

**Laser-getriggerte Freisetzung
polymergebundener pharmazeutischer Wirkstoffe
zur Behandlung des Nachstars**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Dipl. Chem. Sebastian Härtner
aus Groß-Gerau

Marburg / Lahn 2006

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

angenommen.

Erstgutachter
Zweitgutachter
Tag der mündlichen Prüfung

Prof. Dr. N. Hampp
Prof. Dr. A. Greiner
21.12.2006

„...Ich trinke auf Auf gute Freunde Verlorene Liebe Auf alte Götter Und auf neue Ziele!“
E.I.N.S., *B.O.*

Einzelne Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp

Single-photon (SPA) and Two-photon absorption (TPA) in sunlight of a new photodimerizable 7-Hydroxycoumarin derivative versus SPA and TPA phototriggered cleavage.

In preparation.

S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp

Phototriggered release of photolabile drugs via two-photon absorption-induced cleavage of polymer-bound dicoumarin.

Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, (2006),

doi:10.1016/j.jphotochem.2006.10.015.

S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp

Photodimerized 7-hydroxycoumarin with improved solubility in PMMA: single-photon and two-photon induced photocleavage in solution and PMMA films.

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, (2006), *in press.*

H.-C. Kim, S. Härtner, M. Behe, T. M. Behr, N. Hampp

Two-photon-absorption controlled multi-dose drug release: A novel approach for secondary cataract treatment.

Journal of Biomedical Optics, 11 (3) (2006) 034024-1.

S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp

Phototriggered multifunctional drug delivery device.

Proc. SPIE, 6139 (2006) 260.

H.-C. Kim, S. Härtner, N. Hampp

Two-photon triggered drug delivery system: A new way to prevent posterior capsule opacification.

Proc. SPIE, 6138 (2006) 162.

H.-C. Kim, S. Kreiling, S. Härtner, L. Hesse, A. Greiner; N. Hampp

Two-photon absorption-induced drug delivery from polymers for medical applications.

Proc. SPIE, 5323 (2004) 327.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	3
2.1	DER GRAUE STAR.....	3
2.2	CUMARIN UND SEINE EIGENSCHAFTEN	6
2.3	ZWEI-PHOTONEN ABSORPTION.....	7
2.4	ZIELSETZUNG.....	16
3	MONOFUNKTIONALES COPOLYMER (H5FUPBMAOC)	21
3.1	UV/VIS UND HPLC KALIBRIERUNG VON 5FU UND H5FU	22
3.2	HYDROLYSEEIGENSCHAFTEN VON H5FU	24
3.3	BESTIMMUNG DES BELADUNGSGRADES VON H5FUPBMAOC	26
3.4	SPA INDUZIERTE FREISETZUNG VON H5FU	31
3.5	TPA INDUZIERTE FREISETZUNG VON H5FU IN LÖSUNG.....	33
3.6	SPA INDUZIERTER MULTISTEP	36
3.7	TPA INDUZIERTE FREISETZUNG VON H5FU AUS EINER POLYMERMATRIX	39
3.8	LANGZEITSTABILITÄTSTEST VON H5FUPBMAOC	42
3.9	BESTIMMUNG DER BRECHUNGSINDEXÄNDERUNG NACH FREISETZUNG.....	44
3.10	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	45
4	PHOTOCHEMISCHE LINKERSYSTEME ZUM AUFBAU VON MULTIFUNKTIONALEN COPOLYMEREN	47
4.1	ISOMERE DES CUMARINDIMERS	48
4.2	BESTIMMUNG DER EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN	49
4.3	SPA INDUZIERTE CYCLOREVERSION IN LÖSUNG	51
4.4	TPA INDUZIERTE CYCLOREVERSION IN LÖSUNG	55
4.5	SPA INDUZIERTE CYCLOREVERSION IN POLYMERMATRIX	61
4.6	TPA INDUZIERTE CYCLOREVERSION IN DER POLYMERMATRIX	65
4.7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	72
4.8	THEORETISCHE BERECHNUNG DER UNERWÜNSCHTEN FREISETZUNG DURCH SONNENLICHT	74
4.9	EXKURS	75
5	COPOLYMER ALS MULTIFUNKTIONALER TRÄGER FÜR PHARMAZEUTISCHE WIRKSTOFFE	80
5.1	PHOTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON TBS-COPO	81
5.2	SPA UND TPA INDUZIERTE FREISETZUNG VERSCHIEDENER WIRKSTOFF-CUMARIN-KONJUGATE	87
5.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	97
6	ERGEBNISSE DER IN VITRO ZELLVERSUCHE	98
6.1	VERSUCHE MIT MONOFUNKTIONALEN COPOLYMER	98
6.2	VERSUCHE MIT MULTIFUNKTIONALEN COPOLYMER	102
6.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ZELLKULTURTESTS.....	106
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
8	EXPERIMENTELLER TEIL	109
8.1	MATERIALIEN UND METHODEN	109
8.2	SYNTHESEN DER VORSTUFEN, DER LINKERSYSTEME UND DER COPOLYMER	113
9	LITERATURVERZEICHNIS	137

Abkürzungsverzeichnis

5FU	5-Fluoruracil
ACN	Acetonitril
AIBN	Azoisobuttersäurenitril
Cl-Amb	Chlorambucil
CHCl ₃	Chloroform
CPM	Compression Moulding
d	Dublett (NMR)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DSC	Differential scanning calorimetry
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
eq	Äquivalente
HAc	Essigsäure
EtOAc	Ethylacetat
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
M _n	Zahlenmittel des Molekulargewichtes
M _w	Gewichtsmittel des Molekulargewichtes
T _g	Glasübergangstemperatur
GM	Goeppert-Mayer
hept	heptett (NMR)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
Ibu	Ibuprofen
IR	Infrarot
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Liquid Chromatographie
LiOH	Lithiumhydroxid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MS	Massenspektrometrie
MA	Methacrylsäure

Abkürzungsverzeichnis

n-BMA	Methacrylsäurebutylester
MACl	Methacrylsäurechlorid
MMA	Methylmethacrylat
MeOH	Methanol
min	Minuten
m	Multiplett (NMR)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
OD	Optische Dichte
M _w /M _n	Polydispersität
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
q	Quartett (NMR)
Quin	Quintett (NMR)
RT	Raumtemperatur
HCl	Salzsäure
s	Singulett (NMR)
h	Stunden
d	Tage
T _{5%}	Temperatur des 5 %igen Abbaus (TGA)
TBSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-chlorid
THF	Tetrahydrofuran
TGA	Thermogravimetrische Analyse
NEt ₃	Triethylamin
t	Triplett (NMR)
UV	ultraviolett
Val	Valproinsäure

1 EINLEITUNG

Krankheiten stellen seit Menschengedenken Probleme für die Menschheit dar, die zu heilen, die Ursachen zu verstehen und sie zu vermeiden von jeher das Anliegen der Medizin und der angrenzenden Wissenschaften war und ist.

Das seit Jahrhunderten angesammelte vielfältige Wissen darüber, kombiniert mit den existierenden neusten physikalischen und chemischen Technologien, eröffnet ein umfassendes Verständnis für deren Ursachen und damit für deren Behandlungsmöglichkeiten, wie man es sich noch vor Jahren nicht vorstellen konnte. Einer der epochalen Erfolge in der Behandlung von Krankheiten war in den letzten Jahrzehnten die Entwicklung und der Einsatz synthetisch hergestellter chemisch-pharmazeutischer Arzneimittel, wie zum Beispiel Omeprazol (Säureblocker) oder Risperidon (Antipsychotikum)^[1]. All diese Arzneimittel haben gemein, dass sie üblicherweise oral oder mittels Spritze (i.m. oder i.v.) verabreicht werden, mit dem Nachteil, dass ein hoher Prozentsatz des aktiven Wirkstoffes mehr oder weniger durch Metabolisierung deaktiviert und anschließend ausgeschieden wird. Er steht damit für die Therapie der Krankheit nicht mehr zur Verfügung. Speziell bei der Behandlung mit onkologischen Medikamenten ist es wünschenswert, Möglichkeiten der gezielten Verabreichung zu besitzen.

Daher ist es Ziel der heute forschenden Pharmainstitute und der Pharmaindustrie, den entwickelten aktiven Wirkstoff in Form des Arzneimittels so zu synthetisieren oder galenisch zu gestalten, dass die Metabolisierung weitestgehend unterbleibt, damit der Wirkstoff am „Ort des Geschehens“ in hoher Konzentration zur Verfügung steht und seine gewünschte Wirkung entfalten kann.

Neuste Forschungsergebnisse im Bereich der Onkologie befassen sich mit dem gezielten Verabreichen von Medikamenten in die Zielzellen, um das umgebende Zellgewebe nicht der Wirkung des Medikament auszusetzen. Diese neuartigen Verabreichungsmethoden werden durch den Begriff „drug targeting“ beschrieben. Zwei Beispiele neuerer Methoden des drug targeting zur Behandlung von Tumoren sind zum Einen das Einbinden von Zytostatika in Liposomen und zum Anderen das Anbinden von Zytostatika an magnetische Nanopartikel^[2, 3].

Neben diesen neueren Methoden besteht auch die Möglichkeit den Wirkstoff an ein nicht aktives Polymer zu binden, und diesen dann am Zielort durch physikalische Methoden wieder freizusetzen. Das hat den Vorteil, dass das Wirkstoffmolekül nicht angegriffen wird und als solches in aktiver Form erst am „Zielort“ freigesetzt wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Versuch, pharmazeutische Wirkstoffe an ein Polymer / Copolymer zu binden und durch Laser-Triggering bzw. den Einfluss von Photonen wieder abzuspalten, ohne dass das aktive Wirkstoffmolekül geschädigt wird.

Die dafür notwendigen chemischen Synthesen von z.B. mit Cumarinderivaten copolymerisierten Polymeren werden in der Arbeit ebenfalls beschrieben.

Weiterhin werden aus den so genannten Wirkstoff-Copolymeren Model-Intraokularlinsen hergestellt und an Hand derer das postulierte Ziel der Arbeit

„Laser-getriggerte Freisetzung polymergebundener pharmazeutischer Wirkstoffe zur Behandlung des Nachstars“

geprüft. Darauf aufbauend wurde der eingeschlagene Syntheseweg zur Herstellung des photochemisch aktivierbaren Copolymers optimiert und damit die Möglichkeit eröffnet verschiedene Wirkstoffe synthetisch anzuknüpfen. Aus den daraus resultierenden Copolymeren werden die Wirkstoffe photochemisch induziert freigesetzt und ihre Aktivität an in vitro Zellversuchen vergleichend getestet.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Der Graue Star

Für den Menschen als Individuum sind funktionierende Sinnesorgane enorm wichtig und für das Leben notwendig. Das Auge, als eines dieser Sinnesorgane ist für die visuelle Wahrnehmung der Umwelt verantwortlich, da etwa zwei Drittel aller Informationen über unsere Umwelt durch das Auge zur Weiterleitung im Gehirn bereitgestellt und verarbeitet wird. Summiert man die dabei über ein Menschenleben im Gehirn verarbeitete Photonenanzahl auf, so verarbeitet der Mensch die Datenmenge von unvorstellbaren 150.000.000 Gigabyte^[4].

Der Verlust des Auges ist deshalb für den Menschen sehr schmerzhaft und mit enormen Einschränkungen in der Lebensqualität verbunden. Zum Verlust des Augenlichtes können verschiedenste mechanische, erbliche oder krankheitsbedingte Ursachen beitragen. Dabei sind, was die Häufigkeit und die Schwere der Folgen betrifft, verschiedenste Augenkrankheiten als Hauptursache der Erblindung auf einem oder auf beiden Augen anzuführen. Eine dieser Krankheiten ist der so genannte „Graue Star“, welcher weltweit der Hauptgrund für eine Erblindung ist^[5]. In den Industrieländern kann solch eine Erblindung durch eine Operation behoben werden, während in den Entwicklungsländern, aufgrund fehlender finanzieller Mittel, diese Möglichkeit weitestgehend nicht besteht^[6].

Geschichtlich gesehen ist der Graue Star schon sehr lange bekannt; bereits 1750 v. Chr. wurde die Augenkrankheit „Grauer Star“ in der Schrift von Hammurabi das erste Mal schriftlich erwähnt^[7]. Seinen Namen Katarakt (griechisch: Wasserfall) verdankt der Graue Star der Annahme, dass die Trübung der Linse auf Grund ihres Erscheinungsbildes wie geronnenes Wasser, das aus dem Gehirn stamme sollte, aussah^[8]. Die älteste bekannte medizinische Behandlung des Grauen Stars ist das so genannte Starstechen, erstmals in der griechisch-lateinischen Handschrift der Medizin „De re Medicina“ erwähnt. Bei dieser Methode wurde mit einer kleinen Lanze die getrübte Linse des Auges in den unteren Teil des Auges gedrückt, um somit den Weg für das Licht in den Augapfel wieder freizugeben. Eben solche Lanzen fand man bei Ausgrabungen in Griechenland, die auf 2000 v. Chr. datiert wurden.

1705 erkannte und beschrieb der Franzose Pierre Brisseau als Erster die Ursache des Grauen Stars als eine Trübung der Linse. Die Geschichte der Behandlung hat durch den an der Philipps-Universität Marburg arbeitenden Augenarzt, Theologen, Schriftsteller und Professor Johann Heinrich Jung-Stilling schon früh einen Bezug zur Universität Marburg erhalten. In dem Werk „Dichtung und Wahrheit“ von Goethe dokumentiert dieser 1775 die Operationstechnik des Starstechens^[9].

In 90 % der Fälle ist die Ursache der Trübung der Linse die so genannte „Alterskatarakt“. Ursache der Trübung sind altersbedingte Risikofaktoren, die letztendlich wenn sie nicht rechtzeitig erkannt und behandelt werden zu Grauem Star führen. In diversen Studien wurden allerdings verschiedenste Risikofaktoren für die Entstehung einer Katarakt aufgezeigt. Zu diesen Risikofaktoren zählen zum Beispiel Strahlenbelastung des Auges, vorausgegangene Augenverletzungen, UV-Strahlung oder auch die dauerhafte Einnahmen von Medikamenten wie Cortison. Eine Katarakt kann auch angeboren sein und ihre Ursache in einer vorgeburtlichen Infektion der Mutter, z.B. mit Röteln, oder auch in einer genetischen Disposition haben. Weiterhin gelten auch Rauchen, falsche Ernährung und Alkoholkonsum als Risikofaktoren^[10]. Im Allgemeinen ist die Folge von z. B. Wassermangel eine vermehrte Ansammlung von Kristallinen (Proteine, welche geometrische Komplexe bilden, die entfernt an chemische Kristalle erinnern) im Wasser der Linsenzellen. Diese Erhöhung der Konzentration von Kristallinen ist mit ein Hauptgrund für die Katarakt^[11].

Die Behandlung des Grauen Stars veränderte sich den in letzten Jahrhunderten zunächst durch den Vorschlag von Jacques Daviel 1753, die Linse gänzlich zu entfernen, wodurch gleichzeitig die Starbrille zum Ausgleich der entfernten Linse zum Einsatz kam. Ein weiterer großer Schritt wurde mit der Entdeckung des Kokains im 19. Jh. und dessen Einsatz als Lokalanästhetikum bei der Implantierung von Intraokularlinsen (IOL) aus Polymethylmethacrylat (PMMA) ab dem Jahr 1948 gemacht^[7, 12]. Harold Ridley fand heraus, dass Plexiglassplitter (PMMA) im Auge, eingedrungen durch Beschuss der Flugzeugkapseln im zweiten Weltkrieg, von den Augen der Piloten toleriert wurden. Heute werden diese Linsen fast ausschließlich aus Silikon oder faltbaren Acrylaten angefertigt, da sie flexibler sind und damit gleichzeitig der operative Eingriff am Auge für den Patienten schonender ist.

Operationen dieser Art werden aktuell weltweit etwa 14 Millionen Mal pro Jahr durchgeführt, davon drei Millionen Mal in den USA und allein 600.000 Mal in Deutschland^[13]. Schätzungsweise 25 Millionen Menschen sind weltweit an einer Katarakt erblindet und 110 Millionen Menschen leiden unter starker Beeinträchtigung ihres Sehvermögens. 2020 wird sich diese Anzahl nach aktuellen Schätzungen aufgrund der Überalterung der Gesellschaft verdoppelt haben, da es in den meisten Fällen ältere Menschen trifft. Doch auch Kinder leiden bereits unter dieser Krankheit^[10].

Bei der derzeitigen Standardoperation des Grauen Stars wird die natürliche Augenlinse mit Hilfe einer Ultraschallsonde zerstört und abgesaugt (Phakoemulsifikation). Über den operativen Schnitt wird anschließend die IOL eingeführt und im Auge platziert.

Da bei der Operation nicht 100 %ig gewährleistet werden kann, dass alle Linsenepithelzellen entfernt wurden, kommt es in bis zu 50 % der Fälle zu einer Proliferation der Zellen und einhergehend damit zur erneuten Eintrübung des Sichtfeldes. Diese postoperative Komplikation wird als Nachstar bezeichnet und kann derzeit nur durch die physikalische Zerstörung der Zellschicht unter Verwendung von Lasern behandelt werden (Kapsulotomie)^[14]. Dabei wird im Zentrum des Sichtfeldes die sehr dünne Epithelzellschicht mit Hilfe eines Lasers örtlich so stark erhitzt, dass die Zellen abgetötet und von der Linsenoberfläche abgesprengt werden. Die Zellfragmente schwimmen anschließend im Augenkapselwasser und werden bei Jugendlichen über das Blut zum körpereigenen Abbau wegtransportiert. Bei älteren Personen versagt dieser Mechanismus und die Zellfragmente werden nicht abtransportiert, wodurch sich mit jeder zusätzlichen Laserbehandlung im Sichtfeld mehr Zellfragmente im Augenkapselwasser ansammeln. Zellen, die in den Randbezirken der Linse wachsen, können aufgrund der nur ungenauen Positionierung des Laserfokus auf die Zellschicht, nicht abgetötet werden und sich somit wieder vermehren. Die Genauigkeit der Positionierung hängt allein vom behandelnden Arzt ab und, da es in vielen Fällen zu einer Beschädigung der IOL kommen kann, birgt diese Behandlung einen sehr hohen Risikofaktor^[15-17]. Die Nachstarhäufigkeit auf den kommerziell erhältlichen IOL-Materialien zeigt, dass Hydrogellinsen diesbezüglich die schlechteste Wahl sind, aber auch bei allen anderen Materialien kommt es, abhängig von vielen Bedingungen, zu Nachstar^[18]. Die Forschung hat in den letzten Jahren verschiedenste Ansätze zur Nachstarbehandlung entwickelt und publiziert, wobei die Strategien über das Design der Linsen^[19-21], über IOL-Materialveränderung zur Beeinflussung der Zelladhäsion^[22-25], zu Bearbeitung der IOL-Oberfläche^[26, 27] gehen. Ein neuer Ansatz soll hier noch kurz hervorgehoben werden, bei dem die chemische Oberflächenveränderung von Silikonlinsen mit Hilfe photochemischer Anbindung von Biopolymeren über Zimtsäurederivate beschrieben wird^[28]. Es wäre wünschenswert das Zellwachstum durch Laser getriggerte Freisetzung von aktiven Wirkstoffen zu beeinflussen, im besten Fall zu verhindern.

2.2 Cumarin und seine Eigenschaften

Cumarin und viele seiner Derivate sind in der Literatur dafür bekannt, dass sie aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften durch Licht dimerisiert und wieder gespalten werden können.

Die erste Photodimerisierung durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition von Cumarin wurde 1902 von Silber et al.^[29] durchgeführt. Eine genauere Untersuchung der Isomere, welche bei solch einer Dimerisierung auftreten können, wurde von Krauch et al. durchgeführt^[30]. In neueren Arbeiten befasst man sich mit dem Einfluss von Photosensibilisatoren und Lösungsmitteln auf das Isomerenverhältnis^[31], wobei die Charakterisierung der Isomere mittels NMR von Yu et al.^[32] zuerst simuliert und anschließend experimentell bewiesen wurde. Die Dimerisierung von Cumarin findet bei Wellenlängen oberhalb von 300 nm statt, während die Spaltung des Cyclobutanringes unterhalb von 300 nm induziert werden kann^[33, 34]. Abbildung 1 zeigt die Struktur von Cumarin und die durch UV-Licht induzierte Veränderung im Molekül. Durch die Ausbildung eines Cyclobutanringes wird das konjugierte π -System unterbrochen und die resultierende Bande im UV/Vis-Spektrum verschwindet. Diese durch das Verschwinden der Bande im Spektrum bei ca. 310 nm eindeutig zu identifizierende Veränderung ist ein wichtiger analytischer Bestandteil der Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Cycloaddition und Cycloreversion.

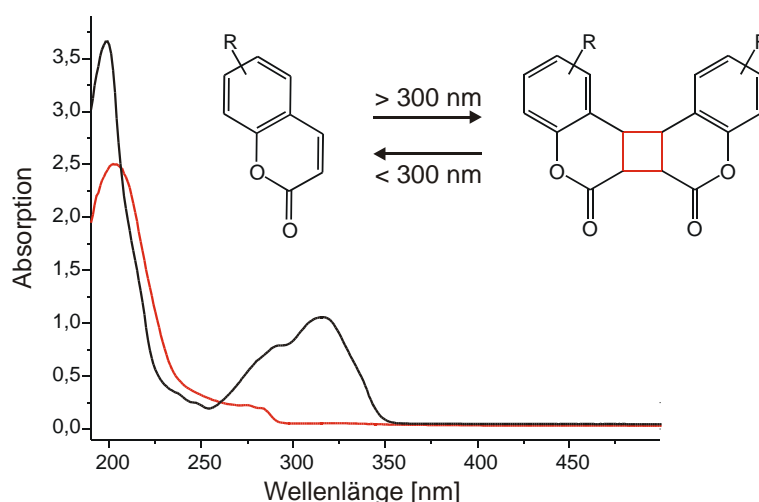


Abb. 1 Photochemische Bildung und Spaltung von Cumarindimeren und die resultierenden UV/Vis-Spektren.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Spaltung des Cyclobutanringes auch mittels Zwei-Photonen-Absorption möglich ist^[33]. Um Cumarin in ein Polymer einzubauen, gehört in der heutigen Forschung die Derivatisierung von Cumarin, im speziellen von 7-Hydroxycumarin zum Standard Repertoire^[35, 36]. Zum Beispiel die Verlängerung von Polyethylen-Ketten

mittels Cumarin und die anschließende Dimerisierung der Endgruppen konnte von Trenor et al.^[37] gezeigt werden. Um photochemisch eine Öffnung bzw. Schließung einer Silicapore mittels UV-Licht zu induzieren, macht man sich die Möglichkeit der Schaltbarkeit von Cumarin-Molekülen zu Nutze^[38]. Die Anwendungsbereiche und Forschungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Cumarin-Derivate, -Dimerisierung und deren Anbindung sind vielseitig und gewinnen durch die Möglichkeit der photochemisch induzierten Reaktion mittels Zwei-Photon-Absorption (TPA) an zusätzlichem Interesse. Speziell in der vorliegenden Arbeit spielen Cumarinderivate und deren photochemische Eigenschaften eine entscheidende Rolle.

2.3 Zwei-Photonen Absorption

2.3.1 Grundlagen

Wird im Allgemeinen von lichtinduzierten Prozessen in Molekülen gesprochen, bezieht man sich automatisch auf die Anregung des Moleküls über eine Ein-Photon-Absorption (SPA). In den letzten Jahren wurden solche lichtinduzierten Prozesse auch vermehrt über Zwei- oder Multi-Photonen-Absorption durchgeführt. 1931 beschrieb *Maria Goeppert-Mayer* in ihrer Arbeit „Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“ als erste die Möglichkeit der TPA induzierten Photochemie^[39]. Ihre Theorie wurde zu diesem Zeitpunkt allerdings aufgrund der fehlenden Lichtquellen als intellektuelle Kuriosität betrachtet. Erst 30 Jahre später konnte durch die Erfindung des Pulslasers diese Theorie experimentell bestätigt werden^[40], wobei der Vergleich der Übergangswahrscheinlichkeiten der Ein- bzw. Zwei-Photonen-Absorption zeigte, dass der Zwei-Photonen-Querschnitt (Goeppert-Mayer-Koeffizient $1 \text{ GM} = 1 \cdot 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ sec Photon}^{-1}$) um ca. 30 Größenordnungen kleiner ist als der der Ein-Photon-Reaktion ($1 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^2 \text{ sec Photon}^{-1}$) generell gilt, dass der Absorptionsquerschnitt ($\text{cm}^2 / \text{Molekül}$) sich immer auf die Übergangswahrscheinlichkeit eines Moleküls bezieht und kann durch Umrechnung in den Extinktionskoeffizienten ($\text{L} / \text{mol cm}^{-1}$) überführt werden, der dann die Übergangswahrscheinlichkeit eines Mols definiert.

In beiden Fällen der photochemischen Anregung über SPA und TPA wird ein Molekül vom Grundzustand in den angeregten Zustand überführt. Diese Anregung findet bei einem TPA-Prozess mittels zweier gleichzeitig eintreffenden Photonen statt, welche die doppelte Wellenlänge, mit der halben Energie, besitzen. Um den angeregten Zustand erreichen zu können verläuft der Anregungsprozess bei der TPA über einen virtuellen Zwischenzustand. Der daraus resultierende Vorteil der Verschiebung der Wellenlänge durch Verdopplung in den

sichtbaren Bereich gegenüber SPA wird in der Zielsetzung dieser Arbeit verwendet, dass z. B. die UV-Licht-Barriere des Auges, nämlich die Hornhaut, jetzt überwunden wird.

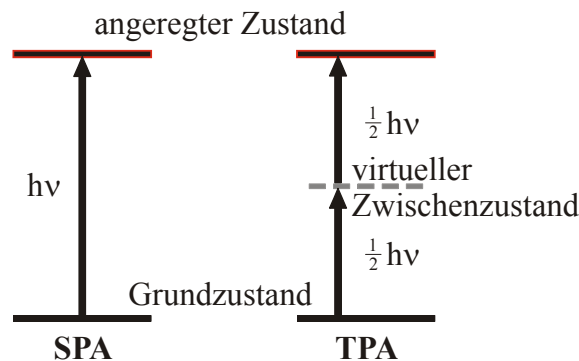


Abb. 2 Schematische Darstellung induzierter Übergänge via SPA und TPA.

Dessen steht als Nachteil gegenüber die Höhe der benötigten Lichtintensität, da die Übergangswahrscheinlichkeit bei TPA induzierten Prozessen vergleichsweise gering ist. Gleichung 1 zeigt, dass die Übergangswahrscheinlichkeit des Zwei-Photonen-Prozesses von der Lichtintensität abhängig ist^[41].

Gleichung 1
$$\frac{dW_{TPA}}{dt} = \frac{8\pi^2 \omega}{n^2 c^2} I^2 \text{Im}(\chi^{(3)})$$

Übergangswahrscheinlichkeit = dW_{TPA} / dt ; optische Frequenz = ω ; Brechungsindex = n ;

Lichtgeschwindigkeit = c ; Lichtintensität = I ; Suszeptibilität = χ

Die Vereinfachung von Gleichung 1 zeigt, dass die Übergangswahrscheinlichkeit der TPA quadratisch von der eingestrahlenen Lichtintensität abhängt.

Gleichung 2
$$W_{TPA} \sim I^2$$

Diese quadratische Abhängigkeit begründet sich im Zusammenhang zwischen Photonendichte und Übergangswahrscheinlichkeit, da sowohl die zeitliche, als auch die räumliche Komponente zweier Photonen überlappen muss um einen Übergang zu induzieren. Nur im Laserfokus ist die Photonendichte ausreichend groß, so dass diese Überlappung stattfindet und Übergänge induziert werden. Auf dieser Rahmenbedingung beruht der Vorteil von durch TPA induzierten Prozessen: nur an gezielten Punkten wird eine Photoreaktion eingeleitet.

Für die TPA-Experimente in dieser Arbeit ist es ausschlaggebend, dass der beobachtete photochemische Prozess tatsächlich nur durch TPA induziert wird. Zur Beweisführung wird Gleichung 3 logarithmiert.

Gleichung 3
$$\frac{d[c]}{dt} = v_0 = \sigma \cdot c_0 \cdot I^2 \cdot \Phi_{TPA} = k \cdot I^2$$

Gleichung 4
$$\ln v_0 = \ln(k \cdot I_0^2) = \ln k + 2 \cdot \ln I_0$$

Zwei-Photonen-Querschnitt = σ ; Anfangskonzentration = c_0 ; Intensität = I ;

Quantenausbeute für die Zwei-Photonen-Reaktion = Φ_{TPA}

Bestimmt man nun bei verschiedenen Pulsintensitäten die Anfangsgeschwindigkeiten und trägt diese doppelt logarithmisch auf, so muss die Steigung der Ausgleichsgeraden zwei betragen^[33], siehe Gleichung 4.

Um eine genaue Aussage über die Fähigkeit eines Moleküls eine TPA einzugehen machen zu können, werden in dieser Arbeit die Zwei-Photonen-Querschnitte σ bestimmt (Gleichung 5).

Die detaillierte Erklärung dieser Berechnung wird in Kapitel 2.3.4 besprochen.

Gleichung 5
$$\frac{dn}{dt} = \sigma \cdot N \cdot F^2$$

Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeit = dn / dt ; Anzahl der absorbierenden Moleküle pro

Volumeneinheit = N ; Photonendichte = F

2.3.2 Anwendung

Durch die erwähnten Vorteile der TPA, wie die gezielte orts aufgelöste Induzierung von Prozessen, konnten neue mannigfaltige Anwendungsmöglichkeiten entwickelt werden.

In der Polymerchemie zum Beispiel macht man sich diese Auflösung für die Mikrofabrikation von 3D-Strukturen aus Polymermaterial zu Nutze. In einer Polymerlösung aus Monomer, Photoinitiator und Inhibitoren (notwendig, da sonst die Polymerlösung unkontrolliert weiter polymerisieren würde - als Beispiel sei hier der „world smallest bull“ erwähnt^[42]) kann durch Laserinduzierung die Polymerisation orts aufgelöst initiiert und anschließend nach Entfernen der nicht polymerisierten Lösung das gewünschte auspolymerisierte Teil erhalten werden. Abhängig von der Größe des Laserfokus und der Lösungszusammensetzung kann die Auflösung bis in den μm Maßstab optimiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für die TPA ist der so genannte „WORM“-Speicher (write-once read-many)^[43]. Hierbei wird durch TPA induzierte Veränderung das Fluoreszenzverhalten von Fluorophoren in einer Polymermatrix verändert, wodurch eine dreidimensionale Speicherung von Daten ermöglicht wird.

Eine Hauptanwendung der TPA induzierten Fluoreszenz ist in der Mikroskopie zu finden. Als Bestandteil der biologischen Zelluntersuchungen hat sich die Methode der Laser Scanning Fluorescence Microscopy über TPA in den letzten Jahren etabliert. Diese Methode ermöglicht eine extrem hohe räumliche Auflösung, z. B. können Zellen dabei in einzelnen Schichten analysiert werden^[41, 44].

Auch in der Medizin wird die Möglichkeit der Anregung von Molekülen mittels TPA verwendet, was als „Photodynamische Therapie“ bezeichnet wird^[45]. Hierbei wird ein Wirkstoff injiziert, welcher sich bevorzugt in Tumorgewebe ansammelt. Dieser Wirkstoff wird nun durch Photoinduzierung angeregt und bildet Singulett-Sauerstoff, der wiederum aufgrund seiner hohen Reaktivität die Tumorzellen schädigt. Um diesen Wirkstoff zu aktivieren würde normalerweise Licht im visuellen Spektrum ausreichen, die Haut ist allerdings in diesem Wellenlängenbereich nicht durchlässig. Unter zu Hilfenahme von IR-Licht, welches in die Haut eindringen kann, kann mittels TPA der Wirkstoff aktiviert werden.

2.3.3 Berechnung der Ein-Photon-Quantenausbeute

Zur Bestimmung der SPA Quantenausbeute muss zunächst der Extinktionskoeffizient der entstehenden Spezies bestimmt werden, um Informationen über die Anzahl gespaltener Cyclobutanringe zu erhalten. Durch die Spaltung wird das konjugierte π -System des Cumarins zurückgebildet, welches eine typische Absorptionsbande bei ca. 310 nm (abhängig von Cumarinderivaten) hat, die in ihrer Zunahme als Grundlage für die Berechnung der Anzahl an gespaltenen Cyclobutanringen dient.

Unter zu Hilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich aus den resultierenden Extinktionen der Versuchsreihen auf die Stoffmenge bzw. Konzentration von Cumarin schließen. Zur Bestimmung der Stoffmengenänderung pro Sekunde wird die Anfangssteigung errechnet, welche aus der Auftragung der Stoffmengenänderung gegen die Belichtungszeit/energie resultiert. Die emittierte Anzahl an Photonen wird über eine kalibrierte Photodiode (1337-1010BQ, Fa. Hamamatsu) bestimmt, die eine spektrale

Sensitivität von 0,105 A / W pro cm² bei 266 nm aufweist. Die interne Kalibrierung der Photodiode wurde von Herrn Kreiling über das chemische Azobenzol-Aktinometer durchgeführt^[48]. Zur Bestimmung der Quantenausbeute wird zu Grunde gelegt, dass alle Photonen, welche emittiert werden von den, in der Lösung befindlichen, einen Cyclobutanring beinhaltenden Molekülen absorbiert werden (OD > 2). Des Weiteren gilt, dass die Anzahl der Moleküle größer als die der emittierten Photonen ist. Die folgenden Gleichungen zeigen die mathematische Durchführung der Berechnung der SPA Quantenausbeute in Lösung.

Konstanten (werden in den folgenden Experimenten spezifisch erwähnt):

Gemessene Stromstärke der Photodiode bei 266 nm: α [μ A]

Anzahl entstandener Moleküle pro Sekunde: n_{Monomer}

Berechnung der Energie für einen Belichtungszeitraum von einer Sekunde:

$$\text{Gleichung 6} \quad I_{\text{abs}} = \frac{\alpha \cdot t}{\beta} \left[\frac{\mu A \cdot s}{\mu A / \mu W} = \mu W s = \mu J \cdot \text{cm}^{-2} \right]$$

$$\text{Gleichung 7} \quad E_{\text{gesamt}} = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

$$\text{Gleichung 8} \quad n_{\text{Photonen}} = \frac{I_{\text{abs}} \cdot \text{cm}^2}{E_{\text{gesamt}}}$$

I_{abs} = Intensität ; E_{gesamt} = Photonenenergie bei 266 nm; n_{Photonen} = Anzahl emittierter Photonen

Die Quantenausbeute wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 9} \quad \text{Quantenausbeute} = \frac{n_{\text{Monomer}}}{n_{\text{Photonen}}}$$

Da bei der Berechnung die Anzahl der entstandenen Monomere verwendet wird, muss die erhaltene Quantenausbeute noch durch zwei dividiert werden.

Die Berechnung der Quantenausbeute in einer Polymermatrix (PMMA Film) benötigt zu den bisherigen Annahmen der aus Lösungen heraus berechneten Quantenausbeuten zusätzlich die Annahmen, dass der Extinktionskoeffizient in einer Polymermatrix gleich dem Extinktionskoeffizienten in Lösung ist. Für die Berechnung wird die so genannte Flächenkonzentration eingeführt F_D [mol / cm²], welche durch Dividieren der OD durch den Flächenextinktionskoeffizienten [cm² / mol] erhalten wird. Der Flächenextinktionskoeffizient ist eine reine Umrechnung der Einheiten des Extinktionskoeffizienten [L / mol cm⁻¹] für Lösungen. Die dadurch erhaltenen Werte werden, wie für die Berechnung der

Quantenausbeute einer Cyclobutanringsspaltung in Lösung, in Gleichung 13 eingesetzt und man erhält die Quantenausbeute für die Cycloreversion in der Polymermatrix. In den folgenden Kapiteln werden die benötigten Variablen wie hier bereits beschrieben erwähnt.

Absorptionsänderung: ΔOD

Flächenextinktionskoeffizient: ε [cm^2 / mol]

Bestrahlungsdauer: t [s]

Intensität: I_0 [$\text{J} / \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$]

$$\text{Gleichung 10} \quad \Delta F_D = \frac{\Delta OD}{\varepsilon}$$

$$\text{Gleichung 11} \quad F_{D,Cyclo} = \frac{\Delta F_D}{2 \cdot t}$$

ΔF_D = Änderung der Flächenkonzentration (Monomer) [mol / cm^2];

$\Delta F_{D,Cyclo}$ = Änderung der Flächenkonzentration (Cyclobutanring) pro sek [$\text{mol} / \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$]

Die Photonendichte, welche aufgrund der vorherigen Annahmen gleich der von den Cyclobutanring-Molekülen absorbierten Photonenanzahl ist, wird ähnlich der Anzahl der emittierten Photonen n_{Photonen} berechnet:

$$\text{Gleichung 12} \quad d_{\text{Photonen}} = \frac{I_0}{E_{\text{gesamt}} \cdot N_A}$$

d_{Photonen} = Photonendichte [$\text{mol} / \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$]

Berechnung der Quantenausbeute:

$$\text{Gleichung 13} \quad \text{Quantenausbeute} = \frac{F_{D,Cyclo}}{d_{\text{Photonen}}}$$

Für alle folgenden Berechnungen in der vorliegenden Arbeit werden die beiden vorangegangenen Lösungsansätze verwendet um die Quantenausbeuten in Lösung und in Polymermatrix zu bestimmen.

2.3.4 Berechnung des Zwei-Photonen-Querschnittes

Wie schon bei der SPA induzierten Cycloreversion erwähnt, werden in dieser Arbeit die TPA-Querschnitte sowohl in Lösung als auch in Polymermatrix bestimmt. In diesem Kapitel wird nun im Allgemeinen erklärt wie die Berechnung der Werte durchgeführt wird.

Die TPA induzierte Spaltung wird mit einem Q-switched Nd:YAG-Pulslaser der Firma Coherent (Infinity 40-100) durchgeführt. Die Wellenlänge (532 nm), die Frequenz (20 Hz) und die Pulslänge (3 ns) werden für alle Experimente beibehalten. Die Lösungen werden während der Bestrahlung stetig gerührt und die Weglänge beträgt unverändert 1 cm (Quarzglasküvette).

Für die Berechnung des TPA-Querschnittes muss generell die folgende Annahme gemacht werden: SPA Quantenausbeute ist gleich TPA Quantenausbeute^[33].

Um die Anfangsgeschwindigkeit der Cycloreversion zu erhalten, wird die Änderung der Monomerkonzentration gegen die tatsächliche Belichtungszeit aufgetragen. Die tatsächliche Belichtungszeit resultiert damit aus der Pulsanzahl und der Pulslänge. Die Berechnung des TPA-Querschnittes bezieht sich immer auf das tatsächlich belichtete Volumen der Lösung, d.h. der Laserstrahldurchmesser ist von entscheidender Bedeutung. Die Belichtungen werden immer in 1 cm Quarzglasküvetten durchgeführt. Da alle Experimente, welche TPA Prozesse beinhalten nur mit einer Wellenlänge durchgeführt werden, kann die Energie für ein Photon bei 532 nm vorab zu $E_{\text{Photon}} = hv = 3,7 \cdot 10^{-19} \text{ J / Photon}$ berechnet werden. In den folgenden Kapiteln werden zur Berechnung die wichtigen Parameter angegeben, welche wie hier für die mathematische Betrachtung aufgelistet sind.

Laserstrahldurchmesser:	d [cm]
Ansatzvolumen:	V [mL]
Anfangskonzentration der Lösung:	c_0 [mmol / L]
Anfangsgeschwindigkeit der Cycloreversion:	v_0 [$\Delta\text{OD} / \text{sek}$]
Extinktionskoeffizient:	ϵ [mol / L cm^{-1}]
Pulsintensität:	P_p [mJ]
Ein-Photon-Quantenausbeute:	$\Phi_{\text{SPA, Lösung}}$

Berechnung der Photonendichte F :

$$\text{Gleichung 14} \quad I = \frac{P_p}{\text{Pulslänge}} \left[\frac{mJ}{ns} = 10^6 J/s \right]$$

$$\text{Gleichung 15} \quad P = \frac{I}{E_{\text{Photon}}} \left[\frac{J/s}{J/\text{Photon}} = \text{Photon}/s \right]$$

$$\text{Gleichung 16} \quad F = \frac{P}{A} \left[\frac{\text{Photon}/s}{\text{cm}^2} = \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 s} \right]$$

I = Laserintensität; P = Photonenanzahl pro Sekunde; A = Laserstrahlfläche

Anfangsanzahl Cyclobutanringe pro cm^3 :

$$\text{Gleichung 17} \quad n_{\text{Cyclo,Anfang}} = c_0 \cdot 10^6 \cdot N_A$$

Der im Folgenden verwendete Begriff der „effektiven Sekunde“ beschreibt die tatsächliche Belichtungsdauer der Probe. Bei der Dauer von einer Sekunde bei einem Puls laser resultiert aus 20 Pulsen a 3 ns eine effektive Belichtungsdauer von 60 ns. Eine effektive Belichtung der Probe für die Dauer von einer Sekunde entspricht demnach 192,9 Tagen.

Anzahl gespaltener Cyclobutanringe pro effektiver Sekunde:

$$\text{Gleichung 18} \quad n_{\text{Cyclo,eff}} = \frac{\nu_0 \cdot V \cdot 10^{-3} \cdot N_A}{\varepsilon \cdot 2}$$

Anzahl gespaltener Cyclobutanringe pro effektiver Sekunde und Reaktionsvolumen:

$$\text{Gleichung 19} \quad n_{\text{Cyclo}} = \frac{n_{\text{Cyclo,eff}}}{r^2 \cdot \pi \cdot l}$$

Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt:

$$\text{Gleichung 20} \quad \sigma = \frac{n_{\text{Cyclo,Anfang}}}{\Phi_{\text{TPA}} \cdot F^2 \cdot n_{\text{Cyclo}}}$$

Der Wert des Zwei-Photonen-Querschnittes σ wird in der Einheit „Goepfert-Mayer“ angegeben ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{Photon}$).

Die Bestimmung des TPA-Querschnittes in Polymermatrix basiert auf der vorangegangenen Berechnung in Lösung und der schon vorgestellten Berechnung der SPA Quantenausbeute in Polymermatrix. Die Lasereinstellungen bleiben unverändert, alle variablen Parameter werden dem jeweiligen Experiment zugeordnet und aufgeführt. Die Berechnung basiert auf der Verwendung von Flächenkonzentrationen, dem entsprechend werden die Daten über die Filme auch detailliert bestimmt und erwähnt. Für die mathematische Betrachtung gelten folgende Parameter:

Verhältnis PMMA / Dimer:	$Ver_{P/D}$ [mg / mg]
Filmgewicht:	g_F [mg]
Filmfläche:	F_F [mm ²]
Molmasse Molekül:	M [g / mol]
Laserstrahldurchmesser:	d [cm]
Anfangsflächenkonzentration Cyclobutanringe:	F_{Cyclo} [mol / cm ²]
Anfangsgeschwindigkeit der Cycloreversion:	v_0 [ΔOD / sek]
Flächenextinktionskoeffizient:	ε [cm ² / mol]
Pulsintensität:	P_P [mJ]
Ein-Photon-Quantenausbeute:	$\Phi_{SPA, Film}$

Die Photonendichte F wird wie in Gleichung 16 gezeigt berechnet. Aus einem definierten Filmstück (mm²), dem Gewicht und der Mischungszusammensetzung des Filmstückes, sowie dem Molekulargewicht des Dimers erhält man die Anfangsflächenkonzentration F_{Cyclo} .

Anfangsflächenkonzentration Cyclobutanringe pro cm²:

Gleichung 21
$$F_{Cyclo, Anfang} = F_{Cyclo} \cdot N_A$$

Anzahl gespaltener Cyclobutanringe pro effektive Sekunde:

Gleichung 22
$$n_{Cyclo, eff} = \frac{v_0 \cdot N_A}{\varepsilon \cdot 2}$$

Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt:

Gleichung 23
$$\sigma = \frac{n_{Cyclo, eff}}{\Phi_{TPA} \cdot F^2 \cdot F_{Cyclo, Anfang}}$$

Da für den Nachweis der TPA induzierten Spaltung mehrere Experimente bei verschiedenen Pulsintensitäten nötig sind, ist es möglich die TPA-Querschnitte bei verschiedenen Pulsintensitäten zu berechnen. Die Ergebnisse werden zeigen, dass, wie in der Theorie beschrieben, keine Abhängigkeit des TPA-Querschnittes von der Pulsintensität besteht.

2.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer wirkstoffbasierten Behandlung des Nachstars und die Weiterentwicklung eines photochemisch aktivierbaren wirkstoffbeladenen Polymers. Wie schon erwähnt hat die aktuelle Forschung auf dem Gebiet der Nachstarprävention noch keine entscheidende Entwicklung in der getriggerten Wirkstofffreisetzung gezeigt, die bisherigen Wirkstofffreisetzungen basieren grundsätzlich nur auf dem Prinzip des „sustained drug release“^[46, 47].

An der Philipps Universität Marburg wurden bereits mehrere Arbeiten auf dem neuen Gebiet erfolgreich beendet. Die hier vorgestellte Arbeit soll nahtlos an die vorangegangenen Arbeiten anschließen und die Forschung dem Ziel der getriggerten wirkstoffbasierten Nachstarbehandlung näher bringen.

Die im Folgenden vorgestellten Systeme machen sich die, in den vorangegangenen Kapiteln erklärten Eigenschaften der Dimerisierung des Cumarins und dessen TPA induzierter Spaltung zu Nutze. Nach der Implantation der IOL in das Auge ist es primär wichtig, dass sich das Auge wieder regenerieren kann. Wird zu diesem frühen Zeitpunkt schon ein Zellwachstum hemmender Wirkstoff verabreicht, kann die Heilung nur erschwert stattfinden. In Konsequenz dazu muss der Wirkstoff erst Wochen nach der Operation, oder eben erst wenn nötig, freigesetzt werden können. Um keinen weiteren operativen Eingriff vornehmen zu müssen, sollte der Wirkstoff also mit dem Implantieren der IOL in das Auge eingebracht werden. Es bietet sich an, das Material der IOL chemisch so zu modifizieren, das ein Wirkstoffdepot in der IOL entsteht, das mit in das Auge eingesetzt wird. Die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes kann nun, aufgrund der Lichtdurchlässigkeit des Auges, mittels Photochemie ausgelöst werden. Photochemisch aktive Systeme sind z. B. Cyclobutanringe, die schon während der Synthese photochemisch aufgebaut werden, z. B. mit Cumarinderivaten. Die Spaltung solcher Cyclobutanringe findet normalerweise im UV-Licht statt, es besteht allerdings die Möglichkeit die Spaltung auch über einen TPA-Prozess zu induzieren. Im speziellen Fall ist das für die Anwendung im Auge daher geeignet, da man sich mit der Behandlung im sichtbaren Spektrum bewegt. Abbildung 2 zeigt die Problematik der Absorption der Hornhaut im UV/Vis-Bereich und die experimentelle Lösung der Freisetzung des Wirkstoffes in der implantierten IOL. Die Verwendung zweier Laserstrahlen mit einer kurzen Brennweite ermöglicht es, die notwendige hohe Laserintensität auf der Retina zu minimieren.

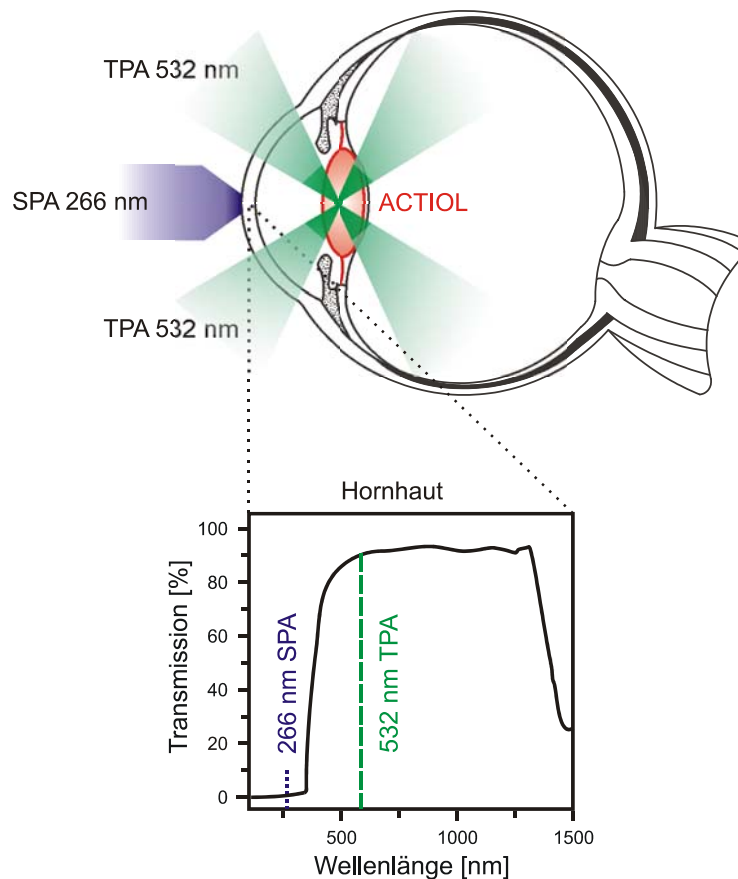


Abb. 2 Schematische Darstellung der photochemischen Wirkstofffreisetzung im Auge. UV/Vis-Spektrum der Hornhaut.

Die vorgelegte Arbeit unterteilt sich in vier Teilgebiete

- Die Weiterführung der Experimente und Analyse des mit Heptanoyl-5-fluoruracil (H5FU) beladenen Copoly-(n-butylmethacryl-co-methacryloylcumarin)(H5FUPBMAOC)^[48] zur Verwendung als IOL-Material mit der Möglichkeit gezielt photochemisch den Wirkstoff zur Behandlung des Nachstars freizusetzen.
- Die Synthese und die Charakterisierung von cumarinbasierten photochemischen Linkersystemen für die Anbindung von Wirkstoffen an verschiedene Trägermaterialien und ihre photochemisch induzierte Abspaltung.
- Die Entwicklung eines photochemisch aktivierbaren Copolymers, welches mit verschiedenen Wirkstoffen beladen werden kann zur Verwendung in der Ophthalmologie.
- Der Nachweis der prinzipiellen Wirksamkeit der photochemisch freigesetzten aktiven Wirkstoffe an in vitro Zellversuchen.

