

# Biokompatible Glycerin-basierte Nanogelee mit einstellbaren Eigenschaften

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Haixia Zhou**  
aus Jining/China

November 2012



1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag, Freie Universität Berlin
2. Gutachter: PD Dr. Helmut Schlaad, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

Tag der Verteidigung: 21.12.2012



*Für AI*



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2006 bis Oktober 2012 am Institut für Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin im Arbeitskreis von Herrn Prof. Rainer Haag.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Rainer Haag danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Übertragung des interessanten Themas. Insbesondere danke ich ihm für die Freiheit und Zeit, die mir gewährt wurde, um in der Welt der Wissenschaft ausgiebig zu stöbern.

Herrn PD Dr. Helmut Schlaad danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats, auch für die Bereitstellung der wichtigen Verbindung KLE25 danke ich ihm herzlichst.

Herrn Dr. Andreas Schäfer und der gesamten NMR- sowie MS-Abteilung danke ich für die oft anspruchsvolle Analytik meiner Produkte. Für die Durchführung der TEM-Analytik bin ich Herrn Dr. Christoph Böttcher und Frau Andrea Schulz zu Dank verpflichtet. Für die Mikrowellenanalytik danke ich Herrn Prof. Matthias Rudolph von der Universität Cottbus.

Für die fruchtbare Zusammenarbeit danke ich Frau Prof. v. Klitzing und Herrn Marcel Richter von der TU Berlin. Herrn PD Dr. Kai Licha von Mivenion sowie Herrn Prof. Kissel und Frau Dr. Olga Samsonova von der Philips-Universität Marburg. Herrn Markus Hellmund danke ich für seinen wichtigen Beitrag und für die gute Kooperationsarbeit im nPG-Amin-Projekt.

Bei der ganzen AG Haag, insbesondere bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Labor- und Bürokollegen, namentlich Frau Dr. Wiebke Fischer, Frau Dr. Ilona Papp, Herrn Dr. Florian Mummy, Herrn Dr. Min Shan, Herrn Dirk Steinhilber, Herrn Markus Hellmund, Herrn Dr. Adam Sisson, Herrn Florian Paulus, Herrn Christian Kördel, Herrn Michal Andrä, Herrn Sasa Duric, Frau Swantje Wiebalck und Frau Dr. Monika Wyszogrodzka, bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Meinem Bachelorstudenten Matthias Dimde und meinem Praktikanten Robby Klemme danke ich für ihr Engagement und ihre Beiträge zu dieser Arbeit.

Frau Dr. Fischer danke ich nicht nur für die Korrektur des Manuskripts, sondern auch für die ständige Unterstützung als Kollegin sowie als Freundin. Für die Korrektur danke ich ferner Frau Dr. Lada Bemert, Herrn Dirk Steinhilber, und Frau Dr. Ying Luo.

Gegen Ende möchte ich einen besonderen Dank an meine Familien, bestehend aus meinen beiden Elternpaaren, Peter, meinen Großeltern und meiner Tante, aussprechen, für alles, was sie mir mit auf den Weg gegeben haben. Besonders meinem Adoptivvater, Herrn Alois Bücken, verdanke ich Vieles, was ich heute habe.

Der ganz besondere Dank gilt meinem Ehemann, Herrn Qi Wang, der mir in jeder Situation beisteht, mit Liebe, Verständnis, Vernunft, Tatkraft und auch mit Fachkompetenz.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Grundlagen</b> .....	<b>1</b>
1.1 Verzweigte Polymere und ihre Darstellungen .....	1
1.1.1 Dendrimere und ihre Darstellungen .....	1
1.1.2 Hyperverzweigte Polymere, allgemeine Darstellungsmethoden.....	3
1.1.3 Charakterisierung .....	8
1.1.4 Hyperverzweigtes Polyglycerin: Darstellung und Eigenschaften .....	10
1.2 Vernetzte Polymere .....	14
1.2.1 Hydrogele .....	14
1.2.2 Nanogele .....	16
1.2.3 Quellungverhalten von Hydro- und Nanogelen .....	22
1.3 Nanotransporter in der Biomedizin .....	23
1.3.1 Gentherapie.....	24
1.3.2 Polyglycerin-basierte Transportsysteme in der Gentherapie .....	24
<b>2. Aufgabenstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>28</b>
2.1 Katalysierte Kondensationen von Glycerin und Oligoglycerinen .....	28
2.2 Darstellung von wasserlöslichen Nanogelen durch Vernetzung von Glycerinoligomeren .....	29
2.2.1 Funktionalisierung sowie Anwendung der erhaltenen Polyether Nanogele .....	29
2.2.2 Darstellung von wasserlöslichen Nanogelen unterschiedlicher Innenarchitekturen und Untersuchung von deren mechanischer Eigenschaften .....	29
<b>3. Synthese von Polyether Polyolen aus Glycerin</b> .....	<b>30</b>
3.1 Direkte Synthese aus Glycerin .....	31
3.2. Polymerisation funktionalisierter Glycerine .....	37
3.2.1 Funktionalisierung des Glycerins zum Monomer 1 .....	38
3.2.2 Vermeidung von Lactonringbildung .....	42
3.2.3 Oligomerisation des Monomers 3 .....	46
<b>4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion</b> ...	<b>48</b>
4.1 Polyether Nanogele aus Glycerin und Oligoglycerinen .....	49
4.2 Analyse der Verzweigungsgrade mit Hilfe von inverse gated (IG) <sup>13</sup> C-NMR .....	51
4.3 Intrinsische Viskosität [η] und OH-Zahl .....	57
4.4 Partikelgröße und Quellung.....	58
4.6 Zusammenfassung und Diskussion.....	61
<b>5. Modifikationen der Polyether Nanogele</b> .....	<b>63</b>
5.1 Nanogele mit offenen Netzwerken basierend auf langkettigen Bausteinen .....	63
5.1.1 Quellung in variablen Lösungsmitteln .....	65
5.1.2 Quellverhalten auf der Goldoberfläche .....	66
5.1.3 Mechanische Eigenschaften.....	68
5.1.4 Zusammenfassung und Diskussion .....	70
5.2 Oberflächenfunktionalisierung der Polyglycerin Nanogele .....	71
5.2.1 Synthese und Syntheseoptimierung .....	72
5.2.2. nPG-Nanogele als DNA-Transfektionsmittel .....	74
5.2.2.1. Zytotoxizitätstest.....	75

5.2.2.2	<i>Transfektion von Plasmid-DNA</i>	76
5.2.2.3	<i>DNA-Komplexierung der nPG-Amine</i>	78
5.2.2.4	<i>Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay</i>	79
5.2.3	<i>Zellaufnahme</i>	84
5.2.4	<i>Zusammenfassung und Diskussion</i>	85
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>90</b>
7.1	Allgemeine Angaben	90
7.1.1	<i>Analytische Methoden</i>	90
7.1.2	<i>Chromatographie</i>	90
7.1.3	<i>Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zeta(<math>\zeta</math>)-Potentialmessung</i>	91
7.1.4	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	91
7.1.5	<i>Kryo-Transelectronenmikroskopie(Kryo-TEM)</i>	91
7.1.6	<i>Rasterkraftmikroskopie (SFM)</i>	91
7.1.7	<i>Young's Modulus Messung</i>	92
7.1.8	<i>Viskositätsbestimmung</i>	92
7.1.9	<i>DNA Präparation</i>	92
7.2	Methoden	92
7.2.1	<i>Bestimmung der intrinsischen Viskosität</i>	92
7.2.2	<i>Ethidiumbromid-Verdrängungsassay</i>	93
7.2.3	<i>Transfektionsversuche</i>	93
7.2.4	<i>Zytotoxizitätstest</i>	94
7.3	Chemikalien und Geräte	94
7.4	Synthesen	95
7.4.1	<i>Synthesen niedermolekularer Verbindungen</i>	95
7.4.2	<i>Polymerisation</i>	105
7.4.3	<i>Funktionalisierung von Nanogelen</i>	108
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>118</b>

## Abkürzungen

Äq.	Äquivalent
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AFM	Atomic Force Microscopy (dt. Rasterkraftmikroskopie)
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CE <sub>50</sub>	charge excess (dt. Ladungsüberschuß)
δ	Chemische Verschiebung
D	dendritische Einheit
Da	Dalton
DB	Degree of Branching (dt. Verzweigungsgrad)
DC	Degree of Crosslinking (dt. Vernetzungsgrad)
DCM	Dichlormethan
DGE	Diglycidylether
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMM	Doppel-Monomer-Methode
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
DS	Degree of Substitution (dt. Substitutionsgrad)
dt.	deutsch
EDGE	Ethylenglykoldiglycidylether
[η]	Intrinsische Viskosität
EPR-Effekt	Enhanced Permeation and Retentioneffects
EtBr	Ethidiumbromid
Gl.	Gleichung
GPC	Gelpermeationschromatographie

## Abkürzungen

---

GTGE	Glycerin triglycidylether
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPG	hyperverzweigte Polyglycerin
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IG	Inverse gated
Kap.	Kapitel
KLE25	Poly(ethylene-co-butylene)- <i>block</i> -poly(ethylene oxide)
kPa	KiloPascal
L	lineare Einheit
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel der Molmasse
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel der Molmasse
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation- time of flight
mbar	Millibar
mL	Milliliter
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeOH	Methanol
mmol	Millimol
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
Ms	Mesyl
MsCl	Mesylchlorid
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mV	Millivolt
NIPAM	<i>N</i> -Isopropylacrylamid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nPG	Polyglycerinnanogel

## Abkürzungen

---

N/P-Verhältnis	Stickstoff/Phosphat-Verhältnis
PBS	Phosphate buffered saline
PAMAM	Polyamidoamin
PD	Polydispersität
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PEO	Polyethylenoxid
PET	Pentaerythritol
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPI	Poly(propylenimin)
ppm	Parts per million
PTP	Protontransferpolymerisation
PVA	Polyvinylalkohol
Q	Quellungsgrad
$Q_M$	Massenquellungsgrad
$Q_V$	Volumenquellungsgrad
RITC	Rhodamin-B-Isothiocyanat
RLU	relative luminescence units
RNA	Ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
ROMBP	Ring-opening multi-branching Polymerisation
ROP	Ringöffnende Polymerisation
RT	Raumtemperatur
SFM	Scanning Force Microscope
SMM	Single-Monomer-Methode
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	terminale Einheit
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

## Abkürzungen

---

THF	Tetrahydrofuran
TMP	1,1,1-Trimethylolpropan
V	Volumen
$\zeta$ -Potential	Zeta-Potential

## 1. Einleitung und Grundlagen

### 1.1 Verzweigte Polymere und ihre Darstellungen

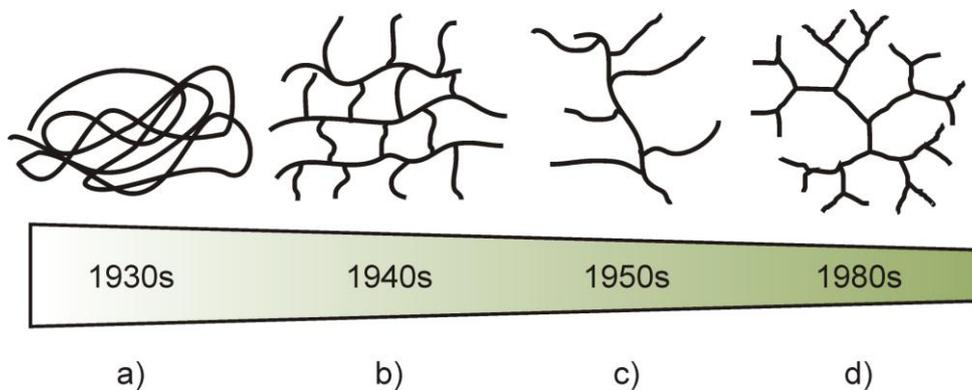
Seit Anfang des vergangenen Jahrhunderts sind Polymere zu einem wichtigen Bestandteil der industriellen Produkte und des alltäglichen Lebens geworden. Sie können auf verschiedene Weise klassifiziert werden:

Nach ihrer Struktur können Polymere in lineare, verzweigte und vernetzte Polymere aufgeteilt werden.<sup>[1]</sup> (Abb.1.1.1.)

Diese Arbeit befasst sich hauptsächlich mit verzweigten und vernetzten Polymeren.

Verzweigte Polymere können weiter in Sternpolymere und Kaskadenpolymere unterteilt werden.

Sternpolymere bestehen ausschließlich aus linearen Ketten, die an einem Kernpunkt geknüpft sind, wohingegen Kaskadenpolymere auch Verzweigungen außerhalb des Kernpunkts aufweisen. In den letzten Jahren fanden Kaskadenpolymere zunehmend breitere Anwendung. Je nach Verzweigungsgrad können diese in Dendrimere und hyperverzweigte Polymere unterteilt werden.



**Abb. 1.1.1:** a) lineare, b) vernetzte, c) verzweigte Polymere und d) Dendrimer.

#### 1.1.1 Dendrimere und ihre Darstellungen

Der Begriff Dendrimer stammt aus dem Griechischen (dendron: der Baum, meros: der Teil) und beschreibt die baumartige Struktur des in Abb. 1.1.2 schematisch dargestellten Moleküls. Die Pionierarbeit wurde 1978 von Vögtle berichtet.<sup>[2]</sup> Geprägt wurde dieser Begriff seit 1985 durch Dendrimere höherer Generationen, die unter anderen von Tomalia<sup>[3-6]</sup> publiziert wurden. Aufgrund ihrer baumartigen Verzweigungen verfügt diese Polymerklasse

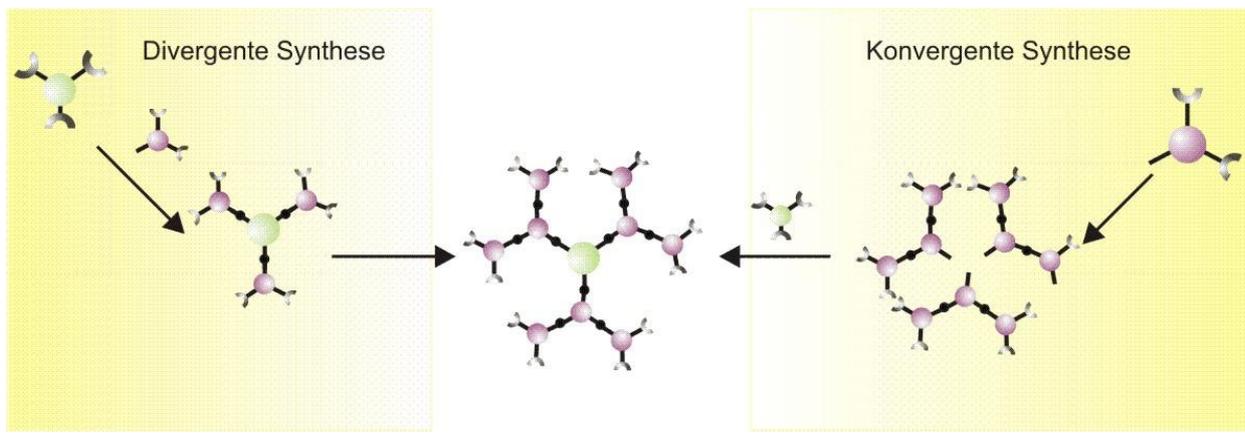
## 1. Einleitung und Grundlagen

---

über eine große Anzahl von funktionellen Gruppen, die mit jeder weiteren Generation exponentiell ansteigt. Außerdem besitzt sie eine hohe Symmetrie und einen sphärischen Charakter.

In Verbindung mit den verzweigten Polymeren wurde der Verzweigungsgrad, *degree of branching* (DB) eingeführt. Ein perfektes Dendrimer, dessen Schale ausschließlich aus dendritischen und terminalen Einheiten besteht, besitzt einen Verzweigungsgrad von 1.

Dendrimere werden in der Regel über zwei Synthesemethoden erhalten, die in Abb. 1.1.2 skizziert sind.



**Abb. 1.1.2:** Darstellung von Dendrimeren

Bei einer konvergenten Synthese wird das Zielmolekül von außen nach innen aufgebaut. Dazu werden zunächst die Dendrimersegmente, so genannte Dendrone, synthetisiert und schließlich werden diese an den Kern konjugiert.

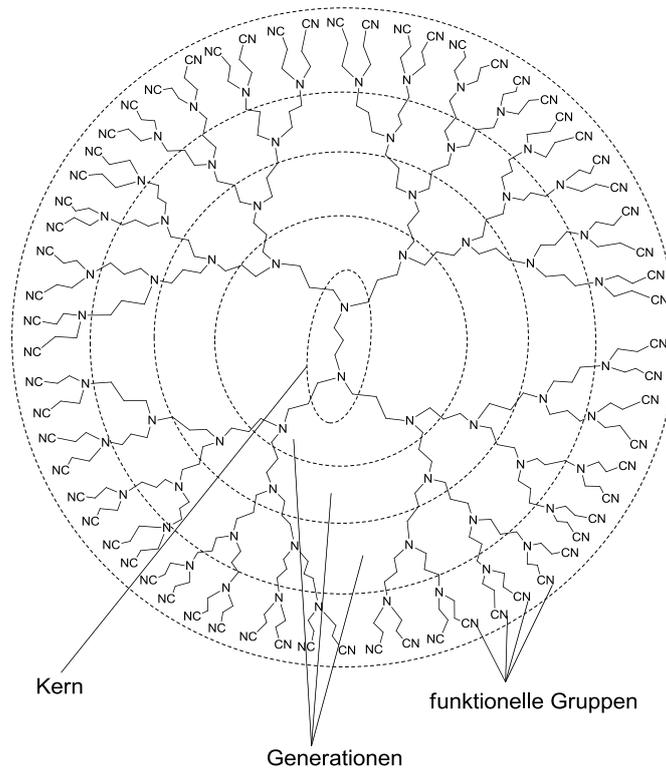
Bei der divergenten Synthese geht man von einem Kern mit mehreren funktionellen Gruppen aus und bringt stufenweise Monomere an, die ihrerseits gleiche funktionelle Gruppen enthalten. Mit jeder kompletten Besetzung der Oberfläche entsteht eine neue Schale um den Kern, welche man auch als Generation bezeichnet (Abb. 1.1.3) Auf dieser Art sind Dendrimere höherer Molmassen erreichbar. Läuft jede Reaktion vollständig ab, so erhält man am Ende ein monodisperses, perfektes Dendrimer.

Beispiele für Produkte divergenter Synthese sind das Dendrimer Polypropylenimin (PPI)<sup>[7]</sup> und Poly(amidoamin) (PAMAM), die jeweils unter den Namen Astramol® (DSM)<sup>[6, 8, 9]</sup> und Starburst® (Dendritech Inc.) kommerziell erhältlich sind.

## 1. Einleitung und Grundlagen

---

In Abb.1.1.3 ist das PPI, dessen Generationen mit den Kreisen gekennzeichnet sind, abgebildet.<sup>[10]</sup>

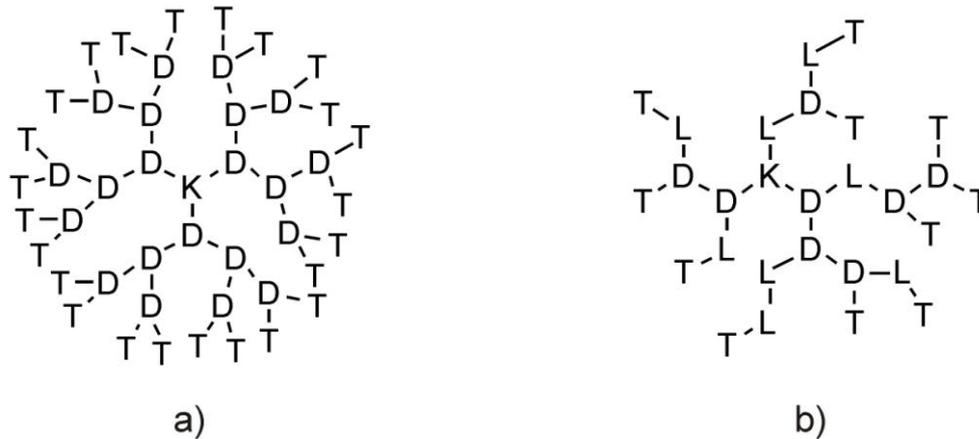


**Abb. 1.1.3:** PPI, ein perfektes Dendrimer, hergestellt über divergente Synthese.<sup>[10]</sup>

### 1.1.2 Hyperverzweigte Polymere, allgemeine Darstellungsmethoden

Aufgrund der aufwendigen und damit kostspieligen Synthesen können Dendrimere nur in kleinem Maßstab hergestellt werden. Als Alternative wurden Synthesewege für hyperverzweigte Polymere entdeckt, die zwar strukturell und funktionell den Dendrimern ähnlich sind, dessen Darstellung sowie Aufreinigung aber einfacher und kostengünstiger sind.

Der Begriff hyperverzweigtes Polymer wurde 1988 von Kim und Webster eingeführt.<sup>[11, 12]</sup> Damit bezeichnet man Polymere mit einem DB zwischen 0.5 und 1. Darin liegt auch der wichtigste Unterschied zu den Dendrimern. Des Weiteren erwartet man bei einem Dendrimer eine monodisperse Strukturverteilung, während hyperverzweigte Polymere als ein Gemisch aus Polymeren unterschiedlicher Molmassen vorliegen. Somit weisen sie Charakteristika auf, die auch typisch für konventionelle Polymere sind.



**Abb.1.1.4:** a) Dendrimer, welches in der Mitte einen Kern (K) besitzt und sonst ausschließlich aus dendritischen (D) und terminalen (T) Einheiten besteht. b) Hyperverzweigtes Polymer, mit dendritischen (D), terminalen (T) und linearen (L) Einheiten.

Wie in Abb. 1.1.4 gezeigt, enthalten hyperverzweigte Polymere, im Gegensatz zu Dendrimeren neben dendritischen und terminalen auch lineare Einheiten.

Allerdings ist der unvollkommene Strukturaufbau des hyperverzweigten Polymers nicht immer von Nachteil. Durch die linearen Einheiten wird die Flexibilität des Gerüsts erhöht, auch die Oberfläche ist größer.

Da hyperverzweigte Polymere keinen perfekten Aufbau haben, ist auch ihre Darstellung weniger anspruchsvoll. Ausgehend von multifunktionellen Monomeren des Typs  $AB_x$  ( $x \geq 2$ ) können sie in einer so genannten Eintopf-Reaktion synthetisiert werden.

Die Theorie über die Darstellungsmethoden wurde bereits in den 50er Jahren von Flory untersucht, der zu der Erkenntnis kam, dass die Polymerisation von  $AB_m$ -Monomeren bei einem Überschuss der Funktionalität B und einer höheren Reaktivität der Funktionalität A zu hoch verzweigten Strukturen führt. Durch diese Methode wird der sogenannte Gelpunkt nicht erreicht und somit führt es nicht zur Vernetzung. <sup>[13-16]</sup>

Die systematische Umsetzung dieser Theorie erfolgte jedoch erst in den 90ern.

Grundsätzlich gibt es zwei Strategien, um hyperverzweigte Polymere herzustellen. Die *single-monomer methodology* (SMM) und *double-monomer methodology* (DMM).<sup>[17]</sup> Die Letztere führt oft zu Gelierung, sobald der Gelpunkt erreicht ist. Dies kann aber durch strenge Temperatur- und Zeitkontrolle vermieden werden.

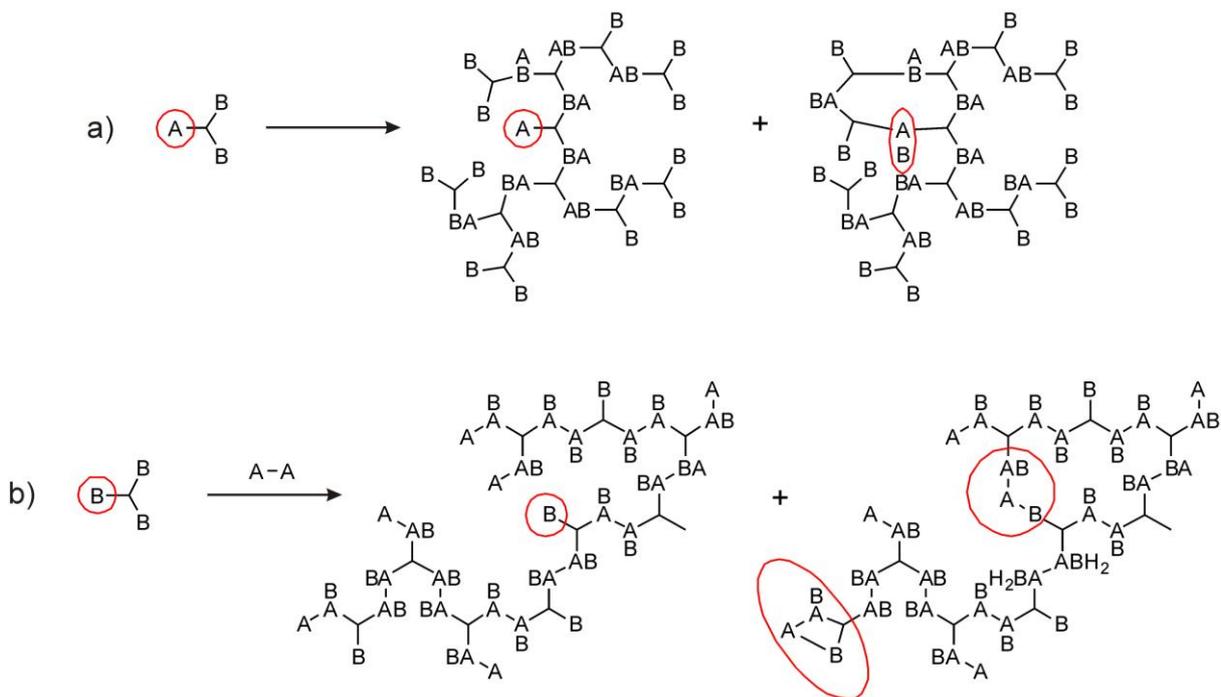
Bei SMM handelt es sich um die Polymerisation von  $AB_n$ - bzw. latenten  $AB_n$ -Monomere. Dazu zählen folgende drei Polymerisationstypen:

- a) Polykondensation von  $AB_n$ -Monomeren
- b) Protontransferpolymerisation (PTP)

c) Ringöffnende Polymerisation (ROP)

Bei der DMM bilden zwei verschiedene Monomertypen bzw. Monomerpaare die Bausteine der Polymere.

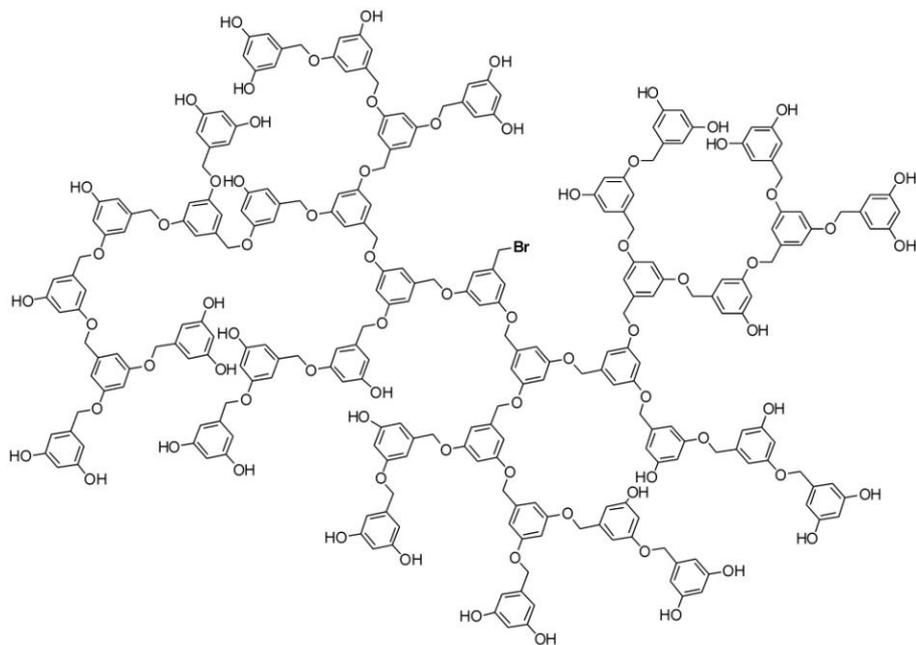
Bei beiden Strategien können zyklische Nebenprodukte gebildet werden, die durch intramolekulare Reaktionen zwischen A und B entstehen. Die Zyklenbildung bei der  $AB_2$ -Monomer-Polymerisation und bei der Copolymerisation von  $A_2 + B_3$  sind jeweils in Schema 1.1.5 a) und b) dargestellt.<sup>[18]</sup>



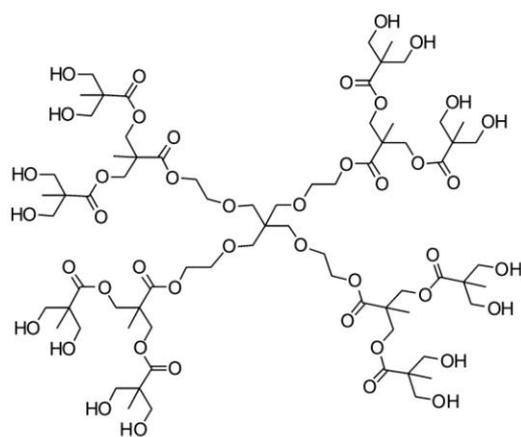
**Schema: 1.1.5** Polymerisationen nach SMM (a) und DMM (b), die zur Bildung von zyklischen Produkten führen können.

Die **Polykondensation von  $AB_n$ -Monomeren** ist inzwischen eine etablierte Produktionsmethode in der Industrie. Dadurch gelangt man zu zahlreichen hyperverzweigten Polyethern,<sup>[19]</sup> Polyestern,<sup>[20]</sup> Polyamiden<sup>[21-23]</sup> sowie Polyphenylen.<sup>[11, 24, 25]</sup>

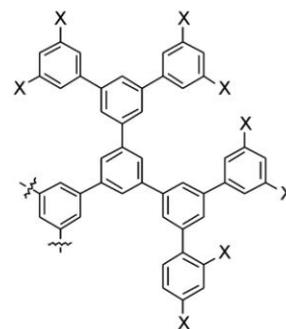
Ein paar Beispiele sind in der Abb. 1.1.6 dargestellt.



a) Polyether



b) Polyester

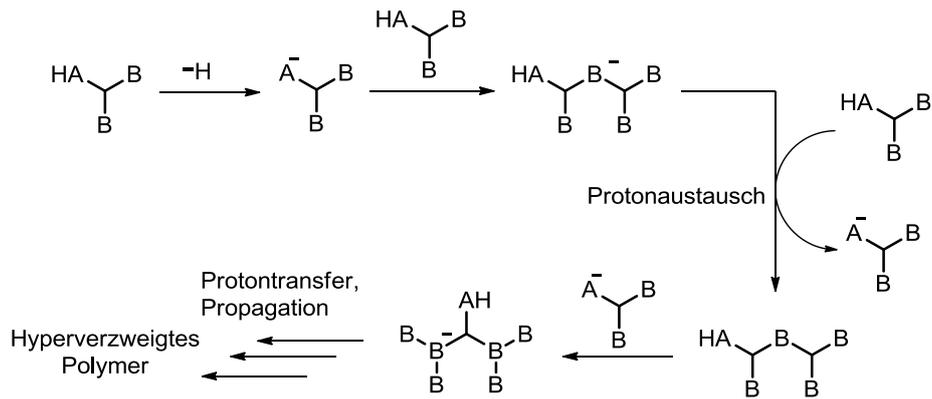


c) Polyphenylen

**Abb. 1.1.6:** Strukturen von Polymeren, die durch Polykondensation von  $AB_n$ -Monomeren erhalten werden können. a) Polyether, b) Polyester und c) Polyphenylen.

### Protontransferpolymerisation (PTP)

Bei PTP handelt es sich um eine katalytisch initiierte Kettenreaktion, die besonders geeignet ist, um hydroxy- oder epoxid-funktionalisierte hyperverzweigte Polymere herzustellen. Die Besonderheit hierbei ist der Protonentransfer, der bei jedem Propagationsschritt zur Aktivierung des Epoxidrings stattfindet. Der Mechanismus ist in Schema 1.1.7 dargestellt.<sup>[26]</sup>



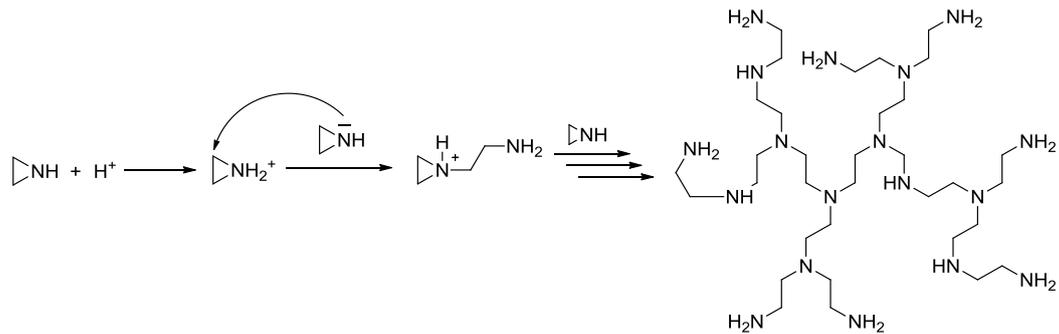
**Schema 1.1.7:** Schematische Darstellung der Protontransferpolymerisation (PTP).

Nach der Einführung dieses Polymerisationsprozesses Ende der 90er wurde dieser von vielen Polymerforschern erfolgreich verwendet.<sup>[27, 28]</sup> So wurde z. B. die Synthese von hypervernetzten aliphatischen Polyethern aus bi- und trifunktionalisierten Alkoholen berichtet.<sup>[28-30]</sup>

## Ringöffnende Polymerisation (Ring-opening polymerization (ROP))

Einer der ersten Berichte über ringöffnende Polymerisation wurde 1992 von Suzuki und Mitarbeitern veröffentlicht, damals wurde die Palladium-katalysierte Polymerisation von zyklischen Carbamaten untersucht. Ausgehend von einem AB Monomer, das keine Verzweigungsstelle enthält, wurde der Polymerisationsprozess durch geeignete Initiatoren angestoßen. Die Verzweigungsstellen entstehen durch Ringöffnung der Oxazinringe.<sup>[28, 31]</sup>

Das früheste kommerziell erhältliche hypervernetzte Polymer, das via ringöffnende Polymerisation synthetisiert wurde, ist das Polyethylenimin (PEI), das von BASF seit den 50er Jahren im Tonnenmaßstab produziert wurde.<sup>[32]</sup> Unter langsamer Zugabe von Aziridin als Monomer wird ein hochverzweigtes Produkt mit einem *DB* Wert von bis zu 60-70% gebildet, das eine Molmasse bis hin zu 10000 g/mol und eine enge Massenverteilung aufweist. Schema 1.1.8 zeigt diese Reaktion als Beispiel für eine ROP.



**Schema 1.1.8:** Synthese von hypervverzweigtem Polyethylenimin (PEI) über eine säurekatalysierte ringöffnende Polymerisation. Das Produkt enthält dendritische, lineare und terminale Einheiten.

### 1.1.3 Charakterisierung

#### Verzweigungsgrad

Eine der wichtigsten Eigenschaften von hypervverzweigten Polymeren ist der Verzweigungsgrad (DB), der eine Aussage über die Vollkommenheit der Verzweigung macht. Wie bereits erwähnt liegt hier einer der wichtigsten Unterschiede zwischen perfekten Dendrimeren und hypervverzweigten Polymeren.

Die DB-Werte von hypervverzweigten Polymeren werden aus relativen Mengen der dendritischen (D), linearen (L) und terminalen (T) Einheiten berechnet (Abb. 1.1.9).



**Abb. 1.1.9:** Terminale (T), linearen (L) und dendritischen (D) Einheiten von Polymeren, die aus AB<sub>2</sub>-Monomeren bestehen

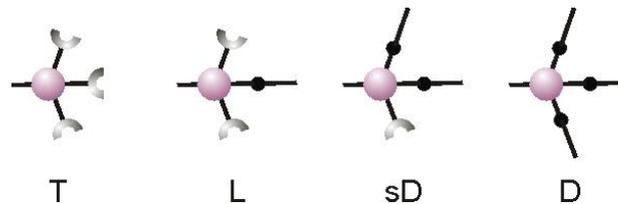
Sie erfolgt nach den Gl. 1.1 und 1.2, die jeweils von Fréchet und Frey aufgestellt sind.<sup>[33-35]</sup>

$$DB_1 = \frac{D + T}{D + T + L} \quad \text{Gl. 1.1}$$

$$DB_2 = \frac{2D}{2D + L} \quad \text{Gl. 1.2}$$

Dabei ist zu beachten, dass Gl. 1.1 bei niedermolekularen Polymeren zur Überschätzung der Ergebnisse führt,<sup>[34]</sup> während Gl. 1.2 eher etwas niedrigere DB-Werte liefert.<sup>[35]</sup>

Bei Polymeren, bestehend aus AB<sub>3</sub>-Monomeren, müssen neben den D-,T- und L-Einheiten, auch die semidendritischen (sD) Einheiten (Einheit mit drei Verzweigungen, von denen zwei linearen und eine terminale Gruppe trägt) mitberücksichtigt werden (Abb. 1.1.10).<sup>[34]</sup>



**Abb. 1.1.10:** Terminale (T), lineare (L) semidendritische (sD) und dendritische (D) Einheiten von Polymeren aus AB<sub>3</sub>-Monomeren

Es gilt:

$$DB = \frac{2D + sD}{2/3(3D + 2sT + L)} \quad \text{Gl. 1.3}^{[34]}$$

Die DB-Werte von hyperverzweigten Polymeren liegen meistens zwischen 0.4 - 0.7, wobei der maximal mögliche Verzweigungsgrad abhängig von der Synthese ist. Im Fall von latenten AB<sub>2</sub>-Monomeren beträgt dieser z. B. 0.66. Allerdings gibt es auch Beispiele von Pseudodendrimern, die durch postsynthetische Modifikationen Verzweigungsgrade über 0.7 erreichen.<sup>[36]</sup>

### Bestimmung des Verzweigungsgrades mit Hilfe von inverse gated <sup>13</sup>C-NMR

Der Verzweigungsgrad von PG beträgt typischerweise ~ 60%, welcher dem theoretisch berechneten DB-Wert von 66% schon sehr nahe kommt. Dieser wird mit Hilfe von inverse gated <sup>13</sup>C-NMR ermittelt.

Aufgrund der geringeren Häufigkeit und des kleineren magnetischen Moments des <sup>13</sup>C-Kernes sind die NMR-Signale schwer zu detektieren bzw. ist das Signal/Rausch-Verhältnis sehr schwach. Um die Signale zu verstärken, werden die <sup>13</sup>C-Kerne mit <sup>1</sup>H-Kernen in ihrer Umgebung gekoppelt, wobei die Signalintensität abhängig von der Anzahl der gekoppelten <sup>1</sup>H-Kerne ist, die Signale der primären C-Atome sind besonders stark, während die der quartären C-Atome nur sehr schwach sind. Damit kann das Mengenverhältnis der Kohlenstoffatome nicht quantitativ widerspiegelt werden.

Mit der Technik der inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR werden Kohlenstoffsignale entkoppelt gemessen. Mit langer Relaxationszeit von bis zu 10 s und einer hohen Anzahl von Scans sind  $^{13}\text{C}$ -Signale in hoher Qualität trotz der Entkopplung möglich. Die auf diesem Weg detektierten Signalintensitäten entsprechen der Kohlenstoffanzahl.<sup>[37]</sup>

Diese Methode wurde zum ersten Mal in den 80ern von Vandenberg<sup>[38]</sup> berichtet und später von Penczek<sup>[39]</sup> und Dworak<sup>[40]</sup> erweitert. Die Möglichkeit, DB-Werte über inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR zu berechnen, wurde jedoch erst Ende der 90er von Frey umgesetzt.<sup>[33]</sup>

Die in dieser Arbeit beschriebenen hyperverzweigten Polyglycerine weisen insgesamt sieben charakteristische Signale zwischen 60 und 85 ppm auf, die jeweils dendritischen, linearen und terminalen C-Atomen zuzuordnen sind. Anhand ihrer Integration kann die relative Menge der jeweiligen Glycerineinheiten ermittelt und in die o.g. Gleichungen eingesetzt werden, um die Verzweigungsgrade zu berechnen.

### 1.1.4 Hyperverzweigtes Polyglycerin: Darstellung und Eigenschaften

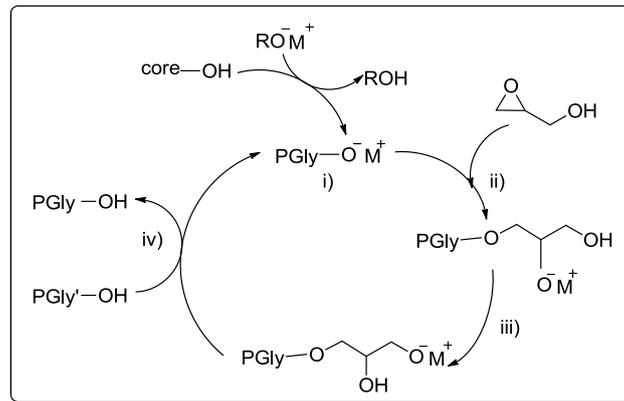
Hier wird besonderes auf hyperverzweigtes Polyglycerin eingegangen, das als Vertreter der Klasse hyperverzweigter Polymere ein zentrales Thema dieser Dissertation ist. Im Allgemeinen ist das hyperverzweigte Polyglycerin (HPG) (Abb. 1.1.12) ein bekanntes Beispiel für aliphatische, hyperverzweigte Polymere.

Im Jahr 1999 berichteten Sunder *et al.* über die Verwendung latenter  $\text{AB}_2$ -Monomere für eine "Ring-opening multi-branching Polymerisation" (ROMBP) basierend auf der Single-Monomer-Methode (SMM) von  $\text{AB}_x$ -Typ Monomeren.<sup>[33]</sup> Wie schon im Kapitel 1.1.2 erwähnt, führt diese Art der Polymerisation, laut Flory, nicht zur Vernetzung, sondern zur hyperverzweigten Struktur, solange die funktionelle Gruppe A eine höhere Aktivität besitzt, die Gruppe B im Überschuss vorliegt und jede A nur mit einer B eines anderen Moleküls reagiert. Überschreitung dieser kritischen Bedingungen führt zur intramolekularen Reaktionen zwischen A und B desselben Moleküls, wodurch Zyklen entstehen,<sup>[13-15]</sup> was ein Abbruch der Polymerisation zur Folge hat. Da man mit dieser Technik die Bildung von Nebenprodukten vermeiden kann, fand sie zunehmend Interesse in der Polymerchemie.

