Wasser als Medium verwendet in Verbindung mit positiv bzw. negativ geladenen Initiatoren wie Azo-Initiatoren oder Kaliumperoxodisulfat. Eines der am häufigsten eingesetzten Tenside ist das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS). So können monodisperse Kolloide aus zahlreichen Acrylaten, Methacrylaten und auf Styrol basierenden Monomeren dargestellt werden.⁶⁻⁸ Der Beginn einer solchen Polymerisation ist durch den Zerfall des Initiators gekennzeichnet. Die anschließende Partikelbildung findet dabei, im Gegensatz zur Suspensionspolymerisation, nicht in den Monomertröpfchen, sondern im Dispersionsmedium statt. Dabei reagieren entstandene Monomerradikale zunächst mit anderen Monomeren, worauf ihre eigene Hydrophobizität zunimmt. Auf Grund der zunehmenden Hydrophobie diffundieren die entstandenen Oligoradikale in leere oder mit Monomer gequollene Mizellen, wo die Partikelnukleation stattfindet.

Diese hier beschriebene Emulsionspolymerisation ist sicherlich eine der bekanntesten Heterophasenpolymerisationen und findet vor allem in der Industrie breite Anwendung.

1.1.3 Miniemulsionspolymerisation

Das Verfahren der Miniemulsionspolymerisation wurde 1973⁹ zum ersten Mal vorgestellt und hat verschiedene Vorteile gegenüber der klassischen Emulsionspolymerisation. Es bietet einerseits die Möglichkeit, wasserlösliche Stoffe in Polymerpartikel einzubauen^{10,11} bzw. in Polymerkapseln einzuschließen.^{12,13} Andererseits können Polymerkolloide im Nanometermaßstab leicht hergestellt werden und weisen darüber hinaus eine deutlich längere Stabilität über die Zeit auf. Die Miniemulsion erlaubt es, verglichen mit der Emulsionspolymerisation, eine deutlich niedrigere Konzentration an Tensid zu verwenden, d.h. zwischen 0,1% und 20% relativ zur dispersen Phase¹⁴⁻¹⁶, was zu einer nicht vollständigen Bedeckung der Oberfläche des zu stabilisierenden Tröpfchens führt. Die so erhaltenen homogen verteilten Tröpfchen sind deutlich kleiner als in der Emulsionspolymerisation und liegen in einem Größenbereich von 50-500 nm. Zur Bildung dieser sehr kleinen Tröpfchen bedarf es aber auch enormer Scherkräfte, die eine starke Vergrößerung der Öl-Wasser-Grenzfläche bewirken. Als geeignet für diese Anwendung haben sich beispielsweise Ultraschall-¹⁷, Mikrofluidizer-¹⁸ oder Hochdruckhomogenisatoren¹⁹ gezeigt. Die Stabilität der so entstandenen Miniemulsion wird von zwei miteinander konkurrierenden Größen bestimmt: Koaleszenz und Ostwald-Reifung (Abbildung 2).^{15,20}

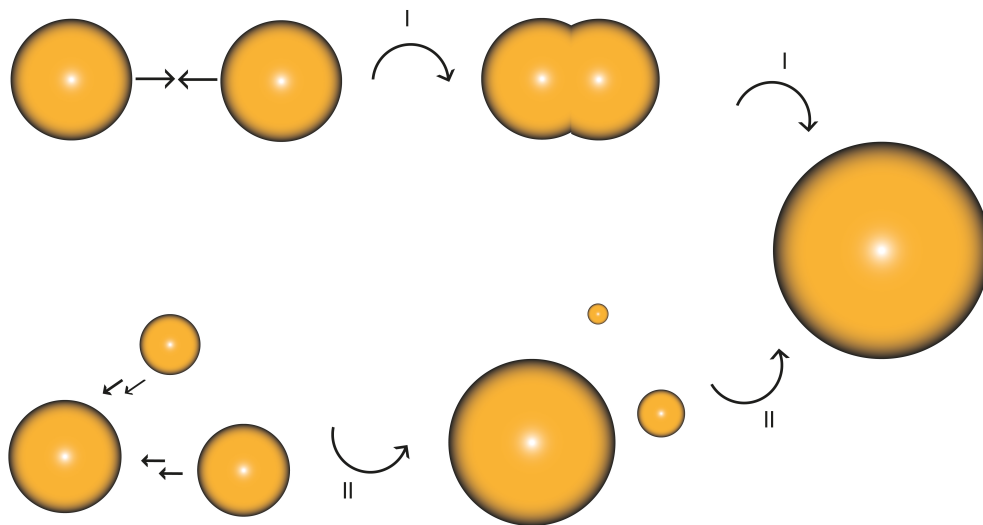


Abbildung 2. Schematische Darstellung des Koaleszenz-Verhaltens (I) und der Ostwald-Reifung (II). Bei Verlauf (I) kommt es zur Kollision und daraus resultierendes Zusammenfließen der Tröpfchen aufgrund von Brownscher Molekularbewegung. Bei Verlauf (II) diffundiert Öl aus kleineren Tröpfchen in das größere Tröpfchen, dabei wachsen Tröpfchen auf Kosten von kleinen.

Koaleszenz beschreibt den Prozess, bei dem Tröpfchen nach Kollision zusammenfließen.^{15,20} Sie entsteht durch die Bewegung der Tröpfchen, welche entweder mechanisch durch Rühren oder durch die Brownsche Molekularbewegung zustande kommt. Um diesem Prozess entgegenzuwirken, wird ein Tensid zugegeben, welches in der Lage ist, die Tröpfchen zu stabilisieren. Dabei schirmt das Tensid, entweder durch elektrostatische Kräfte (ionische Tenside) oder sterische Hinderung (nicht-ionische Tenside), die Tröpfchen voneinander ab (Abbildung 3).²⁰ Die Art des Tensids hat zusätzlich einen Einfluss auf die Tröpfchengröße, wobei ionische Tenside häufig zu kleineren Tröpfchen, verglichen mit nicht-ionischen Tensiden, führen. Es gilt dabei, je mehr Tensid verwendet wird, desto mehr Oberfläche kann stabilisiert werden und desto kleiner werden die Tröpfchen.²¹

Zusätzlich bewirkt eine Erhöhung der Viskosität der kontinuierlichen Phase eine Verringerung der Eigenbewegung der Tröpfchen und bietet eine weitere Möglichkeit, Koaleszenz zu unterdrücken.²²

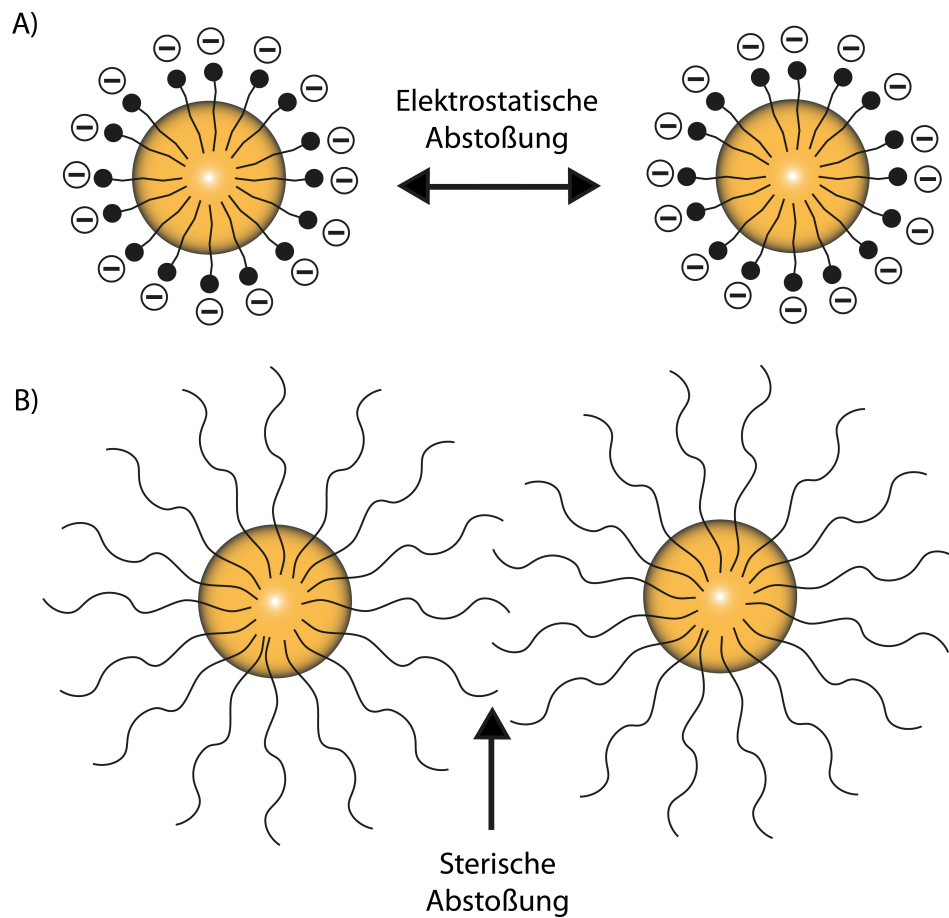


Abbildung 3. Schematische Darstellung der elektrostatischen Abstoßung (A) und der sterischen Abstoßung (B) zweier Tröpfchen mittels entsprechender Tenside.

Die Ostwald-Reifung stellt den zweiten Prozess dar, der zur Destabilisierung einer Emulsion führt.^{15,23} Unter Ostwald-Reifung versteht man die Massendiffusion der dispersen Phase durch die kontinuierliche Phase, was zum Heranwachsen von großen Tröpfchen auf Kosten von kleinen führt (Abbildung 2 B) und basiert im Wesentlichen auf einem höheren Laplace-Druck p_L der kleineren Tröpfchen. Der Laplace-Druck beschreibt die Differenz zwischen Druck innerhalb und außerhalb der Tröpfchen und ist hauptsächlich vom Tröpfchenradius r sowie der Grenzflächenspannung γ abhängig (Gleichung 1):²⁴

$$p_L = \frac{2\gamma}{r} \quad (1)$$

Gleichung (1) zeigt, dass bei kleineren Tröpfchen, bedingt durch die stärkere Oberflächenkrümmung, ein höherer Laplace-Druck im Inneren vorliegt als bei großen ($p \sim \frac{1}{r}$). So wird die Diffusion der dispersen Phase von kleinen Tröpfchen hin zu großen begünstigt, wobei Faktoren wie Löslichkeit, Tröpfchengröße und insbesondere die Polydispersität der Tröpfchen das Ausmaß der Ostwald-Reifung bestimmen. Ein Entgegenwirken des Laplace-Drucks führt so zur Unterdrückung der Ostwald-Reifung und kann durch die Zugabe eines osmotischen Reagenzes erreicht werden. Dieses Reagenz muss die Eigenschaft aufweisen, möglichst unlöslich (ultrahydrophob bei Öl-in-Wasser-Emulsionen) in der kontinuierlichen Phase zu sein, um dadurch zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks Π zu führen. Dieser Druck wirkt anschließend dem Laplace-Druck entgegen und kann wie folgt berechnet werden werden:

$$\Pi = \frac{RTc}{M} \quad (2)$$

Formel 2 zeigt, dass der osmotische Druck bei konstanter Temperatur T und R als idealer Gaskonstante, von der Konzentration c des osmotischen Reagenzes abhängt. Dabei wird mindestens ein molares Verhältnis von Ultrahydrophob zu Monomer von 1 zu 250 benötigt.²⁴ Hexadekan (HD) oder ein anderes langkettiges Alkan eignen sich besonders als osmotische Reagenzien und finden bei der direkten Miniemulsion Anwendung.

Wie bereits erwähnt stellt die Miniemulsion eine gute Möglichkeit dar Polymerkolloide herzustellen. Konkreter besteht die disperse Phase meist aus radikalisch polymerisierbaren Monomeren, die durch Zugabe eines Initiators polymerisiert werden können. Während der Polymerisation kommt es aufgrund der Stabilisierungsprozesse der Miniemulsion zu keiner Nettodiffusion zwischen den Monomertröpfchen untereinander. Somit sind die Partikel in der Regel das Abbild der vorhergehenden Tröpfchen hinsichtlich Größe und Form.¹⁵ Während des Polymerisationsprozesses stellt jedes Tröpfchen einen individuellen Reaktionsort

dar, sodass diese Tröpfchen auch unter dem Begriff Nanoreaktoren bekannt sind. Dies unterscheidet sie im Wesentlichen von der Makroemulsionspolymerisation, welche die Diffusion der Monomere aus den Monomertröpfchen als einen elementaren Prozess beinhaltet (vgl. Abschnitt 1.1.2). Abbildung 4 zeigt schematisch die Herstellung von Polymerkolloiden mittels direkter Miniemulsionspolymerisation.

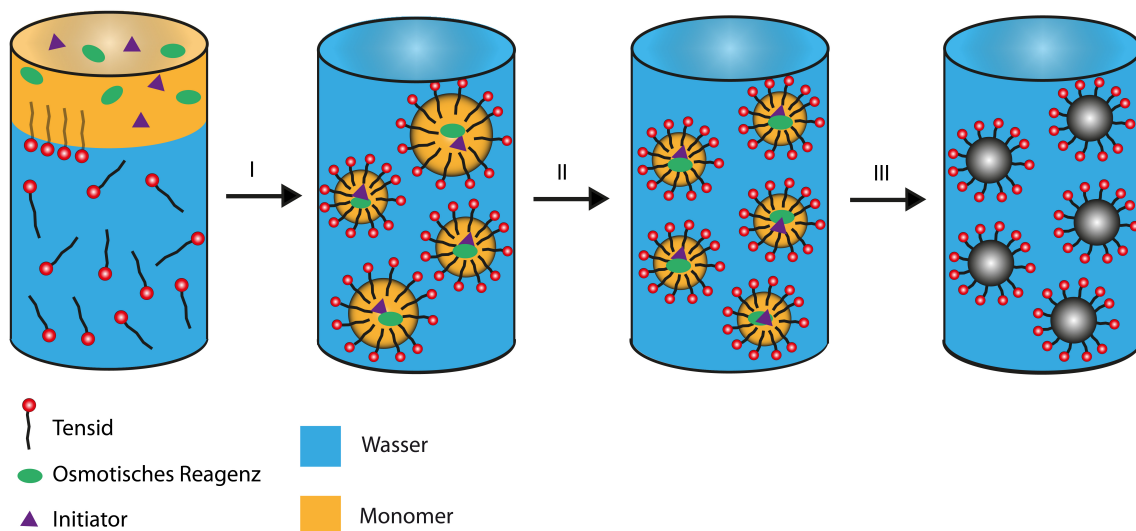


Abbildung 4. Schematische Darstellung einer direkten Miniemulsionspolymerisation; I) Präemulgieren, II) Homogenisierung mittels Ultraschall, III) Polymerisation.

Die Miniemulsionspolymerisation besteht zum einen aus einer wässrigen Phase, in der das Tensid gelöst vorliegt, und zum anderen aus einer dispersen Phase bestehend aus Monomer, Initiator und osmotischem Reagenz (meist HD). Im ersten Schritt kommt es zur Präemulgierung, bei der mittels kräftigem Rühren erste Tröpfchen generiert werden, die meist eine breitere Größenverteilung aufweisen. Anschließend werden gleichgroße Tröpfchen durch den Eintrag von hohen Scherkräften (z.B. Ultraschall) gebildet, in welchen die Polymerisation letztlich stattfindet. Idealerweise sind die so entstehenden Partikel genau so groß wie die ursprünglichen Tröpfchen.

1.1.4 Miniemulsions-Verdampfungsprozess

Die vorangehend beschriebene Miniemulsionspolymerisation ist eine einfache Methode zur Herstellung von monodispersen Partikeln in Größenbereichen von 50-500 nm und ist vielfältig einsetzbar. Allerdings weist sie auch Limitierungen auf, wie zum Beispiel bei der Herstellung von außergewöhnlichen und komplexen (hochfunktionellen) Polymeren, die anspruchsvolle Reaktionsbedingungen benötigen.^{25,26} Ein weiteres Problem stellt die Abtrennung von überschüssigem Monomer, Initiator oder Katalysator dar, welche nicht oder nur unter Destabilisierung der Partikel entfernt werden können. Um diese Probleme zu umgehen, kann man sich sogenannten Sekundärdispersionen bedienen, bei denen die Polymersynthese, inklusive Aufreinigung, von der Emulgierung getrennt wird. Eine Variante der Sekundärdispersionen stellt der von Burton und O'Farrell entdeckte Emulsions-Verdampfungsprozess dar.²⁷ Diese Methode beschreibt den Einsatz eines vorgefertigten Polymers oder eines Polymergemisches, welches in einer wässrigen Phase, die das Tensid enthält, emulgiert wird. In Abbildung 5 ist dies beispielhaft am Miniemulsions-Verdampfungsprozess gezeigt.

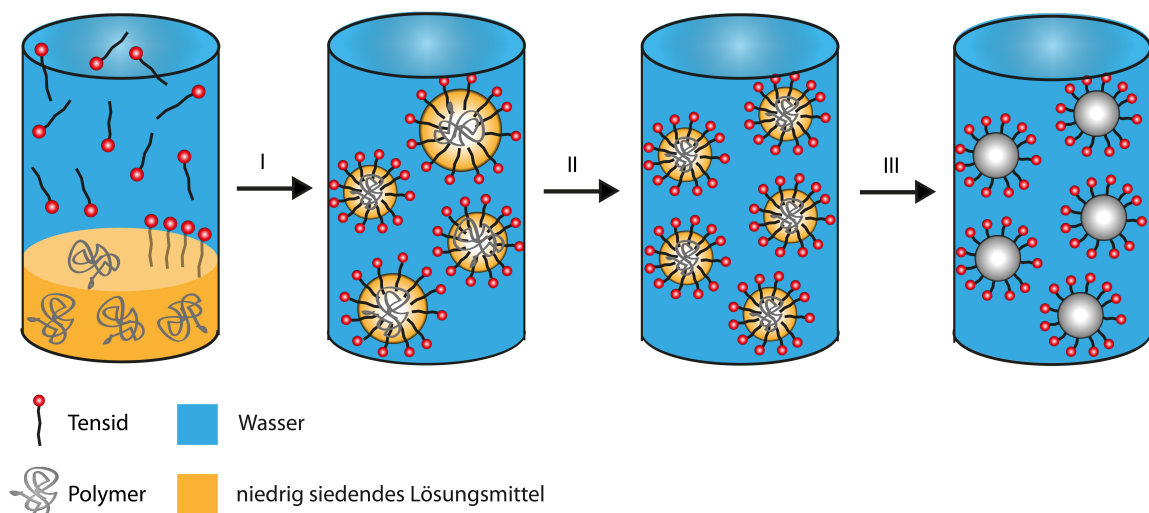


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Miniemulsions-Verdampfungsprozesses. Hierbei wird das Polymer-Lösungsmittel aus den entstandenen Tröpfchen abgedampft, um Nanopartikel zu erzeugen. Wasser stellt in diesem Fall die kontinuierliche Phase dar; I) Präemulgieren, II) Homogenisierung mittels Ultraschall, III) Lösungsmittelverdampfung.

Nach Bildung der Tröpfchen mittels Ultraschall, wird im Folgeschritt lediglich das Lösungsmittel durch leichte Temperaturerhöhung langsam verdampft.²⁸ Dies führt zur Nukleation des Polymers an der Grenzfläche zwischen Wasser und Lösungsmittel.²⁹ Die Entfernung des Lösungsmittels hängt von der Löslichkeit in der kontinuierlichen Phase ab, sodass sowohl die Temperatur als auch die physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittels einen entscheidenden Einfluss auf die Verdampfungsgeschwindigkeit haben. Dadurch kommt der Verdampfungsgeschwindigkeit eine besondere Rolle zu, da auf diese Weise die Härte der Partikel beeinflusst werden kann, vorausgesetzt, dass die kontinuierliche Phase mit dem Lösungsmittel der dispergierten Phase gesättigt ist und dass die Diffusionsrate des Lösungsmittels von dispergierter zu kontinuierlicher Phase schneller ist als der Verdampfungsprozess selbst. Mittels Gaschromatographie³⁰ oder Kernspinresonanzmessungen (engl. Nuclear Magnetic Resonance, NMR)³¹ kann überprüft werden, ob der Verdampfungsprozess, welcher meist innerhalb weniger Stunden erreicht ist, vollständig ist.³²

Einer der wichtigsten Parameter von Nanopartikeln ist zweifelsfrei ihre Größe. Da die Partikel ursprünglich aus Tröpfchen entstehen, besteht eine enorme Abhängigkeit zwischen Partikel- und Tröpfchengröße und somit ist die Kontrolle dieser Größen von Bedeutung. Im Fall der Miniemulsion ist die Tröpfchengröße überwiegend durch die Menge an Tensid beeinflussbar.³³ Des Weiteren spielen Parameter wie Eigenschaften des Lösungsmittels³⁴, Rührgeschwindigkeit oder Ultraschalldauer³⁵ bezüglich der Größe und der Größenverteilung eine wichtige Rolle. Längeres und stärkeres Schallen führt beispielsweise bis zu einem gewissen Maß zu kleineren und enger verteilten Partikeln, wobei es schwierig ist, beobachtete Effekte einem einzelnen Parameter zuzuschreiben, da sich diese meist nicht unabhängig voneinander verhalten. Des Weiteren dürfen physikalische Prozesse, die für die Destabilisierung der Emulsionen verantwortlich sind, wie Ostwald-Reifung und Koaleszenz bei der Größenbestimmung, wie auch bei der Größenverteilung, nicht außer Acht gelassen werden, da bekannt ist, dass die

Zugabe minimaler Mengen eines Ultrahydrophobs die Ostwald-Reifung unterdrücken kann.³⁶

Ein Prozess, bei dem auf die Zugabe eines zusätzlichen Ultrahydrophobs als osmotisches Reagenz verzichtet wird, ist der Emulsions-Verdampfungsprozess, da das Polymer selbst als Ultrahydrophob fungiert. Dabei muss die Konzentration des Polymers jedoch über einem Schwellenwert liegen, um die Ostwald-Reifung effektiv zu verhindern.³⁷ Loxley und Vincent vermuten hingegen, dass die breitere Größenverteilung, der mittels Emulsions-Verdampfungsprozess dargestellten Partikel, von der Koaleszenz abhängt.³⁸ Daher wurde die Größe der Emulsionströpfchen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt³² und mit diesen Experimenten bestätigt, dass die Koaleszenz eine wichtige Rolle bei der Partikelbildung einnimmt. Zwei Jahre nach der Entdeckung des Emulsions-Verdampfungsprozesses, reichten Vanderhoff, El-Aasser und Ugelstad dazu ein Patent³⁹ ein, was diesem Prozess hauptsächlich in der pharmazeutischen Wissenschaft Anwendung verschaffte, um Wirkstoffe in bioabbaubare Polymere einzukapseln^{40,41} und so Nanopartikel darzustellen.⁴²

1.1.5 Grenzflächenaktive Verbindungen

Grenzflächenaktive Verbindungen (häufig Tenside, im Englischen Surfactants, surface active agent) genannt, begegnen uns ständig im alltäglichen Leben. Auch in der Industrie sind sie nicht mehr weg zu denken. Sie finden Anwendung in den verschiedensten Bereichen, wie Waschmittel, Körperpflegeprodukte, Farben, Emulgatoren in der Kosmetik und Pharmaindustrie, Erdölrückgewinnung, Umweltschutz, Agrarchemie, Lebensmittelbranche, in Plastik usw. Sie weisen allesamt eine amphiphile Struktur auf und haben die Eigenschaft, sich an der Grenzfläche zweier nicht miteinander mischbarer Phasen anzuordnen und so die Grenzflächenspannung zu reduzieren.

1.1.5.1 Niedermolekulare Tenside

Tenside selbst sind meist niedermolekulare Verbindungen, die sich durch ihren amphiphilen Charakter auszeichnen. Im Allgemeinen bestehen sie aus einer polaren Kopfgruppe (geladene oder neutrale Gruppen) und einem unpolaren Molekülrest (meist unverzweigte Alkyl- bzw. Arylketten). Sie ordnen sich an Phasengrenzen unterschiedlicher Polarität an und orientieren sich mit ihrem Kopfteil zur polaren und mit ihrem hydrophoben Molekülrest zur unpolaren Phase hin. Dabei bewirken sie, dass die Oberflächen- oder Grenzflächenspannung zwischen diesen beiden Phasen herabgesetzt wird. Meistens handelt es sich bei einer der Phasen um ein wässriges System, sodass insbesondere ihre Wasserlöslichkeit von Bedeutung ist, welche von verschiedenen Faktoren abhängt: der Länge des hydrophoben Molekülteils, der Art der Kopfgruppe sowie der Wertigkeit des Gegenions. Beispiele für niedermolekulare Tenside, die in Emulsionsprozessen häufig Anwendung finden, sind Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Tensid und Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTMA-Cl) als kationisches Tensid.⁴³

1.1.5.2 Polymere Tenside

Die Verwendung von niedermolekularen Tensiden, wie z. B. SDS, kann allerdings auch Nachteile mit sich bringen. In der Annahme, dass die Adsorption hauptsächlich vom hydrophoben Effekt abhängt, sind die verwendeten Tenside nicht fest an der Oberfläche der Kolloide gebunden, sondern unterliegen einem dynamischen Gleichgewicht. Auf Grund ihrer hohen kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC, engl. critical micelle concentration), welche im Fall von SDS bei ca. 0,01 M liegt, löst sich das Tensid teilweise von der Oberfläche ab. Da SDS, hinsichtlich seiner toxischen Wirkung, bekannt dafür ist, Proteine zu denaturieren und die Fluidität von Zellmembranen zu verändern, ist es notwendig das Ablösen von der Partikeloberfläche zu verhindern, bzw. im Vorfeld durch aufwändige Aufreinigungsschritte der Miniemulsion (z. B. mittels Dialyse) die Partikel von überschüssigem Tensid zu befreien, um eine biologische Anwendung gewährleisten zu können. Die fehlende Funktionalisierbarkeit dieser Tenside

schließt ihre Verwendung bei der Darstellung von Kolloiden, die z. B. Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche tragen sollen, aus. Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen, bietet sich der Einsatz von polymeren Tensiden, d. h. amphiphilen Copolymeren mit einer niedrigen CMC, an. So ist gewährleistet, dass diese auf der Oberfläche des hydrophoben Kerns verbleiben und auch so die Form des Kolloids ausmachen. Beispiele hierfür sind Poly-(ethylen-co-butylen)-*b*-ethylenoxid (P(E/B-*b*-EO)) oder Lutensol AT50 (C₁₆C₁₈ Fettalkoholethoxylat, (EO)₅₀).

Zusätzlich ist durch die Verwendung polymerer Tenside eine selektive Funktionalisierung der hydrophilen Korona des Partikels möglich. Um solche polymeren Tenside herzustellen, eignen sich kontrollierte radikalische Polymerisationsmethoden, vor allem die RAFT-Polymerisation.

1.2 Zugang zu wohldefinierten Polymeren

Die kontrollierte Synthese von wohldefinierten Polymeren hinsichtlich Ketten- und Blocklängen, Architektur, Funktionalitäten und Dispersität stellt eine enorme Herausforderung dar. Die lebende anionische Polymerisation, welche 1956 von Michael Szwarc und Mitarbeitern entdeckt wurde, stellt als einzige Methode eine wirklich lebende Polymerisation dar, bei der es durch Zugabe von Monomer ausschließlich zum Wachstum des Polymers selbst kommt. Dies führt dazu, dass bei dieser Methode keine Nebenreaktionen auftreten, die Anzahl der wachsenden Ketten nahezu konstant ist und alle Ketten zu einer einheitlichen Länge wachsen. So ist es möglich Dispersitäten mit enger Molekulargewichtsverteilung ($M_w/M_n < 1,1$) eine sehr gute Kontrolle über das Molekulargewicht zu erhalten. Dabei kann das Molekulargewicht allein aus den Konzentrationen an Initiator und Monomer bestimmt werden. Jedoch setzt diese Methode eine sehr aufwendige Arbeitsweise aufgrund harscher Reaktionsbedingungen voraus und ist nur für eine geringe Anzahl von Monomeren, besonders unfunktionalisierten Monomeren, geeignet, was für die pharmazeutische Anwendung ein Problem darstellen kann.

1.2.1 Freie radikalische Polymerisation

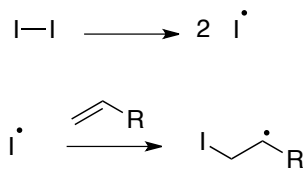
Anders verhält es sich mit der freien radikalischen Polymerisation. Sie ist die meist verwendete Polymerisationsmethode in der Industrie. Nahezu 50% der großtechnisch hergestellten Polymere werden auf diesem Weg erhalten, da eine Vielzahl von Monomeren mit funktionellen Gruppen unter milden Bedingungen zu hochmolekularen Polymeren umgesetzt werden kann. Hierbei können sogar Wasser und andere protische Lösungsmittel eingesetzt werden. Es muss lediglich auf die Abwesenheit von Sauerstoff (Radikalfänger) geachtet werden.

Daher sind Emulsionspolymerisationen, die sich meist die freie radikalische Polymerisation zu Nutze machen, von großem Interesse, da sie vor allem für den großtechnischen Maßstab geeignet sind und Polymerisationen innerhalb einer breiten Temperaturskala erlauben. Die Vielzahl von einsetzbaren Monomeren ist ein weiterer Punkt ihres breiten Anwendungsspektrums, um so Zugang zu einer großen Zahl von polymeren Materialien zu erhalten. Der Mechanismus der freien radikalischen Polymerisation kann in drei elementare Schritte eingeteilt werden: Initiierung bzw. Kettenstart, Kettenwachstum und Kettenabbruch (Schema 1).⁴⁴

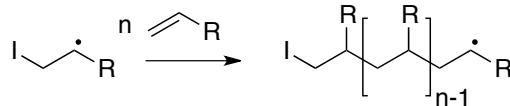
Im ersten Schritt, der Initiierung, werden aus einem Initiatorradikal thermisch oder photochemisch zwei Initiatorradikale erzeugt. Häufig verwendete Initiatoren sind Diazoderivate wie beispielsweise α,α' -Azobisisobutyronitril (AIBN). Im zweiten Schritt addiert ein Initiatorradikal an ein Monomer und startet die Kette. Im folgenden Wachstumsschritt reagieren diese Radikale mit neuen Monomeren. Während des Kettenwachstums kann es jedoch auch zu Nebenreaktionen kommen. Zum einen kann das radikalische Zentrum der wachsenden Kette durch H-Abstraktion auf ein Monomer oder ein Lösungsmittelmolekül übertragen werden. Dabei entsteht zwar eine neue Kette, die andere wird jedoch deaktiviert. Außerdem kann es zu Kettenabbruch-Reaktionen kommen. Die am häufigsten auftretenden Abbruchreaktionen sind die Kombination zweier wachsender Ketten oder Disproportionierung, bei welcher eine Radikalübertragung von einer wachsenden Kette auf eine andere stattfindet. Kombinationen führen zu Polymeren mit höheren

Molekulargewichten und geringeren Polydispersitäten, wohingegen die Disproportionierung Polymere mit geringeren Molekulargewichten und einer breiteren Molekulargewichtsverteilung liefert.

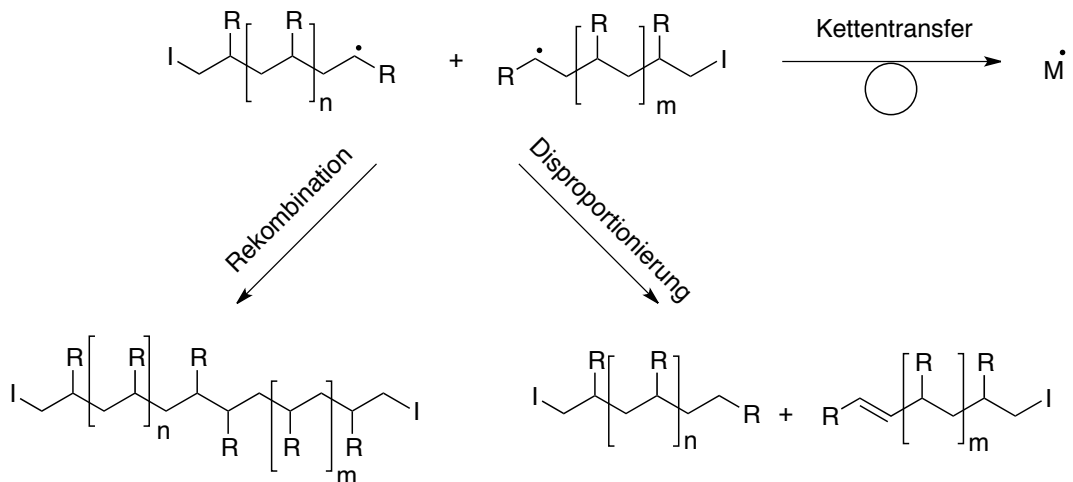
Kettenstart



Kettenwachstum



Kettenabbruch



Schema 1. Mechanismus der freien radikalischen Polymerisation; modifiziert nach ⁴⁴.

Durch die mangelnde Kontrolle und hohe Reaktivität der Reagenzien erhält man mit dieser Methode breit verteilte Molekulargewichte sowie uneinheitliche Endgruppen durch eine Vielzahl von möglichen Abbruch- und Nebenreaktionen, was diese Methode, trotz ihrer breiten Anwendungsmöglichkeiten, für die Herstellung von definierten Block-Copolymeren ungeeignet macht.

1.2.2 Kontrollierte radikalische Polymerisation

Kontrollierte radikalische Polymerisationstechniken (engl. controlled radical polymerization, CRP) kombinieren die Vorteile der eben beschriebenen Methoden, während es lediglich zu einer minimalen Erhöhung der Dispersität im Vergleich zur anionischen Polymerisation kommt.

Es gelingt bei dieser Polymerisationstechnik eine optimale Endgruppenkontrolle zu erreichen und zusätzlich, durch aufeinanderfolgende Monomerzugabe, Block-Copolymere darzustellen. Um eine gute Kontrolle über das Molekulargewicht und die Verteilung zu haben, muss die Initiierung schnell stattfinden und beendet sein, bevor die Polymerisation beginnt. Im Vergleich zur freien radikalischen Polymerisation ist die Schlüsselrolle der kontrollierten radikalischen Polymerisation, dass alle wachsenden Ketten gleichzeitig initiiert werden. Das bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstante der Initiierung höher sein muss als die Geschwindigkeitskonstante des Kettenwachstums, um so allen Ketten eine gleiche Wachstumsgeschwindigkeit zu ermöglichen. Diese Eigenschaften definieren die kontrollierte radikalische Polymerisation.⁴⁴ Zur Vermeidung von Abbruchreaktionen muss die Konzentration an freien Radikalen so gering wie möglich gehalten werden. Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen, die ein solches Konzept vereinen, wobei bei allen die reversible Terminierung der aktiven, wachsenden Polymerradikale genutzt wird.

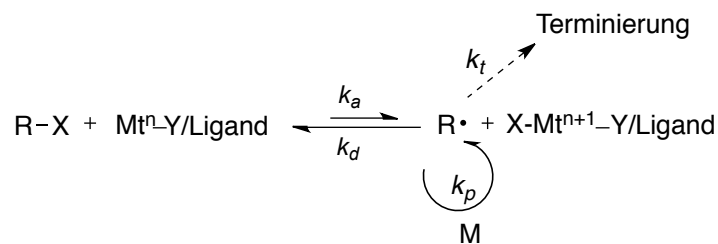
Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Konzepte der CRP kurz erläutert werden und im Weiteren näher auf die RAFT-Polymerisation, als hauptsächlich verwendete Methode, eingegangen werden.

1.2.2.1 Nitroxid-vermittelte Polymerisation (NMP)

Mit der Nitroxid-vermittelten Polymerisation (engl. nitroxide-mediated polymerization, NMP) wird eine Polymerisation beschrieben, die durch Alkoxyamine kontrolliert polymerisiert. Die Initiierung kann über zwei Wege erfolgen, wobei der erste Weg über einen thermolabilen Initiator und der

1.2.2.2 Metallkatalysierte Polymerisation (ATRP)

Mitte der 1990er Jahre beschrieben Mitsuo Sawamoto und Krzysztof Matyjaszewski fast zeitgleich kontrollierte radikalische Polymerisationsbedingungen in Anwesenheit von Übergangsmetall-Komplexen.^{47,48} Bei der sogenannten "Atom Transfer Radical Polymerization" (ATRP) besteht der Katalysator aus einem Übergangsmetall mit der Oxidationszahl n , einem entsprechenden Gegenatom Y (meist Bromid oder Chlorid) und mehrzähligen Stickstoffliganden (Schema 3). Da das Übergangsmetall weiter oxidierbar ist und freie Koordinationsstellen besitzt, kann eine Alkylhalogenidbindung unter Eigenoxidation und Aufnahme des Halogenids homolytisch gespalten werden. Bei der Initiierung stammt das Halogenid vom Initiator, später vom inaktiven Kettenende.



Schema 3. Allgemeiner Mechanismus der "Atom Transfer Radical Polymerization" (ATRP), modifiziert nach^{47,48}.

Der dabei entstehende Metallhalogenid-Komplex $\text{X-Mt}^{n+1}/\text{Ligand}$ sowie das freie aktive Alkylradikal $\text{R}\cdot$, können mit Monomer reagieren (k_p), reversibel deaktiviert (k_d), aber auch terminiert (k_t) werden. Da sekundäre oder tertiäre Alkylhalogenide wesentlich stabiler als primäre sind, werden diese meist als Initiatoren verwendet. Auch hier ist eine schnelle Initiierung und ein schneller Austausch zwischen deaktivierter und aktivierter Spezies, einhergehend mit der Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der inaktiven Spezies, ein Kriterium für eine gute Kontrolle über Molekulargewicht und Polydispersität. Die Stärke des Liganden, das verwendete Salz des Übergangsmetalls, aber auch die Temperatur und das Monomer selbst beeinflussen die Polymerisationskontrolle ebenfalls. Die ATRP findet eine breite Anwendung, da sich fast alle Vinylmonomere polymerisieren lassen. Nicht geeignet sind Monomere mit elektronendonierenden Eigenschaften,

die als Ligand wirken können und somit das Katalysatorsystem stören. Dazu zählen u. a. Carbonsäuren, Amine und Amide. Aus diesem Grund konnte diese Methode nicht für die in der Arbeit verwendeten Polymere eingesetzt werden.

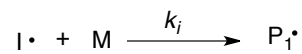
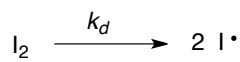
1.2.2.3 RAFT-Prozess

Als dritte und heutzutage meist verwendete CRP-Methode ist die 1998 von Ezio Rizzardo und San Thang entdeckte "Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs"- (engl. reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT) Polymerisation zu nennen.⁴⁹ Der Vorteil gegenüber ATRP ist ihre Robustheit gegenüber Säuregruppen während der Polymerisation und die Vermeidung von Metallen, was für eine biologische Anwendung von Vorteil ist.

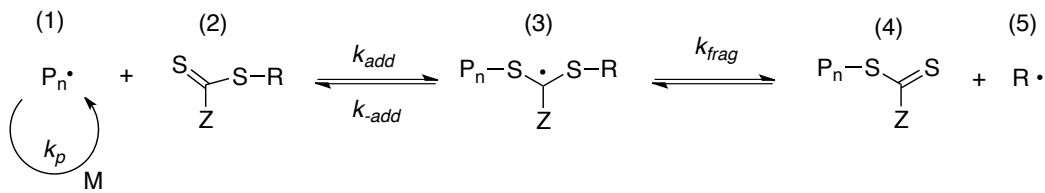
In der ersten Phase der RAFT-Polymerisation reagieren durch einen Initiator erzeugte Radikale ($I \cdot$) mit Monomer (M) zu Oligomeren mit aktiven Kettenenden (1), die durch Addition an das Kettenübertragungsreagenz (2) und anschließender Fragmentierung des entstandenen intermediären Radikals (3) deaktiviert (4) werden können (Schema 4). Das freigesetzte Radikal aus der Abgangsgruppe R (5) initiiert neue Polymerketten (6). Sobald alle R-Gruppen des Kettenübertragungsreagenzes freigesetzt sind, wird die Kinetik nur noch vom Kettengleichgewicht bestimmt. Aktive Kettenenden (6) werden an das Kettenübertragungsreagenz (7) addiert. Es kommt durch Übertragung der Radikalfunktion über das intermediäre Radikal (8) auf die am Reagenz gebundene (inaktive) Polymerkette und deren Abspaltung zur Deaktivierung der soeben addierten Polymerkette (7) und zur Aktivierung der abgespaltenen Polymerkette (6). Die Polymerketten sind dabei immer nur kurzzeitig aktiv, bevor die Reaktivität wieder auf eine andere Kette übertragen wird. Da Dithiocarbonyl-Verbindungen, wie z. B. Dithioester, Dithiocarbamate und Xanthogenate in der Lage sind Radikale zu stabilisieren, werden diese meist als Kettentransferreagenzien (engl. chain transfer agent, CTA) verwendet. Der finale Schritt ist eine unausweichliche irreversible Termination, die zu "toten" Polymerketten führt, welche keine Dithioester-funktionalisierten Endgruppen mehr tragen. Da die Termination dem

Kettenwachstum untergeordnet ist, tragen die Mehrzahl der Polymerketten diese Endgruppe, sofern die Polymerisation bei angemessenen Polymerisationszeiten gestoppt wird. Die RAFT-Polymerisation ermöglicht es, eine Vielzahl von funktionellen Monomeren unter milden Bedingungen zu polymerisieren, wie zum Beispiel Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMMA), welches überwiegend in dieser Arbeit verwendet wurde.⁵⁰

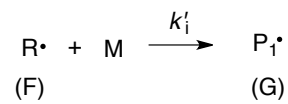
Initiierung



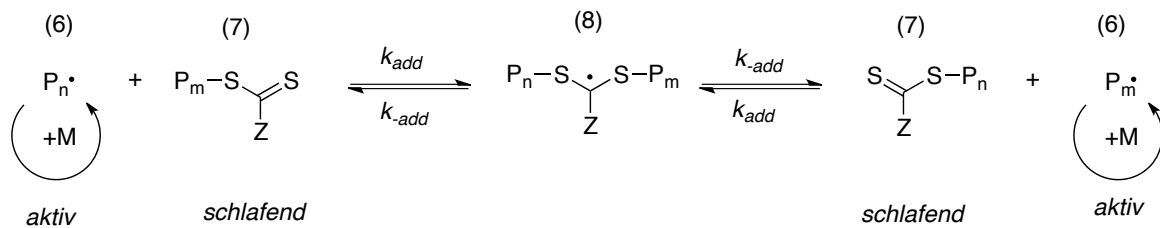
Kettenübertragung



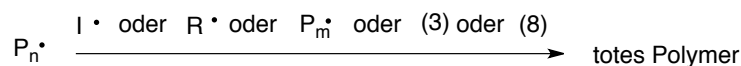
Reinitiierung



Kettengleichgewicht



Terminierung



Schema 4. Mechanismus der RAFT-Polymerisation am Beispiel eines Dithioesters, modifiziert nach.⁴⁹

Des Weiteren ist es möglich Endgruppen, basierend auf den funktionalisierten Kettentransferreagenzien, selektiv zu funktionalisieren sowie die Dithiocarbonyl-Verbindung am Kettenende zu modifizieren. Dies ermöglicht die Einführung einer Vielzahl von Funktionalitäten in das Polymer.⁵¹ Beispielsweise waren Roth *et al.* in der Lage zwei unterschiedliche Proteine an die beiden Kettenenden eines mittels RAFT-Polymerisation hergestellten wasserlöslichen, hetero-telechelen Polymers anzubinden.⁵²

Aufgrund der Dithiospezies an den Enden eines jeden Polymers sind diese in der Lage in einer anschließenden RAFT-Polymerisation als Makro-CTA eingesetzt zu werden und so funktionelle Block-Copolymere zu generieren. Diese Methode ist z. B. anwendbar auf mittels RAFT polymerisierte Präkursorpolymere aus PFPMA, da sie in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln sehr gut löslich sind (Abbildung 6).⁵⁰

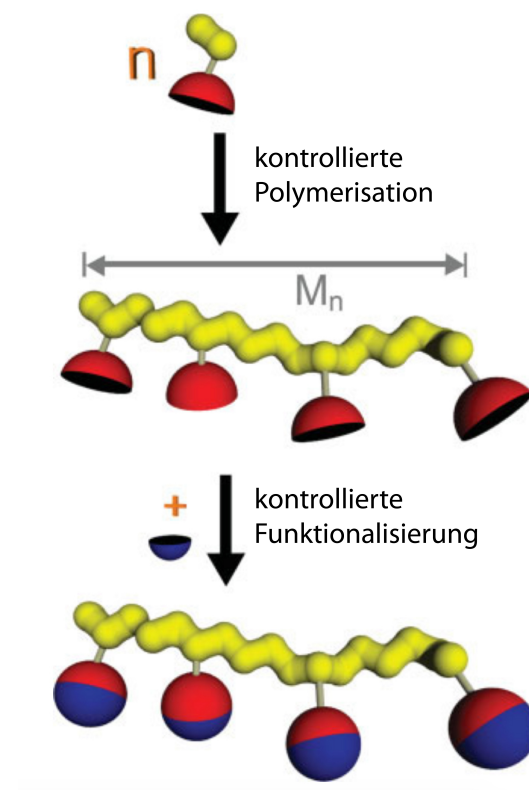


Abbildung 6. Schematische Darstellung der kontrollierten radikalischen Polymerisation von Reaktivestermonomeren und anschließender polymeranaloger Umsetzung zu funktionalisierten Polymeren, modifiziert nach⁵⁶.

So waren Barz *et al.* in der Lage, mittels polymeranaloger Umsetzung wohldefinierte amphiphile HPMA-basierte Block-Copolymere herzustellen, die für *in vitro*- und *in vivo*-Anwendungen eingesetzt werden konnten.⁵³⁻⁵⁵ Die Einführung einer Amidbindung gewährleistet eine erhöhte hydrolytische Stabilität der Seitenkette im Vergleich zu herkömmlich eingebrachten Esterfunktionen.

1.2.3 Chemische Ligation

Die chemische Ligation stellt eine einfache Methode zur Funktionalisierung von Biomolekülen dar, welche hoch selektiv, schnell und bestenfalls ohne Nebenreaktionen abläuft. Von besonderer Bedeutung sind dabei Reaktionen, die in wässrigem Medium unter physiologischen Bedingungen durchführbar sind.^{57,58}

1.2.3.1 Azid-Alkin-Cycloadditionen

Ein weit verbreitetes Synthesekonzept stellt die von Sharpless, Kolb und Finn 2001 definierte Click-Chemie dar, welche einfach durchzuführen ist, hohe Ausbeuten liefert, stereospezifisch abläuft, gut abtrennbare Nebenprodukte liefert und in umweltfreundlichen Lösungsmitteln abläuft.⁵⁹

Hierzu zählt unter anderem die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), bei welcher es sich um eine 1,3 dipolare Cycloaddition handelt.^{59,60} Unter Kupferionenkatalyse können so selbst bei Raumtemperatur stereospezifisch 1,4-substituierte Triazole hoher Stabilität gebildet werden (Abbildung 7, B). Die unkatalysierte Variante (Abbildung 7, A) liefert hingegen Gemische der 1,4- und 1,5-Regioisomere.⁶¹ Die selektive Synthese von 1,5-Triazolen ist durch die Verwendung von Rutheniumkatalysatoren möglich.^{62,63}

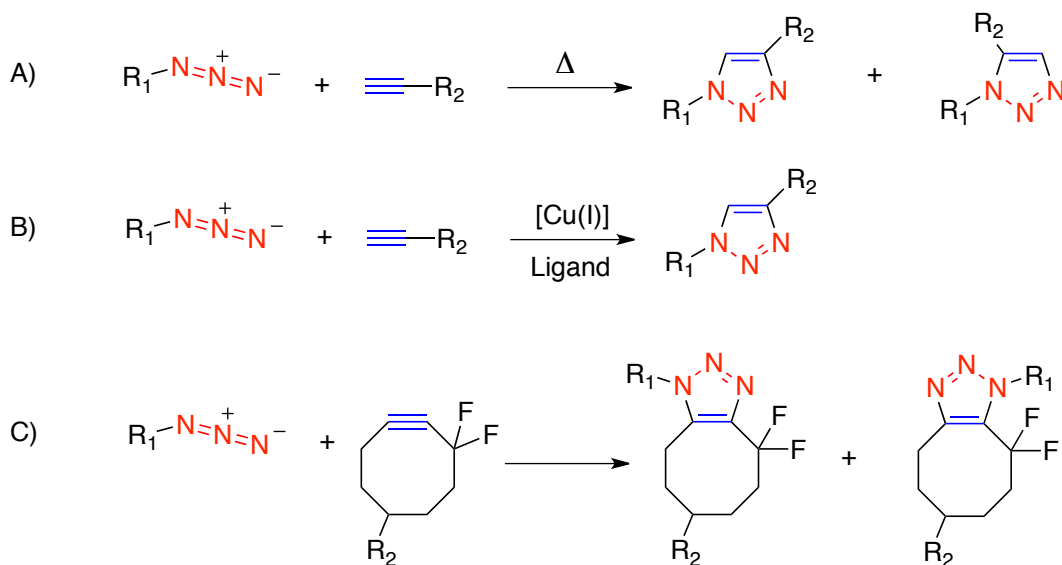


Abbildung 7. A) thermische Azid-Alkin-Cycloaddition (AAC); B) Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC); C) "strain-promoted" Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).

Mittlerweile ist die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition von Aziden und Alkinen zum Synonym für die Click-Chemie geworden. Zu den Vorteilen dieser Reaktion gehören die sehr guten Ausbeuten, die meist über 90% liegen⁶⁴ und kurze Reaktionszeiten, die selbst bei niedrigen Temperaturen nur wenige Stunden bis Minuten betragen. Des Weiteren ist die Reaktion unempfindlich gegenüber Sauerstoff und Wasser, besonders wenn Kupfer(I)-Spezies *in situ* durch die Reduktion von Kupfer(II)-salzen generiert werden.⁶⁵ Die Beliebtheit dieser Reaktion resultiert aber auch aus der hohen Toleranz gegenüber anderen funktionellen Gruppen.⁶⁶ Da Azid-Gruppen selten in biologischen Systemen vorhanden sind, ist die CuAAC eine attraktive Methode zur Darstellung von Biokonjugaten. Die Reaktion kann dabei in einer biologischen Umgebung stattfinden ohne die nativen biochemischen Stoffwechselwege zu beeinflussen (bioorthogonale Chemie).⁶⁷

Der Mechanismus der CuAAC konnte bisher nicht vollständig aufgeschlüsselt werden, da insbesondere die Intermediatstrukturen noch Anlass zur Diskussion geben.^{66,68,69} Bereits bekannt ist, dass die Reaktion im Gegensatz zur unkatalysierten Variante nicht konzentriert abläuft und es sich somit um keine pericyclische Reaktion handelt.⁶⁸

Durch die zelltoxische Wirkung von Kupfer(I)-Ionen stellt die Übergangsmetallkatalyse der Click-Reaktion bei der direkten *in vivo*-Anwendung ein Problem dar, was aufwendige Reaktionsschritte mit sich bringt.^{70,71} Der Fokus wird deshalb immer mehr auf kupferfreie Click-Methoden gelegt. 2004 wurde von Bertozzi und Mitarbeitern eine Strategie vorgeschlagen, die sich den Einsatz von gespannten Cyclooctinen zu Nutze macht (Abbildung 7, C).⁷¹ Auf die Ringspannung des Systems und die damit verbundene Deformation der Dreifachbindung ist die hohe Reaktivität dieser Alkinverbindung zurückzuführen. Die sogenannte SPAAC (engl. strain-promoted alkyne-azide cycloaddition) verläuft im Vergleich zur CuAAC wesentlich langsamer. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurden elektronenziehende Ringsubstituenten, wie z. B. Fluor-Atome in α -Position, zur Dreifachbindung eingeführt.⁷² Obwohl die SPAAC mit Cyclooctinderivaten nicht regiospezifisch verläuft, zeigt sie aber typische Merkmale der Click-Chemie wie Chemoselektivität, milde Reaktionsbedingungen und eine schnelle Umsetzung. Die Bioorthogonalität der SPAAC und die Anwendung unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7) macht diese Ligationstechnik zu einer sehr attraktiven Methode zur Synthese von Biokonjugaten.

1.3 Vom Reagenzglas über die Petrischale in den lebenden Organismus

1.3.1 HPMA-basierte Trägersysteme

Um für einen therapeutischen Zweck eingesetzt werden zu können, müssen Wirkstoff-Trägersysteme einige Voraussetzungen erfüllen. Zum einen sollten sie biokompatibel sein, d. h. weder zytotoxisch, noch inflammatorisch oder gar immunogen sein. Zum anderen sollten sie nach einer erfolgreichen Freisetzung des Wirkstoffes entweder ausgeschieden oder abgebaut werden können. Um das Auftreten von Entzündungsreaktionen oder Immunantworten vorzubeugen, sollte die Oberfläche der kolloidalen Systeme einen eher hydrophilen Charakter haben⁷³,

was auch für eine verlängerte Blutzirkulation vorteilhaft ist, da so Aggregation mit Plasmaproteinen unterbunden werden kann ("Stealth-like" Charakter).^{74,75}

In der Literatur sind einige erfolgsversprechende polymere Systeme beschrieben. Dabei ist zum einen Poly-*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (PHPMA) zu nennen, welches aufgrund seiner niedrigen Immunogenität und systemischen Toxizität^{76,77} ein attraktives Polymer darstellt und welches in das Konzept der polymeren Wirkstoff-Konjugate von Ringsdorf⁷⁸ passt. Auf dieser Grundidee wurden innerhalb von 25 Jahren erste HPMA-basierte Antikrebs-Wirkstoff-Konjugate entwickelt, die in klinischen Studien hinsichtlich ihrer Anwendung in der Krebstherapie untersucht wurden.⁷⁹ Das durch Duncan^{80,81} entwickelte HPMA-Doxorubicin Polymer-Konjugat, PK1⁸², wurde das erste Prodrug (1994), welches sich nach intravenöser (i.v.) Verabreichung mittels passiver Tumoranreicherungsmechanismen im Zielgewebe anreicherte.⁸³ Ein paar Jahre später wurde ein Galaktosamin-modifiziertes HPMA-Doxorubicin-Konjugat für eine gezielte Leberanreicherung, PK2, in Patienten mit primärem oder metastasierendem Leberkrebs evaluiert.⁸⁴ Durch diese Studien konnten grundlegende Kenntnisse hinsichtlich pharmakologisch aktiven Polymeren gewonnen werden, was den Fokus auf HPMA-basierte Formulierungen als Nanomedizin legte.^{85,86} Des Weiteren bringt die Entdeckung neuer molekularer Ziele in der Krebsbiologie und der damit verbundenen Entwicklung innovativer Krebsmedikamente neue Möglichkeiten für Wirkstoff-Kombinationstherapien mit sich.⁸⁷ Beispielsweise erhöhte der Aromatase-Inhibitor Aminoglutethimid, welcher zusätzlich an das HPMA-Doxorubicin Konjugat angebunden wurde, die Antitumoraktivität des Polymers signifikant.^{87,88} Auf Grund der Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten stellt HPMA, neben dem heutzutage häufig für biomedizinische Anwendungen eingesetzten Poly(ethylenglykol) (PEG)⁸⁹, eine vielversprechende Alternative in der Nanomedizin dar.⁹⁰ Das große Potential HPMA-basierter Nanomedizin ist nicht zu unterschätzen oder gar außer Acht zu lassen.^{91,92}

1.3.2 *In vitro*-Evaluierung

1.3.2.1 Bioabbaubare Systeme

Der Idealfall beschreibt den Abbau der Trägersysteme nach Freisetzung des geladenen Wirkstoffes. In Anlehnung an natürlich vorkommende Polymere wie Polysaccharide⁹³ (Zellulose, Stärke, Hyaluronsäure) oder Polyester⁹⁴ müssen daher biologisch abbaubare Polymere Stellen besitzen, die durch den pH-Wert selbst oder durch natürlich vorkommende Enzyme (z.B. Esterasen)⁹⁵ gespalten und abgebaut werden können.⁹⁶

Ein gut etabliertes Beispiel ist das Polylactid (PLA). Hierbei handelt es sich um einen Polyester, der hydrolytisch gespalten werden kann und somit die Grundvoraussetzung für ein polymeres Trägersystem zur Wirkstofffreisetzung erfüllt. Durch die Wahl der Enantiomere oder die Kombination mit anderen Polymeren kann das Abbauverhalten gesteuert werden, wobei Milchsäure als Abbauprodukt entsteht, welche ein Zwischenprodukt im Kohlenhydratmetabolismus ist und so in allen Geweben vorkommt. Zu den am häufigsten untersuchten Systemen gehören Poly-*D/L*-lactid-co-glycolid (PLGA)⁹⁷, Poly- ϵ -caprolacton, Poly-alkylcyanacrylat, Chitosan und Gelatine.