2.4.1 Monofunktionales Copolymer (H5FUPBMAOC)

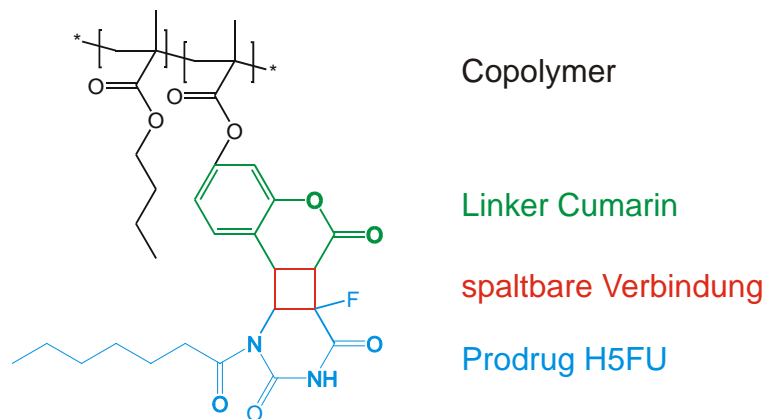


Abb. 3 Struktur von H5FUPBMAOC.

Das Polymer soll in diversen Experimenten auf seine Anwendbarkeit als IOL-Material hin untersucht werden. Wichtig hierfür ist z. B. die Möglichkeit der wiederholten Freisetzung aus der Polymermatrix um eine Mehrfachbehandlung gewährleisten zu können. Die Freisetzung über TPA in Polymermatrix und der anschließende Nachweis der Diffusion des Wirkstoffes soll ein weiterer Schritt zum Ziel der Anwendbarkeit hin sein. Die Synthese des beladenen Polymers erfolgt analog der von Herrn Dr. Kreiling erarbeiteten Synthese, unter Abänderung der Parameter, so dass eine möglichst hohe Beladung mit H5FU erreicht wird^[48].

2.4.2 Photochemische Linkersysteme

Drei auf Cumarin basierende Linkersysteme werden vorgestellt und deren photochemische Eigenschaften bestimmt. Diese Linkersysteme eignen sich zum Anbinden von verschiedenen Wirkstoffen an Funktionspolymere. Die Freisetzung dieser Wirkstoffe kann zu gegebenen Zeitpunkt durch einen SPA oder TPA Prozess induziert werden. Für spätere Anwendungen soll es möglich sein die vorgestellten Linkersysteme nicht nur an Polymere zu binden, sondern auch an andere Trägermaterialien wie magnetische Nanopartikel. Im Speziellen wird die Weiterentwicklung beziehungsweise Verbesserung der vorgestellten Behandlungsstrategie des Nachstars durch die neuen Linkersysteme vorangetrieben.

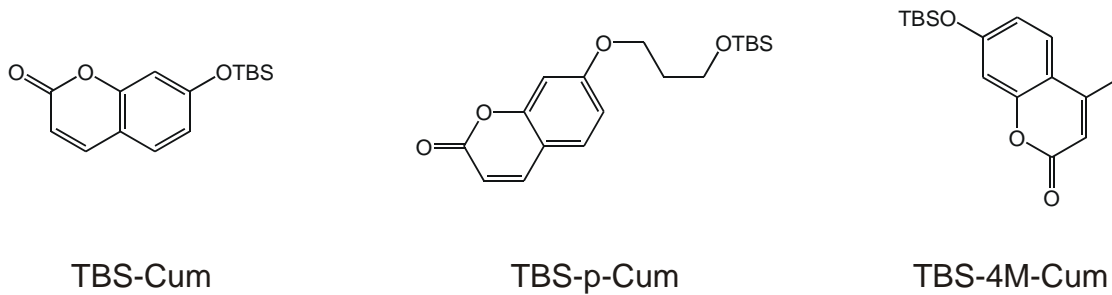


Abb. 4 Strukturen der drei synthetisierten Coumarinderivate.

Wichtig für die spätere Anwendung, ist die SPA Quantenausbeute und der TPA-Querschnitt in Lösung und Polymermatrix, da diese Auskunft über die Freisetzung des Wirkstoffes geben. Die Bestimmung dieser photochemischen Parameter wird in diesem Teil durchgeführt.

2.4.3 Multifunktionales Copolymer

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich über das bereits Gesagte hinaus auch mit dem Einsatz der vorgestellten Linkersysteme in einem Polymer. Die neuartige Synthese des Polymers und die anschließende Beladung mit Wirkstoff ist Teil dieser Arbeit. Der wichtige Nachweis der induzierten Freisetzung der Wirkstoffkonjugate durch SPA und TPA stellt den Abschluss der Arbeit dar, und ist Grundlage für weitere erfolgreiche Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der gezielten medikamentösen Nachstarbehandlung. Des Weiteren eröffnen die vorgestellten Funktionspolymere eine neuartige medizinische Behandlung durch gezielte photochemische Wirkstofffreisetzung.

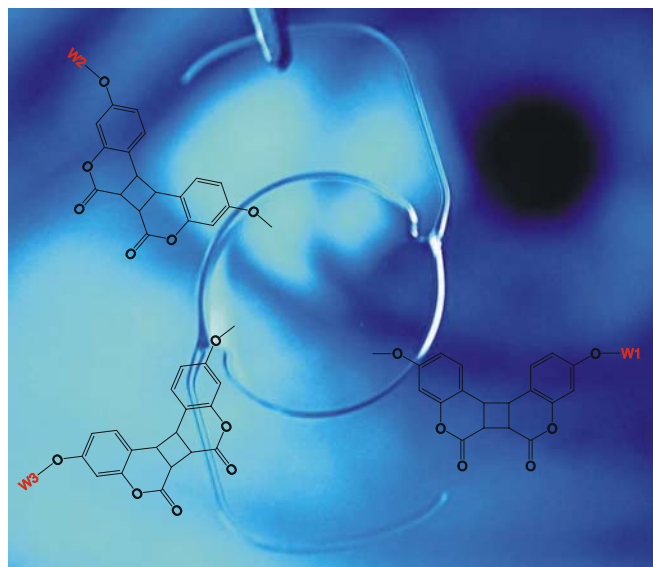


Abb. 5 Visionäre Darstellung der multifunktionalen IOL mit anhängenden photochemischen Linkersystemen (W_x = Wirkstoffe)

2.4.4 In vitro Zellversuche

Zum Abschluss der Experimente mit dem monofunktionalen Copolymer H5FUPBMAOC soll der Nachweis der Wirksamkeit des Polymers in vitro gezeigt werden. Einhergehend mit dem Nachweis der Wirksamkeit kann die Biokompatibilität nachgewiesen werden. Die Zelltests sind im Arbeitskreis Behr eine etablierte Methode und werden an unproblematisch kultivierbaren Tumorzellen eines Bauchspeicheldrüsenkrebs durchgeführt.

An in vitro Zellversuchen wird ebenfalls die Wirksamkeit der photochemisch freigesetzten Wirkstoffe aus dem multifunktionalen Copolymer nachgewiesen und durch eine chemisch etablierte Nachweismethode verifiziert.

3 MONOFUNKTIONALES COPOLYMER (H5FUPBMAOC)

Wie in der Zielsetzung für diese Arbeit bereits erwähnt wird sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Weiterführung der Forschungsarbeit von Herrn Dr. Kreiling^[48] befassen. Das untersuchte wirkstoffbeladene Copolymer wird in Abbildung 3 (Kapitel 2.4.1) vorgestellt und im Folgenden erklärt. Der Hauptanteil des durch die Copolymerisation entstehenden Polymers ist n-Butylmethacrylat, welches durch seine Eigenschaften den Glaspunkt des Copolymers absenkt, was für die spätere Verarbeitung von entscheidendem Vorteil ist. Das Linkersystem besteht aus einer polymerisierbaren Gruppe, welche über eine Esterbindung an den photochemischen Linker (Cumarin) gebunden ist. Durch eine polymeranaloge photochemische Beladung wird der Wirkstoff (5FU) über einen Cyclobutanring, der photochemisch gespalten werden kann, an das Polymer angebunden. Um eine Verbesserung der Diffusionseigenschaften des Wirkstoffes 5FU im Polymer zu erhalten, wird 5FU zu H5FU derivatisiert. Einhergehend mit der Erhöhung der Diffusion erhöht sich auch drastisch die Löslichkeit, was für die Beladung von großer Wichtigkeit ist, da ein sehr großer Überschuss von H5FU (Prodrug) nötig ist. Da 5FU in der Augenbehandlung bereits als anerkanntes Medikament verwendet wird, ist dies bei der späteren Zulassung für die Anwendung des zu entwickelnden Polymers ein entscheidender Vorteil.

Auch die Derivatisierung von 5FU zu so genannten Prodrugs ist in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben und analysiert worden^[49-51]. Als Prodrug bezeichnet man chemisch modifizierte nicht mehr wirksame Wirkstoffe, die, eingebracht in den Körper, an entsprechender Stelle wieder zum Wirkstoff metabolisiert werden. Es werden bereits erste Versuche unternommen 5FU über ein „sustained release“-System im Körper freizusetzen^[52, 53].

In der folgenden Zusammenfassung werden die entscheidenden Experimente dieser Arbeit vorgestellt und erläutert.

Die wichtigste Aussage nach der Wirkstoffbeladung des Copolymers ist der Beladungsgrad des Copolymers. Diese wird beispielhaft anhand einer Syntheserieihe bestimmt und gibt Auskunft über die Effektivität der Beladung. Das dargestellte beladene Copolymer wird darüber hinaus auf die Fähigkeit hin, Wirkstoff photochemisch mittels SPA und TPA freisetzen zu können, untersucht. Die erfolgte photochemische Freisetzung des Wirkstoffes in Lösung wird auf der HPLC bestätigt. Der Nachweis, dass eine TPA induzierten Cycloreversion stattgefunden hat, kann über die doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Pulsintensität geführt werden. Da die Behandlung des Nachstars mittels photochemischer Freisetzung des Wirkstoffes wiederholbar sein sollte, ist

es notwendig die Mehrfach-Freisetzung zu nachweisen (Multistep). Da das Polymer als IOL verarbeitet wird, muss gewährleistet sein, dass die Wirkstoffbindung die Verarbeitungsparameter übersteht und anschließend noch aktiv bleibt. Hierzu wird eine Modell-IOL aus einem Polymerblend im „compression molding“-Verfahren hergestellt und anschließend der Wirkstoff daraus freigesetzt. Da die Hornhaut nicht UV durchlässig ist, muss bewiesen werden, dass auch die Freisetzung mittels TPA in Polymermatrix möglich ist und auch hier der Wirkstoff anschließend ausdiffundiert. Ein Langzeittest des Polymers und ein Aktivitätsnachweis nach dieser langen Zeit runden die Ergebnisse ab.

Es soll gleich am Anfang darauf hingewiesen werden, dass der wichtigste Syntheseschritt, der der Beladung ist, da in diesem Schritt die Ursache für die Probleme bei den folgenden Experimenten liegt.

Während der Beladung mit UV-Licht laufen parallel zu der Cycloaddition von H5FU und Cumarin mehrere Nebenreaktionen ab, welche zu verschiedensten Problemen führen. Diese Nebenreaktionen seien hier kurz erwähnt, wobei deren Auswirkungen später an entsprechender Stelle erläutert werden. Ein Großteil der Nebenreaktionen der Polymerkette unterliegt den Photoabbaureaktionen vom Norrish Typ I und II. Des Weiteren wird durch Photolyse die Esterbindung im Copolymer gebrochen und ein Großteil der Cumarinlinker dimerisiert miteinander, wodurch es zur Vernetzung des Polymers kommt.

3.1 UV/Vis und HPLC Kalibrierung von 5FU und H5FU

3.1.1 Erstellung einer Kalibriergeraden von 5FU

Zur quantitativen Analyse von 5FU, welches bei photoinitierten Cycloreversionsreaktionen aus dem wirkstoffbeladenen Polymer freigesetzt wird, erstellt man eine Kalibriergerade für 5FU mittels HPLC und UV/Vis-Spektroskopie.

Es werden sechs verschiedene Standardlösungen hergestellt und mittels HPLC (Methode: SH6Bfrei, siehe Kapitel 9.1) untersucht, wobei jeweils ein Volumen von 5 μL injiziert wird. Die Retentionszeit für 5FU liegt bei 2 min. Die Peakfläche (DAD bei 260 nm) wird in Abhängigkeit der Injektionsmenge an 5FU aufgetragen und man erhält eine Proportionalitätskonstante von $k_{5\text{FU}} = 341,24 \text{ mAU s nmol}^{-1}$.

Die Kalibriergerade für 5FU im UV/Vis-Spektrometer ergibt einen Extinktionskoeffizienten bei 265 nm von $\epsilon_{265} = 7368 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Folgende Abbildung zeigt das Spektrum von 5FU in ACN.

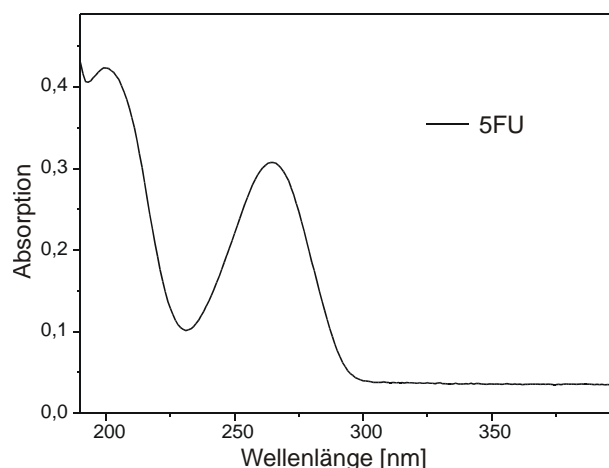


Abb. 6 UV/Vis-Spektrum von 5FU in ACN.

Da für die folgenden Messungen H5FU nur in hydrolysierten Form im UV/Vis-Spektrometer gemessen wird, ist der Extinktionskoeffizient von 5FU eine wichtige Kenngröße.

3.1.2 Erstellung einer HPLC-Kalibriergeraden für H5FU

Die durch Belichtung freigesetzten Wirkstoffmoleküle liegen zunächst noch als Derivate / Prodrugs vor (H5FU). Für die Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmenge ist es also von großer Bedeutung, auch für dieses Molekül, eine Kalibriergeraden zu erstellen.

Da davon auszugehen ist, dass sich in dem aus 5FU synthetisierten H5FU noch Rückstände von 5FU befinden, und dass das in der Standardlösung befindliche in Acetonitril gelöste H5FU aufgrund von Wasserspuren im Lösungsmittel bis zum Zeitpunkt der HPLC-Messung teilweise zu 5FU hydrolysiert, kann eine Kalibriergerade für H5FU nicht durch eine einmalige HPLC-Messung jeder Standardlösung erstellt werden. Ein zweiter wichtiger Faktor ist die Lösungsmittelzusammensetzung bei der HPLC Messung, denn auch hier wird Wasser verwendet und es kommt während der Messung zur Hydrolyse von H5FU.

Die sechs Standardlösungen werden daher nach der ersten HPLC-Messung mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und nach ca. 96 h, nach vollständiger Hydrolyse des H5FU, erneut mittels HPLC (Methoden: SH6Bfrei, Kapitel 9.1) gemessen.

Die Retentionszeit des H5FU beträgt bei der verwendeten HPLC-Methode (Methoden: SH6Bfrei, Kapitel 9.1) 20,5 min. Bei den vollständig hydrolysierten Proben wird ein Injektionsvolumen von 10 μ L eingesetzt, da die Konzentrationen der Proben durch die Verdünnung halbiert werden.

Die Berechnung einer Kalibriergeraden für den HPLC-Standard von H5FU ist unter der Annahme möglich, dass die Hydrolyse von H5FU zu 5FU vollständig verläuft (Nachweis: In der HPLC-Analyse ist kein H5FU mehr zu sehen).

Daraus lässt sich schließen, dass die Mengenänderung von 5FU im Zeitraum zwischen der 1. und der 2. HPLC-Messung der negativen Mengenänderung von H5FU im gleichen Zeitraum equivalent ist und durch folgende Gleichung beschrieben werden kann:

$$\text{Gleichung 24} \quad \Delta n(5FU)_{t_2-t_1} = -\Delta n(H5FU)_{t_2-t_1}$$

t_1 : Zeitpunkt der 1. HPLC-Messung

Für die Proportionalitätskonstante k_{H5FU} ergibt sich somit folgende Beziehung:

$$\text{Gleichung 25} \quad \Delta n(H5FU)_{t_2-t_1} = k_{H5FU} \cdot \Delta F_{t_2-t_1}^{H5FU}$$

$\Delta F_{t_2-t_1}^{H5FU}$: Peakflächendifferenz von H5FU zwischen 1. und 2. HPLC-Messung

Durch Einsetzen von (25) in (24) erhält man:

$$\text{Gleichung 26} \quad k_{H5FU} = -\frac{\Delta F_{t_2-t_1}^{H5FU}}{\Delta n(5FU)_{t_2-t_1}}$$

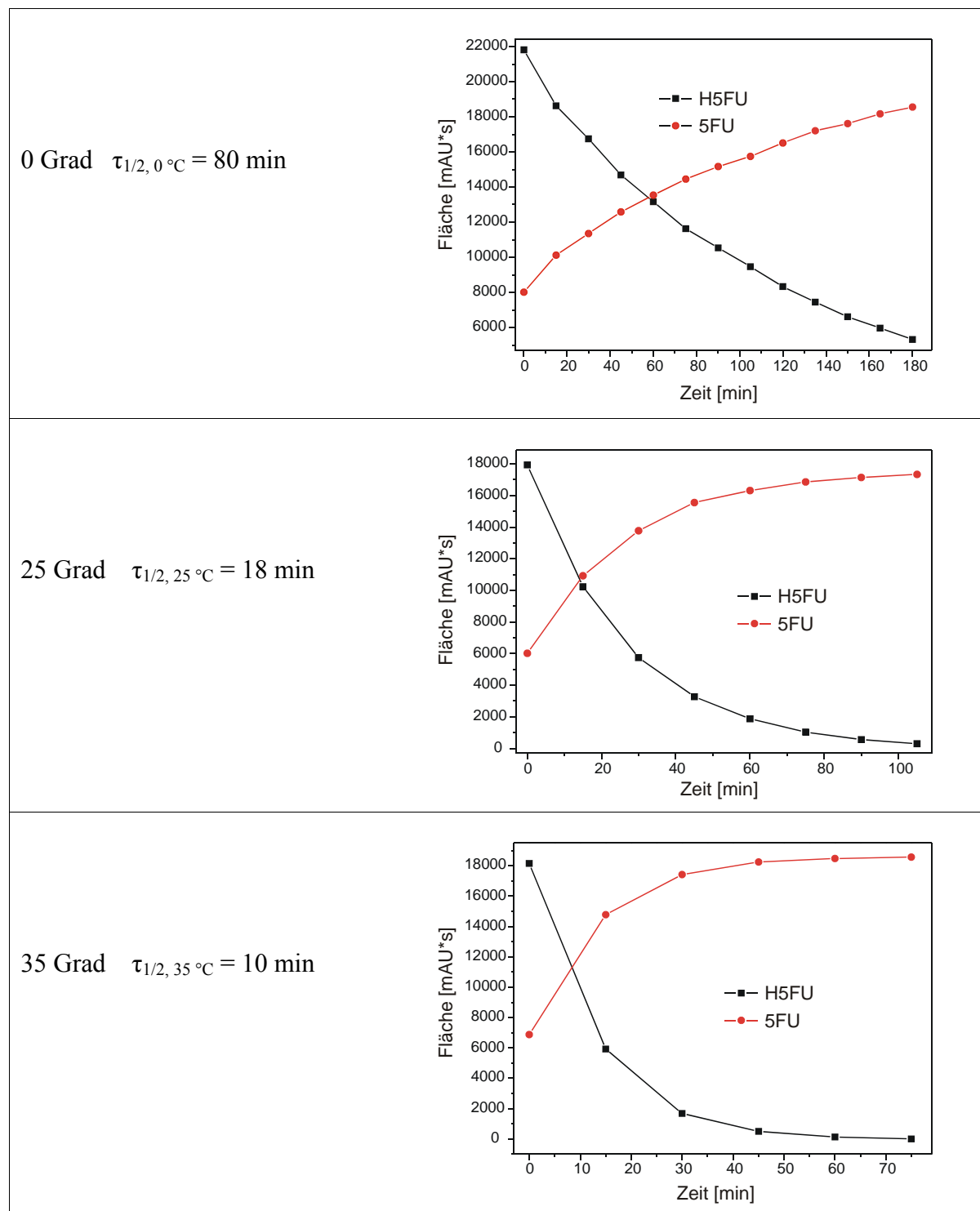
$\Delta F_{t_2-t_1}^{H5FU} / \text{mAU} \cdot \text{s}$	$\Delta n(5FU)_{t_2-t_1} \text{ (nmol/5}\mu\text{L)}$	$k_{H5FU} / \text{mAU} \cdot \text{s} \cdot (\text{nmol})^{-1}$
-424,7	0,83	511,69
-443,9	0,81	548,02
-933,2	1,7	548,94
-2405,1	4,27	563,26
-4989,0	8,9	560,56

Tab. 1 H5FU Proportionalitätskonstanten bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Diese Untersuchungen werden an fünf verschiedenen Stammlösungen unterschiedlicher Konzentrationen vorgenommen. Aus den fünf Ergebnissen für die Proportionalitätskonstante erhält man einen Mittelwert von $k_{H5FU} = 546,49 \text{ mAU s nmol}^{-1}$.

3.2 Hydrolyseeigenschaften von H5FU

Um bessere Diffusionseigenschaften von 5FU im Polymer zu erhalten, wird eine Derivatisierung von 5FU zu H5FU durchgeführt. Diese „Prodrug“ muss nach der Diffusion aus dem Polymer in das Kammerwasser wieder zu 5FU hydrolysieren. In diesem Abschnitt soll die Hydrolyse von H5FU bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden.



Tab. 2 Hydrolysekinetik von H5FU in Wasser bei drei Temperaturen (0 °C, 25 °C, 35 °C).

Hierzu werden für jeden Versuch 72,6 mg H5FU in 3 mL ACN gelöst, davon 100 μL abgenommen und 1 : 10 mit ACN für die Analyse mittels HPLC verdünnt. Die restlichen 2,9 mL werden mit 27 mL Wasser verdünnt, 30 sec gerührt, filtriert und in temperierte Eppendorf-Caps aufgeteilt. Die Lösungen aus den Eppendorf-Caps werden dann in bestimmten Zeitabständen an der HPLC vermessen. Dieser experimentelle Ablauf wird für drei Temperaturen (0 °C, 25 °C, 35 °C) durchgeführt.

In Tabelle 2 sind die Verhältnisse von H5FU und 5FU in Flächeneinheiten gegen die Hydrolysezeit aufgetragen. Wie erwartet nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit mit der Erhöhung der Temperatur zu, was sich in der Zunahme der Halbwertszeit von H5FU widerspiegelt.

An den Ergebnissen ist eindeutig zu erkennen, dass die Hydrolyse von H5FU zu 5FU hinreichend schnell abläuft, damit bei einer Körpertemperatur von 37 °C sofort nach der Freisetzung aus dem Polymer und der anschließenden Diffusion in das Kammerwasser, das 5FU zur Therapie des Zellwachstums zur Verfügung steht.

3.3 Bestimmung des Beladungsgrades von H5FUPBMAOC

Da die Masse einer IOL begrenzt ist und eine bestimmte Anzahl an Behandlungen möglich sein muss, ist die Bestimmung des Beladungsgrades des Polymers mit Wirkstoff für die spätere Anwendung essentiell. Die Berechnung der möglichen Behandlungen pro IOL wird am Ende dieses Kapitels einen Aufschluss darüber geben, ob die erhaltenen Beladungen ausreichend sein werden.

3.3.1 UV/Vis-Standard von PBMAOC

Für die folgende Berechnung des Beladungsgrades von H5FUPBMAOC muss zunächst eine Kalibrierung des PBMAOC, gelöst in Chloroform, vorgenommen werden, wozu sechs in Chloroform gelöste PBMAOC Proben unterschiedlicher Konzentration im UV/Vis-Spektrometer gemessen werden.

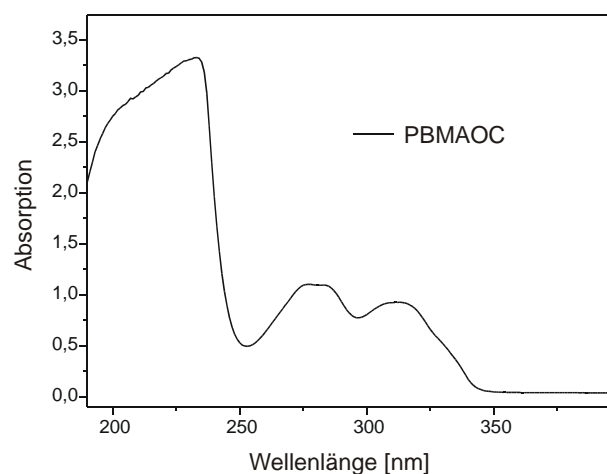


Abb. 7 UV/Vis-Spektrum von PBMAOC in Chloroform.

Die charakteristische Doppelbande im Bereich von $\lambda = 250\text{-}350\text{ nm}$ begründet sich in dem konjugierten π -System des am Polymer gebundenen Cumarins. Die charakteristische Bande bei 314 nm wird in den folgenden Auswertungen herangezogen um die Cumarinkonzentration im Polymer zu bestimmen. Die starke Absorption unterhalb von $\lambda = 250\text{ nm}$ wird durch das Polymergerüst verursacht.

Sechs verschiedene Standardlösungen von PBMAOC in Chloroform, mit definiertem Gewichtsanteil, werden vermessen und die Absorption bei 314 nm aufgetragen.

Für die Absorption bei $\lambda = 314\text{ nm}$ ergibt sich ein Proportionalitätskonstante von $k_{\text{PBMAOC}} = 0,0049\text{ L mg}^{-1}$.

3.3.2 SPA in Lösung

Die SPA induzierte Wirkstofffreisetzung geht einher mit der Bestimmung des Beladungsgrades des verwendeten H5FUPBMAOC.

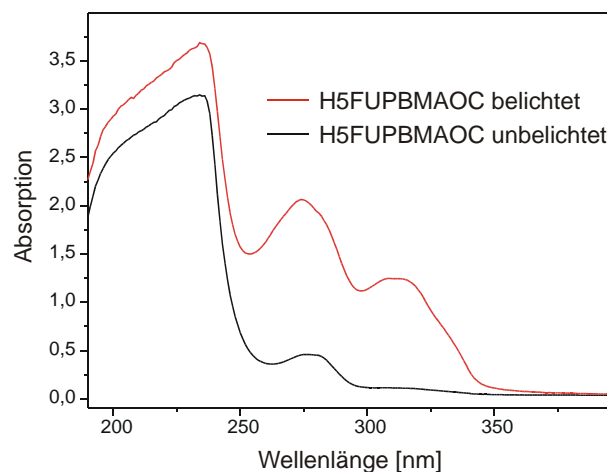


Abb. 8 UV/Vis-Spektren von belichtetem und unbelichtetem H5FUPBMAOC.

Für diese Untersuchung wird eine Lösung des beladenen Polymers von $2,8\text{ mg}$ in 5 mL Chloroform bzw. $1,68\text{ mg} / 3\text{ mL}$ hergestellt. Von dieser Lösung werden 3 mL in eine Quarzküvette überführt und mit einem Rührfisch versehen. Die Küvette wird inklusive Rührer in das Fluoreszenzspektrometer gestellt und dort jeweils für bestimmte Zeiträume bei einer Wellenlänge von 266 nm belichtet. Nach jedem Belichtungszeitraum wird ein UV/Vis-Spektrum der Polymerlösung aufgenommen und somit die Konzentration der freigesetzten Cumarinbanden aufgezeichnet. Durch die Cycloreversion entsteht wieder das konjugierte π -System im Cumarin und einhergehend damit die Bande bei 314 nm (Abbildung 8).

Die über die Belichtungszeit zunehmende Absorptionsbande bei 314 nm wird in der folgenden Abbildung 9 dargestellt. Man kann deutlich das Abflachen der Kurve erkennen, was auf ein Maximum der Freisetzung hindeutet. Anhand dieser Messungen kann im Folgenden der Beladungsgrad des Polymers bestimmt werden.

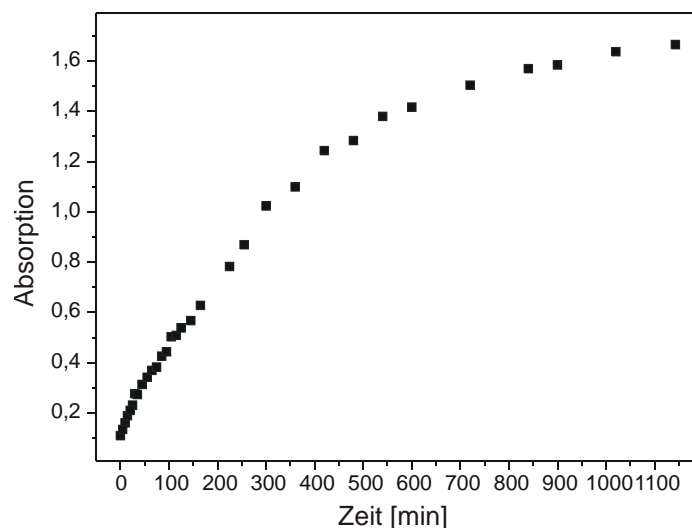


Abb. 9 SPA induzierte Freisetzung in Chloroform, Absorptionzunahme bei 314 nm.

3.3.3 Berechnung des Beladungsgrades

Bei der Synthese des wirkstoffbeladenen Copolymers, kommt es während der Photoreaktion nicht ausschließlich zu Cycloadditionen zwischen dem Cumarin-Linker und H5FU, sondern auch zur Bildung von Cumarin-Cumarin-Dimeren. Des Weiteren kann nicht sichergestellt werden, dass während der Photoreaktion an allen Cumarin-Linkern eine Cycloaddition abläuft.

Im Produkt befinden sich folglich neben wirkstoffbeladenen Cumarin-Seitenketten, unbeladene und dimerisierte Cumarin-Seitenketten in einem unbekanntem Verhältnis.

Für die Summe der Anzahl der Cumarin-Seitenketten gilt:

$$\text{Gleichung 27} \quad n(\text{MAOC})_{\text{gesamt}} = 2 \cdot n(\text{MAOdiCum}) + n(\text{MAOC} - \text{H5FU}) + n(\text{MAOC})_{nr}$$

nr: nicht reagiert

Die für die Wirkstofffreisetzung durch SPA hergestellte H5FUPBMAOC Lösung mit einer Massenkonzentration von 1,68 mg / 3 mL wird vor der Bestrahlung mit einem UV/Vis-Spektrometer vermessen. Zur Berechnung der Konzentration von den im Polymer eingebauten MAOC-Monomeren, die nicht reagiert haben, wird der charakteristische

Absorptionswert bei 314 nm in das Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt. Da der molare Absorptionskoeffizient bei 314 nm für das polymergebundene Cumarin experimentell nicht zugänglich ist, wird näherungsweise der molare Absorptionskoeffizient der Modellverbindung 7-Heptanoyloxycumarin $\epsilon_{314nm} = 8600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet^[48].

$$\text{Gleichung 28 } c(\text{MAOC})_{nr} = \frac{E_{314nm}^{\text{Polymer,NB}}}{\epsilon_{314nm} \cdot 1cm} = \frac{0,11}{8600} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 1,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$E_{314nm}^{\text{Polymer,NB}}$: Absorption der Lösung bei 314 nm nach der Belichtung

Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Anzahl von im Polymer eingebauten nicht reagierten MAOC-Gruppen pro Lösungsmittelvolumen.

Aufgrund des nicht exakt bekannten Einbauverhältnisses von MAOC zu BMA kann die Gesamtkonzentration an Cumarinseitenketten im Copolymer nicht aus der eingewogenen Menge bestimmt werden.

Die Konzentration von MAOC vor der Beladung berechnet sich somit unter zu Hilfenahme des Standards für PBMAOC. Es wird hierbei näherungsweise vorausgesetzt, dass der effektive Massenanteil von H5FU im beladenen Polymer so gering ist, dass bei gleicher Masseneinwaage einer unbeladenen und einer beladenen Polymerprobe Gleichung 27 erfüllt ist.

$$\text{Gleichung 29 } c(\text{MAOC})_{gesamt} = \frac{E_{314nm}^{\text{Polymer,VB}}}{\epsilon_{314nm} \cdot 1cm} = \frac{2,76}{8600} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 3,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$E_{314nm}^{\text{Polymer,NB}}$: Absorption der Lösung bei 314 nm vor der Belichtung

Die Konzentrationen von H5FU und 5FU nach vollständiger Freisetzung werden mittels HPLC (Methoden: SH6Bfrei, Kapitel 9.1) bestimmt. Das Injektionsvolumen beträgt $V_{\text{Inj}} = 50 \mu\text{L}$.

Unter der Annahme einer vollständigen Wirkstofffreisetzung nach der SPA ergibt sich folgende Beziehung:

$$\text{Gleichung 30 } c(\text{MAOC} - \text{H5FU}) = c(\text{H5FU}) + c(\text{5FU})$$

$$\text{Gleichung 31 } c(\text{MAOC} - \text{H5FU}) = \frac{k^{\text{H5FU}} \cdot F_{NF}^{\text{H5FU}} + k^{\text{5FU}} \cdot F_{NF}^{\text{5FU}}}{V_{\text{Injekt}}}$$

F_{NF}^{5FU} : Fläche des 5FU Peaks im HPLC Chromatogramm nach der Freisetzung; F_{NF}^{H5FU} : Fläche des H5FU Peaks im HPLC Chromatogramm nach der Freisetzung

Gleichung 32

$$c(\text{MAOC} - \text{H5FU}) = \left(\frac{521,28}{546,5} \text{ nmol} + \frac{393,42}{341,236} \text{ nmol} \right) \cdot (50 \mu\text{L})^{-1} = 42,14 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$$

Der effektive Beladungsgrad von H5FU ($\alpha_{B_1}^{\text{H5FU}}$) bezogen auf die Anzahl der MAOC-Gruppen vor der Beladung berechnet sich wie folgt:

$$\text{Gleichung 33} \quad \alpha_{B_1}^{\text{H5FU}} = \frac{n(\text{MAOC} - \text{H5FU})}{n(\text{MAOC})_{\text{gesamt}}} = \frac{42,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L}}{3,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L}} = 0,132$$

Es konnten folglich an 13,2 % der im Polymer eingebauten MAOC-Gruppen während der photochemischen Cycloaddition H5FU-Moleküle angekoppelt werden.

Bezogen auf die Anzahl der MAOC-Gruppen, an denen während der Photoreaktion eine Cycloaddition abgelaufen ist, erhält man einen Beladungsgrad von:

Gleichung 34

$$\alpha_{B_2}^{\text{H5FU}} = \frac{n(\text{MAOC} - \text{H5FU})}{n(\text{MAOC})_{\text{gesamt}} - n(\text{MAOC})_{\text{nr}}} = \frac{42,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L}}{(3,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} - 1,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L}} = 0,137$$

Folglich laufen an 86,3 % der reagierenden Cumarin-Linkern unerwünschte Nebenreaktionen, wie zum Beispiel die Dimerisierung von Cumarin, ab.

Zur Überprüfung der oben verwendeten Näherung, dass der effektive Massenanteil von H5FU bezogen auf die eingesetzte Polymermasse nur sehr klein ist, wird dieser wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 35} \quad \frac{m(\text{H5FU})}{m(\text{PBMAOC} - \text{H5FU})} = \frac{(42,14 \cdot 10^{-6} \cdot 3 \cdot 10^{-3}) \text{ mol} \cdot 242,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{1,68 \cdot 10^{-3} \text{ g}} = 0,0182$$

Der effektive Massenanteil beträgt 1,85 % und die Näherung ist daher akzeptabel.

Die maximale Cycloreversionsausbeute ($\alpha_{266\text{nm}}^{\text{C}}$) bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 266 nm ergibt sich zu:

$$\text{Gleichung 36} \quad \alpha_{266\text{nm}}^{\text{C}} = \frac{n(\text{MAOC})_{\text{NF}}}{n(\text{MAOC})_{\text{VB}} - n(\text{MAOC})_{\text{NB}}} = \frac{\Delta E_{314\text{nm}}^{\text{Polymer,NF}}}{E_{314\text{nm}}^{\text{Polymer,VB}} - E_{314\text{nm}}^{\text{Polymer,NB}}}$$

$\Delta E_{314\text{nm}}^{\text{Polymer,NF}}$: Differenz zwischen Absorptionswerten am Anfang der SPA und nach Erreichen des

Sättigungsniveaus

Durch Einsetzen der ermittelten Absorptionswerte in (Gleichung 36) erhält man für α_{266nm}^C :

$$\text{Gleichung 37} \quad \alpha_{266nm}^C = \frac{1,589}{2,7552 - 0,11026} = 0,601$$

Die maximale Cycloreversionsausbeute liegt bei 60,1 %.

Unter der Annahme, dass die Reaktionskinetik der Cumarin-Cumarin-Dimere und der Cumarin-H5FU Gruppen bei der Cycloreversion identisch ist, kann eine 60,1%ige Freisetzung des im beladenen Polymer gebundenen H5FU angenommen werden. Nach Untersuchungen von Chen et al.^[54] zeigt sich, dass bei einer Wellenlänge von 254 nm die Spaltung der Dimere ca. 50-60 % erreicht und sich dann ein Gleichgewicht zwischen Cycloaddition und Reversion einstellt. Dieses Ergebnis bestätigt die in dieser Arbeit experimentell erhaltene maximale Freisetzung.

Mit einem relativen Massenanteil von 1,82 % von H5FU im beladenen Polymer ergibt sich eine maximale Freisetzung von H5FU von 11,1 mg pro 1,0 g des Polymers. Das entspricht nach vollständiger Hydrolyse des freigesetzten H5FU zu 5FU einer maximalen Freisetzung von 5,96 mg 5FU pro 1,0 g Polymer.

Es ist zu analysieren, ob die maximal freigesetzte Menge an 5FU in Bezug auf die Masse des Polymers für eine spätere Anwendung als Wirkstoffdepot in Intraokularlinsen für eine Behandlung des Nachstars ausreichend ist.

Bei einer Masse der Intraokularlinse von ungefähr $m = 50,0$ mg lassen sich durch eine Ein-Photon-Reaktion mit monochromatischem Licht der Wellenlänge $\lambda = 266$ nm maximal ca. 300 μ g 5FU freisetzen.

Betrachtet man den Literaturwert für den LD50 von 5FU für Linsenepithelzellen beim Hasen (RECL), welcher $0,58 \mu\text{g} / \text{mL}^{[55]}$ beträgt, könnten bei ca. 100 μ L Augenkapselsackwasser ausreichend viele wiederholbare Wirkstofffreisetzungen stattfinden.

3.4 SPA induzierte Freisetzung von H5FU

In diesem Abschnitt wird nochmals die Freisetzung von H5FU induziert durch SPA mittels HPLC und UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Ziel ist es, eine Aussage über die unterschiedlichen Abspaltungseigenschaften von Cumarin-Cumarin und Cumarin-H5FU zu erhalten. Hierzu wird eine Lösung von 32,8 mg H5FUPBMAOC in 4,5 mL Chloroform hergestellt und filtriert (PTFE 0,45 μ m). 3 mL dieser Lösung werden in eine Küvette überführt und unter Rühren im Fluoreszenzspektrometer bei 266 nm belichtet.

Von dieser Lösung werden dann in bestimmten Zeitabständen Proben mit einem Volumen von 70 μL genommen, mit 70 μL ACN verdünnt und in der HPLC (Methode: SH6BFrei, 50 μL Injektionsvolumen, siehe Kapitel 9.1) vermessen. Aus den HPLC Proben werden wiederum 50 μL entnommen und für die UV/Vis-Messung mit 330 μL Chloroform verdünnt. Die erhaltenen Peakflächen für H5FU und 5FU aus den HPLC Chromatogrammen werden mit den Proportionalitätskonstanten umgerechnet um eine Mengenangabe zu erhalten. Die UV/Vis-Daten können ebenfalls, wie schon beschrieben, mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten in Konzentrationen umgerechnet werden.

Abbildung 10 zeigt, dass während einer SPA induzierten Wirkstofffreisetzung mehr Cumarin freigesetzt wird als Wirkstoff. Der Grund dieser unterschiedlichen Freisetzung liegt in der polymeranalogen photochemischen Beladung des Polymers. Durch die induzierende Strahlung wird ein Großteil der Cumarinlinkersysteme miteinander über Cycloadditionsreaktionen verbunden.

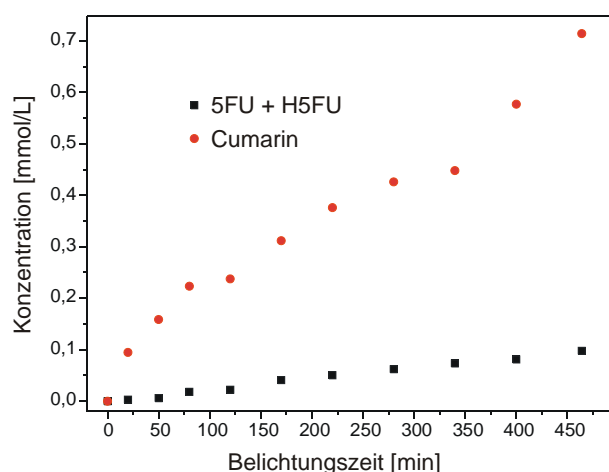


Abb. 10 SPA induzierte Konzentrationsänderung von Cumarinlinker und H5FU.

Da bei der SPA induzierten Freisetzung die Wellenlänge nicht spezifisch nur H5FU freisetzt sondern auch die Cumarindimere spaltet, kommt es zu einer statistischen Verteilung der Spaltung von allen vorhandenen Cyclobutanringen im Polymer. Das resultierende Ergebnis gibt Aufschluss über das Verhältnis zwischen Cumarindimeren und Kreuzdimeren.

Setzt man die Konzentrationsänderungen ins Verhältnis zueinander, wie in Abbildung 11 zu sehen ist, zeigt sich, dass die Spaltung der Cumarindimere bevorzugt ist und sich erst nach einiger Zeit das Verhältnis angleicht. Das Verhältnis zwischen Cumarindimeren und Kreuzdimeren liegt bei ca. 7 : 1, ersichtlich in dem gleich bleibenden Verhältnis der Cycloreversion der Cumarindimere und Kreuzdimere nach 200 min Belichtung.

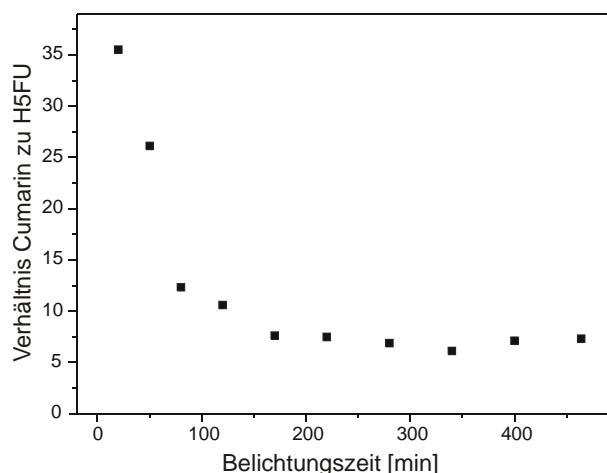


Abb. 11 Verhältnis von freigesetztem Coumarinlinker zu H5FU.

Wie schon eingangs erwähnt, zeigt sich hier deutlich der Nachteil dieser Synthese. Für die spätere Anwendung ist es schwer zu beurteilen, wie viel Energie nötig ist, um eine bestimmte Wirkstoffmenge freizusetzen, da das Verhältnis von Coumarindimer und Kreuzdimer nicht genau bekannt ist, sowie auch deren Spaltungsverhältnis. Für jede Beladung müssten diese Parameter immer wieder genau bestimmt werden.

Die HPLC-Daten zur Freisetzung mittels SPA werden im folgenden Teil der TPA induzierten Wirkstofffreisetzung behandelt, um einen direkten Vergleich zu erhalten.

3.5 TPA induzierte Freisetzung von H5FU in Lösung

3.5.1 Durchführung und Nachweis

Wie schon Kapitel 2.4.1 beschrieben, ist es wichtig den Nachweis zu erbringen, gebundenes Wirkstoffmolekül durch einen TPA Prozess in der Polymermatrix freisetzen zu können.

Für die TPA induzierte Wirkstofffreisetzung werden 24,26 mg H5FUPBMAOC in 3 mL Chloroform gelöst und in einer Quarzglasküvette aufbewahrt. Die Lösung wird während der Belichtung mit dem Puls-Laser gerührt. Die Laserleistungen werden variiert (34,5 mJ, 44 mJ, 55,5 mJ, 70,0 mJ, 80,0 mJ), wobei die Wellenlänge bei 532 nm liegt, die Frequenz 20 Hz und der Strahldurchmesser 5,5 mm beträgt. Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit wird bei jeder Pulsintensität die Lösung für verschiedene Zeiträume belichtet. Die Änderung der induzierten Coumarinkonzentration wird im UV/Vis-Spektrometer gemessen. Als Beispiel werden im folgenden Graphen die Differenzspektren bei 55,5 mJ Pulsintensität aufgetragen. Hierbei ist deutlich eine Zunahme der Coumarinbande mit zunehmender Bestrahlungszeit / -energie zu erkennen. Da die beobachtete Zunahme der Coumarinbande im UV/Vis-Spektrum nicht einher geht mit der Freisetzung des Wirkstoffes, wie es im voran

gegangenen Kapitel der SPA Freisetzung gezeigt wird, wird in diesem Kapitel der Nachweis der Freisetzung des Wirkstoffes mittels HPLC bewiesen.

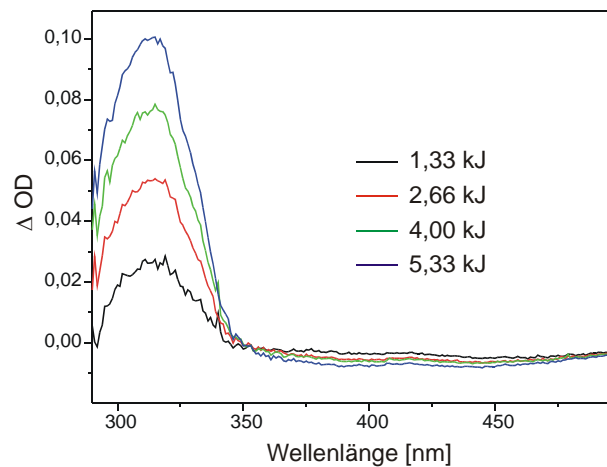


Abb. 12 Differenzspektren einer TPA induzierten Freisetzung in Chloroform mit einer Pulsintensität von 55,5 mJ.

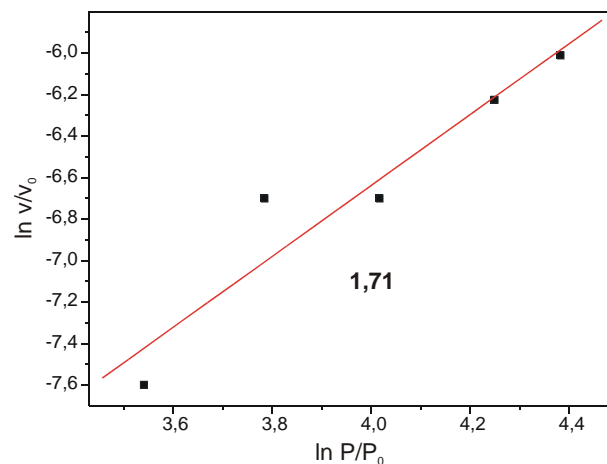


Abb. 13 Doppellogarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Laserleistung

Um den Nachweis führen zu können, dass die Wirkstofffreisetzung tatsächlich über einen Zwei-Photonen-Prozess abgelaufen ist, werden zu jeder Pulsintensität die Anfangssteigungen der Freisetzung ermittelt. Die Logarithmierung der Werte von Anfangssteigung und Pulsintensität und deren anschließende Auftragung sollte nach der im Kapitel 2.3.1 veranschaulichten Herleitung ungefähr eine Steigung von zwei ergeben.

Abbildung 13 weist eine Steigung von 1,71 auf, was grundsätzlich auf einen TPA induzierten Prozess hinweist. Da zu dem Zeitpunkt des Experimentes leider nicht genügend H5FUPBMAOC vorhanden war, wird nur eine Lösung verwendet, was ein Grund für das abweichende Ergebnis der Steigung sein könnte, welche nach der Theorie einen Wert von zwei erreichen sollte.

3.5.2 HPLC-Nachweis

Da der Nachweis der Freisetzung bis jetzt nur anhand der Zunahme der Cumarinbande im UV/Vis durchgeführt wurde, soll in diesem Kapitel auch der tatsächliche Nachweis der Freisetzung beschrieben und diskutiert werden.

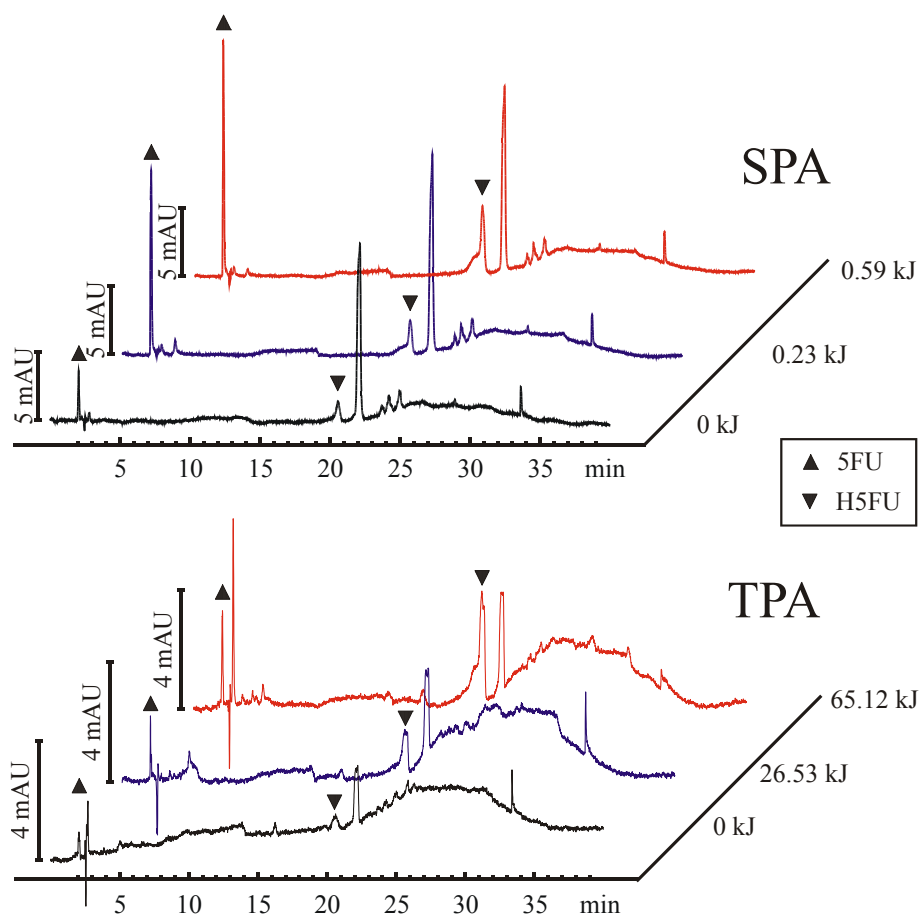


Abb. 14 HPLC-Chromatogramme der SPA und TPA induzierten Wirkstofffreisetzung in Lösung abhängig von der induzierten Gesamtenergie.