Bei der Synthese handelt es sich um einen quasi-lebende Polymerisation. Der Mechanismus ist eine Kombination von PTP und ROP. Wie in Schema 1.1.11 dargestellt besteht der Polymerisationsprozess aus vier Schritten. Bei dem Initiationsschritt (i) wird ein Trialkohol durch Deprotonierung einer OH-Gruppe aktiviert und dient damit als Initiator. Im zweiten Schritt (ii), dem Propagationsschritt reagiert das Alkoxid mit dem zugegebenen Glycidol an dem unsubstituierten Ende des Epoxidrings, wodurch sich dieser öffnet. Dadurch entsteht

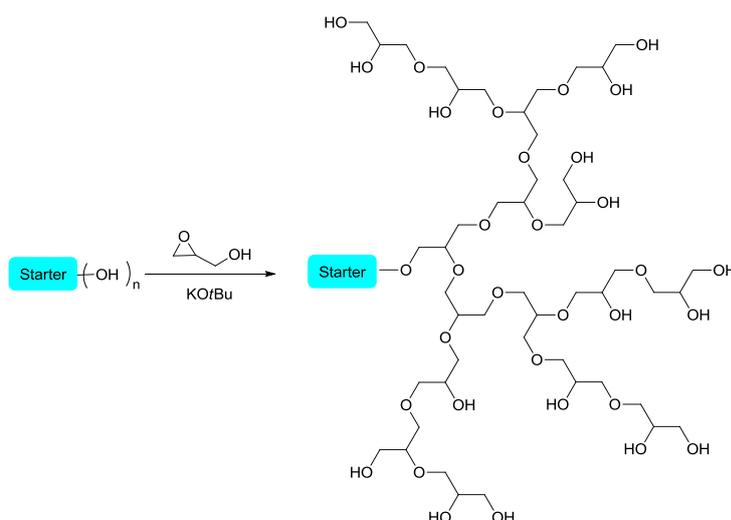
## 1. Einleitung und Grundlagen

ein instabiles sekundäres Alkoxid. Die Ladung des Alkoxids wird auf das primäre Ende transferiert ((iii), intramolekularer Transfer). Durch den anschließenden intermolekularen Transfer (iv) wird erneut Initiator erzeugt und der Zyklus von Neuem gestartet. Durch schnellen intra- und intermolekularen Protonenaustausch, erfolgt eine ständige Änderung der aktiven Zentren, wodurch ein gleichmäßiges, statistisches Wachstum aller Ketten ermöglicht wird.



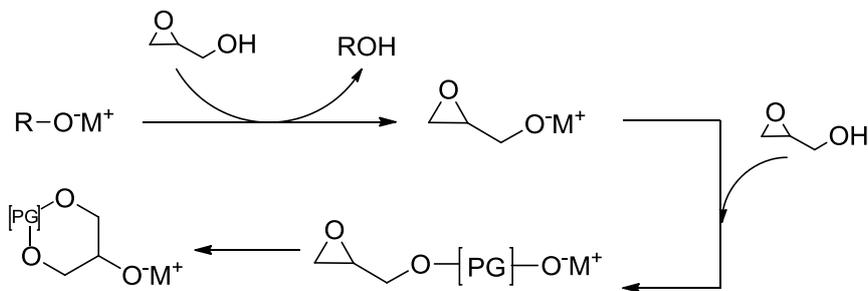
**Schema 1.1.11:** Reaktionszyklus der ringöffnenden multiverzweigten Polymerisation von Glycidol, bestehend aus vier Schritten i) Initiation, ii) Propagation, iii) intramolekularer Transfer, iv) intermolekularer Transfer.

Führt man diesen Prozess unter kontrollierter und langsamer Monomerzugabe durch, so erhält man am Ende ein hochverzweigtes Polyetherpolyol mit gezielter Molmasse und enger Molmassenverteilung, das aus Glycerineinheiten besteht,<sup>[33, 41]</sup> welches in Schema 1.1.12 dargestellt ist.



**Schema 1.1.12:** Herstellung von PG aus Glycidol als Monomer.

Die Produkteigenschaften der synthetisierten Polyglycerine sind von vielerlei Faktoren abhängig, z. B. die Polydispersität (PD), welche die Molmassenverteilung eines Polymers beschreibt ( $PD = M_w/M_n$ ). Für ein monodisperses Polymer ist die  $PD = 1$ . Die PD ist abhängig von der Zugabegeschwindigkeit des Monomers. Je langsamer diese erfolgt, desto niedriger ist die PD. Wird das Monomer schneller zugegeben als es die Reaktionsgeschwindigkeit erlaubt, so können die überschüssigen Monomere durch intermolekularen Protonenaustausch deprotoniert werden. Ein deprotoniertes Monomer tritt dann in Konkurrenz mit dem eigentlichen Starter und greift ebenfalls den Epoxidring des Glycidols an (Schema 1.1.13). Damit wird eine neue Reaktionskette gestartet, die zur Bildung von Nebenprodukten und somit zu einer breiteren Molmassenverteilung führt. Bei der Reaktionsführung muss besonderes auf wasserfreie Bedingungen geachtet werden, da ins Reaktionsgemisch gelangtes Wasser ebenfalls deprotoniert werden könnte und somit eine weitere Nebenreaktion starten würde.



**Schema 1.1.13:** Mögliche Nebenreaktion der PG-Synthese

Darüber hinaus ist auch die Wahl des Starters von großer Bedeutung. Als Starter finden multifunktionelle Alkohole, wie 1,1,1-Trimethylolpropan (TMP), Pentaerylritol (PET) und Glycerin, oder Oligoglycerin, Anwendung. Eine Studie über den Zusammenhang zwischen Polydispersität PD und Starterfunktionalität  $f_c$  zeigt umgekehrte Proportionalität zwischen diesen Größen nach der folgenden Gleichung.<sup>[42]</sup>

$$PD = 1 + \frac{1}{f_c} \quad \text{Gl. 1.4}$$

Bislang konnten PGs mit  $M_n$  von bis zu 1 000 000 Da und einer Größe von ca. 10 nm synthetisiert werden. Brooks *et al.* erreichten diese über eine ROMBP (Ring-opening multi-branching Polymerisation) von Glycidol mit Dioxan als Emulgator.<sup>[43]</sup> Im Jahr 2009 berichteten Frey *et al.* über einen zweistufigen Ansatz mit einem niedermolekularen PG als

Makroinitiator, wodurch ein HPG mit einem Molekulargewicht von  $M_n = 24\ 000\ \text{g/mol}$  und einer niedrigen PD ermöglicht wurde

Diese Ansätze zeigen, dass klassische Methoden nicht in der Lage sind, Partikel in Größenbereich von 20 bis 100 nm zu liefern, die jedoch für biomedizinische Anwendungen notwendig sind. Die PG-Synthese braucht also eine Erweiterung, um größere Polyether Partikel mit kontrollierten physikalischen Eigenschaften zu erhalten.

Wir befassen uns mit der Doppel-Monomer-Methode (DMM), welche erstmals von Kakimoto und Fréchet vorgestellt wurde, wobei sie über Synthese von hyperverzweigten Polymeren aus einer  $A_2 + B_3$  Monomerkombination berichteten.<sup>[30]</sup> Laut Flory könnte dies jedoch zur unerwünschten Gelierung führen, wenn der kritische Zustand überschritten würde.<sup>[13-16]</sup> Um die Gelierung zu vermeiden, wurden die Reaktionen vor Erreichen des Gelpunkts abgebrochen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz auf verschiedene  $A_n$  und  $B_m$  erweitert, um verschiedene hyperverzweigte Polymere zu erhalten. Dabei stehen n und m für die Anzahl der funktionalen Gruppen an den jeweiligen Monomeren A bzw. B. Dabei wird das Phänomen der Gelierung zum Vorteil ausgenutzt, indem wir den Gelierungsprozess in einer Miniemulsion durchführen.

Die Lösung zu diesem Problem wird im Kapitel 4 ausführlicher beschrieben.

### 1.2 Vernetzte Polymere

#### 1.2.1 Hydrogele

Hydrogele stellen eine besondere Klasse von vernetzten Polymeren dar. Sie sind hydrophile Netzwerke, die Wasser absorbieren und dadurch stark aufquellen können. Trotz ihrer Hydrophilie sind sie nicht wasserlöslich, da sie durch starke chemische und/oder physikalische Wechselwirkung miteinander vernetzt sind.<sup>[44]</sup> Die chemischen Vernetzungen können kovalente oder ionische Bindungen sein, andere Phänomene, wie Verschlaufungen und Wasserstoffbrückenbindungen sind physikalischer Natur.<sup>[45]</sup> Aufgrund einiger Eigenschaften, die denen der Körpergewebe ähnlich sind, wie z. B. ein hoher Wassergehalt und eine niedrige Oberflächenspannung, erscheinen Hydrogele als aussichtsreiche Kandidaten für biomedizinische Anwendungen.<sup>[46]</sup>

In den letzten Jahren wurden verschiedene biokompatible Polymere intensiv erforscht. Ein ganzes Spektrum von Hydrogelen, die aus Biopolymergerüsten aufgebaut sind, wie z. B. Kollagene, Fibrine, Alginate und Chitosane konnten gewonnen und für biomedizinische Anwendungen bereits getestet werden.

Einer der wichtigsten und zukunftsreichsten Bereiche biomedizinischer Anwendungen und moderner Arzneimittelentwicklung ist die Verbesserung des therapeutischen Index von Wirkstoffen. Im Bereich der Polymeren-Therapeutika bieten makromolekulare Wirkstofftransportsysteme eine Basis zur Entwicklung von Medikamenten mit verbesserter Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen.<sup>[3-6]</sup> Bei den heutigen klinisch verwendeten Medikamenten handelt es sich zum überwiegenden Teil um Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht (typischerweise unter 500 g/mol), die eine kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf und eine hohe Ausscheidung aufweisen. Um die Wirksamkeit von Medikamenten zu verbessern, wird der Einsatz makromolekularer Transportsysteme untersucht. Diese lassen sich allgemein als partikuläre Wirkstofftransportsysteme und als Polymer-Wirkstoff-Konjugate klassifizieren. Außerdem konzentrierte sich die Entwicklung auch auf enzymatisch spaltbare Polymer-Wirkstoff-Konjugate, die die intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffs nach zellulärer Aufnahme ermöglichen. Damit strebt man eine Wirksamkeitserhöhung an, welche die Wirksamkeit verbessern könnte und gleichzeitig Nebenwirkungen, wie Nierentoxizität, Knochenmarkschädigung, Schäden des Nervensystems, Herztoxizität, Schleimhautentzündungen und gastrointestinale Toxizität, minimiert.

Synthetische Hydrogele finden als makromolekulare Transporter Anwendung. Wirkstoffe werden innerhalb des Hydrogels eingeschlossen und die kontrollierte Freisetzung erfolgt dann z. B. durch Abbau oder Quellung des Hydrogelgerüsts.<sup>[47]</sup>

Dafür können nicht nur die oben aufgezählten Biopolymere, sondern auch zahlreiche synthetische Polymere, wie Polyvinylalkohole (PVA) und Polyacrylsäuren verwendet werden. Ein bekanntes Beispiel ist das Polyhydroxyethyl-methacrylat (PHEMA), das in Wasser stabil ist und durch Funktionalisierung der Oberflächenhydroxylgruppen leicht modifiziert werden kann. Bei einer Funktionalisierung mit Dextran wird es leicht abbaubar und kann somit als Wirkstoffträger benutzt werden.<sup>[48]</sup>

Polyethylenglykol (PEG) Hydrogele gehören zu den am besten untersuchten und meist verwendeten synthetischen Hydrogelen in biomedizinischen Anwendungen, da sie nicht immunogen, nicht toxisch sind und außerdem keinerlei Wechselwirkungen mit Proteinen und Zellen eingehen.<sup>[46, 49, 50]</sup> Die Darstellung solcher Hydrogele erfolgt meistens durch die Photo-Polymerisation von PEG-Makromonomeren mit Acrylatendgruppen in Gegenwart geeigneter Photoinitiatoren. Mit diesem Verfahren wurden biologisch abbaubare Hydrogele durch Zugabe von geeigneten Vernetzern, die photolabile Endgruppen enthalten, synthetisiert.<sup>[51]</sup> Ein anderer Ansatz, biologisch abbaubare PEG Hydrogele herzustellen, ist die Vernetzung von PEG-Blockcopolymeren, wobei die vernetzten Blocks abbaubar sind. Dieser Ansatz wurde unter anderem von Anseth *et al.* berichtet, in dem Poly-(milchsäure)-(PLA)-b-PEG-b-PLA Divinyl Makromonomere synthetisiert und miteinander vernetzt wurden.<sup>[52]</sup> Außerdem wurde das Freisetzungsverhalten verschiedener Hydrogele mit unterschiedlichem prozentualen Anteil acrylierter Blockcopolymere, durch Verkapselung des Rinderserumalbumins (BSA) untersucht. Durch Hydrolyse der Esterbindungen der Milchsäure bei pH 7.4 Phosphat-gepufferter Salzlösung (kurz PBS von englisch phosphate buffered saline) und 37 °C konnte BSA freigesetzt werden. Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Freisetzung abhängig von der Vernetzungsdichte und dem Quellungsvermögen des Hydrogels ist. Das Hydrogel, welches aus 90% acrylierten Blockcopolymeren hergestellt wurde, weist eine höhere Vernetzungsdichte und einen niedrigeren Quellungsgrad auf, was dazu führt, dass die Freisetzung im Vergleich zu niedriger funktionalisierten Polymeren langsamer erfolgt.

Eine gängige Methode, um biokompatible Hydrogele herzustellen, ist die radikalische Vernetzungsreaktion (radical crosslinking reaction). Beispielsweise berichtete Hennink *et al.* über die Synthese von Dex-HEMA-Hydrogelen, die in der Lage sind, Wirkstoff-Moleküle einzufangen und diese unter physiologischen Bedingungen durch Hydrolyse der Carbonatester wieder freizugeben. Besonders erwähnenswert ist, dass die

Abbaugeschwindigkeit über den Substitutionsgrad von HEMA Monomeren an Dextran Makromolekülen geregelt werden kann.<sup>[53, 54]</sup>

Auch Polyglycerincopolymere finden auf dem Gebiet der kontrollierten Wirkstofffreisetzung Anwendungen. Hyperverzweigte Polyglycerine (HPG) sind kompakte, hochverzweigte Polyether mit unregelmäßigen Verzweigungen. Sie besitzen ein stabiles und biokompatibles Polyethergerüst, sowie eine hohe Endgruppendichte (siehe Kap. 1.1). So berichtete Langer *et al.* über die Synthese von Poly(glycerin-co-sebacat)-Hydrogelen, die durch Photopolymerisation von Poly(glycerin-co-sebacat)-acrylat gebildet werden. Diese Hydrogele enthalten funktionalisierte Hydroxygruppen und weisen eine hohe *in vitro* Biokompatibilität sowie elastomere Eigenschaften auf.<sup>[55]</sup>

Vor einigen Jahren wurde die Synthese eines HPG-Hydrogels durch Photo- und chemisch initiierte radikalische Polymerisation von Glycidylmethacrylat methacrylierten (GMA) HPG-Monomeren berichtet. Der Quellungsgrad des HPG-Hydrogels von 1.5 ist deutlich niedriger als z. B. die PEG-Methacrylat-Hydrogele, welche bis zu des 10 Fache quellen können. Dieses Verhalten wurde durch die starren Vernetzungen der Hydrogele erklärt. Das Hydrogel mit einem Substitutionsgrad (DS) von 11 ist völlig transparent, die Gele mit einem DS von 18 und 28 dagegen sind undurchsichtig bzw. milchig. Der Verlust an Transparenz mit zunehmender Dichte der Vernetzungen wurde durch eine Phasentrennung innerhalb des Hydrogels begründet. Die Gele enthalten hydrophile HPG-Domänen und hydrophobe Methacrylat Domänen, die mit zunehmender Phasentrennung mehr und mehr Licht reflektieren und streuen.

Diese HPG-Hydrogele gelten als exzellente Kandidaten für die Anwendung in Gewebezüchtung (Tissue Engineering) und Wirkstofffreigabe (Drug-Delivery).

### 1.2.2 Nanogelee

Seit einigen Jahren wecken Hydrogele von spezieller Dimension, nämlich zwischen 10 und 1000 nm, sog. Nanogelee, aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften, großes Interesse bei Polymerchemikern.

Bei der biomedizinischen Anwendungen sind die physikalischen Spezifika der Materialien, wie Partikelgröße, -form und Mechanik, genauso entscheidend wie ihre chemischen und molekularen Eigenschaften.<sup>[56]</sup>

Die Bedeutung der nanodimensionalen Hydrogele (Nanogelee) wird in Abb. 1.3.1 veranschaulicht.<sup>[57]</sup> Der Bereich der Proteine und Metaboliten (bis zum 10 nm) wird durch die in Kap. 1.1 vorgestellten Polyglycerine abgedeckt. Der Bereich der Zellen mit der Größenordnung von einigen  $\mu\text{m}$  wurde von Hennink *et al.* durch Polyglycerinmakrogele

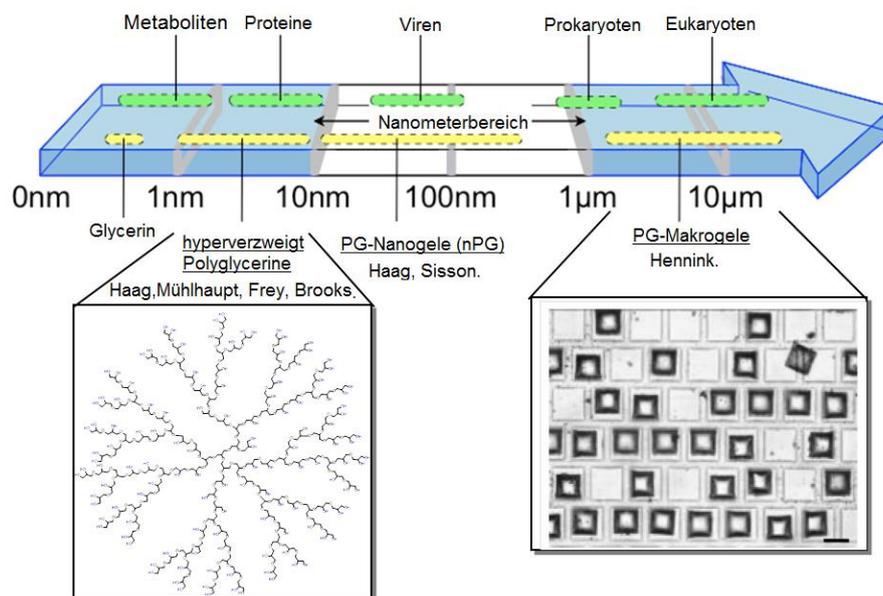
## 1. Einleitung und Grundlagen

erforscht. Mit der Methode der Fotolithographie konnten definierte HPG-MA-Mikropartikel zwischen 30-1400  $\mu\text{m}$  hergestellt werden.<sup>[58]</sup>

Partikel im Größenbereich zwischen 10 nm und 1  $\mu\text{m}$  sind für biomedizinische Anwendungen von großem Interesse, da viele biologische Objekte in dieser Längenskala liegen.

Die folgende Abb. 1.3.1 spiegelt die Größenbereiche verschiedener Polymere im Vergleich zu verschiedenen Zellbestandteilen wider.

Viren besitzen in der Regel einen Durchmesser von 100 - 500 nm. Demnach sind auch Partikel in dieser Größenordnung bei der Bekämpfung von Viren besonders von Vorteil, da sie, genauso wie Viren, im Blutstrom zirkulieren und in die Zellen eindringen können.



**Abb. 1.3.1:** Anwendungsbereiche verschiedener Polyglycerine.<sup>[57, 58]</sup>

### Herstellung

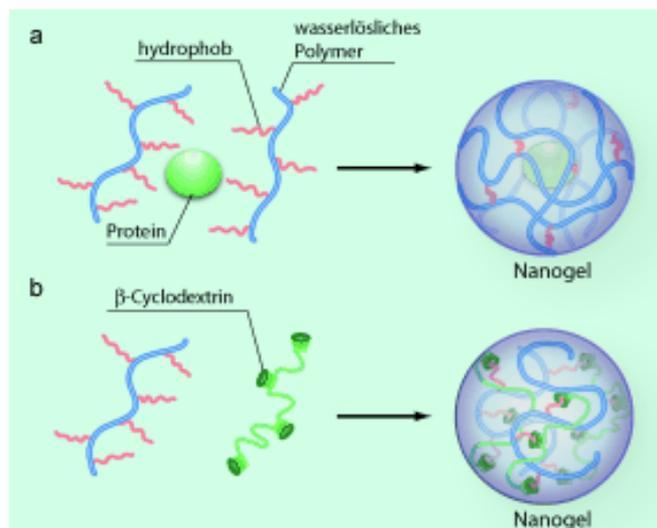
Im Allgemeinen können Nanogele auf vier verschiedene Weisen hergestellt werden, die im Folgenden näher erläutert werden.

- 1) physikalische Selbstorganisation von wechselwirkenden Polymeren<sup>[59-61]</sup>
- 2) Anwendung geeigneter nanoskaliger Template
- 3) Polymerisation von Monomeren in homogener Phase oder in mikro- bzw. nanoskaliger heterogener Umgebung
- 4) kovalente Vernetzung von Polymeren

### 1) Physikalische Selbstorganisation

Die Methode der physikalischen Selbstorganisation wird überwiegend bei hydrophilen Polymeren verwendet, die intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden können. Diese Art der Herstellung findet in der Regel unter milden Bedingungen statt, so dass Biomoleküle wie Proteine auf diesem Weg zu Gelen geformt werden können. Yao *et al.* berichtete z. B. über die Gewinnung von stabilen Proteinnanogelen aus positiv geladenem Chitosan und negativ geladenem Ovalbumin,<sup>[61]</sup> wobei die Eigenschaften der Nanogele, wie Größe und Hydrophilie über den pH-Wert der Reaktionslösung kontrolliert werden können.

Biomoleküle können aber auch bei der Nanogelsynthese eingearbeitet werden (Abb. 1.3.2) So gelang Akizoschi *et al.* die Herstellung von Cholesterin-Pullulan Nanogelen aus Cholesterin und dem Polysaccharid Pullulan, die mit bis zu fünf Insulin Molekülen beladen sind.<sup>[59, 62]</sup> Eine enge Verteilung der Partikelgröße wird durch ein bestimmtes Cholesterin-Zuckereinheiten-Verhältnis gewährleistet, denn nur bei einem Verhältnis von 1:40-1:100 werden Nanogele mit 20 - 30 nm Durchmesser gebildet.



**Abb. 1.3.2:** Physikalische Selbstorganisation von Nanogelen im wässrigen Medium. a) Die Aggregation des hydrophob modifizierten Polymers Cholesterin-Pullulan. b) Nanogele aus entgegengesetzt geladenen β-Cyclodextrin und Laurylmodifiziertem Dextran.<sup>[63]</sup>

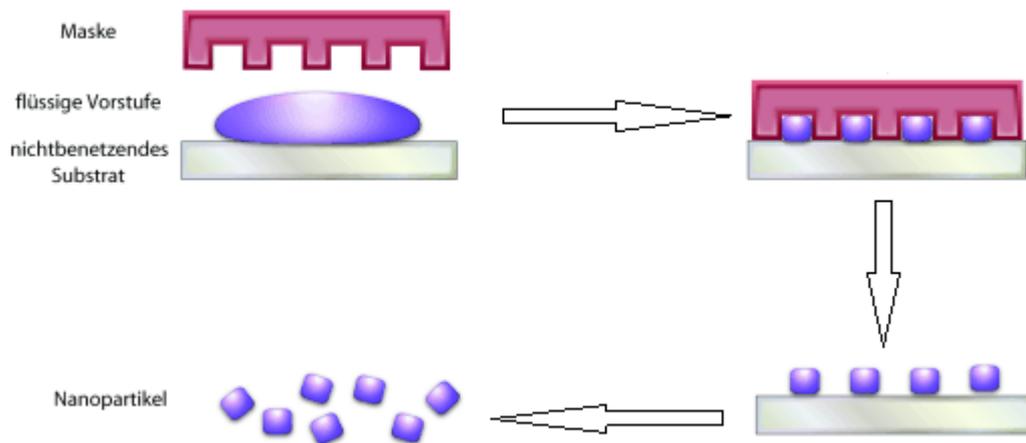
### 2) Anwendung geeigneter nanoskaliger Template am Beispiel der Softfotolithographischen PRINT-Methode

Die softfotolithographische PRINT-Methode (Partikel-Replikation in nicht benetzenden Templaten) ist gut geeignet, um monodisperse Nanogelpartikel in speziellen Formen herzustellen. Dabei dient eine Elastomermatrix aus Perfluoropolyether als Form, in dem die

flüssige Vorstufe durch UV-Induktion zu Gelen miteinander vernetzt werden. Das Nanogel nimmt dabei Formen und Größe der Matrix an. Wie Abb. 1.3.3 illustriert, ist die Größe und Form der Nanogelpartikel über die Matrix beliebig steuerbar.

Diese Methode wurde in den 90er Jahren von Whitesides erfunden<sup>[64-67]</sup> und später von DeSimone weiterentwickelt, um einheitliche Partikel mit bis zu 200 nm Durchmesser aus Polyethylenglykoldiacrylaten, Triacrylateharzen und Polypyrrolen zu gewinnen.<sup>[68]</sup>

Auch Hennink *et al.* berichteten über diversen Vorteile dieser Methode bei der Herstellung von HPG-MA-Mikrogelen mit einer Größe zwischen 30 und 1400  $\mu\text{m}$ .<sup>[58]</sup>



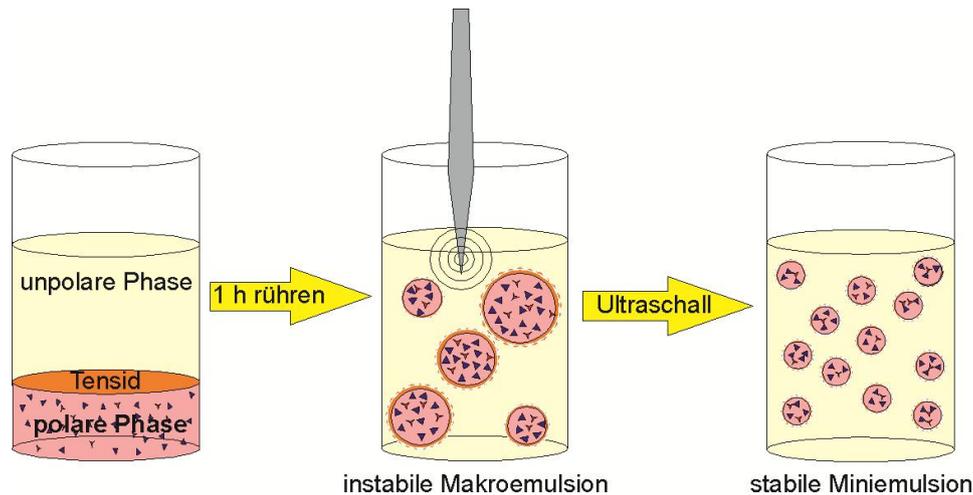
**Abb. 1.3.3:** Fotolithographische PRINT-Methode mit Hilfe eines nichtbenetzenden Perfluorpolyether-Elastomermatrix.<sup>[63]</sup>

### 3) Polymerisation von Monomeren in homogener Phase oder in mikro- bzw. nanoskaliger heterogener Umgebung am Beispiel der Miniemulsion

Neben der fotolithographischen PRINT-Methode existieren noch andere Mittel, um den Gelierungsprozess zu kontrollieren und die Gele im Nanometerbereich zu gewährleisten.

So werden die klassischen Emulsions-/Fällungspolymerisationen auf Nano- bzw. Mikrobereiche erweitert. Bei der Emulsion kann es sich sowohl um Wasser-in-Öl- als auch um Öl-in-Wasser-Emulsionen (inverse Emulsion) handeln. Emulsionen sind disperse Systeme von zwei oder mehr miteinander nicht mischbarer Flüssigkeiten. Eine der beiden flüssigen Phasen (z. B. Wasser) bildet dabei die kontinuierliche Phase, in dem die andere Phase (z. B. Öl) in Form feiner Tropfen verteilt ist. Gegen Koaleszenz und Ostwald-Reifung wird ein geeignetes Tensid zugesetzt, das sowohl einen hydrophilen als auch einen hydrophoben Teil besitzt und die Grenzen der Tröpfchen bildet.

Im Gegensatz zur Mikroemulsion, die durch Rühren entstehen, werden höhere Scherkräfte bei der Entstehung von Miniemulsionen benötigt. Außerdem sind Miniemulsionen sehr stabil. Die Tröpfchen können durch ein zusätzliches Reagenz stabilisiert werden, das nur in der dispergierenden Phase löslich ist (Abb.1.3.4).<sup>[69-71]</sup> Jedes Tröpfchen fungiert hier als ein Nanoreaktor, in dem eine vollständige Gelierung innerhalb des Nanoreaktors stattfindet, so erhält man Nanopartikel als 1:1 Kopie der Tröpfchen.



**Abb. 1.3.4:** Polymerisation in einer inversen Miniemulsion

Die erste Polymerisation in inversen Mizellen wurde bereits in den 80er Jahren von Speiser *et al.* durchgeführt,<sup>[72]</sup> doch in den 90er Jahren fand diese Methode wenig Beachtung und es gab nur wenige Forschungsberichte, die darauf basierten. Heute gehört die Miniemulsionspolymerisation zu einer der meist verwendeten Herstellungsmethoden von Nanogelen.<sup>[70]</sup> Sowohl radikalische Polymerisation,<sup>[69]</sup> als auch andere Polymerisationen wie Polyadditionen<sup>[71]</sup> und Polykondensationen<sup>[73-75]</sup> können in Miniemulsionen durchgeführt werden. So gelang Antonietti und Landfester die Synthesen von Polyamiden über anionische Polymerisation in nicht wässriger Miniemulsionen,<sup>[76]</sup> sowie die Synthese von Polydimethylsiloxan-Latex über die Copolymerisation.<sup>[77, 78]</sup>

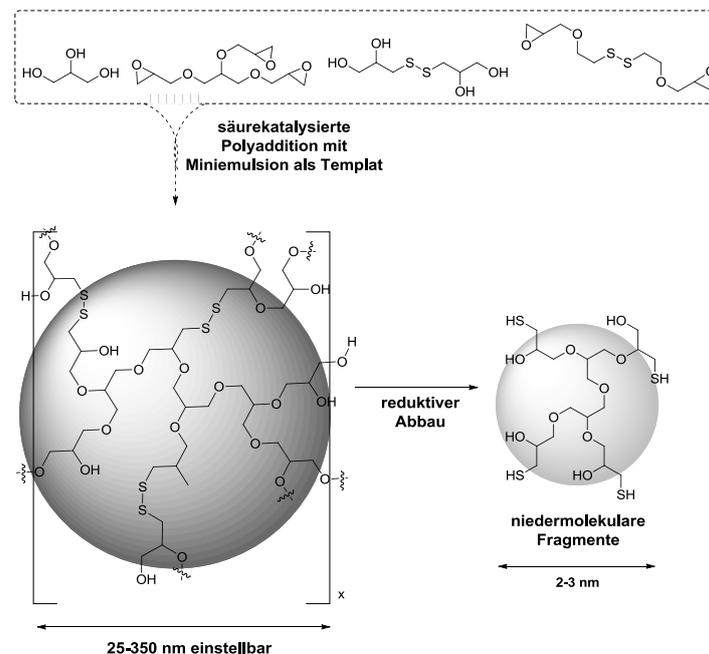
Bei direkter wie auch bei inverser Miniemulsion ist das oberflächenaktive Tensid das Schlüsselement, welches für die kolloidale Stabilität der Emulsion verantwortlich ist und die Größen der Tropfen bestimmt. Die gängigsten oberflächenaktiven Stoffe sind inzwischen kommerziell erhältlich und werden teilweise auch kombiniert verwendet, um die gewünschte Größe und Stabilität zu erzielen. Variiert man z. B. das Verhältnis zwischen Natriumdodecylsulfat (SDS) und Styren in einer 20% dispergierten Phase, kann man die Tropfengröße zwischen 180 nm und 32 nm regulieren.<sup>[69]</sup> Für manche Fälle stellt das Tensid

allerdings auch eine gewisse Einschränkung dar, wenn spezielle Systeme benötigt werden. Dies wird in Kapitel 4 ausführlich vorgestellt.

## 4) Kovalente Vernetzung von Polymeren

Die Vernetzung von vorhandenen Polymeren ist eine Methode, um Nanogele unterschiedlicher Morphologie zu bekommen. Solche Synthesen werden ebenfalls in Emulsionen/Miniemulsionen durchgeführt. Einerseits kann man durch Knüpfen der kovalenten Bindungen über ausgewählte Linker großporige Nanogele herstellen,<sup>[79]</sup> andererseits sind auch nicht sphärische, bzw. stäbchenförmige und toroidale Partikel zugänglich.<sup>[80]</sup>

Verknüpft man z. B. labile Linker mit Polymeren, so bietet sich die Möglichkeit, die Bindung unter geeigneten Bedingungen wieder zu spalten und den eingeschlossenen Inhalt, wie z. B. Wirkstoff, wieder freizulassen. Beispielsweise nutzten Kabanov et. al. 1999 ein kationisches PEI-PEG-Copolymer als Träger für Antisense Phosphorthioate Oligonukleotiden (SODN), um diese effektiver in die menschlichen oralen epidermoiden Krebszellen einzuschleusen<sup>[81]</sup>. In den letzten Jahren wurden von Haag und Mitarbeitern über 25-350 nm großen Polyglycerinnanogele berichtet, die Disulfidbindungen enthalten, die unter reduktiven Bedingungen in der Zelle gespalten werden, den Wirkstoff freisetzen und ausgeschieden werden (Abb. 1.3.5).<sup>[75]</sup>



**Abb. 1.3.5:** Disulfidhaltige bioabbaubare Polyglycerinnanogele, Syntheseroute und reduktiver Abbau<sup>[75]</sup>

### 1.2.3 Quellungverhalten von Hydro- und Nanogelen

Sowohl für klassische Hydrogele als auch für Nanogele ist die Quellung eine der wichtigsten Eigenschaften, insbesondere für die Werkstoffbeladung und -freisetzung ist diese von großer Bedeutung.

Die Quellung in wässriger Umgebung wird beeinflusst durch

1) deren Aufbau (chemische Struktur des Polymers, Vernetzungsgrad, Ladungsdichte in Polyelektrolytgelen) und durch

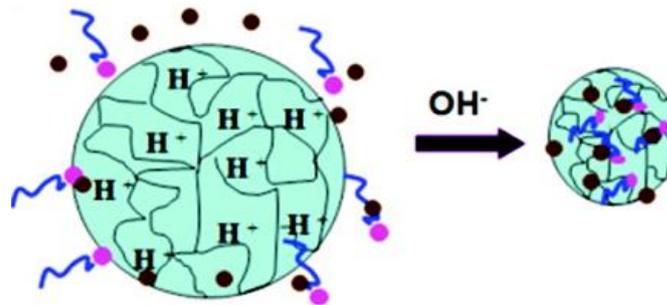
2) Umgebungsparameter wie pH-Wert, Ionenstärke und Struktur der niedermolekularen Gegenionen für Polyelektrolytgele sowie die Temperatur bei temperaturabhängigen Gelen.<sup>[63]</sup>

Generell kann davon ausgegangen werden, dass der Quellungsgrad mit höherer Vernetzung abnimmt.<sup>[82, 83]</sup> Dies wurde von Wooley und Mitarbeiter am Beispiel der PEG-*b*-PMA-Nanogelen gezeigt.<sup>[80]</sup>

Das Quellungsvermögen klassischer Hydrogele bezogen auf ein Lösungsmittel wird berechnet als  $Q = m_{\text{abs. Lös.}}/m_{\text{Polymer}}$ . Dabei steht  $m_{\text{Polymer}}$  für die Masse der Probe und  $m_{\text{abs. Lös.}}$  für die Masse des Lösungsmittels, die von der Probe aufgenommen wird. Die Masse des Lösungsmittels wird ermittelt als die Massendifferenz der Probe vor- und nach dem Quellvorgang. Die reziproke Zahl von diesem Wert ergibt den Vernetzungsgrad des Gels. Dadurch wird der Zusammenhang zwischen Quellverhalten und Vernetzungsgrad deutlich.<sup>[84]</sup>

Bei Nanogelen ist es aber nicht möglich, das Quellverhalten bzw. den Quellungsgrad über die aufgenommene Lösungsmittelmenge zu untersuchen. Hier wird die Partikelgröße bzw. das -volumen herangezogen. So wurde über das Poly*N*-Isopropylacrylamid-Gel (PNIPAAm) berichtet, dessen Partikel mit steigendem pH-Wert (4-6.5) von 100 auf 500 nm aufquellen können. Dies ist eine oft beobachtete Eigenschaft von Polyelektrolytgelen,<sup>[85, 86]</sup> jedoch ist die Tendenz zur Größenänderung je nach Acidität der Komponenten unterschiedlich. Vernetzte PEG-*b*-PMA-Nanogele schrumpfen zum Beispiel bei einer Senkung des pH-Werts von 9 auf 5 infolge der Protonierung der Carboxylatgruppen von PMA.<sup>[83]</sup> PEG-*c*-PEI-Nanogele wiederum schrumpfen dagegen bei Erhöhung des pH-Werts von 8.5 auf 10 durch Deprotonierung der Ammoniumgruppen von PEI.<sup>[63, 87]</sup> Abb. 1.3.6 zeigt schematisch das Prinzip des pH-induzierten Quellvorgangs eines positiv geladenen Nanogels.<sup>[88]</sup> Zusätzlich hängt das Quellverhalten eines Polyelektrolytgels auch von der Ionenstärke ab. Die ionisierten Gruppen ziehen hydratisierte Gegenionen an. Dies begünstigt die Quellung des Gels, während die Entropieelastizität der Polymerketten sich der Quellung entgegensetzt. Für schwache Polyelektrolytgele hängt die Ionisierung vom pH-Wert ab. Eine Reduzierung der Zahl an Gegenionen und der Gesamtladung durch pH-Änderungen führt zur

Schrumpfung der Gele, weil der osmotische Druck abnimmt; dabei kann die Schrumpfung nur bis zum Ausschlussvolumen der Polymerketten erfolgen.<sup>[63]</sup>



**Abb. 1.3.6:** Der pH-induzierte Quellvorgang eines Nanogels.

Bei temperaturempfindlichen Gelen muss man die Entmischungstemperatur in Betracht ziehen, so quillt beispielweise das Pluronic-Polymer-PPG-Gel bei Abkühlen unter die Entmischungstemperatur von 120 nm auf über 400 nm an.<sup>[86]</sup> Aufgrund dieser Eigenschaft kann es als schaltbarer Wirkstoffträger verwendet werden.

Die deutliche und sehr schnelle Reaktion auf sich verändernde Umgebungsbedingungen macht nanoskalige Hydrogele zu vielversprechenden Kandidaten als Wirkstoffträger.

In einigen Fällen kann das Beladen der Hydrogele mit Wirkstoffen zusätzlich zu Volumenschrumpfen führen. Ursache dafür können elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrücken sein, die der Wirkstoff mit den Hydrogelketten bildet. Diese Wechselwirkungen setzen die "Löslichkeit" der Hydrogelketten herab, was eine Verdrängung von Wassermolekülen zur Folge hat und schließlich zum Schrumpfen und Kollaps des Gels führt.<sup>[63]</sup>

### 1.3 Nanotransporter in der Biomedizin

Wie bereits erwähnt fanden Nanogele in den letzten Jahren zunehmend Anwendungen als Wirkstofftransporter, wodurch die Effizienz niedermolekularer Therapeutika erheblich verbessert werden konnte.<sup>[87, 89]</sup>

Unter anderem konnten auch Biomakromoleküle wie Oligonucleotide, von Nanogelen geträgert, erfolgreich durch Blut-Hirn-Schranke geschleust werden.<sup>[90]</sup>

So war es naheliegend, Nanogele auch in der Gentherapie als DNA-Transporter zu versuchen.

### 1.3.1 Gentherapie

In den letzten Jahren ist die Gentherapie ein wichtiger Forschungsschwerpunkt in Biologie, Chemie und Medizin geworden.

Bei allen gentherapeutischen Verfahren geht es darum, Krankheiten nicht symptomatisch zu behandeln, sondern die Ursache der Erkrankung zu beheben, indem defekte Gene, durch intakte DNA-Sequenzen, ersetzt oder die Expression eines defekten Gens verhindert wird, Erblich bedingte Krankheiten wie z. B. Mukoviszidose oder Sichelzellenanämie können auf diesem Weg bekämpft werden. Das Fortschreiten der Krankheit kann verlangsamt bzw. die Krankheit im Idealfall behoben werden.