1.3.2.2 Aggregationsverhalten im Blutserum

Da nanopartikuläre Systeme meist intravenös (i.v.) appliziert werden, kommen sie in direkten Kontakt mit Blutbestandteilen, einer Vielzahl verschiedener Proteine, wobei das Serumalbumin mit ca. 55% den proteinogenen Hauptbestandteil darstellt. Dabei spielt die Adsorption an Plasmaproteinen eine entscheidende Rolle und kann die Eigenschaften der Systeme deutlich verändern und somit die Wirkungsweise sowie die Bioverträglichkeit erheblich beeinflussen. Es ist daher wichtig, die Systeme vor der *in vivo*-Applikation auf deren Wechselwirkung mit komplexen Proteinmischungen, wie sie im Blutserum oder -plasma vorliegen, zu testen. Die Proteinzusammensetzung des Plasmas gleicht der des Serums mit Ausnahme der nur im Plasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren.⁹⁸ Rausch *et al.*

zeigten bereits, dass sie mittels dynamischer Lichtstreuung das Aggregationsverhalten von nanopartikulären Systemen in konzentriertem humanem Blutserum messen können.⁹⁹ Auch mittels SDS-Gelelektrophorese und UV/VIS-Spektroskopie waren sie in der Lage, Wechselwirkungen der Partikel mit Proteinkomponenten (z. B. Albumin, Immunoglobulin und Fibronectin) zu untersuchen.¹⁰⁰

1.3.2.3 Aufnahme in die Zelle

Ziel eines nanopartikulären Wirkstoff-Trägersystems ist, neben einer langen Blutzirkulation und Schutz des Wirkstoffes vor Metabolisierung, in den meisten Fällen die Aufnahme in bestimmte Zellen. Besonders angestrebt ist eine Erhöhung der Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen im Zielgewebe, die u. a. Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche tragen, im Vergleich zu denen ohne Erkennungsstruktur. Da die Zellmembran nur bestimmte Moleküle wie Wasser, Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff oder lipophile Verbindungen über Diffusion aufnimmt, bedarf es zur Aufnahme anderer Moleküle bestimmter Aufnahmemechanismen. Makromolekulare Systeme werden beispielsweise über Endozytoseprozesse unter Ausbildung von Transportvesikeln internalisiert.^{101,102} Dieser Mechanismus kann wiederum in unterschiedliche Subtypen unterteilt werden, wie die Makropinozytose, die Clathrin-vermittelte, die Clathrin-unabhängige sowie die Caveolin-vermittelte Endozytose (Abbildung 8).

Des Weiteren gibt es die sogenannte Phagozytose, welche nur von bestimmten Zellen, den Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, durchgeführt werden kann. Die Phagozytose bietet der Zelle die Möglichkeit, Partikel, die im Größenbereich von > 700 nm liegen, in sogenannte Phagosomen einzuschließen und aufzunehmen.¹⁰²

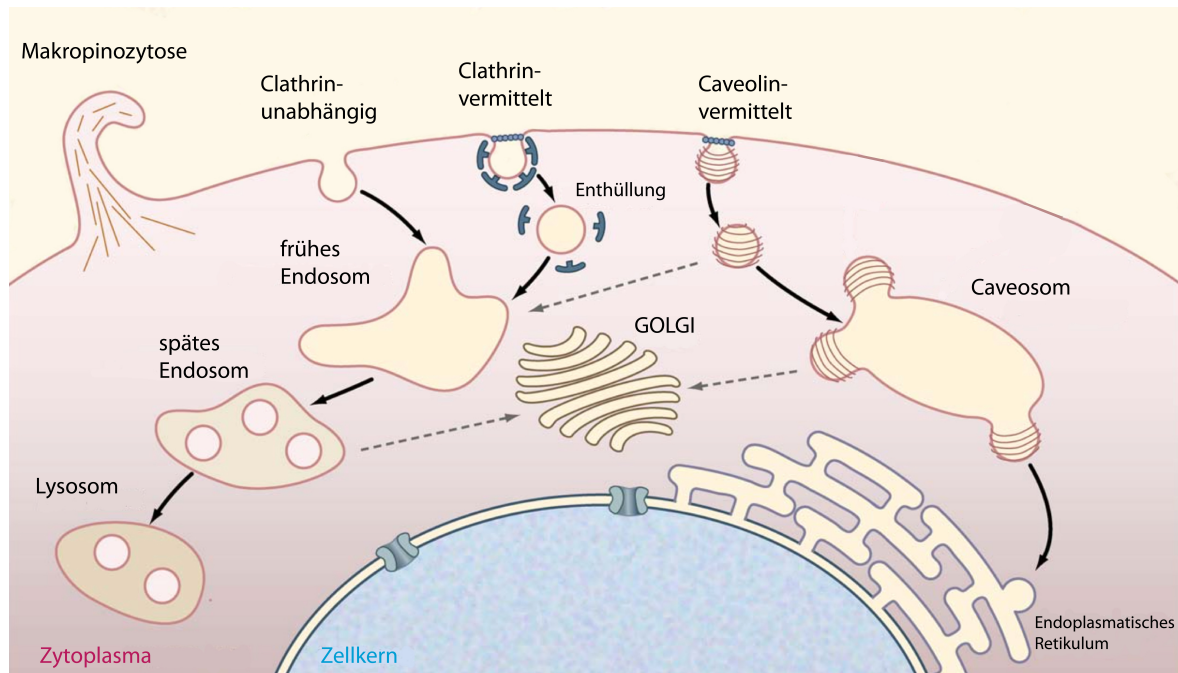


Abbildung 8. Gängige Aufnahmemechanismen, modifiziert nach¹⁰³.

Welcher Aufnahmeweg für welches System in Frage kommt, hängt von vielen Faktoren ab und ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist, dass die Größe eine übergeordnete Rolle spielt, aber auch Form, Ladung¹⁰⁴ und Funktionalitäten nicht außer Acht zu lassen sind. Ein weiterer wichtiger Aufnahmemechanismus ist die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Hierbei dienen spezielle Rezeptoren an der Zelloberfläche für die Erkennung der aufzunehmenden Partikel und lösen deren Aufnahme aus. Dieser Mechanismus kann bei Transportsystemen mit Erkennungsstrukturen ausgenutzt werden.¹⁰⁵ Die aufgenommenen Partikel befinden sich dabei zunächst im Endosom bzw., in einem speziellen Fall der Phagozytose, im Phagosom. Im folgenden verschmelzen diese mit dem Lysosom oder werden über Recycling-Endosomen zurück zur Zellmembran transportiert, wobei der Partikel in der Zelle verbleibt.¹⁰⁶ Je nach Zellkompartiment liegen unterschiedliche pH-Werte vor, was u. a. für die Freisetzung von Wirkstoffen ausgenutzt werden kann.

1.3.2.4 Freisetzung des Wirkstoffes

Sobald das Trägersystem an seinem Zielort angekommen ist, soll die Fracht, beispielsweise ein Wirkstoff, freigesetzt werden. Man kann sich unterschiedliche Eigenschaften zu Nutze machen, um die Freisetzung des Wirkstoffes zu erreichen. Dabei wird häufig der leicht erniedrigte pH-Wert in Endosomen und Lysosomen im Vergleich zum extrazellulären Milieu ausgenutzt¹⁰⁷, sodass der pH-bedingte Abbau der polymeren Systeme zu einer gezielten Freisetzung des Wirkstoffes führen kann.^{107,108} Ein weiteres Prinzip ist die intrazelluläre Freisetzung durch Änderung des Redoxpotentials.¹⁰⁹ Polymere Systeme, die spaltbare Linker wie Disulfidbindungen besitzen, können durch Glutathion, welches in der Zelle vorliegt, gespalten werden,¹¹⁰ da im Tumorgewebe beispielsweise im Vergleich zu normalem Gewebe eine 4-fach höhere Glutathion-Konzentration vorliegt.¹¹¹ Lysosomen enthalten aber auch Verdauungsenzyme, wie etwa Proteasen oder Hydrolasen, die polymere Trägersysteme abbauen können.¹¹² Eine Wirkstoff-Freisetzung kann auch mittels Diffusion durch die polymere Hülle erreicht werden. Dabei hängt die Freisetzung von verschiedenen Parametern, wie z. B. der Löslichkeit des Wirkstoffes, ab.

Um Wirkstoff-Trägersysteme auf ihre Freisetzungseigenschaften bezüglich des Kargos zu untersuchen oder diese in der Zelle verfolgen zu können, bedient man sich Biomarkern, meist einer einfachen Fluoreszenzmarkierung. Hierbei wird entweder der Wirkstoff selbst, bzw. das Wirkstoffmodell, oder das Trägermaterial markiert, um eine Charakterisierung *in vitro* durchführen zu können.

1.3.3 *In vivo*-Evaluierung

1.3.3.1 Positronen-Emissions-Tomographie als bildgebendes Verfahren

Die klinische Anwendung von polymerbasierter Nanomedizin erfordert eine vollständige Charakterisierung der verwendeten Substanzen. Erste Eindrücke hinsichtlich Körperverteilung, bzw. des Anreicherungsmusters im Zielgewebe und Exkretionswege können beispielsweise durch präklinische Bildgebungstechniken

gewonnen werden. Hierbei stellen diagnostische Methoden wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ein probates Mittel dar. Die Sensitivität dieser Messmethode wird durch das gut zu detektierende radioaktive Signal ermöglicht. Die dafür notwendige Markierung der Trägersysteme kann a) an verschiedenen Stellen mit einem Nuklid oder aber, je nach Fragestellung, mit Nukliden unterschiedlicher Halbwertszeit erfolgen. Der weitaus größte Vorteil gegenüber den meisten herkömmlichen Verfahren, wie der Biopsie, besteht darin, dass es sich bei der PET um ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren handelt, welches es ermöglicht, multiple Scans über verschiedene Zeiträume (am selben Tier) durchzuführen. Darüber hinaus erlaubt die PET quantitative Bestimmungen der Aktivität in Zielorganen/Zielgeweben über einen genau definierten Zeitrahmen.⁹² Auf diese Weise können makromolekulare Radiopharmazeutika hinsichtlich Tumoranreicherung und Körperverteilung am lebenden Organismus untersucht werden. Herth *et al.* konnten so beispielsweise das *in vivo* Verhalten von Polymeren unterschiedlicher Größe verfolgen, um so erste Eindrücke über Exkretionswege zu erhalten.⁵⁵ Gleichzeitig untersuchte Pressly *et al.* polymere Nanopartikel unterschiedlicher PEG-Kettenlängen hinsichtlich erhöhter Blutzirkulation.¹¹³

Die radioaktiv markierten Substanzen, Tracer genannt, die bei einer PET-Untersuchung eingesetzt werden, nehmen aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften zwar an den zu untersuchenden Körperprozessen teil oder binden an bestimmten Zielstrukturen, haben aber keinen physiologischen Effekt, da ihre Konzentration im nanomolaren Bereich liegt. So werden biochemische Prozesse nicht beeinflusst. Eine Übersicht über das PET-Prinzip ist in Abbildung 9 dargestellt.

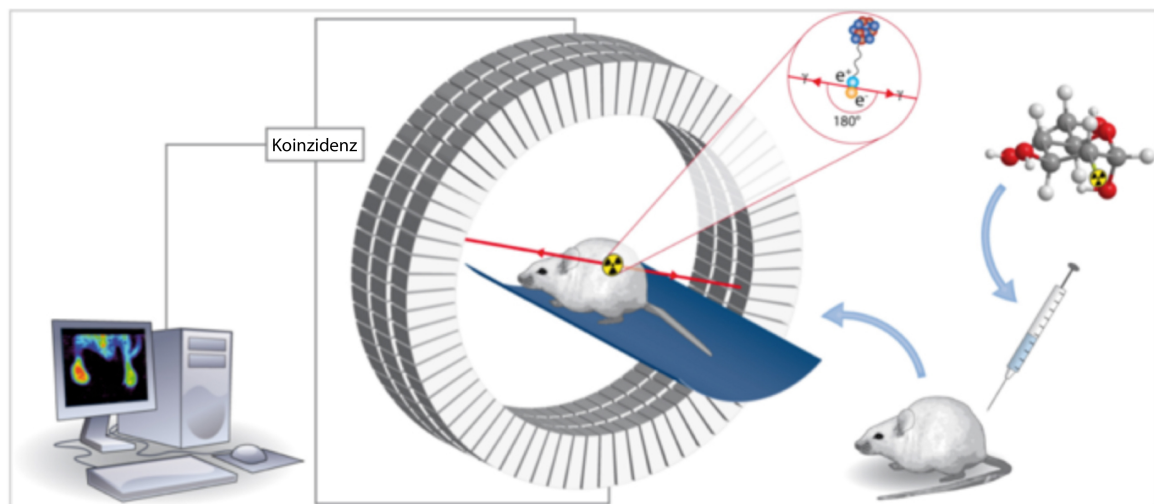


Abbildung 9. Schematische Darstellung des Positronen-Emissions-Tomographie- (PET) Prinzips am Beispiel eines Kleintier-PET Aufbaus, modifiziert nach¹¹⁴.

Neben den physiologischen Parametern sind kernchemische/physikalische Kriterien bei der Auswahl der zu verwendenden Radioisotope von großer Bedeutung. Das wichtigste Kriterium ist die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Radionuklids. Hierbei muss ein geeigneter Kompromiss zwischen Dauer der Radiosynthese und PET-Messung auf der einen Seite, aber auch der Strahlenbelastung der Patienten auf der anderen Seite gefunden werden. Kurzlebige Positronenemitter wie ^{13}N eignen sich nur für die Synthese einfacher Verbindungen und die Darstellung sehr schnell ablaufender Prozesse bzw. als Perfusionstracer. Die Verwendung von ^{11}C ($t_{1/2} = 20 \text{ min}$) und ^{18}F ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$) ermöglicht im Gegensatz dazu mehrstufige Synthesen.

Obwohl ^{64}Cu das am häufigsten verwendete Radionuklid für die PET-Bildgebung von Nanopartikeln darstellt, bringt es einige Nachteile mit sich. So sind für die Radiomarkierung Chelatoren nötig, welche die molekulare Struktur der polymeren Systeme signifikant beeinflussen und so direkt die Körperverteilung verändern können. Kleine Radioisotope, wie ^{18}F ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$), stellen daher interessante Alternativen mit erhöhter Bildauflösung dar, da Fluor mit seiner geringen β^+ -Energie eine bessere Ortsauflösung liefert. Darüber hinaus ist ^{18}F als Isoster von Wasserstoff ein Element, welches nur geringen Einfluss auf die *in vivo*-Eigenschaften der Verbindung hat. ^{18}F spielt in der PET-Diagnostik selbst die größte

Rolle, was auf seine besonderen physikalischen und nuklearen Eigenschaften, aber auch einfach auf seine Verfügbarkeit zurückzuführen ist.

Erste Untersuchungen, wie von Devaraj *et al.*, zeigten so die erfolgreiche Synthese und *in vivo*-Charakterisierung von ^{18}F -markierten Kern-Schale-Partikeln (^{18}F -CLIO)¹¹⁵ Diese Partikel bestanden aus einem superparamagnetischen Eisenkern und einer Hülle aus vernetztem Dextran, welches über Click-Chemie mit einem ^{18}F -PEG Synthon markiert werden konnte. Des Weiteren zeigten Guerrero *et al.*¹¹⁶ an ^{18}F -markierten Gold-Peptid-Konjugaten deren Körperverteilung in Ratten. Ein weiteres Beispiel ist die Radiomarkierung von Ceriumoxid-Partikeln mittels ^{18}F , wobei ebenfalls das *in vivo*-Verhalten dieser Partikel in Ratten untersucht wurde.¹¹⁷

Auf Grund der relativ kurzen Halbwertszeit von ca. 110 min können Synthese, Aufreinigung und klinische Anwendung sichergestellt werden und geben somit erste Eindrücke auf das *in vivo* Verhalten von Kolloiden.

Obwohl die Anreicherung der Nanopartikel meist durch den EPR-Effekt (engl. enhanced permeability and retention = "erhöhte Permeabilität und Retention")¹¹⁸ ein langsamer Prozess ist, können *in vivo*-Studien mittels ^{18}F -Markierung für ein erstes Indiz bezüglich des 'Metabolismus' und der Ausscheidung dienen. Im Folgenden können detaillierte Langzeitstudien angeschlossen werden, die sich mit der Anreicherung mittels des EPR-Effekts in Zielgeweben befassen.

1.3.3.2 Passive Anreicherungsmechanismen

Wie schon beschrieben sollen Wirkstoff-Trägersysteme ihre Ladung möglichst genau an einen gewünschten Zielort liefern, um der systemischen Toxizität der Wirkstoffe entgegenzuwirken. Man unterscheidet dabei zwei mögliche Mechanismen, die von ganz unterschiedlichen Faktoren abhängig sind. Die passive Anreicherung, welcher der EPR-Effekt zugrunde liegt und der durch die Größe der Systeme beeinflusst werden kann. Und die aktive Anreicherung (engl. targeting), bei welcher sogenannte Erkennungsstrukturen zum Einsatz kommen, die nach dem

Schlüssel-Schloss Prinzip mit Zellerkennungsstrukturen wechselwirken. (Abbildung 10).

Die passive Anreicherung beruht überwiegend auf pathophysiologischen Charakteristika in den Geweben. Grundgedanke ist, dass sich das Gewebe der meisten malignen Tumoren physiologisch und biochemisch von normalem Gewebe maßgeblich unterscheidet. Hierfür gibt es mehrere Ursachen. Während der schnellen Angiogenese von Tumoren kommt es zu einer Hypervaskularisierung. Die neu geformten Blutgefäße der Tumoren weisen so jedoch Mängel in ihrer vaskulären Struktur auf. Die Endothelzellen der Kapillargefäße von Tumoren sind fenestriert, das heißt sie weisen im Vergleich zu anderen Kapillaren deutlich größere Öffnungen auf. Auch das lymphatische System weist gegenüber gesundem Gewebe erhebliche Mängel auf. Somit ist eine effektive Lymphdrainage im Tumor nicht gewährleistet. Die Tumorzellen steigern die Produktion von Verbindungen, die für eine erhöhte Durchlässigkeit des Gewebes sorgen. Dies ermöglicht, dass Makromoleküle leicht und vermehrt in das Tumorgewebe eindiffundieren können. Der Abtransport der eindiffundierten Materialien ist aufgrund des mangelhaften lymphatischen Systems zusätzlich erschwert.^{118,119} Die erhöhte Durchlässigkeit und die verminderte Drainage führen so zu einer Anreicherung von eindiffundierten Makromolekülen, was bei gesundem Gewebe nicht auftritt und was sich die passive Wirkstoffanreicherung zu Nutzen macht. Wirkstoff-Trägersysteme wie Liposomen, polymere Mizellen und Kolloide können so ohne angebundene Erkennungsstrukturen an den Zielort gelangen.^{120,121}

Der EPR-Effekt stellt somit kein temporäres Phänomen dar, d. h. eine therapeutische Retention des Wirkstoffes ist für mehrere Wochen oder gar längere Zeiträume denkbar. Das Konzept des EPR-Effekts ist in Abbildung 10 dargestellt.

Da beim EPR-Effekt die Größe der makromolekularen Systeme eine entscheidende Rolle spielt, ist das Molekulargewicht der Systeme nicht unbedeutend. Um den EPR-Effekt vermehrt ausnutzen zu können, müssen die Makromoleküle in ihrem Molekulargewicht über der renalen Ausscheidungsgrenze liegen (>40 kDa) und eine erhöhte Blutzirkulation aufweisen.¹²²

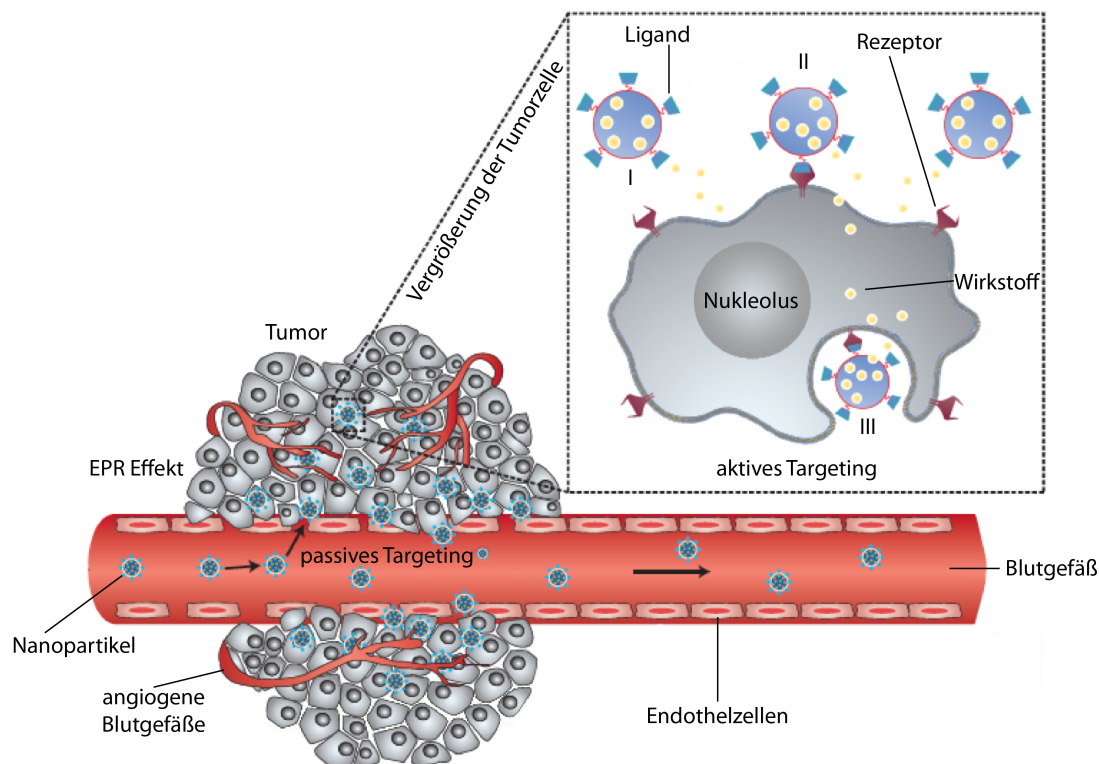


Abbildung 10. Schematische Darstellung der gezielten Anreicherung von nanopartikulären Trägersystemen im Tumorgewebe. Passive Anreicherung kann durch den EPR Effekt (engl. enhanced permeability and retention = "erhöhte Permeabilität und Retention" beschrieben werden. Eine aktive Anreicherung kann durch Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor erreicht werden. Die Nanopartikel können (I) ihre Ladung nahe der Zielzelle abgeben; (II) an der Zelloberfläche andocken; oder (III) internalisiert werden, modifiziert nach¹²³.

Um dies zu untersuchen, wurden bereits Studien mit HPMA-basierenden Copolymeren durchgeführt. Diese Copolymere variierten in ihrem Molekulargewicht (zwischen 22 und 778 kDa) und zeigten eine erhöhte Tumoraufnahme mit steigenden Molekulargewichten.¹²⁴ Die Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen (Abbildung 11) zeigen deutlich die abnormale Vaskularisierung der Tumorblutgefäße im Vergleich zum einheitlichen Netzwerk und Orientierung in gesundem Gewebe. Der EPR-Effekt ist jedoch nicht vollständig vom Molekulargewicht abhängig, sondern auch von der Oberflächenladung oder *in vivo*-Kontrollsystemen für Makromoleküle, wie z. B. Scavenger-Rezeptoren des RES, die einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Halbwertszeit nehmen. Maeda und Mitarbeiter zeigten, dass eine Reihe

von vaskulären Mediatoren den Effekt beeinflussen können.^{119,122} Dazu gehören z. B. Bradykinin/(Hydroxylpropyl³)bradykinin, Stickstoffmonoxid (NO) und seine Derivate, Prostaglandine oder Angiotensin-konvertierende Enzym- (ACE) Inhibitoren.

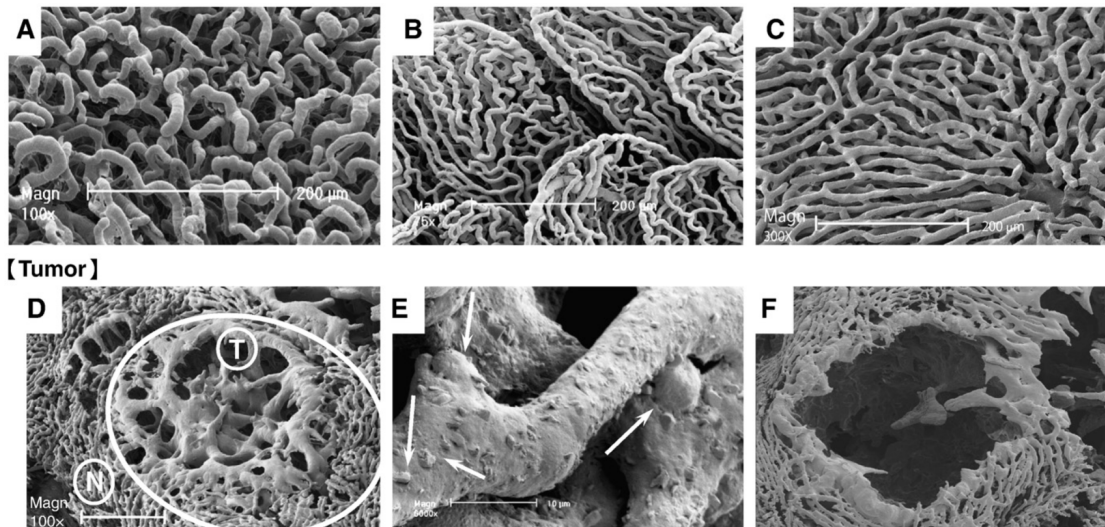


Abbildung 11. Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der Blutgefäße in gesundem Gewebe (A-C) und in metastatischen Lebertumoren (D-F). Normale Kapillaren der Bauchspeicheldrüse (A), des Dickdarms (B) und der Leber (C). Metastatische Tumorknöllchen in der Leber (D), Tumorgefäße am Kapillarlevel (E) und leere Hohlräume (F).¹²²

Die Freisetzung von NO oder NO-freisetzender Komponenten, wie zum Beispiel Nitroglycerin, bewirken einen erhöhten Blutfluss im Tumorgewebe, was zusätzlich den EPR-Effekt unterstützt und zu einer weiteren höheren Anreicherung von Makromolekülen führt. Folglich konnte so die Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe nochmals erhöht werden.^{122,125}

1.3.3.4 Aktive Anreicherungsmechanismen

Hinter dem Begriff aktiver Anreicherungsmechanismen (engl. active targeting) verbirgt sich die direkte "Adressierung" eines Wirkstoffes an den gewünschten Zielort ohne möglichst gesunde Zellen zu beeinflussen, um so unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren. Aktive Anreicherungsmechanismen beschreiben daher einerseits Erkennungsstrukturen wie Rezeptorliganden, Antikörper oder Peptide, welche an Zielstrukturen im Zielgewebe binden, um eine Tumoraufnahme

zu ermöglichen, aber auch eine erhöhte Retentionszeit an der Zelloberfläche kann eine Zellinternalisierung unterstützen.^{126,127} Neben relativ hochmolekularen Erkennungsstrukturen, wie Antikörpern, stellt z. B. die Folatrezeptor-vermittelte Anreicherung eine niedermolekulare Variante dar.

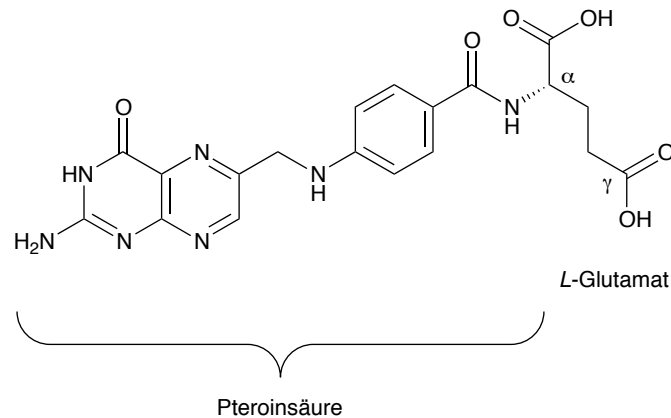


Abbildung 12. Chemische Struktur der Folsäure (FS).

(2S)-N-(4-(((2-Amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)benzoyl)glutaminsäure oder Folsäure (FS) (Abbildung 12) ist ein essentieller Nährstoff und zählt zur Gruppe der Vitamine. Folsäure ist auch als Vitamin B₉ bekannt und wurde 1941 von Esmond Snell entdeckt, der sie erstmals aus Spinat extrahierte. Er leitete die Bezeichnung aus dem lateinischen Wort "folium" für Spinat, ab.¹²⁸ Ab diesem Zeitpunkt war die Folsäure im Bereich der Ernährungswissenschaften nicht mehr wegzudenken und spielt vor allem während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle.¹²⁹ Unter physiologischen Bedingungen spielt die Folsäure eine entscheidende Rolle in der frühen DNA-Synthese, genauer während der Nukleotidsynthese als C₁-Donor.¹³⁰ Hierbei ist es nicht die Folsäure selbst, sondern ihre reduzierten Formen, welche aktiv an der Nukleotidbiosynthese teilnehmen.¹³¹ Folsäure selbst, kann wie bereits gesagt, nicht vom menschlichen Körper hergestellt werden, sondern muss über die Nahrung aufgenommen werden.¹³⁰ Die häufigste vorkommende Form der Folsäure im Plasma ist das 5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat mit einem Plasmaspiegel von 5-30 nM.

Die Überexpression des Folatezeptors in pathophysiologischen Fällen durch die erhöhte Proliferation von entarteten Zellen führte dazu, dass Folsäure eine immer interessanter werdende Zielstruktur in der Onkologie geworden ist. In Folge dessen beschäftigen sich immer mehr Forscher mit dieser Thematik für Therapie, aber auch Diagnostik.¹³²

Folate zeigen einen hydrophilen und anionischen Charakter was einen speziellen Transport über die Zellmembran erfordert. Daher gibt es auch eine Rezeptorfamilie, die sich unter dem Namen folatbindendes Protein (FBP) zusammenfassen lassen. Diese haben eine hohe Affinität (~ 1 nM) zur oxidierten Form der Folsäure.^{133,134} Diese Rezeptorfamilie kann in 3 Rezeptor-Untergruppen gegliedert werden, dem alpha-Folatezeptor ($FR\alpha$), dem beta-Folatezeptor ($FR\beta$) und dem gamma-Folatezeptor ($FR\gamma$), wobei $FR\alpha$ und $FR\beta$ N-glykosyliert und Zelloberflächenrezeptoren sind. Allerdings kommen $FR\alpha$ und $FR\beta$ nur auf bestimmten Organen und bestimmtem Gewebe wie der Lunge ($FR\alpha$), dem Adergeflecht ($FR\alpha$), der Plazenta ($FR\alpha/FR\beta$) und den Nieren ($FR\alpha$) vor.¹³⁵⁻¹³⁷ Es konnte gezeigt werden, dass $FR\beta$ häufig auf aktivierten Makrophagen, in Gelenksflüssigkeit und in entzündeten Gelenken von rheumatischer Arthritis in Menschen und Rattenmodellen (über)exprimiert ist.¹³⁸⁻¹⁴¹

Die entscheidende Rolle des Folats während der DNA-Biosynthese erklärt die Überexpression des FR in vielen Arten von Krebs, wie Eierstock-, Gebärmutterhals- und Gebärmutter-schleimhautkrebs. Die biologischen Eigenschaften der Folate, wie die schnelle Aufnahme in Zellen oder Gewebe mit FR-Expression und die schnelle Ausscheidung aus gesundem Gewebe, macht sie attraktiv für die Anwendung als Tumorerkennungsstruktur in der molekularen Bildgebung, aber auch in Therapieansätzen. Die ersten Therapieansätze von metastasierendem Krebs in Mäusen wurde 2003 durchgeführt, als Kennedy *et al.* Fluoreszein-Folat-Konjugate verwendeten.¹⁴²

Bezieht man dieses Konzept auf makromolekulare Systeme, konnte gezeigt werden, dass das Anbinden von Folat an PHPMA zu einer Steigerung der Aufnahme von FS-PHPMA-Konjugaten in Tumorzellen *in vitro* geführt hat.¹⁴³ Des Weiteren konnte

gezeigt werden, dass die Konjugation von FS an Liposomen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich des gezielten Transports verschiedenster Wirkstoffe in Tumorzellen liefert.¹⁴⁴⁻¹⁴⁹ Auch folattragende Nanopartikel gewinnen immer mehr Beachtung.¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ Eisenpartikel, die mit Folat derivatisiert sind und somit gezielt an Tumorgewebe binden, zeigen erste Ergebnisse als MR-Kontrastreagenzien.¹⁵⁵

1.4 Messmethoden

1.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist eine Methode zur Abbildung von Oberflächenstrukturen im Nanometerbereich.¹⁵⁶ Sie macht sich beschleunigte Elektronen zur Bildgebung als Strahlungsquelle zu Nutze. Hierbei ist die maximale Auflösung des Mikroskops durch die Wellenlänge der verwendeten Quelle limitiert. Ernst Abbe legte die Abhängigkeit des Auflösungsvermögens zwischen zwei Punkten d in der Gleichung 3 fest:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha} \quad (3)$$

Dabei steht λ für die verwendete Wellenlänge und $n \cdot \sin\alpha$ für die numerische Apertur, welche das Vermögen beschreibt Licht zu fokussieren. n steht dabei für die Brechzahl des Mediums und α für den Akzeptanzwinkel des Objekts.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird der Elektronenstrahl auf der Oberfläche der Probe fokussiert, welcher dann die Probe Pixel für Pixel abrastert. Der Kontrast kommt durch die Anzahl der Elektronen zustande, die vom Elektronenstrahl aus der Probenoberfläche "herausgeschlagen" und vom Detektor aufgenommen werden. Dadurch entsteht ein dreidimensional wirkendes Bild, welches die Oberflächenbeschaffenheit (die Elektronendichteverteilung) widerspiegelt. Die Auflösung des Rasterelektronenmikroskops ist vom Durchmesser des Elektronenstrahls abhängig, wobei gilt -je dünner der Strahl, umso besser die

Auflösung. Sobald der primäre Elektronenstrahl auf die Probe trifft, kommt es zur Wechselwirkung der Primärelektronen mit der Probe, wodurch Sekundärelektronen mit einer Energie von ≤ 50 eV emittiert werden. Diese Sekundärelektronen stammen aufgrund ihrer niedrigen Energie aus dem obersten Nanometerbereich der Oberfläche. Trifft der Primärelektronenstrahl auf eine Kante, können deutlich mehr Sekundärelektronen austreten. Dieser Effekt führt dazu, dass Kanten heller erscheinen und führt zu einem kontrastreichen, räumlich wirkenden Bild. Da im Rasterelektronenmikroskop nur Sekundärelektronen gemessen werden, reicht ein schwacher primärer Elektronenstrahl aus. Das entstandene Signal wird elektronisch verstärkt und ermöglicht das Betrachten der Probe an einem Bildschirm. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit zu Untersuchungen der Morphologie, der Größe, der Oberflächenbeschaffenheit und der Verteilung der synthetisierten Polymerpartikel eingesetzt.

1.4.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurde zur Bestimmung der mittleren Partikelgröße und der Größenverteilung benutzt.^{157,158} Bei der dynamischen Lichtstreuung kann die Bewegung von Molekülen verfolgt werden. Das Primärergebnis ist der Diffusionskoeffizient, der auf den hydrodynamischen Radius schließen lässt und bei Kenntnis von Beziehung zwischen Diffusionskoeffizient und Molmasse es ermöglicht auch Molmassenmittelwerte und -verteilungen berechnen zu können. Das Prinzip der DLS basiert auf dem Dopplereffekt. Durch die Bewegung der Teilchen erfährt das Streulicht eine Frequenzverschiebung, die mit der Geschwindigkeit der Teilchenbewegung korreliert. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung bewegen sich die dispergierten Partikel in allen Raumrichtungen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Je größer ein Partikel ist, desto langsamer bewegt es sich und desto kleiner ist sein Diffusionskoeffizient. Wird, beispielsweise eine Dispersion, mit einem Laserstrahl durchstrahlt, kommt es an den Partikeln zur Streuung des Lichts. Dabei kann die Intensität des Streulichts unter einem bestimmten Winkel zu

seiner Ausbreitungsrichtung gemessen werden. Hierzu werden Laser als Lichtquelle eingesetzt, deren monochromatische, kohärente Strahlung durch die Probe geleitet wird. Da sich die Kolloide mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegen und zusätzlich Moleküle oder Molekülgruppen rotieren oder schwingen können, ist die Streuung nicht konstant. Je schneller sich die Partikel bewegen, umso stärker sind die bei einem bestimmten Winkel detektierten Schwankungen der Intensität des gestreuten Lichts. Die gemessenen Fluktuationen der Streuintensität werden in eine Zeit-Intensitäts-Korrelationsfunktion umgewandelt (Gleichung 4):

$$g_2(t) = \langle I(0) \cdot I(n + \tau) \rangle \quad (4)$$

wobei τ das Zeitintervall, n die Anzahl der Intervalle, $I(0)$ die Streuamplitude zum Zeitpunkt 0 und $I(n + \tau)$ die Streuintensität zum Zeitpunkt $n + \tau$ darstellt. Dieser Vorgang wird für viele Intervalle und unterschiedliche Startzeiten wiederholt und am Ende über alle gemittelt. Für kleine monodisperse kugelförmige Partikel, welche in sehr großer Verdünnung und somit ohne gegenseitige Wechselwirkung vorliegen, kann die Autokorrelationsfunktion zur Berechnung des translatorischen Diffusionskoeffizienten D verwendet werden (Gleichung 5).

$$g_1(t) = B \exp(-q^2Dt) \quad (5)$$

Hierbei stellt B das experimentell gegebene Signal-Rausch-Verhältnis und q den Streulichtvektor dar. Über das Stokes-Einstein-Gesetz ist es dann möglich den kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius R_h der Partikel zu berechnen (Gleichung 6):

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (6)$$

Hierbei stellt k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und η die dynamische Viskosität dar.

1.4.3 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Im Vergleich zur dynamischen Lichtstreuung erlaubt die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)^{159,160} die Beobachtung der freien Diffusion fluoreszierender Partikel in Lösung oder auch in biologischen Systemen. Hierzu wird die Intensitätsfluktuation der Emission gemessen, die durch Fluorophore, die in das Beobachtungsvolumen hinein und hinaus diffundieren, verursacht wird. Auch bei dieser Methode ist die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten durch Korrelation der zeitabhängigen Intensität möglich. Vor jeder Messung muss die Größe des Beobachtungsvolumens mittels einer Referenzverbindung, meist Rhodamin 6G, bestimmt werden. Dies macht die FCS im Gegensatz zur DLS zu einer Relativmethode. Auch bei der FCS basiert die analytische Auswertung auf der Autokorrelationsfunktion, welche die Korrelation der Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten beschreibt. Durch eine Poisson-Verteilung für die Eintrittswahrscheinlichkeit verschiedener Partikel in das konfokale Volumen lässt sich eine Gleichung herleiten, über die es möglich ist Diffusionszeiten τ_D aus der Intensitäts-Autokorrelation zu bestimmen (Gleichung 7).

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (7)$$

Hierbei stellt τ die Korrelationszeit, τ_D die Diffusionszeit, N die mittlere Teilchenzahl im Detektionsvolumen und S das Achsenverhältnis des ellipsoiden Detektionsvolumen (Strukturfaktor) dar. Da die Diffusionszeit vom Achsenverhältnis des ellipsoiden Detektionsvolumen abhängt, kann sie nicht als Absolutwert angesehen werden. Nach Gleichungen 8 und 9 lässt sich der Diffusionskoeffizient D des fluoreszierenden Polymers bestimmen, wobei D_{Ref} den Diffusionskoeffizienten des Referenzfarbstoffs und τ_{Ref} die Korrelationszeit des Referenzfarbstoffs darstellen:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (8)$$

mit

$$r_0 = 2\sqrt{D_{Ref}\tau_{Ref}} \quad (9)$$

Im letzten Schritt kann der hydrodynamische Radius analog zur DLS nach Stokes-Einstein bestimmt werden (siehe 1.4.2).

1.4.4 Konfokale Laserrastermikroskopie

Bei der konfokalen Laserrastermikroskopie¹⁶¹ (eng.: confocal laser scanning microscope, CLSM) wird die Probe, wie der Name schon sagt, von einem fokussierten Laser abgetastet. Der Laser wird dabei über ein bewegliches Spiegelsystem Zeile für Zeile über das Präparat geleitet. Die konfokale Blende ermöglicht es, nur emittiertes Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene zu detektieren.¹⁶² Auf diese Weise werden optische Schnitte erzeugt, welche nur die scharfen Objektdetails darstellen. Durch Änderung der Fokusebene (was rechnergesteuert durch Höhenverschiebung der Probe abläuft) wird eine Serie von Schnitten erhalten, welche eine Rekonstruktion der Abbildungen ermöglichen. Die laterale Auflösungsgrenze liegt bei ca. 0,2 μm , die axiale bei ca. 0,5 μm . Auch hier ist die Auflösungsgrenze, wie beim REM, durch die Numerische Apertur festgelegt. Sie ist vom Brechungsindex des Mediums zwischen Deckglas und Objektivlinse und dem halben Öffnungswinkel des Objektivs abhängig. Analog zu Abschnitt 1.4.1 kann die Auflösungsgrenze nach E. Abbe beschrieben werden.

1.4.5 Durchflusszytometrie

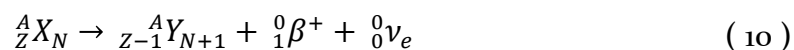
Die Durchflusszytometrie¹⁶³ ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Fluoreszenz bei gleichzeitiger Bestimmung verschiedener Zellparameter in einer Zellpopulation. Sowohl Zellgröße und Granularität, aber auch die

Fluoreszenzintensität einer jeden einzelnen Zelle kann durch die von den Zellen aufgenommen fluoreszierenden Partikel bestimmt werden. Das Prinzip dieser Messmethode basiert auf der hydrodynamischen Fokussierung der Zellsuspension. Das bedeutet, die Zellen werden einzeln nacheinander an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Dabei werden die Fluorophore angeregt und es kommt zur Streuung des Laserlichts durch die einzelnen Zellen. Das gestreute Licht wird von zwei unterschiedlichen Detektoren aufgenommen. Dabei ist das Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) ein Maß der Brechung des Lichts im rechten Winkel, das von der Granularität der Zellen abhängt. Das Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) lässt durch die Beugung des Lichts im flachen Winkel hingegen Rückschlüsse auf die Zellgröße zu. Die Fluoreszenzsignale werden ebenfalls im rechten Winkel zum Laserstrahl detektiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden von Dr. [REDACTED] mittels Durchflusszytometrie quantitative Bestimmungen zur Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Kolloiden durchgeführt.

1.4.6 Positronen-Emissions-Tomographie

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)^{164,165} werden kurzlebige, neutronenarme Isotope verwendet, die sich durch einen Positronenzerfall (β^+ -Zerfall) stabilisieren. Dabei wird im Kern ein Proton in ein Neutron umgewandelt und sowohl ein Positron (β^+), zum Erhalt der Ladung, als auch ein Neutrino (ν_e), zum Erhalt des Spins, emittiert (Gleichung 10):



Durch Wechselwirkung mit der umgebenen Materie gibt das emittierte Positron seine kinetische Energie ab, bis seine Gesamtenergie in etwa der seiner Ruhemasse entspricht. Die Wegstrecke, die das Positron dabei zurücklegt, hängt von dessen Energie ab und ist für das jeweils eingesetzte Radioisotop spezifisch. Das thermische Positron rekombiniert mit seinem Antiteilchen, einem Elektron aus der Umgebung,

und bildet dabei ein intermediäres Positronium. In einer weiteren Reaktion, der sogenannten Annihilation, wird das Positronium vernichtet (Abbildung 13). Dabei wird seine Gesamtenergie von 1022 keV (Ruhemasse von Positron und Elektron) auf zwei γ -Quanten verteilt. Solch eine Zwei-Quanten-Annihilation findet statt, wenn das Positronium im Singulett-Zustand mit antiparallelem Kernspin vorliegt. Liegt es hingegen im Triplett-Zustand mit parallelem Kernspin vor, tritt eine Drei-Quanten-Annihilation auf. Dieser zuletzt genannte Prozess kann jedoch vernachlässigt werden, da das beobachtete Verhältnis von Drei- zu Zwei-Quantenvernichtung etwa 10^{-3} entspricht.¹⁶⁶

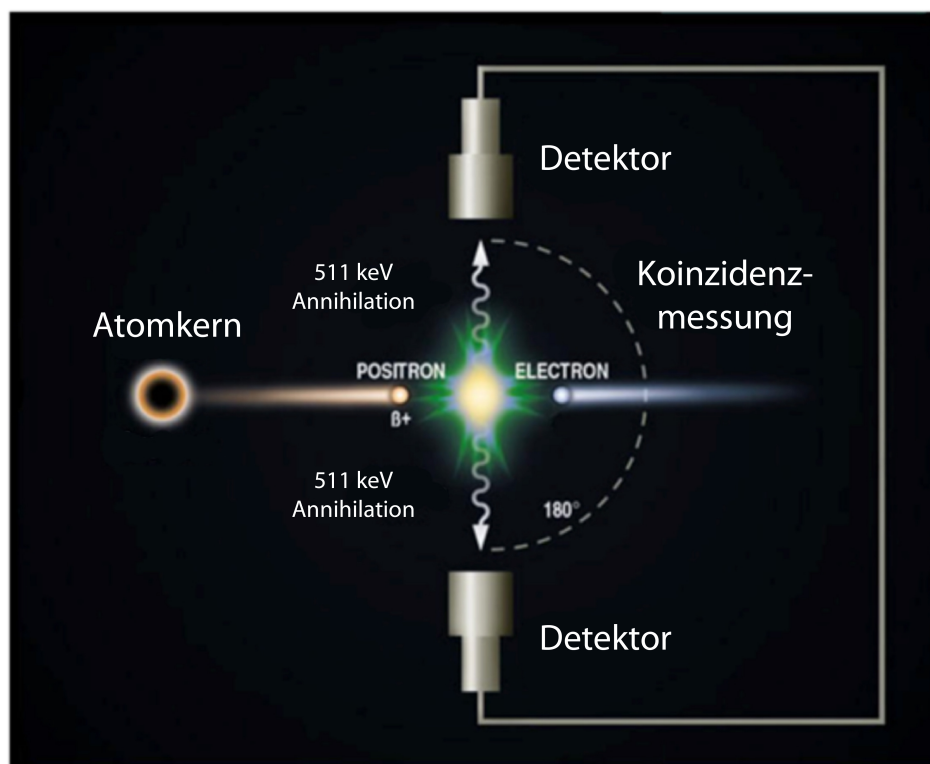


Abbildung 13. Schematische Darstellung des PET Prinzips, modifiziert nach¹⁶⁷.

Auf Grund der Auswahlregeln für die Erhaltung von Energie, Impuls und Parität werden die beiden γ -Quanten in einem Winkel von 180° und mit einer Energie von jeweils 511 keV emittiert. Die beiden γ -Quanten können mittels Szintillations-Detektoren nachgewiesen werden. Eine PET-Kamera besteht in der Regel aus ca. 10.000 einzelnen Detektorkristallen, die zu mehreren Blöcken zusammengefasst und über eine Koinzidenzschaltung miteinander verbunden sind. Somit wird ein

Zerfall nur registriert, wenn beide γ -Quanten eines Zerfalls zeitgleich detektiert werden. Durch den Emissionswinkel von 180° muss der Zerfall in etwa auf der Verbindungslinie der zwei Detektorkristalle (der LOR: engl. Line of response, bzw. Koinzidenzlinie) stattgefunden haben und kann zu seinem Ursprung zurückverfolgt werden. Die maximale Ortsauflösung der PET wird daher von der β^+ -Energie der Positronen bestimmt. Diese liegt im Falle heutiger Tomographen bei etwa 3-5 mm. Mit Hilfe von Rekonstruktionsalgorithmen wird durch die Überlagerung der LORs ein Aktivitätsprofil errechnet, welches eine genaue Verteilung des Radiopharmakons im Organismus zeigt.¹⁶⁵ Somit erhält man ein dreidimensionales Bild, welches die räumliche sowie die zeitliche Verteilung der radioaktiv markierten Komponenten *in vivo* widerspiegelt. Darüber hinaus können PET-Messungen mit einer Computertomographie (CT) bzw. Magnetresonanztomographie (MRT) kombiniert werden. Dies ermöglicht neben funktionellen auch morphologische Informationen zu erhalten, welche für klinische Fragestellungen relevant sein können. Dazu wird im Anschluss an die PET-Messung eine CT durchgeführt und die beiden Bilder zu einem Fusionsbild überlagert.

2 Motivation und Zielsetzung

Eine wirkungsvolle Therapie von malignen Tumorerkrankungen erfordert eine zielgerichtete Anreicherung eines (Chemo)therapeutikums in den betroffenen Geweben. Neben der Entwicklung neuer Wirkstoffe geht es heutzutage überwiegend darum, bereits bekannte Wirkstoffe noch effektiver in ihr Zielgewebe zu transportieren, wo sie ihre Wirkung entfalten sollen. Bisher verwendete Arzneistoffe eignen sich nur schlecht für eine systemische (intravenöse) Verabreichung, da sie eine nicht zu vernachlässigende unspezifische Wirkung, verbunden mit erheblichen Nebenwirkungen, haben, schlecht löslich sind und schnell metabolisiert werden. Makromolekulare Trägersysteme bieten hier das Potential, sowohl die Bioverfügbarkeit als auch das pharmakokinetische Profil solcher Wirkstoffe zu verbessern (Abbildung 14).

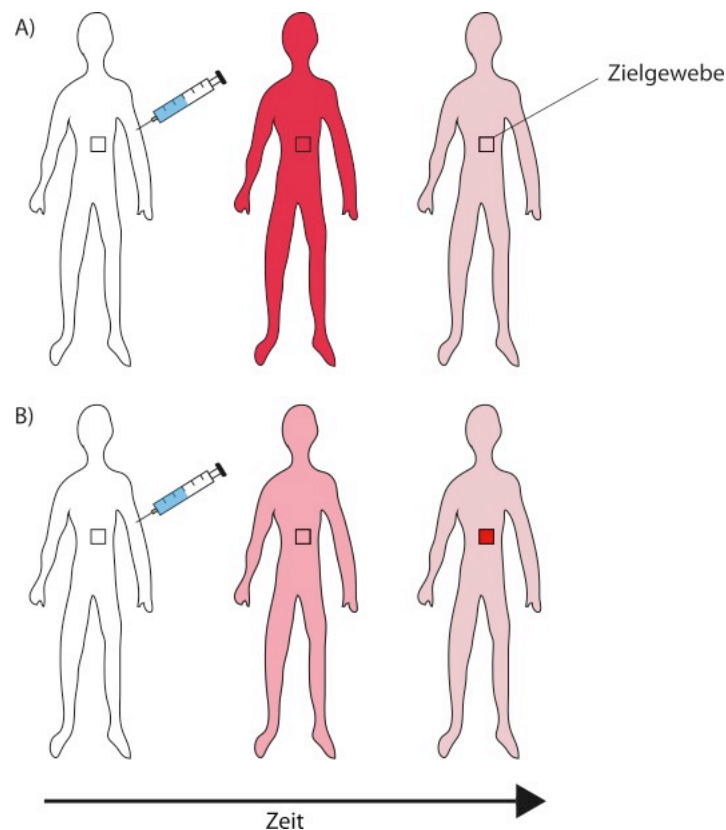


Abbildung 14. Pharmakokinetische Profile eines niedermolekularen Wirkstoffes (A) und eines makromolekularen Wirkstoff-Trägersystems (B), modifiziert nach¹⁶⁸.

Hauptgründe dafür sind eine durch Einkapselung oder Anbindung an das makromolekulare Trägersystem verminderte Metabolisierung, eine erhöhte Plasma-Halbwertszeit, durch die größenbedingte verminderte renale Ausscheidung, sowie eine gesteigerte Anreicherung im Tumorgewebe durch den EPR-Effekt. Betrachtet man Kern-Schale-Systeme, wie beispielsweise polymere Mizellen, sind diese in der Lage, sehr hydrophobe Wirkstoffe einzuschließen.¹⁶⁹ Als Alternative kommen geeignete funktionalisierte Kolloide in Frage. Die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren als Detergenzien zur Stabilisierung der Kolloide eröffnet hierbei die prinzipielle Möglichkeit, Erkennungsstrukturen für eine aktive zielgerichtete Anreicherung anzubinden.

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und Evaluierung von Wirkstoff-Trägersystemen, basierend auf Kolloiden, welche mittels HPMA-basierten Copolymeren stabilisiert sind und Größenbereiche von 100-300 nm im Durchmesser abdecken. Diese Systeme sollen zum einen die Verkapselung eines Wirkstoffes und zum anderen die selektive Anbindung von Erkennungsstrukturen ermöglichen. Des Weiteren sollen die Systeme biokompatibel und besser bioabbaubar sein sowie keine Interaktion mit Blutbestandteilen zeigen. Im Anschluss steht die Evaluierung dieser Systeme *in vitro*, um Aufnahme- und Freisetzungskinetiken zu bestimmen. Dazu ist eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der einzelnen Kolloidbestandteile (Kern, Hülle und Kargo) notwendig. Zudem soll das pharmakokinetische Profil der ¹⁸F-markierten Kolloide mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und *ex vivo*-Biodistribution im Mausmodell ermittelt werden, was die Synthese von geeigneten ¹⁸F-Markierungsvorläuferpolymeren bedingt. Darüber hinaus ist es angedacht, den Einfluss von Folat als Erkennungsstruktur *in vivo* am einfachen HPMA-Homopolymer zu untersuchen, um erste Hinweise auf die Anwendbarkeit des Folatkonzepts auf kolloidale Systeme zu erhalten.

3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 15 zeigt eine Gesamtübersicht der in dieser Arbeit behandelten Themen.