Hierzu werden 51,7 mg H5FUPBMAOC in 4 mL Chloroform gelöst und filtriert (PTFE 0,45 μm , Fa. Roth). 3 mL dieser Lösung werden in einer Quarzglasküvette gerührt und verschieden lang mit 67,0 mJ Pulsintensität, 20 Hz, 5,5 mm Strahldurchmesser und 532 nm Wellenlänge belichtet. Für die HPLC-Messungen werden je 50 μL Probe abgenommen und mit 50 μL ACN verdünnt. Von dieser Lösung werden dann 50 μL injiziert (Methode: SH6Bfrei, siehe Kapitel 9.1). In den drei Chromatogrammen, welche unterschiedlichen Energieeinträgen entsprechen, sieht man bei der TPA und der SPA induzierten Freisetzung (Abbildung 14) die zwei charakteristischen Peaks für 5FU (2 min) und H5FU (20,5 min). Der Peak bei 21,5 min resultiert aus dem Lösungsmittel Chloroform. Referenzsubstanzen von 5FU und H5FU zeigen die gleiche Retentionszeit, der eindeutige Nachweis wird durch die

identischen UV/Vis-Spektren des DAD geliefert. Mit der Erhöhung der Gesamtenergieeinträge in beiden Fällen der Freisetzung ist deutlich zu erkennen, dass die freigesetzte Wirkstoffmenge sich auch erhöht. Eine genaue Korrelation zwischen Wirkstofffreisetzung und Energiemenge ist aus den bisher genannten Gründen nicht sinnvoll, da eine wiederholte Beladung zu anderen Ergebnissen führen würde.

Die zusätzlich auftretenden Peaks sind Artefakte aus dem Polymer, welche bei der Belichtung freigesetzt werden. Dies lässt sich auf die Synthese der polymeranalogen Beladung zurückführen. Die Cumarinseitenketten dimerisieren und die Polymerkette wird durch die UV-Strahlung gebrochen. Durch die Belichtung wird dann dieses Teilstück freigesetzt und auf der HPLC detektiert. Diese ungewollte Freisetzung lässt sich bei dieser Art der Synthese nicht vermeiden und ist ein Grund für den bereits in der Zielsetzung erwähnten neuen Syntheseansatz.

3.6 SPA induzierter Multistep

3.6.1 In Polymermatrix

Für die spätere Anwendung ist es wichtig zu wissen, ob es auch möglich ist, die Freisetzung in Polymermatrix auszulösen und dann eine anschließende Diffusion des Wirkstoffes beobachten zu können. Aus H5FUPBMAOC und PMMA (1 : 3 w/w) wird ein Film im solvent casting Verfahren hergestellt und in einer Fluoreszenzquarzglasküvette plaziert. Die Küvette wird mit 3 mL Wasser aufgefüllt. Der Film wird nun mit Licht der Wellenlänge 254 nm und einer Energiedosis von 112 mJ belichtet (MinUVIS DESAGA, $187 \mu\text{W} / \text{cm}^2$), anschließend im UV/Vis-Spektrometer vermessen, durch Drehen der Küvette wird anschließend auch die Lösung vermessen. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, wird mit jeder Belichtung die Cumarinbande im Film größer, damit einhergehend wird H5FU freigesetzt. Abbildung 16 zeigt die Diffusion von H5FU in das Wasser anhand der Absorptionzunahme bei 265 nm. Der in Kapitel 3.1.1 errechnete Extinktionskoeffizient ermöglicht die Umrechnung in eine Mengenangabe, da das H5FU in Wasser hydrolysiert und dann als 5FU vorliegt. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, werden bei jeder Freisetzung ca. 2 μg 5FU aus 30 mg Polymer (Gesamtgewicht des Films) frei. Auch dieses Ergebnis erfüllt die Erwartung für den späteren Einsatz des Polymers als Intraokularlinsenmaterial, wenn man den schon erwähnten LD50 Wert für 5FU (0.58 $\mu\text{g} / \text{ml}$, RECL) betrachtet^[55].

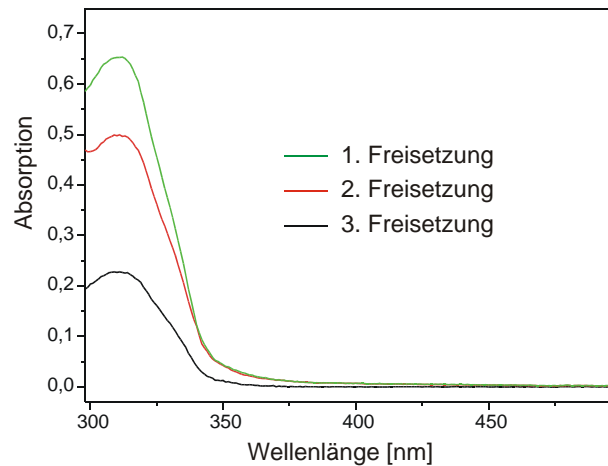


Abb. 15 Absorptionsänderung im Film nach jeweils einer Freisetzung.

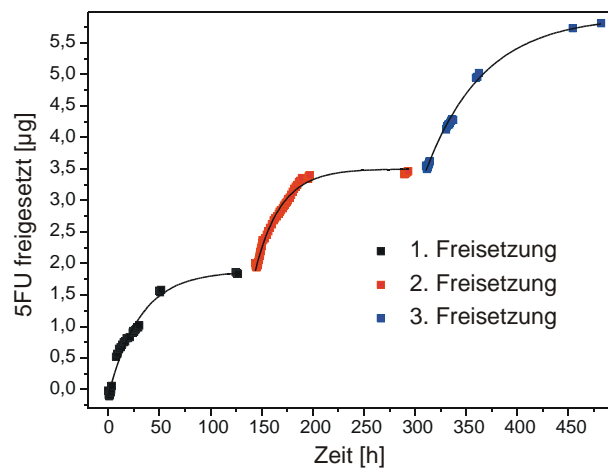


Abb. 16 Stufenweise SPA induzierte Freisetzung von 5FU pro 30 mg Polymer.

Es war notwendig einen Blend aus H5FUPBMAOC und PMMA herzustellen, da der reine Film aus beladenem Polymer nicht stabil ist. Der Grund für diese Instabilität liegt im induzierten Kettenabbruch bei der Beladung. Auch in diesem Experiment ist wieder eindeutig zu erkennen, dass die induzierte Cumarinzunahme nicht mit der freigesetzten Menge an 5FU korreliert.

3.6.2 In Modell-IOL

Um die Freisetzung des Wirkstoffes aus IOLs zu simulieren, wird aus dem beladenen Polymer und PMMA ein Pressling hergestellt. Ein Blend aus H5FUPBMAOC und PMMA 1 : 1 wird unter folgenden Parametern in dem Gerät Polystat 200T der Fa. Schwabenthan zu einer Modell-IOL verarbeitet:

1. 10 min heizen ohne Druck bei 190 °C
2. 5 min pressen bei 25 bar
3. alles langsam abkühlen

Als Presswerkzeug wird eine Edelstahlplatte mit 8 mm Durchmesser und 2 mm Stärke verwendet.

Der Pressling wird anschließend für drei Tage in Wasser gelegt um evtl. freien Wirkstoff herauszuwaschen, wobei die HPLC-Analyse des Waschwassers keinen freien Wirkstoff zeigt. Für die erste Belichtung wird der Pressling von jeder Seite 1 min lang mit einer UV-C-Lampe (9W Philips) bestrahlt. Anschließend wird eine Quarzglasküvette mit 2,5 mL Wasser befüllt und der Pressling hinein gegeben. Die Diffusion des Wirkstoffes wird im UV/Vis-Spektrometer aufgezeichnet und diese Prozedur nochmals wiederholt. Die Absorptionsänderung bei 265 nm, welche durch den diffundierenden Wirkstoff hervorgerufen wird, ist in Abbildung 17 dargestellt.

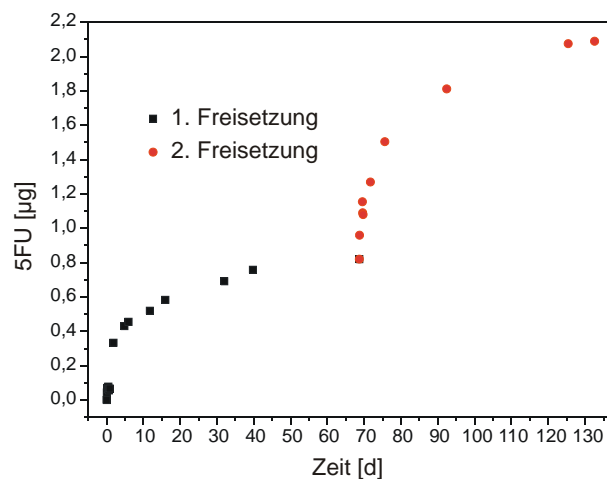


Abb. 17 Menge an freigesetztem 5FU, welches nach SPA induzierter Freisetzung aus dem Pressling in das Wasser diffundiert ist.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es auch möglich ist, den Wirkstoff aus heiß gepresstem Bulk-Polymer über SPA freizusetzen. Deutlich ist zu erkennen, dass nach der induzierten Freisetzung eine rasche Diffusion einsetzt und erst über einen längeren Zeitraum sein Maximum erreicht. Ob es sich bei der Freisetzung um reine oberflächeninduzierte Prozesse handelt, kann nicht geklärt werden. Die wichtige Aussage ist, dass der Cyclobutanring während des Heißpressens stabil und aktiv bleibt.

3.7 TPA induzierte Freisetzung von H5FU aus einer Polymermatrix

3.7.1 Durchführung und Nachweis

Der Nachweis, dass Wirkstoff aus einer Polymermatrix photochemisch freigesetzt werden kann, konnte im vorherigen Abschnitt mittels SPA gezeigt werden. Im folgenden Abschnitt soll nun der Nachweis der TPA induzierten Freisetzung erbracht werden. Wie in Kapitel 2.4.1 erwähnt wird, ist es für die angestrebte Anwendung wichtig, den Wirkstoff über einen TPA Prozess freisetzen zu können, da die Hornhaut eine UV-Licht Barriere darstellt.

Auch für dieses Experiment wird ein Film aus H5FUPBMAOC und PMMA (1 : 1 w/w) erzeugt. Vor dem Ausbringen der Polymerlösung mit einem 0,4 mm Raket wird die Lösung filtriert (PTFE 0,45 μm , Fa Roth). Der entstandene Film wird in eine Halterung eingespannt, in die sich Blenden einschieben lassen, damit nur die belichtete Fläche im UV/Vis gemessen wird. Der Film wird an fünf verschiedenen Stellen mit unterschiedlichen Pulsintensitäten (33,0 mJ, 22,5 mJ, 19,5 mJ, 14,0 mJ) belichtet. Die Lasereinstellungen waren: 532 nm, 20 Hz und 5,5 mm Strahldurchmesser. Bei jeder Pulsintensität wird mit unterschiedlichen Zeitintervallen belichtet.

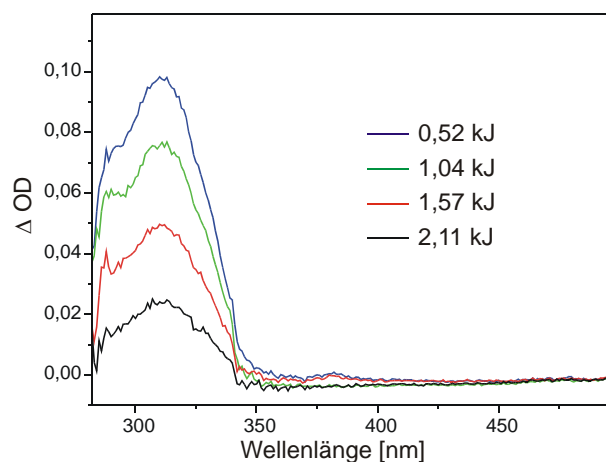


Abb. 18 TPA induzierte Freisetzung aus einer Polymermatrix mit 33 mJ / Puls.

Die resultierenden Differenzspektren bei einer Belichtung mit einer Pulsintensität von 33 mJ / Puls zeigt Abbildung 18.

Der lineare Zusammenhang zwischen der Absorptionszunahme und der Energie ist deutlich in den gleich bleibenden Abständen der Spektren in Abbildung 18 zu erkennen. Aus den TPA induzierten Spaltungen mit vier unterschiedlichen Pulsintensitäten erhält man die zugehörigen Anfangsgeschwindigkeiten der Cycloreversion. Für den Nachweis der TPA induzierten Spaltung wird, wie in Abbildung 19 zu sehen, die Anfangsgeschwindigkeit und die

Pulsintensität logarithmiert und gegeneinander aufgetragen. Die resultierende Steigung von 1,93 zeigt, dass bei der Freisetzung ein TPA-Prozess vorliegt.

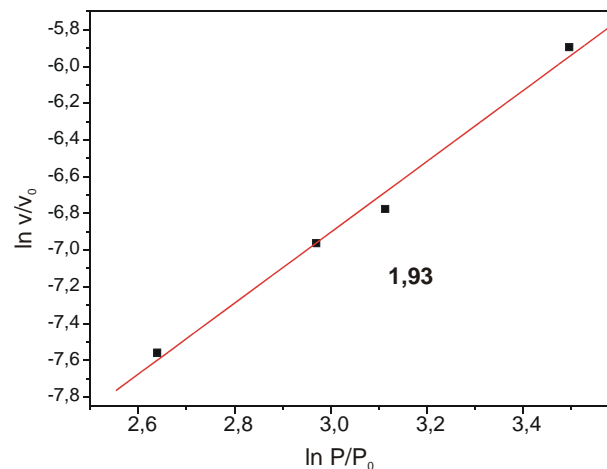


Abb. 19 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangssteigung gegen die Pulsintensität.

3.7.2 TPA induzierter Multistep

Nachdem es gelungen ist die TPA induzierte Wirkstofffreisetzung in Polymermatrix nachzuweisen, soll nun noch der Nachweis erbracht werden, dass das mittels TPA freigesetzte H5FU auch aus dem Polymer diffundiert.

Für dieses Experiment wird ein Polymerfilm als Blend aus H5FUPBMAOC : PMMA (1 : 3 w/w in Chloroform) nach dem Solvent Casting Verfahren hergestellt. Die Polymerlösung wird vor dem Rakeln (0,8 mm) über einen Spritzenfilter (PTFE, 0,45 μm , Fa. Roth) filtriert. Der Film (30 mg) wird in eine 4-Fenster-Quarzglasküvette eingespannt und die Küvette mit 2,5 mL Wasser befüllt. Nach drei Tagen wird das Wasser getauscht und die Belichtung des Films begonnen. Der Film wird an fünf Punkten je 20 min mit dem Puls-Laser bestrahlt (532 nm, 20 Hz, 46 mJ / Puls, 5,5 mm Durchmesser). Vor und nach der Bestrahlung wird der Film im UV/Vis vermessen.

Um die Diffusion des Wirkstoffes zu beobachten wird die Lösung über mehrere Tage im UV/Vis gemessen. Nach Beendigung der Freisetzung wird diese Prozedur mit dem gleichen Film nochmals durchgeführt, wobei die Bestrahlungsdauer verändert wird (30 min). Die Lösungen werden nach Beendigung der Diffusion anschließend in der HPLC (Methode: SH6Bfrei, siehe Kapitel 9.1) gemessen. Um eine messbare Konzentration für die HPLC zu erhalten, wird die Lösung zur Trockne eingedunstet und der Rückstand in 120 μL Wasser aufgenommen.

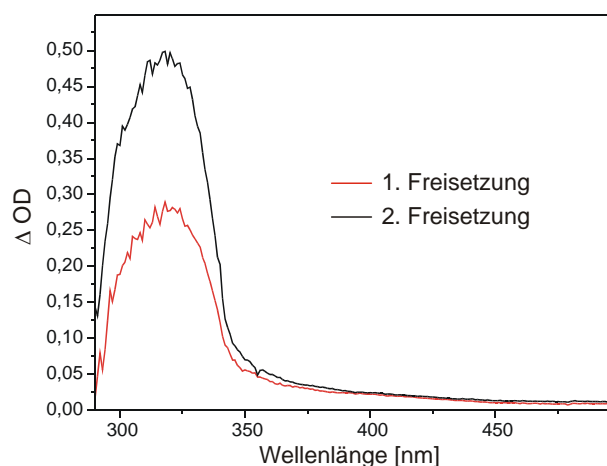


Abb. 20 TPA induzierte Absorptionsänderung im Film.

Abbildung 20 zeigt die beiden Differenzspektren der zwei Belichtungen. Die erwartete größere Änderung der Absorption bei längerer Bestrahlungsdauer tritt nicht ein, da höchstwahrscheinlich die maximale Freisetzung erreicht ist. Der Film wird nach Beendigung des Experimentes in Chloroform gelöst und in der HPLC vermessen. Erwartungsgemäß zeigt sich in dem Chromatogramm kein H5FU und kein 5FU Peak, aufgrund der vorher stattgefundenen Diffusion in das Wasser. Damit ausgeschlossen werden kann, ob vor der Belichtung schon freier Wirkstoff im Film vorhanden war, wird ein Teil des unbelichteten Films in der HPLC (Methode: SH6BFrei, siehe Kapitel 9.1) untersucht und kein freier Wirkstoff gefunden. Die beiden Chromatogramme der Lösungen weisen nur einen Peak für 5FU auf, da H5FU in Wasser, wie bereits erwähnt, hydrolysiert.

Die folgende Tabelle führt die Ergebnisse dieses Experimentes noch einmal genau auf.

Freisetzung	ρ_{Energie} [J·cm ⁻²]	Diffusionszeit	Peakfläche [mAU·s]	c(5-FU) [μmol/L]	n(5-FU) [nmol]
Freisetzung 1	4646	190 h 50 min	341.930	116.7	14.0
Freisetzung 2	6970	282 h 25 min	154.176	52.6	6.3

Tab. 3 Ergebnisse der ersten und zweiten TPA induzierten Freisetzung.

An den Ergebnissen der zweiten Belichtung ist zu erkennen, dass trotz längerer Belichtungsdauer weniger Wirkstoff freigesetzt werden konnte. Auch bei diesem Experiment ist nicht klar, woher die schlechte Ausbeute bei der zweiten Freisetzung kommt. Ein Grund dafür könnte allerdings wieder in der angewendeten Synthesestrategie liegen.

3.8 Langzeitstabilitätstest von H5FUPBMAOC

Für die spätere Anwendung ist die Langzeitstabilität von entscheidender Bedeutung. Der Cyclobutanring muss über eine lange Zeit stabil und trotzdem bei gewünschter photochemischer Induzierung nach langer Zeit spaltbar sein.

Das beladene Polymer wird zum Test der Langzeitstabilität als Blend 1 : 2,5 PMMA : H5FUPBMAOC zu einem Film verarbeitet (0,8 mm Rakel) und in eine Küvette eingespannt. Die Küvette wird mit 3 mL Wasser aufgefüllt und verschlossen. In bestimmten Zeitabständen werden über ein Jahr der Film und die Lösung mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht und die Ergebnisse aufgezeichnet. Nach einem Jahr wird der Film mit einer UV-C-Lampe (9W Philips) einmal 30 sec und einmal 1 min belichtet. Die Änderung im Film und die anschließende Diffusion des Wirkstoffes in das Wasser wird dokumentiert, und ist in den folgenden Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

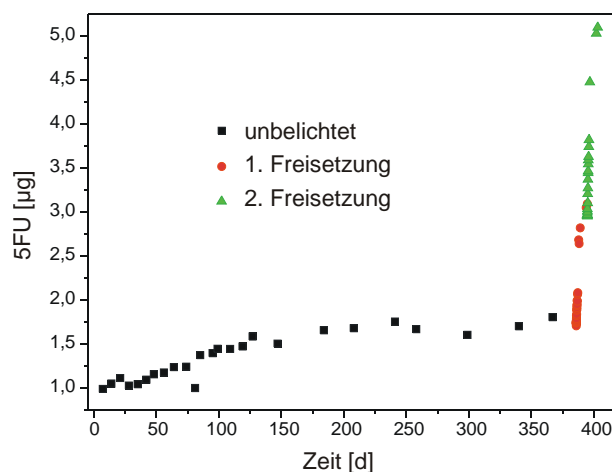


Abb. 21 Freigesetztes und in Wasser diffundiertes 5FU.

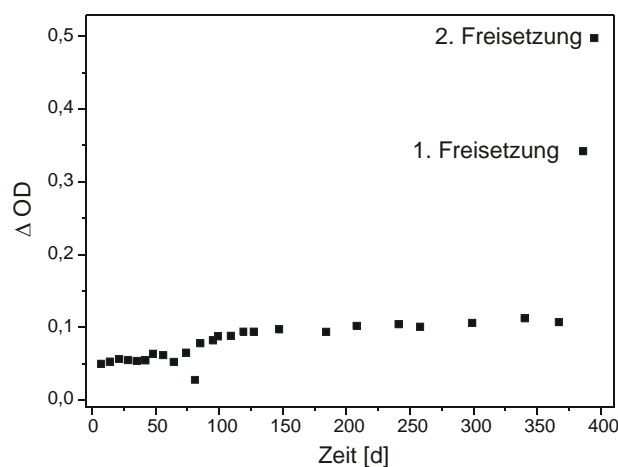


Abb. 22 Absorptionsänderung bei 314 nm im Film.

Die freigesetzte Menge an 5FU verändert sich über den beobachteten Zeitraum nur leicht und erst nach der induzierten Freisetzung kommt es zu einem starken Anstieg der Konzentration. Die Wiederholung der Induzierung zeigt, dass auch nach einem Jahr eine stufenweise Freisetzung möglich ist. Die Absorptionsänderung im Film korreliert mit der freigesetzten Menge an 5FU.

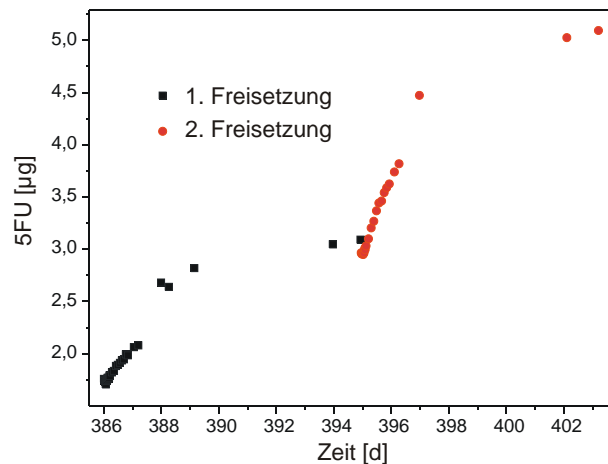


Abb. 23 5FU freigesetzt nach 1. und 2. Freisetzung (vergrößert).

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass in dem Zeitraum der Beobachtung ohne Induzierung eine kleine Menge an 5FU aus dem Film heraus diffundiert. Die Zunahme der 5FU Konzentration während des einen Jahres ist nur damit zu erklären, dass während der Messungen eine kleine Menge 5FU freigesetzt wird. Diese Erkenntnis untermauert auch Abbildung 22 mit der Zunahme der Absorption der Cumarinbande im Film. Setzt man die Zunahme von 5FU und Cumarin ins Verhältnis zueinander, sieht man einen stetigen Zusammenhang (Abbildung 24).

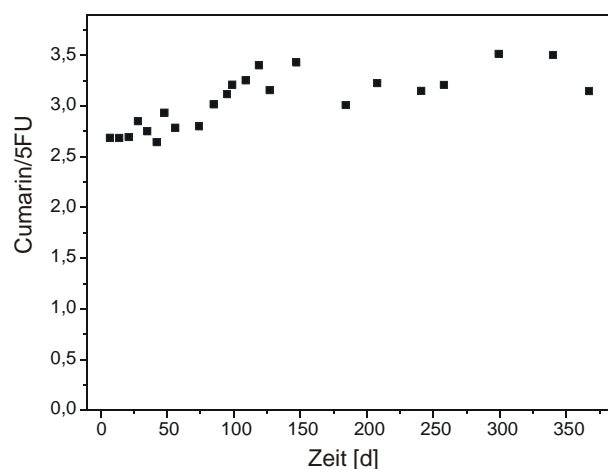


Abb. 24 Verhältnis 5FU in Lösung zu Cumarin im Film.

Aufgrund des Zeitmangels konnte die genaue Ursache dieses Phänomens nicht analysiert werden. Eine Vermutung legt nahe, dass es durch den zwar sehr schwachen aber vorhandenen Messstrahl des UV/Vis-Spektrometers zu einer Abspaltung kommt. Das Experiment bestätigt allerdings, dass die Wirkstoffanbindung stabil ist und jederzeit aktiviert werden kann, auch nach einer längeren Zeitperiode.

3.9 Bestimmung der Brechungsindexänderung nach Freisetzung

Üblicherweise hängt der Brechungsindex einer Substanz von ihrer entsprechenden Polarisation ab^[56]. Dieser Zusammenhang müsste auch bei der Wirkstofffreisetzung aus H5FUPBMAOC zu beobachten sein und könnte auf der Änderung der Polarisation bei der Spaltung des Cyclobutanringes der Cumarindimere und des Cumarin-H5FU-Kreuzdimers beruhen. Zur Messung dieser Hypothese wird ein Polymerblend aus PMMA und H5FUPBMAOC (1 : 1) hergestellt und mittels Spin coat auf einen Siliciumwafer aufgebracht. Der Film wird dann unbelichtet mit einem Phasenmodulationsellipsometer vermessen und nach Belichtung (1 min) mit UV-Licht (9W Philipps) nochmals vermessen. Es kann keine Brechungsindexänderung festgestellt werden. Abbildung 25, in der Psi gegen den Einfallswinkel aufgetragen ist, zeigt keine Änderung. Genauere Untersuchungen zur Bestimmung des Brechungsindex waren nicht möglich, da die Filmeigenschaften zu schlecht waren. Das Polymer ist durch die Belichtung teilweise vernetzt und auch zerstört worden, was die Löslichkeit des Polymers und damit auch die Filmbildungseigenschaften beeinflusst. Es war nicht möglich Filme zur Bestimmung des Brechungsindex mit dem Ellipsometer zu generieren, welche einheitlich glatt waren.

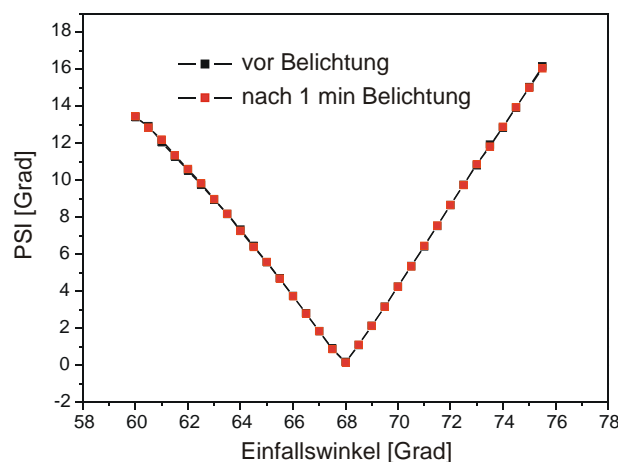


Abb. 25 Veränderung von Psi zum Einfallswinkel für belichtetes und unbelichtetes H5FUPBMAOC.

3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Synthese des wirkstoffbeladenen Polymers konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Hydrolyse der Wirkstoffvorstufe H5FU zu 5FU ist bei Körpertemperatur hinreichend schnell, um eine effektive Behandlung durchführen zu können; die Halbwertszeit beläuft sich auf $\tau_{1/2, 35\text{ °C}} = 10\text{ min}$. Da die Beladung des Polymers mit H5FU als Wirkstoff schwankt, wird für eine Beladung beispielhaft der Grad berechnet. Während der Reaktion gehen ca. 13 % der Cumarinlinker eine Kreuzdimerisierung mit H5FU ein, wobei die maximale Freisetzung über SPA induzierte Cycloreversion bei ca. 60 % liegt. Die Freisetzung des Wirkstoffes in Lösung über SPA und TPA konnte bewiesen werden. H5FU und sein Hydrolyseprodukt 5FU werden nach der Freisetzung in der HPLC eindeutig identifiziert. Aus 30 mg Polymer konnte die wiederholbare Freisetzung von je 2 μg 5FU, dessen Diffusion und die Entstehung des entsprechenden Hydrolyseproduktes gezeigt werden. Einer der entscheidenden Schritte zur Anwendung war der Nachweis der Freisetzung von 5FU aus Polymermaterial mittels TPA, und die anschließende Diffusion des Wirkstoffes. Ein Langzeittest erbrachte die gewünschten Ergebnisse, der Wirkstoff wird nur durch Induzierung freigesetzt. Der endgültige Durchbruch der photoinduzierten Wirkstofffreisetzung in einer implantierten IOL zur Behandlung des Nachstars konnte durch die positiven Ergebnisse der Zelltests erzielt werden (siehe Kapitel 6.1).

Während der Experimente stellte sich allerdings heraus, dass der angewandte Syntheseweg Nachteile mit sich bringt. Aufgrund der unterschiedlichen Dimerisierungseigenschaften von Cumarin zu Cumarin und Cumarin zu H5FU kommt es zu einem schwankenden Verhältnis dieser Dimere (ca. 7 : 1), einhergehend damit ist der Beladungsgrad nie 100 %ig vorhersagbar. Um dieses Verhältnis positiv zu beeinflussen, muss mit 40 fachem Überschuss des Wirkstoffes gearbeitet werden, was einen sehr großen Verlust bedeutet, da der Wirkstoff nicht zurückgewonnen werden kann. Aufgrund der ungewollten Dimersierung kommt es bei der anschließenden Freisetzung zur Spaltung von beiden vorliegenden Dimersystemen, was wiederum zu einer unspezifischen Freisetzung des Wirkstoffes führt, der Energieeintrag korreliert nicht wiederholbar mit der freigesetzten Wirkstoffmenge. Des Weiteren hat UV-Licht Einfluss auf das Polymergerüst, da es bei der Belichtung des PBMAOC mit kurzwelliger UV-Strahlung zu einem Photoabbau bzw. photooxidativen Abbau durch Reaktionen vom Norrish-Typ-I und -II und Decarboxylierungsreaktionen kommen kann^[48]. Bei allen Photoabbaureaktionen entstehen Radikale, die wiederum weitere Reaktionen, wie zum Beispiel inter- und intramolekulare C-H-Abstraktion, Disproportionierungs-, Umlagerungs- und Rekombinationsreaktionen, hervorrufen. Da das Polymer bei der

Verwendung als Intraokularlinse sowohl spezielle optische, als auch mechanische Eigenschaften erfüllen muss, sind Veränderungen des Polymergerüsts während der Beladung zu vermeiden.

Die vorgestellten Ergebnisse in diesem ersten Teil der Arbeit zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist über einen TPA Prozess Wirkstoff aus IOL-Material freizusetzen und damit eine gezielte medikamentöse Behandlung des Nachstars zu ermöglichen. Die erwähnten Probleme, welche durch die polymeranaloge Beladung hervorgerufen werden, sollten durch eine geeignete Synthesestrategie behoben werden können. Diese neuen Strategien werden in den folgenden zwei Teilen der Arbeit genauer beschrieben und verfolgt.

4 PHOTOCHEMISCHE LINKERSYSTEME ZUM AUFBAU VON MULTIFUNKTIONALEN COPOLYMEREN

Um die im vorangegangenen Kapitel erwähnten Nachteile der Synthese von H5FUPBMAOC zu umgehen, wird eine neue Synthesestrategie entwickelt. Diese beinhaltet die Trennung der photochemischen Synthese von der Polymerisation, was im Detail bedeutet, dass zuerst der photochemische Aufbau des Linkersystems stattfindet und anschließend die Polymerisation durchgeführt wird, wobei die Eigenschaften des Polymers durch UV-Belichtung nicht beeinflusst werden. Für diese neue Strategie müssen zunächst geeignete photochemische Linker gefunden, synthetisiert und charakterisiert werden. Als viel versprechender photochemischer Linker erwies sich das schon näher auf seine photochemischen Eigenschaften hin untersuchte Cumarin-Dimer^[33]. Da dieses Dimer keine reaktiven Seitengruppen aufweist, wird auf das nächstliegende Derivat, 7-Hydroxycumarin (da käuflich erwerbbar), zurückgegriffen. Da hierbei die Dimerisierung mittels UV-Licht durchgeführt wird, muss zunächst die phenolische OH-Gruppe geschützt werden, da diese sonst Radikale ausbildet, welche wiederum zu unerwünschten Nebenreaktionen führen^[57]. Als Schutzgruppen werden Silylchlorid-Derivate gewählt, da es in der Literatur mannigfaltige Möglichkeiten beschrieben sind diese Schutzgruppen unter milden Bedingungen wieder zu entfernen^[58]. Während der Synthese stellte sich heraus, dass die *tri*-Methylsilyl-Schutzgruppe nicht stabil genug war, für die späteren Syntheseschritte. *Tert*-Butyldiphenylsilylchlorid erwies sich bei der Dimerisierung als schlechte Schutzgruppe, da die sterische Hinderung zu groß war und damit die Ausbeute gravierend nachließ. Als optimale Lösung kristallisierte sich die *tert*-Butyldimethylsilyl Schutzgruppe heraus, welche dann in der Linkersynthese Einsatz fand. Die Synthese dieser Linker (TBS-Cum, TBS-p-Cum, TBS-4M-Cum) wird in Kapitel 9.2 ausführlich beschrieben. In den folgenden Kapiteln soll die photochemische Charakterisierung der Linker vorgestellt werden. Das Derivat 4-Methyl-7-hydroxycumarin wird zusätzlich gewählt, da nach Literaturangabe die Spaltung im Vergleich zu 7-Hydroxycumarin effektiver ablaufen sollte^[59]. Da die Dimere als photochemische Linkersysteme für die Wirkstofffreisetzung fungieren sollen, ist es von enormer Wichtigkeit, deren Charakteristika bezüglich der Freisetzung via SPA und TPA zu bestimmen. Der Einfachheit halber werden die Freisetzungen via SPA und TPA zunächst in Lösung durchgeführt und die SPA-Quantenausbeute / TPA-Querschnitt bestimmt. Da aber die spätere Anwendung die Freisetzung in einer Polymermatrix voraussetzt, werden weitere Experimente zur Freisetzung mittels SPA und TPA durchgeführt, diesmal in PMMA-Matrix. Auch hier können die Quantenausbeute und die TPA-Querschnitte berechnet werden. Zum besseren

Vergleichen werden die Ergebnisse der Dimere in den einzelnen Abschnitten zusammengefasst. Wie schon in der allgemeinen Berechnung zur Bestimmung der Quantenausbeute und des TPA-Querschnittes erwähnt, wird die Anzahl der gespaltenen Dimere mit der Zunahme der Absorption bei ca. 310 nm berechnet, abhängig vom betrachteten Dimer. Diese Zunahme resultiert aus dem, durch die Cycloreversion entstandenen, konjugierten π -System zwischen Carbonyl-Gruppe und Doppelbindung.

Anforderungsparameter für Linkersysteme basierend auf Cumarin:

Chemisch:

- Reaktive Seitengruppen zur chemischen Anbindung an ein Polymer und zur Wirkstoffanbindung
- Leicht entfernbare photostabile Schutzgruppe für die Seitengruppen
- Hohe Ausbeute bei der Photodimerisierung
- Eignung für die Anbindung von sterisch anspruchsvollen Wirkstoffen

Physikalisch:

- hohe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln
- Mischbarkeit mit Polymeren
- Spaltbarkeit via SPA und TPA
- Hohe Quantenausbeute

4.1 Isomere des Cumarindimers

Während der photochemischen Dimerisierung der Cumarinderivate sind vier verschiedene Isomere zu erwarten (Abbildung 26). Die Analyse der belichteten Reaktionslösung mittels HPLC wies in allen Fällen nur zwei Isomere auf, wobei das Verhältnis der Isomere zueinander bei 95 : 5 liegt. Die genaue Bestimmung der Isomere kann nur mit Hilfe von NMR-Spektrometrie und unter Zuhilfenahme einer Publikation vorgenommen werden. Die vier entstehenden Isomere unterscheiden sich in ihren unterschiedlichen $^1\text{H-NMR}$ Strukturen im Bereich von 3,8 ppm bis 4,2 ppm^[60]. Je nach Anordnung der H-Atome im Cyclobutanring resultieren die vier typischen Kopplungsmuster. Xiuling Yu et al.^[32] hat die zu erwartenden Spektren der vier Isomere simuliert und anschließend die vier Isomere mittels NMR den simulierten Spektren zugeordnet. Diese Zuordnung kann mit allen entstehenden Cumarinderivaten durchgeführt werden, welche keine Substitution an der dimerisierbaren Doppelbindungen aufweisen (Dimere basierend auf 4M-Cum konnten nicht analysiert werden).

Der Grund für die Entstehung nur eines Hauptisomers, ist das verwendete Lösungsmittel und der Sensibilisator^[60]. Ein Experiment mit TBS-Cum zeigte, dass unter Verwendung von Cyclohexan statt Chloroform, und unter Verzicht auf den Sensibilisator, sich das Isomerenverhältnis umdreht. Dieses Phänomen wurde auch von Xiuling Yu et al.^[32] untersucht und anhand verschiedenster Lösungsmittel und Sensibilisatoren bestätigt. Für unsere Anwendung sollte es allerdings primär unerheblich sein, welche Isomere entstehen, da kein großer Unterschied zwischen den Spaltungseigenschaften der einzelnen Dimere erwartet wird.

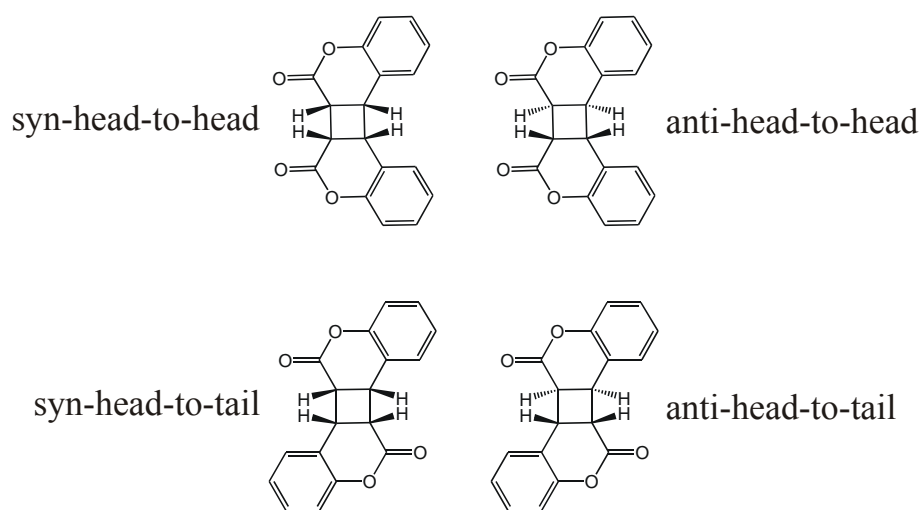
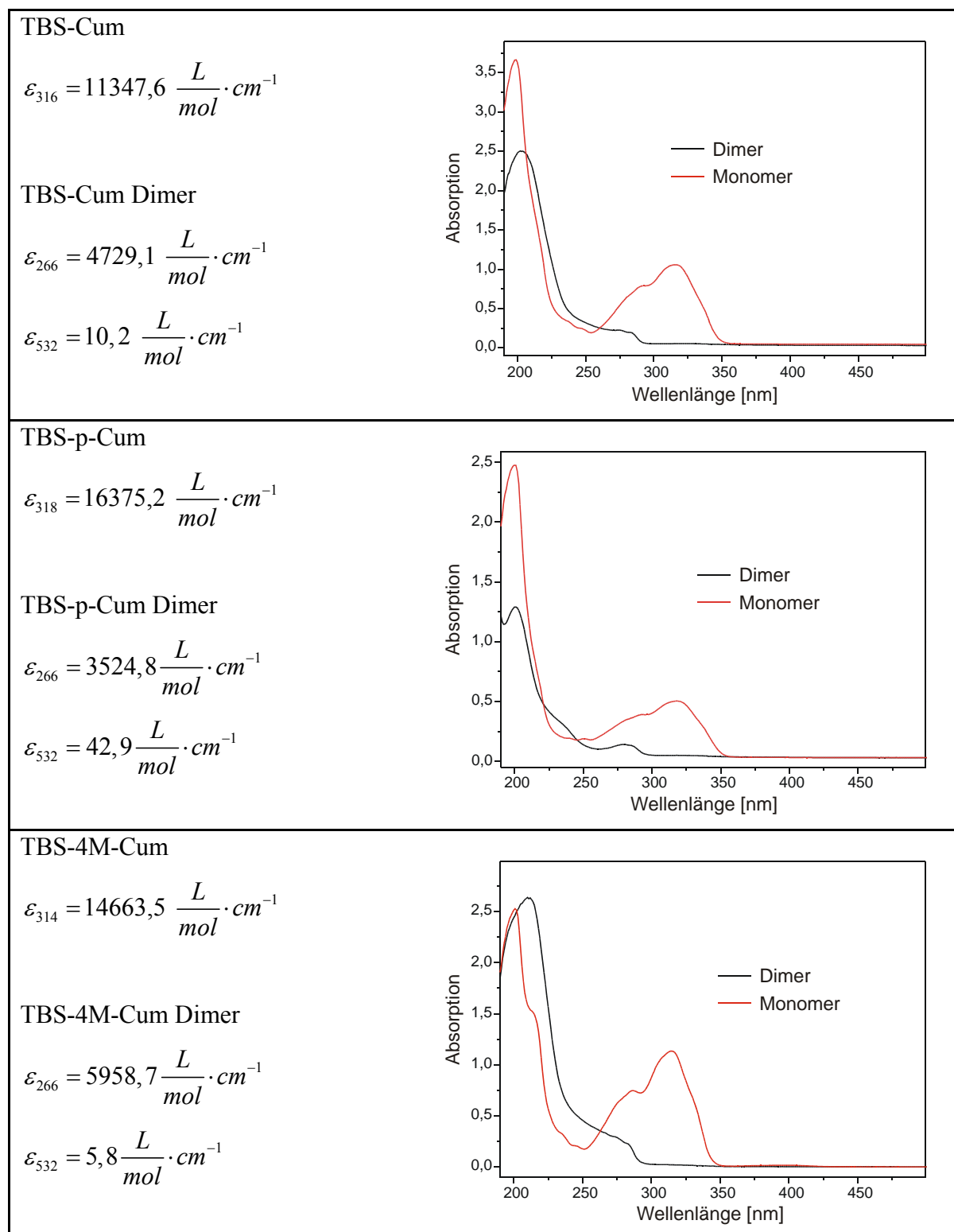


Abb. 26 Strukturen der vier möglichen Isomere von Cumarin und seinen Derivaten.

4.2 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Zur genauen Bestimmung der Anzahl gespaltener Dimermoleküle werden zunächst die Extinktionskoeffizienten der Monomere bestimmt. Wie schon in vorangegangenen Kapiteln erwähnt, wird durch die Spaltung der Dimere ein konjugiertes π -System generiert, welches eine typische Absorptionsbande bei ca. 310 nm, abhängig vom Cumarinderivat, hervorruft. In Tabelle 4 sind die Extinktionskoeffizienten der Monomere mit ihrer charakteristischen Absorption angegeben. Des Weiteren sind die UV/Vis-Spektren der Monomere und der entsprechenden Dimere aufgeführt. Wie in den UV/Vis-Spektren zu sehen ist, zeigen die Dimersysteme keine Absorption oberhalb von 300 nm. Die durch die Cycloreversion wieder entstehende Bande des Monomersystems kann somit als Indikator und damit zur Auswertung der photochemisch induzierten Spaltung via SPA und TPA verwendet werden. Die Extinktionskoeffizienten der Monomere werden an den jeweils typischen Absorptionsmaxima bestimmt. Für die Bestimmung des SPA-Querschnittes (siehe Kapitel 2.3.3) der Dimere

werden deren Extinktionskoeffizienten bei 532 nm und 266 nm bestimmt und in der Tabelle 4 mit aufgeführt.



Tab. 4 UV/Vis-Spektren der Monomere und Dimere. Übersicht über bestimmte Extinktionskoeffizienten.

4.3 SPA induzierte Cycloreversion in Lösung

Für die SPA induzierte Cycloreversion in den Dimersystemen werden Stammlösungen hergestellt und in einer Quarzglasküvette im Fluoreszenzspektrometer unter Rühren belichtet. Die Lösungen werden nach bestimmten Zeitintervallen im UV/Vis-Spektrometer vermessen. Durch die Cycloreversion entstehen wieder die Cumarinderivate mit der charakteristischen Absorptionsbande bei ca. 310 nm, verursacht durch das entstehende delokalisierte π -System. Anhand der entstehenden Bande kann mit den charakteristischen Maxima und den entsprechenden Extinktionskoeffizienten die Konzentrationsänderung pro Zeit aufgetragen werden. Die Monomerkonzentration ist in der Anfangsphase der Spaltung so gering, dass sie für die Auswertung vernachlässigbar ist. Wie in Kapitel 2.3.3 erklärt, kann anschließend die SPA Quantenausbeute berechnet werden. Die Ergebnisse und Auftragungen sind in den folgenden Abbildungen zusammengestellt.

4.3.1 TBS-Cum-D

Stammlösung: $c_0 = 0,36 \text{ mM}$ in ACN

Volumen: $V = 2,5 \text{ mL}$

Gemessene Stromstärke der Photodiode bei 266 nm: $\alpha = 20,5 \text{ } \mu\text{A}$

Anzahl entstandener Moleküle pro Sekunde: $n_{\text{Monomer}} = 1,878 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$

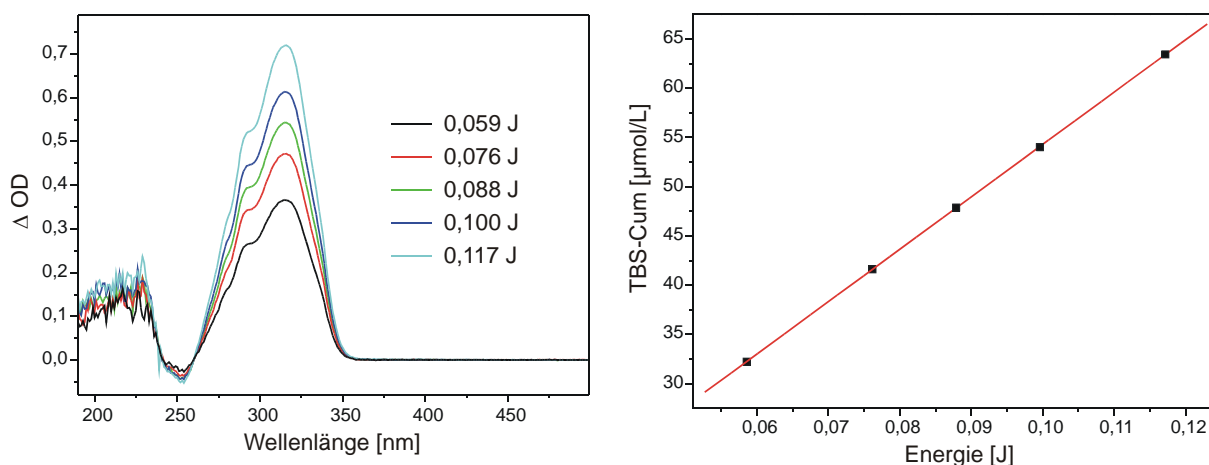


Abb. 27 Resultierende Differenzspektren der SPA induzierten TBS-Cum-D Spaltung (Links).

Lineare Konzentrationsänderung pro Energiedosis (Rechts).

Die Belichtung der TBS-Cum Dimerlösung mit unterschiedlichen Zeitintervallen bei 266 nm führt zu einer energieabhängigen Zunahme der Absorptionsbanden, was in den Differenzspektren (Abbildung 27 rechts) deutlich zu sehen ist. Die Absorptionzunahme bei

314 nm, welche dem Maximum der Bande entspricht, wird mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten in die entstandene Monomerkonzentration umgerechnet und dann gegen die eingestrahlte Energie aufgetragen. Die Ausgleichsgerade durch die generierten Punkte zeigt die erwartete lineare Zunahme der Absorption einhergehend mit der eingestrahlten Energie. Die Quantenausbeute für dieses Linkersystem wird zu $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} \approx 0,36$ bestimmt.

Im Zuge der später folgenden Verwendung dieses Linkersystems, der Anbindung an ein Polymer, werden Löslichkeitstests durchgeführt um die gewollte Erhöhung der Löslichkeit gegenüber 7-Hydroxycumarin zu zeigen. Es stellt sich heraus, dass die Löslichkeit des neuen TBS-Cum Dimers in Chloroform ca. 100 mal größer ist als die des 7-Hydroxycumarin.

Anhand der Extinktionskoeffizienten für TBS-Cum-D werden die SPA-Querschnitte für die relevanten Wellenlängen von 266 nm (SPA) und 532 nm (TPA) bestimmt^[61]. Die Werte zeigen deutlich, wie unwahrscheinlich eine SPA induzierte Spaltung des Dimers mittels Licht der Wellenlänge 532 nm ist.

$$\text{Gleichung 38} \quad \sigma_{266} = \varepsilon_{266} \cdot N_A = 4729,1 \frac{10^3 \text{ cm}^3}{\text{mol}} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol} = 7,85 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$$

$$\text{Gleichung 39} \quad \sigma_{532} = \varepsilon_{532} \cdot N_A = 10,2 \frac{10^3 \text{ cm}^3}{\text{mol}} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol} = 1,69 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^2$$

4.3.2 TBS-p-Cum-D

Stammlösung. $c_0 = 0,30 \text{ mM}$ in ACN

Volumen: $V = 2,5 \text{ mL}$

Gemessene Stromstärke der Photodiode bei 266 nm: $\alpha = 153 \mu\text{A}$

Anzahl entstandener Moleküle pro Sekunde: $n_{\text{Monomer}} = 6,095 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$

2,5 mL der Dimerstammlösung werden im Fluoreszenzspektrometer belichtet und anschließend im UV/Vis-Spektrometer vermessen. Von den gemessenen Spektren wird jeweils das Spektrum der unbelichteten Lösung subtrahiert, was zu den in Abbildung 28 (rechts) gezeigten Differenzspektren führt. Die Zunahme geht einher mit der in die Lösung eingetragenen Energie. Diese stetige Zunahme lässt sich auch in Abbildung 28 (links) erkennen, in der die Konzentration gegen die Energie aufgetragen ist. Wie auch schon für das TBS-Cum Dimer, können für das TBS-p-Cum Dimer die SPA Quantenausbeute $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} \approx 0,16$ und die SPA Querschnitte bei 266 nm und 532 nm anhand der Extinktionskoeffizienten bestimmt werden.