### 1.3.2 Polyglycerin-basierte Transportsysteme in der Gentherapie

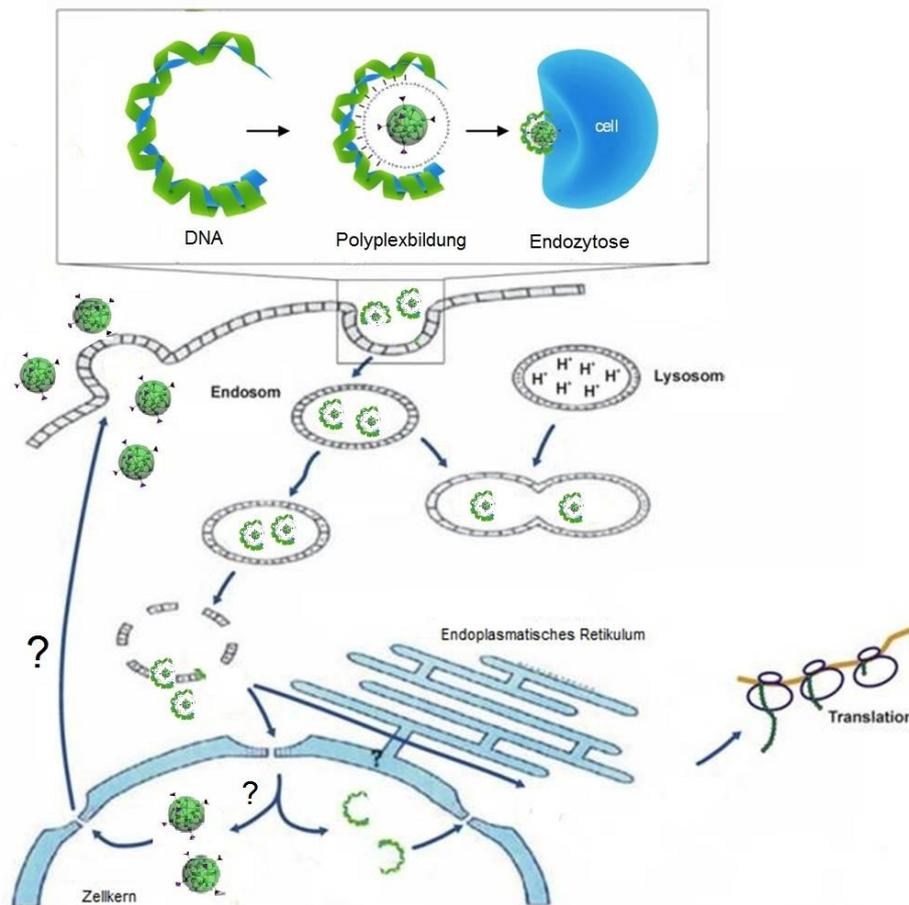
In den letzten Jahren wurden neben viralen Vektoren verschiedene kationische Polymere zum Transport von DNA- und RNA-Fragmenten untersucht.<sup>[91-96]</sup> Als Vektor bezeichnet man in der Gentherapie ein „Carrier-System“ für den Transfer des Genmaterials. Viren sind derzeit die wirkungsvollsten Systeme, da sich durch diese hohe Transfektions- als auch Genexpressionsraten erzielen lassen. Jedoch besitzen Viren eine erhebliche Zytotoxizität und ihre Isolierung und Aufarbeitung aus einer biologischen Matrix ist kostenintensiv. Eine mögliche Alternative bieten nicht viralen, biokompatiblen Nanogelee.

Im Jahr 2004 wurde ein effizienter Zugang zu dendritischen Polyaminen mit definiertem Molekulargewicht und einstellbarer Flexibilität (Verzweigungsgrad) gefunden.<sup>[96]</sup> Die Beobachtung, dass ein teilweise zerstörtes Rückgrat eine sowohl höhere Transfektionsgeschwindigkeit als auch eine höhere Effizienz aufweist, unterstreicht die Bedeutung/Verwendung von hyperverzweigten Polyglycerin mit einstellbarer Flexibilität.<sup>[91]</sup> Beide Parameter beeinflussen sowohl die Effektivität der DNA-Transfektion, als auch die Zytotoxizität.<sup>[93]</sup>

Die Klasse der biokompatiblen, hyperverzweigten Polyglycerole (PG) erlaubt aufgrund der zahlreichen Hydroxygruppen eine leichte und vielseitige Funktionalisierung, durch welche die Eigenschaften und die Struktur dieser dendritischen PG maßgeschneidert werden können. Zusätzlich weisen PG eine sehr gute Löslichkeit auf. Das Potenzial dieser dendritischen Nanotransporter wurde bereits intensiv im Bereich der Solubilisierung und des Wirkstofftransports untersucht, dennoch ist der Mechanismus der aktiven Abgabe der verkapselten Wirkstoffe weitestgehend unerforscht. Dendritische Nanotransporter bieten zahlreiche Bindungsstellen zum Anbinden, von z. B. Genen (durch Anbindung von

## 1. Einleitung und Grundlagen

aminofunktionalisierten Gruppen) und/oder pharmakologisch wirksamen Peptiden bzw. anderer Targeting-Liganden.



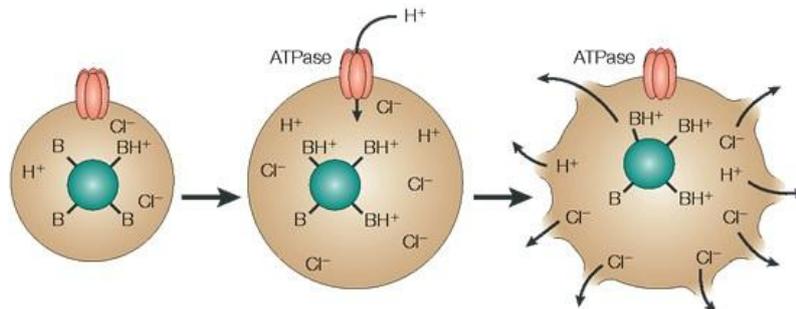
**Abb.1.3.7:** DNA-Transfektion mit Hilfe von PG-Aminen.

Polykationische Polyglycerole sind relativ einfach synthetisierbar, ihre Größe kann variiert werden und ihre Zusammensetzung kann unterschiedlich gestaltet werden, wodurch ihre Eigenschaften, wie Oberflächenbeladung angepasst werden können.<sup>[97]</sup> So kann man z. B. durch Modifizierung der Oberfläche die Zellspezifität erhöhen oder im Allgemeinen deren Eigenschaften als Vektoren verbessern, wie z. B. deren Effizienz als Genvektor. Dadurch können etwaige Nebenwirkungen, wie Toxizität auch vermindert werden. Zusätzlich können kationische Polymere mit unterschiedlichem Molekulargewicht und einstellbarer Flexibilität, also unterschiedlichem Verzweigungsgrad hergestellt werden. Beide Parameter haben Einfluss auf die Effizienz, bzw. Zytotoxizität des jeweiligen Vektors. Die Anzahl der funktionellen Gruppen kann durch Wahl der Größe des Grundgerüsts, dem so genannten

Kern, bestimmt werden. Die Anzahl der funktionellen Gruppen steigt exponentiell mit der Kerngröße an.

In Abb. 1.3.7 ist die Transfektion von DNA mit Hilfe eines PG-basierten Vektors schematisch dargestellt. Der Vektor, dargestellt als grüner Kugel mit entsprechender Oberflächenfunktionalisierung, bildet zunächst mit DNA einen Polyplex. Dadurch wird die negative Ladung der DNA abgeschirmt, so dass diese in die Zelle transportiert werden kann. Bei der Endozytose umfließt die Zellmembran den Polyplex und schließt sich zu einem Vesikel, das durch die Zellen diffundiert. Gelangt ein Vesikel in die Nähe des Zellkerns kann die DNA abgegeben und in den Zellkern eingebaut werden. Der Transfektionsvektor kommt frei und kann anschließend die Zelle wieder verlassen.

Die in Abb. 1.3.8 dargestellte Protonenschwamm-Hypothese postuliert eine verstärkte Transfektion durch kationische Polymer-DNA-Komplexe (Polyplexe), die protonenpuffernde Polyamine durch verstärkte endosomale Chlorid-Akkumulation enthalten und zu osmotischer Schwellung und Lyse des Endosoms führen.<sup>[93, 98]</sup>



**Abb.1.3.8:** Prinzip des Protonenschwamm-Mechanismus.<sup>[98]</sup> Der Protonenschwamm (grün) erhöht den Fluß der Protonen und deren Gegenionen in Endozydenvesikeln. Der erhöhte osmotische Druck bringt die Vesikeln zum Quellen.

Bifunktionelle Dendrone, basierend auf Polyglycerin konnten sich bereits als gute, effiziente und kontrollierbare Ausgangsmaterialien für diesen Zweck erweisen. Zudem sind diese Systeme wegen ihrer geringen Zytotoxizität sicherer in der Handhabung. In unveröffentlichten Vorarbeiten wurde ein modulares Konzept für die Synthese von dendritischen Amphiphilen entwickelt, die spontan durch Selbstorganisation wohldefinierte Architekturen ausbilden. Hierbei wurde eine lange Alkylkette als hydrophobe Einheit und ein Dendron, basierend auf Polyglycerin als hydrophiles Segment ausgewählt.

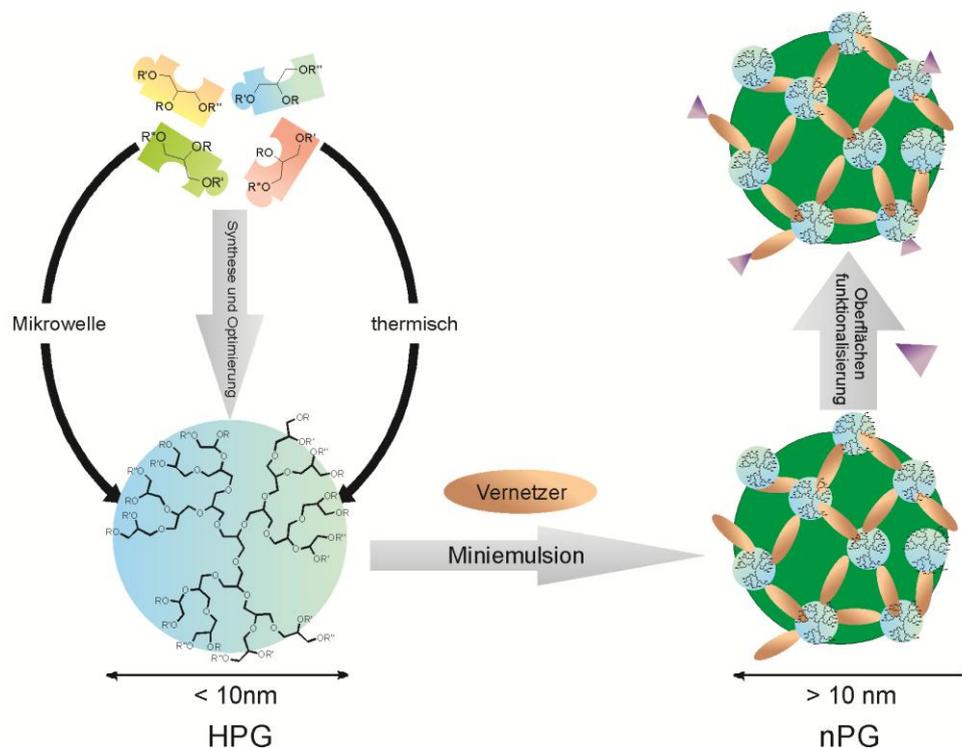
Die Modifizierung solcher Amphiphile durch eine Amino-Funktionalisierung, wie z. B. die kovalente Anbindung verschiedener Aminosäuren, ermöglicht den Einsatz dieser neuartigen

dendritischen Amphiphile in der Gentransfektion. Durch die amphiphilen Eigenschaften und Mizellbildung, wäre einerseits eine Komplexierung von DNA möglich und andererseits sollte durch Selbstorganisation und die hydrophoben Einheiten ein erleichterter Membraneintritt gewährleistet sein.<sup>[99]</sup>

## 2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Hyperververzweigte wasserlösliche Polymere, wie Polyglycerine, haben großes Potential, sowohl in der Industrie als auch für biomedizinische Anwendungen.

In dieser Arbeit werden Polyglycerine aus Glycerin bzw. Glycerinderivaten und nach unterschiedlichen Konzepten synthetisiert. Die geplanten Konzepte beruhen einerseits auf der thermischen Methode, weiterhin sollten auch moderne Techniken wie die Mikrowelle verwendet werden.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Zielsetzung: aus Glycerinderivaten sollen hyperverzweigte Polyglycerine (HPG) mit Durchmessern  $< 10\text{ nm}$  (links) gebildet werden. R, R', R'' stellen mögliche funktionale Gruppen dar. Weiterhin sollen diese verzweigten Oligo- und Polyglycerinbausteine zu Nanogelen mit Durchmessern  $> 10\text{ nm}$  (nPG) vernetzt (rechts unten) und anschließend an der Oberfläche funktionalisiert (rechts oben) werden.

### 2.1 Katalysierte Kondensationen von Glycerin und Oligoglycerinen

Die zurzeit gängige Synthese von HPG geht von dem toxischen Glycidol aus und bedarf aufwendige Vorbereitung der Chemikalien, da die anionische Polymerisation unter absolut trockenen Bedingungen ablaufen muss.

Unter Zuhilfenahme von Alternativtechniken wie z. B. Mikrowellenreaktoren soll Polyglycerin aus Glycerin und Oligoglycerin gewonnen werden.

Letztendlich soll eine umweltfreundlichere sowie effizientere Methode gefunden werden, um HPG mit höherer Molmasse zu synthetisieren.

### **2.2 Darstellung von wasserlöslichen Nanogelen durch Vernetzung von Glycerinoligomeren**

Eine weitere Strategie, hochverzweigte Polymerpartikeln im Nanometer Bereich zu erhalten, ist die Vernetzung von Glycerin bzw. Oligoglycerin und ihren Derivaten.

Um die gewünschte Größenordnung zu erreichen, soll die Technik der Miniemulsion verwendet werden. Dieses Verfahren soll in Bezug auf die Partikeleigenschaften optimiert werden. Mittels analytischer Methoden, die speziell zur Charakterisierung von Polymeren geeignet sind, wie GPC, MALDI-TOF, ESI-TOF, DLS, sollen die Polymerisationsprodukte analysiert werden, um das Konzept zu überprüfen und die Synthesemethoden zu optimieren.

#### **2.2.1 Funktionalisierung sowie Anwendung der erhaltenen Polyether Nanogele**

Nachdem eine Synthesemethode etabliert ist, sollen Produkte im größeren Maßstab hergestellt werden. Weiterhin sollten die Polyether Nanogele mit Aminen funktionalisiert und als Trägersysteme für Wirkstoffe (z. B. DNA) untersucht werden. Dazu sind biomedizinische Tests durchzuführen.

#### **2.2.2 Darstellung von wasserlöslichen Nanogelen unterschiedlicher Innenarchitekturen und Untersuchung von deren mechanischer Eigenschaften**

Es sollte möglich sein, auch das Kerngerüst an sich zu modifizieren bzw. zu variieren, sodass das Polymer nicht nur die Oberfläche zur Verfügung stellt, sondern auch seine Form und Innenarchitektur spezielle Anwendungen dienen können. Dazu sollen Nanogele aus verschiedenen Bausteinen synthetisiert werden. Es sollen z. B. langkettige Bausteine verwendet werden, um flexible bzw. offene Netzwerke zu gewinnen.

Die erhaltenen Produkte sollen hinsichtlich ihrer chemischen und mechanischen Eigenschaften analysiert werden. Als eine der wichtigsten Eigenschaften der Hydrogele soll das Quellvermögen intensiv untersucht werden, um diese für weitere Anwendungen einzusetzen.

### 3. Synthese von Polyether Polyolen aus Glycerin

Glycerin, auch 1,2,3-Propantriol oder Glycerol genannt, wurde 1779 von dem deutsch-schwedischen Apotheker Carl Wilhelm Scheele bei der Hydrolyse von Olivenöl, entdeckt, wobei er eine süß schmeckende, ölige Flüssigkeit, die er zunächst "Ölsüß" nannte, erhielt. Später konnte er zeigen, dass dieser Stoff auch in anderen Fetten und Ölen enthalten ist.<sup>[100, 101]</sup> Im Jahr 1811 untersuchte der französische Chemiker Eugene Chevreul diese chemische Verbindung und nannte sie Glycerin (von gr.: glykys, süß),<sup>[102]</sup> aber erst mehr als ein halbes Jahrhundert später folgte die ausführliche Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR. Erste synthetische Darstellung aus 2-Propanol über Propendichlorid wurde 1872 von Charles Friedel und Silva beschrieben.<sup>[103]</sup>

Glycerin ist der wichtigste dreiwertige Alkohol und kommt als Baustein der Glyceride in allen pflanzlichen Ölen und tierischen Fetten vor. Glycerin ist eine farblose, geruchlose, ungiftige, viskose, süß schmeckende und stark hygroskopische Flüssigkeit, die in jedem Verhältnis sowohl mit Wasser als auch mit Ethanol mischbar ist.

Anfänglich wurde Glycerin überwiegend als Begleitprodukt bei der Fettverseifung erhalten. Später fand es jedoch immer mehr Anwendung in der Pharmazie, der Nahrungsmittelindustrie und der Kosmetik. Als Alfred Nobel 1886 die Synthese des Sprengstoffs Nitroglycerin aus Glycerin entwickelte, stieg der Bedarf an Glycerin exponentiell an. Aufgrund der großen Nachfrage wurde Glycerin gezielt und in großen Mengen industriell hergestellt. Dabei wurde das aus der Erdölraffinierung gewonnene Propen erst in Epichlorhydrin und anschließend mit Hilfe von Natronlauge in Glycerin umgewandelt.<sup>[104, 105]</sup> Heute dient Glycerin als Ausgangsstoff für viele funktionalisierte Chemikalien.<sup>[106]</sup> Außerdem fällt Glycerin bei der steigenden Produktion von Biodiesel immer mehr als Nebenprodukt an. Ein Bestreben dieser Arbeit liegt unter anderem auch darin, neue Anwendung für Glycerin zu finden, um aus dem Abfallprodukt hochwertige Materialien zu gewinnen.

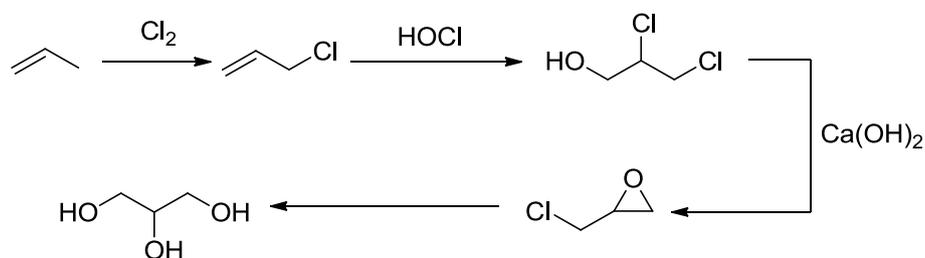


Abb. 3.1: Industrielle Glycerinsynthese.<sup>[104]</sup>

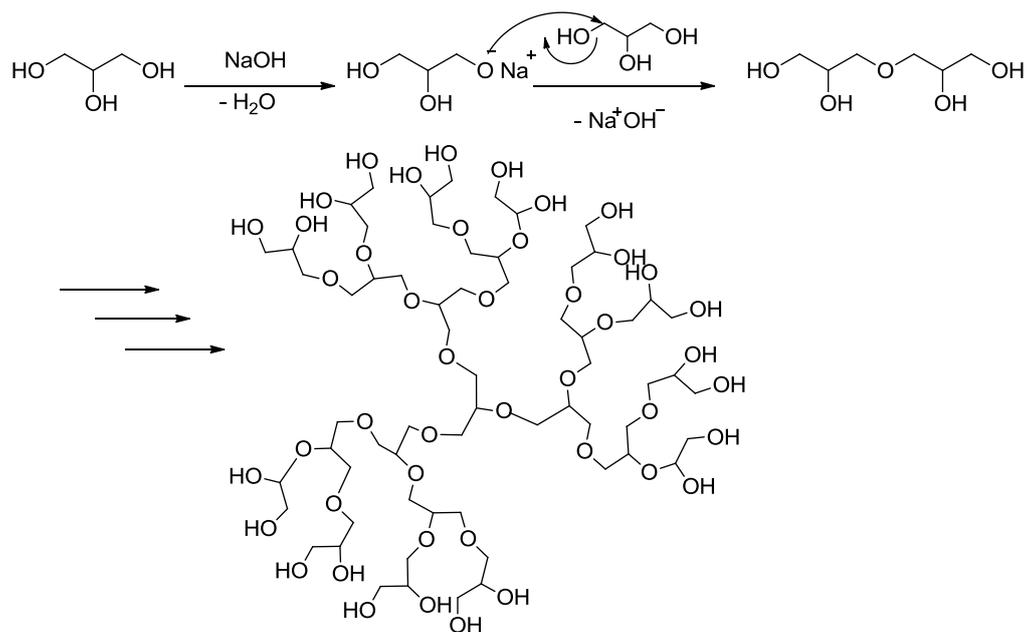
Seit Mitte der 80er wird die Mikrowellen-Technik vermehrt für organischen Synthesen eingesetzt. Wegen ihrer hohen Effizienz gilt diese als neue, alternative Methode der „grünen Chemie“.<sup>[107]</sup> Auch für die Synthese von Polymeren kann diese Technik verwendet werden, um deutlich kürzere Reaktionszeiten zu erzielen. Dieser Effekt entsteht durch die effiziente Energieübertragung auf das Reaktionssystem durch das dielektrische Erhitzen mit Mikrowellen. Sowohl die Haushalts- als auch die Labormikrowellen besitzen in der Regel eine Frequenz von 2.45 GHz, um Störungen der Telekommunikation- und Mobiltelefon-Frequenzen zu vermeiden. Diese Frequenz liegt in einem Bereich, in dem die Dipole oder Ionen der Proben einerseits genügend Zeit haben, sich im angelegten Feld auszurichten, andererseits aber sich auch nicht zu schnell reorientieren können, so dass sie noch Molekularreibung und Dielektrizitätsverlust erfahren müssen. Somit ist die Voraussetzung für Freigabe der Wärmeenergie gegeben. Die Effizienz des Erhitzens mit Mikrowelle hängt stark von der dielektrischen Eigenschaften der Probe ab. Aus dem Quotient  $\epsilon''/\epsilon'$  ( $\epsilon''$ : Dielektrizitätsverlust;  $\epsilon'$  = Dielektrizitätskonstante) wird der Verlustfaktor  $\tan\delta$  berechnet. Dieser beschreibt die Fähigkeit einer bestimmten Verbindung, elektromagnetische Energie in Wärme umzuwandeln. Viele gängige organische Lösungsmittel besitzen große  $\tan\delta$  und sind damit rasch aufgeheizt werden.<sup>[108, 109]</sup> Als eine wichtige Alternative zum herkömmlichen thermischen Erhitzen wurde die Mikrowelle bereits für verschiedene Reaktionstypen eingesetzt. Unter anderem auch für Polykondensationsreaktionen und Oligomerisierungen von Alkanen.<sup>[110]</sup>

In diesem Kapitel wird die Syntheseoptimierung der katalytischen Polykondensation von Glycerin und Oligoglycerinen vorgestellt. Die entstandenen Produkte werden untersucht und mit den aus der Literatur bekannten Polyethern verglichen.

#### 3.1 Direkte Synthese aus Glycerin

Für die Synthese von Polyether-Polyolen mit möglichst enger Massenverteilung wählten wir die katalytische Polykondensation von Glycerin. Die Kontrolle über die Polymerisation und somit ihre Optimierung erfolgt über die Anpassung des Katalysators, der Katalysatormenge, der Reaktionstemperatur, der Reaktionszeit sowie des Druckes. Die Polykondensation wurde unter Variation dieser Parameter durchgeführt und die erhaltenen Polymerisate schließlich untersucht.

### 3 Synthese von Polyether Polyolen aus Glycerin



**Schema 3.1.1:** Darstellung der katalysierten Polykondensation von Glycerin.

In Schema 3.1.1 ist der Mechanismus der basenkatalysierten Polykondensation von Glycerin dargestellt. Der nukleophile Angriff des Alkoholats kann nicht nur, wie hier gezeigt, an dem primären, sondern auch an dem sekundären Kohlenstoff erfolgen, dadurch kommt es zu einer verzweigten Struktur.

Als Katalysatoren wurden zunächst Erdalkalimetalloxide (CaO und MgO), aufgrund ihrer hohen katalytischen Wirkung gegenüber Glycerin, verwendet. Schließlich wurden auch Lewisäuren und stärkere Basen eingesetzt.

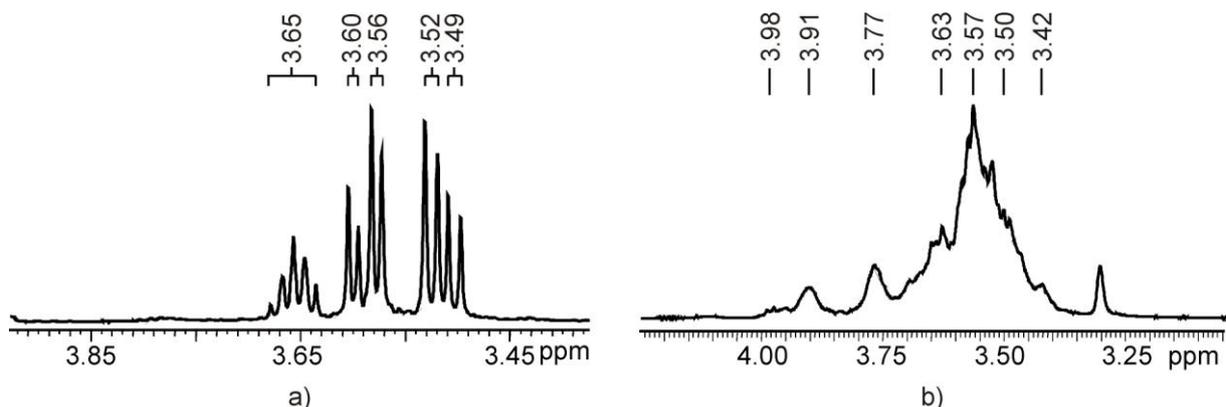
Als Alternative zum thermischen Erhitzen wird seit einigen Jahren die Mikrowellentechnik verwendet. Laut Berichten von Kappe, liegt der Vorteil dieser Methode im effektiven Erhitzen des Reaktionssystems, somit kann die Reaktionszeit deutlich verkürzt werden.<sup>[109]</sup> Für folgenden Polykondensationsreaktionen entschieden wir uns auch für diese Technik.

Erste Versuche zur Darstellung von hyperverzweigtem Polyglycerin wurden bei 120°C, 12 h unter Normaldruck mit 1 Gew.-% LiOH im 5 g Maßstab durchgeführt. Dabei konnte die Bildung von Wasser beobachtet werden, welches einen eindeutigen Hinweis auf die Bildung von Kondensationsprodukte liefert. Nach 12 Stunden des Erhitzens wurde das erhaltene Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Parallel dazu wurde die gleiche Reaktion in einem Mikrowellenreaktor durchgeführt, die Reaktionszeit betrug 5 Minuten. In dem untern Spektrum (Abb. 3.1.2 b)) erkennt man deutlich breitere Signale im Vergleich zu Glycerin,

während das obere Spektrum fast identisch mit dem des Glycerins ist. Die Verbreiterung der Peaks ist ein eindeutiger Hinweis auf Bildung von Polymeren, dessen Verzweigungsgrad mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -NMR untersucht wurde.

Die Überlagerung der NMR-Signale gab erste Hinweise auf die Polymerisation. Allerdings wurden auch Nebenprodukte gefunden. Die Peaks im Bereich von 4-6 ppm weisen auf Doppelbindungen hin, die durch Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  gebildet wurden. Die Ausbeute nach der Dialyse betrug weniger als 10%.

Um das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite zu verschieben, wurde die Reaktion versuchsweise unter niedrigem Druck und Wasserentzug durchgeführt. Wider Erwarten führte dies aber zu geringerer bis gar keiner Produktbildung, was anhand des Rohproduktes schon vermutet und durch NMR-Spektren bestätigt wurde. Eine mögliche Ursache dafür könnte ein Verlust der zu Reaktionsbeginn entstandenen niedermolekularen Verbindungen sein, welche im Wasser gelöst sind und welche in Folge der Wasserabscheidung aus der Reaktionsmischung entfernt wurden.



**Abb. 3.1.2:** NMR-Spektren von a) Produkt nach thermischen Methode und b) Produkt nach Ansatz im Mikrowellenreaktor.

In der Tabelle 3.1 ist eine Versuchsreihe aufgelistet, bei der verschiedene Katalysatoren für die Polykondensation von Glycerin verwendet wurden. Die einzelnen Reaktionen wurden jeweils in der Mikrowelle durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden hinsichtlich Farbe und Viskosität mit dem Edukt verglichen, die Änderung dazu wurde notiert.

**Tab. 3.1:** Viskositätsänderung der ersten Mikrowellensynthesen.

	LiOH	AlCl <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub>	CaO	Mg(OH) <sub>2</sub>	MgO	NaOH	KOH	
1%	mittel <sup>2</sup>	leicht <sup>1</sup>	-	-	-	-	stark <sup>3</sup>	mittel	1013 mbar
5%	mittel	leicht	-	-	-	-	stark	mittel	
10%	mittel	leicht	leicht	leicht	leicht	-	mittel	mittel	
1%	leicht	-	-	-	-	-	-	-	23 mbar
5%	leicht	-	-	-	-	-	-	-	
10%	leicht	-	-	-	-	-	leicht	leicht	

<sup>1</sup> leicht: Viskosität ähnlich der des Glycerins, farbliche Änderung

<sup>2</sup> mittel: deutlich zähflüssiger als Glycerin, gelbbraune Verfärbung

<sup>3</sup> stark: honigartig zähflüssig, bei Raumtemperatur kaum flüssig

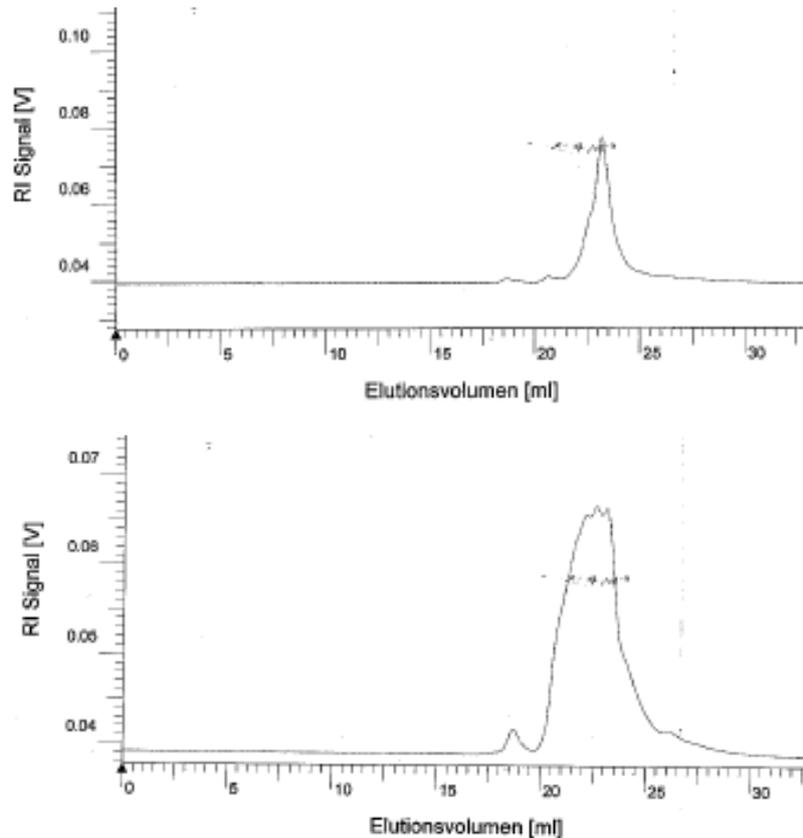
In dieser Tabelle werden die Produkte aus den Mikrowellenreaktionen beurteilt. Dabei wurden verschiedene Katalysatoren und verschiedene Ansatzmengen eingesetzt. Zusätzlich wurde der Druck variiert, unter vermindertem Druck wurde das entstandene Wasser entzogen, um das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite zu verschieben.

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass basische Katalysatoren im Allgemeinen Produkte mit höherer Viskosität erzeugen. Auch mit dem in der Literatur als am effizientesten bezeichneten Katalysator CaO<sup>[111]</sup> wurden geringere Viskositätsveränderung beobachtet als mit NaOH. Dies ist überraschend, da in der Regel die Etherbildung durch Alkoholkondensation sauer katalysiert ist.

Außerdem kann man erkennen, dass das Abscheiden des Wassers unter vermindertem Druck nicht zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf die Produktseite führt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, z. B. die Tatsache, dass Wasser, Glycerin und Oligoglycerine unterschiedliche Verlustfaktoren  $\tan\delta$  besitzen, was direkt zu unterschiedlichen Effizienz bei Hitzaufnahme der Proben führt. Eine von Prof. Matthias Rudolph durchgeführte Messung der Reflexion an einem Koaxial-Kabel in verschiedenen Flüssigkeiten zeigte, dass Glycerin bzw. Oligo- und Polyglycerine die Mikrowellenstrahlung kaum absorbieren und somit auch nicht in Hitze umwandeln können. Das entstehende Wasser im Reaktionsgemisch ist also fördernd, um das Gemisch aufzuheizen. Entzieht man dem System das Wasser, so kann es nicht effizient erhitzt werden und die Reaktion wird nicht ausreichend angeregt.

Die in der Tabelle angegebenen optischen Zustände der Produkte stimmen mit den Ergebnissen überein, die anhand von NMR und GPC ermittelt wurden. Laut Tabelle hatte die NaOH-katalysierte Synthese die stärkste Veränderung erzielt. Dieses Produkt wurde zusätzlich mit MALDI-TOF analysiert.

In Abb 3.1.3 sind die GPC-Spektren von zwei verschiedenen Polymeren, welche durch unterschiedliche Katalysatoren, nämlich CaO und NaOH, gezeigt.



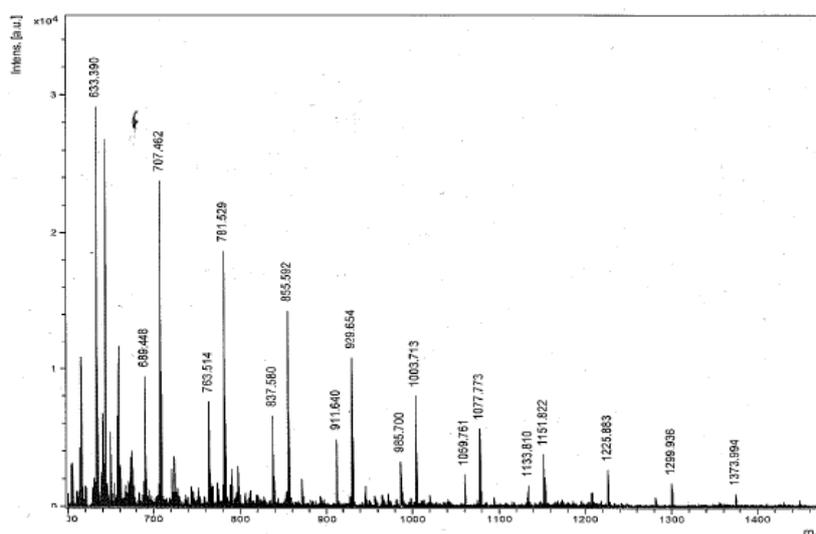
**Abb. 3.1.3:** GPC-Ergebnis des Produktes von der CaO katalysierten Reaktion (oben) und GPC-Ergebnis des Produktes von der NaOH katalysierten Reaktion (unten).

Mit Polyglycerin 2000, 5000 und 10000 als Kalibriersubstanzen, wurden die in Tabelle 3.2 aufgeführten Werte bei GPC-Messungen erhalten. Es ist zu beachten, dass diese Werte keine absoluten Molmassen darstellen, sondern lediglich dem Vergleich dienen. Vor allem die Polydispersität PD ist stark fehlerbehaftet, da die Kalibriersubstanzen bereits eine Polydispersität  $> 1$  besitzen.

**Tab. 3.2:** GPC-ermittelte Molmassen.

Kat.	Fractionen	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$M_p$ (g/mol)	PD
CaO	3	1573	2408	3735	1.24
LiOH	3	3638	3748	3794	1.13
NaOH	2	4653	5795	5874	1.74

MALDI-TOF-Messungen ergeben, dass das erhaltene Produkt aus der NaOH-katalysierten Reaktion eine Molmasse bis zu 1300 g/mol besitzen kann.

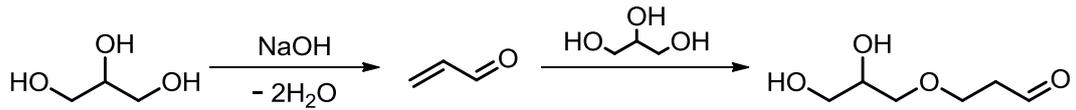


**Abb.3.1.4:** MALDI-TOF-Ergebnis eines Produktes aus der NaOH-katalysierten Reaktion.

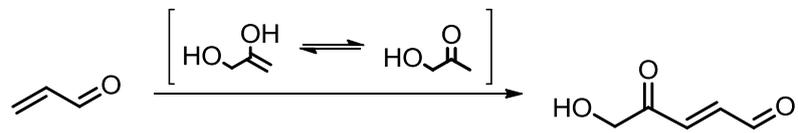
Die Verbindungen mit etwas geringerer Intensität, deren Massen um jeweils 18 m/z kleiner sind als die des Hauptproduktes, weisen auf das Nebenprodukt hin, das durch Dehydratisierung des Hauptproduktes entsteht.

Außerdem sind Nebenprodukte mit Abständen von 44 m/z zu beobachten. Eine Erklärung kann die folgende Nebenreaktion liefern. Glycerin kann bei 200°C unter zweifacher Dehydratisierung zu toxischem Acrolein reagieren. Auch einfache Dehydratisierung ist möglich.

Ferner kann der Aldehyd in Schema 3.1.5 zur Säure oxidiert werden, dies ist aber unter den hier vorhandenen Bedingungen nicht zwangsläufig der Fall. Trifft er auf weiteres Acrolein können weitere Additionen an den OH-Gruppen sowie an dem Aldehyd stattfinden.



bzw.

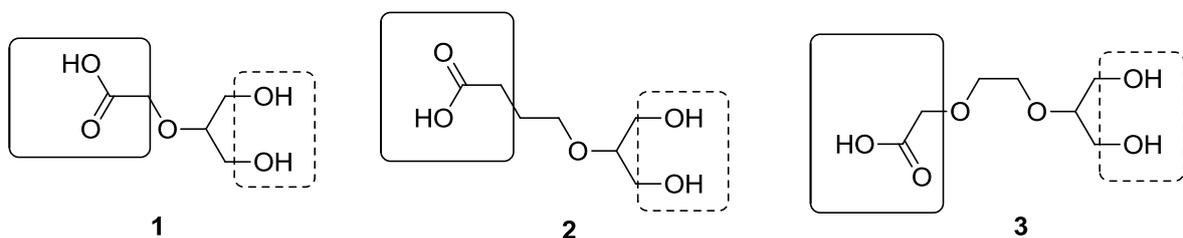


**Schema 3.1.5:** Mechanismus der Acrolein-Addition, einer denkbaren Nebenreaktion.

Verzweigte Polyglycerine weisen zwischen 60 und 80 ppm charakteristische Peaks auf. Durch die Auswertung des NMR-Spektrums wird ersichtlich, dass der Verzweigungsgrad hier jedoch sehr niedrig ist, welcher auf unterschiedlichen Reaktivitäten von primären und sekundären Alkoholen zurückzuführen ist. Das Polymerwachstum findet eher an den primären OH-Gruppen statt, so dass die Verzweigung nicht gleichmäßig an allen Funktionalitäten abläuft. Auch die während des Polymerisationsprozesses zunehmende sterische Hinderung könnte dabei eine Rolle spielen.

### 3.2. Polymerisation funktionalisierter Glycerine

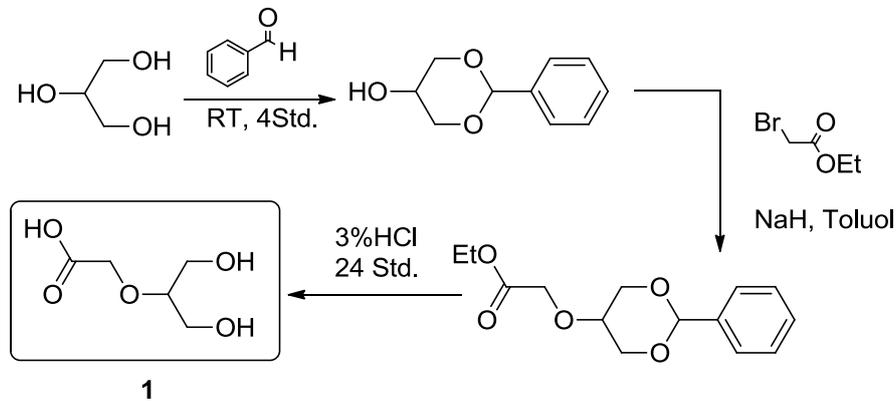
Um verschiedene Bausteine für die Polymerisation zu erhalten und die Selektivität zu erhöhen, wurde Glycerin zu den in Abb. 3.2.1 gezeigten Verbindungen umgesetzt. Die entsprechenden Reaktionsschritte werden im Folgenden näher erläutert.



**Abb. 3.2.1:** angestrebte Monomere.

#### 3.2.1 Funktionalisierung des Glycerins zum Monomer 1

Nach folgendem Schema sollte die Verbindung **1** synthetisiert und anschließend polymerisiert werden.

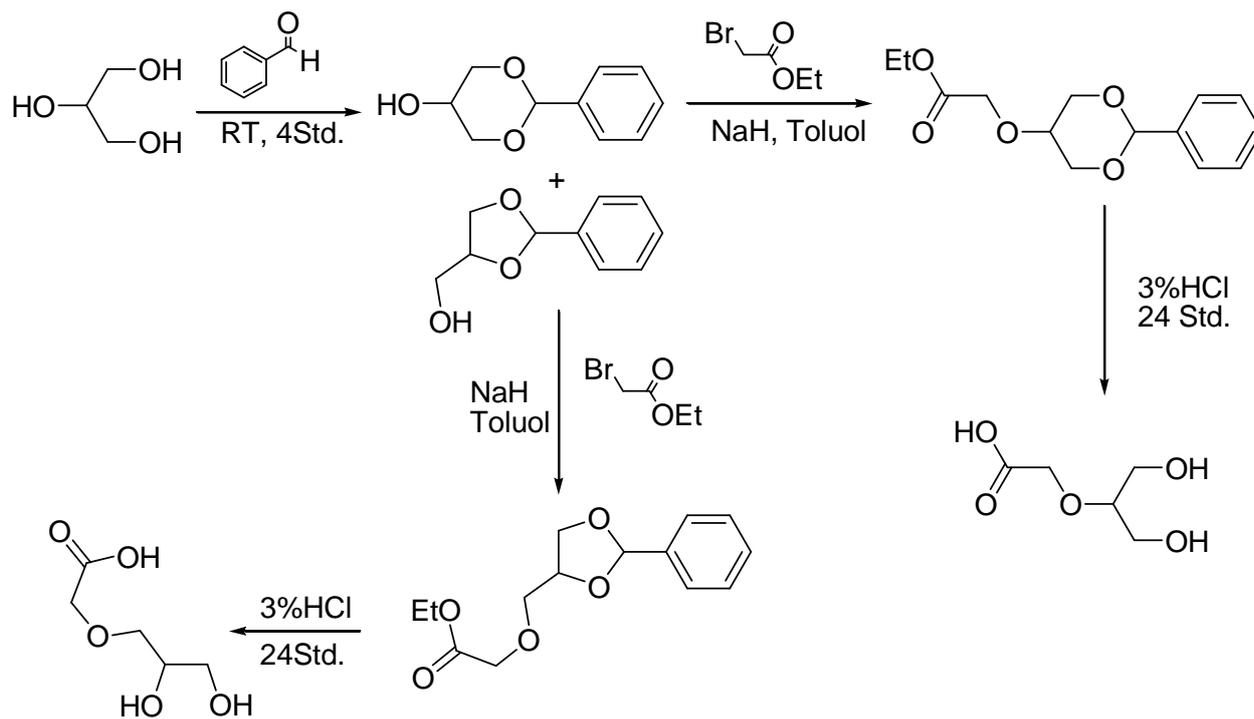


**Schema 3.2.2:** Funktionalisierung des Glycerins zur Verbindung **1**.

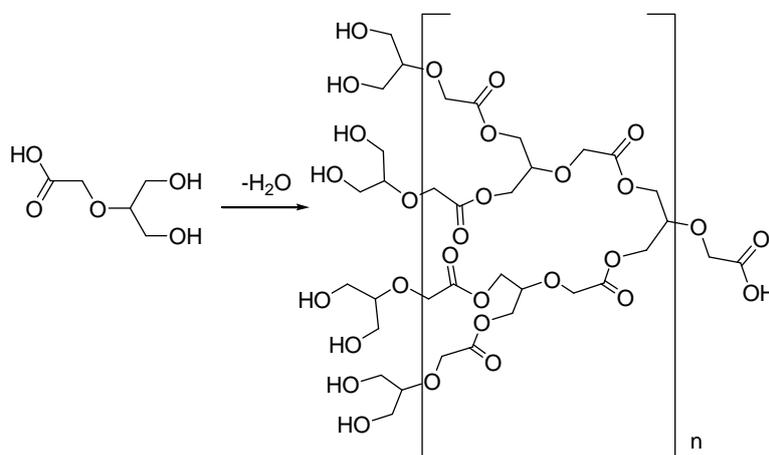
Zuerst wurden die beiden primären OH-Gruppen als Ether geschützt. Mittels Williamson'schen Ethersynthese wurde eine geschützte Säurefunktion angebracht. Abschließend erfolgte die säurekatalysierte Entschützung, dabei wurde sowohl der Ethylester als auch Benzaldehyd abgespalten.