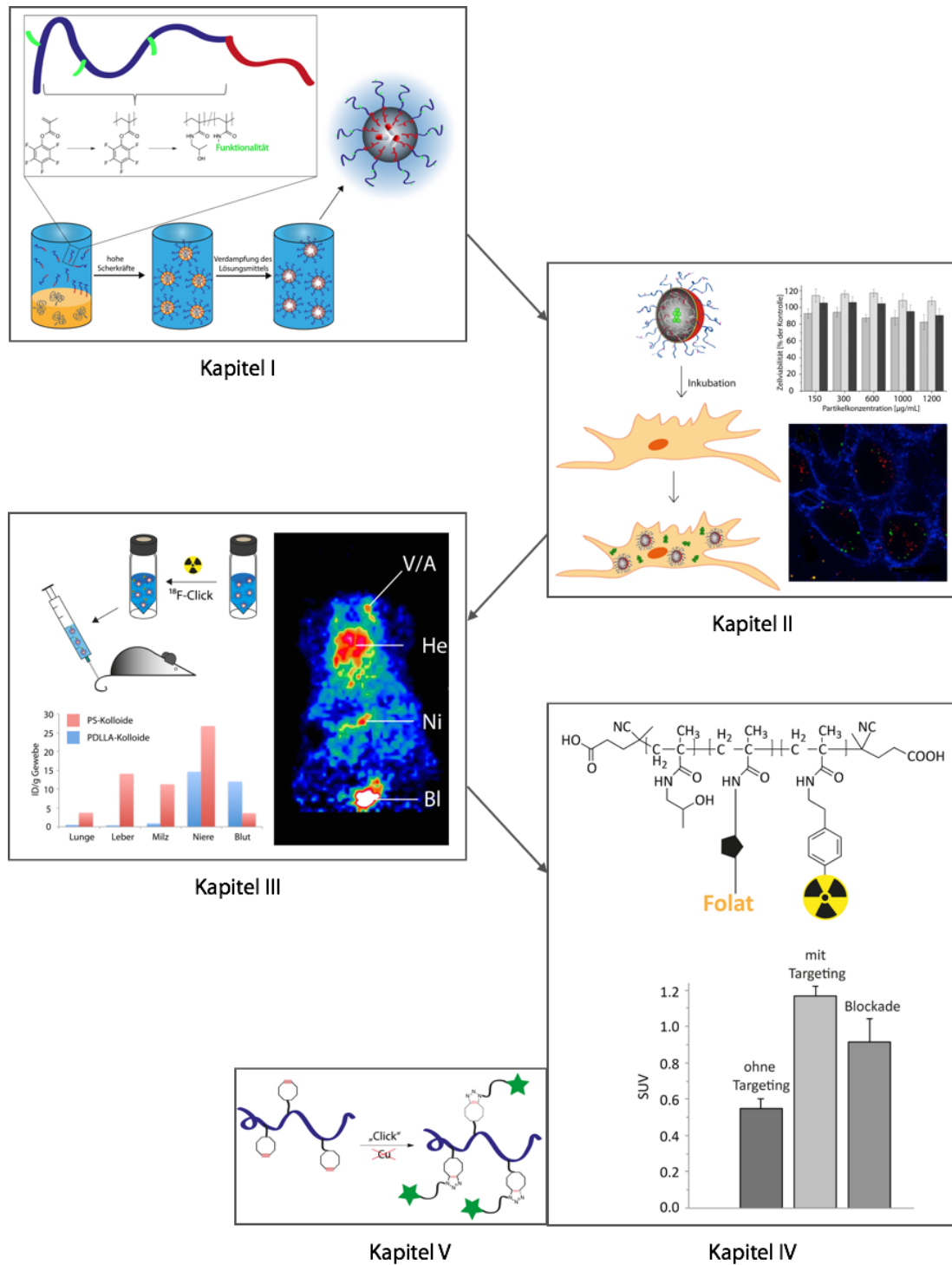


Abbildung 15. Schematische Übersicht der einzelnen Projekte dieser Arbeit, von der Synthese der Nanopartikel bis hin zu ihrer Evaluierung *in vitro* und *in vivo*.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde sich mit der Synthese von biokompatiblen und bioabbaubaren Kolloiden, welche durch HPMA-basierte Block- und statistische Copolymere stabilisiert sind, beschäftigt. Nach physikochemischer Charakterisierung wurden diese kolloidalen Systeme hinsichtlich ihrer Toxizität, sowie ihres Aggregationsverhaltens in humanem Blutserum getestet. Zusätzlich wurde das Aufnahme-/Freisetzungsverhalten der Systeme *in vitro* untersucht. Das pharmakokinetische Profil konnte mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und *ex vivo* Biodistributionsstudien bestimmt werden. Dabei wurde zusätzlich die Möglichkeit von verschiedenen Anbindungsstrategien und deren Einfluss untersucht. Letztlich zeigte die Anbindung von Folat, einer etablierten Erkennungsstruktur, eine erhöhte Anreicherung in Zielgeweben.

3.1 Herstellung von kolloidalen Wirkstoff-Trägersystemen mittels Miniemulsionstechniken

Der Transport von hydrophoben Wirkstoffen stellt einige Anforderungen an das Trägersystem (Abbildung 16). Zum einen wird eine hydrophobe Matrix benötigt, in welcher der Wirkstoff gut löslich ist und eingekapselt werden kann. Dieser Kern sollte biokompatibel und im besten Fall bioabbaubar sein sowie eine hohe Beladungskapazität aufweisen. Um einen solchen Kern im wässrigen Blutmedium zu stabilisieren, bedarf es lösungsvermittelnder Komponenten, wobei sich der Einsatz von Tensiden zu Nutze gemacht wird. Solche kolloidalen Systeme (Kern und Hülle) lassen sich über Emulsionspolymerisationen, im Speziellen die Miniemulsionspolymerisation, herstellen. Es werden in der Regel niedermolekulare Tenside wie z. B. das Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Diese bringen jedoch einige Nachteile mit sich. Einerseits basiert die Stabilisierung auf ionischer Natur, was im Blut mit hohen Ionenkonzentrationen Aggregationen induzieren kann. Zum anderen haben niedermolekulare im Vergleich zu hochmolekularen Tensiden eine hohe kritische Mizellbildungskonzentration (engl. critical micellar concentration, cmc), was zu einer höheren Dynamik führt. Das heißt, dass es zu einem ständigen

Hin- und Abdiffundieren der Moleküle kommen kann, was ein beträchtliches Problem darstellt, da SDS zytotoxisch und immunogen ist.¹⁷⁰ Eine aufwendige Aufreinigung mittels Dialyse ist somit unabdingbar. Von Bedeutung ist heutzutage besonders die Funktionalisierung der Oberfläche, was mit SDS als Tensid nicht möglich ist. Mit den vorher beschriebenen Anforderungen an das Tensid wurden in dieser Arbeit polymere Tenside zur Stabilisierung verwendet, welche die erforderlichen Merkmale eines Wirkstoff-Trägersystems erfüllen.

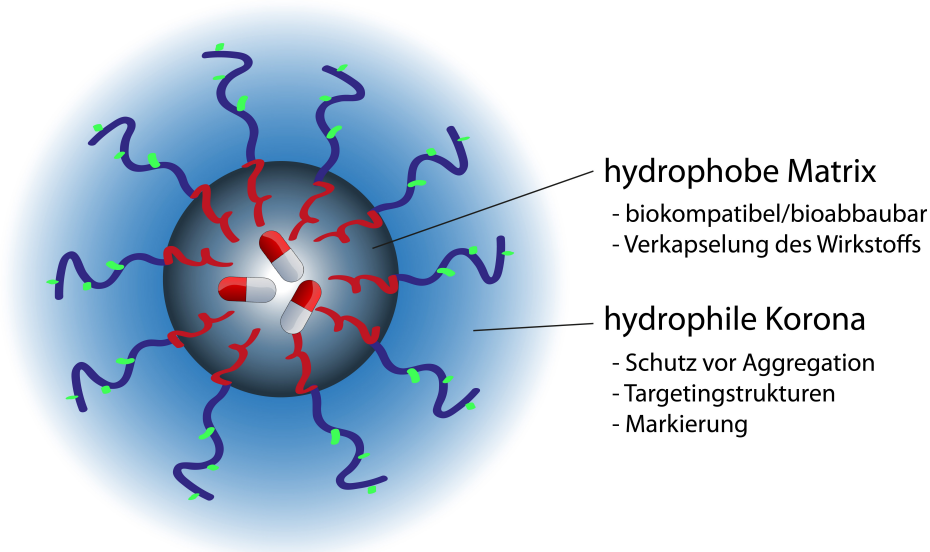


Abbildung 16. Schematische Darstellung eines idealen Wirkstoff-Trägersystems.

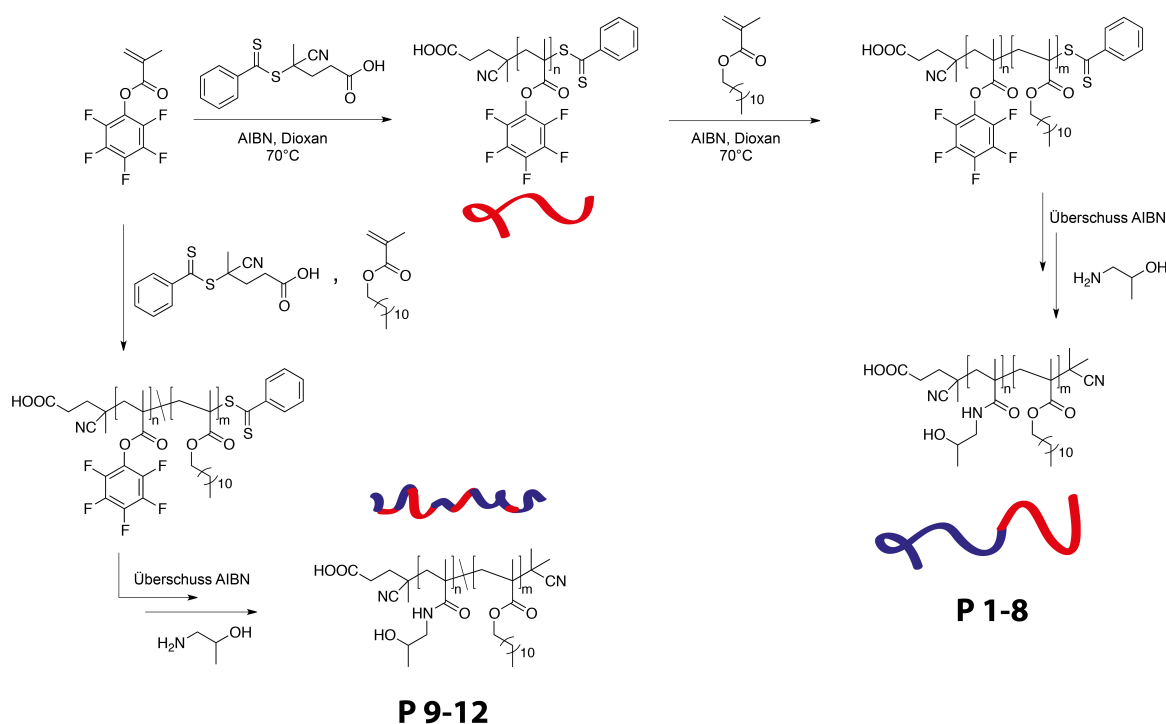
3.1.1 Synthese von wohldefinierten HPMA-LMA-basierten Copolymeren als Tenside

Die verwendeten polymeren Tenside müssen folgende Eigenschaften aufweisen. Sie müssen sehr gut wasserlöslich sein, aber dennoch einen amphiphilen Charakter haben und vor allem aber wohldefiniert sein, um überhaupt als Medizinprodukt zugelassen werden zu können.

Dabei eignet sich Poly(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) (PHPMA), welches sich bereits als geeignete hydrophile Komponente bewiesen hat und sich in klinischen Studien befindet. Als hydrophobes Segment hingegen wurde Poly-Laurylmethacrylat (PLMA) eingesetzt. Solche amphiphilen Systeme sind in der Synthese und der Charakterisierung jedoch herausfordernd (Aggregatbildung),

weshalb als Methode der Wahl die RAFT-Polymerisation in Verbindung mit dem Reaktivesteransatz gewählt wurde.⁵³ Der Reaktivesteransatz bietet dabei die Möglichkeit, primär komplett hydrophobe Copolymere mit einer engen Molekulargewichtsverteilung darzustellen, welche somit in organischen Lösungsmitteln gut charakterisiert werden können. Diese wurden anschließend in polymeranalogen Reaktionen zum HPMA umgesetzt, wobei so auch auf einfache Art und Weise Funktionalitäten, wie beispielsweise Farbstoffe, eingeführt werden konnten.¹⁷¹

Zu Beginn der Arbeit wurde eine Reihe von potentiell einsetzbaren amphiphilen HPMA-LMA-basierten Block- und statistischen Copolymeren verschiedener Zusammensetzung hergestellt (Schema 5).



Schema 5. Syntheseroute zu Block- (**P 1-8**) und statistischen Copolymeren (**P 9-12**) basierend auf HPMA unter Verwendung des Reaktivesteransatzes.

Die Eigenschaften der Polymere sind in Tabelle 4 gezeigt. Es ist bekannt, dass Polymere ab einem Einbau von 10 mol% des hydrophoben Monomers, im Fall von Laurylmethacrylat, in Wasser zusammenlagern und komplexe Aggregate bilden, wobei die hydrophilen HPMA-Segmente nach außen in das wässrige Medium

ragen.^{53,172} Ein weiterer Vorteil dieser polymeren Tenside ist ihre sehr niedrige kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) von ungefähr 5×10^{-4} mg/mL für die statistischen und ungefähr $4,1 \times 10^{-6}$ mg/mL für die Block-Copolymere und der damit verbundene langsamere Austausch der polymeren Tenside.⁵⁴

Aus vorangegangenen Arbeiten^{53,54} ist bekannt, dass HPMA-basierte Copolymere bis zu einer Konzentration von 2 mg/mL nicht toxisch sind, was den Einsatz dieser Systeme als polymere Tenside in Emulsionsprozessen zur Herstellung kolloidaler Nanomedizin erlaubt.

Zusätzlich konnten Scheibe und Mitarbeiter zeigen, dass polymere Membranen, welche auf vergleichbaren Block-Copolymeren basierten, an der Wasser-Luft-Grenzfläche (hydrophil/hydrophob) stabil sind. Es konnte auch kein Verlust der Polymere der Membran in die wässrige Subphase, während Komprimierungs-Expansions-Hysterese der Membranen, beobachtet werden.¹⁷³ Diese Ergebnisse unterstreichen wiederum den hohen Grad der Polymerstabilität an der hydrophilen/hydrophoben Grenzfläche und ihre Eignung als polymere Tenside.

Die Synthese der Systeme gliedert sich in sechs Teilschritte: die Synthese des Kettentransferreagenzes (CTA), die Synthese des Reaktivestermonomers (PFPMa), die Darstellung der Reaktivesterpräcursorpolymere (P(PFPMa)), die Copolymerisation zu Block- und statistischen Copolymeren, die Modifikation der Endgruppe sowie die polymeranaloge Umsetzung samt Funktionalisierung.

3.1.1.1 Synthese des Kettentransferreagenzes (CTA)

Bei der Wahl des Kettentransferreagenzes wurde sich bewusst für die 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (Säure-CTA) entschieden (Abbildung 17), da sie sich zum einen hinsichtlich ihrer Anwendung bei Methacrylaten im organischen Medium bewährt hat. Zum anderen ist es aber auch möglich die polare Säuregruppe gezielt im hydrophilen Segment zu positionieren.^{49,174}

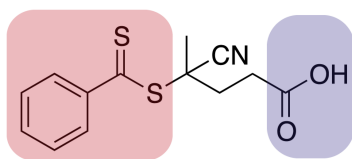
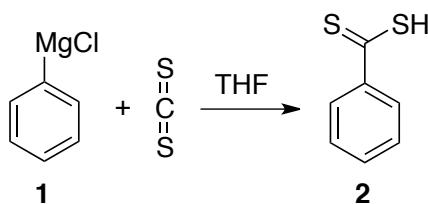


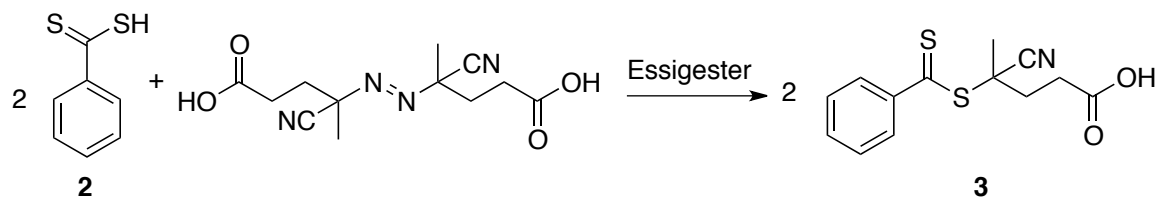
Abbildung 17. 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (Säure-CTA) für die RAFT-Polymerisation.

Die Synthese dieses Säure-CTAs erfolgte in zwei Stufen. Zuerst wurde die Grignard-Verbindung Phenylmagnesiumchlorid **1** in THF unter wasserfreien Bedingungen mit Schwefelkohlenstoff zur intensiv violetten Dithiobenzoesäure **2** umgesetzt (Schema 6).



Schema 6. Synthese der Dithiobenzoesäure **2**.

Diese wurde anschließend durch Extraktion aus etherischer Phase gewonnen und konnte direkt unaufgereinigt in der nächsten Stufe mit dem Radikalstarter 4,4'-Azobis(4-cyanvaleriansäure) zum gewünschten Kettentransferreagenz **3** umgesetzt werden (Schema 7). Die hergestellte Verbindung wurde mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert (siehe 5.5.1.2).

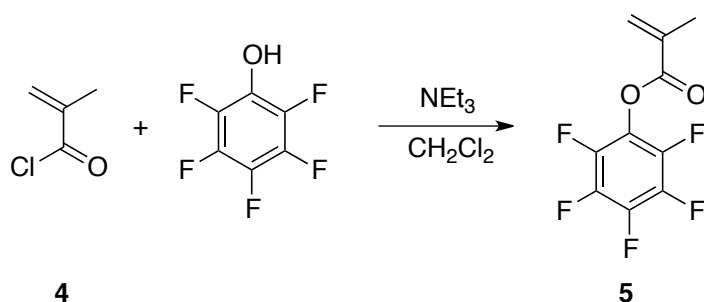


Schema 7. Umsetzung zum Kettentransferreagenz, der 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)-pentansäure **3**.

3.1.1.2 Synthese des Monomers Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMa)

Die Synthese erfolgte nach bekannter Vorschrift.¹⁷⁵ Dabei wurde in Anwesenheit von Base eine nukleophile Substitution des Methacrylsäurechlorids **4** mit Pentafluorphenol durchgeführt (Schema 8). Das Pentafluorphenylmethacrylat **5**

konnte durch Vakuumdestillation als farblose, leicht viskose Flüssigkeit in sehr guter Ausbeute (67% der Theorie) gewonnen werden. Der Siedepunkt der Verbindung lag bei 1×10^{-3} mbar bei 35°C . Die hergestellte Verbindung **5** weist eine hohe Hydrolysestabilität auf und wurde mit Hilfe der ^1H -, ^{13}C und ^{19}F -NMR-Spektroskopie charakterisiert.



Schema 8. Darstellung des Pentafluorphenylmethacrylats (PFPMA) **5**.

3.1.1.3 RAFT-Polymerisation von PFPMA zur Darstellung polymerer Makro-CTAs

Nach Darstellung der Ausgangssubstanzen konnte mit der Synthese der Homopolymere begonnen werden (Schema 9).⁵⁵

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2.3 beschrieben, handelt es sich bei der RAFT-Polymerisation um eine kontrollierte radikalische Polymerisationsmethode, die es ermöglicht, wohldefinierte Polymere mit genau kalkuliertem Polymerisationsgrad \bar{X}_n herzustellen. Der Polymerisationsgrad ist dabei von der eingesetzten Monomerkonzentration $[M]_0$, der Ausgangskonzentration des Kettentransferreagenz $[CTA]_0$ und von der Initiatorkonzentration $[I]_0$ abhängig. Über Gleichung 11 lässt sich \bar{X}_n berechnen, wobei p' , p'' und p''' die jeweiligen Umsätze angeben:¹⁷⁶

$$\bar{X}_n = \frac{p' \cdot [M]_0}{p'' \cdot [CTA]_0 + 2 \cdot f \cdot p''' \cdot [I]_0} \quad (11)$$

Der zusätzliche Term $2 \cdot f$ wird für den Zerfall des Initiators in zwei Radikalmoleküle mit der entsprechenden Zerfallsrate f eingefügt. Die verwendeten

CTA-Reagenzien sollten eine hohe und effiziente Kettenübertragungsrates aufweisen. Da die CTA-Reagenzien in einem 10-fachen Überschuss zum Initiator eingesetzt werden, ist der Term des Initiators somit vernachlässigbar (Gleichung 12):

$$p'' \cdot [CTA]_0 \gg 2 \cdot f \cdot p''' \cdot [I]_0 \quad (12)$$

Die Gleichung kann wie folgt vereinfacht werden (Gleichung 13), wobei p den Gesamtumsatz der RAFT-Polymerisation angibt:

$$\bar{X}_n = \frac{p' \cdot [M]_0}{p'' \cdot [CTA]_0} = p \cdot \frac{[M]_0}{[CTA]_0} \quad (13)$$

Das theoretische Molekulargewicht M_{theor} lässt sich folgendermaßen berechnen (Gleichung 14), sofern der Polymerisationsgrad bekannt ist:

$$M_{theor} = \bar{X}_n \cdot M_{Monomer} + M_{CTA} \quad (14)$$

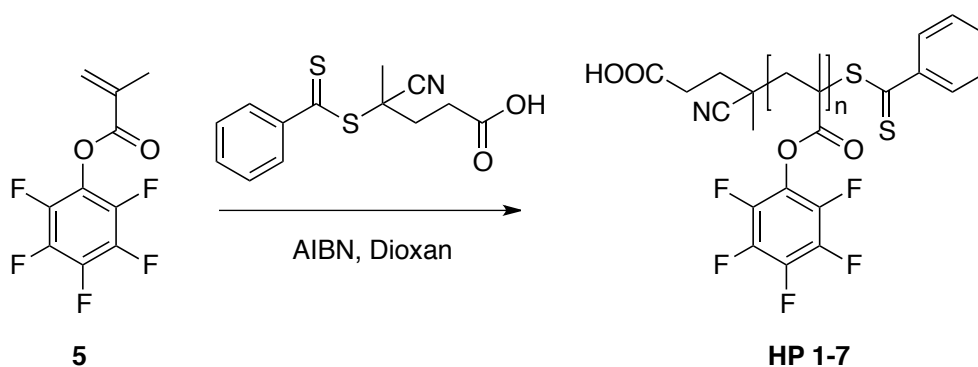
Unter Berücksichtigung von Gleichung 14 kann das theoretische Molekulargewicht entsprechend berechnet werden (Gleichung 15):

$$M_{theor} = p \cdot \frac{[M]_0}{[CTA]_0} \cdot M_{Monomer} + M_{CTA} \quad (15)$$

Der Umsatz sowie das theoretische Molekulargewicht können mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Über Gelpermeationschromatographie (GPC) lässt sich das Zahlen (M_n)- und Gewichtsmittel (M_w) und somit der daraus resultierende Polydispersitätsindex (PDI) bestimmen (Gleichung 16).

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (16)$$

Um die polymeren Tenside hinsichtlich ihrer Stabilisierungseigenschaften untersuchen zu können, wurden zu Beginn Block- und statistische Copolymere, verschiedener Größen und hydrophiler/hydrophober Zusammensetzung, hergestellt. Da Block-Copolymere im Größenbereich von 10 bis 25 kDa mit einem hydrophoben Einbau von 10-40% getestet werden sollten, wurde mit der Synthese von PFPMA-Homopolymeren **HP 1-7** mittels RAFT-Polymerisation begonnen (Schema 9), welche Molekulargewichte im Bereich von 14.000-40.000 g/mol aufwiesen (Tabelle 1).



Schema 9. RAFT-Polymerisation des PFPMA zum P(PFPMA) **HP 1-7**.

Die Reaktionsführung war dabei unter sauerstofffreien Bedingungen unabdingbar, da es sonst zu einem Abbruch der Polymerisation durch die Bildung von unreaktiven Peroxidradikalen kommt.¹⁷⁷ Auch die Verwendung von sehr trockenem Dioxan war außerordentlich wichtig um eine partielle Hydrolyse auszuschließen.¹⁷⁸

In Tabelle 1 sind die dargestellten Homopolymere aufgelistet. Es konnten die angestrebten Molekulargewichte erreicht werden. Alle synthetisierten Homopolymere weisen eine relativ enge Molekulargewichtsverteilung auf. Um die synthetisierten Homopolymere näher zu charakterisieren, wurden ¹H-NMR- und ¹⁹F-NMR-Spektren (siehe 5.5.3) aufgenommen.

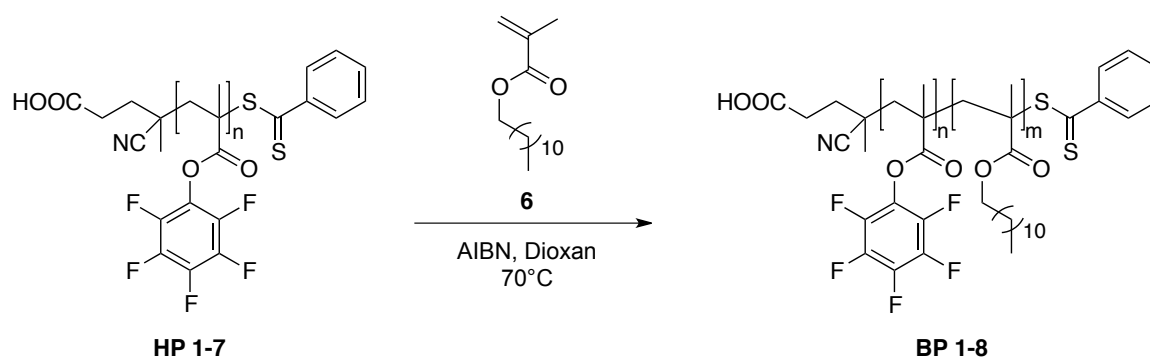
Tabelle 1. Dargestellte Homopolymere **HP 1-7** mittels RAFT-Polymerisation und deren Charakterisierung.

Name	Polymer	$M_{\text{theor.}}$ (g/mol)	M_n (g/mol) ^a	\mathcal{D}^a
HP 1	P(PFPMA) ₅₇	14.100	14.700	1,24
HP 2	P(PFPMA) ₅₈	15.000	14.900	1,26
HP 3	P(PFPMA) ₆₀	15.750	15.500	1,29
HP 4	P(PFPMA) ₆₁	16.000	15.600	1,29
HP 5	P(PFPMA) ₁₀₀	28.000	25.500	1,28
HP 6	P(PFPMA) ₁₃₀	36.000	33.000	1,33
HP 7	P(PFPMA) ₁₄₂	40.000	36.100	1,33

^a Bestimmung mittels GPC (THF mit LiBr ($c = 0,1$ mmol/L)).

3.1.1.4 Copolymerisation der Makro-CTAs mit Laurylmethacrylat zur Darstellung amphiphiler Copolymere

Die hergestellten Homopolymere (**HP 1-7**) trugen noch die für die RAFT-Polymerisation essentielle Dithiobezoatgruppe und konnten somit im Folgenden als Makro-CTAs zur Synthese von Block-Copolymeren eingesetzt werden. Hierzu wurden **HP 1-7** einer weiteren RAFT-Polymerisation mit unterschiedlichen Mengen an Laurylmethacrylat (LMA) **6** unterzogen, um so Systeme bestehend aus zwei hydrophoben Blöcken verschiedener Größe und Zusammensetzung zu erhalten (Schema 10; **BP 1-8**). Für die Berechnung der Molekulargewichte wurde das zahlengemittelte Molekulargewicht (M_n) der Homopolymere verwendet (Tabelle 1).



Schema 10. Darstellung der PFPMA-basierenden Block-Copolymere **BP 1-8**.

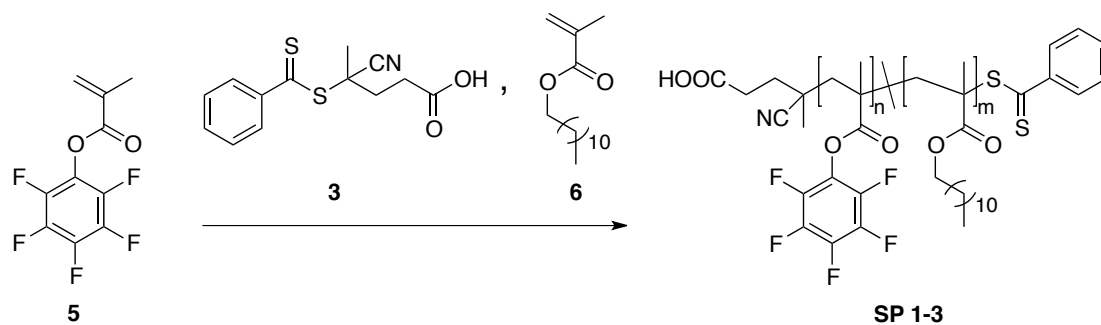
Tabelle 2. Dargestellte Block-Copolymere **BP 1-8** mittels RAFT-Polymerisation und deren Charakterisierung.

Name	Block-Copolymer	Monomer Verhältnis	HP	M_n (g/mol) ^a	\mathcal{D}^a
BP 1	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	90:10	1	15.500	1,21
BP 2	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	80:20	3	18.300	1,25
BP 3	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	70:30	2	18.600	1,26
BP 4	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	60:40	4	19.200	1,24
BP 5	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	90:10	6	35.500	1,30
BP 6	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	80:20	6	35.000	1,32
BP 7	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	70:30	5	31.000	1,35
BP 8	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	90:10	7	41.000	1,38

^a Bestimmung mittels GPC (THF mit LiBr ($c = 0,1$ mmol/L)).

Es konnten so Block-Copolymere **BP 1-8** mit einer relativ engen Molekulargewichtsverteilung dargestellt werden. Diese hydrophoben Vorläufer-Polymere (**BP 1-8**) sind gut in organischen Lösungsmitteln löslich und neigen nicht zur Aggregatbildung, was eine präzise und zuverlässige Charakterisierung der Copolymere mittels THF-GPC erlaubt. Um die synthetisierten Block-Copolymere näher zu charakterisieren, wurden auch hier ¹H-NMR- und ¹⁹F-NMR-Spektren (siehe 5.5.4) aufgenommen.

Um den Einfluss von statistischen Copolymeren hinsichtlich Stabilisierungseigenschaften zu untersuchen, wurden auch solche Copolymere ähnlicher Größe und Zusammensetzung hergestellt (Tabelle 3). Dabei wurden beide Monomere PFPMA **5** und LMA **6** in stöchiometrischen Mengen direkt von Anfang an einer RAFT-Polymerisation unterzogen (Schema 11).¹⁷⁹ In Analogie zu Abschnitt 3.1.1.3 wurde für das jeweilige angestrebte Molekulargewicht die Menge an CTA berechnet.



Schema 11. Synthese der statistischen Copolymere basierend auf PFPMA 5.

Tabelle 3. Dargestellte statistische Copolymere **SP 1-3** mittels RAFT-Polymerisation und deren Charakterisierung.

Name	Polymer	Monomer Verhältnis	M_n (g/mol) ^a	\bar{D}^a
SP 1	P(PFPMA)- <i>co</i> -P(LMA)	90 : 10	17.600	1,16
SP 2	P(PFPMA)- <i>co</i> -P(LMA)	80 : 20	22.000	1,19
SP 3	P(PFPMA)- <i>co</i> -P(LMA)	60 : 40	20.000	1,19

^a Bestimmung mittels GPC (THF mit LiBr ($c = 0,1$ mmol/L)).

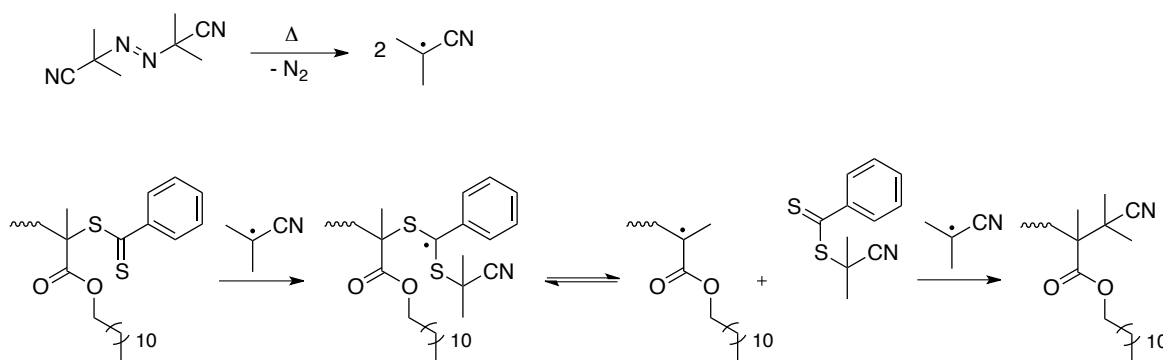
Die gewünschten Größen sowie eine sehr enge Molekulargewichtsverteilung konnten erreicht werden (Tabelle 3). Auch die statistischen Copolymere wurden NMR-spektroskopisch untersucht (siehe 5.5.5).

3.1.1.5 Modifikation der RAFT-CTA-Endgruppe der Block- und statistischen Copolymere

Die in Tabelle 2 und 3 synthetisierten Block- und statistischen Copolymere aus PFPMA 5 und LMA 6 zeigten eine leicht rosa bis intensiv pinke Farbe, was für das Vorhandensein der Thiocarbonylthio-Endgruppe steht. Diese charakteristische Farbe ist auf die Absorptionsmaxima bei 500 nm und 310 nm dieser Endgruppe zurückzuführen und wird sich in diesem Abschnitt als Kontrolle zu Nutze gemacht. Da diese Copolymere bei der späteren polymeranalogen Umsetzung einer Aminolyse unterzogen werden, war eine Endgruppenentfernung nach Perrier *et al.* nötig, um später Nebenreaktionen zu vermeiden.¹⁸⁰ Als Nebenreaktionen treten auf: a) Hydrolyse zum Thiol, b) Oxidation zu Dithiolen in Anwesenheit von Sauerstoff

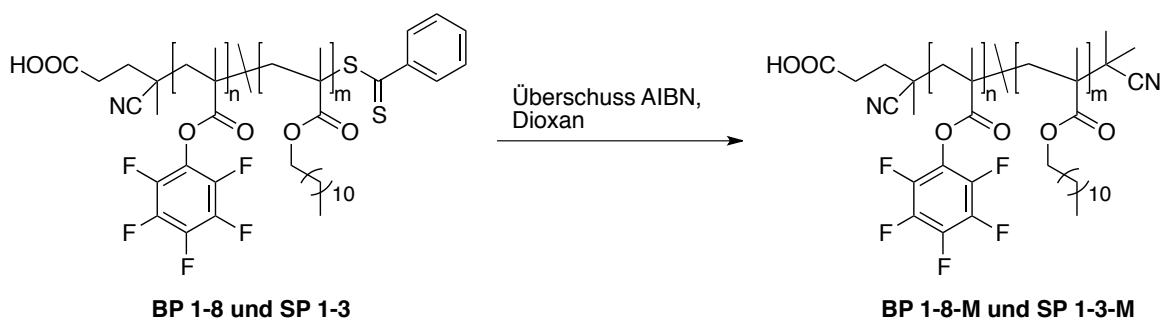
und damit verbunden eine Verdopplung des Molekulargewichts und c) Bildung von Thiolactonen durch Umesterung.¹⁸¹ Um aber sicherzustellen, dass definierte Systeme erhalten werden, musste auf die Vollständigkeit der Entfernung der Endgruppen geachtet werden. Auch mit Blick auf klinische Anwendungen war eine Entfernung der Endgruppe nötig, da diese bekannterweise zytotoxisch wäre. HPMA-Polymere ohne Endgruppe hingegen zeigen keinen toxischen Effekt.¹⁸²

Die Entfernung der Dithioester-Endgruppe konnte durch einen Radikalüberschuss nach folgendem Mechanismus erreicht werden. Die Dithiobezoessäuregruppe wurde dabei durch eine Isobutylnitrilgruppe ersetzt (Schema 12).¹⁸⁰



Schema 12. Zerfall des AIBNs und anschließende Endgruppenmodifikation, modifiziert nach¹⁸⁰.

Die verschiedenen Copolymere **BP 1-8** und **SP 1-3** wurden mit einem Überschuss an AIBN von 20 Äquivalenten versetzt (Schema 13), wodurch eine quantitative Abspaltung der Endgruppe gewährleistet werden konnte (**BP 1-8-M** und **SP 1-3-M**).



Schema 13. Abspaltung der Endgruppe der Copolymere durch 20fachen Überschuss an AIBN.

Die Abspaltung der Endgruppe konnte visuell durch den Verlust der pinken Farbe festgestellt werden. Eine genauere Methode liefert jedoch die UV/Vis-Spektroskopie (Abbildung 18). Hierbei kommt es zur Auslöschung der charakteristischen Absorptionsbanden der Endgruppe bei 310 nm und 500 nm.

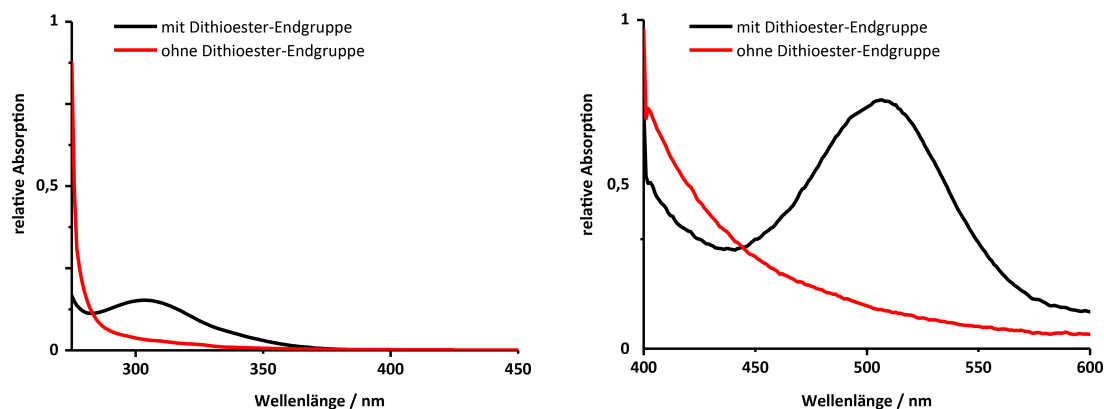
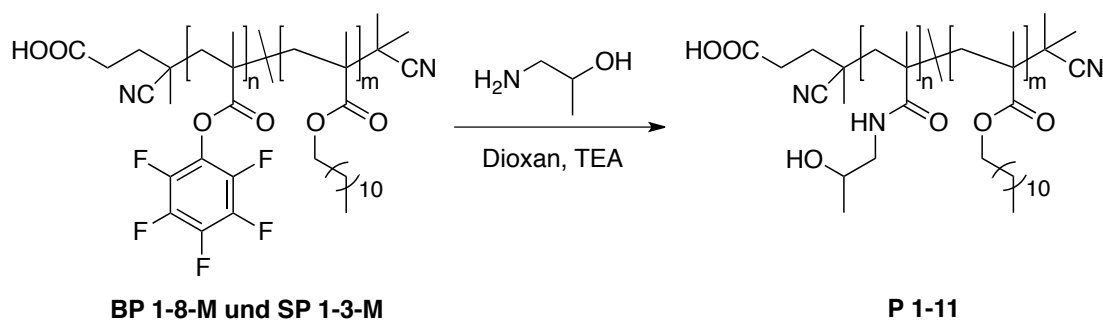


Abbildung 18. UV/Vis-Absorptionsspektren am Beispiel von P(PFPMA)-*co*-P(LMA) **SP 1** vor (schwarz) und nach der Umsetzung mit AIBN (rot).

Zur Aufreinigung wurden die Copolymere in einem Gemisch aus Ethanol und Diethylether (2:1) gefällt, wodurch ein weißer Feststoff ausfiel. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigten (siehe 5.5.6), dass die Endgruppenmodifikation keinerlei Auswirkung auf die chemische Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum hat und es somit zu keinen weiteren strukturellen Veränderungen am Polymer gekommen ist. Nachdem an allen synthetisierten Copolymeren die Endgruppen entfernt waren, konnten diese polymeranalogen Umsetzungen unterzogen werden.

3.1.1.6 Polymeranaloge Umsetzung zum Poly-*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA)

Die bereits synthetisierten auf PFPMA-basierenden Copolymere (**BP 1-8-M** und **SP 1-3-M**) wurden anschließend mit 2-Hydroxypropylamin polymeranalog zu biokompatiblen Poly-HPMA-Copolymeren **P 1-11** umgesetzt (Schema 14).



Schema 14. Polymeranaloge Umsetzung zu P(HPMA)-*b*/co-P(LMA) P 1-11.

Während der polymeranalogen Umsetzung musste zusätzlich eine nicht-nukleophile Base wie Triethylamin im Überschuss in Bezug auf die Reaktivester-Einheiten eingesetzt werden, da das bei der Reaktion entstehende Pentafluorphenol einen sauren Charakter zeigte ($pK_a = 5,5$). Durch Protonierung der primären Amine würde somit der nukleophile Angriff des 2-Hydroxypropylamins am Reaktivester unterbunden werden. Der Reaktionsverlauf konnte mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie verfolgt und somit auf seine Vollständigkeit überprüft werden. In Abbildung 19 sind die ^{19}F -NMR-Spektren im Verlauf der polymeranalogen Umsetzung für ein Copolymer exemplarisch dargestellt. Die ^{19}F -Signale des polymeren Reaktivesters liegen bei -150 ppm, -157 ppm und -162 ppm, wohingegen die ^{19}F -Signale des entstehenden Pentafluorphenols bei -168 ppm, -169 ppm und -182 ppm liegen. Über das Verhältnis der Integrale lässt sich der Fortschritt der Reaktion bestimmen. Die IR-Spektroskopie bietet zusätzlich die Möglichkeit durch Verschwinden der Esterbande bei $1515,2\text{ cm}^{-1}$ die Reaktion auf Vollständigkeit zu überprüfen.

Nach 24 h konnten noch Signale des gebundenen Reaktivesters nachgewiesen werden, sodass erneut ein Überschuss an 2-Hydroxypropylamin zur vollständigen Umsetzung hinzugegeben werden musste (Abbildung 19; mittleres Spektrum). Nach 72 h war der Umsatz vollständig, da keine Signale des gebundenen Reaktivesters mehr detektiert werden konnten (Abbildung 20; hinteres Spektrum).

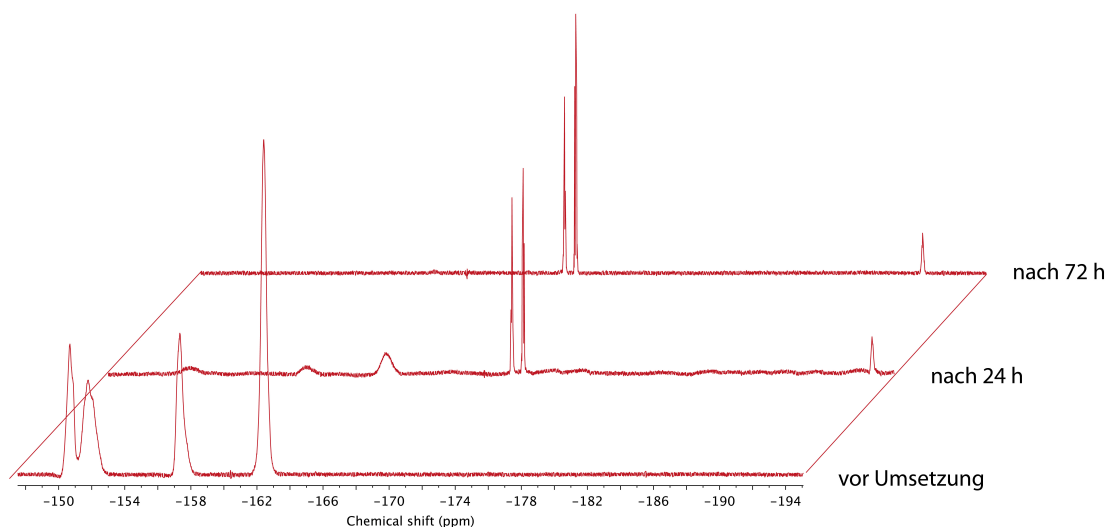
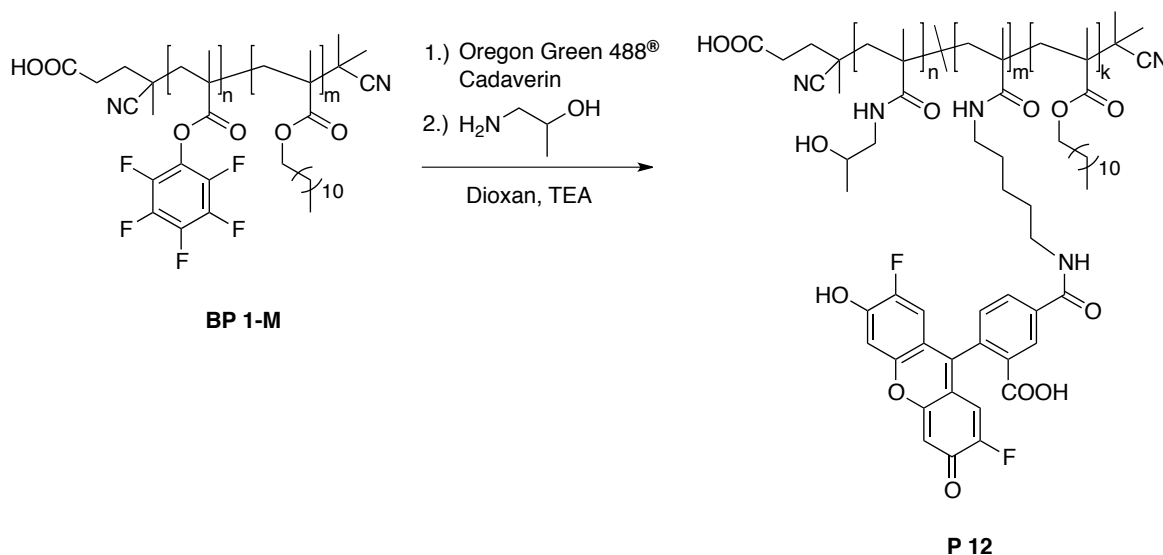


Abbildung 19. ^{19}F -NMR-Spektren über einen Zeitraum von 3 Tagen während der polymeranalogen Umsetzung in $\text{DMSO-}d_6$.

Um niedermolekulare Bestandteile abzutrennen, wurde in Diethylether gefällt, gegen destilliertes Wasser dialysiert und im Anschluss lyophilisiert. Sowohl bei den Block-Copolymeren **BP 1-8-M**, als auch bei den statistischen Copolymeren **SP 1-3-M** war die polymeranalogue Umsetzung zum $\text{P(HPMA)-}b/\text{co-P(LMA)}$ **P 1-11** vollständig. Nach erfolgreicher Entfernung der Endgruppe und anschließender polymeranaloger Umsetzung zum HPMA konnten die in Tabelle 4 aufgelisteten Polymere erhalten werden. Dabei stellen **P 1-8** Block-Copolymere dar, **P 9-12** sind hingegen statistischer Natur. Der hydrophobe LMA-Anteil variiert zwischen 10-50 mol% und die Molekulargewichte liegen zwischen 9 kDa und 25 kDa. Dabei zeigten die verschiedenen Copolymere unterschiedliche Eigenschaften vor allem in Bezug auf Löslichkeit. Generell ist auffällig, dass die statistischen Copolymere besser in Wasser löslich sind als die analogen Block-Copolymere, da die hydrophoben LMA-Fragmente von den gut wasserlöslichen HPMA-Fragmenten kompensiert werden können. Diese Kompensation ist bei Block-Copolymeren nicht möglich, da die LMA-Fragmente in einem Block konzentriert vorliegen. Die Copolymere, die einen besonders hohen Anteil an LMA aufweisen, wie **P 7** und **P 11** sind erwartungsgemäß schlecht bis gar nicht wasserlöslich.

3.1.1.7 Polymeranaloge Umsetzung zu fluoreszenzmarkierten Block-Copolymeren

In einem separaten Schritt wurden fluoreszenzmarkierte Block-Copolymere (**P 12** und **P 13**) synthetisiert, um physikochemische Untersuchungen mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie durchzuführen. Darüber hinaus kann die spätere zelluläre Aufnahme der Partikel in Zell-Experimenten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Hierbei wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, wie Oregon Green 488® Cadaverin und Texas Red® Cadaverin angebunden. Exemplarisch ist hier die Anbindung von Oregon Green 488® Cadaverin, einem Xanthen-Farbstoff, gezeigt. Analog zu Abschnitt 3.1.1.6 wurde das PFPMA-Copolymer (**BP 1-M**) in einem vorgezogenen Schritt mit 1 mol% Oregon Green 488® Cadaverin umgesetzt und nach ca. 7 h mit 2-Hydroxypropylamin abgesättigt (Schema 15). Mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie und IR-Spektroskopie konnte auch hier der Reaktionsverlauf kontrolliert werden, sodass nach ca. 90 h eine vollständige Umsetzung zu sehen war. Anschließend wurde gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.



Schema 15. Fluoreszenzmarkierung des P(PFPMA)-*b*-P(LMA)-Copolymers (**BP 1-M**) mit Oregon Green 488® Cadaverin zu P(HPMA)-*b*-P(LMA) (**P 12**).

In Tabelle 4 sind alle synthetisierten HPMA-basierten Systeme **P 1-13** aufgelistet.

Tabelle 4. HPMA-basierte Block- (**P 1-8**, **P 12** und **P 13**) und statistische Copolymere (**P 9-11**).

Name	Copolymer	Monomer Verhältnis ^a	M_n (g/mol) ^b	\bar{D}
P 1	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	89:11	9.500	1,21
P 2	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	79:21	11.000	1,25
P 3	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	70:30	12.500	1,26
P 4	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	61:39	13.500	1,24
P 5	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	90:10	21.000	1,30
P 6	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	80:20	22.500	1,32
P 7	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	69:31	21.500	1,35
P 8	P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	88:12	25.000	1,38
P 9	P(HPMA)- <i>co</i> -P(LMA)	89:11	10.800	1,16
P 10	P(HPMA)- <i>co</i> -P(LMA)	75:25	15.000	1,19
P 11	P(HPMA)- <i>co</i> -P(LMA)	50:50	16.000	1,19
P 12	P(HPMA/OG)- <i>b</i> -P(LMA)	89:11 [#]	9.500	1,21
P 13	P(HPMA/TR)- <i>b</i> -P(LMA)	89:11 [#]	9.500	1,21

^aMonomerverhältnis berechnet mittels ¹H-NMR-Spektroskopie in DMSO-d₆ nach polymeranaloger Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin. ^bBerechnet aus den Molekulargewichten der Reaktivesterpolymere (**BP 1-8** und **SP 1-3**) bestimmt mittels GPC in THF als Lösungsmittel. OG = Oregon Green, TR = Texas Red; [#] 1 mol%.

3.1.2 Einsatz der polymeren Tenside in Miniemulsionsprozesse

Die zuvor synthetisierten Copolymere wurden in die Miniemulsionsprozesse eingeführt, um Wirkstoff-Trägersysteme zu generieren, die eine lange Zirkulation im Blut erlauben sollen. Dazu sollen diese in Größenbereichen von 100-300 nm liegen, um den EPR-Effekt effektiv ausnutzen zu können. Darüber hinaus soll eine einfache und effiziente Beladung mit einem Wirkstoff möglich sein und zusätzlich die Formstabilität gewährleistet werden. Hierzu eignet sich besonders die Miniemulsionspolymerisationstechnik. Dazu wurden im folgenden Abschnitt die zuvor hergestellten polymeren Tenside (**P 1-11**) eingesetzt und hinsichtlich ihrer Stabilisierungseffizienz untersucht. Begonnen wurde mit der Herstellung von Polystyrolpartikeln mittels Miniemulsionspolymerisation, was in dieser Arbeit als Standardsystem diente, da dieses System eine gewisse Robustheit mit sich bringt.

3.1.2.1 Synthese von Polystyrol-Partikeln mittels Miniemulsionspolymerisation unter Einsatz der Block- und statistischen Copolymere **P 1-11**

Die Voraussetzung für den Einsatz von Copolymeren als Stabilisierungsreagenzien bei der Herstellung von Kolloiden mittels Miniemulsionstechniken ist ihre Wasserlöslichkeit. Sind diese nicht gut wasserlöslich, sind sie in der Regel auch nicht in der Lage, die Dispersion ausreichend zu stabilisieren. Dies führte dazu, dass die Polymere **P 7** und **P 11**, welche einen hydrophoben Einbau von > 30 mol% aufwiesen und nicht wasserlöslich waren, direkt von Anfang an ausgeschlossen wurden. Somit wurden die Block-Copolymere **P 1-6** und **P8** und die statistischen Copolymere **P9** und **P 10** auf ihre Stabilisierungseffizienz hin untersucht, wozu sie für die direkte Miniemulsionspolymerisation von Styrol (Abbildung 20) eingesetzt wurden. Styrol diente als robustes Modellsystem. Der Aufbau der Miniemulsionspolymerisation war folgender: Die kontinuierliche Phase bestand aus Wasser, in welchem das jeweilige Copolymer gelöst vorlag. Die disperse Phase hingegen beinhaltete Styrol und den öllöslichen Initiator V59. Um die Ostwald-Reifung zu unterdrücken, wurde Hexadekan als osmotisches Reagenz eingesetzt, welches dem Laplace-Druck entgegenwirkt und somit die Tröpfchen vor

Monomerdiffusion bewahrt. Danach wurde mittels Ultraschallbehandlung eine Miniemulsion erzeugt und die Polymerisation bei 70 °C über Nacht durchgeführt.

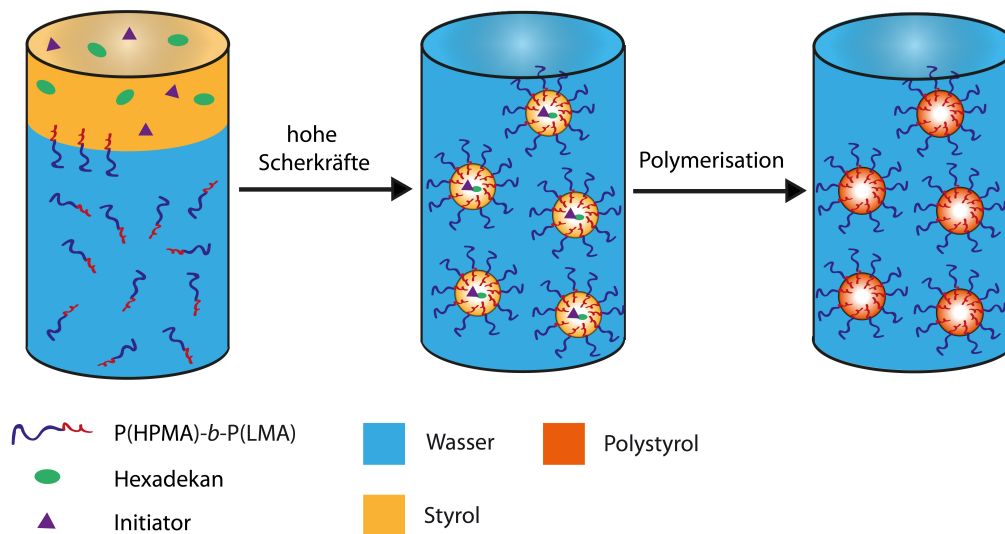


Abbildung 20. Schematische Darstellung der Synthese von Polystyrol-Partikeln mittels Miniemulsionspolymerisation am Beispiel von P(HPMA-*b*-LMA).

Sowohl die Block-Copolymere **P 1-6** und **P 8** als auch die statistischen Copolymere **P 9-10** waren in der Lage, die Polystyrol-Partikel effizient zu stabilisieren, da keine Koagulation während der Miniemulsionspolymerisation festgestellt werden konnte. Dies war etwas überraschend, da eine bessere Stabilisierung der Block-Copolymere, durch den zusammenhängenden LMA-Block, zu erwarten gewesen wäre.

Anschließend wurden die Parameter der Miniemulsionspolymerisation optimiert, wobei sich die Optimierung auf eine enge Verteilung und eine kleinstmögliche Größe der Kolloide bezog. Es zeigte sich dabei, dass das Molekulargewicht den größten Einfluss auf Größe und Verteilung der Kolloide hatte. Es konnte ein Trend beobachtet werden, dass die kleineren Block- und statistischen Copolymere (10 kDa - 15 kDa) zu enger verteilten und auch im Radius zu kleineren Kolloiden führten. Der hydrophobe Einbau an LMA hingegen ließ mehr Spielraum offen. Ein Einbau von nur 10 mol% bis zu 20 mol% zeigte keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf eine effiziente Stabilisierung der Kolloide. Ein weiterer wichtiger Emulsionsparameter ist das Verhältnis von Wasser zu Monomer. Dabei stellte sich

heraus, dass ein Verhältnis von 10 zu 0,4 (Wasser zu Styrol) eine sehr stabile Emulsion bildete. Tabelle 5 zeigt die optimierten Parameter.