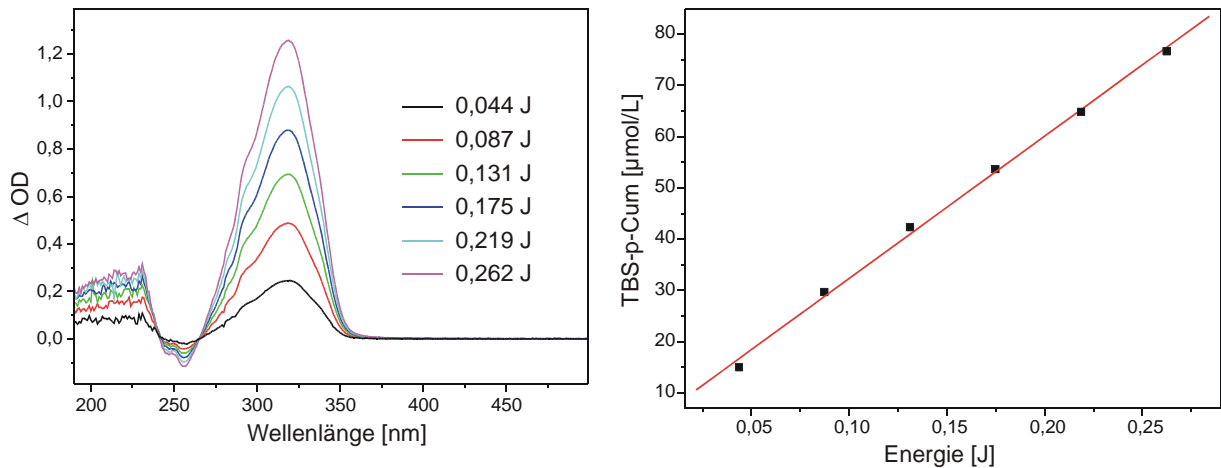


Abb. 28 Resultierende Differenzspektren der SPA induzierten TBS-p-Cum-D Spaltung (Links).
Lineare Konzentrationsänderung pro Energiedosis (Rechts).

Gleichung 40 $\sigma_{266} = \varepsilon_{266} \cdot N_A = 3524,8 \frac{10^3 \text{ cm}^3}{\text{mol}} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol} = 5,85 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$

Gleichung 41 $\sigma_{532} = \varepsilon_{532} \cdot N_A = 42,9 \frac{10^3 \text{ cm}^3}{\text{mol}} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol} = 7,12 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^2$

4.3.3 TBS-4M-Cum-D

Stammlösung: $c_0 = 0,35 \text{ mM}$ in ACN

Volumen: $V = 2,5 \text{ mL}$

Gemessene Stromstärke der Photodiode bei 266 nm: $\alpha = 140 \mu\text{A}$

Anzahl entstandener Moleküle pro Sekunde: $n_{\text{Monomer}} = 1,135 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$

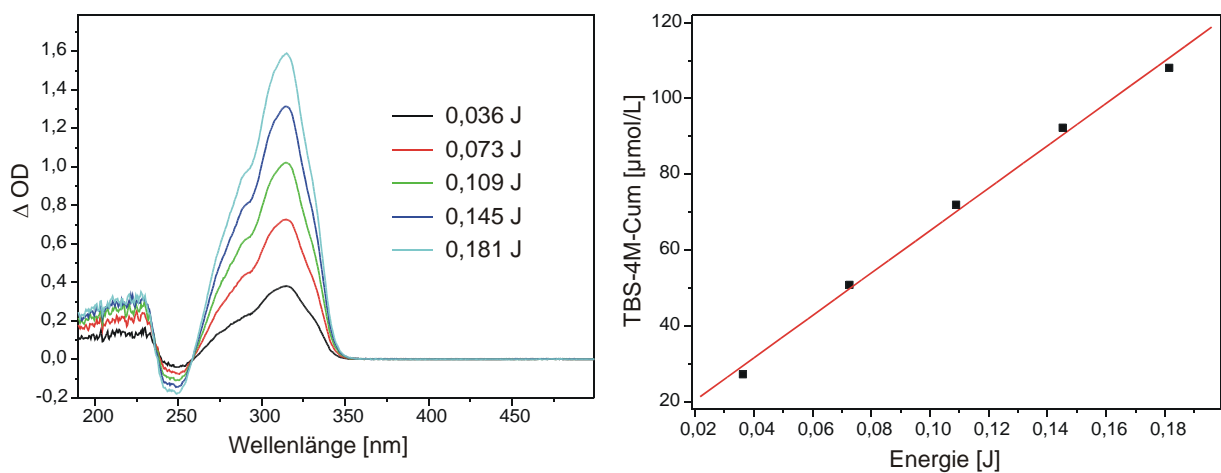


Abb. 29 Resultierende Differenzspektren der SPA induzierten TBS-4M-Cum-D Spaltung (Links).
Lineare Konzentrationsänderung pro Energiedosis (Rechts).

TBS-4M-Cum-D zeigt bei Belichtung mit Licht der Wellenlänge 266 nm, ebenso wie die vorherigen Dimere, eine charakteristische Spaltungskinetik. Die Linearität der Cycloreversion, induziert durch SPA, zeigt sich deutlich in Abbildung 29 (links), in der die Konzentrationszunahme des Monomers in der Lösung gegen die eingestrahelte Energie aufgetragen ist. Auch in den Differenzspektren ist deutlich zu erkennen, dass durch das eingestrahelte Licht nur die Spaltung des Dimers induziert wird. Die SPA Quantenausbeute beläuft sich auf $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} \approx 0,32$.

$$\text{Gleichung 42} \quad \sigma_{266} = \varepsilon_{266} \cdot N_A = 5958,7 \frac{10^3 \text{ cm}^3}{\text{mol}} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol} = 9,89 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$$

$$\text{Gleichung 43} \quad \sigma_{532} = \varepsilon_{532} \cdot N_A = 5,8 \frac{10^3 \text{ cm}^3}{\text{mol}} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol} = 9,63 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^2$$

4.3.4 Zusammenfassung

Linkersystem	$\Phi_{\text{SPA, Lösung}}$	$\sigma_{266} [\text{cm}^2]$	$\sigma_{532} [\text{cm}^2]$
TBS-Cum-D	0,36	$7,85 \cdot 10^{-18}$	$1,69 \cdot 10^{-20}$
TBS-p-Cum-D	0,16	$5,85 \cdot 10^{-18}$	$7,12 \cdot 10^{-20}$
TBS-4M-Cum-D	0,32	$9,89 \cdot 10^{-18}$	$9,63 \cdot 10^{-21}$

Tab. 5 Übersicht über die experimentell bestimmten SPA Quantenausbeuten in Lösung.

Die Untersuchungen der SPA induzierten Spaltungen zeigen, dass die Quantenausbeute von TBS-p-Cum-D in Lösung nur halb so groß ist, wie die der beiden anderen Dimere (Tabelle 5). Ein Grund für diesen gravierenden Unterschied konnte nicht gefunden werden. Auch die Differenz im SPA Querschnitt zwischen 266 nm und 532 nm ist bei dem TBS-p-Cum Dimer nicht so hoch und könnte daher später einen Einfluss auf die TPA induzierte Spaltung haben. Es sei noch erwähnt, dass alle bestrahlten Lösungen mittels HPLC untersucht werden und durch die Belichtung nur das jeweilige Monomer entsteht.

4.4 TPA induzierte Cycloreversion in Lösung

Da die Wirkstofffreisetzung hinter der Hornhaut, welche als UV-Barriere im Auge fungiert, durch Photochemie induziert werden soll, müssen zunächst Experimente zur TPA induzierten Freisetzung durchgeführt werden. Wie in Kapitel 2.4 erwähnt, ist die TPA die Methode der Wahl um eine Cycloreversion, welche mittels SPA mit UV-Licht induziert wird, im sichtbaren Wellenlängenbereich auszulösen. Eine wichtige Größe für ein Molekül in einem Zwei-Photonen-Prozess ist der TPA-Querschnitt. In diesem Abschnitt werden die drei Dimersysteme über TPA gespalten, der Nachweis der TPA geführt und der TPA-Querschnitt bestimmt. Es werden wieder Stammlösungen verwendet, wobei für jede Bestrahlungsreihe mit einer Pulsintensität eine Küvettenfüllung verwendet wird. Die Lösung wird während der Bestrahlung gerührt und anschließend UV/Vis-spektroskopisch analysiert. Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, werden die Parameter und Ergebnisse für die entsprechenden Linkersysteme in einer Tabelle zusammengestellt. Für die verschiedenen Pulsintensitäten werden die TPA-Querschnitte berechnet.

4.4.1 TBS-Cum-D

Laserstrahldurchmesser: $d = 0,55 \text{ cm}$

Ansatzvolumen: $V = 2,5 \text{ ml}$

Anfangskonzentration der Lösung: $c_0 = 0,36 \text{ mmol / L}$

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{316} = 11347,6 \text{ mol / L cm}^{-1}$

Ein-Photon-Quantenausbeute: $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} = 0,36$

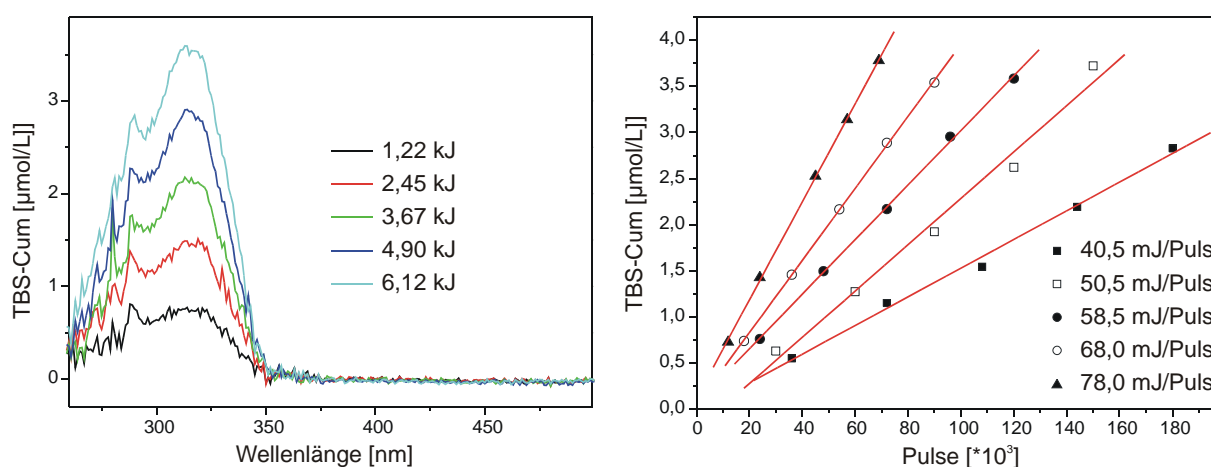


Abb. 30 Aus der TPA induzierten Spaltung (68 mJ / Puls) von TBS-Cum-D resultierende Differenzspektren (Links). Konzentrationsänderung des durch Spaltung entstehenden TBS-Cum in Abhängigkeit von Pulsanzahl und Pulsintensität (Rechts).

Für den anschließenden Nachweis der tatsächlich stattfindenden TPA induzierten Dimer-Spaltung werden fünf Messreihen mit jeweils unterschiedlichen Pulsintensitäten (40,5 mJ, 50,5 mJ, 58,5 mJ, 68,0 mJ, 78,0 mJ) durchgeführt. Zu der Messreihe mit 68,0 mJ Pulsintensität zeigt Abbildung 30 (rechts) die resultierenden Differenzspektren, welche, wie in der SPA induzierten Spaltung, eine Zunahme in der Absorption aufweisen. Die Differenzspektren in Abbildung 30 (rechts) zeigen wie erwartet die gleiche Bandenstruktur im Vergleich zu dessen der durch SPA induzierten Spaltung. Die induzierten Änderungen fallen nicht so groß aus da, wie schon in Kapitel 2.3.1 erklärt, die TPA induzierte Spaltung um Größenordnungen unwahrscheinlicher ist als die durch einen SPA induzierten Prozess. Abhängig von der Pulsintensität soll ein Anstieg der Absorptionsänderung pro Pulsanzahl zu beobachten sein. In Abbildung 30 (links) sind die jeweiligen Konzentrationsänderungen pro Pulsanzahl in Abhängigkeit zu der Pulsintensität aufgetragen und es zeigt sich die erwartete Linearität. Die folgende Abbildung dient als Nachweis des TPA induzierten Prozesses bei der Spaltung des Dimers.

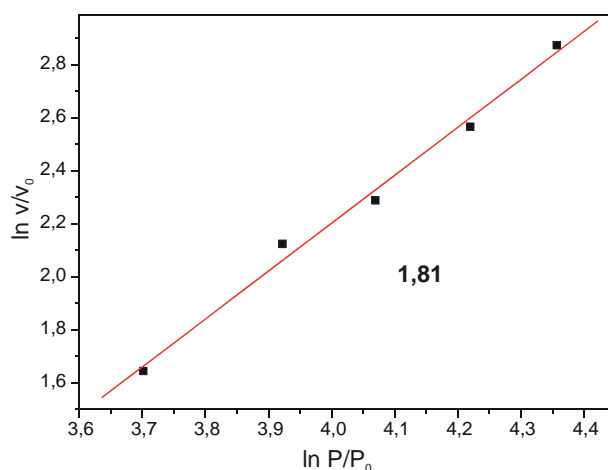


Abb. 31 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung gegen die Pulsintensität.

Die doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Pulsintensität zeigt eine Steigung von 1,81, was als Nachweis für eine TPA induzierte Cycloreversion angesehen werden kann.

Die Bestimmung des TPA-Querschnittes wird zu jeder Pulsintensität einzeln durchgeführt und ergibt fünf Werte, welche in Tabelle 6 zusammengestellt sind. Da es keine Abhängigkeit des TPA-Querschnittes von der Pulsintensität geben soll, und dieser auch nicht zu erkennen ist, kann im Mittel ein Wert zu 0,87 GM für den Querschnitt bestimmt werden.

Laserleistung P_P [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [ΔOD / sek]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$cm^4 s Photon^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
40,5	58,77	$9,08 \cdot 10^{-51}$	0,908
50,5	94,98	$9,44 \cdot 10^{-51}$	0,944
58,5	111,86	$8,28 \cdot 10^{-51}$	0,828
68,0	147,72	$8,10 \cdot 10^{-51}$	0,810
78,0	201,04	$8,37 \cdot 10^{-51}$	0,837

Tabelle 6 Übersicht über bestimmte TPA-Querschnitte bei unterschiedlichen Pulsintensitäten.

4.4.2 TBS-p-Cum-D

Laserstrahldurchmesser: $d = 0,55$ cm

Ansatzvolumen: $V = 2,5$ ml

Anfangskonzentration der Lösung: $c_0 = 0,30$ mmol / L

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{318} = 16375,2$ mol / L cm^{-1}

Ein-Photon-Quantenausbeute: $\Phi_{SPA, Lösung} = 0,16$

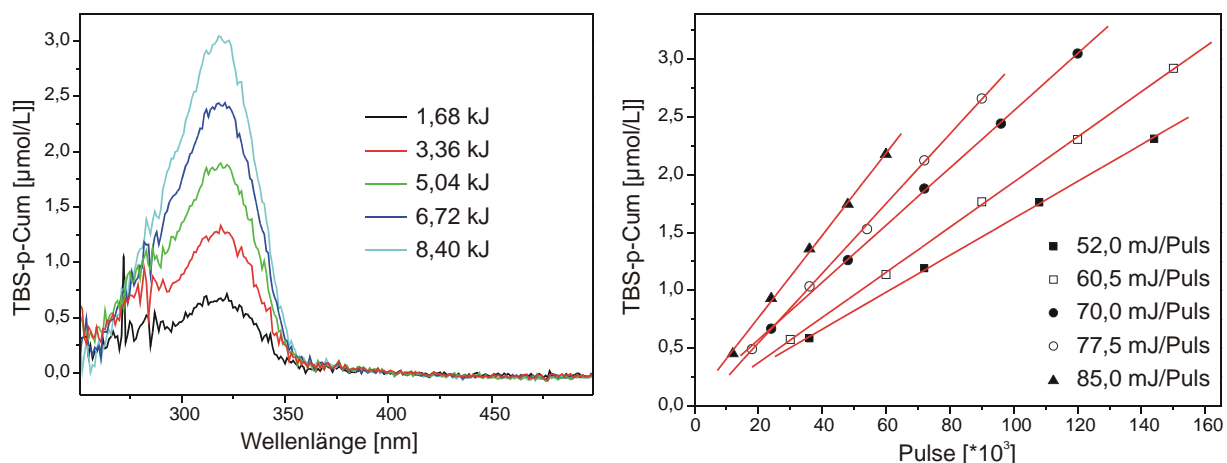


Abb. 32 Aus der TPA induzierten Spaltung (70 mJ / Puls) von TBS-p-Cum-D resultierende Differenzspektren (Links). Konzentrationsänderung des durch Spaltung entstehenden TBS-p-Cum in Abhängigkeit von Pulsanzahl und Pulsintensität (Rechts).

Die in Abbildung 33 (rechts) gezeigten Differenzspektren resultieren aus der photochemisch induzierten Spaltung des TBS-p-Cum Dimers mittels 70 mJ / Puls über einen TPA Prozess. Abbildung 32 (links) zeigt deutlich die lineare Zunahme der Absorption in Abhängigkeit von der Pulsanzahl.

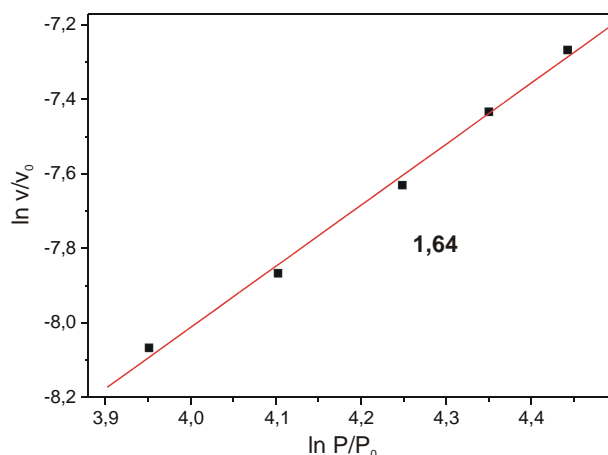


Abb. 33 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung gegen die Pulsintensität.

Die unterschiedlichen Pulsintensitäten (52,0 mJ, 60,5 mJ, 70,0 mJ, 77,5 mJ, 85,0 mJ) ermöglichen im Anschluss den Nachweis der TPA induzierten Spaltung des Cyclobutanringes.

Die doppelt logarithmische Auftragung in Abbildung 33 zeigt mit einer Steigung von 1,64 die Tendenz zur TPA induzierten Spaltung. Als weiterer Nachweis, dass es sich hierbei nur um einen TPA Prozess handeln kann, wird ein Experiment mit 2,5 mL der Stammlösung durchgeführt, bei dem die Lösung mit einem CW Laser mit Licht der Wellenlänge 532 nm bestrahlt wird. Der totale Energieeintrag in die Lösung entspricht in etwa dem der TPA induzierten Spaltung bei 85 mJ / Puls. Die folgende Abbildung zeigt eindeutig, dass keine Spaltung mittels SPA induziertem Prozess bei 532 nm zu erwarten ist.

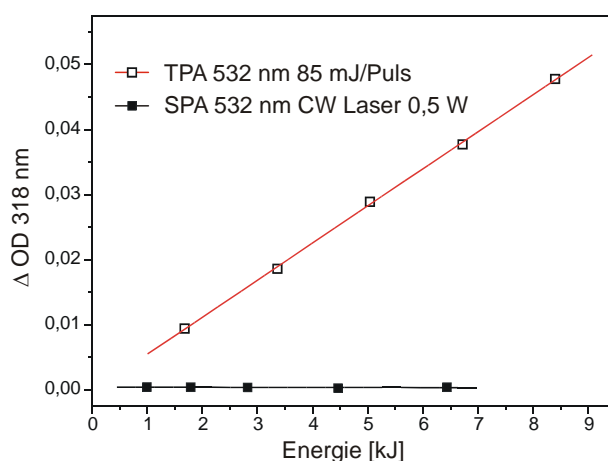


Abb. 34 Vergleich von SPA und TPA induzierter Spaltung mit Licht der Wellenlänge 532 nm.

Die folgende Tabelle zeigt die TPA-Querschnitte, zugeordnet zu der jeweiligen Pulsintensität, wobei auch hier wieder keine Abhängigkeit von der Pulsintensität zu beobachten ist und somit im Mittel ein TPA-Querschnitt von 1,36 GM bestimmt werden kann.

Laserleistung P_P [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [ΔOD / sek]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$\text{cm}^4 \text{s Photon}^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
52,0	87,10	$1,51 \cdot 10^{-50}$	1,51
60,5	106,47	$1,38 \cdot 10^{-50}$	1,38
70,0	134,86	$1,31 \cdot 10^{-50}$	1,31
77,5	164,27	$1,30 \cdot 10^{-50}$	1,30
85,0	193,92	$1,27 \cdot 10^{-50}$	1,27

Tab. 7 Übersicht über bestimmte TPA-Querschnitte bei unterschiedlichen Pulsintensitäten.

4.4.3 TBS-4M-Cum-D

Laserstrahldurchmesser: $d = 0,55 \text{ cm}$

Ansatzvolumen: $V = 2,5 \text{ ml}$

Anfangskonzentration der Lösung: $c_0 = 0,35 \text{ mmol / L}$

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{314} = 14663,5 \text{ mol / L cm}^{-1}$

Ein-Photon-Quantenausbeute: $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} = 0,32$

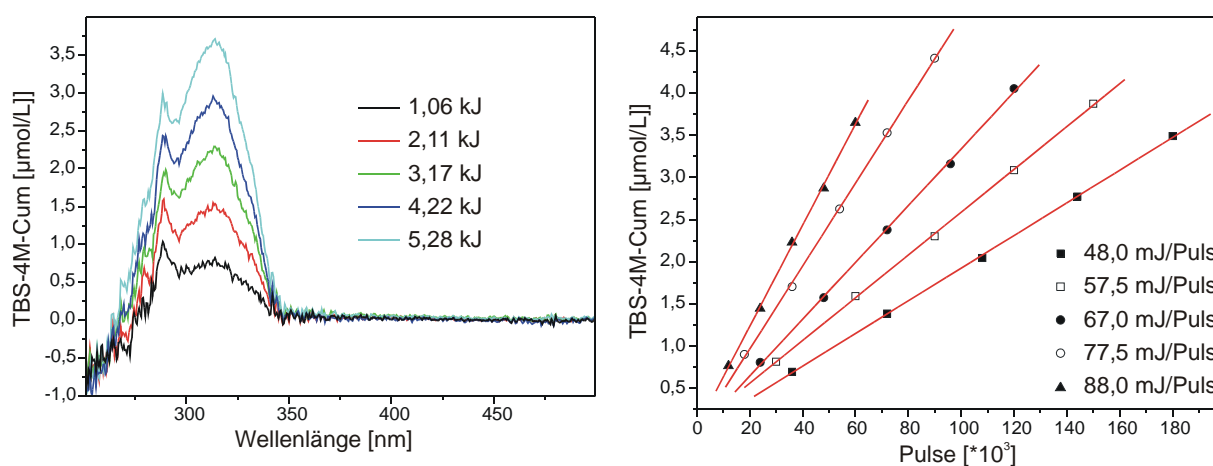


Abb. 35 Aus der TPA induzierten Spaltung (88 mJ / Puls) von TBS-4M-Cum-D resultierende Differenzspektren (Links). Konzentrationsänderung des durch Spaltung entstehenden TBS-4M-Cum in Abhängigkeit von Pulsanzahl und Pulsintensität (Rechts).

Die kontinuierliche Zunahme der Absorption in den Differenzspektren geht einher mit der kontinuierlichen Erhöhung der eingetragenen Gesamtenergie. Diese beobachtete Linearität findet sich auch, wie aus Abbildung 35 (links) ersichtlich, bei der Auftragung der Konzentrationsänderung gegen die Pulsanzahl. Für je fünf verschiedene Pulsintensitäten (48,0 mJ, 57,5 mJ, 67,0 mJ, 77,5 mJ, 88,0 mJ) werden Messreihen durchgeführt und deren Ergebnisse in Abbildung 35 (links) dargestellt. Aus den Steigungen der erhaltenen Ausgleichsgeraden und der verwendeten Pulsintensität kann durch die doppelt logarithmische Auftragung der Nachweis für eine TPA induzierte Spaltung vollzogen werden (Abbildung 36).

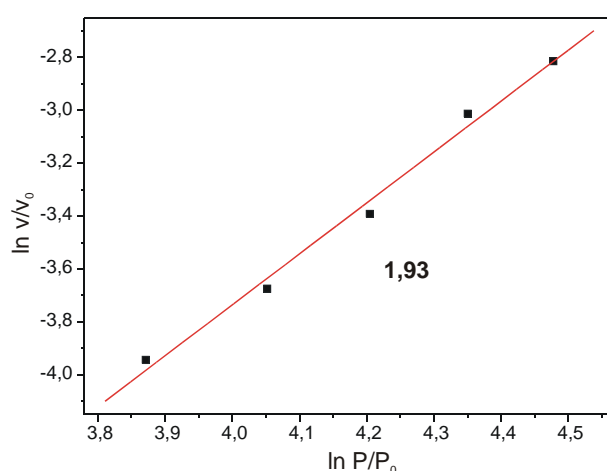


Abb. 36 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung gegen die Pulsintensität.

Die Steigung von 1,93 bestätigt, dass die hier vorliegende photochemisch induzierte Absorptionsänderung über einen TPA Prozess abgelaufen ist. Der Mittelwert der bestimmten TPA-Querschnitte liegt für dieses Dimer bei einer Wellenlänge von 532 nm bei 0,88 GM.

Laserleistung P_P [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [ΔOD / sek]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$\text{cm}^4 \text{s Photon}^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
48,0	94,69	$9,33 \cdot 10^{-51}$	0,933
57,5	123,98	$8,51 \cdot 10^{-51}$	0,851
67,0	164,54	$8,32 \cdot 10^{-51}$	0,832
77,5	240,26	$9,08 \cdot 10^{-51}$	0,908
88,0	293,03	$8,59 \cdot 10^{-51}$	0,859

Tab. 8 Übersicht über bestimmte TPA-Querschnitte bei unterschiedlichen Pulsintensitäten.

4.4.4 Zusammenfassung

Alle drei untersuchten Linkersysteme lassen sich in Lösung mittels TPA spalten. Die Absorptionsänderungen steigen linear an und verändern, abhängig von der Pulsintensität, ihre Steigung in Äquivalenz zur Linkerspaltung. Die TPA-Querschnitte sind, wie erwartet, nicht abhängig von der verwendeten Pulsintensität und liegen für alle drei Linkersysteme in einer Größenordnung (Tabelle 9).

Linkersystem	TPA Querschnitt σ [GM]
TBS-Cum-D	0,87
TBS-p-Cum-D	1,36
TBS-4M-Cum-D	0,88

Tab. 9 Zusammenfassung der Mittelwerte für die bestimmten TPA-Querschnitte von TBS-Cum-D, TBS-p-Cum-D und TBS-4M-Cum-D.

4.5 SPA induzierte Cycloreversion in Polymermatrix

Da die hier vorgestellten Linker-Systeme für die späteren Anwendungen in einer Polymermatrix eingebunden werden, ist es wichtig, die photochemischen Eigenschaften der Dimere in der Polymermatrix zu untersuchen. PMMA bietet sich als einfaches Acrylat-Polymer an, da es leicht zu verarbeiten ist.

Die benötigten Filme für die SPA- und TPA-Messungen werden nach folgender Vorschrift präpariert. PMMA wird in einem bestimmten Verhältnis mit dem zu untersuchenden Dimer in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Die Lösung wird mit einem Rakel definierter Dicke auf einer Glasplatte verteilt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet (solvent casting). Die getrockneten Filme werden in einem Wasserbad von der Glasplatte abgelöst und im Dunkeln aufbewahrt. Für die anschließenden Belichtungen werden Stücke der abgelösten Filme in spezielle Halterungen eingesetzt, belichtet und anschließend im UV/Vis-Spektrometer vermessen.

Bei der Belichtung der Filme wird wie bei den Lösungen die induzierte Cycloreversion mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Die Zunahme der charakteristischen Bande kann dann in Abhängigkeit der verwendeten Energie betrachtet werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung der einzelnen Linkersysteme werden im Folgenden beschrieben.

4.5.1 TBS-Cum-D

Verhältnis PMMA/Dimer:	800 mg / 40 mg
Lösungsmittel:	2 mL Chloroform
Rakel:	6 mm
Absorptionsänderung:	$\Delta OD = 0,008$
Flächenextinktionskoeffizient:	$\epsilon_{316} = 1,1 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 / \text{mol}$
Bestrahlungsdauer:	$t = 10 \text{ s}$
Intensität:	$I_0 = 4,35 \cdot 10^{-5} \text{ J} / \text{cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

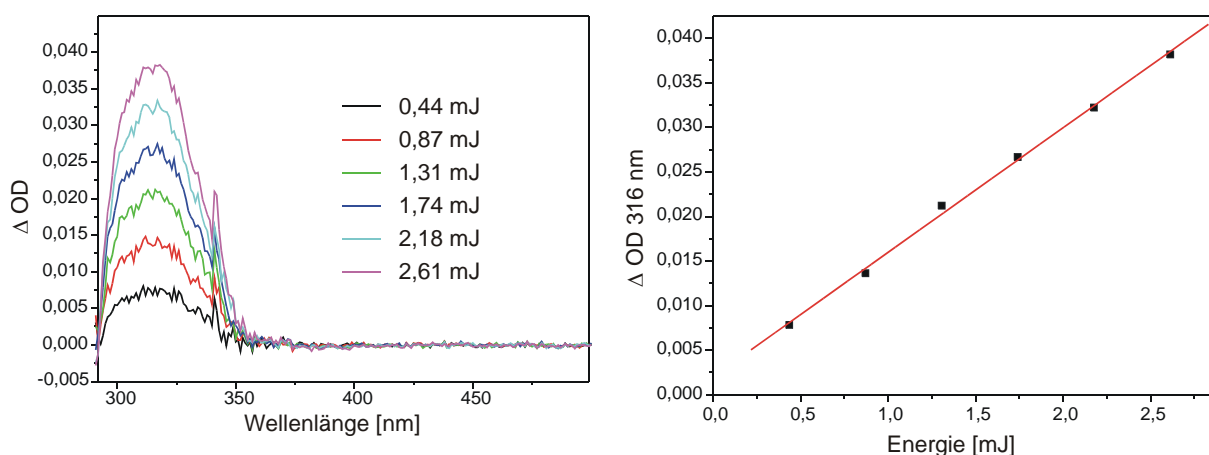


Abb. 37 SPA induzierte Absorptionsänderung in Polymermatrix. Links: Energieabhängige resultierende Differenzspektren; Rechts: Absorptionsänderung bei 316 nm in Abhängigkeit des Energieeintrages.

Die Belichtung des Polymerfilmes mit 5 % Gewichtsanteil TBS-Cum-D in bestimmten Bestrahlungsintervallen, führt bei der anschließenden Messung des Films im UV/Vis-Spektrometer zu den oben aufgeführten Differenzspektren. Im Vergleich zu der SPA induzierten Spaltung in Lösung ist der Gesamtenergieeintrag hier um drei Größenordnungen geringer. Die Berechnung der SPA Quantenausbeute zeigt aber, dass die Spaltung in der Polymermatrix nicht effektiver abläuft ($\Phi_{\text{SPA, Lösung}} = 0,36$; $\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,37$).

4.5.2 TBS-p-Cum-D

Verhältnis PMMA/Dimer:	800 mg / 40 mg
Lösungsmittel:	2 mL Tetrahydrofuran
Rakel:	6 mm
Absorptionsänderung:	$\Delta OD = 0,019$
Flächenextinktionskoeffizient:	$\epsilon_{318} = 1,6 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 / \text{mol}$
Bestrahlungsdauer:	$t = 2 \text{ s}$
Intensität:	$I_0 = 1,05 \cdot 10^{-3} \text{ J} / \text{cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

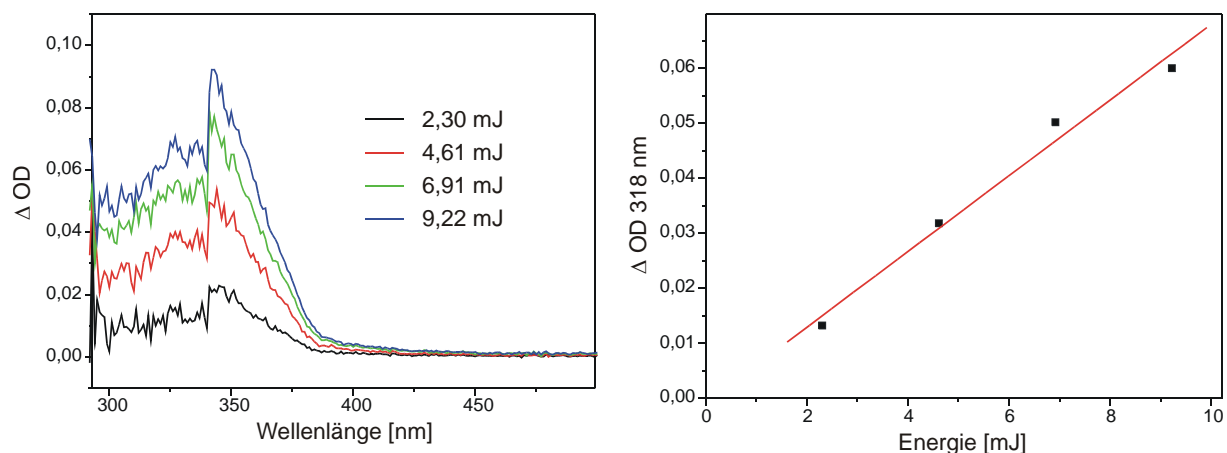


Abb. 38 SPA induzierte Absorptionsänderung in Polymermatrix. Links: Energieabhängige resultierende Differenzspektren; Rechts: Absorptionsänderung bei 318 nm in Abhängigkeit des Energieeintrages.

Abbildung 38 zeigt die Differenzspektren des belichteten Polymerfilmes bei unterschiedlichen Energien. Die Stufe um 340 nm ist bedingt durch das Umschalten der Spiegel im UV/Vis-Spektrometer. Vergleicht man nun die verwendeten Energien der SPA induzierten Spaltung in der Polymermatrix von TBS-Cum-D und TBS-p-Cum-D fällt auf, dass bei der Spaltung von TBS-p-Cum-D eine höhere Energie nötig ist. Für dieses Phänomen sind zwei Gründe zu nennen: Die SPA Quantenausbeute ($\Phi_{\text{SPA, Lösung}} = 0,16$; $\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,13$) ist, wie in Lösung, um den Faktor 2 kleiner als die des TBS-Cum Dimer. Des Weiteren spielt die Filmdicke eine entscheidende Rolle. Durch das Solvent Casting Verfahren kann nicht gewährleistet werden, dass eine identische Filmdicke reproduzierbar ist. Lässt man diese Schwankungen außer Betracht so kann die Linearität der Zunahme der Absorption für beide Dimere (TBS-Cum-D, TBS-p-Cum-D) in Abhängigkeit von der Energie gezeigt werden.

4.5.3 TBS-4M-Cum-D

Verhältnis PMMA/Dimer:	800 mg / 40 mg
Lösungsmittel:	2 mL Chloroform
Rakel:	6 mm
Absorptionsänderung:	$\Delta\text{OD} = 0,007$
Flächenextinktionskoeffizient:	$\epsilon_{314} = 1,5 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 / \text{mol}$
Bestrahlungsdauer:	$t = 10 \text{ s}$
Intensität:	$I_0 = 4,35 \cdot 10^{-5} \text{ J} / \text{cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

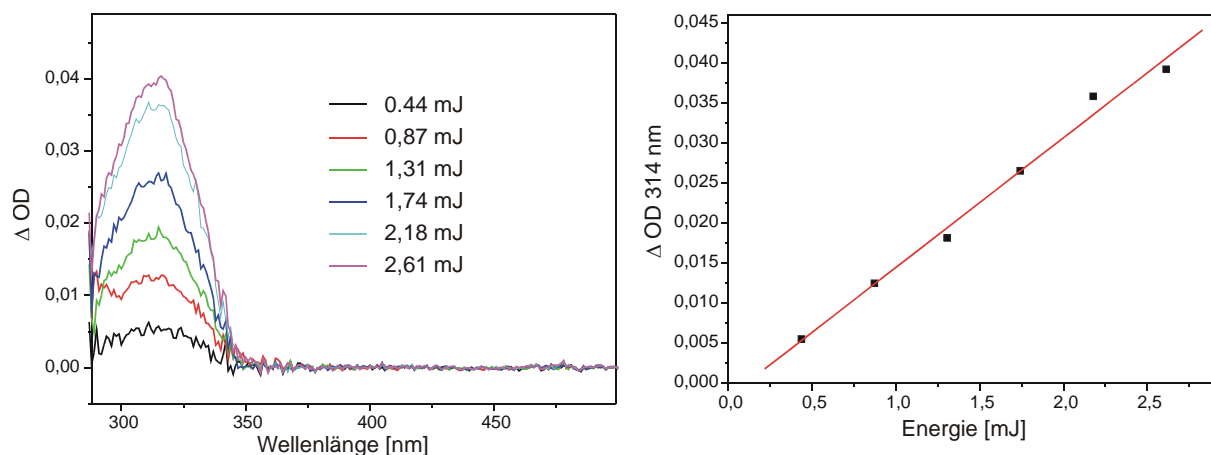


Abb. 39 SPA induzierte Absorptionsänderung in Polymermatrix. Links: Energieabhängige resultierende Differenzspektren; Rechts: Absorptionsänderung bei 314 nm in Abhängigkeit des Energieeintrages.

Wie zu erwarten ist, ist der Gesamtenergieeintrag für die SPA induzierte Spaltung von TBS-4M-Cum Dimer in der Polymermatrix ähnlich dem der Spaltung von TBS-Cum-D, da sich die Quantenausbeuten in Lösung ähneln. Die Differenzspektren zeigen deutlich eine lineare Zunahme der Absorption, welche mit der eingestrahnten Energie einhergeht. Die experimentell bestimmte SPA Quantenausbeute für die Spaltung in der Polymermatrix beläuft sich auf $\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,25$.

4.5.4 Zusammenfassung

Linkersystem	$\Phi_{\text{SPA, Film}}$
TBS-Cum-D	0,37
TBS-p-Cum-D	0,13
TBS-4M-Cum-D	0,25

Tab. 10 Übersicht über SPA Quantenausbeuten in Polymermatrix.

Die bestimmten Quantenausbeuten für die SPA induzierte Cycloreversion der drei vorgestellten Linkersysteme in PMMA Matrix weichen nur geringfügig von denen in Lösung ab. Diese geringfügigen Abweichungen resultieren aus den schwankenden Filmdicken und den weiteren experimentellen Unwägbarkeiten. Lässt man diese Gegebenheiten außer Betracht, kann durch das Einbinden der Linkersysteme in eine Polymermatrix, kein Effekt auf die Quantenausbeute beobachtet werden. Für die folgenden Bestimmungen der TPA-Querschnitte der Linker in der Polymermatrix, werden die SPA Quantenausbeuten mit den TPA Quantenausbeuten, wie in Kapitel 2.3.3 erwähnt, gleichgesetzt.

4.6 TPA induzierte Cycloreversion in der Polymermatrix

Aus den vorherigen Abschnitten resultiert als letzter wichtiger Schritt die Dimerspaltung in der Polymermatrix mit Hilfe der TPA. Für die folgenden Experimente werden Polymerfilmstücke aus der Filmherstellung für die SPA Freisetzung verwendet. Je ein Filmstück wird in eine Halterung eingespannt und an fünf unterschiedlichen Stellen belichtet. Mit Hilfe von Blenden kann der unbelichtete Bereich abgedeckt und nur der belichtete Bereich, entsprechend dem Laserstrahlquerschnitt, UV/Vis-spektroskopisch vermessen werden. Für die spätere TPA-Querschnitt Bestimmung wird aus jedem Film ein definiertes Stück herausgeschnitten, vermessen und gewogen. Aufgrund der Problematik, immer die gleiche Stelle zum Belichten bzw. Messen treffen zu müssen, was aufgrund experimenteller Gegebenheiten nicht immer möglich ist, kann es zu größeren Messfehlern und Abweichungen kommen. Trotzdem sollen die gefundenen Ergebnisse präsentiert und verglichen werden, da sie für eine Gesamtbetrachtung am Ende des Kapitels nicht außer Acht gelassen werden können.

Wichtige Parameter, welche für alle Experimente gelten:

Laserstrahldurchmesser: $d = 0,55 \text{ cm} \Rightarrow r = 0,28 \text{ cm}$

Laserstrahlfläche: $A = r^2 \cdot \pi = 0,24 \text{ cm}^2$

Wellenlänge des Laserlichtes: $\nu = 532 \text{ nm}$

Pulslänge: 3 ns

Frequenz: 20 Hz

Energie eines Photons bei 532nm: $E_{\text{photon}} = h\nu = 3,7 \cdot 10^{-19} \text{ J / Photon}$

4.6.1 TBS-Cum-D

Verhältnis PMMA/Dimer: $800 \text{ mg} / 40 \text{ mg}$

Filmgewicht: $1,6 \text{ mg}$

Filmfläche: $3,5 \text{ mm} \cdot 3 \text{ mm} = 10,5 \text{ mm}^2$

Molmasse Molekül: $552,81 \text{ g} / \text{mol}$

Laserstrahldurchmesser: $d = 0,55 \text{ cm}$

Anfangsflächenkonzentration Cyclobutanringe: $F_{\text{Cyclo}} = 7,91 \cdot 10^{17} \text{ mol} / \text{cm}^2$

Flächenextinktionskoeffizient: $\epsilon_{316} = 1,1 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 / \text{mol}$

Ein-Photon-Quantenausbeute: $\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,37$

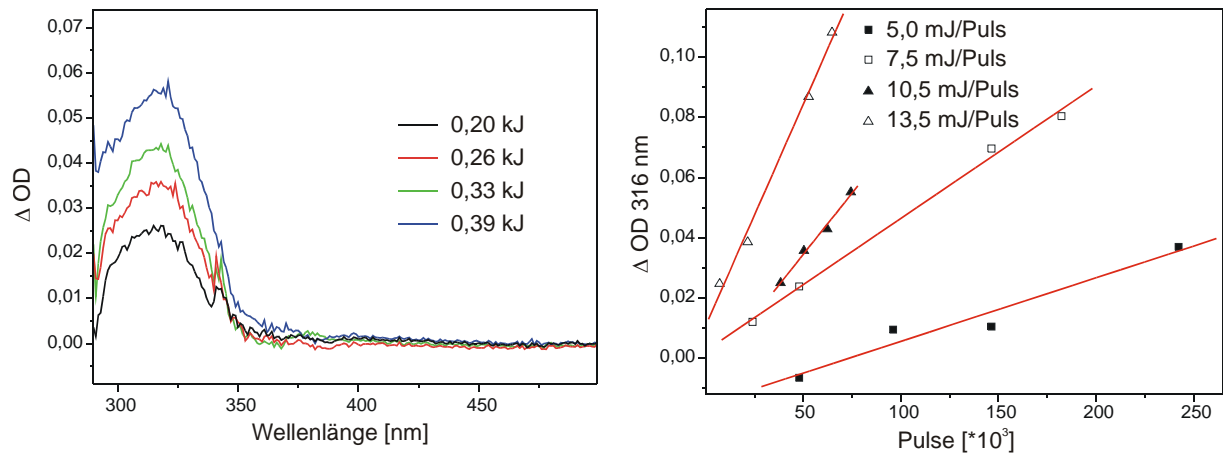


Abb. 40 TPA induzierte Cycloreversion von TBS-Cum-D in Polymermatrix. Links: Differenzspektren induziert mit 10,5 mJ / Puls; Rechts: Absorptionszunahme bei 316 nm in Abhängigkeit von der Pulsanzahl und Pulsintensität.

Beim Vergleich der verwendeten Pulsintensitäten (5,0 mJ, 7,5 mJ, 10,5 mJ, 13,5 mJ) mit denen bei der TPA induzierten Spaltung in Lösung zeigt sich, wie bei der SPA induzierten Cycloreversion, dass die Spaltung des Dimers, unbeachtet des experimentellen Aufbaus, effektiver abläuft. Abbildung 40 (rechts) zeigt die Differenzspektren (10,5 mJ / Puls) und deren Absorptionszunahmen, welche mit der im Vergleich geringen Energie von unter 1,0 kJ induziert werden können. Für die vier verschiedenen Pulsintensitäten zeigt sich auch in der Filmphase eine lineare Absorptionsänderung der Pulsanzahl.

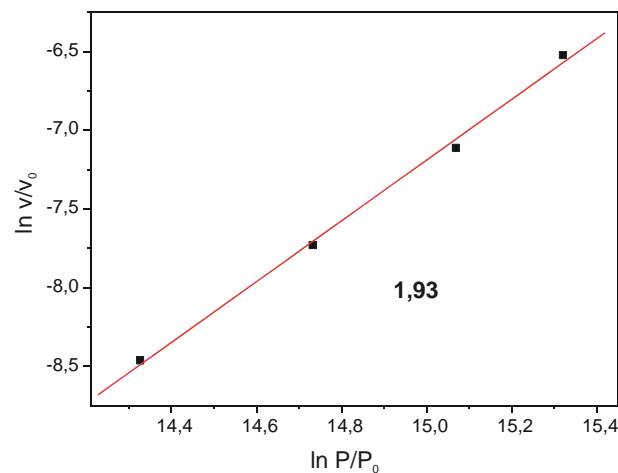


Abb. 41 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangssteigung gegen die Pulsintensität.

Der Nachweis für die TPA induzierte Spaltung im Film wird, wie bereits erwähnt, über die doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Pulsintensität geführt. Abbildung 41 zeigt die resultierende Ausgleichsgerade mit einer Steigung von 1,93, was als Nachweis für einen TPA induzierten Prozess angesehen werden kann. Wie auch

schon für die Experimente in Lösung, werden zu den jeweiligen Pulsintensitäten die TPA-Querschnitte berechnet. Tabelle 11 führt die berechneten Werte auf und es zeigt sich, dass die Querschnitte im Mittel fünffach größer sind als die in Lösung.

Laserleistung P_P [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [ΔOD / sek]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$\text{cm}^4 \text{s Photon}^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
5,0	211,14	$5,60 \cdot 10^{-50}$	5,60
7,5	440,10	$5,19 \cdot 10^{-50}$	5,19
10,5	815,00	$4,90 \cdot 10^{-50}$	4,90
13,5	1470,24	$5,35 \cdot 10^{-50}$	5,35

Tab. 11 TPA-Querschnitte (Polymermatrix) in Abhängigkeit von der Pulsintensität.

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse werden für dieses Dimer die Querschnitte mit neuen Experimenten nochmals bestimmt, um einen evtl. Einfluss der PMMA-Matrix auf die Cycloreversion ausschließen zu können.

Die TPA induzierte Cycloreversion in Lösung wird unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wobei die Abweichungen im Folgenden aufgeführt sind:

Lösung 1: $c_0 = 0,58$ mM TBS-Cum-D in Chloroform

Lösung 2: $c_0 = 0,7$ mg (0,51 mM) TBS-Cum-D und 13,5 mg PMMA in 2,5 mL Chloroform

Laserleistung: $P_P = 70$ mJ / Puls

Die berechneten Querschnitte für Lösung 1 und 2 sind annähernd gleich (L1 1,06 GM; L2 1,06 GM).

Für die photochemische Spaltung in PMMA-Matrix werden die gleichen Einstellungen, mit Ausnahme der aufgeführten Variablen, wie in dem vorangegangenen Abschnitt verwendet.

Film 1: 20 : 1 PMMA : Dimer; 308,1 mg PMMA : 15,3 mg Dimer; 2,9 mm · 4,2 mm 2,2 mg

Film 2: 15 : 1 PMMA : Dimer; 305,7 mg PMMA : 20,4 mg Dimer; 3,15 mm · 5,1 mm 3,3 mg

Laserleistung: $P_P = 10,5$ mJ / Puls

Auch bei diesem Experiment weisen die unterschiedlichen Filme wieder annähernd identische Querschnitte auf (F1 1,90 GM; F2 1,83 GM).

Auffällig bei diesem Experiment ist, dass die zuvor bestimmten Querschnitte in Lösung keine große Abweichung zu den neuen Experimenten zeigen. Das zusätzlich gelöste PMMA hat in diesem Experiment keinen Einfluss auf den TPA Prozess. Vergleicht man aber die berechneten Querschnitte für die TPA induzierte Cycloreversion in Polymerfilmen, so zeigt sich eine Abweichung um das 2,5 fache von der ersten Messreihe. Diese Schwankung und auch der Unterschied zu den Werten in Lösung zeigen deutlich, dass es bei der Spaltung in einem Polymerfilm noch zu viele Unwägbarkeiten gibt, so dass eine genaue Untersuchung der TPA Prozesse zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich ist. Die Ergebnisse dienen als erste Grundlage für die photoinduzierte Wirkstofffreisetzung via Cumarin-Linkersystemen, und zeigen, dass durch die Einbindung des Linkersystems in eine Polymermatrix kein Einfluss auf die photochemische Spaltung zu erwarten ist.