Der erste Reaktionsschritt führt oft zu einem Gemisch aus 1,3- und 1,2-geschützten Produkten. Auch wenn die schwierige Trennung der beiden Produkte gelingt, beträgt die Ausbeute bei diesem Schritt nur ca. 50%. Dieses Problem wurde schon oft in der Literatur beschrieben.<sup>[112]</sup> Der Grund dafür ist die große Ähnlichkeit der beiden entstehenden Produkten. Damit liegt der Gedanke nahe, das Produktgemisch ohne Trennung weiter zu verarbeiten. Diese Umsetzung ist in Abb. 3.2.4 b) dargestellt.

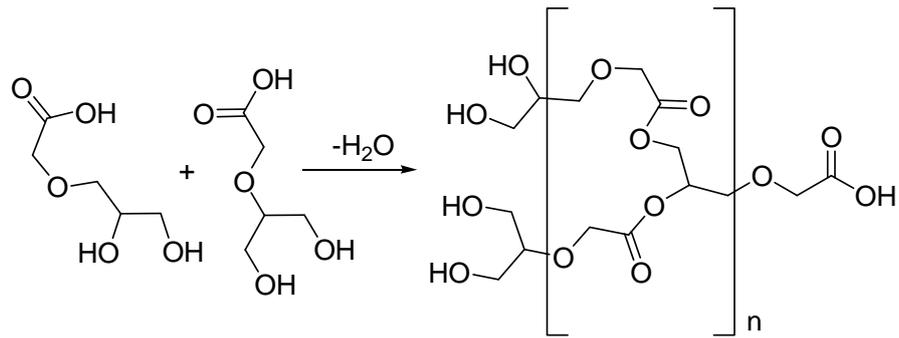
### 3 Synthese von Polyether Polyolen aus Glycerin



**Schema 3.2.3:** Syntheseroute von Monomer 1 (keine Trennung nach dem ersten Schritt).



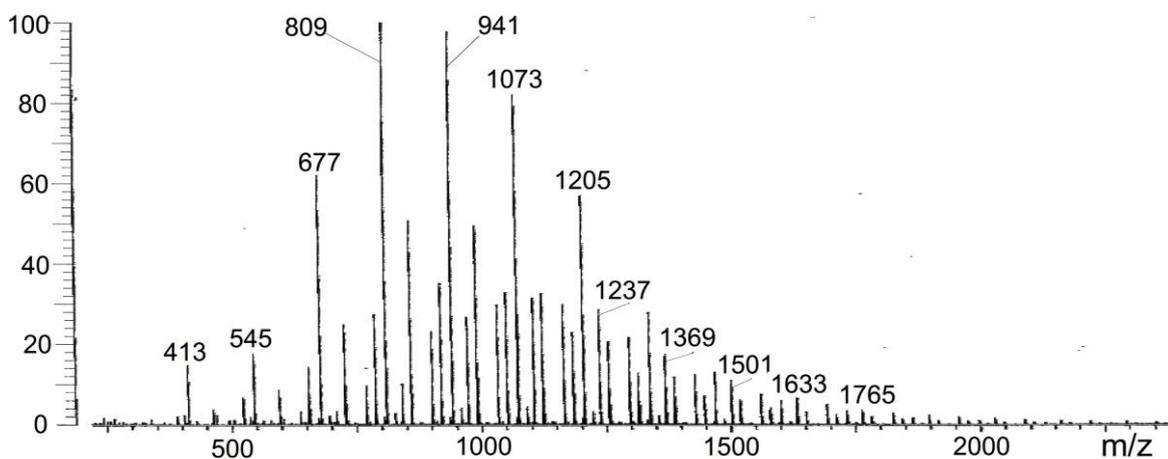
a)



b)

**Schema 3.2.4:** a) Polymerisation von reinem Monomer, b) Polymerisation vom Monomergemisch.

Bisher ist es gelungen, die Monomere mit einer Totalausbeute von über 50% zu synthetisieren. Durch die Polymerisation in der Mikrowelle werden Produkte höherer Molmassen (bis zu ~ 2000 g/mol) erhalten. In Abb. 3.2.5 ist das ESI-FTICR-Massenspektrum des Produktes abgebildet. Es ist eine Massenverteilung zwischen 413 und 1765 zu erkennen. Die beiden Hauptfraktionen mit  $m/z$  809 bzw. 941 weisen jeweils auf Hexamer und Heptamer hin. Die Differenz der Fraktionen beträgt 132, was einer (Monomereinheit- $H_2O$ ) entspricht.



**Abb. 3.2.5:** ESI-FTICR-Massenspektrum des Polymerisationsproduktes des Monomers 1.

In Tab. 3.3 und 3.4 werden die GPC-Ergebnisse zweier Produkte verglichen. Im Experiment **A** wurde eine bestimmte Menge an Monomer mit 3%igem NaOH einmalig 6 min. bei 160°C erhitzt, im Experiment **B** wurde die gleiche Menge an Monomer und NaOH in vier Portionen

aufgeteilt und drei Mal je 2 min. erhitzt, nach jedem Heizzyklus wurde eine Portion Monomer hinzugefügt.

**Tab. 3.3:** GPC ermittelte Molmassen der Produkte aus den Experiment **A** und **B**.

	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$M_z$ (g/mol)	PD	$M_p$ (g/mol)
<b>A</b>	2035	3359	5149	1.65	2950
<b>B</b>	3402	3795	4313	1.12	3181

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Methode **B** zum Produkt höherer Masse führt, dies wird noch deutlicher, wenn man alle Fraktionen (P1-4) der Produkte analysiert.

**Tab. 3.4:** Vergleich einzelner Fraktionen der Produkte aus den Experimenten **A** und **B**.

		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
Intensität	<b>A</b>	6.5	4.5	7	100	-----
(% zum höchsten Peak)	<b>B</b>	100	77.9	33.7	8.7	11.6
Peakmaximum in	<b>A</b>	18.51	20.60	23.15	26.05	-----
(mL Elutionsvolumen)	<b>B</b>	18.74	20.81	23.16	26.28	28.51

Betrachtet man die Positionen der Peakmaxima unter Berücksichtigung systematischer Abweichung, so ist davon auszugehen, dass es sich bei den Peaks P<sub>1</sub>-P<sub>4</sub> bei **A** und **B** jeweils um die gleiche Verbindung handelt. Der Peak P<sub>5</sub>, der nur bei **B** vorhanden ist, stammt vermutlich von dem Monomerrest, der bei **A** schon weitestgehend abreagiert ist.

Hier wird deutlich, dass P<sub>1</sub> die Hauptfraktion bei **A** darstellt, andere Produkte mit höheren Molmassen (P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub>) sind hier nur in geringem Anteil vorhanden. Damit ist die Polydispersität PD von **A** relativ klein.

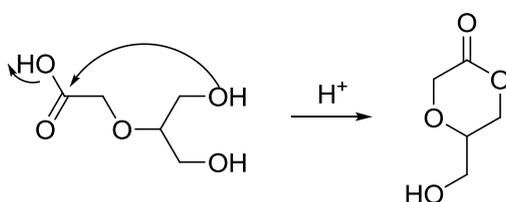
Im Vergleich zu **A** besitzt **B** eine größere Polydispersität, da hier mehrere Fraktionen in vergleichbaren Anteilen vorliegen. Der Peak mit höchster Intensität stellt das Produkt mit größter Molmasse dar.

Daraus kann man den Schluss ziehen, dass man mit stufenweisem Erhitzen und Monomerzugabe höhere Molmassen erzielt. Es besteht die Möglichkeit, eine engere Produktverteilung zu bekommen, in dem man das Reaktionsgemisch anschließend einmalig für etwas längere Zeit erhitzt.

Die Polymerisationsversuche in dem Mikrowellenreaktor wurden jeweils mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und mit  $\text{NaOH}$  als Katalysator durchgeführt.

#### 3.2.2 Vermeidung von Lactonringbildung

Bei der Polymerisation von Substanz **1** wurden nur Produkte mit begrenztem Polymerisationsgrad von bis zu 10 erhalten. Der Grund dafür ist vermutlich die Ringbildung, die ab einer bestimmten Anzahl von Monomeren stattfindet (Schema 3.2.6). Eine mögliche Bildung von Makrozyklen wird vernachlässigt, da dies bei der hohen Monomerkonzentration sehr unwahrscheinlich ist. Bei der intramolekularen Reaktion zwischen den beiden aktiven Enden des Monomers entsteht ein sechsgliedriger Ring, dessen Bildung begünstigt ist.

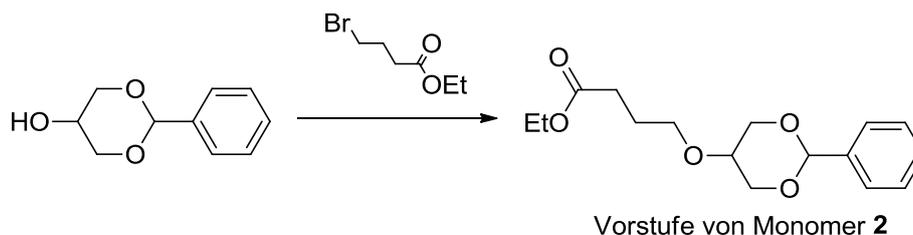


**Schema 3.2.6:** Lactonringbildung durch intramolekulare Veresterung.

Um dieses Problem zu umgehen und somit eventuell einen höheren Polymerisationsgrad zu erreichen, wurden die Monomere **2** und **3** synthetisiert, welche beide einen größeren Abstand zwischen der Alkohol- und der Säuregruppen aufweisen (siehe Abb. 3.2.1).

##### 3.2.2.1 Synthese des Monomers **2**

Die Synthesen von Substanz **2** ist analog zu der von Substanz **1**. Aufgrund der längeren Kohlenstoffkette, die die Aktivität der Estergruppe schwächt, verläuft die Reaktion jedoch wesentlich langsamer. In Weiteren wird die in Schema 3.2.7 gezeigte Reaktion optimiert.



**Schema 3.2.7:** Synthese zur Vorstufe von Monomer **2**.

Die Daten dazu sind in Tab. 3.5 zusammengefasst.

**Tab. 3.5:** Optimierungsversuche der Synthese von Vorstufe von Monomer 2.

	Edukt	Base	Lösungsmittel	Brombutylacetat	Ausbeute
1	6.0 g (33.4 mmol)	1.3 g (1 Äq.) NaH*	100 mL Toluol	9.7 g (1.5 Äq.)	----
2	7.1g (40 mmol)	4.7 g (3 Äq.) NaH*	100 mL Toluol	15.6 g (2 Äq.)	0.5%
3	64.0 mg (0.3 mmol)	15.7 mg (1.1 Äq.) NaH*	10 mL THF	139.0 mg (2 Äq.)	3%
4	200 mg (1.1 mmol)	26.7 mg (1 Äq.) Na	10 mL THF	243.4 mg (2 Äq.)	1.8%
5	300 mg (1.6 mmol)	66.7 mg (1 Äq.) NaH*	10 mL DMF	651.4 mg (2 Äq.)	2.1%

\*: Das hier verwendete NaH liegt als 60%ige Produkte in Mineralöl vor.

Wie in der Tabelle aufgeführt, wurden sowohl Eduktmengen als auch das Lösungsmittel variiert. Als Base wurden in den meisten Fällen 60%iges NaH verwendet, aber auch metallisches Natrium (Tab. 3.5, Nr. 4) wurde versuchsweise angesetzt, um effizienter zu deprotonieren. Es wurde jedoch kein Umsatz beobachtet.

Bei dem ersten Versuch konnte das Produkt nur anhand des Massenspektrums identifiziert werden. Es wurde nicht weiter aufgearbeitet. Das Edukt wurde zurückgewonnen und für weitere Versuche wiederverwendet.

In den weiteren Versuchen (Tab. 3.5, Nr. 2-5) konnten keine nennenswerten Ausbeuten erzielt werden. Der Grund liegt wahrscheinlich in der Kinetik der Reaktion.

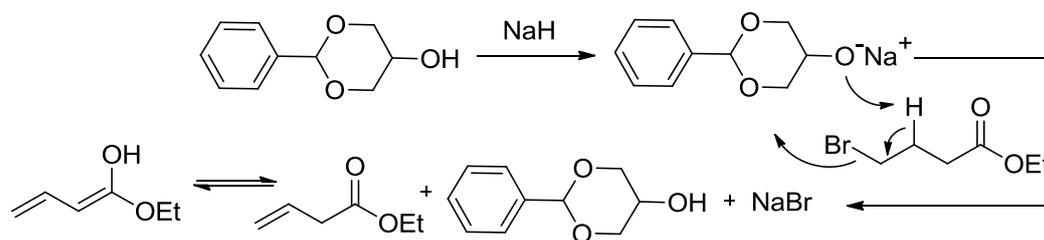
Bei der Williamson'schen Veretherung sind primäre Halogenide bevorzugt, da sekundäre oder tertiäre Halogenidverbindungen über eine Eliminierungsreaktion ( $E_2$ ) zu Alkenen reagieren. Sowohl starke, als auch sterisch gehinderte Nuklophile reagieren bevorzugt über eine Eliminierung.

Aufgrund der Kettenlänge des Brombutylacetats wird die elektronenziehende Wirkung der Estergruppe geschwächt, so dass eine Eliminierung begünstigt ist und sich so ein stabileres

Nebenprodukt bildet (Schema 3.2.7). Durch Keto-Enol-Tautomerie des Nebenproduktes wird ein 1,3-Dien gebildet, das durch ein konjugiertes  $\pi$ -Bindungssystem stabilisiert ist. Das 1,3-Dien konnte als Diol über ein ESI-Massenspektrum nachgewiesen werden ( $m/z$  107.04).

Bei der Synthese von Monomer **2** bildet sich als Zwischenstufe ein energetisch sehr günstiges Michael-System, so dass die Reaktion vorzugsweise als Eliminierung abläuft und nicht zu dem gewünschten Produkt führt.

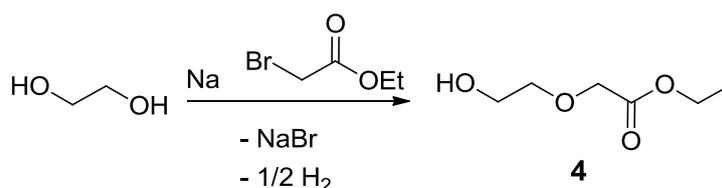
Der Mechanismus ist in Schema 3.2.8 dargestellt.



**Schema. 3.2.8:** Bildung des stabilisierten 1,3-Diens.

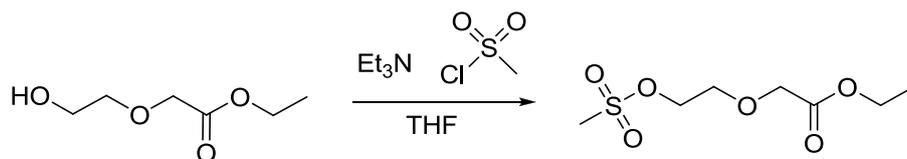
#### 3.2.2.2. Synthese des Monomers **3**

Im ersten Schritt wird Ethylenglycol über die Williamson'sche Veretherung zu Verbindung **4** in Schema 3.2.9 synthetisiert. Hier dient Ethylenglycol gleichzeitig als Edukt und Lösungsmittel.



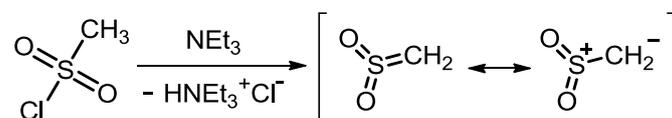
**Schema 3.2.9:** Synthese von Verbindung **4**.

Im zweiten Schritt wird Substanz **4** mesyliert,<sup>[113]</sup> um Alkylsulfonate als eine gute Abgangsgruppen einzuführen.



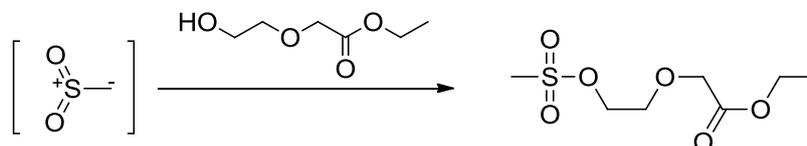
**Schema 3.2.10:** Mesylierung von Verbindung **4**.

Durch eine  $E_2$ -Eliminierung von Mesylchlorid wurde das Sulfen gebildet. Der dabei entstehende Chlorwasserstoff wurde über das Triethylamin abgefangen. Dabei bildete sich ein Ammoniumsalz.



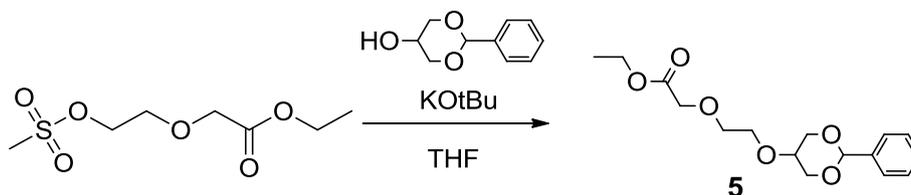
**Schema 3.2.11:** Sulfenbildung.

An das entstandene Sulfen wurde Verbindung **4** addiert.



**Schema 3.2.12:** Addition des Alkohols an das Sulfen.

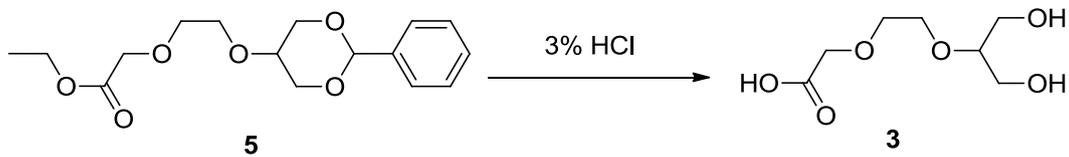
Im dritten Schritt dieser Monomersynthese wurde die mesylierte Verbindung **4** nun mit dem 1,3-geschützten Glycerin über die Williamson'sche Ethersynthese verbunden.



**Schema 3.2.13:** Kopplung des Mesylats mit dem geschützten Glycerin.

Das 1,3-Diols wird von Kalium-*tert*-butanolat deprotoniert und damit aktiviert. Aus dieser Veretherung geht Substanz **5** hervor.

Die Entschützung der Verbindung **5** zum Monomer **3** wurde, analog zu der von Monomer **1**, unter katalytischer Wirkung von HCl durchgeführt.



**Schema 3.2.14:** Entschützung von Verbindung **5** zu **3**.

#### 3.2.3 Oligomerisation des Monomers **3**

Das erhaltene Monomer **3** wurde, ähnlich wie das Monomer **1**, im Mikrowellenreaktor unter wässriger saurer Bedingung polymerisiert. Es wurde nach der Methode **B** im Abschnitt 3.2.1 verfahren, sodass nach jedem zweiminütigem Heizzyklus das Monomer portionsweise hinzugefügt wurde.

Nach jedem Zyklus wurde jeweils eine Probe entnommen, um den Fortschritt der Polymerisation zu verfolgen. Nach dem ersten Zyklus wies der Hauptpeak eine Masse/Ladung-Verhältnis von 471 auf, nach drei Zyklen konnte eine Fraktion mit  $m/z$  647 vermehrt beobachtet werden. Die jeweils als Sulfonsäureester von Dimer bzw. Trimer identifiziert wurden.

Bei weiteren Zyklen konnte aber keine höhere Masse mehr detektiert werden.

Schon beim Polymerisationsversuch von Monomer **1** wurde die Spaltung der Etherfunktion in geringer Menge beobachtet, dies ist wahrscheinlich auch bei Monomer **3** passiert, sodass keine weitere Polymerisation möglich war.

### 3.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden Glycerin und Glycerinderivate polymerisiert, dabei wurden verschiedene Parameter variiert, unter anderem der Katalysators, die Reaktionstemperatur sowie die Heizquelle. Als Alternative zum Rückflußkochen wurde die Mikrowelle verwendet, um gleichzeitig zu testen, ob sich diese Methode auch für die Polykondensation eignet.

Beim Vergleich beider Reaktionsansätze erwies sich die Mikrowelle als effizienter. Nach nur 5 min. in der Mikrowelle erhält man Produkte mit deutlich höheren Polymerisationsgraden als nach 12 Std. durch den herkömmlichen thermischen Ansatz. Allerdings blieb auch das Ergebnis aus den Mikrowellenversuchen weit unter dem angestrebten Wert. Auch eine bessere Kontrollierbarkeit konnte damit nicht erreicht werden, die Reproduzierbarkeit sowie Vorhersehbarkeit der Ergebnisse erfüllen nicht die Erwartungen. Der Polymerisationsgrad erreichte in besten Fall einen Wert von 20.

Mit dem in Abschnitt 3.2 vorgestellten Glycerinderivat **1** konnte die Reproduzierbarkeit erhöht werden, auch die Polydispersität konnte durch stufenweises Erhitzen verbessert werden.

Auch in diesem System war der Polymerisationsgrad mit 10-15 sehr niedrig, Nach drei Heizzyklen wurde das maximal erreichbare  $m/z$  2814 beobachtet, welches einem Polymerisationsgrad von 20 entspricht. Die Hauptfraktionen sind Penta- bzw. Hexamere. Weder durch weiteres Erhitzen noch durch weitere Monomerzugabe mit anschließendem Erhitzen konnte ein höherer Polymerisationsgrad erzielt werden. Jedoch wurde dadurch die Entstehung von Nebenprodukten begünstigt. Der vermeintliche Grund für den begrenzten Polymerisationsgrad war einerseits die zunehmende sterische Hinderung und andererseits die intramolekulare Ringbildung als Nebenreaktion. Um dies zu umgehen wurde das Monomer **3** synthetisiert und polymerisiert, jedoch wurde auch in diesem Fall nur ein begrenztes Polymerwachstum beobachtet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Polykondensation via Mikrowelle der thermischen Methode überlegen ist, der Vorteil dieser Methode liegt im Wesentlichen, wie schon oft berichtet, in ihrer hohen Effizienz.

Jedoch führt sie nicht zu den angestrebten hochmolekularen Polymeren, die für unseren Zweck mindestens 20 nm Durchmesser haben müssen.

Trotzdem kann man diese Methode als schnelle und kostengünstige Synthese von Oligoglycerinen verwenden.

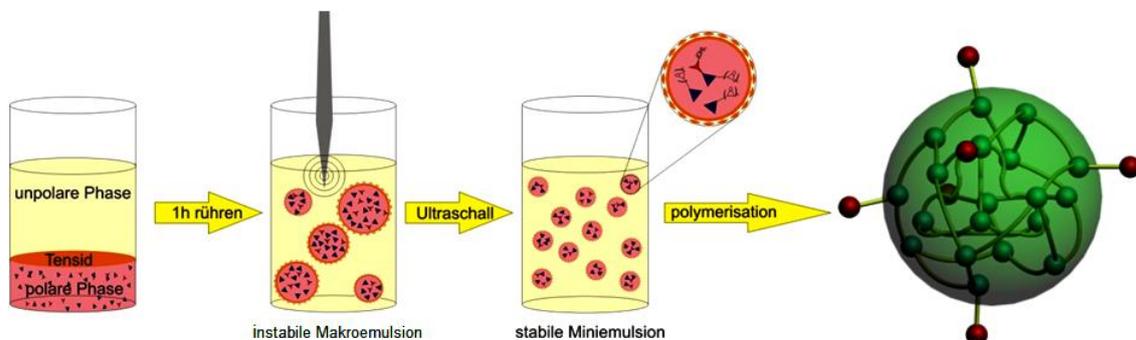
## 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion

Wie bereits im Kapitel 1 beschrieben, sind Miniemulsionen disperse Systeme von zwei oder mehr nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten. Die eine der flüssigen Phasen (z. B. Cyclohexan) bildet dabei die kontinuierliche Phase, in dem die disperse Phase (z. B. H<sub>2</sub>O, DMSO) in Form feiner Nanotröpfchen verteilt ist.

Der Grad des Dispergierprozesses ist abhängig von der Grenzflächenspannung zwischen den beiden Flüssigkeiten. Als Koaleszenz bezeichnet man das Zusammenfließen zweier Nanotröpfchen, welches durch eine Kollision zweier Nanotröpfchen hervorgerufen wird. Dieser Vorgang kann durch die Verwendung von Tensiden weitestgehend unterdrückt werden. In diesem Fall wurden das nicht-ionischen Copolymer-Tensids KLE 25 verwendet das von Prof. Schlaad zur Verfügung gestellt wurde. Um die Emulsion gegen Ostwald-Reifung, die zur Diffusion der Monomeren führen kann, zu stabilisieren, wurden die Monomere in DMSO gelöst.

Zudem setzen Tenside die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen herab, so dass kleinere Teilchen hergestellt und stabilisiert werden können. Außerdem kann so die Vernetzung der Polymere auf Makroebene vermieden werden, wodurch die Partikel in Nanometerbereich gehalten werden und dadurch weiterhin löslich bleiben.

Nach schnellem Rühren und Behandlung mit Ultraschall liegt die Mischung als thermodynamisch stabile Dispersion mit Tröpfchen von 50-500 nm Durchmesser vor. Jedes Tröpfchen fungiert selbst als eine Art diskreter Nanoreaktor, so dass die Polymerisation nur in diesem begrenzten Raum auftritt. Eine Totalgelierung innerhalb eines Nanoreaktors ergibt ein im Kern vernetztes Polymerpartikel, dessen Größe der des Nanotröpfchens entspricht. Dies ermöglicht die Herstellung von Polymerpartikeln mit kontrollierten Größen (Abb.4.1).



**Abb.4.1:** Schematische Darstellung der Nanogelsynthese über inverse Miniemulsion.

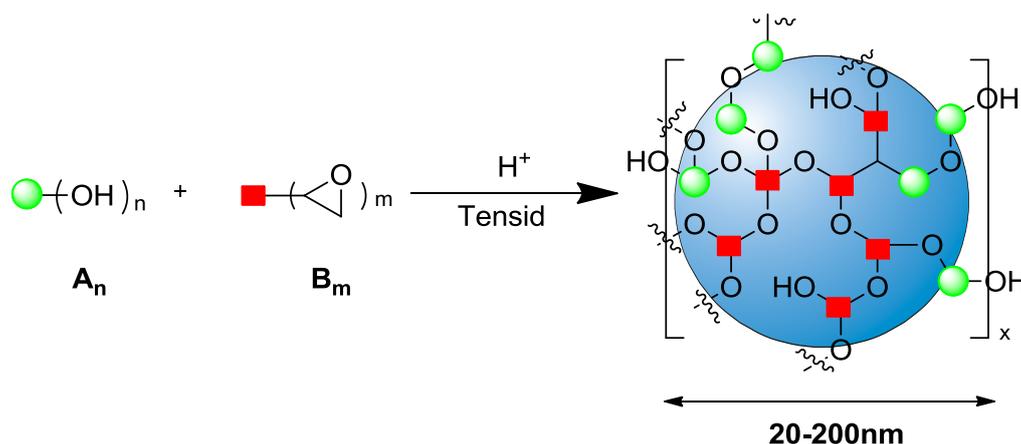
Bereits in 2009 berichtete unsere Gruppe wie Polyglycerolpartikel auf verschiedenen Längenskalen hergestellt werden, dabei erstrecken sich die Partikeldurchmesser von der klassischen Größe der hyperverzweigten Polyglycerine (ca. 3 nm) bis hin zu Nanogelen mit kontrollierbaren Größen, zwischen 25 bis 85 nm.

Diese Nanogele konnten mit handelsüblichen Monomeren in Miniemulsion gewonnen werden. Sie sind in polaren Lösungsmitteln wie Wasser vollständig löslich.

Aufgrund ihrer Größe im Nanometerbereich und ihrer hoher Biokompatibilität können sie gut in die Zelle aufgenommen werden ohne diese zu vergiften. In der Arbeit sollen eine Reihe von verzweigten Polyethern aus  $A_n$ - und  $B_m$ -Monomeren synthetisiert werden, um diese Verbindungsklasse systematisch zu untersuchen. Durch die Kontrollierbarkeit können die Eigenschaften und die Struktur dieser Nanogele maßgeschneidert werden. Damit weisen sie große Potenziale für vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf.

#### 4.1 Polyether Nanogele aus Glycerin und Oligoglycerinen

Die Synthese der Nanogele wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt und schematisch in Abb. 4.1.1 dargestellt. Im Prinzip handelt sich dabei um eine Kondensation zwischen zwei Monomeren, die jeweils OH-Gruppen und Epoxid enthalten. Das OH-enhaltende Monomer wird hier als Monomer A und das epoxidhaltige Monomer als Komponente B definiert. Die Anzahl der jeweiligen Funktionalitäten werden mit  $n$  bzw.  $m$  gekennzeichnet. Verschiedene Kombinationen von  $A_n$  und  $B_m$  sind in der Tab. 4.1 aufgeführt.



**Abb. 4.1.1:** Prinzip der Miniemulsionpolymerisation aus  $A_n$ - und  $B_m$ - Bausteinen. Mit Hilfe von Tensiden können Nanogele bestimmter Größe hergestellt werden.

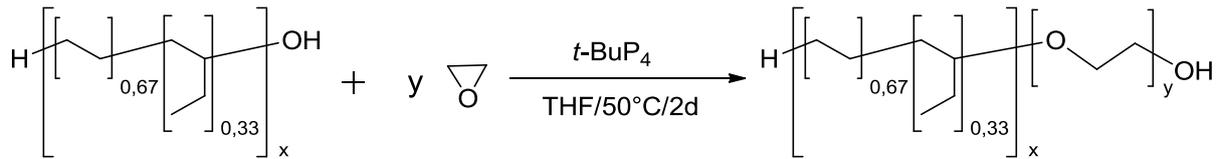
Basenkatalysierte Polyadditionen von aromatischen Dialkoholen zu Bisepoxiden in Miniemulsion wurden bereits von Landfester *et al.* berichtet. Im Vergleich dazu benötigt die hier durchzuführende Deprotonierung der aliphatischen Glycerine eine höhere Aktivierungsenergie (120 °C).

Um die Emulsion gegen Ostwald-Reifung, die zur Diffusion der Monomeren führen kann, zu stabilisieren, wurden die Monomere in DMSO gelöst. In Gegenwart des nicht-ionischen Copolymer-Tensids KLE 25 wird die Bildung von Partikeln mit definierten Größen gewährleistet. Die so erhaltenen Partikeln weisen starke Verzweigungen an der Oberfläche sowie eine dichte Vernetzung in Inneren auf. Ohne Agentien gegen den osmotischen Druck führte dieser Prozess zur Bildung von vernetztem Polymer-Netzwerk auf der Makroebene, die in keinem Lösungsmittel löslich sind.

Die Schwierigkeit dieser Synthese liegt in der ungewöhnlichen Zusammensetzung des Systems. Da sich hierbei um eine Polykondensation handelt, muss das Reaktionsmedium komplett wasserfrei sein, sonst würde Wasser mit dem OH-Komponenten in Konkurrenz treten. Außerdem muss das verwendete Lösungsmittel einen höheren Siedepunkt als 120°C besitzen, denn diese Temperatur wird benötigt, um die Epoxide zu öffnen. Daher wurde DMSO gewählt, welches eine deutlich höhere Dichte als Wasser aufweist. Als Tensid wurde das spezielle Poly(ethylene-co-butylene)-*block*-poly(ethylene oxide) (KLE 25) verwendet, das, wie in Abb. 4.1.2 gezeigt, ausgehend von Kraton Liquid durch ringöffnende Polymerisation des Ethylenoxides, synthetisiert wurde. Entscheidend für die Stabilität der gebildeten Tropfen ist die Länge der Polyethylenoxidkette, d.h. die Größe von  $y$  (siehe Abb. 4.1.2). Das von uns verwendete KLE 25 besitzt eine durchschnittliche Molmasse von 81kDa mit 41% wt. PEO. Ein ähnliches Copolymer, bekannt unter dem Produktname Pluronic, das einen niedrigeren PEO-Anteil enthält, erwies sich als ungeeignet, da dies die Emulsion nicht lange genug stabil hält.<sup>[114, 115]</sup>

Aufgrund der aufwendigen Herstellung von KLE wurde versucht, dies nach der Reaktion wiederzugewinnen und erneut einzusetzen. Leider erwies sich die Emulsion, die mit dem wiederverwerteten Tensid erzeugt wurde, als instabil. Es wurde mit Hilfe von GPC festgestellt, dass das KLE nach der Reaktion nur noch eine Masse von ~ 6 kDa hat, demzufolge wurde es also während der Nanogelsynthese abgebaut und kann nicht wieder verwendet werden.

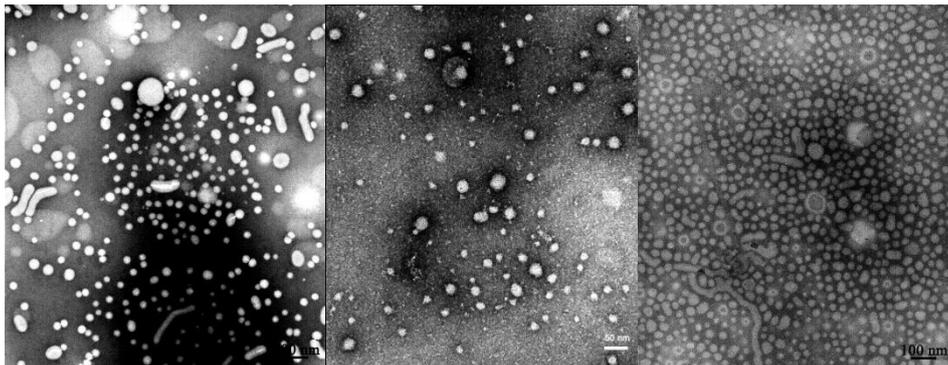
#### 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion



**Abb. 4.1.2:** Synthese von KLE-Blockcopolymeren.

Der Abbau des KLE-Blockcopolymer liefert auch eine Erklärung für die anfängliche teils niedrige Ausbeute von ~ 10%, nach verschiedenen Optimierungsversuche der Synthese konnte die Ausbeute auf bis zum 50% erhöht werden.

Im Folgenden sind die TEM-Aufnahmen von einigen Nanogelen zu sehen, dabei wurde 1%iges Uranylacetat als Kontrastmittel verwendet. Die Aufnahmen a) und b) weisen nach längerem Lagern teilweise Aggregate auf.



**Abb.4.1.3:** TEM-Aufnahmen von Nanogelen **6** (a 10 mg/mL), **2** (b, 10 mg/mL), **1** (c, 200 mg/mL) (vgl. Tab. 4.1).

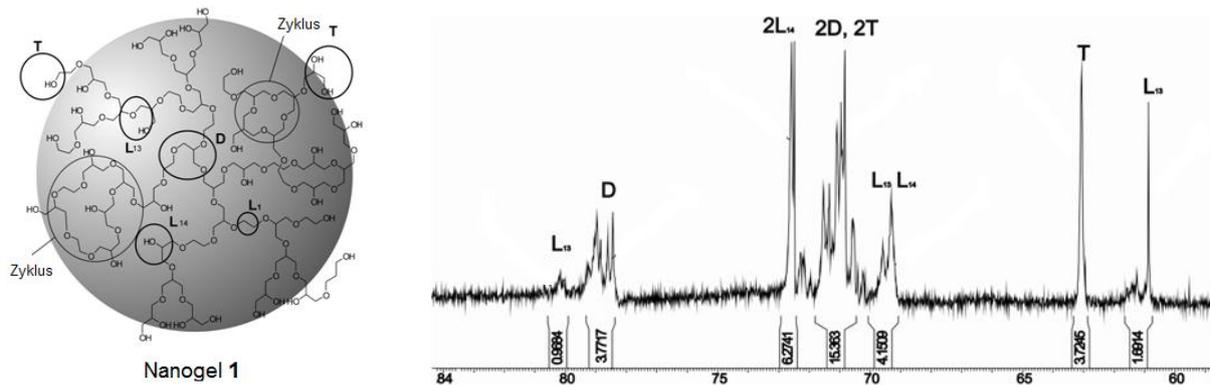
#### 4.2 Analyse der Verzweigungsgrade mit Hilfe von inverse gated (IG) $^{13}\text{C}$ -NMR

Analyse von Polyglycerin mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde zuerst von Vandenberg berichtet und später durch Penczek und Dworak erweitert. Die inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR Methode ermöglicht die Ermittlung des Verzweigungsgrads durch Interpretation der Spektren. Polyglycerine von Frey und Brooks, sowie unsere Nanogele besitzen sieben gut aufgelöst Peaks im Bereich von 60-85 ppm, die von dendritischen, linearen und terminalen Polyethereinheiten stammen. Sie geben Auskunft über die Kompaktheit der Struktur. In Fällen von einfachen Systemen wie Nanogel **1**, kann man sogar, aufgrund der Spektrenzuordnung, den Anteil des Vernetzers berechnen. Dabei betrachten wir die

#### 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion

Vernetzungsgrade unter Berücksichtigung der  $^{13}\text{C}$ -Peaks der in das Netzwerk eingebundenen dendritischen Einheiten.

In Abb. 4.2.1 ist ein inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Nanogel 1 zusehen. Die Signale, die terminalen, dendritischen, linearen 1,3 und linearen 1,4 Einheiten zuzuordnen sind, sind jeweils als T,D,  $L_{13}$  und  $L_{14}$  gekennzeichnet.



**Abb. 4.2.1:** Nanogel 1 aus Glycerintrisglycidylether und Ethylenglykol. (links): Struktur von Nanogel 1. (rechts): inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Nanogel 1.

Alle Signale können, wie in Abb. 4.2.1 gezeigt, auf folgender Weise zugeordnet werden: (i) lineare 1,3- Einheiten( $L_{13}$ ):  $\text{CH}_2\text{OH}$  Kohlenstoff bei 62.6 ppm;  $\text{CH}_2$  Kohlenstoff bei 70.6 ppm und  $\text{CH}$  Kohlenstoff bei 81.5 ppm; (ii) lineare 1,4-Einheit ( $L_{14}$ ): beide  $\text{CH}_2$  Kohlenstoffe bei 73.9 ppm,  $\text{CHOH}$  Kohlenstoff bei 70.7 ppm ; (iii) terminale Einheit (T):  $\text{CH}_2\text{OH}$  Kohlenstoff bei 64.4 ppm,  $\text{CHOH}$  Kohlenstoffe bei 72.2 ppm und die  $\text{CH}_2$  Kohlenstoffe bei 72.2 ppm; (iv) dendritische Einheit (D):  $\text{CH}$  Kohlenstoffe bei 80.3 ppm, zwei  $\text{CH}_2$  Kohlenstoffe bei 72.2 ppm überlappend mit einem  $\text{CH}_2$  Kohlenstoff einer terminalen Einheit.<sup>[33]</sup>

In Allgemeinen ist der Verzweigungsgrad eines glycerin-basierten Polyethers, das dem Spektrum in Abb. 4.2.1 entspricht, wie folgt zu berechnen:

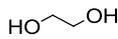
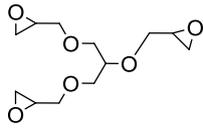
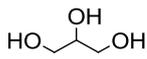
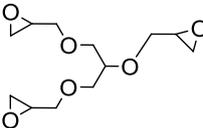
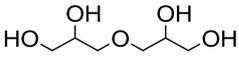
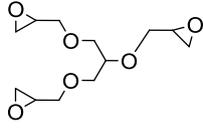
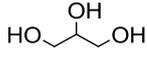
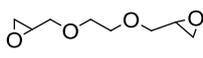
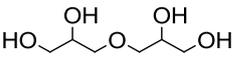
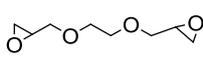
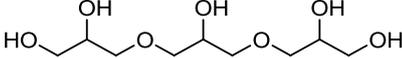
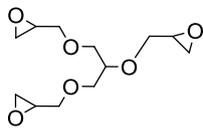
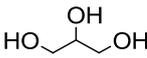
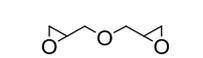
$$DB = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}} \quad \text{Gl. 4.1}$$

L und D bezeichnen jeweils die nicht verzweigten, linearen und die vollständig verzweigten, dendritischen Einheiten.

Die so berechnete DB-Werte werden in Tab. 4.1 aufgeführt.