Tabelle 5. PS-Partikel stabilisiert durch Block (D 2 und D 4) und statistische Copolymere (D 1 und D 3) mittels Miniemulsionspolymerisation.

Name	Kern	Wasser: Styrol	Copolymer	Initiator	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} /$ nm^a	μ_2^a
D 1	PS	10:0,4	P 9	V59	103	<0,07
D 2	PS	10:0,4	P 1	V59	100	<0,07
D 3	PS	10 0,4	P 10	V59	91	<0,07
D 4	PS	10:0,4	P 2	V59	107	<0,07

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Um die hergestellten Kolloide zu charakterisieren, wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Rasterelektronenmikroskopie (REM) genutzt. Die dynamische Lichtstreuung mittelt dabei eine Vielzahl von Partikeln und liefert zuverlässige Daten hinsichtlich der Polydispersität. Dennoch kann es zur Überschätzung der Partikelgröße kommen (z-gemittelter Radius). Außerdem wird bei der dynamischen Lichtstreuung der hydrodynamische Durchmesser (D_h), welcher eine gequollene Korona und eine hydratisierte Hülle mit einschließt, gemessen. Im Gegensatz dazu finden REM-Messungen im Vakuum unter Abwesenheit von Wasser statt. Unter diesen Bedingungen kollabieren die Polymere und es liegt keine hydratisierte Hülle vor. Demzufolge sind die durchschnittlichen Partikelgrößen in der dynamischen Lichtstreuung größer als durch REM-Messungen bestimmte Partikelgrößen (Abbildung 21). Die Charakterisierung der Partikel hinsichtlich reziprokem z-gemitteltem hydrodynamischen Radius und der Größenverteilung sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die enge Molekulargewichtsverteilung der Partikel wird durch die kleinen Werte von 0,07 des normalisierten sekundären Kumulanten (μ_2) angezeigt, welcher durch den

biexponentiellen Fit der Partikel-Autokorrelationsfunktion bei 90° abgeleitet wird. Die enge Verteilung wird zusätzlich durch die geringe Winkelabhängigkeit (15% bei 30° bis 150°) des "scheinbaren" Diffusionskoeffizienten bestätigt.

Die Morphologie der PS-Partikel konnte mittels SEM visualisiert werden und ist in Abbildung 21 am Beispiel von **D 2** und **D 4** dargestellt. Alle Partikel **D 1-4** zeigen eine sphärische Form und sind monodispers.

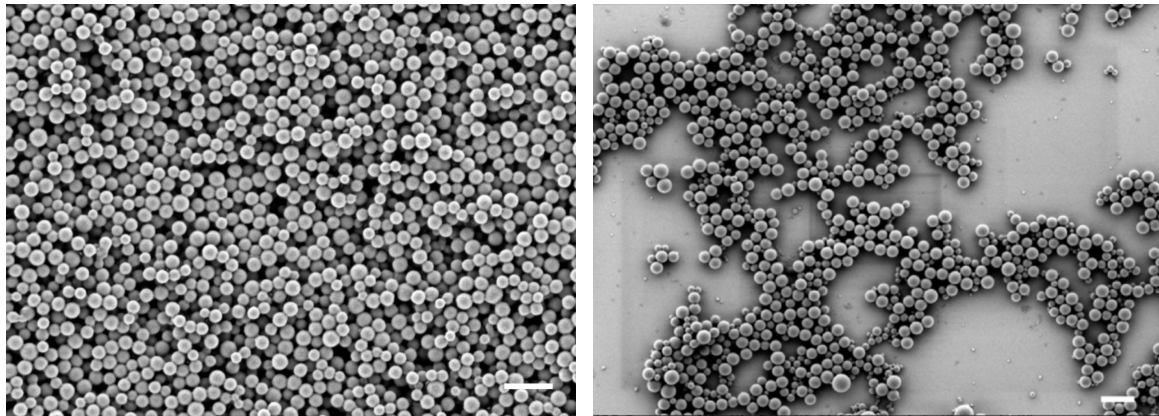


Abbildung 21. REM Aufnahmen von **D 2** stabilisiert durch **P 1** (links) und **D 4** stabilisiert durch **P 2** (rechts); Maßstab 500 nm.

Hinsichtlich biologischer Anwendung bringt die Miniemulsionspolymerisation jedoch einige Nachteile mit sich. Zum einen gibt es eine Limitation an einsetzbaren Monomeren und aufgrund der freien radikalischen Polymerisation hat man nur eine bedingte Kontrolle über die Molekulargewichtsverteilung. Zum anderen muss das eingeschlossene Kargo stabil gegenüber Radikalen sein, was bei Wirkstoffen eher selten gegeben ist. Darüber hinaus kann es zu Resten an Monomer kommen, was im Falle von Styrol hinsichtlich biologischer Anwendung vermieden werden sollte, da geringe Spuren bereits zytotoxisch sind. Die Aufreinigung dieser Kolloide ist zudem nicht immer trivial und führt häufig zur Destabilisierung der Dispersion. Um diese Probleme zu umgehen, wurde im Folgenden mit der Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung eingesetzt.

3.1.2.2 PS- und PDLA-Partikel mittels Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung

Bei der Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung wird an Stelle von Monomer bereits synthetisiertes Polymer in einem leicht siedenden, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, wie beispielsweise Chloroform, gelöst. Das Polymer selbst übernimmt in diesem Fall die Rolle des Ultrahydrophobs. Diese Methode hat den Vorteil, dass bereits aufgereinigtes und gut charakterisiertes Polymer als Kernmaterial eingesetzt werden kann. Die in der Miniemulsionspolymerisation eingesetzten Block-Copolymere **P 1-6** und **P 8** und die statistischen Copolymere **P 9** und **P 10** wurden im Miniemulsionsprozess in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung verwendet und auf ihre Stabilisierungseffektivität untersucht. Hierzu wurde wiederum mit Polystyrol als Modellsystem begonnen, um eine Vergleichbarkeit zur vorhergehenden Methode zu gewährleisten. In Abbildung 22 ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt. Es wurde Polystyrol in Chloroform gelöst und die Copolymere in Wasser, bevor die beiden Phasen zusammengegeben wurden. Nach Präemulgieren und Eintrag hoher Scherkräfte mittels Ultraschall wurde eine Miniemulsion hergestellt. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Schalldauer von 3 min erreicht, wobei ein Schallprogramm von 10 s Puls und 10 s Pause unter Eiskühlung gefahren wurde. Dies war nötig, um den Verlust an niedrig siedendem Lösungsmittel so gering wie möglich zu halten. Nach Erhalt der Miniemulsion konnte mit der Verdampfung des Chloroforms begonnen werden, um so den Kollaps des Polystyrols herbeizuführen, sodass sich das finale kolloidale System bilden konnte. Diese Methode ist in der Regel viel sensitiver hinsichtlich Art und Menge des Tensids, im Vergleich zur Miniemulsionspolymerisation, da die Dynamik während der Polymerisation wegfällt und nur das Verdampfen des Lösungsmittels den Bildungsprozess, genauer die Größenverteilung, steuert.

Unter Verwendung der Block-Copolymere **P 1-3** und **P 5-7** sowie der statistischen Copolymere **P 9** und **P 10** konnten auch mittels dieser Methode stabile PS-Partikel hergestellt werden.

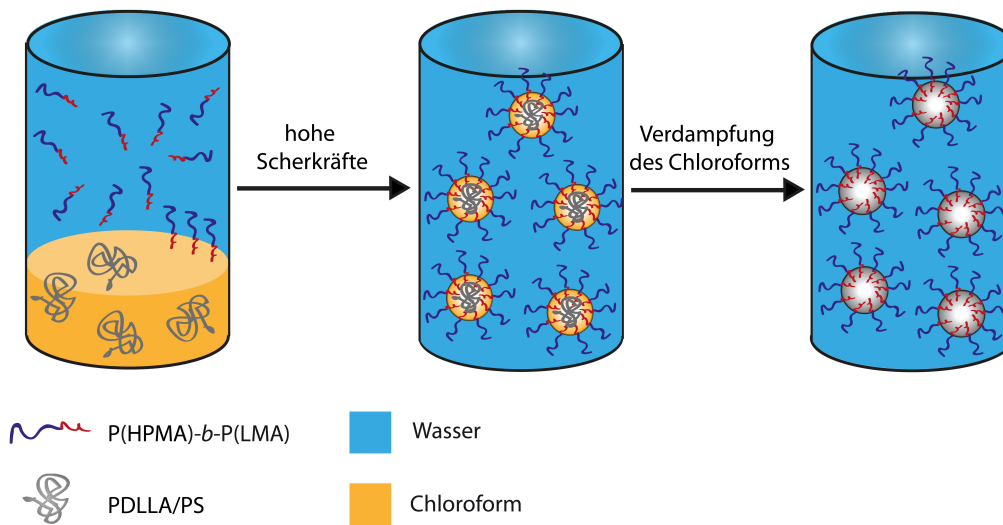


Abbildung 22. Schematische Darstellung der Herstellung von polymeren Kolloiden mittels Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Zusätzlich wurden für dieses PS-Modellsystem die Emulsionsparameter hinsichtlich Molekulargewicht, hydrophiles/hydrophobes Verhältnis sowie Architektur der Copolymere für bereits gebildetes PS mit einem M_w von 120.000 g/mol variiert und optimiert. Auch die Menge an PS, wie auch das Verhältnis von disperser zu kontinuierlicher Phase, wurden untersucht. Die beste Stabilisierung, bezogen auf die kleinst mögliche Größe und Dispersität, konnte bei Verwendung der Copolymere im Größenbereich von 10 kDa und einem hydrophoben Einbau von 10 mol% LMA (**P 1** und **P 9**), erreicht werden. Die Verwendung von **P 2** und **P 10** ergab zwar stabile Kolloide, jedoch mit einer breiteren Größenverteilung. Der Einsatz von **P 3** und **P 7** führte nach kurzer Zeit zur Phasenseparation. Im Fall von **P 5** und **P 6** hingegen konnten stabile und eng verteilte Kolloide erhalten werden, welche jedoch im Vergleich zu **P 1** und **P 2** einen deutlich größeren Durchmesser besaßen. Bei Verwendung von **P 8** wurden sogar Kolloide im Größenbereich von 500 nm erhalten. Somit eigneten sich in diesem Prozess nur die Copolymere **P 1** und **P 9** für die Herstellung von einheitlichen PS-Partikeln mit für die biologische Anwendung relevanten Größen (Tabelle 6). Da LMA sehr hydrophob ist, reicht bereits ein kleiner Anteil von 10 mol% aus, um einen effizienten Anker darzustellen. Dieser geringe Anteil bedingt im Gegenzug das Vorhandensein von langen

hydrophilen HPMA-Ketten, welche eine effiziente sterische Abschirmung der Kolloide gewährleisten müssen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ab einem Molekulargewicht von > 20 kDa der Raumbedarf des Copolymers an Einfluss gewinnt. Wahrscheinlich wird dadurch die Oberfläche der Kolloide weniger dicht mit Block-Copolymeren belegt. Die daraus resultierende schlechtere Stabilisierung bedingt, dass größere Kolloide entstehen. Betrachtet man sich die Parameter der Miniemulsion, zeigt sich, dass bereits bei einem Verhältnis von **P 1** oder **P 9** zu PS von 1 zu 25 stabile Kolloide erhalten wurden. Um die Partikelgröße allerdings weiter zu reduzieren, was für die biologische Anwendung unabdingbar war, wurde ein Verhältnis von 1:5 verwendet. Somit war es möglich, Partikel im gewünschten Größenbereich (Abbildung 23) darzustellen. Das Verhältnis von Öl-zu-Wasser-Phase erwies sich bei 1:4,8 als optimal, da es bei anderen Zusammensetzungen entweder direkt zur Phasenseparation oder zu einer breiteren Verteilung der Kolloide kam. Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl die statistischen als auch die Block-Copolymere die initialen Töpfchen effektiv gegen Koaleszenz und direkte Phasenseparation stabilisieren. Auch nach Verdampfen des Lösungsmittels lag eine effiziente Stabilisierung über Monate vor. Das Block-Copolymer **P 1** und das statistische Copolymer **P 9** waren somit allen getesteten Copolymeren überlegen (Tabelle 6).

Nachdem die amphiphilen Copolymere sich nun auch für diese Methode am Modellsystem Polystyrol bewährt haben, sollten nun bioabbaubare Systeme unter Verwendung von **P1** und **P9** entwickelt werden. Ein geeignetes System stellte die Verwendung eines Polylactidkerns dar. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Verwendung des amorphen Poly-*D/L*-lactids (PDLLA) dem Poly-*L*-lactid (PLLA) bei Verwendung der HPMA-basierten Tenside überlegen war. Die kristalline Form des PLLAs und die damit verbundene schlechtere Löslichkeit in Chloroform scheint die Bildung des Kolloids zu beeinträchtigen, was sich in größeren und breiter verteilten Kolloiden widerspiegelte. Im nächsten Schritt wurden die zuvor optimierten Parameter des Modellsystems PS auf das neue System PDLLA angewendet. Es zeigte sich schnell, dass die optimierten Parameter komplett übertragen werden konnten.

Die erhaltenen Kolloide **D 5-8** lagen im Größenbereich von 146 nm - 243 nm im Radius und wiesen eine noch enge Verteilung auf (Tabelle 6 und Abbildung 23). Somit war es nun gelungen, Systeme mit einem bioabbaubaren Kern darzustellen.

Tabelle 6. Optimierte Parameter zur Darstellung von PS- und PDLLA-Partikeln *via* Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung sowie deren Charakterisierung.

Name	Kern	Copolymer	Chloroform: Wasser	$\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} /$ nm^a	μ_2^a
D5	PS	P9	1:4,8	222	0,12
D6	PS	P1	1:4,8	203	0,07
D7	PDLLA	P9	1:4,8	243	0,10
D8	PDLLA	P1	1:4,8	146	0,06

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

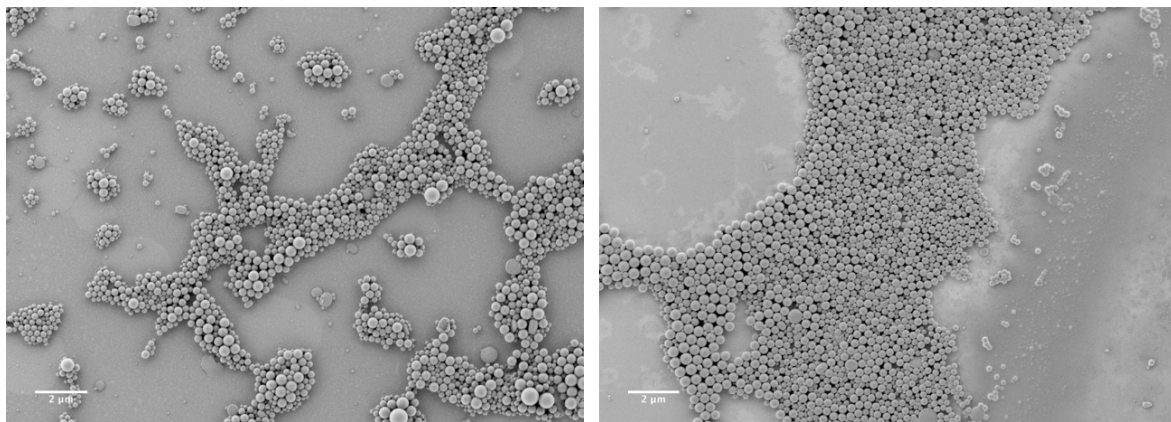


Abbildung 23. REM-Aufnahmen von **D 6** (links) und **D 8** (rechts) mittels Rasterelektronenmikroskopie; Maßstab 2 µm.

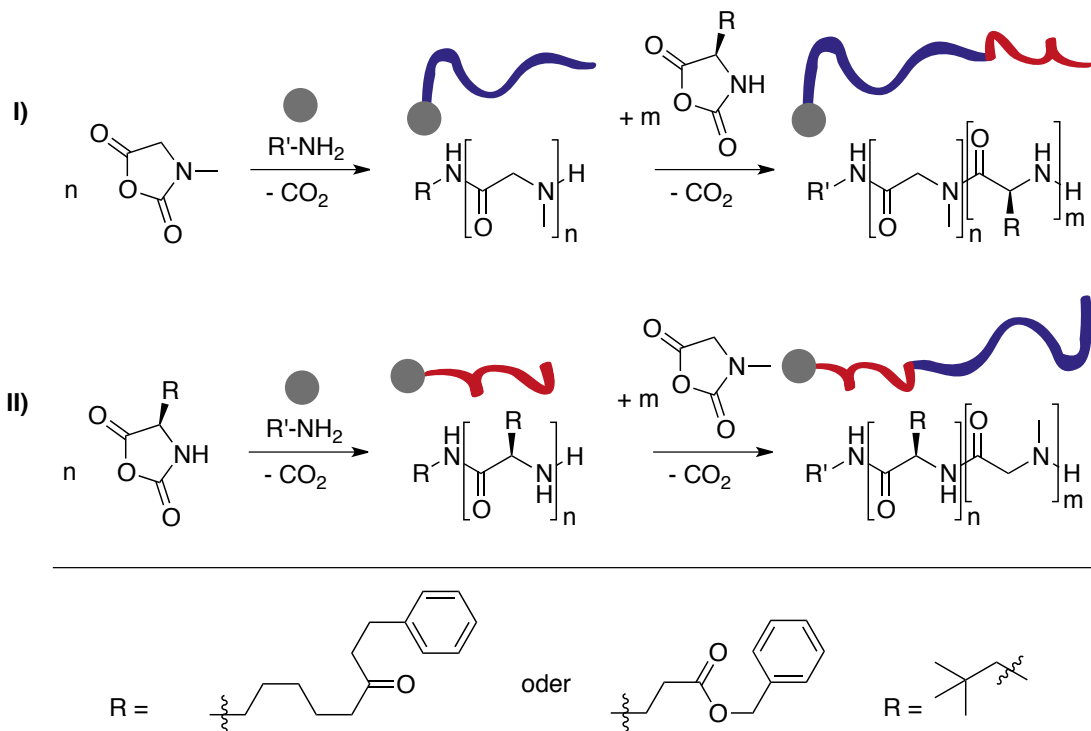
Um nachzuweisen, dass eine starke Adhäsion der HPMA-Copolymere auf der Partikeloberfläche vorliegt, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Die Kolloide **D 6** und **D 8**, welche mit dem Block-Copolymer **P 1** stabilisiert waren, wurden mehrere Male zentrifugiert und wieder in destilliertem Wasser re-suspendiert. Diese Prozedur wurde mehr als zehnmals wiederholt, ohne dass sichtbare

Unterschiede in den Partikeleigenschaften wie Deformation oder veränderte Größen/-verteilungen zu erkennen waren. Dies zeigte, dass das Polymer fest auf der Oberfläche der Partikel haftet. Während das Re-suspendieren für das Block-Copolymer beliebig oft möglich war, konnte dieser Prozess im Fall des statistischen Copolymers **P 9** nur begrenzt wiederholt werden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Arbeiten von Scheibe *et al.*¹⁷³ überein, welche zeigen konnten, dass Block-Copolymere sehr stabile Langmuir-Blodgett Filme ausbilden. Bei den statistischen Copolymeren der gleichen Zusammensetzung kommt es dagegen zu einem ständigen Verlust von Polymer in die Subphase. Dies entspricht der höheren CMC der statistischen Copolymere. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich mit **P 1**-stabilisierten Kolloiden durchgeführt.

Mit den so dargestellten PS- (**D 6**) und PDLLA-Partikeln (**D 8**) war das Grundgerüst für ein Wirkstoff-Trägersystem geschaffen. Jetzt galt es diese auf ihre Tauglichkeit in biologischen Systemen zu untersuchen.

3.1.3 Einsatz von bioabbaubaren Polypeptiden zur Darstellung von Kolloiden

Neben den obigen biokompatiblen HPMA/LMA-Block-Copolymeren wurden auch bioabbaubare Polypeptide als polymere Tenside eingesetzt. Dazu wurden PSar-*block*-PGlu(OBn) und PSar-*block*-PLys(Z)) von [REDACTED] mittels ringöffnender Polymerisation von *N*-Carboxyanhydriden mit verschiedenen hydrophilen/hydrophoben Verhältnissen hergestellt (Schema 16).



Schema 16. Sequentielle Synthese der Copolypept(o)ide mittels Ringöffnender Polymerisation eines *N*-Carboxyanhydrids, modifiziert nach ¹⁸³.

Diese amphiphilen Block-Copolypeptide wurden als polymere Tenside, analog zu den HPMA-Systemen, in die Miniemulsionspolymerisation und Miniemulsions-Verdampfungstechnik eingesetzt (Abbildung 24).

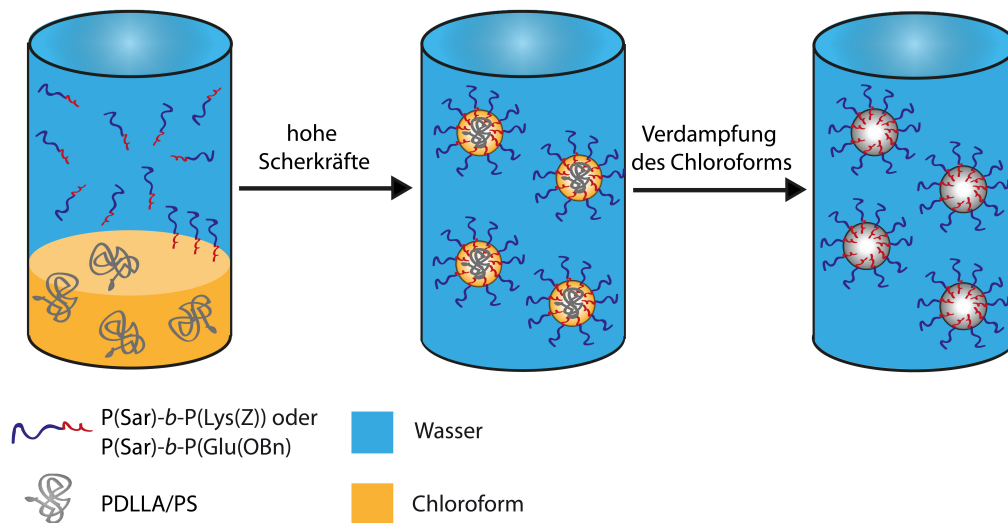


Abbildung 24. Schematische Darstellung der Herstellung von PS- und PDLLA-Kolloiden mittels Sarcosin-basierter Block-Copolypeptide als polymere Tenside.

Dabei wurden beide Block-Copolypeptide, $P(\text{Sar})_{200}\text{-block-P}(\text{Glu}(\text{OBn}))_{27}$ (**P 14**) und $P(\text{Sar})_{200}\text{-block-P}(\text{Lys}(\text{Z}))_{22}$ (**P 15**) in der kontinuierlichen Phase gelöst. Diese waren in der Lage, PS-Kolloide zu stabilisieren und ergaben Kolloid-Durchmesser von ca. 100 nm - 200 nm **D 9-10**. **P 14** führte zur Bildung von monodispersen Kolloiden (Abbildung 25, links). Auch in diesem Fall wurde hinsichtlich biologischer Anwendung PS durch PDLLA ersetzt. Um dies zu erreichen, wurde von der Miniemulsionspolymerisation auf die Miniemulsions-Lösungsmittelverdampfungsstechnik gewechselt. Die erhaltenen PDLLA-Kolloide **D 11-12** waren, wie zu erwarten, etwas breiter verteilt und wiesen Größen von ca. 200 nm auf (Abbildung 25, rechts). Im Vergleich zu den HPMA/LMA-Systemen zeigten diese Systeme ein ähnliches Verhalten bei der Anwendung in Miniemulsionsprozessen. Die aufwendige Funktionalisierungsschemie der Polypeptide führte jedoch dazu, dass im Folgenden nur die über die kontrollierte RAFT-Polymerisation hergestellten HPMA/LMA-Copolymere, welche einfach zu funktionalisieren sind, verwendet wurden.

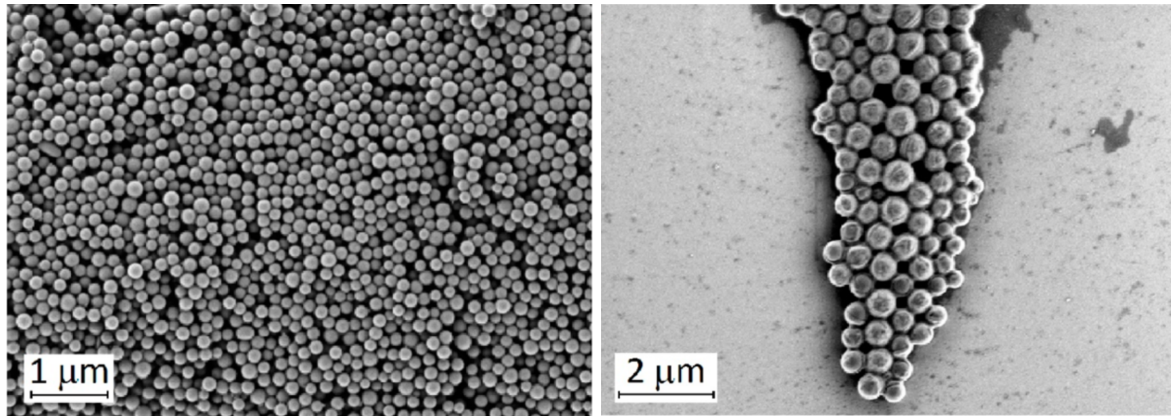


Abbildung 25. REM-Aufnahmen der PS- **D 9** (links) und PDLLA-Kolloide **D 11** (rechts) stabilisiert durch das Sarcosin-basierte Block-Copolypeptid **P 14**.

3.2 *In vitro* Evaluierung von P(HPMA-*b*-LMA)-stabilisierten Kolloiden

Für eine erfolgreiche biologische Anwendung der kolloidalen Systeme als Wirkstoff-Trägersystem müssen zuerst Kriterien wie Zelltoxizität und Aggregationsverhalten in humanem Blutserum ausgeschlossen werden. Zur Untersuchung der Zelltoxizität wurden in Kooperation mit Dr. [REDACTED] MTS-Assays an HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei wurden PS- (D 6) und PDLLA-Partikel (D 8) bis zu einer Konzentration von 1,2 mg/mL auf die Zellen gegeben und für 72 h inkubiert. Falls keine Zelltoxizität vorliegt, sind die lebenden Zellen in der Lage, NAD(P)H zu bilden, welches wiederum für die Reduktion von MTS-Tetrazoliumsals zu Formazan verantwortlich ist. Dieses kann photometrisch detektiert werden, wobei das erhaltene Signal proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist. Abbildung 26 zeigt, dass bei allen untersuchten Kolloiden eine Zellviabilität von über 80% gemessen werden konnte, was per Definition als nicht-toxisch angesehen wird.

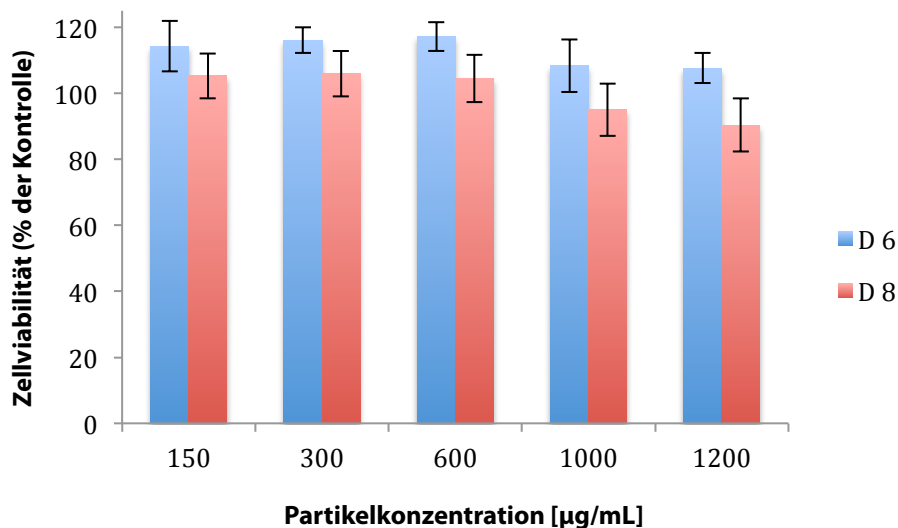


Abbildung 26. MTS-Assay der PS- (D 6) und PDLLA-Partikel (D 8) an HeLa-Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Die Zellviabilität lag bei beiden Systemen über 80%.

Ein weiter wichtiger Aspekt für langzirkulierende Wirkstoff-Trägersysteme ist ihre Interaktion mit Blutkomponenten. Kommt es zur Aggregation, kann dies zum einen

zu Blutkoagulation bis hin zu Thrombosen führen, aber auch das pharmakokinetische Profil gravierend verändern. Um solche Interaktionen zu verhindern, wird beim Design der Systeme auf einen "Stealth-like"-Charakter¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ geachtet. Das Aggregationsverhalten von **D 6** und **D 8** wurde in Kooperation mit Dr. [REDACTED] mittels dynamischer Lichtstreuung nach Inkubation gemessen. Dazu wurden diese sowohl im Blutserum als auch im Zellkulturmedium getestet, um Effekte ausschließen zu können, die auf das Medium zurückzuführen sind. Solche Effekte schließen vor allem Interaktionen mit fötalem Kälberserum (engl. fetal bovine serum, FBS) ein, welches ähnlich den Serumproteinen die Oberfläche der kolloidalen Systeme durch Adsorption modifiziert und so sowohl die Körperverteilung als auch die zellulären Interaktionen verändern kann.¹⁸⁷ Die Messergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

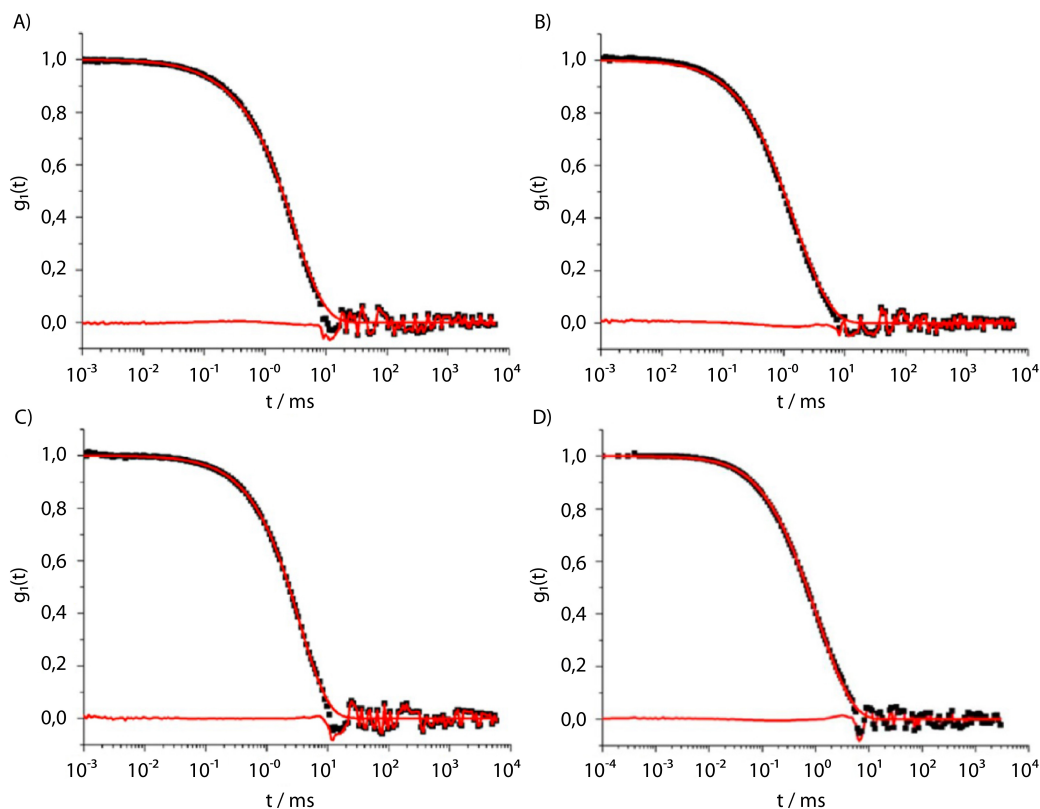


Abbildung 27. Darstellung der Autokorrelationsfunktionen von **D 6** in (A) Zellkulturmedium und (C) humanem Serum sowie **D 8** in (B) Zellkulturmedium und (D) humanem Serum. Der rote Graph stellt die "Forced Fit"-Funktion der Summe der einzelnen Korrelationsfunktionen des Serums ($\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 18$ nm), des Zellkulturmediums ($\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 7,5$ nm) und der Kolloide (D6: $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 203$ nm/ D8: $\langle 1/R_h \rangle_z^{-1} = 146$ nm) dar; Streuwinkel 60° , $T=293$ K.

Um die Vergleichbarkeit der *in vitro*-DLS-Daten zu gewährleisten, wurden die Konzentrationen der Kolloide im Zellmedium und humanem Blutserum an die Werte der Zellstudien angepasst. Die Analyse der Daten in beiden Medien wurde in Analogie zu den Arbeiten von Rausch *et al.* durchgeführt.⁹⁹ Die Messdaten der Gemische können in allen Fällen (A-D) gut durch die "Forced Fit"-Funktion beschrieben werden. Daraus kann geschlossen werden, dass es zu keiner oder vernachlässigbarer Aggregation der Systeme im jeweiligen Medium kam.

Da die untersuchten Systeme nicht zelltoxisch sind und auch keine Interaktionen mit den Bestandteilen von Blut und Zellmedium eingehen, stellen diese vielversprechende Kandidaten für langzirkulierende Wirkstoff-Trägersysteme dar. Auf dieser Grundlage stellt sich zuerst die Frage nach ihrer Zellaufnahme und in Folge dessen nach der Freisetzung eines geladenen Wirkstoffes, welcher hier durch einen fluoreszierenden Farbstoff als Modellsystem ersetzt wurde.

Zur Untersuchung der Aufnahme der Kolloide in HeLa-Zellen wurden diese (**D 13** und **D 14**) dahingehend modifiziert, dass das stabilisierende Block-Copolymer **P 12** mittels Oregon Green® Cadaverin fluoreszenzmarkiert war (Tabelle 7).

Tabelle 7. Darstellung von fluoreszenzmarkierten PS- (**D 13**) und PDLLA-Partikeln (**D 14**) via Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Name	Kern	Copolymer	Chloroform: Wasser	R / nm^a
D 13	PS	P 12	1:4,8	150
D 14	PDLLA	P 12	1:4,8	175

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

So konnten Zellaufnahmen mittels konfokaler Laserrastermikroskopie (engl. confocal laser scanning microscopy, CLSM) in Kooperation mit Dr. [REDACTED] durchgeführt werden, womit eine Lokalisation der Kolloide möglich war. Darüber konnten so Aussagen getroffen werden, ob sich die Kolloide intra- oder extrazellulär befanden.

Dazu wurden die HeLa-Zellen mit **D 13** und **D 14** für 24 h inkubiert und mittels CLSM visualisiert (Abbildung 28). Die Ausschnitte A (Negativkontrolle), C (PS, **D 13**) und E (PDLLA, **D 14**) sind Übersichtsbilder, wohingegen B, D und F die jeweilige Vergrößerung darstellen.

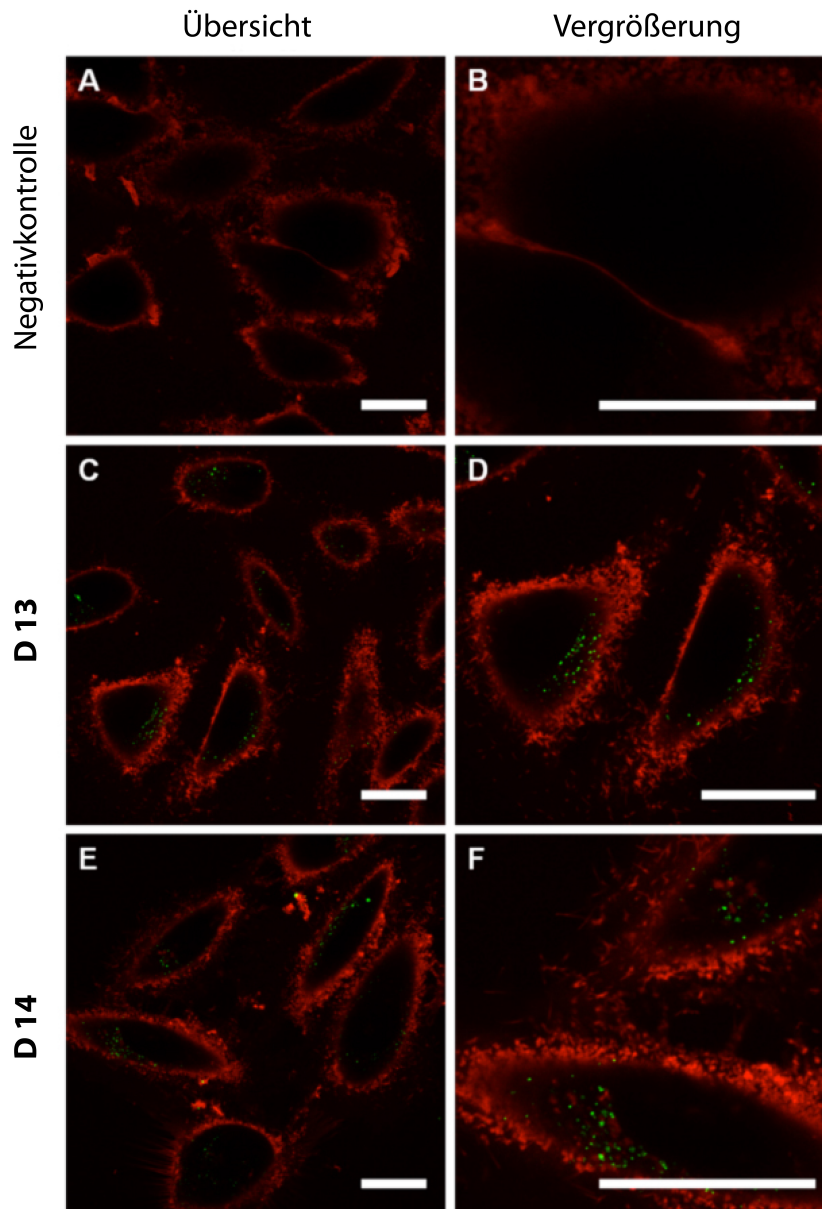


Abbildung 28. CLSM-Aufnahmen der HeLa-Zellen nach Inkubation (24 h) mit fluoreszenzmarkierten PS- (**D 13**) und PDLLA-Partikeln (**D 14**) (150 µg/mL) samt Negativkontrolle. Teilausschnitte A, C und E repräsentieren Übersichtsbilder, B, D und F sind Vergrößerungen. Alle Bilder zeigen Fluoreszenzsignale der Oregon Green®-markierten Partikel (grün) und der Zellmembran angefärbt mit CellMask™ Deep Red (rot). Ausschnitte A und B repräsentieren die Zellen der Negativkontrolle, C und D die mit **D 13** und E und F die mit **D 14** inkubierten Zellen. Maßstab = 25 µm.

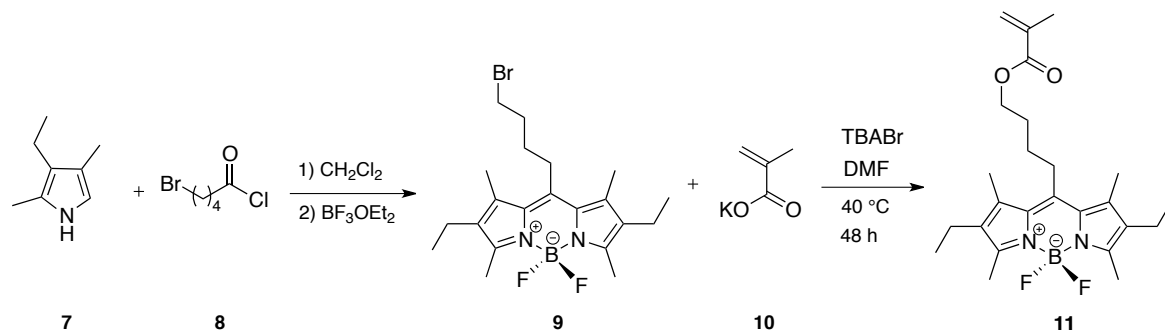
Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl **D 13** (C und D), als auch **D 14** (E und F) von den Zellen eher moderat aufgenommen wurden. Dies wird deutlich durch die vereinzelten grün fluoreszierenden Signale (Kolloide) innerhalb der rot angefärbten Zellmembran.

Vergleicht man die Aufnahme der PS- und PDLLA-Partikel untereinander, ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Diese Ergebnisse waren überraschend, da bereits von Höcherl *et al.*¹⁸⁸ gezeigt wurde, dass PLLA-Partikel deutlich besser im Vergleich zu PS-Partikeln aufgenommen werden. Anzumerken ist jedoch, dass die PS- und PDLLA-Partikel in dieser Arbeit mittels HPMa-*b*-LMA-Block-Copolymeren, im Gegensatz zu SDS stabilisiert wurden, wie es bei Höcherl *et al.*¹⁸⁸ und Musyanovych *et al.*¹⁸⁹ der Fall war und daher die unterschiedliche Aufnahme erklären könnte. Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass die HPMa-basierte Korona eine Reduktion der unspezifischen Bindung mit Transmembranproteinen und der Zellmembran bewirkt und somit zu einer verminderten unspezifischen Zellaufnahme führt.

Als nächstes stellte sich die Frage was genau mit dem aufgenommenen Kolloid in der Zelle geschieht. Um nähere Erläuterungen darüber machen zu können, muss als erstes geklärt werden, ob die Partikelsignale (Abbildung 28), welche bisher durch die Markierung des Block-Copolymers auf der Oberfläche zustande kamen, den gesamten Partikel repräsentieren oder möglicherweise, durch Ablösung von der Oberfläche, das angereicherte Block-Copolymer alleine darstellen. Im folgenden Abschnitt soll nun die Partikelmatrix mit in die Untersuchungen einbezogen werden.

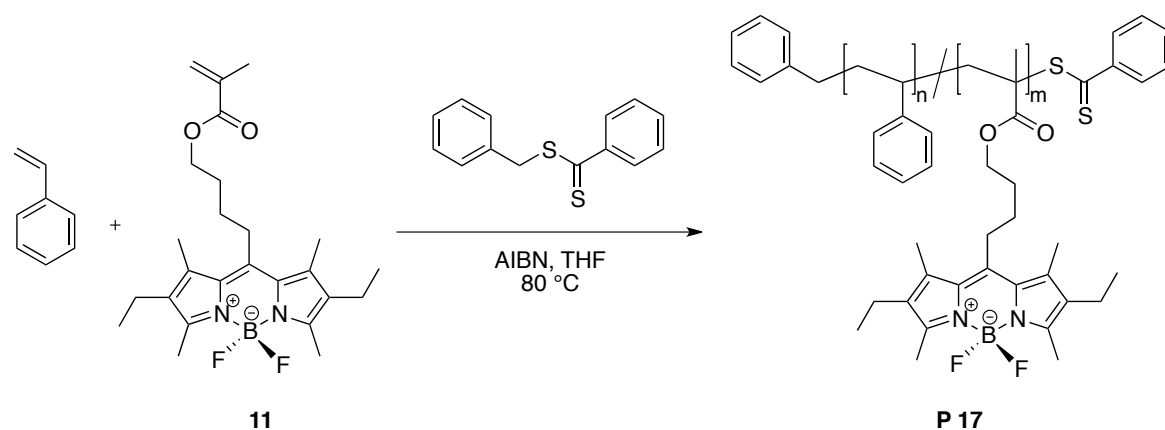
Dafür wurden Partikel hergestellt, deren Kern- und Hüllmaterial jeweils fluoreszent markiert waren. Für die bisherigen Studien wurde das kommerziell erhältliche Poly-D/L-lactid mit einer Ester-Endgruppe als Kernmaterial verwendet. Da dies nicht ohne Weiteres mit einem Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiert werden konnte, wurde für folgende Studien auf das leicht synthetisierbare Polystyrol-System zurückgegriffen, welches von Dr. [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurde und mittels BODIPY fluoreszenzmarkiert war (**P 16**). Zusätzlich wurde ein zweites

BODIPY-MA **11** über eine zweistufige Syntheseroute hergestellt und anschließend *via* RAFT-Polymerisation mit Styrol zu **P 17** copolymerisiert. Das Reaktionsschema ist im Folgenden gezeigt (Schema 17).



Schema 17. Darstellung des BODIPY-Methacrylats **11** in einer zweistufigen Synthese.

Dabei wurde 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol **7** mit 5-Bromvalerylchlorid **8** unter Stickstoffatmosphäre umgesetzt. Die Aufarbeitung ergab ein rötliches Öl, welches mit Diethylether-Bortrifluorid versetzt wurde, um den Bor-Komplex **9** zu bilden. Um einen polymerisierbaren Farbstoff zu erhalten, wurde das BODIPY-Br **9** mit Kaliummethacrylat **10** umgesetzt. Das entstandene BODIPY-MA **11** konnte unter Verwendung des Benzyl-CTAs kontrolliert mit Styrol copolymerisiert werden (Schema 18).



Schema 18. Darstellung des BODIPY-markierten Polystyrols **P 17** mittels RAFT-Polymerisation.

BODIPY-markiertes Polystyrol **P 16** und **P 17** wurde nun als Kernmaterial eingesetzt. So konnten PS-BODIPY-Partikel (**D 15**), wie bereits beschrieben, mittels Miniemulsions-Lösungsmittelverdampfungstechnik hergestellt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8. Darstellung von BODIPY-markierten PS-Kolloiden **D 15** via Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Name	Kern	Copolymer	Chloroform: Wasser	R / nm^a
D 15	BODIPY-PS	P 13	1:4,8	135

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Um die Hülle der Kolloide mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, dessen Absorptionsmaximum sich von BODIPY (488 nm) unterschied, wurde Texas Red® (586 nm) markiertes P(HPMA)-*b*-P(LMA) Block-Copolymer (**P 13**) als Stabilisierungsreagenz verwendet. Diese doppelt markierten Kolloide **D 15** wurden weiteren Zellstudien unterzogen. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Kolloiden für 8 h bzw. 24 h inkubiert. Nach Inkubationszeit und Anfärben der Zellmembran mit CDR wurden anschließend CLSM-Messungen an den lebenden Zellen durchgeführt.

Abbildung 29 zeigt, dass nach 8 h Inkubation in HeLa-Zellen Kolokalisation der BODIPY- und Texas Red-Signale vorliegt (Überlagerungsbild 29 C). Somit ist gewährleistet, dass das gesamte Partikel **D 15** (Kern und Block-Copolymer) aufgenommen wurde. Wenn man allerdings die Aufnahmen nach 24 h Inkubationszeit (Abbildung 29 D-F) betrachtet, wird deutlich, dass viel mehr Texas Red-Signale ohne dazugehörige BODIPY-Signale erscheinen, was auf ein intrazelluläres Ablösen des Block-Copolymers (**P 13**) schließen lässt.

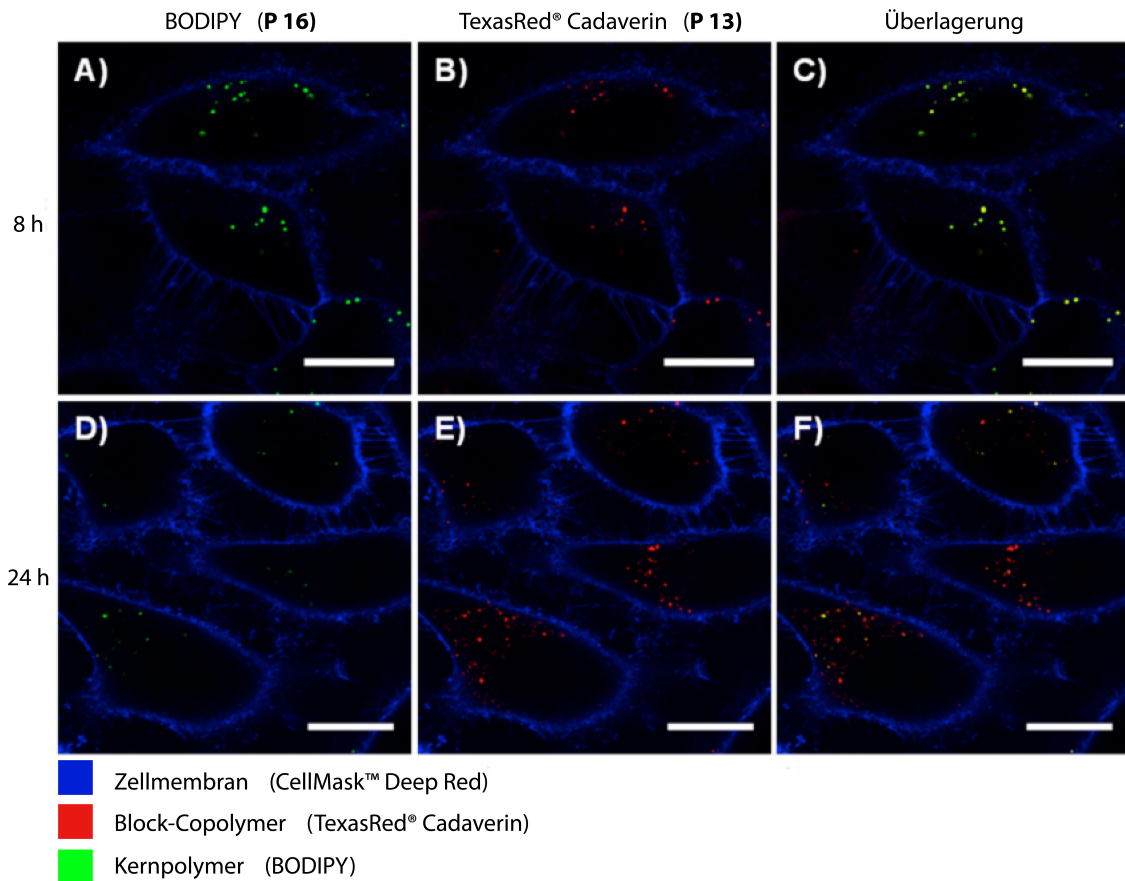


Abbildung 29. CLSM Aufnahmen der HeLa-Zellen nach 8 h (A-C) und 24 h (D-F) Inkubation mit **D 15**. A) und D) zeigen Fluoreszenzsignale des BODIPYs (P 16), B) und E) Signale des Texas Reds (P 13). C) und F) sind Überlagerungsbilder beider Fluoreszenzsignale. Maßstab = 20 μm .

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde in Kooperation mit Dr. [REDACTED] eine quantitative Analyse der CLSM-Aufnahmen mittels Volocity® durchgeführt. Dazu wurden die CLSM-Aufnahmen von zwanzig einzelnen Zellen nach 8 h und 24 h Inkubationszeit mit **D 15** ausgewertet. Das Programm Volocity® wurde verwendet, um die Fluoreszenzsignale von BODIPY und Texas Red hinsichtlich der Menge an Spots in jeder einzelnen Zelle auszuzählen. Das folgende Histogramm zeigt die Fluoreszenzsignale nach 8 h (Abbildung 30 A) und 24 h (Abbildung 30 B) Inkubationszeit für jede einzelne Zelle (20 Zellen insgesamt). Diese Quantifizierung zeigt deutlich, dass die Menge der Fluoreszenzsignale der beiden Fluorophore nahezu identisch war. Somit fand kein intrazelluläres Ablösen des Texas Red-markierten Block-Copolymers (P 13) vom Partikelkern innerhalb der ersten 8 h statt. Außerdem zeigt Abbildung 30 A eine moderate Zellaufnahme, was mit den

Ergebnissen der CSLM-Aufnahmen in Abbildung 28 und 29 übereinstimmt. Dies entspricht der geringen unspezifischen Zellaufnahme und ist die Voraussetzung für ein gezieltes Ansteuern der gewünschten Zielzellen. Nach 24 h Inkubationszeit (Abbildung 30 B) kam es zu keiner nennenswerten Veränderung der BODIPY-Signale, wohingegen die Menge an Texas Red-Signalen deutlich anstieg.

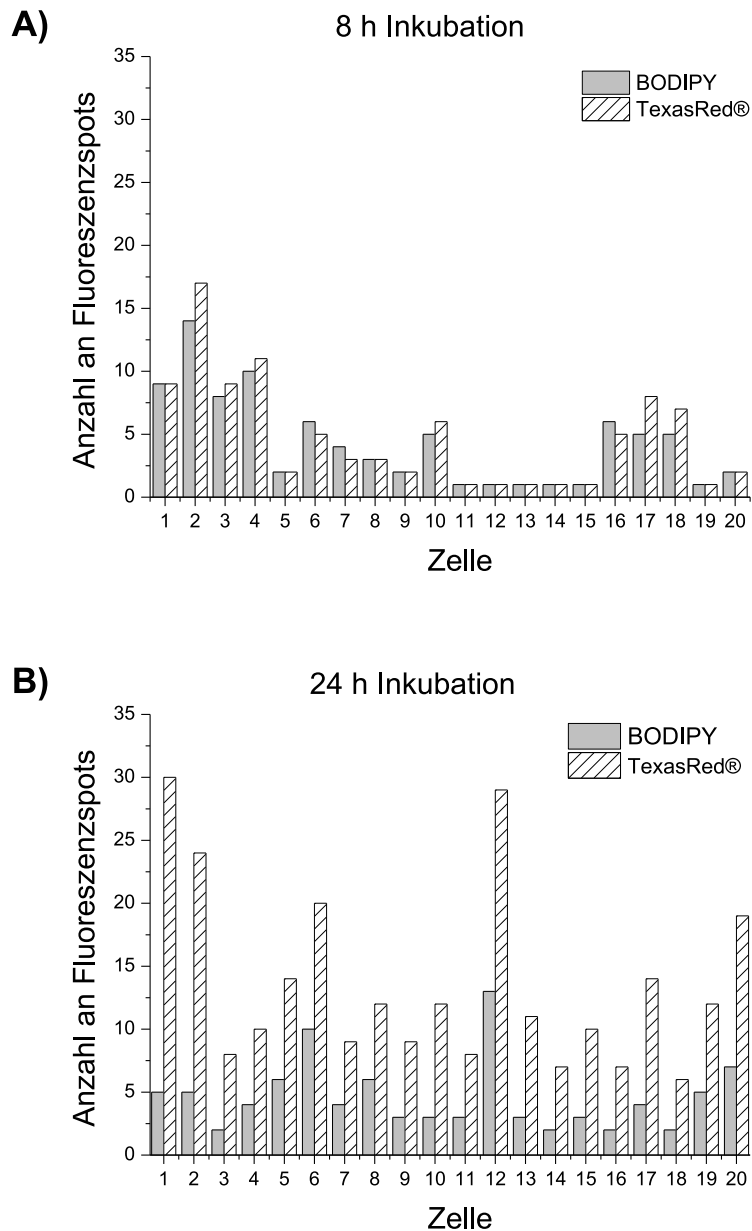


Abbildung 30. Die quantitative Auswertung von zwanzig Zellen mittels Volocity® zeigt ein intrazelluläres Ablösen des Block-Copolymers (**P 13**) vom Partikelkern beginnend 8 h nach Aufnahme. Die Anzahl der Fluoreszenzsignale des BODIPYs (Kernmarkierung) und Texas Red (Block-Copolymer) ist in A) nach 8 h und in B) nach 24 h Inkubationszeit mit **D 15** dargestellt.