4.6.2 TBS-p-Cum-D

Verhältnis PMMA/Dimer:	800 mg / 40 mg
Filmgewicht:	4,6 mg
Filmfläche:	$5,85 \text{ mm} \cdot 5,45 \text{ mm} = 49,4 \text{ mm}^2$
Molmasse Molekül:	668,96 g / mol
Laserstrahldurchmesser:	$d = 0,55 \text{ cm}$
Anfangsflächenkonzentration Cyclobutanringe:	$F_{\text{Cyclo}} = 6,19 \cdot 10^{17} \text{ mol} / \text{cm}^2$
Flächenextinktionskoeffizient:	$\epsilon_{318} = 1,6 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 / \text{mol}$
Ein-Photon-Quantenausbeute:	$\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,13$

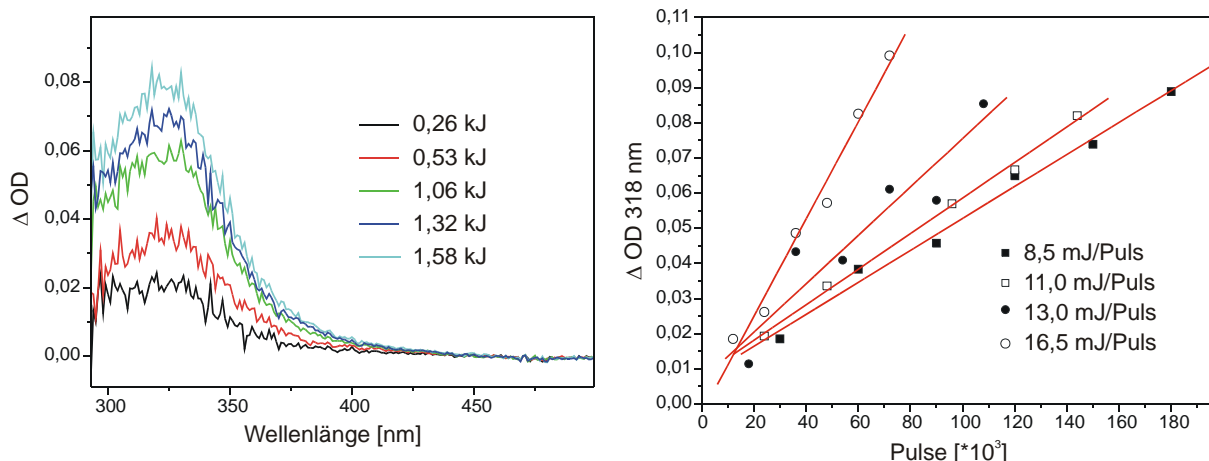


Abb. 42 TPA induzierte Cycloreversion von TBS-p-Cum-D in Polymermatrix. Links: Differenzspektren induziert mit 11,0 mJ / Puls; Rechts: Absorptionszunahme bei 318 nm in Abhängigkeit von der Pulsanzahl und Pulsintensität.

Die oben aufgeführte Abbildung zeigt wieder eindeutig die TPA induzierte Spaltung des TBS-p-Cum Dimers in der Polymermatrix. Die Linearität der Absorptionzunahmen ist bei allen vier verwendeten Pulsintensitäten (8,5 mJ, 11,0 mJ, 13,0 mJ, 16,5 mJ) zu erkennen. Die doppelt logarithmische Auftragung zeigt eine Steigung von 1,67 und ist somit identisch mit der, welche für den TPA Prozess in Lösung bestimmt wurde.

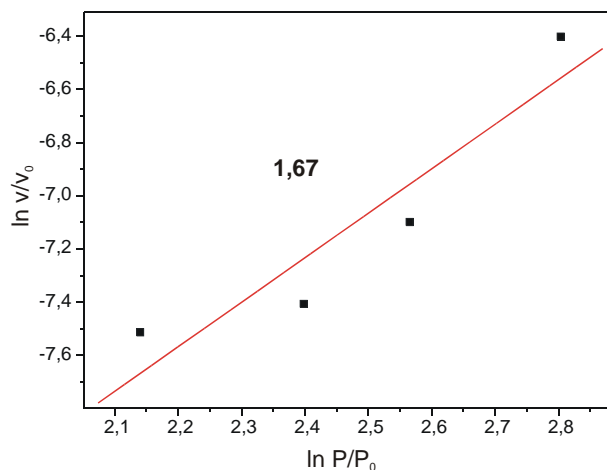


Abb. 43 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangssteigung gegen die Pulsintensität.

Bei der Bestimmung der TPA-Querschnitte stellt sich heraus, dass diese in der Polymermatrix im Mittel um das Doppelte größer sind, als die für die Spaltung in Lösung. Zieht man wieder die experimentellen Unwägbarkeiten in Betracht, kann näherungsweise auch der Einfluss der Matrix auf die Spaltung vernachlässigt werden.

Laserleistung P_p [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [ΔOD / sek]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$\text{cm}^4 \text{s Photon}^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
8,5	151,61	$3,48 \cdot 10^{-50}$	3,48
11,0	168,75	$2,31 \cdot 10^{-50}$	2,31
13,0	229,67	$2,25 \cdot 10^{-50}$	2,25
16,5	461,13	$2,81 \cdot 10^{-50}$	2,81

Tab. 12 TPA-Querschnitte (Polymermatrix) in Abhängigkeit von der Pulsintensität.

4.6.3 TBS-4M-Cum-D

Verhältnis PMMA/Dimer:	800 mg / 40 mg
Filmgewicht:	3,0 mg
Filmfläche:	3,1 mm · 5,15 mm = 16,0 mm ²
Molmasse Molekül:	580,86 g / mol
Laserstrahldurchmesser:	d = 0,55 cm
Anfangsflächenkonzentration Cyclobutanringe:	$F_{\text{Cyclo}} = 9,28 \cdot 10^{17} \text{ mol / cm}^2$
Flächenextinktionskoeffizient:	$\epsilon_{314} = 1,5 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 / \text{mol}$
Ein-Photon-Quantenausbeute:	$\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,25$

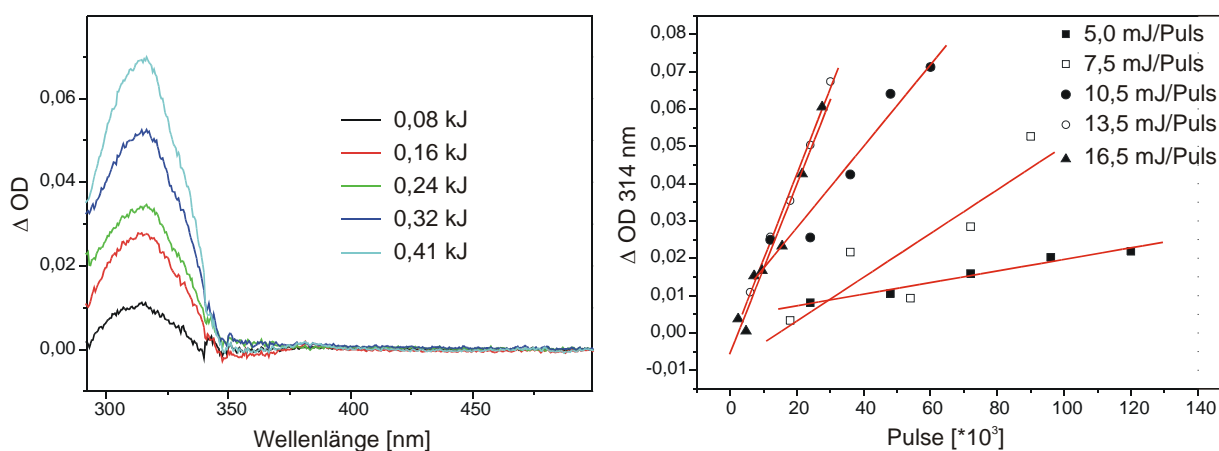


Abb. 44 TPA induzierte Cycloreversion von TBS-4M-Cum-D in Polymermatrix. Links: Differenzspektren induziert mit 13,5 mJ / Puls; Rechts: Absorptionszunahme bei 314 nm in Abhängigkeit von der Pulsanzahl und Pulsintensität.

Die TPA induzierte Spaltung des TBS-4M-Cum Dimers in einer Polymermatrix kann, wie am Beispiel der Differenzspektren gezeigt, durchgeführt werden und zeigt auch eine kontinuierliche Zunahme der Absorption, einhergehend mit der Erhöhung der eingestrahnten Gesamtenergie. Der Vergleich der resultierenden linearen Absorptionszunahmen bei unterschiedlichen Pulsintensitäten allerdings zeigt die große Problematik der Filmdickenvariation und experimentelle Unwägbarkeiten bei diesen Untersuchungen (Abbildung 40 links). Die doppelt logarithmische Auftragung, welche in einer Steigung von 2,45 resultiert, verdeutlicht die Problematik bei der experimentellen TPA induzierten Dimerspaltung in einer Polymermatrix. Der erhaltenen Werte sollen nur als Demonstration angesehen werden. Der tatsächliche Nachweis der TPA kann mit diesem Experiment nicht eindeutig erbracht werden.

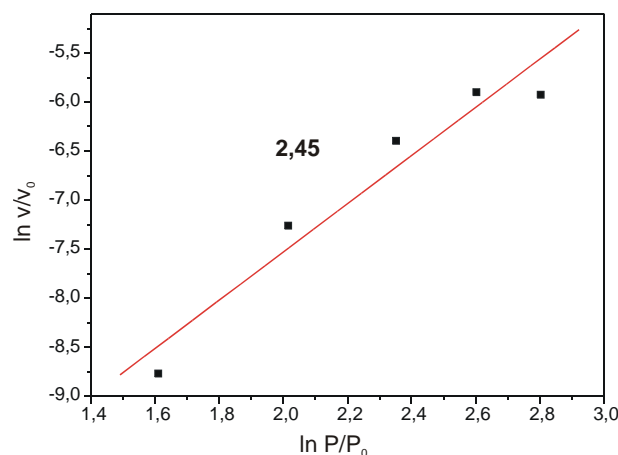


Abb. 45 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangssteigung gegen die Pulsintensität.

Laserleistung P_P [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [ΔOD / sek]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$cm^4 s Photon^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
5,0	51,73	$1,27 \cdot 10^{-50}$	1,27
7,5	195,33	$2,13 \cdot 10^{-50}$	2,13
10,5	364,03	$2,02 \cdot 10^{-50}$	2,02
13,5	764,61	$2,57 \cdot 10^{-50}$	2,57
16,5	754,81	$1,70 \cdot 10^{-50}$	1,70

Tab. 13 TPA-Querschnitte (Polymermatrix) in Abhängigkeit von der Pulsintensität.

Die Werte für die TPA-Querschnitte in Tabelle 13 liegen im erwarteten Bereich für die Spaltung in der Polymermatrix, sollten aber erneut vermessen werden, da wie gezeigt die Messung zum Nachweis der TPA induzierten Spaltung eine unrealistische Steigung aufweist. Fasst man die Ergebnisse dieses Experimentes zusammen, ist eine Tendenz der TPA induzierten Spaltung in PMMA Filmen ersichtlich, aber nicht bewiesen. Die Gründe für die schlechten Ergebnisse für die TPA Cycloreversion von TBS-4M-Cum-D in der Polymermatrix sind auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Die Filmpräparation führt zu Schwankungen in der Filmdicke und damit zu unterschiedlichen Dimerkonzentrationen im Laser und im Lichtweg des UV/Vis-Spektrometers. Bei der Belichtung und der anschließenden Messung der induzierten Absorptionsänderung kann es aufgrund von Positionierungsfehlern schnell zu gravierenden Abweichungen kommen. Da die Berechnung der TPA-Querschnitte auf den ermittelten Anfangssteigungen basiert, gelten diese Ergebnisse nur als vorläufig.

4.6.4 Zusammenfassung

Linkersysteme	TPA Querschnitt σ [GM]
TBS-Cum-D	5,26 (1,87)
TBS-p-Cum-D	2,71
TBS-4M-Cum-D	1,94

Tab. 14 Mittelwerte der bestimmten TPA-Querschnitte in Polymermatrix der drei Linkersysteme.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aus diesem Kapitel zeigt, dass die bestimmten Querschnitte nur geringfügig von den Werten für die Querschnitte in Lösung abweichen. Zieht man die experimentellen Unwägbarkeiten in Betracht, ist durch Einschließen der Linkersysteme in eine Polymermatrix ein Einfluss auf die Querschnitte nicht zu erkennen.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

	TBS-Cum-D	TBS-p-Cum-D	TBS-4M-Cum-D	Cumarin-Dimer ^[33]
ϵ [L /mol cm ⁻¹]	11347,6 (316 nm)	16375,2 (318 nm)	14663,5 (314 nm)	5170,0 (310 nm)
$\Phi_{\text{SPA, Lösung}}$	0,36	0,16	0,32	0,21
$\sigma_{\text{TPA, Lösung}}$ [GM]	0,87 (1,06)	1,36	0,88	0,016
$\Phi_{\text{SPA, Film}}$	0,37	0,13	0,25	-
$\sigma_{\text{TPA, Film}}$ [GM]	5,26 (1,87)	2,71	1,94	-

Tab. 15 Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften der drei vorgestellten Linkersysteme.

Die oben aufgeführte Tabelle stellt nochmals eine Zusammenfassung der Ergebnisse der photochemischen Eigenschaften der Linkersysteme dar. Für das TBS-4M-Cum-D stellt sich in diesen Experimenten heraus, dass es nicht wie aufgrund von Informationen aus der Literatur erwartet, effektiver als TBS-Cum-D spaltet^[58].

Die folgende Tabelle zeigt die einzelnen Tendenzen bezüglich der aufgestellten Anforderungsparameter der hergestellten Dimere, im Vergleich zu Cumarin Dimer:

- Chemisch: **I.** Reaktive Seitengruppen zur chemischen Anbindung an ein Polymer und Wirkstoffanbindung
II. Leicht entfernbare photostabile Schutzgruppe für die Seitengruppen
III. Hohe Ausbeute bei der Photodimerisierung
IV. Eignung für die Anbindung von sterisch anspruchsvollen Wirkstoffen
- Physikalisch: **V.** hohe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln
VI. Mischbarkeit mit Polymer
VII. Spaltbarkeit via SPA und TPA
VIII. Hohe Quantenausbeute

Parameter	Cumarin-D ^[33]	TBS-Cum-D	TBS-p-Cum-D	TBS-4M-Cum-D
I	-	+	+	+
II	-	+	+	+
III	+	+	-	+
IV	-	-	+	-
V	-	+	+	+
VI	+	+	+	+
VII	+	+	+	+
VIII	-	+	-	+

Tab. 16 Übersicht über die Erfüllung der Anforderungsparameter.

Alle drei untersuchten Dimere zeigen eine gute Eignung um als Linkersystem verwendet werden zu können. TBS-p-Cum-D bietet, mit dem gebundenen Spacer, die Möglichkeit, sterisch anspruchsvolle Wirkstoffe zu binden. Allerdings ist die Ausbeute der Dimerisierung nur halb so groß, wie die von TBS-Cum-D oder TBS-4M-Cum-D. Die schlechte SPA Quantenausbeute ist zwar nicht befriedigend, aber der TPA Querschnitt ist vergleichbar mit den beiden anderen Dimeren. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird das TBS-Cum-D gewählt um es als neues Linkersystem in ein Polymer einzubauen. Die Ergebnisse werden im folgenden dritten Teil dieser Arbeit vorgestellt.

4.8 Theoretische Berechnung der unerwünschten Freisetzung durch Sonnenlicht

Für die spätere Anwendung ist es von größter Wichtigkeit, dass es nach der Implantation der wirkstoffbeladenen IOL nicht zu einer unerwünschten Freisetzung durch Sonnenlicht kommt. Da es nicht möglich ist einen überschaubaren Zeitraum 10 Jahre Exposition im Sonnenlicht mittels Experimente zu simulieren wird in diesem Kapitel eine theoretische Betrachtung anhand der experimentell ermittelbaren Daten, am Beispiel von TBS-p-Cum, durchgeführt.

Im Wellenlängenbereich für die SPA induzierte Spaltung mittels Sonnenlicht ist die in den Experimenten betrachtetete Wellenlänge von 266 nm unerheblich, da nach dem Bundesamt für Strahlenschutz UV-Strahlung erst ab der Wellenlänge 290 nm auf der Erdoberfläche detektierbar ist^[62]. Aufgrund dieses Sachverhalts wird ein Szenario für den schlimmsten Fall angenommen. Da das UV/Vis-Spektrum des Dimers nur eine Absorption bis 300 nm aufweist kann davon ausgegangen werden, dass auch nur in diesem Wellenlängenbereich eine Spaltung mittels SPA induziert werden kann. Für die durch SPA unerwünscht induzierte Freisetzung mittels Sonnenlicht wird das Spektrum der Globalstrahlung ($1250 \text{ W m}^{-2} \mu\text{m}^{-1}$) über den Bereich $290 \pm 10 \text{ nm}$ integriert um eine Intensitätsangabe zu erhalten (1 W m^{-2})^[63]. Da die Möglichkeit besteht über einen TPA Prozess auch eine Spaltung zu erhalten wird auch hier das Spektrum im Bereich $500 \pm 100 \text{ nm}$ integriert, da mittels SPA eine Spaltung im Bereich von 200 - 300 nm (250 W m^{-2}) erwartet wird.

Für die Berechnung der unerwünschten SPA induzierten Spaltung werden zwei weitere Parameter aufgeführt: Erstens die Hornhaut absorbiert in diesem Wellenlängenbereich bis zu 98 % der Strahlung, zweitens das IOL-Material wird mit einem UV-Absorber versehen und absorbiert somit zusätzlich 99,9 % der UV-Strahlung^[64, 65]. Nimmt man nun an, dass die belichtete Fläche einen Durchmesser von 0,55 cm hat, eine IOL 50,0 mg wiegt, diese zu 5 % beladen ist und die Quantenausbeute $\Phi_{\text{SPA, Film}} = 0,13$ ist, dann würde das komplette Wirkstoffdepot nach ca. 788 Jahren kontinuierlicher Sonneneinstrahlung abgebaut sein. Es kann nicht verhindert werden, dass dauerhaft eine kleine Menge an Wirkstoff freigesetzt wird, diese ist aber vernachlässigbar klein und nicht wirksam.

Für den TPA induzierten Prozess mittels Sonnenstrahlung greift man auch auf die experimentell bestimmten Daten zurück, wie den TPA-Querschnitt und SPA-Quantenausbeute. Die Sonnenstrahlungsintensität für den erwähnten Bereich wird umgerechnet in eine Pulsintensität pro 3 ns und dann eingesetzt in die nach der Anzahl der gespaltenen Dimere umgestellte Gleichung 23. In der folgenden Tabelle sind die theoretisch

berechneten Werte für die ungewollte SPA und TPA induzierte Spaltung mittels Sonnenlicht für eine 100 %ige Freisetzung aufgeführt.

Unerwünscht Freisetzung	
SPA	TPA
290 ± 10 nm	500 ± 100 nm
≈ 800 Jahre	≈ 2,44*10¹⁰ Jahre

Tab. 17 Übersicht über Zeiträume zur Spaltung von 100 % der Linkersysteme in einer IOL.

Als Konsequenz dieser Berechnung ist zu erwähnen, dass in der späteren Anwendung nicht auf einen UV-Absorber verzichtet werden kann, es aber über einen Zeitraum von 10 – 20 Jahren keine merkenswerte Freisetzung geben wird.

4.9 Exkurs

4.9.1 Hept-Cum-D

Wie in Kapitel 9.2 beschrieben wird, können noch weitere Cumarinderivate dimerisiert werden. Heptanoylcumarin kann auch in hoher Isomerenreinheit hergestellt werden und wird anschließend auf seine photochemischen Eigenschaften in Lösung hin untersucht. Die Ergebnisse sind wichtig, da dieses Derivat als Vergleichsubstanz zum Polymer gebundenen Cumarin angesehen wird^[48]. Im folgenden Abschnitt wird nun die SPA und die TPA induzierte Spaltung des Dimers in Lösung untersucht und charakterisiert. Zur genauen Berechnung der gespaltenen Dimermoleküle wird zunächst, wie bereits beschrieben, der Extinktionskoeffizient von hept-Cum bestimmt zu $\epsilon_{308} = 7989,68 \text{ L / mol cm}^{-1}$.

4.9.1.1 SPA

Für die Untersuchung der SPA induzierten Cycloreversion von Hept-Cum-D wird eine Stammlösung aus 18 mg Dimer in 100 mL ACN (0,33 mM) hergestellt. Aus dieser Lösung werden 2,5 mL entnommen und in einer Quarzglaszuvette im Fluoreszenzspektrometer mit 266 nm belichtet. Im 5 Sekunden Takt wird die Belichtung unterbrochen und ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen.

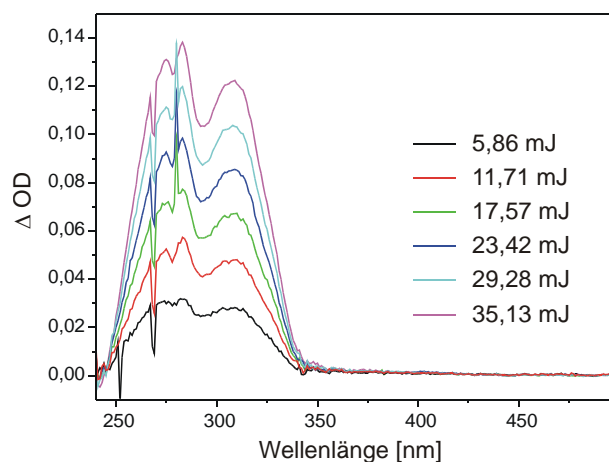


Abb. 46 Differenzspektren der Spaltung des Hept-Cum Dimers, induziert durch einen SPA Prozess.

Zieht man nun den vorher bestimmten Extinktionskoeffizienten für Hept-Cum heran, kann die Absorptionsänderung bei 308 nm als eine Konzentrationsänderung pro Zeit aufgetragen werden. Die resultierende Anfangsgeschwindigkeit ($7,07 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$) wird dann wie beschrieben in die Formel zur Berechnung der Quantenausbeute eingesetzt.

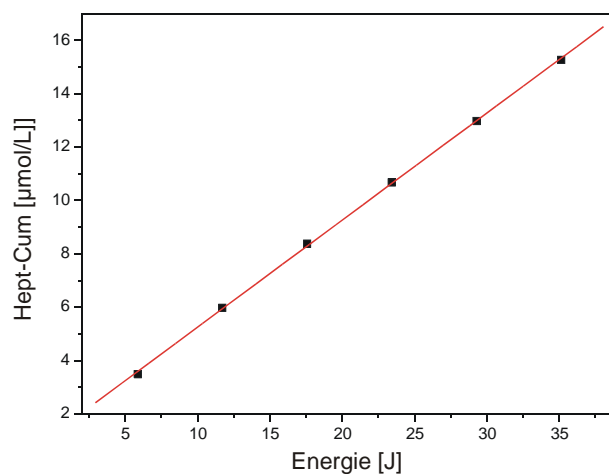


Abb. 47 Lineare Abhängigkeit der SPA induzierten Cycloreversion von der Intensität.

Die Messung der emittierten Strahlung des Fluoreszenzspektrometers mit der kalibrierten Photodiode ergab eine gemessene Stromstärke der Photodiode bei 266 nm von 123 μA . Dividiert man die Anzahl der gespaltenen Dimere durch die emittierte Photonenzahl, erhält man eine Quantenausbeute von 23 % für das Hept-Cum-D.

4.9.1.2 TPA

Die TPA induzierte Spaltung des Hept-Cum Dimers in Lösung wird bei folgenden Parametern durchgeführt:

Laserstrahldurchmesser:	0,55 cm
Ansatzvolumen:	2,5 ml
Anfangskonzentration der Lösung:	0,33 mmol / L
Extinktionskoeffizient:	$\epsilon_{308} = 7989,68 \text{ mol / L cm}^{-1}$
Ein-Photon-Quantenausbeute:	0,23

Es werden vier Belichtungsreihen bei unterschiedlichen Pulsintensitäten durchgeführt (52,0 mJ, 63,0 mJ, 73,0 mJ, 83,0 mJ), wobei die Belichtungszeiten variiert werden. Abbildung 48 zeigt beispielhaft die erhaltenen Differenzspektren für die Belichtungsreihe mit 73,0 mJ.

Die Ergebnisse der Belichtungsreihen, welche die Konzentrationsänderung an Hept-cum in Bezug auf die Pulsanzahl und Pulsintensität darstellen, sind nochmals in Abbildung 49 aufgeführt.

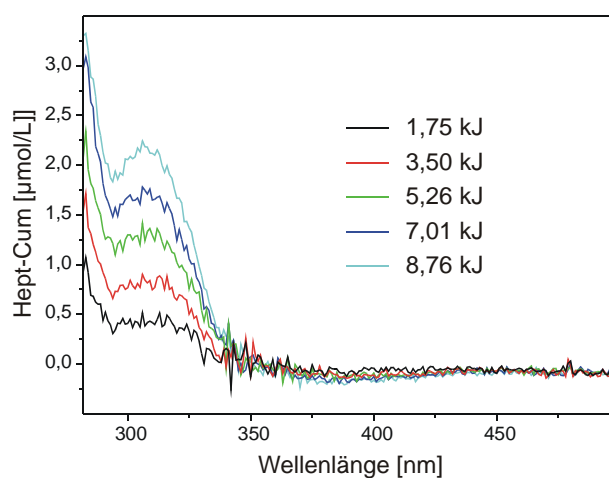


Abb. 48 Resultierende Differenzspektren bei der TPA induzierten Spaltung des Hept-Cum Dimers in Lösung mit einer Pulsintensität von 73 mJ.

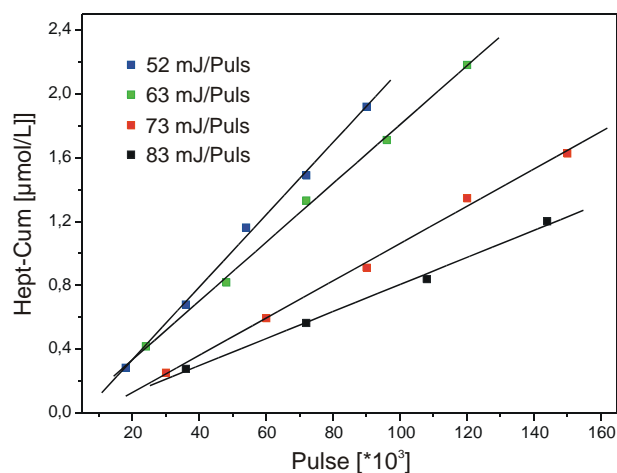


Abb. 49 Konzentrationsänderung des durch TPA gebildeten Monomers in Abhängigkeit von der Pulsanzahl und der Pulsintensität.

Der Nachweis für die TPA induzierte Cycloreversion mittel doppelt logarithmischer Auftragung ist in Abbildung 50 zu sehen. Die Steigung mit 1,98 dient als Nachweis für den Zwei-Photonen-Prozess.

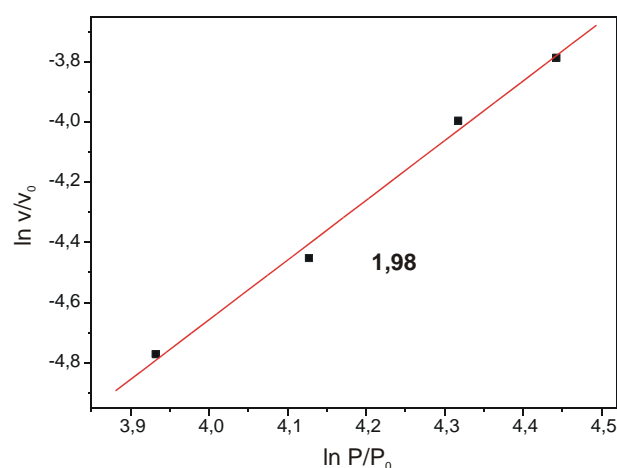


Abb. 50 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Pulsintensität.

Wie bereits in Kapitel 2.3.4 beschrieben, kann der TPA-Querschnitt für die vier Pulsintensitäten (53,0 mJ, 63,0 mJ, 73,0 mJ, 83,0 mJ) berechnet werden (Tabelle 17). Der Zwei-Photonen-Querschnitt variiert nur leicht bei den unterschiedlichen Pulsintensitäten, entsprechend der Theorie, dass der Querschnitt unabhängig von der Pulsintensität ist.

Laserleistung [mJ / Puls]	Anfangsgeschwindigkeit: v_0 [$\Delta OD/sek$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$cm^4 s Photon^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
53	22,56	$5,13 \cdot 10^{-51}$	0,513
63	31,06	$4,81 \cdot 10^{-51}$	0,481
73	49,04	$5,66 \cdot 10^{-51}$	0,566
83	60,39	$5,39 \cdot 10^{-51}$	0,539

Tab. 18 Übersicht über bestimmte TPA-Querschnitte von Hept-Cum-D in Lösung, in Abhängigkeit von der Pulsintensität.

4.9.2 Val-4M-Cum-D

Für die weitere Forschung könnte es von starkem Interesse sein, direkt Wirkstoff an Cumarin anzubinden und diese Moleküle anschließend zu dimerisieren bzw. Kreuzdimere mit polymerisierbaren Cumarinderivaten zu bilden. Die ersten Versuche in diese Richtung konnten mit Valproinsäure und 4M-Cum durchgeführt werden. Wie im Ex-Teil bereits beschrieben, kann die Wirkstoffankopplung durchgeführt werden und auch die anschließende Dimerisierung im Photoreaktor war erfolgreich. Diese Wirkstoff-Cumarin-Dimere könnten, wie in meiner Diplomarbeit bereits beschrieben, auf ihre unterschiedlichen Diffusionseigenschaften vor und nach photochemischer Spaltung (Dimer / Monomer) hin untersucht werden^[66]. Sollte ein gravierender Unterschied zwischen Monomer und Dimer existieren, wäre eine sehr einfache photochemisch steuerbare Wirkstofffreisetzung aus der Polymermatrix zugänglich. Durch die große Auswahl an Wirkstoffen, welche an Cumarin koppelbar sind, wäre somit eine breite Anwendung in der Medizin denkbar.

5 COPOLYMER ALS MULTIFUNKTIONALER TRÄGER FÜR PHARMAZEUTISCHE WIRKSTOFFE

Die Problematik der photochemischen Beladung von PBMAOC mit H5FU, einhergehend mit der Verschlechterung der Polymereigenschaften, war der Anlass, neue Strategien der Herstellung zu entwickeln. Der wichtigste Ansatzpunkt an der bekannten Synthese ist, die photochemische Beladung nicht polymeranalog durchzuführen. Als Konsequenz ist die Synthese eines photochemisch aktiven Monomers und die anschließende Copolymerisation notwendig. Der dafür nahe liegende Ansatz wäre die Kreuzdimerisierung von Cumarin und H5FU. Dieser Ansatz wurde schon im Arbeitskreis von Prof. Greiner^[48] verfolgt und als wenig praktikabel festgestellt, da die Ausbeute nur verschwindend gering war. Um zu hohen Ausbeuten für die photochemische Synthese zu gelangen, muss die Dimerisierung von Cumarinderivaten optimiert werden. Dafür wären zwei Strategien denkbar:

- 1.) Die Verwendung von Cumarindimeren als Linkersystem, an welche verschiedenste zugelassene Wirkstoffe gekoppelt werden könnten.
- 2.) Die Verwendung von Kreuzdimeren aus Cumarin (gebunden an Polymer) und Wirkstoffen auf Cumarinbasis.

Beide Systeme haben Vorteile und Nachteile. Strategie eins ermöglicht die Verwendung von verschiedensten zugelassenen Wirkstoffen, während Strategie 2 nur Wirkstoffe zulässt, die eine Cumarinstruktur enthalten und soweit bekannt, existieren davon noch keine zugelassenen Wirkstoffe. Ein Nachteil von 1 ist die anschließende Hydrolyse des Cumarin-Wirkstoff-Konjugates, während bei 2 der Wirkstoff direkt freigesetzt wird. Bei der Synthese über Strategie 1 wird zuerst das Dimer photochemisch hergestellt und dann der Wirkstoff angebunden, somit muss der Wirkstoff bei der Beladung nicht photostabil sein. Für beide Synthesewege gilt, dass der Wirkstoff während der Polymerisation stabil sein muss und nicht einpolymerisiert wird. Sollte es zu Problemen bei beiden Synthesen kommen, besteht die Ausweichmöglichkeit zuerst nach dem entscheidenden Schritt den Wirkstoff anzubinden oder zu synthetisieren.

Da beide Synthesestrategien ihre Vor- und Nachteile haben, entschieden wir uns für Strategie Nummer 1, da zu Beginn dieser Arbeit keine passenden Wirkstoffe basierend auf Cumarin, zur Verfügung standen, welche für die Synthesestrategie 2 hätten Verwendung finden müssen.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Synthese geht von einem multifunktionalen photochemischen Linkersystem aus, welches mit verschiedenen Wirkstoffen beladen werden kann.

In dem vorhergehenden Kapitel wurden die Entwicklungen und Charakterisierungen der dafür notwendigen Linkersysteme beschrieben. Der nun folgende Schritt ist, die Linkersysteme mit einem Polymer und einem Wirkstoff zu verbinden.

Der Syntheseablauf wird wie folgt beschrieben. Als Linkersystem wird das TBS-Cum Dimer verwendet, dieses wird einseitig geschützt und anschließend mit Methacrylsäure derivatisiert. Dieses Monomer kann nun mit MMA copolymerisiert werden. Die im erhaltenen Copolymer geschützten Linkersysteme werden entschützt und mit verschiedenen Wirkstoffen beladen. Die einzelnen Syntheseschritte sind in Kapitel 9.2 detailliert beschrieben. Die photochemische Charakterisierung, speziell die photoinduzierte Wirkstofffreisetzung soll in diesem Teil der Promotionsschrift beschrieben werden.

5.1 Photochemische Charakterisierung von TBS-Copo

Die photochemische Charakterisierung des im Polymer eingebauten Linkersystems ist die Grundlage für die weiteren Synthese- und Charakterisierungsschritte. Die Freisetzung des TBS-Cum aus dem Copolymer mittels SPA und TPA soll den Nachweis liefern, dass die Synthesestrategie Erfolg hat. Die Versuche sollen außerdem noch zeigen, ob bezüglich der photochemischen Eigenschaften Effekte durch die Polymerkette auftreten.

5.1.1 SPA induzierte Freisetzung von TBS-Cum

Für das folgende Experiment werden 50 mg Copolymer in 2,5 mL Chloroform gelöst. Die Lösung wird unter Rühren in einer Quarzglasküvette ($d = 1$ cm) mit Licht der Wellenlänge 266 nm (Fluoreszenzspektrometer) bestrahlt. Die resultierenden Differenzspektren mit der typischen Bandenstruktur des TBS-Cum / MAOC sind in der folgenden Abbildung zu sehen.

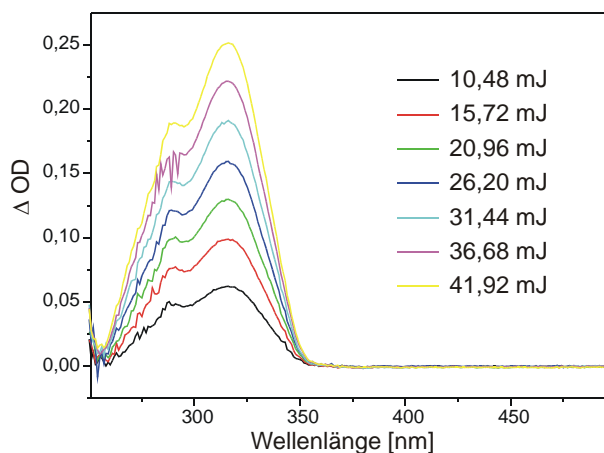


Abb. 51 Resultierende Differenzspektren aus SPA induzierter TBS-Cum Abspaltung.

Der lineare Zusammenhang zwischen der Absorptionsänderung und der eingetragenen Energie wird aus Abbildung 52 ersichtlich.

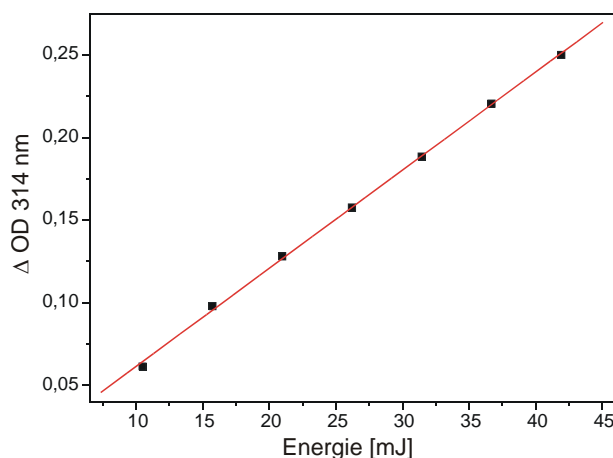


Abb. 52 Lineare Absorptionszunahme bei 314 nm.

5.1.2 Bestimmung der SPA-Quantenausbeute in Lösung

Mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten können die Absorptionswerte bei 314 nm in Konzentrationen umgerechnet und gegen die Bestrahlungsdauer aufgetragen werden. Für das TBS-Cum ist der Extinktionskoeffizient bekannt mit $\epsilon_{314} = 11303 \text{ L / mol cm}^{-1}$. Für das bei der Spaltung entstehende Cumarinmonomer am Polymer wurde zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten eine Ersatzsubstanz synthetisiert, basierend auf einer C₇-Kette, einer Esterbindung und 7-Hydroxycumarin. Diese Substanz sollte annähernd den gleichen Extinktionskoeffizienten haben wie polymergebundenes Cumarin ($\epsilon_{314} = 8600 \text{ L / mol cm}^{-1}$)^[48]. Die Umrechnung der Absorptionsänderung bei 314 nm in eine Konzentrationsänderung wurde, wie nachfolgend beschrieben, berechnet.

$$\text{Gleichung 44} \quad E = \epsilon^1 \cdot c \cdot d + \epsilon^2 \cdot c \cdot d$$

E: Extinktion

$$\text{Gleichung 45} \quad E = (\epsilon^1 + \epsilon^2) \cdot c \cdot d$$

$$\text{Gleichung 46} \quad OD = (\epsilon^1 + \epsilon^2) \cdot c$$

$$\text{Gleichung 47} \quad c = \frac{OD}{(\epsilon^1 + \epsilon^2)}$$

Die Anfangsgeschwindigkeit kann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden entnommen werden. Um die Anzahl der gespaltenen Linker pro Sekunde bestimmen zu können, wird die Anfangsgeschwindigkeit in nachfolgende Formel eingesetzt:

$$\text{Gleichung 48} \quad n_{TBS-Cum} = v^{Linker} \cdot V \cdot N_A$$

v^{Linker} : Anfangsgeschwindigkeit der Linkerspaltung; V : Volumen

$$\text{Gleichung 49} \quad n_{TBS-Cum} = 3,13 \cdot 10^7 \frac{mol}{L \cdot s} \cdot 2,5 \cdot 10^{-3} L \cdot 6,023 \cdot 10^{23} mol^{-1} = 4,71 \cdot 10^{14} s^{-1}$$

Die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Photonen lässt sich aus der Intensität der absorbierten Strahlung berechnen, wie es bei den SPA Experimenten der Linkersysteme durchgeführt wurde. Die gemessene Stromstärke der Photodiode bei 266 nm betrug $\alpha = 110,04 \mu A$, daraus resultiert eine Intensität von $I_{abs, 266nm} = 1,05 \cdot 10^{-51} 10^{-3} W / cm^2$.

Die Photonenzahl wird wie schon erwähnt wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 50} \quad E_{Photon,\lambda} = \frac{h \cdot c}{\lambda} = \frac{6,63 \cdot 10^{-34} J \cdot 2,30 \cdot 10^8 \frac{m}{s}}{2,66 \cdot 10^{-7} m} = 7,47 \cdot 10^{-19} J$$

$$\text{Gleichung 51} \quad n_{Photon} = \frac{I_{abs} \cdot A}{E_{Photon,\lambda}} = \frac{1,05 \cdot 10^{-3} \frac{J}{s \cdot cm^2} \cdot 1 \cdot cm^2}{7,47 \cdot 10^{-19} J} = 1,40 \cdot 10^{15} s^{-1}$$

A : belichtete Fläche

Aus den Werten für die Anzahl der reagierten Linker und der Anzahl der an der Reaktion beteiligten Photonen wird die SPA Quantenausbeute Φ_{SPA} bestimmt:

$$\text{Gleichung 52} \quad \Phi = \frac{n_{Dimer}}{n_{Photon}}$$

$$\text{Gleichung 53} \quad \Phi_{266} = \frac{4,71 \cdot 10^{14}}{1,40 \cdot 10^{15} s^{-1}} = 0,34$$

Das Ergebnis bestätigt für den Fall der SPA induzierten Freisetzung, dass die Polymerkette keinen Einfluss auf die Quantenausbeute des Linkersystems hat, wenn man davon ausgeht, dass das Kreuzdimer im Polymer ungefähr die gleiche Quantenausbeute haben sollte wie TBS-Cum-D ($\Phi_{SPA, Lösung} = 0,36$).

5.1.3 TPA induzierte Freisetzung von TBS-Cum

Wie schon oft in dieser Arbeit erwähnt, ist es von großem Interesse die Freisetzung auch mittels TPA induzieren zu können. Für den späteren Nachweis der TPA induzierten Cycloreversion in Lösung müssen mehrere Experimente mit unterschiedlichen Pulsintensitäten durchgeführt werden, dazu werden vier Lösungen mit je 50 mg Copolymer in 2,5 mL Chloroform belichtet (48,0 mJ, 57,5 mJ, 67,0 mJ, 77,5 mJ). Folgende Lasereinstellungen werden verwendet: Strahldurchmesser 5,5 mm, Frequenz 20 Hz, Pulslänge 3 ns und Wellenlänge 532 nm. Die Abbildungen 53-55 zeigen wieder die typische Zunahme der Absorptionsbande, hervorgerufen durch die Cycloreversion; die Linearität der Absorptionszunahmen bei verschiedenen Pulsintensitäten und den Nachweis der TPA induzierten Spaltung mittels doppelt logarithmischer Auftragung.

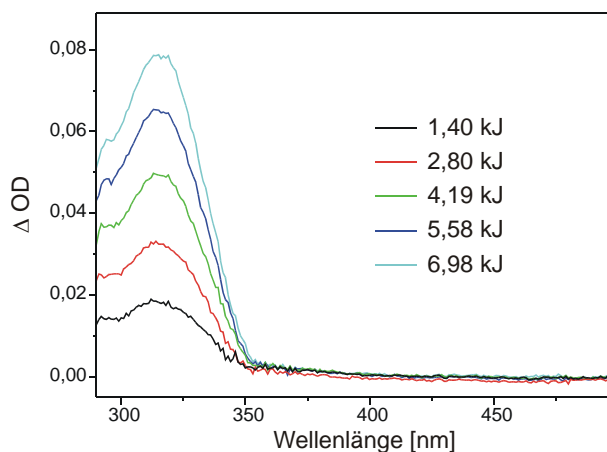


Abb. 53 Differenzspektren der Polymerlösung nach TPA induzierter Freisetzung mit 77,5 mJ / Puls.

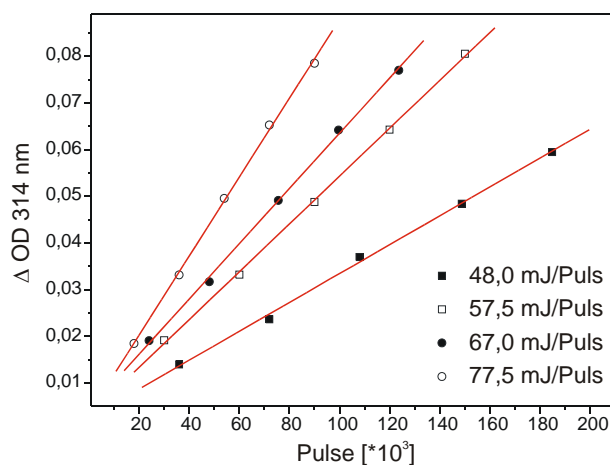


Abb. 54 Absorptionszunahme bei 314 nm induziert mittels TPA bei unterschiedlichen Pulsintensitäten.

Die Steigung von 1,99 ist ein eindeutiger Nachweis der TPA induzierten Abspaltung von TBS-Cum aus dem Copolymer.

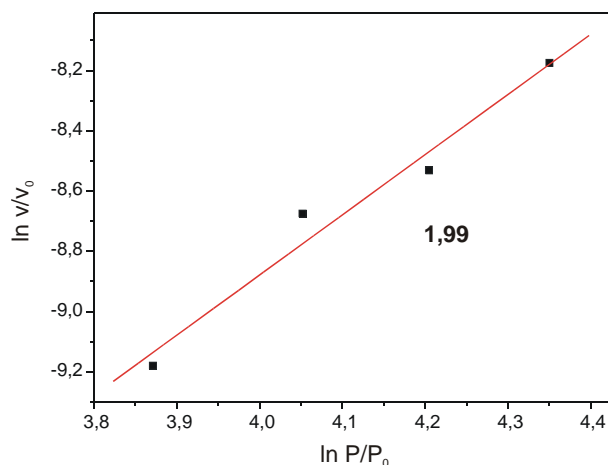


Abb. 55 Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Pulsintensität.

5.1.4 Bestimmung des TPA-Querschnittes

Der Nachweis, dass die Polymerkette keinen Einfluss auf die SPA Quantenausbeute des Linkersystems hat konnte schon geführt werden. Für die TPA induzierte Freisetzung wird die Berechnung wie beschrieben durchgeführt. Bei der Berechnung für die Anzahl der gespaltenen Cyclobutanringe pro effektive Sekunde $n_{\text{Cyclo, eff}}$ muss beachtet werden, dass nicht durch zwei, wie in Kapitel 2.3.3, geteilt wird, da der hier verwendete Extinktionskoeffizient sich aus den zwei Extinktionskoeffizienten der beiden Monomere zusammensetzt. Des Weiteren muss die Anmerkung gemacht werden, dass das hier verwendete Copolymer eine andere Zusammensetzung aufweist, als im Kapitel 9.2.18 beschrieben (zwei Syntheseansätze). Die resultierenden Anfangskonzentrationen sind wie folgt:

$c_{0, a} = 0,53 \text{ mmol / L}$ (bei Einbauverhältnis CumD : MMA 1 : 375 wie theoret. berechnet)

$c_{0, b} = 0,30 \text{ mmol / L}$ (bei Einbauverhältnis CumD : MMA 1 : 648 wie aus NMR ermittelt)

Für beide Konzentrationen werden die Querschnitte berechnet.

Laserstrahldurchmesser: $d = 0,55 \text{ cm}$

Ansatzvolumen: $V = 2,5 \text{ ml}$

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{314} = 19903 \text{ mol/L cm}^{-1}$

Ein-Photon-Quantenausbeute: $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} = 0,34$

Die nachfolgenden Tabellen führen die Ergebnisse für die TPA cross section σ_{TPA} bei vier unterschiedlichen Laserleistungen sowie zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf. Einerseits wurde der Zwei-Photonen-Querschnitt mit der theoretischen Konzentration und andererseits mit der per NMR ermittelten Konzentration berechnet.

Laserleistung P_p [mJ]	Anfangs- geschwindigkeit v_0 [$\Delta\text{OD} / \text{sek}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$\text{cm}^4 \text{s Photon}^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
48,0	103,01	$9,51 \cdot 10^{-51}$	0,951
57,5	170,80	$1,10 \cdot 10^{-50}$	1,10
67,0	197,23	$9,34 \cdot 10^{-51}$	0,934
77,5	281,83	$9,98 \cdot 10^{-51}$	0,998

Tab. 19 Auflistung des Zwei-Photonen-Querschnittes in Abhängigkeit von der Pulsintensität für das theoretische Einbauverhältnis CumD : MMA 1 : 375 ($c_{0,a} = 0,53 \text{ mmol} / \text{L}$).

Laserleistung P_p [mJ]	Anfangs- geschwindigkeit v_0 [$\Delta\text{OD} / \text{sek}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [$\text{cm}^4 \text{s Photon}^{-1}$]	Zwei-Photonen- Querschnitt σ [GM]
48,0	103,01	$1,65 \cdot 10^{-50}$	1,65
57,5	170,80	$1,90 \cdot 10^{-50}$	1,90
67,0	197,23	$1,62 \cdot 10^{-50}$	1,62
77,5	281,83	$1,73 \cdot 10^{-50}$	1,73

Tab. 20 Auflistung des Zwei-Photonen-Querschnittes in Abhängigkeit von der Pulsintensität für das per NMR ermittelte Einbauverhältnis CumD : MMA 1 : 648 ($c_{0,b} = 0,30 \text{ mmol} / \text{L}$).

Die Ergebnisse zeigen auch bei der TPA induzierten Freisetzung keinen Einfluss der Polymerkette. Da die Bestimmung des Monomer-Einbauverhältnisses sehr stark fehlerbehaftet ist, sollte nur die Größenordnung der Querschnitte interessant sein, diese liegen im Bereich des TBS-Cum-D ($\sigma_{\text{TPA, Lösung}} = 1,1 \text{ GM}$).

Zusammengefasst ist zu sagen, dass die Freisetzungen von TBS-Cum aus dem Copolymer mittels SPA und TPA durchführbar sind und kein Effekt der Polymerkette auf die SPA-Quantenausbeute / TPA-Querschnitt zu erkennen ist. Mittels HPLC konnte zusätzlich bewiesen werden, dass nur TBS-Cum aus dem Copolymer freigesetzt wird. Diese viel versprechenden Ergebnisse waren der Anlass verschiedene Wirkstoffe an dieses Copolymer anzubinden.

5.2 SPA und TPA induzierte Freisetzung verschiedener Wirkstoff-Cumarin-Konjugate

Der Nachweis, dass es möglich ist photochemische Linkersysteme zu copolymerisieren und dann mittels SPA und TPA eine Wirkstofffreisetzung zu induzieren, eröffnet den Weg zur Anbindung von verschiedenen Wirkstoffen an dieses Copolymer. Um die Ankopplung der Wirkstoffe zu ermöglichen musste zuerst der TBS geschützte Linker im Copolymer entschützt werden. Das entschützte Copolymer wird mit drei Wirkstoffen beladen, der Valproinsäure, dem Ibuprofen und dem Chlorambucil. Diese Reihenfolge wird so gewählt, da die molekulare Komplexität von Valproinsäure über Ibuprofen zu Chlorambucil stetig zunimmt. Chlorambucil zählt durch seine alkylierende Wirkungsweise zu den Zytostatika und steht somit als Beispiel, wenn an das Linkersystem angebunden, für die spätere Anwendung als multifunktionales Copolymer zur wirkstoffbasierten Nachstarbehandlung dar. In den folgenden Abschnitten werden die Wirkstoffe im Einzelnen vorgestellt.