#### 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion

**Tab. 4.1:** Verzweigungsgrad, Partikelgrößen und ingtrinsische Viskositäten aller synthetisierten Nanogelen

System	Bausteine		DB	Durch-messer (nm)	Intrinsische Viskosität (mL/g)
	A <sub>n</sub>	B <sub>m</sub>			
1 A <sub>2</sub> +B <sub>3</sub>			0.64	100	1.6
2 A <sub>3</sub> +B <sub>3</sub>			0.63	45	1.92
3 A <sub>4</sub> +B <sub>3</sub>			0.57	43	2.34
4 A <sub>3</sub> +B <sub>2</sub>			0.27	116	3.77
5 A <sub>4</sub> +B <sub>2</sub>			0.06	73	4.11
6 A <sub>5</sub> +B <sub>3</sub>			0.35	50	3.38
7 A <sub>3</sub> +B <sub>2</sub>			0.04	75	5.46

Die Verzweigungsgrade DB, (degree of branching) aller A<sub>n</sub>+B<sub>m</sub> Systeme sind in Abb. 4.2.3 abgebildet. Der höchste DB-Wert wurde bei A<sub>2</sub> + B<sub>3</sub> (0.64) beobachtet, gefolgt von A<sub>3</sub> + B<sub>3</sub> (0.63). Diese Werte sind höher als die von Frey und Brooks berichteten Werte von 0.5-0.6.

Ein deutlicher Unterschied zwischen  $A_2 + B_3$  (Ethylenglycol + GTGE) und  $A_3 + B_2$  (Glycerin + DGE) wird beobachtet, obwohl beide aus einem bi- und einem tri-funktionellen Bausteinen gebildet sind. Das lässt vermuten, dass die vernetzenden Komponenten reaktionsbestimmend sind und damit einen höheren Einfluss auf die Verzweigungsgrade besitzen.

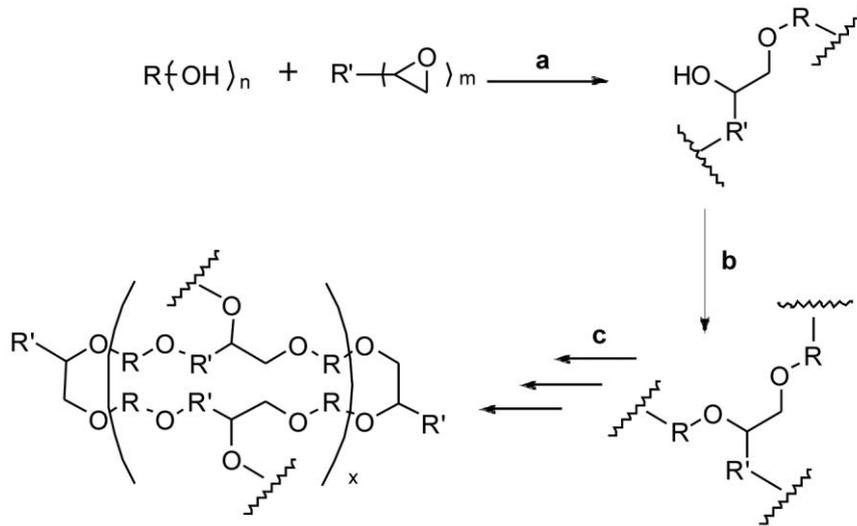
Des Weiteren besitzen die Epoxidkomponenten nach der Ringöffnung potentielle Verzweigungsmöglichkeiten, so dass die Reaktionen an beiden Enden stattfinden können. Bei einer Berechnung des Vernetzer/Monomer-Verhältnisses wird diese Annahme bestätigt. Angenommen, die Polymerisation verläuft vollständig nach der in Schema 4.2.2 dargestellten Reaktion a, so spiegelt der Peak bei 78 ppm die Summe aller dendritischen Einheiten wieder, die nur von dem  $B_3$ -Vernetzer, dem GTGE, herrühren. Damit ist der Peak D direkt proportional zu der Anzahl der vollständig abreagierten Vernetzer ( $n_{B_3}$ ). Da jedes GTGE-Molekül eine dendritische Einheit besitzt, ist  $n_{B_3}$  gleich D, bzw.  $x \cdot D$  ( $x \geq 1$ ). Ferner besitzt ein GTGE-Molekül 12 Kohlenstoffatome, also kann man die Gesamtmenge der GTGE-Kohlenstoffatome als  $12D$  formulieren. Das gesamte Integral aller Peaks (total) umfasst alle Kohlenstoffatome der Probe. Zieht man die Anzahl der GTGE-Kohlenstoffatome von der Gesamtheit ab, bleibt die Menge der Ethylenglykol-Kohlenstoffe übrig. Da das Ethylenglykol zwei Kohlenstoffatome besitzt, gilt für die Menge von Ethylenglykol  $n_{A_2} = (total - 12D)/2$ . Somit hätte man eine Möglichkeit, das Verhältnis beider Komponenten zu ermitteln, als

$$\frac{n_{A_2}}{n_{B_3}} = \frac{total - 12 \cdot D}{2D}$$

**Gl. 4.2**

Das Gesamtintegral (total) beträgt 36.0 und das Integral von D beträgt 3.8, damit ist der Betrag von D zu groß, sodass der Term  $(total - 12 \cdot D)$  keinen sinnvollen Wert ergibt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die dendritischen Einheiten weitaus häufiger sind als zunächst angenommen. Also ist es anzunehmen, dass neben der Reaktion a auch Reaktion b stattfindet und somit zu einem höheren Verzweigungsgrad führt. Auch Ringbildung nach c ist möglich.

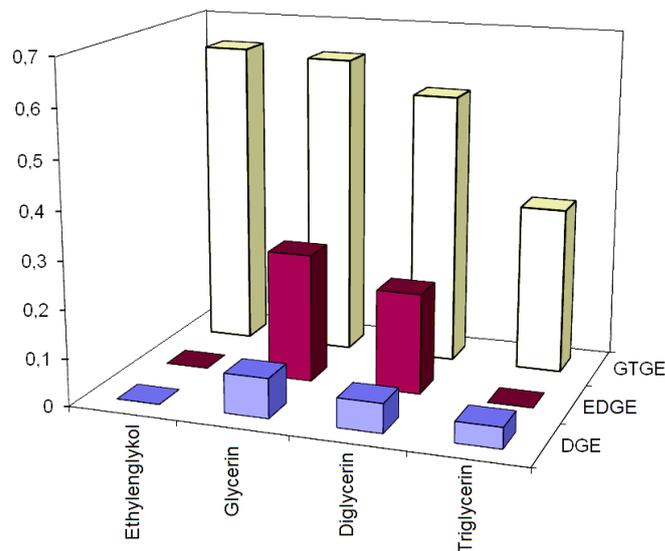
#### 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion



**Schema 4.2.2:** Reaktionen, die während der Polymerisation in Miniemulsion auftreten: Bildung von linearen(a), dendritischen (b) und zyklischen (c) Einheiten.

Bei dieser vielversprechenden These wurde versucht, noch höhere Verzweigungsgrade zu erreichen.

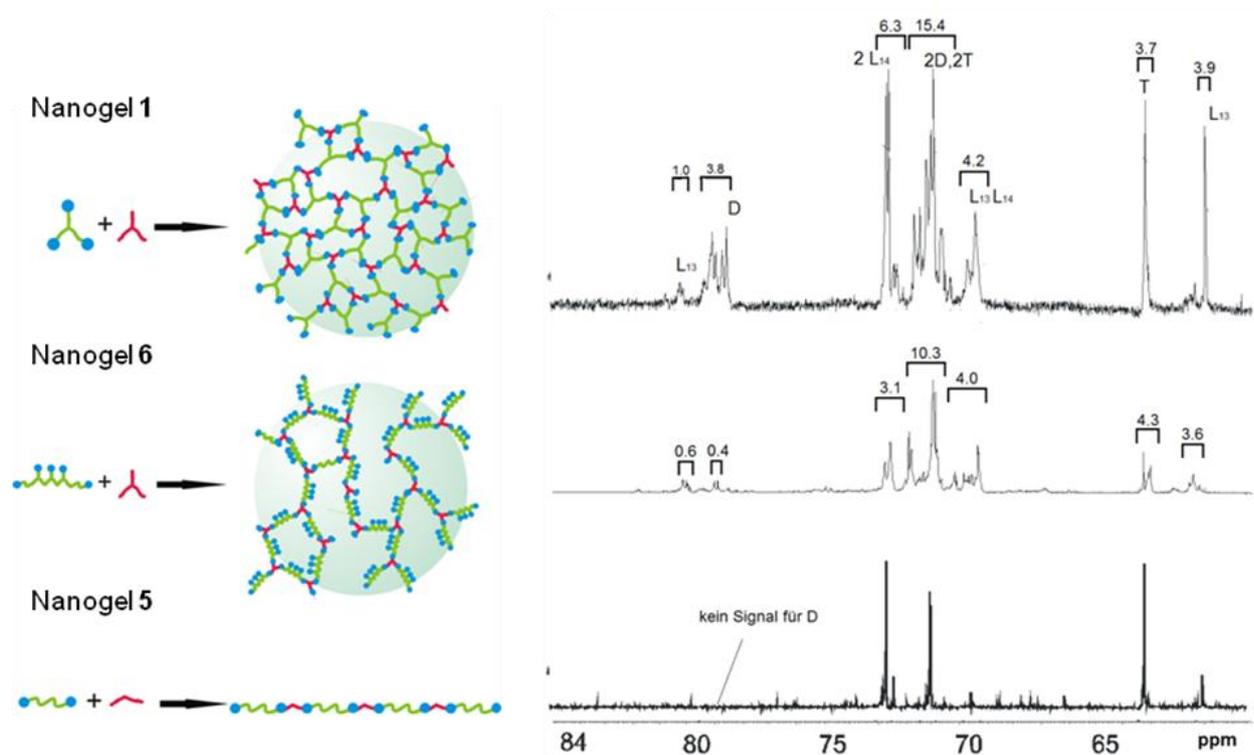
Bei weiterer Untersuchung von anderen Nanogelen stellte sich jedoch heraus, wie in Abb. 4.2.3 und Abb. 4.2.4 aufgeführt, dass Oligoglycerine mit höherer OH-Anzahl eher zu niedrigeren Verzweigungsgraden führen.



**Abb. 4.2.3:** Verzweigungsgrade der Nanogele, berechnet anhand von inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren. Der höchste Wert wurde bei Nanogel 1 aus GTGE und Ethylenglykol ermittelt.

#### 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion

In Abb. 4.2.4 werden drei  $^{13}\text{C}$ -Spektren verglichen, die von drei Nanogele aufgenommen wurden. Spektrum a) zeigt das Nanogel 1, hergestellt aus Glycerin und GTGE ( $A_3 + B_3$ ), das einen Verzweigungsgrad von 0.63 aufweist. Das Nanogel 6 wird aus Triglycerin und GTGE hergestellt ( $A_5 + B_3$ ). Mit einem höher funktionalisierten  $A_n$ -Komponenten, (Triglycerin mit 5 OH-Gruppen) sollte eine höhere Verzweigung erzielt werden, entgegen der Erwartung wurde jedoch nur eine Verzweigung von 0.35 gemessen.



**Abb. 4.2.4:**  $^{13}\text{C}$ -NMR der Nanogele 1, 6 und 5, die Integrale der für die Berechnung des Verzweigungsgrades relevanten Peaks sind in den Spektren angegeben.

Der Grund für dieses Phänomen ist einerseits die unterschiedliche Reaktivität der primären und sekundären OH-Gruppen und andererseits die zunehmende sterische Hinderung während der Polymerisation. Diese beide Faktoren haben zur Folge, dass die Reaktionen bevorzugt an den primären OH-Gruppen stattfinden, so dass das Polymer hauptsächlich in lineare Richtung wächst.

Auch rechnerisch kann es erklärt werden, wenn man eine weitere Größe in Betracht zieht, nämlich die sog. average number of branches ( $\overline{ANB}$ ). Diese ist ein Maß für die Verzweigungsdichte und wird als Verhältnis zwischen Anzahl dendritischer Einheiten und Anzahl aller nichtterminalen Einheiten formuliert.<sup>[34]</sup>

$$\overline{ANB} = \left[ \left( \frac{m}{m-1} \right)^m - 1 \right]^{-1}$$

Gl. 4.3

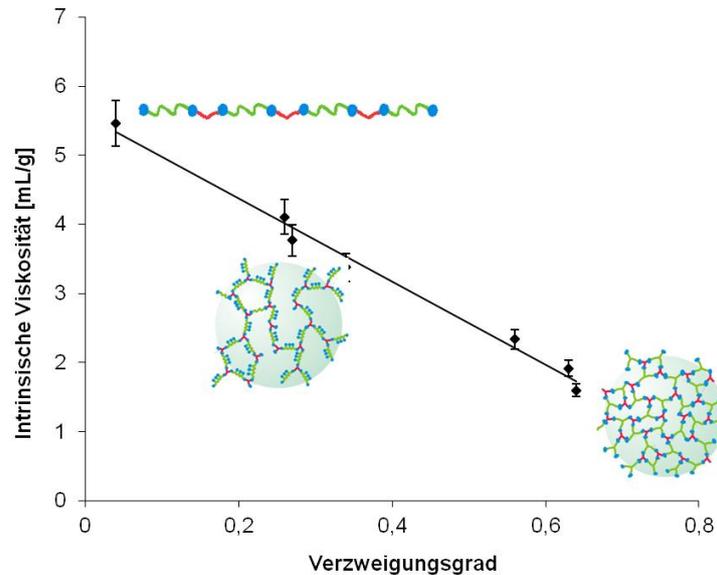
Daraus wird ersichtlich, dass es nicht möglich ist, zumindest nicht bei einem willkürlichen Vernetzungsvorgang, den DB-Wert nur durch Einsatz höher funktionalisierter Monomere zu steigern. Die Funktionalität  $n$  des  $A_n$ -Komponenten fließt in den Nenner mit ein und verringert dadurch die Dichte der Verzweigung.

### 4.3 Intrinsische Viskosität $[\eta]$ und OH-Zahl

Sowohl die herkömmliche HPG als auch die glycerin-basierten Nanogele haben in der Regel sphärische Formen und führen daher nicht zu Verschlaufungen, die bei linearen Polymeren häufig auftreten. Aus diesem Grund besitzen die hier beschriebenen Nanogele niedrigere Viskosität, die auch bei gesteigerten Konzentration konstant bleiben. Für biomedizinischen Anwendungen ist diese Eigenschaft von großem Vorteil.

Wie im Kapitel 1 beschrieben wurden die intrinsische Viskosität über die spezifische Viskosität der wässrigen Polymerlösungen verschiedener Konzentrationen ermittelt. Die spezifische Viskosität ( $\eta_{sp}$ ) errechnet sich aus den gemessenen Fließzeiten der Polymerlösungen geteilt durch die jeweiligen Konzentrationen. Die Auftragung der  $\eta_{sp}$ -Werte gegen die Konzentrationen in g/ml wurden bis zum Nullpunkt extrapoliert, aus den Schnittpunkten mit den Y-Achse wurden die intrinsischen Viskositäten abgelesen (siehe. Tab. 4.1). Jede Messung wurde bei 37 °C dreimal durchgeführt, um daraus den Mittelwert zu bilden.

Abb. 4.3.1 veranschaulicht das lineare Verhältnis zwischen intrinsischer Viskosität und Verzweigungsgraden. Die niedrigste Viskosität von 1.6 mL/g wurde beim Nanogel **1** gemessen, das aus Glycerin triglycidylether und Ethylenglykol ( $A_2 + B_3$ ) besteht und den höchsten Verzweigungsgrad von 0.64 aufweist. Wie erwartet hat das Gel **7**, bestehend aus quasi-linearen Bausteinen mit dem niedrigsten Verzweigungsgrad ( $DB = 0.04$ ), auch die höchste Viskosität, die mit der von linearen PEG vergleichbar ist.<sup>[75, 116]</sup>



**Abb. 4.3.1:** Korrelation zwischen intrinsischer Viskosität und Verzweigungsgraden.

Dementsprechend ist es möglich, die Viskosität eines Nanogels aufgrund seines Verzweigungsgrades vorherzusagen, der Verzweigungsgrad wiederum ist steuerbar über die Wahl der Monomeren sowie über das Verhältnis von Monomer zu Vernetzer.

#### 4.4 Partikelgröße und Quellung

Bei dem hier vorgestellten Glycerin-basierten Nanogelen handelt es sich um ein Hydrogel. Daher ist der Vernetzungsgrad von Bedeutung. Der Vernetzungsgrad eines Gels wird definiert über die Anzahl des Vernetzers pro Monomer. Dieser wird normalerweise als das reziproke des Quellungsgrades  $Q$  ermittelt.

Man unterscheidet zwischen dem Volumenquellungsgrad  $Q_V$  und dem Massenquellungsgrad  $Q_M$ . Eine gängige Methode, es zu messen ist das einfache Quellen einer Gelmasse in bestimmten Lösungsmitteln. Um den  $Q_M$ -Wert zu erhalten wird die Massendifferenz zwischen der Masse des gequollenen Netzwerks  $a$  und der des ungequollenen Netzwerks  $b$  ermittelt, nachdem ein Quellungsgleichgewicht erreicht ist. Nach der Gleichung 4.4 erhält man:

$$Q_M = \frac{a-b}{b}$$

**GI 4.4**

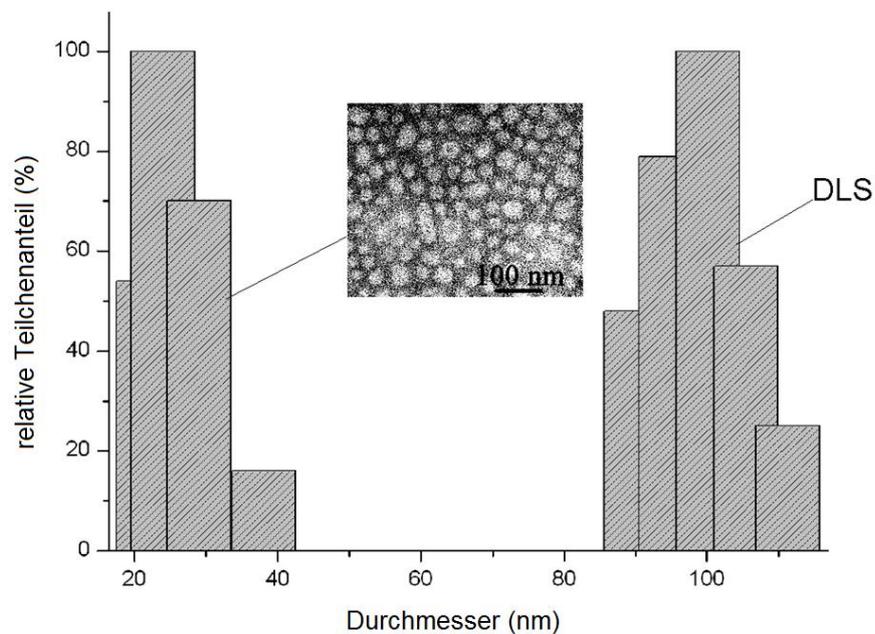
Der reziproke Wert davon  $1/Q$ , dient als relatives Maß vom Vernetzungsgrad. Bei Vernetzung langkettiger Polymere kann er auch mit Hilfe von NMR-Spektren ermittelt

#### 4. Polyether Nanogele über Ringöffnungspolymerisation in Miniemulsion

werden.<sup>[117]</sup> Analog zu  $Q_M$  wird  $Q_V$  als das Verhältnis zwischen dem Volumen des gequollenen Gels zum Volumen der trockenen Masse vor der Quellung. Somit gilt Gl. 4.5

$$Q_V = \frac{V_{gequ.}}{V_{tr.}} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Mit Hilfe der Analyse des Quellverhaltens wurden die Nanogele auf eventuelle Zyklenbildung hin untersucht, die durch lineare Monomere gemäß der Reaktionspfad c entsteht (Abb. 4.4). Da keine kleinen Zyklen im NMR-Spektren sichtbar sind, ist der Quellungsgrad, der als der Kehrwert der Vernetzungsgrad dargestellt wird und umgekehrt proportional zu der Anzahl der Zyklen ist, der einzige Hinweis auf Zyklenbildung. Dazu wurden Änderungen der Partikelgrößen in trockenem und gequollenem Zustand untersucht.



**Abb. 4.8:** Partikelgrößen gemessen mit Hilfe von TEM (links) und DLS (rechts).

Abb. 4.8 zeigt die unterschiedlichen Partikelgrößen des Nanogels im trockenen Zustand und in Lösung. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) Analyse einer wässrigen Lösung zeigte Nanogelteilchen von etwa 100 nm Durchmesser. Die gleiche Probe, gemessen mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) unter Hochvakuum zeigte viel kleinere Partikelgrößen im Bereich von  $27 \text{ nm} \pm 15\%$ . Dieser signifikante Volumenunterschied weist auf eine starke Quellung der Nanogelpartikel in Wasser hin und kann als  $V_{gequ.} / V_{tr.}$  formuliert

werden. Für dieses Beispiel betrug der Quellungsfaktor  $\sim 30$ . Die Partikelgröße des Nanogels **2**, bestehend aus einem  $A_3 + B_3$  System, das auch in wässriger Lösung und im trockenen Zustand gemessen wurde, zeigte sehr ähnliches Verhalten.<sup>[73]</sup> Allerdings war Nanogel **2** weniger quellbar und enthielt mehr zyklische Einheiten. Dieser Unterschied konnte nicht durch die Untersuchung der Viskositäten ermittelt werden, da sowohl Verzweigung als auch Makrozyklen zu einer kompakteren Struktur und damit zu einer geringeren Viskosität führten. Demzufolge ist die Bildung der Zyklen nur an ihrem Quellverhalten erkennbar.

DLS Messungen zeigten eine enge Größenverteilung und sphärische Form der Partikeln, die durch Korrelationsfunktion bestätigt ist. Durch TEM Messungen, jedoch konnte man auch längliche Partikel beobachten, die entweder durch Kondensation der Tröpfchen oder durch Aggregationen von zwei oder mehr Teilchen aufgrund der Trocknungseffekt gebildet sein können.

### 4.6 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Synthese und Eigenschaften von glycerin-basierten Nanogelen beschrieben.

Im Vergleich zu gängigen Wasser-in-Öl-Miniemulsionen,<sup>[77]</sup> die zur Herstellung von z. B. Polyacrylamide verwendet werden, wurde für die Synthese der hydrophilen Nanogele ein System verwendet, das schwer zu stabilisieren war. Wegen der Natur einer Polykondensation musste das verwendete Lösungsmittel zu einem polar-aprotisch sein, zu anderem einen hohen Siedepunkt besitzen. Diese ungewöhnliche Zusammensetzung stellte eine Herausforderung dar, die mit handelsüblichen Tensiden nicht zu meistern ist.

Mit Hilfe von dem speziellen Tensid KLE25 konnte so eine Miniemulsion hergestellt werden, in deren Nanotropfen die Reaktion stattfand.

Aufgrund hoher Reaktionstemperatur wurde jedoch ein Teil des Tensid abgebaut, was teilweise zum führt. Daher kann die Ausbeute diese Reaktion 50% nicht überschreiten.

Die erhaltenen Nanogele wurde auf verschiedenen Eigenschaften hin untersucht.

Neben der guten Löslichkeit in Wasser und Methanol liegt der wichtigste Vorteil dieser Verbindungsklasse in der niedrigen Viskosität, die weder von der Konzentration noch von ihren Partikelgröße beeinflusst wird.

Aus der in Tab. 4.1 aufgeführten Serie lässt sich ein Zusammenhang zwischen Verzweigungsgrad und Viskosität erkennen. Hohe Verzweigung führt zur verminderten Verschlaufung und somit zur niedrigeren Viskosität.

Somit ist es möglich, die Viskosität eines Nanogels aufgrund seines Verzweigungsgrades vorherzusagen, der Verzweigungsgrad wiederum ist steuerbar über das Verhältnis von Monomer zu Vernetzer. Eine der möglichen Anwendungen solcher Nanogele ist Plasma-expander, welcher in der Regel mit höheren Konzentrationen infundiert wird.<sup>[43, 118, 119]</sup>

Im Vergleich zu den von Brooks berichteten 14-18 nm großen HPGs mit DB-Werten von 0.5-0.6 und einer inneren Viskosität von 2.2 ml/g,<sup>[118]</sup> zeigte Nanogel **1** trotz seiner Partikelgröße von 50 nm eine niedrigere Viskosität von 1.6 ml/g.

Ein weiterer Faktor, der die Viskosität beeinflussen könnte, ist die Anzahl bzw. Konzentration der Oberflächenhydroxygruppen, wovon die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung direkt abhängig ist. Allerdings kann man diesen Faktor hier vernachlässigen, da es sich hier um stark verdünnte Lösungen handelt.

Andererseits gehört die OH-Zahl auch zu wichtigen charakteristischen Daten dieser Verbindungsklasse und ist essentiell für die weitere Funktionalisierung an der Oberflächen.

Über Titrationsanalyse wurde bei Nanogel **1** eine Konzentration der OH-Gruppen von 11.2 mmol/g ermittelt, dieser Wert liegt leicht unter dem des hyperverzweigten Polyglycerins ( $c(\text{OH}) = 13.5 \text{ mmol/g}$ ).<sup>[120]</sup> Dies rührt von der vernetzten Struktur des Nanogels her und sollte bei weiteren Verwendungen berücksichtigt werden. Die niedrigste OH-Zahl besitzt, wie erwartet, das am niedrigst verzweigte Nanogel **7** mit 5.8 mmol/g.

Anders als beim hyperverzweigten PG ist die innere Struktur des Nanogels vernetzt, die Vernetzungsgrad ist in diesem Fall direkt abhängig von der Verzweigungsgrad, da die Vernetzungsreaktionen immer an dendritischen Einheiten stattfinden.

Aus der Nebenreaktionen können außerdem größeren Zyklen gebildet werden (Schema 4.2.2), die das Quellverhalten des Nanogels beeinflussen könnten.

Aufgrund der Nanometer-Dimension der Nanogelpartikeln kann man Ihre Quellbarkeit nicht, wie üblich, anhand der aufgenommenen Lösungsmittelmenge ermitteln. Hier muss das Volumen der Partikeln herangezogen werden, um Volumenquellungsgrad zu ermitteln. Daher wurden die Durchmesser der Partikeln in der Lösung und im Vakuum miteinander verglichen.

Durch den Vergleich konnte eine starke Quellbarkeit festgestellt werden. Im Wasser besitzt ein Nanogel nämlich bis zum 3.5 fache Durchmesser und somit ~ 33 fache Volumen wie im Vakuum. Im Vergleich dazu weisen die von Hennink hergestellten HyPG-MA (methacrylated hyperbranched polyglycerol) Mikrogele eine die Quellungsgrad bzgl. Durchmesser von 1.3-1.7 auf.<sup>[58]</sup> Damit betragen die Volumenquellungsgrade 2-5. Ein von Köster als ausgezeichnet beschriebenes polymers Carbonsäureamid besitzt dagegen eine Volumenquellungsgrad von 5 in Wasser<sup>[121]</sup> Durch den Vergleich konnte eine starke Quellbarkeit festgestellt werden.

Nimmt man diesen Wert, genauso wie die Massenquellungsgrad, als Grundlage für die Berechnung des Vernetzungsgrades (DC), erhält man über die Gl. 4.6

$$DC = \frac{1}{Q_v} \quad \text{Gl. 4.6}$$

einen Vernetzungsgrad von 0.023, der bei einem Verzweigungsgrad von 0.6 relativ niedrig ist. Damit kann man annehmen, dass die Ringbildung in den Nanogelpartikeln vernachlässigt werden kann.

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogelee

### 5.1 Nanogelee mit offenen Netzwerken basierend auf langkettigen Bausteinen

Wie schon in Kapitel 1 erwähnt, eignet sich die Klasse der hypervverzweigten aliphatischen Polyether aufgrund ihrer hervorragenden Biokompatibilität besonders gut als Wirkstofftransporter. Der aussichtsreichste Kandidat ist das hypervverzweigte Polyglycerin (HPG).<sup>[122]</sup> Leider ist seine Effizienz in der medizinischen Anwendungen durch dessen Größe von maximal ~10 nm beschränkt. Partikel in dieser Größe verlassen schnell die Blutbahn durch Extravasation und die renale Ausscheidung.<sup>[57]</sup> Dagegen können Moleküle mit einem Durchmesser von ~200 nm aufgrund des "Enhanced Permeation and Retention-Effect" (EPR-Effekt) länger im Blut verweilen (vgl. Kap. 1).

Die in den vorherigen Kapiteln vorgestellten Nanogelee mit den beschriebenen chemischen und physikalischen Eigenschaften gelten für zahlreiche Anwendungen als sehr vielversprechend. Aufgrund ihrer hohen Stabilität, Biokompatibilität und einer ausgezeichneten Steuerbarkeit durch Veränderungen von äußeren Parametern wie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur, können sie beispielweise als Wirkstoff- und Gen-Transporter sowie Mikrocontainer eingesetzt werden.<sup>[73, 123, 124]</sup>

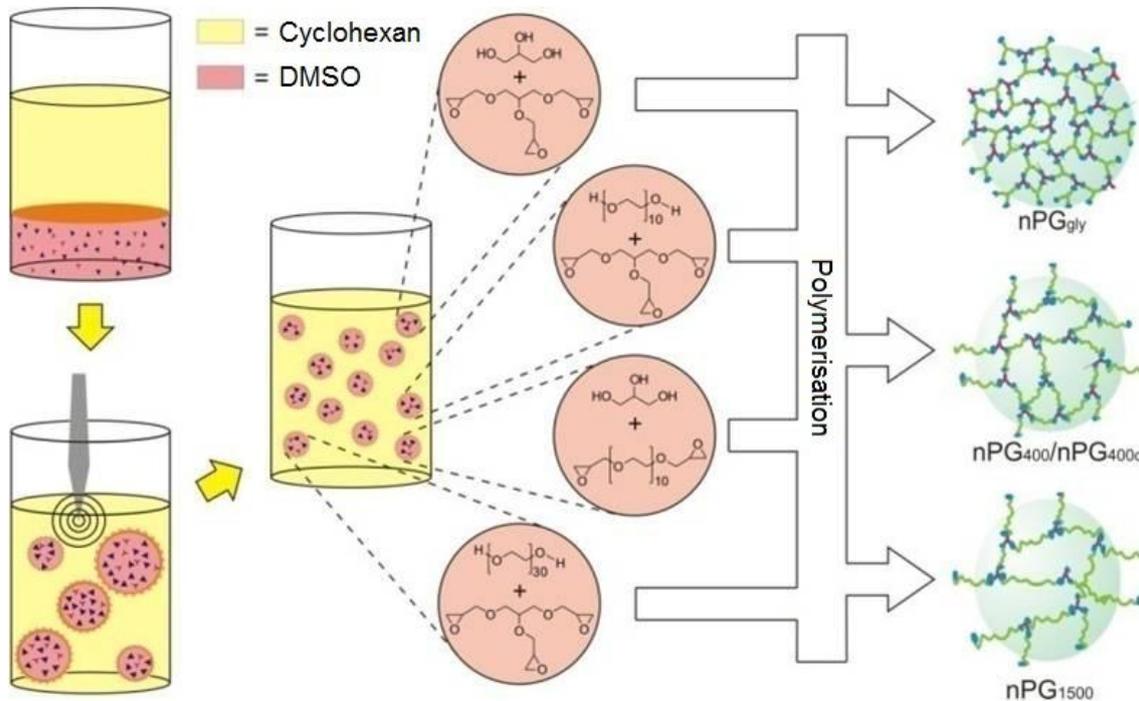
In Kapitel 4 wurden Nanogelee auf Glycerinbasis hergestellt, die eine Größe von 20-200 nm aufweisen.<sup>[74, 125]</sup> Diese Nanogelee vereinen Merkmale von HPG und vernetzten Hydrogelen. Einerseits weisen sie, ähnlich wie das hypervverzweigte Polyglycerin, eine niedrige Viskosität und dichte Oberflächenfunktionalität auf, andererseits besitzen sie vernetzte Strukturen und die damit verbundenen Eigenschaften, wie z. B. die Quellbarkeit.

Im letzten Kapitel wurden bereits die Nanogelee mit HPG verglichen. In Bezug auf die gelähnliche Funktionen, wie z. B. Quellverhalten, ist auch die interne Architektur der Nanogelee von besonderem Interesse. Um diese zu untersuchen wurden die Auswahl der Bausteine, aus denen die Nanogelee gebaut sind, von Glycerin auf langkettige Polyethylenglykole (PEG) erweitert. PEGs sind als biokompatible Materialien schon in vielen Bereichen etabliert und kommerziell erhältlich.

In diesem Kapitel wird die Innenarchitektur der Nanogelee variiert, um zu untersuchen, welchen Einfluss die Struktur der Bausteine auf die Elastizität der Partikel hat. Mit Hilfe von DLS, AFM sowie SFM sollen die Größe der Nanogelpartikeln in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen ermittelt werden. Anhand von Ergebnissen der Elastizitätsmessungen soll auch geklärt werden, in wie fern sich die Geleigenschaften durch die Lösungsumgebung beeinflussen lassen.<sup>[126]</sup>

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogele

Wie in Abb. 5.1.1 dargestellt, wurden vier Nanogele aus unterschiedlichen Bausteinen synthetisiert, die im Folgenden jeweils als  $nPG_{gly}$  (aus GTGE und Glycerin),  $nPG_{400C}$  (aus PEG400-GE und Glycerin),  $nPG_{400}$  (aus GTGE und PEG400) und  $nPG_{1500}$  (aus GTGE und PEG1500) bezeichnet werden.



**Abb. 5.1.1:** Nanogele aus verschiedenen Bausteinkombinationen.

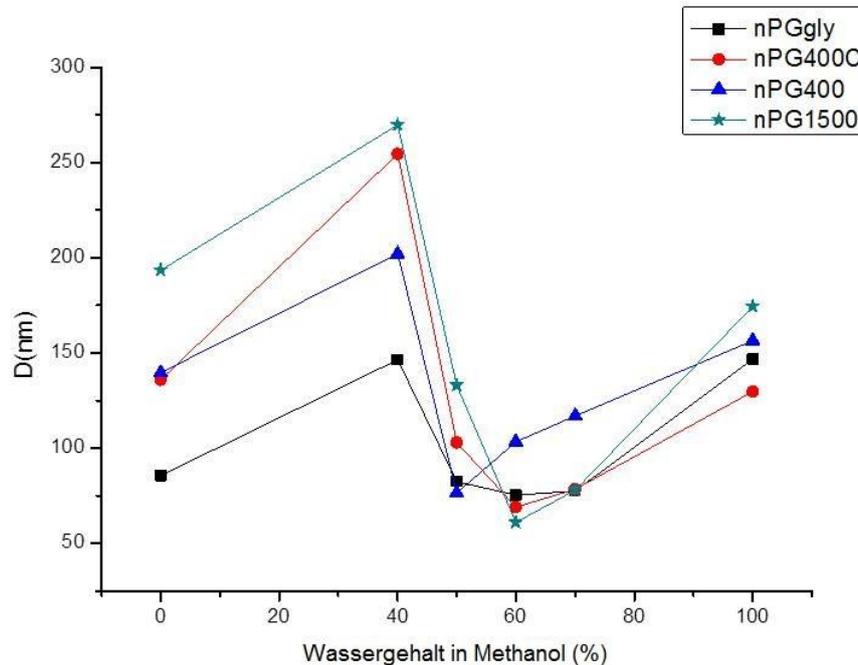
Aufgrund der unterschiedlichen Kettenlänge der Bausteine werden unterschiedliche innere Architekturen und somit unterschiedliche Flexibilitäten der Nanogelpartikel erwartet, die anhand von Quellbarkeiten untersucht werden sollen. Dabei ist der Vergleich zwischen  $nPG_{400C}$  und  $nPG_{400}$  besonders interessant. Beide enthalten langkettige Komponenten mit einer mittleren relativen Molmasse von 400 g/mol. Bei  $nPG_{400}$  dient das PEG 400 als das  $A_n$ -Komponente, während das PEG 400-GE mit zwei endständigen Epoxidringen bei  $nPG_{400C}$  die Rolle des  $B_m$ -Komponenten übernimmt. Laut dem in Kapitel 4 beschriebenen Reaktionsmechanismus ist der epoxidhaltige  $B_m$ -Baustein die reaktionsbestimmende Komponente, so ist es sehr wahrscheinlich, dass die beiden Gele trotz ähnlichen Ausgangsverbindungen doch unterschiedliche Inneren Architekturen erhalten, was schließlich zu unterschiedlichen Quellverhalten führt.

### 5.1.1 Quellung in variablen Lösungsmitteln

Die folgende Tabelle und das dazugehörige Diagramm in der Abb. 5.1.2 zeigen die Daten einer Messreihe, bzw. die graphische Auftragung dieser Daten, die Aussagen über das Quellverhalten der Nanogelen liefern können.

**Tab. 5.1:** Partikelgrößen der Nanogele in verschiedenen Lösungsmittelgemischen.

Wassergehalt in Methanol (%)	Durchmesser (nm)			
	nPG <sub>gly</sub>	nPG <sub>400C</sub>	nPG <sub>400</sub>	nPG <sub>1500</sub>
0	85.5±2.4	136±38.8	139.6±30	193.4±40.4
40	146.4±9.2	254.4±38.8	202±68.1	269.7±14.9
50	82.5±5.2	103±8.4	76.4±1.1	133±39.7
60	75.4±0.5	69±2.8	103.4±6.5	61±2.8
70	77.5±0.9	78.5±2.8	117±5.5	78±3.8
100	146.8±6.1	129.7±23.2	156.4±30	174.4±10.3



**Abb. 5.1.2:** Größenänderungen der Nanogele in verschiedenen Lösungsmittelgemischen. Die Standardabweichungen sind in der Tab. 5.1 angegeben.

An den gemessenen Partikelgrößen und deren graphischer Auftragung gegen den Wassergehalt im Lösungsmittel wird bei allen Gelen ein ähnlicher Verlauf ersichtlich. Die Partikelgrößen nehmen zunächst mit steigendem Wassergehalt zu und fallen wieder, bis ein Minimum bei 50-60% Wassergehalt erreicht wird, mit weiterer Zugabe von Wasser quellen die Partikel jedoch wieder auf.

Der durch die Kettenlänge der Bausteinen verursachte Unterschied wird in Methanol besonders deutlich. Aufgrund des höheren PEG-Gehalts im Rückgrat weisen die PEG-basierten Nanogelee eine bessere Quellbarkeit in Methanol als in Wasser auf. Die Quelleigenschaften stehen im direkten Zusammenhang mit der Kettenlänge der Bausteine. Wie erwartet, zeigte nPG<sub>1500</sub> den größten Partikeldurchmesser und das stärkste Quellverhalten, was eine hohe Flexibilität belegt. Die beiden Gele nPG<sub>400c</sub> und nPG<sub>400</sub>, bestehend aus PEG 400 Derivaten, haben fast die gleiche Größe in Methanol. Der kleinste Durchmesser wurde bei nPG<sub>gly</sub> gemessen, im Gegensatz zu den PEG-basierten Gelen quillt nPG<sub>gly</sub> in reinem Wasser mehr als in reinem Methanol. Den Grund dafür findet man in der hohen Hydrophilie dieses Gels. Aufgrund höherer Reaktivität findet die Vernetzungsreaktion bevorzugt an primären OH-Gruppen statt, somit bleibt eine große Menge sekundären OH-Gruppen frei. Als Folge dessen sind nicht nur an der Partikeloberfläche eine große Anzahl von OH-Gruppen zu finden, sondern auch in ihrem Inneren. Alle vier Gele erreichen das Minimum ihrer Durchmesser im Bereich von 60% Wassergehalt. Offensichtlich besteht hier eine Mischungslücke zwischen Wasser und Methanol, was zu kompletter Verdrängung des Lösungsmittels aus dem Gelpartikel führt (cononsolvency effect).<sup>[127]</sup> Unter dieser Bedingung ist die Partikelgröße vergleichbar mit derjenigen unter Lösungsmittelfreier Bedingung. Die anfängliche Zunahme der Partikelgrößen ist jedoch auffällig. Dieses Phänomen lässt vermuten, dass das ideale Lösungsmittel Ether-basierter Nanogelee eine Mischung ist, d. h. die Quellung erreicht das Maximum nur in einem Gemisch aus Wasser und Methanol. Obwohl nPG<sub>400</sub> und nPG<sub>400c</sub> aus ähnlichen Bausteinen bestehen, haben sie ganz unterschiedliche Quellverhalten.

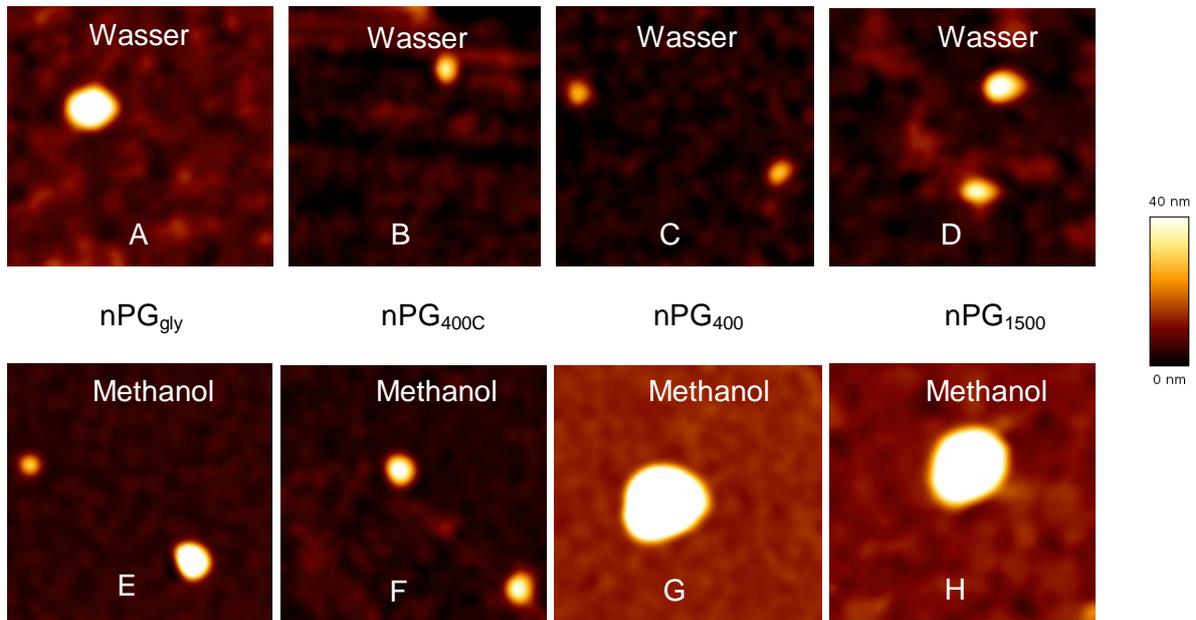
### 5.1.2 Quellverhalten auf der Goldoberfläche

Die SFM- sowie die im nächsten Abschnitt beschriebene Young's Modulus Messung wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Klitzing von Marcel Richter an der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

Um die Härte bzw. die Biegesteifigkeit der Partikel zu bestimmen wurden SFM-Messungen an den Nanogelen durchgeführt. Über Spin-Coating wurden die Proben auf Goldoberflächen aufgetragen. Abb. 5.1.3 zeigt SFM-Bilder der Nanogelpartikeln im Wasser (obere Zeile) und

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogele

Methanol (untere Zeile). Die drei PEG-Nanogele quellen viel stärker in Methanol als im Wasser, dies ist auf die bessere Löslichkeit der PEG-Einheiten in Methanol zurückzuführen.