Diese Ergebnisse führten zur Annahme, dass sich die Block-Copolymere nach mehr als 8 h langsam intrazellulär vom Partikel ablösen, möglicherweise durch Einwirkung von abbauenden Enzymen in den späten Endosomen/Lysosomen oder durch die direkte Wechselwirkung mit Membranstrukturen. Zusätzliche Berechnungen der Flächendimensionen von BODIPY- und Texas Red-Signalen wurden mittels Volocity® durchgeführt (Abbildung 31). Das Auftreten von mehr, aber kleineren Flächen an Texas Red-Signalen nach 24 h im Vergleich zu den Ergebnissen nach 8 h legt dabei die Annahme der Bildung von mizellaren Strukturen des Block-Copolymers **P 13** nach Ablösen vom Kolloid nahe. Während die BODIPY-Signale nahezu gleiche Flächendimensionen nach 8 h und 24 h Inkubationszeit aufwiesen, zeigten Texas Red-Signale einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Flächengröße bei Vergleich von 8 h und 24 h Inkubationszeit (Abbildung 31 B). Nach 8 h waren Menge und auch Fläche der Texas Red-Signale vergleichbar mit der Flächenanzahl und -größe des BODIPYs (Abbildung 31, schwarze Balken). Dies unterstützt weiterhin die Annahme, dass das Block-Copolymer nach 8 h Inkubationszeit noch an der Oberfläche der Kolloide adsorbiert ist. Nach 24 h erhöhte sich die Anzahl an Texas Red-Signalen mit einer kleinen Fläche im Vergleich zu nach 8 h drastisch (Abbildung 31, rote Balken). Interessanterweise blieb die Anzahl und Flächengröße der BODIPY-Signale konstant.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme, dass es zu einem langsamen intrazellulären Ablösen des Block-Copolymers kam. Inwieweit dieses Ablösen die Folge einer Abdiffusion der Block-Copolymere im engen Kontakt mit Membranstrukturen der Zelle ist oder, ob sie als Folge einer enzymatischen Veränderung des Block-Copolymers auftritt (partielle Esterhydrolyse), ist noch offen.

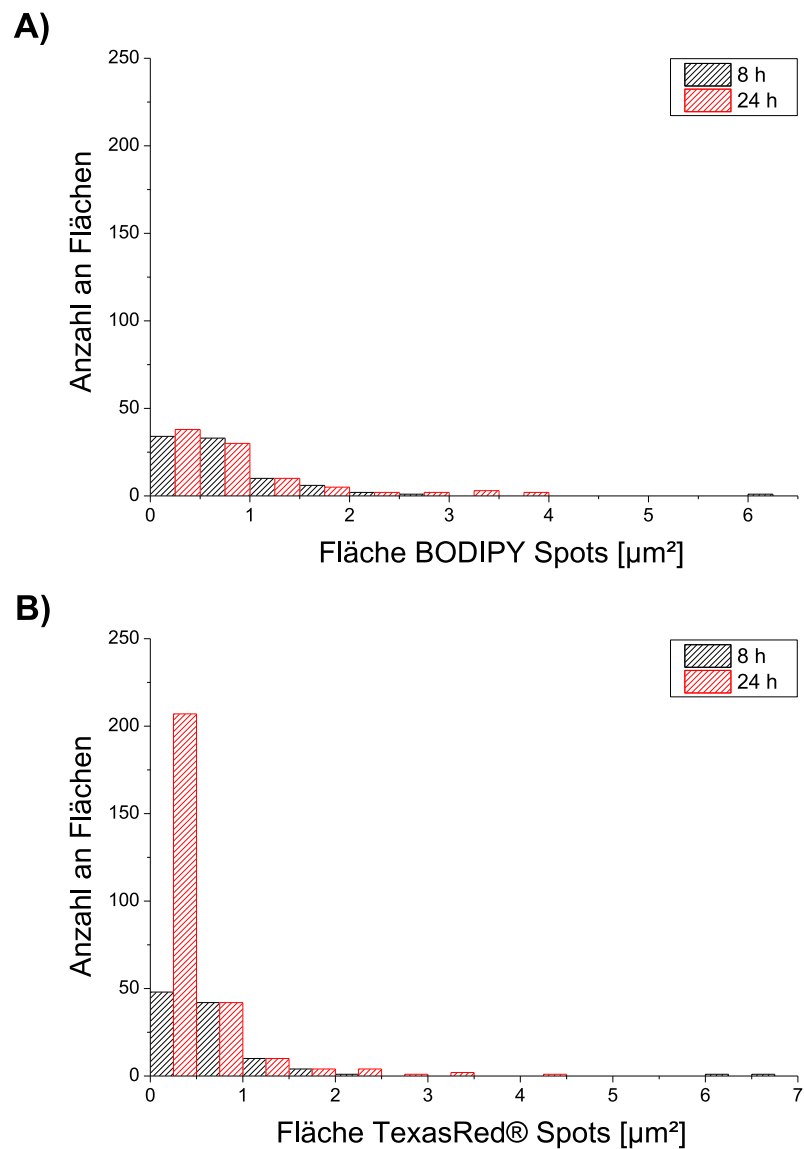


Abbildung 31. Flächenverteilung der Fluoreszenzsignale aus Abbildung 29. A) zeigt die BODIPY-Signale nach 8 h und 24 h Inkubationszeit mit **D 15**, B) das gleiche für die Texas Red-Signale.

Die kolloidalen Systeme bringen darüber hinaus nicht nur die Möglichkeit mit sich Wirkstoffe, die auf der Oberfläche gebunden sind, am Zielort freizusetzen, vielmehr ist die Beladung innerhalb des hydrophoben Kerns mittels hydrophober Moleküle möglich. Um diese zweite Eigenschaft auszunutzen, sollte im folgenden Kapitel ein hydrophobes Wirkstoffmodell in den kolloidalen Systemen verkapselt und die Freisetzung mittels geeigneter Kinetikstudien untersucht werden. Hierzu wurde *N*-

(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarbonacidimid (PMI, $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, Abbildung 32) in die Polymermatrix eingekapselt.

Tabelle 9. Darstellung von PDLLA-Partikeln mit eingekapseltem PMI, als hydrophobes Wirkstoffmodell *via* Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Name	Kern	Kargo	Copolymer	Chloroform: Wasser	R / nm^a
D 16	PDLLA	PMI	P 13	1:4,8	125

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Die Einlagerung des PMIs wurde während der Kolloidherstellung durch Lösen in der dispersen Phase bewerkstelligt. Dabei wurde analog zu 3.1.2.2 verfahren.

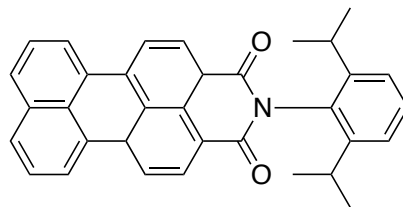


Abbildung 32. Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes *N*-(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarbonacidimid (PMI), als hydrophobes Wirkstoffmodell.

Die Hülle der mit PMI beladenen PDLLA-Nanopartikel (**D 16**) wurde wiederum mit Texas Red® Cadaverin ($\lambda_{\text{ex}} = 561$ nm) markiert, um den Partikel vom Kargo unterscheiden zu können. Im beladenen Zustand zeigten die kolloidalen Systeme Größen von 125 nm im Radius (DLS) und eine enge Größenverteilung. Mittels CLSM an lebenden Zellen sollte nun die Wirkstoff-Freisetzung und die Verteilung über einen gewissen Zeitraum untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit **D 15** über verschiedene Zeiträume (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 h) inkubiert und im direkten Anschluss mittels CLSM vermessen. Dabei wurde die Zellmembran mit CellMask™ Deep Red (CDR, $\lambda_{\text{ex}}=633$ nm) angefärbt. In Abbildung 33 sind die Bilder der unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Freisetzung des PMIs sehr schnell geschah, wohingegen die Aufnahme des Partikels zeitverzögert stattfand. Selbst nach einer Inkubationszeit von nur 15 min waren bereits Fluoreszenzsignale des PMIs sichtbar, was für eine sehr schnelle

Aufnahme des hydrophoben Wirkstoffmodells spricht. Die Signale der Texas Red-markierten Partikel waren dagegen erst nach 2 h Inkubation sichtbar. Sowohl die Intensität des Signals als auch die Menge der Texas Red Spots nahm über die Zeit stetig zu. Im Gegensatz dazu stieg die Intensität der PMI-Signale auch über die Zeit, wobei allerdings keine neuen Spots entstanden. Somit deuteten die CLSM-Aufnahmen darauf hin, dass die Freisetzung von PMI direkt nach dem Kontakt (evt. auch schon in näherer Umgebung) von Kolloid und Zellmembran vonstatten ging.

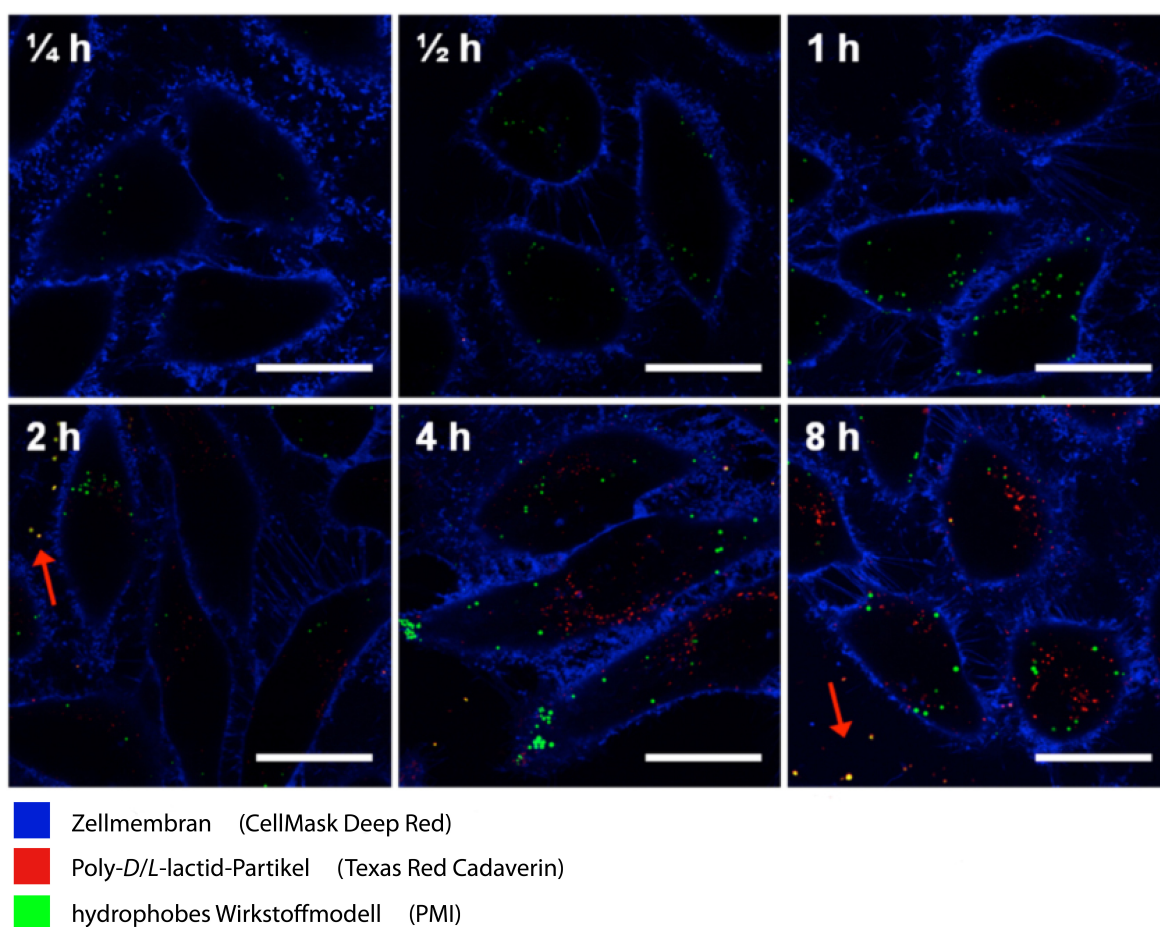


Abbildung 33. CLSM Aufnahmen von HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 0,25 h bis 8 h, die eine schnelle Freisetzung des hydrophoben Wirkstoffmodells aus **D 16** zeigen. Die roten Pfeile zeigen die Kolokalisation von PMI und Texas Red außerhalb der Zellen. Maßstab = 25 µm.

Die Kolloide müssen somit nicht zwangsläufig von der Zelle aufgenommen werden, um solch eine schnelle initiale Freisetzung zu erreichen. Es ist offensichtlich, dass keine intrazelluläre Kolokalisation von PMI- und Texas Red-Signalen detektiert werden konnte, obwohl extrazellulär im umgebenden Medium Kolokalisation

vorlag (roten Pfeile in Abbildung 33), was auf eine erfolgreiche Einkapselung des PMIs in den Kolloiden hindeutete. Diese Ergebnisse liefern einen ersten Hinweis auf einen möglichen zusätzlichen und unabhängigen Aufnahmemechanismus des eingeschlossenen Wirkstoffmodells vom Kolloid selbst.

Um die im CLSM erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden in Kooperation mit Dr. [REDACTED] zusätzlich FACS- (engl. fluorescence-activated cell sorting) Messungen zur Zellaufnahme durchgeführt. HeLa-Zellen wurden für 1 h und 8 h mit **D 16** inkubiert, um die Aufnahme der jeweiligen Komponenten (Kolloid und PMI) zu quantifizieren. Der Graph in Abbildung 34 zeigt, dass nach 1 h Inkubation eine große Menge an PMI innerhalb der Zellen bereits detektiert werden konnte, verglichen mit einem eher schwachen Signal des Texas Red® Cadaverins.

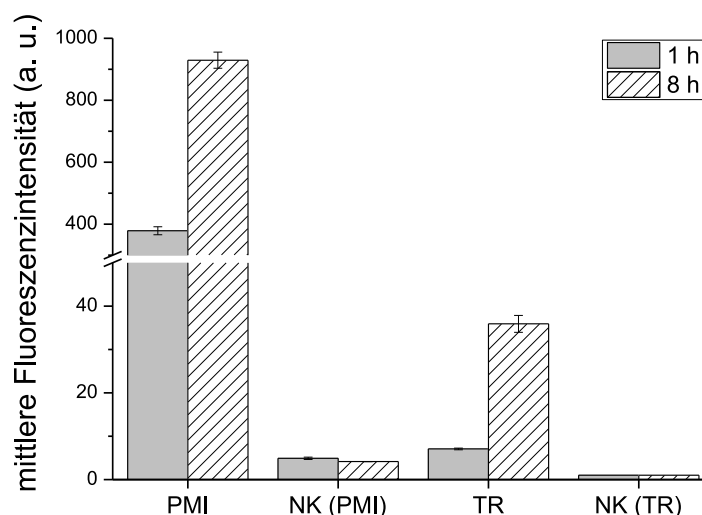


Abbildung 34. Quantifizierung der Nanopartikelaufnahme in HeLa-Zellen nach 1 h und 8 h Inkubationszeit von **D 16** mittels Durchflusszytometrie. NK: Negativkontrolle (Zellen ohne Partikelzugabe gemessen mit dem entsprechenden Detektor für PMI oder Texas Red® Cadaverin, n=6 pro Gruppe).

Eine Beeinflussung durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität der beiden Fluorophore konnte darüber hinaus ausgeschlossen werden, da normalisierte Werte zur Berechnung verwendet wurden. Im CLSM waren keine Partikel sichtbar, die an der Zellmembran hafteten, weshalb angenommen werden konnte, dass jedes detektierte Signal PMI oder Kolloid innerhalb der Zelle darstellte. Der große

Unterschied in der Fluoreszenzintensität von PMI und Texas Red® Cadaverin-markierten Partikeln nach 1 h Inkubation bestätigt deutlich die schnelle initiale Freisetzung des PMIs ohne vorherige Aufnahme der Kolloide. Die Ergebnisse der FACS- und CLSM-Messungen stimmten somit überein und festigten die Hypothese der schnellen Freisetzung eines eingeschlossenen Wirkstoffes. Nach 8 h Inkubation von **D 16** konnte eine deutliche Erhöhung der beiden Fluoreszenzsignale PMI und Texas Red® Cadaverin detektiert werden, welche den optischen Eindruck der CLSM-Aufnahmen untermauerten (Abbildung 33). Die Aufnahme der Kolloide geschah somit zeitverzögert im Vergleich zur Aufnahme und Freisetzung des PMIs. Wie bereits erwähnt, konnten die Signale von PMI und Texas Red® Cadaverin nach Inkubation der kolloidalen Systeme an verschiedenen intrazellulären Kompartimenten vorgefunden werden. Folglich wurden im nächsten Schritt Experimente durchgeführt, die aufklären sollten, wo sich das PMI nach Zellaufnahme befindet. Hofmann *et al.*¹⁹⁰ zeigten bereits ein ähnliches Verhalten von hydrophoben Molekülen, welche ohne vorherige Aufnahme des Nanopartikels in die Zelle freigesetzt wurden. Dabei wurde gezeigt, dass diese Moleküle sich in sogenannten "Lipid Droplets" (Fetttröpfchen) anreichern, welche als intrazelluläre Fettdepots fungieren. Um Aussagen über einen solchen Verbleib des PMIs treffen zu können, wurden HeLa-Zellen mit den Nanopartikeln **D 17** (PDLLA) und **D 18** (PS) inkubiert, die nur mittels nicht kovalent gebundenem PMI fluoreszenzmarkiert waren.

Tabelle 10. Darstellung von PDLLA- (**D 17**) und PS-Kolloiden (**D 18**), die nur mittels PMI fluoreszenzmarkiert sind.

Name	Kern	Kargo	Copolymer	Chloroform: Wasser	R / nm^a
D 17	PDLLA	PMI	P 1	1:4,8	150
D 18	PS	PMI	P 1	1:4,8	55

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Die Überlagerung von Transmissions- und Fluoreszenzaufnahmen der Zellen nach Inkubation bestätigte den ersten Eindruck, dass sich PMI in diesen fettreichen Regionen, welche auf Grund von unterschiedlichen Brechungsindices, im Vergleich zum umgebenden Medium, als helle oder dunkle runde Spots im Transmissionsbild erscheinen, anreicherte (Abbildung 35 A und D, rote Kreise). Die Fluoreszenzsignale von PMI (Abbildung 35 B, E) und die lipidreichen Regionen zeigen Kolokalisation, was in den Überlagerungsbildern sehr gut zu erkennen ist (Abbildung 35 C und F).

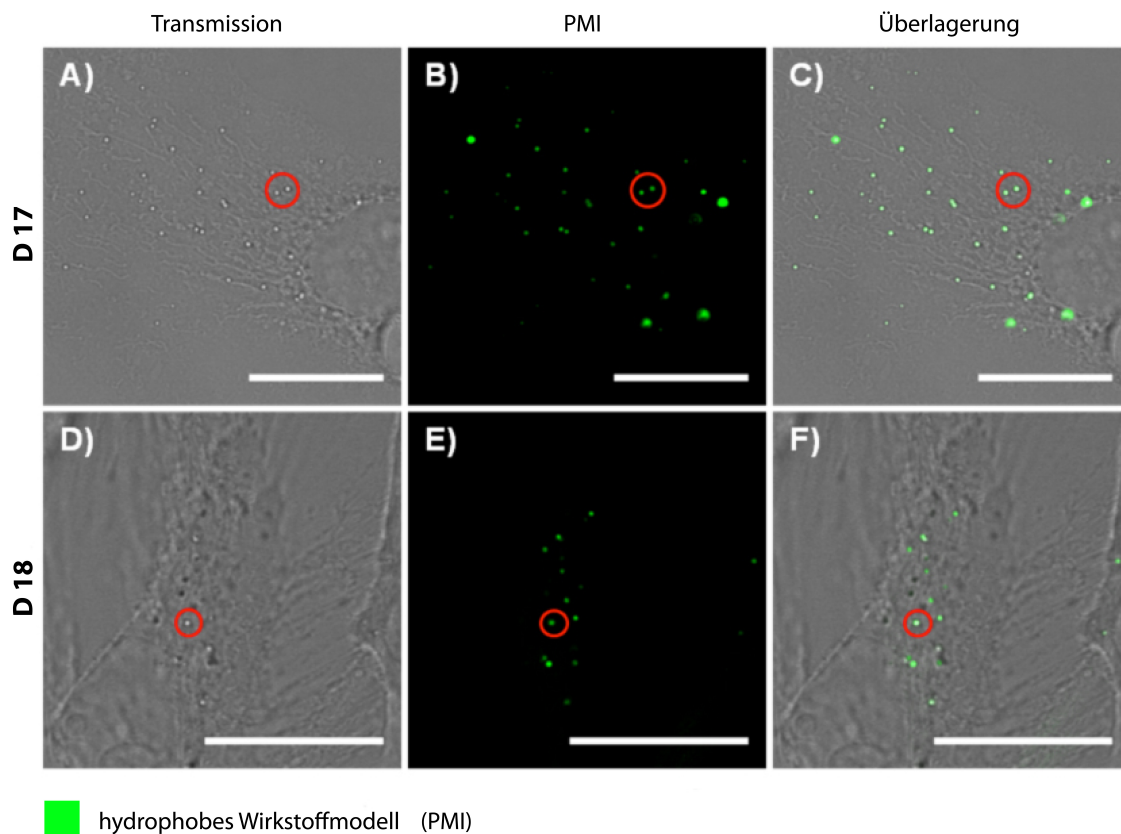


Abbildung 35. CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation von **D 17** und **D 18**, die PMI eingekapselt haben. Helle und dunkle Spots der Transmissionsbilder (A und D) zeigen fettreiche Regionen (Beispiele sind rot umkreist). Diese Regionen kolokalisieren mit PMI-Signalen (B und E) in den Überlagerungsbildern (C und F). Maßstab = 25 µm.

Es stellte sich die Frage, ob sich die polymeren Trägersysteme nicht möglicherweise auch in diesen fettreichen Domänen ansammeln. Dazu wurden PS-Partikel hergestellt, die kein PMI im Inneren trugen und deren Hülle jedoch mit Oregon Green 488[®] Cadaverin markiert war (D 9). Die gleiche Studie, wie vorher

beschrieben, wurde wiederholt. Es ist zu erkennen, dass selbst nach 24 h Inkubationszeit keine Fluoreszenzsignale in den fettreichen Domänen detektiert werden konnten (Abbildung 36). Es war keine Kolo-kalisation zwischen hellen und dunklen Spots im Transmissionsbild (Abbildung 36 A) und Fluoreszenzsignalen des Oregon Green 488® Cadaverins (Abbildung 36 B) im Überlagerungsbild (Abbildung 37 C) zu sehen. Somit waren diese Ergebnisse der kolloidalen Systeme, mit eingekapseltem oder an der Oberfläche ange-bundenem Fluoreszenzfarbstoff, in Einklang mit vorhergehenden Experimenten.

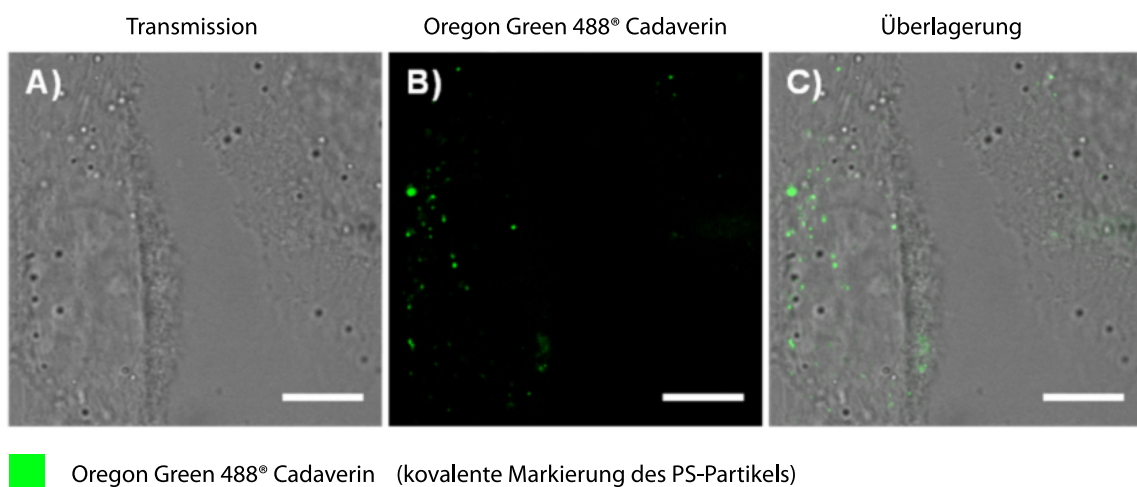


Abbildung 36. CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation von **D 13**, die anstelle von PMI mit Oregon Green 488® Cadaverin an der Oberfläche kovalent markiert waren. Anreicherung der Kolloide in den fettreichen Domänen lag nicht vor. Maßstab = 10 μm .

Das Ergebnis, dass PMI und Kolloid nach Aufnahme nicht in denselben intrazellulären Regionen vorliegen, untermauert die Tatsache, dass es zu einer Freisetzung des PMIs kam. Um diese fettreichen Domänen, in denen sich PMI anreichert, als "Lipid Droplets" identifizieren zu können, wurde in Analogie zu Hofmann *et al.*¹⁹⁰ eine zusätzliche Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit **D 14** für 24 h inkubiert. Die Experimente wurden mit Fluoreszenz- und Hellfeld-CLSM-Bildgebung durchgeführt. Die rote Korona der fettreichen Regionen im Überlagerungsbild von Transmissions- und Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers, welcher mit Alexa Fluor® 633 ($\lambda_{\text{ex}}=633 \text{ nm}$) markiert war, (Abbildung 37 A) signalisierte, dass es sich bei diesen

Regionen tatsächlich um Lipid Droplets handelte. Abbildung 37 B zeigt, dass sich PMI (grün) in den Lipid Droplets (Alexa Fluor® 633-markierter sekundärer Antikörper, rot) anreichert. Weitere Untersuchungen bei tiefen Temperaturen (4 °C) zeigten, dass die PMI-Aufnahme weitestgehend diffusionsabhängig ist und keine Endozytoseprozesse involviert sind (Daten hier nicht gezeigt), was ebenfalls die Aussage untermauert, dass die PMI-Aufnahme unabhängig von der Partikel-Aufnahme stattfand.

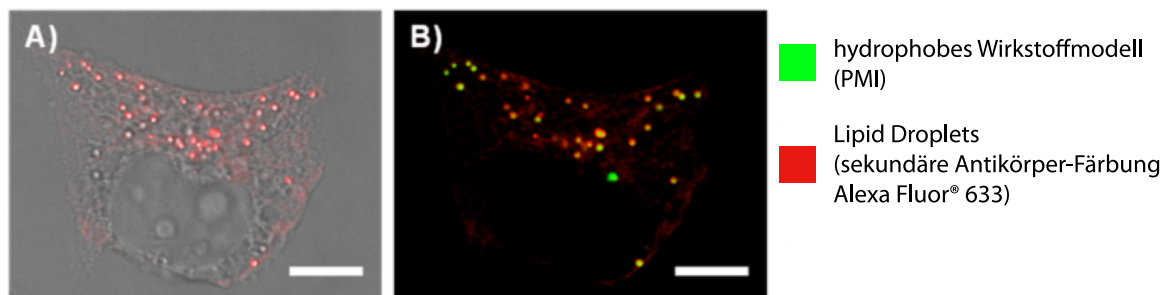


Abbildung 37. CLSM-Aufnahmen nach 24 h Inkubation mit **D 14** und Immunofluoreszenzfärbung zur Detektion der Lipid Droplets, welche mit Alexa Fluor® 633 markiert sind und somit eine rote Korona aufweisen. PMI reichert sich im Kern dieser an. Maßstab = 10 µm.

Daher ist es gelungen die Aufnahme und Lokalisation der Kolloide in Zellen aufzuklären sowie die Freisetzungskinetik eines hydrophoben Wirkstoffmodells zu bestimmen (Abbildung 38). Da eine schnelle initiale Freisetzung des Wirkstoffes vorliegt, kann diese verwendet werden, um schon nach kurzer Zeit einen pharmakologischen Effekt zu erzielen. Zusätzlich könnte in einem nachgeschalteten zeitverzögerten Schritt ein zweiter Wirkstoff kontrolliert und zielgerichtet freigesetzt werden. Somit könnte dieses Wirkstoff-Trägersystem zum Beispiel für die Tumorthherapie verwendet werden. Dabei ist es möglich, das System beispielweise mit Nitroglycerin zu beladen, was zur Verstärkung des EPR-Effekts führen und so eine verbesserte Anreicherung des Trägers im Tumor gewährleisten würde. Nitroglycerin ist dafür bekannt, nicht zelltoxisch zu sein und kaum eine unspezifische Wirkung zu haben. Maeda und Mitarbeiter konnten bereits zeigen, dass es nach Freisetzung in der Tumorumgebung die Erweiterung der Adern bewirkt, diese also sozusagen "löchrig" macht und damit die gezielte Ansammlung der Kolloide im Tumor nochmals verbessert.^{119,122,125} Am Zielort angekommen,

könnten die kolloidalen Wirkstoff-Trägersysteme dann selektiv ihren zweiten Wirkstoff, der kovalent auf der Oberfläche angebunden ist, freisetzen.

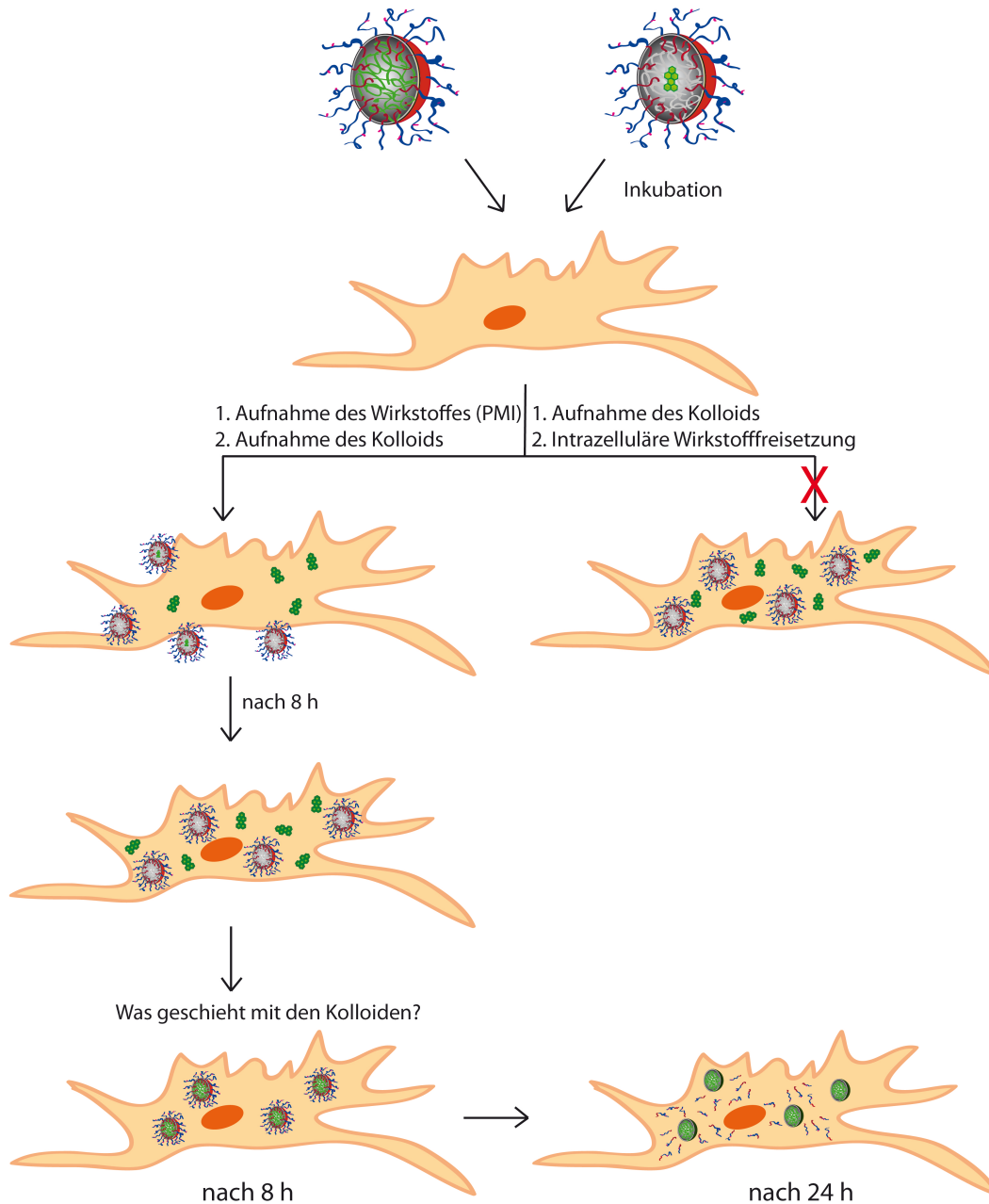


Abbildung 38. Schematische Übersicht der potentiellen Freisetzungsmechanismen des hydrophoben Wirkstoffes aus den kolloidalen Systemen und das intrazelluläre Verhalten der Trägersysteme nach Aufnahme in die Zelle.

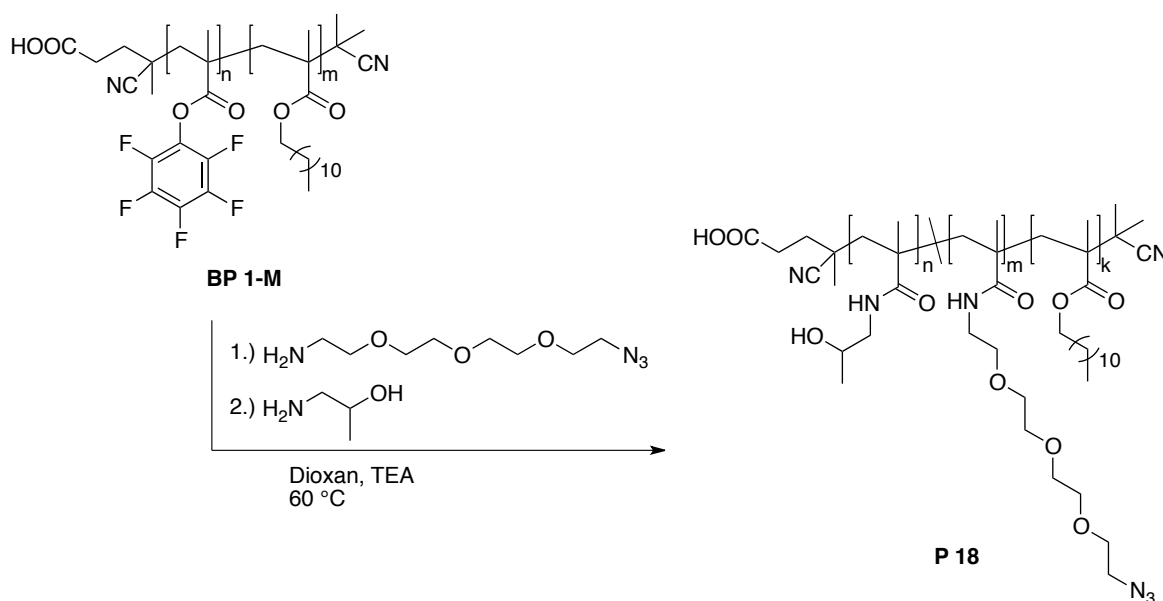
Diese vielversprechenden *in vitro*-Daten heißt es nun hinsichtlich ihres pharmakokinetischen Profils zu untersuchen, um den Einfluss der verschiedenen Kern- und Hüllmaterialien auf die Verteilung im Körper zu bestimmen. Darüber hinaus können so erste Aussagen über etwaige Exkretionswege getroffen werden.

3.3 *In vivo*-Evaluierung von P(HPMA-*b*-LMA)-stabilisierten Kolloiden

Eine Möglichkeit die Bioverteilung von makromolekularen Trägersystemen zu bestimmen, bietet die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Dabei wird ein Positron-Emitter an das jeweilige System angebunden, welcher nach intravenöser Applikation *in vivo* verfolgt werden kann. In dieser Arbeit wurde ^{18}F , als das meist verwendete diagnostische PET-Nuklid, verwendet.^{55,179,191,192}

Um eine Markierung zu ermöglichen, mussten die kolloidalen Systeme dahingehend modifiziert werden, dass eine selektive Anbindung des radioaktiven Markers möglich wurde. Die Methode der Wahl stellte die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition von Azid und Alkin (engl. copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions, CuAAC) dar, welche häufig für die radioaktive Markierung von nanopartikulären Systemen verwendet wird.¹¹⁵ Dazu mussten die Kolloide zunächst mit einem Azidoligoethylenspacer auf der Oberfläche modifiziert werden.

Dieser ließ sich durch die polymeranaloge Umsetzung von **BP 1-M** einfach in das hydrophile Segment einbauen, sodass **P 18** erhalten wurde (Schema 19, Tabelle 11).



Schema 19. Synthese des HPMA-LMA-Block-Copolymers **P 18**, welches mit einem Azidspacer im hydrophilen Segment funktionalisiert ist. Dabei wird **BP 1-M** mittels polymeranaloger Umsetzung modifiziert.

Der Einbau eines PEG-Segments sollte darüber hinaus keinen wesentlichen Einfluss auf die Tenseigenschaften haben.

Tabelle 11. HPMA-basiertes Block-Copolymer **P 18** mit Azid-Funktionalisierung durch einen Azidoligoethylenspacer.

Name	Block-Copolymer	Einbau Azidspacer	Monomer Verhältnis ^a	M_n (g/mol) ^b	\bar{D}
P 18	P(HPMA/Azid-OEG)- <i>b</i> -P(LMA)	4% [#]	8g:11	9.500	1,21

^aMonomerverhältnis berechnet mittels ¹H-NMR-Spektroskopie in DMSO-d₆ nach polymeranaloger Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin. ^bBerechnet aus den Molekulargewichten des Reaktivesterpolymers (**BP 1**) bestimmt mittels GPC in THF als Lösungsmittel. [#]entspricht Anteil im hydrophilen Segment.

Im Anschluss wurde das funktionalisierte Block-Copolymer **P 18** statt der bisher verwendeten Block-Copolymere eingesetzt, um mittels Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung (siehe Abschnitt 3.1.2.2) PDLLA-Partikel herzustellen, die auf der Oberfläche mit Azidgruppen dekoriert waren (Abbildung 39).

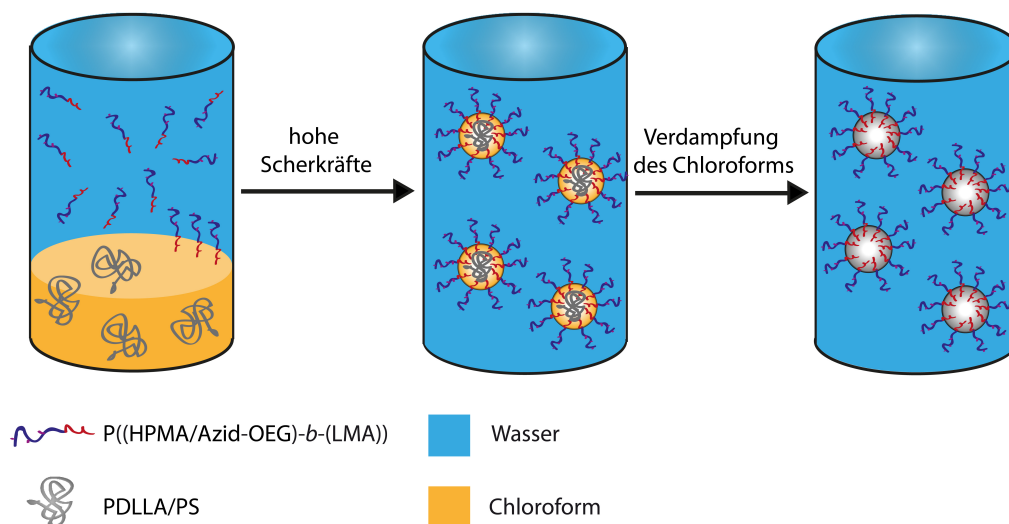


Abbildung 39. Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Azid-funktionalisierten PDLLA-Kolloiden **D 20** mittels Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Stabile Kolloide mit einer Größe von ca. 200 nm (Durchmesser) konnten erhalten werden, welche mittels REM-Aufnahmen (Abbildung 40) dargestellt werden konnten (Tabelle 12).

Tabelle 12. Darstellung von Azid-funktionalisierten PS (**D 19**) und PDLLA-Partikeln (**D 20**) *via* Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Name	Kern	Copolymer	Chloroform: Wasser	R / nm^a
D 19	PS	P 18	1:4,8	90
D 20	PDLLA	P 18	1:4,8	85

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Alle Partikel zeigen eine sphärische Form und eine enge Verteilung. Die leichte Verformung der Partikel während der REM-Aufnahme kommt durch das Schmelzen des PDLLAs unter dem Elektronenstrahl zustande.

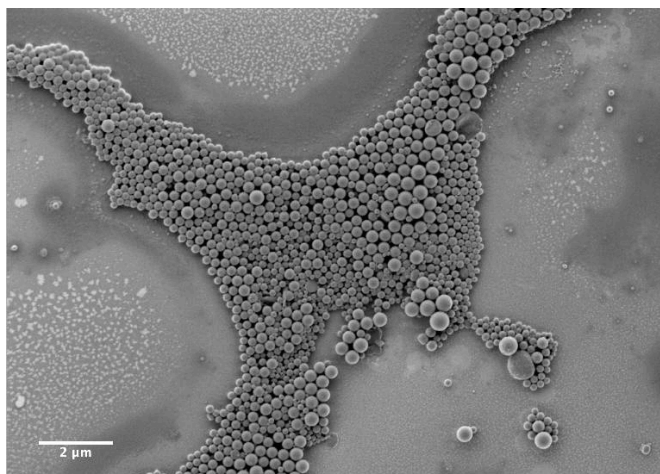


Abbildung 40. REM-Aufnahme der Azid-funktionalisierten PDLLA-Kolloide **D 20**; Maßstab 2 µm.

Der Einbau des Azidspacers im hydrophilen Segment diente dazu, dass die Azidgruppen nach außen orientiert waren, was für die radioaktive Markierung unabdingbar ist. So können die ebenfalls Oligoethylen-basierten prosthetischen Gruppen, die das Alkin tragen, den Azid-Partner gut erreichen.

Die hergestellten Kolloide mit einem PDLLA-Kern und einer P(HPMA/Azid-OEG)-*b*-(LMA)-Hülle konnten in Kooperation mit Dr. [REDACTED] mittels CuAAC, welche eine selektive Methode darstellt und hohe Ausbeuten liefert, mit ¹⁸F markiert werden. Die radioaktive Markierung wurde in einer zweistufigen Synthese durchgeführt. Für die geplante Markierung über eine prosthetische Gruppe, musste

ein geeigneter Markierungsvorläufer dargestellt werden. Dieser war Oligoethylenbasiert, um die Hydrophilie beizubehalten, und trug ein endständiges Alkin sowie Toluolsulfonsäure als Abgangsgruppe am gegenüber liegenden Ende.¹⁹³ Die ^{18}F -markierte prosthetische Gruppe (Abbildung 41) wurde mit einer hohen radiochemischen Ausbeute und Reinheit synthetisiert.

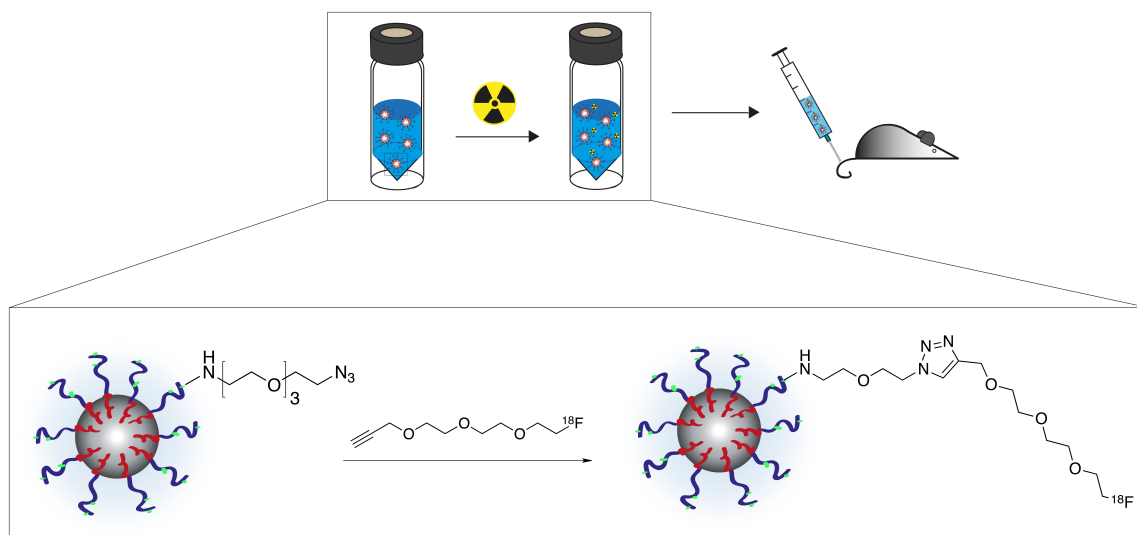


Abbildung 41. ^{18}F -Markierung der kolloidalen Systeme **D 19** und **D 20** via CuAAC und anschließender Evaluierung *in vivo*.

Im nachfolgenden Schritt wurden die PDLLA-Kolloide mittels dieser prosthetischen Gruppe ^{18}F -markiert. Da zum einen die PDLLA-Kolloide, aber auch das geladene hydrophobe Wirkstoffmodell, gegenüber Hitze und organischen Lösungsmitteln sensitiv waren, wurde sich für eine Markierung über die CuAAC entschieden, welche milde Reaktionsbedingungen zulässt und einen etablierten Ansatz für die Markierung sensitiver Strukturen darstellt.^{194,195} Darüber hinaus ist bekannt, dass das gebildete 1,4-Disubstituierte-1,2,3-Triazol unter physiologischen Bedingungen sehr stabil ist und ähnliche Eigenschaften wie Amidbindungen aufweist.¹⁶⁷ Im Folgenden wurden die Parameter der ^{18}F -Clickreaktion bezüglich Reaktionstemperatur, Wahl des Lösungsmittelgemisches, Menge der Kolloidlösung, Menge des Katalysators und Verhältnis der Kupfer- und Acetatmenge gescreent und hin zu hohen radiochemischen Umsetzungen optimiert (Tabelle 13). Die Testansätze wurden mit Aktivitätsmengen von 50-200 MBq durchgeführt. Die Natur

der PDLLA-Dispersion **D 20** ließ nur wässrige Lösungsmittel zu, wobei sich das PBS-System am geeignetsten erwies, da der leicht basische Charakter zusätzlich die CuAAC unterstützt.⁵⁹ Die Verwendung von geringsten Mengen an organischen Lösungsmitteln führte zur sofortigen Auflösung der Emulsion.

Tabelle 13. Screening und Optimierung der ¹⁸F-Clickreaktion an **D 20**.

Miniemulsion ^a [μL]	CuSO ₄ [μmol]	Na-L- Ascorbat [μmol]	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Ausbeute ^b [%]
50	20	100	15	RT	0
50	20	100	20	RT	3
70	20	50	20	RT	10
70	20	50	5	40	6
70	20	50	10	40	17
70	20	50	20	40	32
70	20	100	20	40	7
70	40	250	20	40	0
100	20	50	20	40	0
100	20	100	20	40	4
150	20	50	20	40	0
500	20	50	20	40	0
700	20	50	20	40	0

^aDer Feststoffgehalt der Miniemulsion **D 20** lag bei 0,42 w%. ^bDie Ausbeute wurde mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt.

Die besten Ergebnisse wurden bei einem Verhältnis von Kupfer(II)-sulfat und Natrium-*L*-ascorbat von 1:2,5 und einer leicht erhöhten Temperatur von 40 °C erreicht. Höhere Temperaturen führten wiederum zur direkten Zersetzung der PDLLA-Kolloide (**D 20**). Die Verwendung von größeren Mengen an Kupfer(II)-sulfat führte zu keiner signifikanten Veränderung der Umsetzung. Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Umsetzung von der Menge an Natrium-*L*-ascorbat untersucht. Dabei kam es zu einer Zersetzung der Kolloide bei Verwendung von zu hohen

Konzentrationen an Natrium-*L*-ascorbat, was auf ein zu hohes Redoxpotential im Reaktionsgemisch zurückgeführt werden kann.¹⁹⁶ Ebenfalls wurde eine starke Abhängigkeit von der Reaktionszeit beobachtet. Nach 10 min war die Umsetzung noch sehr gering, wohingegen ab einer Reaktionszeit von über 10 min die Umsetzung von 6% auf 23% stieg. Die Aufreinigung der ¹⁸F-markierten Kolloide konnte mittels Größenausschlusschromatographie erreicht werden (Abbildung 42) und ergab bei direkter Formulierung in isotonischer Kochsalzlösung eine radiochemische Gesamtausbeute von 8±3%. Dieses Konzept konnte auf die Kolloide mit PS-Kern (**D 19**) direkt und vollständig übertragen werden. Die radiochemischen Gesamtausbeuten lagen auch hier im Bereich der Ausbeuten der PDLLA-Kolloide (**D 20**).

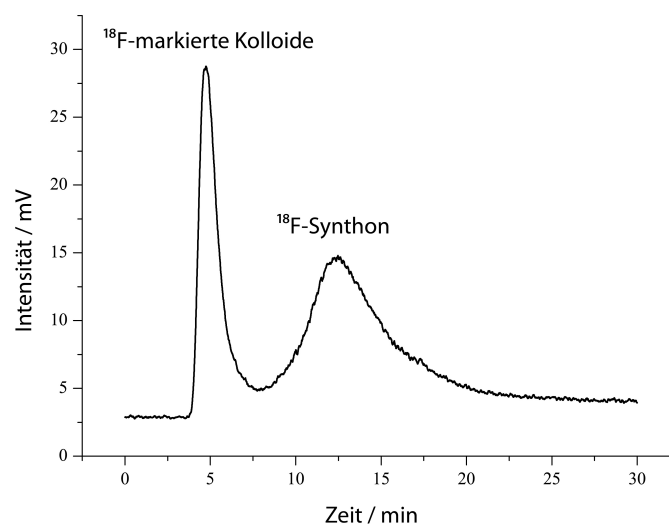


Abbildung 42. Aufreinigung der ¹⁸F-markierten PDLLA-Kolloide **D 20** mittels Größenausschlusschromatographie.

Nach erfolgreicher ¹⁸F-Markierung der kolloidalen Systeme **D 19** und **D 20** sowie deren Formulierung konnte die Körperverteilung im Mausmodell mittels PET und *ex vivo*-Biodistribution untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse (C57BL/6) verwendet.

Zuerst wurden die ¹⁸F-markierten PS-Kolloide **D 19** verwendet, um als biokompatibles, aber nicht bioabbaubares Modellsystem zu fungieren. Hierzu wurden 2-5 MBq in 500-900 μ L isotonischer Kochsalzlösung intravenös in die

Schwanzvene der Maus appliziert und über einen Zeitraum von 60 min im PET gemessen (Abbildung 43). Das relativ kurze Zeitfenster wurde gewählt, um erste Aussagen über die Körperverteilung, sowie Exkretionswege zu treffen, da nicht-zirkulierende Wirkstoff-Trägersysteme auch nicht den gewünschten EPR-Effekt ausnutzen können. Abbildung 43 zeigt eine dynamische PET-Aufnahme der ^{18}F -markierten PS-Kolloide in koronarer (A) und sagittaler (B) Schnittebene. Man erkennt eindeutig eine starke Anreicherung in Blase (Bl) und Niere (Ni), was für eine renale Ausscheidung der Systeme spricht. Darüber hinaus sieht man eine Aktivitätsansammlung in der Leber (Le), was dafür spricht, dass die Systeme einer hepatobiliären Ausscheidung unterliegen. Überraschend hingegen ist die erwähnte starke Anreicherung in Niere und Blase, da die verwendeten Systeme Durchmesser von 150 bis 200 nm haben und somit deutlich über der renalen Ausscheidungsgrenze liegen. Ein solches Anreicherungsmuster kann für das Vorhandensein von markiertem freiem Block-Copolymer **P 18** (10 kDa) sprechen, da dieses deutlich unter der Ausscheidungsgrenze liegt.

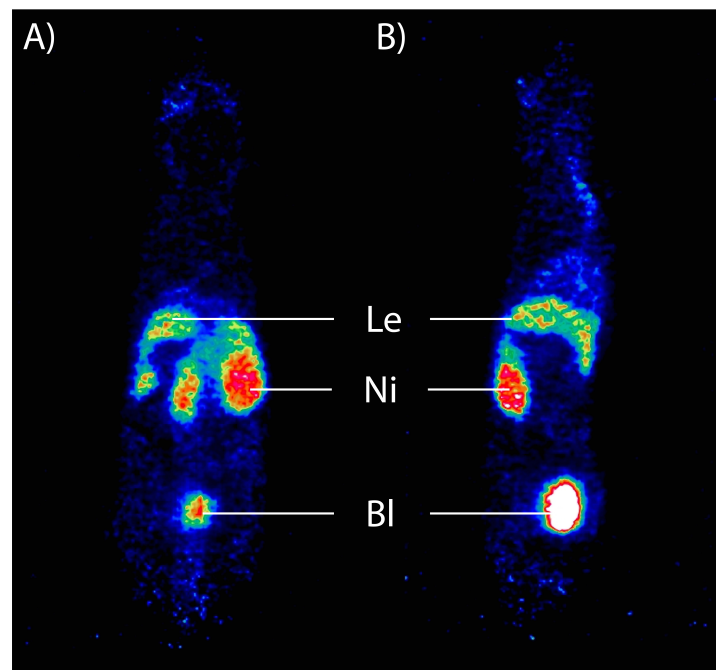


Abbildung 43. Kleintier-PET-Aufnahme mit 2-5 MBq der ^{18}F -markierten PS-Kolloide **D 19**; Messintervall von 60 min; koronare (A) und sagittale (B) Schnittebene; Le: Leber, Ni: Niere, Bl: Blase.

Dieses Modellsystem sollte mit dem PDLLA-System, welches bioabbaubar ist, verglichen werden. Hierzu wurden wiederum 2-5 MBq in 500-900 μ L isotonischer Kochsalzlösung intravenös in die Schwanzvene der Maus appliziert und über einen Zeitraum von 60 min im PET gemessen. In Abbildung 44 ist die dynamische PET-Aufnahme der ^{18}F -markierten PDLLA-Kolloide **D 20** in koronarer (A und C) und sagittaler (B und D) Schnittebene gezeigt.

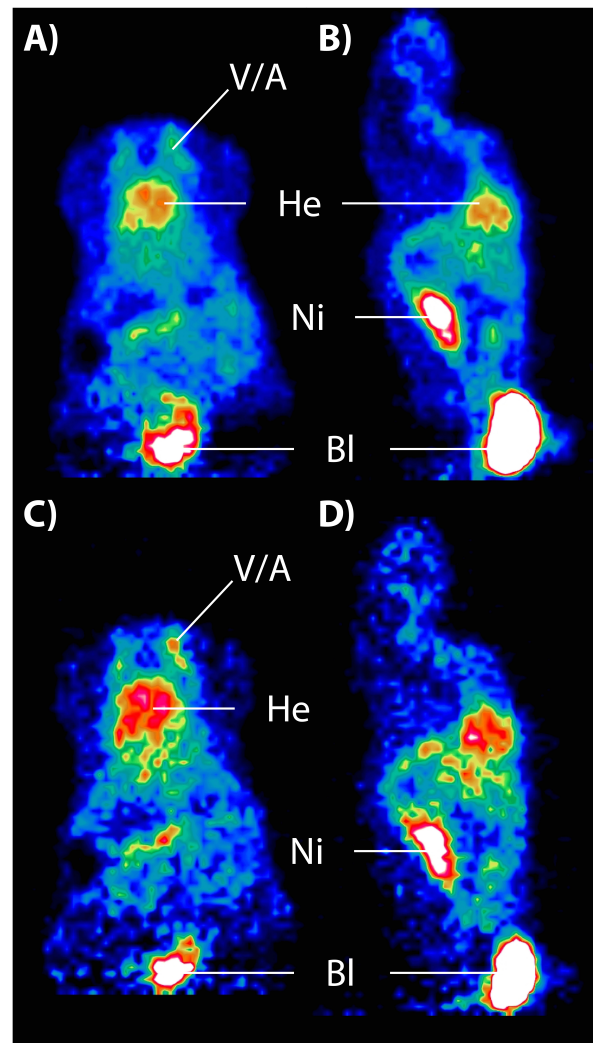


Abbildung 44. Kleintier-PET-Aufnahme mit 2-5 MBq der ^{18}F -markierten PDLLA-Kolloide **D 20**; Messintervall von 0 bis 60 min (A und B) und 0 bis 4 min (C und D); koronare (A und C) und sagittale (B und D) Schnittebene; V/A: Vene oder Arterie, He: Herz, Ni: Niere, Bl: Blase.