Valproinsäure

Valproinsäure ist auch heute noch eines der am häufigsten verschriebenen Mittel gegen diverse Formen der Epilepsie. Nach sorgfältiger Einstellung des Patienten durch den Arzt führt Valproinsäure empirisch in über 60 % zu dauerhafter Anfallsfreiheit. Im normalen Gehirnstoffwechsel hemmt die Gamma-Aminobuttersäure (GABA) eine übermäßige Erregbarkeit der Nervenzellen. GABA wird normalerweise im Gehirnstoffwechsel je nach Bedarf auf- oder abgebaut. Valproinsäure greift in den Ionentransport der Ionenkanäle ein und hemmt ferner den Abbau von GABA. Dadurch erhöht sich die Konzentration von GABA im Gehirn und die Nervenzellerregung wird gehemmt. Valproinsäure reguliert durch Beeinflussung der Nukleosomen ebenfalls die Aktivität bestimmter Gene. Hierbei hemmt Valproinsäure die Histondeacetylasen, wodurch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der negativen Ladung der DNS und der Histone reduziert wird. Deshalb findet Valproinsäure auch in der Krebsforschung Beachtung^[67, 68].

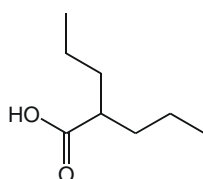


Abb. 56 Struktur von Valproinsäure (Val).

Ibuprofen

Ibuprofen zählt mit Aspirin[®] und Paracetamol zu den meist bekannten Schmerzmitteln. Bei der Schmerzentstehung im Körper werden Botenstoffe, die Prostaglandine, freigesetzt, die die Nervenenden reizen und somit Schmerzsignale an das Gehirn senden. Eine weitere Funktion der Prostaglandine ist die Aktivierung von Immunzellen um Krankheitserreger oder Fremdstoffe zu bekämpfen. Dabei kommt es zu einer Rötung und Schwellung des entzündeten Gewebes.

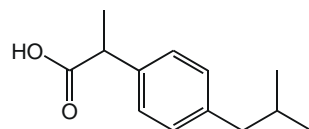


Abb. 57 Struktur von Ibuprofen (Ibu).

Sollte die Ursache solcher Reaktionen chronischer Natur sein, so sollten diese mit Medikamenten behandelt werden. Ibuprofen ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (NSAID), diese Arzneistoffgruppe hemmt die Produktion von Prostaglandinen. Ibuprofen ist somit schmerzstillend, abschwellend und entzündungshemmend^[69].

Chlorambucil

Chlorambucil (Handelsname: Leukeran) ist ein Stickstoff-Lost-Derivat, das sehr lange als Medikament der Wahl gegen chronisch lymphatische Leukämie eingesetzt wurde, bevor es durch Fludarabine in der Langzeittherapie ersetzt wurde. Chlorambucil ist ein aromatisches Stickstofflost-Derivat, das 2 alkylierende Zentren im Molekül aufweist. Durch eine chemische Verknüpfung innerhalb des DNA-Stranges oder zwischen den einzelnen DNA-Strängen wird eine Replikation der DNA und damit das Überleben der Zelle und die Bildung neuer maligner Zellen gehemmt. Wie andere zytotoxisch wirkende Arzneimittel ist Chlorambucil mutagen in genotoxischen in-vitro- und in-vivo-Tests und kanzerogen bei Tieren und Menschen. Leukeran kann somit beim Menschen Chromosomenveränderungen hervorrufen. Bei der Anwendung von Chlorambucil muss das vorhandene Krebs-Risiko gegen den zu erwartenden therapeutischen Nutzen abgewogen werden (geringe Dosierung / kurze Behandlungszyklen).

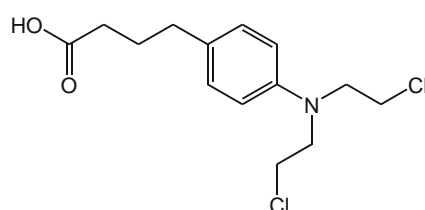


Abb. 58 Struktur von Chlorambucil (Cl-Amb).

Der Metabolismus von Chlorambucil beim Mensch erfolgt über eine S-Oxidation in der Buttersäureseitenkette. Hauptmetabolit des Chlorambucils ist Bis-2-chlorethyl-2-(4-aminophenyl)-essigsäure (Phenylessigsäurelost), das vorwiegend alkylierend wirkt^[70, 71]. Chlorambucil wird auch in der Rheumatologie durch Hemmung des Zellwachstums sehr teilungsfreudiger Zellen kurzzeitig eingesetzt^[72, 73].

5.2.1 Polymeranalyse

Wie in Kapitel 9 beschrieben, werden diese drei erwähnten Wirkstoffe chemisch an den Linker im Copolymer angebunden. Da der Anteil des Linkers im Copolymer sehr gering ist, konnten in den NMR-Spektren keine genauen Signalzuordnungen gemacht werden. Der endgültige Nachweis der Anbindung der Wirkstoffe wird über die SPA und TPA induzierte Freisetzung mit anschließender HPLC Analyse, was im Anschluss vorgestellt werden soll, geführt.

Wie in der Einleitung dieses Teils der Promotionsschrift erläutert, soll diese neue Strategie zu besseren Polymereigenschaften führen. Somit liegt es nahe, dass vor der photochemischen Charakterisierung die Polymereigenschaften der einzelnen Copolymerstufen verglichen werden sollten. Tabelle 20 zeigt die drei Merkmale der synthetisierten Copolymere.

	TBS-Copo	OH-Copo	Val-Copo	Ibu-Copo	Cl-Amb-Copo
GPC: $M_w / 10^5$	1,68	1,34	1,92	1,82	1,94
TGA: $T_{5\%} [^{\circ}\text{C}]$	249,47	292,23	287,03	287,97	303,92
DSC: $T_g [^{\circ}\text{C}]$	128,21	127,62	129,31	129,12	127,09

Tab. 21 Übersicht über Copolymereigenschaften.

Es fällt auf, dass die Eigenschaften der Polymere sich nicht gravierend verändert haben. Die Verarbeitung von TBS-Copo zu einem Polymerfilm war einfach zu bewerkstelligen. Die Eigenschaften dieses Films aus TBS-Copo sind hervorragend (stabil, transparent). Im Vergleich mit dem H5FUPBMAOC, welches immer leicht gelblich war, nur als Blend verarbeitbar war und nach dem Heißpressen inhomogen wurde, vereint der TBS-Copo Film alle gewünschten Eigenschaften. Die zwei Bilder (Abbildung 59 und 60) zeigen den gravierenden Unterschied der beiden Materialien. Abbildung 59 zeigt eine Polymerplatte aus H5FUPBMAOC, bei der man die Inhomogenität, die Gelbfärbung und einhergehend damit die schlechte Transparenz / Lesbarkeit sieht. Abbildung 60 zeigt einen Film aus reinem TBS-Copo, welcher absolut transparent, stabil, farblos und eine klare Lesbarkeit aufweist.



Abb. 59 H5FUPBMAOC Polymerplatte

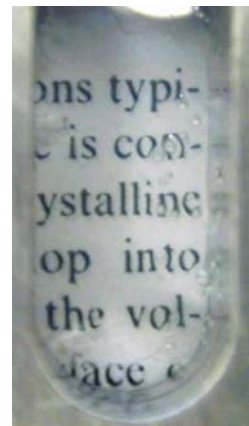


Abb. 60 TBS-Copo Polymerfilm

5.2.2 SPA induzierte Freisetzung von Val-Cum, Ibu-Cum, Cl-Amb-Cum aus Copolymer in Lösung

Die SPA induzierte Freisetzung in Lösung wird für alle drei Copolymere unter identischen Bedingungen durchgeführt. In je einer Quarzglasküvette ($d = 1$ cm) wird in 3 mL Chloroform eine bestimmte Menge beladenes Copolymer (Val-Copo 12,0 mg; Ibu-Copo 12,1 mg; Cl-Amb-Copo 12,4 mg) gelöst. Von diesen Lösungen werden jeweils 700 μ L Probelösung abgenommen und in der HPLC (Methode: SH03, siehe Kapitel 9.1) gemessen. Diese unbelichteten Proben zeigen alle keine freigesetzten Wirkstoffe. Die übrigen 2,3 mL von jeder Lösung werden unter Rühren im Fluoreszenzspektrometer in bestimmten Zeitabständen belichtet und im UV/Vis gemessen. Nach Beendigung der Belichtung werden die Lösungen über eine solid-phase-extraction (SPE) Säule (Supelco, LC18, 1 mL) filtriert und nachgespült mit 10 mL ACN, um die freigesetzten Wirkstoffe vom Polymer zu trennen. Die filtrierten Lösungen werden einzeln im Vakuum eingeeengt und dann in der HPLC gemessen. Um Peaks in den Chromatogrammen zu identifizieren, welche von der Filtration kommen könnten, wird auch eine SPE Säule ohne Copolymer gespült und die Spüllösung in der HPLC gemessen.

Die drei folgenden Abbildungen 61-63 zeigen jeweils die Differenzspektren der einzelnen Belichtungsenergien und die Auftragung der Zunahme der Absorption bei 314 nm zu der induzierten Energiemenge. Bei allen Copolymeren sieht man, dass mit zunehmender Gesamtenergiedosis die Absorptionzunahme abflacht, was darauf hindeutet, dass man sich der maximalen Freisetzung annähert.

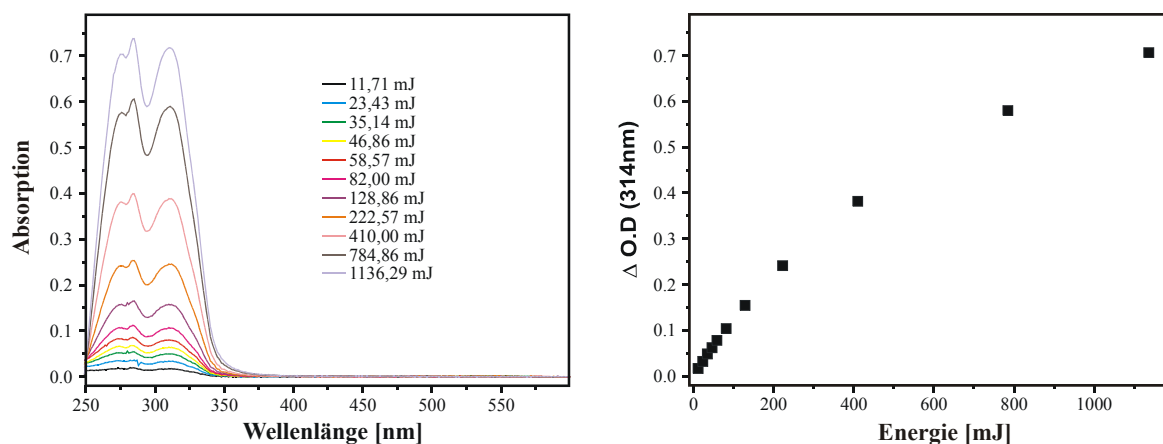


Abb. 61 Val-Copo

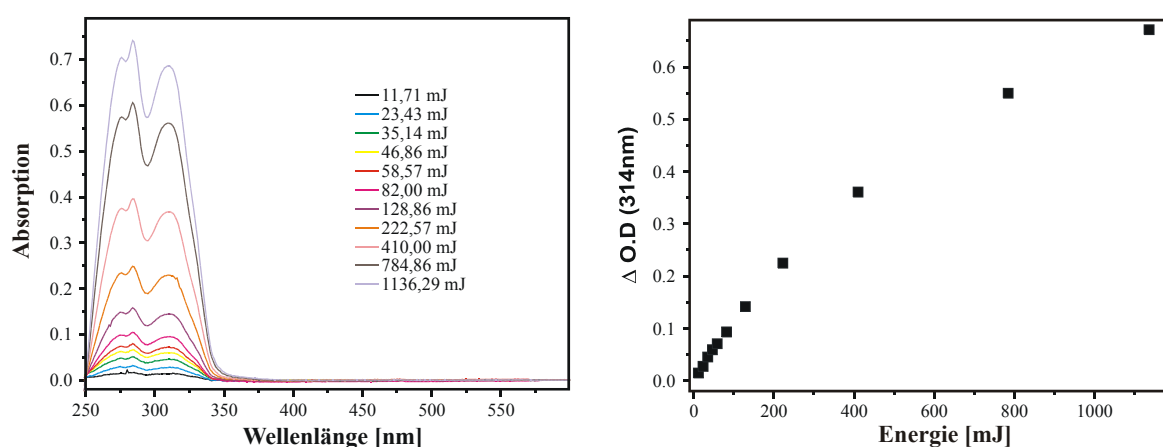


Abb. 62 Ibu-Copo

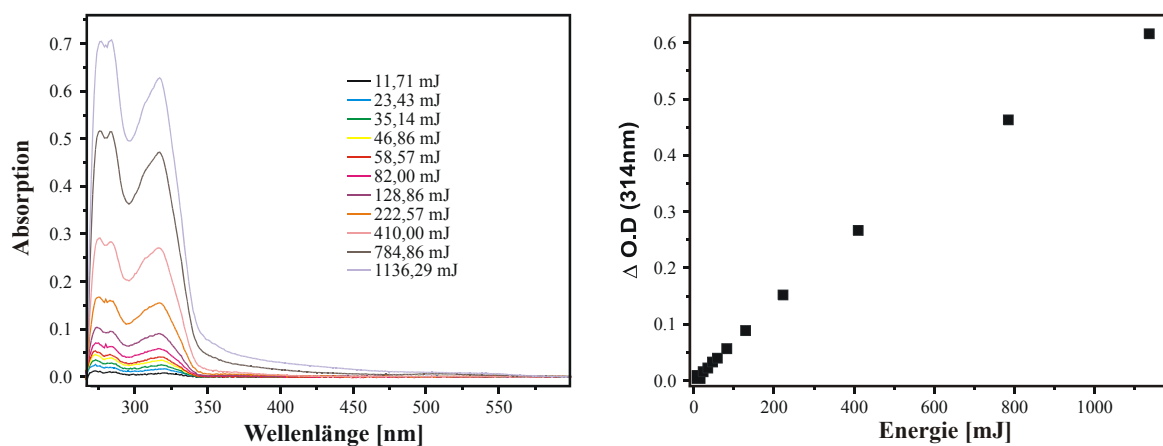


Abb. 63 Cl-Amb-Copo

Die Ergebnisse der HPLC Messungen der filtrierten Lösungen werden im Kapitel zur TPA induzierten Freisetzung erwähnt und ausgewertet, damit ein direkter Vergleich der freigesetzten Substanzen mit der Referenzsubstanz geführt werden kann.

5.2.3 TPA induzierte Freisetzung von Val-Cum, Ibu-Cum, Cl-Amb-Cum aus Copolymer in Lösung

Als letzten und entscheidenden Schritt ist der Nachweis der Wirkstofffreisetzung mittels TPA vorzustellen. Hierzu werden wie im Experiment zur SPA Freisetzung die experimentellen Einstellungen bei allen drei Copolymeren beibehalten. Von jedem Copolymer wird eine bestimmte Menge (Val-Copo 40,2 mg; Ibu-Copo 39,0 mg; Cl-Amb-Copo 39,1 mg) in 2,5 mL Chloroform gelöst. Die Lösung wird in einer Quarzglasküvette unter Rühren belichtet. Die Lasereinstellungen sind wie folgt: Strahldurchmesser 5,5 mm, Frequenz 20 Hz, Wellenlänge 532 nm, Pulsintensität 70 mJ, eingebrachte Gesamtenergie 8,91 kJ. Die Lösungen werden nach der Belichtung über SPE Säulen (Supelco, LC18, 1 mL) filtriert und mit ACN gewaschen. Vor der eigentlichen Verwendung der Säulen werden diese vorher mit Chloroform und ACN gespült um das „Bluten“ der Säulen zu minimieren. Die filtrierten Lösungen werden im Vakuum eingeeengt und in der HPLC gemessen.

5.2.3.1 Val-Copo

Für die definitive Zuordnung des freigesetzten Val-Cum wird, wie in Kapitel 9 beschrieben, Val-Cum synthetisiert und charakterisiert. Diese Substanz wird als Referenzsubstanz mit der gleichen HPLC Methode gemessen und hat eine Retentionszeit von 4,1 min. Das Zweite Chromatogramm (Lösung nach SPA Freisetzung) weist zwei Peaks auf, einen bei 4,1 min, dieser entspricht Val-Cum, und einen bei 4,9 min, welcher TBS-Cum entspricht. Auch im dritten Chromatogramm (Lösung nach TPA Freisetzung) finden sich zwei Peaks bei 4,1 min und 4,9 min, deren Zuordnung identisch wie im zweiten Chromatogramm ist. Die abgebildeten UV/Vis-Spektren des DAD nachweisen, dass es sich tatsächlich bei dem freigesetzten Molekül mit Retentionszeit 4,1 min um Val-Cum handelt. Die zusätzliche Freisetzung von TBS-Cum verwundert nicht, da eine vollständige Entschützung im Polymer nicht möglich ist. Wie man bei den zwei weiteren Copolymeren sehen wird, findet auch hier eine Freisetzung von TBS-Cum statt.

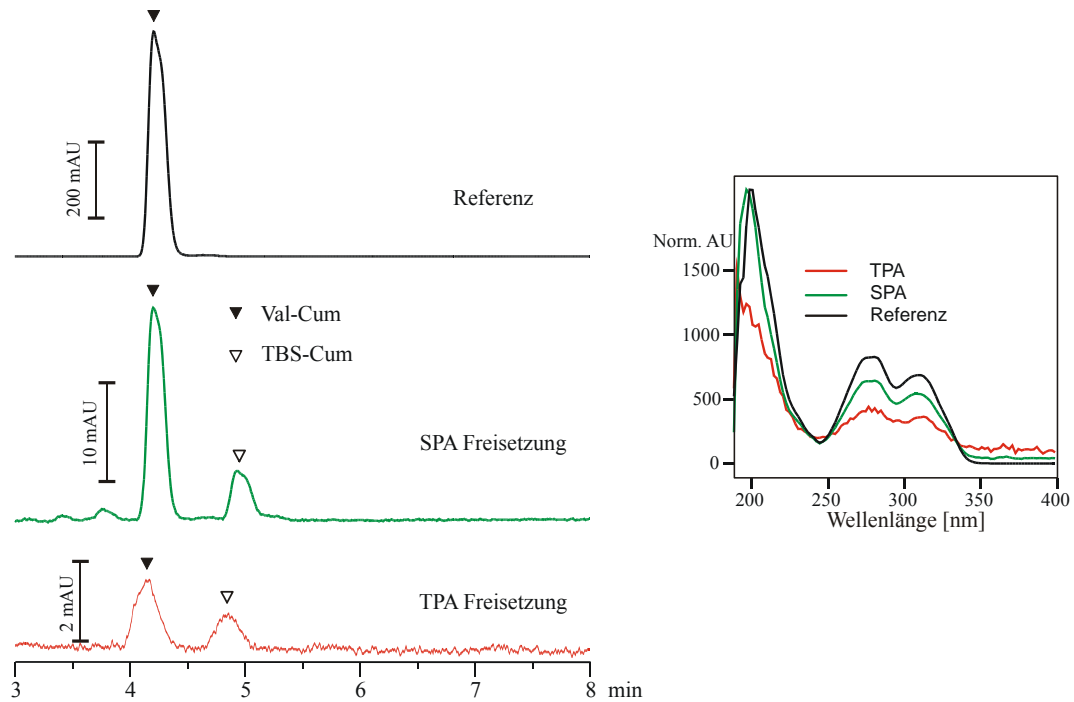


Abb. 64 Val-Copo HPLC Chromatogramme (links); DAD Signale der Produktpeaks (rechts).

5.2.3.2 Ibu-Copo

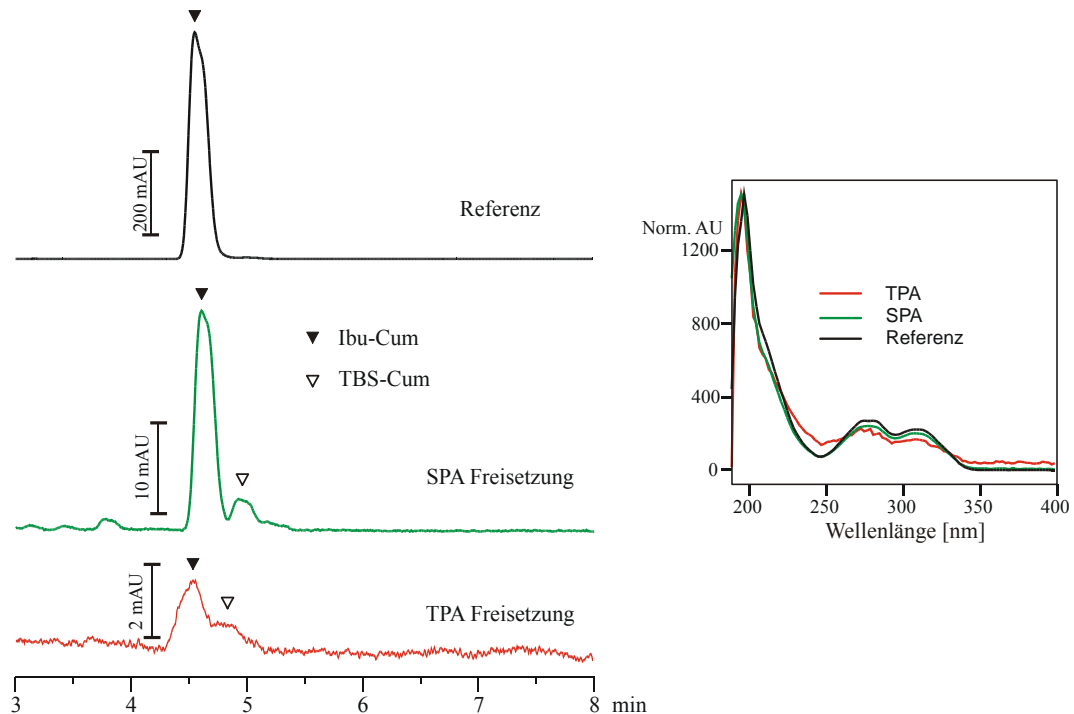


Abb. 65 Ibu-Copo HPLC Chromatogramme (links); DAD Signale der Produktpeaks (rechts).

Der Nachweis der Freisetzung von Ibu-Cum wird auch wieder über eine synthetisierte Referenzsubstanz geführt, welche im ersten Chromatogramm eine Retentionszeit von 4,6 min aufweist. In den Chromatogrammen der filtrierten Lösungen von SPA und TPA induzierter

Freisetzung findet man wieder das TBS-Cum bei 4,9 min und einen zweiten Peak bei 4,6 min, welcher durch das DAD UV/Vis-Spektrum als Ibu-Cum identifiziert werden kann.

5.2.3.3 Cl-Amb-Copo

Identisch wie in vorangegangenen Nachweisen wird auch bei dieser Freisetzung eine Referenzsubstanz synthetisiert und in der HPLC gemessen. Cl-Amb-Cum weist eine Retentionszeit von 3,9 min auf. Die Chromatogramme von SPA und TPA induzierter Wirkstofffreisetzung zeigen wieder den Peak bei 4,9 min (TBS-Cum) und einen Peak bei 3,9 min, welcher durch sein UV/Vis-Spektrum und die Referenz als Cl-Amb-Cum identifiziert werden kann.

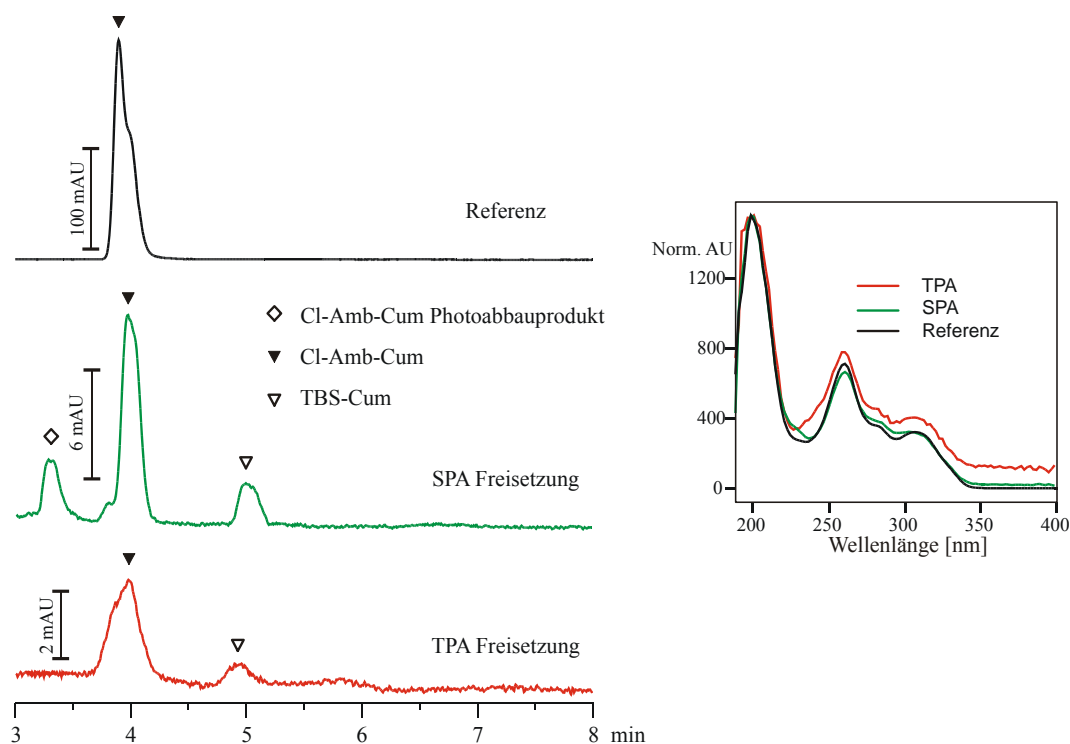


Abb. 66 Cl-Amb-Copo HPLC Chromatogramme (links); DAD Signale der Produktpeaks (rechts).

Einen Unterschied in der Freisetzung mittels SPA und TPA erkennt man durch das Auftreten eines weiteren Peaks im Chromatogramm der SPA Freisetzung. Dieser Peak ist begründet in dem photochemischen Abbau von Cl-Amb-Cum durch UV-Licht. Dieser Photochemische Abbau wird mit reinem Cl-Amb-Cum nochmals reproduziert, wie in Abbildung 67 zu sehen.

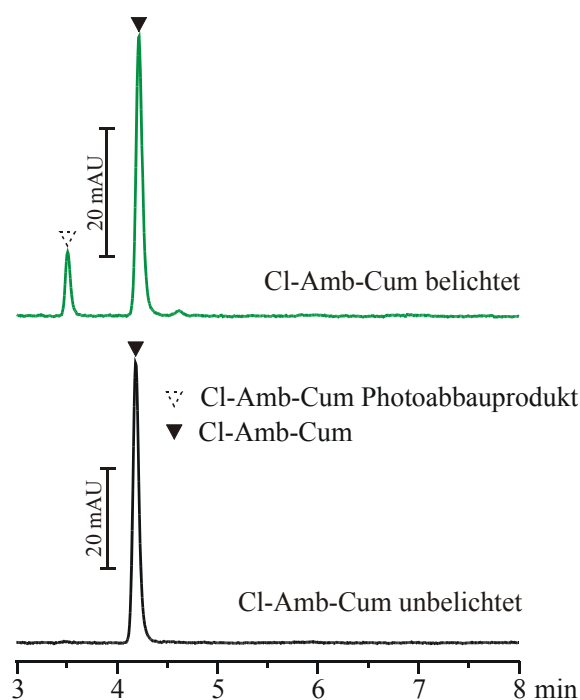


Abb. 67 HPLC Nachweis des UV-Licht induzierten CL-Amb-Cum Abbau.

In der Diplomarbeit von A. Brodwolf^[74] wird erwähnt, dass Chlorambucil selbst im UV-Licht nicht stabil ist und ein Photoabbauprodukt entsteht. Dieser photoinduzierte Abbau von Chlorambucil wurde genauer betrachtet und analysiert^[75]. Da ein photoinduzierter Abbau von Cumarin nicht erwartet wird, aufgrund der Dimerisierung im UV-Licht, wird nur das Chlorambucil der Einfachheit halber analysiert. Es wird eine 10 mM Standardlösung von Chlorambucil in ACN angesetzt und jeweils 3 mL dieser Lösung im Rayonet-Typ UV-Reaktor und im Puls laser (79 mJ / Puls, Gesamtenergie 8,5 kJ) bei 532 nm belichtet. Die drei Chromatogramme in Abbildung 68 wurden bei 220 nm detektiert. Das mittlere Chromatogramm (UV-Licht) weist deutlich das Abbauprodukt auf, welches bei der Belichtung im UV-Licht entsteht. Die Charakterisierung des Photoabbauprodukts mittels GCMS und ¹H-NMR zeigt, dass es sich hierbei um ein Chlorambucilderivat handelt, welches eine Chlorethyl-Gruppe weniger besitzt (EI-MS m/e: 241 (M⁺, 79,41 %), 192 (100 %), 168 (97,05 %), 132 (18,82 %), 119 (27,65 %), 60 (17,65 %); ¹H-NMR, 300 MHz, CD₃CN: δ [ppm] = 7.36 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.20 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 3.74 (t, 2H, J = 6.2 Hz), 3.63 (t, 2H, J = 6.4 Hz), 2.45 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 2.11 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 1.70 (q, 2H, J = 7.5 Hz).

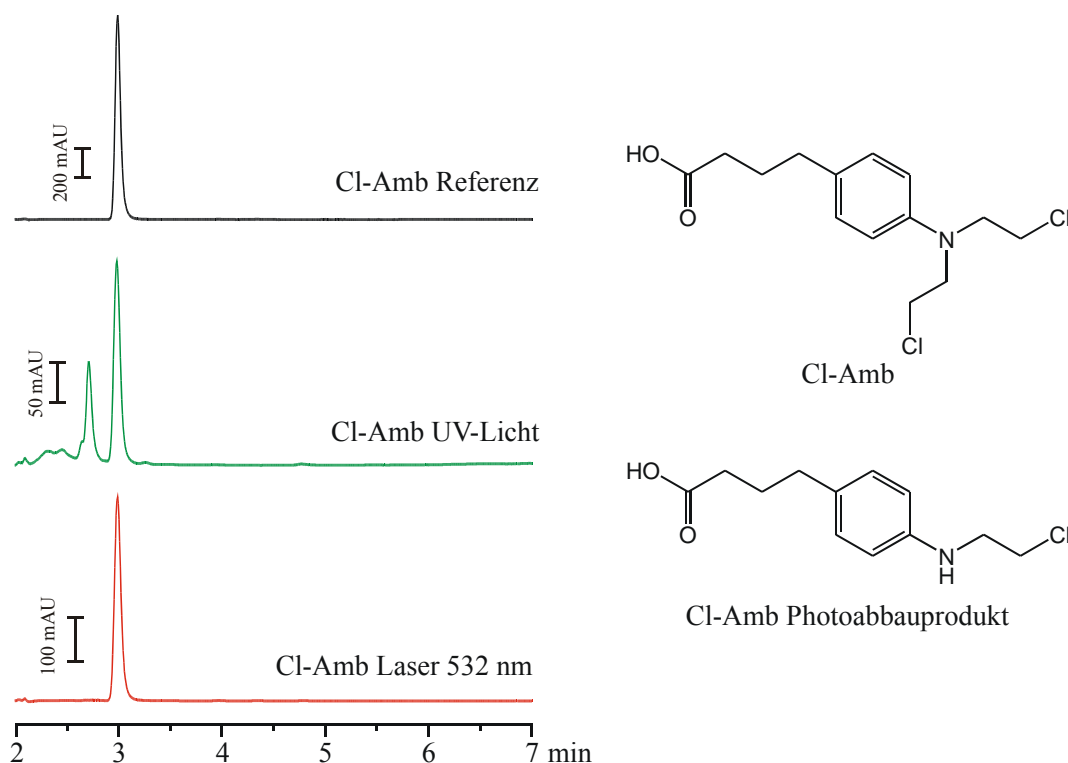


Abb. 68 HPLC Chromatogramme zum Photostabilitätstest von Chlorambucil.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass es durchaus von Vorteil ist, eine photoinduzierte Freisetzung von Wirkstoff mittels TPA durchzuführen, obwohl hohe Lichtintensitäten benötigt werden, da es bei dieser Wellenlänge zu keiner Schädigung der angehenden Wirkmoleküle kommen kann. Voraussetzung ist, dass die Wirkstoffe keine Absorption in der verwendeten Wellenlänge aufweisen. Es ist somit möglich UV-photolabile Wirkstoffe, gebunden an ein photosensitives Linkersystem wie einen Cyclobutanring, mittels TPA, mit Wellenlängen im sichtbaren Bereich des Spektrums, freizusetzen.

5.2.4 Hydrolyseuntersuchungen

Für die Behauptung ein „drug release system“ entwickelt zu haben, muss die Hydrolyse des freigesetzten Wirkstoff-Cumarin Konjugates nachgewiesen werden. Hierzu werden von jeder Referenzsubstanz Stammlösungen hergestellt (Val-Cum 10,1 mg / 1,5 mL ACN; Ibu-Cum 8,7 mg / 1,5 mL ACN; Cl-Amb-Cum 10,6 mg / 1,5 mL ACN). Von diesen Stammlösungen werden je 100 μ L Probevolumen abgenommen und mit je 1 mL Wasser, Phosphatpuffer pH 5,5, Phosphatpuffer pH 6,0 und Phosphatpuffer pH 7,4 gemischt. Diese Lösungen werden über Nacht bei 37 °C aufbewahrt und anschließend in der HPLC gemessen. Vergleicht man die einzelnen Ansätze mit den Referenzsubstanzen, fällt auf dass keine Hydrolyse zu Wirkstoff und Cumarin stattfindet. Bei Cl-Amb-Cum ist zusätzlich zu erwähnen, dass die

Chloratome selbst hydrolysieren. Ein endgültiger Nachweis ein „drug release system“ entwickelt zu haben wird in Kapitel 6 beschrieben.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass ein neues Copolymer, folgend der vorgegebenen Strategie, synthetisierbar ist. Das TBS-Copo wurde auf seine photochemischen Eigenschaften hin untersucht, die SPA Quantenausbeute ist $\Phi_{\text{SPA, Lösung}} = 0,34$, der TPA-Querschnitt liegt um 1 GM abhängig von dem Einbauverhältnis. Die Entschützung und die anschließende Beladung des Copolymers konnte gezeigt werden. SPA und TPA induzierte Freisetzung der drei verschiedenen Wirkstoff-Cumarin Konjugate wurde mittels HPLC vorgenommen und mit Hilfe von Referenzsubstanzen bewiesen. Die anschließende Hydrolyse der Konjugate fand leider nicht statt, aber durch geeignete Modifizierungen an diesem System kann auch dieses Problem behoben werden, wie es z.B. bei der Derivatisierung von 5FU zu H5FU gelingt. Die abschließenden Zelltests am Beispiel von Chlorambucil und Cl-Amb-Cum werden in Kapitel 6.2 beschrieben. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse kommt man zu dem Schluss, dass die Synthesestrategie erfolgreich war. Zur Synthese der Linkersysteme sei erwähnt, dass eine Kreuzdimerisierung zweier unterschiedlich geschützter Cumarine die anschließende Entschützung und weitere Umsetzung vereinfachen würden.

Wie in der Einleitung zu diesem Kapitel schon erwähnt wurde gab es in der Literatur bis vor kurzem keine auf dem Cuamringerüst basierende aktive Wirkstoffmoleküle. Neuste Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass 7-Hydroxycumarin, 4-Methyl-7-hydroxycumarin und deren verschiedene Derivate eine weitläufige Wirksamkeit in der medizinischen Anwendung haben können^[76-79]. Eine aktuelle Veröffentlichung auf diesem Gebiet ermöglicht nun die Verfolgung der zweiten Strategie. Hierbei wird 7-Hydroxycumarin mit 2-Bromessigsäuremethylester derivatisiert und mit verschiedenen Aminosäuren gekoppelt. Es zeigt sich in den Untersuchungen, dass mit Tryptophan ein hoch potenter Wirkstoff entwickelt wurde, welcher gegen verschiedene Tumorzelllinien wirkt und auch HIV hemmt^[77]. Leider sind diese Wirkstoffe noch nicht zugelassen, aber diese Kombination von Wirkstoff und photoaktivierbaren Polymer ist viel versprechend.

6 ERGEBNISSE DER IN VITRO ZELLVERSUCHE

Um erste Aussagen treffen zu können ob Wirkstoffmoleküle tatsächlich eine Wirksamkeit gegenüber Zellen zeigen haben sich der Einfachheit halber die in vitro Zellversuche als eine einfache Alternative zu den in vivo Zelltest erweisen. In solchen in vitro Zelltests werden in Wellplatten eine Anzahl an Zellen einer Zellreihe ausgesät und dann in Kontakt mit den zu untersuchenden Substanzen gebracht. Zu diesen Messungen werden immer begleitende Vergleichstests durchgeführt. Der Vergleich des Referenztests mit den zu testenden Substanzen und deren Zelltest zeigt die Ergebnisse auf. Viele dieser Vergleichstest werden in der Literatur aufgeführt als Beispiel sei hier die folgende Literaturstelle erwähnt^[80]. Die folgenden Zelltests sind an diese Methode der Versuche angelehnt.

6.1 Versuche mit monofunktionalen Copolymer

Den Abschluss der Experimente mit H5FUPBMAOC bildet der in vitro Test des Polymers^[81]. In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es möglich sein wird, Wirkstoff photochemisch aus Polymermaterial freizusetzen. All diese Ergebnisse sind von entscheidender Bedeutung, doch der endgültige Nachweis der Wirksamkeit kann nur durch einen Zelltest gezeigt werden. Für diesen Test wird vorab die Hydrolyse von H5FU zu 5FU in dem verwendeten Nährmedium verfolgt. Die anschließenden Zelltests konnten nur mit Polymerblends durchgeführt werden, da auch hier wieder die Stabilität der Filme von enormer Wichtigkeit war und reines H5FUPBMAOC diese Stabilität leider nicht bietet. Die Zelltests werden mit Tumorzellen des Bauchspeicheldrüsenkrebs durchgeführt, da diese im Vergleich zu Linsenepithelzellen viel leichter zu kultivieren sind. Das schnelle Zellwachstum der Tumorzellen ermöglicht zusätzlich eine Beobachtung der Wirksamkeit in einem angemessenen zeitlichen Rahmen.

6.1.1 Hydrolyse von H5FU im Nährmedium

Für die spätere Freisetzung von H5FU aus einem Polymer und die anschließende Diffusion in das Nährmedium der Zellkulturen, werden zunächst Tests zur Hydrolyse von H5FU in Nährmedien durchgeführt. Von einer Stammlösung aus 1,9 mg H5FU in 10 mL werden 2 mL abgenommen und mit 18 mL Nährmedium (DEME / MAM'S + FCS + N / S) bei 37 °C temperiert. Aus der Lösung wird alle 15 min eine Probe entnommen und in der HPLC vermessen. Die Chromatogramme weisen schon nach 30 min kein H5FU mehr auf. Die Hydrolyse von H5FU zu 5FU läuft demnach bei den Bedingungen der Zelltests hinreichend schnell ab.

6.1.2 Filmvorbereitung (solvent casting)

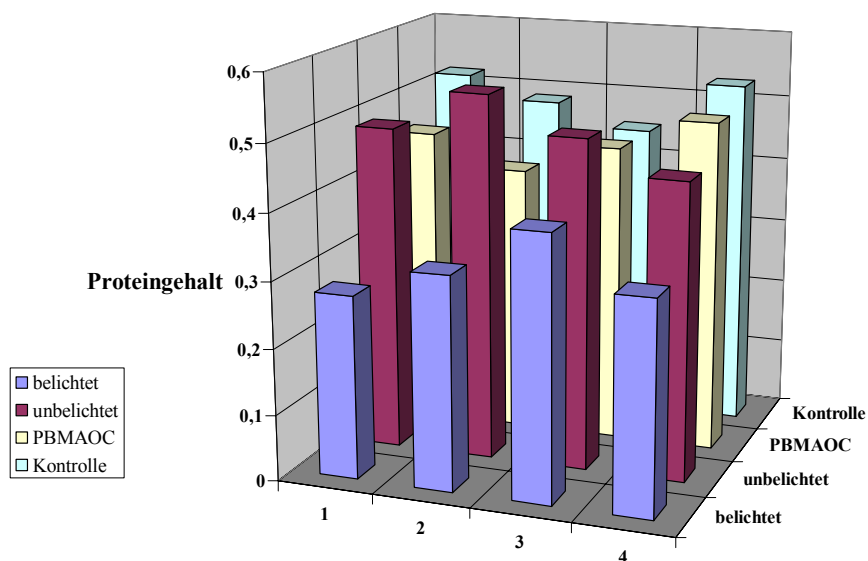
Für die Zelltests werden verschiedenartige Polymerfilme hergestellt. Die Lösungen werden über einen 0,45 µm PTFE Filter filtriert, bevor sie zu den Filmen verarbeitet werden. Es werden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Für Versuchsreihe eins wird ein PBMAOC Film (0,8 mm Rakel) und ein H5FUPBMAOC : PMMA Blend 2,7 : 1 (0,8 mm Rakel) hergestellt. Für die zweite Versuchsreihe wird nur ein H5FUPBMAOC : PMMA Blend 2,9 : 1 (0,8 mm Rakel) hergestellt.

6.1.3 Versuchsaufbau und Durchführung

Aus den Polymerfilmen werden runde Plättchen mit 16 mm Durchmesser ausgestanzt. Die Plättchen haben ca. 0,4 mm Dicke und sind mit ca. 800 µg 5FU beladen. Die Filme, welche aktiviert werden sollen, werden mit Licht der Wellenlänge 254 nm und einer totalen Energie von 0,504 J / cm² belichtet. Für die Zelltests werden 2000 Bon 1 (Bauchspeicheldrüsenkrebs) Zellen in 1,2 mL DMEM / HAM's F-12 mit 10 % fötalem Kälberserum (PAA, Cölbe) und 1 % Penicillin/Streptomycin in 24 Wellplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät. Die Polymerplatten werden nach 4 h, ohne die Zellkulturen zu berühren, in Kontakt mit dem Nährmedium gebracht und über den Zeitraum der Tests dort belassen. Die Kontrollmessungen werden nicht mit Polymerplatten versehen. Für 7 Tage werden die Zellen bei 37 °C, gesättigter Wasseratmosphäre und 5 % CO₂ Gehalt in einer HS Inkubationskabine von Heraeus beobachtet. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Homogenisierung der Zellen wird dann 1 mL 20 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure mit 0,1 % Triton-X-100 in die Wellplatten gegeben. 50 µL dieser Suspension wird auf einem RC-DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, California) auf den Proteingehalt nach der modifizierten Lowry Methode untersucht^[82]. Der Proteingehalt korreliert mit der totalen Zellzählung, wobei die statistische Korrelation mit dem Turkey Test durchgeführt wird. Die angegebenen Werte in den Diagrammen sind die bestimmten Proteingehalte (angegeben als Absorptionswerte der photochemischen Bestimmung) für die einzelnen Zellkulturen in je einem Well.

6.1.4 Ergebnisse

6.1.4.1 Versuchsreihe 1



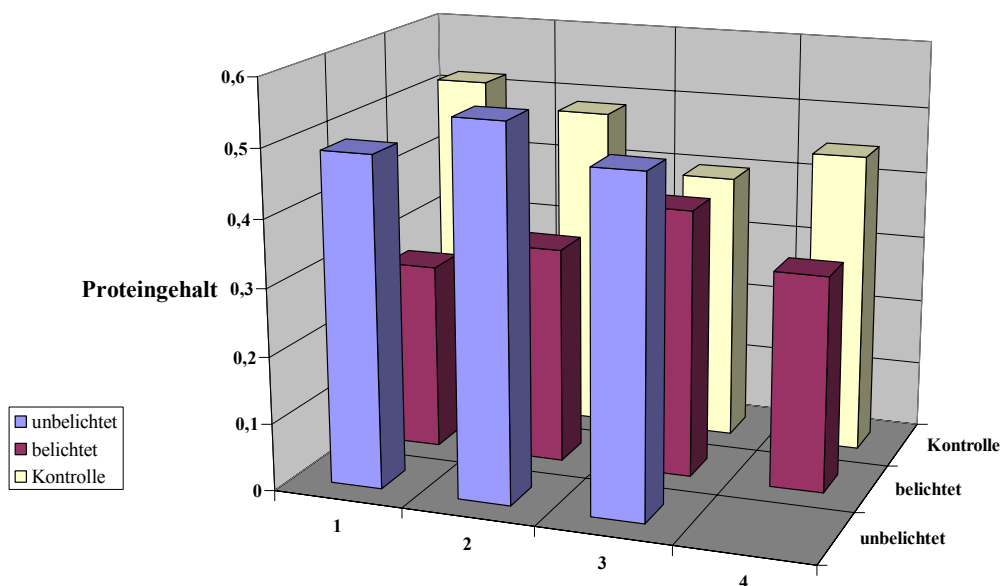
	1	2	3	4
belichtet	0,277	0,322	0,397	0,32
unbelichtet	0,49	0,551	0,497	0,447
PBMAOC	0,453	0,406	0,452	0,501
Kontrolle	0,52	0,485	0,45	0,529

Abb. 69 Grafische und tabellarische Darstellung der ersten Zelltestergebnisse.

Das Diagramm der ersten Versuchsreihe zeigt den eindeutigen Effekt von belichtetem Polymer auf das Zellwachstum. Der bestimmte Proteingehalt (in Absorption angegeben) ist in den vier Wells, welche mit belichtetem Polymer bestückt waren, im Vergleich zum Kontrollexperiment (Mittel 100 %), im Mittel um 66 % niedriger. Die unbelichteten Polymerplättchen zeigen keine Wirksamkeit und können somit als biocompatibel bezeichnet werden, was auch für das PBMAOC gilt. Die in dieser ersten Versuchsreihe aufgeführten Zahlen werden in der zweiten Versuchsreihe bestätigt und zusätzlich mit Fotos der Zellkulturen belegt.

6.1.4.2 Versuchsreihe 2

Auch in dieser Versuchsreihe werden mehrere Proben einer Reihe betrachtet und gemittelt. Das Balkendiagramm zeigt den eindeutigen Trend, dass belichtetes wirkstoffbeladenes Polymer wirksam ist und der prozentuale Mittelwert von 73 %, bezogen auf 100 % der Kontrollversuche, bestätigt die Wirksamkeit des aktivierten Polymers.



	1	2	3	4
unbelichtet	0,49	0,551	0,497	
belichtet	0,277	0,322	0,397	0,32
Kontrolle	0,52	0,485	0,4	0,448

Abb. 70 Grafische und tabellarische Darstellung der zweiten Zelltestergebnisse.

Beide Versuchsreihen zeigen, dass die aktivierten Polymerplatten das Zellwachstum hemmen. Die experimentellen Ergebnisse in Versuchreihe 2 werden durch die in Abbildung 71 gezeigten Aufnahmen bildlich unterstützt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nicht aktivierte Polymerplättchen das Zellwachstum nicht hemmen und somit als unbedenklich bzw. biocompatibel einzustufen sind.

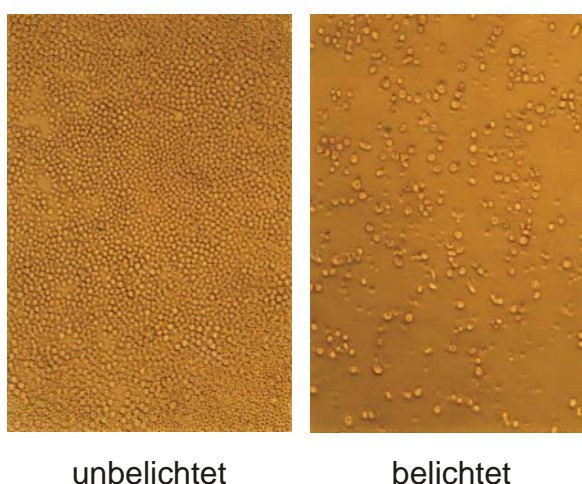


Abb. 71 Fotos der Zellkulturen mit belichtetem und unbelichtetem Polymer.

6.2 Versuche mit multifunktionalen Copolymer

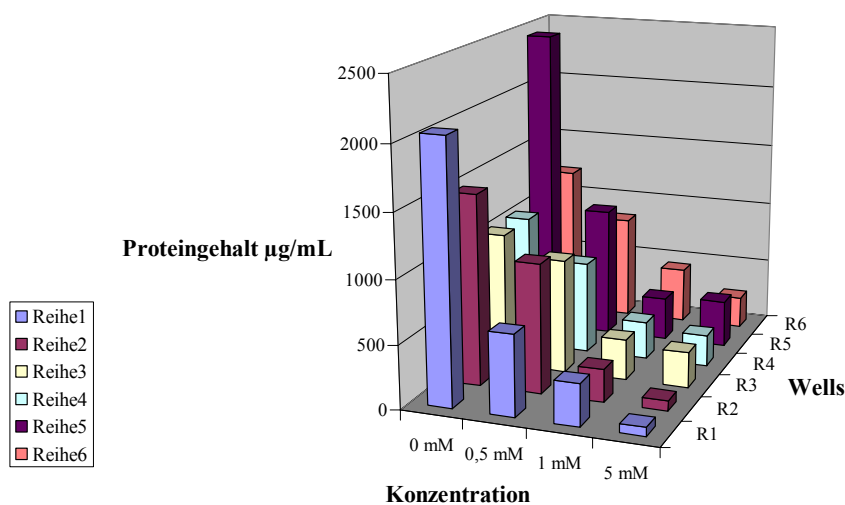
Wie für das monofunktionale Copolymer (H5FUPBMAOC) gilt auch für das multifunktionale Copolymer, dass ein erfolgreicher Abschluss der Experimente der Zelltest ist. Von den drei verschiedenen Wirkstoffen die angebunden wurden ist das Chlorambucil ein viel versprechender Wirkstoff für Zelltests, da es mit seinen alkylierenden Seitengruppen zu den Zytostatika zählt. Wie in Kapitel 5.2.4 gezeigt wurde kommt es zu keiner Hydrolyse des Cumarin-Wirkstoff-Konjugates nach der Freisetzung, es bleibt somit nachzuweisen, dass auch diese Substanz eine Wirksamkeit hat. Hierzu wird ein Vergleichstest mit Chlorambucil angestrebt und im folgenden Kapitel beschrieben.