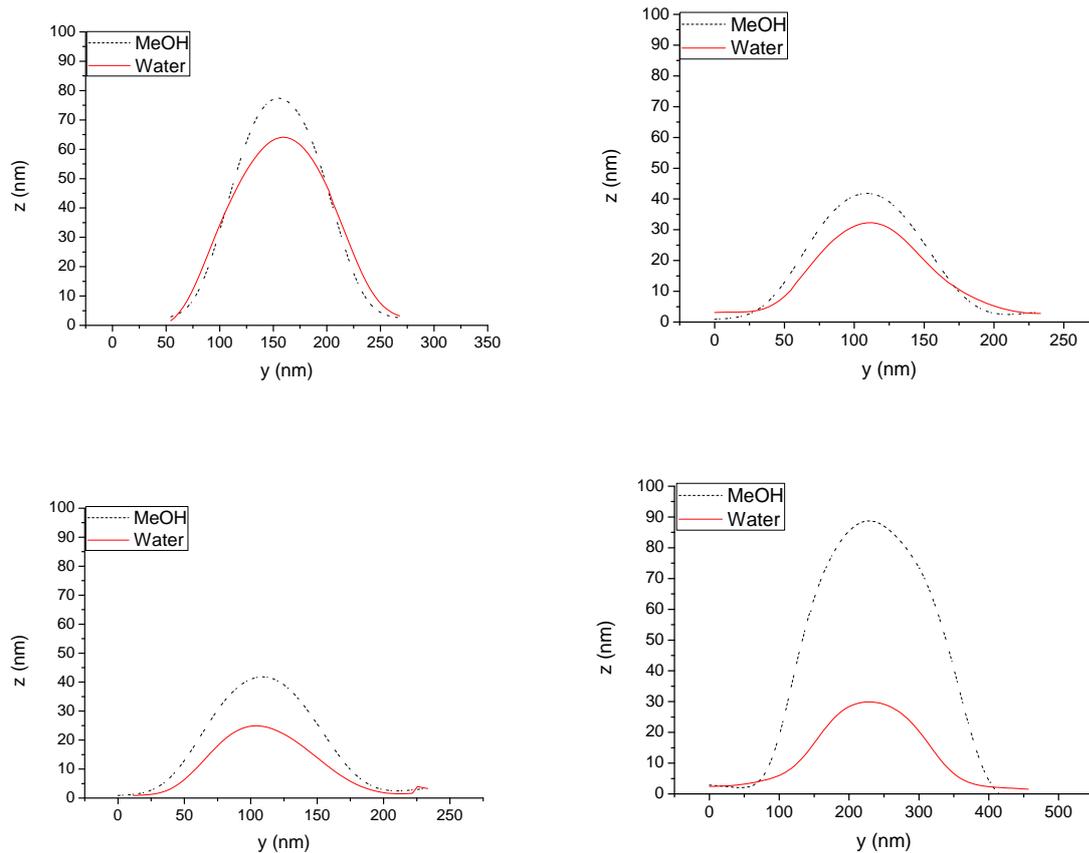


**Abb. 5.1.3:** SFM Aufnahmen in Wasser (obere Reihe) und Methanol (untere Reihe) von nPG<sub>gly</sub> (A, E), nPG<sub>400c</sub> (B, F), nPG<sub>400</sub> (C, G) und nPG<sub>1500</sub> (D, H). Die Größe von nPG<sub>gly</sub>-Partikeln unterscheiden sich nur leicht, während PG<sub>400c</sub>-, PG<sub>400</sub>- und PG<sub>1500</sub>-Partikeln in Methanol deutlich vergrößert sind. (Maße der Scans: 1x1  $\mu$ m)

In Wasser besitzt das nPG<sub>gly</sub> den größten Durchmesser von allen vier Gelen. In Methanol schrumpft er ein wenig, dahingegen quellen nPG<sub>400</sub> und nPG<sub>1500</sub> stark auf. Dies belegt eine höhere Flexibilität der letzteren beiden Gele.

In Abb. 5.1.4 sind die Querschnitte der Nanogelpartikel zu sehen, die roten Linien zeigen den Umriss der Partikeln in Wasser, während die gestrichelten Linien die Partikel in Methanol darstellen. Eine deutliche Zunahme der Partikelgröße kann für die Teilchen nPG<sub>400</sub> und nPG<sub>1500</sub> festgestellt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der DLS-Messung überein.

Zusätzlich kann man mit Hilfe der cross section Darstellung erkennen, dass die Partikel sich an den Trägeroberflächen zum Teil anders verhalten als in schwebendem Zustand. Insbesondere das nPG<sub>1500</sub> flachte auf dem Träger stark ab, was im Vergleich zu seinem Zustand in Methanol besonders deutlich wird. Somit sind die Partikel in Wasser weicher als in Methanol.



**Abb. 5.1.4:** SFM-Cross sections von nPG<sub>gly</sub> (oben links), nPG<sub>400c</sub> (oben rechts), nPG<sub>400</sub> (unten links) und nPG<sub>1500</sub> (unten rechts). Im Wasser weisen sie deutlich größere Durchmesser auf als im Methanol, dies ist bei nPG<sub>1500</sub> besonders deutlich zu sehen.

### 5.1.3 Mechanische Eigenschaften

Der Young's-Modulus von adsorbierten Partikeln wurde durch SFM Nanoindentation an mindestens drei Partikeln bei 25 °C bestimmt. Tab. 5.2 zeigt die Ergebnisse der Young-Moduli in Methanol und Wasser. Der Young's-Modul  $E$  wurde mit einem von Hertz Dimitriadis eingeführten Modell berechnet

Die Quellfähigkeit der Partikel ist viel besser in Methanol als in Wasser, was zu einem größeren Methanolaufnahmeindex führt. Daher konnten die Elastizitäten nPG<sub>400c</sub> und nPG<sub>400</sub> aufgrund ihrer geringen Größe nicht in Wasser bestimmt werden. Dabei sind die Ergebnisse in Methanol für weitere Experimente von größerer Bedeutung. Die Young's-Modulus-Werte von den beiden glycerin-basierten Gelen, nPG<sub>gly</sub> und nPG<sub>400c</sub>, liegen nah beieinander. Dies lässt vermuten, dass die A<sub>n</sub>-Komponente, in diesem Fall Glycerin, mehr zur Steifheit beiträgt als die B<sub>m</sub>-Komponente. Andererseits unterscheiden sich die Gele mit einem PEG-Rückgrat, wie das nPG<sub>400</sub> und das nPG<sub>1500</sub>, extrem in ihrer Steifheit. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Gele umso weicher sind, je langkettiger ihre Bestandteile sind. Demnach sollte das

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogele

---

nPG<sub>1500</sub>, aufgrund der flexibleren Innenstruktur, einen niedrigeren Youngs' Modulus-Wert als nPG<sub>gly</sub> haben, dies ist aber nicht der Fall. Dahingegen ist nPG<sub>400</sub>, das aus kürzeren PEG-Ketten besteht, viel weicher als nPG<sub>1500</sub> mit seinem 3-fach längeren PEG-Ketten. Dies kann durch Bildung von Substrukturen erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass bei Nanogelsynthesen isolierte Substrukturen aus einzelnen Monomeren entstehen können. Diese Substrukturen beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der Gele.<sup>[115]</sup> Von längeren PEG-Ketten ist bekannt, dass sie schraubenförmige oder globuläre Substrukturen bilden, was zu einem kompakten Netzwerk führt. Dahingegen sind die Einheiten des PEG-Rückgrates von nPG<sub>400</sub> weniger flexibel als diejenigen von nPG<sub>1500</sub>, dadurch ist die Tendenz, solche Unterkonstruktionen zu bilden, weniger ausgeprägt, was zu weicheren Partikeln führt.

**Tab. 5.2:** Die gemessenen Young's Moduli der Nanogele, in Wasser und Methanol.

Substanz	Young's modulus in Methanol [kPa]	Young's modulus in Wasser [kPa]
nPG <sub>Gly</sub>	1429.8 ± 600	1636 ± 522
nPG <sub>400C</sub>	1556 ± 244	-----
nPG <sub>400</sub>	389 ± 10	-----
nPG <sub>1500</sub>	1871 ± 106	2884 ± 217

Es sei nochmal darauf hingewiesen, dass die Teilchen, die in Wasser gemessen wurden, steifer als in Methanol sind. Dies stimmt mit den Daten aus dem SFM und DLS-Messungen überein (siehe Abb. 5.1.2-5.1.4).

### 5.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Abschnitt wurde das Spektrum der Bausteine der im Kapitel 4 bereits beschriebenen Synthese auf langkettige PEG-Spacer erweitert. Die daraus gebildeten Nanogele werden im Folgenden als PEG-PG-Nanogele bezeichnet, um diese von dem in Kapitel 4 erwähnten nPG zu unterscheiden. Da diese ebenfalls Glycerinkomponenten enthalten gehören auch sie, genauso wie das nPG, zu den glycerin-basierten Nanogelen.

Die erhaltenen PEG-PG-Nanogele wurden in ihren mechanischen Eigenschaften mit dem nPG aus dem vorherigen Kapitel verglichen. Die Quellbarkeit dieser Partikel wurde sowohl im schwebenden Zustand als auch auf der Oberfläche gemessen. Zusätzlich wurde das Elastizitätsmodul der auf Goldoberfläche aufgetragenen Partikel untersucht.

Es wurde gezeigt, dass sich die Quellbarkeit der Nanogele, je nach Lösungsmittel, deutlich verändert. Im Wasser waren die nPG-Partikel viel größer als in Methanol, was durch die bessere Wasserlöslichkeit der Glycerineinheiten zu erklären war. Im Gegensatz dazu waren die PEG-PG-Nanogele in Methanol stärker gequollen als in Wasser.

Der gleiche Trend bei den PEG-PG-Nanogelen wurde auch auf der Goldoberfläche beobachtet. Anders als in der Lösung, wies nPG dabei einen geringfügig größeren Durchmesser in Methanol auf.

Auffällig war, dass die beiden Gele, die Glycerin als  $A_n$ -Komponente enthalten, also das  $nPG_{Gly}$  und das  $nPG_{400C}$ , trotz dem deutlichen Längenunterschied ihrer Bausteine, sich in ihren Young's-Moduli sehr ähneln. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die  $nPG_{400}$  und  $nPG_{400C}$  sehr deutlich in ihrer Steifigkeit, obwohl beide PEG400 in ihrem Gerüst enthalten (siehe Tab. 5.2). Daraus erschließt sich, dass die Komponente  $B_m$ , (oder der Vernetzer) mehr Einfluss auf die Kernarchitektur und Quelleigenschaften des Produktes hat als das  $A_n$ -Komponent.  $nPG_{1500}$  mit PEG1500-Ketten erwies sich wiederum als steifer als das  $nPG_{400}$ , dies ist auf die Bildung von Substrukturen zurückzuführen. Derartige Phänomene wurden auch bei PolyNIPAM-Partikeln beobachtet.<sup>[126]</sup> Auch für langkettige PEGs ist es bekannt, dass sie globuläre oder helikale Substrukturen bilden können. Je länger die PEG-Kette ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese verknäult vorliegt. Somit gehen sie auch als Knäule in die Reaktion ein, so dass innerhalb des Gels lokal verdichtete Strukturen entstehen. Dies beeinflusst die Flexibilität und erhöht die Steifigkeit eines PEG-PG-Nanogels erheblich.

Daraus lässt sich schließen, dass die Flexibilität, wie vorhergesagt, mit steigender Kettenlänge der Bausteine zunimmt, allerdings muss die Verknäulung berücksichtigt werden, die erst ab einer bestimmten Kettenlänge auftritt.

## 5.2 Oberflächenfunktionalisierung der Polyglycerin Nanogelee

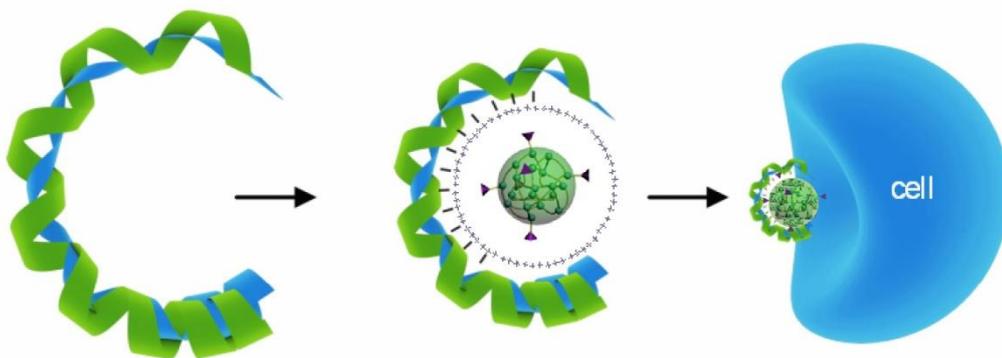
Im Laufe der letzten zehn Jahre wurden viele Carrier zur DNA/RNA-Transfektion untersucht, die meisten basieren auf polykationischen Lipiden oder Polymeren, welche mit der DNA Komplexe bilden, sogenannte Lipo- bzw. Polyplexe. Dabei müssen die Polykationen zahlreiche Anforderungen erfüllen, wie geeignete Größe, Ladung, Hydrophobie oder Pufferkapazität.<sup>[92, 93, 128-130]</sup>

In den letzten Jahren wurden bereits dendritische Polyethylenimine (PEI), Polypropyleniminen (PPI), Polyamidoaminen (PAMAM) sowie polyglycerin-basierten Polyaminen berichtet, die hohe DNA/RNA-Transfektionseffizienzen aufweisen.<sup>[96, 129, 131]</sup> Obwohl die meisten noch große Verbesserungspotentiale bezüglich Toxizität haben, hat sich das Konzept von Protonenschwamm in Form von Polyaminen als vielversprechend erwiesen.

Auch das in dieser Arbeit behandelte nPG kann durch entsprechende Funktionalisierung als DNA/RNA-Komplexierungsmittel wirken.

Mit der exzellenten Dispergierbarkeit und der Größe in Nanometerbereich sind sie äußerst vielversprechende Kandidaten für die Gentransfektion.

Ziel dieses Projektes war es, ein effizientes Transfektionsmittel mit geringer Toxizität zu designen. Da angenommen wird, dass die Toxizität abhängig von der Ladungsdichte ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit Nanogelee, aufgrund ihrer Größe, als potenzielle Transfektionsmittel getestet.



**Abb.5.2:** Komplexierung der DNA durch nPG-Amin, Bildung eines DNA/nPG-Amin Polyplexes und Aufnahme in die Zelle.

### 5.2.1 Synthese und Syntheseoptimierung

Die Funktionalisierung der Polyglycerinnanogelee kann auf zwei verschiedene Routen erfolgen, die in Abb. 5.2.1 jeweils als a) und b) aufgeführt sind. Route a) stellt eine bereits etablierte Methode dar und geht von nPG-OH aus.<sup>[113]</sup> Die Hydroxygruppen werden zunächst teilweise in Mesyl-Gruppen überführt, anschließend ergeben sich zwei Möglichkeiten zur Aminierung. Zum Einen über eine Azidierung mit abschließender Reduktion zu nPG-Amin (Route a1)), zum Anderen über eine direkte Aminierung in wässriger Ammoniaklösung (Route a2)). Für die Route b) wird die in Kap. 4 beschriebene Nanogelsynthese (durch ringöffnende Polykondensation von Epoxiden, Abb. 4.2.2) leicht variiert, da die so gebildeten Nanogelee am Ende der Reaktion immer noch Epoxide enthalten, solange sie nicht mit Wasser gequollen werden.<sup>[57, 75, 116]</sup> Durch kontrollierte Reaktionszeit werden Epoxid beladene Nanogelee gezielt hergestellt. Dadurch kann man die anschließende Funktionalisierung auf zwei Schritte reduzieren und vermeidet nicht nur den relativ anspruchsvollen Schritt der Mesylierung sondern verringert auch den Ausbeuteverlust durch die Aufarbeitung. Die Beladung der Epoxide ist über die Reaktionszeit der Nanogelsynthese regulierbar, allerdings erreicht man auf diese Art und Weise nur eine relativ niedrige Beladung von  $\leq 20\%$ . Ist eine höhere Beladung erwünscht, so muss man auf die Route a) zurückgreifen.

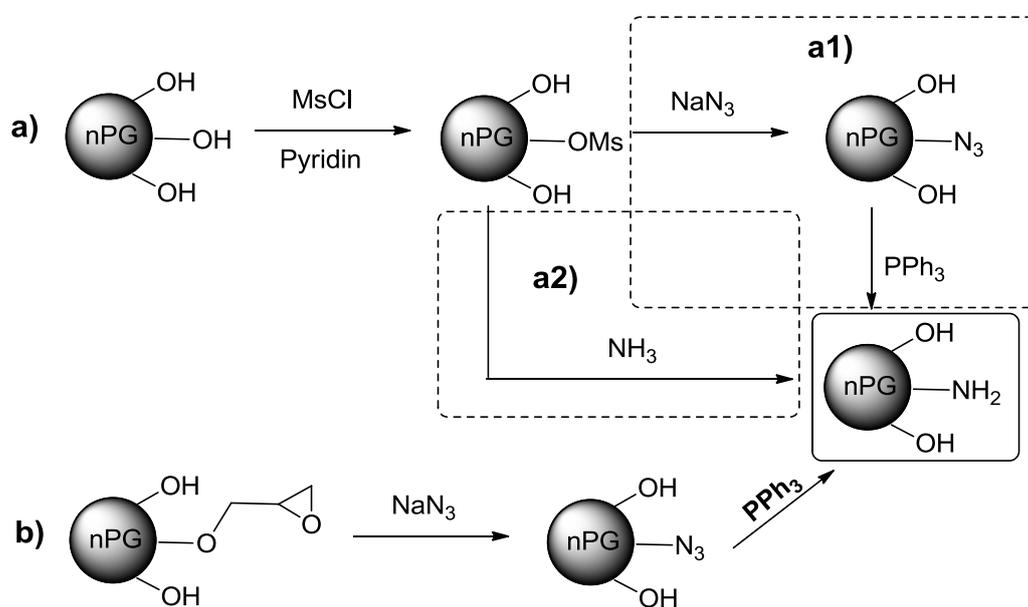
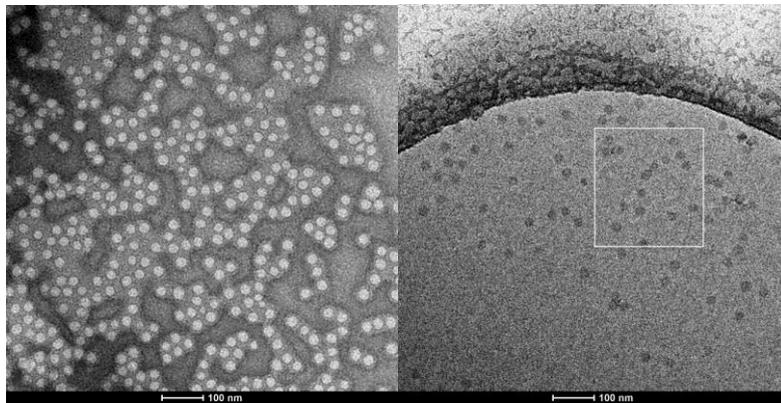


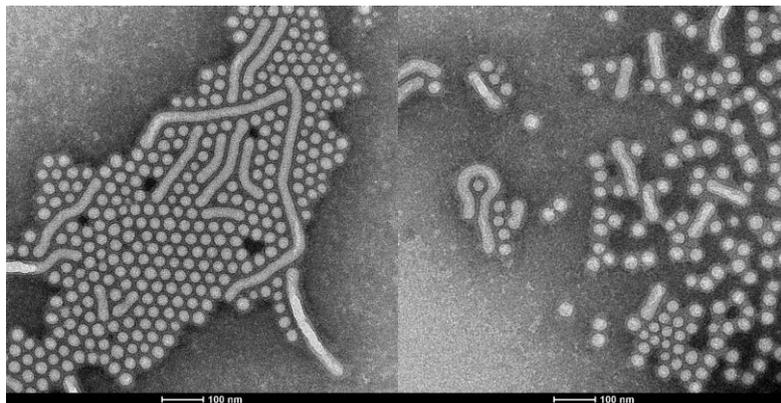
Abb. 5.2.1: Syntheserouten zur nPG-Amin.

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogelee

Die mit Epoxiden beladenen nPG Partikel (nPG-Epoxid) wurden mit Hilfe von NMR- und TEM charakterisiert. Zunächst sind sie den nPG Partikeln sehr ähnlich. Nach sechs Monaten wurden jedoch Veränderungen im TEM beobachtet, welche in Abb. 5.2.3 a) und b) illustriert sind. Hier sieht man z. B. längliche Strukturen, die zunächst für Aggregate gehalten wurden. Nach der Ultraschallbehandlung der Probe konnten diese Gebilde aber nicht gebrochen werden, sondern scheinen sich eher zu vermehren und noch kompliziertere Formen anzunehmen, wie in Abb. 5.2.3 c) und d) zu sehen ist. Die länglichen Partikel müssen also durch kovalenten Bindungen zustande gekommen sein, vermutlich durch die Epoxide, die an der Oberfläche nach längerer Zeit mit den OH-Gruppen reagieren.

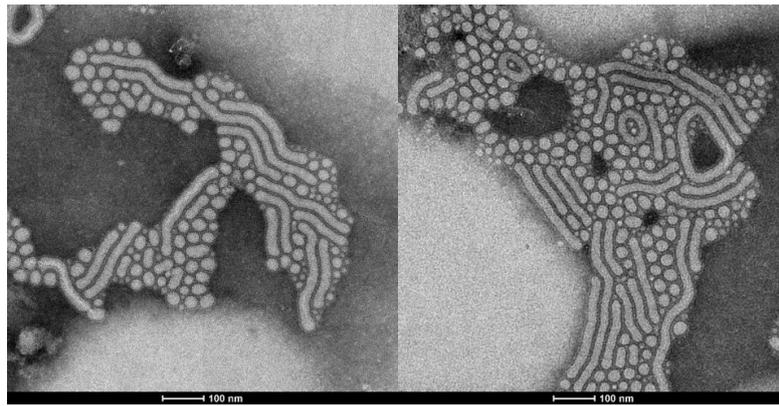


**Abb. 5.2.2:** TEM- (links) und Cryo-TEM- (rechts) Aufnahmen einer zu 16% mit Epoxiden beladene nPG Probe, Probenkonzentration; ~ 10 mg/mL.



a)

b)



c)

d)

**Abb. 5.2.3:** a), b): Unterschiedliche Bereiche der Probe nPG-Epoxyd 16% nach sechs Monaten c), d): unterschiedliche Bereiche dieser Probe nach einer Ultraschallbehandlung.

Es ist also wichtig, die Epoxyd-beladenen Nanogelee schnell zu verarbeiten. Die Umsetzungen der Epoxyden zu Aziden und die anschließende Reduktion zu Aminen wurden anhand von IR- und NMR-Spektren verfolgt.

Es wurden nPG-Amine mit verschiedenen Beladungen hergestellt. Ein 16%iges nPG-Amin wurde über Route b) erhalten, ein 88%iges und ein 78%iges ein nPG-Amin wurden von Markus Hellmund über Route a1) hergestellt, Die jeweilige Funktionalisierung bzw. Beladung wurde anhand von NMR-Spektren ermittelt.

Die geplante Methode a2) erwies sich als ungeeignet, da die Umsetzung auch nach mehreren Tagen nicht vollständig ablief. Daher erfolgten die Synthesen ausschließlich über Route a1) und b).

Unserer Erwartung entsprechend wurden mit beiden Methoden einheitliche Partikel detektiert. In TEM-Aufnahmen können die aminierten Nanogelee nicht von den normalen nPG Partikel unterschieden werden und besitzen einen Durchmesser von ~30 nm (Abb. 5.2.2). Ähnlich wie die nPG-Nanogelee zeigen auch die funktionalisierten Partikel mit einem Durchmesser von ~ 80 nm in wässriger Lösung eine relativ starke Quellbarkeit.

### 5.2.2. nPG-Nanogelee als DNA-Transfektionsmittel

Basierend auf einem nPG aus A<sub>3</sub>+B<sub>3</sub>-System (Glycerin + GTGE, siehe Kapitel 4) wurden zwei nPG-Amine mit unterschiedlichen Beladungen hergestellt (16% und 88%). Die 88%ige nPG-Amine wurden von Markus Hellmund funktionalisiert. Ein weiteres nPG, ebenfalls aus A<sub>3</sub>+B<sub>3</sub>-System wurde von Markus Hellmund hergestellt und zu 78% mit Amin funktionalisiert. Mit dem nPG-Amin 78% wurden Zytotoxizitätstest sowie DNA-Transfektionsversuche in der

Arbeitsgruppe von Prof. Kissel an der Phillips-Universität Marburg von Frau Dr. Samsonova in Zusammenarbeit mit Markus Hellmund durchgeführt.

### 5.2.2.1. Zytotoxizitätstest

Zunächst wurde die Zytotoxizität eines PG-Nanogels mit 78%iger Amin-Beladung (nPG-Amin 78%) an SKOV-Luc und CHO-Luc-Zellen bestimmt.

Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden Polymerlösungen verschiedener Konzentrationen versetzt, inkubiert und anschließend mit gelbem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) eingefärbt, die durch Dehydrogenasen der Atmungskette von aktiven Zellen zu blau-violetten Formazan reduziert wird (Abb. 5.2.4).<sup>[132]</sup>

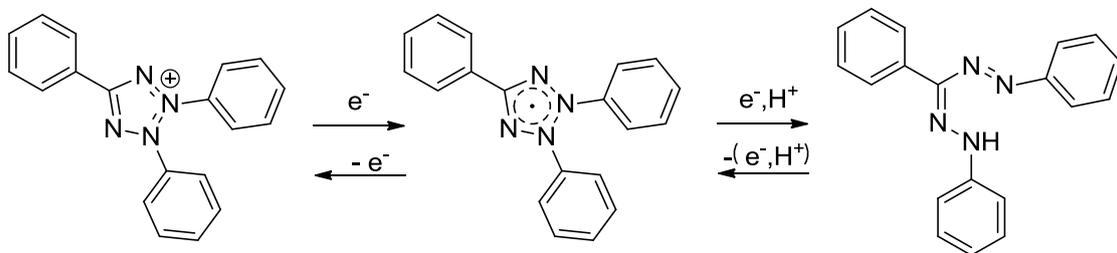
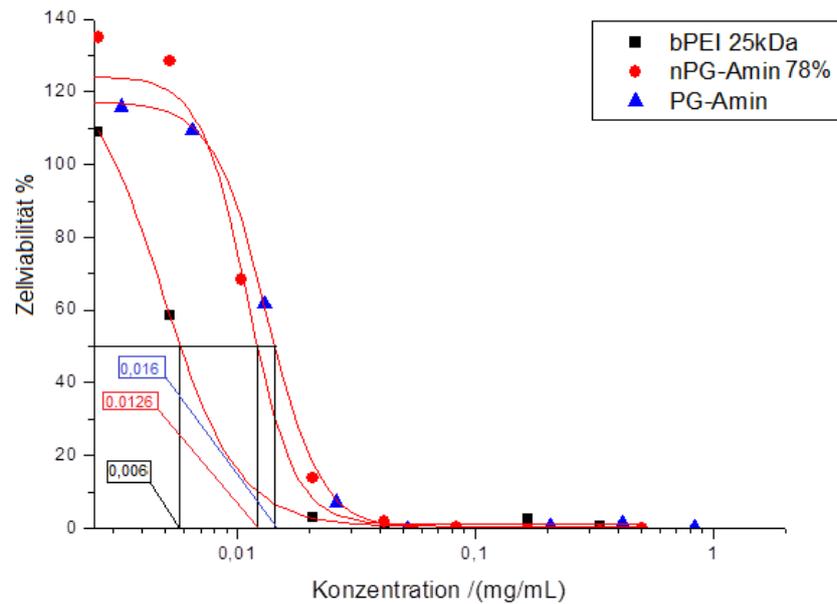


Abb. 5.2.4: Reduktion des Tetrazolium-Kations zu Formazan

Anhand der Farbintensität im Vergleich zu einer Kontrollprobe kann der prozentuale Anteil lebender Zellen in jeweiligen Proben bestimmt werden. Trägt man diese Zahlen gegen die Konzentration der angesetzten Substanzen an, kann der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt werden. Der  $IC_{50}$ -Wert beschreibt die Konzentration, die benötigt wird, um eine Abnahme der Vitalität der Zellen um 50 % zu erreichen. (siehe, Abb. 5.1.4). Je höher der  $IC_{50}$ -Wert einer Substanzen ist, desto geringer ist dessen Toxizität.

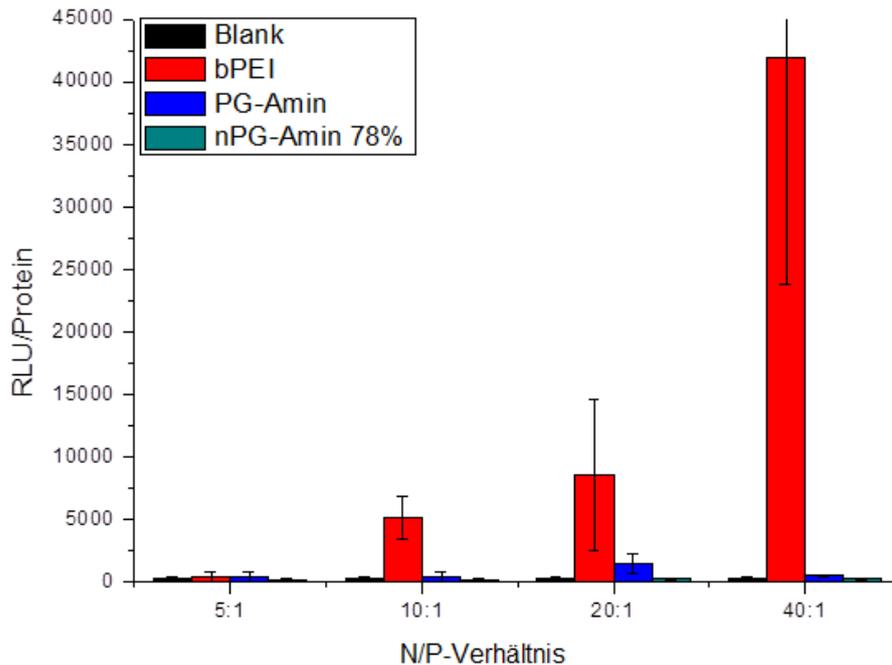
Der hier bestimmte  $IC_{50}$ -Wert von bPEI 25kDa liegt weit unter dem bekannten Literaturwert von  $30 \mu\text{g/mL}$ .<sup>[133]</sup> Daher ist der hier ermittelte Wert für nPG-Amin wahrscheinlich auch stark verfälscht. Trotzdem kann man aus dem Diagramm der Abb. 5.2.5 den Trend entnehmen, dass die Toxizität des hochbeladenen nPG-Amins zwischen der des verzweigten Polyethylenimins (bPEI, hier bPEI 25kDa) und der des PG-Amins liegt.



**Abb. 5.2.5:** Zytotoxizität des nPG-Amin 78%, im Vergleich zu bPEI und PG-Amin.

### 5.2.2.2 Transfektion von Plasmid-DNA

Als Transfektion bezeichnet man den Transport von Genen in die Zelle, sowie deren anschließende Freisetzung. Die Transfektionseffizienz des nPG-Amins wurde in Abhängigkeit von verschiedenen N/P-Verhältnissen (Stickstoff/Phosphat-Verhältnis), von der Arbeitsgruppe Kissel an der Phillips-Universität Marburg, getestet. Dazu wurden die nPG-Amin-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen mit dem Plasmid-DNA, Luciferase Gen versetzt und auf die Zellen gegeben. Im Falle positiver Transfektion wird dieses Gen erfolgreich in Zellkern gebracht und die Produktion von Luciferase wird angeregt, das Luciferin unter Lichtemission oxidieren kann. Dieser Effekt wurde anschließend mithilfe von einem Luminometer gemessen und als RLU (relative luminescence units) ausgedrückt. Daraus wurde dann das Verhältnis RLU/ $\mu\text{g}$  Protein gebildet. Je mehr RLU pro  $\mu\text{g}$  Protein vorhanden sind, desto „stärker“ wurde die Zelle mit DNA transferiert und umso erfolgreicher ist der Träger für DNA.



**Abb. 5.2.6:** Transfektionstest mit nPG-Amin im Vergleich zu bPEI und PG-Amin.

Entgegen unserer Erwartung zeigt das hochbeladene nPG-Amin bei allen getesteten N/P-Verhältnissen nur sehr geringe Transfektion, die im Vergleich zu bPEI vernachlässigbar ist. Der Wert ist vergleichbar mit dem der Kontrollprobe.

Dafür könnte es zwei verschiedenen Erklärungen geben. Zum Einen könnte es sein, dass die Polyplexe gar nicht erst gebildet werden und die DNA nicht in die Zellen gelangt oder aber dass der gebildeten Komplex so stabil sind, dass die DNA zwar in die Zellen aufgenommen wird, aber nicht aus dem Polyplex wieder freigesetzt wird. Die zweite Hypothese könnte z. B. durch niedrigere Aminbeladung verhindert werden.

Um die mögliche Ursache für die geringe Effizienz zu klären, wurden weitere Untersuchungen zur Komplexierung, bzw. zur Stabilität der gebildeten Polyplexe durchgeführt, die im folgenden Abschnitte näher erläutert werden. Ferner wurde auch ein niedrigbeladenes Gel untersucht, um eine ideale Aminbeladung zu ermitteln.

### 5.2.2.3. DNA-Komplexierung der nPG-Amine

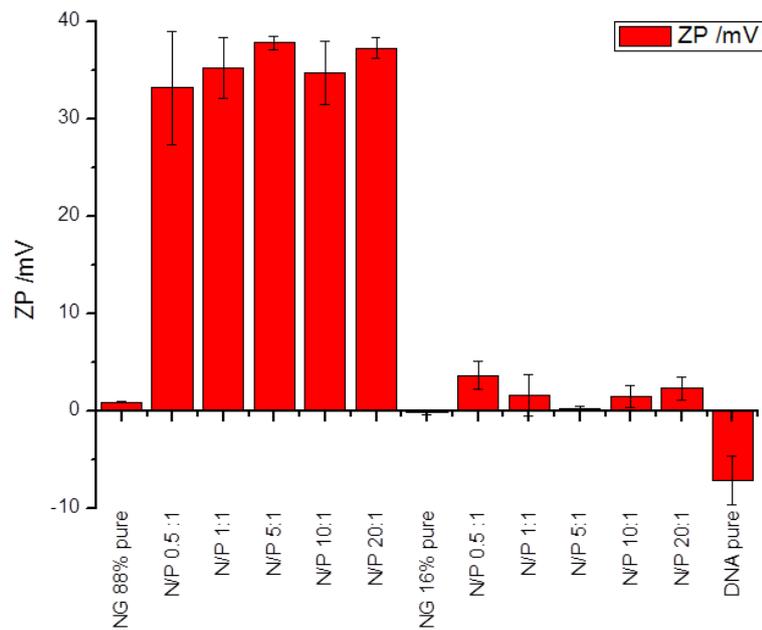
Um das Komplexierungsverhalten der nPG-Amine mit DNA zu untersuchen, wurden unterschiedliche DNA-Mengen mit zwei unterschiedlich beladenen Aminen (88% und 16%) komplexiert, es wurden in Zusammenarbeit mit Markus Hellmund  $\zeta$ -Potential-Messungen und ein Ethidiumbromid-Assay durchgeführt.

Für die  $\zeta$ -Potential-Messung wurden jeweils eine konstante DNA-Lösung (0,2 mM, Nukleotid mit 23 Basenpaare) mit unterschiedlichen Mengen, bezüglich N/P-Verhältnis, zu der Nanogel-Lösungen versetzt. Nach 30 min. Inkubation wurden die  $\zeta$ -Potentiale der jeweiligen Lösungen gemessen. Die reine DNA-Lösung hat ein negatives  $\zeta$ -Potential von  $\sim -7$  mV. Die reinen Lösungen der beiden nPG-Amine sind positiv (Tab. 5.3).

**Tab. 5.3:**  $\zeta$ -Potential-Messung zweier nPG-Amin.

N/P-Verhältnis	$\zeta$ -Potential	
	nPG-Amin 88%	nPG-Amin 16%
0	0.89 $\pm$ 0.1	-0.178
1:2	33.17 $\pm$ 5.78	-----
1:1	35.2 $\pm$ 3.1	0.176
5:1	37.8 $\pm$ 0.7	0.404
10:1	34.7 $\pm$ 2.3	2.27
20:1	37.25 $\pm$ 0.8	3.1

In Abb. 5.2.7 sind die Werte in Diagramm aufgetragen, daraus wird eindeutig, dass das hochbeladene Amin einen zu großen Überschuss an positiver Ladungen bietet und damit wahrscheinlich einen zu stabilen Komplex bildet. Mit dem 16%igen nPG-Amin dagegen durch entsprechende Portionierung eine Neutralisation erreicht werden. Im Zusammenhang mit den vorherigen Ergebnisse aus dem Zytotoxizitätstest und Transfektionsversuche findet man hier eine mögliche Erklärung für die geringe Transfektionseffizienz des nPG-Amin 78% mit der vergleichbar hohen Ladung. In diesem Fall wäre das nPG-Amin 16%, im Vergleich zum nPG-Amin 78%, als Transfektionsträger besser geeignet.



**Abb. 5.2.7:** Balkendiagramm zur Veranschaulichung der  $\zeta$ -Potential-Werte der zwei unterschiedlich beladenen nPG-Amine.

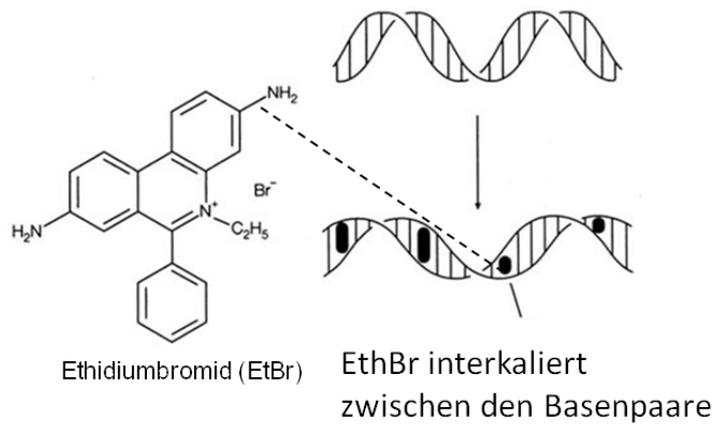
### 5.2.2.4 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay

Um sicher zu sein, dass die Veränderung der  $\zeta$ -Potentiale wirklich durch Komplexbildung zustande gekommen ist und nicht ein Resultat der einfachen Kompensation beider Substanzen ist, wurde die Affinität der Nanogelee zur DNA mit Hilfe des Ethidiumbromid (EtBr)-Assays untersucht.

Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, welcher eine planare Geometrie besitzt, die es ihm ermöglicht, sich zwischen die Basenpaare der DNA-Helix einzulagern (interkalieren) (Abb. 5.2.8). Dadurch bildet sich ein Komplex, der eine viel höhere Fluoreszenzintensität als die freie Substanz aufweist.<sup>[134]</sup> In Gegenwart anderer Liganden kann EtBr kompetitiv aus diesem Komplex verdrängt werden. Die Substanzkonzentration, die zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität um 50% führt, wird als  $C_{50}$  definiert und ist indirekt proportional zur Bindungskonstante der untersuchten Substanz. Kleinere  $C_{50}$ -Werte weisen auf eine höhere DNA-Affinität hin.<sup>[135]</sup> Die absolute Konzentration wird oft auch in N/P-Verhältnis umgerechnet, in diesem Fall wird  $CE_{50}$  (charge excess) anstatt  $C_{50}$  ermittelt.<sup>[136]</sup> Dazu stellt man Lösungen mit verschiedenen N/P-Verhältnissen her und nimmt die Fluoreszenzspektren der jeweiligen Mischungen auf (Abb. 5.2.9). Dabei wird das Absorptionsmaximum der reinen EtBr-Lösung als 0 definiert, das der Ethidiumbromid/DNA-Lösung als 100. Trägt man die relativen Werte der Absorptionsmaxima gegen die jeweiligen N/P-Verhältnisse auf, entsteht

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogelee

eine Kurve, an der dasjenige N/P-Verhältnis abgelesen werden kann, bei dem die 50%ige Intensität der EtBr/DNA-Lösung erreicht wäre (Abb. 5.2.8), dieser Wert wird als  $CE_{50}$  bezeichnet.



**Abb. 5.2.8:** EtBr und deren Interkalation in DNA.

In Tabellen 5.4 und 5.5 sind die Messdaten des EtBr-Verdrängungs-Assays aufgeführt, die mit 16%igen und 88%igen nPG-Amine durchgeführt wurden. Deren graphische Auftragungen sowie die daraus ermittelten  $CE_{50}$ -Werte sind in den Abb. 5.2.9 und 5.2.10 zu sehen.