Die Aufnahmen 44 A und B stellen das Anreicherungsmuster nach 1 h p.i. dar. Im Gegensatz zu **D 19** erkennt man, dass diese nur renal ausgeschieden wurden, was

durch die starke Anreicherung in Niere (Ni) und Blase (Bl) zu sehen ist, dagegen ist keine Anreicherung in Leber und Milz zu erkennen. Jedoch ist auch eine erhöhte Blutaktivität zu erkennen, was durch das Aktivitätssignal im Herzen und den dazugehörigen Arterien und Venen angezeigt wird. Abbildungen 44 C und D zeigen die ersten 4 min p.i. und bekräftigen diese Ergebnisse nochmals.

Um die *in vivo* erhaltenen Ergebnisse quantifizieren und bestätigen zu können, wurde zusätzlich eine *ex vivo*-Biodistribution mit den beiden Systemen durchgeführt. Dazu wurden nach i.v. Applikation der ^{18}F -markierten Kolloide **D 19** und **D 20** die Mäuse nach 60 min getötet, die Organe entnommen und im Gammaskontrometer ausgezählt. Abbildung 45 stellt die Ergebnisse der Kolloide **D 19** (rot) und **D 20** (blau) dar. Die Organverteilung bestätigt hierbei die in den Kleintier-PET-Studien erhaltenen Ergebnisse. Auch hier zeigt sich, dass sowohl **D 19** als auch **D 20** prädominant renal ausgeschieden wurden.

***Ex vivo*-Biodistribution (1 h)**

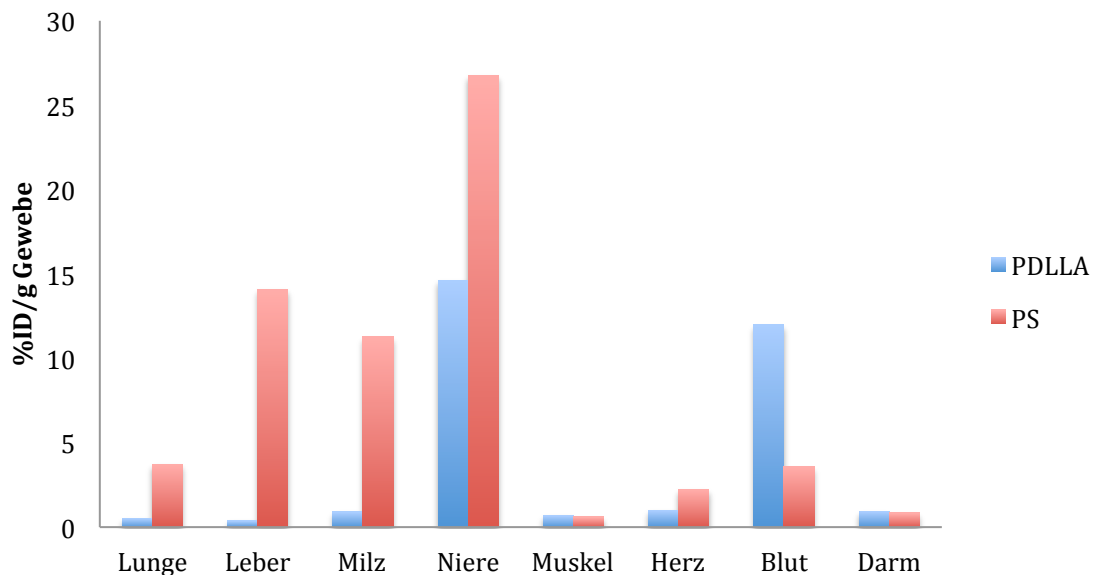


Abbildung 45. Biodistribution der ^{18}F -markierten PDLLA- **D 20** (blau) und PS-Partikel **D 19** (rot) 1 h nach Injektion.

Jedoch ist für die anderen Organe ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Kolloide untereinander zu sehen. Die PS-Kolloide **D 19** reichern sich bevorzugt in

Leber (14% ID/g) und Milz (11% ID/g) an, wohingegen die PDLLA-Partikel **D 20** durch ihre hohe Blutaktivität (12% ID/g) auffallen. Somit zeigt **D 20** erste vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Entwicklung eines langzirkulierenden Wirkstoff-Trägersystems.

Es bleibt jedoch die Frage bestehen, ob das Kernmaterial einen Einfluss auf die Bioverteilung hat und so zu diesem Anreicherungsmuster führte. Die hohe Anreicherung von **D 15** in Lunge, Leber und Milz legt die Vermutung nahe, dass es *in vivo* zur Aggregatbildung der Partikel durch Adsorption von Blutkomponenten, vor allem Albumin, kam.¹⁹⁷ Bei **D 20** scheint dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Verantwortlich dafür könnte das leicht hydrophilere Kernmaterial (PDLLA) sein. Zusätzlich weist die höhere Nierenaktivität von **D 19** im Vergleich zu **D 20** auch auf ein stärkeres Aggregationsverhalten hin, da durch die höhere Proteinadsorption das polymere Tensid **P 18** von der Oberfläche verdrängt werden könnte. Dieses sollte sich dann aufgrund des Molekulargewichts von 10 kDa in den Nieren und Blase anreichern.

Allgemein kann man sagen, dass es zu einem Ablösen der Block-Copolymere kommt, was bereits in den Zellaufnahmestudien (Kapitel 3.2) gezeigt werden konnte. Während dieses Verhalten *in vitro* nach 24 h auftritt, scheint es *in vivo* wesentlich schneller vonstatten zu gehen. Dem können mehrere Erklärungen zugrunde liegen. Zum einen kann dies auf den Blutfluss zurückgeführt werden, aber auch auf die Komplexität physiologischer Prozesse.

Das erhaltene *in vivo*-Ergebnis führte zur Entwicklung neuer Kolloide, deren biologische Halbwertszeit deutlich erhöht sein sollte, indem eine bessere Adsorption der Block-Copolymere auf der Oberfläche gewährleistet wird. Dazu wurden Kettenlänge und hydrophober Einbaugrad variiert (Tabelle 14). Die Kettenlänge wurde von 10 auf 20 kDa (**D 22**) und der Einbaugrad an LMA von 10 auf 20% erhöht (**D 21**) und erneut Kolloide dargestellt (Tabelle 15).

Tabelle 14. HPMA-basierte Block-Copolymere mit Texas Red-Markierung.

Name	Block-Copolymer	Vorläufer	Monomer Verhältnis ^a	M_n (g/mol) ^b	\bar{D}
P 19	P(HPMA/TR)- <i>b</i> -P(LMA)	BP 5-M	90:10 [#]	21.000	1,30
P 20	P(HPMA/TR)- <i>b</i> -P(LMA)	BP 2-M	79:21 [#]	11.000	1,25

^aMonomerverhältnis berechnet mittels ¹H-NMR-Spektroskopie in DMSO-d₆ nach polymeranaloger Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin. ^bBerechnet aus den Molekulargewichten der Reaktivesterpolymere (**BP 5** und **BP 2**) bestimmt mittels GPC in THF als Lösungsmittel; TR = Texas Red; [#]1 mol%.

Tabelle 15. Darstellung von PS-Partikeln **D 21** und **D 22** via Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung.

Name	Kern	Copolymer	Besonderheit	R / nm ^a
D 21	PS	P 20	10 kDa, 20% LMA	125
D 22	PS	P 19	20 kDa, 10% LMA	115

^abestimmt durch Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Untersuchungen zur Zellaufnahme und zum Verbleib der Block-Copolymere auf den Kolloiden wurden *in vitro* analog zu Abschnitt 3.2 an HeLa-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 gezeigt. Dabei zeigten die CLSM-Aufnahmen A-C die Ergebnisse von **D 21** und D-F von **D 22**. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Erhöhung des hydrophoben Einbaus nach 24 h zu keiner signifikanten Veränderung der Stabilität führte, da nur ein geringes Kolokalisationssignal (47 C, gelb) zu sehen war. Anders verhält sich **D 22** bei Verwendung des größeren Block-Copolymers **P 19**, welches deutlich mehr Kolokalisationssignale (47 E, gelb) zeigte. Dies deutet darauf hin, dass nach 24 h noch ein größerer Anteil an polymerem Tensid auf der Oberfläche adsorbiert war. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das größere Block-Copolymer eine bessere sterische Abschirmung der Kolloidoberfläche, z. B. gegen Enzyme, gewährleistet.

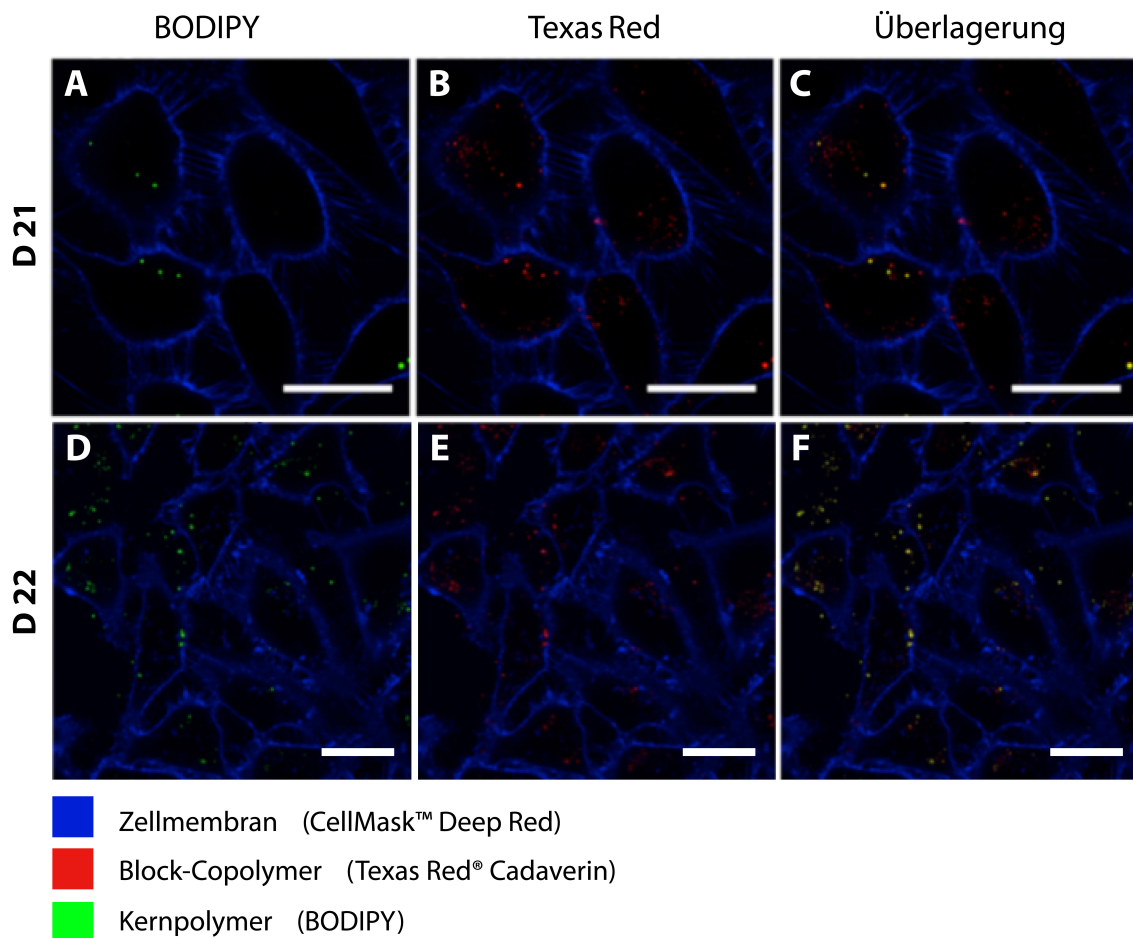


Abbildung 46. CLSM Aufnahmen der HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit **D 21** (A-C) und **D 22** (D-F). A) und D) zeigen Fluoreszenzsignale des BODIPYs, B) und E) Signale des Texas Reds. C) und F) sind Überlagerungsbilder beider Fluoreszenzsignale. Maßstab = 20 μm .

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mittels SDS-PAGE der Einfluss des Kernmaterials sowie die unterschiedliche Beschaffenheit der Oberfläche hinsichtlich Proteinadsorption nach Inkubation in humanem Serum untersucht. Abbildung 47 zeigt das Auftrennungsmuster der unterschiedlichen Kolloide **D 6**, **D 8**, **D 21** und **D 22** nach Inkubation mit humanem Serum bei 37 °C. Dabei wurden die Plasmaproteine im Überschuss eingesetzt sowie die Partikelkonzentrationen auf gleiche Oberfläche normiert, um so die adsorbierten Proteinmengen vergleichen zu können.¹⁰⁰ Nach mehreren Aufreinigungsschritten wurden die so vorbehandelten Kolloide auf das Gel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt (Abbildung 47). Als Marker wurde SeeBlue Plus2 Pre-Stained verwendet (Tasche 1). Des Weiteren sind die Taschen wie folgt belegt: **D 8** (Tasche 3), **D 6** (Tasche 5), **D 21**

(Tasche 7), **D 22** (Tasche 9). In Tasche 11 befinden sich als Vergleichssystem PS-Partikel, welche mit Lutensol AT50 stabilisiert sind. Das reine Plasma ist in Tasche 12 zu finden. Alle vier mit HPMA-basierten Block-Copolymeren als polymere Tenside zeigten eine leichte Adsorption mit dem Hauptbestandteil des Serums Albumin. Dies ist an der Bande bei 62 kDa zu erkennen. Zudem kommt es zu einer leichten Adsorption einer Proteinfraction mit etwa 40 kDa. Vergleicht man die Kolloide **D 6** und **D 8** mit den unterschiedlichen Kernmaterialien PS und PDLLA untereinander, ist ein leichter Trend zu weniger Aggregation bei PDLLA zu erkennen, was sich in einer schwächeren Bande bei ca. 40 kDa widerspiegelte. Interessanterweise zeigte ein erhöhter hydrophober Einbau (**D 21**) keinen Effekt auf die Proteinadsorption. Im Fall der Verwendung von **D 22**, welches durch ein größeres Block-Copolymer (**P 19**) stabilisiert ist, sah man dagegen den Wegfall der Bande bei 40 kDa. Diese Daten unterstreichen die vorhergehenden Ergebnisse zur Kollokalisierung nach 24 h, nämlich, dass durch größere Block-Copolymere stabilisierte Kolloide zu weniger Aggregation neigen. Dies kann auf eine bessere sterische Abschirmung durch die im Verhältnis längeren hydrophilen Segmente zurückgeführt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen zeigten die Kolloide hauptsächlich eine leichte Interaktion mit Albumin, welches eine Monolage bildet und nicht in der dynamischen Lichtstreuung detektiert werden konnte. Albumin ist dafür bekannt weitere Interaktion mit anderen Bestandteilen des Serums zu unterbinden.¹⁹⁸

Vergleicht man nun alle HPMA-stabilisierten Kolloide mit Kolloiden, die durch das gängige Tensid Lutensol AT50 stabilisiert sind, sieht man eindeutig die verringerte Wechselwirkung mit Komponenten des humanen Blutserums, was den "stealth-like"-Charakter von PHPMA unterstreicht.

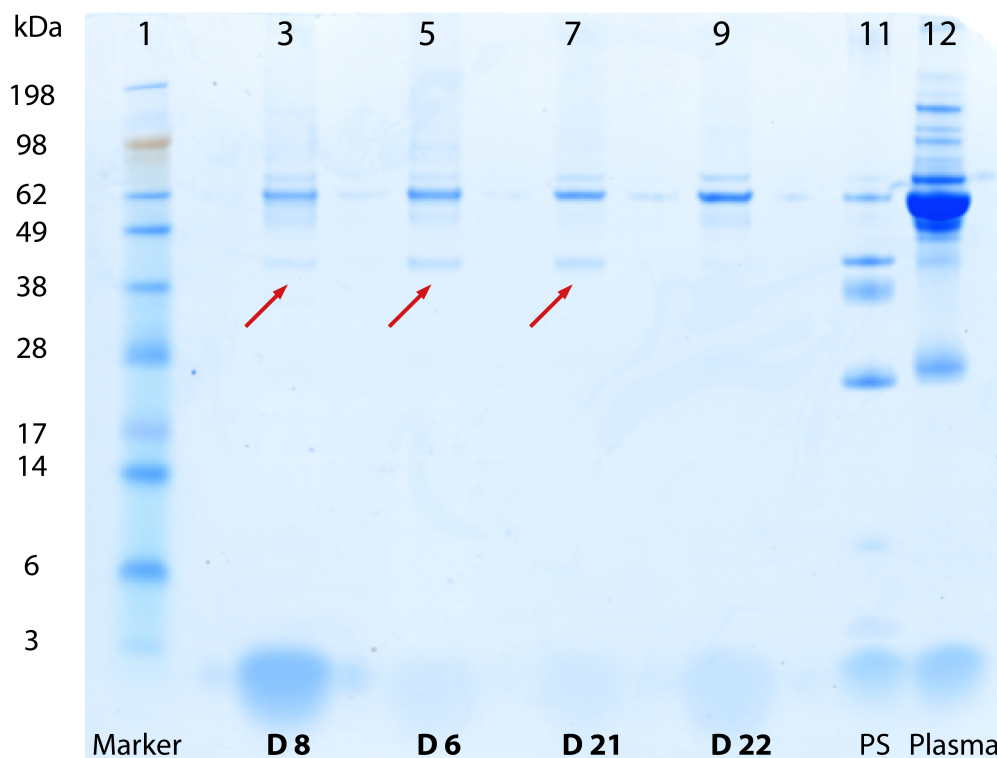


Abbildung 47. SDS-PAGE zur Bestimmung der Proteinwechselwirkung der Kolloide **D 6**, **D 8**, **D 21** und **D 22** sowie PS stabilisiert mit AT₅₀ (Tasche 11). Als Marker wurde SeeBlue Plus2 Pre-Stained verwendet und Plasma (4 µg) als Referenz mitlaufen gelassen; Inkubationszeit 1 h bei 37 °C.

Diese Ergebnisse bekräftigen die bereits erhaltenen vielversprechenden *in vivo*-Daten der HPMA-LMA-stabilisierten Kolloide. Darüber hinaus zeigten die PDLLA-Kolloide eine verminderte Proteinwechselwirkung im Blut und zusätzlich eine verlängerte Zirkulationszeit *in vivo*, weswegen sie weiterhin als erfolgsversprechende Wirkstoff-Trägersysteme angesehen werden können. Mit diesen könnte somit eine erhöhte Tumoranreicherung durch den EPR-Effekt erzielt werden. Im nächsten Schritt ging es darum zu untersuchen, ob mittels Erkennungsstrukturen, wie z. B. Folat, die Aufnahme in den Tumor gesteigert werden kann. Hierbei sollten zuerst einfache HPMA-Polymere, an welche Folat angebunden wurde, als initiales Modellsystem dienen.

3.4 ^{18}F -markierte Folat-HPMA-Konjugate und deren Einfluss auf die Tumoranreicherung

Ziel dieses Teilgebiets war es, Polymere darzustellen, welche es ermöglichen Erkennungsstrukturen anzubinden, z. B. Folat, um so mittels Positronen-Emissions-Tomographie die aktive Anreicherung *in vivo* zu untersuchen. Die Körperverteilung und Pharmakokinetik von polymeren Systemen kann durch Variation der Größe, Molekulargewicht und Zusammensetzung beeinflusst werden.^{55,179} Deshalb wurden HPMA-basierte Polymere mit unterschiedlichen Molekulargewichten (10 kDa **P 21** und 50 kDa **P 22**) hergestellt. An diesen sollte der Einfluss von Folatstrukturen untersucht werden. Um die Anbindung der Zielstrukturen zu ermöglichen, mussten diese Polymere zusätzlich Alkinfunktionalitäten tragen (Schema 20). Die Konjugation des Vektors wurde in diesem Fall wie zuvor auch mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) erreicht, da so eine hohe Regioselektivität und Spezifität gewährleistet werden konnte.

Die von Barz und Mitarbeitern *in vitro* gezeigte erhöhte Internalisierungsrate von Folat-pHPMA-Konjugaten bei einem Einbaugrad von 10% Folat war Ausgangspunkt dieser Untersuchungen. Daher wurden Konjugate hergestellt, deren Folatanteil in derselben Größenordnung lag.¹⁴³ Beide Polymertypen sollten zusätzlich mit Oregon Green 488 Cadaverin (OG) markiert werden (**P 23**, **P 24**), um FCS-Messungen zu ermöglichen. Diese erlauben die Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Polymere und die Detektion eventueller Aggregatbildung nach Einbau des hydrophoberen Folats.¹⁷² Die dazu nötigen Vorläuferpolymere (**HP 8**, **HP 9**) wurden mittels RAFT-Polymerisation hergestellt und anschließend in einer polymeranalogen Umsetzung mit 2-(2-(2-(Prop-2-in-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)-ethanamin, 2-Hydroxypropylamin und Tyramin zu den finalen Polymerkonjugaten umgesetzt. Sie wiesen eine enge Molekulargewichtsverteilung von PDI = 1,2 für die kleineren (10 kDa) und PDI = 1,3 für die größeren Polymere (50 kDa) auf (Tabelle 16). Der Einbau von Tyramin ermöglichte hierbei die radioaktive Markierung.

Verhältnis an Oligoethyleneinheiten der Vorläuferpolymere (**P 21-24**) und der Folat-Polymer-Konjugate (**FA-P 21-24**) konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie der Anteil an gebundenem Folat bestimmt werden, der für alle Polymere konstant bei ca. 8% lag (Tabelle 16). Der Einbau von 3% Tyramin ermöglichte, wie auch in den Vorarbeiten zu markierten HPMA-Polymeren, die Radiomarkierung mittels Fluor-18 und die damit verbundene Möglichkeit die Folat-Konjugate *in vivo* zu verfolgen.

Tabelle 16. Eigenschaften der Präkursorpolymere **HP 8-9**, der HPMA-Polymere **P 21-24** und der Folat-Konjugate **FA-P 21-24**, samt Markierungsausbeuten [^{18}F]FE-**FA-P 21-22**.

Name	M_n [g/mol]	\bar{D}	Tyramin Einbau ²	Alkin Einbau ²	Folat Einbau ²	RCA / %
HP 8	12.800 ¹	1,23 ¹	-	-	-	-
HP 9	64.000 ¹	1,43 ¹	-	-	-	-
P 21	8.000 ³	1,23 ³	3%	10%	-	-
P 22	40.000 ³	1,43 ³	3%	10%	-	-
FA-P 21	10.500 ³	1,23 ³	3%	10%	8%	-
FA-P 22	52.500 ³	1,43 ³	3%	10%	8%	-
[^{18}F]FE- FA-P 21	10.500	1,23 ³	3%	10%	8%	10±2
[^{18}F]FE- FA-P 22	52.500	1,43 ³	3%	10%	8%	5±3
P 23 (OG)⁴	8.000 ³	1,23 ³	-	10%	-	-
P 24 (OG)⁴	40.500 ³	1,43 ³	-	10%	-	-
FA-P 23⁴	10.800 ³	1,23 ³	-	10%	8%	-
FA-P 24⁴	53.500 ³	1,43 ³	-	10%	8%	-

¹Bestimmung mittels GPC in THF als LM; ²Tyramin-, Alkinspacer- und Folateinbau bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie nach polymeranaloger Umsetzung; ³Bestimmt aus dem Molekulargewicht der Präkursorpolymere **HP 8** und **HP 9** mittels GPC in THF als LM; ⁴Oregon Green Cadaverin wurde während der polymeranaloger Reaktion eingebaut **P 23** und **P 24** (1 mol%).

Obwohl Folate in leicht basischen wässrigen Medien löslich sind, ist bekannt, dass diese auch hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können.¹⁹⁹ Der Verlust der γ -

Carboxyl-Funktion des Folsäurederivats durch Derivatisierung führt zusätzlich zu einer Verstärkung des hydrophoben Charakters und zur Förderung von Aggregatbildung. Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit Dr. [REDACTED] eine mögliche Aggregatbildung der Konjugate mittels FCS untersucht und sollte Aufschluss darüber geben, ob sich in wässrigen isotonischen Lösungen solche ausbilden, indem die hydrodynamischen Radien von **FA-P 21-24** in An- und Abwesenheit von Folsäure bestimmt wurden.^{172,200}

Abbildung 48 A zeigt die gefittete Autokorrelationskurve (engl. autocorrelation curve, ACC) der kleinen Polymere **P 23** und **FA-P 23**. Es ist eindeutig zu erkennen, dass nur eine diffundierende Spezies vorlag und man von einem zufälligen Polymerknäuel ausgehen konnte. Hydrodynamische Radien von $R_h = 2,0$ nm (**P 23**) und $R_h = 2,2$ nm (**FA-23**) wurden bestimmt und sind durch das schnelle Abklingen der gefitteten ACC (Abbildung 48 A) eindeutig zu bestimmen. Die Zugabe von $0,04 \mu\text{mol}$ an Folsäure pro Milliliter **FA-P 23**-Lösung, was der Blutkonzentration unter Blockadebedingungen entspricht, erzeugte keine Aggregatbildung, was durch die entsprechende ACC der kleinen diffundierenden Fluoreszenzspezies mit einem hydrodynamischen Radius von $R_h = 2,2$ nm erkennbar ist (Abbildung 48 A).

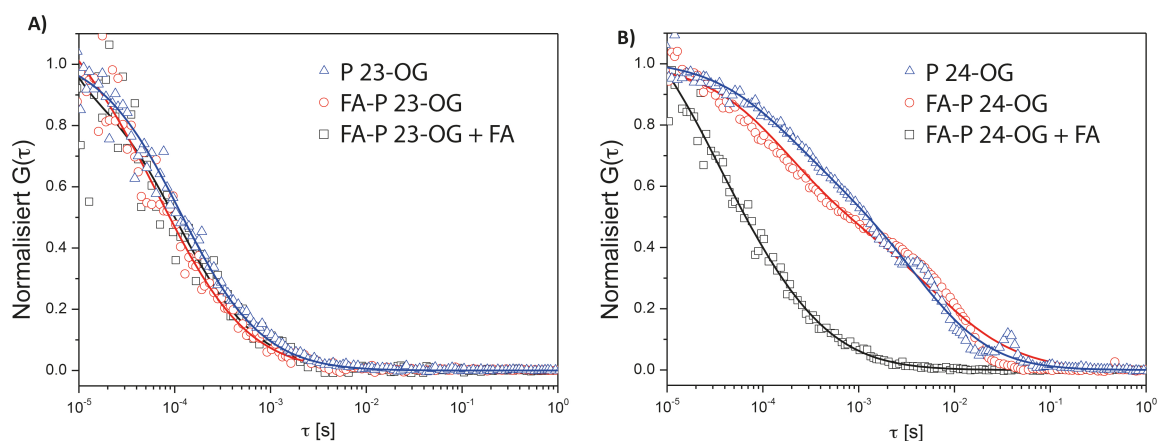


Abbildung 48. Normalisierte FCS-Autokorrelationskurven für das kleine **FA-P 23** (A) und große **FA-P 24** (B) PHPMA-Konjugat in wässriger Lösung. Quadrate repräsentieren pHPMA, Kreise repräsentieren die Folat-PHPMA-Konjugate ohne zusätzliche Folsäure und Dreiecke repräsentieren Folat-PHPMA-Konjugate mit zusätzlicher Folsäurezugabe.

Betrachtet man das Verhalten der großen Polymere, erkennt man, dass diese sich deutlich verschieden verhalten. Während in der Lösung der reinen HPMA-Polymere (**P 23**) nur Polymerketten mit hydrodynamischen Radien von $R_h = 3,3$ nm zu sehen waren, zeigte die Konjugation von Folat an das Polymer starke Aggregation. Dies wird durch das langsame Abklingen des Fits der entsprechenden Korrelationskurve widerspiegelt (Abbildung 48 B) und kann bereits der Anbindung von Folat (Einbau von 8%) zugeschrieben werden. In diesem Fall liegen Aggregate von $R_h \sim 100$ nm vor, welche zusätzlich zu den einzeln diffundierenden Polymerketten detektiert werden konnten. Die Zugabe von Folsäure beeinflusst das Aggregationsverhalten von **FA-P 24** nur unwesentlich, was durch den ähnlichen Verlauf der zugehörigen ACC ersichtlich ist (Abbildung 48 B).¹⁷² Der Unterschied zwischen **FA-P 23** und **FA-P 24** liegt somit mit großer Wahrscheinlichkeit am unterschiedlichen Molekulargewicht/Polymerisationsgrad. Eine Polymerkette des **FA-P 23** trägt beispielsweise 7 Folateneinheiten, während an einer Polymerkette des **FA-P 24** 35 Folate gebunden sind. Die Messungen deuten somit darauf hin, dass bereits 35 Folate pro Kette ausreichen, um eine Aggregation zu induzieren und stabile Mizellstrukturen zu bilden.

Nach Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften sollte die Bioverteilung und das pharmakokinetische Profil der Konjugate untersucht werden, wobei eine Radiomarkierung mittels [¹⁸F]Fluorethyltosylat in Analogie zu Herth *et al.*⁵⁵ durchgeführt wurde. Für die Radiomarkierung wurde ein einheitliches Protokoll beibehalten (siehe 5.5.9.5), sodass radiochemische Ausbeuten (RCA) von 10% für das kleinere Polymer und 5% für das größere Polymer erhalten werden konnten (Tabelle 16). Das Reaktionsgemisch wurde über ein LC-gestütztes Größenausschluss-System aufgereinigt. Dabei wurde 0,9% isotonische Kochsalzlösung als Laufmittel und eine Reihe von 3 konsekutiv geschalteten GE HiTrap (5 mL) Säulen verwendet.

Nach erfolgreicher ¹⁸F-Markierung und Formulierung der Konjugate wurden Kleintier-PET-Experimente durchgeführt, sodass Aussagen über das Verteilungsprofil in verschiedenen Organen und im Tumor selbst möglich waren.

Um die aktive Anreicherung in einem realistischen Experiment zu untersuchen, wurde, wie bereits erwähnt, das Walker-256-Karzinommodell der Ratten verwendet. Es ist bekannt, dass dieses Modell den Folatezeptor (über)exprimiert, allerdings nicht in dem Ausmaß wie KB-Zellen. Um zwischen passiver Anreicherung mittels EPR-Effekt²⁰¹ und aktivem Anreicherung unterscheiden zu können, wurde im Folgenden besonders den Blockadestudien Beachtung geschenkt. Abbildung 49 A und B zeigt jeweils das Ganzkörper-PET-Bild der Polymerverteilung nach 120 min nach i.v. Injektion des kleineren ($[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P } 21$) und des größeren ($[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P } 22$) Konjugats.

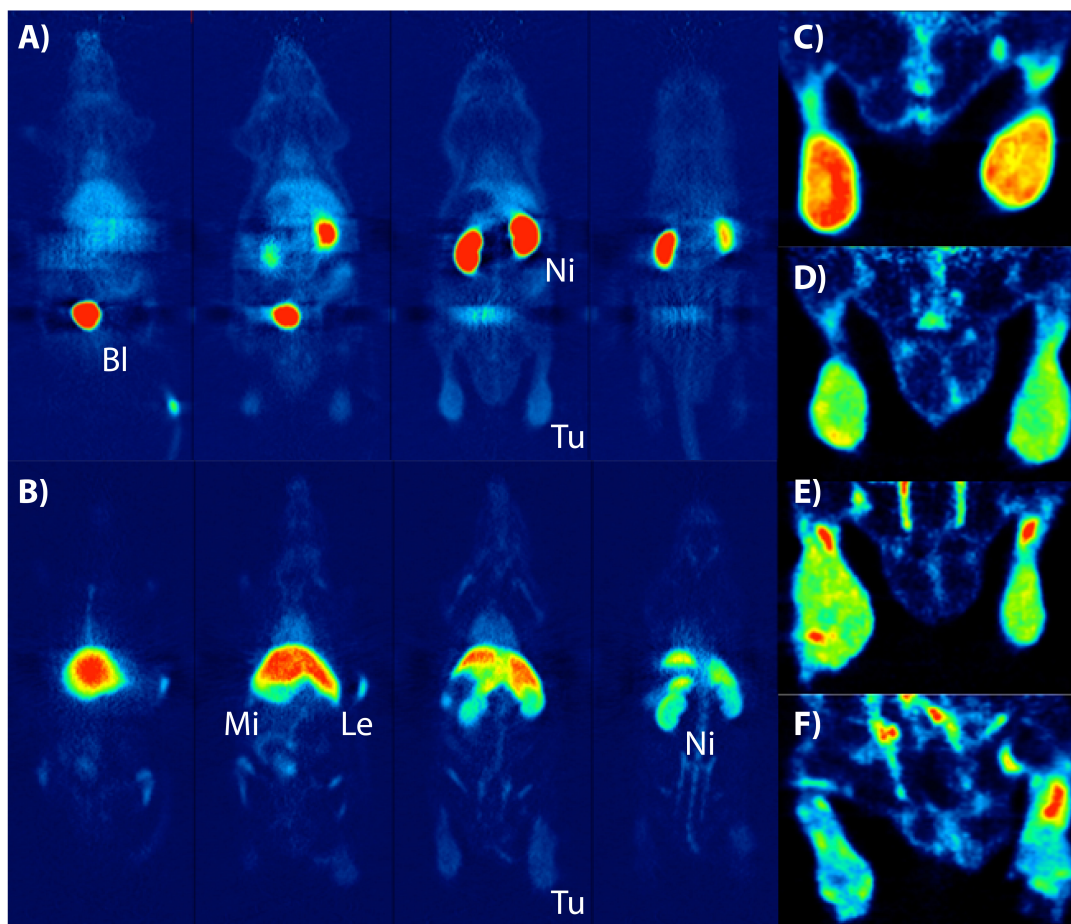


Abbildung 49. Repräsentative koronale Schnitte des Ganzkörper-PET-Scans (A+B) und der Tumorakkumulation im Hinterfuß/lauf (C, D, E, F) des kleinen Konjugats (C, $[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P } 21$, $M_n=10,5$ kDa), des reinen kleinen Polymers (D) und des großen Konjugats (E, $[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P } 22$, $M_n=52,5$ kDa) sowie des reinen großen Polymers (F); Tu: Tumor, Ni: Niere, Le: Leber, Mi: Milz, Bl: Blase.

Betrachtet man die reinen kleinen Homopolymere ohne Folatanbindung, zeigten diese in Übereinstimmung mit Allmeroth *et al.*¹⁷⁹ hohe Konzentrationen in der Niere und der Blase, was auf eine überwiegend renale Ausscheidung hindeutet. Im Fall der kleinen Folat-HPMA-Konjugate sah man dieses Anreicherungsmuster auch, jedoch kam zusätzlich eine spezifische Bindung an den Folatrezeptor (FR), welcher in den proximalen Tubuli der Nieren exprimiert ist, hinzu. Dem gegenüber zeigte [¹⁸F]FE-FA-P 22 eine hohe Anreicherung in der Leber (Le) und der Milz (Mi), was auf die Größe der Polymere und vor allem die Aggregatbildung zurückzuführen war.¹⁷⁹ Somit hängt das Anreicherungsmuster der beiden Konjugate auch in diesem Fall überwiegend von der Polymerarchitektur und -größe ab.

Die Messung zeigte, im Vergleich zu den HPMA-Polymeren ohne Erkennungsstruktur (Abbildung 49 D und F), eine eindeutige Anreicherung der Konjugate in den Tumoren, welche auf den Hinterläufen implantiert waren (Abbildung 49 C und E). Um die Tumoraufnahme zu quantifizieren und vergleichbar zu machen, wurden standardisierte Aufnahmewerte (engl. standardized uptake values, SUVs) berechnet. Diese zeigten eine höhere Tumoranreicherung für die Konjugate [¹⁸F]FE-FA-P 21 und [¹⁸F]FE-FA-P 22 verglichen mit den HPMA-Polymeren ohne Erkennungsstruktur. Zeitaktivitätskurven (engl. time activity curves, TACs) wurden für einen Beobachtungszeitraum von 120 min aufgenommen.

Abbildung 50 zeigt die gemittelten TACs der ¹⁸F-markierten Folat-pHPMA-Konjugate mit und ohne Blockade durch native Folsäure sowie die Tumoranreicherung der Polymere, die kein Folat trugen (¹⁸F-P 21, ¹⁸F-P 22). Man erkennt, dass nach anfänglicher Umverteilung innerhalb der ersten 20 min p.i. die Anreicherung des [¹⁸F]FE-FA-P 21 (Abbildung 50 A, durchgezogene Linie) ein stabiles Plateau erreichte, welches fast zweimal so hoch war wie das der HPMA-Polymere ohne Erkennungsstruktur (Abbildung 50 A, gepunktete Linie). Eine Blockade des Folatrezeptors (FR) mittels nativer Folsäure reduzierte deutlich die relative Anreicherung (Abbildung 50 B, gestrichelte Linie), welche dann noch weiter über die Zeit abnahm. Im Vergleich zum großen Polymer ¹⁸F-FE-FA-P 22 war die

Aufnahme des kleinen Konjugats etwas höher, was den besseren Diffusionseigenschaften der kleinen Konjugate zugeschrieben werden kann (Abbildung 50). Diese Unterschiede in der Diffusion im Körper konnten bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden.¹⁷⁹ Es sind aber auch Unterschiede in der Tumoraufnahme des ^{18}F -FE-FA-P 21 verglichen mit ^{18}F -FE-FA-P 22 zu erkennen (Abbildung 50 B). Ohne Blockade zeigte ^{18}F -FE-FA-P 21 eine reduzierte anfängliche Umverteilungsphase gefolgt von einer mehr oder weniger kontinuierlichen Abnahme der Tumoraufnahme.

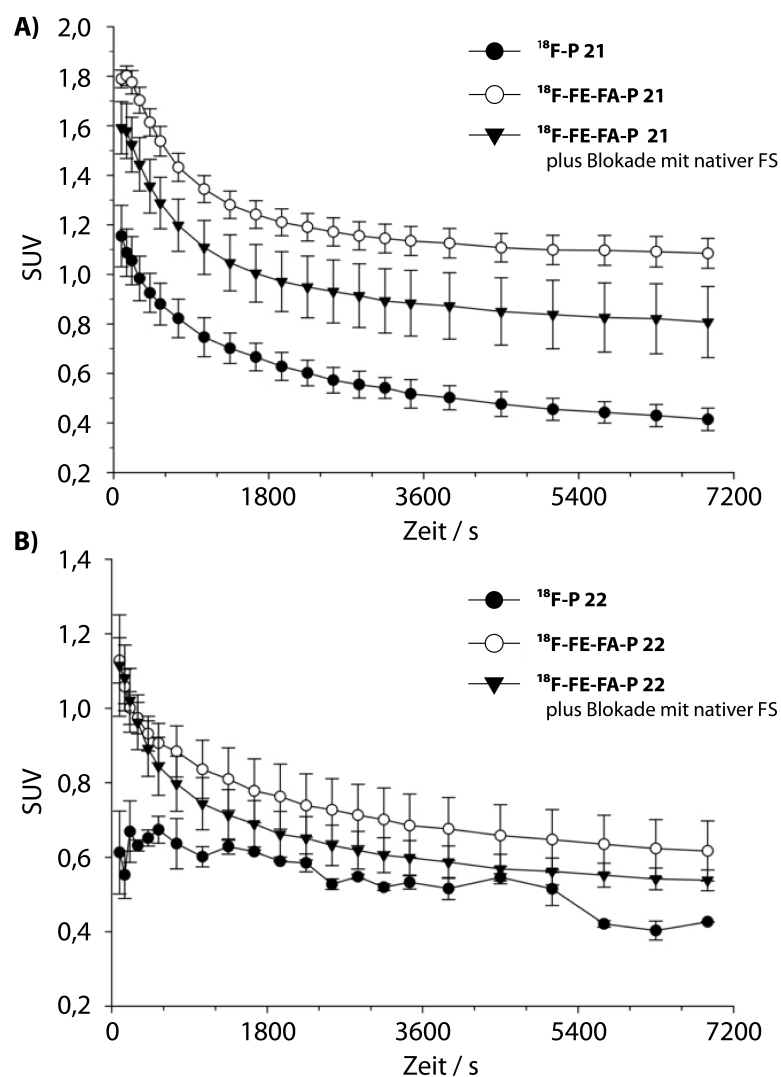


Abbildung 50. SUV der intratumoralen Aktivitätslevel von (A) den kleinen und (B) den großen Polymeren. Unausgefüllte Kreise zeigen die jeweiligen Folat-pHPMA-Konjugate ungeblickt. Ausgefüllte Kreise zeigen die ^{18}F -markierten reinen Polymere. Die Werte wurden normalisiert auf die Aktivitätsmenge im Referenzgewebe (Hoden); n=2-7.

Unter FR-Blockadebedingungen war der Zeitverlauf vergleichbar mit dem Zeitverlauf ohne Blockade. Nach 2 h p.i. konnte ein signifikanter Unterschied (ungefähr 20%) zwischen geblockten und nichtgeblockten Tieren festgestellt werden. Der Vergleich der finalen Aufnahme ist in Abbildung 51 gezeigt, welche eine deutlich erhöhte Tumoranreicherung zeigt, was der aktiven Anreicherung zugeschrieben werden kann und was durch die Ergebnisse der Blockadestudien mit nativer Folsäure noch unterstützt wird.

Betrachtet man die unterschiedlichen Aufnahmekinetiken der kleinen und großen Konjugate, kann die Aggregatbildung eine mögliche Erklärung sein, welche durch den höheren Anteil an lipophilen Folaten bei den großen Polymeren induziert wird. Obwohl Folate, wie bereits gesagt, generell eher polare Moleküle sind, stellen sie durch Derivatisierung der Carboxylgruppe (γ -Position) in Kombination mit den Ethylenglykol-basierenden Spacern eher hydrophobe Seitenketten, verglichen mit dem übrigen HPMA-Rückgrad, dar. Der so vergrößerte hydrodynamische Radius führt zu einer Reduzierung der diffusionsbedingten Aufnahme (Abbildung 51).

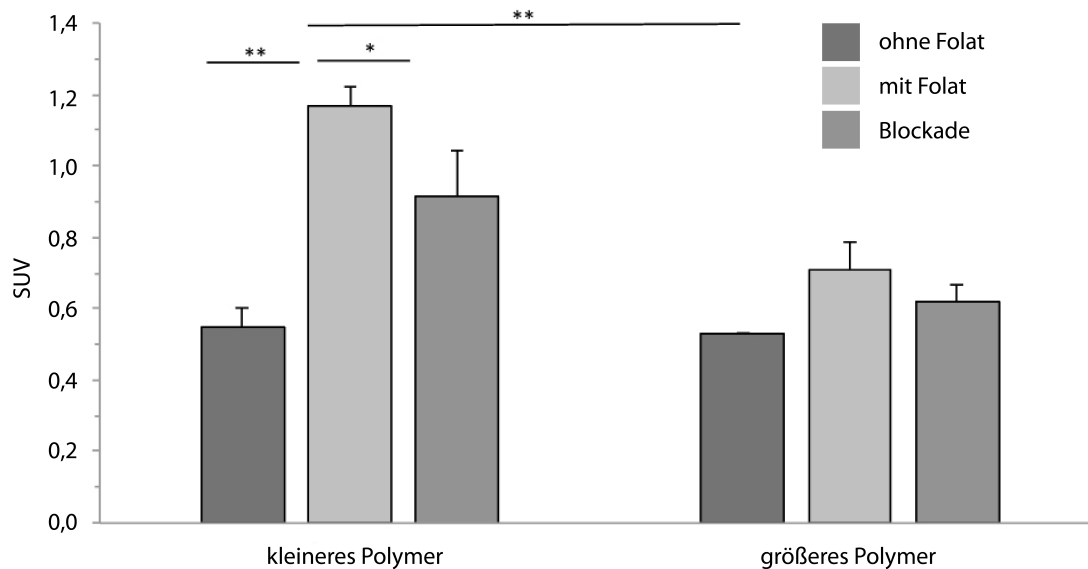


Abbildung 51. Vergleich der absoluten Werte (von 15 bis 120 min p.i.) des kleineren und größeren HPMA-Polymers (Folatkonjugat und reines pHPMA) im Walker-256 Karzinom, welche mittels PET bestimmt wurden. Gezeigt sind die standardisierten Aufnahmewerte der HPMA-Polymere mit und ohne Folat sowie Blockadestudien mittels nativer Folsäure; n=2-7; (*) p<0.05, (**) p<0.01.

Darüber hinaus kann die Anzahl an verfügbaren Folaten pro Polymermolekül, im Fall des kleinen Polymers, eine weitere Erklärung für die erhöhte Anreicherung sein. Im Fall des großen Konjugats steht so ein großer Teil der Folate durch Aggregatbildung nicht mehr zur Rezeptorbindung zur Verfügung. Dies führte dazu, dass das ^{18}F -FE-FA-P 21, mit einem SUV von 1,2 eine etwas höhere Aufnahme im Vergleich zu ^{18}F -FE-FA-P 22, zeigte (Abbildung 51).

Um die im PET generierten Daten zu bestätigen, wurden auch *ex vivo*-Biodistributionsstudien durchgeführt (Tabelle 17).

Tabelle 17. Ergebnisse der Biodistributionsstudien von $[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P 21}$ und $[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P 22}$ in Tumor tragenden Ratten.

Organ oder Gewebe	$[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P 21}$		$[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P 22}$	
	120 min p.i. (n = 3)	240 min p.i. (n = 3)	120 min p.i. (n = 3)	240 min p.i. (n = 3)
% ID/g in:				
Lunge	0,76 ± 0,71	0,29 ± 0,16	0,29 ± 0,07	0,17 ± 0,13
Leber	1,78 ± 0,84	1,01 ± 0,18	5,57 ± 1,10	5,74 ± 0,62
Milz	0,74 ± 0,36	0,55 ± 0,10	1,82 ± 0,11	1,72 ± 0,18
Nieren	18,51 ± 3,56	20,31 ± 3,65	3,99 ± 0,40	4,02 ± 0,57
Muskel	0,08 ± 0,19	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Herz	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,10 ± 0,03
Blut	0,32 ± 0,16	0,25 ± 0,08	0,47 ± 0,08	0,34 ± 0,13
Darm (leer)	0,35 ± 0,07	0,31 ± 0,06	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,01
Hoden	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Tumor	0,46 ± 0,04	0,44 ± 0,11	0,28 ± 0,06	0,31 ± 0,13

Die Ergebnisse der *ex vivo*-Biodistributionsstudien der Konjugate [¹⁸F]FE-FA-P 21 und [¹⁸F]FE-FA-P 22 in tumortragenden Ratten bestätigen die aus den PET-Messungen erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 50 A). Auch in der Biodistribution wurde die höchste Aufnahme des Konjugats [¹⁸F]FE-FA-P 21 in den Nieren gefunden, was mit den Ergebnissen, dass kleinere Polymere bevorzugt renal ausgeschieden werden, übereinstimmt. Die generell niedrige Anreicherung in der Leber weist darauf hin, dass die hepatobiliären Ausscheidungswege für die hier beschriebenen kleinen Folat-pHPMA-Konjugate von geringer Bedeutung waren.

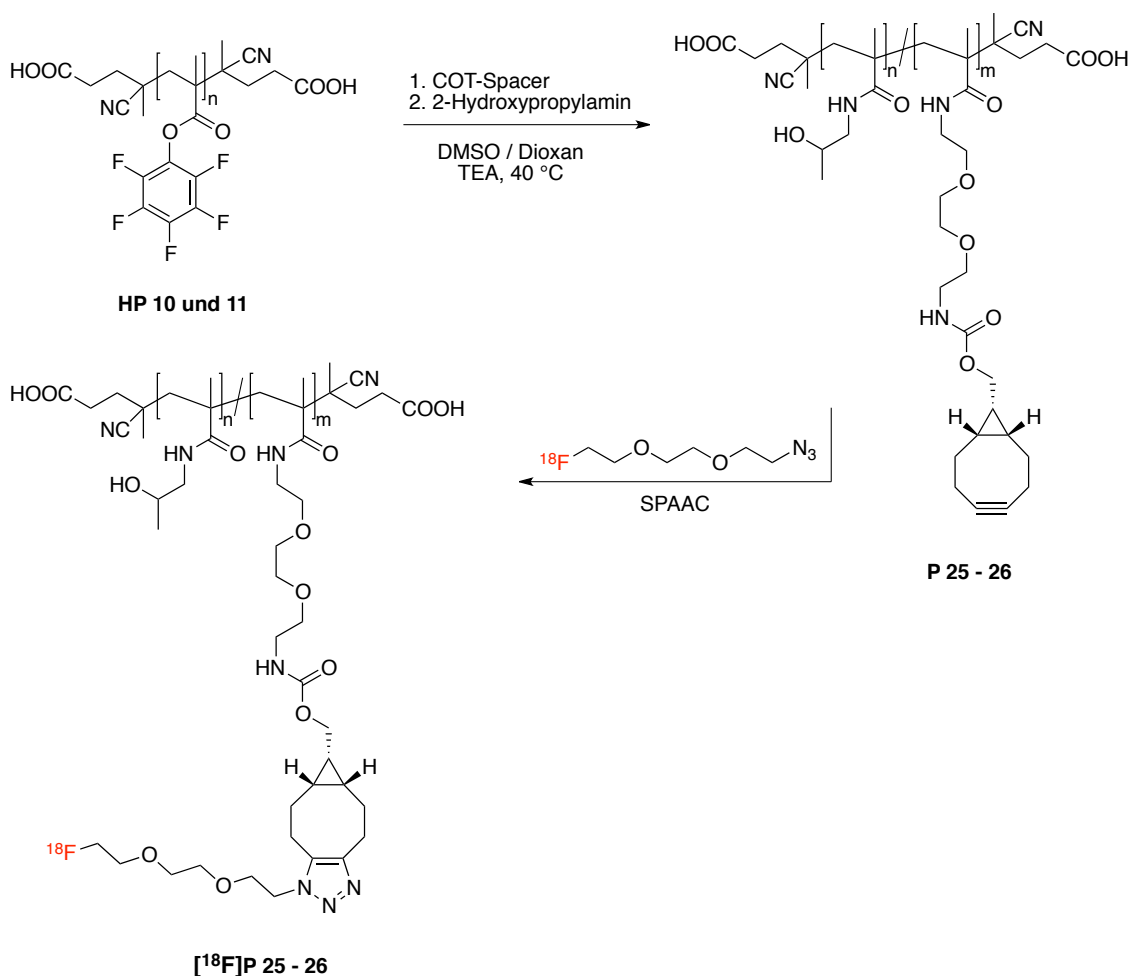
Im Gegensatz dazu zeigt [¹⁸F]FE-FA-P 22, wie zu erwarten, hohe Aktivitätslevel in der Leber und Milz, sowohl nach 120 min als auch nach 240 min (Tabelle 17).¹⁷⁹ Interessanterweise konnten jedoch keine erhöhten Blutaktivitätslevel festgestellt werden, welche mit einer reduzierten renalen Ausscheidung korreliert werden könnten. Die Anreicherung von [¹⁸F]FE-FA-P 22 in den Nieren veränderte sich über die Zeit nicht signifikant und kann unter anderem dem Folatezeptor in den proximalen Tubuli zugeschrieben werden. Tabelle 17 zeigt die absoluten Tumoraufnahmewerte der *ex vivo* Biodistributionsstudien von ungefähr 0,46% ID/g (2 h) bzw. 0,44% ID/g (4 h) für das kleinere Konjugat, wohingegen das Polymer ohne Erkennungsstruktur vergleichbar geringere Aufnahmewerte von 0,18% ID/g (2 h) zeigte.¹¹⁴ Des Weiteren wurden für das schwerere Konjugat Werte von 0,28% ID/g (2 h) bzw. 0,31% ID/g (4 h) ermittelt, während das schwerere Polymer ohne Erkennungsstruktur Werte von 0,16% ID/g zeigte.¹¹⁴ Somit war es durch Konjugation von Folat möglich eine 1,5-2fache Erhöhung der spezifischen Anreicherung in den Tumoren zu erreichen. Dies stimmte auch mit den Ergebnissen der Kleintier-PET-Studien überein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man durch Anbindung von Erkennungsstrukturen an makromolekulare PHPMA-Polymere ein Zielgewebe adressieren kann, was eine erhöhte Anreicherung des Konjugats bewirkt und so ein erfolgsversprechendes System zum schnellen Wirkstofftransport in u. a. Krebszellen, welche sich in extravaskulären Kompartimenten befinden, darstellt. Dieses Konzept kann nun auf die kolloidalen System, welche sich bereits als

Wirkstoff-Trägersysteme bewährt haben, übertragen werden, indem in das hydrophile Segment Folatstrukturen eingebaut und so auf der Oberfläche präsentiert werden.

3.5 Kupferfreie SPAAC an HPMA-Polymeren

Da die Verwendung von Kupferspezies oft ein Problem in der biologischen Anwendung darstellt, besteht derzeit der Trend hin zu katalysatorfreien Clicksystemen. Dabei stellt das Clicken mittels gespannter ungesättigter Ringsysteme (engl. strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC) eine elegante Methode dar, da diese analog der CuAAC immer noch eine hohe Selektivität besitzen und vor allem unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen. In diesem Sinne wurde basierend auf den HPMA-Polymeren diese Methode getestet, um später verschiedene Funktionalitäten kupferfrei anbringen zu können. Begonnen wurde dabei in Kooperation mit [REDACTED] mit der einfachen ^{18}F -Markierung der Polymere (Schema 21).



Schema 21. Kupferfreie SPAAC von HPMA-Polymeren P 25 - 26 und ^{18}F -Tracer [^{18}F]P 25 - 26.

Die HPMA-Polymere **P 25-28** wurden analog zu 3.1.1.3 hergestellt, wobei die Präkursorpolymere **HP 10-11** mit dem Alkinoligoethylen-Spacer (**P 27-28**) und dem COT-Spacer (**P 25-26**) mittels polymeranaloger Umsetzung funktionalisiert wurden (siehe 5.5.10). Auch in diesem Fall wurden Polymere oberhalb (60 kDa) und unterhalb (12 kDa) der renalen Ausscheidungsgrenze hergestellt (Tabelle 18). Die Dispersitäten lagen dabei bei 1,26 für das kleinere und 1,42 für das größere HPMA-Polymer, wobei der Einbau an Alkinfunktionalitäten jeweils bei 3% lag.

Tabelle 18. Hergestellte Alkin-funktionalisierte Polymere für die SPAAC (**P 25-26**) und für die CuAAC (**P 27-28**) oberhalb und unterhalb der renalen Ausscheidungsgrenze.

Name	M_w in g/mol	\bar{D}	Einbau Spacer
HP 10	25.300	1,26	-
HP 11	91.000	1,42	-
P 25	12.500 ^a	1,26	3%
P 26	61.000 ^a	1,42	3%
P 27	12.000 ^a	1,26	3%
P 28	60.000 ^a	1,42	3%

^aBerechnet aus den Molekulargewichten der Reaktivesterpolymere **HP 10** und **HP 11**, welche mittels GPC in THF als Lösungsmittel bestimmt wurden.

Beide Clickreaktionen wurden einem ausführlichen Optimierungsprozess unterzogen. Dabei wurden Parameter wie Einwaage, Temperatur, Lösungsmittel, Verhältnis von Kupfer(II)salz zu Reduktionsmittel und Reaktionszeit hin zu maximalen Umsätzen optimiert, wobei in Tabelle 19 die optimalen Bedingungen aufgelistet sind. Alle Polymere lieferten einen guten bis sehr guten Umsatz, was zeigt, dass die SPACC einen adäquaten Ersatz zur CuAAC darstellt.

Tabelle 19. Optimierte Parameter der ^{18}F -CuAAC und ^{18}F -SPAAC.