6.2.1 Versuchsdurchführung

Zuerst werden zwei Stammlösungen (0,1 M) von Chlorambucil und Cl-Amb-Cum in DMSO angesetzt. Die Zellen der Zelllinie Bon (Bauchspeicheldrüsenkrebs) werden in 2 mL DMEM / HAM's F-12 mit 10 % fötalem Kälberserum (PAA, Cölbe) und 1 % Penicillin/Streptomycin in 24 Wellplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät. Beide Substanzen werden in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM) untersucht, wobei für jede Konzentration 6 Wells untersucht werden. Um einen Vergleich zu erhalten werden zusätzlich in 6 Wells Zellen ausgesät und unbehandelt kultiviert. Nach Zugabe der Lösung (0 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L) zu den Zellkulturen in 2 mL Nährmedium werden diese für 24 h bei 37 °C, gesättigter Wasseratmosphäre und 5 % CO₂ Gehalt in einer HS Inkubationskabine von Heraeus kultiviert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zur abschließenden Bestimmung des Proteingehaltes homogenisiert man die Zellen mit 1 mL 20 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure mit 0,1 % Triton-X-100 und gibt 50 μ L dieser Suspension auf einen RC-DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, California) anhand dem der Proteingehalt nach der modifizierten Lowry Methode untersucht wird^[82]. Die erhaltenen Werte für den Proteingehalt (angegeben in μ g / mL) in jedem einzelnen Well werden in den Tabellen angegeben.

6.2.2 Ergebnisse

6.2.2.1 Chlorambucil

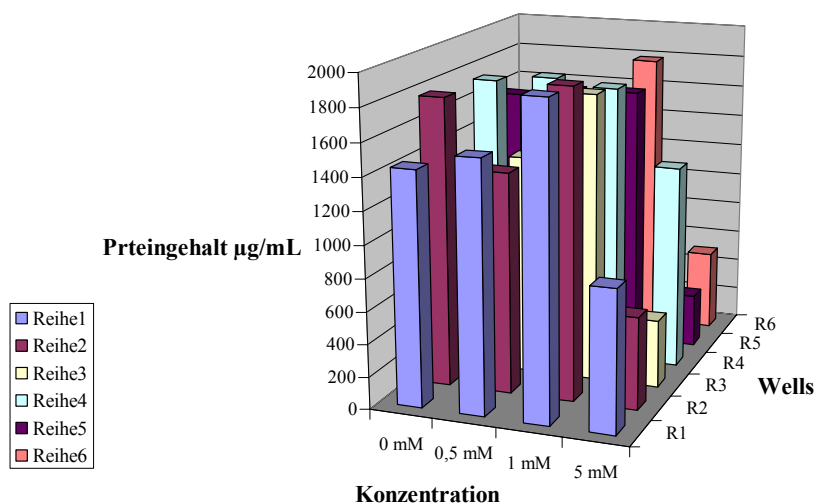


	0 mM	0,5 mM	1 mM	5 mM
Reihe1	2055	640	330	70
Reihe2	1505	1020	260	80
Reihe3	1055	900	320	280
Reihe4	1055	730	300	250
Reihe5	2455	1030	340	370
Reihe6	1205	830	440	250

Abb. 72 Grafische und tabellarische Darstellung der Zelltests mit Chlorambucil.

Wie deutlich in dem Balkendiagramm in Abbildung 72 zu erkennen ist, nimmt der Proteingehalt in den einzelnen Wells mit Zunahme der Chlorambucilkonzentration ab. Die Wirksamkeit des Chlorambucils auf die Zellteilung der Bon Zellen wurde mit diesem Experiment bestätigt und kann für das Zellkulturexperiment mit Cl-Amb-Cum als Referenz verwendet werden.

6.2.2.2 Cl-Amb-Cum



	0 mM	0,5 mM	1 mM	5 mM
Reihe1	1440	1540	1910	870
Reihe2	1780	1360	1900	570
Reihe3	1290	1360	1780	420
Reihe4	1740	1780	1740	1270
Reihe5	1580	1630	1640	330
Reihe6	1480	1530	1780	500

Abb. 73 Grafische und tabellarische Darstellung der Zelltests mit Cl-Amb-Cum

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Zellkulturtests mit Cl-Amb-Cum ergab die in Abbildung 73 aufgeführten Ergebnisse. Für die Konzentrationen von 0 mM, 0,5 mM und 1 mM ist keine Abnahme des Proteingehaltes zu erkennen. Bei einer 5 mM Konzentration von Cl-Amb-Cum kommt es zu einer Erniedrigung des Proteingehaltes, wobei dieses Ergebnis mit Vorsicht zu genießen ist. Die Aufarbeitung der Zellen nach der Behandlung mit der 5 mM Lösung zeigte, dass sich die Zellen weiß färbten und nur noch mit mechanischer Gewalt von den Wells abzutrennen waren. Man kann sagen, dass es zu einem Effekt durch Cl-Amb-Cum beim Zellwachstum kommt, dieser aber nicht so eindeutig bewiesen ist.

Die Ergebnisse der Zelltests zeigen, dass Chlorambucil das Wachstum von Bon Zellen hemmt, im Vergleich dazu aber Cl-Amb-Cum keine nennenswerten Effekte zeigt. Ein tatsächlicher Beweis der Ineffektivität von Cl-Amb-Cum als Wirkstoff ist damit noch nicht gegeben, da diese Zelllinie evtl. nicht sensitiv genug ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein reiner Effektivitätsnachweis für Chlorambucilderivate mit der Methode nach Epstein et al.^[83] und Boger et al.^[84] durchgeführt werden kann um zumindest eine Wirksamkeit des Chlorambucil nachweisen zu können^[85]. Greig et al.^[86] postuliert anhand dieses Versuches die potentielle Wirksamkeit von *tert*-Butyl-chlorambucilester. Aufgrund dieser Vorkenntnisse wurde anschließend an die Zelltests dieser Aktivitätstest durchgeführt.

6.2.3 Aktivitätstest von Cl-Amb-Cum

6.2.3.1 Durchführung

Zuerst wird eine 10 mM Stammlösung von Chlorambucil und Cl-Amb-Cum in Aceton / Ethanol 1 : 1 hergestellt. Zu jeweils 1 mL 0,2 M Acetatpuffer (pH 5,6) werden fünf unterschiedliche Mengen Stammlösung (0,2 mL, 0,1 mL, 50,0 μ L, 25,0 μ L, 12,5 μ L) und die jeweils fehlende Menge an Lösungsmittelmischung (zu 0,2 mL) zugegeben. Zu dieser Mischung gibt man anschließend 0,5 mL einer 5 %igen 4(4-Nitrobenzyl)pyridin in Aceton zu und inkubiert die Reaktionslösung bei 37 °C für 3 h. Nach Beendigung der Inkubationszeit mischt man die Reaktionslösungen mit 2 mL Triethylamin / Aceton 1 : 1 und vermischt die blau gefärbten Lösungen im UV/Vis-Spektrometer. Die Extinktionswerte bei 560 nm der fünf Konzentrationen für Chlorambucil und Cl-Amb-Cum werden gegen die jeweiligen Konzentrationswerte aufgetragen und die Steigung der Geraden miteinander verglichen.

6.2.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Setzt man die Steigung der Geraden für Chlorambucil auf 100 % und bezieht die Steigung der Geraden von Cl-Amb-Cum auf diesen Wert so erhält man eine prozentuale Aktivität von Cl-Amb-Cum zu Chlorambucil von 10 % (Abbildung 74). Im Vergleich zu Chlorambucil ist die Aktivität nicht so hoch wie erwartet, vergleicht man diesen Wert mit dem des Melphalan (20,6 % zu Chlorambucil), welches ein zugelassenes alkylierendes Zytostatikum ist, so ist die Aktivität des Cl-Amb-Cum nicht allzu gering^[86].

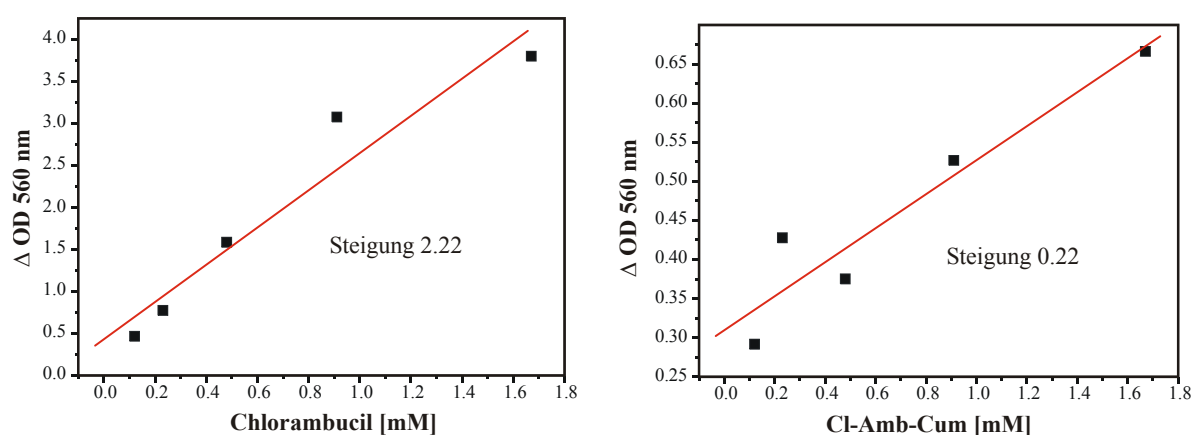


Abb. 74 Graphische Darstellung der Alkylierungs Aktivität von Cl-Amb-Cum im Vergleich zu Chlorambucil.

6.3 Zusammenfassung der Zellkulturtests

Die beiden vorgestellten Zelltests bilden den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit und sollen in diesem kurzen Absatz nochmals kurz zusammengefasst werden.

Die photochemische Freisetzung von H5FU aus dem Copolymer konnte eine sichtbare Änderung des Zellwachstums hervorrufen. Des Weiteren ist konnte gezeigt werden, dass nicht aktiviertes Copolymer biocompatibel ist. Die Photos der Zellkulturen zeigen noch mal deutlich die experimentell erhaltenen Werte.

Für das aus dem multifunktionalen Copolymer freisetzbare Cl-Amb-Cum zeigen die Zelltests im Vergleich zu reinem Chlorambucil keine nennenswerten Ergebnisse. Da es evtl. auch an der verwendeten Zelllinie liegen kann, dass keine Wirksamkeit nachweisbar war, wurde ein Aktivitätsnachweis anhand von einer Literatur bekannten Methode durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass Cl-Amb-Cum alkylierend wirkt und somit als aktiver Wirkstoff einsetzbar ist.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das angestrebte Ziel der vorliegenden Arbeit:

„Laser-getriggerte Freisetzung polymergebundener pharmazeutischer Wirkstoffe zur Behandlung des Nachstars“

konnte anhand vieler erwartungsgemäß verlaufender Experimente erreicht werden. Die vier Teilgebiete der Arbeit zeigen Ergebnisse, welche viel versprechend sind und die Grundlagen dafür legen, das Gesamtprojekt „lasergetriggerte Wirkstofffreisetzung“ in unterschiedlicher Art und Weise weiterzuführen.

Teil eins, die weiterführende Untersuchung des Copolymermaterials H5FUPBMAOC zum Nachweis der Theorie der photochemisch getriggerten wirkstoffbasierenden Nachstar-Behandlung, kann als erfolgreich beendet bezeichnet werden. Herausstechende Ergebnisse sind die SPA induzierte wiederholbare Freisetzung des Wirkstoffes aus H5FUPBMAOC, die TPA induzierte wiederholbare Freisetzung und anschließende Diffusion von H5FU aus H5FUPBMAOC, der Langzeitstabilitätstest des H5FUPBMAOC und der Nachweis, dass keine messbare Brechungsindexänderung durch photochemisch induzierte Freisetzung zu beobachten sind.

Die Synthesen der drei unterschiedlichen cumarinbasierenden Linkersysteme konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die TBS Schutzgruppe erwies sich als hervorragend geeignet, da sie während der photochemischen Dimersierung stabil bleibt und sich unter sehr milden Bedingungen wieder abspalten lässt. Alle drei Linkersysteme zeigen eine erhöhte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und eine Mischbarkeit mit PMMA. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um Dimer beladene Polymerfilme herzustellen, welche für erste TPA Versuche in einer Polymermatrix dienen. Die photochemische Charakterisierung der Linkersysteme wurde in Lösung und anschließend in einer Polymermatrix durchgeführt. Auffallend ist, dass alle drei Dimere einen TPA-Querschnitt aufweisen, welcher in der gleichen Größenordnung liegt wie der des Cumarins. Des Weiteren wurde eindeutig gezeigt, dass die Einbettung der Dimere in eine Polymermatrix keinen Einfluss auf den TPA-Querschnitt hat. Als Resultat kann behauptet werden, dass die Derivatisierung von Cumarin zur besseren Verwendung als Linkersystem keinen großen Einfluss auf den TPA-Querschnitt haben sollte. Die positiven Ergebnisse bezüglich der Verwendung der Dimere als Linkersystem finden deshalb im dritten Teil Anwendung als Copolymerbaustein.

Auf Basis des TBS-P-Cum Dimer konnte anhand einer theoretischen Berechnung gezeigt werden, dass eine Exposition der implantierten Linse im Sonnenlicht zu keiner meßbaren Wirkstofffreisetzung führt.

Die Untersuchung der Linkersysteme hinsichtlich ihrer TPA induzierten Spaltung bei unterschiedlichen Wellenlängen konnte anhand des TBS-Cum Dimers im Arbeitskreis Prof. M. Motzkus erfolgreich beendet werden.

Aus den im zweiten Teil dieser Arbeit vorgestellten Linkersystemen wurde das TBS-Cum Dimer gewählt, um es erfolgreich zu derivatisieren und anschließend mit MMA zu copolymerisieren. Dieses photochemisch aktive Copolymer konnte dann polymeranalog mit drei verschiedenen pharmazeutischen Wirkstoffen beladen werden. Die Synthese dieses multifunktionalen Copolymers ist die Grundlage für die ophthalmologische Anwendung von photochemischen Linkersystemen auf Basis von Cyclobutanringen.

Die photochemische Charakterisierung des Grundpolymers TBS-Copo konnte erfolgreich durchgeführt werden und führte zu einer SPA-Quantenausbeute von 34 % und einem TPA-Querschnitt von ca. 1 GM, abhängig vom angenommenen Monomerverhältnis. Aufgrund der positiven photochemischen Freisetzung von TBS-Cum aus dem Copolymer, wurde anschließend die Freisetzung der einzelnen Wirkstoffe mittels SPA und TPA durchgeführt. Die Analyse der über SPA- und TPA-Photochemie freigesetzten Wirkstoffe erfolgte mittels HPLC mit positivem Erfolg.

Der vierte und letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Nachweis der Aktivität der photochemisch freigesetzten Wirkstoffe anhand von *in vitro* Zelltests. Für das monofunktionale Copolymer (H5FUPBMAOC) konnte gezeigt werden, dass nicht aktiviertes Polymer biocompatibel ist und durch die Aktivierung das Zellwachstum deutlich gehemmt werden kann. Aufgrund des nicht eindeutig positiv verlaufenen Zelltests mit Cl-Amb-Cum, wurde ein Aktivitätstest durchgeführt und für positiv befunden. Als Resultat kann die Behauptung aufrechterhalten werden, ein multifunktionales photochemisch aktives Copolymer zur Wirkstofffreisetzung entwickelt zu haben.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Materialien und Methoden

8.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurde, sofern nicht anders angemerkt, über die folgenden Firmen bezogen:

Acros	Gell, Belgien
Alfa Aesar	Karlsruhe, Deutschland
Degussa	Düsseldorf, Deutschland
Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Fluorochem	Derbys, Groß-Britannien
Merck	Darmstadt, Deutschland
Sigma / Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

8.1.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es werden Aluminiumstreifen mit SiO₂-Beschichtung (Merck Silicagel 60) auf die benötigte Größe zugeschnitten. Die Substanzen werden durch UV-Licht bei 254 bzw. 366 nm detektiert.

8.1.3 Flash-Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wird Silicagel 60 (230-400 Mesh, 0.040-0.063 mm) der Firma Merck mit den angegebenen Lösungsmitteln verwendet.

8.1.4 NMR-Spektroskopie

¹H- und ¹³C-NMR Spektren werden bei Raumtemperatur durch die Service-Abteilung des Fachbereiches Chemie der Universität Marburg auf Geräten der Firma Bruker (Modell: AC 300, DRX 500, Avance 600) aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist relativ zu CHCl₃ (7.26 ppm bzw. 77.00 ppm) angegeben.

8.1.5 CHN-Analyse

CHN-Analysen werden auf dem Gerät CHN-Rapid der Firma Hereaus durch die Service-Abteilung des Fachbereiches Chemie der Universität Marburg durchgeführt.

8.1.6 Massenspektrometrie (MS)

EI-MS wird durch die Massenspektroskopieabteilung des Fachbereiches Chemie der Universität Marburg bei 70 eV (Varian CH7A, Finnigan) durchgeführt. ESI-Massenspektren werden an einem Massenspektrometer LCQ-duo der Firma Thermo Electron aufgenommen. Die ESI-Messung findet bei folgenden Einstellungen statt: positive mode, spray voltage 4.50 kV, capillary temperature 200 °C und capillary voltage 10.00 V.

8.1.7 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS)

Die gaschromatographischen Messungen werden an einem Gerät der Firma Shimadzu (Modell GC 17A) bestückt mit einer 30 m FS-SE-54-CB-0.25 Säule (Chromatographie Service, Langerwehe) durchgeführt. Helium 5.0 wird als Trägergas mit einer Flussrate von 0,6 mL / min verwendet. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Massenspektrometers der Firma Shimadzu (Modell: QP5050A, EI: 70 eV).

Die untersuchten Proben werden mit folgenden Parametern analysiert: Injektionstemperatur 300 °C, Anfangstemperatur der Säule 50 °C, Endtemperatur der Säule 280 °C, Aufheizphase 10 °C / min, Interfacetemperatur 230 °C (Methode: Ligninmodell).

8.1.8 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die dargestellten Polymere werden auf der Säule SDV 10 µm (PSS) getrennt und mit dem Detektormodell 300 TDA – THF M (Viscotek) detektiert. Die Säulen haben eine Temperatur von 25,0 °C, der Detektor wird auf 35,0 °C geheizt.

8.1.9 UV/VIS-Spektroskopie

Alle Spektren werden auf dem UVIKON 922 Spektrophotometer der Firma Kontron Instruments gemessen, wobei die Schichtdicke bei den Messungen von Lösungen immer 1 cm beträgt.

8.1.10 Compression Moulding (CPM)

Für die Herstellung von Prototypen für Intraokular-Linsen aus Polymermaterial wird das Heißpressgerät der Fa. Schwabenthan Polystat 200T verwendet.

8.1.11 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine HPLC der Fa. Agilent Technologies Modell 1050 eingesetzt. Für die durchgeführten Untersuchungen werden polare Lösungsmittelgemische aus Wasser (mit 300 μL H_3PO_4 / L angesäuert) und Acetonitril verwendet. Als Füllmaterial für die Säule (250 mm x 4 mm) wird RP18 Material Nucleosil 100-3-C18 Fa. Bischoff mit einer Korngröße von 3 μm verwendet, dieser Säule ist noch eine Vorsäule (Nucleosil 100-3-C18, 3 μm , 20 x 4mm, Firma Bischoff) vorgeschaltet. Mittels eines DAD werden die getrennten Substanzen anschließend identifiziert.

Neben der analytischen HPLC wird auch eine präparative HPLC (Säule: 250 mm x 32 mm, RP18 10 μm , EnCaPharm; Pumpe: HPLC Pump 64, Knauer; Software: WinGPC 6.20, PSS) zur Reinigung von Produkten verwendet. Die Detektion findet bei 280 nm im UV/Vis-Detektor statt. Das Aufgabevolumen ist immer 5 mL.

Methoden:

SH6Bfrei Gradient Acetonitril / H_2O : Start 37 / 63, 16 min 37 / 63, 23 min 95 / 5, 28 min 95 / 5, 35 min 37 / 63, Ende 37 / 63, 40 °C Säulentemperatur, 1 mL / min Flussrate.

SH03 isokratisch Acetonitril / H_2O : 80 / 20, 40 °C Säulentemperatur, 1 mL / min Flussrate.

8.1.12 Thermogravimetrische Analyse (TGA) / Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die Zersetzungstemperatur für den 5 %igen Abbau der Polymere wird auf dem Gerät TGA / SDTA 851^e der Firma Mettler Toledo gemessen. Die Messung wird im Stickstoffstrom von Zimmertemperatur bis 800 °C mit einer Aufheizrate von 10 °C / min durchgeführt.

Zur Bestimmung der Glasstemperatur wird ein Wärmestrom-DSC verwendet (DSC 821^e, Mettler Toledo) mit einer Heiz- und Abkühlrate von 10 °C / min. Die Auswertung der Messdaten erfolgt mit der *STAR^e* Software von *Mettler Toledo* jeweils anhand der zweiten Heizkurve.

8.1.13 Photoreaktoren

8.1.13.1 Cycloaddition

Die Cycloaddition wird in einem Rayonet Photoreaktor durchgeführt, in dem 12 UV-Leuchtröhren (40 W / 79 K, Osram) konzentrisch angeordnet sind. Die zu belichtenden Lösungen werden während der Reaktion stetig gerührt.

8.1.13.2 Cycloreversion

Für die SPA induzierte Freisetzung werden die Proben in einem Fluoreszenzspektrometer der Firma Shimadzu (Typ RF-1502) mit Licht der Wellenlänge 266 nm bestrahlt. Die Dauer der Bestrahlung variiert für die verschiedenen Proben, wobei die flüssigen Proben für die Messung in eine 1 cm dicke Quarzglaszelle gefüllt und mittels eines Magnetrührers gerührt werden. Um die wellenlängenabhängige Lichtintensität des Spektrometers, die zur Berechnung der Quantenausbeute elementar ist, zu erhalten, wird mit einer Photodiode (1337-1010BQ, Hamamatsu) kalibriert. Diese Art der Kalibrierung ist von Herr Dr. Kreiling mittels der bekannten Azobenzol-Aktinometrie überprüft worden^[48].

Die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Polymerfilmen für die Zelltests wird mit einer DC-Lampe MinUVIS DESAGA, $187 \mu\text{W} / \text{cm}^2$ bei 254 nm durchgeführt. Auch hier wird die Intensität mit der Photodiode 1337-1010BQ von Hamamatsu bestimmt.

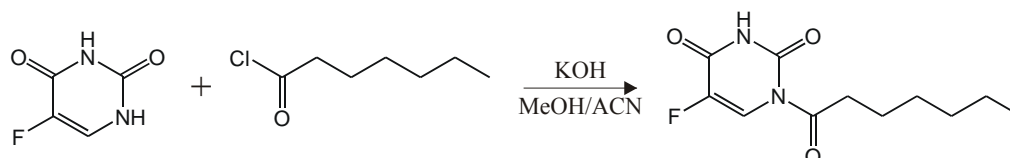
Die Spaltung der Cyclobutanringe mittels Zwei-Photonen-Absorption wird mit Hilfe eines Q-switched Nd:YAG-Pulslasers der Firma Coherent (Infinity 40-100) durchgeführt. Die verwendete Wellenlänge beträgt dabei 532 nm, mit einer Frequenz von 20 Hz, einer Pulsdauer von 3 ns und einem Strahldurchmesser von 5,5 mm. Die tatsächliche Energie der emittierten Strahlung wird mit dem Gerät Fieldmaster GS (Firma Coherent) und einem Messkopf (Power Meter Head, Model 80) bei 532 nm gemessen. Bei TPA induzierten Reaktionen in Lösung wird während der Belichtung die Reaktionslösung mit einem Magnetrührer stetig durchmischt.

8.1.14 Ellipsometer

Für den Nachweis, dass durch die Freisetzung von 5FU aus dem Polymer keine Brechungsindexänderung des Polymers auftritt, werden Filmblands aus PMMA / H5FUPBMAOC 1 : 1 (3 % in CHCl_3) auf Silicium in einem Phasenmodulationsellipsometer vermessen. Die Phasenmodulation wird mit einem photoelastischen Modulator (Modulationsfrequenz 50 kHz, HINDS) durchgeführt, als Lichtquelle wird dabei ein He/Ne Laser verwendet.

8.2 Synthesen der Vorstufen, der Linkersysteme und der Copolymer

8.2.1 Heptanoyl-5-fluoruracil (H5FU)^[48]



5-Fluoruracil	[130,08 g / mol]	1,0 eq	40,0 mmol	5,20 g
Kaliumhydroxid	[56,11 g / mol]	1,0 eq	40,0 mmol	2,24 g
Heptansäurechlorid	[148,63 g / mol]	1,1 eq	44,0 mmol	6,51 g
Methanol				200 mL

5,2 g (40,0 mmol) 5-FU und 2,24 g (40,0 mmol) KOH werden in 200 mL MeOH bei RT 1 h gerührt bis eine trübe Lösung entsteht. Anschließend wird das MeOH abdestilliert und das Produkt im HV getrocknet. Unter Argon gibt man 500 mL ACN zu, lässt die Lösung 1 h rühren, kühlt auf 0 °C und gibt langsam 6,51 g (44,0 mmol) Heptanoylsäurechlorid zu. Die Lösung rührt anschließend 20 h bei RT. Nach Beendigung der Reaktion wird das ACN abdestilliert und das Rohprodukt im HV getrocknet. Das Rohprodukt, suspendiert in 200 mL Ethylacetat (getrocknet über Molekularsieb), wird filtriert, das Lösungsmittel anschließend abdestilliert und das Produkt im HV getrocknet. Die Ausbeute beträgt 8,65 g (89 %).

Element	% berechnet	% enthalten
N	11,56	11,75
C	54,54	51,32
H	6,24	5,20

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

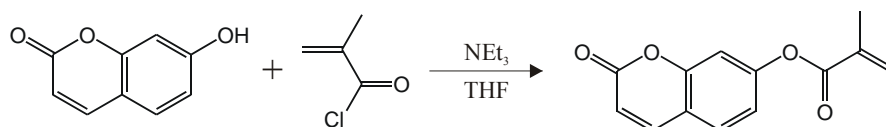
δ [ppm] = 9.67 (s broad, 1H), 8.26 (d, 1H, J = 7.0 Hz), 3.11 (t, 2H, J = 20.2 Hz), 1.68 (quin, 2H, J = 7.3 Hz), 1.2-1.41 (m, 6H), 0.85 (t, 3H, J = 6.3 Hz).

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 172.1, 157.1 (d, J_{C-F} = 28.1 Hz), 148.0, 141.2 (d, 1J_{C-F} = 242 Hz), 121.7 (d, J = 36.5 Hz), 39.0, 31.4, 28.5, 24.3, 22.4, 13.9.

¹⁹F-NMR (188 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -162.25

8.2.2 7-Methacryloxyumarin (MAOC)^[48]



7-Hydroxyumarin	[162,14 g / mol]	1,0 eq	0,10 mol	16,2 g
Triethylamin	[101,19 g / mol]	5,0 eq	0,50 mol	50,6 g
Methacrylsäurechlorid	[104,53 g / mol]	1,5 eq	0,15 mol	15,7 g
Tetrahydrofuran				500 mL

In 500 mL THF werden 16,2 g (0,10 mol) 7-Hydroxyumarin suspendiert, anschließend mit 50,6 g (0,50 mol) Triethylamin versetzt und für 30 min bei RT gerührt. Zu dieser Lösung werden 15,7 g (0,15 mol) Methacrylsäurechlorid gegeben und die Reaktion für 2 h bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktion lässt man die Lösung für weiter 20 h bei RT rühren. Die entstandenen Ammoniumsalze werden abfiltriert und mit THF gewaschen. Das durch Abdestillieren des THF und Trocknen im HV erhaltene Rohprodukt, wird in zwei Läufen flashchromatographisch an 600 g Kieselgel und einem Lösungsmittelgemisch von CHCl₃ : MeOH 40 : 1 (R_f = 0,6) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 18,2 g (79 %).

Element	% berechnet	% enthalten
C	67,82	66,90
H	4,38	4,96

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

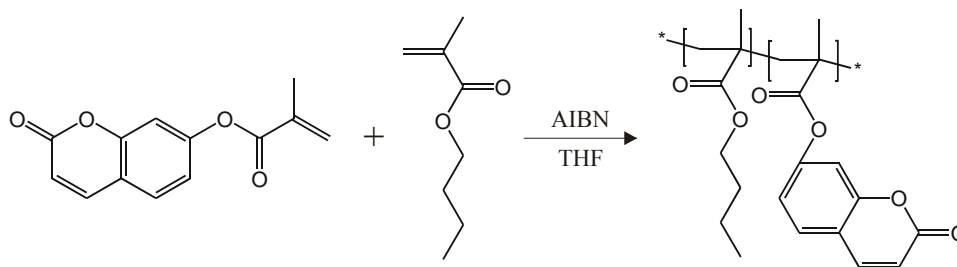
δ [ppm] = 7.71 (d, 1H, J = 14.4 Hz), 7.50 (d, 1H, J = 12.6 Hz), 7.10 - 7.16 (m, 1H), 7.00 - 7.09 (m, 1H), 6.38-6.44 (m, 2H), 5.83 (d, 1H, J = 6.6 Hz), 2.08 (t, 3H, J = 2.1 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 165.4, 165.2, 154.7, 153.6, 142.7, 135.4, 128.5, 128.3, 118.5, 117.2, 116.2, 110.3, 18.4.

EI-MS m/e: 230 (M⁺, 29.6 %), 134 (7.6 %), 105 (4.4 %), 69 (100 %), 41 (48.9 %).

8.2.3 Poly(methylmethacrylat-co-7-methacryloxy-cumarin) (PBMAOC)^[48]



7-Methacryloyloxy-cumarin [230,22 g / mol]	0,1 eq	0,03 mol	6,9 g
Methacrylsäurebutylester [142,2 g / mol]	1,0 eq	0,30 mol	42,6 g
Azoisobuttersäurenitril [164,21 g / mol]		0,2 mmol	32,8 mg
Tetrahydrofuran			50 mL

42,6 g (0,3 mol) n-BMA, 6,9 g (0,03 mol) MAOC und 32,8 mg (0,2 mmol) AIBN werden in 50 mL THF gelöst und die Lösung dreimal entgast. Die radikalische Copolymerisation findet bei 60 °C statt. Die Lösung wird nach 21 h mit 75 mL THF verdünnt und in 1,5 L MeOH langsam eingetropft. Das ausgefallene Copolymer wird abfiltriert, getrocknet, in 200 mL Chloroform gelöst um nochmals in 2 L MeOH ausgefällt zu werden. Anschließend wird das abfiltrierte Copolymer bei 60 °C im Vakuum über 3 d getrocknet. Die Ausbeute beträgt 34,8 g (70 %). Um das Einbauverhältnis von MAOC : n-BMA im vorliegenden Copolymer zu bestimmen bedient man sich des ¹H-NMR. Das Integral eines H-Atoms der Doppelbindung im Cumarin wird zum Integral der CH₂-Gruppe des n-Butyl-Restes, welches direkt am Ester-Sauerstoff hängt, ins Verhältnis gesetzt. Das so erhaltene Verhältnis für dieses Copolymer beläuft sich auf 1 : 10 MAOC : n-BMA.

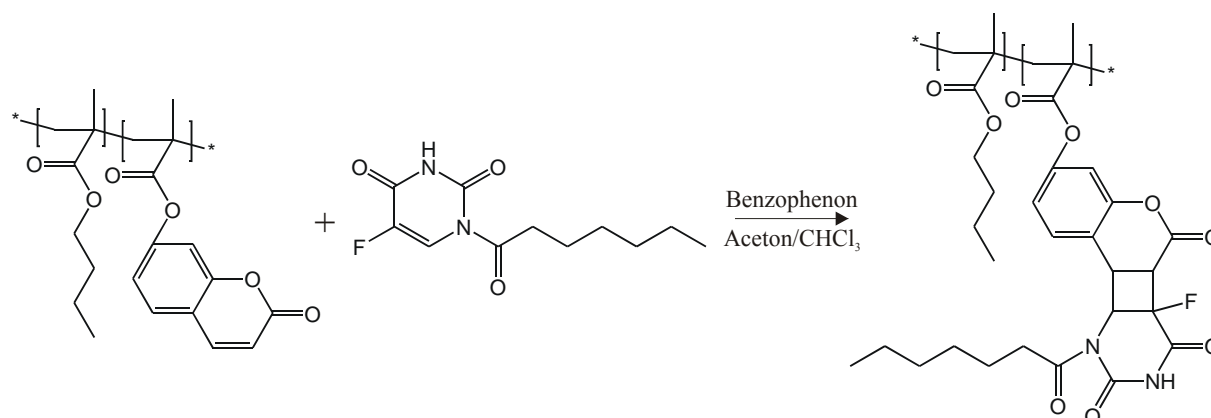
Element	% berechnet	% enthalten
C	67,64	67,27
H	9,09	9,31

GPC (THF): $M_W = 3,54 \cdot 10^5$, $M_n = 1,67 \cdot 10^5$, $M_W / M_n = 2,12$

DSC: $T_g = 54,16$ °C

TGA: $T_{5\%} = 259$ °C

8.2.4 Mit H5FU beladenes PBMAOC (H5FUPBMAOC)^[48]



Poly(BMA-co-MAOC)		1 eq		0,20 g
1-Heptanoyl-5-fluoruracil [242,25 g / mol]		50 eq	4,79 mmol	1,16 g
Benzophenon [182,22 g / mol]		1 eq	0,10 mmol	18,0 mg
Chloroform				3 mL
Aceton				6 mL

In 5 Reagenzgläsern werden jeweils 0,2 g (1 eq.) PBMAOC in 3 mL CHCl_3 gelöst. Des Weiteren werden 18,0 mg (0,10 mmol) Benzophenon und 1,16 g (4,79 mmol, ca. 50 eq.) H5FU in 6 mL Aceton gelöst. Diese Lösung wird sechsmal angesetzt und in je ein Reagenzglas zugegeben. Die Lösungen werden je 20 min mit Argon entgast und anschließend für 20 h im Rayonet-Reaktor belichtet. Nach der Belichtung vereint man die sechs Lösungen, engt sie ein und fällt das Polymer in 750 mL MeOH aus. Das Polymer wird getrocknet und nochmals durch Umfällen gereinigt. Das erhaltene beladene Polymer wird im HV getrocknet. Die Ausbeute beträgt 0,86 g (86 %).

Element	% berechnet	% enthalten
N	1,48	0,67
C	65,96	65,47
H	8,72	7,87

GPC (THF): $M_w = 6,36 \cdot 10^5$, $M_n = 1,55 \cdot 10^5$, $M_w / M_n = 4,10$

DSC: T_g = kein Glasübergang zu erkennen

TGA: $T_{5\%} = 245 \text{ °C}$

8.2.5 7-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-cumarin (TBS-Cum)



7-Hydroxycumarin	[162,14 g / mol]	1,0 eq	21 mmol	3,36 g
Imidazol	[68,08 g / mol]	2,5 eq	53 mmol	3,53 g
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid	[150,72 g / mol]	1,2 eq	25 mmol	3,75 g
Tetrahydrofuran				75 mL

In 75 mL wasserfreien THF löst man 3,36 g (21 mmol) 7-Hydroxycumarin und 3,53 g (53 mmol) Imidazol und gibt unter Argon-Atmosphäre 3,75 g (25 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zu. Die Reaktionslösung wird für 3,5 h auf 50 °C erhitzt und weiter 22 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion filtriert man die Ammoniumsalze ab und wäscht die Lösung mit 5 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Durch dreimaliges Extrahieren mit Chloroform und anschließendem Trocknen über Magnesiumsulfat erhält man das Rohprodukt. Mittels Flashchromatographie auf 300 g Kieselgel mit einem Lösungsmittelgemisch von 1 : 4 Ethylacetat : n-Pentan wird 4,7 g (81 %) Produkt erhalten.

Element	% berechnet	% enthalten
C	65,22	64,65
H	7,25	7,55

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

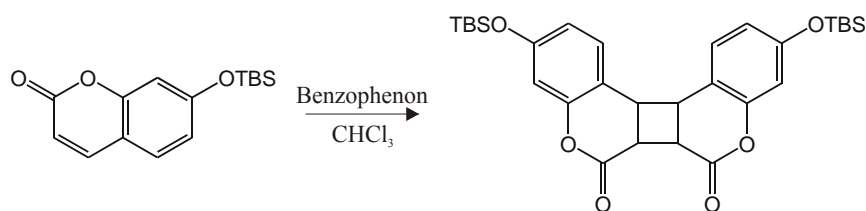
δ [ppm] = 7.63 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.33 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.77 (s, 1H), 6.75 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.24 (d, 1H, J = 9.4 Hz), 0.98 (s, 9H), 0.24 (s, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 161.2, 159.5, 155.7, 143.4, 128.8, 117.5, 113.5, 113.3, 107.8, 25.6, 18.4, -4.3.

EI-MS m/e: 276 (M⁺, 14.65 %), 219 (100 %), 163 (30.19 %), 89 (11,00 %), 73 (7.54 %), 29 (9.27 %).

8.2.6 7,7'-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-dicumarin (TBS-Cum-D)



7-O-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxy)-cumarin	[276,40 g / mol]1,0 eq	3,60 mmol	1,00 g
Benzophenon	[182,22 g / mol]0,2 eq	0,70 mmol	0,13 g
Chloroform			25 mL

Für die Dimerisierung von TBS-Cum werden fünf Reagenzgläser mit je 0,2 g (0,72 mmol) TBS-Cum, 25 mg (0,14 mmol) Benzophenon und 5 mL Chloroform befüllt. Die Lösungen werden entgast und anschließend für 20 h im Rayonet-Reaktor belichtet. Die Lösungen werden nach der Belichtung vereint und eingeeengt. Für die Aufreinigung auf der präparativen HPLC wird das Rohprodukt in 5 mL THF gelöst und auf die Säule aufgegeben (Acetonitril / Wasser 80 : 20 \rightarrow 100 : 0). Die Ausbeute beträgt 0,75 g (75 %) anti-head-to-head Isomer.

Element	% berechnet	% enthalten
C	65,22	64,40
H	7,25	7,63

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

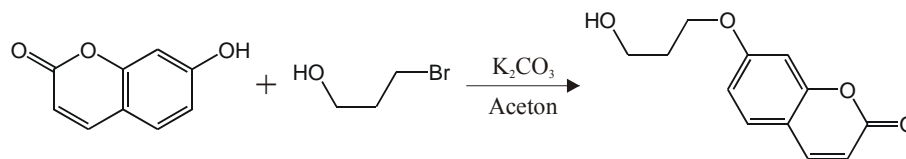
δ [ppm] = 6.98 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.65 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.62 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.58 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz), 3.88 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz), 3.74 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 0.99 (s, 18H), 0.23 (s, 12H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 166.3, 156.8, 151.9, 128.5, 117.5, 113.2, 109.2, 43.7, 40.1, 25.7, 18.3, - 4.3.

ESI-MS m/e : 570.6 [$\text{M}^+ + \text{H}_2\text{O}$].

8.2.7 7-(3-Hydroxypropoxy)-cumarin (p-Cum)



7-Hydroxycumarin [162,15 g / mol]	1,0 eq	25,0 mmol	4,05 g
3-Brom-1-propanol [139,00 g / mol]	1,0 eq	25,0 mmol	3,48 g
K ₂ CO ₃ [138,21 g / mol]	1,1 eq	27,5 mmol	3,80 g
Aceton			65 mL

Eine Suspension von 4,05 g (25,0 mmol) 7-Hydroxycumarin und 3,80 g (27,5 mmol) K₂CO₃ in 65 mL Aceton wird auf 70 °C erwärmt. Nachdem sich der gesamte Niederschlag gelöst hat, wird langsam 3,48 g (25,0 mmol) 3-Brom-1-propanol zugegeben und die Lösung für 22 h bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der erhaltene hellbraune Feststoff mit 70 mL 10 %iger Salzsäure versetzt. Die Lösung wird dreimal mit jeweils 20 mL Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wird im Vakuum entfernt und nach flashsäulenchromatographischer Reinigung (600 g Kieselgel, EtOAc / Pentan 2 : 1 → 10 : 1) erhält man 4,98 g (90 %) des Propanol-cumarinethers (R_f = 0,11: EtOAc / Hexan 1 : 1) als farblosen Feststoff.

Element	% berechnet	% enthalten
C	65,45	64,65
H	5,45	5,71

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

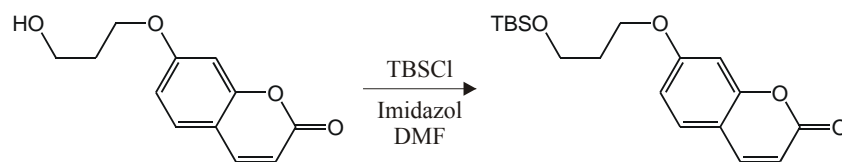
δ [ppm] = 7.60 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 7.32 (d, 1H, J = 12.9 Hz), 6.81 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.4 Hz), 6.76 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.20 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 4.14 (t, 2H, J = 6 Hz), 3.84 (t, 2H, J = 6 Hz), 2.05 (q, 2H, J = 6 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 162.2, 161.4, 155.8, 143.6, 128.8, 113.0, 112.9, 112.6, 101.5, 65.8, 59.4, 31.9.

EI-MS m/e: 220 (M⁺, 62.01 %), 162 (84.54 %), 143 (100 %), 105 (8.31 %), 78 (8.76 %), 51 (15.61 %).

8.2.8 7-[3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-propoxy]-cumarin (TBS-p-Cum)



7-(3-Hydroxypropoxy)-cumarin [220,22 g / mol]	1,0 eq	22,60 mmol	4,98 g
Imidazol [68,08 g / mol]	2,5 eq	56,50 mmol	3,85 g
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid [150,72 g / mol]	1,2 eq	27,12 mmol	4,09 g
Dimethylformamid			23 mL

Zu einer Lösung von 4,09 g (27,12 mmol) TBSCl in 13 mL DMF wird eine Lösung von 4,98 g (22,60 mmol) 7-(3-Hydroxypropoxy)-cumarin in 10 mL DMF und 3,85 g (56,50 mmol) Imidazol gegeben. Die Lösung wird für 19 h bei 35 °C gerührt, die Ammoniumsalze abfiltriert und anschließend mit 150 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Nach dreimaligem Extrahieren der Suspension mit Chloroform und Vereinigen der organischen Phasen trocknet man die Lösung über MgSO₄. Das Lösungsmittel wird im Vakuum wieder entfernt, und man erhält nach flashsäulenchromatographischer Reinigung (650 g Kieselgel, EtOAc / Pentan 1 : 4) 5,940 g (79 %) das TBS geschützte Propoxycumarin (R_f = 0,48 EtOAc / Hexan 1 : 2) als farblosen Feststoff.

Element	% berechnet	% enthalten
C	65,67	64,16
H	7,78	8,01

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

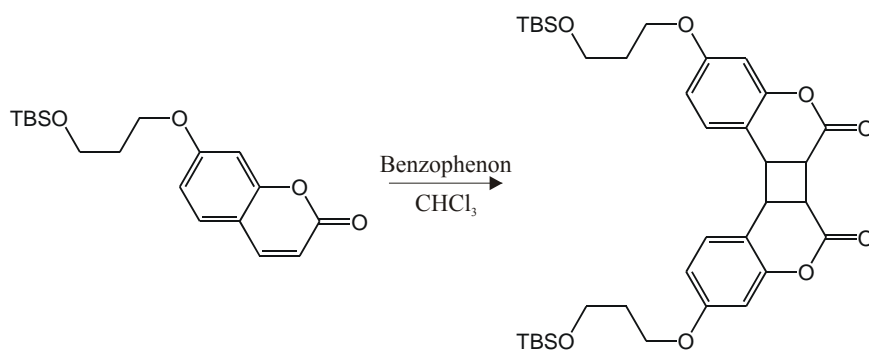
δ [ppm] = 7.63 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 7.36 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 6.82 - 6.86 (m, 2H), 6.25 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 4.12 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 3.81 (t, 2H, J = 6 Hz), 2.01 (q, 2H, J = 6 Hz), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 162.5, 161.4, 156.1, 143.5, 128.8, 113.1, 112.6, 113.0, 101.6, 63.3, 59.3, 32.2, 26.0, 18.4, - 5.3.

EI-MS m/e: 334 (M⁺, 1.12 %), 277 (44.48 %), 249 (40.92 %), 219 (56.63 %), 96 (63.36 %), 59 (100 %).

8.2.9 7,7'-[3-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-propoxy]-dicumarin (TBS-p-Cum-D)



7-[3-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-propoxy]-cumarin [334,48 g / mol]

1,0 eq 3,10 mmol 1,04 g

Benzophenon [182,22 g / mol]

0,2 eq 0,66 mmol 0,12 g

Chloroform

25 mL

Fünf Reagenzgläser werden gleichmäßig mit insgesamt 1,04 g (3,1 mmol) 7-[3-(*tert*-Butyldimethyl-silanyloxy)-propoxy]cumarin, 0,12 g (0,66 mmol) Benzophenon und 25 ml entgasten Chloroform befüllt. Die Lösungen werden anschließend in einem Rayonet-Reaktor für 20 h belichtet. Anschließend vereinigt man die Lösungen und entfernt das Lösungsmittel im HV. Das Rohprodukt wird in 5 mL THF aufgenommen und mit Hilfe einer präparativen HPLC gereinigt (Acetonitril / Wasser 85 : 15 → 100 : 0). Die Ausbeute von 7,7'-[3-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-propoxy]dicumarin beläuft sich auf 0,444 g (43 %) anti-head-to-head Isomer.

Element	% berechnet	% enthalten
C	65,67	59,31
H	7,78	7,51

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

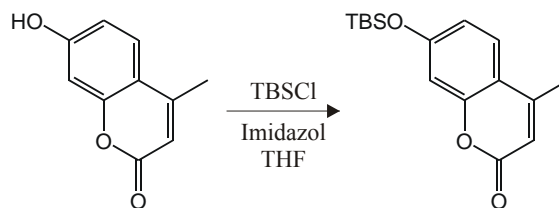
δ [ppm] = 7.01 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.71 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 6.63 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.06 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 3.88 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 3.80 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 3.73 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 1.99 (q, 2H, $J = 6$ Hz), 0.89 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = -5.4, 18.3, 25.9, 32.2, 40.0, 43.6, 59.3, 65.0, 103.4, 112.1, 112.3, 128.4, 152.0, 160.0, 166.1.

ESI-MS m/e : 686.4 [$\text{M}^+ + \text{H}_2\text{O}$].

8.2.10 7-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4-methyl-cumarin (TBS-4M-Cum)



4-Methyl-7-hydroxycumarin	[176,17 g / mol]	1,0 eq	39,96 mmol	7,04 g
Imidazol	[68,08 g / mol]	2,5 eq	99,88 mmol	6,80 g
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid	[150,72 g / mol]	1,2 eq	51,75 mmol	7,80 g
Tetrahydrofuran				170 mL

4-Methyl-7-hydroxycumarin (7,04 g, 39,96 mmol) wird mit Imidazol (6,80 g, 99,88 mmol) in 150 mL THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Eine Lösung von TBSCl (7,80 g, 51,75 mmol) in 20 mL THF wird hinzugegeben, für 4 h auf 50 °C erwärmt und bei RT 2,5 Tage gerührt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages wird das Filtrat mit 200 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, das Produkt mit Chloroform extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (600 g Kieselgel; Pentan/ EtOAc 5 : 1) gereinigt und man erhält 9,74 g (83 %) 4-Methyl-7-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-cumarin (R_f = 0,73: Pentan / Ethylacetat 70 : 30) als weißes Pulver.

Element	% berechnet	% enthalten
C	66,17	66,13
H	7,64	7,99

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

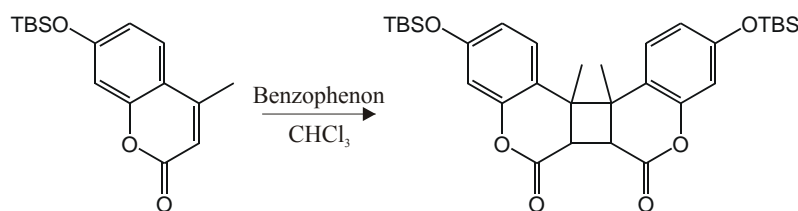
δ [ppm] = 7.46 (d, 1H, J = 9.3 Hz), 6.77 - 6.81 (m, 2H), 6.14 (d, 1H, J = 1.2 Hz), 2.39 (d, 3H, J = 1.2 Hz), 0.99 (s, 9H), 0.24 (s, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 161.2, 159.2, 155.0, 152.4, 125.4, 117.1, 114.2, 112.2, 107.8, 25.6, 18.6, 18.2, -4.4.

EI-MS m/e: 290 (M⁺, 31.38 %), 233 (100 %), 177 (11.69 %), 102 (10.13 %), 75 (8.94 %).

8.2.11 7,7'-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4-methyl-dicumarin (TBS-4M-Cum-D)



7-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)- 4-methyl-cumarin [290,43 g / mol]

1,0 eq 3,62 mmol 1,05 g

Benzophenon [182,22 g / mol]

0,2 eq 0,69 mmol 0,13 g

Chloroform

30 mL

30 mL Chloroform werden 30 Minuten entgast, in einen Schlenkkolben überführt und mit TBS-4M-Cum (1,05 g, 3,62 mmol) und Benzophenon (0,13 g, 0,69 mmol) versetzt. Die Lösung wird 22 h im UV-Reaktor belichtet und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird in 5 mL THF aufgenommen und über eine präparative HPLC (Acetonitril / Wasser 85 : 15 → 100 : 0) gereinigt. Man erhält 0,82 g (78 %) 7,7'-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4-methyl-dicumarin als weißen Feststoff.

Element	% berechnet	% enthalten
C	66,17	65,67
H	7,64	7,58

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

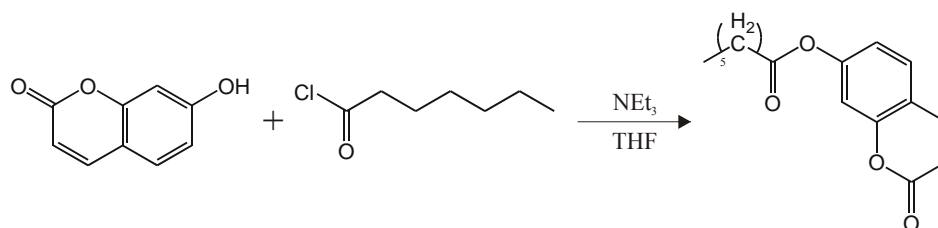
δ [ppm] = 6.99 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 6.70 (d, 2H, J = 2.4 Hz, J = 8.7 Hz), 6.67 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 3.37 (s, 2H), 1.23 (s, 6H), 0.99 (s, 18H), 0.23 (s, 12H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 166.1, 156.5, 151.5, 128.0, 117.2, 115.8, 108.9, 46.6, 45.0, 26.3, 25.6, 18.2, -4.4.

ESI-MS m/e: 598 [M⁺ + H₂O].