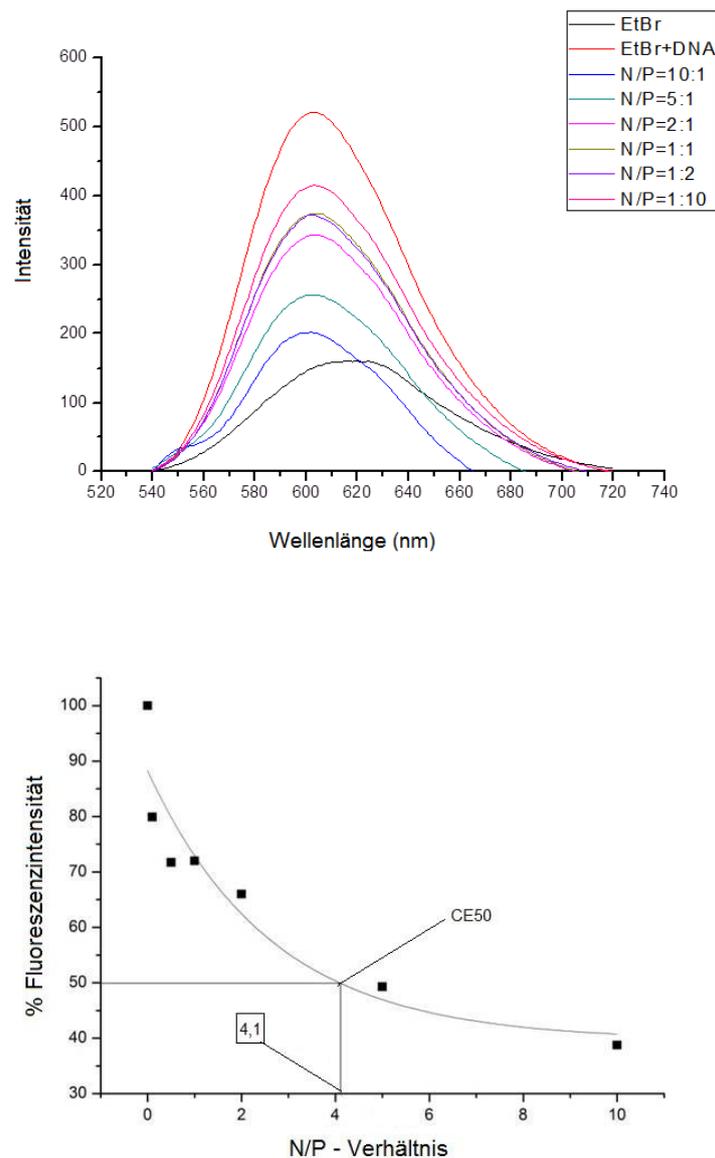
**Tab. 5.4:** Messdaten des EtBr-Verdrängungs-Assays mit 16%igem nPG-Amin.

N/P- Verhältnis	Absorptionsmaximum	% Fluoreszenzintensität
0 (EtBr+DNA)	520.3	100
0.1	415.5	79.9
0.5	373.4	71.7
1	374.6	72
2	343.4	66
5	256.4	49.3
10	201.7	38.8
EtBr	160.0	0

## 5. Modifikationen der Polyether Nanogelee

Aus den unten aufgeführten Daten erkennt man, dass der  $CE_{50}$ -Wert des 16%igen nPG-Amins zwischen 2 und 5 liegen muss, mit einem N/P-Verhältnis von 10 wird die ursprüngliche Intensität um 70% verringert.

An der graphischen Auftragung in Abb. 5.2.9 kann man ablesen, dass die Fluoreszenzintensität bei einem N/P-Überschuss von 4.1 auf 50% reduziert wird. Damit liegt der  $CE_{50}$ -Wert des 16%igen nPG-Amins zwar unter denen der meisten literaturbekannten Oligoaminen wie Spermidin ( $CE_{50} = 15$ ) und Spermin ( $CE_{50} = 5.8$ ), jedoch über dem von PG-geträgerten Amin (0.1) bzw. Oligoamine (0.6-1.6).<sup>[97]</sup>



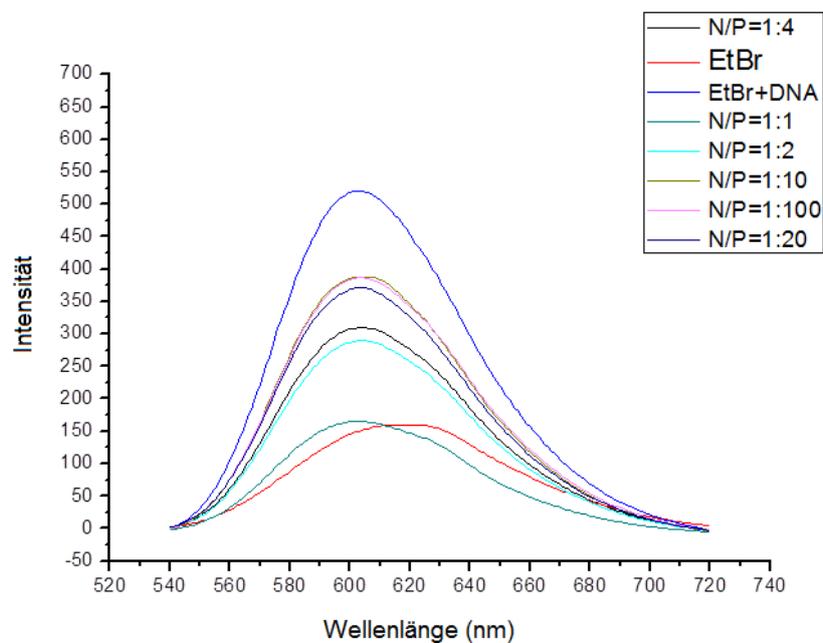
**Abb. 5.2.9:** (oben): Fluoreszenzspektren von nPG-Amin/EtBr/DNA-Lösungen verschiedener N/P-Verhältnisse, (unten): Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die jeweiligen N/P-Verhältnisse. der  $CE_{50}$ -Wert liegt bei 4.1

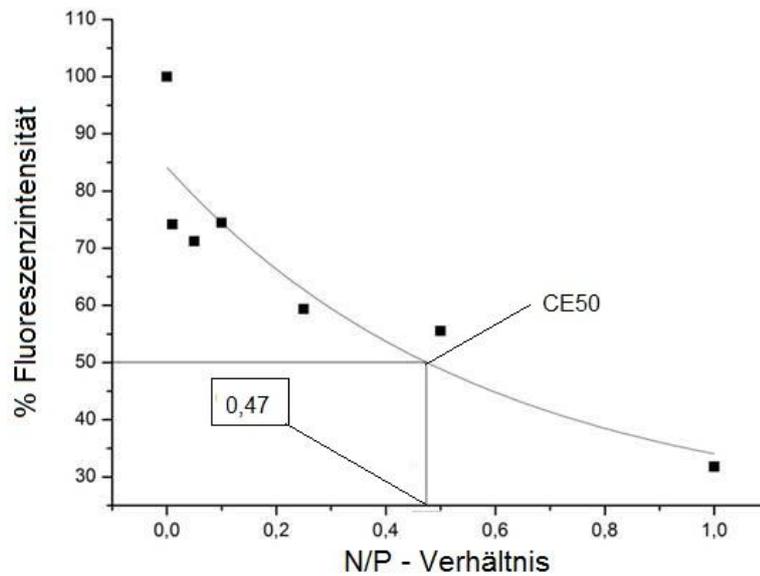
## 5. Modifikationen der Polyether Nanogelee

Die Ergebnisse aus dem Experiment mit dem 88%igen nPG-Amin befinden sich in einer ganz anderen Größenordnung. Wie man der Tabelle 5.5 sowie Abb. 5.2.8 entnehmen kann, wird die ursprüngliche Fluoreszenzintensität bereits bei einem N/P- Verhältnis von 1 auf ca. 30% gesenkt, somit liegt der  $CE_{50}$ -Wert des hochbeladenen nPG-Amins bei 0.47.

**Tab. 5.5:** Messdaten des EtBr-Verdrängungs-Assays mit 88%igem nPG-Amin.

N/P- Verhältnis	Absorbtionsmaximum	% Fluoreszenzintensität
0 (EtBr+DNA)	521.2	100
0.01	386.7	74.2
0.05	371.1	71.2
0.1	388.2	74.5
0.25	309.5	59.4
0.5	289.4	55.5
1	165.6	31.8
EthBr	160.0	0





**Abb. 5.2.10:** (oben): Fluoreszenzspektren von nPG-Amin/EtBr/DNA-Lösungen verschiedener N/P-Verhältnisse, (unten): Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die jeweiligen N/P-Verhältnisse. der  $CE_{50}$ -Wert liegt bei 0.47.

Es ist beachtlich, dass die DNA-Bindungsaffinität des höher geladenen Nanogels um fast das 10-fache höher ist als die des niedriggeladenen. Offensichtlich ist dieser Effekt nicht durch die absolute Menge der Aminfunktionen zu erklären. Unter dem Aspekt der Multivalenz jedoch, spielt die Beladung eine wichtige Rolle.

Insbesondere in biologischen Prozessen und in der Natur ist es seit langem bekannt, dass die Bindungsstärke zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor mit steigender Anzahl der Bindungsstellen drastisch erhöht wird.<sup>[137-140]</sup>

In Fall der nPG-Amine also, bietet das höher beladene Gel die Möglichkeit zur höhervalenten Komplexen mit DNA. Wegen des geringen entropischen Aufwandes und der sterischen Stabilität aufgrund ihrer Größe kommt es zu einem effizienten Abschirmen von DNA.<sup>[141, 142]</sup> so dass die Interkalation von EtBr stärker verhindert wird.

Dieser Effekt erklärt auch die in Abschnitt 5.1.2.1 erwähnte niedrige Transfektion. Die starke Affinität des Nanogelträgers zu DNA lässt vermuten, dass die DNA nicht freigesetzt werden kann, was zu einer geringen Transfektionseffizienz führte.

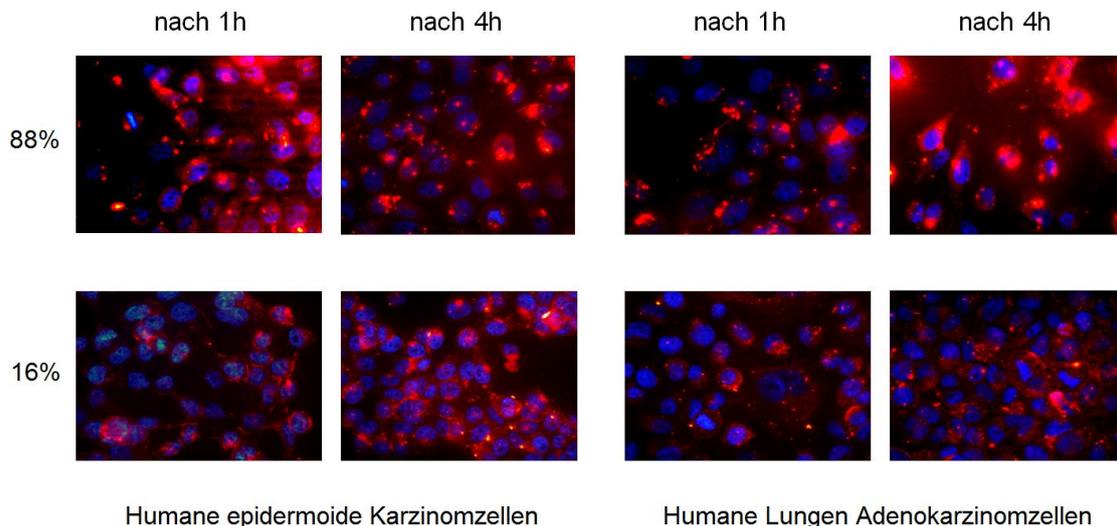
Bei den oben beschriebenen Experimenten konnte die Verdrängung des EtBr durch die nPG-Amine festgestellt werden, damit ist es erwiesen, dass die vorher gemessene Erhöhung des  $\zeta$ -Potentials tatsächlich durch Komplexierung der nPG-Amine mit den DNA-Strängen zustande gekommen ist.

### 5.2.3. Zellaufnahme

Als ein weiterer Schritt der Studien wurde anhand einer Fluorescence Activated Cell Sorting-Messung das Zellaufnahmeverhalten der nPG-Amine untersucht. Diese Tests wurden von der Firma Mivenion durchgeführt.

Dazu wurden die Amin-funktionalisierten Nanogelee mit dem Farbstoff Rhodamin-B-Isothiocyanat (RITC) angefärbt. Die Nanogelee wurden in PBS-Puffer gelöst und unter physiologischen Bedingungen mit zwei verschiedenen Zelllinien inkubiert. Nach 1 h bzw. 4 h wurden die Zellen sowie die angefärbten Gelee durch Laserlicht angeregt und detektiert. Anhand der Platzierung von markierten Nanogelee kann man ihre Aufnahme in die Zelle beobachten.

In Abb. 5.2.11 sieht man neben den blau fluoreszierenden Zellen auch die rot angefärbten Gelee. In beiden Fällen wurden die Gelee von den Zellen aufgenommen. Das niedrig beladene Gel zeigt eine gleichmäßige Verteilung, während das hoch beladene Gel zum Teil als Flecken zu sehen sind. Dies liegt an der unterschiedlichen Löslichkeit der beiden Gelee in PBS-Puffer. Aufgrund der höheren Aminfunktionalisierung neigt das Gel nach längerer Zeit dazu, Aggregate zu bilden, die schwer löslich werden und deshalb nicht gleichmäßig verteilt sind.



**Abb. 5.2.11:** Zellaufnahmetest zweier Zelllinien von zwei nPG-Amine mit jeweils 88% bzw. 16% Aminbeladung.

### 5.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Im Abschnitt 5.2 wurde die Aminfunktionalisierung der PG-Nanogele sowie eine Reihe biochemische Tests beschrieben. Verschiedene Aminbeladung können über mehrere Synthesestrategien gezielt angebracht werden.

Die hoch- und niedrigbeladene nPG-Amine unterscheiden sich nicht nur in der möglichen Syntheseroute, sondern vor allem in ihren biochemischen Daten, die in Tab. 5.6 noch mal zusammengefasst sind.

**Tab. 5.6:** Vergleich der biochemischen Daten zweier nPG-Amine.

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Transfektions -effizienz	Zeta-Potential (mV)	CE <sub>50</sub> (N/P)	Zellaufnahme
nPG-Amin 78%	12.6	Keine	-----	-----	-----
nPG-Amin 88%	-----	-----	0.887	0.47	Positiv, Aggregate
nPG-Amin 16%	-----	-----	-0.178	4.1	Positiv, gut gelöst

Mit dieser Testreihe sollte nPG-Amin als Trägermittel für DNA-Transfektion untersucht werden.

In Zytotoxizitäts- und Transfektionstest wies das hochbeladene nPG-Amin 78% mit fehlender Transfektion und höherer Toxizität keinen Vorteil im Vergleich zu PG-Amin auf. Immerhin zeigte es eine niedrigere Toxizität als das PEI.

Da ein Transfektionsprozess aus drei Schritten besteht

- 1) Bildung des Polyplex;
- 2) Zellaufnahme des Polyplex;
- 3) Freigabe der DNA in der Zelle.

gilt es nun zu untersuchen, welcher der drei Schritten maßgebend für das negative Ergebnis ist, dafür wurden weitere Tests mit einem niedrigbeladenen nPG-Amin 16% und einem hochbeladenen nPG-Amin 88% durchgeführt. Die ζ-Potential der beiden reinen Gelen liegen nahe bei 0. Erst nach der Komplexierung mit DNA wurde der Unterschied deutlicher (siehe Tab. 5.3 bzw. Abb. 5.2.7). Im Vergleich zu hochbeladenem nPG-Amin zeigen die Polyplexe aus DNA und nPG-Amin 16% leicht positive Werte und lässt somit eine weniger stabilen Komplex vermuten, der eine Transfektion begünstigen würde.

Auch die CE<sub>50</sub>-Werte, die durch ein EtBr-Assay ermittelt wurden, bestätigen den erheblichen Unterschied der Bindungsaffinitäten unterschiedlich beladener Nanogele. Hier spielt der Effekt von Multivalenz eine wichtige Rolle. Die fünffach höhere Beladung verursacht eine

starke Verringerung des  $CE_{50}$ -Wertes um das 8.7-Fache. Damit weist das hochbeladene nPG-Amin eine höhere Bindungsaffinität als die meisten PG-geträgerten Oligoamine auf. Die laut Literatur bei 0.6-1.6 liegen (PG-Spermidin, PG-Spermin und PG-PEHA), Jedoch ist PG-Amin von 0.1 immer noch nicht zu unterbieten. Auch der vergleichsweise hohe Wert von nPG-Amin 16% von 4,1 ist immer noch deutlich niedriger als die der nicht geträgerten Oligoamine, die oft über 10 liegen.<sup>[97]</sup> Beide nPG-Amine sind also in der Lage, stabile Polyplexe mit DNA zu bilden.

Sie erwiesen sich außerdem als Substanzen, die gut von Zellen aufgenommen werden. damit ist eine weitere Voraussetzung für mögliche Transfektion erfüllt.

Somit konnte mit den nPG-Amin 16% und nPG-Amin 88% gezeigt werden, dass weder die Zellpenetration der Gele noch die Komplexierung mit DNA für die geringe Transfektionseffizienz verantwortlich ist.

Da die Transfektions- und Zytotoxizitätstests mit keiner der beiden Proben durchgeführt wurden, lässt sich diese Aussage nur sehr eingeschränkt verallgemeinern. Es kann vermutet werden, dass das nPG-Amin 78%, aufgrund ihrer hohen Beladung, eine vergleichbar starke Affinität zu DNA hat wie das nPG-Amin 88%. So ist es sehr wahrscheinlich, dass die Transfektionsversuche mit nPG-Amin wegen zu hohen Stabilität des Polyplexes negativ ausfiel. Das bedeutet, dass es zwar die DNA in die Zelle bringt, sie jedoch nicht wieder freisetzt. Sollte dies der Grund für das negative Ergebnis der Transfektionversuche sein, so ist es sehr wahrscheinlich, dass das nPG-Amin 88% auch ähnlich niedrige Transfektionseffizienz zeigen wird.

Eine höhere Transfektionseffizienz ist also nicht einfach durch hohe Aminbeladung und großen Partikeldurchmesser zu erreichen.

Aus den Ergebnissen der  $\zeta$ -Potential-Messungen und dem Ethidiumbromid-Assay ergab sich, dass das niedrigbeladene nPG-Amin 16% als vielversprechende Alternative zu dem vorher getesteten nPG-Amin 78% darstellt, mit der geringen Amindichte hat es auch gute Chancen, eine niedrigere Zytotoxizität zu erzielen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden untersucht, um hochmolekulare biokompatible Polymerpartikel auf Glycerinbasis zu synthetisieren.

Über die basenkatalysierte Polykondensation von Glycerin im Mikrowellenreaktor konnten hauptsächlich Pentamere bzw. Hexamere gewonnen werden. Der höchste erreichte Polymerisationsgrad betrug 20. Die Ausbeute betrug  $< 10\%$ .

Die Methode der säurekatalysierten Vernetzung in Miniemulsion erwies sich als erfolgreich und konnte etabliert bzw. optimiert werden. Die säurekatalysierte ringöffnende Kondensationsreaktion findet bei  $120\text{ °C}$  in DMSO-Tröpfchen statt, die in Cyclohexan dispergieren und mit Hilfe von einem speziellen Tensid, dem KLE25, stabilisiert werden. Die Ausbeute betrug bis zu  $50\%$ .

Auf diese Weise wurde eine Reihe von neuartigen biokompatiblen Nanogelen auf Glycerinbasis synthetisiert, als Monomere dienten außerdem Ethylenglykol, GTGE, EDGE, DGE, Di- und Triglycerin, sowie langkettige PEGs. Die angestrebten für biomedizinische Anwendungen relevanten Größen von  $100\text{-}200\text{ nm}$  wurden mit relativ enger Verteilung ( $\text{PDI} < 1.3$  in der DLS) erreicht. Die chemischen und mechanischen Eigenschaften der Nanogele wurden ebenfalls untersucht.

Die erhaltenen Nanogele weisen interessante Eigenschaften auf und sind vielversprechend für diverse Anwendungen. So besitzen die Nanogelpartikel mit Durchmesser von  $\sim 100\text{ nm}$  zum Teil sehr niedrige intrinsische Viskositäten von bis zu  $1.6\text{ mL/g}$ , was für die biomedizinische Anwendungen einen wichtigen Aspekt darstellt. Die ersten biomedizinischen Tests zeigen, dass die aminbeladene nPGs als nicht viralen Genvektoren durchaus geeignet sind. Diese Nanogele können gut in die Zellen diffundieren und gehen mit plasmid-DNA auch multivalenten Wechselwirkungen ein, bezüglich Transfektionseffizienz besteht dabei jedoch noch Verbesserungspotenzial.

Die kompakten nPGs mit Verzweigungsgrad bis zu  $63\%$  sind einerseits als vernetzte HPGs zu betrachten, andererseits besitzen sie aber auch typische Eigenschaften von Hydrogelen, wie z. B. einen hohen Quellungsgrad.

Die gelähnlichen Eigenschaften sind bei den mikroporösen PEG-PG Nanogelen besonders ausgeprägt, die aus langkettigen PEGs bestehen. So quellen sie in verschiedenen Lösungsmittelgemischen unterschiedlich auf, teilweise ändern sich die Partikeldurchmesser um das sechs-fache. Auch die Härte der Partikeln ist abhängig von dem PEG-Anteil des Netzwerks.

Durch diese Arbeit wurde also eine Methode gefunden, biokompatiblen Nanogelpartikel herzustellen, deren chemische sowie mechanische Eigenschaften durch geeignete Wahl der Bausteine gezielt eingestellt werden können.

Bei dem Polyglycerinnanogel wurde der Multivalenzeffekt bei der DNA-Komplexierung bereits deutlich bewiesen. Eine Untersuchung über die Bindung zwischen Sialinsäure-funktionalisierten Goldnanopartikel und Influenzaviren zeigte jedoch, dass sphärische multivalente Nanopartikel für flächige polyvalente Wechselwirkung nicht geeignet sind. Aufgrund ihrer ungünstigen Form kann ein solches Nanopartikel nur wenige effektive Bindungen zu einem Virus aufbauen.<sup>[143, 144]</sup> Auch die nPGs mit ihrem kompakten Netzwerk können ähnliche Probleme haben. Dagegen sind die in Kapitel 5.1 beschriebene flexiblen PEG-PG-Nanogele im Vorteil. Mit seinem flexiblen Netzwerk hat ein PEG-PG-Nanogel die Möglichkeit, sich der Form des Bindungspartners anzupassen und somit den Multivalenzeffekt zusätzlich zu verstärken. Die PEG-PG-Nanogele haben also auch große Potentiale, als Transfektionsträger zu wirken. Effektiveres Ausnutzen der vorhandenen Bindungsmöglichkeiten würde den Bedarf an Oberflächenbeladung reduzieren, was die Toxizität des Trägers senken würde. Die lösungsmittelabhängige Quellbarkeit kann ausgenutzt werden, um die Partikelgrößen unter physiologischer Bedingung nach Bedarf einzustellen. Auch die Härte und die Flexibilität der Nanogelpartikeln sind über die PEG-Anteile im Netzwerk einstellbar. (vgl. Kapitel 5.1.2 und 5.1.3)

Die flexiblen PEG-PG Nanogele können außerdem als Nanokontainer verwendet werden. Ihre hohe Quellbarkeit und die offene Netzstruktur bietet die Möglichkeit, anderen Partikeln einzukapseln. Dies kann ausgenutzt werden, um hydrophobe Partikel in hydrophile Medien zu transportieren. Ähnliche Ansätze wurden bereits mit Hydrogelen wie Agarose durchgeführt.<sup>[123]</sup> Wegen ihres variablen Quellungsvermögens in unterschiedlichen Lösungsmitteln kann das Gel bei Schrumpfen in einem Lösungsmittel hydrophoben Quantumdots in sich einschließen, beim Lösen des Gels im Wasser erhielt man eine homogene Dispersion der hydrophoben Quantumdots im Wasser.

Des Weiteren können sowohl die nPGs als auch die PEG-PG-Nanogele als Bausteine zu noch größeren Strukturen vernetzt werden. Analog zu zuletzt veröffentlichten Mikrogelsynthesen, in der HPG zu Mikrogelen vernetzt wurde,<sup>[145]</sup> können auch diese Nanogele dafür eingesetzt werden. Es ist zu erwarten, dass daraus hergestellte Mikrogele sowohl makroporös als auch mikroporös sind, was ganz neue Möglichkeiten eröffnen würde.

Generell ist es nun möglich, maßgeschneiderte PEG-PG-Nanogele mit unterschiedlicher Größe und Elastizität gezielt herzustellen.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Angaben

#### 7.1.1 Analytische Methoden

$^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden an den Spektrometern AC 250, ADVANCE III 500 sowie am ADVANCE III 700 der Firma Bruker aufgenommen.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden durch vollständige Proton-Entkopplung (decoupling), bzw. durch 'inverse gated' Proton-Entkopplung (Entkopplung nur während der FIDs) erhalten. Als interner Standard diente das Signal von Deutero-Methanol ( $^1\text{H}$ : = 3,31 ppm,  $^{13}\text{C}$ : = 49,00 ppm) bzw. Deutero-Chloroform ( $^1\text{H}$ : = 7,26 ppm,  $^{13}\text{C}$ : = 77,16 ppm). In der Regel wurden Substanzmengen von 50-100 mg verwendet. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen und mit dem Programm MestReC von MestReLab bearbeitet. Massenspektren wurden auf einem Varian CH7A (EI), einem Varian CH5-DF (FAB) oder einem Agilent G1969A LC/MSD TOF (TOF) aufgenommen. MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight)-Massenspektren wurden mit einem UltraflexTOF Massenspektrometer aufgenommen. Die Ionen wurden zu 25 kV angeregt und dabei sowohl linearen als auch im reflektiven Modus des Spektrometers gemessen. Als Matrix diente hierbei  $\alpha$ -Cyanohydroxymizsäure (HCCA).

#### 7.1.2. Chromatographie

Dünnschichtchromatographische (DC) Analyse wurde auf Merck Aluminiumfolien mit Silica (Korngröße 60) und Fluoreszenzmarker (F254) durchgeführt. Säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (0.040 0.063 nm) der Firma Merck durchgeführt.

Die präparative Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie wurde mit einer Nucleosil 50-5 (ID 32x240mm) Säule durchgeführt.

Messungen zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung erfolgten auf einem Agilent 1100 System der Firma PSS mit SUPREMA (Modifiziertes Acrylatcopolymer-Netzwerk, 10  $\mu\text{m}$ , Porosität von 100 bis 1000  $\text{Å}$ ) Säulen und 0.05%  $\text{NaN}_3$ -Lsg. als Eluent. Die Messungen wurden jeweils bei 25°C durchgeführt. Zur Detektion wurde ein RI (refractive Index)-Detektor verwendet. Die Polymerkonzentration betrug etwa 1 mg/ml. Die Messungen wurden an Probenlösungen der Konzentration 1g/L durchgeführt. PG-Standards (2kDa, 5kDa, 10kD) dienten zur Kalibrierung.

### **7.1.3. Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zeta( $\zeta$ )-Potentialmessung**

Alle dynamischen Lichtstreuungsexperimente sowie Zeta-Potenzial-Messungen wurden mit dem Zetasizer-Nano der Firma Malvern (Malvern Instruments Ltd. U.K.) durchgeführt. Verwendet wurde ein 4 mW He-Ne Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm und einem Detektionswinkel von 173°. Die Messungen einfacher Partikelgrößen wurden bei 25 °C im Millipor Wasser präpariert und durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  Polyethersulfonfilter filtriert. Die Polyplexe wurden im HEPES-Puffer gemessen.

### **7.1.4. Fluoreszenzspektroskopie**

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Spectrometer FP-6500 der Firma Jaco gemessen. Dabei wurde die Probe jeweils bei einer Wellenlänge von 546 nm angeregt und die Emission in einem Wellenlängenbereich von 560 bis 700 nm gemessen.

### **7.1.5. Kryo-Transelectronenmikroskopie (Kryo-TEM)**

Die KryoTEM-Aufnahmen wurden mit einem FEI Tecnai F20 (FEI Company, Oregon) bei einer Spannung von 100 kV aufgenommen. Zur Negativkontrastierung wurde Uranylacetat eingesetzt.

### **7.1.6 Rasterkraftmikroskopie (SFM)**

Die SFM- sowie die Young's Modulus Messung wurden in der Arbeitsgruppe von Klitzing von Marcel Richter an der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

SFM-Messungen wurden mit einem JPK Nano Wizard II von der Firma JPK Instruments AG (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Für die Aufnahme wurde der intermittierende Modus verwendet. Sowohl die Bildgebung als auch die Messungen wurden in Lösung in elektrochemischen Zellen, sogenannten ECCells von JPK, durchgeführt, dafür wurde ein unbeschichteter Siliziumbalken CSC38 von Micromash (Micromasch, Tallinn, Estonia) als Sonde verwendet. Um die Auslenkung des Cantilevers zu bestimmen wurde der Cantilever zunächst auf einer sauberen und harten Oberfläche kalibriert. Die Kalibrierung wurde über die JPK SFM-Software durchgeführt. Alle Nanogelee wurden mittels Rotationsbeschichtung (Spin-Coating, SCS P6700, SCS Spincoater, Indianapolis, USA) auf eine Gold-beschichtete Silizium-Oblate (Wafer, Georg Albert PVG-Beschichtung) aufgetragen, dabei erfolgte die Beschichtung bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 300 Sekunden.

### 7.1.7 Young's Modulus Messung

Alle Messungen in Flüssigkeiten wurden auf einer unbeschichteten Siliziumbalken CSC38 durchgeführt. Der Ausleger wurde auf eine saubere, harte Oberfläche kalibriert. Die Kalibrierung wurde mithilfe von JPK SFM-Software durchgeführt. Der Young's Modulus wurde mit einem eigens entwickelten Verfahren von Igor Pro Software-Paket (Wavemetrics, Inc., USA) berechnet. Für jede Probe wurden Kraftkurven von mindestens drei verschiedene Partikel aufgenommen. Der Young-Modul E wurde mit einem von Hertz Dimitriadis eingeführten Modell berechnet.

### 7.1.8 Viskositätsbestimmung

Die Bestimmung der intrinsischen Viskosität erfolgte mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters.<sup>[146]</sup> (Schott)

### 7.1.9 DNA Präparation.

Die DNA-Einzelstränge mussten für die jeweiligen Studien jeweils frisch hybridisiert werden. Dazu mussten jeweils gleiche Mengen der Einzelstränge eingewogen werden, im Puffer gelöst (HEPES-Puffer (1L): 0.476 mg (2 mmol) HEPES, 3.722 mg (10 pmol) EDTA und 0,5492 g (9.4 mmol) NaCl, pH=7.2) werden, miteinander gemischt werden und zur Hybridisierung 1 min. auf 90°C und anschließend 60 min bei 37°C und 1200 rpm geschüttelt. Die DNA (Luciferase)- hat folgende Sequenz 5'-GAUUAUGUCCGGUUAUGUAUU-3'. Die DNA Stränge wurden von Operon Biotechnologies GmbH bezogen.

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Bestimmung der intrinsischen Viskosität

Die Bestimmung der intrinsischen Viskosität erfolgte mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters.<sup>[146]</sup> Aus einer Stammlösung des jeweiligen Nanogels wurde eine Verdünnungsreihe aus mindestens fünf Lösungen verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Die Zeit, die jede Lösung braucht, um einen definierten Differenz zu durchfließen wurde gemessen und gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Daraus erhält man

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [\eta_{sp} / c]$$

### 7.2.2 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Die Ethidiumbromid-Verdrängungsassay wurde nach Literaturangaben durchgeführt<sup>[138, 147]</sup> Fluoreszenz-Spektroskopie Messungen wurden an einem JASCO FP-6500 Spektrofluorometer aufgenommen. Die Proben wurden mit bei 546 nm angeregt und die Emission lag zwischen 560 und 700 nm. 1000 mL Puffer wurde aus 0.476 mg (2 mmol) HEPES, 3.722 mg (10 pmol) EDTA und 0.5492 g (9.4 mmol) NaCl hergestellt und der pH wurde auf 7.2 eingestellt. Um eine Ethidiumbromid-Konzentration von 1.26  $\mu\text{M}$  zu erhalten, wurden 0,1242 mg Ethidiumbromid in 50 mL Puffer gelöst. Zur Vorbereitung von 100 ml, 5  $\mu\text{M}$  DNA-Lösung wurden 0.07625 mg DNA-Strang gewogen und wie oben beschrieben präpariert. Zunächst wird von den reinen Lösungen Ethidiumbromid und DNA-Lösung (200  $\mu\text{M}$ ), sowie deren Mischung in unterschiedlichem Mischungsverhältnissen die Fluoreszenz gemessen. Die maximale Fluoreszenzdifferenz von reinem EtBr und EtBr/DNA-Lösung wurde als 100% definiert. Schließlich wurde dieses EtBr/DNA-Mischungsverhältnis jeweils im Meßzylinder vorgelegt und mit jeweils unterschiedlichen Mengen, bzw. unterschiedlichem N/P-Verhältnis der Nanogele gemischt und entsprechend mit dem Puffer jeweils auf das gleiche Volumen (5 mL) aufgefüllt. Nach der Zugabe wurde das Gemisch für weiteren 30 min. inkubiert. Zur Kontrolle wurde auch eine Probe gemessen, die nur Ethidiumbromid enthielt, deren Absorptionsmaximum als 0 definiert wurde. Von den jeweiligen Proben wurde jeweils die Fluoreszenz gemessen und die Intensitäten gegen die N/P-Verhältnisse graphisch aufgetragen.

### 7.2.3 Transfektionsversuche

Die Transfektionsversuche im Abs. 7.2.3 sowie die Zytotoxizitätstest im Abs. 7.2.4 wurden in Kooperation mit Markus Hellmund in der Arbeitsgruppe Kissel an der Phillips-Universität Marburg durchgeführt.

Die Transfektionsversuche wurden an SKOV-Luc und CHO-Luc-Zellen (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h vor den Experimenten in einer Dichte von 15,000 Zellen/Well (48-Well-Zellkultur Platten; Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Die Polyplexe wurden in 10 mM HEPES-Puffer zubereitet und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Polyplexlösungen zu den Zellsuspensionen gegeben und 4h inkubiert. Die Messungen der relativen Licht Einheiten (relative luminescence units RLU) wurden mittels eines Luminometers durchgeführt (Sirius, Berthold, Deutschland)

### 7.2.4 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizitätstests wurden mit CHO-Luc-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h vor den Experimenten in einer Dichte von 8000 Zellen/Well ausgesät (in 96-Well Mikrotiterplatten Nunclon, Nunc, Deutschland). Die Konzentrationen der Proben wurden so gelegt, damit die IC50-Wert erreicht und überschritten wird (die Überlebensrate soll bis 10-20% überlebenden von Blank sein). Die Blanks enthielten 200 µL Vollmedium

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde zu jeder Probe überschüssige MTT zugegeben.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 h wurde das Medium abgesaugt und in DMSO gelöst. Die Messung der Farbintensität erfolgte mittels Plattenleser (Titertek Plus-MS 212, ICN, Deutschland) bei Wellenlängen von 570 und 690 nm.

### 7.3 Chemikalien und Geräte

Die Mikrowellen-Reaktionen wurden in einem Mikrowellenreaktor von dem Hersteller Plazmatronika vom Typ RM- DA4 durchgeführt.

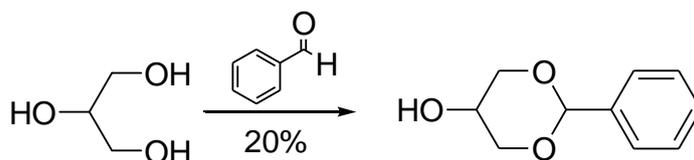
Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Acros, Sigma-Aldrich, Fluka, Raschig und Solvay bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Tensid KLE25 wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Helmut Schlaad bereitgestellt.

**Lösungsmittel:** Toluol, DMSO, Cyclohexan, DMF, THF, Pyridin, Methanol, Diethylether, Milliporewasser. Die Lösungsmittel hatten p.a. Qualität. Trockene Lösungsmittel wurden aus einer MB SPS-800 Lösungsmittelanlage der Firma MBraun entnommen. Es wurde demineralisiertes Wasser aus einer Entmineralisierungsanlage der Firma Millipore/Advantage verwendet.

## 7.4 Synthesen

### 7.4.1 Synthesen niedermolekularer Verbindungen

#### 7.4.1.1 Darstellung von 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol<sup>[148]</sup>



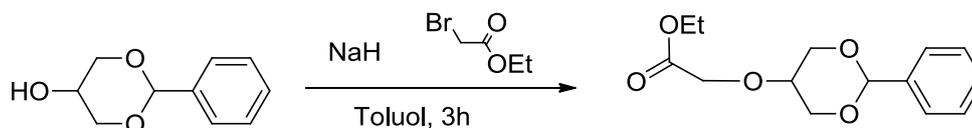
26.1g (246 mmol, 1 Äq) Benzaldehyd und 22.5g (245 mmol, 1Äq) Glycerin wurden zusammen in einen 250 mL- Einhalskolben gegeben. Es wurden 3 Tropfen konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugetropft.

Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch unter vermindertem Druck solange erhitzt ( $T = 45\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$ ) bis die milchige Reaktionsmischung klar wurde. Nach dem Abkühlen auf RT wurde noch 1 h weiter gerührt. Anschließend wurde die Mischung zunächst mit 100 mL Diethylether, dann mit 10%iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und schließlich mit ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg.extrahiert. Die org. Phase wurde vereinigt und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Mit jeweils 50 mL abs. Diethylether wurde das Produkt zweimal im Gefrierschrank umkristallisiert.

Man erhält 9.2 g farblose Kristalle, was einer Ausbeute von 21% entspricht.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = .3.68-3.50(m, 1H, -CH-OH); 4.34-3.95(m, 4H, -CHOH); 5.93; 5.81; 5.53; 5.37 (s, 1H, - $\text{C}_6\text{H}_5$ ); 7.51-7.35 (m, 5H, arom.);

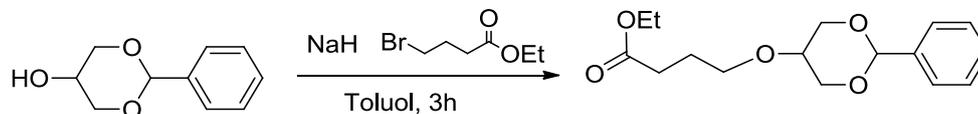
$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 61.2; 62.73; 63.31; 64.03; 66.85; 67.02; 71.77; 72.31; 76.89; 77.52; 101.00; 101.67; 103.86; 104.39; 126.00; 126.22; 126.49; 126.70; 128.40; 128.49; 128.54; 129.07; 129.18; 129.37; 129.64; 129.86; 134.60; 137.15; 137.67;137.94

7.4.1.2 Herstellung von Ethyl 2-(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yloxy)acetat<sup>[112]</sup>

6 g (33,4 mmol) 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol wurden in 100 ml abs. Toluol gelöst. 1.4 g 60%ige NaH wurden unter Schutzgas-Atmosphäre und Eiskühlung portionsweise zugegeben. Nachdem das NaH abreagiert war, wurden 6.05g (49 mmol, 1,5 Äq ) 3-Bromessigsäureethylester langsam zugetropft. Im auftauenden Bad wurde das Gemisch 3 h weitergerührt. Nach Ende der Reaktion verdünnte man die Lösung mit weiteren 100 mL Toluol und quenchte die Reaktion mit 50 mL Eiswasser. Die org. Phase wurde abgetrennt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte mittels einer Vakuumdestillation bei 2 Torr und 190°C-194°C. Man erhielt 6,5 g Produkt, dies entsprach einer Ausbeute von 73,2%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ (ppm) = 1.26 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>, J = 7.2); 3.49 (t, 1H, -CH<sub>2</sub>-O, J = 1.6); 4.04 (dd, 2H, -CH-O, J<sup>α</sup> = 2, J<sup>β</sup> = 10.8 ); 4.19(q, 2H, -CH<sub>3</sub>, J = 7.2); 4.27 (s, 1H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 4.38 (dd, 2H, -CH-O, J<sup>α</sup> = 2, J<sup>β</sup> = 10,8); 7.32-7.49 (m, 5H, arom.);

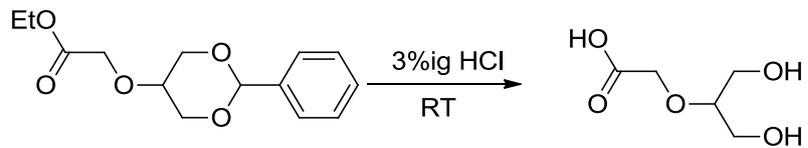
<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.27; 60.98; 65.94; 69.07; 70.74; 76.90; 77.21; 77.54; 101.25; 126.21; 128.25; 128.98; 138.08; 170.69.

7.4.1.3 Herstellung von Ethyl 4-(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yloxy)butanoat<sup>[112]</sup>

6 g (33,4 mmol) 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol wurde in 100 ml abs. Toluol gelöst. 1,4 g 60%ige NaH wurde unter Schutzgas-Atmosphäre und Eiskühlung portionweise zugegeben. Nachdem das NaH abreagiert war, wurden 6,05g (49 mmol, 1,5äq ) 4-Brombutylsäureethylester langsam zugetropft. Im auftauenden Bad wurde das Gemisch 3h weitergerührt. Nach Ende der Reaktion verdünnte man die Lösung mit weiteren 100 mL Toluol und quenchte die Reaktion mit 50 mL Eiswasser. Die org. Phase wurde abgetrennt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, mit einem Laufmittel Hexan/Ethylacetat 3:1.

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.27 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>, J = 7.2); 1.97 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.34 (t, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J = 7.2); 3.10 (m, 1H); 3.39 (t, 1H, -CH<sub>2</sub>-O, J = 7.4); 4.04 - 4.19(m, 4H) 6.01 (s, 1H, -O-CH-O-); 7.36-7.49 (m, 5H, arom.);

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.37; 25.32; 27.82; 60.33; 66.49; 68.11;78.31; 106.78; 124.38;126.44; 136.49; 170.56.