Name	Einwaage [mg]	T / [°C]	Löse- mittel ^b	CuSO ₄ [μmol]	Na-L- Ascorbat [μmol]	Zeit [min]	Umsatz [%]
[¹⁸F]P 25	3	120 ^a	DMSO:PBS (1:9)	-	-	10	52
[¹⁸F]P 26	3	120 ^a	DMSO:PBS (1:9)	-	-	10	99
[¹⁸F]P 27	1	70	DMSO:PBS (1:9)	20	100	20	96
[¹⁸F]P 28	1	70	DMSO:PBS (1:9)	20	100	20	94

^aMikrowellengestützte Markierung mit einer Ramptime von 1 min plus jeweilige Holdtime und eine $P_{\text{max}}=50\text{ W}$; ^balle Reaktionen wurden in 1 mL durchgeführt.

In folgenden Schritten gilt es die bisher verwendeten Systeme mittels SPAAC zu funktionalisieren und anschließend *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren.

4 Zusammenfassung

Nanodimensionale Wirkstoff-Trägersysteme gewinnen in der Therapie von malignen Tumorerkrankungen immer mehr an Bedeutung, da sie in der Lage sind, sowohl die Bioverfügbarkeit als auch das pharmakokinetische Profil von Wirkstoffen drastisch zu verbessern. Hauptgründe dafür sind eine erhöhte Plasma-Halbwertszeit durch die größenbedingte verminderte renale Ausscheidung und eine geringere Metabolisierungsrate sowie eine gesteigerte Anreicherung im Tumorgewebe durch den EPR-Effekt.

Diese Arbeit beschreibt die erfolgreiche Synthese und Entwicklung solcher neuer kolloidaler Wirkstoff-Trägersysteme, welche biokompatibel, teilweise bioabbaubar und funktionalisierbar sind. Dabei wurde ein Fluoreszenzfarbstoff als hydrophobes Wirkstoffmodell eingekapselt. Die Funktionalisierbarkeit wurde durch den Einsatz von polymeren Tensiden gewährleistet, wobei sich HPMA/LMA-basierte Polymersysteme dazu besonders eigneten. In Folge dessen wurden HPMA-basierte Block- und statistische Copolymere unterschiedlicher Molekulargewichte (10-25 kDa) und hydrophiler/hydrophober Zusammensetzung (10-50 mol%) mittels RAFT-Polymerisation in Kombination mit dem Reaktivesteransatz dargestellt. Die erhaltenen wohldefinierten, eng verteilten und leicht funktionalisierbaren Copolymere wurden sowohl in die Miniemulsionspolymerisation, als auch in die Kombination aus Miniemulsion und Lösungsmittelverdampfung eingesetzt, um die Stabilisierungseffizienz verschiedener Polymerkompositionen zu untersuchen (Abbildung 52). Die Block-Copolymere waren den statistischen Copolymeren überlegen. Dabei zeigten sich die kleineren Copolymere mit einem Molekulargewicht von 10 kDa und einem hydrophoben Einbau von 10 mol% LMA im Modellsystem Polystyrol als besonders geeignet. Diese optimierten Parameter konnten auf das PDLLA-System als zusätzliches bioabbaubares Kernmaterial übertragen werden. Im Fall der Miniemulsionspolymerisation konnten Kolloide im Größenbereich von 150-200 nm im Durchmesser mit einer engen Größenverteilung hergestellt werden. Nur leicht größere und geringfügig breiter verteilte PS- und

PDLLA-Kolloide wurden mittels Miniemulsionstechnik in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung erhalten, was auf den Herstellungsprozess selbst zurückzuführen ist.

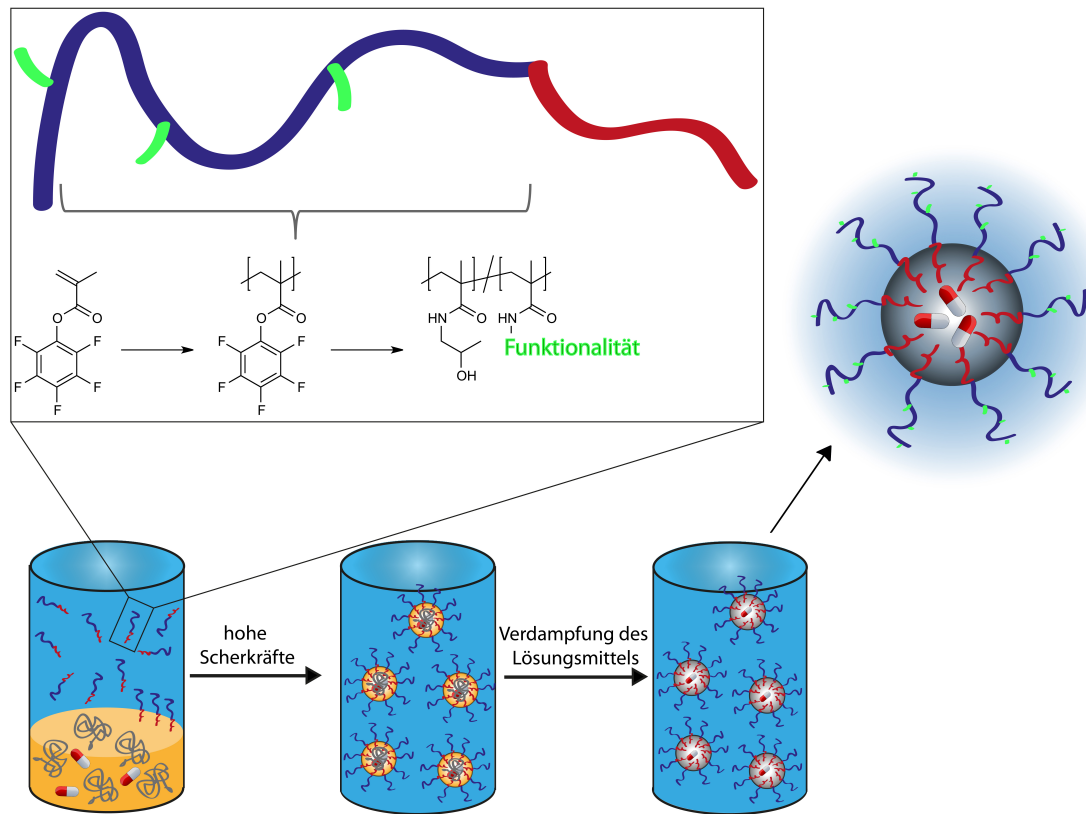


Abbildung 52. Synthese HPMA-basierter Block-Copolymere und ihr Einsatz in der Miniemulsionstechnik zur Herstellung von funktionalisierten kolloidalen Wirkstoff-Trägersystemen.

Auch Polypeptide wurden als polymere Tenside eingesetzt und lieferten die entsprechenden Kolloide. Da diese aber keine einfache Funktionalisierungschemie zulassen, wurde sich im Anschluss auf die Evaluierung der HPMA-basierten Systeme beschränkt.

Die kolloidalen Systeme zeigten keine Wirkung auf die Zellviabilität bis zu Konzentrationen von 1,2 mg/mL. Mittels dynamischer Lichtstreuung in humanem Blutserum konnte gezeigt werden, dass keine Interaktion mit Blutbestandteilen stattfand.

Unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung (verschiedene Absorptionsmaxima) ermöglichte Kernmaterial, Hülle und das hydrophobe Wirkstoffmodell getrennt *in vitro* zu untersuchen (Abbildung 53). Es konnte gezeigt werden, dass das hydrophobe Wirkstoffmodell allein durch Interaktion der Kolloide mit den Zellen übertragen wird, was die Hypothese einer diffusionsbedingten, initialen, aber unspezifischen Freisetzung bestätigt und so nicht der Weg der intrazellulären Freisetzung des eingekapselten Wirkstoffes eingeschlagen wird.

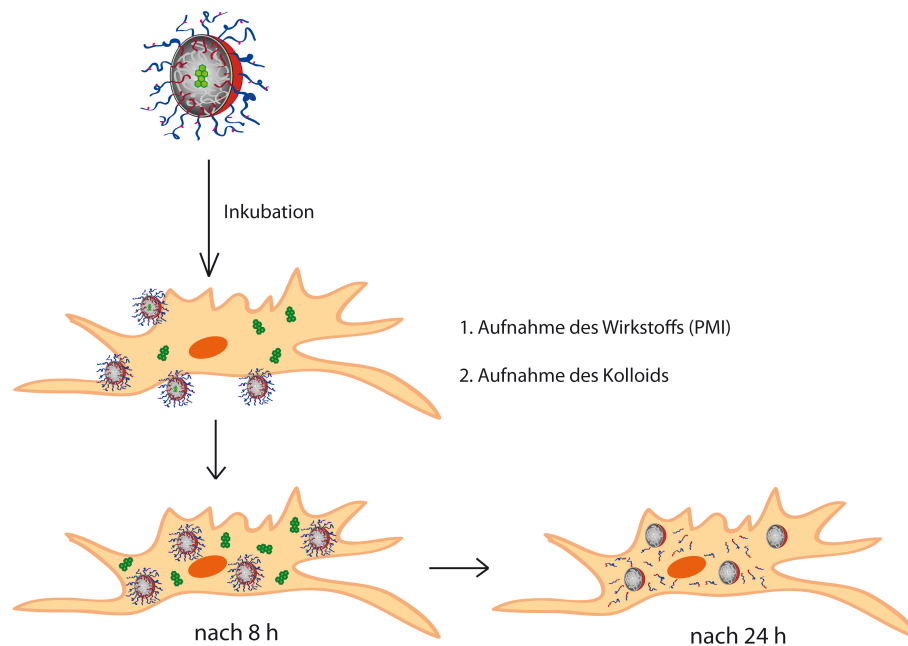


Abbildung 53. Schematische Übersicht des Freisetzungsmechanismus eines hydrophoben Wirkstoffmodells aus den polymeren Kolloiden und das intrazelluläre Schicksal der Trägersysteme nach Aufnahme in die Zelle.

Eine solche Freisetzungskinetik kann z. B. durch Verwendung von Nitroglycerin, als vasodilatierender Wirkstoff mit geringer unspezifischer Wirkung, ausgenutzt werden, um den EPR-Effekt zu unterstützen. Dies hätte eine noch höhere Anreicherung der kolloidalen Systeme im Tumorgewebe zur Folge.¹²⁵ Über doppelte Fluoreszenzmarkierung konnte gezeigt werden, dass es zu einer langsamen intrazellulären Ablösung der stabilisierenden Block-Copolymere zwischen 8 h und 24 h kam. Diese Ablösung der Block-Copolymere vom Kern der Kolloide könnte zur

kontrollierten Freisetzung eines weiteren kovalent angebondenen Wirkstoffes ausgenutzt werden.

Die Körperverteilung der PS- und PDLLA-Kolloide nach ^{18}F -Markierung mittels PET und *ex vivo*-Biodistributionsstudien (Abbildung 54) zeigte, dass das Kernmaterial einen Einfluss auf die Körperverteilung hat. Die ^{18}F -markierten Block-Copolymere beider Kolloide ergeben ein starkes Signal in der Niere, wobei dieser Befund für die PS-Kolloide stärker ausgeprägt war. Darüber hinaus reicherten sich die PS-Kolloide in Lunge, Leber und Milz an, was auf Aggregation mit Proteinen im Blut hindeutet (nicht für die PDLLA-Kolloide beobachtet). Diese Beobachtung kann durch eine Verdrängung der stabilisierenden Polymere durch Interaktion mit Blutbestandteilen erklärt werden, was dann eine Aggregation auslöst. Diese Annahme kann auch das erhöhte Nieren- und Blasensignal der PS-Kolloide erklären, da das verwendete ^{18}F -markierte polymere Tensid unter der renalen Ausscheidungsgrenze liegt.

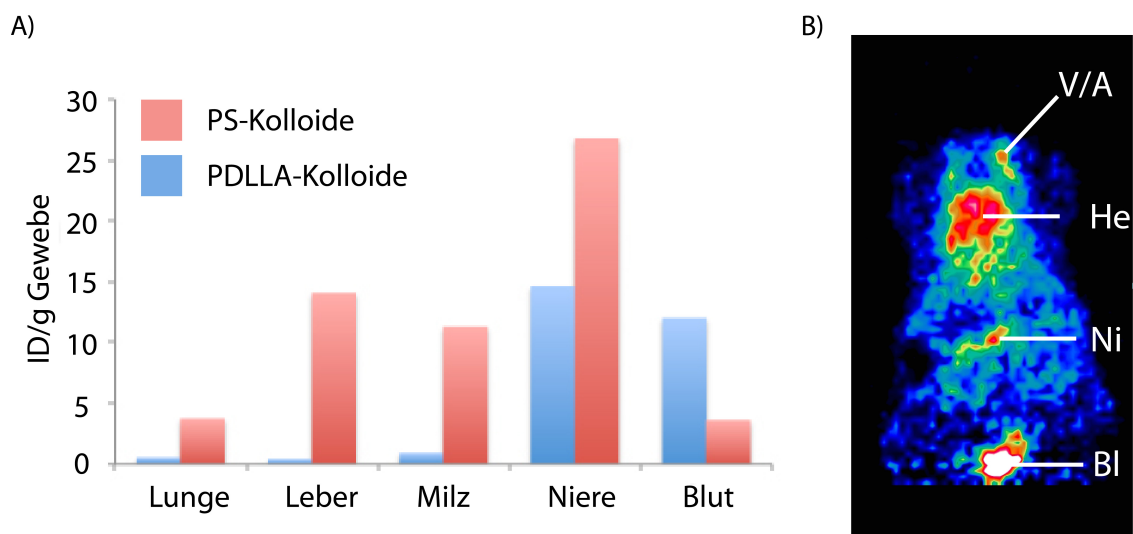


Abbildung 54. Körperverteilung der PS- und PDLLA-Kolloide mittels *ex vivo*-Biodistribution (A) und Kleintier-PET (B).

Das Anreicherungsmuster der PDLLA-Kolloide ist deutlich anders. Es zeigt neben der Nierenakkumulation eine deutlich erhöhte Blutaktivität und somit die gewünschten langzirkulierenden Eigenschaften, die für ein Wirkstoff-Träger unabdingbar sind. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich mittels *ex vivo*-Biodistributionsstudien bestätigt.

Somit konnten attraktive Wirkstoff-Transportsysteme hergestellt werden. Um eine längere *in vivo*-Stabilität zu gewährleisten, wurden erste Versuche mit größeren Block-Copolymeren (20 kDa) durchgeführt, die eine verbesserte Stabilität zeigten.

Um die Tumoranreicherung und -aufnahme nochmals zu verbessern, wurde die Anwendbarkeit des Folat-Konzepts auf die kolloidalen Systeme untersucht. Dabei wurden zuerst lediglich die reinen HPMA-Homopolymere mit Folat über Kupfer(I)-katalysierte Clickchemie derivatisiert und *in vivo* getestet. Es wurden Polymere oberhalb und unterhalb der renalen Ausscheidungsgrenze auf ihre Anreicherung im Tumor untersucht. Für beide Konjugate konnte eine erhöhte Anreicherung nach bereits 2 h -im Vergleich zu den Polymeren ohne Erkennungsstruktur- erreicht werden. Blockadestudien bestätigten die Spezifität der Anreicherung, welche auch mittels *ex vivo*-Biodistributionsstudien bestätigt werden konnten.

Diese Daten zeigen das Potential der Folat-modifizierten makromolekularen Systeme unter Verwendung des aktiven Anreicherungsmechanismus' auf Tumorzellen in extravaskulären Kompartimenten innerhalb kurzer Zeitfenster. Folgeschritte beinhalten nun die Markierung der kolloidalen Systeme mit Folat, um so auch das Konzept der aktiven Anreicherung auf diese zu übertragen. Dabei soll die Anbindung des Folats mittels kupferfreier Clickchemie erfolgen, wobei schon erste Versuche zu SPAAC durchgeführt wurden und das Potential der SPAAC als Alternative zur CuAAC unterstreichen.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit eine Reihe unterschiedlich funktionalisierter PS- und PDLLA-Kolloide dargestellt werden, die mittels HPMA/LMA-Block-Copolymeren stabilisiert sind. Diese zeigten *in vitro* und *in vivo* vielversprechende Ergebnisse und so das große Potential dieser Systeme, als langzirkulierende Wirkstoff-Trägersysteme für die Tumorthherapie.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Chemikalien

Name	Abkürzung	Anbieter	Reinheit
Aluminiumoxid, basisch 50-200 µm	-	Acros	-
Aluminiumoxid, neutral 50-200 µm	-	Acros	-
11-Azid-3,6,9-trioxaundekan-1-amin	Azid-PEG-Amin	Sigma Aldrich	90%
4,4'-Azobis(4-cyanvaleriansäure)	ACVA	Sigma Aldrich	98%
2,2'-Azobis(2-methylbutyronitril)	V59	Acros	98%
2,2'-Azo-bis-(isobutyronitril)	AIBN	Fluka	98%
<i>N</i> -(1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl-methyloxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctan	-	Synaffix	95%
Benzylbenzodithioat	Benzyl-CTA	-	-
5-Bromvalerylchlorid	-	Sigma Aldrich	97%
Chloroform	CHCl ₃	Sigma Aldrich	99,9%
Chloroform-d ₁	CDCl ₃	Deutero	-
Cyclohexan	-	Sigma Aldrich	99%
Dialysemembran 1000 MWCO	-	SpectraPor	-
Dialysemembran 3500 MWCO	-	SpectraPor	-
Dichlormethan	DCM	Sigma Aldrich	99,4%
Diethylether	-	Sigma Aldrich	99,9%
Diethylether-Bortrifluorid	-	Acros	48%
<i>N</i> -(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarboximid	PMI	BASF	-
Dimethylformamid	-	Acros	99,8%
Dimethylsulfoxid	DMSO	Acros	99,7%
Dimethylsulfoxid-d ₆	DMSO-d ₆	Deutero	-

Name	Abkürzung	Anbieter	Reinheit
1,4-Dioxan	-	Fischer Scientific	99,9%
Ethanol	EtOH	Sigma Aldrich	99,5%
Ethylacetat	-	Sigma Aldrich	99,5%
3-Ethyl-2,4-dimethylpyrrol	-	Sigma Aldrich	97%
<i>n</i> -Hexadekan	HD	Sigma Aldrich	99%
<i>n</i> -Hexan	-	Fischer Scientific	95%
2-Hydroxypropylamin	HPA	Acros	94%
Isotonische Kochsalzlösung	-	Braun	0,5%
Kaliummethacrylat	-	ABCR	95%
Kupfer(II)-acetat	Cu(OAc) ₂	Acros	99%
Laurylmethacrylat	LMA	Sigma Aldrich	96%
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	Acros	99%
9-Mercapto-1,2-dicarba- <i>closo</i> -dodecanboran	Carboran	-	-
Methacrylsäurechlorid	-	-	-
Methanol	MeOH	Sigma Aldrich	99,9%
Natrium- <i>L</i> -ascorbat	-	Sigma Aldrich	-
Natriumdodecylsulfat	SDS	Alfa Aesar	99%
Oregon Green 488® Cadaverin	OG	Invitrogen	-
Pentafluorphenol	PFP	Apollo Scientific	99%
Phenylmagnesiumchlorid	-	Acros	0,8 M in THF
Phosphate-buffered saline	PBS	Fischer BioReagents	-
Poly(<i>D,L</i> -lactid) $M_w=28.000$ g/mol	PDLLA-28	Sigma Aldrich	-
Poly(<i>D,L</i> -lactid) $M_w=120.000$ g/mol	PDLLA-120	Sigma Aldrich	-
Poly(<i>L</i> -lactid) $M_w=126.000$ g/mol	PLLA	Biomer	-
Propargylamin	-	Sigma Aldrich	98%
Propargyl-PEG ₃ -amin	-	BroadPharm	95%

Name	Abkürzung	Anbieter	Reinheit
Schwefelkohlenstoff	CS ₂	Sigma Aldrich	99%
Sephadex® G25	-	Sigma Aldrich	-
Sephadex® G75	-	Sigma Aldrich	-
Styrol	S	Merck	99%
Tetrabutylammoniumbromid	TBAB	Sigma Aldrich	99%
Tetrahydrofuran	THF	Sigma Aldrich	99,9%
Texas Red® Cadaverine	TR	Invitrogen	-
Triethylamin	TEA	Sigma Aldrich	-
Toluol	-	Sigma Aldrich	99,7%
Tyramin	-	Sigma Aldrich	99%

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders vermerkt, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden je nach Notwendigkeit vor Gebrauch nach Standardverfahren getrocknet und destilliert. Alle Initiatoren wurden vor Gebrauch aus Diethylether oder Methanol umkristallisiert.

Dünnschichtchromatographische Analysen wurden auf Silica-Gel beschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck durchgeführt. Säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte unter Verwendung von Silica-Gel der Firma Macherey-Nagel (0.063-0.2 mm/20-230 mesh). Die Monomere wurden vor Verwendung mittels Aluminiumoxid von Stabilisatoren befreit. Es wurde durchweg Millipore-Wasser verwendet.

5.2 Mess- und Analysemethoden

5.2.1 Kernresonanz-Spektroskopie

Messungen der ^1H und ^{13}C -Spektren wurden mit Hilfe eines Bruker 300 und 400 (Ultrashield TM) sowie an einem Bruker 300 Advance III HD (Bruker, Billerica, Ma, United States) mit einer Frequenz von 300 MHz und 400 MHz (^1H) bzw. 75 MHz und 100 MHz (^{13}C) aufgenommen. ^{19}F -NMR Spektren wurden bei 400 MHz an einem Bruker DRX 400 NMR-Gerät vermessen. Alle aufgeführten Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm im Vergleich zu Tetramethylsilan/ Trichlorfluormethan ($\delta=0$) als Standard angegeben und auf den jeweiligen Lösungsmittelpeak normiert. Mittels MestReNova 7 wurde die Spektrenauswertung durchgeführt.

5.2.2 FT-IR-Spektroskopie

Die Infrarotspektren wurden mit dem ATR-FT-IR-Spektrometer Perkin Elmer 100 FTIR aufgenommen. Hierbei wurden ca. 0,5 mg der Proben gelöst in leicht flüchtigen Lösungsmittel (200 μL) oder als Öle direkt auf den Messkristall aufgetragen.

5.2.3 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden an einem Jasco V-630 Spektrometer gemessen. Dabei wurde die Absorption der Proben in einer Quarzküvette mit 1 cm Länge im angegebenen Wellenlängenbereich vermessen.

5.2.4 ESI-Massenspektroskopie

Die ESI-Massenspektren wurden mittels eines Navigator Instrument der Firma Thermoelectrics bei einer Probenkonzentration von 0,1 mg/mL, einer Flussrate von 0,75 mL/min, einer Cone-Voltage von 70 V, 45 V oder 35 V und einem Stickstoffstrom von 300 L/h aufgenommen.

5.2.5 Gelpermeationschromatographie

Die GPC-Messungen erfolgten in THF bei einer Konzentration von 2-4 mg/ml. Die Elugramme wurden mit einer GPC-Anlage bestehend aus Jasco PU-980 Pumpe, Jasco RI-930 Brechungsindexdetektor, Jasco UV-970 UV-Detektor und einem TriStar Mini Dawn Lichtstreuendetektor aufgenommen. Säulenmaterial wurde von der Firma MZ-Gel mit einer Porengröße von 10^3 - 10^4 Å verwendet. Die Messungen wurden bei einer konstanten Flussrate von 1,0 mL/min durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte zuvor mit Polystyrol-Standards der Firma POLYMER STANDARD SERVICES.

5.2.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die REM-Aufnahmen wurden mittels Zeiss 1530 Gemini Rasterelektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) bei Beschleunigungsspannungen von 0,1 kV bis 1 kV aufgenommen. Dafür wurden verdünnte Proben auf Si-Wafer aufgetropft und über Nacht getrocknet.

5.2.7 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei Messung an einem Nicomp 380 (Nicomp Particle Sizing Systems, USA) wurde bei einem Rückstreuwinkel von 90° gearbeitet. Die Messung der Polymerteilchen erfolgte für die in Wasser redispergierten Proben in einer Polystyrol-Einwegküvette. Dabei wurden 40 μ L der Probe in 1 mL Wasser verdünnt und bei 20 °C gemessen.

Des Weiteren fanden Messungen an einer Apparatur, bestehend aus einem HeNe Laser (632.8 nm, 25 mW output power), einem ALV-CGS 8F SLS/ DLS 5022F Goniometer, der mit acht gleichzeitig funktionierenden ALV 7004 Korrelatoren ausgestattet ist und acht QEAPD Avalanche Photodioden Detektoren besitzt, statt.

5.2.8 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die FCS-Messungen wurden am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Kooperation mit Prof. XXXXXXXXXX durchgeführt. Dafür wurde ein

kommerzieller FCS-Aufbau der Firma Olympus verwendet. Dieser bestand aus einem Olympus IX70/Fluo View300 Aufbau mit PicoQuant FCS Erweiterung und einem Olympus UPLSAPO 60x/1,2 W Corr Modul. Die mit Oregon Green Cadaverin 488®-markierten Folat-Polymer-Konjugate wurden mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission nach Passage durch einen LP Long Pass Filter aufgenommen. Dafür kam eine Avalanche-Photodiode zum Einsatz. Als Probenkammer wurde eine 8-Well-Polystyrolplatte mit Glasdeckelboden der Firma Laboratorytek Nalge Nunc International verwendet. Die Probenkonzentrationen wurden an die Blutkonzentrationen von PHPMA, Folat-PHPMA-Konjugat (0,02 mg/mL) sowie an das Blockadereagenz (0,04 mg/mL) angepasst. Die präparierten Proben wurden innerhalb von 5 Minuten 10 mal vermessen. Die aufgenommene Fluoreszenz-Intensitätsfluktuation konnte als gemittelte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ausgegeben werden. Zur Kalibrierung wurde vor dem Messzyklus eine wässrige Stammlösung aus Alexa-488 mit bekanntem Diffusionskoeffizient vermessen.

5.2.9 *Ex vivo* Biodistribution

Für *ex vivo* Biodistributionsstudien wurden die ^{18}F -markierten Folat-HPMA-Konjugate (1 mg in 1 mL isotonischer Kochsalzlösung, 5,5-23,7 MBq) intravenös (i.v.) in eine Schwanzvene injiziert. Nach 120 min oder 240 min (p.i.) wurden die Tiere getötet und die Aktivitätsverteilung in den einzelnen Organen (Niere, Leber, Lunge, Milz, Herz, Muskel, Darm, Hoden und Blut) sowie den Tumoren mittels eines Perkin Elmer 2470 Wizard2 γ -counters bestimmt. Es wurde dabei die prozentuale injizierte Dosis pro Gramm Gewebe (%ID/g) berechnet.

5.2.10 *In vivo* Kleintier-PET

Für die PET-Messungen wurden die Tiere mittels Isofluran (3%) in Narkose versetzt und anschließend die ^{18}F -markierten Polymere/Kolloide in eine Schwanzvene injiziert. Die Kleintier-PET-Aufnahmen wurden an einem Focus 120 small animal PET (Siemens/Concorde, Knoxville, USA) durchgeführt. Dynamische Messungen

wurden im Listmode durchgeführt. Für Blockadestudien wurde native Folsäure (2 mg/kg) 3 min vor Traceradministration verabreicht. Es wurden 2-20 MBq in 9-900 µL isotonischer Kochsalzlösung injiziert. Rekonstruktionen wurden unter Verwendung des OSEM2D Algorithmus durchgeführt. Nach Definition von Volumes-of-interest (VOIs) und Referenzgeweben konnten Zeitaktivitätskurven (engl. time activity curves, TACs) berechnet werden.

5.2.11 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die Methode der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie wurde von Dr. [REDACTED] durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines Leica TCS SP5 II Mikroskops, ausgestattet mit folgenden Laser-Kombinationen: Argon: 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm; DPSS: 561 nm; HeNe: 594 nm, 633 nm. Für die Aufnahmen wurde ein Öl-Objektiv HCX PL APO CS 63' /1.4-0.6 verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte unter Verwendung der Software LAS AF 2.6.0.7266 von Leica.

5.2.12 Durchflusszytometrie

HeLa-Zellen wurden mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag erfolgte die Partikelinkubation (150 µg/mL) über 1 und 8 h. Nach Inkubation wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS mit 400 µL/Well Trypsin abgelöst und der Verdauungsprozess mit jeweils 400 µL/Well Medium gestoppt. Die Analyse mittels Durchflusszytometer (CyFlow ML) wurde von Dr. [REDACTED] durchgeführt und mittels der Software FCSExpress V4 ausgewertet.

5.2.13 Toxizitätstest via MTS-Assay

Zellviabilitätsmessungen mit Hilfe des MTS-Assays wurden gemäß dem Protokoll von CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA) von Dr. [REDACTED] durchgeführt. MTS (3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-Salz) wird NADH-

abhängig von Zellen in Formazan umgesetzt. Dabei wird MTS unter Oxidation des NADH in NAD⁺ zu Formazan reduziert, welches in Zellkulturmedien löslich ist. Die Konzentration des gefärbten Formazans wurde am Mikrotiterplattenleser (Infinite M1000) photometrisch bei einer Absorption von 490 nm bestimmt. Dabei ist das Absorptionssignal proportional zur Anzahl lebender Zellen.

5.3 Informationen zur verwendeten Zelllinie

1951 wurde die Zelllinie HeLa aus dem Gebärmutterhalskrebs von **Henrietta Lacks**, einer Afroamerikanerin, die mit 31 Jahren ihrer Krankheit erlag, etabliert. Die Anfangsbuchstaben ihres Namens dienen der Bezeichnung der Zelllinie. HeLa-Zellen sind epitheloide Zellen, welche in Monolagen wachsen, eine hohe Proliferationsrate aufweisen und kontinuierlich kultiviert werden.

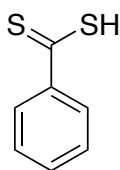
5.4 Informationen zu verwendeten Tieren und Tumoren

Für Kleintierexperimente wurde die Walker-256 Brustkrebskarzinom Zelllinie verwendet. Die Zellen wurden im RPMI Medium, welches 10 mM *L*-Glutamin und 10% FBS beinhaltet, bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Männliche Wistar Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld, Germany; Körpergewicht 180 g bis 400 g) wurden für die Tumorimplantation verwendet. Es wurden jeweils 0,4 mL (ca. 10⁴ Zellen/μL) subkutan in den Fußrücken der Hinterläufe inokuliert. Die Tiere wurden verwendet, sobald der Tumor eine Größe von 0,5 mL bis 4,0 mL besaß, was nach ca. 7-14 Tagen erreicht werden konnte. Für die Untersuchungen zur Körperverteilung der Kolloide wurden C57BL/6 Mäuse (Charles River Wiga, Sulzfeld, Germany; Körpergewicht 25 g bis 35 g) verwendet. Alle Experimente wurden vom regionalen Tier-Ethik-Komitee genehmigt und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie den UKCCCR Richtlinien durchgeführt.²⁰²

5.5 Syntheseschritte zur Darstellung HPMA-basierter Polymere

5.5.1 Synthese des Kettentransferreagenz 4-Cyano-4-((thio-benzoyl)sulfanyl)-pentansäure (Säure-CTA)

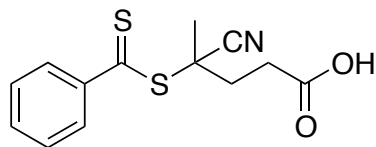
5.5.1.1 Synthese der Dithiobenzoessäure



In einem 250 mL Dreihalskolben mit Tropftrichter und Rührfisch wurde unter Stickstoffatmosphäre Phenylmagnesiumchlorid (22,40 g; 0,157 mol; 86 mL) in 155 mL absolutiertem THF gelöst. Anschließend wurde durch ein Septum unter N₂-Atmosphäre Schwefelkohlenstoff in einen Tropftrichter gegeben. Das CS₂ (11,95 g; 0,157 mol; 17,2 mL) wurde daraufhin langsam der Grignard-Lösung zugegeben, sodass diese nicht zu stark siedete. Dabei verfärbte sich das Reaktionsgemisch zu einer rot-braunen Lösung. Nach vollständiger Zugabe wurde noch eine Stunde weitergerührt und die Lösung auf Eis gegossen. Anschließend wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 angesäuert und mehrfach mit Diethylether (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, wodurch eine sehr viskose violette Lösung an Dithiobenzoessäure (22,1 g; 0,144 mol, 92% d. Th.) entstand, die direkt in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 8,03 (d, 2H, o-ArH); 7,57 (t, 1H, p-ArH); 7,39 (t, 2H, m-ArH).

5.5.1.2 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)-pentansäure (Säure-CTA)



In einem 250 mL Rundkolben mit Rührfisch wurden Dithiobenzoesäure (22,1 g; 0,144 mol) und 4,4'-Azo-bis-(cyanovaleriansäure) (31,1 g, 0,111 mol) in 280 mL Ethylacetat gelöst. Dabei bildete sich eine rot-schwarze Suspension, die anschließend viermal sekuriert wurde. Anschließend wurde die Lösung für 12 h unter Rückfluss gerührt und die Umsetzung dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 16 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Chloroform:Ethanol; 30:1).

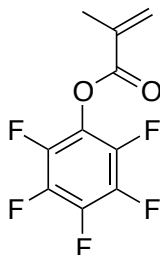
Es wurde ein pink-roter Feststoff an 4-Cyano-4-thiobenzoylsulfanylpentansäure (12,81 g; 0,046 mol; 65%) isoliert.

$R_f = 0,39$ (CHCl_3 :EtOH; 20:1 ; 254 nm).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ [ppm] = 7,91 (d, 2H, o-ArH); 7,57 (t, 1H, p-ArH); 7,39 (t, 2H, m-ArH); 2,78-2,40 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 1,94 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ [ppm] = 219,55 ($-\text{CS}_2-$); 174,94 (COOH); 146,02 ($\text{C}_{\text{ipso-Ar}}$); 134,14 ($\text{C}_{\text{para-Ar}}$); 129,47 ($\text{C}_{\text{meta-Ar}}$); 127,65 ($\text{C}_{\text{ortho-Ar}}$); 119,68 ($-\text{CN}$); 46,97 ($-\text{C-CH}_3$); 33,29 ($\text{CH}_2-\text{C-CH}_3$); 29,81 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$); 24,18 ($-\text{CH}_3$).

5.5.2 Synthese des Monomers Pentafluorphenylmethacrylat



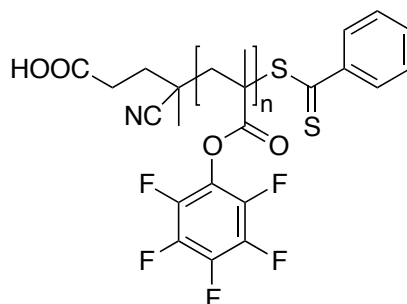
Es wurde Pentafluorphenol (29,82 g; 0,162 mol) in einem 500 mL Dreihalskolben in 300 mL absolutiertem Dichlormethan unter N₂-Atmosphäre gelöst. Anschließend wurde mittels eines Septums Triethylamin (16,90 g; 0,167 mol; 23 mL) als Hilfsbase hinzugegeben. Unter Eiskühlung wurde langsam Methacrylsäurechlorid (18,50 g; 0,177 mol; 17,28 mL) hinzugegeben, wobei sich unmittelbar ein weißer Feststoff absetzte. Nach vollständiger Zugabe des Reagenzes wurde für weitere 15 min bei 0 °C gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Der Feststoff wurde durch Ausschütteln mit destilliertem Wasser (4x30 mL) entfernt und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Man erhielt als Rohprodukt eine leicht gelbe Flüssigkeit, die im Anschluss einer Vakuumdestillation unterzogen wurde. Dabei wurde bei 42 °C und 1x10⁻³ mbar Pentafluorphenylmethacrylat (27,54 g; 0,109 mol; 67% d. Th.) als farblose Flüssigkeit isoliert.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 6,43 (s, 1H, C=CH₂-cis); 5,89 (s, 1H, C=CH₂-trans); 2,07 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ [ppm] = 164,03 (-CO₂-); 144,04 (C_{meta}-Ar); 141,90 (C_{ipso}-Ar); 140,12 (C_{para}-Ar); 137,96 (C_{ortho}-Ar); 134,21 (C=CH₂); 130,14 (C=CH₂); 18,16 (-CH₃).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = -153,32 (d, 2F, o-ArF); -158,70 (t, 1F, p-ArF); -163,02 (t, 2F, m-ArF).

5.5.3 Synthese von Poly-(Pentafluorphenylmethacrylat) (P(PFPMA))



In einem Schlenkkolben wurde Pentafluorphenylmethacrylat (3,0 g; 0,012 mol) in 5 mL absolutiertem Dioxan gelöst und anschließend, je nach Kettenlänge, mit entsprechenden Mengen an Säure-CTA und Radikalstarter 2,2'-Azo-bis-isobutyronitril (AIBN) versetzt. Beispielsweise wurde für **HP 1** Säure-CTA (50,0 mg; 0,179 mmol) und AIBN (2,94 mg; 0,0179 mmol) verwendet. Anschließend wurde dreimal sekuriert. Die Polymerisation wurde über Nacht bei 70 °C durchgeführt. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Schlenkkolben belüftet und das entstandene Polymer in *n*-Hexan (70 mL) gefällt. Dabei präzipitierte das Polymer als hellrosafarbener Feststoff. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand dekantiert, der Feststoff in 5 mL Dioxan wieder aufgenommen und erneut in *n*-Hexan (70 mL) gefällt. Dieser Prozess wurde insgesamt dreimal wiederholt, um restliche Monomerspuren zu entfernen. Das aufgereinigte Polymer wurde anschließend über Nacht im Vakuumofen bei 40 °C und 10 mbar getrocknet. Es konnte so ein rosafarbener Feststoff von Poly(Pentafluorphenylmethacrylat) P(PFPMA)₅₇ (2,37 g; 79% d. Th.) erhalten werden.

$$M_n = 14.700 \text{ g/mol}$$

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 2,60–1,90 (br, 2H, -CH₂- (Polymerrückgrad)), 1,65 – 1,18 (br, 3H, -CH₃ (Polymerrückgrad)).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = -150,88 (br, 1F, o-ArF); -151,75 (br, 1F, o-ArF); -157,39 (s, 1F, p-ArF); -162,51 (s, 2F, m-ArF).

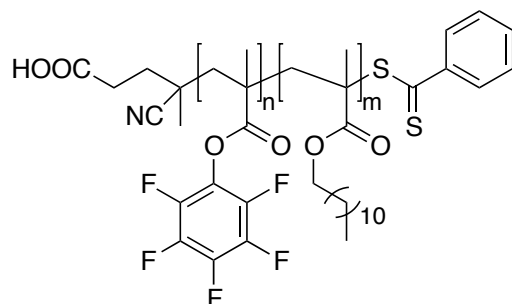
FT-IR: ν [cm⁻¹] = 1772 (m, C=O); 1515 (s, C=C); 1471 w; 1249 w; 1050 (s, C-O); 989 s.

Neben der vorgestellten Versuchsvorschrift wurden weitere Ansätze für die Homopolymerisation von Pentafluorphenylmethacrylat durchgeführt. Es wurde analog zu 5.5.3 verfahren, die eingesetzten Mengen sowie erhaltenen Molekulargewichte M_n sind in Tabelle 20 angegeben.

Tabelle 20. Ansatzgrößen der PFPMA-Homopolymerisationen **HP 2-7**

Name	PFPMA	Säure-CTA	AIBN	M_n in g/mol	Ausbeute
HP 2	3 g (0,012 mol)	48 mg (1,72x10 ⁻⁴ mol)	2,82 mg (1,72x10 ⁻⁵ mol)	14.900	57%
HP 3	3 g (0,012 mol)	45 mg (1,61x10 ⁻⁴ mol)	2,64 mg (1,61x10 ⁻⁵ mol)	15.500	55%
HP 4	3 g (0,012 mol)	44 mg (1,57x10 ⁻⁴ mol)	2,58 mg (1,57x10 ⁻⁵ mol)	15.600	58%
HP 5	3 g (0,012 mol)	18 mg (6,44x10 ⁻⁵ mol)	1,10 mg (0,67x10 ⁻⁵ mol)	25.500	47%
HP 6	3 g (0,012 mol)	16 mg (5,73x10 ⁻⁵ mol)	0,94 mg (0,57x 0 ⁻⁵ mol)	33.000	53%
HP 7	3 g (0,012 mol)	13 mg (4,65x10 ⁻⁵ mol)	0,76 mg (0,46x10 ⁻⁵ mol)	36.100	56%
HP 8	3 g (0,012 mol)	96 mg (3,44x10 ⁻⁴ mol)	5,60 mg (3,44x10 ⁻⁵ mol)	12.800	80%
HP 9	3 g (0,012 mol)	7 mg (2,51x10 ⁻⁵ mol)	0,40 mg (2,51x10 ⁻⁶ mol)	64.000	59%
HP 10	3 g (0,012 mol)	27 mg (9,66x10 ⁻⁵ mol)	1,98 mg (1,21x10 ⁻⁵ mol)	20.100	44%
HP 11	3 g (0,012 mol)	5 mg (1,25x10 ⁻⁵ mol)	0,35 mg (1,57x10 ⁻⁶ mol)	64.100	27%

5.5.4 Synthese von PFPMA/LMA-basierten Block-Copolymeren



In einem 25 mL Schlenkkolben mit Rührfisch wurden der Makro-CTA **HP 1** P(PFPMA)₅₇ (1 g; 6,80x10⁻⁵ mol), AIBN (1,86 mg; 1,13x10⁻⁵ mol) und Laurylmethacrylat (0,112 g; 4,41x10⁻⁴ mol) in 7 mL absolutiertem Dioxan gelöst und drei Sekurierzyklen unterzogen. Danach wurde der schwach pinkfarbene Ansatz bei 70 °C für 75 h kräftig gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Schlenkkolben belüftet und das entstandene Polymer in Ethanol (70 mL) gefällt. Dabei präzipitierte das Polymer als schwach hellrosa gefärbter Feststoff. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand dekantiert, der Feststoff in 5 mL Dioxan wieder aufgenommen und erneut in Ethanol gefällt. Dieser Prozess wurde insgesamt dreimal wiederholt, um restliche Monomerspuren zu entfernen. Im Anschluss wurde zusätzlich in Diethylether (70 mL) gefällt, um restliche Initiatorsuren zu entfernen. Das aufgereinigte Polymer wurde anschließend über Nacht im Vakuumofen getrocknet. Man erhielt so einen schwach hellrosa gefärbten Feststoff von P(PFPMA)₅₇-*b*-P(LMA)₇ (960 mg; 86% d. Th.).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 3,90 (s, 2H, -O-CH₂-CH₂); 2,39 (br, 2H, -CH₂- (PFPMA-Polymerrückgrad)); 1,59 (s, 2H, -CH₂- (LMA-Polymerrückgrad)); 1,40 (s, 12H, -CH₂-(CH₂)₆-CH₂-), 1,25 (s, 3H, -CH₃ (Methyl-PFPMA-Rückgrad)), 1,00 (s, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 0,87 (s, 3H, -CH₂-CH₃), 0,84 (s, 3H, -CH₃ (Methyl-LMA-Rückgrad)).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = -150,87 (br, 1F, o-ArF); -151,75 (br, 1F, o-ArF); -157,35 (br, 1F, p-ArF); -162,42 (br, 2F, m-ArF).

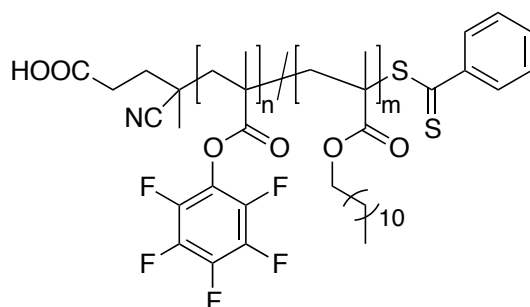
Neben der vorgestellten Versuchsvorschrift wurden noch weitere Ansätze für die Block-Copolymerisation von P(PFPMA) mit LMA angesetzt. Es wurde analog zu

5.5.4 verfahren, die eingesetzten Mengen sowie erhaltenen Molekulargewichte M_n sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21. Ansatzgrößen für PFPMA-LMA-Block-Copolymerisationen **BP 2-8**.

Name	Makro-CTA	LMA	AIBN	M_n in g/mol	Ausbeute
BP 2	1 g HP 3 ($6,45 \times 10^{-5}$ mol)	252 mg ($9,92 \times 10^{-4}$ mol)	1,77 mg ($1,08 \times 10^{-5}$ mol)	18.300	77%
BP 3	0,5 g HP 2 ($3,36 \times 10^{-5}$ mol)	216 mg ($8,50 \times 10^{-4}$ mol)	0,92 mg ($5,59 \times 10^{-6}$ mol)	18.600	82%
BP 4	0,5 g HP 4 ($3,21 \times 10^{-5}$ mol)	336 mg ($1,32 \times 10^{-4}$ mol)	0,88 mg ($5,34 \times 10^{-6}$ mol)	19.200	80%
BP 5	0,5 g HP 6 ($1,52 \times 10^{-5}$ mol)	56 mg ($2,20 \times 10^{-4}$ mol)	0,41 mg ($2,53 \times 10^{-6}$ mol)	35.500	68%
BP 6	0,5 g HP 6 ($1,52 \times 10^{-5}$ mol)	126 mg ($4,96 \times 10^{-4}$ mol)	0,41 mg ($2,53 \times 10^{-6}$ mol)	35.000	71%
BP 7	0,5 g HP 5 ($1,96 \times 10^{-5}$ mol)	216 mg ($8,50 \times 10^{-4}$ mol)	0,54 mg ($3,27 \times 10^{-6}$ mol)	31.000	69%
BP 8	0,5 g HP 7 ($1,39 \times 10^{-5}$ mol)	56 mg ($2,20 \times 10^{-4}$ mol)	0,38 mg ($2,31 \times 10^{-6}$ mol)	41.000	65%

5.5.5 Synthese von PFPMA/LMA-basierten statistischen Copolymeren



In einem 25 mL Schlenkkolben mit Rührfisch wurden für **SP 1** PFPMA (1,5 g; $5,95 \times 10^{-3}$ mol), Säure-CTA (38 mg; $1,36 \times 10^{-4}$ mol), Laurylmethacrylat (167 mg; $6,56 \times 10^{-4}$ mol) und AIBN (2,8 mg; $1,70 \times 10^{-5}$ mol) in 4 mL absolutiertem Dioxan gelöst und drei Sekurierzyklen durchgeführt. Danach wurde der schwach pinkfarbene Ansatz bei 70 °C für 75 h kräftig gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Schlenkkolben belüftet und das entstandene Polymer in *n*-Hexan (70 mL) gefällt. Dabei präzipitierte das Polymer als schwach hellrosa gefärbter Feststoff. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand dekantiert, der Feststoff in wenige Milliliter Dioxan wieder aufgenommen und erneut in *n*-Hexan (70 mL) gefällt. Dieser Prozess wurde insgesamt dreimal wiederholt, um restliche Monomerspuren zu entfernen. Das aufgereinigte Polymer wurde anschließend über Nacht im Vakuumofen getrocknet. Man erhielt so einen schwach hellrosa gefärbten Feststoff von Poly(pentafluorphenylmethacrylat)-co-Poly(laurylmethacrylat) P(PFPMA)₆₂-co-P(LMA)₇ (1,24 g; 74% d. Th.).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 4,02 (s, 2H, -O-CH₂-CH₂); 2,41 (br, 2H, -CH₂- (Polymerrückgrad)); 1,44 (br, 20H, -CH₂-(CH₂)₁₀-CH₂-); 1,21 (br s, 3H, -CH₃ (Methyl-Polymerrückgrad)); 0,85 (br t, 3H, -CH₃).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = -150,87 (br, 1F, o-ArF); -151,75 (br, 1F, o-ArF); -157,35 (br, 1F, p-ArF); -162,42 (br, 2F, m-ArF).

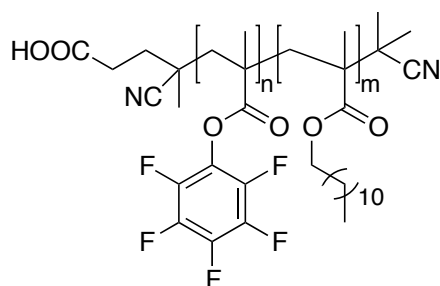
Neben der vorgestellten Versuchsvorschrift wurden noch weitere Ansätze für die Copolymerisation von PFPMA und LMA angesetzt. Es wurde analog zu 5.5.5

verfahren, die eingesetzten Mengen sowie die erhaltenen Molekulargewichte M_n sind in Tabelle 22 angegeben.

Tabelle 22. Ansatzgrößen für statistische PFPMA-LMA-Copolymerisation **SP 2-3**.

Name	PFPMA	CTA	LMA	AIBN	M_n in g/mol	Ausbeute
SP 2	1,5 g	26 mg	0,38 g	1,90 mg	22.000	58%
	$(5,95 \times 10^{-3}$ mol)	$(9,25 \times 10^{-5}$ mol)	$(1,50 \times 10^{-3}$ mol)	$(1,16 \times 10^{-5}$ mol)		
SP 3	1,5 g	35,0 mg	1,00 g	2,57 mg	20.000	80%
	$(5,95 \times 10^{-3}$ mol)	$(1,25 \times 10^{-4}$ mol)	$(3,94 \times 10^{-3}$ mol)	$(1,57 \times 10^{-5}$ mol)		

5.5.6 Entfernung der Endgruppe der PFPMA-LMA-Copolymere mittels AIBN



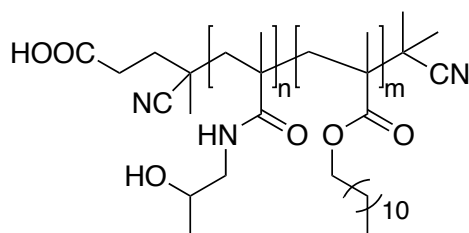
Die Endgruppenabkochung verlief nach der allgemeinen Vorschrift, bei der jeweils 200 mg der verschiedenen Reaktivester-Copolymere **HP 1-7** und **SP 1-3** eingewogen und mit 5 mL absolutem Dioxan versetzt wurden. Anschließend wurde der Radikalstarter 2, 2'-Azo-bis-isobutyronitril im Überschuss (25 Äquivalente) zugesetzt. Es wurde 5 Stunden bei 80 °C gerührt und im Anschluss zur Aufarbeitung im Fall der Block-Copolymere in einem Gemisch aus Ethanol/Diethylether (2:1) (70 mL) und im Fall der statistischen Copolymere in einem Gemisch aus *n*-Hexan/Ether (2:1) (70 mL) gefällt. Die Reaktion verlief quantitativ und führte zu **HP 1-7-M** und **SP 1-3-M**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ [ppm] = 3,90 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 2,39 (br, 2H, $-\text{CH}_2-$ (PFPMA-Polymerrückgrad)); 1,59 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$ (LMA-Polymerrückgrad)); 1,40 (s,

12H, $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-$), 1,25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ (Methyl-PFPMA-Rückgrad)), 1,00 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 0,87 (s, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 0,84 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ (Methyl-LMA-Rückgrad)).

^{19}F -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = -150,87 (br, 1F, o-ArF); -151,75 (br, 1F, o-ArF); -157,35 (br, 1F, p-ArF); -162,42 (br, 2F, m-ArF).

5.5.7 Synthese von HPMA/LMA-basierten Copolymeren

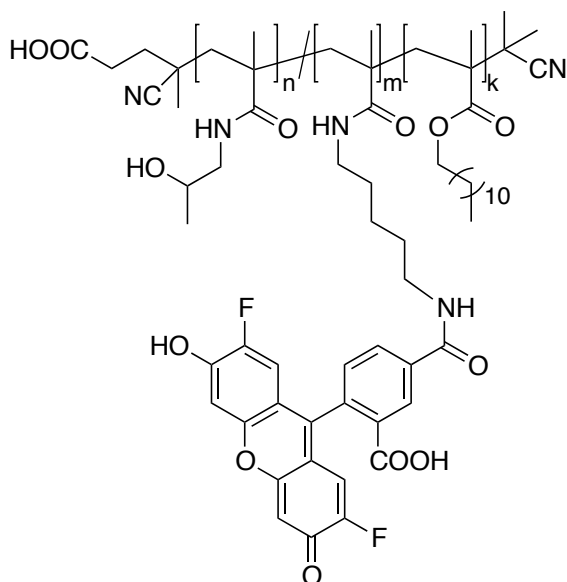


Die polymeranaloge Umsetzung wird am Beispiel von **BP 1-M** erläutert. **BP 1-M** (100 mg; $6,45 \times 10^{-6}$ mol) wird in 2 mL absolutiertem Dioxan gelöst. Es wurde 2-Hydroxypropylamin (29,76 mg; $3,97 \times 10^{-4}$ mol) und Triethylamin (80,20 mg; $7,94 \times 10^{-4}$ mol) hinzugegeben und anschließend für 24 h bei 40 °C unter N_2 -Atmosphäre gerührt. Nach 16 h wurde der Reaktionsmischung erneut 2-Hydroxypropylamin (59,52 mg; $7,94 \times 10^{-4}$ mol) und Triethylamin (160,40 mg; $1,588 \times 10^{-3}$ mol) zugesetzt und über Nacht weitergerührt. Mit Hilfe der ^{19}F -NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die Abspaltung des Reaktivesters vollständig war. Die Polymere wurden in Diethylether (70 mL) gefällt. Daraufhin wurde für 72 h gegen destilliertes Wasser dialysiert, um alle Rückstände zu entfernen und abschließend lyophilisiert. Diese Vorgehensweise war für alle weiteren P(PFPMA)-P(LMA)-Copolymere bezüglich der eingesetzten Äquivalente an 2-Hydroxypropylamin und Triethylamin analog.

^1H -NMR (DMSO-d_6 , 300 MHz): δ [ppm] = 7,21 (br, 1H, $-\text{NH}-$); 4,71 (s, 1H, $-\text{OH}$); 3,67 (br s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3\text{OH}$); 2,92 (s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$); 1,56-0,55 (br, 40H, $-\text{CH}_3$ (Methyl-Polymerrückgrad); $-\text{CH}_2-$ (Polymerrückgrad); $-\text{CH}_3$ (HPMA), $-\text{CH}_2-$ (LMA), $-\text{CH}_3$ (LMA)).

5.5.8 Funktionalisierung HPMA/LMA-basierter Block-Copolymere

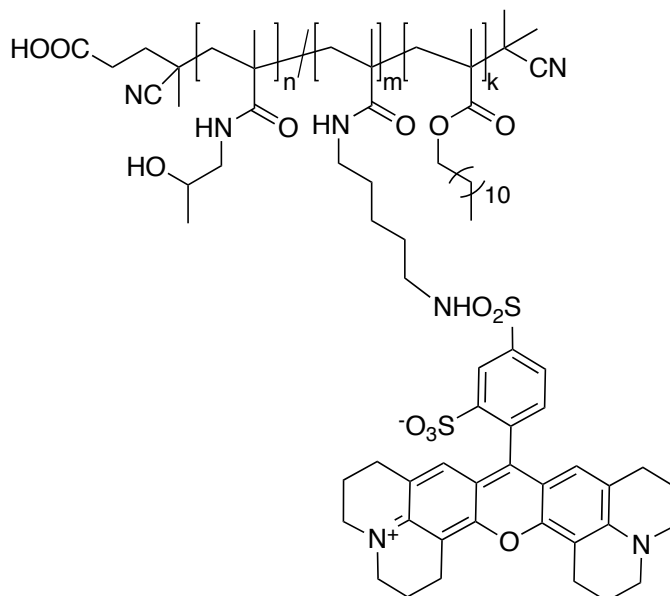
5.5.8.1 Fluoreszenzmarkierung mit Oregon Green® 488 Cadaverin



Für die Fluoreszenzmarkierung wurden im Beispiel von **BP 1-M** (100 mg; $6,45 \times 10^{-6}$ mol) in 4 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurde Oregon Green 488 Cadaverin (1,99 mg; $4,01 \times 10^{-6}$ mol) gelöst in 1,5 mL Dioxan und 1 ml DMSO sowie Triethylamin (0,81 mg; $8,02 \times 10^{-6}$ mol) zugegeben und bei 40 °C für 8 h gerührt. Es wurde analog zu 5.5.7 mit der Zugabe des 2-Hydroxypropylamins sowie der äquivalenten Menge des Triethylamins, verfahren.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ [ppm] = 7,21 (br, 1H, -NH-); 4,71 (s, 1H, -OH); 3,67 (br s, 1H, -CH₂-CH-CH₃OH); 2,92 (s, 2H, -NH-CH₂-CH-); 1,56 - 0,55 (br, 40H, -CH₃ (Methyl-Polymerrückgrad); -CH₂- (Polymerrückgrad); -CH₃ (HPMA), -CH₂- (LMA), -CH₃ (LMA)).