8.2.12 7-(Heptanoyloxy)-cumarin (hept-Cum)



7-Hydroxycumarin [162,15 g / mol]	1,0 eq	62,0 mmol	10,0 g
Triethylamin [101,19 g / mol]	5,0 eq	0,31 mol	31,2 g
Heptansäurechlorid [148,63 g / mol]	1,5 eq	93,0 mmol	13,7 g
Tetrahydrofuran			300mL

10,0 g (62,0 mmol) 7-Hydroxycumarin, suspendiert in 300 mL THF, werden mit 31,2 g (0,31 mol, 5 eq) Triethylamin versetzt und die Suspension 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Unter Argon werden 13,7 g (93,0 mmol) Heptanoylchlorid langsam hinzugegeben, weitere 2 Stunden bei 60 °C gerührt, abgekühlt auf RT und weitere 20 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion werden die Ammoniumsalze abfiltriert und mit THF gewaschen. Das THF wird abdestilliert und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Methanol (< 300 mL) umkristallisiert und man erhält weiße Kristalle. Die Ausbeute beträgt 10,59 g (62 %).

Element	% berechnet	% enthalten
C	70,06	69,51
H	6,61	7,17

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

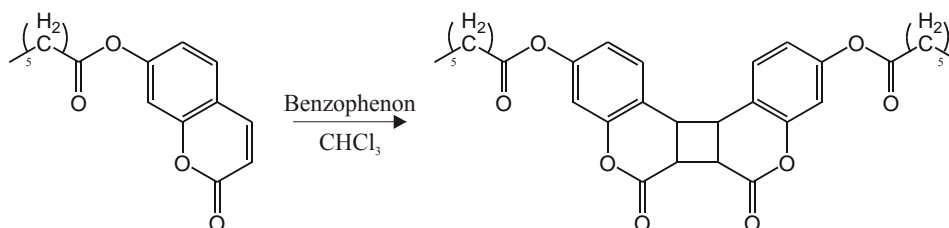
δ [ppm] = 7.69 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 7.47 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz), 7.11 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.04 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz), 6.39 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 2.59 (t, 2H, $J = 9.6$ Hz), 1.76 (quin, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.31 – 1.46 (m, 6H), 0.91 (t, 3 H, $J = 6.6$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171.6, 160.3, 154.7, 153.3, 142.8, 128.5, 118.4, 116.6, 116.0, 110.4, 34.3, 31.4, 28.7, 24.7, 22.4, 13.9 .

EI-MS m/e : 274 (M^+ , 1.9 %), 162 (48.4 %), 134 (12.1 %), 113 (27.2 %), 85 (10.4 %), 43 (100 %).

8.2.13 7,7'-(Heptanoyloxy)-dicumarin (Hept-Cum-D)



7-(Heptanoyloxy)-cumarin [274,31 g / mol]	1,0 eq	3,72 mmol	1,02 g
Benzophenon [182,22 g / mol]	0,2 eq	0,69 mmol	0,13 g
Chloroform			25 mL

In 25 mL entgastem Chloroform werden 1,02 g (3,72 mmol) Hept-Cum und 0,13 g (0,69 mmol) Benzophenon gelöst. Die Reaktionslösung wird 20 h im Rayonet-Photoreaktor belichtet und anschließend eingengt. Mit 5 mL THF wird das Rohprodukt aufgenommen und auf der präparativen HPLC (Acetonitril / Wasser 75 : 25 → 100 : 0) aufgereinigt. Die Ausbeute beträgt 0,65 g (64 %) anti-head-to-head Isomer.

Element	% berechnet	% enthalten
C	70,06	68,62
H	6,61	6,83

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

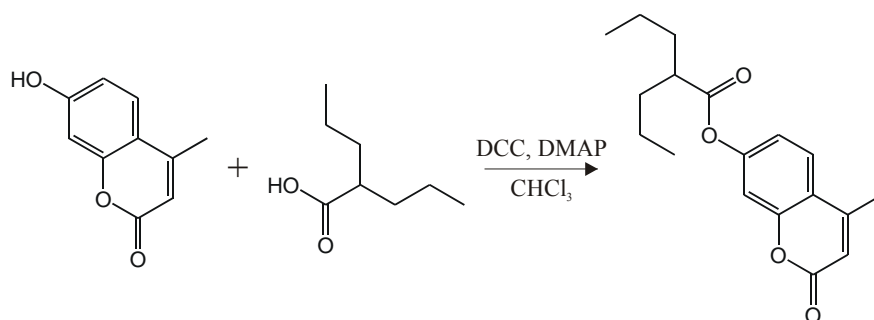
δ [ppm] = 7.12 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.93 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz), 6.87 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.12 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 3.85 - 3.94 (m, 2H), 2.57 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.75 (quin, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.31-1.46 (m, 6H), 0.91 (t, 3H, $J = 6.3$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171.9, 165.5, 151.7, 151.4, 128.3, 118.8, 117.5, 111.6, 43.5, 40.1, 34.3, 31.4, 28.7, 24.8, 22.4, 14.0 .

MS-ESI m/e 566: $[\text{M}^+ + \text{H}_2\text{O}]$.

8.2.14 7-(Valproyloxy)-4-methyl-cumarin (Val-4M-Cum)



4-Methyl-7-hydroxycoumarin	[176,17 g / mol]	1,0 eq	11,46 mmol	2,02 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,1 eq	1,33 mmol	0,16 g
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	2,5 eq	27,77 mmol	5,73 g
Valproinsäure	[144,21 g / mol]	2,2 eq	25,52 mmol	3,68 g
Chloroform				80 mL

DCC (5,73 g, 27,77 mmol), DMAP (0,16 g, 1,334 mmol) und Valproinsäure (3,68 g, 25,52 mmol) werden in 80 mL CHCl₃ gelöst und 30 Minuten bei RT gerührt. 4-Methyl-7-hydroxycoumarin (2,02 g, 11,46 mmol) wird hinzugegeben und für 2,5 h bei RT gerührt. Die Lösung wird filtriert, die organische Phase je zweimal mit 0,5 M HCl und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft. Anschließend nimmt man das Rohprodukt in 5 mL THF auf und reinigt es über eine präparative HPLC (Acetonitril / Wasser 85 : 15 → 100 : 0). Man erhält 2,97 g (86 %) Val-4M-Cum als weißen Feststoff.

Element	% berechnet	% enthalten
C	71,50	70,80
H	7,33	7,28

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

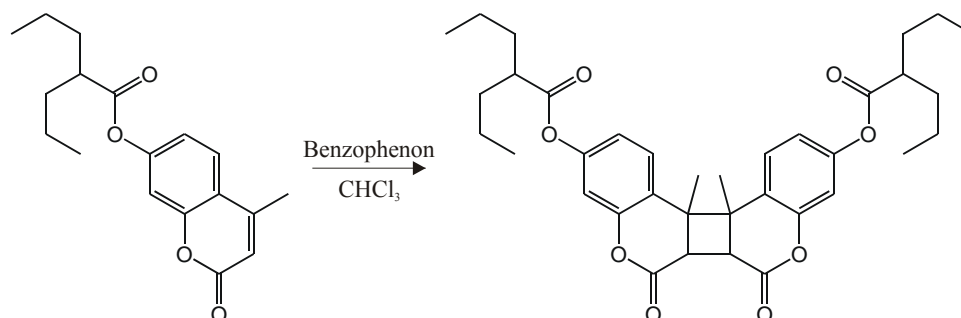
δ [ppm] = 7.59 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.08 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 8.4 Hz), 7.03 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 6.26 (d, 1H, J = 1.2 Hz), 2.43 (d, 3H, J = 1.2 Hz), 0,97 (t, 6H, J = 7.2 Hz), 1.43 (m, 4H), 1.75 (m, 2H), 1.58 (m, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 174.4, 160.4, 154.2, 153.3, 151.8, 125.3, 118.1, 117.7, 114.5, 110.5, , 45.4, 34.5, 20.7, 18.7, 14.0.

EI-MS m/e: 302 (M⁺, 0.3 %), 176 (4.83 %), 127 (11.57 %), 99 (14.45 %), 57 (100 %).

8.2.15 7,7`-(Valproyloxy)-4-methyl-dicumarin (Val-4M-Cum-D)



7-(Valproyloxy)-4-methyl-cumarin [302,36 g / mol]	1,0 eq	3,32 mmol	1,00 g
Benzophenon [182,22 g / mol]	0,2 eq	0,70 mmol	0,13 g
Chloroform			25 mL

25 mL Chloroform werden 30 Minuten entgast, in einen Schlenkkolben überführt und mit Val-4M-Cum (1,00 g, 3,32 mmol) und Benzophenon (0,13 g, 0,70 mmol) versetzt. Die Lösung wird 22 Stunden im UV-Reaktor belichtet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird in 5 mL THF aufgenommen und mittels einer präparativen HPLC (Acetonitril / Wasser 85 : 15 → 100 : 0) gereinigt. Man erhält 0,94 g (94 %) Val-4M-Cum-D.

Element	% berechnet	% enthalten
C	71,50	70,96
H	7,33	7,21

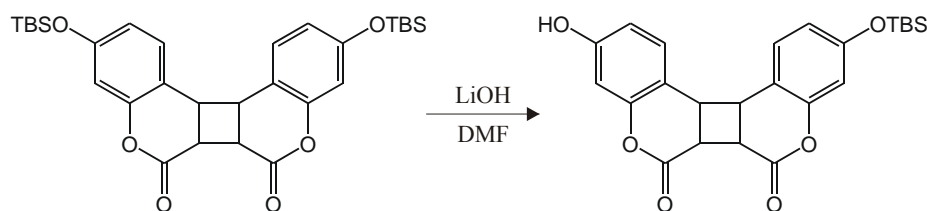
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.13 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 6.98 (dd, 2H, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz), 6.87 (d, 2H, $J = 2.1$ Hz), 3.44 (s, 2H), 2.58-2.67 (m, 2H), 1.69 – 1.81 (m, 2H), 1.51 – 1.63 (m, 2H), 1.37 – 1.49 (m, 4H), 1.30 (s, 6H), 0.97 (t, 12H, $J = 7.2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 174.5, 165.3, 151.3, 151.3, 127.7, 120.2, 118.7, 111.4, 46.9, 45.3, 45.0, 34.6, 26.2, 20.7, 14.0.

ESI-MS m/e 622: $[\text{M}^+ + \text{H}_2\text{O}]$.

8.2.16 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-hydroxy-dicumarin (TBS-Cum-D-OH)

7,7'(<i>tert</i> -Butyldimethylsiloxy)-dicumarin	[552,81 g / mol]	1,0 eq	0,45 mmol	0,25 g
Lithiumhydroxid	[23,95 g / mol]	0,3 eq	0,13 mmol	3,14 mg
Dimethylformamid				5 mL

Zur Synthese von 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-hydroxy-dicumarin werden 0,25 g (0,45 mmol) 7,7'(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-dicumarin in 5 mL LiOH-DMF-Lösung (62,86 mg auf 100 mL DMF) 40 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf eine präparative HPLC (Acetonitril / Wasser 75 : 25 → 100 : 0) gegeben um TBS-Cum-D-OH von TBS-Cum-D zu trennen. TBS-Cum-D kann anschließend aus der reinen ACN-Phase zurückgewonnen werden. Die TBS-Cum-D-OH enthaltenden Fraktionen werden vereint und im Vakuum eingengt. Die übrig gebliebene wässrige Lösung wird dreimal mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen vereint, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und anschließend im HV getrocknet.

Die Ausbeute beträgt 63,5 mg (32 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

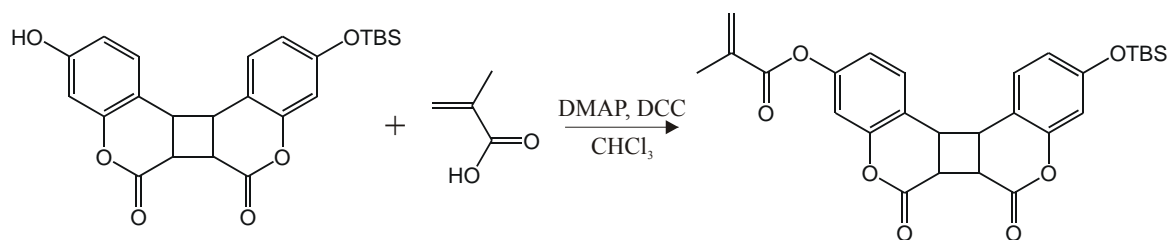
δ [ppm] = 6.96 – 7.00 (m, 2H), 6.66 – 6.70 (m, 2H), 6.58 – 6.64 (m, 2H), 3.72 – 3.90 (m, 4H), 0.877 (s, 9H), 0.11 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 166.4, 166.2, 162.8, 157.5, 156.7, 151.9, 128.6, 128.4, 117.4, 113.1, 113.0, 111.9, 109.1, 104.7, 43.6, 40.0, 36.7, 31.7, 25.6, 18.2, -4.5.

ESI-MS m/e : 456 [$\text{M}^+ + \text{H}_2\text{O}$].

8.2.17 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'--(methacryloyl)-dicumarin (TBS-Cum-D-MA)



7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-hydroxy-dicumarin [438,55 g / mol]

		1,0 eq	1,14 mmol	0,50 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,1 eq	0,11 mmol	13,9 mg
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	2,0 eq	2,28 mmol	0,47 g
Methacrylsäure	[86,09 g / mol]	1,5 eq	1,71 mmol	0,15 g
Chloroform				45 mL

0,15 mg (1,71 mmol) Methacrylsäure, 0,47 g (2,28 mmol) DCC und 13,9 mg (0,11 mmol) DMAP werden in 18 mL Chloroform gelöst und bei RT 30 min gerührt. Anschließend werden 0,50 g (1,14 mmol) 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-hydroxy-dicumarin in 27 mL Chloroform zugegeben und die Lösung bei RT weiter gerührt. Nach 2 h wird die Lösung filtriert, das Filtrat eingengt und auf der präparativen HPLC (Acetonitril / Wasser 75 : 25 → 100 : 0) gereinigt. Das Lösungsmittel der Fraktion wird abdestilliert und die überbleibende wässrige Phase mit Chloroform dreimal extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im HV getrocknet.

Die Ausbeute beträgt 0,12 g (21 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

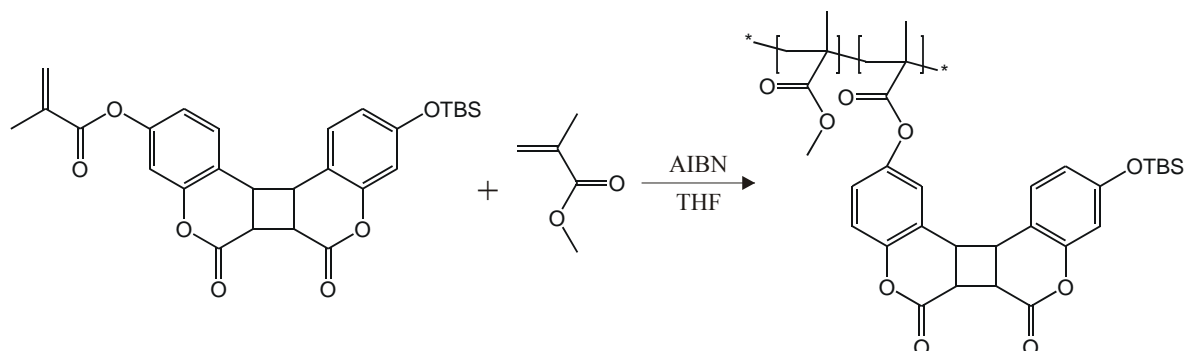
δ [ppm] = 7.14 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.94 – 6.98 (m, 2H), 6.91 (d, 1H, J = 2.1 Hz), 6.65 (dd, 1H, J = 8.1 Hz, J = 2.4 Hz), 6.60 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 6.35 – 6.38 (m, 1H), 5.80–5.81 (m, 1H), 3.80 – 3.92 (m, 4H), 2.07 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.23 (s, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 166.3, 165.9, 165.7, 157.1, 152.1, 152.0, 151.7, 135.7, 128.6, 128.6, 128.2, 119.1, 118.2, 117.7, 113.1, 111.8, 109.4, 43.9, 43.8, 43.8, 40.2, 25.9, 18.6, -4.2.

ESI-MS m/e: 507 [M⁺ + H].

8.2.18 Poly(MMA-co-MA-TBS-Cum-D) (TBS-Copo)



7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-(methacryloyl)-dicumarin [506,62 g/mol]

1 eq 0,24 mmol 0,12 g

Methylmethacrylsäure [438,55 g/mol]

236 eq 56,65 mmol 5,66 g

Azoisobuttersäurenitril [164,21 g/mol]

0,06 mmol 10 mg

Tetrahydrofuran

20 mL

Zur Copolymerisation werden 0,12 g (0,24 mmol) TBS-Cum-D-MA, 5,66 g (56,64 mmol) MMA und 10 mg (0,06 mmol) AIBN in 20 mL trockenem THF gelöst und die Lösung 4 mal entgast. Bei 60 °C copolymerisieren die Monomere über einen Zeitraum von 3 d. Das fertige Copolymer wird in 1 L MeOH ausgefällt, getrocknet und nochmals ausgefällt. Nach 3 d Trocknen bei RT im HV erhält man 4,73 g (82 %) Copolymer.

Eine genaue Auswertung des Spektrums ist aufgrund der geringen Menge an TBS-Cum-D-MA im Vergleich zu MMA nicht möglich. Die aber deutlich zu erkennenden Signale im Aromatenbereich, die nicht vom PMMA stammen können, zeigen, dass 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-(methacrylester)dicumarin in das Polymer eingebaut ist.

Um ein ungefähres Verhältnis von MMA : 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-(methacrylester)dicumarin zu ermitteln, wird ein Signal im Aromatenbereich auf eins genormt und das Signal für die COOCH₃-Gruppe integriert. Aus den Werten berechnet sich ein Verhältnis von 1 : 848 von 7-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-7'-(methacrylester)dicumarin : MMA. Für die folgenden Reaktionen an diesem Copolymer wird daher bei der NMR-Auswertung nur Wert auf die Signale im Aromatenbereich gelegt. NMR-Signale des Polymergrundgerüsts werden der Vollständigkeit halber erwähnt, wobei auch zusätzlich auftretende eindeutige Signale erwähnt werden.

GPC (THF): $M_w = 1,68 \cdot 10^5$, $M_n = 0,86 \cdot 10^5$, $M_w / M_n = 1,96$

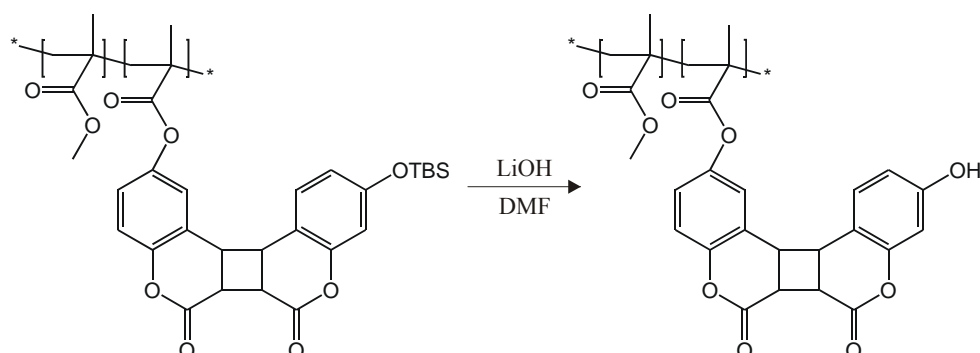
DSC: $T_g = 128,21 \text{ }^\circ\text{C}$

TGA: $T_{5\%} = 249 \text{ }^\circ\text{C}$

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

δ [ppm] = 7.09 – 7.13 (m, 1H), 6.94 – 6.96 (m, 2H), 6.87 – 6.90 (m, 1H), 6.62 – 6.64 (m, 1H), 6.56 – 6.57 (m, 1H), 3.78 – 3.89 (m, 4H), 3.57 (s, 2544H), 1.78 – 1.93 (m, 1577H), 0.98 (s, 864H), 0.80 – 0.82 (m, 1645H), 0.20 (s, 6H).

8.2.19 Poly(MMA-co-MA-OH-Cum-D) (OH-Copo)



Poly(MMA-co-MA-TBS-Cum-D)		3,82 g
Lithiumhydroxid [23,95 g / mol]	0,44 mmol	10,56 mg
Dimethylformamid		31 mL

Zur Entschützung der Hydroxyl-Gruppe im Polymer werden 3,82 g Copolymer in 15 mL DMF gelöst und anschließend 16 mL (33 mg LiOH in 50 mL DMF) zugeben. Es wird angenommen, dass ein vollständiger Einbau des Dicumarinmonomers stattgefunden hat. Nach 4 h Rühren bei RT wird das entschützte Copolymer in 1,5 L MeOH ausgefällt und 1 d im HV getrocknet. Wiederholtes Ausfällen in MeOH und anschließendes Trocknen ergibt 2,84 g (74 %) Copolymer.

GPC (THF): $M_w = 1,34 \cdot 10^5$, $M_n = 0,70 \cdot 10^5$, $M_w / M_n = 1,91$

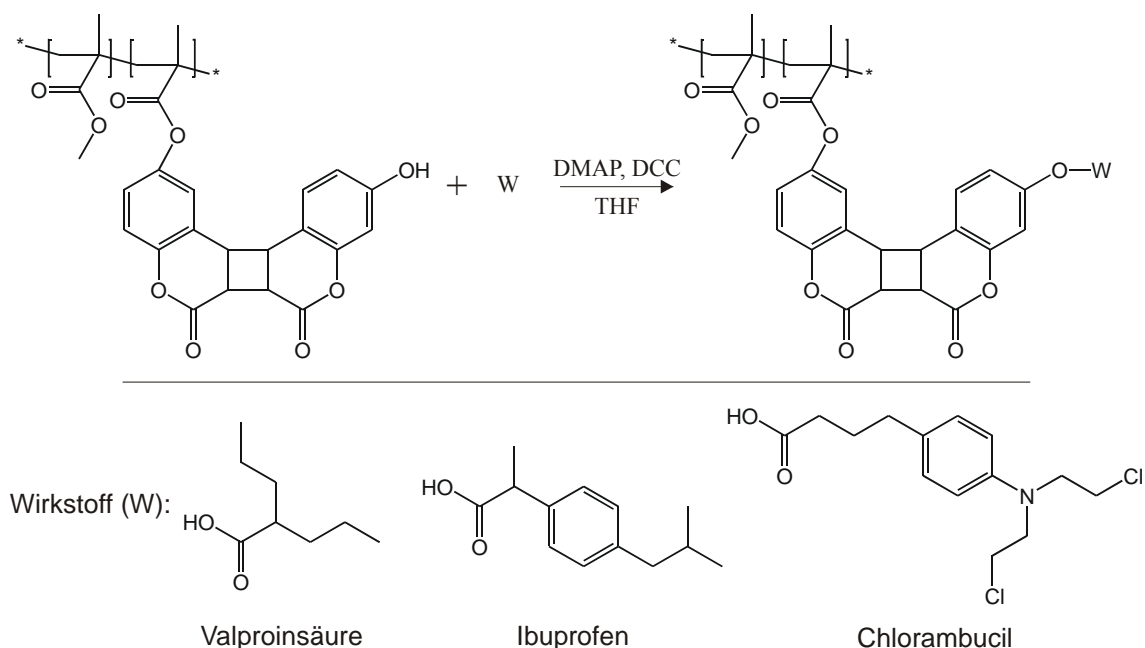
DSC: $T_g = 127,62 \text{ }^\circ\text{C}$

TGA: $T_{5\%} = 292 \text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.32 – 7.42 (m, 1H), 6.96 – 7.07 (m, 2H), 6.62 – 6.73 (m, 3H), 3.59 (s, 2521H), 1.80 – 1.95 (m, 1552H), 1.01 (s, 847H), 0.82 – 0.84 (m, 1608H).

8.2.20 Wirkstoffbeladung von OH-Copo mit Valproinsäure (Val-Copo), Ibuprofen (Ibu-Copo) und Chlorambucil (Cl-Amb-Copo)



Die folgenden Beladungen mit Wirkstoff werden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das Copolymer wird mit dem Wirkstoff, DCC, DMAP in THF gelöst und für 4 d bei RT gerührt. Anschließend wird das Copolymer in 1 L MeOH ausgefällt, getrocknet und nochmals in MeOH ausgefällt. Nach Trocknen des Polymers über einen Zeitraum von 2 d im HV erhält man die unten aufgeführten Ausbeuten an Ibu-Copo und Cl-Amb-Copo.

8.2.20.1 Val-Copo

Poly(MMA-co-MA-OH-Cum-D)		0,44 g
Dimethylaminopyridin [122,17 g / mol]	0,041 mmol	5,0 mg
Dicyclohexylcarbodiimid [206,34 g / mol]	1,000 mmol	0,21 g
Valproinsäure [144,21 g / mol]	0,950 mmol	0,14 g
Tetrahydrofuran		10 mL

Die Ausbeute beträgt 0,39 mg (89 %).

GPC (THF): $M_w = 1,92 \cdot 10^5$, $M_n = 0,93 \cdot 10^5$, $M_w / M_n = 2,06$

DSC: $T_g = 129,31 \text{ }^\circ\text{C}$

TGA: $T_{5\%} = 287 \text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.11 – 7.13 (m, 1H), 6.90 – 6.91 (m, 2H), 6.78 – 6.82 (m, 3H), 3.87 – 3.94 (m, 4H), 3.59 (s, 2481H), 1.81 – 1.96 (m, 1507H), 1.02 (s, 839H), 0.83 – 0.85 (m, 1607H).

8.2.20.2 Ibu-Copo

Poly(MMA-co-MA-OH-Cum-D)			0,25 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,024 mmol	2,89 mg
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	0,500 mmol	0,10 g
Ibuprofen	[206,28 g / mol]	0,470 mmol	97,71 mg
Tetrahydrofuran			5 mL

Die Ausbeute beträgt 0,23 g (91 %).

GPC (THF): $M_w = 1,82 \cdot 10^5$, $M_n = 0,91 \cdot 10^5$, $M_w / M_n = 2,00$

DSC: $T_g = 129,12$ °C

TGA: $T_{5\%} = 288$ °C

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.25 - 7.29 (m, 2H), 7.12 – 7.18 (m, 2H), 7.11 – 7.13 (m, 1H), 6.90 – 6.91 (m, 2H), 6.78 – 6.82 (m, 3H), 3.85 – 3.95 (m, 4H), 3.60 (s, 2504H), 2.47 – 2.48 (m, 2H), 1.81 – 1.96 (m, 1527H), 1.02 (s, 829H), 0.84 – 0.85 (m, 1589H).

8.2.20.3 Cl-Amb-Copo

Poly(MMA-co-MA-OH-Cum-D)			0,25 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,024 mmol	2,89 mg
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	0,500 mmol	0,10 g
Chlorambucil	[304,21 g / mol]	0,470 mmol	0,14 g
Tetrahydrofuran			5 mL

Die Ausbeute beträgt 0,22 g (86 %).

GPC (THF): $M_w = 1,94 \cdot 10^5$, $M_n = 0,92 \cdot 10^5$, $M_w / M_n = 2,12$

DSC: $T_g = 127,09$ °C

TGA: $T_{5\%} = 304$ °C

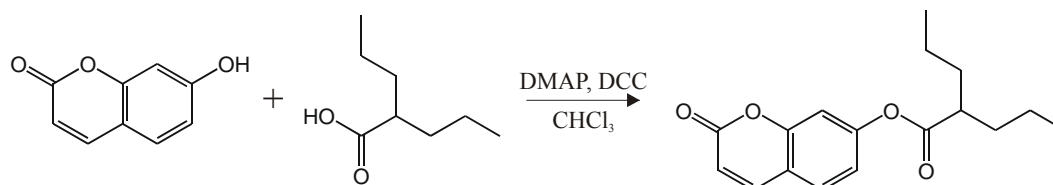
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.12 – 7.14 (m, 3H), 6.89 – 6.91 (m, 2H), 6.76 – 6.84 (m, 5H), 3.88 – 3.94 (m, 4H), 3.60 (s, 2496H), 2.64 – 2.69 (m, 2H), 2.54 – 2.61 (m, 2H), 1.81 – 1.96 (m, 1514H), 1.02 (s, 827H), 0.83 – 0.85 (m, 1613H).

8.2.21 Referenzsubstanzen

Um die photochemisch freigesetzten Wirkstoffe auf der HPLC eindeutig identifizieren zu können, werden Referenzsubstanzen hergestellt. Die Umsetzung für Valproinsäure und Ibuprofen wird wie folgt durchgeführt. Wirkstoff, DMAP, DCC und 7-Hydroxycumarin werden in 8 mL Chloroform gelöst und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird anschließend filtriert und zweimal mit 0,5 M HCl gewaschen. Es wird erneut mit ges. Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird eingeeengt und das Rohprodukt im HV getrocknet. Die beiden Rohprodukte werden über jeweils 200 g Kieselgel mit n-Pentan / Ethylacetat 80 : 20 als Laufmittelgemisch aufgereinigt.

8.2.21.1 7-(Valproyloxy)-cumarin (Val-Cum)



7-Hydroxycumarin	[162,14 g / mol]	1,0 eq	1,15 mmol	0,19 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,1 eq	0,13 mmol	16,3 mg
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	2,4 eq	2,78 mmol	0,57 g
Valproinsäure	[144,21 g / mol]	2,2 eq	2,55 mmol	0,37 g
Chloroform				8 mL

Die Ausbeute beträgt 0,26 g (79 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

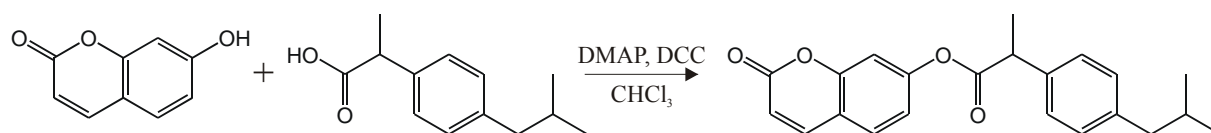
δ [ppm] = 7.68 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 7.47 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.08 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.02 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz), 6.39 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 2.59 - 2.68 (m, 1H), 1.56-1.65 (m, 4H), 1.37 - 1.47 (m, 4H), 0.97 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 174.3, 153.5, 151.1, 142.8, 128.5, 125.8, 118.5, 116.6, 116.0, 110.4, 45.4, 34.5, 20.7, 14.0.

GCMS: bei 26,81 min 288 M^+

8.2.21.2 7-[α -Methyl-4-(isobutyl)phenylacetoxy]-cumarin (Ibu-Cum)



7-Hydroxycumarin	[162,14 g / mol]	1,0 eq	1,15 mmol	0,19 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,1 eq	0,13 mmol	16,3 mg
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	2,4 eq	2,78 mmol	0,57 g
Ibuprofen	[206,28 g / mol]	2,2 eq	2,55 mmol	0,53 mg
Chloroform				8 mL

Die Ausbeute beträgt 0,31 g (73 %).

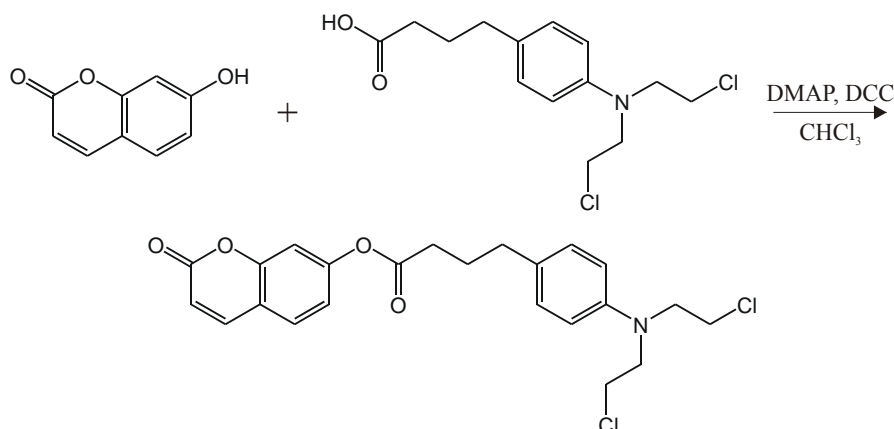
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.66 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 7.44 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.29 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.16 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.02 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.94 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz), 6.38 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.96 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 2.48 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.87 (hept, 1H, $J = 6.6$ Hz), 1.62 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 0.91 (d, 6H, $J = 6.6$ Hz).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172.6, 160.3, 154.7, 153.5, 142.8, 141.1, 136.7, 129.6 (zwei C-atome), 128.4, 127.2 (zwei C-atome), 118.3, 116.6, 116.0, 110.3, 45.3, 45.0, 30.2, 22.4, 18.4.

GCMS: bei 32,86 min 350 M^+

8.2.21.3 7-[4-[*p*-[bis(2-Chlorethyl)amino]phenyl]butanoyloxy]-cumarin (Cl-Amb-Cum)

7-Hydroxycumarin	[162,14 g / mol]	1,0 eq	1,01 mmol	0,16 g
Dimethylaminopyridin	[122,17 g / mol]	0,1 eq	75,6 μ mol	9,2 mg
Dicyclohexylcarbodiimid	[206,34 g / mol]	1,6 eq	1,66 mmol	0,34 g
Chlorambucil	[304,21 g / mol]	1,5 eq	1,51 mmol	0,46 g
Tetrahydrofuran				40 mL

Chlorambucil (0,46 g, 1,51 mmol), DMAP (9,2 mg, 75,6 μ mol), 7-Hydroxycumarin (0,16 g, 1,01 mmol) und DCC (0,34 g, 1,66 mmol) werden in 40 mL trockenen THF gelöst und 24 h bei RT gerührt. Das THF wird anschließend am Rotationsverdampfer abdestilliert und die Lösung mit Chloroform aufgenommen und filtriert. Die organische Phase wird je einmal mit 1 M HAc und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wurde über 200 g Kieselgel mit n-Pentan / Ethylacetat 80 : 20 als Laufmittelgemisch aufgereinigt. Die Ausbeute beträgt 0,26 g (56 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 7.69 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 7.47 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.12 - 6.99 (m, 4 H), 6.63 (t, 2H, $J = 9.0$ Hz), 6.39 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.77 - 3.66 (m, 8H), 2.41 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.06 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.73 - 1.67 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171.3, 160.3, 156.9, 154.7, 154.1, 153.2, 144.4, 142.8, 130.7, 129.8, 129.7, 128.5, 118.3, 116.0, 112.3, 110.4, 40.5 (zwei C-atome), 33.9 (zwei C-atome), 32.7, 30.9, 24.9.

ESI-MS m/e 512 [$\text{M}^+ + \text{H}_2\text{O}$, 2 Na].

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign Der Weg zum Arzneimittel*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, First Edition, **1996**.
- [2] P. Ortner, <<PEG meets Liposome>> - zwei Technologien führen zu einer Substanz mit neuem Profil, *Onkologie* **2001**, 24 (2), Beilage.
- [3] URL: http://www.hno-klinik.klinikum.uni-erlangen.de/e1846/e61/index_ger.html
- [4] R. Dahm, Zwischen glasklar und grauem Star, *Biologie in unserer Zeit* **2003**, 33 (6), 366.
- [5] URL: <http://www.m-ww.de/krankheiten/augenkrankheiten/erblindung.html>
- [6] URL: <http://m-ww.de/krankheiten/augenkrankheiten/katarakt.html>
- [7] K. Pesudovs, D. B. Elliott, The evolution of cataract surgery, *Optometry today Optics today* **2001**, 30.
- [8] M. Sachsenweger, *Augenheilkunde*, Georg Thieme Verlag, Weinheim, 2. überarb. Aufl., **2003**.
- [9] URL: <http://www.augen-und-mehr.de>.
- [10] D. J. Apple, J. Ram, A. Foster, Q. Peng, Elimination of cataract blindness: A global perspective entering the new millennium, *Survey of Ophthalmology* **2000**, 45 (Suppl. 1), 1.
- [11] R. Dahm, Klare Sicht durch Augenlinsen, *Spektrum der Wissenschaft* **2005**, Februar, 24.
- [12] N. H. L. Ridley, Intraocular acrylic lenses, *Transactions of the American Ophthalmological Society* **1951**, 71, 617.
- [13] URL: <http://www.augeninfo.de/patinfo/catop.pdf>.
- [14] URL: <http://www.m-ww.de>.
- [15] L. Jiahn-Shing, L. Chia-Yun, Rippel-like intraocular lens damage from a Neodymium:YAG laser, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **2003**, 29, 621.
- [16] A. Trinavarat, L. Atchaneeyasakul, Neodymium:YAG laser damage threshold of foldable intraocular lenses, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **2001**, 27 (5), 775.
- [17] S. P. Pradella, R. Träumer, Frequenz der Nd:Yag-Kapsulotomie nach Implantation von Intraokularlinsen aus PMMA und Silikon, *Ophthalmologie* **1998**, 95, 482.

- [18] S. Shizuya, M. Takeshi, Histology of anterior capsule opacification with a polyHEMA/HOHEXMA hydrophilic hydrogel intraocular lens compared to poly(methyl methacrylate), silicone, and acrylic lenses, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **2003**, 29 (6), 1198.
- [19] C. S. Pearlstein, S. S. Lane, R. L. Lindstrom, The incidence of secondary posterior capsulotomy in convex-posterior vs. convex-anterior posterior chamber intraocular lenses, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **1998**, 14 (5), 578.
- [20] R. G. Martin, D. R. Sanders, J. Soucek, M. G. Raanan, M. DeLuca, Effect of posterior chamber intraocular lens design and surgical placement on postoperative outcome, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **1992**, 18 (4), 333.
- [21] T. Nagata, I. Watanabe, Optic sharp edge or convexity: comparison of effects on posterior capsular opacification, *Japanese Journal of Ophthalmology* **1996**, 40 (3), 397.
- [22] C. Latz, V. Migonney, G. Pavon-Djavid, Inhibition of lens epithelial cell proliferation by substituted PMMA intraocular lens, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **2000**, 238 (8), 696.
- [23] C. N. Cunanan, N. M. Tarbaux, P. M. Knight, Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **1991**, 17 (6), 767.
- [24] D. R. Absolom, C. Thomson, L. A. Hawthorn, W. Zingg, A. W. Neumann, Kinetics of cell adhesion to polymer surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, 22 (3), 215.
- [25] L. Werner, J. M. Legeais, M. D. Nagel, G. Renard, Evaluation of teflon-coated intraocular lenses in an organ culture method, *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, 46 (3), 347.
- [26] S. Umezawa, K. Shimizu, Biocompatibility of surface-modified intraocular lenses, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **1993**, 19, 371.
- [27] L. Hesse, L. Freisberg, H. Bienert, H. Richter, C. Kreiner and C. Mittermayer, Reduction of cataract by plasma etching of intraocular lenses. An animal experiment study, *Ophthalmologie* **1997**, 94, 821.
- [28] P. Yammine, G. Pavon-Djavid, G. Helary, V. Migonney, Surface modification of silicone intraocular implants to inhibit cell proliferation, *Biomacromolecules* **2005**, 6 (5), 2630.

- [29] G. Ciamician, P. Silber, Chemical light action. V, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1902**, 35, 4128.
- [30] C. H. Krauch, S. Farid, G. O. Schenk, Photosensitized cyclodimerization of coumarin, *Chemische Berichte* **1962**, 95, 1409.
- [31] T. Wolff, H. Görner, Photodimerization of coumarin revisited: Effect of solvent polarity on the triplet reactivity and product pattern, *Physical Chemistry, Chemical Physics* **2004**, 6 (2), 368.
- [32] X. Yu, D. Scheller, O. Radenmacher, T. Wolff, Selectivity in the photodimerization of 6-Alkylcoumarins, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 68, 7386.
- [33] H-C. Kim, S. Kreiling, A. Greiner, N. Hampp, Two-photon-induced cycloreversion reaction of coumarin photodimers, *Chemical Physics Letters* **2003**, 372, 899.
- [34] S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long, Coumarins in polymers: From light harvesting to Photo-Cross-linkable tissue scaffolds, *Chemical Reviews* **2004**, 104, 3059.
- [35] J. K. Oh, V. Stöeva, J. Rademacher, R. Farwaha, M. A. Winnik, Synthesis, characterization, and emulsions polymerization of polymerizable coumarin derivatives, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer chemistry* **2004**, 42, 3479.
- [36] D. Zhao, J. Sun, K. Ding, New types of soluble polymer-supported bisphosphine ligands with a cyclobutane backbone for Pd-catalyzed enantioselective allylic Coumarin-dimer derivat substitution reactions, *Chemistry A European Journal* **2004**, 10 (23), 5952.
- [37] S. R. Trenor, T. E. Long, B. J. Love, Photoreversible chain extension of poly(ethylene glycol), *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, 205 (6), 715.
- [38] N. K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, Photo-switched storage and release of guest molecules in the pore void of coumarin-modified MCM-41, *Chemistry of Materials* **2003**, 15, 3385.
- [39] M. Goeppert-Mayer, Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen, *Annalen der Physik* **1931**, 9, 273.
- [40] H.-H. Perkampus, *Encyclopedia of Spectroscopy*, VCH Verlag, Weinheim, **1995**.
- [41] J. D. Bhawalkar, G. S. He, P. N. Prasad, Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials, *Reports on Progress in Physics* **1996**, 59, 1041.
- [42] S. Kawata, H.-B. Tanaka, T. Takada, K. Finer, Features for functional microdevices, *Nature* **2001**, 412, 697.

- [43] K. D. Belfield, K. J. Schafer, A new photosensitive polymeric material for WORM optical data storage using multichannel two-photon fluorescence readout, *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 3656.
- [44] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science* **1990**, *248*, 73.
- [45] D. Karlsson, H. Nilsson, A study of two-photon excitation in turbid media-possibilities in photodynamic therapy, *Lund Reports on Atomic Physics* **2001**, *277*, 1.
- [46] J. Heller, Ocular delivery using poly(ortho esters), *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 2053.
- [47] T. Yasukawa, Y. Ogura, E. Sakurai, Y. Tabata, H. Kimura, Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 2033. 292
- [48] S. Kreiling, Darstellung und Untersuchung von polymeren Implantatmaterialien für die Laser-induzierte kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen, *Dissertation*, Marburg, **2004**.
- [49] W. Wang, H. Bundgaard, Corneal penetration of 5-fluorouracil and its improvement by prodrug derivartization in the albino rabbit: implication in glaucoma filtration surgery, *Current Eye Research* **1991**, *10* (1), 87.
- [50] A. Buur, H. Bundgaard, E. Falch, Prodrugs of 5-fluorouracil. IV. Hydrolysis kinetics, bioactivation and physicochemical properties of various N-acyloxymethyl derivates of 5-fluorouracil, *International Journal of Pharmaceutics* **1985**, *24*, 43.
- [51] J. M. Quigley, D. G. Lloyd, A topological study of prodrugs of 5-fluorouracil, *Journal of Pharmaceutics* **2002**, *231* (2), 241.
- [52] Q. Feng, N. Norased, Membarne-encased polymer millirods for sustained release of 5-fluorouracil, *Journal of Biomedical Material Research* **2002**, *61* (2), 203.
- [53] M. Glavas-Dodov, E. Fredro-Kumbaradzi, 5-fluorouracil in topical liposome gels for anticancer treatment - Fromulation and evaluation, *Acta Pharmacologica* **2003**, *53*, 241.
- [54] Y. Chen, J.-D. Wu, Preparation and photoreaction of copolymers derived from *N*-(1-phenylethyl)acrylamide and 7-Acryloyloxy-4-methyl coumarin, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1994**, *32*, 1867.
- [55] X. Su, S. Li and J. Zheng, Inhibition of rabbit lens epithelial cell proliferation, *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* **1996**, *32*, 339.

- [56] J. Träger, Photoinduzierte Brechungsindexänderung in polymeren Materialien für Intraokularlinsen, *Diplomarbeit*, Marburg, **2005**.
- [57] Y. Chen, K.-H. Chen, Synthesis and reversible photocleavage of novel polyurethanes containing dimer components, *Journal of polymer science Part A: Polymer Chemistry* **1997**, *35*, 613.
- [58] T. W. Greene, P.G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, Third Edition, **1999**.
- [59] Y. Chen, C.-S. Jean, Polyethers containing couamrin dimer components in the main chain. II. Reversible photocleavage and photopolymerization, *Journal of Applied Polymer Science* **1997**, *64* (9), 1759.
- [60] Y. Chen, C.-S. Jean, Polyethers containing couamrin dimer components in the main chain. I. Synthesis by photopolymerization of 7,7'-(polymethylenedioxy)dicoumarins, *Journal of Applied Polymer Science* **1997**, *64* (9), 1749.
- [61] X. D. Li, M. A. O'Leary, D. A. Boas, Britton Chance, A. G. Yodh, Fluorescent diffuse photon density waves in homogeneous and heterogeneous turbid media: analytic solutions and applications, *Applied Optics* **1996**, *35* (19), 3746.
- [62] L. Ventura, S. J. F. Sousa, A. M. V. Messias, J. M. Bispo, System for measuring the transmission spectrum of in vitro corneas, *Physiological Measurement* **2000**, *21*, 197.
- [63] J. A. Martinez-Lozano, F. Tena, M. P. Utrillas, Ratio of UV global broad band irradiation in Valencia, Spain, *International Journal of Climatology* **1999**, *19*, 903
- [64] M. Steinmetz, Solare terrestrische UV-Strahlung in Deutschland, Jahresbericht über das solare UV-Messnetz von BfS/UBA **2000**.
- [65] AcrySof[®] Material U.S. Patent No. 5,290,892.
- [66] S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp, Dimeric drug depot forms for photo-induced drug release, *Proc. SPIE* **2004**, *5323*, 382.
- [67] URL:<http://www.krebs-kompass.de/Krebsnews/article/Krebsforschung/1008886380.html~content>
- [68] URL: <http://www.netdokter.de/medikamente/100010961.htm>
- [69] URL: <http://www.netdokter.de/medikamente/100007494.htm>
- [70] URL: <http://www.gifte.de/B-%20und%20C-Waffen/leukeran.htm>
- [71] URL: <http://www.gifte.de/B-%20und%20C-Waffen/leukeran.htm>
- [72] URL: <http://www.rheuma-kinderklinik.de/index.php?id=161>
- [73] URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorambucil>

- [74] A. BrodWolf, Untersuchung von Wirkstoffen und Linkersystemen für die photochemisch induzierte Wirkstofffreisetzung, *Diplomarbeit*, Marburg, 2005.
- [75] S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp, Phototriggered release of photolabile drugs via two-photon absorption-induced cleavage of polymer-bound dicoumarin, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2006**, *submitted*.
- [76] I. Kostova, Synthetic and natural coumarins as Cytotoxic agents, *Current Medicinal Chemistry – Anti Cancer Agents* **2005**, *5*, 29.
- [77] N. A. Al-Masoudi, I. A. Al-Masoudi, I. A. I. Ali, Y. A. Al-Soud, B. Saeed, P. La Colla, Amino acid derivatives. Part I. Synthesis, antiviral and antitumor evaluation of new α -amino acid esters bearing coumarin side chain, *Acta Pharmacologica* **2006**, *56*, 175.
- [78] M. Kawase, H. Sakagami, N. Motohashi, H. Hauer, S. S. Chatterjee, G. Spengler, A. V. Vigykanne, A. Molnar, J. Molnar, Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity, *In vivo* **2005**, *19*, 705.
- [79] H. Nakazawa, S. Yoshihara, D. Kudo, H. Morohashi, I. Kakizaki, A. Kon, K. Takagaki, M. Sasaki, 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2006**, *57*, 165.
- [80] F. E. Khadali, G. H elary, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, Modulating fibroblast cell proliferation with functionalized poly(methyl methacrylate) base copolymers: chemical composition and monomer distribution effect, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 51.
- [81] H.-C. Kim, S. H artner, M. Behe, T. M. Behr, N. Hampp, Two-photon absorption-controlled multidose drug release: a novel approach for secondary cataract treatment, *Journal of Biomedical Optics* **2006**, *11*, 034024-1.
- [82] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal Biological Chemistry* **1951**, *193*, 264.
- [83] J. Epstein, R. W. Rosenthal, R. J. Ess, Use of γ -(4-Nitrobenzyl)pyridine as analytical reagent for ethylenimines and alkylating agents, *Analytical Chemistry* **1955**, *27 (9)*, 1435.
- [84] O. M. Friedmann, E. Boger, Calorimetric estimation of nitrogen mustard in aqueous media: Hydrolytic behaviour of bis(beta-chloroethyl)amine, nor HN2, *Analytical Chemistry* **1961**, *33 (7)*, 906.

-
- [85] U. Beyer, T. Roth, P. Schumacher, G. Maier, A. Unold, A. W. Frahm, H. H. Fiebig, C. Unger, F. Kratz, Synthesis and in vitro efficacy of transferring conjugates of the anticancer drug chlorambucil, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 2701.
- [86] S. Genka, J. Deutsch, U. H. Shetty, P. L. Stahle, V. John, I. M. Lieberburg, F. Ali-Osman, S. I. Rapoport, N. H. Greig, Development of lipophilic anticancer agents for the treatment of brain tumors by the esterification of water-soluble chlorambucil, *Clinical and Experimental Metastasis* **1993**, *11*, 131.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich im Laufe dieser Arbeit in der Erreichung des Forschungsziels unterstützt haben. Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. N. Hampp für das interessante Thema und die Ermöglichung der Besuche von Konferenzen und Messen, welche den Horizont erweiterten.
- Herrn Prof. Dr. A. Greiner für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Meiner Katja, die mich durch Höhen und Tiefen begleitet hat, tut und werden wird.
- Meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und mit denen ich außeruniversitär sehr viel Spaß und Freude habe.
- Meiner Schwester, du bist die Beste.
- Den Nolls: Sandra, die gute Seele im AK Hampp ohne die nichts läuft und Frank, dem Literaturmeister und Helfer in fachlichen Fragen. Vielen Dank euch Beiden auch für die schönen Stunden in der Mittagspause.
- Der Actiol Abteilung für die schöne Zeit. Danke Hee-Cheol für die Hilfe bei technischen und Jens für labortechnischen Fragen. Behaltet diese schönen Diskussionen im Büro bei, Sie waren extrem produktiv. An Matthias und Niko: macht so weiter und habt Spaß und ihr werdet euch entwickeln.
- Martin Behe und seinen Mitarbeitern für die erfolgreichen Durchführungen der Zelltests.
- Frau J. Hennen, für das Bearbeiten der bürokratischen Angelegenheiten, Sie haben einem wirklich viel abgenommen.
- allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Arbeitsatmosphäre.
- den zahlreichen Studenten, die im Rahmen von Vertiefungsprojekten oder „HiWi“-Arbeiten einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

- den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt für ihre Hilfe bei technischen Angelegenheiten und den produktiven Arbeiten zu den Messen.
- Den guten Freunden mit denen man das Leben außerhalb der UNI lebhaft gestaltet hat.
- B.O. für die Unterstützung in den schwierigen Zeiten.