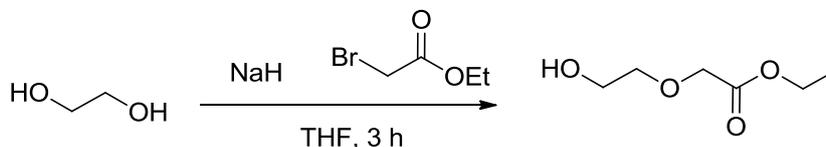
**7.4.1.4 Darstellung von 2-((1,3-dihydroxypropan-2-yl)oxy)essigsäure**

3g Ethyl 2-(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yloxy)acetat wurden in 10 ml Ethanol gelöst und mit 10 ml 3%iger HCl versetzt. Unter RT wurde das Gemisch 24h gerührt, bis die Umsetzung vollständig war. Mit 10 mL Diethylether wurde das Nebenprodukt herausextrahiert und verworfen. Das Ethanol/Wasser-Gemisch wurde an Rotationsverdampfer entfernt, um das Produkt zu erhalten. Es wurde 1.7g erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 93%.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.56-3.65 (m, 5H, -OH, - $\text{OCH}_2$ ); 4.29 (s, 2H, -COOH);

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 63.25; 64.74; 68.90; 87.70; 174.74;

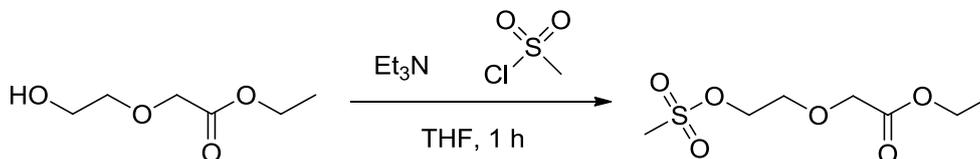
ESI-MS: 149.0471 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (berechnet: 149.0444)

7.4.1.5 Ethyl 2-(2-hydroxyethoxy) acetat<sup>[149]</sup>

14.9 g (240.0 mmol, 4 Äq.,) Ethylenglycol durch 1.38 g (60 mmol, 1 Äq.,) Natrium aktiviert. Dieses wurde in 3 Portionen über 24 h zugegeben. Nachdem das Natrium abreagiert war, wurde 9.9 g (60 mmol, 1 Äq.) Bromethylacetat zugetropft. Durch Dünnschichtchromatographie wurde das Reaktionsende nach 5 h festgestellt. Anschließend wurde die Lösung in 200 mL Chloroform extrahiert und mit dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt. Dabei erhielt man 675.5 mg des Reinstoffes. Das entspricht einer Ausbeute von 11 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.25 (t, 3 H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, J = 7.2 Hz, 1H); 3.68 (m, 4 H, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 4.10 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-C(O)); 4.19 (q, 3 H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J = 7.1 Hz),

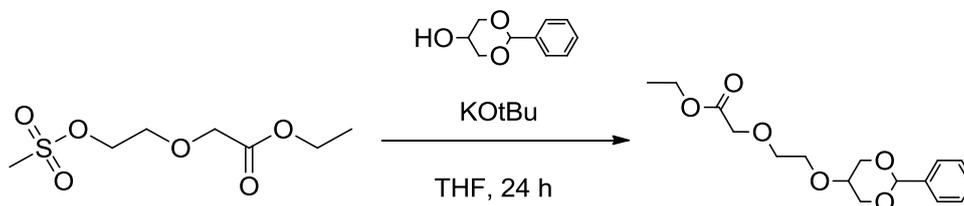
<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 13.74; 60.65, 67.01; 65.43; 70.17; 166.84

7.4.1.6. Ethyl 2-(2-(methylsulfonyloxy) ethoxy) acetat<sup>[149]</sup>

675.5 mg (4.56 mmol, 1 Äq.) von Ethyl 2-(2-hydroxyethoxy)acetat wurden in einem 250 mL Zweihalskolben in 100 mL abs. THF gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre wurden 969.9 mg (29.58 mmol, 1 Äq.) Triethylamin hinzugegeben. Anschließend wurden unter Eiskühlung 575.1 mg (1.1 Äq., 5.02 mmol) Methansulfonylchlorid zum Reaktionsgemisch zugetropft. Die Lösung wurde eine Stunde unter Raumtemperatur gerührt. Zuletzt wurde in 100 mL Ethylacetat gequenchet und mit BRINE-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das entstandene braune Öl hatte eine Masse von 862.8 mg. Das entspricht einer Ausbeute von 83.8 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.27 (t, 3 H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, J = 7.2 Hz, 1H); 3.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S); 3.84 – 3.82 (m, 4 H, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 4.13 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-C(O)); 4.21 (q, 3 H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, J = 7.1 Hz); 4.42 – 4.40 (m, 1H).

## 7.4.1.7. Ethyl 2-(2-(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yloxy) ethoxy) acetat

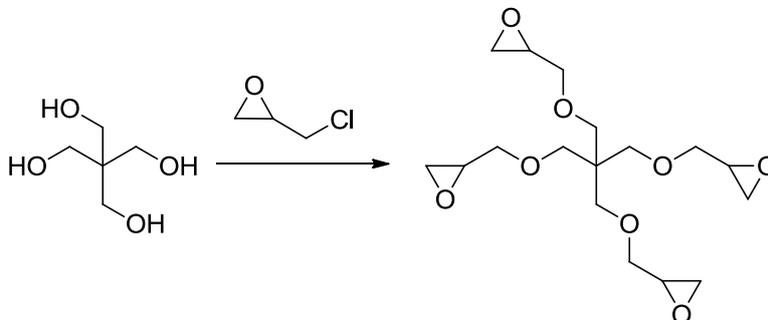


In einem 25 mL Schlenkkolben wurden 45.8 mg (0,25 mmol, 1 Äq.) von 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol in 20 mL abs. THF gelöst. Das Edukt wurde durch 28.52 mg (0.25 mmol, 1 Äq.) Kaliumtert-butanolat aktiviert. Dabei färbte sich die Lösung gelb. Anschließend wurden 115.1 mg (2 Äq., 0,5 mmol) von Ethyl 2-(2-(methylsulfonyloxy) ethoxy) acetat zugetropft. Unter Rückfluss wurde das Substanzgemisch 24 h bei 70 °C gerührt. Die bräunliche Lösung wurde in dest. Wasser gequenchet. Nach dem entfernen des THF wurde das Öl-Wasser Gemisch in Ethylacetat extrahiert und mit BRINE-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Bei dem Trocknen am Hochvakuum entstanden gelbliche Kristalle mit einer Masse 45.5 mg, die Ausbeute betrug also 57.5%.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 1.28 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ,  $J = 7$  Hz); 3.07 (m, 1H) 3.62 (s, 4H); 3.79 - 4.21 (m, 4 H,  $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 4.40 (s, 2 H,  $\text{O-CH}_2\text{-C(O)}$ ), 5.55 (s, 1H,  $\text{O-CH-O}$ ), 7.25 - 7.43 (m, arom.);

$^{13}\text{C}$ -NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 13.9; 61.1; 66.8; 67.2; 68.8; 78.3; 108.5; 126.1; 127.8; 128.1; 135.3; 165.2;

ESI-MS: 311.1476  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (berechnet: 311,1495), 333.1293  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (berechnet: 333.1314), 349.1031  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (berechnet: 349.1053)

**7.4.1.8 Darstellung von Pentaerythritoltetraglycidylether (2,2'-(((2,2-bis((oxiran-2-ylmethoxy)methyl)propane-1,3-diyl)bis(oxy))bis(methylene))bis(oxirane))**

3.4 g (25 mmol, 1 Äq) Pentaerythriol wurden in 30 ml DMSO gelöst und 30 min. lang gerührt. 13.17g KOH (200 mmol, 8 Äq) wurden fein gemörsert und langsam portionsweise zugegeben. Nach der Zugabe wurden 27.6g (300 mmol, 12 Äq) Epichlorhydrin unter Wasserkühlung langsam zugetropft, so dass die Temperatur des Gemisches 20 °C nicht überschreitete. Nach der Zugabe wurde das Wasserbad entfernt und das Gemisch 16 h. bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde indes rötlich braun und ein brauner Niederschlag fiel aus.

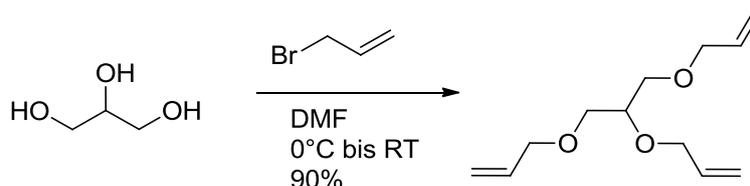
Durch Zugabe von jeweils 200 mL Dichlormethan und Wasser löste sich der Niederschlag auf. Die organische Phase wurde extrahiert und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Dichlormethan wurde bei 75 °C am Rotationsverdampfer entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels einer Kugelrohrdestillation aufgereinigt. Das Produkt wurde bei 250°C unter einem Druck von 5\*10<sup>-2</sup> mbar gesammelt. Es wurde 4.6g erhalten, was einer Ausbeute von 51% entsprach.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 2.73 (t, 4H, J= 4.80 Hz), 3.10 (m, 4H), 3.35 (dd, 4H, J= 6.00, 11.55 Hz), 3.43-3.49 (m, 8H), 3.7 (m, 4H), 2.58 (m, 4H);

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ (ppm) = 41.18; 44.21; 50.85; 70.88; 72.20;

ESI-MS: 383.1725 [M+Na]<sup>+</sup> (berechnet: 383,1682).

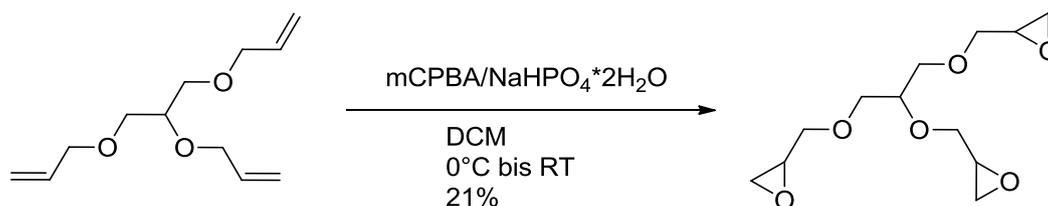
7.4.1.9 Darstellung von 3-((1,3-bis(allyloxy)propan-2-yl)oxy)prop-1-en<sup>[150]</sup>

In 20 mL DMF wurden 0.9 g Glycerin (9.77 mmol) gelöst. Parallel dazu wurden 3.95 g NaH (60 % in Mineralöl, 98.75 mmol, 10 Äq.) mit 40 mL DMF versetzt und 20 Min. gerührt bis eine Suspension entstand. Die Suspension wurde im Eis/Wasserbad auf 0°C gekühlt. Die Glycerin-DMF-Lösung wurde langsam zugetropft. Nach 1 h rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 7.5 mL Allylbromid (10.5 g, 86.78 mmol, 9 Äq.) tropfenweise versetzt. Im auftauenden Eisbad wurde das Gemisch über Nacht gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde mit 50 mL Methanol gequentscht und anschließend mit 50 mL DCM und einem Gemisch aus 50 mL Brine und 50 mL H<sub>2</sub>O extrahiert. Anschließend wurde zweimal mit je 50 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C bis 11 mbar eingengt, der Rückstand lag als ein gelbes Öl vor. Es wurden 3.7 g Rohprodukt erhalten. Nach einer säulenchromatischen Reinigung (Hexan/Ethylacetat) wurden 1.9 g (8.95 mmol, 90%) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.47 (t, 1H,  $J_1 = 5.88$  Hz); 3.53 (d, 4H,  $J_1 = 5.88$  Hz); 4.07 (ddd, 6H,  $J_1 = 5.88$  Hz,  $J_2 = 1.47$  Hz,  $J_3 = 1.47$  Hz); 5.08 (ddt, 3H,  $J_1 = 11.03$  Hz,  $J_2 = 2.21$  Hz,  $J_3 = 1.47$  Hz); 5.21 (ddt, 3H,  $J_1 = 1.47$  Hz,  $J_2 = 10.10$  Hz,  $J_3 = 16.91$  Hz); 5.93 – 5.75 (m, 3H);

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ (ppm) = 71.8; 82.3; 132.8, 175.6.

7.4.1.10 Darstellung von 1,2,3-tris(2,3-epoxypropoxy)propan<sup>[151]</sup>

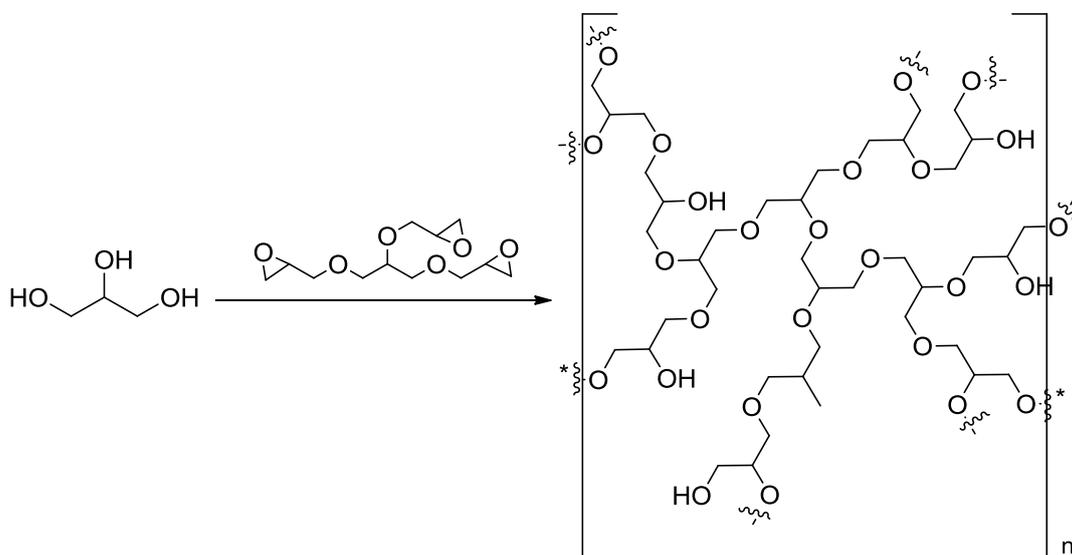
In 100 mL DCM wurden 1.9 g 3-((1,3-Bis(allyloxy)propan-2-yl)oxy)prop-1-en (8.95 mmol, 1 Äq.) gelöst und im Eis/Wasserbad auf 0°C gekühlt. 9.39 g mCPBA (70 % Monohydrat, 54.41 mmol, 6 Äq.) und 14.22 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat (78.88 mmol, 9. Äq ) wurden zu gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit je 50 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, 10 Min. über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und 2.75 g eines farblosen Öls wurde erhalten. Nach einer säulenchromatischen Aufreinigung (Vorlauf Hexan/Aceton 99/1 v/v, Hauptlauf Hexan/Aceton 95/5 v/v, Nachlauf Hexan/Aceton 90/10 v/v) wurden 0.5 g (1.92 mmol, 21 %) Produkt erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2.58 (ddd, 3H,  $J_{1,2,3} = 11.58$  Hz); 2,78, (ddd, 3H,  $J_{1,2,3} = 11.58$  Hz); 3,16 (m, 3H,  $J_1 = 7.15$  Hz); 3.44 (t, 1H,  $J = 6.81$ Hz); 3,50 (m, 4H), 4.00 (m, 6H);

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 44.9; 45.1; 51.1; 51.8; 70.0, 72.2; 72.6; 79.8



### 7.4.2.2 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von dendritischen Polyglycerin-Nanopartikel in Miniemulsion am Beispiel Glycerin + GTGE



261.4 mg Glycerin (3 mmol, 9mmol OH) und 738.6 mg GTGE100 (4 mmol, 12 mmol Epoxiden) wurden in 0.2 ml DMSO gelöst. 20 mg KLE wurde in 15ml Cyclohexan gelöst und zu der DMSO-Lösung zugegeben. Das Gemisch wurde 1 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Gemisch dreimal je 1 min. mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 115°C 16 h in einem Bombenrohr erhitzt.

Nachdem das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt ist wurde einigen Tropfen Wasser zugegeben und bei 115°C drei Stunden erhitzt.

Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung wurde sie mit 15 ml n-Hexan in ein Zentrifugengefäß gegeben und dreimal je 45 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugiervorgang wurde die Hexanphase durch frisches Hexan ersetzt.

Die Wasserphase wurde in Wasser drei Tage dialysiert und anschließend am Gefriertrockner getrocknet.

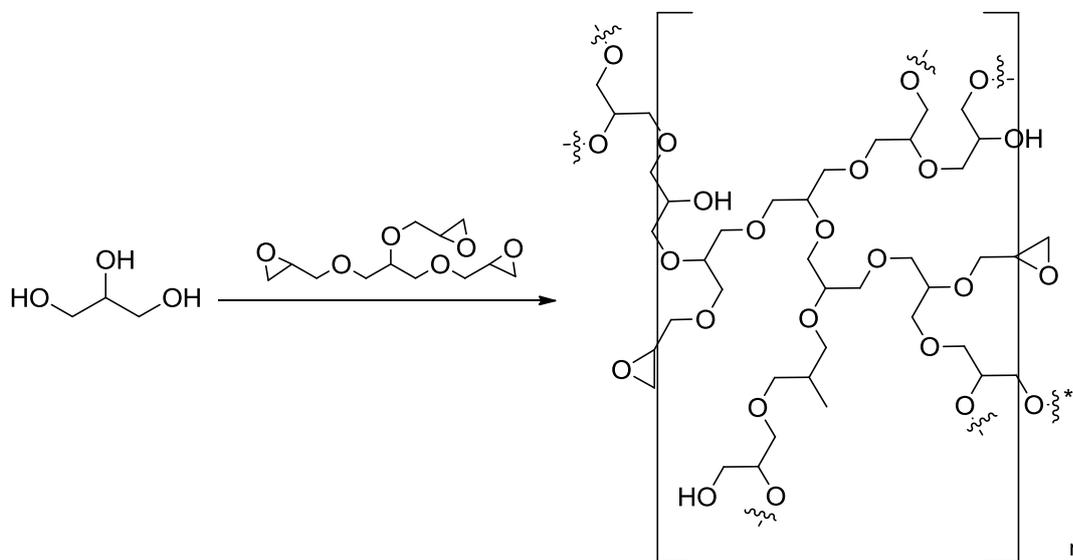
$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.00-3.40 (m, PG-Rückgrat);

$^{13}\text{C-NMR}$  (176 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 62.6; 64.4; 70.6; 70.7; 72.2; 73.9; 80.3; 81.5;

DLS: 45 nm  $\pm$  15 nm

Analog dazu wurden alle Nanogele hergestellt, die NMR- Spektren sind sich sehr ähnlich, lediglich die Integrale im IG- $^{13}\text{C}$  unterscheiden sich, die Daten dazu sind im Kap. 4 aufgeführt.

### 7.4.2.3 Synthese von epoxidfunktionalisierte dendritischen Polyglycerin-Nanopartikel in Miniemulsion



261.4 mg Glycerin (3 mmol) und 738.6 mg GTGE (4 mmol, 12 mmol Epoxiden) wurden in 0.2 ml DMSO gelöst. 20 mg KLE wurde in 15 ml Cyclohexan gelöst und zu der DMSO-Lösung zugegeben. Das Gemisch wurde 1 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Gemisch dreimal je 1 min. mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 115°C 3.5 h. in einem Bombenrohr erhitzt und anschließend beim Raumtemperatur 16 Std. lang weitergerührt.

Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit 15 ml n-Hexan in ein Zentrifugengefäß gegeben und dreimal je 45 min bei 4000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugiervorgang wurde die Hexanphase durch frisches Hexan ersetzt.

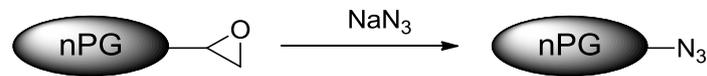
Die Wasserphase wurde in Wasser 3 Tage dialysiert und anschließend am Gefriertrockner getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.6 (m, 1H); 2.8 (m, 1H); 4.00-3.40 (m, PG-Rückgrad);

$^{13}\text{C-NMR}$  (176 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 62.6 ( $\text{L}_{13}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 64.4 (T,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 70.6 ( $\text{L}_{13}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 70.7 ( $\text{L}_{14}$ ,  $\text{CHOH}$ ); 72.2 (T,  $\text{CHOH}$  and  $\text{CH}_2$ ); 72.2 (D,  $\text{CH}_2$ ); 73.9 ( $\text{L}_{14}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 80.3 (D, CH); 81.5 ( $\text{L}_{13}$ , CH).

### 7.4.3 Funktionalisierung von Nanogelen

#### 7.4.3.1 Synthese von niedrig beladene nPG-Amin 11%



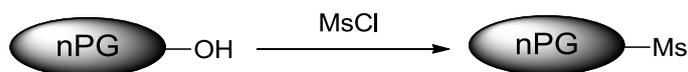
0.15 g nPG-Epoxid wurden in 10 ml DMF gelöst. 0.28 g NaN<sub>3</sub> wurde dazugegeben und bei 60 °C 24 h lang gerührt, dabei fiel ein weißer Niederschlag aus. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und dann in Wasser aufgenommen. Schließlich wurde die Lösung drei Tage in Wasser dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Produkt gefriergetrocknet. Es wurde 97 mg Produkt erhalten. Die Ausbeute beträgt 97%.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =4.23–2.87 (nPG-Rückgrad);

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =81.9–67.5 (nPG), 60.5 (funktionalisierte sekundäre PG-Gruppen), 51.5 (functionalisierten primären PG-Gruppen);

IR (C): ν = 2873, 2361, 2102 (N<sub>3</sub>), 1457,1273, 1122, 668 cm<sup>-1</sup>.

#### 7.4.3.2. Synthese von teilweise mesyloxyfunktionalisierten nPG (nPG-Ms 11%)



Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. 150 mg nPG (2 mmol OH) wurden in 5 ml abs. Pyridin gelöst und in einem Eis/Wasserbad auf 0°C gekühlt. 0.037 ml (0.48 mmol) MsCl wurden zugetropft. Die Lösung bekam eine braune Verfärbung. Im auftauenden Eisbad wurde die Lösung 24 h gerührt und anschließend mit Eis gequenchet.

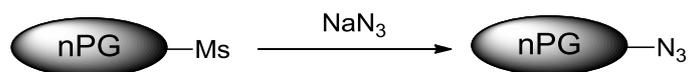
Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in Wasser gelöst und mit Hilfe von Ultrafiltration aufgereinigt. Es wurde 126 mg Produkt mit 11% Mesyloxyfunktionalisierung erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 84%.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta = 5.16 - 4.74$  (funktionalisierte sekundäre PG-Gruppen),  $4.63-4.20$  (funktionalisierten primären PG-Gruppen),  $3.17$  (Me);

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta = 83.1 - 69.0$  (PG),  $38.2$  (Me);

IR (C):  $\nu = 3030, 2941, 2361, 1709, 1457, 1362, 1184, 971, 813, 753 \text{ cm}^{-1}$ .

### 7.4.3.3 teilweise azidfunktionalisieren nPG (nPG-N<sub>3</sub> 11%) aus nPG-Ms 11%



120 mg nPG mit 11% Mesylfunktionalisierung wurden in 5 mL DMF gelöst. 12 mg NaN<sub>3</sub> wurden mit einer Plastikspatel zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60°C drei Tage lang gerührt.

Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, wurde das DMF unter Hochvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in Wasser aufgenommen und ultrafiltriert.

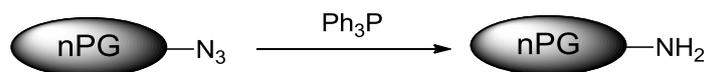
Es wurde 106 mg Produkt erhalten, dies entsprach einer Ausbeute von 88.3%.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =4.23–2.87 (nPG-Rückgrad);

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =81.9–67.5 (nPG), 60.5 (funktionalisierte sekundäre PG-Gruppen), 51.5 (funktionalisierten primären PG-Gruppen);

IR (C): ν = 2873, 2361, 2102 (N<sub>3</sub>), 1457,1273, 1122, 668 cm<sup>-1</sup>.

#### 7.4.3.4 Reduktion des nPG-N<sub>3</sub> 11% zu nPG-Amin 11%



80 mg nPG-azid wurden in 5ml THF gelöst, dazu wurden 3 ml H<sub>2</sub>O 31mg PPh<sub>3</sub>(1 Äq.zu Azid-Funktion) zugegeben. Durch die Zugabe von PPh<sub>3</sub> wurde N<sub>2</sub>-Gas freigesetzt, die anhand von Gasbläschen zu beobachten waren.

Das Gemisch wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das THF unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Lösung wurde durch Ultrafiltration gereinigt, anschließend wurde das Wasser am Gefriertrockner entfernt.

Es wurde 72 mg Produkt erhalten, was einer Ausbeute von 90% entsprach.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ =4.01–3.21 (nPG), 3.31–2.40(funktionalisierte PG-Gruppen);

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ =83.0–65.5 (nPG), 55.5–43.6 (funktionalisierte PG-Gruppen);

IR (C): ν = 3354, 2874, 2362, 2338, 2103, 1576, 1473, 1338, 1104, 820, 668 cm<sup>-1</sup>.

### 8. Summary

This thesis explores the synthesis and properties of biocompatible glycerol-based polymer particles with a high molecular weight. Two routes were attempted for the synthesis.

The base-catalyzed polycondensation of glycerol using microwave reactor mostly resulted in pentamers or hexamers, while the method of acid-catalyzed cross-linking via miniemulsion was proved to be successful and could be easily applied and optimized. The acid-catalyzed ring-opening condensation reaction takes place at 120°C in DMSO-droplets dispersed in cyclohexane and the droplets can be stabilized with the aid of a special surfactant, the KLE25. The yield was enhanced up to 50%.

By this method a series of novel biocompatible nanogels were synthesized involving monomers, such as ethylene glycol, GTGE, EDGE, DGE, di- and triglycerol, and long-chain PEG. The targeted size of 100-200 nm in diameter, which is relevant for biomedical applications were obtained with a relatively narrow distribution ( $PDI < 1.3$  in DLS). Moreover the chemical and mechanical properties of the resulting nanogels were investigated.

These nanogels show interesting features and are promising for various applications. In some cases nanogel particles with diameters of ca. 100 nm have very low intrinsic viscosities of up to 1.6 mL/g, which is a big advantage for biomedical applications.

Initial biomedical studies show that amine functionalized nPGs are suitable as a nonviral gene vector. These nanogels may easily diffuse into the cell and are able to build multivalent complexes with plasmid-DNA. However they still need to be improved, with respect to their cytotoxicity and transfection efficiency.

The nPG with a compact scaffold and high degree of branching of up to 63% can be considered both as cross-linked HPG and hydrogel due to its typical properties, such as high swelling.

Also the nanogels built of long-chain PEG have distinct gel-like characteristics, a special focus was placed on their varying swelling abilities in different solvents and solvent mixtures. Depending on the scaffold the particles can change their sizes up to the six-fold.

Furthermore, the mechanical properties of the PEG-PG nanogels were evaluated by force measurements. In some cases their stiffness, expressed as Young's Modulus, strongly differ in different solvents. The hardness depends on the PEG-content of the particles' network architecture

Within this thesis a method was found to synthesize biocompatible nanoparticles whose chemical and mechanical properties can be tailored by an appropriate choice of the building blocks.

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] J. M. J. Fréchet, D. A. Tomalia, *Dendrimers and other dendritic polymers*, Wiley, Chichester, p 155, **2001**.
- [2] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 2, 155 - 158.
- [3] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, 17, 117-132.
- [4] D. A. Tomalia, E. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules* **1986**, 19, 2466-2468.
- [5] D. A. Tomalia, J. R. Dewald, *U.S. Patent 4 507 466* **1985**.
- [6] D. A. Tomalia, J. R. Dewald, *U.S. Patent 4 568 737* **1986**.
- [7] C. Wörner, R. Mülhaupt, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1367-1370.
- [8] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 119-157.
- [9] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 138-175.
- [10] M. de Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 1308-1311.
- [11] Y. H. Kim, O. W. Webster, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4593- 4594.
- [12] Y. H. Kim, Webster, O.W., *Polym.Prepr.* **1988**, 29, 310-311.
- [13] P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 3091 - 3096.
- [14] P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 3083 - 3090.
- [15] P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 3096 -3100.
- [16] P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 74, 2718 - 2723.
- [17] C. Gao, D. Yan, *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 183-275.
- [18] A. I. Fiedler, PhD Thesis thesis, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2008**.
- [19] K. E. Uhrich, C. J. Hawker, J. M. J. Frechet, S. R. Turner, *Macromolecules* **1992**, 25, 4583-4587.
- [20] H. R. Kricheldorf, T. Stukenbrock, *J.Polym. Sci. Pol. Chem.* **1998**, 36, 2347-2357.
- [21] G. Yang, M. Jikei, M.-a. Kakimoto, *Macromolecules* **1998**, 31, 5964-5966.
- [22] G. Yang, M. Jikei, M.-a. Kakimoto, *Macromolecules* **1999**, 32, 2215-2220.
- [23] Y. Ishida, A. C. F. Sun, M. Jikei, M.-a. Kakimoto, *Macromolecules* **2000**, 33, 2832-2838.
- [24] Y. H. Kim, R. Beckerbauer, *Macromolecules* **1994**, 27, 1968-1971.
- [25] Y. H. Kim, O. W. Webster, *Macromolecules* **1992**, 25, 5561-5572.
- [26] H.-T. Chang, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2313-2314.
- [27] M. Jikei, S.-H. Chon, M.-a. Kakimoto, S. Kawauchi, T. Imase, J. Watanebe, *Macromolecules* **1999**, 32, 2061-2064.
- [28] M. Jikei, M. Kakimoto, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, 1233 - 1285.
- [29] C. Gong, J. M. J. Fréchet, *Macromolecules* **2000**, 33, 4997-4999.
- [30] T. Emrick, H.-T. Chang, J. M. J. Fréchet, *Macromolecules* **1999**, 32, 6380-6382.
- [31] M. Suzuki, A. Ii, T. Saegusa, *Macromolecules* **1992**, 25, 7071-7072.
- [32] C. R. Dick, G. E. Ham, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **1970**, 4, 1301 - 1314.
- [33] A. Sunder, R. Hanselmann, H. Frey, R. Mülhaupt, *Macromolecules* **1999**, 32, 4240-4246.
- [34] D. Hölter, A. Burgath, H. Frey, *Acta Polym.* **1997**, 48, 30-35.
- [35] C. J. Hawker, R. Lee, J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4583-4588.

- [36] A. Sunder, R. Mülhaupt, R. Haag, H. Frey, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 235-239.
- [37] P. Giraudeau, J. L. Wang, É. Baguet, *Comptes Rendus Chimie* **2006**, *9*, 525-529.
- [38] E. J. Vandenberg, *J. Polymer Sci. Polymer Chem. Ed.* **1985**, *23* 915 - 949.
- [39] R. Tokar, P. Kubisa, S. Penczek, A. Dworak, *Macromolecules* **1994**, *27*, 320-322.
- [40] A. Dworak, W. Walach, B. Trzebicka, *Macromol. Chem. Physic.* **1995**, *196*, 1963-1970.
- [41] R. Mülhaupt, Sunder, A., Haag, R., Frey, H. , *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 235-239.
- [42] R. Hanselmann, D. Hölder, H. Frey, *Macromolecules* **1998**, *31*, 3790-3801.
- [43] R. K. Kainthan, E. B. Muliwan, S. G. Hatzikiriakos, D. E. Brooks, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7707-7718.
- [44] A. M. Lowman, N. A. Peppas, in *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery* (Ed.: E. Mathiowitz), John Wiley and Sons, New York, **1999**, pp. 397-418.
- [45] R. Langer, N. A. Peppas, *AIChE Journal* **2003**, *49*, 2990-3006.
- [46] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345-1360.
- [47] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3181-3198.
- [48] M. V. Sefton, M. H. May, S. Lahooti, J. E. Babensee, *J. Control. Release* **2000**, *65*, 173-186.
- [49] L. G. Cima, *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 155-161.
- [50] J. K. Tessmar, A. M. Göpferich, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 23-39.
- [51] J. L. West, J. A. Hubbell, *Macromolecules* **1998**, *32*, 241-244.
- [52] K. S. Anseth, A. T. Metters, S. J. Bryant, P. J. Martens, J. H. Elisseeff, C. N. Bowman, *J. Control. Release* **2002**, *78*, 199-209.
- [53] W. N. E. van Dijk-Wolthuisa, S. K. Y. Tsanga, J. J. Kettenes-van den Bosch, W. E. Hennink, *Polymer* **1991**, *38*, 6235-6242.
- [54] W. N. E. van Dijk-Wolthuisa, M. J. van Steenberg, W. J. M. Underberg, W. E. Hennink, *J. Pharm. Sci.* **1997**, 413-417.
- [55] C. L. E. Nijst, J. P. Bruggeman, J. M. Karp, L. Ferreira, A. Zumbuehl, C. J. Bettinger, R. Langer, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3067-3073.
- [56] S. Mitragotri, J. Lahann, *Nat Mater* **2009**, *8*, 15-23.
- [57] A. L. Sisson, R. Haag, *Soft Matter* **2010**, *6*, 4968-4975.
- [58] M. H. M. Oudshoorn, R. Penterman, R. Rissmann, J. A. Bouwstra, D. J. Broer, W. E. Hennink, *Langmuir* **2007**, *23*, 11819-11825.
- [59] K. Akiyoshi, S. Kobayashi, S. Shichibe, D. Mix, M. Baudys, S. Wan Kim, J. Sunamoto, *J. Control. Release* **1998**, *54*, 313-320.
- [60] S. Yu, P. Yao, M. Jiang, G. Zhang, *Biopolymers* **2006**, *83*, 148-158.
- [61] S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, M. Jiang, *Langmuir* **2006**, *22*, 2754-2759.
- [62] K. Akiyoshi, S. Deguchi, H. Tajima, T. Nishikawa, J. Sunamoto, *Macromolecules* **1997**, *30*, 857-861.
- [63] A. V. Kabanov, S. V. Vinogradov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5418-5429.
- [64] X.-M. Zhao, Y. Xia, G. M. Whitesides, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1069-1074.
- [65] D. Qin, Y. Xia, J. Rogers, R. Jackman, X.-M. Zhao, G. Whitesides, *Vol. 194* (Eds.: A. Manz, H. Becker), Springer Berlin / Heidelberg, **1998**, pp. 1-20.
- [66] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153-184.
- [67] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550-575.
- [68] J. P. Rolland, B. W. Maynor, L. E. Euliss, A. E. Exner, G. M. Denison, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10096-10100.

- [69] K. Landfester, *Vol. 227* (Ed.: M. Antonietti), Springer Berlin / Heidelberg, **2003**, pp. 75-123.
- [70] K. Landfester, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4556-4576.
- [71] K. Landfester, F. Tiarks, H.-P. Hentze, M. Antonietti, *Macromol. Chem. Physic.* **2000**, *201*, 1-5.
- [72] P.L.Luisi, B. E. Straub, Plenum, New York, **1984**, pp. 339-346.
- [73] A. L. Sisson, D. Steinhilber, T. Rossow, P. Welker, K. Licha, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7540-7545.
- [74] H. Zhou, D. Steinhilber, H. Schlaad, A. L. Sisson, R. Haag, *React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 356-361.
- [75] D. Steinhilber, A. L. Sisson, D. Mangoldt, P. Welker, K. Licha, R. Haag, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 4133-4138.
- [76] D. Crespy, K. Landfester, *Macromolecules* **2005**, *38*, 6882-6887.
- [77] K. Landfester, U. Pawelzik, M. Antonietti, *Polymer* **2005**, *46*, 9892-9898.
- [78] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2001**, *39*, 2520-2524.
- [79] W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2002**, *54*, 13-36.
- [80] Q. Ma, E. E. Remsen, T. Kowalewski, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4627-4628.
- [81] S. Vinogradov, E. Batrakova, A. Kabanov, *Colloid. Surface. B* **1999**, *16*, 291-304.
- [82] K. McAllister, P. Sazani, M. Adam, M. J. Cho, M. Rubinstein, R. J. Samulski, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15198-15207.
- [83] S. Bontha, A. V. Kabanov, T. K. Bronich, *J. Control. Release* **2006**, *114*, 163-174.
- [84] G. Jiang, C. Liu, X. Liu, G. Zhang, M. Yang, Q. Chen, F. Liu, *J. Macromol. Sci. A* **2010**, *47*, 663-670.
- [85] I. Varga, I. Szalai, R. Mészáros, T. Gilányi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20297-20301.
- [86] Y. Shin, J. Liu, J. H. Chang, G. J. Exarhos, *Chem. Comm.* **2002**, 1718-1719.
- [87] T. K. Bronich, S. V. Vinogradov, A. V. Kabanov, *Nano Letters* **2001**, *1*, 535-540.
- [88] S. R. Deka, A. Quarta, R. Di Corato, A. Falqui, L. Manna, R. Cingolani, T. Pellegrino, *Langmuir* **2010**, *26*, 10315-10324.
- [89] S. V. Vinogradov, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4703-4712.
- [90] S. V. Vinogradov, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *15*, 50-60.
- [91] J. Haensler, F. C. Szoka, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372-379.
- [92] J. F. Kukowska-Latallo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia, J. R. Baker, *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 4897-4902.
- [93] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, *92*, 7297-7301.
- [94] P. D. Richardson, L. B. Augustin, B. T. Kren, C. J. Steer, *Stem Cells* **2002**, *20*, 105-118.
- [95] D. Joester, M. Losson, R. Pugin, H. Heinzelmann, E. Walter, H. P. Merkle, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1486-1490.
- [96] M. Krämer, J. F. Stumbé, G. Grimm, B. Kaufmann, U. Krüger, M. Weber, R. Haag, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1081-1087.
- [97] W. Fischer, M. Calderón, A. Schulz, I. Andreou, M. Weber, R. Haag, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1744-1752.

- [98] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 581-593.
- [99] R. K. Kainthan, C. Mugabe, H. M. Burt, D. E. Brooks, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 886-895.
- [100] J. J. W. Berzelius, F.; Öngen, O.G., *Lehrbuch der Chemie*, BiblioBazaar, **2010**.
- [101] J. Berzelius, *Arch. Pharm* **1843**, *84*, 257-260.
- [102] O. L. Erdmann, *J. prakt. Chem.* **1836**, 7-8, 411.
- [103] A. Ladenburg, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **1899**, *32*, 3721-3744.
- [104] U. P. Steinbac, W., *Fat.Sci.Technol.* **1987**, *89*, 297-303.
- [105] U. Steinberner, W. Preuss, *Lipid / Fett* **1987**, *89*, 297-303.
- [106] M. Pagliaro, R. Ciriminna, H. Kimura, M. Rossi, C. Della Pina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4434-4440.
- [107] M. J. Gronnow, R. J. White, J. H. Clark, D. J. Macquarrie, *Org. Process. Res. Dev.* **2005**, *9*, 516-518.
- [108] C. Klein, C. T. Bock, H. Wedemeyer, T. Wüstefeld, S. Locarnini, H. P. Dienes, S. Kubicka, M. P. Manns, C. Trautwein, *Gastroenterology* **2003**, *125*, 9-18.
- [109] C. O. Kappe, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6408-6443.
- [110] L. D. S. Conder, S.L., *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3663-3670.
- [111] A. M. Ruppert, J. D. Meeldijk, B. W. M. Kuipers, B. H. Ern e, B. M. Weckhuysen, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2016-2024.
- [112] P. G. Parzuchowski, M. Grabowska, M. Tryznowski, G. Rokicki, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7181-7186.
- [113] S. Roller, H. Zhou, R. Haag, *Mol. Divers.* **2005**, *9*, 305-316.
- [114] H. Schlaad, H. Kukula, J. Rudloff, I. Below, *Macromolecules* **2001**, *34*, 4302-4304.
- [115] A. Thomas, H. Schlaad, B. Smarsly, M. Antonietti, *Langmuir* **2003**, *19*, 4455-4459.
- [116] D. Steinhilber, **2008**.
- [117] M. A. Gauthier, J. Luo, D. Calvet, C. Ni, X. X. Zhu, M. Garon, M. D. Buschmann, *Polymer* **2004**, *45*, 8201-8210.
- [118] R. K. Kainthan, S. R. Hester, E. Levin, D. V. Devine, D. E. Brooks, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4581-4590.
- [119] R. K. Kainthan, M. Gnanamani, M. Ganguli, T. Ghosh, D. E. Brooks, S. Maiti, J. N. Kizhakkedathu, *Biomaterials* **2006**, *27*, 5377-5390.
- [120] H. T rk, Dissertation thesis, Universit t Dortmund (Dortmund), **2005**.
- [121] H. K ster, W. Heidmann, *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 576-577.
- [122] H. Frey, R. Haag, *J. Biotechnol.* **2002**, *90*, 257-267.
- [123] S. Bai, T.-L. Nguyen, P. Mulvaney, D. Wang, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3247-3250.
- [124] M. Calder n, M. A. Quadir, S. K. Sharma, R. Haag, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 190-218.
- [125] A. L. Sisson, I. Papp, K. Landfester, R. Haag, *Macromolecules* **2008**, *42*, 556-559.
- [126] A. Burmistrova, M. Richter, M. Eisele, C.  z m, R. von Klitzing, *Polymers* **2011**, *3*, 1575-1590.
- [127] N. Takahashi, T. Kanaya, K. Nishida, K. Kaji, *Polymer* **2003**, *44*, 4075-4078.
- [128] J. A. Wolff, *Nat Biotech* **2002**, *20*, 768-769.
- [129] C. Brus, H. Petersen, A. Aigner, F. Czubayko, T. Kissel, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 677-684.
- [130] S. W. Richardson, H. J. Kolbe, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* **1999**, *178*, 231-243.
- [131] B. Brissault, A. Kichler, C. Guis, C. Leborgne, O. Danos, H. Cheradame, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 581-587.
- [132] M. C. Gonzalez, E. San Roman, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 3536-3540.

- [133] P. Ofek, W. Fischer, M. Calderon, R. Haag, R. Satchi-Fainaro, *FASEB J.* **2010**, *24*, 3122-3134.
- [134] J. B. Lepecq, C. Paoletti, *J.Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87-106.
- [135] A. Marotto, Y. S. Kim, E. Schulze, U. Pindur, *Pharmazie* **2002**, *57*, 194-197.
- [136] D. J. Welsh, S. P. Jones, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4047-4051.
- [137] A. Mulder, A. Jukovic, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org Biomol Chem* **2004**, *2*, 1748-1755.
- [138] M. A. Kostianen, D. K. Smith, O. Ikkala, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7600-7604.
- [139] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953.
- [140] I. Papp, Freie Universität (Berlin), **2011**.
- [141] S. K. Choi, S. Lee, G. M. Whitesides, *J Org Chem* **1996**, *61*, 8739-8745.
- [142] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *Chem Biol* **1996**, *3*, 97-104.
- [143] I. Papp, C. Sieben, K. Ludwig, M. Roskamp, C. Böttcher, S. Schlecht, A. Herrmann, R. Haag, *Small* **2010**, *6*, 2900-2906.
- [144] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dervede, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10622-10650.
- [145] T. Rossow, J. A. Heyman, A. J. Ehrlicher, A. Langhoff, D. A. Weitz, R. Haag, S. Seiffert, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4983-4989.
- [146] J. d. P. P. Atkins, *Physical Chemistry*, Oxford, **2002**.
- [147] B. F. Cain, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 658-668.
- [148] R. Zhuo, M. Li, *Vol. 1392148* (Ed.: W. University), China, **2003**.
- [149] U. C. Yoon, C. W. Lee, S. W. Oh, H. J. Kim, S. J. Lee, *Journal of Photochemistry* **2000**, *7*, 143-148.
- [150] S.K.Rajaraman, J. V. Crivello, *Des. Monomers Polym.* **1998**, *1*, 77.
- [151] T. Kida, M. Yokota, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, M. Okahara, *Synthesis* **1993**, *5*, 487-489.

## **10. Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der online Version nicht veröffentlicht