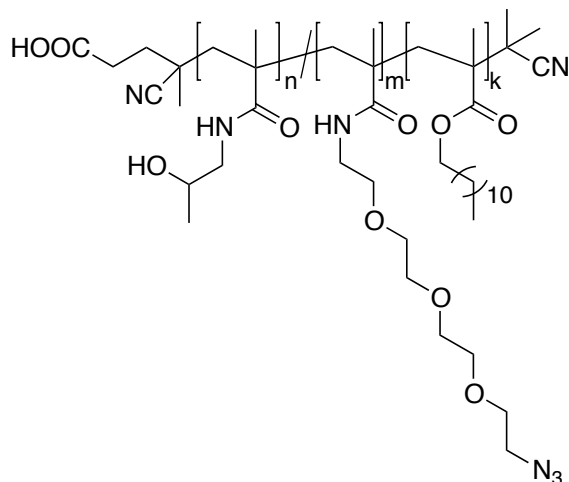
5.5.8.2 Fluoreszenzmarkierung mit Texas Red® cadaverin



Für die Fluoreszenzmarkierung mit Texas Red® cadaverin wurde beispielhaft **BP 1-M** (100 mg; $6,45 \times 10^{-6}$ mol) in 4 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurde der Farbstoff Texas Red® cadaverin (2,7 mg; $4,01 \times 10^{-6}$ mol), gelöst in 1 ml DMSO sowie Triethylamin (0,81 mg; $8,02 \times 10^{-6}$ mol) zugegeben und bei 40 °C für 8 h gerührt. Es wurde wie unter 5.5.7 beschrieben mit der Zugabe des 2-Hydroxypropylamins sowie der äquivalenten Menge des Triethylamins, verfahren.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ [ppm] = 7,21 (br, 1H, -NH-); 4,71 (s, 1H, -OH); 3,67 (br s, 1H, -CH₂-CH-CH₃OH); 2,92 (s, 2H, -NH-CH₂-CH-); 1,56-0,55 (br, 40H, -CH₃ (Methyl-Polymerrückgrad); -CH₂- (Polymerrückgrad); -CH₃ (HPMA), -CH₂- (LMA), -CH₃ (LMA)).

5.5.8.3 Einführung des PEG-Azid-Spacers mittels polymeranaloger Umsetzung

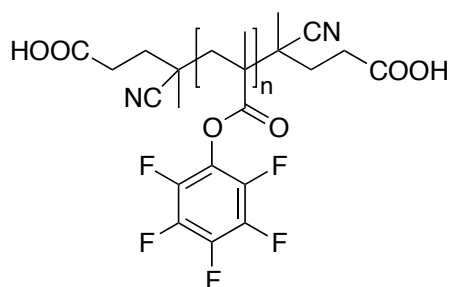


Für die Einführung des PEG-N₃-Spacers wurde beispielhaft **BP 1-M** (100 mg; 6,45x10⁻⁶ mol) in 3 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurde der PEG-N₃-Spacer (7,8 mg; 3,57x10⁻⁵ mol) sowie Triethylamin (7,21 mg; 7,14x10⁻⁵ mol) zugegeben und bei 40 °C für 16 h gerührt. Es wurde wie unter 5.5.7 beschrieben mit der Zugabe des 2-Hydroxypropylamins sowie der äquivalenten Menge des Triethylamins, verfahren.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 7,21 (br, 1H, -NH-); 4,71 (s, 1H, -OH); 3,85-3,67 (br s, 1H, -CH₂-CH-CH₃OH); ; 3,60-3,22 (br, 16H, OEG); 2,92-2,65 (s, 2H, -NH-CH₂-CH-); 2,35-0,55 (br, 45H, -CH₃ (Methyl-Polymerückgrad); -CH₂- (Polymerückgrad); -CH₃ (HPMA), -CH₂- (LMA), -CH₃ (LMA)).

5.5.9 Synthese von Folat-HPMA-Konjugaten

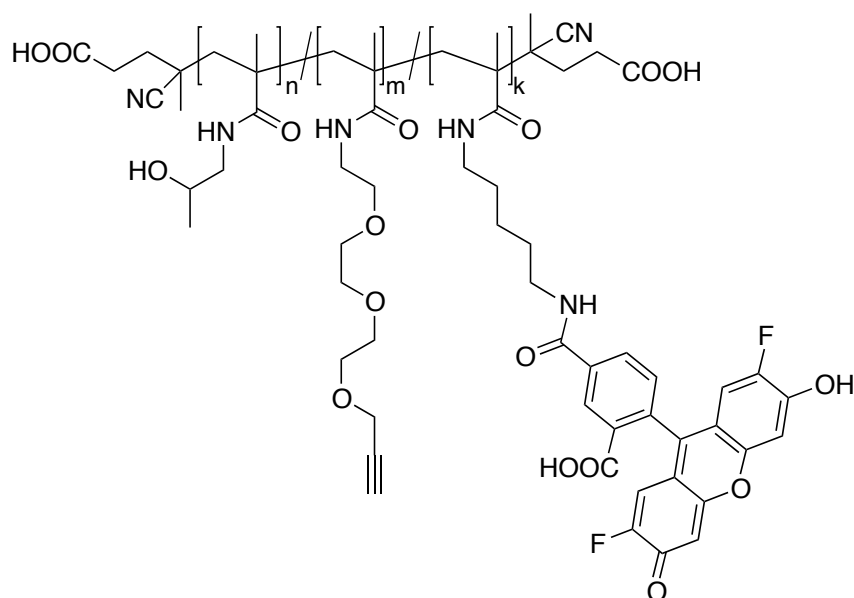
5.5.9.1 Entfernung der Dithioester-Endgruppe mittels ACVA



Menge des Triethylamins, verfahren. So konnten **P 21** (68% d. Th.) und **P 22** (59% d. Th.) hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 7,04-6,89 (br, 2H, m-ArH); 6,76-6,60 (br, 2H, o-ArH); 4,83-4,50 (br s, 1H, -OH); 4,22-4,06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 3,90-3,61 (br s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3\text{OH}$); 3,60-3,22 (br, 12H, OEG); 3,07-2,72 (br s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$); 2,40-0,60 (br, 23H $-\text{CH}_3$ (Methyl-Polymerrückgrad); $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Ar}$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-$ (Polymerrückgrad); CH_3 (HPMA)).

5.5.9.3 Fluoreszenzmarkierung mit Oregon Green® 488 Cadaverin und Einführung des PEG-Alkin-Spacers

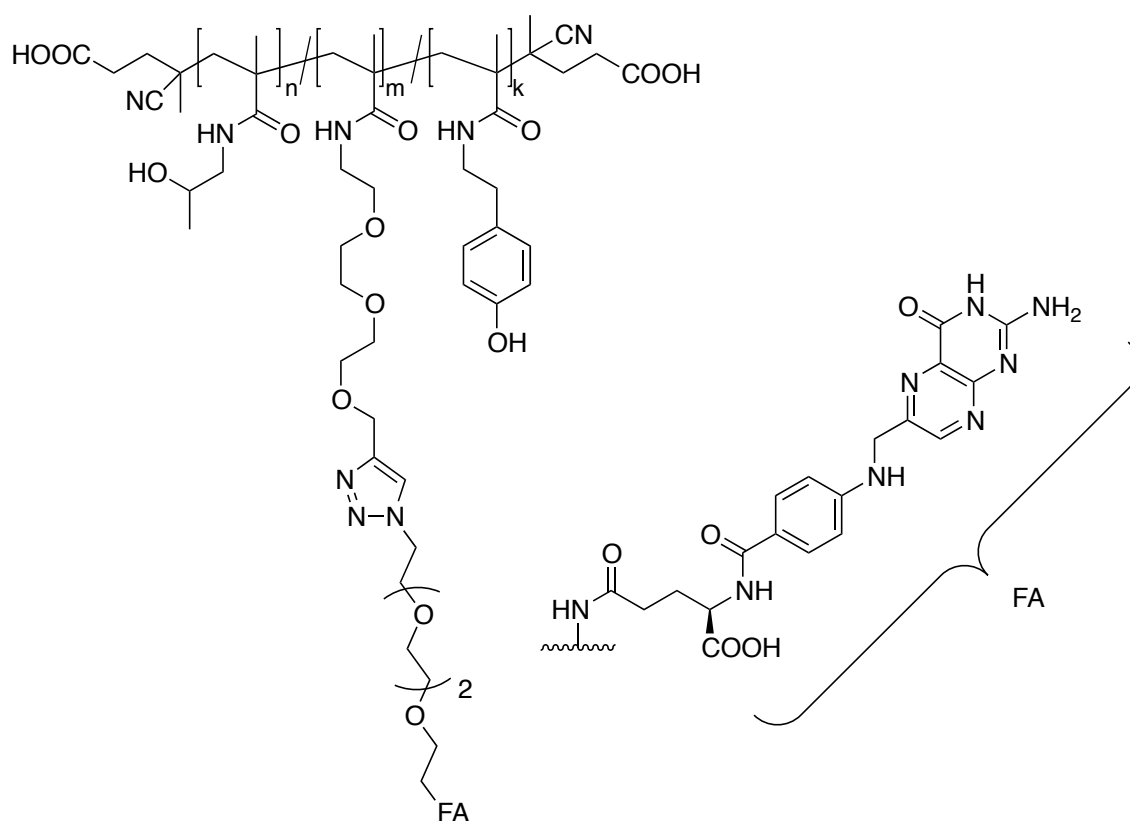


Für die Fluoreszenzmarkierung mit Oregon Green® 488 Cadaverin und die Einführung des PEG-Alkin-Spacers wird mit der Unterschusskomponente, dem 1%igen Einbau von Oregon Green® 488 Cadaverin, begonnen. Dazu wurde **HP 8-M** (66 mg; $5,16 \times 10^{-6}$ mol) in 1,7 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurde Oregon Green® 488 Cadaverin (1,31 mg; $2,64 \times 10^{-6}$ mol), gelöst in 1 ml DMSO sowie Triethylamin (0,53 mg; $5,25 \times 10^{-6}$ mol) zugegeben und bei 40 °C für 12 h gerührt. Im Anschluss wurde der PEG-Alkin-Spacer (29,7 mg; $1,59 \times 10^{-4}$ mol) sowie Triethylamin (32,1 mg; $3,18 \times 10^{-4}$ mol) zugegeben und bei 40 °C für weitere 16 h gerührt. Es wurde wie unter 5.5.7 beschrieben mit der Zugabe des 2-Hydroxypropylamins sowie der äquivalenten

Menge des Triethylamins, verfahren. So konnten **P 23** (60% d.Th.) und **P 24** (31% d.Th.) hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 4,83-4,50 (br s, 1H, -OH); 4,22-4,06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 3,90-3,61 (br s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3\text{OH}$); 3,60-3,22 (br, 12H, OEG); 3,07-2,72 (br s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$); 2,40-0,60 (br, 14H $-\text{CH}_3$ (Methyl-Polymerrückgrad); $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-$ (Polymerrückgrad); CH_3 (HPMA)).

5.5.9.4 Anbindung von Folat mittels CuAAC

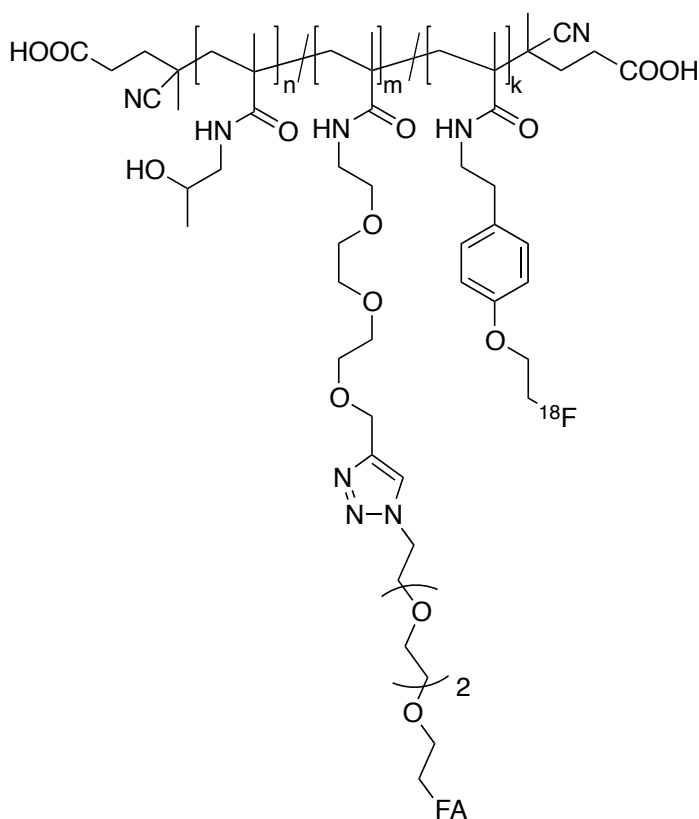


P 23 bzw. **P 24** (20 mg) wurden in PBS (500 μL) gelöst. Anschließend wurden Kupfer(II)sulfat (3,2 μg , 0,02 μmol) und Natrium-*L*-Ascorbat (39 μg , 0,2 μmol), in jeweils 500 μL gelöst, hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des in PBS (200 μL) gelösten Azid-Folats (0,1 mg; 0,15 μmol) wurde das Reaktionsgemisch für 16 h unter Lichtausschluss gerührt. Die Aufreinigung fand über eine GE PD-10 Desalting Säule (MWC 5000), konditioniert mit Milli-Q Wasser, statt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie und

Kaliumpermanganat-Färbung analysiert, sodass 15 mg (75% d. Th.) des Folat-HPMA-Konjugates **FA-P 21** bzw. **FA-P 22** erhalten werden konnten.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 7,04-6,89 (br, 2H, m-ArH); 6,76-6,60 (br, 2H, o-ArH); 4,83-4,50 (br s, 1H, -OH); 4,22-4,06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 3,90-3,61 (br s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3\text{OH}$); 3,60-3,22 (br, 28H, OEG); 3,07-2,72 (br s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$); 2,40-0,60 (br, 22H $-\text{CH}_3$ (Methyl-Polymerrückgrad); $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Ar}$, $-\text{CH}_2-$ (Polymerrückgrad); CH_3 (HPMA)).

5.5.9.5 Radiomarkierung von **FA-P 21** und **FA-P 22**



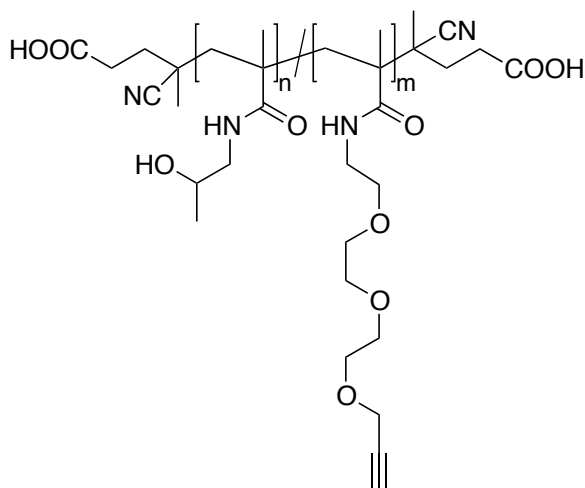
Die Radiomarkierung wurde analog zu Herth *et al.* durchgeführt.⁵⁵

Die Reaktionslösung wurde über eine GE HiTrap Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine, und einem Merck Hitachi System ausgestattet mit zwei L-7100 Pumpen, einem L-7400 UV Detektor, einer D-7000 D-Line, einem L-7250 Autosampler, einem L-7300 Säulenofen und einem Gina-Star Radiodetektor aufgereinigt. Laufmittel

dabei war isotonische Kochsalzlösung. Die radiochemische Ausbeute betrug für $[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P 21}$ $10\pm 2\%$ und für $[^{18}\text{F}]\text{FE-FA-P 22}$ $5\pm 3\%$.

5.5.10 Synthese von HPMA-Polymeren mit unterschiedlicher Anbindungschemie

5.5.10.1 Einführung des PEG-Alkin-Spacers



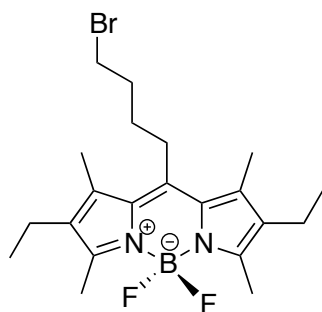
Für die Einführung des PEG-Alkin-Spacers wurde beispielhaft **HP 10-M** (200 mg; $1,06 \times 10^{-5}$ mol) in 4,5 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurden der PEG-Alkin-Spacers (14,9 mg; $7,94 \times 10^{-5}$ mol) sowie Triethylamin (16,2 mg; $1,59 \times 10^{-4}$ mol) zugegeben und bei 40 °C für 16 h gerührt. Es wurde wie unter 5.5.7 beschrieben mit der Zugabe des 2-Hydroxypropylamins sowie der äquivalenten Menge des Triethylamins, verfahren. So konnten **P 27** (47% d.Th.) und **P 28** (59% d. Th.) hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 4,83-4,50 (br s, 1H, -OH); 4,22-4,06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 3,90-3,61 (br s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3\text{OH}$); 3,60-3,22 (br, 12H, OEG); 3,07-2,72 (br s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$); 2,40-0,60 (br, 14H $-\text{CH}_3$ (Methyl-Polymerrückgrad); $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2-$ (Polymerrückgrad); CH_3 (HPMA)).

5.6 Herstellung BODIPY-markierter Styrolsysteme

5.6.1 Synthese von BODIPY-Methacrylat

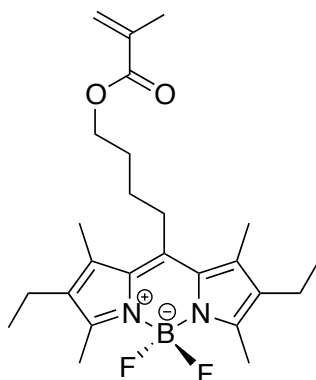
5.6.1.1 Synthese des halogenierten BODIPY-Vorläufers (F-C₄-BODIPY-Br)



Es wurden 2,4-dimethyl-3-ethylpyrrol (5 g; 0,04 mol) in 200 mL Dichlormethan in einem 500 mL-Dreihalskolben vorgelegt. Bei Raumtemperatur wurde tropfenweise 5-Bromvalerylchlorid (4,02 g; 0,02 mol; 2,7 mL) unter N₂-Atmosphäre zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 50 °C gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der rote ölige Rückstand wurde mit 150 mL Toluol, 15 mL Dichlormethan und 13 mL Triethylamin versetzt. Dabei färbte sich die Lösung von rot nach braun und wurde milchig. Anschließend wurde Diethylether-Bortrifluorid (18 mL) zugegeben und für weitere 1,5 h bei 50 °C gerührt. Dabei färbte sich die Lösung rot. Das Lösungsmittel wurde daraufhin im Vakuum entfernt und das entstandene rot, ölige Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan:Chloroform; 3:1). Es konnte ein intensiv orange fluoreszierender Feststoff an F-C₄-BODIPY-Br mit einer Ausbeute von 56% d. Th. isoliert werden.

$R_f = 0,46$ (Cyclohexan:Chloroform ; 2:1).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 3,48 (t, 2H, -CH₂-Br); 3,03 (m, 2H, -C-CH₂-CH₂); 2,52 (s, 6H, -C-CH₃); 2,42 (m, 4H, -C-CH₂-CH₃); 2,37 (s, 6H, N-C-CH₃); 2,09 (m, 2H, -CH₂-CH₂-Br); 1,83 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br); 1,07 (t, 6H, -CH₂-CH₃)

5.6.1.2 Synthese des BODIPY-Methacrylats (F-C₄-BODIPY-MA)

F-C₄-BODIPY-Br (372 mg; $8,47 \times 10^{-4}$ mol), Kaliummethacrylat (421 mg; $3,39 \times 10^{-3}$ mol) und Tetrabutylammoniumbromid (14 mg; $4,24 \times 10^{-5}$ mol) wurden in trockenem DMF gelöst und 65 h bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan:Chloroform; 3:1). So konnte F-C₄-BODIPY-MA mit einer Ausbeute von 62% d. Th. isoliert werden.

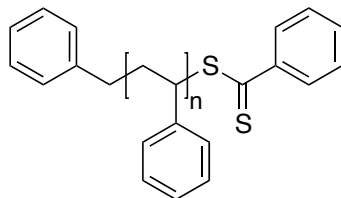
$R_f = 0,42$ (Cyclohexan:Chloroform; 2:1).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 6,08 (s, 1H, CH_{trans}); 5,56 (s, 1H, CH_{cis}); 4,22 (t, 2H, -CH₂-O-); 3,03 (m, 2H, -C-CH₂-CH₂); 2,49 (s, 6H, -C-CH₃); 2,41 (m, 4H, -C-CH₂-CH₃); 2,33 (s, 6H, N-C-CH₃); 1,94 (s, 3H, CH₃-C-CH₂); 1,89 (m, 2H, -CH₂-CH₂-Br); 1,77 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br); 1,04 (t, 6H, -CH₂-CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ [ppm] = 167,3; 152,3; 143,9; 136,2; 135,5; 132,7; 130,9; 125,5; 63,9; 29,1; 28,2; 27,9; 18,3; 17,2; 14,8; 13,2; 12,4.

5.6.2 Synthese von BODIPY-markiertem Polystyrol

5.6.2.1 Synthese von Polystyrol unter Verwendung des Benzyl-CTAs

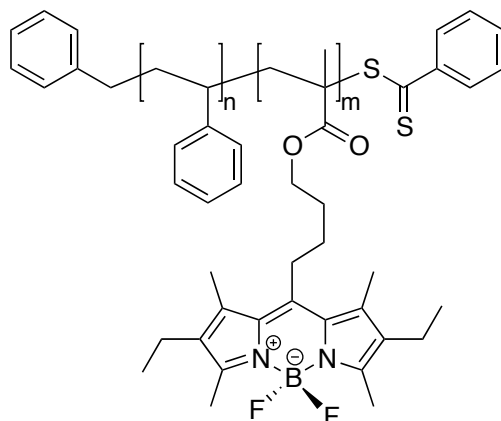


In einem Schlenkkolben wurde Styrol (1,0 g; $9,60 \times 10^{-3}$ mol) in 3 mL absolutiertem THF gelöst und anschließend, je nach Kettenlänge, mit entsprechenden Mengen an Benzyl-CTA (im Arbeitskreis verfügbar) und Radikalstarter 2,2'-Azo-bis-isobutyronitril (AIBN) versetzt. Es wurden dabei Benzyl-CTA (1,32 mg; $5,39 \times 10^{-6}$ mol) und AIBN (0,15 mg; $9,02 \times 10^{-7}$ mol) verwendet. Anschließend wurde dreimal sekuriert. Die Polymerisation wurde für 65 h bei 80 °C durchgeführt. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Schlenkkolben belüftet und das entstandene Polystyrol in kaltem Methanol (70 mL) gefällt. Dabei präzipitierte das Polymer als farbloser Feststoff. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand dekantiert, der Feststoff in 3 mL THF wieder aufgenommen und erneut in kaltem Methanol (70 mL) gefällt. Dieser Prozess wurde insgesamt dreimal wiederholt, um restliche Monomerspuren zu entfernen. Das aufgereinigte Polymer wurde über Nacht im Vakuumofen bei 40 °C und 10 mbar getrocknet. Es konnte so ein farbloser Feststoff an Polystyrol (0,45 g; 45% d. Th.) erhalten werden.

$$M_n = 18.200 \text{ g/mol}$$

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7,50-6,30 (br, 5H, ArH); 2,55-0,75 (br, 3H, -CH-CH₂- (Polymerrückgrad)).

5.6.2.2 Copolymerisation von Styrol und BODIPY-MA



Für die Fluoreszenzmarkierung des Polystyrols wurde, zusätzlich zu den unter 5.6.2.1 beschriebenen Komponenten, F-C₄-BODIPY-MA (4,27 mg; $9,61 \times 10^{-6}$ mol) zugegeben und analog verfahren. Es konnte ein orange leuchtender Feststoff an P(BODIPY-MA)-co-P(Sty) (0,45 g; 45% d. Th.) erhalten werden.

$M_n = 18.200$ g/mol

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7,50–6,30 (br, 5H, ArH); 2,55–0,75 (br, 3H, -CH-CH₂- (Polymerrückgrad)).

5.7 Herstellung polymerer Kolloide

5.7.1 Miniemulsionspolymerisation

Bei der Herstellung der Nanopartikel mittels radikalischer Miniemulsionspolymerisation bestand die disperse Phase aus dem eingesetzten Monomer, dem Initiator V59, dem Ultrahydrophob Hexadekan und dem hydrophoben Kargo. Die kontinuierliche Phase setzte sich aus polymerem Tensid und demineralisiertem Wasser zusammen. Nach dem Mischen der beiden Phasen wurde 1 h bei 2000 rpm präemulgiert. Anschließend wurde 3 min mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450D, 1/2-Zoll Spitze, 90% Amplitude, Eiskühlung) homogenisiert, wodurch eine Miniemulsion mit charakteristischen

Tröpfchen im Nanometerbereich erhalten wurde. Durch Erhitzen der Miniemulsion auf 70 °C wurde die Polymerisation für 18 h bei konstantem Rühren und 70 °C durchgeführt. Die Probe wurde anschließend mittels Sephadex-Säule oder Zentrifugation (6000 rpm, 10 min) aufgereinigt. Die Ansatzgrößen der unterschiedlichen Miniemulsionspolymerisationen sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23. Ansatzgrößen der Miniemulsionspolymerisationen zur Herstellung von **D 1-4**, **D 9-10** und **D 18**.

Name	Menge Styrol	Menge V59	Menge HD	Polymeres Tensid (P)	Menge (P)	Menge Wasser
D 1	400 mg	8 mg	5 mg	P 9	10 mg	10 g
D 2	400 mg	8 mg	5 mg	P 1	10 mg	10 g
D 3	400 mg	8 mg	5 mg	P 10	10 mg	10 g
D 4	400 mg	8 mg	5 mg	P 2	10 mg	10 g
D 9	200 mg	4 mg	2,5 mg	P 14	10 mg	5 g
D 10	200 mg	4 mg	2,5 mg	P 15	10 mg	5 g
D 18	400 mg	8 mg	2,5 mg	P 1	10 mg	10 g

5.7.2 Lösungsmittel-Verdampfungsprozess

Zu Beginn wird eine disperse Phase, bestehend aus dem Polymer, einem guten, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel für das Polymer und dem hydrophoben Kargo, hergestellt. Die kontinuierliche Phase setzt sich aus demineralisiertem Wasser und polymerem Tensid zusammen. Nach Vereinigen der beiden Phasen wurde 1 h unter kontinuierlichem Rühren bei 1200 rpm präemulgiert, wobei das Reaktionsgefäß, während der ganzen Zeit verschlossen blieb, um vorzeitige Verdampfung des Lösungsmittels zu verhindern. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450D, 1/2-Zoll Spitze) bei einer

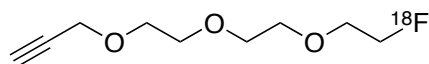
Amplitude von 70% über eine Dauer von 3 min (10 s Puls/10 s Pause) und unter ständiger Eiskühlung. Anschließend wurde die Miniemulsion bei RT oder bei 40 °C über Nacht bei offenem Reaktionsgefäß gerührt, um das Lösungsmittel des Polymers zu verdampfen. Der Verlust an Wasser wurde kompensiert und die Probe anschließend mittels Sephadex G75 oder Zentrifugation (6000 rpm für 10 min) aufgereinigt. Variiert wurde Typ und Menge an eingesetztem polymeren Tensid. Die Ansatzgrößen der unterschiedlichen Miniemulsionen in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24. Ansatzgrößen der Miniemulsionen in Kombination mit Lösungsmittelverdampfung zur Herstellung von **D 5-8**, **D 11-17** und **D 19-22**.

Name	Polymer	Menge Polymer	Disperse Phase (DP)	Menge DP	Menge PMI	Polym. Tensid (P)	Menge (P)	Menge Wasser
D 5	PS	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 9	10 mg	10 g
D 6	PS	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 1	10 mg	10 g
D 7	PDLLA	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 9	10 mg	10 g
D 8	PDLLA	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 1	10 mg	10 g
D 11	PDLLA	75 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 14	10 mg	6 g
D 12	PDLLA	75 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 15	10 mg	6 g
D 13	PS	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 12	30 mg	10 g
D 14	PDLLA	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	-	P 12	30 mg	10 g
D 15	P 16	50 mg	CHCl ₃	1,9 g	-	P 13	6 mg	5 g
D 16	PDLLA	50 mg	CHCl ₃	1,9 g	50 µg	P 13	10 mg	5 g
D 17	PDLLA	100 mg	CHCl ₃	2,5 g	0,1 mg	P 1	20 mg	10 g
D 19	PS	50 mg	CHCl ₃	1,9 g	-	P 18	10 mg	5 g
D 20	PDLLA	50 mg	CHCl ₃	1,9 g	-	P 18	10 mg	5 g
D 21	P 16	50 mg	CHCl ₃	1,9 g	-	P 20	10 mg	5 g
D 22	P 16	50 mg	CHCl ₃	1,9 g	-	P 19	10 mg	5 g

5.8 ^{18}F -Markierung der polymeren Kolloide

5.8.1 Synthese des ^{18}F -markierten Synthons 3-(2-(2-(2- ^{18}F)Fluor-ethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (^{18}F -OEG-Alkin)



Die Synthese des ^{18}F -OEG-Alkin wurde analog zu Schieferstein *et al.* durchgeführt.¹⁹³

5.8.2 ^{18}F -Markierung mittels CuAAC

Die markierte prosthetische Gruppe wurde auf einer Phenomenex StrataX C18 Kartusche fixiert und mittels Acetonitril (1 mL) eluiert. Anschließend wurde das Acetonitril unter milden Bedingungen (70 °C, 300 mbar, 30 mL/min Heliumfluss) verdampft und das Synthon wieder in PBS-Puffer (500 μL) aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden Kupfer(II)sulfat (20 μmol in 20 μL) hinzugegeben und 2 min gerührt. Nach Zugabe von **D 19** bzw. **D 20** (jeweils 70 μL und 0,42 w%) wurde nun Natrium-*L*-ascorbat (50 μmol in 20 μL) hinzugefügt und für 20 min bei 40 °C gerührt (Click-Ausbeute 32%). Nach Ende der Reaktion wurde die Reaktionslösung über eine GE HiTrap Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine, und einem Merck Hitachi System ausgestattet mit zwei L-7100 Pumpen, einem L-7400 UV Detektor, einer D-7000 D-Line, einem L-7250 Autosampler, einem L-7300 Säulenofen und einem Gina-Star Radiodetektor aufgereinigt. Laufmittel dabei war isotonische Kochsalzlösung. Das ^{18}F -markierte Produkt konnte in einer radiochemischen Gesamtausbeute von $8\% \pm 3$ erhalten werden.

6 Literatur

- (1) Zhang, L.; Gu, F. X.; Chan, J. M.; Wang, A. Z.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 761–769.
- (2) Abulateefeh, S. R.; Spain, S. G.; Aylott, J. W.; Chan, W. C.; Garnett, M. C.; Alexander, C. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1722–1734.
- (3) Landfester, K.; Willert, M.; Antonietti, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 2370–2376.
- (4) Dörfler, H. D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer Verlag, 2002; pp. 373–404.
- (5) Butt, H.-J.; Graf, K.; Kappl, M. *Physics and Chemistry of Interfaces*; 2003; pp. 118–144.
- (6) Arshady, R. *Colloid Polym. Sci.* **1992**, *270*, 717–732.
- (7) Yong, C. P.; Gan, L. M. In *Springer*; Okubo, M., Ed.; Advances in Polymer Science; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; Vol. 175, pp. 257–298.
- (8) Lange, B.; Fleischhaker, F.; Zentel, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1291–1311.
- (9) Ugelstad, J.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **1973**, *11*, 503–513.
- (10) Vogel, N.; Ziener, U.; Manzke, A.; Plettl, A.; Ziemann, P.; Biskupek, J.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 459–472.
- (11) Hauser, C. P.; Thielemann, D. T.; Adlung, M.; Wickleder, C.; Roesky, P. W.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 286–296.
- (12) Landfester, K.; Weiss, C. K. *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions*; 2010; pp. 1–49.
- (13) Wohnhaas, C.; Turshatov, A.; Mailänder, V.; Lorenz, S.; Balushev, S.; Miteva, T.; Landfester, K. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 772–778.
- (14) Landfester, K. *Macromol. Symp.* **2000**, *150*, 171–178.
- (15) Landfester, K. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 896–936.

- (16) Landfester, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4488–4507.
- (17) Mason, T. G.; Wilking, J. N.; Meleson, K.; Chang, C. B.; Graves, S. M. *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, R635–R666.
- (18) Claverie, J.; Charreyre, M.-T.; Pichot, C. *Polymers in Dispersed Media I: International Conference on Polymers in Dispersed Media*; 2000.
- (19) Hecht, L. L.; Wagner, C.; Landfester, K.; Schuchmann, H. P. *Langmuir* **2011**, *27*, 2279–2285.
- (20) Landfester, K. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2006**, *36*, 231–279.
- (21) Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2679–2683.
- (22) Tesch, S.; Schubert, H. *J. Food Eng.* **2002**, *52*, 305–312.
- (23) Ostwald, W. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **1900**, *34*, 495.
- (24) Schubert, H. *Emulgiertechnik*; 1st ed.; Behr's Verlag: Hamburg, 2005.
- (25) Pavel, F. M. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2004**, *25*, 1–16.
- (26) Yong, C.; Gan, L. In *Polymer Particles SE - 3*; Okubo, M., Ed.; Advances in Polymer Science; Springer Berlin Heidelberg, 2005; Vol. 175, pp. 257–298.
- (27) Burton, G. W.; O'Farrell, C. P. *J. Elastomers Plast.* **1977**, *9*, 94–101.
- (28) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 887–913.
- (29) Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 185–199.
- (30) Wang, J.; Schwendeman, S. P. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1090–1099.
- (31) Zhao, Y.; Berger, R.; Landfester, K.; Crespy, D. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 365.
- (32) Desgouilles, S.; Vauthier, C.; Bazile, D.; Vacus, J.; Grossiord, J.-L.; Veillard, M.; Couvreur, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 9504–9510.
- (33) Staff, R. H.; Rupper, P.; Lieberwirth, I.; Landfester, K.; Crespy, D. *Soft Matter* **2011**, *7*, 10219.
- (34) Mainardes, R. M.; Evangelista, R. C. *J. Microencapsul.* **2005**, *22*, 13–24.
- (35) Sansdrap, P.; Moës, A. J. *Int. J. Pharm.* **1993**, *98*, 157–164.

- (36) Higuchi, W. I.; Misra, J. J. *Pharm. Sci* **1962**, *51*, 459–466.
- (37) Miller, C. M.; Blythe, P. J.; Sudol, E. D.; Silebi, C. A.; El-Aasser, M. S. J. *Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1994**, *32*, 2365–2376.
- (38) Loxley, A.; Vincent, B. J. *Colloid Interface Sci.* **1998**, *208*, 49–62.
- (39) Vanderhoff, J. W.; El-Aasser, M. S.; Ugelstad, J. *United States Pat.* **1979**, *4*, 177.
- (40) Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113–1128.
- (41) Freiberg, S.; Zhu, X. X. *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 1–18.
- (42) O'Donnell, P. B.; McGinity, J. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *28*, 25–42.
- (43) Soto-Portas, M. L.; Argillier, J. F.; Mechin, F.; Zydowicz, N. *Polym. Int.* **2003**, *52*, 522–527.
- (44) Schulte, T. *Entwicklung neuer Alkoxyamine für die Nitroxid-vermittelte kontrollierte lebende radikalische Polymerisation*; Cuvillier, Ed.; Göttingen, 2004.
- (45) Colombani, D. *Prog. Polym. Sci.* **1997**, *22*, 1649–1720.
- (46) Braunecker, W. a.; Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 93–146.
- (47) Wang, J.; Matyjaszewski, K. **1995**, 5614–5615.
- (48) Kato, M.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M.; Higashimuras, T. *Macromolecules* **1995**, 1721–1723.
- (49) Chiefari, J.; Chong, Y. K. B.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- (50) Eberhardt, M.; Théato, P. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1488–1493.
- (51) Willcock, H.; O'Reilly, R. K. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 149.
- (52) Roth, P. J.; Jochum, F. D.; Zentel, R.; Theato, P. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 238–244.
- (53) Barz, M.; Tarantola, M.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Luxenhofer, R.; Janshoff, A.; Theato, P.; Zentel, R. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114–3118.

- (54) Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R.; Kabanov, A. V. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5682–5690.
- (55) Herth, M. M.; Barz, M.; Moderegger, D.; Allmeroth, M.; Jahn, M.; Thews, O.; Zentel, R.; Rösch, F. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1697–1703.
- (56) Theato, P. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 6677–6687.
- (57) Best, M. D. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571–6584.
- (58) Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D. *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 10182–10228.
- (59) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (60) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- (61) Wang, Q.; Chittaboina, S.; Barnhill, H. *Lett. Org. Chem.* **2005**, *2*, 293–301.
- (62) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.
- (63) Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.
- (64) Binder, W. H.; Sachsenhofer, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15–54.
- (65) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- (66) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- (67) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- (68) Victoria D. Bock, H. H. J. H. van M. *European J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 51–68.
- (69) Sun, S.; Wu, P. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 8331–8336.
- (70) Gaetke, L. M.; Chow, C. K. *Toxicology* **2003**, *189*, 147–163.
- (71) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

- (72) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793–16797.
- (73) Ghosh, P. K. *Sect. Title Pharm.* **2000**, *37*, 273–282.
- (74) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 631–651.
- (75) Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 246–255.
- (76) Říhová, B.; Kopeček, J.; Ulbrich, K.; Chytrý, V. *Die Makromol. Chemie* **1985**, *9*, 13–24.
- (77) Říhová, B.; Kovář, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 184–191.
- (78) Gros, L.; Ringsdorf, H.; Schupp, H. *Angew. Chemie* **1981**, *332*, 311–332.
- (79) Kopeček, J.; Kopečková, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 122–149.
- (80) Duncan, R.; Seymour, L. W.; O'Hare, K. B.; Flanagan, P. A.; Wedge, S.; Hume, I. C.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Subr, V.; Spreafico, F.; Grandi, M.; Ripamonti, M.; Farao, M.; Suarato, A. *J. Cont. Rel.* **1992**, *19*, 331–346.
- (81) Duncan, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347–360.
- (82) Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Conjugates, A. D.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83–94.
- (83) Lammers, T.; Ulbrich, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 119–121.
- (84) Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1668–1676.
- (85) Vicent, M. J.; Ringsdorf, H.; Duncan, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1117–1120.
- (86) Duncan, R.; Vicent, M. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 272–282.
- (87) Greco, F.; Vicent, M. J.; Gee, S.; Jones, A. T.; Gee, J.; Nicholson, R. I.; Duncan, R. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 28–39.
- (88) Vicent, M. J.; Greco, F.; Nicholson, R. I.; Paul, A.; Griffiths, P. C.; Duncan, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 4061–4066.

- (89) Pasut, G.; Veronese, F. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1177–1188.
- (90) Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R.; Vicent, M. J. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1900.
- (91) Tucker, B. S.; Sumerlin, B. S. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 1566.
- (92) Lammers, T.; Subr, V.; Ulbrich, K.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Kiessling, F. *Nano Today* **2010**, *5*, 197–212.
- (93) Cascone, M. G.; Barbani, N.; Cristallini, C.; Giusti, P.; Ciardelli, G.; Lazzeri, L. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12*, 267–281.
- (94) Timmins, M. R.; Lenz, R. W.; Clinton Fuller, R. *Polymer (Guildf)*. **1997**, *38*, 551–562.
- (95) Azevedo, H. S. In *Biodegradable Systems in Medical Functions: Design, Processing, Testing and Applications*; CRC Press, 2004; pp. 171–201.
- (96) Williams, D. F.; Zhong, S. P. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **1994**, *34*, 95–130.
- (97) Hans, M. .; Lowman, A. . *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *6*, 319–327.
- (98) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1*, 845–867.
- (99) Rausch, K.; Reuter, A.; Fischer, K.; Schmidt, M. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2836–2839.
- (100) Mohr, K.; Sommer, M.; Baier, G.; Schöttler, S.; Okwieka, P.; Tenzer, S.; Landfester, K.; Mailänder, V.; Schmidt, M.; Meyer, R. G. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, *05*.
- (101) Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
- (102) Zhao, F.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Chang, X.; Chen, C.; Zhao, Y. *Small* **2011**, *7*, 1322–1337.
- (103) Marsh, M.; Helenius, A. *Cell* **2006**, *124*, 729–740.
- (104) Dausend, J.; Musyanovych, A.; Dass, M.; Walther, P.; Schrezenmeier, H.; Landfester, K.; Mailänder, V. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 1135–1143.
- (105) Webster, D. M.; Sundaram, P.; Byrne, M. E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 1–20.
- (106) Iversen, T. G.; Skotland, T.; Sandvig, K. *Nano Today* **2011**, *6*, 176–185.

- (107) Meng, F.; Cheng, R.; Deng, C.; Zhong, Z. *Mater. Today* **2012**, *15*, 436–442.
- (108) Bachelder, E. M.; Beaudette, T. T.; Broaders, K. E.; Dashe, J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10494–10495.
- (109) Wu, G.; Fang, Y. Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. *J Nutr* **2004**, *134*, 489–492.
- (110) Sun, H.; Guo, B.; Li, X.; Cheng, R.; Meng, F.; Liu, H.; Zhong, Z. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 848–854.
- (111) Kuppusamy, P.; Li, H.; Ilangoan, G.; Cardounel, A. J.; Zweier, J. L.; Yamada, K.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 307–312.
- (112) Fehrenbacher, N.; Jaattela, M. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2993–2995.
- (113) Pressly, E. D.; Rossin, R.; Hagooly, A.; Fukukawa, K.; Messmore, B. W.; Welch, M. J.; Wooley, K. L.; Lamm, M. S.; Hule, R. A.; Pochan, D. J.; Hawker, C. J. *Society* **2007**, *8*, 3126–3134.
- (114) Moderegger, D. Radiolabeling of defined polymer architectures with fluorine 18 and iodine 131 for ex vivo and in vivo evaluation: Visualization of structure property relationships, 2012.
- (115) Devaraj, N. K.; Keliher, E. J.; Thurber, G. M.; Nahrendorf, M.; Weissleder, R. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 397–401.
- (116) Guerrero, S.; Herance, J. R.; Rojas, S.; Mena, J. F.; Gispert, J. D.; Acosta, G. a; Albericio, F.; Kogan, M. J. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 399–408.
- (117) Rojas, S.; Gispert, J. D.; Abad, S.; Buaki-Sogo, M.; Victor, V. M.; Garcia, H.; Herance, J. R. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 3543–3550.
- (118) Matsumura, Y.; Maeda, H.; Smancs, A. **1986**, 6387–6392.
- (119) Maeda, H.; Bharate, G. Y.; Daruwalla, J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 409–419.
- (120) Seymour, L. W. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1992**, *9*, 135–187.
- (121) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283–318.
- (122) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 136–151.
- (123) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.

- (124) Seymour, L. W.; Miyamoto, Y.; Maeda, H.; Brereton, M.; Strohmalm, J.; Ulbrich, K.; Duncan, R. *Eur. J. Cancer* **1995**, *31*, 766–770.
- (125) Maeda, H. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 779–789.
- (126) Allen, T. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *2*, 750–763.
- (127) Lammers, T.; Hennink, W. E.; Storm, G. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 392–397.
- (128) Green, T. Folic acid one of several discoveries that made Esmond Snell world-renowned.
- (129) Locksmith, G. J.; Duff, P. *Obstet. Gynecol.* **1998**, *91*, 1027–1034.
- (130) Fox, J. T.; Stover, P. J. *Vitam. Horm.* **2008**, *79*, 1–44.
- (131) Damaraju, V. L.; Cass, C. E.; Sawyer, M. B. *Vitam. Horm.* **2008**, *79*, 185–202.
- (132) Leamon, C. P.; Low, P. S. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 44–51.
- (133) Antony, A. C. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 501–521.
- (134) Antony, A. C. *Blood* **1992**, *79*, 2807–2820.
- (135) Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284–293.
- (136) Weitman, S. D.; Lark, R. H.; Coney, L. R.; Fort, D. W.; Frasca, V.; Zurawski, V. R.; Kamen, B. A. **1992**, 3396–3401.
- (137) Weitman, S. D.; Weinberg, A. G.; Coney, L. R.; Zurawski, V. R.; Jennings, D. S.; Kamen, B. A. **1992**, 6708–6711.
- (138) Gent, Y. Y.; Weijers, K.; Molthoff, C. F.; Windhorst, A. D.; Huisman, M. C.; Smith, D. E.; Kularatne, S. a; Jansen, G.; Low, P. S.; Lammertsma, A. a; van der Laken, C. J. *Arthritis Res. Ther.* **2013**, *15*, R37.
- (139) Nakashima-Matsushita, N.; Homma, T.; Yu, S.; Matsuda, T.; Sunahara, N.; Nakamura, T.; Tsukano, M.; Ratnam, M.; Matsuyama, T. *Arthritis Rheum.* **1999**, *42*, 1609–1616.
- (140) Van der Heijden, J. W.; Oerlemans, R.; Dijkmans, B. a C.; Qi, H.; van der Laken, C. J.; Lems, W. F.; Jackman, A. L.; Kraan, M. C.; Tak, P. P.; Ratnam, M.; Jansen, G. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 12–21.

- (141) Paulos, C. M.; Turk, M. J.; Breur, G. J.; Low, P. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1205–1217.
- (142) Kennedy, M. D.; Jallad, K. N.; Thomson, D. H.; Ben-Amotz, D.; Low, P. S. *J. Biomed. Opt.* **2003**, *8*, 636–641.
- (143) Barz, M.; Canal, F.; Koynov, K.; Zentel, R.; Vicent, M. J. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2274–2282.
- (144) Anderson, K. E.; Eliot, L.; Stevenson, B. R.; Rogers, J. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 316–322.
- (145) Lee, R.; Low, P. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1995**, *1233*, 134–144.
- (146) Pan, X.; Zheng, X.; Shi, G. *Blood* **2002**, *100*, 594–602.
- (147) Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Horowitz, A. T.; Zalipsky, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1177–1192.
- (148) Goren, D.; Horowitz, A. T.; Tzemach, D.; Tarshish, M.; Zalipsky, S.; Gabizon, A. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1949–1957.
- (149) Saul, J. M.; Annapragada, A.; Natarajan, J. V.; Bellamkonda, R. V. *J. Control. Release* **2003**, *92*, 49–67.
- (150) Park, E. K.; Lee, S. B.; Lee, Y. M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1053–1061.
- (151) Hattori, Y.; Maitani, Y. *J. Control. Release* **2004**, *97*, 173–183.
- (152) Pan, D.; Turner, J. L.; Wooley, K. L. *Chem. Commun.* **2003**, 2400–2401.
- (153) Salmaso, S.; Semenzato, A.; Caliceti, P.; Hoebeke, J.; Sonvico, F.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 997–1004.
- (154) Caliceti, P.; Salmaso, S.; Semenzato, A.; Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Pricl, S. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 899–908.
- (155) Choi, H.; Choi, S. R.; Zhou, R.; Kung, H. F.; Chen, I.-W. *Acad. Radiol.* **2004**, *11*, 996–1004.
- (156) Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*; 3. ed.; Springer US: Boston, MA, 2003.

- (157) Schärftl, W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*; Springer Laboratory; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007.
- (158) Wagner, J. *Chemie Ing. Tech.* **1986**, 58.
- (159) Koynov, K.; Butt, H.-J. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, 17, 377–387.
- (160) Rigler, R.; Elson, E. S. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*; Springer Series in Chemical Physics; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2001; Vol. 65.
- (161) Pawley, J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; 3. ed.; 2006; p. 988.
- (162) Minsky, M. *Scanning* **1988**, 10, 128–138.
- (163) Watson, J. V. *Introduction to Flow Cytometry*; Cambridge University Press, 2004.
- (164) Ollinger, J. M.; Fessler, J. A. *IEEE Signal Process. Mag.* **1997**, 14, 43–55.
- (165) Herzog, H.; Rösch, F. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, 34, 468–473.
- (166) Ache, H. *Angew. Chem. internat. Ed.* **1972**, 11, 179–199.
- (167) Ross, T. L. *Curr. Radiopharm.* **2010**, 3, 202–223.
- (168) Lammers, T.; Subr, V.; Peschke, P.; Kühnlein, R.; Hennink, W. E.; Ulbrich, K.; Kiessling, F.; Heilmann, M.; Debus, J.; Huber, P. E.; Storm, G. *Br. J. Cancer* **2008**, 99, 900–910.
- (169) Cabral, H.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2014**, 190, 465–476.
- (170) Fendinger, N. J.; Versteeg, D. J.; Weeg, E.; Dyer, S.; Rapaport, R. A. *Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs*; Baker, L. A., Ed.; Advances in Chemistry; American Chemical Society: Washington, DC, 1994; Vol. 237.
- (171) Gauthier, M. A.; Gibson, M. I.; Klok, H.-A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 48–58.
- (172) Hemmelmann, M.; Kurzbach, D.; Koynov, K.; Hinderberger, D.; Zentel, R. *Biomacromolecules* **2012**.
- (173) Scheibe, P.; Barz, M.; Hemmelmann, M.; Zentel, R. *Langmuir* **2010**, 26, 5661–5669.

- (174) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer (Guildf)*. **2008**, *49*, 1079–1131.
- (175) Eberhardt, M.; Mruk, R.; Zentel, R.; Théato, P. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1569–1575.
- (176) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 379–410.
- (177) Odian, G. *Principles of Polymerization, 4th Edition*; Wiley-Interscience, 2004.
- (178) Mohr, N.; Barz, M.; Forst, R.; Zentel, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 1522–1527.
- (179) Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Biesalski, B.; Koynov, K.; Rösch, F.; Thews, O.; Zentel, R. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2841–2849.
- (180) Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Mars, C. A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033–2036.
- (181) Roth, P. J.; Kessler, D.; Zentel, R.; Theato, P. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3118–3130.
- (182) Pissuwan, D.; Boyer, C.; Gunasekaran, K.; Davis, T. P.; Bulmus, V. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 412–420.
- (183) Birke, A.; Huesmann, D.; Kelsch, A.; Weilbacher, M.; Xie, J.; Bros, M.; Bopp, T.; Becker, C.; Landfester, K.; Barz, M. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 548–557.
- (184) Whiteman, K. R.; Subr, V.; Ulbrich, K.; Torchilin, V. P. *J. Liposome Res.* **2001**, *11*, 153–164.
- (185) Schneider, G. F.; Subr, V.; Ulbrich, K.; Decher, G. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 636–642.
- (186) Talelli, M.; Rijcken, C. J. F.; van Nostrum, C. F.; Storm, G.; Hennink, W. E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 231–239.
- (187) Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5761–5768.
- (188) Höcherl, A.; Dass, M.; Landfester, K.; Mailänder, V.; Musyanovych, A. *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 454–464.
- (189) Musyanovych, A.; Schmitz-Wienke, J.; Mailänder, V.; Walther, P.; Landfester, K. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 127–139.
- (190) Hofmann, D.; Messerschmidt, C.; Bannwarth, M. B.; Landfester, K.; Mailänder, V. *Chem. Commun. (Camb)*. **2014**, *50*, 1369–1371.

- (191) Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Gündel, D.; Koynov, K.; Buchholz, H.-G.; Mohr, K.; Rösch, F.; Zentel, R.; Thews, O. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3091–3101.
- (192) Lammers, T.; Kühnlein, R.; Kissel, M.; Subr, V.; Etrych, T.; Pola, R.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Storm, G.; Huber, P.; Peschke, P. *J. Control. Release* **2005**, *110*, 103–118.
- (193) Schieferstein, H.; Betzel, T.; Fischer, C. R.; Ross, T. L. *Eur. J. Nucl. Med. Molecular Imaging Res.* **2013**, *3*, 68.
- (194) Li, Z.-B.; Wu, Z.; Chen, K.; Chin, F. T.; Chen, X. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1987–1994.
- (195) Ramedda, T.; Bergmann, R.; Wüst, F. *Lett. Drug Des. Discov.* **2007**, *4*, 279–285.
- (196) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- (197) Bertrand, N.; Leroux, J.-C. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 152–163.
- (198) Finn, T. E.; Nunez, A. C.; Sunde, M.; Easterbrook-Smith, S. B. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 21530–21540.
- (199) Jha, N. S.; Kishore, N. *J. Chem. Thermodyn.* **2011**, *43*, 814–821.
- (200) Koynov, K.; Butt, H. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17*, 377–387.
- (201) Kunjachan, S.; Pola, R.; Gremse, F.; Theek, B.; Ehling, J.; Moeckel, D.; Hermanns-Sachweh, B.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Lederle, W.; Kiessling, F.; Lammers, T. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 972–981.
- (202) Workman, P.; Aboagye, E. O.; Balkwill, F.; Balmain, A.; Bruder, G.; Chaplin, D. J.; Double, J. A.; Everitt, J.; Farningham, D. A. H.; Glennie, M. J.; Kelland, L. R.; Robinson, V.; Stratford, I. J.; Tozer, G. M.; Watson, S.; Wedge, S. R.; Eccles, S. A. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1555–1577.

Veröffentlichungen

"HPMA Copolymers as Surfactants in the Preparation of Biocompatible Nanoparticles for Biomedical Application"

Annette Kelsch, Stephanie Tomcin, Kristin Rausch, Matthias Barz, Volker Mailänder, Manfred Schmidt, Katharina Landfester and Rudolf Zentel, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 4179–4187.

"Polypeptoid-block-polypeptide Copolymers: Synthesis, Characterization, and Application of Amphiphilic Block Copolypept(o)ides in Drug Formulations and Miniemulsion Techniques"

Alexander Birke, David Huesmann, **Annette Kelsch**, Martin Weilbacher, Jing Xie, Matthias Bros, Tobias Bopp, Christian Becker, Katharina Landfester, Matthias Barz, *Biomacromolecules* **2014**, 15, 548-557.

"¹⁸F-Radiolabeling, Preliminary Evaluation of Folate-pHPMA Conjugates via PET"

Hanno Schieferstein, **Annette Kelsch**, Achim Reibel, Kaloian Koynov, Matthias Barz, Hans-Georg Buchholz, Nicole Bausbacher, Oliver Thews, Rudolf Zentel, Tobias L. Ross, *Macromol. Biosci.*, **2014**, 14, 1396-1405.

"Degradable Cationic Nanohydrogel Particles for Stimuli-Responsive Release of siRNA"

Lutz Nuhn, Lydia Braun, Iris Overhoff, **Annette Kelsch**, David Schaeffel, Kaloian Koynov and Rudolf Zentel, *Macromol. Rapid Commun.*, **2014**, 35, 2057–2064.

"Back Cover: Macromol. Biosci. 10/2014"

Hanno Schieferstein, **Annette Kelsch**, Achim Reibel, Kaloian Koynov, Matthias Barz, Hans-Georg Buchholz, Nicole Bausbacher, Oliver Thews, Rudolf Zentel, Tobias L. Ross, Macromol. Biosci., **2014**, 14, 1506.

"Nanoparticles Stabilized by HPMA-based Block Copolymers Promote Initial Burst Release of a Hydrophobic Drug Model"

Stephanie Tomcin, **Annette Kelsch**, Roland H. Staff, Rudolf Zentel, Katharina Landfester, Volker Mailänder, *in Vorbereitung*.

"Biodistribution of ^{18}F -labeled Colloids Stabilized by HPMA-based Block Copolymers"

Annette Kelsch, Hanno Schieferstein, Nicole Bausbacher, Matthias Miederer, Katharina Landfester, Tobias L. Ross, Rudolf Zentel, *in Vorbereitung*.

Danksagung

Gelöscht aus Datenschutzgründen

Curriculum Vitae

Gelöscht aus Datenschutzgründen

